



Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Justyna Uszak

**Trwałość [(N-pirolidyno)metyleno]daunorubicyny  
w roztworach wodnych**

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: Dr hab. Anna Jelińska prof. UM

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011  
jako projekt badawczy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N405 179535  
oraz jako projekt promotorski nr 501-02-03305411-04981-50514  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2010

Słowa kluczowe: [(*N*-pirolidyno)metyleno]daunorubicyna,  
HPLC,  
trwałość w roztworach wodnych,  
trwałość w fazie stałej,  
parametry kinetyczne i termodynamiczne

*Składam serdeczne podziękowania*

*Pani Prof. UM dr hab. Annie Jelińskiej  
za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej,  
kierownictwo naukowe,  
za cierpliwość i poświęcony czas  
przekazaną wiedzę  
oraz ogromną życzliwość*

*Pani Prof. dr hab. Mariannie Zajac  
za ogromną życzliwość, cenne uwagi  
i wskazówki podczas realizacji pracy*

*Wszystkim pracownikom Zakładu Chemii Farmaceutycznej  
za miłą i serdeczną atmosferę, która towarzyszyła mi  
podczas prowadzonych badań*

*Pani Prof. dr hab. Jadwidze Mielcarek  
za okazaną życzliwość i pomoc podczas realizacji pracy*

*Pani Doc. dr hab. Irenie Oszczapowicz  
z Zakładu Antybiotyków Modyfikowanych  
Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie  
za udostępnienie substancji do badań*



*Składam serdeczne podziękowania*

*Zarządowi Firmy Biofarm Sp. z o. o.  
za umożliwienie prowadzenia badań i rozwijanie zainteresowań naukowych*

*Panu Dyrektorowi ds. Jakości i Rozwoju dr Andrzejowi Ostrowiczowi  
za okazaną życzliwość i cenne wskazówki*



## Spis treści

---

1. Wstęp .....	9
2. Część teoretyczna .....	13
2.1. Daunorubicyna i jej modyfikacje .....	13
2.2. Mechanizmy działania daunorubicyny .....	21
2.3. Zastosowanie daunorubicyny i działania niepożądane .....	25
2.4. Metody oceny jakości chlorowodoru daunorubicyny według Ph. Eur. 6.0, FP VIII i USP 30 .....	29
2.5. Badania stabilności .....	34
2.6. Wybrane metody stosowane w analizie daunorubicyny .....	45
3. Cel pracy .....	49
4. Część doświadczalna .....	51
4.1. Substancja do badań .....	51
4.2. Odczynniki .....	51
4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy .....	53
4.4. Metoda analityczna stosowana w ocenie trwałości <i>N</i> -[(pirolidyno)metyleno]- daunorubicyny (PMD) w roztworach wodnych .....	54
4.4.1. Selektywność metody .....	55
4.4.1. Liniowość metody .....	56
4.4.3. Precyzja metody .....	57
4.4.4. Granica detekcji i oznaczalności .....	58
4.4.5. Zakres i czułość metody .....	58
4.5. Ocena trwałości PMD w roztworach wodnych .....	59
4.5.1. Warunki badań kinetycznych .....	59
4.5.2. Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu PMD .....	60
4.6. Ocena trwałości PMD w roztworach do podania parenteralnego .....	91
4.7. Ocena fototrwałości PMD w roztworach wodnych .....	96
4.7.1. Metoda analityczna .....	96
4.7.2. Ocena fototrwałości PMD .....	99
4.8. Ocena trwałości PMD w fazie stałej .....	110
4.8.1. Metoda analityczna .....	110
4.8.2. Ocena trwałości PMD testem przyspieszonego starzenia .....	113
4.8.3. Parametry kinetyczne reakcji .....	114
5. Omówienie wyników .....	123
6. Wnioski .....	139
7. Streszczenie .....	141
8. Piśmiennictwo .....	149





## 1. WSTĘP

---

Choroby nowotworowe stanowią jedno z największych wyzwań dla współczesnej medycyny. Pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie diagnostyki, syntezy nowych leków oraz leczenia, wciąż ponad milion osób w Europie rocznie umiera z powodu raka. W przypadku większości nowotworów nie jest bowiem możliwe określenie jednego czynnika odpowiedzialnego za ich powstawanie. Najczęściej wywołuje je zespół kancerogenów związanych z nałogami, dietą, standardem życia, wykonywanym zawodem, zachowaniami seksualnymi czy nawet sposobem spędzania wolnego czasu. Dlatego też najlepszym sposobem walki z nowotworami jest prewencja poprzez propagowanie zdrowego stylu życia dotyczącego wielu dziedzin ludzkiej aktywności.

W zależności od rodzaju raka, jego umiejscowienia, wczesnego wykrycia oraz innych czynników, w leczeniu nowotworów stosuje się metody chirurgiczne, radiologiczne oraz chemioterapię, hormonoterapię, immunoterapię i terapię genową.

Podstawową metodą leczenia nowotworów rozsiaanych oraz metodą wspomagającą leczenie nowotworów ograniczonych ze współistnieniem przerzutów jest obecnie chemioterapia. Zasadniczą różnicą biologiczną pomiędzy tkanką nowotworową a prawidłową i równocześnie najważniejszą właściwością nowotworów jest ich inwazyjny, charakteryzujący się dużą intensywnością procesów podziałowych, niekontrolowany wzrost oraz zdolność do tworzenia ognisk przerzutowych. Stosowanie leków przeciwnowotworowych ma na celu wyeliminowanie komórek nowotworowych, przy jednoczesnym jak najmniejszym uszkodzeniu zdrowych komórek gospodarza. Poszukiwanie nowych leków o wyższym indeksie bezpieczeństwa terapeutycznego, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych jest zatem nadrzędnym zadaniem stawianym chemioterapii. Kierunki poszukiwań nowych leków często polegają na chemicznej modyfikacji chemioterapeutyków o udowodnionym działaniu farmakologicznym. Obecnie w terapii nowotworów stosuje się około 100 leków o różnych mechanizmach działania [1].

Można je podzielić na kilka grup:

- leki alkilujące, które przenoszą reszty alkilowe na ugrupowania nukleofilowe, a zatem tworzą wiązania głównie z grupami aminowymi, karboksylowymi czy sulfhydrylowymi cząsteczek DNA, RNA i białek; przedstawicielami tej grupy są: cyklofosfamid, karmustyna, analogi platyny, azyrydyny oraz busulfan
- antymetabolity kwasu foliowego (np. metotreksat, edatreksat), pirymidyn (np. fluorouracyl, kapecytabina) i puryn (np. merkaptopuryna, tioguanina) oraz analogi nukleozydów (np. cytarabina, gemcytabina, fludarabina)
- inhibitory topoizomerazy (topotekan, irrinotekan), enzymu odpowiedzialnego za zachowanie i topologię struktury DNA
- alkaloidy barwnika różowego (winkrystyna, winblastyna, winorelbina), taksoidy (palitaksel, docetaksel) i lignany (tenipozyd, etopozyd) o działaniu antymitotycznym; miejscem ich działania są mikrotubule, odpowiedzialne za tworzenie wrzeciona w profazie
- hormony i antyhormony, których stosowanie ma na celu ograniczenie (ablację) albo znaczne zwiększenie stężenia określonego hormonu (addycję)
- immunoterapeutyki, do których zaliczamy cytokiny (np. interferon alfa), przeciwciała monoklonalne (np. rituksimab, cetuksimab) oraz immunoglobuliny otrzymywane z frakcji globulin surowicy lub z osocza krwi
- środki hamujące angiogenezę (np. protamina, siarczan pentosanu)
- środki znoszące odporność wielolekową
- leki przeciwnowotworowe o innej budowie i działaniu, do których zaliczamy: enzymy (asparaginaza), retinoidy, pochodne mocznika (hydroksykarbamid), mitotan, miltefozynę, pentostatynę czy imatinib
- leki interkalujące DNA (interkalatory), które są jedną z najważniejszych grup cytostatyków; należą do niej: aktynomycyny, pochodne naftalimidu, leki zawierające układ pirydokarbazolowy, interlaktory nawlekające, pochodne akrydyny, antybiotyki z grupy echinomycyny, antracykliny.

Ważną pozycję wśród wymienionych leków zajmują antybiotyki antracyklinowe. Jest to grupa antybiotyków wytwarzanych przez różne szczepy *Streptomyces* lub otrzymywanych w wyniku syntezy chemicznej [2, 3]. Dzielą się one na dwie generacje:

- I generacja: daunorubicyna, doksorubicyna, karminomycyna

- II generacja: alkarubicyna, epirubicyna, idarubicyna, zorubicyna, pirarubicyna, walrubicyna.

Wadą tej grupy cytostatyków jest jednak zależna od skumulowanej dawki znaczna toksyczność, w tym kardiotoxyczność, oraz narastająca stopniowo oporność na te leki.

W czasie przyjmowania chemioterapeutyków przeciwnowotworowych najczęściej występują działania niepożądane, takie jak: zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego, upośledzenie czynności szpiku kostnego oraz układu krążenia, które leczy się objawowo.

Od początku stosowania antybiotyków antracyklinowych w leczeniu chorób nowotworowych zaproponowano wiele molekularnych mechanizmów ich działania – zarówno cytostatycznego, jak i cytotoxycznego.

Mechanizm działania antybiotyków antracyklinowych polega na interkalacji, czyli wstawianiu chemioterapeutyku między dwie pary sąsiadujących ze sobą zasad w DNA [4]. W następstwie interkalacji w helisie DNA może nastąpić jej wydłużenie lub pęknięcie, zmiana właściwości biochemicznych, zahamowanie zdolności do replikacji i transkrypcji. Udowodniono, że antybiotyki antracyklinowe przyczyniają się również do generowania wolnych rodników, peroksydacji lipidów i zmian w strukturze błon komórkowych.

Oznaczanie antybiotyków antracyklinowych, jak również ich metabolitów wykonuje się najczęściej metodą HPLC. Jest to metoda szybka, prosta, pozwalająca na równoczesne oznaczenie większej liczby badanych substancji. Nie wymaga przy tym żadnego wstępnego przygotowania próbki [5–12]. Często stosowana jest także, jako uzupełnienie metody HPLC, metoda spektrofotometryczna, spektrometria mas, elektroforeza oraz metoda TLC [5, 8, 13–23].

Warunkiem skutecznej i bezpiecznej terapii jest odpowiednia jakość substancji leczniczych. Z jakością leku ściśle związana jest jego trwałość, stosowanie odpowiednich metod analitycznych oraz badanie obecności zanieczyszczeń pochodzących z procesu syntezy, powstających w czasie przechowywania oraz w trakcie przygotowania postaci leku – przed podaniem pacjentowi. Dlatego do uzyskania oczekiwanego efektu terapii cytostatykami niezbędna jest ocena wpływu budowy chemicznej substancji oraz czynników fizycznych i chemicznych (temperatury, stężenia jonów wodorowych, rodzaju i stężenia składników buforów, siły jonowej) na ich kinetyczny mechanizm rozkładu oraz szybkość rozkładu w roztworach wodnych. Antybiotyki antracyklinowe są stosowane głównie jako roztwory do wlewów dożylnych. Ta droga podania jest obciążona dużym ryzykiem niebezpieczeństwa związanym z tworzeniem się nieaktywnych farmakologicznie produktów

ich rozkładu. Leki z grupy antybiotyków antracyklinowych wykazują optimum trwałości przy pH 4–5, stąd istotnym jest określenie ich trwałości w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach iniekcyjnych. Istotnym zagadnieniem jest również określenie wpływu rodzaju i stężenia składników buforów oraz temperatury [6, 7, 8, 24–27].

Synteza nowych związków z grupy antybiotyków antracyklinowych ma na celu maksymalne zmniejszenie działań niepożądanych przy zachowaniu korzystnych właściwości farmakologicznych i farmakokinetycznych. Prowadzi do tego synteza proleków, które działają na komórki nowotworowe po proteolitycznej aktywacji przez enzymy wydzielane przez te komórki, jak również łączenie antracyklin z polimerami rozpoznawanymi przez receptory ulegające ekspresji w guzach. Ponadto wykorzystuje się także możliwość terapii celowanej, w której jedną ze strategii jest formułowanie postaci liposomowych leków, co pozwala na zwiększenie przyswajalności substancji leczniczej przez organizm, poprawę stabilności oraz zmniejszenie toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych [28–29]. Ważną metodą zmniejszenia toksyczności antybiotyków antracyklinowych jest synteza nowych pochodnych poprzez: zmiany w pierścieniu A, tworzenie form disacharydowych i pochodnych morfolinowych, eliminacja lub zmiany w części cukrowej, zmiany w aglikonie oraz zmiany w obu elementach [30–31].

Znacznym postępowaniem w leczeniu nowotworów jest chemioterapia wielolekowa, zakładająca, że różne chemioterapeutyki mają różne mechanizmy działania, działają na różne typy komórek nowotworowych, na różne fazy cyklu komórkowego oraz wywołują różne objawy niepożądane. Stąd dla danego nowotworu stosuje się najbardziej odpowiednie kombinacje leków cytostatycznych, podawane w odpowiedniej sekwencji. W ten sposób uzyskuje się bardziej wielostronne działanie na czynności życiowe komórek patologicznych, jak również możliwe jest zmniejszenie objawów niepożądanych [32].

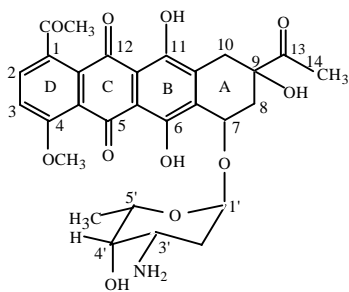
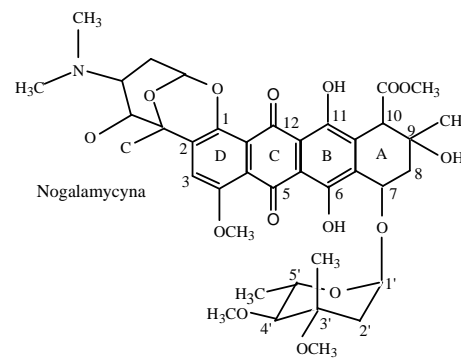
## 2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

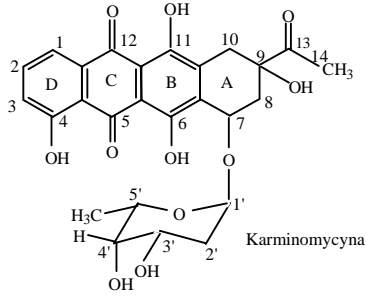
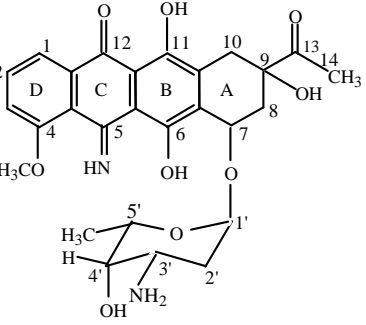
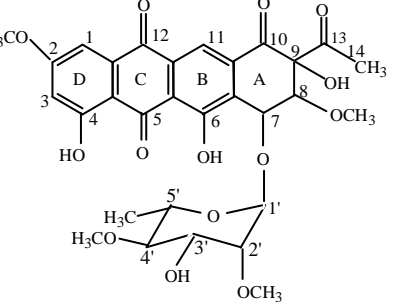
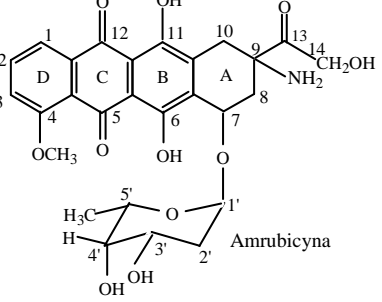
### 2.1. Daunorubicyna i jej modyfikacje [30, 33]

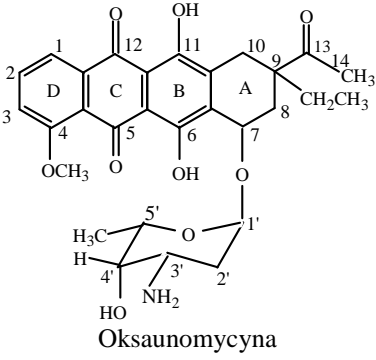
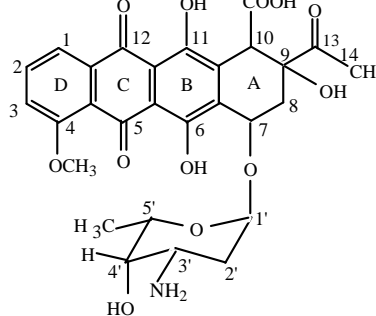
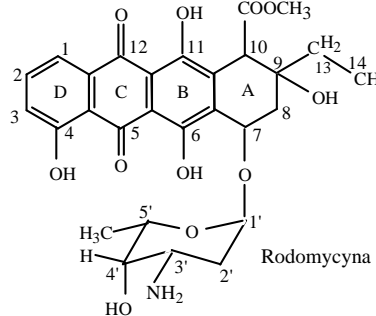
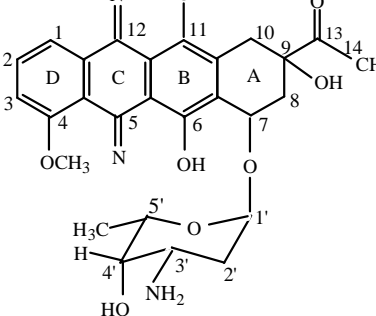
Pierwszym zastosowanym lekiem z grupy antracyklin była daunorubicyna, otrzymana z *Streptomyces peucetius* – tlenowych bakterii gram-dodatnich należących do rzędu promieniowców. Pierwszy preparat z daunorubicyną wprowadzono na rynek w 1967 r. Ujemną stroną daunorubicyny jest jej znaczna toksyczność oraz narastająca stopniowo oporność. Z tego powodu daunorubicyna należy do grupy związków intensywnie modyfikowanych chemicznie.

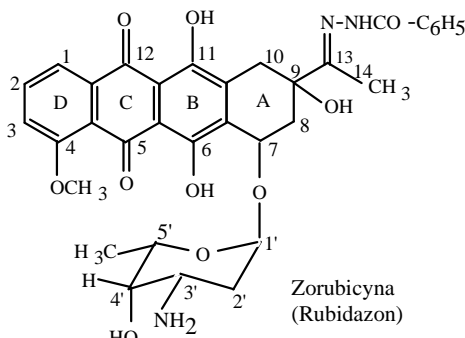
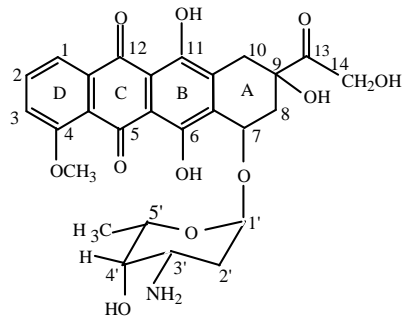
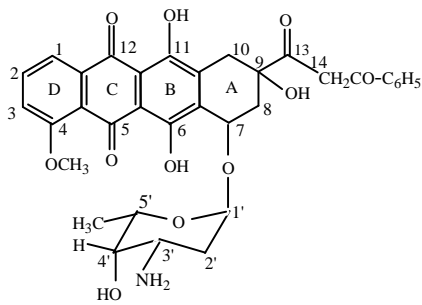
W tabeli 1 przedstawiono wybrane modyfikacje chemiczne daunorubicyny.

Tabela 1. Modyfikacje daunorubicyny

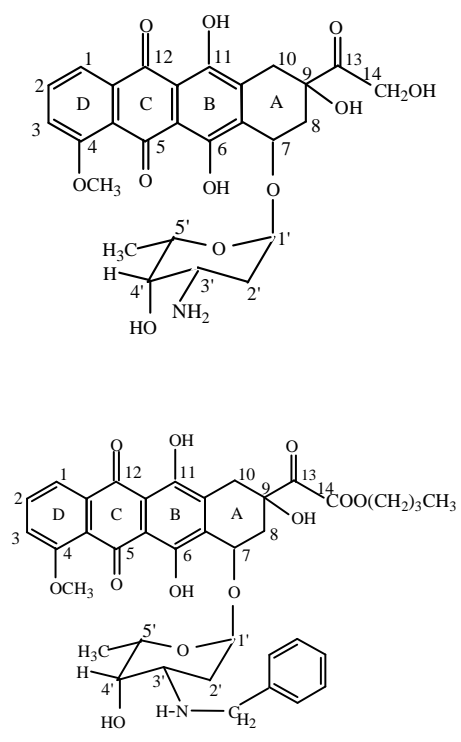
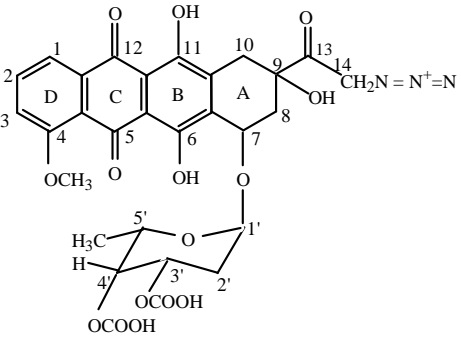
Struktura chemiczna antracyklin	Rodzaj modyfikacji i jej konsekwencje
	<ul style="list-style-type: none"> <li>– grupa <math>-\text{COCH}_3</math> w położeniu C1 – spadek aktywności <i>in vitro</i> wobec linii białaczki L1210</li> <li>– grupa hydroksylowa w pozycji C1 – podwyższenie cytotoksyczności <i>in vitro</i></li> </ul>
 <p>Nogaralmycyna</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– fragment aminokwasu w pozycji C1 i C2 – znaczna aktywność związku, lecz mała stabilność (Menogaryl, Nogaralmycyna – 7-CON-O-metylonogarol)</li> <li>– metylowanie i chlorowanie w pozycji C1 lub C2 – obniżenie aktywności <i>in vitro</i></li> <li>– grupa hydroksylowa w pozycji C2 – obniżenie aktywności <i>in vitro</i></li> <li>– metylowanie lub chlorowanie w pozycji C3 – obniżenie aktywności <i>in vitro</i></li> </ul>

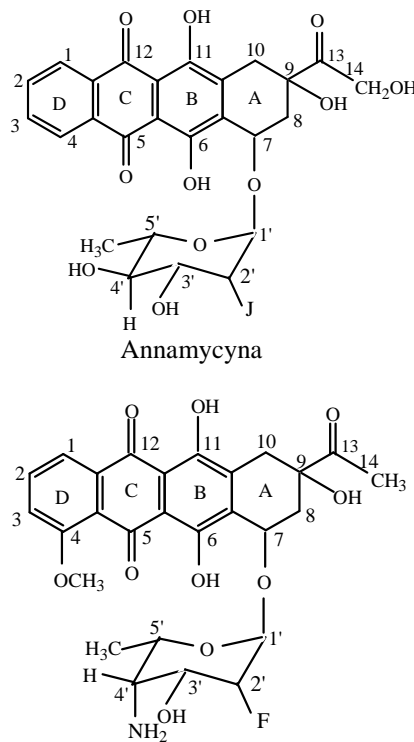
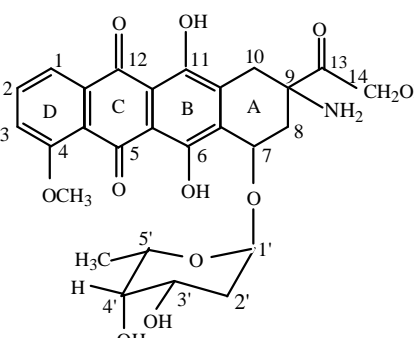
 <p style="text-align: center;">Karminomycyna</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa -OH w pozycji C4 i C3' (karminomycyna) – wysoka aktywność <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> w terapii różnych nowotworów, np. mięsaków, chłoniaków</li> <li>- atom wodoru w pozycji C4 – idarubicyna</li> <li>- atom fluoru w pozycji C4 – zwiększenie aktywności <i>in vivo</i> wobec białaczki P388 w porównaniu do idarubicyny</li> <li>- atom fluoru w pozycji C1 i C4 – obniżenie aktywności <i>in vivo</i> wobec białaczki P388 w porównaniu do idarubicyny</li> </ul>
 <p style="text-align: center;">Iminopochodne</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa -NH w pozycji C5 – zmniejszona kardiotoxyczność w porównaniu z macierzystymi antybiotykami, przy jednoczesnej obniżonej aktywności przeciwnowotworowej</li> <li>- atomy azotu zamiast tlenu w pozycjach C5 i C12 (podwójne N-tlenki) – znaczna aktywność przeciwnowotworowa</li> <li>- druga cząsteczka antracykliny w pozycji C7 (poprzez grupę aryłową, aryloalkilową, cykloalkilową lub heterocykliczną) – znaczna aktywność przeciwnowotworowa zarówno wobec wrażliwych, jak i opornych na działanie antracyklin nowotworów i związana z tym zdolność do przełamania bariery lekooporności <i>in vitro</i></li> <li>- Nogarole – nie posiadają podstawników w pozycji C7, najwyższą aktywność wykazuje 7-Con-O-metylonogarol (Menogaryl)</li> </ul>
 <p style="text-align: center;">Steffimycyna B</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa metoksyłowa w pozycji C8 – umiarkowana aktywność przeciwnowotworowa</li> <li>- grupa hydroksyłowa w pozycji C8 – jednoczesny wzrost aktywności, zmniejszenie toksyczności oraz zdolność do przełamania bariery oporności <i>in vitro</i></li> <li>- atom fluoru w pozycji C8 – brak wyraźnych zmian aktywności</li> <li>- zastąpienie atomu węgla w pozycji C8 atomem tlenu, siarki lub grupą -SO, -SO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub> – duża aktywność <i>in vivo</i> przeciwko różnym nowotworom w dawkach od 0,001 do 100 mg/kg/24 h</li> </ul>
 <p style="text-align: center;">Amrubicyna</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa -OH położeniu C3', grupa -NH<sub>2</sub> w położeniu C9 oraz atom wodoru w położeniu C4 – znaczne podwyższenie aktywności (amrubicyna – obecnie w badaniach klinicznych wobec zaawansowanych nowotworów pęcherza moczowego i płuc oraz chłoniaka nieziarniczego)</li> <li>- grupa aminowa w położeniu C9, grupa β-aminoetylowaj w położeniu C14, atom fluoru i grupa -OH odpowiednio w położeniu C2' i C3' – antybiotyk o dużej aktywności, testowany obecnie wobec nowotworów żołądka i płuc, opornych na działanie doksorubicyny</li> </ul>

 <p>Oksaunomycyna</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa <math>-CH_2CH_3</math> w położeniu C9 (oksaunomycyna) – ok. 70-krotny wzrost aktywności przeciwnowotworowej <i>in vitro</i>, oznaczonej wobec linii białaczki L1210, w porównaniu do daunorubicyny lub doksorubicyny</li> <li>- zaobserwowano wpływ wielkości grupy w pozycji C9 na aktywność – wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w grupie arylowej w szeregu <math>-COCH_3 &gt; -COCH_2CH_3 &gt; -COCH(CH_3)_2</math> następuje wyraźny spadek aktywności przeciwnowotworowej</li> <li>- atom wodoru i grupa <math>-OH</math> w położeniu C9 – wyższa aktywność niż w przypadku grupy acetylowej lub hydroksyacetylowej</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- podstawienie w pozycji C10 powoduje najbardziej widoczny efekt biologiczny w modyfikacjach pierścienia A</li> <li>- grupa <math>-COOH</math> w położeniu C10 – większa aktywność związku, w przeciwieństwie do grup <math>-COOCH_3</math> lub <math>-OCH_3</math> powodujących obniżenie aktywności przeciwnowotworowej</li> </ul>
 <p>Rodomycyna D</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa trifluoroacetoksylova lub hydroksylova w położeniu C10, grupa etylova w położeniu C9 oraz odpowiednio w położeniach C4' i C3' grupy <math>-OH</math> i <math>-NH_2</math> – pochodna rodomicyny D (B 880308) – wysoka, nawet 10-krotnie większa aktywność w porównaniu z doksorubicyną (przy grupie aminowej w pozycji C3' ugrupowanie oksiranu)</li> <li>- rodomicyna D – dość mała aktywność przeciwnowotworowa przy jednoczesnej dużej aktywności przeciwbakteryjnej i znacznej toksyczności</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa metoksylova lub atom wodoru w położeniu C11 (deoksyantracykliny) – brak wpływu na aktywność</li> <li>- atomy azotu w położeniach C5 i C12 – otrzymanie di-N-tlenku – stwierdzona aktywność przeciwnowotworowa</li> </ul>

 <p>Zorubicyna (Rubidazon)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– grupa =N-NHCOC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> w położeniu C13 – wysoka aktywność w leczeniu białaczek, stosowana zwykle u pacjentów z ujawnioną opornością na dokсорubicynę</li> <li>– grupa hydrazydowa w położeniu C13 – zwiększenie aktywności <i>in vivo</i> w porównaniu do daunorubicyny</li> <li>– grupa 4-morfolinowa w położeniu C3' lub grupa iminowa w położeniu C5 (pochodne 13-deoksyantracyklin) – bardzo duża aktywność przeciwnowotworowa <i>in vitro</i> i mała kardiotoxycyżność</li> </ul>
 <p>Dokсорubicyna</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– grupa hydroksylowa w położeniu C14 – poprawa właściwości terapeutycznych daunorubicyny, większa skuteczność w leczeniu guzów litych, szerszy zakres działania przeciwnowotworowego</li> <li>– reszta kwasu masłowego lub retinowego w położeniu C14 – nieznaczne obniżenie aktywności i zdolność do przełamania bariery lekooporności <i>in vitro</i></li> <li>– reszta kwasu masłowego lub retinowego w pozycjach C14 i C3' – wyraźne obniżenie zarówno aktywności jak i zdolności do przełamania bariery lekooporności</li> <li>– atom chlorowca w położeniu C14: atom fluoru – zachowanie aktywności przeciwnowotworowej, atom bromu – prawie całkowita redukcja aktywności</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>– grupy: benzyloacylowa, O-CO-alkil, S-CO-alkil, O-CO-alkil-COOH w pozycji C14 – znaczny wzrost aktywności zarówno <i>in vitro</i>, jak i <i>in vivo</i></li> <li>– grupy estrowe w pozycji C14 – wyższa aktywność przeciwnowotworowa w porównaniu z dokсорubicyną</li> <li>– grupy: -O-alkil, O-aryl, O-acyl w położeniu C14 – wytworzenie eterów lub tioeterów – obniżenie aktywności przeciwnowotworowej</li> <li>– grupy tioacetylowe lub tiobenzoilowe w położeniu C14 – obniżenie aktywności przeciwnowotworowej w znacznie większym stopniu niż obecność w tej samej pozycji ugrupowań acetylowych i benzylowych</li> <li>– grupa aryłowa w pozycji C-14 i modyfikacja pozycji C3' i C4' podstawioną grupą -NH<sub>2</sub> lub O-acylem – bardzo dobrze rozpuszczalna w tłuszczach pochodna o zbliżonej aktywności do wyjściowej antracykliny</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupy: alkilowa, azydowa, nitrowa, tiocyjanianowa, sulfurylowa lub acetylotiolowa w położeniu C14 – obniżenie aktywności w porównaniu z daunorubicyną</li> <li>- łańcuch alkylkarbonyloksylowy w pozycji C14 oraz grupa -O-benzylova lub -NH-benzylova w pozycji C3' – całkowite przełamanie bariery lekooporności; w przypadku pochodnych z grupą -NH-benzylova, wyższe indeksy oporności niż dla pochodnych O-benzylova</li> <li>- reszta kwasu pirogronowego lub asparaginowego w pozycji C14 oraz atom fluoru w położeniu C2' – obniżenie toksyczności przy jednoczesnym zachowaniu aktywności przeciwnowotworowej</li> <li>- estryfikacja kwasem walerianowym grupy hydroksylovej w pozycji C14 i modyfikacja w pozycji C3' grupy aminowej przez dołączenie reszty trifluoroacetylovej lub benzylovej – kwas N-benzyłodokсорubicyno-14-walerianowy</li> <li>- reszta kwasu walerianowego prowadzi do zwiększenia lipofilności związku oraz bardzo szybkiej penetracji do komórek</li> <li>- grupa iminowa w położeniu C-14 połączona z następną cząsteczką antracykliny – utworzenie di-, tri- lub tetrametrów – obniżenie toksyczności bez wyraźnego zmniejszenia aktywności przeciwnowotworowej</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupy: azydowa, tiocyjanowa, acetylotiolowa w pozycji C14 oraz grupa -OAc w pozycji C3' i C4' – znaczne obniżenie aktywności <i>in vivo</i></li> <li>- ugrupowanie acyloksylove lub reszty kwasów tłuszczowych w pozycji C14 w dokсорubicynie – zachowanie aktywności przeciwnowotworowej; wraz z wydłużaniem łańcucha alkilowego – stopniowy, lecz nieznaczny spadek aktywności</li> <li>- grupa -β-aminoetylova w położeniu C14, grupy -NH<sub>2</sub> i -OH odpowiednio w pozycjach C9 i C2' oraz atom fluoru w pozycji C3' – wysoka aktywność przeciwnowotworowa</li> <li>- epimeryzacja przy C4', zastąpienie grupy aminowej w położeniu C3' grupą hydroksylova oraz atom jodu w pozycji C2' cząsteczki idarubicyny (analog dokсорubicyny) – aktywność <i>in vitro</i> 50–100-krotnie większa niż dokсорubicyny, niska kardiotoksyczność oraz brak oporności krzyżowej</li> </ul>

 <p>Annamycyna</p> <p>Daunorubicyna</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- atom bromu w pozycji C2' w położeniu ekwatorialnym oraz grupa -O-acylowa w pozycjach C3' i C4' – znaczne obniżenie zarówno aktywności, jak i toksyczności</li> <li>- atom fluoru w położeniu C2' – znaczne podwyższenie aktywności</li> <li>- atom fluoru w położeniu C2', grupa -OH w położeniu C3' oraz grupa -OCH<sub>3</sub> w położeniu C4' – zwiększenie aktywności wobec opornych nowotworów</li> <li>- atom fluoru w pozycji C2' daunorubicyny, oraz zastąpienie grupy -NH<sub>2</sub> w pozycji C3' grupą metoksylową lub atomem fluoru, jodu czy wodoru – wzrost aktywności lecz jedynie w przypadku difluoropochodnej</li> <li>- atom fluoru w położeniu C2', grupa -OH w położeniu C3' oraz grupa -NH<sub>2</sub> w położeniu C4' – podwyższenie aktywności w porównaniu do daunorubicyny czy doksorubicyny, obniżenie toksyczności oraz zwiększenie rozpuszczalności w wodzie; zmiana położenia grupy NH<sub>2</sub> w pozycji C4' z aksjalnego na ekwatorialne – ok. 4-krotne zwiększenie aktywności <i>in vivo</i> wobec białaczki L1210</li> <li>- grupa metoksylowa w położeniu C2 daunorubicyny i doksorubicyny – znaczne zwiększenie aktywności wobec białaczki L1210 oraz obniżenie toksyczności</li> </ul>
 <p>Amrubicyna</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa -OH w położeniu C3' oraz grupa -NH<sub>2</sub> w położeniu C9 (amrubicyna – obecnie w badaniach klinicznych wobec zaawansowanych nowotworów pęcherza moczowego i płuc oraz chłoniaka nieziarniczego); inne antybiotyki z grupą OH w pozycji C3' (karminomycyna, annamycyna) – znaczne zwiększenie aktywności</li> <li>- grupa -O-benzylowa w położeniu C3' (amrubicyna, karminomycyna, annamycyna), oraz ugrupowanie alkilokarbonylowe w położeniu C-14 – związki zdolne do przełamania bariery lekooporności <i>in vitro</i></li> <li>- grupa merkaptylowa lub tiometylowa w położeniu C3 doksorubicyny - zachowanie aktywności przeciwnowotworowej; pochodna 3'-merkaptylowa bardziej aktywna niż 3'-tiometylowa</li> <li>- inne modyfikacje doksorubicyny w położeniu C3': grupa S-acetylowa – obniżenie aktywności; grupa OH – wzrost aktywności</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grupa -OH w pozycji C3' oraz atom wodoru w pozycji C5' - brak znaczącej zmiany aktywności <i>in vivo</i></li> <li>- epimeryzacja grupy -OH w położeniu C3' oraz wprowadzenie w pozycję C5' grupy -OH lub atomu wodoru - zanik aktywności przeciwnowotworowej</li> <li>- grupy -OH w pozycjach C3' i C4' - brak znaczącej zmiany aktywności <i>in vivo</i></li> <li>- pierścień cykloheksylowy lub 4H-pirany w pozycji C3' (atom azotu poza pierścieniem) - znaczące obniżenie aktywności</li> <li>- pierścień morfolinowy w położeniu C3', grupa -OH w pozycji C4 i grupa etylowa w pozycji C14 (analog o nazwie MX 2 lub KRN-8602, obecnie w drugiej fazie badań klinicznych) - znaczne zmniejszenie kardiotoxyczności, zdolność do przełamania bariery oporności, wysoka aktywność</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- podstawienie/niepodstawienie grupy 4-morfolinowej lub piperydynowej w pozycji C3' (atom azotu w pierścieniu) - znaczne podwyższenie aktywności</li> <li>- w położeniu C3' pierścień morfolinowy lub piperydynowy podstawiony w pozycjach 3'' i 5'' np. grupą alkilową, O-alkilową lub tiulową - zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej zarówno <i>in vitro</i>, jak i <i>in vivo</i>; wzrost jest znacznie wyższy w przypadku obecności w pozycji C3' pierścienia morfoliny; (układ morfolinowy podstawiony grupą CN - nawet kilkusetkrotne zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej; większość otrzymanych pochodnych wykazuje znaczne zmniejszenie kardiotoxyczności oraz zdolność do przełamania bariery oporności);</li> <li>- pierścień pirolidynowy w położeniu C3' oraz w położeniu C4 fragment łańcucha peptydowego połączonego z cząsteczką antracykliny cząsteczką kwasu glutarowego - wysoka aktywność wobec szeregu nowotworów litych</li> <li>- położenie C4' - grupa aminowa lub podstawiona/niepodstawiona grupa morfolinowa - niewielka zmiana aktywności w stosunku do analogicznych pochodnych w położeniu C3'</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ekwatorialna grupa -CH<sub>3</sub> oraz aksjalna grupa -OH lub -OCH<sub>3</sub> w położeniu C4' daunorubicyny oraz doksorubicyny – obniżenie zarówno toksyczności, jak i aktywności</li> <li>- atom wodoru i grupa -OCH<sub>3</sub> w położeniu C4' doksorubicyny – zachowanie aktywności</li> <li>- ekwatorialny atom wodoru oraz aksjalna grupa -OCH<sub>3</sub> w pozycji C4' doksorubicyny – zachowanie aktywności</li> </ul>
<p style="text-align: center;">Pirarubicyna</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ugrupowanie 4'-tetrahydropiranylowe w położeniu C4' (pirarubicyna) – aktywność podobna do doksorubicyny przy znacząco niższej kardiotoxyczności</li> <li>- epimeryzacja przy C4' doksorubicyny (epirubicyna) – niższa kardiotoxyczność, znaczna skuteczność w monoterapii, stosowana także w kombinacjach z innymi cytostatykami; wskazania: ostre białaczki nieлимfocytowe, mięsaki tkanek, miękkich, rak sutka, rak jajnika, chłoniaki nieziarnicze i drobnokomórkowy rak płuc</li> <li>- atom wodoru w położeniu C4' epirubicyny (esorubicyna) – aktywność zbliżona do doksorubicyny przy niższej kardiotoxyczności</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- druga reszta cukrowa w położeniu C-4' (pirarubicyna – (2''R)-4-O-tetrahydropiranylodoksorubicyna) – wysoka aktywność wobec białaczek i chłoniaków, zmniejszenie kardiotoxyczności i innych niepożądanych działań</li> <li>- atom wodoru oraz druga reszta cukrowa w położeniu C4' (disacharydowa pochodna antracyklinowa – sabarubicyna, MEN 10755)</li> </ul>
<p style="text-align: center;">Aklarubicyna (Aklacynomycyna A)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aklarubicyna – grupa -COOCH<sub>3</sub> w położeniu C10, disacharyd w położeniu C4' oraz atom wodoru w położeniu C-11 i grupa dimetylowa w położeniu C3' – wysoka aktywność, mała toksyczność, w tym obniżona kardiotoxyczność,</li> <li>- dla serii aklarubicyn wykazano, że disacharydy i trisacharydy są bardziej aktywne <i>in vitro</i> niż monosacharydy lecz liczba reszt cukrowych nie ma znaczącego wpływu na aktywność <i>in vivo</i></li> </ul>

## 2.2. Mechanizmy działania daunorubicyny [33]

Daunorubicyna, tak jak i pozostałe antracykliny, ulega w większości komórek transformacji enzymatycznej i jest przekształcana w nieaktywne metabolity, lub w związki będące silnymi inhibitorami enzymów, o znacznej toksyczności [30, 33–34].

Daunorubicyna modyfikuje strukturę DNA poprzez [35–36]:

- kompleksy interkalacyjne
- wiązania kowalencyjne
- wprowadzanie zmian w strukturze zasad azotowych (oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych, będące wynikiem oddziaływania reaktywnych form tlenu powstających w reakcjach reoks z udziałem antracyklin).

Na podstawie badań krystalograficznych stwierdzono, że daunorubicyna i doksorubicyna tworzą interkalacyjne kompleksy z DNA. Interkalacja jest procesem odwracalnego wiązania się z DNA polegającym na „wejściu” płaskiego układu aromatycznego cząsteczki antracykliny między pary zasad DNA z aminocukrem położonym w mniejszym rowku DNA.

Interkalacja powoduje wydłużenie heliksu DNA oraz zmniejszenie jego elastyczności, co w konsekwencji prowadzi do relaksacji DNA i zniekształcenia struktury heliksu.

Istotną rolę w stabilizowaniu kompleksów interkalacyjnych odgrywają oddziaływania warstwowe pomiędzy zasadami azotowymi i chromoforami antracyklin, a także wiązania wodorowe [37, 38]. Stąd pochodne daunorubicyny, które nie posiadają grupy OH w pozycji C9 nie są zdolne do tworzenia wiązań wodorowych i są pozbawione aktywności przeciwnowotworowej. W stabilizowaniu kompleksów interkalacyjnych biorą też udział siły van der Waalsa oraz wiązania jonowe możliwe dzięki obecności ładunku dodatniego w daunozaminie.

Istnieją również bisinterkalacyjne kompleksy daunorubicyny z DNA, będące naturalnymi dimerami, których stała wiązania jest kilka rzędów wielkości większa od stałej wiązania monomeru [39].

Wykazano, że zmiany w strukturze chemicznej daunorubicyny mogą wpływać na jej zdolność oddziaływania z makrocząsteczkami ważnymi biologicznie.

W powstawaniu wiązań kowalencyjnych z DNA uczestniczy formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ). Jego udział w powstawaniu wiązań kowalencyjnych między antracyklinami i DNA przyczynił się do powstania koncepcji syntezy koniugatów antracyklin z formaldehydem. Ich synteza polega na połączeniu dwóch cząsteczek antracyklin z trzema cząsteczkami formaldehydu.

Formaldehyd jest w tej reakcji źródłem grup metylenowych, z których dwie tworzą pierścienie oksazolidynowe przez połączenie grupy aminowej daunozaminy z grupą hydroksylową, a trzecia wiąże te pierścienie poprzez azot.

Pochodne pozbawione grupy  $-NH_2$  nie tworzą wiązań kowalencyjnych z DNA. Powstawanie wiązań kowalencyjnych nie zależy od stereochemii grupy aminowej w pozycji 3', natomiast wymaga jej obecności w tej właśnie pozycji.

Istnieje wiele uszkodzeń DNA, które nie wynikają z wiązania daunorubicyny z DNA, lecz powstają w wyniku działania na DNA reaktywnych form tlenu (ROS) indukowanych w reakcjach redoks antracyklin [40–42]. Ze względu na bardzo dużą reaktywność, ROS mogą oddziaływać ze wszystkimi makrocząsteczkami komórkowymi (białka, lipidy, węglowodany, kwasy nukleinowe). Szczególnie niebezpieczne dla organizmu są oddziaływania ROS z DNA, które mogą powodować jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA oraz oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych. Niektóre z tych modyfikacji mają ustalony potencjał mutageny.

Wolne rodniki mogą również pośrednio modyfikować zasady azotowe w DNA, poprzez peroksydację lipidów. Diałdehyd malonowy (MDA) jest jednym z końcowych produktów procesu peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w komórkach.

Powstawanie kompleksów interkalacyjnych, wiązań kowalencyjnych oraz modyfikacje oksydacyjne zasad azotowych z udziałem daunorubicyny lub produktów jej biotransformacji prowadzą do zaburzeń w strukturze DNA. Zmiany te wpływają na aktywność enzymów oraz czynników transkrypcyjnych bezpośrednio oddziałujących z DNA, a więc mają znaczenie w procesach decydujących o zdolności komórki do proliferacji.

Zdolność antybiotyków antracyklinowych do tworzenia kompleksów interkalacyjnych z DNA prowadzi do hamowania aktywności polimerazy DNA.

Modyfikacje DNA z udziałem antracyklin nie tylko hamują wydłużanie łańcucha RNA czy wiązanie polimerazy z DNA, ale również wpływają na regulację ekspresji genów przez oddziaływanie na wiązanie czynników transkrypcyjnych ze swoistymi sekwencjami DNA. Jak wykazano, leki przeciwnowotworowe modyfikujące strukturę DNA lub współzawodniczące z białkami o sekwencje regulatorowe w DNA mogą zaburzać oddziaływanie pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi a rozpoznawanymi przez nie sekwencjami. Leki wiążące się kowalencyjnie z DNA wywierają większy wpływ na oddziaływanie czynników transkrypcyjnych niż związki oddziałujące niekowalencyjnie.

W procesach replikacji, transkrypcji, rekombinacji czy naprawy DNA konieczna jest relaksacja superheliksu DNA, za którą odpowiedzialne są topoisomerazy. Topoisomeraza I przeci-

na tylko jeden łańcuch polinukleotydowy, topoiizomeraza II natomiast przecina jednocześnie oba łańcuchy.

Hamowanie aktywności topoiizomerazy II jest jednym z głównych mechanizmów toksycznego działania antracyklin na komórki [43–44]. Daunorubicyna wiąże się z kompleksem rozcinającym, a więc w chwili gdy przecięty DNA jest związany kowalencyjnie z topoiizomerazą II. Uniemożliwia to ponowne połączenie nici DNA. Powstawanie i stabilność kompleksów antracykliny-DNA-topoiizomeraza II zależy od struktury związków. Ważną rolę odgrywają w tym przypadku zewnętrzne podstawniki (reszta cukrowa, pierścień A), które w przeciwieństwie do układu płaskich pierścieni nie biorą udziału w interkalacji. Wykazano, że hamowanie topoiizomerazy II wzrasta po usunięciu grupy NH<sub>2</sub> przy C3' w reszcie cukrowej lub grupy metoksyłowej przy C4 w pierścieniu D. Równie istotny jest charakter podstawników w pozycji C3'. Blokowanie aktywności topoiizomeraż powoduje fragmentację DNA i nagromadzenie się wiązań kowalencyjnych DNA-białko w kompleksach topoiizomerazy z przeciętym DNA, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki.

Daunorubicyna może wpływać na replikację, transkrypcję, czy rekombinację również poprzez hamowanie działania helikazy. Enzym ten katalizuje rozplatanie dwuniciowej cząsteczki kwasu dezoksyrybonukleinowego przez rozerwanie wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami. Przyczyną stabilizacji drugorzędowej struktury DNA, a tym samym uniemożliwienie rozplatania nici z udziałem helikazy, jest prawdopodobnie interkalacja daunorubicyny do DNA, a nie tworzenie wiązań kowalencyjnych. Ponadto blokowanie działania helikazy wskazuje na inhibicję niekompetycyjną oraz tworzenie przez daunorubicynę, DNA i helikazy nieodwracalnych, trójskładnikowych kompleksów. Stężenia daunorubicyny wykorzystywane do hamowania aktywności helikaz znajdują się w zakresie stężeń istotnych klinicznie.

Dotychczas najlepiej poznano mechanizmy hamowania aktywności trzech enzymów: polimerazy RNA, topoiizomerazy II i helikazy, jednakże należy uwzględnić także wiele enzymów uczestniczących w reakcjach redoks oraz w transporcie przez błonę [14, 45–47]. Wnikanie antracyklin do warstwy lipidowej zaburza organizację błony, która jest istotna dla aktywności katalitycznej niektórych enzymów. Jako przykład posłużyć może oksydaza cytochromu c, będąca białkiem złożonym z 13 podjednostek, dwóch grup hemowych oraz dwóch atomów miedzi połączonych koordynacyjnie z białkiem. Enzym ten znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i jest końcowym ogniwem w łańcuchu oddechowym katalizującym czteroelektronową redukcję tlenu cząsteczkowego. Oddziaływanie antracyklin z oksydazą cytochromu c jest uważane za jedną z przyczyn ich kardiotoksyczności.

Uważa się, że miarą skuteczności leków przeciwnowotworowych, oprócz hamowania proliferacji komórek nowotworowych, jest zdolność do indukowania procesu apoptozy [48]. Istnieje wiele kontrowersyjnych doniesień na temat roli białka p53 w cytotoksycznym działaniu antracyklin. Niektóre antracykliny indukują apoptozę poprzez aktywację kinazy białkowej p38 aktywowanej mitogenami (MAPK). W innym przypadku apoptozie indukowanej antracyklinami towarzyszy obniżenie aktywności czynnika transkrypcyjnego GATA-4. Antracykliny mogą również bezpośrednio uwalniać cytochrom c z mitochondriów, tym samym indukując apoptozę bez uszkodzenia DNA. Istotną przyczyną apoptotycznej śmierci komórek jest zaburzenie homeostazy żelaza, indukowane antracyklinami. Jony żelaza w postaci związanej z białkami są niezbędne do funkcjonowania podstawowych procesów życiowych. Utrzymanie homeostazy w komórce zależy od wspólnego działania dwóch białek – ferrytyny i receptora transferyny (TfR). Pierwsze odpowiedzialne jest za przechowywanie żelaza w dostępnej i nieszkodliwej postaci, a drugie za wychwytywanie żelaza z płynów zewnątrzkomórkowych. Przypuszcza się również, że antracykliny biorą udział w lizosomalnej lub proteasomowej degradacji białek ferrytyny.

Wiele nowotworów wykazuje odwracalne zaburzenia w procesie różnicowania komórek. Zastosowanie odpowiedniego induktora tego procesu może zatem przeprogramować komórki tak, aby utraciły zdolność do proliferacji, a uzyskały możliwość różnicowania. Wykazano, że daunorubicyna zastosowana w małych stężeniach wykazuje selektywny wpływ na ekspresję genów, a do efektów fenotypowych tego mechanizmu należą różnicowanie komórek nowotworowych oraz ograniczenie ich zdolności do tworzenia przerzutów. Różnicowanie komórek nowotworowych stymulowane może być też oddziaływaniem daunorubicyny z błoną komórkową. Udowodniono, że antracykliny indukują proces różnicowania zarówno w komórkach białaczkowych, jak i guzach litych. Opiszano wiele czynników istotnych dla procesu różnicowania komórek indukowanego przez antracykliny, jak np. brak surowicy uniemożliwiający różnicowanie komórek ML-1, ale nie przeszkadzający w ich cytostatycznym działaniu.

W badaniach procesu różnicowania *in vitro* często wykorzystywanym modelem jest linia komórkowa K562. Są to komórki erytroleukemiczne, które w zależności od stosowanego induktora mogą różnicować w kierunku erytrocytów, megakariocytów i w mniejszym stopniu w kierunku monocytów. Zostały one wyizolowane od pacjentki z przewlekłą białaczką pochodzenia szpikowego w fazie zaostżenia blastycznego. Antracykliny indukują proces różnicowania komórek K562 w kierunku erytrocytów i nawet niewielkie zmiany w ich strukturze mogą zmieniać mechanizm tego procesu.



### 2.3. Zastosowanie daunorubicyny i działania niepożądane

Daunorubicyna była pierwszą szeroko stosowaną antracykliną. Działa cytotoksycznie na nowotwory lite i wysiękowe, wykazuje aktywność w przypadku ostrych białaczek limfoblastycznych i mieloblastycznych a ponadto oddziałuje na drobnoustroje Gram-dodatnie

i słabo na Gram-ujemne [28, 49–57]. Po podaniu dożylnym łatwo przenika z krwi do tkanek i innych narządów. W tkankach przekształca się w daunorubicynol (wykazuje aktywność przeciwnowotworową) oraz aglikony daunorubicyny i daunorubicynolu. Antybiotyk ten działa przeciwwirusowo i immunosupresyjnie.

Działanie niepożądane daunorubicyny w dużym stopniu uzależnione jest od wielkości dawki leku, którą dostosowuje się do indywidualnych potrzeb pacjenta. Przyjęto, iż całkowita dawka daunorubicyny nie powinna przekraczać  $550 \text{ mg/m}^2$  u osoby dorosłej, lub  $400 \text{ mg/m}^2$  u osób otrzymujących inne kardiotoksyczne leki. W każdym przypadku terapia daunorubicyną wiąże się z zahamowaniem produkcji szpiku kostnego i ryzykiem uszkodzenia mięśnia sercowego [58–63]. Nierzadko odnotowywana jest mielotoksyczność, małopłytkowość czy niedokrwistość. Do pozostałych, lecz odwracalnych działań niepożądanych należą nudności i wymioty, pojawiające się już w czasie 24–48 godzin od podania leku, biegunka, wypadanie włosów, zapalenie błony śluzowej jamy ustnej, hiperpigmentacja skóry i paznokci, widoczna po miesiącu stosowania leku. Silnie żółte zabarwienie moczu pacjenta nie oznacza jakiegokolwiek zagrożenia. Wyłącznie leku poza żyłę powoduje poważne lokalne reakcje w postaci martwicy tkanki [64–74]. Daunorubicyna nie pokonuje bariery krew-mózg, ale przenika do łożyska, stąd istnieje prawdopodobieństwo uszkodzenia płodu podczas jej podawania zwłaszcza w pierwszym trymestrze ciąży. Z powodzeniem stosowana jest za to w drugim i trzecim trymestrze ciąży. Jak dotąd nie udowodniono jednoznacznie, czy daunorubicyna przenika do mleka matki [75–79].

Modyfikacje w cząsteczce daunorubicyny mają na celu otrzymanie analogów, które okazałyby się lepsze w działaniu oraz mniej kardiotoksyczne [31, 80–82]. Do najbardziej znanych i szeroko stosowanych pochodnych daunorubicyny należą: doksorubicyna, epirubicyna, idarubicyna, karminomycyna i pirarubicyna.

Grupa karbonylowa, hydroksylowa oraz aminowa są odpowiedzialne za oddziaływania z makrocząsteczkami w komórce, stąd różnice w efektach terapeutycznych uzyskiwanych dla poszczególnych pochodnych antracyklin [30].

Doksorubicyna wykazuje lepsze właściwości terapeutyczne w porównaniu z daunorubicyną oraz szerszy zakres działania przeciwnowotworowego. Stosowana jest w leczeniu nowotworów piersi, guzów litych u dzieci, mięsaków tkanek miękkich i agresywnych chłoniaków [38, 83]. Izomerycznym analogiem doksorubicyny jest epirubicyna, wykazująca niższą kardiotoxycywność i dużą skuteczność zarówno w monoterapii, jak i w kombinacjach z innymi cytostatykami [84]. Idarubicyna jest analogiem otrzymanym z daunorubicyny przez usunięcie grupy 4-metoksylowej z pierścienia D. Stosowana jest w przypadku ostrych białaczek szpikowych, szpiczaków mnogich, chłoniaków nieziarnicznych i raka piersi [85]. Jest jedynym lekiem z w/w grupy stosowanym doustnie. Karminomycyna wykazuje wysoką aktywność *in vitro* i *in vivo* w terapii różnych nowotworów, np. mięsaków czy chłoniaków, natomiast pirarubicyna posiada aktywność zbliżoną do doksorubicyny, przy znacząco niższej kardiotoxycywności [30].

Pomimo dużej skuteczności w leczeniu różnych typów nowotworów, podawanie zarówno daunorubicyny, jak i jej analogów, jest znacznie ograniczone z powodu rozwoju oporności na te leki w komórkach nowotworowych oraz wywoływanej przez nie kardiotoxycywności, której z uwagi na częstotliwość występowania, poświęca się wiele uwagi w piśmiennictwie [40, 41, 59, 61, 86–92]. Ze względu na czas, w jakim wystąpiły działania niepożądane wyróżnia się:

- kardiotoxycywność ostrą – pojawia się w okresie do roku od zastosowanego leczenia; jej podstawowe objawy obejmują: zaburzenia rytmu serca nadkomorowe i komorowe, tachy-kardię zatokową, obniżenie lub uniesienie odcinka ST w zapisie EKG, wydłużenie czasu QT, obniżenie woltażu zespołów QRS, obniżenie parametrów skurczowych lewej komory, wysięk w worku osierdziowym;
- kardiotoxycywność przewlekłą – występuje w czasie dłuższym niż rok po zakończeniu leczenia, do jej najczęstszych objawów należą: męczliwość, postępujący spadek tolerancji wysiłku, duszność wysiłkowa, przyspieszenie rytmu serca, bledność, potliwość, skłonność do infekcji dróg oddechowych.

Jako czynniki ryzyka uszkodzenia mięśnia sercowego wymienia się:

- dużą dawkę sumaryczną lub jednorazową zastosowanego leku
- młody lub zaawansowany wiek pacjenta
- obecność zmian w układzie sercowo-naczyniowym przed wdrożeniem leczenia cytostatykami, np. przebyte zapalenie mięśnia sercowego, wada serca
- inne stosowane łącznie z antracyklinami cytostatyki, zwłaszcza alkilujące
- radioterapię okolic serca.

Zwykle w okresie roku po zakończeniu terapii antracyklinami rozwija się kardiomiopatia oraz przewlekła niewydolność serca (CHF). Czasami nawet w okresie tygodnia od rozpoczęcia leczenia może wystąpić ostra kardiotoxyczność. Jest ona zazwyczaj odwracalna i występuje u około jednego procenta pacjentów.

Indukowana daunorubicyną kardiomiopatia obejmuje utratę miofibrili, rozszerzenie retikulum sarkoplazmatycznego, wakuolizację cytoplazmy, pęcznienie mitochondriów i zwiększenie liczby lizosomów.

Ponieważ daunorubicyna indukuje kardiotoxyczność za pośrednictwem innych mechanizmów niż te, które są odpowiedzialne za jej aktywność przeciwnowotworową, poznanie ich pozwoliłoby na rozwój nowych strategii ograniczających działania niepożądane nie zmniejszając odpowiedzi nowotworu [45, 93–100]. Spośród procesów odpowiedzialnych za rozwój kardiotoxyczności wymienić można zwiększenie peroksydacji lipidów, zaburzenia w gospodarce wapniowej, hamowanie ekspresji swoistych genów, enzymatyczną aktywację mitochondrialnych kinaz kreatynowych (MtCK) oraz indukcję syntezy tlenu azotu. Ciągłe podawanie daunorubicyny zmniejsza poziom  $Ca^{2+}$ -ATP-azy w retikulum sarkoplazmatycznym.

Podjęmowane są liczne próby obniżenia lub opóźnienia wystąpienia objawów kardiotoxyczności, takie jak:

- ograniczenie sumarycznej dawki leku
- wydłużenie czasu infuzji leku
- podawanie analogów antracyklinowych o udowodnionej niższej kardiotoxyczności
- stosowanie leku w dawkach podzielonych
- stosowanie leków kardioprotekcyjnych.

Związkiem o właściwościach kardioprotekcyjnych jest deksrazoksan, który nie wpływa na obniżenie efektywności działania przeciwnowotworowego. Jego kardioprotekcyjna rola polega na chelatowaniu żelaza w znacznie większym stopniu niż ma to miejsce w przypadku antracyklin. Działanie kardioprotekcyjne wykazują również: kardioksan, witamina E, *N*-acetylocysteina, *L*-karnityna, koenzym Q10 i flawony [40–41, 56, 101–103].

Problem oporności komórek nowotworowych na antracykliny, w tym także na daunorubicynę, może wiązać się z pierwotną cechą genetyczną komórek lub też nabytą, wytworzoną w reakcji na podany lek. Udało się już zidentyfikować geny, których nieprawidłowości wywołują oporność na leki. Udowodniono, że jedną z przyczyn tego stanu jest nadekspresja genu MDR1.

Istotny problem w terapii antracyklinami stanowi indukowany przez nie ogólnoustrojowy stres oksydacyjny, który zakłóca efektywność leczenia. Mediatorami stresu oksydacyjnego są aktywne formy tlenu, rodniki lipidowe, końcowe produkty peroksydacji lipidów oraz aktywne formy azotu [40–42].

Nowymi strategiami w walce z nowotworami są liposomowe formuły antracyklin czy synteza proleków – związków działających na komórki nowotworowe po proteolitycznej aktywacji przez enzymy wydzielane przez te komórki. Duże nadzieje budzi terapia celowana skierowana wprost na nieprawidłowo funkcjonujące komórki a oszczędzająca zdrowe tkanki i minimalizująca działania niepożądane. Istnieją dwie główne strategie farmakologiczne terapii celowanej z udziałem antracyklin:

- rozwój „przenośników” pozwalających na dotarcie antracyklin do nowotworu bez uszkodzenia zdrowych tkanek, np. formuły liposomowe [104]
- łączenie antracyklin z nośnikami swoiście rozpoznającymi komórki nowotworowe [105].

Celem zamknięcia leków w liposomach jest zwiększenie ich przyswajalności przez organizm, poprawa stabilności oraz zmniejszenie toksyczności w stosunku do zdrowych komórek, przy zachowaniu takich samych właściwości cytotoksycznych w stosunku do komórek nowotworowych, jakie ma wolny lek. Liposomy mogą wnikać do tkanki nowotworowej wykorzystując zmiany w przepuszczalności i porowatości systemu naczyń krwionośnych. Odmienna struktura kapilar guza pozwala na selektywne dostarczenie leku przez liposomy, które nie przenikają do normalnych tkanek i preferencyjnie akumulują się w obszarze guza.

Od kilku lat na rynku dostępne są dwa przeciwnowotworowe preparaty liposomowe: Doxil (liposomowa forma doksorubicyny) i DaunoXome (liposomowa forma daunorubicyny) [25, 106–108]. Cechują się one dobrymi parametrami farmakokinetycznymi oraz są stabilne w warunkach fizjologicznych, co sprawia, że nie następuje wyciek leku w czasie transportu do miejsca docelowego. Zamknięcie leku w pęcherzyku liposomowym ogranicza działania uboczne oraz umożliwia zmniejszenie dawek leku [62, 109–111]. Zastosowanie liposomowych postaci leków w terapiach pozytywnie wpływa na ogólne samopoczucie pacjenta i tylko w minimalnym stopniu obniża komfort życia. Skutki uboczne przyjmują w tym przypadku łagodną formę i objawiają się głównie sennością, utratą apetytu oraz minimalną toksycznością w stosunku do komórek szpiku kostnego. Nudności i wymioty występują bardzo rzadko, praktycznie nie pojawia się kardiotoxycznosc. DaunoXome jest liposomowym preparatem cytrynianu daunorubicyny, zamkniętego w liposomach SUV o średnicy ok. 45 nm, składających się z distearylolecytyny i cholesterolu. Dwuwarstwa o takim składzie pozostaje

w warunkach fizjologicznych w fazie żelu i nie następuje wyciek zawartości liposomu. Dodatkowym czynnikiem stabilizującym i wydłużającym czas krążenia liposomu w układzie krwionośnym jest obojętny charakter dwuwarstwy. Daunorubicyna zamykana jest w fazie wodnej pęcherzyka liposomowego przy pomocy gradientu pH. Preparat dostępny jest w postaci czerwonej, przezroczystej zawiesiny liposomowej o pH od 4,9 do 6,0.

Daunorubicyna zamknięta w liposomach charakteryzuje się ograniczeniem wydajności eliminacji leku (CL), wydłużonym czasem połowicznego rozpadu, ograniczoną akumulacją w zdrowych tkankach i wydłużonym czasem uwalniania [112–115].

Pomyślne rezultaty przyniosły też próby łączenia antracyklin z polimerami rozpoznawanymi przez receptory ulegające ekspresji w guzach. Zaobserwowano selektywną akumulację takich związków w wątrobie oraz dużo mniejszą kardiotoxycność w porównaniu z odpowiednią dawką wolnych antracyklin.

Nową generacją liposomów są immunoliposomy, stanowiące połączenie swoistych przeciwciał monoklonalnych lub fragmentów Fab' z liposomowymi antracyklinami.

#### **2.4. Metody oceny jakości chlorowodorku daunorubicyny według Ph. Eur. 6.0, FP VIII i USP 30**

W tabeli 2 przedstawiono porównanie wymagań jakości dla chlorowodorku daunorubicyny wg Ph. Eur. 6.0 = FP VIII i USP 30, natomiast w tabeli 3 zanieczyszczenia daunorubicyny wg FP VIII.

Tabela 2. Charakterystyka chlorowodoru daunorubicyny wg. Farmakopei Europejskiej 6 = Farmakopei Polskiej VIII i Farmakopei Amerykańskiej

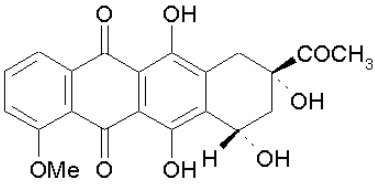
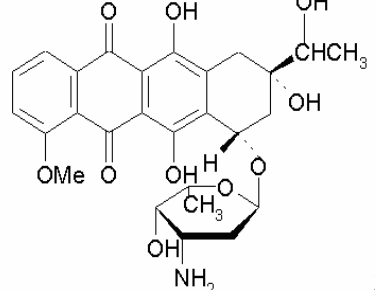
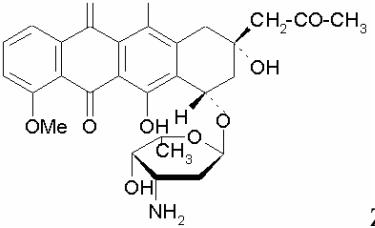
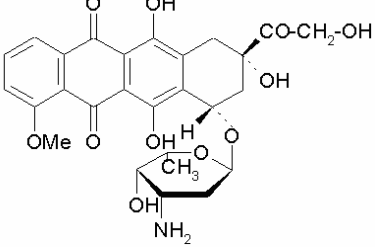
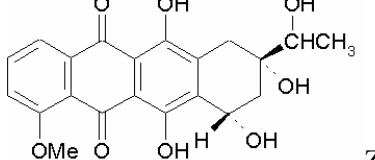
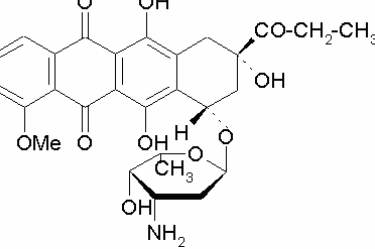
	Ph. Eur. 6.0 i FP VIII	USP 30
<b>Wzór sumaryczny</b>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> ClNO <sub>10</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>10</sub> ·HCl
<b>Masa cząsteczkowa</b>	564,0	563,98
<b>Definicja</b>	<b>Nazwa chemiczna:</b> (8 <i>S</i> ,10 <i>S</i> )-8-Acetylo-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy- $\alpha$ - <i>L</i> -lykso-heksa piranozylo)oksy]-6,8,11-trihydroksy-1-metoksy-7,8,9,10-tetrahydro tetraceno-5,12-dionu chlorowodorek	<b>Nazwa chemiczna:</b> 5,12-Tetracenodion, 8-acetylo-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy- $\alpha$ - <i>L</i> -lykso-heksapiranozylo)oksy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroksy-1-metoksy-(8 <i>S</i> -cis) chlorowodorek  (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3-Acetylo-1,2,3,4,6,11-heksahydro-3,5,12-trihydroksy-10-metoksy-6,11-diokso-1-naftacenylo-3-amino-2,3,6-trideoksy- $\alpha$ - <i>L</i> -lykso-heksopiranozylo chlorowodorek
	<b>Otrzymywanie:</b> Substancja wytwarzana przez pewne szczepy <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> lub <i>Streptomyces peucetius</i> lub otrzymywana w inny sposób	–
	<b>Zawartość:</b> od 95,0% - 102,0% (w przeliczeniu na bezwodną substancję)	<b>Zawartość:</b> nie mniej niż 842 $\mu$ g/mg i nie więcej niż 1030 $\mu$ g/mg
<b>Wytwarzanie</b>	Metody wytwarzania zostały opracowane tak, aby usunąć lub ograniczyć obecność histaminy	–
<b>Właściwości</b>	<b>Wygląd:</b> krystaliczny, pomarańczowo-czerwony proszek, higroskopijny	<b>Wygląd:</b> substancja krystaliczna
	<b>Rozpuszczalność:</b> substancja łatwo rozpuszczalna w wodzie i metanolu, trudno rozpuszczalna w etanolu 96%, praktycznie nierozpuszczalna w acetonie	–
<b>Tożsamość</b>	A. Absorpcyjna spektrofotometria w podczerwieni Porównanie: chlorowodorek daunorubicyny CSP B. Rozpuścić ok. 10 mg substancji w 0,5 ml kwasu azotowego OD, dodać 0,5 ml wody OD i ogrzewać 2 min nad płomieniem; pozostawić do ochłodzenia i dodać 0,5 ml roztworu azotanu srebra OD1; wytrąca się biały osad	A. Widmo absorpcyjne w podczerwieni wykazuje maksima przy tych samych długościach fali co widmo USP chlorowodoru daunorubicyny, a względne intensywności są do siebie zbliżone B. Oznaczanie zawartości metodą HPLC – czas retencji pików głównych jest zgodny z czasem retencji pików głównych na chromatogramie roztworu porównawczego

<b>Badania</b>	<p><b>pH:</b> od 4,5 do 6,5 Rozpuścić 50 mg substancji badanej w wodzie pozbawionej dwutlenku węgla OD i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 10 ml</p>	<p><b>pH:</b> od 4,5 do 6,5 (w roztworze o stężeniu 5 mg/ml)</p>
	<p><b>Substancje pokrewne</b> Chromatografia cieczowa <i>Roztwory przygotowywać bezpośrednio przed użyciem</i></p> <p><i>Roztwory</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>roztwór badany:</i> rozpuścić 50,0 mg substancji badanej w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 50,0 ml</li> <li>– <i>roztwór porównawczy (a):</i> rozpuścić 50,0 mg chlorowodoru daunorubicyny CSP w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 50,0 ml</li> <li>– <i>roztwór porównawczy (b):</i> rozpuścić 10 mg chlorowodoru doksorubicyny CSP i 10 mg chlorowodoru epirubicyny CSP w fazie ruchomej uzupełnić fazą ruchomą do 100,0 ml; uzupełnić 1,0 ml roztworu fazą ruchomą do 10,0 ml</li> <li>– <i>roztwór porównawczy (c):</i> rozpuścić 5,0 mg daunorubicynonu CSP i 5,0 mg chlorowodoru doksorubicyny CSP w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 100,0 ml; uzupełnić 1,0 ml roztworu fazą ruchomą do 10,0 ml</li> <li>– <i>roztwór porównawczy (d):</i> uzupełnić 1,0 ml roztworu porównawczego (a) fazą ruchomą do 200,0 ml</li> </ul> <p><i>Kolumna</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>wymiary:</i> długość 0,25 m, średnica wewnętrzna 4,0 mm</li> <li>– <i>faza nieruchoma:</i> żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi, związany na końcu OD (5 µm)</li> <li>– <i>Faza ruchoma:</i> zmieszać równe objętości acetonitrylu OD i roztworu zawierającego 2,88 g/l laurylosiarczanu sodu OD i 2,25 g/l kwasu fosforowego(V) OD;</li> <li>– <i>Szybkość przepływu:</i> 1 ml/min</li> <li>– <i>Detekcja spektrofotometryczna:</i> 254 nm</li> <li>– <i>Wprowadzenie:</i> 5 µl; wprowadzić roztwór badany i roztwory porównawcze (b), (c), (d);</li> <li>– <i>Czas analizy:</i> 2-krotność czasu retencji daunorubicyny</li> </ul>	<p><b>Oznaczenie</b> <i>Faza ruchoma:</i> zmieszać 62 objętości wody i 38 objętości acetonitrylu, doprowadzić kwasem fosforowym(V) do pH 2,2 ±0,2; objętość acetonitrylu dostosować tak, by spełnić wymagania przydatności układu i zapewnić odpowiedni czas retencji daunorubicyny; przesączyć roztwór przez sącdek membranowy (średnica porów 1µm lub mniej) i odgazować</p> <p><i>Przygotowanie roztworów</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>roztwór porównawczy:</i> rozpuścić w fazie ruchomej odpowiednią ilość substancji porównawczej USP chlorowodoru daunorubicyny RS, tak aby otrzymać roztwór o stężeniu ok. 250 µg/ml</li> <li>– <i>roztwór porównawczy:</i> przygotować roztwór substancji porównawczej chlorowodoru doksorubicyny w roztworze porównawczym o stężeniu ok. 250µg/ml</li> <li>– <i>roztwór badany:</i> przenieść ok. 25 mg substancji badanej chlorowodoru daunorubicyny do kolby stożkowej poj. 100 ml, rozpuścić w fazie ruchomej, uzupełnić fazą ruchomą do 100 ml i wymieszać</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Kolumna:</i> 4,6 mm x 30 cm</li> <li>– <i>Faza nieruchoma:</i> żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi, związany na końcu (3–10 µm)</li> <li>– <i>Szybkość przepływu:</i> ok. 1,5 ml/min</li> <li>– <i>Detekcja spektrofotometryczna:</i> 254 nm</li> <li>– <i>Wprowadzenie:</i> 5 µl</li> </ul> <p>Retencja względna: doksorubicyna = ok. 0,7; daunorubicyna = 1,0</p> <p>Przydatność układu:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>rozdzielczość:</i> nie mniej niż 3,0 pomiędzy pikami doksorubicyny i daunorubicyny</li> </ul>

	<p>Retencja względna w porównaniu z daunorubicyną (czas retencji = ok. 15 min): zanieczyszczenie A = ok. 0,4; zanieczyszczenie D = ok. 0,5; epirubicyna = ok. 0,6; zanieczyszczenie B ok. 0,7</p> <p><i>Przydatność układu:</i> roztwór porównawczy (b):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>rozdzielczość:</i> nie mniej niż 2,0 pomiędzy pikami zanieczyszczenia D i epirubicyny</li> </ul> <p><i>Wartości graniczne:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>zanieczyszczenie A:</i> nie więcej niż powierzchnia odpowiadającego pikę na chromatogramie roztworu porównawczego (c) (0,5%)</li> <li>– <i>zanieczyszczenie B:</i> nie więcej niż 3-krotność powierzchni pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (d) (1,5%)</li> <li>– <i>zanieczyszczenie D:</i> nie więcej niż powierzchnia odpowiadającego pikę na chromatogramie roztworu porównawczego (c) (0,5%)</li> <li>– <i>każde inne zanieczyszczenie:</i> nie więcej niż powierzchnia pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (d) (0,5%)</li> <li>– <i>suma innych zanieczyszczeń:</i> nie więcej 5-krotność powierzchni pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (d) (2,5%)</li> <li>– <i>wartość graniczna pominięcia:</i> 0,1-krotność powierzchni pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (d) (0,05%)</li> </ul>	
<b>Butanol</b>	Nie więcej niż 1,0%	–
<b>Woda</b>	Nie więcej niż 3,0%, do wykonania badania użyć 0,100 g substancji	Nie więcej niż 3,0%
<b>Endotoksyny bakteryjne</b>	Mniej niż 4,3 IU/mg, jeżeli substancja jest przeznaczona do wytwarzania pozajelitowych postaci leku bez zachowania odpowiedniej procedury pozwalającej na usunięcie endotoksyn bakteryjnych	–
<b>Zawartość</b>	<p>Chromatografia cieczowa jak podano w badaniu substancji pokrewnych</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>wprowadzenie:</i> roztwór badany i roztwór porównawczy (a)</li> </ul> <p>Obliczyć procentową zawartość chlorowodoru daunorubicyny (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>ClNO<sub>10</sub>)</p>	–
<b>Przechowywanie</b>	W hermetycznym pojemniku, chroniąc od światła; jeżeli substancja jest jałowa, należy ją przechowywać w jałowym, hermetycznym pojemniku z zabezpieczeniem gwarancyjnym	Przechowywać w szczelnych opakowaniach, chronić przed światłem oraz nadmiernym ogrzaniem
<b>Środki ostrożności</b>	–	Unikać wdychania substancji oraz kontaktu ze skórą



Tabela 3. Zanieczyszczenia daunorubicyny wg FP VIII

Nazwa chemiczna związku	Budowa chemiczna
<p>(8<i>S</i>,10<i>S</i>)-8-acetylo-6,8,10,11-tetrahydrokso-1-metoksy-7,8,9,10-tetrahydrotetraceno-5,12-dion (daunorubicyny aglikon, daunorubicynon)</p>	 <p style="text-align: right;">Zanieczyszczenie A</p>
<p>(8<i>S</i>,10<i>S</i>)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-lykso-heksapiranozylo)oksy]-6,8,11-trihydrokso-8-[(1<i>R</i><i>S</i>)-1-hydroksoetylo]-1-metoksy-7,8,9,10-tetrahydrotetraceno-5,12-dion (daunorubicynol)</p>	 <p style="text-align: right;">Zanieczyszczenie B</p>
<p>(8<i>S</i>,10<i>S</i>)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-lykso-heksapiranozylo)oksy]-6,8,11-trihydrokso-1-metoksy-8-(2-oksopropilo)-7,8,9,10-tetrahydrotetraceno-5,12-dion (feudomycyna B)</p>	 <p style="text-align: right;">Zanieczyszczenie C</p>
<p>(2<i>S</i>, 4<i>S</i>)-4-[(3-amino-2,3,6-trideoksy-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-lykso-piranozylo)oksy]-2-glikoloilo-2,5,12-trihydrokso-7-metoksy-1,2,3,4,6,11-heksahydrotetraceno-6,11-dion (doksorubicyna)</p>	 <p style="text-align: right;">Zanieczyszczenie D</p>
<p>(8<i>S</i>,10<i>S</i>)-8-acetylo-6,8,10,11-tetrahydrokso-8-[(1<i>R</i><i>S</i>)-1-hydroksoetylo]-1-metoksy-7,8,9,10-tetrahydrotetraceno-5,12-dion (13-dihydrodaunorubicynon)</p>	 <p style="text-align: right;">Zanieczyszczenie E</p>
<p>(8<i>S</i>,10<i>S</i>)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-lykso-heksapiranozylo)oksy]-6,8,11-trihydrokso-1-metoksy-8-propanoilo-7,8,9,10-tetrahydrotetraceno-5,12-dion (8-etyloldaunorubicyna)</p>	 <p style="text-align: right;">Zanieczyszczenie F</p>

## 2.5. Badania stabilności [116–117]

Celem badań stabilności jest wykazanie, w jaki sposób zmienia się jakość substancji aktywnej (API – *Active Pharmaceutical Ingredient*) lub produktu leczniczego w czasie, pod wpływem różnych czynników otoczenia, takich jak: temperatura, wilgotność i światło. Dzięki takim badaniom można określić termin ważności zarówno substancji czynnej, jak i postaci leku (*shelf-life*) oraz warunki ich przechowywania.

W celu ujednoczenia informacji na temat stabilności, w ramach „Międzynarodowej Konferencji do Spraw Harmonizacji” (ICH – *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) opracowano wytyczne, które określają niezbędne dane na temat stabilności nowej substancji leczniczej lub leku w zakresie wystarczającym do złożenia wniosku o rejestrację w UE, Japonii i USA. W UE wymogi ICH zostały opracowane i opublikowane w wytycznych Komitetu do Spraw Leków Produkowanych na Skalę Masową (CPMP – *Committee for Proprietary Medicinal Products*).

Istnieje wiele definicji i pojęć związanych z badaniami stabilności. Spośród podstawowych zagadnień wymienić można następujące:

- badania długookresowe (*long term testing*) – badania stabilności w zalecanych warunkach magazynowania, wykonane w przedziale czasu określonym dla zbadania okresu ważności, proponowanego lub zatwierdzonego
- badania przyspieszone (*accelerated testing*) – badania zaprojektowane w celu przyspieszenia reakcji chemicznej lub zmian fizycznych produktu przy zastosowaniu warunków przechowywania wyższych niż w przypadku badań długookresowych
- badania obciążeniowe (stresowe) (*stress testing*) – badania, które są wykonywane w celu określenia atrybutów stabilności; badania takie są elementem strategii rozwoju i są wykonywane zwykle w bardziej restrykcyjnych warunkach, niż te, które zastosowano w badaniach przyspieszonych; do badań obciążeniowych zalicza się badanie fotostabilności
- formalne badania stabilności (*formal stability studies*) – badania długookresowe i przyspieszone (ewentualnie średniookresowe), wykonane z szarżami badawczymi lub rynkowymi, zgodnie z opracowanym protokołem stabilności
- strefy klimatyczne (*climatic zones*) – koncepcja podziału świata na cztery strefy klimatyczne oparta jest na przeważających warunkach klimatycznych; strefy klimatyczne przedstawiono w tabeli 4

- średnia temperatura kinetyczna (*mean kinetic temperature*) – obliczona stała wartość temperatury symulująca „stres termiczny”, na który narażone są produkty podczas przechowywania i dystrybucji w różnych temperaturach dla odpowiednio zdefiniowanych przedziałów czasowych; średnia temperatura kinetyczna jest wyższa niż średnia temperatura arytmetyczna i bierze pod uwagę równanie Arrheniusa
- okres ponownego testowania (*re-test period*) – okres, podczas którego oczekuje się, że jakaś API jest zgodna ze specyfikacją, a więc można ją używać do wytwarzania danego leku, pod warunkiem, że była magazynowana w zdefiniowanych warunkach; po upływie tego okresu, szarża kierowana do wytwarzania leku musi ponownie być badana w celu wykazania zgodności ze specyfikacją, a następnie natychmiast użyta
- data ponownego testowania (*re-test date*) – data, po upływie której próbki API muszą być zbadane, w celu wykazania, czy nadają się nadal do użycia
- termin przydatności (*shelf-life*) – przedział czasowy, w którym oczekuje się, że lek utrzyma specyfikowane właściwości, pod warunkiem, że jest magazynowany w warunkach zdefiniowanych na etykiecie, w opakowaniu ostatecznym i zamknięty
- specyfikacja zwalniania (*release specification*) – połączenie testów fizycznych, chemicznych, biologicznych i mikrobiologicznych oraz kryteriów akceptacji, które określają, czy jakość leku jest odpowiednia w chwili jego zwalniania
- specyfikacja kontroli (*shelf-life specification*) – połączenie testów fizycznych, chemicznych, biologicznych i mikrobiologicznych oraz kryteriów akceptacji, które wyznaczają badania kontrolne odpowiedniości API oraz odpowiedniość leku do użycia
- szarże pilotowe (*pilot scale batch*) – szarże API lub leku, które zostały wyprodukowane przy zastosowaniu takiej samej procedury wytwarzania, jaka może być wykorzystana do procesu końcowego (normalna skala produkcyjna); w przypadku doustnych form leków stanowi zwykle nie mniej niż 1/10 z szarży produkcyjnej lub 100 000 tabletek/kapsułek.

### *Substancja lecznicza*

Informacje o stabilności API są elementem systematycznej oceny stabilności leków. Testowanie obciążeniowe przez wyznaczenie drogi rozpadu i prawdopodobnych produktów rozpadu pomaga określić wewnętrzną stabilność cząsteczki. Ponadto, potwierdza odpowiedność zaplanowanych procedur analitycznych (wskaźników stabilności). Warunki obciążenia, które mogą wystąpić w czasie dystrybucji, muszą być wyznaczone przez testowanie stresowe.

Wykonuje się je zwykle dla jednej szarży substancji, oceniając wyniki w następujących warunkach:

- podwyższonej temperaturze (o 10°C wyższej niż przy testach przyspieszonych, np. 50°C, 60°C itd.)
- podwyższonej wilgotności (np. 75% względna wilgotność lub wyższa)
- utlenianiu
- fotolizie
- hydrolizie w szerokim zakresie pH (w roztworze lub zawiesinie)

Tabela 4. Strefy klimatyczne

Strefa	Średnia T (°C)	Średnia kinetyczna T (°C)	RH (%)
I Umiarkowana	20,0	20,0	42
II Subtropikalna	21,6	22,0	52
III Gorąca/sucha	26,4	27,9	35
IV Gorąca/wilgotna	26,7	27,4	76

Formalne badania stabilności muszą być oparte na danych z trzech szarży API. Szarże wyprodukowane przynajmniej w skali półprodukcyjnej, muszą być wytwarzane na drodze takiej samej syntezy, przy zastosowaniu takiej samej procedury, jak w procesie końcowym (tzn. normalna skala wytwarzania). Dane na temat stabilności szarży laboratoryjnych API można użyć tylko jako dane pomocnicze. Materiał do badań stabilności musi być przechowywany w pojemniku zamkniętym, który jest taki sam lub naśladuje opakowanie zaprojektowane do magazynowania i dystrybucji produktu gotowego. Testowanie obejmuje właściwości API (fizyczne, chemiczne, biologiczne i mikrobiologiczne), które są wrażliwe na zmiany w czasie magazynowania i które mogą mieć wpływ na jej jakość, bezpieczeństwo i skuteczność. Do określenia stabilności stosowane są zwalidowane procedury testowania. Kryteria akceptacji stanowią limity zanieczyszczeń i produkty rozpadu pochodzące z szarży zastosowanych w badaniach klinicznych i przedklinicznych. Częstotliwość testowania musi być odpowiednia do ustalenia profilu stabilności API i najczęściej jest następująco zaplanowana:

- magazynowanie długookresowe (minimalny okres do ponownego testowania 12 miesięcy)
  - co 3 miesiące w 1 roku

- co 6 miesięcy w 2 roku
- następnie raz na rok
- magazynowanie przyspieszone
  - minimum 3 czasy testowania (np. 0, 3, i 6 miesięcy)
  - jeżeli spodziewamy się zmian (na podstawie badań z rozwoju), wykonuje się testowanie kolejnych prób na końcu przedziału czasowego lub wprowadza się czwarty czas testowania
- magazynowanie średniookresowe (przy załamaniu stabilności w warunkach przyspieszonego magazynowania); przynajmniej 4 czasy testowania (np. 0, 6, 9 i 12 miesięcy).

Testowanie API wymagane jest z uwagi na stabilność w określonych warunkach magazynowania (stabilność temperatury, ewentualnie stabilność przy zwiększonej wilgotności) (Tabela 5). Warunki magazynowania i czas trwania wybranych badań muszą być takie, aby objęły magazynowanie, transport i następnie użycie. Warunki magazynowania, w jakich wykonuje się badania długookresowe, stają się warunkiem dla czasu ponownego testowania (minimalnie 12 miesięcy) i są wykorzystane przy oznakowaniu produktu. Dane z warunków magazynowania przyspieszonego lub średniookresowego, mogą być wykorzystane do oceny skutków krótkookresowych odchyień (do jakich może dojść w trakcie transportu).

Tabela 5. Testy stosowane w badaniu trwałości substancji do celów farmaceutycznych

Ogólny przykład dla substancji leczniczych			
Badania	Warunki magazynowania		Minimalny przedział czasu
Długookresowe	25°C ± 2°C	60% ± 5% RH	12 miesięcy
	30°C ± 2°C	65% ± 5% RH	
Średniookresowe	30°C ± 2°C	65% ± 5% RH	6 miesięcy
Przyspieszone	40°C ± 2°C	75% ± 5% RH	6 miesięcy

W czasie badań stabilności może dojść do istotnej zmiany stabilności, zdefiniowanej jako niezgodność ze specyfikacją.

W przypadku substancji leczniczych, które planuje się przechowywać w zamrażarce, okres ponownego testowania musi być określony na podstawie danych uzyskanych z badań długookresowych. Musi być jednak wykonane testowanie jednej szarży w podwyższonej temperaturze (np. 5°C ± 3°C lub 25°C ± 3°C), które ma symulować zastosowanie API znajdującej się poza deklarowanymi warunkami magazynowania. Jeżeli planuje się

magazynowanie API w temperaturze poniżej  $-20^{\circ}\text{C}$ , zawsze zaleca się przeprowadzenie indywidualnych testów stabilności.

### *Produkt leczniczy*

Zaplanowanie formalnego badania stabilności leku musi opierać się na wiedzy o API i na doświadczeniach z badań klinicznych. Muszą być sformułowane prawdopodobne zmiany w czasie magazynowania i uzasadniony wybór wszystkich atrybutów stabilności.

Ponadto wymagane jest przekazanie danych z formalnych testów stabilności przynajmniej dla 3 szarzy leku. Dwie spośród trzech szarzy muszą być przynajmniej pilotażowe, trzecia szarża może być mniejsza (np. 25 do 50 tys kapsułek lub tabletek). Proces wytwarzania zastosowany dla pierwszych szarzy musi symulować proces, jaki będzie stosowany przy szarzach produkcyjnych i musi prowadzić do otrzymania produktu o takiej samej specyfikacji. O ile to możliwe, szarże leku powinny być wytworzone z różnych szarzy API. Dla formalnych testów stabilności nie są dopuszczalne szarże laboratoryjne. Do wspierania badań stabilności można przedstawić dane dotyczące produktów leczniczych o podobnym składzie.

Testowanie stabilności musi być wykonane z lekiem przechowywanym w opakowaniu ostatecznym. Testowanie leku bez ochrony może być elementem testów obciążeniowych i oceny opakowania. Aby uzasadnić właściwość wyboru opakowania można także wykonywać testowanie w innych materiałach opakowaniowych.

Zakres testowania obejmuje właściwości fizyczne, chemiczne, biologiczne i mikrobiologiczne produktu, zawartość dodatków konserwujących i przeciwutleniaczy oraz testy funkcjonowania (np. systemów dozujących), które są wrażliwe na zmiany w czasie magazynowania i które prawdopodobnie mogą mieć wpływ na jakość, bezpieczeństwo lub skuteczność. Do określenia stabilności produktu leczniczego muszą być stosowane zwalidowane procedury testowania.

Kryteria akceptacji muszą być powiązane z limitami obowiązującymi przy zwalnianiu, przy czym muszą być także uwzględnione dostępne informacje o stabilności. Kryteria akceptacji przez cały okres ważności (*shelf-life*) mogą różnić się od kryteriów zwalniania (*releasing*), co musi być udokumentowane poprzez ocenę stabilności i zmian obserwowanych w czasie magazynowania.

Każdą różnicę limitu dla substancji konserwującej w specyfikacjach *shelf-life* i *releasing* należy udokumentować poprzez sprawdzenie zależności stężenia i skuteczności konserwacji

w trakcie rozwoju końcowej postaci leku, gdy badanie skuteczności jest wykonywane przy stężeniu na dolnej granicy *shelf-life* lub niższym.

Przy ustalaniu maksymalnych limitów dla produktów rozpadu należy uwzględnić ich stężenie w produktach użytych do testów klinicznych i przedklinicznych.

Określenie limitów dla wielkości cząstek, uwalniania musi opierać się na wynikach badań biodostępności lub badań klinicznych.

Częstotliwość testowania musi być odpowiednia do ustalenia profilu stabilności leku (Tabela 6). Zwykle częstotliwość testowania przedstawia się następująco:

- magazynowanie długookresowe (minimalny okres ważności 12 miesięcy)
  - co 3 miesiące w 1 roku
  - co 6 miesięcy w 2 roku
  - następnie raz na rok
- magazynowanie przyspieszone
  - minimum 3 czasy testowania
  - w przypadku spodziewanych zmian wykonuje się testowanie kolejnych prób na końcu przedziału czasowego lub wprowadza się czwarty czas testowania
- magazynowanie średniookresowe (przy załamaniu stabilności w warunkach przyspieszonego magazynowania); przynajmniej 4 czasy testowania

Ocena produktu musi odbywać się w określonych warunkach magazynowania, w których można sprawdzić jego stabilność w danej temperaturze oraz w warunkach podwyższonej wilgotności. W przypadku produktów płynnych w pojemnikach półprzepuszczalnych ocenia się możliwość ubytku rozpuszczalnika. Warunki magazynowania i czas trwania wybranych badań muszą odpowiadać magazynowaniu, transportowi i następnie używaniu (Tabela 6).

Warunki magazynowania, w jakich wykonuje się długookresowe badania, wybiera wnioskodawca, w zależności od charakteru produktu. Stają się one podstawą dla czasu ponownego testowania i są wykorzystane przy oznakowaniu produktu. Dane z przyspieszonego lub średniookresowego starzenia mogą być wykorzystane do oceny skutków krótkookresowych odchyień.

Za stabilny uznawany jest lek, który w czasie długookresowych badań stabilności odpowiada specyfikacji i w czasie przyspieszonych badań stabilności nie dochodzi do **istotnej zmiany** w stabilności, za którą uważa się:

- 5% zmianę mocy
- każdy produkt rozpadu przekraczający kryterium akceptacji

- niedotrzymanie kryteriów akceptacji wyglądu, właściwości fizycznych i testu funkcjonalności
- pH przekraczające kryteria akceptacji
- uwalnianie dla 12 jednostkowych dawek poza kryteriami akceptacji

Tabela 6. Testy stosowane w badaniu trwałości produktów leczniczych

Ogólny przykład dla leków			
Badania	Warunki magazynowania		Minimalny przedział czasu
Długookresowe	25°C ± 2°C	60% ± 5% RH	12 miesięcy
	30°C ± 2°C	65% ± 5% RH	
Średniokresowe	30°C ± 2°C	65% ± 5% RH	6 miesięcy
Przyspieszone	40°C ± 2°C	75% ± 5% RH	6 miesięcy

Jeżeli w trakcie sześciomiesięcznego magazynowania dojdzie do istotnej zmiany w testach przyspieszonych, należy wówczas wykonać dodatkowe testowanie w warunkach badań średniokresowych.

Wrażliwość na wilgoć lub możliwość ubytku rozpuszczalnika nie jest brana pod uwagę w produktach w pojemnikach, stanowiących barierę dla przenikania wilgoci lub rozpuszczalnika. Stąd też badania stabilności produktów w nierozpuszczalnych pojemnikach mogą być wykonywane przy dowolnej wilgotności względnej.

Roztwory wodne pakowane w pojemniki półprzepuszczalne, oprócz badań stabilności chemicznych, fizycznych, biologicznych i mikrobiologicznych muszą być badane także na ubytek wody. Oceny należy dokonać w warunkach z niższą wilgotnością względną. W przypadku produktów z rozpuszczalnikami innymi niż woda, muszą być opracowane i zastosowane odpowiednie procedury porównawcze.

Dla substancji leczniczych, które planuje się przechowywać w zamrażarce, okres ponownego testowania musi być określony na podstawie realnych danych uzyskanych w badaniach długookresowych. Musi być jednak wykonane testowanie jednej szarży w podwyższonej temperaturze, które będzie symulować zastosowanie leku będącego w innych warunkach niż deklarowane.



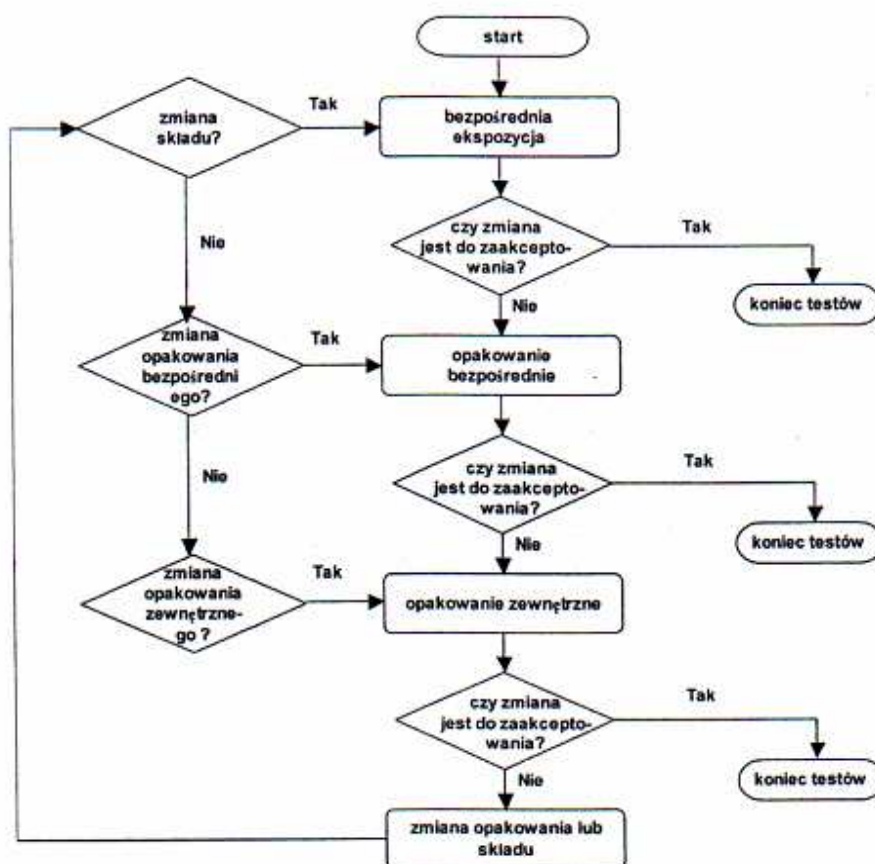
## Testowanie fotostabilności

Nieodłączną częścią testów obciążeniowych nowych API oraz leków jest testowanie fotostabilności (*stress testing*), wykonywane zwykle tylko dla jednej wybranej szarży. Celem tego badania jest wykazanie, że poddanie produktu niekorzystnemu działaniu światła nie spowoduje zmian jakości niemożliwych do zaakceptowania. Testy muszą być powtarzane przy wprowadzaniu wszelkich zmian mogących wpłynąć na stabilność.

Testowanie fotostabilności powinno obejmować badania API i leków bez opakowania bezpośredniego, ewentualnie także leku zapakowanego w opakowanie bezpośrednie i zewnętrzne.

Zakres testowania w przypadku leków musi być ustalony po dokonaniu oceny możliwych do zaakceptowania zmian, które zauważono na końcu ekspozycji na światło.

Typowy schemat postępowania przy testowaniu fotostabilności przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat postępowania przy testowaniu fotostabilności substancji i produktów leczniczych [116].

Używane są następujące źródła światła:

- żarówka ksenonowa lub odpowiednia lampa metalohalogenowa, tworząca sztuczne światło dzienne, łączące światło widzialne i UV, podobne do standardu emisji D65/ID65 (według norm ISO 10977)
- ekspozycja z użyciem dwóch żarówek dla:
  - zimnego białego światła (zblizonego do standardu ISO 10977)
  - zbliżone do promieniowania UV (320–400 nm)

Próbki muszą być ekspozowane wspólnie z walidowanym systemem chemicznym do mierzenia intensywności promieniowania (dla promieniowania UV 2% roztwór chlorowodoru chininy) lub promieniowanie jest monitorowane skalibrowanym radiometrem/luksometrem. W celu wyeliminowania wpływu temperatury, urządzenie do testowania musi być wyposażone w regulator temperatury lub używa się porównania z „dark control”, (tzn. z próbką badaną ekspozowana jest chroniona próbka, zapakowana np. w folię aluminiową).

Testowanie fotostabilności API składa się z 2 części:

- przyspieszony test degradacji
- test sprawdzająco/potwierdzający

Celem przyspieszonego testu degradacji jest dokonanie oceny wrażliwości na światło API dla potrzeb rozwoju lub wyjaśnienia sposobu jej degradacji. Musi on obejmować samą substancję i/lub jej roztwory/zawiesiny. W celu wyznaczenia limitów ekspozycji wykorzystywane są warunki, po zastosowaniu których dochodzi do rozpadu produktu (w przypadku stabilnych substancji test jest zakończony po osiągnięciu odpowiedniego poziomu ekspozycji).

Celem badań potwierdzających (test sprawdzająco/potwierdzający) jest uzyskanie danych dotyczących magazynowania, pakowania, oznakowania, lub czy konieczne jest podejmowanie działań zapobiegawczych przy wytwarzaniu substancji lub leku. Zazwyczaj testowanie i sprawdzanie fotostabilności obejmuje tylko jedną szarżę. Zakłada się, że API jest stabilna lub wyraźnie niestabilna. W przypadku niejednoznacznych wyników musi być wykonane testowanie dwóch kolejnych szarży. Próbki substancji w stanie stałym muszą być umieszczone w odpowiednich pojemnikach (szkło, plastik), w warstwie maksymalnie 3 mm grubości. Substancje płynne umieszczone są w obojętnych chemicznie, przezroczystych opakowaniach. Ponadto należy zwrócić uwagę na chłodzenie lub zastosowanie opakowań zamkniętych (zminimalizowanie sublimacji, parowania lub topnienia). Po ekspozycji próby muszą być przetestowane w celu stwierdzenia zmian właściwości fizycznych (np. wygląd, zabarwienie)

oraz musi być określona zawartość i ewentualne produkty rozpadu. Wyniki należy porównać z próbą chronioną.

Testy fotostabilności leków wykonywane są dla produktu bez opakowania, leku w opakowaniu bezpośrednim oraz ewentualnie w opakowaniu handlowym. Zakończenie badań ma miejsce na etapie wykazania wystarczającej ochrony leku przed działaniem światła. Faza testowania i sprawdzania obejmuje z reguły jedną szarżę. Procedura ta jest odpowiednia, o ile lek jest stabilny na działanie światła lub całkowicie niestabilny. W przypadku wyników niejednoznacznych testowane są dwie kolejne szarże. Jeżeli lek posiada opakowanie zupełnie nieprzepuszczalne dla światła (np. tuby aluminiowe/blaszane), testowanie może być zakończone po ekspozycji produktu bez ochrony. W przypadku takich leków jak płyny infuzyjne czy preparaty dermatologiczne zasadne może być także sprawdzenie ich fotostabilności w warunkach *in-use*. Jeżeli testowany jest lek nie chroniony opakowaniem bezpośrednim, próby powinny być ułożone w sposób umożliwiający maksymalną ekspozycję powierzchni. Jeżeli bezpośrednia ekspozycja nie jest możliwa (z uwagi na zagrożenie utlenieniem), próbę należy umieścić w odpowiednim opakowaniu ochronnym, ale przepuszczającym światło (np. szkło bezbarwne). Próbki powinny być ułożone ukośnie w stosunku do źródła światła, gdyż zapewnia to maksymalną jednorodność ekspozycji. Istotne jest również chłodzenie czy wykorzystanie opakowań zamkniętych, celem zminimalizowania sublimacji, parowania i topnienia. Po ekspozycji próbki poddawane są badaniu na zmiany właściwości fizycznych (np. wygląd, przezroczystość, zabarwienie) oraz testom uwalniania/kruszenia. Ustalana jest także zawartość produktów rozpadu, zaś wszystkie wyniki porównywane są następnie z *dark control*. Testowanie wykonywane jest na reprezentatywnej części/liczbie eksponowanych prób (np. 20 tabletek lub kapsułek). W przypadku produktów niehomogennych (np. kremy, maści, zawiesiny), procedury uzupełniane są także badaniem homogenności i rozpuszczalności.

Uzyskane dane służą do zaprojektowania odpowiedniego opakowania, ustalenia warunków magazynowania i wyboru prawidłowego oznakowania w celu ochrony przed skutkami działania światła.

### *Zredukowany plan badań stabilności bracketing i matrixing*

Spełnienie wszystkich wymogów badań stabilności skutkuje zazwyczaj nagromadzeniem dużej ilości testowanych próbek. Zastosowanie zredukowanego planu badania stabilności, typu *bracketing* czy *matrixing*, umożliwia zmniejszenie liczby próbek i kosztów badań, przy jednoczesnym uzyskaniu informacji wystarczających do udokumentowania stabilności leków.

Zastosowanie zredukowanej ilości badań stabilności jest możliwe tylko przy takich typach leków gotowych lub API, które niewiele różnią się.

*Bracketing* jest planem badań stabilności, w którym w każdym przedziale czasowym badane są tylko graniczne próby, np. tylko największa i najmniejsza moc leku lub/i wielkość opakowania. Stabilność badanych prób powinna reprezentować stabilność wszystkich pozostałych dawek i/lub wielkości opakowań.

*Bracketing* nie jest możliwy do wykonania, jeżeli w recepturze leków różnych mocy są zastosowane różne substancje pomocnicze. Tego typu badania nie można stosować w ocenie stabilności API.

*Matrixing* jest statystycznym zaplanowaniem badań stabilności tak, aby w określonym przedziale czasowym były badane tylko określone serie produktu, a w następnym przedziale czasowym inne serie z ogólnej ilości serii. Przewiduje się, że stabilność badanych prób reprezentuje stabilność wszystkich serii.

*Matrixing* odróżnia od bracketingu fakt, że w tym samym zakresie są badane wszystkie dawki, typy i wielkości opakowania i żadne warianty nie są badane oddzielnie.

*Matrixing* można zastosować tylko w przypadku, gdy wspomagające dane o stabilności potwierdzają odpowiednią stabilność produktu i wykazują tylko małą zmienność. Średni poziom zmienności danych prowadzi do konieczności uzasadnienia statystycznego. Przy dużej zmienności nie można zastosować tej metody.

### *Stabilność leków in-use*

Celem badań stabilności *in-use* jest wykazanie, że lek po przygotowaniu (rozcieńczeniu/rekonstruowaniu) lub raz otwarte opakowanie z lekiem o większej liczbie dawek, odpowiada wymaganiom specyfikacji przez cały zatwierdzony okres. Istnieje bowiem zagrożenie, że w przypadku ponownego otwierania i zamykania opakowania może dojść do zanieczyszczenia mikrobiologicznego lub też zmian fizycznych, bądź chemicznych.

Badanie wykonuje się minimum dla 2 szarzy pilotażowych, z których przynajmniej jedna powinna zbliżyć się do końca *shelf-life* okresu ważności. W przypadku większej liczby mocy czy wielkości opakowań, wybrana forma powinna być najbardziej podatna na zmiany. Badania mają w najwyższym stopniu symulować stosowanie leku w praktyce. Testowanie należy wykonać nie tylko pod koniec okresu ważności, ale i w kilku innych punktach testowania. Do najczęściej badanych parametrów należą:

- fizyczne – zabarwienie, przezroczystość, szczelność opakowania, wielkość cząstek

- chemiczne – zawartość API, zawartość substancji konserwujących i przeciwutleniaczy, poziom produktów rozpadu
- mikrobiologiczne – ogólna zawartość mikroorganizmów lub jałowość

Specyficznym rodzajem stabilności *in-use* jest określenie maksymalnego terminu ważności leków jałowych po pierwszym otwarciu lub rekonstytucji. W przypadku leków jałowych z dodatkiem środków przeciwbakteryjnych lub autosterylnych, wnioskujący o rejestrację powinien dołączyć wyniki badań stabilności mikrobiologicznej, dla określonej liczby dni, przy określonej temperaturze. W przypadku leków jałowych bez substancji konserwujących, na opakowaniu powinna być zamieszczona informacja, że jeżeli lek nie zostanie natychmiast wykorzystany, za czas i warunki przechowywania w pełni odpowiada użytkownik.

## 2.6. Wybrane metody stosowane w analizie daunorubicyny

W tabeli 7 przedstawiono wybrane parametry rozdzielania metody HPLC, stosowane w analizie daunorubicyny oraz innych antracyklin.

Tabela 7. Porównanie wybranych parametrów metod HPLC stosowanych w analizie daunorubicyny oraz innych antracyklin [5–9, 11–12, 18–20, 24–26].

Parametry rozdziału	Zastosowanie metody, piśmiennictwo
<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Lichrospher RP 18, 125 mm x 4 mm I.D., 5 µm; prekolumna Lichrocart 4–4 100 RP 18, 5 µm</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> metanol, mieszanina 2 ml kwasu octowego z 248 ml wody (52:48, V/V)</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 0,7 ml/min</p> <p><i>Detekcja spektrofotometryczna:</i> 230 nm</p> <p><i>Wprowadzenie:</i> 20 µl</p> <p><i>Substancje do badań:</i> etopozyd, cytarabina i daunorubicyna</p>	<p>Ocena trwałości i kompatybilności mieszaniny leków przeciwnowotworowych: etopozydu, cytarabiny i daunorubicyny</p> <p>[24]</p>
<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> MCH–10 Micropak, 30 cm x 4 mm RP 18; temperatura pokojowa</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> układ gradientowy: faza A – fosforan sodu (10 mmol/l), 3% acetonitryl (V/V); faza B – 100% acetonitryl</p> <p><i>Detekcja spektrofotometryczna:</i> 235 nm</p> <p><i>Wprowadzenie:</i> 50 µl</p> <p><i>Substancje do badań:</i> cytarabina, daunorubicyna, etopozyd</p>	<p>Ocena trwałości i kompatybilności daunorubicyny, cytarabiny i etopozydu w warunkach <i>in vitro</i></p> <p>[8]</p>

<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Hypersil ODS C 18, 100 x 4,6 mm I.D. 5 µm; prekolumna Hypersil ODS C18 20 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm; temperatura pokojowa</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> acetonitryl, bufor mrówczanowy pH = 4,0 (45:55, V/V)</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 2,0 ml/min</p> <p><i>Detekcja fluorymetryczna:</i> 254 nm (wzbudzenie), 565 nm (emisja)</p> <p><i>Substancje do badań:</i> dokсорubicyna, epirubicyna, daunorubicyna i pirarubicyna; 5% roztwór glukozy i 0,9% roztwór chlorku sodu – jako płyny infuzyjne</p>	<p>Ocena trwałości i kompatybilności czterech antracyklin: dokсорubicyny, epirubicyny, daunorubicyny i pirarubicyny</p> <p>[4]</p>
<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Hypersil ODS RP 18,10 cm x 4,6 mm I.D., 5 µm; temperatura pokojowa</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> acetonitryl, woda</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– 40:60, V/V dokсорubicyna</li> <li>– 55:45, V/V daunorubicyna</li> <li>– 50:50, V/V epirubicyna</li> </ul> <p>Do każdego litra fazy ruchomej dodano 10 kropli dimetyloaminy, a następnie doprowadzono do pH = 2,5 10% kwasem fosforowym</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 1,4 ml/min (dokсорubicyna), 1,5 ml/min (daunorubicyna), 1,3 ml/min (epirubicyna)</p> <p><i>Detekcja spektrofotometryczna:</i> 290 nm</p> <p><i>Wprowadzenie:</i> 10 µl</p> <p><i>Substancje do badań:</i> dokсорubicyna, daunorubicyna i epirubicyna, Adriamycyna, Pharmorubicyna i Cerubidyna</p>	<p>Ocena trwałości dokсорubicyny, daunorubicyny i epirubicyny w opakowaniach z PVC</p> <p>[7]</p>
<p>Parametry rozdzielania jak wyżej</p>	<p>Ocena stopnia fotodegradacji dokсорubicyny, daunorubicyny i epirubicyny</p> <p>[12]</p>
<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Lichrosorb RP 8, 30 cm x 3,9 mm I.D., 10 µm; prekolumna Hypersil ODS C 18 20 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm; temperatura pokojowa</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> 0,02 mol/l roztwór chlorku sodu doprowadzony do pH = 2,0 kwasem nadchlorowym, acetonitryl (40:60, V/V)</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 1,5 ml/min</p> <p><i>Wprowadzenie:</i> 40 µl</p> <p><i>Detekcja:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– spektrofotometryczna: 280 nm, 546 nm</li> <li>– fluorymetryczna: 465 nm (wzbudzenie), 550 nm (emisja)</li> </ul> <p><i>Substancje do badań:</i> chlorowodorek daunorubicyny oraz 7-8,9-10-bisanhydrodaunorubicynon (produkt degradacji chlorowodoru daunorubicyny)</p>	<p>Badanie procesu degradacji daunorubicyny w roztworach wodnych</p> <p>[18]</p>
<p>Parametry rozdzielania jak wyżej</p> <p><i>Detekcja:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– spektrofotometryczna: 254 nm, 280 nm</li> <li>– fluorymetryczna: 465 nm (wzbudzenie), 550 nm (emisja)</li> </ul> <p><i>Substancje do badań:</i> chlorowodorek daunorubicyny, 7-deoksydaunorubicynon, 7,8-9,10-bisanhydrodaunorubicynon (produkty degradacji chlorowodoru daunorubicyny)</p>	<p>Charakterystyka produktów degradacji daunorubicyny</p> <p>[20]</p>

<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Lichrosorb RP 8, 30 cm x 3,9 mm I.D., 10 µm; prekolumna Lichrosorb RP 8 12,5 cm x 4,0 mm I.D., 5 µm; temperatura pokojowa</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> 0,01 mol/l roztwór chlorku sodu (pH = 2,25), acetonitryl (70:30, V/V doksorubicyna; 60:40, V/V daunorubicyna)</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 1,0 ml/min</p> <p><i>Wprowadzenie:</i> 20 µl</p> <p><i>Detekcja:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- spektrofotometryczna: 480 nm</li> <li>- fluorymetryczna: 465 nm (wzbudzenie), 550 nm (emisja)</li> </ul> <p><i>Substancje do badań:</i> chlorowodorek daunorubicyny, chlorowodorek doksorubicyny, chlorowodorek karubicyny, 4'-epidokso-<i>rubicyna</i>, 4'-deoksydaunorubicyna, 4-demetoksydaunorubicyna</p>	<p>Ocena wpływu kompleksów z cyklodekstryną na trwałość dokso-<i>rubicyny</i> i daunorubicyny w roztworach wodnych</p> <p>[9]</p>
<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Lichrosorb RP 8, 30 cm x 3,9 mm I.D., 10 µm; temperatura pokojowa</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> acetonitryl, woda (50:50, V/V), mieszanina doprowadzona do pH = 2,0 kwasem nadchlorowym</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,5 ml/min dla dokso-<i>rubicyny</i> i daunorubicyny</li> <li>- 2,0 ml/min dla pozostałych antracyklin</li> </ul> <p><i>Wprowadzenie:</i> 15–50 µl</p> <p><i>Detekcja spektrofotometryczna:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 254 nm, 436 nm – 4-demetoksydaunorubicyna</li> <li>- 254 nm, 546 nm – pozostałe antracykliny</li> </ul> <p><i>Substancje do badań:</i> Adriblastyna (10 mg liofilizowanej dokso-<i>rubicyny</i> i 50 mg laktozy) oraz Cerubidyna (20 mg daunorubicyny i 100 mg D-mannitolu); chlorowodorki: 4'-epidokso-<i>rubicyny</i>, 4'-O-metylodokso-<i>rubicyny</i>, 4'-deoksydokso-<i>rubicyny</i>, 4-demetoksydaunorubicyny</p>	<p>Ocena trwałości antracyklin w płynach infuzyjnych</p> <p>[25]</p>
<p>- Metoda 1 (normalny układ faz)</p> <p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Lichrosorb Si-60</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> chloroform, metanol, kwas octowy, 0,3 mmol/l roztwór chlorku magnezu (720:210:40:30, V/V/V/V)</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 1,5 ml/min</p> <p>- Metoda nr 2 (odwrócony układ faz)</p> <p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> µBondapak-phenyl</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> bufor mrówczanowy o pH = 4,0, acetonitryl (35:65, V/V)</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 2,0 ml/min</p> <p><i>Detekcja fluorymetryczna:</i> λ = 480 nm (wzbudzenie), λ = 560 nm (emisja)</p> <p><i>Substancje do badań:</i> preparaty dokso-<i>rubicyny</i>, daunorubicyny, daunorubicynolu oraz aglikonu 7-hydroksydaunorubicyny</p>	<p>Porównanie procesu rozkładu dokso-<i>rubicyny</i> i daunorubicyny w płynach biologicznych człowieka i królika</p> <p>[26]</p>
<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Symmetry C 18, 3,5 µm, I.D.</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> 5 mmol/l roztwór mrówczanu amonowego o pH=3,0, acetonitryl (70:30, V/V)</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 50 µl/min</p> <p><i>Substancje do badań:</i> daunorubicyna, daunorubicynol, epirubicyna, dokso-<i>rubicyna</i>, dokso-<i>rubicynol</i> oraz idarubicyna</p>	<p>Oznaczanie czterech antracyklin i trzech metabolitów w materiale biologicznym metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas</p> <p>[19]</p>

<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Luna C 18, I.D. (5 µm), temperatura 25°C</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> woda, acetonitryl, kwas octowy (80:19:1, V/V/V), pH=3,0</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 0,1 ml/min</p> <p><i>Wprowadzenie:</i> 20 µl</p> <p><i>Detekcja fluorometryczna:</i> λ= 505 nm (wzbudzenie), λ= 550 nm (emisja)</p> <p><i>Substancje do badań:</i> chlorowodorek dokсорubicyny oraz chlorowodorek daunomycyny</p>	<p>Zastosowanie prostej metody HPLC w analizie dokсорubicyny</p> <p>[11]</p>
<p><i>Kolumna chromatograficzna:</i> Lichrosorb RP 8, 30 cm x 3,9 mm I.D., 10 µm; temperatura pokojowa (25°C)</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> acetonitryl, woda (50:50, V/V), mieszanina doprowadzona do pH = 2,0 kwasem nadchlorowym</p> <p><i>Szybkość przepływu:</i> 1,5 ml/min</p> <p><i>Wprowadzenie:</i> 20 µl</p> <p><i>Detekcja:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- spektrofotometryczna: 440 nm</li> <li>- fluorometryczna: 465 nm (wzbudzenie), 550 nm (emisja)</li> </ul> <p><i>Substancje do badań:</i> dokсорubicyna, daunorubicyna, 4'-deoksydokсорubicyna, 4'-O-metylodokсорubicyna, 4'-epidokсорubicyny, dokсорubicynol, 4-demetoksydaunorubicyna oraz karminomycyna</p>	<p>Ocena trwałości dokсорubicyny oraz siedmiu innych antracyklin w roztworach o odczynie kwasowym</p> <p>[5]</p>

W ocenie jakości antracyklin stosowano także między innymi:

- metodę elektroforezy kapilarnej [15]
- metodę TLC [5, 20]
- spektrometrię mas [16]
- metodę spektrofotometryczną [8, 14]
- metodę spektrofluorofotometryczną [17]



### 3. Cel pracy

---

Jeden z elementów kompleksowej oceny jakości substancji leczniczych stanowią badania trwałości, które są regulowane odpowiednimi przepisami. Celem podjętych przeze mnie badań była ocena trwałości pochodnej daunorubicyny, modyfikowanej w pozycji C3' daunozaminy - *N*-[(pirolidyno)metyleno] daunorubicyny (PMD) w roztworach wodnych. Dodatkowo postanowiono zbadać trwałość PMD w fazie stałej. Do oceny zmian stężenia badanej pochodnej zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie odwróconych faz, z detekcją UV.

Dla zrealizowania założeń celu koniecznym było:

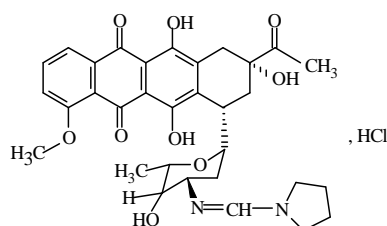
- opracowanie metody HPLC, umożliwiającej śledzenie zmian stężenia substratu w obecności produktów rozkładu i wzorca wewnętrznego
- przeprowadzenie walidacji metody, obejmującej selektywność, liniowość, precyzję, granicę wykrywalności i oznaczalności metody
- przeprowadzenie badań kinetycznych, obejmujących ogólną i właściwą katalizę kwasowo-zasadową
  - wpływ stężenia jonów wodorowych
  - wpływ rodzaju i stężenia składników buforów
  - wpływ siły jonowej
- przeprowadzenie interpretacji
  - ogólnej i właściwej katalizy kwasowo-zasadowej i wyznaczenie katalitycznych stałych szybkości reakcji cząstkowych
  - wpływu temperatury na szybkość rozkładu
  - wpływu siły jonowej na szybkość rozkładu
- określenie trwałości PMD w powszechnie stosowanych roztworach do podania parenteralnego
- określenie fotostabilności PMD w roztworach wodnych.



## 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

---

### 4.1. Substancja do badań



Chlorowodorek *N*-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyny (PMD); Instytut Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie.

*Postać:* czerwony, krystaliczny proszek.

### 4.2. Odczynniki

- Acetonitryl, chromatograficznie czysty; Merck Darmstadt, Niemcy
- Chininy chlorowodorek; Sigma Aldrich, cz.d.a. – wzorzec wewnętrzny
- Kwas borowy, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Kwas octowy, odważka analityczna; POCH Gliwice
- Kwas ortofosforowy(V), 85%, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Kwas solny, odważka analityczna; POCH Gliwice
- Metanol, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Potasu diwodorofosforan, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Sodu chlorek; POCH Gliwice
- Sodu edetynian (Na<sub>2</sub>EDTA), cz.d.a.; POCH Gliwice
- Sodu laurylosiarczan, cz.d.a.; Sigma - Aldrich, Niemcy
- Sodu octan, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Sodu wodorotlenek, odważka analityczna; POCH Gliwice
- Woda demineralizowana z aparatu do demineralizacji wody USF T – 801 965/8903
- Roztwory do podania parenteralnego (Tabela 8)

Tabela 8. Roztwory do podania parenteralnego

L.p	Rodzaj roztworu	Skład	Producent	V [ml]
1.	Aqua pro injectione	Woda do wstrzykiwań 5 ml	Polfarma	5
2.	0,9% Roztwór chlorku sodu	Sodu chlorek 0,9 g Woda do wstrzykiwań do 100,0 ml	Polfarma	5
3.	5% Glucosum	Glukoza 50g Woda do wstrzykiwań do 1000,0 ml	Fresenius Kabi	100
4.	Injectio Glucosi 10%	Glukoza 10,0 g Woda do iniekcji do 1000,0 ml	Baxter Terpol	250
5.	Injectio Glucosi 20%	Glukoza bezwodna 200,0 g Woda do iniekcji do 1000,0 ml	Barter Terpol	250
6.	Injectio Solutionis Ringeri	Sodu chlorek 8,60 g/l Potasu chlorek 0,30 g/l Wapnia chlorek 0,48 g/l Woda do wstrzykiwań do 1000,0ml	Baxter Terpol	250
7.	Solutio Ringeri Lactate	Sodu chlorek 6,01 g Potasu chlorek 0,30 g Wapnia chlorek $\times 6H_2O$ 0,2988 g (lub wapnia chlorek) 0,151 g Sodu mlecyan 3,10 g Woda do wstrzykiwań do 1000,0 ml	Fresenius Kabi	500
8.	Glucosum 5% et Natrium chloratum 0,9% (1:1)	Glukoza 25,0 g/l Sodu chlorek 4,5 g/l	Fresenius Kabi	250
9.	Glucosum 5% et Natrium chloratum 0,9% (2:1)	Glukoza 33,3 g/l Sodu chlorek 3,0 g/l	Fresenius Kabi	250
10.	Płyn pediatryczny wyrównawczy	Sodu chlorek 6,02 g/l Potasu chlorek 0,30 g/l Wapnia chlorek 0,30 g/l Sodu octan 3,67 g/l Woda do wstrzykiwań do 1000,0 ml	Baxter Terpol	250
11.	Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	Sodu chlorek 575 mg Sodu octan 279 mg Sodu cytrynian 79 mg Wapnia chlorek 20 mg Potasu chlorek 38 mg Magnezu chlorek 9 mg Woda do wstrzykiwań do 100 ml	Fresenius Kabi	250
12.	Jonosteril® Basic z glukozą	Sodu chlorek 1,70 g Sodu mlecyan 2,24 g (w postaci 50% r-ru) 4,48 g Potasu wodorofosforan 1,35 g Magnezu chlorek sześciowodny 0,51 g Glukoza 50,0 g (W post. glukozy jednowodnej) 55,0 g Woda do iniekcji do 1000,0 ml	Fresenius Kabi	500
13.	Mannitol 20%	Mannitol 200,0 g Woda do wstrzykiwań do 1000,0 ml	Fresenius Kabi	100

### 4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy

- Wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC Shimadzu:
  - detektor Shimadzu SPD - 20A prominence UV/VIS DETECTOR
  - dozownik z pętlą dozującą Rheodyne Berkeley 7120
  - integrator komputerowy POL LAB Chroma wersja 2006
  - komputer Fujitsu Siemens
  - pompa Shimadzu LC - 20AT prominence LIQUID CHROMATOGRAPH
  - termostat Shimadzu CTO - 10AS VP COLUMN OVEN
- Spektrofotometr UV-160A Shimadzu, z oprogramowaniem *PC160 Plus*
- Radiometr typ VLX-3W z sensorem CX-365, *Vilber Lourmat*
- Wysokociśnieniowa lampa UV-VIS z palnikiem rtęciowym, HBO-50, *Narva*
- Zestaw lamp odpowiadających standardowi D-65
- Waga analityczna Sartorius BP210S
- pH-metr Elmetron CP - 401
- Aparat do demineralizacji wody USF T - 801 965/8903; kolumna jonowymienna Seradest USF 800 z węzłem połączeniowym, komorą pomiarową, konduktorem diodowym LSM i dystrybutorem
- Ultratermostat Fisherbrand FBH - 612
- Mikrostrzykawka 50 µl Microliter Hamilton Co.: Reno Nevada. USA
- Mieszadło REAX top 541
- Lodówka z zamrażalnikiem Polar typ TS136U wersja 638
- Igły Micropoint 1,6 × 40 mm MIFAM S.A. Milanówek, Polska
- Strzykawki 10 ml Romed Holland
- Ampułki polietylenowe, Polpharma
- Kuwety okrągłe kwarcowe do naświetlań o poj. 2,8 ml i grubości warstwy l = 1 cm oraz kuwety podłużne kwarcowe do naświetlań o poj. 2,5 ml i grubości warstwy l = 1 cm, *Hellma*;
- Filtr szklany 365 nm oraz 510 nm, *Pyrex*
- Stoper
- Pakiet programów MsOffice
- Program Chem-Draw

#### 4.4. Metoda analityczna stosowana w ocenie trwałości *N*-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyny (PMD) w roztworach wodnych

Do oceny trwałości PMD wykorzystano metodę HPLC, która umożliwia oznaczanie zmian stężenia substancji w czasie reakcji rozkładu w roztworach wodnych [118]. Zastosowano następujące parametry rozdzielania chromatograficznego:

- *kolumna*: LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) o wymiarach 125 x 4 mm, Merck Darmstadt, Niemcy
- *faza ruchoma*: acetonitryl, metanol, roztwór zawierający 2,88 g/l laurylosiarczanu sodu i 1,6 ml/l kwasu fosforowego(V) 85% (9:1:10, V/V/V)
- *szybkość przepływu fazy ruchomej*: 1,5 ml/min
- *detektor*: spektrofotometr UV,  $\lambda = 254$  nm
- *wzorzec wewnętrzny*: roztwór chlorowodoru chininy.

##### *Przygotowanie roztworu wzorca wewnętrznego*

W kolbie miarowej pojemności 100 ml, rozpuszczono 5,0 mg chlorowodoru chininy i uzupełniono wodą do 100,0 ml.

Metodę HPLC zwalidowano w celu potwierdzenia jej przydatności do oceny trwałości PMD w roztworach wodnych.

Walidacji poddano następujące parametry:

- selektywność
- liniowość
- precyzję
- granicę detekcji i oznaczalności.

Do walidacji metody HPLC użyto próbek następujących substancji:

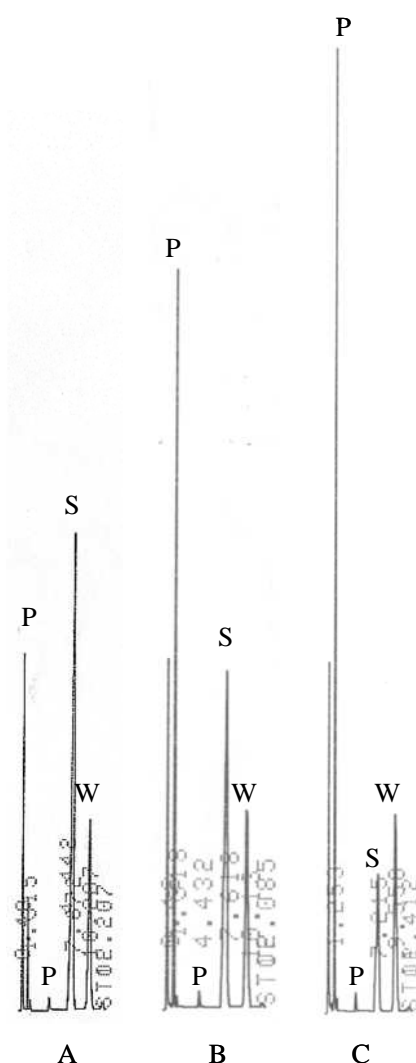
- PMD – substancji badanej (próbki nierozłożonej oraz poddanej rozkładowi w buforze boranowym o pH = 7,82, w temperaturze 343 K w czasie  $t_1 = 0$  min (A),  $t_2 = 5$  min (B),  $t_3 = 15$  min (C))
- chlorowodoru chininy – wzorca wewnętrznego.

#### 4.4.1. Selektyność metody

W przedziale czasu 0–15 minut na chromatogramach rejestrowano następujące piki:

- substancji badanej (PMD),  $t_R \sim 7,6$  min
- wzorca wewnętrznego,  $t_R \sim 10,2$  min
- produktów rozkładu PMD,  $t_R \sim 0,58$  min,  $\sim 1,0$  min i  $\sim 4,5$  min (Rycina 2).

Metoda jest selektywna dla PMD w obecności produktów rozkładu oraz wzorca wewnętrznego.



Rycina 2. Chromatogramy HPLC PMD w buforze boranowym,  $\text{pH} = 7,82$ ,  $B_T = 0,122$  mol/l, w temperaturze 343 K, po 0 min (A), 5 min (B) i 15 min (C); S – PMD; P – produkty rozkładu; W – wzorec wewnętrzny.

#### 4.4.1. Liniowość metody

Krzywą wzorcową dla PMD wyznaczono w zakresie stężeń od 0,010 mg/ml do 0,150 mg/ml. Jako wzorzec wewnętrzny zastosowano roztwór chlorowodoru chininy o stężeniu 50 µg/ml.

##### *Roztwór substancji badanej*

Odważono 10,0 mg substancji badanej, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do 10,0 ml. Następnie pobrano odpowiednio 0,2, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 ml roztworu i uzupełniono wodą do 10,0 ml.

Do 1,0 ml roztworu o odpowiednim stężeniu dodawano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, wymieszano, na kolumnę wprowadzano po 20 µl roztworów i rejestrowano chromatogramy. Wyniki przedstawiono w tabeli 9 i na rycinie 3.

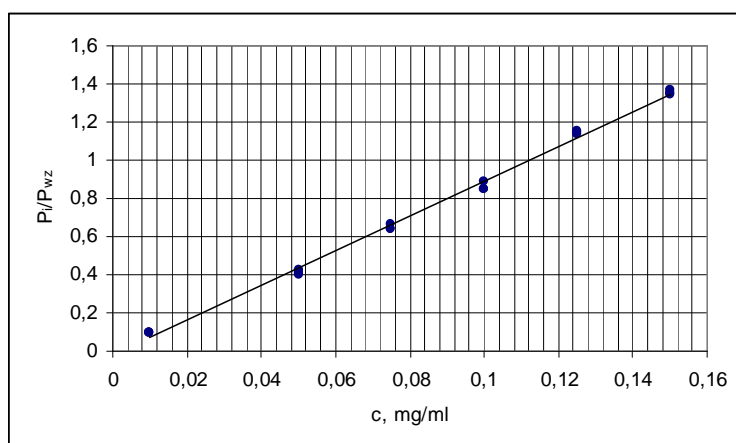
Tabela 9. Zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  i ocena statystyczna prostych  $y = ax + b$  i  $y = ax$

Lp.	C, mg/ml	$P_i/P_{wz} = f(c)$	Ocena statystyczna prostych	
			$y = ax + b$	$y = ax$
1.	0,010	0,0962; 0,0959; 0,0969	$a = 9,135 \pm 0,265$ $b = -0,0235 \pm 0,0257$ $S_a = 0,1250$ $S_b = 0,01212$ $S_y = 0,02469$ $t_a = 72,98$ $t_b = -1,939$ $r = 0,9985$	$a = 8,913 \pm 0,257$ $S_a = 0,1213$ $S_y = 0,02396$ $r = 0,9985$
2.	0,050	0,4041; 0,4254; 0,4028		
3.	0,075	0,6428; 0,6628; 0,6396		
4.	0,100	0,8516; 0,8849; 0,8486		
5.	0,125	1,1321; 1,1533; 1,1428		
6.	0,150	1,3498; 1,3665; 1,3428		

Wykonano wykres zależności  $P_i/P_{wz} = f(c)$ ; (c, mg/ml) (Rycina 3).

Wykres zależności  $P_i/P_{wz} = f(c)$  jest prostoliniowy. Obliczono parametry prostych  $y = ax + b$  i  $y = ax$  (Tabela 10). Stwierdzono, że wyznaczona z powyższej zależności wartość  $t_b = -1,939$  jest mniejsza od wartości krytycznej  $t_{0,05}(16) = 2,120$ , stąd wartość współczynnika  $b = -0,02349 \pm 0,02569$  jest nieistotna ( $b = 0$ ).





Rycina 3. Zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  PMD.

#### 4.4.3. Precyzja metody

W celu wyznaczenia precyzji metody, przygotowano po 8 roztworów PMD o stężeniu odpowiednio: 0,075 mg/ml, 0,10 mg/ml i 0,125 mg/ml (Tabela 10). Roztwory przygotowano w taki sam sposób, jak przy wyznaczaniu liniowości metody.

Tabela 10. Wyniki oznaczania PMD w roztworach o stężeniu 0,075, 0,100 i 0,125 mg/ml

Wyniki oznaczania PMD w roztworze						
Lp.	c = 0,075 mg/ml		c = 0,100 mg/ml		c = 0,125 mg/ml	
	$P_i/P_{wz}$	Parametry statystyczne	$P_i/P_{wz}$	Parametry statystyczne	$P_i/P_{wz}$	Parametry statystyczne
1.	0,6428	n = 8 $\bar{x}_{sr.} = 0,6456$ $s^2 = 8,185 \cdot 10^{-5}$ $s = 9,047 \cdot 10^{-3}$ $s_x = 3,199 \cdot 10^{-3}$ $W_z = 1,401\%$	0,8516	n = 8 $\bar{x}_{sr.} = 0,8600$ $s^2 = 1,75085 \cdot 10^{-4}$ $s = 1,321 \cdot 10^{-2}$ $s_x = 6,684 \cdot 10^{-3}$ $W_z = 1,538\%$	1,1321	n = 8 $\bar{x}_{sr.} = 1,1449$ $s^2 = 1,752 \cdot 10^{-4}$ $s = 1,326 \cdot 10^{-2}$ $s_x = 4,684 \cdot 10^{-3}$ $W_z = 1,157\%$
2.	0,6628		0,8849		1,1533	
3.	0,6396		0,8486		1,1428	
4.	0,6441		0,8621		1,1246	
5.	0,6521		0,8491		1,1647	
6.	0,6475		0,8519		1,1396	
7.	0,6321		0,8745		1,1574	
8.	0,6439		0,8576		1,1444	

$s^2$  – wariancja;  $s$  – odchylenie pojedynczego wyniku;  $s_x$  – odchylenie standardowe średniej arytmetycznej  
 $W_z$  – współczynnik zmienności

Precyzję pośrednią metody wyznaczono z oznaczeń 16 prób PMD o stężeniu 0,100 mg/ml. Badanie zostało przeprowadzone przez dwóch analityków w tym samym laboratorium w różnych dniach (Tabela 11). Roztwory przygotowano w taki sam sposób, jak przy wyznaczaniu liniowości metody.

Tabela 11. Wyniki oznaczeń PMD w roztworze o stężeniu 0,100 mg/ml, wykonanych przez dwóch analityków

Lp.	$P_i/P_{wz, I}$	$P_i/P_{wz, II}$	Parametry statystyczne
1.	0,8516	0,8626	$F_{obl} = 2,120$ $F_{0,05}(7,7) = 3,790$  $t_{obl} = 1,231$ $t_{0,05}(14) = 2,145$
2.	0,8849	0,8494	
3.	0,8486	0,8537	
4.	0,8621	0,8396	
5.	0,8491	0,8521	
6.	0,8519	0,8647	
7.	0,8745	0,8596	
8.	0,8576	0,8424	

Metoda charakteryzuje się dobrą precyzją pośrednią. Oznaczona wartość względnego odchylenia standardowego (RSD) wynosi 1,538% i 1,066% i jest mniejsza od wartości krytycznej  $RSD = 3\%$ , zgodnie z wytycznymi zawartymi w *AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and procedures, 1993*.

Do oceny, czy wyniki uzyskane przez obu analityków różnią się istotnie, zastosowano test jednorodności dwóch wariancji (F. Snedecora) oraz test istotności różnicy wartości średnich (t-Studenta) [120]. Stosując w/w testy stwierdzono, że uzyskane wyniki nie różnią się w sposób istotny pod względem precyzji ( $F_{obl} = 2,120 < F_{0,05}(7,7) = 3,790$ ). Także różnice między średnimi uzyskanymi dwiema metodami nie są istotne statystycznie ( $t_{obl} = 1,231 < t_{0,05}(14) = 2,145$ ).

#### 4.4.4. Granica detekcji i oznaczalności

Granice detekcji obliczono z wzoru  $3,3 S_y/a$  i w podanych warunkach wynosi ona  $8,97 \cdot 10^{-3}$  mg/ml, co odpowiada 0,177  $\mu\text{g}$  PMD w 20  $\mu\text{l}$  roztworu nanoszonego na kolumnę. Granice oznaczalności wyznaczono z wzoru  $10 S_y/a$  i w podanych warunkach wynosi ona 0,0270 mg/ml, co odpowiada 0,540  $\mu\text{g}$  PMD w 20  $\mu\text{l}$  roztworu nanoszonego na kolumnę.

#### 4.4.5. Zakres i czułość metody

Zakres metody jest określany jako przedział pomiędzy najwyższym i najniższym stężeniem substancji badanej, przy którym oznaczenie jest prowadzone z odpowiednią precyzją w

liniowym zakresie stężeń substancji. W zastosowanych parametrach rozdzielania, zakres metody wynosi od 0,0100 do 0,150 mg/ml.

Metoda jest czuła, gdyż przy niewielkiej zmianie wartości oznaczanej obserwowano znaczący przyrost wartości mierzonej. Miarą czułości metody jest nachylenie krzywej wzorcowej, które wynosi  $8,913 \pm 0,257$ .

## 4.5. Ocena trwałości PMD w roztworach wodnych

### 4.5.1. Warunki badań kinetycznych

*Wszystkie roztwory z substancją badaną chroniono przed dostępem światła.*

Badania trwałości PMD w roztworach wodnych przeprowadzono w zakresie pH od 0,42 do 13,03 w temperaturze 343 K, 333 K, 323 K i 313 K, zachowując stałą wartość siły jonowej 0,50 mol/l.

Do uzyskania odpowiednich wartości pH zastosowano:

- kwas solny o stężeniu od 0,05 mol/l do 0,50 mol/l (pH 0,42–2,05)
- bufor fosforanowy ( $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (pH 1,83–3,12)
- bufor fosforanowy ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (pH 5,86–7,54)
- bufor octanowy ( $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$ ) (pH 3,88–6,04)
- bufor boranowy ( $\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NaOH}$ ) (pH 7,50–9,77)
- roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu od 0,05 mol/l do 0,50 mol/l (pH powyżej 12)

Siłę jonową roztworów doprowadzano do stałej wartości 0,50 mol/l roztworem chlorku sodu o stężeniu 4,0 mol/l. Wartości pH roztworów buforowych mierzono w temperaturze reakcji, natomiast w przypadku kwasu solnego i roztworów wodorotlenku sodu, wartości pH obliczono z odpowiednich równań:

$$\text{pH} = -\log f_{\text{HCl}}[\text{HCl}]$$

$$\text{pH} = \text{pK}_w + \log f_{\text{NaOH}}$$

Wartości współczynników aktywności ( $f_{\text{HCl}}$  i  $f_{\text{NaOH}}$ ) zaczerpnięto z piśmiennictwa, bądź otrzymano poprzez interpolację danych literaturowych [120].

Roztwory buforowe o określonej wartości pH przygotowano z dodatkiem Na<sub>2</sub>EDTA (0,004 mol/l) i termostatowano w odpowiedniej temperaturze, dodawano 1,0 ml roztworu substancji badanej, otrzymując roztwór o stężeniu początkowym 0,2 mg/ml.

W określonych odstępach czasu, zależnych od szybkości rozkładu PMD, pobierano 1,0 ml badanego roztworu, który natychmiast chłodzono w wodzie z lodem. Roztwory o pH powyżej 8, doprowadzono do pH ok. 2, kwasem solnym o odpowiednim stężeniu. Przed wprowadzeniem na kolumnę, do 1,0 ml roztworu badanego, dodawano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego. Na kolumnę chromatograficzną wprowadzono po 20  $\mu$ l analizowanych roztworów i rejestrowano pole powierzchni pików substancji badanej, produktów rozkładu oraz wzorca wewnętrznego.

#### 4.5.2. Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu PMD

Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu PMD w roztworach wodnych wyznaczono metodą HPLC. Do interpretacji zmian stężenia substratu jako funkcji czasu wykorzystano stosunek powierzchni pików PMD do powierzchni pików wzorca wewnętrznego. Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  są opisane równaniem reakcji pseudopierwszego rzędu:

$$\ln (P_i/P_{wz})_t = \ln (P_i/P_{wz})_0 - k_{obs} \cdot t$$

$(P_i/P_{wz})_t$  i  $(P_i/P_{wz})_0$  – stosunek pola powierzchni pików PMD do pola powierzchni pików wzorca wewnętrznego po czasie  $t$  i  $t_0$ . W przedziale czasu od  $t_0$  do  $t_\infty$  wartości  $P_i/P_{wz} \rightarrow 0$ .

Półlogarytmiczne wykresy zależności  $P_i/P_{wz} = f(t)$  są prostoliniowe, a ich nachylenie jest równe obserwowanej stałej szybkości reakcji ze znakiem ujemnym ( $-k_{obs}$ ).

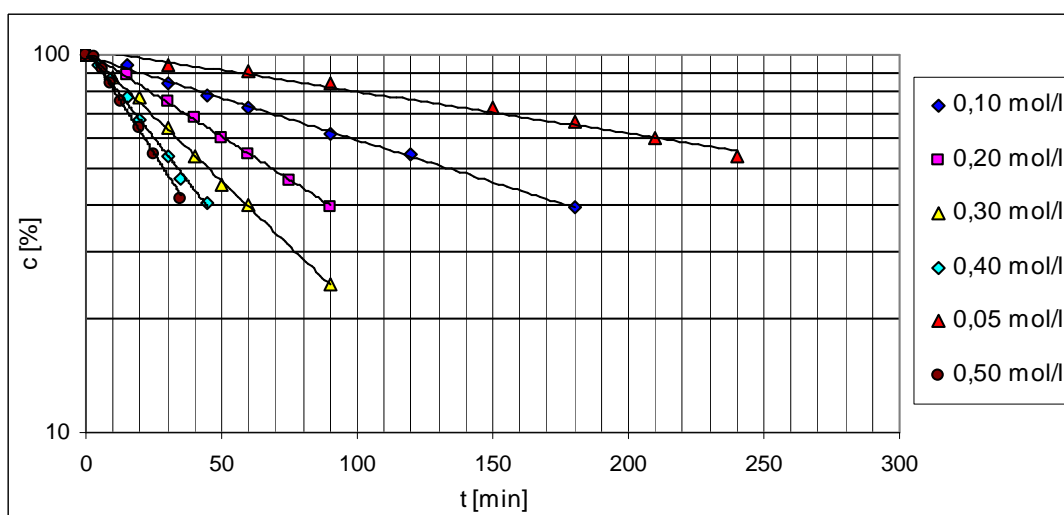
Graficznie wyniki zostały przedstawione w postaci półlogarytmicznych wykresów  $(P_i/P_{wz})_t/(P_i/P_{wz})_0 \cdot 100 = f(t)$ .

Do interpretacji w/w prostoliniowych wykresów obliczono metodą najmniejszych kwadratów następujące parametry statystyczne równania  $y = ax + b$ :  $a \pm \Delta a$ ,  $b \pm \Delta b$ , błędy standardowe  $S_a$ ,  $S_b$  i  $S_y$  oraz współczynnik korelacji linowej  $r$ . Wartości  $\pm \Delta a$  i  $\pm \Delta b$  obliczono dla  $f = n - 2$  stopni swobody i  $\alpha = 0,05$ . Do obliczeń wykorzystano arkusz kalkulacyjny Excel.

Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 4–32 oraz w tabelach 12–38.

Tabela 12. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 313 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

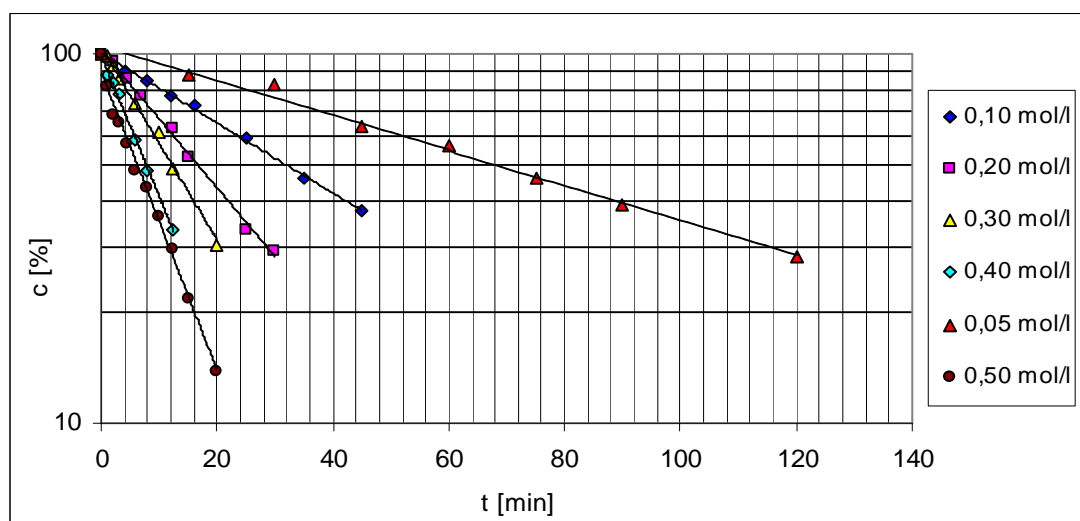
Warunki reakcji, HCl [mol/l]	$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$S_a$	$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	r	n
0,50	$-(2,59 \pm 0,21) \times 10^{-2}$	$8,67 \times 10^{-4}$	$(4,31 \pm 0,35) \times 10^{-4}$	0,997	8
0,40	$-(2,13 \pm 0,16) \times 10^{-2}$	$6,36 \times 10^{-4}$	$(3,54 \pm 0,26) \times 10^{-4}$	0,997	8
0,30	$-(1,58 \pm 0,06) \times 10^{-2}$	$2,46 \times 10^{-4}$	$(2,64 \pm 0,10) \times 10^{-4}$	0,999	8
0,20	$-(1,04 \pm 0,04) \times 10^{-2}$	$1,75 \times 10^{-4}$	$(1,74 \pm 0,07) \times 10^{-4}$	0,999	8
0,10	$-(0,51 \pm 0,02) \times 10^{-2}$	$0,93 \times 10^{-4}$	$(0,85 \pm 0,04) \times 10^{-4}$	0,999	8
0,05	$-(0,26 \pm 0,03) \times 10^{-2}$	$1,32 \times 10^{-4}$	$(0,43 \pm 0,05) \times 10^{-4}$	0,992	8



Rycina 4. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 313 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 13. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 323 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

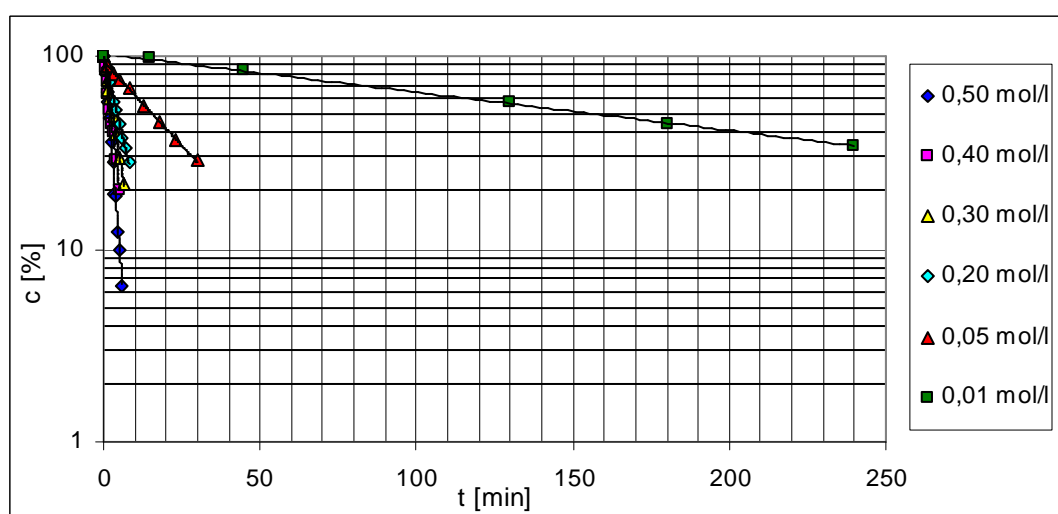
Warunki reakcji, HCl [mol/l]	$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$S_a$	$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	r	n
0,50	$-(9,29 \pm 0,65) \times 10^{-2}$	$2,85 \times 10^{-3}$	$(15,5 \pm 1,1) \times 10^{-4}$	0,996	11
0,40	$-(8,77 \pm 0,46) \times 10^{-2}$	$1,80 \times 10^{-3}$	$(14,6 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	0,999	7
0,30	$-(6,01 \pm 0,54) \times 10^{-2}$	$2,19 \times 10^{-3}$	$(10,0 \pm 0,9) \times 10^{-4}$	0,996	8
0,20	$-(4,29 \pm 0,29) \times 10^{-2}$	$1,17 \times 10^{-3}$	$(7,15 \pm 0,48) \times 10^{-4}$	0,998	8
0,10	$-(2,18 \pm 0,10) \times 10^{-2}$	$0,40 \times 10^{-3}$	$(3,64 \pm 0,26) \times 10^{-4}$	0,999	8
0,05	$-(1,08 \pm 0,11) \times 10^{-2}$	$0,40 \times 10^{-3}$	$(1,80 \pm 0,17) \times 10^{-4}$	0,996	8



Rycina 5. Półlogarymiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 323 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 14. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 333 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

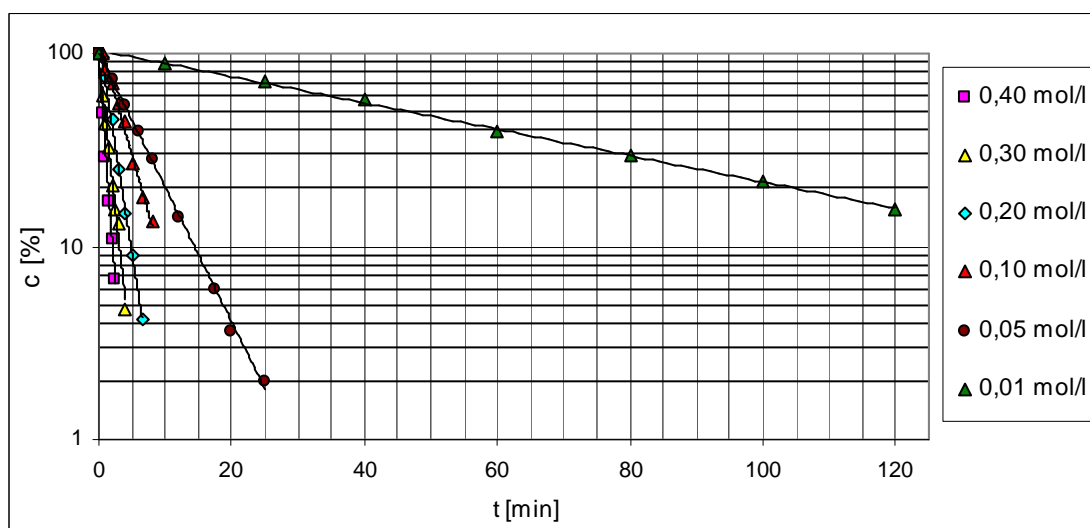
Warunki reakcji, HCl [mol/l]	$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$S_a$	$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	r	n
0,50	$-(46,7 \pm 3,0) \times 10^{-2}$	$13,5 \times 10^{-3}$	$(77,8 \pm 5,0) \times 10^{-4}$	0,996	12
0,40	$-(31,8 \pm 1,1) \times 10^{-2}$	$4,70 \times 10^{-3}$	$(53,1 \pm 1,9) \times 10^{-4}$	0,999	9
0,30	$-(23,3 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	$3,10 \times 10^{-3}$	$(38,9 \pm 1,2) \times 10^{-4}$	0,999	10
0,20	$-(15,8 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	$3,91 \times 10^{-3}$	$(26,4 \pm 1,5) \times 10^{-4}$	0,998	9
0,05	$-(7,68 \pm 0,63) \times 10^{-2}$	$2,10 \times 10^{-3}$	$(13,8 \pm 1,4) \times 10^{-4}$	0,999	6
0,01	$-(4,01 \pm 0,28) \times 10^{-2}$	$1,17 \times 10^{-3}$	$(6,68 \pm 0,46) \times 10^{-4}$	0,997	9



Rycina 6. Półlogarymiczny wykres zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 333 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 15. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 343 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

Warunki reakcji, HCl [mol/l]	$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$S_a$	$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	r	n
0,40	$-(10,6 \pm 1,1) \times 10^{-1}$	$4,09 \times 10^{-2}$	$(17,6 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	0,997	6
0,30	$-(7,19 \pm 0,74) \times 10^{-1}$	$3,03 \times 10^{-2}$	$(12,0 \pm 1,2) \times 10^{-3}$	0,995	8
0,20	$-(5,09 \pm 0,31) \times 10^{-1}$	$1,28 \times 10^{-2}$	$(8,48 \pm 0,52) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,10	$-(2,77 \pm 0,32) \times 10^{-1}$	$1,31 \times 10^{-2}$	$(4,61 \pm 0,53) \times 10^{-3}$	0,993	8
0,05	$-(1,60 \pm 0,06) \times 10^{-1}$	$0,24 \times 10^{-2}$	$(2,67 \pm 0,10) \times 10^{-3}$	0,999	9
0,01	$-(1,57 \pm 0,07) \times 10^{-1}$	$0,02 \times 10^{-2}$	$(0,262 \pm 0,014) \times 10^{-3}$	0,999	8

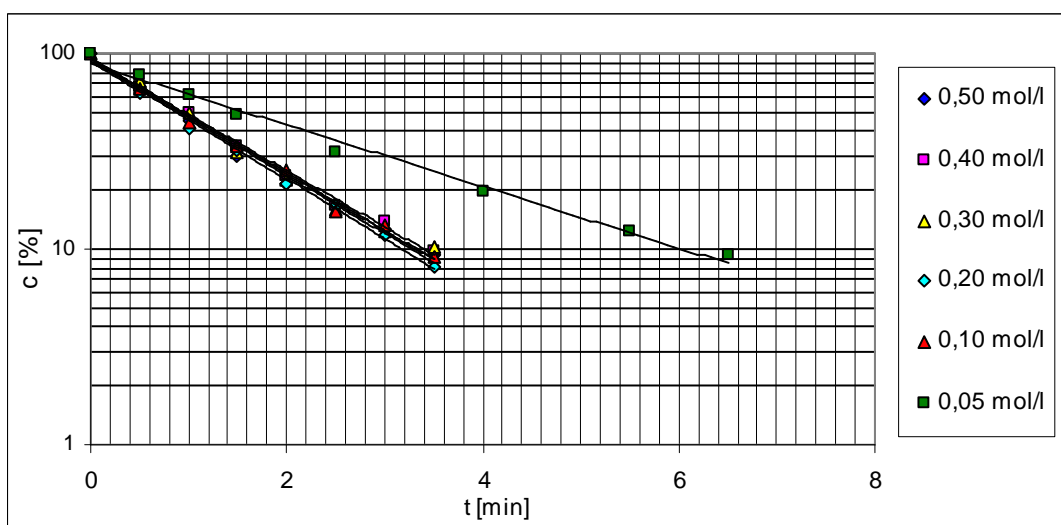


Rycina 7. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 343 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).



Tabela 16. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 313 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l)

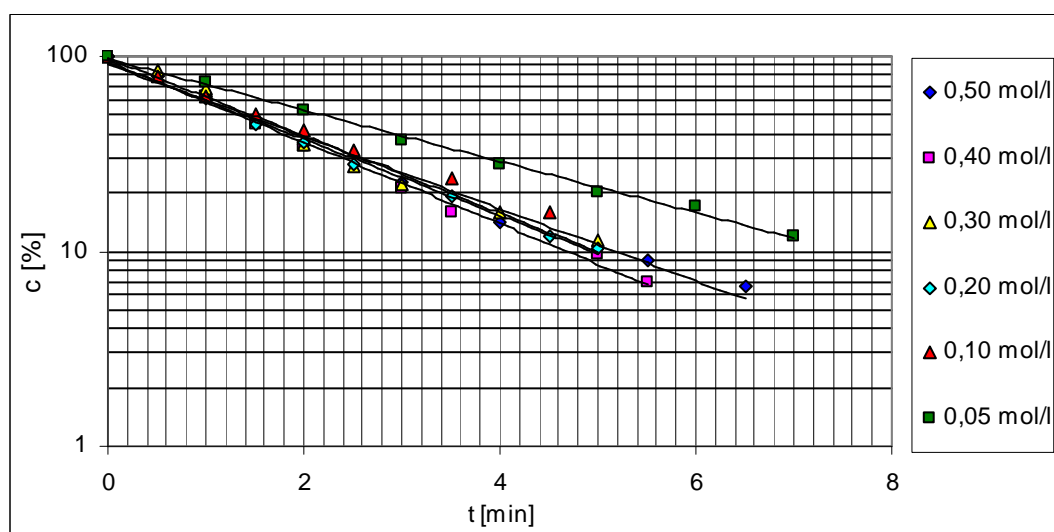
Warunki reakcji, NaOH [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$S_a$	$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	r	n
0,50	$-(6,77 \pm 0,60) \times 10^{-1}$	$2,45 \times 10^{-2}$	$(11,3 \pm 1,0) \times 10^{-3}$	0,996	8
0,40	$-(6,61 \pm 0,45) \times 10^{-1}$	$1,84 \times 10^{-2}$	$(11,0 \pm 0,8) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,30	$-(6,77 \pm 0,72) \times 10^{-1}$	$2,94 \times 10^{-2}$	$(11,3 \pm 1,2) \times 10^{-3}$	0,994	8
0,20	$-(6,96 \pm 0,47) \times 10^{-1}$	$1,92 \times 10^{-3}$	$(11,6 \pm 0,8) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,10	$-(6,73 \pm 0,53) \times 10^{-1}$	$2,17 \times 10^{-2}$	$(11,2 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	0,997	8
0,05	$-(3,62 \pm 0,36) \times 10^{-1}$	$1,47 \times 10^{-2}$	$(6,04 \pm 0,60) \times 10^{-3}$	0,995	8



Rycina 8. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 313 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 17. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 308 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

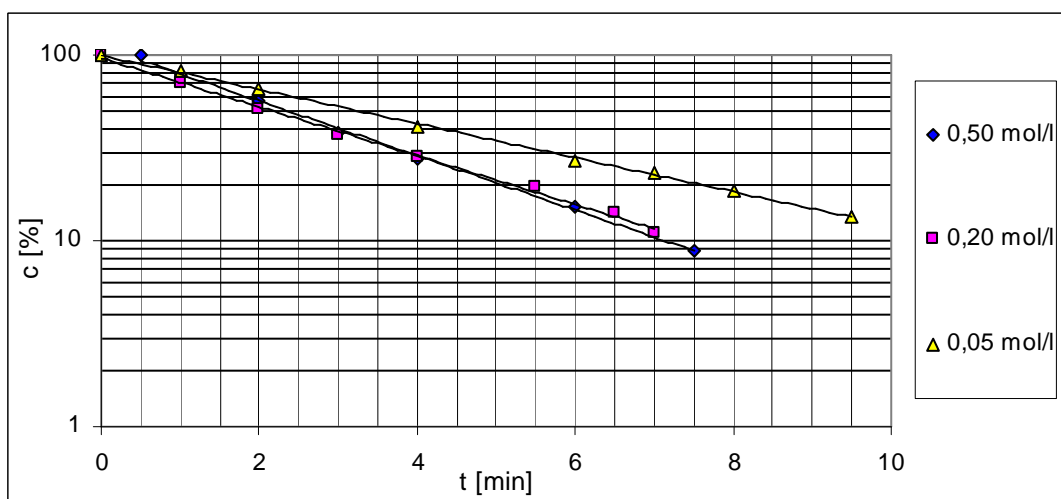
Warunki reakcji, NaOH [mol/l]	$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$S_a$	$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	r	n
0,50	$-(4,26 \pm 0,48) \times 10^{-1}$	$1,96 \times 10^{-2}$	$(7,11 \pm 0,80) \times 10^{-3}$	0,994	8
0,40	$-(4,80 \pm 0,39) \times 10^{-1}$	$1,61 \times 10^{-2}$	$(8,00 \pm 0,66) \times 10^{-3}$	0,997	8
0,30	$-(4,57 \pm 0,62) \times 10^{-1}$	$2,53 \times 10^{-2}$	$(7,62 \pm 1,03) \times 10^{-3}$	0,991	8
0,20	$-(4,52 \pm 0,30) \times 10^{-1}$	$1,22 \times 10^{-2}$	$(7,53 \pm 0,50) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,10	$-(4,03 \pm 0,22) \times 10^{-1}$	$0,89 \times 10^{-2}$	$(6,72 \pm 0,36) \times 10^{-3}$	0,999	8
0,05	$-(3,03 \pm 0,18) \times 10^{-1}$	$0,72 \times 10^{-2}$	$(5,05 \pm 0,29) \times 10^{-3}$	0,998	8



Rycina 9. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 308 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 18. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 303 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l)

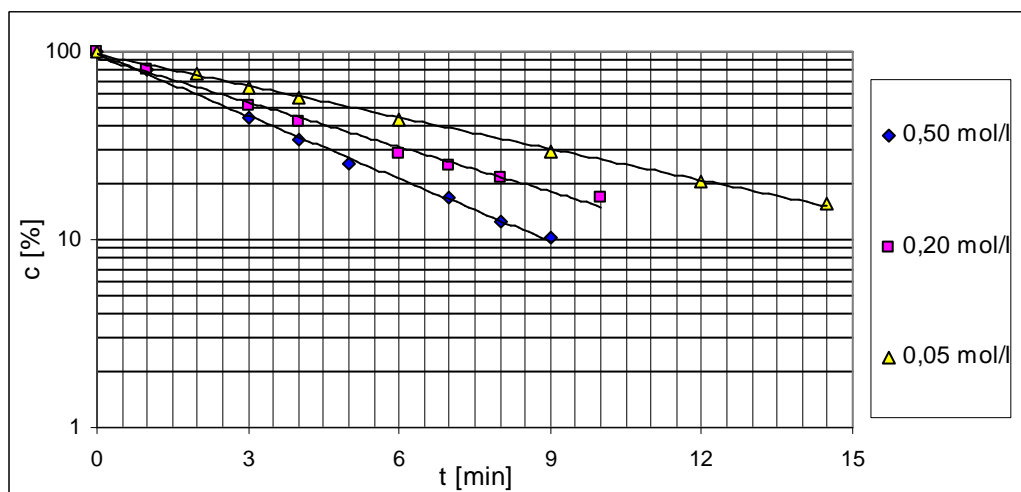
Warunki reakcji, NaOH [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$S_a$	$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	r	n
0,50	$-(3,37 \pm 0,19) \times 10^{-1}$	$7,21 \times 10^{-3}$	$(5,62 \pm 0,31) \times 10^{-3}$	0,999	7
0,20	$-(3,02 \pm 0,17) \times 10^{-1}$	$7,08 \times 10^{-3}$	$(5,04 \pm 0,29) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,05	$-(2,11 \pm 0,07) \times 10^{-1}$	$2,96 \times 10^{-3}$	$(3,52 \pm 0,12) \times 10^{-3}$	0,999	8



Rycina 10. Półlogarymiczny wykres zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 303 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 19. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 298 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l)

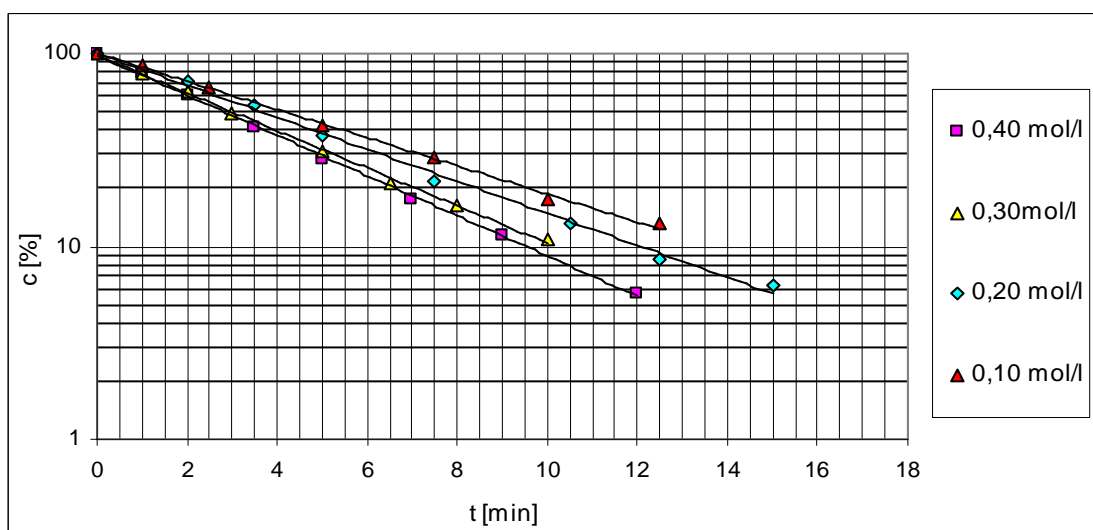
Warunki reakcji, NaOH [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$S_a$	$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	r	n
0,50	$-(2,56 \pm 0,13) \times 10^{-1}$	$5,19 \times 10^{-3}$	$(4,27 \pm 0,21) \times 10^{-3}$	0,999	8
0,20	$-(1,83 \pm 0,19) \times 10^{-1}$	$7,77 \times 10^{-3}$	$(3,05 \pm 0,32) \times 10^{-3}$	0,995	8
0,05	$-(1,28 \pm 0,05) \times 10^{-1}$	$2,20 \times 10^{-3}$	$(2,14 \pm 0,09) \times 10^{-3}$	0,999	8



Rycina 11. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 298 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 20. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 343 K,  $\mu = 0,10 \text{ mol/l}, 0,20 \text{ mol/l}, 0,30 \text{ mol/l}, 0,40 \text{ mol/l}$

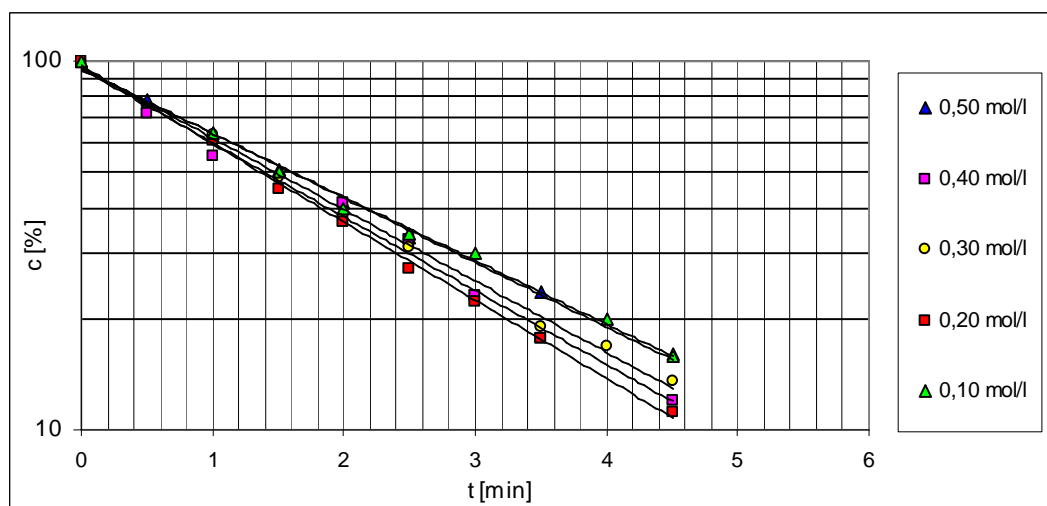
Warunki reakcji, $\mu$ [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$S_a$	$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	r	n
0,40	$-(2,40 \pm 0,08) \times 10^{-1}$	$3,07 \times 10^{-3}$	$(4,00 \pm 0,13) \times 10^{-3}$	0,995	8
0,30	$-(2,24 \pm 0,09) \times 10^{-1}$	$3,82 \times 10^{-3}$	$(3,73 \pm 0,16) \times 10^{-3}$	0,999	8
0,20	$-(1,91 \pm 0,12) \times 10^{-1}$	$4,71 \times 10^{-3}$	$(3,18 \pm 0,19) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,10	$-(1,68 \pm 0,10) \times 10^{-1}$	$4,07 \times 10^{-3}$	$(2,80 \pm 0,17) \times 10^{-3}$	0,999	8



Rycina 12. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 343 K,  $\mu = 0,10 \text{ mol/l}, 0,20 \text{ mol/l}, 0,30 \text{ mol/l}$  i  $0,4 \text{ mol/l}$ .

Tabela 21. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 308 K,  $\mu = 0,10 \text{ mol/l}$ ,  $0,20 \text{ mol/l}$ ,  $0,30 \text{ mol/l}$ ,  $0,40 \text{ mol/l}$ ,  $0,50 \text{ mol/l}$

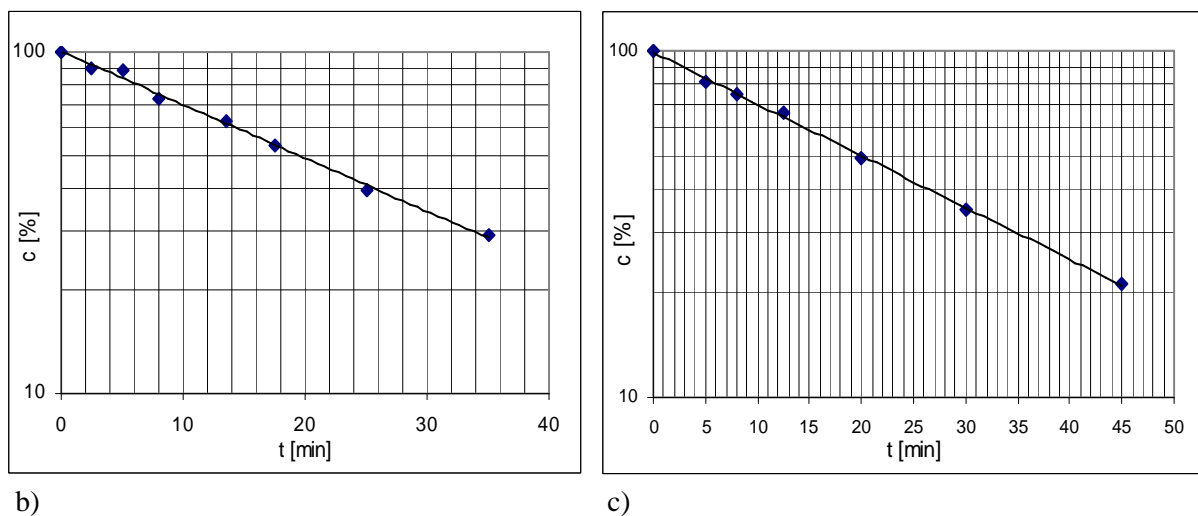
Warunki reakcji, $\mu$ [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$S_a$	$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	r	n
0,50	$-(4,03 \pm 0,22) \times 10^{-1}$	$8,86 \times 10^{-3}$	$(6,72 \pm 0,36) \times 10^{-3}$	0,999	8
0,40	$-(4,10 \pm 0,21) \times 10^{-1}$	$7,96 \times 10^{-3}$	$(6,84 \pm 0,29) \times 10^{-3}$	0,996	8
0,30	$-(4,46 \pm 0,26) \times 10^{-1}$	$10,5 \times 10^{-3}$	$(7,43 \pm 0,43) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,20	$-(3,98 \pm 0,36) \times 10^{-1}$	$10,6 \times 10^{-3}$	$(6,64 \pm 0,51) \times 10^{-3}$	0,992	8
0,10	$-(4,05 \pm 0,16) \times 10^{-1}$	$6,62 \times 10^{-3}$	$(6,76 \pm 0,27) \times 10^{-3}$	0,999	8



Rycina 13. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 308 K,  $\mu = 0,10 \text{ mol/l}$ ,  $0,20 \text{ mol/l}$ ,  $0,30 \text{ mol/l}$ ,  $0,40 \text{ mol/l}$  i  $0,50 \text{ mol/l}$ .

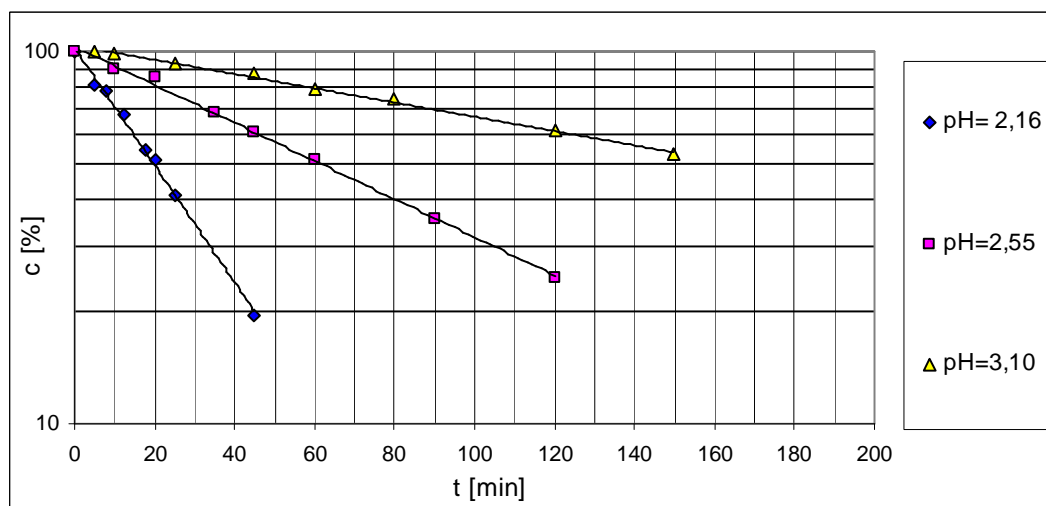
Tabela 22. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 343 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ),  $B_T = 0,40 \text{ mol/l}$  (a),  $B_T = 0,30 \text{ mol/l}$  (b),  $B_T = 0,20 \text{ mol/l}$  (c) ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

Seria	a	b	c
pH = 2,16			
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,277 [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,173	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,171 [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,129	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,114 [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,086
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(3,62 \pm 0,22) \times 10^{-2}$	$-(3,60 \pm 0,24) \times 10^{-2}$	$-(3,56 \pm 0,13) \times 10^{-2}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(6,04 \pm 0,37) \times 10^{-4}$	$(5,99 \pm 0,39) \times 10^{-4}$	$(5,93 \pm 0,22) \times 10^{-4}$
S <sub>a</sub>	$9,14 \times 10^{-4}$	$9,68 \times 10^{-4}$	$5,13 \times 10^{-4}$
r	0,998	0,998	0,999
n	8	8	7
pH = 2,55		pH = 3,10	
a		a	
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,118 [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,282	Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,047 [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] = 0,353
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(1,18 \pm 0,05) \times 10^{-2}$	(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(4,20 \pm 0,27) \times 10^{-3}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(1,96 \pm 0,09) \times 10^{-4}$	(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(7,00 \pm 0,44) \times 10^{-5}$
S <sub>a</sub>	$2,12 \times 10^{-4}$	S <sub>a</sub>	$1,09 \times 10^{-4}$
r	0,999	r	0,998
n	8	n	8



Rycina 14. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 2,16 w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ):

- b)  $B_T = 0,30 \text{ mol/l}$
- c)  $B_T = 0,20 \text{ mol/l}$

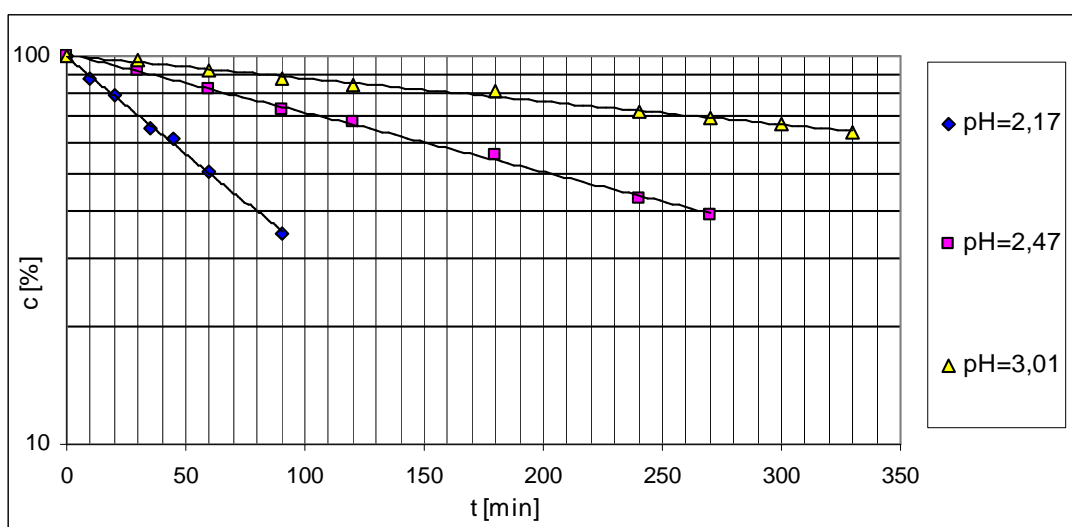


Rycina 15. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 2,16, 2,55, 3,10 w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ),  $B_T = 0,40 \text{ mol/l}$  (a).



Tabela 23. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 333 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

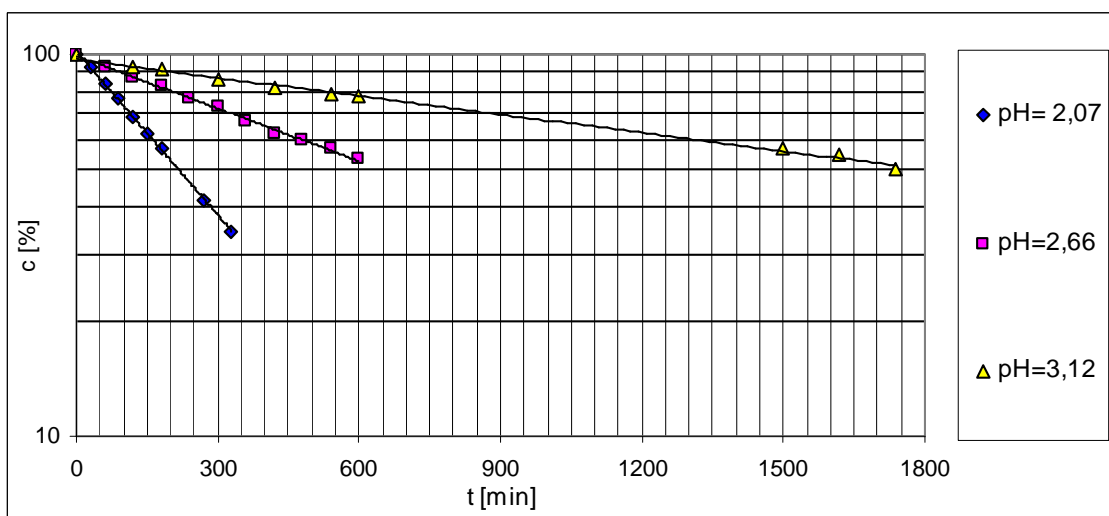
pH	2,17	2,47	3,01
$B_T = 0,40$			
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,277$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,173$	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,118$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,282$	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,047$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,353$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(11,5 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	$-(3,51 \pm 0,16) \times 10^{-3}$	$-(13,7 \pm 0,8) \times 10^{-4}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(19,1 \pm 1,0) \times 10^{-5}$	$(5,85 \pm 0,27) \times 10^{-5}$	$(2,28 \pm 0,14) \times 10^{-5}$
$S_a$	$2,23 \times 10^{-4}$	$6,71 \times 10^{-5}$	$3,66 \times 10^{-5}$
r	0,999	0,999	0,997
n	7	8	10



Rycina 16. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 2,17, 2,47, 3,01 w temperaturze 333 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ),  $B_T = 0,40 \text{ mol/l}$ .

Tabela 24. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 323 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

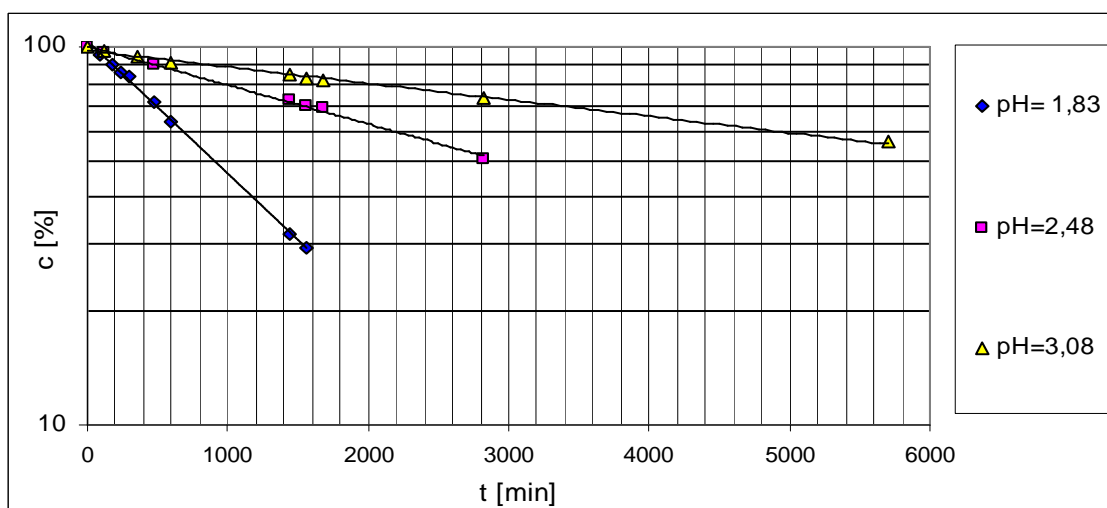
pH	2,07	2,66	3,12
$B_T = 0,40$			
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,277$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,173$	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,118$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,282$	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,047$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,353$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(32,8 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$-(10,6 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$-(3,69 \pm 0,25) \times 10^{-4}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(5,47 \pm 0,14) \times 10^{-5}$	$(17,6 \pm 0,8) \times 10^{-6}$	$(6,15 \pm 0,41) \times 10^{-6}$
$S_a$	$3,54 \times 10^{-5}$	$2,18 \times 10^{-5}$	$1,08 \times 10^{-5}$
r	0,9996	0,9981	0,9966
n	9	11	10



Rycina 17. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 2,07, 2,66, 3,12 w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ),  $B_T = 0,40 \text{ mol/l}$ .

Tabela 25. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 313 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l)

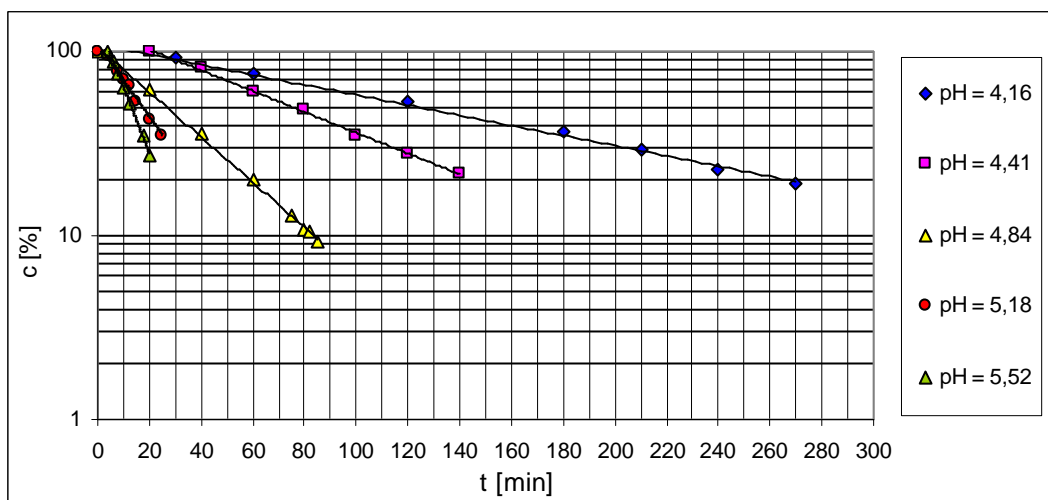
pH	1,83	2,48	3,08
$B_T = 0,40$			
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$[H_3PO_4] = 0,277$ $[KH_2PO_4] = 0,173$	$[H_3PO_4] = 0,118$ $[KH_2PO_4] = 0,282$	$[H_3PO_4] = 0,047$ $[KH_2PO_4] = 0,353$
$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$-(8,08 \pm 0,29) \times 10^{-4}$	$-(2,37 \pm 0,16) \times 10^{-4}$	$-(10,0 \pm 0,6) \times 10^{-5}$
$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$(13,5 \pm 0,5) \times 10^{-6}$	$(3,95 \pm 0,26) \times 10^{-6}$	$(1,67 \pm 0,10) \times 10^{-6}$
$S_a$	$1,22 \times 10^{-5}$	$6,11 \times 10^{-6}$	$2,57 \times 10^{-6}$
r	0,9992	0,9983	0,9977
n	9	7	9



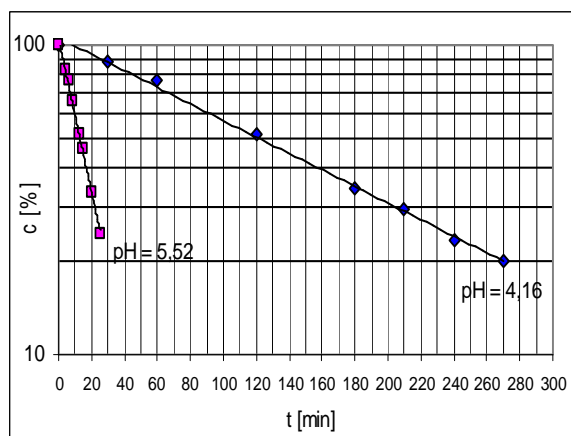
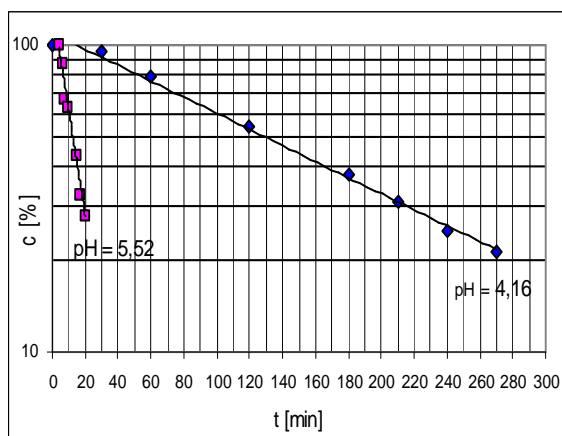
Rycina 18. Półlogarymiczne wykresy zależności  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 1,83, 2,48, 3,08 w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50$  mol/l),  $B_T = 0,40$  mol/l.

Tabela 26. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym, w temperaturze 343 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,40$	$B_T = 0,35$	$B_T = 0,30$
	pH = 4,16		
Stężenie składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,360 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,040	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,315 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,035	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,270 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,030
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(6,35 \pm 0,50) \times 10^{-3}$	$-(6,01 \pm 0,44) \times 10^{-3}$	$-(6,14 \pm 0,32) \times 10^{-3}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(1,06 \pm 0,08) \times 10^{-4}$	$(1,00 \pm 0,07) \times 10^{-4}$	$(1,02 \pm 0,05) \times 10^{-4}$
$S_a$	$2,04 \times 10^{-4}$	$1,79 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-4}$
r	0,997	0,997	0,999
n	8	8	8
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,40$		
	pH = 4,41	pH = 4,84	pH = 5,18
Stężenie składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,320 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,080	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,240 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,160	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,120 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,280
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(1,30 \pm 0,06) \times 10^{-2}$	$-(2,82 \pm 0,12) \times 10^{-2}$	$-(4,49 \pm 0,56) \times 10^{-2}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(2,17 \pm 0,10) \times 10^{-4}$	$(4,69 \pm 0,19) \times 10^{-4}$	$(7,48 \pm 0,94) \times 10^{-4}$
$S_a$	$2,31 \times 10^{-4}$	$4,73 \times 10^{-4}$	$2,29 \times 10^{-3}$
r	0,999	0,999	0,992
n	7	8	8
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,40$	$B_T = 0,30$	$B_T = 0,20$
	pH = 5,52		
Stężenie składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,040 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,360	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,030 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,270	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,020 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,180
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(8,09 \pm 0,32) \times 10^{-2}$	$-(7,95 \pm 0,91) \times 10^{-2}$	$-(7,74 \pm 0,65) \times 10^{-2}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(1,35 \pm 0,05) \times 10^{-3}$	$(1,32 \pm 0,15) \times 10^{-3}$	$(1,29 \pm 0,12) \times 10^{-3}$
$S_a$	$1,26 \times 10^{-3}$	$3,54 \times 10^{-3}$	$1,38 \times 10^{-3}$
r	0,999	0,995	0,998
n	7	7	8



Rycina 19. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym o pH 4,16, 4,41, 4,84, 5,18, 5,52 w temperaturze 343 K,  $B_T = 0,40 \text{ mol/l}$  ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).



b)

c)

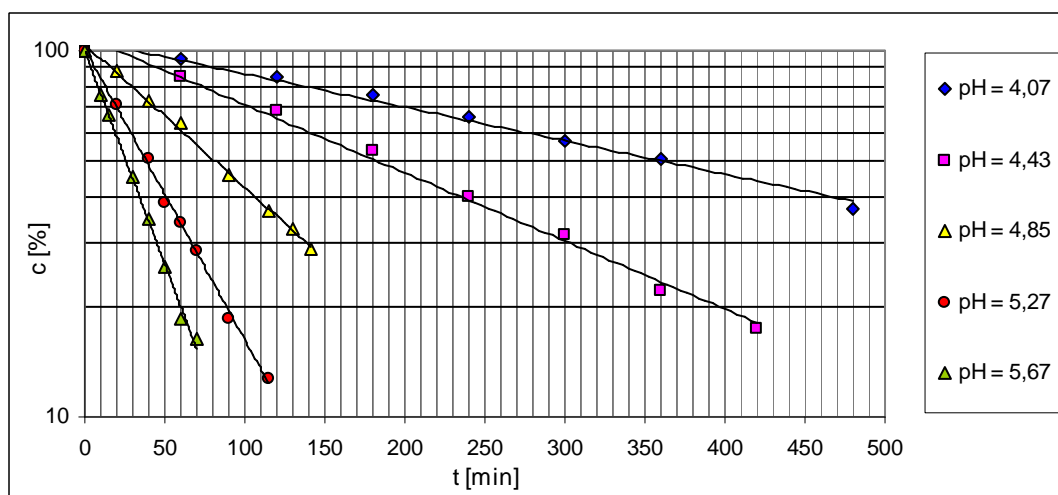
Rycina 20. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c[\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym o pH 4,16 i 5,52 w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

b)  $B_T = 0,35 \text{ mol/l}$  (pH = 4,16),  $B_T = 0,30 \text{ mol/l}$  (pH = 5,52)

c)  $B_T = 0,30 \text{ mol/l}$  (pH = 4,16),  $B_T = 0,20 \text{ mol/l}$  (pH = 5,52).

Tabela 27. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym, w temperaturze 333K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

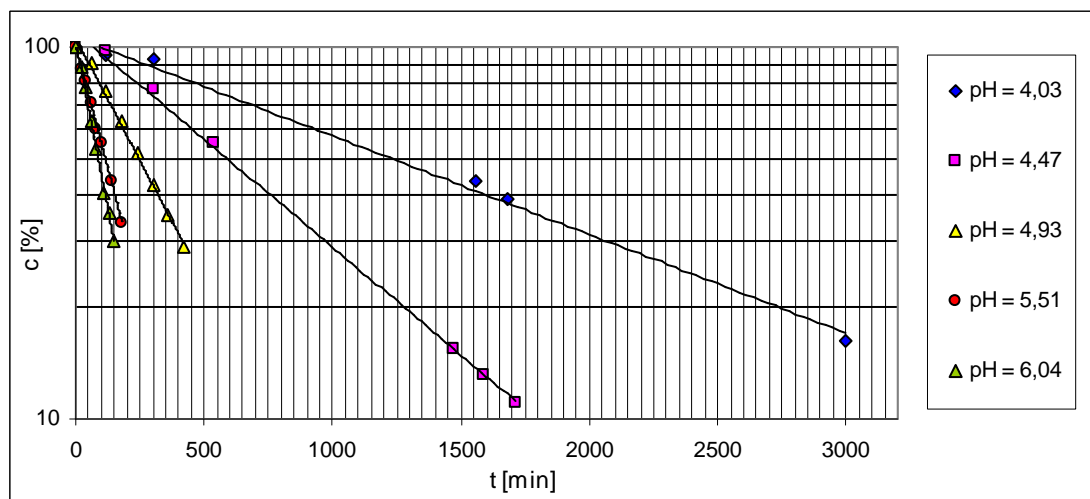
pH	4,07	4,43	4,85
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,360 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,040	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,320 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,080	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,240 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,160
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(2,11 \pm 0,23) \times 10^{-3}$	$-(4,76 \pm 0,37) \times 10^{-3}$	$-(12,5 \pm 1,5) \times 10^{-3}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(0,351 \pm 0,040) \times 10^{-4}$	$(0,794 \pm 0,064) \times 10^{-4}$	$(2,09 \pm 0,18) \times 10^{-4}$
S <sub>a</sub>	$0,93 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$	$2,07 \times 10^{-4}$
r	0,994	0,996	0,998
n	8	8	8
pH	5,27	pH	5,67
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,120 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,280	Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,040 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,360
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(18,3 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	-(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(26,7 \pm 1,6) \times 10^{-3}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(3,04 \pm 0,16) \times 10^{-4}$	(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(4,46 \pm 0,27) \times 10^{-4}$
S <sub>a</sub>	$3,83 \times 10^{-4}$	S <sub>a</sub>	$6,52 \times 10^{-4}$
r	0,999	r	0,998
n	8	n	8



Rycina 21. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym o pH 4,07, 4,43, 4,85, 5,27, 5,67 w temperaturze 333 K,  $B_T = 0,40 \text{ mol/l}$  (a) ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 28. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym, w temperaturze 323 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

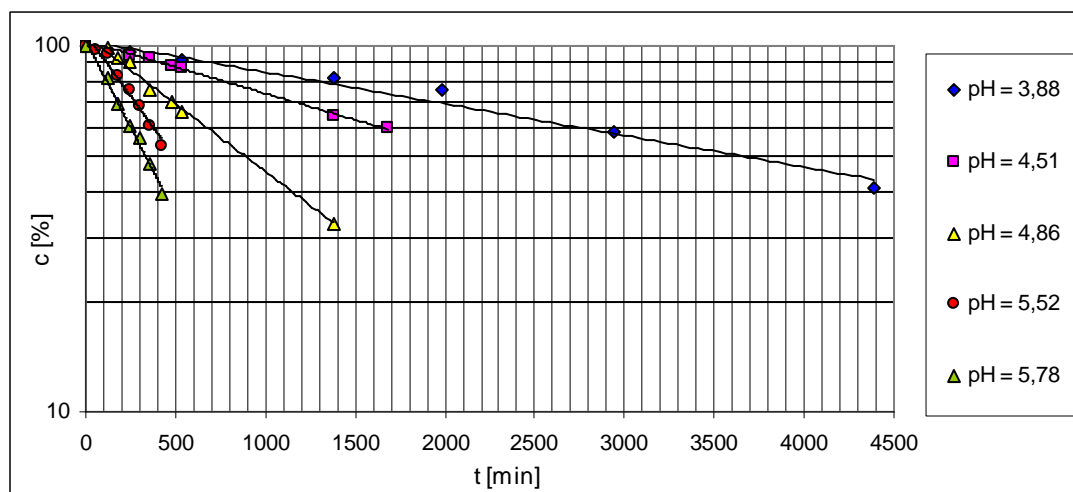
pH	4,03	4,47	4,93
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,360$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,040$	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,320$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,080$	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,240$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,160$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(6,10 \pm 0,64) \times 10^{-4}$	$-(13,3 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	$-(30,3 \pm 2,1) \times 10^{-4}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(1,02 \pm 0,11) \times 10^{-5}$	$(2,22 \pm 0,12) \times 10^{-5}$	$(5,05 \pm 0,35) \times 10^{-5}$
$S_a$	$2,32 \times 10^{-5}$	$2,90 \times 10^{-5}$	$8,64 \times 10^{-5}$
r	0,997	0,999	0,998
n	6	7	8
pH	5,51	pH	6,04
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,120$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,280$	Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,040$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,360$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(60,6 \pm 2,6) \times 10^{-4}$	$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(82,7 \pm 4,8) \times 10^{-4}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(10,1 \pm 0,43) \times 10^{-5}$	$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(13,8 \pm 0,8) \times 10^{-5}$
$S_a$	$10,6 \times 10^{-5}$	$S_a$	$19,7 \times 10^{-5}$
r	0,999	r	0,998
n	8	n	8



Rycina 22. Półlogarymiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym o pH 4,03, 4,47, 4,93, 5,51, 6,04 w temperaturze 323 K,  $B_T = 0,40 \text{ mol/l}$  (a) ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 29. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym, w temperaturze 313 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

pH	3,88	4,51	4,86
Stężenie składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,360 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,040	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,320 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,080	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,240 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,160
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(1,99 \pm 0,35) \times 10^{-4}$	$-(3,31 \pm 0,33) \times 10^{-4}$	$-(8,50 \pm 0,81) \times 10^{-4}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(0,331 \pm 0,062) \times 10^{-5}$	$(0,550 \pm 0,054) \times 10^{-5}$	$(1,42 \pm 0,13) \times 10^{-5}$
S <sub>a</sub>	$1,35 \times 10^{-5}$	$1,34 \times 10^{-5}$	$3,30 \times 10^{-5}$
r	0,989	0,995	0,996
n	7	8	8
pH	5,52	pH	5,78
Stężenie składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,120 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,280	Stężenie składników buforu [mol/l]	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,040 [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] = 0,360
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(15,6 \pm 2,9) \times 10^{-4}$	(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(21,8 \pm 2,5) \times 10^{-4}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(2,60 \pm 0,49) \times 10^{-5}$	(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(3,63 \pm 0,41) \times 10^{-5}$
S <sub>a</sub>	$12,1 \times 10^{-5}$	S <sub>a</sub>	$9,63 \times 10^{-5}$
r	0,983	r	0,995
n	8	n	7

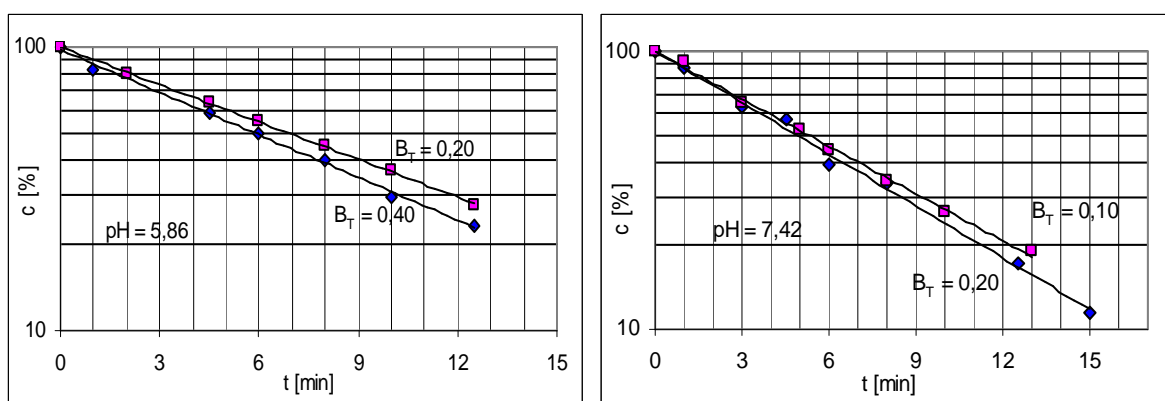


Rycina 23. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze octanowym o pH 3,88, 4,51, 4,86, 5,52, 5,78 w temperaturze 313 K,  $B_T = 0,40 \text{ mol/l}$  (a) ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).



Tabela 30. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 343 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

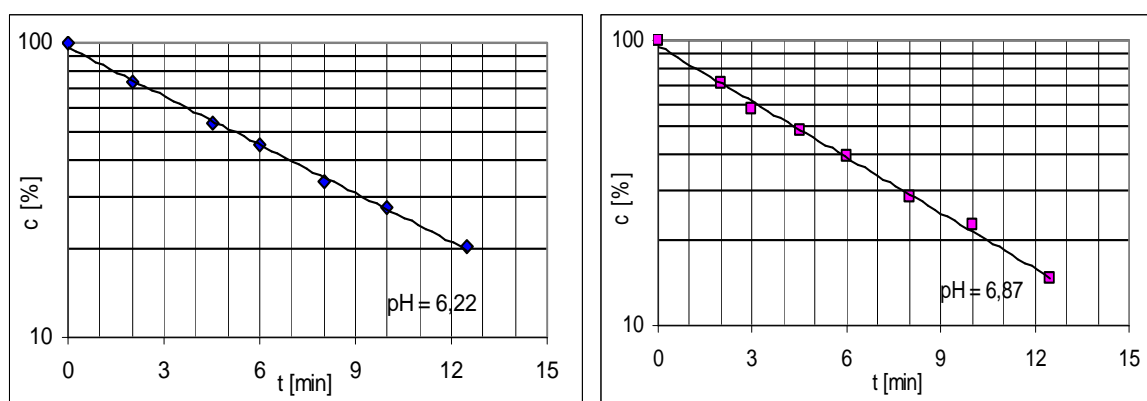
pH = 5,86		
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,40$	$B_T = 0,20$
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,340$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,060$	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,170$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,030$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(11,5 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	$-(10,1 \pm 0,3) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(1,92 \pm 0,12) \times 10^{-3}$	$(1,69 \pm 0,05) \times 10^{-3}$
$S_a$	$2,80 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$
r	0,999	1,000
n	7	7
pH = 7,42		
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,20$	$B_T = 0,10$
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,040$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,160$	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,020$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,080$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(13,7 \pm 0,98) \times 10^{-2}$	$-(13,0 \pm 0,70) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(2,28 \pm 0,16) \times 10^{-3}$	$(2,17 \pm 0,12) \times 10^{-3}$
$S_a$	$4,02 \times 10^{-3}$	$2,85 \times 10^{-3}$
r	0,998	0,999
n	8	8



Rycina 24. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 5,86 i 7,42 w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 31. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 343 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

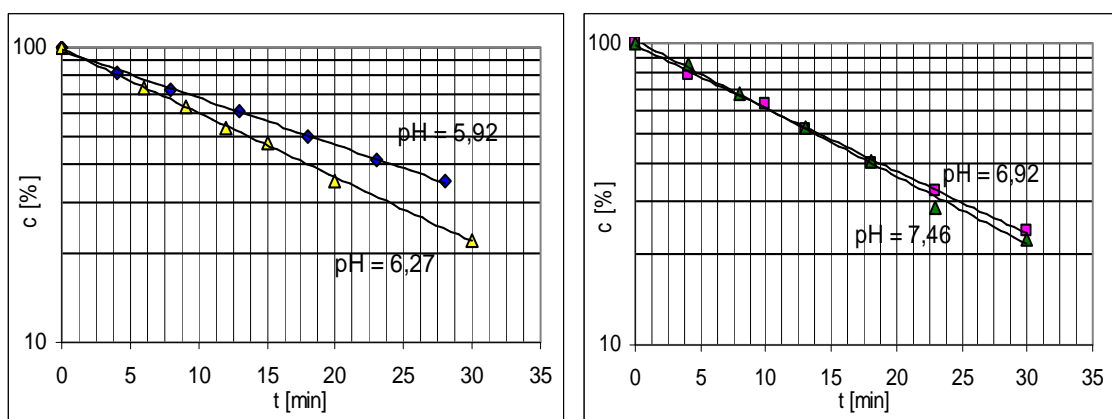
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,20$	
	pH	
pH	6,22	6,87
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,140$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,060$	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,080$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,120$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(12,7 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	$-(15,0 \pm 0,9) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(21,1 \pm 1,2) \times 10^{-4}$	$(24,9 \pm 1,4) \times 10^{-4}$
$S_a$	$27,0 \times 10^{-4}$	$34,9 \times 10^{-4}$
r	0,999	0,998
n	7	8



Rycina 25. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 6,22 i 6,87 w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 32. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 333 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

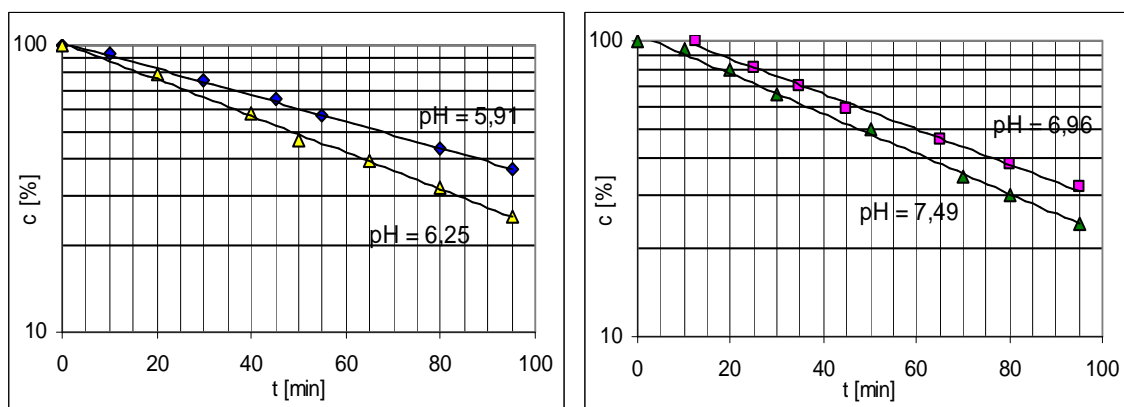
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,20$	
pH	5,92	6,27
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,170$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,030$	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,140$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,060$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(3,68 \pm 0,21) \times 10^{-2}$	$-(4,79 \pm 0,28) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(6,13 \pm 0,35) \times 10^{-4}$	$(7,98 \pm 0,47) \times 10^{-4}$
$S_a$	$8,26 \times 10^{-4}$	$11,0 \times 10^{-4}$
r	0,999	0,999
n	7	7
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,20$	
pH	6,92	7,46
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,080$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,120$	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,040$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,160$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(5,02 \pm 0,19) \times 10^{-2}$	$-(5,19 \pm 0,42) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(8,37 \pm 0,32) \times 10^{-4}$	$(8,65 \pm 0,70) \times 10^{-4}$
$S_a$	$7,39 \times 10^{-4}$	$16,3 \times 10^{-4}$
r	1,000	0,998
n	7	7



Rycina 26. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 5,92, 6,27, 6,92 i 7,46 w temperaturze 333 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 33. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 323 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

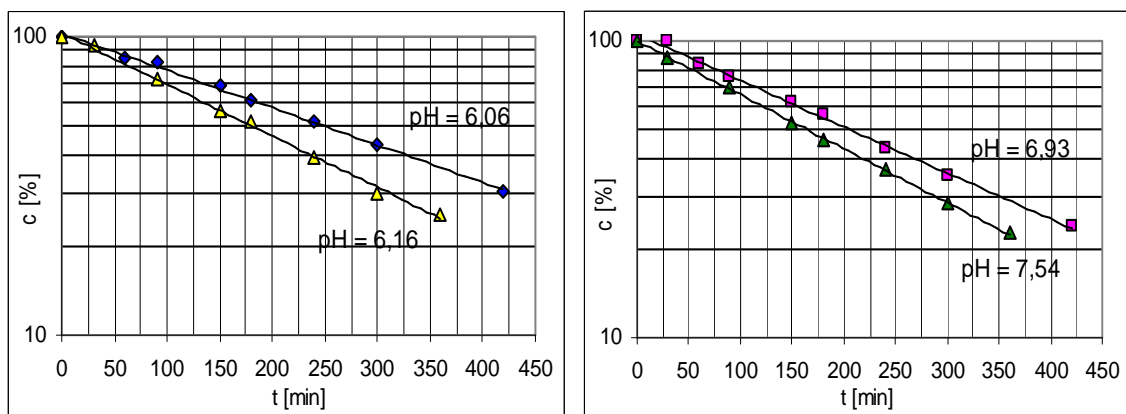
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,20$	
pH	5,91	6,25
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,170$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,030$	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,140$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,060$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(10,7 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$-(13,7 \pm 1,052) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(1,78 \pm 0,08) \times 10^{-4}$	$(2,29 \pm 0,17) \times 10^{-4}$
$S_a$	$1,86 \times 10^{-4}$	$3,97 \times 10^{-4}$
r	0,999	0,998
n	7	7
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,20$	
pH	6,96	7,49
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,080$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,120$	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,040$ $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,160$
$(a \pm \Delta a) [\text{min}^{-1}]$	$-(14,7 \pm 0,96) \times 10^{-3}$	$-(15,5 \pm 0,85) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(2,45 \pm 0,16) \times 10^{-4}$	$(2,59 \pm 0,14) \times 10^{-4}$
$S_a$	$3,73 \times 10^{-4}$	$3,48 \times 10^{-4}$
r	0,998	0,999
n	7	8



Rycina 27. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 5,91, 6,25, 6,96 i 7,49 w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 34. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym, w temperaturze 313 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l)

Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,20$	
pH	6,06	6,16
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[H_2PO_4^-] = 0,170$ $[HPO_4^{2-}] = 0,030$	$[H_2PO_4^-] = 0,140$ $[HPO_4^{2-}] = 0,060$
$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$-(2,88 \pm 0,15) \times 10^{-3}$	$-(3,58 \pm 0,20) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$(4,80 \pm 0,24) \times 10^{-5}$	$(5,97 \pm 0,34) \times 10^{-5}$
$S_a$	$5,93 \times 10^{-5}$	$8,50 \times 10^{-5}$
r	0,999	0,998
n	8	9
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	$B_T = 0,20$	
pH	6,93	7,54
Stężenie składników buforu [mol/l]	$[H_2PO_4^-] = 0,080$ $[HPO_4^{2-}] = 0,120$	$[H_2PO_4^-] = 0,040$ $[HPO_4^{2-}] = 0,160$
$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$-(3,96 \pm 0,20) \times 10^{-3}$	$-(4,18 \pm 0,10) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$(6,60 \pm 0,33) \times 10^{-5}$	$(6,97 \pm 0,17) \times 10^{-5}$
$S_a$	$8,17 \times 10^{-5}$	$4,28 \times 10^{-5}$
r	0,999	1,000
n	8	8

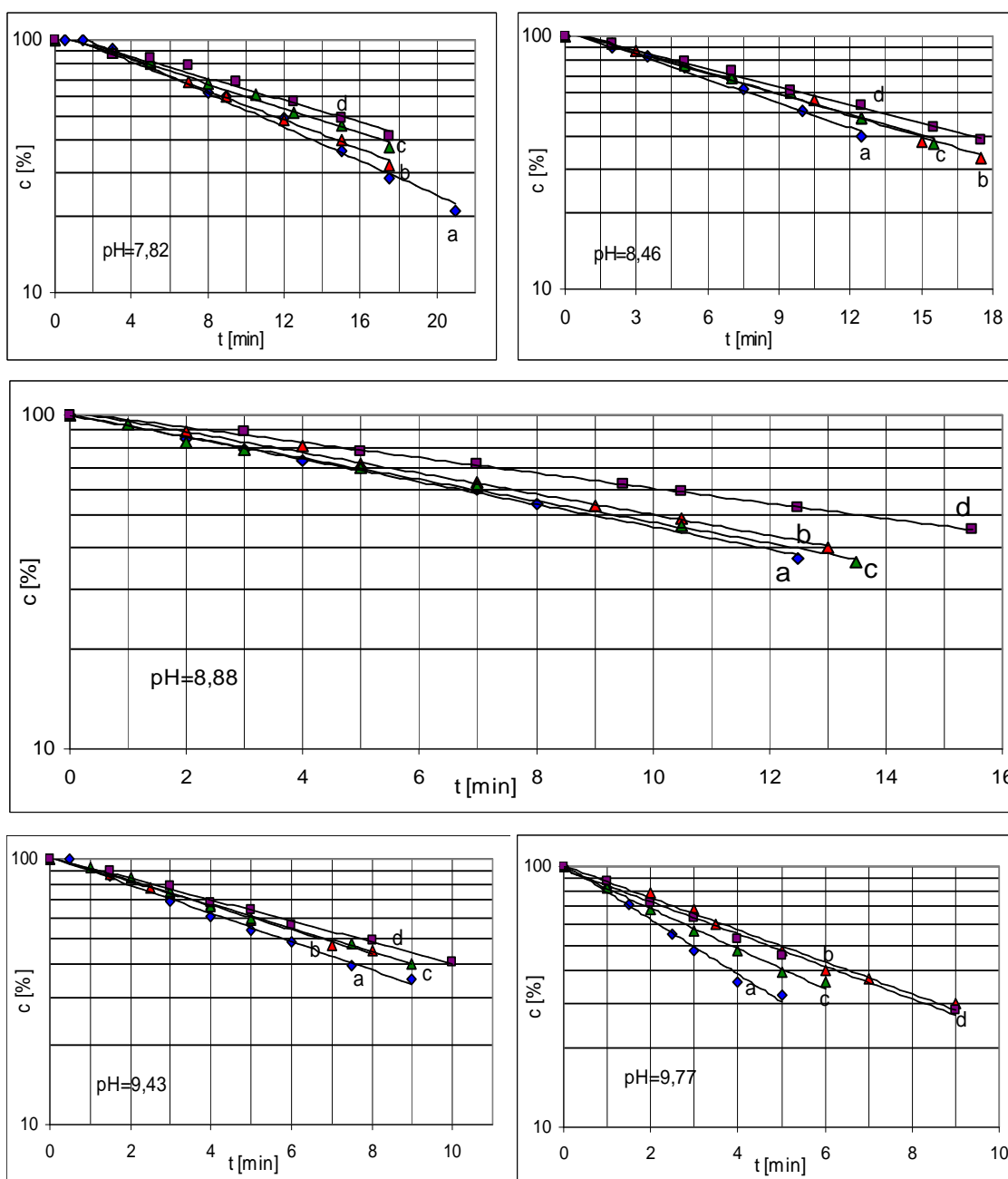


Rycina 28. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 6,06, 6,16, 6,93 i 7,54 w temperaturze 313 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 35. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze boranowym, w temperaturze 343 K, ( $\mu = 0,50$  mol/l)

pH = 7,82				
$B_T$ [mol/l]	$B_T = 0,221$ (a)	$B_T = 0,166$ (b)	$B_T = 0,110$ (c)	$B_T = 0,055$ (d)
Stężenie składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,019 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,202	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,014 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,152	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,009 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,101	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,005 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,050
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(6,72 \pm 0,63) \times 10^{-2}$	$-(6,62 \pm 0,62) \times 10^{-2}$	$-(6,54 \pm 0,55) \times 10^{-2}$	$-(6,45 \pm 0,72) \times 10^{-2}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(1,12 \pm 0,10) \times 10^{-3}$	$(1,10 \pm 0,10) \times 10^{-3}$	$(1,09 \pm 0,09) \times 10^{-3}$	$(1,08 \pm 0,12) \times 10^{-3}$
$S_a$	$2,72 \times 10^{-3}$	$2,53 \times 10^{-3}$	$2,23 \times 10^{-3}$	$2,94 \times 10^{-3}$
r	0,995	0,996	0,995	0,990
n	10	8	8	8
pH = 8,46				
$B_T$ [mol/l]	$B_T = 0,195$ (a)	$B_T = 0,169$ (b)	$B_T = 0,147$ (c)	$B_T = 0,098$ (d)
Stężenie składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,044 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,151	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,039 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,130	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,034 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,113	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,023 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,075
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(5,40 \pm 0,87) \times 10^{-2}$	$-(6,53 \pm 0,66) \times 10^{-2}$	$-(6,31 \pm 0,64) \times 10^{-2}$	$-(5,52 \pm 0,36) \times 10^{-2}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(0,90 \pm 0,14) \times 10^{-3}$	$(1,09 \pm 0,11) \times 10^{-3}$	$(1,05 \pm 0,11) \times 10^{-3}$	$(0,92 \pm 0,06) \times 10^{-3}$
$S_a$	$3,38 \times 10^{-3}$	$2,69 \times 10^{-3}$	$2,48 \times 10^{-3}$	$1,47 \times 10^{-3}$
r	0,995	0,995	0,996	0,998
n	7	8	7	8
pH = 8,88				
$B_T$ [mol/l]	$B_T = 0,162$ (a)	$B_T = 0,122$ (b)	$B_T = 0,101$ (c)	$B_T = 0,081$ (d)
Stężenie składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,078 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,084	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,059 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,063	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,049 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,052	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,039 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,042
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(7,75 \pm 0,41) \times 10^{-2}$	$-(7,14 \pm 0,47) \times 10^{-2}$	$-(7,35 \pm 0,45) \times 10^{-2}$	$-(7,08 \pm 0,27) \times 10^{-2}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(1,29 \pm 0,07) \times 10^{-3}$	$(1,19 \pm 0,08) \times 10^{-3}$	$(1,22 \pm 0,08) \times 10^{-3}$	$(1,18 \pm 0,08) \times 10^{-3}$
$S_a$	$1,67 \times 10^{-3}$	$1,93 \times 10^{-3}$	$1,86 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-3}$
r	0,999	0,998	0,998	0,999
n	8	8	8	8
pH = 9,43				
$B_T$ [mol/l]	$B_T = 0,126$ (a)	$B_T = 0,094$ (b)	$B_T = 0,063$ (c)	$B_T = 0,032$ (d)
Stężenie składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,114 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,012	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,085 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,009	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,057 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,006	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,029 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,003
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(1,09 \pm 0,10) \times 10^{-1}$	$-(1,04 \pm 0,06) \times 10^{-1}$	$-(1,03 \pm 0,05) \times 10^{-1}$	$-(1,04 \pm 0,06) \times 10^{-1}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(1,81 \pm 0,17) \times 10^{-3}$	$(1,74 \pm 0,11) \times 10^{-3}$	$(1,71 \pm 0,09) \times 10^{-3}$	$(1,73 \pm 0,11) \times 10^{-3}$
$S_a$	$4,26 \times 10^{-3}$	$2,62 \times 10^{-3}$	$2,13 \times 10^{-3}$	$2,65 \times 10^{-3}$
r	0,996	0,998	0,999	0,997
n	8	8	8	8
pH = 9,77				
$B_T$ [mol/l]	$B_T = 0,122$ (a)	$B_T = 0,099$ (b)	$B_T = 0,076$ (c)	$B_T = 0,054$ (d)
Stężenie składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,118 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,004	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,095 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,004	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,073 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,003	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,052 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,002
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(1,76 \pm 0,28) \times 10^{-1}$	$-(1,661 \pm 0,16) \times 10^{-1}$	$-(1,77 \pm 0,16) \times 10^{-1}$	$-(1,67 \pm 0,15) \times 10^{-1}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(2,93 \pm 0,47) \times 10^{-3}$	$-(2,76 \pm 0,27) \times 10^{-3}$	$-(2,95 \pm 0,26) \times 10^{-3}$	$-(2,78 \pm 0,24) \times 10^{-3}$
$S_a$	$11,0 \times 10^{-3}$	$6,64 \times 10^{-3}$	$6,16 \times 10^{-3}$	$5,69 \times 10^{-3}$
r	0,995	0,993	0,997	0,996
n	7	8	7	7

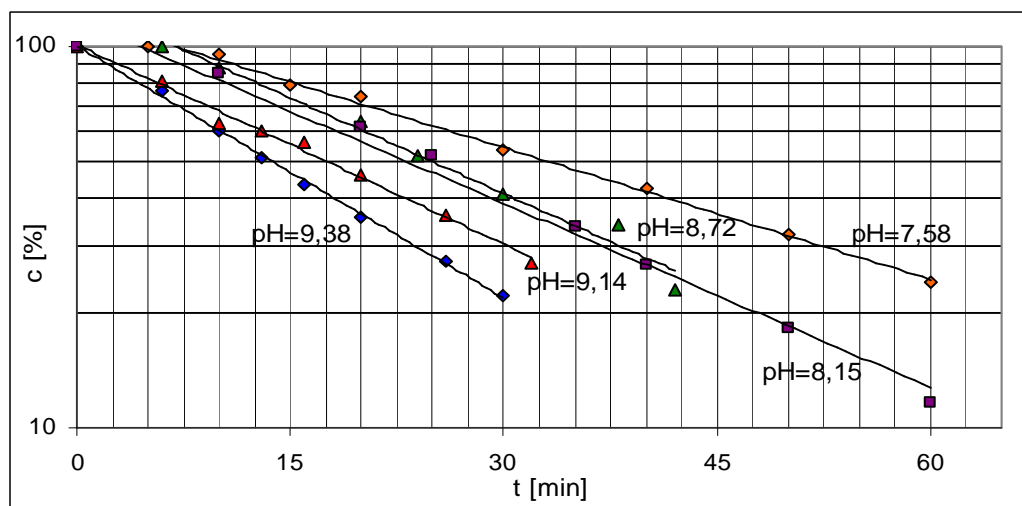
$B_T$  - Stężenie całkowite składników buforu



Rycina 29. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze boranowym o pH 7,82, 8,46, 8,88, 9,43 i 9,77 w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 36. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze boranowym, w temperaturze 333 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

pH	7,58	8,15	8,72
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,019 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,202	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,044 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,151	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,078 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,084
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(2,65 \pm 0,16) \times 10^{-2}$	$-(3,71 \pm 0,45) \times 10^{-2}$	$-(3,86 \pm 0,63) \times 10^{-2}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(4,42 \pm 0,26) \times 10^{-4}$	$(6,18 \pm 0,75) \times 10^{-4}$	$(6,43 \pm 1,04) \times 10^{-4}$
S <sub>a</sub>	$0,64 \times 10^{-3}$	$1,83 \times 10^{-3}$	$2,44 \times 10^{-3}$
r	0,998	0,993	0,990
n	8	8	7
pH	9,14	pH	9,38
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,114 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,012	Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,118 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,004
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(4,01 \pm 0,37) \times 10^{-2}$	(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(5,06 \pm 0,21) \times 10^{-2}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(6,69 \pm 0,61) \times 10^{-4}$	(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(8,44 \pm 0,35) \times 10^{-4}$
S <sub>a</sub>	$1,50 \times 10^{-3}$	S <sub>a</sub>	$0,85 \times 10^{-3}$
r	0,996	r	0,999
n	8	n	8

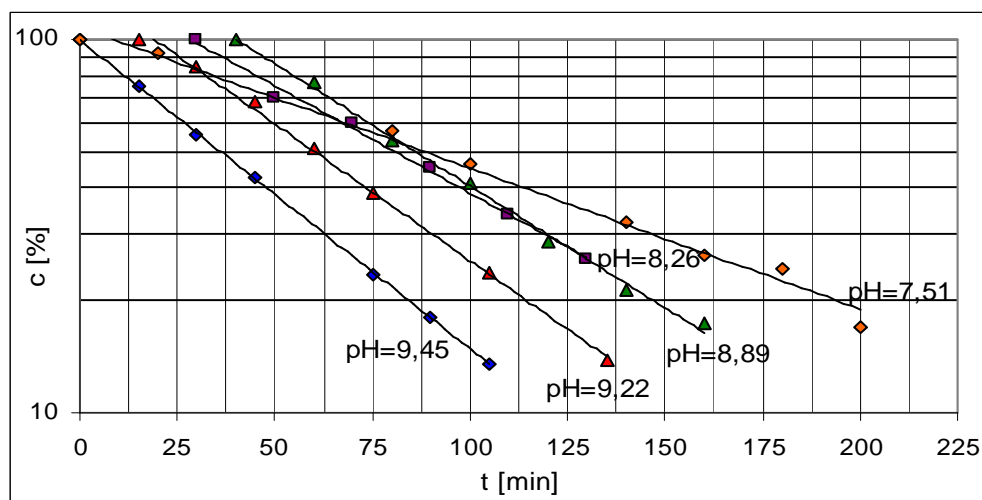


Rycina 30. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze boranowym o pH 7,58, 8,15, 8,72, 9,14 i 9,38 w temperaturze 333 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).



Tabela 37. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze boranowym, w temperaturze 323 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

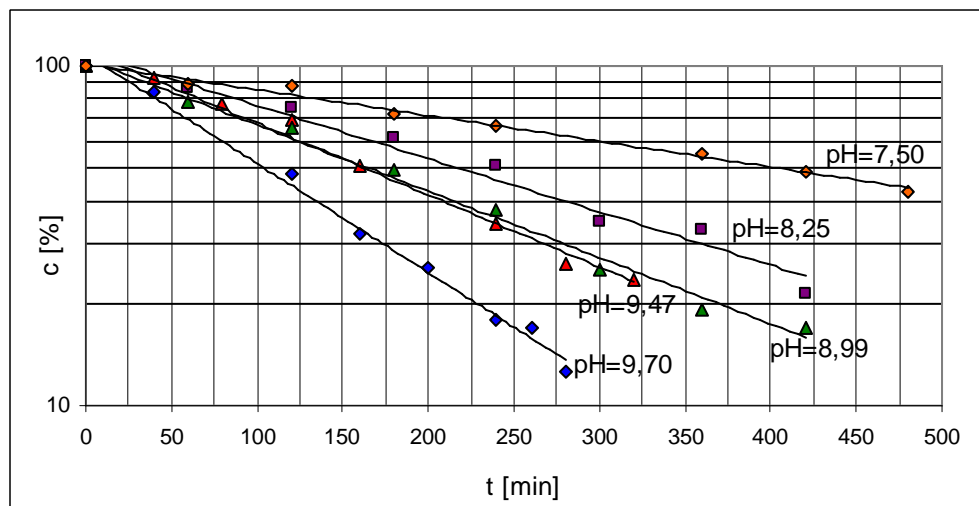
pH	7,51	8,26	8,89
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,019 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,202	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,044 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,151	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,078 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,084
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(0,87 \pm 0,08) \times 10^{-2}$	$-(1,32 \pm 0,14) \times 10^{-2}$	$-(1,51 \pm 0,11) \times 10^{-2}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(1,45 \pm 0,14) \times 10^{-4}$	$(2,20 \pm 0,24) \times 10^{-4}$	$(2,51 \pm 0,18) \times 10^{-4}$
S <sub>a</sub>	$3,47 \times 10^{-4}$	$5,18 \times 10^{-4}$	$4,24 \times 10^{-4}$
r	0,995	0,997	0,998
n	8	6	7
pH	9,22	pH	9,45
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,114 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,012	Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,118 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,004
( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(1,69 \pm 0,11) \times 10^{-2}$	( $a \pm \Delta a$ ) [min <sup>-1</sup> ]	$-(1,90 \pm 0,03) \times 10^{-2}$
( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(2,81 \pm 0,18) \times 10^{-4}$	( $k \pm \Delta k$ ) [s <sup>-1</sup> ]	$(3,17 \pm 0,05) \times 10^{-4}$
S <sub>a</sub>	$4,18 \times 10^{-4}$	S <sub>a</sub>	$1,21 \times 10^{-4}$
r	0,998	r	1,000
n	7	n	7



Rycina 31. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze boranowym o pH 7,51, 8,26, 8,89, 9,22 i 9,45 w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 38. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w buforze boranowym, w temperaturze 313 K, ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

pH	7,50	8,25	8,99
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,019 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,202	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,044 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,151	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,078 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,084
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(1,74 \pm 0,17) \times 10^{-3}$	$-(3,61 \pm 0,60) \times 10^{-3}$	$-(4,49 \pm 0,46) \times 10^{-3}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(2,91 \pm 0,28) \times 10^{-5}$	$(6,01 \pm 1,00) \times 10^{-5}$	$(7,49 \pm 0,77) \times 10^{-5}$
S <sub>a</sub>	$0,69 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^{-4}$	$1,89 \times 10^{-4}$
r	0,995	0,986	0,995
n	8	8	8
pH	9,47	pH	9,70
Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,114 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,012	Stężenie całkowite składników buforu [mol/l]	[NaBO <sub>2</sub> ] = 0,118 [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] = 0,004
(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(4,88 \pm 0,56) \times 10^{-3}$	(a ± Δa) [min <sup>-1</sup> ]	$-(7,39 \pm 0,63) \times 10^{-3}$
(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(8,13 \pm 0,93) \times 10^{-5}$	(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	$(12,3 \pm 1,1) \times 10^{-5}$
S <sub>a</sub>	$2,27 \times 10^{-4}$	S <sub>a</sub>	$2,56 \times 10^{-4}$
r	0,994	r	0,996
n	8	n	8



Rycina 32. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w buforze boranowym o pH 7,50, 8,25, 8,99, 9,47 i 9,70 w temperaturze 313 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

## 4.6. Ocena trwałości PMD w roztworach do podania parenteralnego

Badania trwałości PMD przeprowadzono w wybranych roztworach do podania parenteralnego w:

- temperaturze pokojowej (22°C) po 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h
- temperaturze 2–8°C po 0 h, 6 h, 24 h
- temperaturze -16°C po 0 i 30 dniach [122].

W sterylnych polietylenowych ampułkach, pojemności 5 ml, zawierających 5,0 ml roztworu do podania parenteralnego (Tabela 8), rozpuszczono 1,5 mg PMD i przechowywano w podanych powyżej warunkach.

W określonych odstępach czasu, pobierano 0,5 ml tak przygotowanego roztworu i dodawano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego.

Podczas badań trwałości PMD jako wzorzec wewnętrzny stosowano roztwór chlorowodoru chininy (0,05 mg/ml). Otrzymane roztwory analizowano opisaną w rozdziale 4.4 metodą HPLC.

*Wszystkie czynności wykonywano chroniąc badane roztwory przed dostępem światła*

Wyniki oznaczeń roztworów PMD przedstawiono:

- w temperaturze pokojowej – tabele 39–40, ryciny 33–34
- w temperaturze 2–8°C – tabela 41, rycina 35
- w temperaturze -16°C – tabela 42, rycina 36

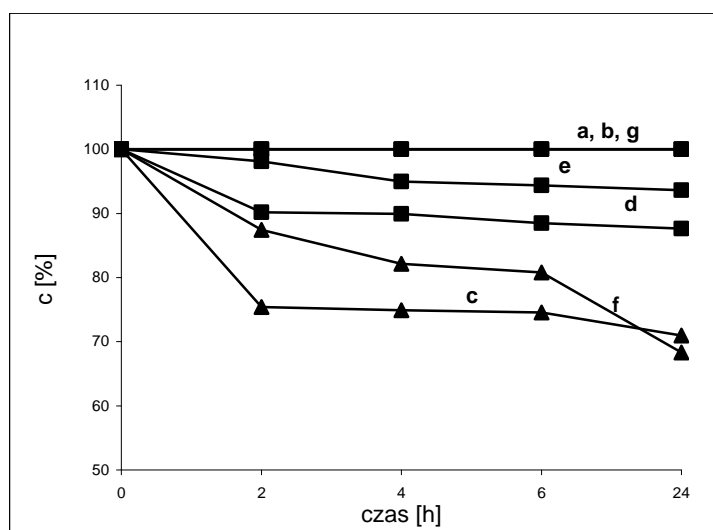
Ubytek stężenia po czasie  $t$  (wyrażony w procentach) obliczono ze wzoru:

$$c = (P_{\text{PMD}}/P_w)_t / (P_{\text{PMD}}/P_w)_0 * 100$$

gdzie:  $P_{\text{PMD}}$  i  $P_w$  są polami powierzchni pików PMD i wzorca wewnętrznego,  $(P_{\text{PMD}}/P_w)_t$  jest stosunkiem tych pól w czasie  $t$ , a  $(P_{\text{PMD}}/P_w)_0$  jest odpowiednio stosunkiem tych pól w czasie  $t = 0$ .

Tabela 39. Wyniki badania trwałości PMD w roztworach do podania parenteralnego w temperaturze pokojowej

Roztwór	Czas przechowywania [h]	$P_{PMD}/P_w$	Zmiana stężenia PMD c [%]
Aqua pro Injectione	0	2,9748	100
	2	2,8433	100
	4	2,9434	100
	6	2,9592	100
	24	3,0682	100
Glucosum 5% et Natrium chloratum 0,9% (1:1)	0	2,6750	100
	2	2,6880	100
	4	2,6770	100
	6	2,6069	100
	24	2,6779	100
Glucosum 5% et Natrium chloratum 0,9% (2:1)	0	4,6166	100
	2	3,4815	75,41
	4	3,4586	74,90
	6	3,4413	74,54
	24	3,2776	70,99
Injectio Glucosi 5%	0	2,9478	100
	2	2,8917	98,10
	4	2,7997	94,98
	6	2,8997	98,37
	24	2,7604	93,64
Injectio Glucosi 10%	0	3,5904	100
	2	3,1389	87,42
	4	2,9503	82,17
	6	2,9012	80,80
	24	2,4521	68,30
Injectio Glucosi 20%	0	2,7463	100
	2	2,8353	100
	4	2,7654	100
	6	2,7872	100
	24	2,7328	100
Jonosteril® Basic z glukozą	0	4,3052	100
	2	3,8828	90,19
	4	3,8723	89,94
	6	3,8102	88,51
	24	3,7733	87,65

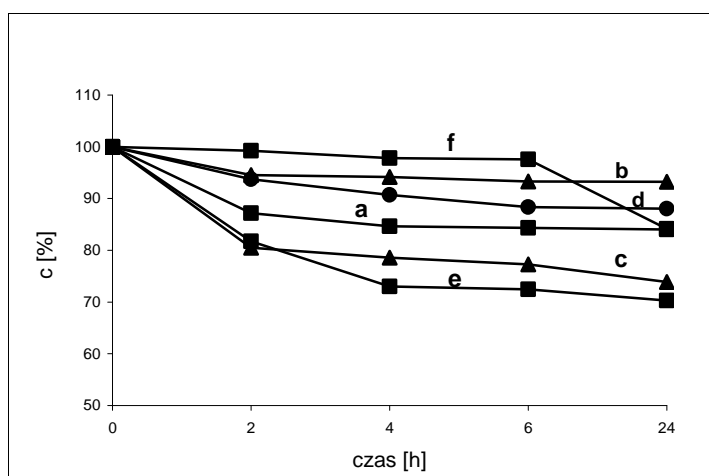


Rycina 33.

Wykresy zależności zmian stężenia PMD jako funkcji czasu ( $c$  [%] =  $f(t)$ ) po przechowywaniu w temperaturze pokojowej w: Aqua pro Injectione (a), mieszaninie 5% glukozy i 0,9% NaCl (1:1) (b), mieszaninie 5% glukozy i 0,9% NaCl (2:1) (c), Jonosterilu (d), 5% glukozy (e), 10% glukozy (f), 20% glukozy (g).

Tabela 40. Wyniki badania trwałości PMD w roztworach do podania parenteralnego w temperaturze pokojowej

Roztwór	Czas przechowywania [h]	$P_{PMD}/P_w$	Zmiana stężenia PMD c [%]
Injectio Solutionis Ringeri	0	4,3504	100
	2	3,7968	87,18
	4	3,6811	84,62
	6	3,6686	84,33
	24	3,6576	84,04
Solutio Ringeri Lactate	0	3,4390	100
	2	3,2507	94,53
	4	3,2385	94,17
	6	3,2080	93,28
	24	3,2066	93,24
0,9% Sol. Natrii chloratii	0	2,8092	100
	2	2,7873	99,22
	4	2,7472	97,79
	6	2,7405	97,55
	24	2,3637	84,14
Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	3,7344	100
	2	3,0069	80,52
	4	2,9353	78,60
	6	2,8852	77,28
	24	2,7582	73,86
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	3,7010	100
	2	3,4701	93,76
	4	3,3590	90,72
	6	3,2686	88,32
	24	3,2576	88,02
Mannitol 20%	0	4,0959	100
	2	3,3474	81,72
	4	2,9899	72,99
	6	2,9669	72,43
	24	2,8789	70,29

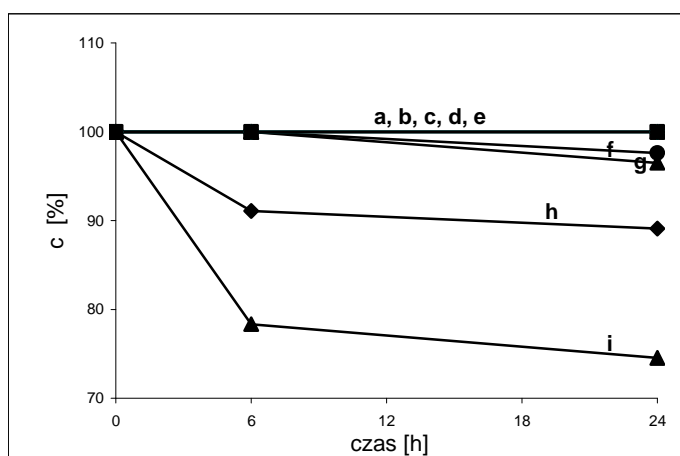


Rycina 34.

Wykresy zależności zmian stężenia PMD jako funkcji czasu ( $c [\%] = f(t)$ ) po przechowywaniu w temperaturze pokojowej w: Sol. Ringeri (a), Sol. Ringeri Lact. (b), płynie pediatrycznym wyrównawczym (c), płynie fizjologicznym wieloelektrolitowym izotonicznym (d), 20% mannitolu (e), 0,9% NaCl (f).

Tabela 41. Wyniki badania trwałości PMD w roztworach do podania parenteralnego w temperaturze 2–8°C

Roztwór	Czas przechowywania [h]	$P_{PMD}/P_w$	Zmiana stężenia PMD c [%]
0,9% Sol. Natrii chloratii	0	3,4753	100
	6	3,5336	100
	24	4,2883	100
5% Glucosum	0	3,4092	100
	6	3,4115	100
	24	3,4168	100
Injectio Glucosi 10%	0	3,3692	100
	6	3,4437	100
	24	3,5034	100
Glucosum 5% et Natrium chloratum 0,9% 2:1	0	2,8861	100
	6	2,8868	100
	24	2,7851	96,50
Injectio Solutionis Ringeri	0	3,3534	100
	6	3,0546	91,09
	24	2,9879	89,10
Solutio Ringeri Lactate	0	3,1882	100
	6	3,2943	100
	24	3,1131	97,64
Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	2,9057	100
	6	2,9083	100
	24	2,9088	100
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	3,4155	100
	6	3,4318	100
	24	3,4222	100
Jonosteril® Basic z glukozą	0	3,7615	100
	6	2,9474	78,36
	24	2,8032	74,52

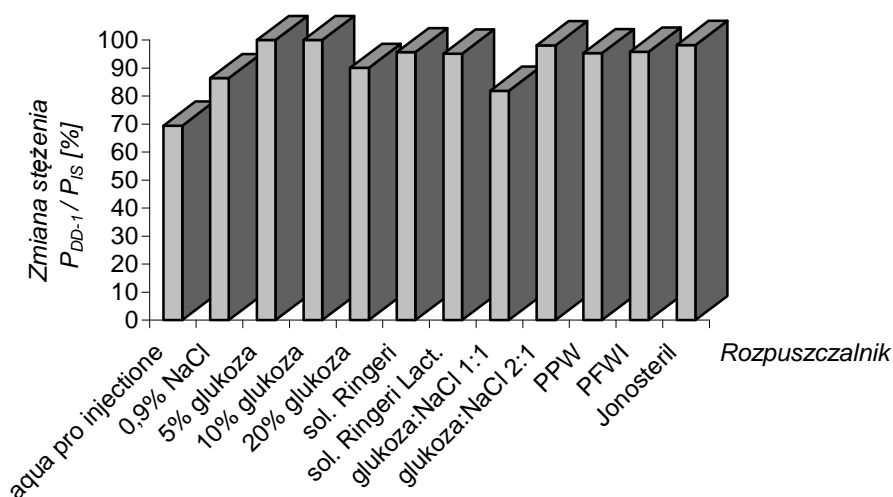


Rycina 35.

Wykresy zależności zmian stężenia PMD jako funkcji czasu ( $c [\%] = f(t)$ ) po przechowywaniu w temperaturze 2–8°C w: 0,9% NaCl (**a**), 5% glukozie (**b**), 10% glukozie (**c**), płynie pediatrycznym wyrównawczym (**d**), płynie fizjologicznym wieloelektrolitowym izotonicznym (**e**), Sol. Ringeri Lact. (**f**), mieszaninie 5% glukozy i 0,9% NaCl (2:1) (**g**), Sol. Ringeri (**h**) i jonosterilu (**i**).

Tabela 42. Wyniki badania trwałości PMD w roztworach do podania parenteralnego po 30 dniowym przechowywaniu w temperaturze -16°C

Roztwór	$P_{PMD}/P_w$	Zmiana stężenia PMD c [%]
Aqua pro Iniectione	3,7454	69,45
0,9% Sol. Natrii Chloratii	3,1559	86,41
5% Glucosum	3,4059	100
Injectio Glucosi 10%	3,1439	99,49
Injectio Glucosi 20%	3,0773	90,08
Injectio Solutionis Ringeri	3,2134	95,65
Solutio Ringeri Lactate	3,1065	95,16
Glucosum 5% et Natrium Chloratum 0,9% 1:1	2,8593	81,91
Glucosum 5% et Natrium Chloratum 0,9% 2:1	3,6614	98,15
Płyn pediatriczny wyrównawczy	3,2545	95,31
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	3,1446	95,84
Jonosteril® Basic z glukozą	3,3433	98,24



Rycina 36. Zmiany stężenia PMD w roztworach do podania parenteralnego po 30-dniowym przechowywaniu w temperaturze -16°C.

## 4.7. Ocena fototrwałości PMD w roztworach wodnych

Badania fototrwałości PMD w roztworach wodnych o stężeniu 25,0 µg/ml, przeprowadzono w cylindrycznej kuwecie kwarcowej, pojemności 2,5 ml i długości drogi optycznej  $l = 1$  cm. Naświetlanie prowadzono wysokociśnieniową lampą UV z palnikiem rtęciowym HBO-50, emitującą promieniowanie w zakresie od 300 do 700 nm. Maksimum absorpcji promieniowania przy 365 i 510 nm uzyskano stosując filtr Wood'a. W przeprowadzonych badaniach, do określenia natężenia promieniowania padającego na badany układ, wykorzystano aktynometr fizyczny (Radiometr typu VLX-3W, Vilber Lourmat) [122].

### 4.7.1. Metoda analityczna

Do oceny fototrwałości PMD w roztworach wodnych zastosowano metodę UV–VIS. Walidacji poddano następujące parametry: liniowość, precyzję, granicę wykrywalności i oznaczalności. Natężenie światła mierzone radiometrem mieściło się w zakresie 86,0–89,0 mW/cm<sup>2</sup>. W czasie 1 min rejestrowano energię 5,10–5,30 J/cm<sup>2</sup>.

#### *Liniowość metody*

Przygotowano roztwory wzorcowe PMD o stężeniach od 0,012 do 0,06 mg/ml.

#### *Roztwory substancji badanej*

Odważono 25,0 mg PMD, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do 25,0 ml (roztwór A). Następnie przygotowano 10 kolejnych rozcieńczeń (0,012 – 0,06 mg/ml) i wykreślono widma w zakresie 200–800 nm.

Wykonano wykresy  $A_i = f(c)$ , (Rycina 37);

$A_i$  = absorbancja przy  $\lambda = 480$  nm

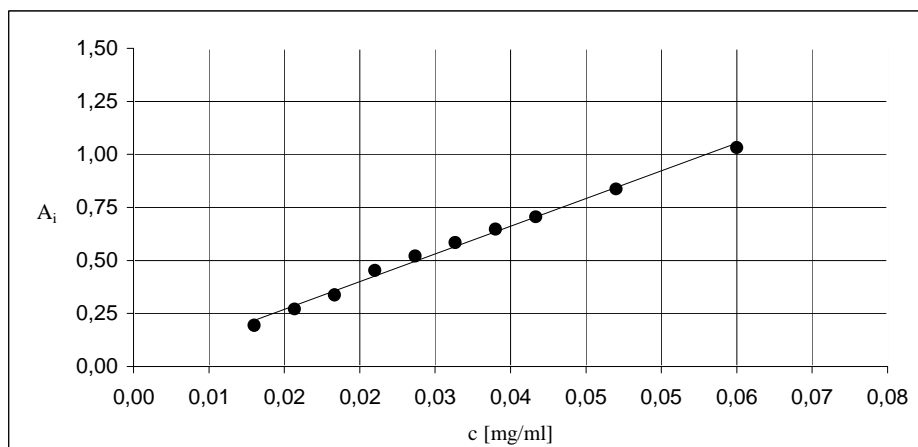
$c$  = stężenie badanego roztworu  $A_1$ – $A_{10}$  (mg/ml)



Wykres zależności  $A_i = f(c)$  dla PMD jest prostoliniowy. Wyznaczono parametry prostych  $y = ax + b$  oraz  $y = ax$ , zbadano istotność współczynnika  $b$  i stwierdzono, że wartość bezwzględna  $t_b$  jest mniejsza od wartości krytycznej; ( $t_{obl} = 0,5248 < t_{0,05}(8) = 2,228$ ), stąd wartość współczynnika  $b = (0,008 \pm 0,036) \cdot 10^{-4}$  jest nieistotna ( $b = 0$ ) (Tabela 43).

Tabela 43. Zależność  $A_i = f(c)$  dla PMD i ocena statystyczna prostych  $y = ax + b$  i  $y = ax$

Lp.	c [mg/ml]	$A_i$	Ocena statystyczna prostych	
			$y = ax + b$	$y = ax$
1.	0,012	0,1950	$a = 17,41 \pm 1,05$ $b = (0,008 \pm 0,036) \cdot 10^{-4}$ $r = 0,9972$ $t_b = 0,5248$ $S_a = 0,4576$ $S_b = 0,0158$ $S_y = 0,0204$	$a = 17,63 \pm 0,99$ $r = 0,9972$ $S_a = 0,4314$ $S_y = 0,0192$
2.	0,016	0,2710		
3.	0,020	0,3380		
4.	0,024	0,4520		
5.	0,028	0,5210		
6.	0,032	0,5840		
7.	0,036	0,6480		
8.	0,040	0,7067		
9.	0,048	0,8375		
10.	0,060	1,0329		



Rycina 37. Zależność  $A_i = f(c)$  PMD.

### Precyzja metody

W celu określenia precyzji metody przygotowano cztery serie roztworów PMD o stężeniach  $A_1$ – $A_4$  i wykonano po 6 oznaczeń dla każdej serii. Mierzono wartość absorbancji prób przy długości fali  $\lambda = 480$  nm (Tabela 44–45).

### Roztwory substancji badanej

Odważono 25,0 mg PMD, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do 25,0 ml (roztwór A). Następnie odmierzone odpowiednio: 1,0 ml, 1,2 ml, 1,6 ml, 2,0 ml roztworu A i uzupełniono wodą do 50,0 ml, otrzymując roztwory o stężeniach: 0,020 mg/ml (A<sub>1</sub>), 0,024 mg/ml (A<sub>2</sub>), 0,032 mg/ml (A<sub>3</sub>) i 0,040 mg/ml (A<sub>4</sub>).

Tabela 44. Wyniki oznaczania PMD o stężeniu A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>.

Lp.	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>
1.	0,3977	0,5102	0,6414	0,7684
2.	0,3970	0,5116	0,6412	0,7696
3.	0,3985	0,5125	0,6424	0,7684
4.	0,3987	0,5127	0,6423	0,7719
5.	0,3987	0,5122	0,6446	0,7695
6.	0,3989	0,5138	0,6455	0,7727

Tabela 46. Precyzja metody UV–VIS oznaczania PMD w roztworach

Parametr	Roztwór A1	Roztwór A2	Roztwór A3	Roztwór A4
A <sub>sr</sub>	$3,98 \cdot 10^{-1}$	$5,12 \cdot 10^{-1}$	$6,43 \cdot 10^{-1}$	$7,70 \cdot 10^{-1}$
s <sup>2</sup>	$1,45 \cdot 10^{-1}$	$1,45 \cdot 10^{-1}$	$3,08 \cdot 10^{-1}$	$3,28 \cdot 10^{-1}$
s	$1,21 \cdot 10^{-3}$	$1,22 \cdot 10^{-3}$	$1,81 \cdot 10^{-3}$	$1,81 \cdot 10^{-3}$
s <sub>x</sub>	$5,00 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-4}$	$7,00 \cdot 10^{-4}$	$7,00 \cdot 10^{-4}$
W <sub>z</sub> [%]	$2,35 \cdot 10^{-1}$	$2,35 \cdot 10^{-1}$	$2,73 \cdot 10^{-1}$	$2,35 \cdot 10^{-1}$

s<sup>2</sup> – wariancja; s – odchylenie pojedynczego wyniku; s<sub>x</sub> – odchylenie standardowe średniej arytmetycznej  
W<sub>z</sub> – współczynnik zmienności

### Granica wykrywalności i oznaczalności metody

Granica wykrywalności (DL) dla PMD wyznaczona z równania wynosi  $1,42 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.

$$DL = 3,3 \cdot S_y/a$$

Granica oznaczalności (QL) dla PMD wyznaczona z równania wynosi  $4,30 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.

$$QL = 10 \cdot S_y/a$$

### *Zakres i czułość metody UV-Vis*

Określony został przedział między najniższym i najwyższym stężeniem substancji, dla którego oznaczanie prowadzone jest z odpowiednią precyzją i liniowością. Zakres ten wynosi od 0,012 mg/ml do 0,06 mg/ml.

Miarą czułości metody jest nachylenie krzywej  $y = ax = (13,4 \pm 1,2) \cdot x$ ;  $r = 0,9928$

Metoda UV–VIS jest metodą czułą, gdyż niewielkie zmiany stężenia substancji powodują wyraźne zmiany wielkości mierzonej.

### 4.7.2. Ocena fototrwałości PMD

#### *Wstępna ocena rozkładu fotochemicznego PMD*

Wstępną ocenę fotostabilności przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w dokumencie ICH Q1B. Według przewodnika ICH, przed przystąpieniem do szczegółowych badań należy wstępnie ocenić podatność danej substancji na rozkład fotochemiczny. Na podstawie uzyskanych wyników związek można sklasyfikować jako fotolabilny lub fotostabilny, a następnie przejść do kolejnych etapów badań.

Do oceny, czy w określonym czasie zastosowano wymaganą dawkę promieniowania, użyto aktynometru chemicznego – roztwór chlorowodoru chininy. Naświetlanie przeprowadzono w komorze do naświetlań, stosując źródło promieniowania o zakresie 320–800 nm. Próbkę chlorowodoru chininy umieszczono obok próbki naświetlanej, a stopień rozkładu substancji badanej i porównawczej określano metodą spektrofotometryczną, mierząc różnicę absorbancji przy  $\lambda = 400$  nm (chlorowodorek chininy) i 480 nm (PMD).

#### *Przygotowanie prób do naświetlania*

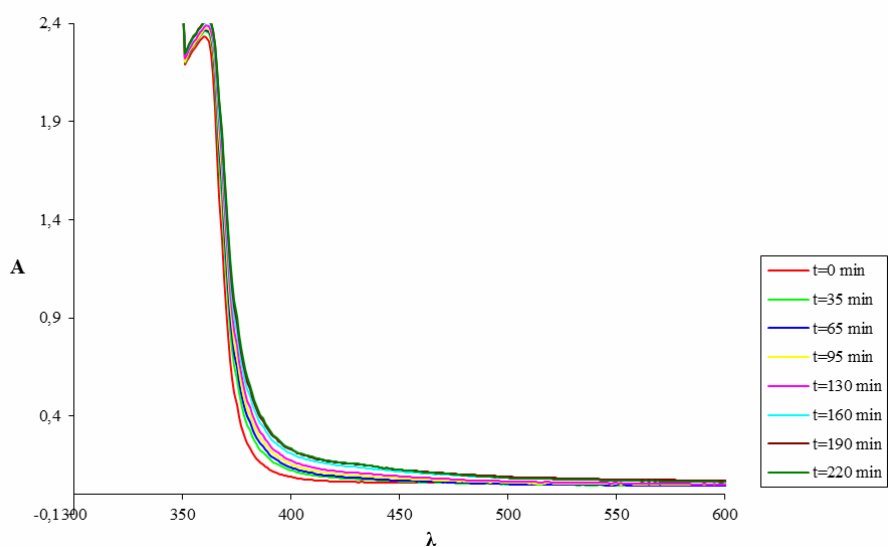
Przygotowano roztwory PMD o stężeniach w zakresie 0,02–0,035  $\mu\text{g/ml}$ . Roztwory naświetlano w kwarcowych kuwetach z teflonowym korkiem o długości drogi optycznej  $l = 1$  cm.

#### *Przygotowanie roztworu chlorowodoru chininy*

W celu otrzymania 50,0 ml 2% roztworu chlorowodoru chininy (AKT) odważono 0,510 g AKT i rozpuszczono w wodzie, ogrzewając, w temperaturze 30°C.

Podczas naświetlania roztworów, w określonych przedziałach czasu, wykreślano widmo UV i mierzono absorbancję roztworu przy długości fali  $\lambda = 400$  nm (chlorowoderek chininy) lub  $\lambda = 480$  nm (PMD). Zmiany widma roztworu chlorowodoru chininy przedstawiono na rycinie 38 oraz w tabeli 46, a PMD na rycinie 39 i w tabeli 47.

### Aktynometr chemiczny



Rycina 38. Zmiany widma absorpcji podczas naświetlania wodnego roztworu chlorowodoru chininy – aktynometru chemicznego.

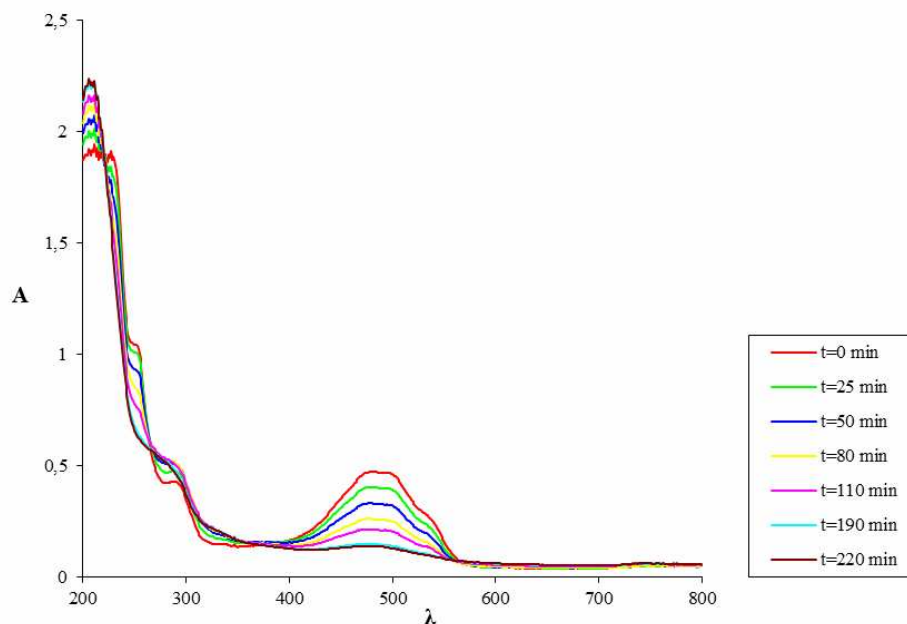
Tabela 46. Zmiany absorbancji roztworu chlorowodoru chininy podczas naświetlania (400 nm)

Czas naświetlania [min]	Absorbancja $A_t$	Różnica absorbancji $\Delta A = A_t - A_0$
0	0,0894	-
35	0,1234	0,034
65	0,1380	0,0486
95	0,1556	0,0662
130	0,1739	0,0845
160	0,2091	0,1197
190	0,2283	0,1389
220	0,2332	<b>0,1438</b>

$A_0$  = absorbancja roztworu chlorowodoru chininy przed naświetlaniem

$A_t$  = absorbancja roztworu chlorowodoru chininy po odpowiednim czasie naświetlania

## PMD



Rycina 39. Zmiany widma absorpcji roztworu PMD podczas naświetlania.

Tabela 47. Zmiany absorbancji roztworu PMD podczas naświetlania (480 nm)

Czas naświetlania [min]	Absorbancja $A_t$	Różnica absorbancji $\Delta A = A_t - A_0$
0	0,4735	0
10	0,4489	0,0246
65	0,2916	0,1819
95	0,2312	0,2423
130	0,1929	0,2806
160	0,1667	0,3068
190	0,1464	0,3271
220	0,1363	<b>0,3372</b>

$A_0$  = absorbancja roztworu PMD przed naświetlaniem

$A_t$  = absorbancja roztworu PMD po odpowiednim czasie naświetlania

## Ocena rozkładu fotochemicznego PMD

### Warunki rozkładu fotochemicznego

Ocena fotodegradacji metodą spektrofotometryczną polegała na analizie zmian widma absorpcji, w zależności od czasu ekspozycji na promieniowanie. W trakcie naświetlań wykonano serię widm UV–VIS w zakresie od 200 do 800 nm, mierząc absorbancję przy długości fali  $\lambda = 480$  nm.

Roztwory wodne PMD umieszczono w okrągłej kuwecie kwarcowej poj.  $2,8 \text{ cm}^3$  i naświetlano wysokociśnieniową lampą UV–VIS HBO–50 z palnikiem rtęciowym, emitującą promieniowanie w odpowiednim zakresie. Natężenie światła mierzone radiometrem wynosiło  $86,0\text{--}89,0 \text{ mW/cm}^2$ . W czasie 1 min rejestrowano energię  $5,10\text{--}5,30 \text{ J/cm}^2$ .

Odpowiednie warunki naświetlania uzyskano stosując filtry *Pyrex* o maksymalnej przepuszczalności światła przy długości fali  $\lambda_{\text{maks}} = 365$  nm oraz  $\lambda_{\text{maks}} = 510$  nm.

### Parametry kinetyczne rozkładu fotochemicznego PMD

Rozkład PMD pod wpływem światła analizowano zgodnie z liniowym równaniem reakcji pierwszego rzędu. Zmiany rejestrowano jako zależność absorbancji od czasu ekspozycji na światło:

$$\ln c = \ln c_0 - k \cdot t$$

$c$  = stężenie po określonym czasie naświetlania [mol/l]

$c_0$  = stężenie początkowe [mol/l]

$k$  = stała szybkości fotodegradacji [ $\text{s}^{-1}$ ]

$t$  = czas naświetlania [s]

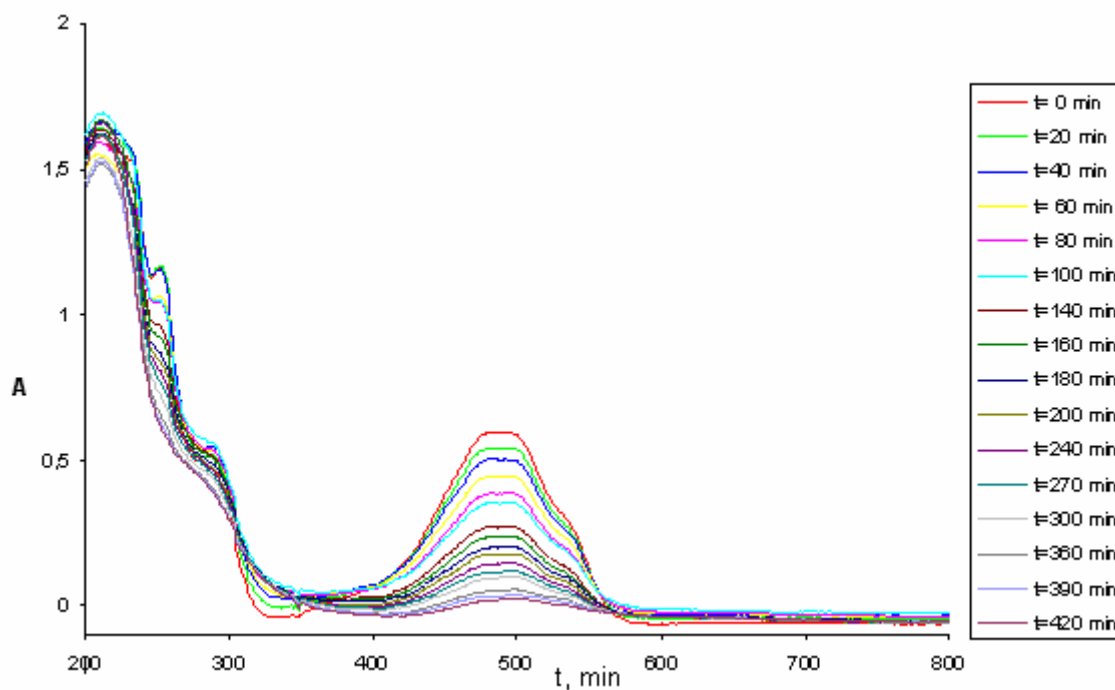
$c$  [%] =  $A_t/A_0 \cdot 100$

Obliczono czas połowicznego rozkładu ( $t_{0,5}$ ) oraz czas rozkładu 10% substancji ( $t_{0,1}$ ), korzystając z wzorów:

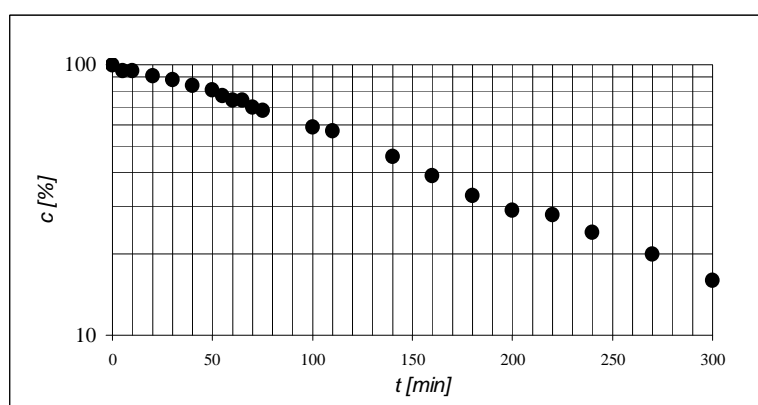
$$t_{0,5} = \ln 2/k = 0,693/k$$

$$t_{0,1} = \ln 1,11/k = 0,1054/k$$

Rozkład fotochemiczny – filtr  $\lambda_{maks} = 365\text{ nm}$



Rycina 40. Zmiany absorpcji podczas naświetlania PMD (filtr  $\lambda_{maks} = 365\text{ nm}$ ).



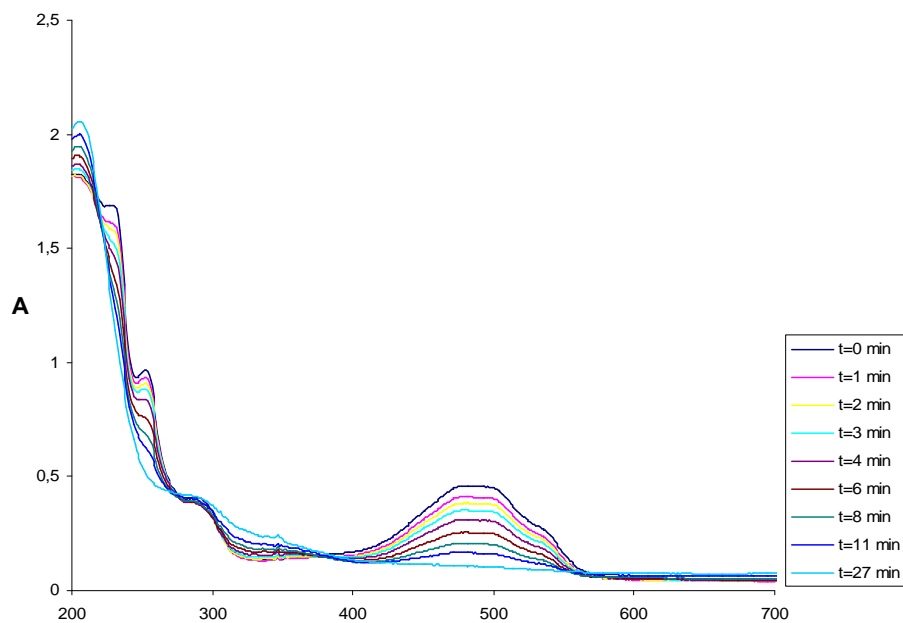
Rycina 41. Półlogarytmiczna zależność  $c$  [%] =  $f(t)$  dla PMD – filtr  $\lambda_{maks} = 365\text{ nm}$ .

Tabela 48. Parametry fotodegradacji PMD - filtr  $\lambda_{\text{maks}} = 365 \text{ nm}$ 

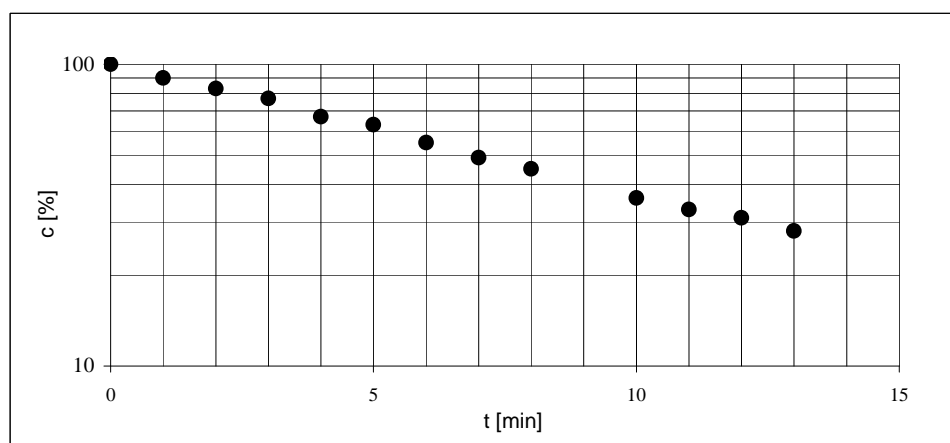
t [min]	Absorbancja A	c [%] <sub>i</sub>	Parametry kinetyczne reakcji rozkładu
0	0,5956	100	$a \pm \Delta a = -6,24 \cdot 10^{-3} \pm 2,01 \cdot 10^{-4}$ $S_a = 9,63 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 106,20 \pm 1,03$ $S_b = 0,0135$ $r = -0,998$ $k = (1,04 \pm 0,03) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ $t_{0,5} = 154,3 \text{ min}$ $t_{0,1} = 16,9 \text{ min}$
5	0,5682	95	
10	0,5633	95	
20	0,5413	91	
30	0,5252	88	
40	0,5025	84	
50	0,4839	81	
55	0,4581	77	
60	0,4431	74	
65	0,4398	74	
70	0,4193	70	
75	0,4056	68	
100	0,3526	59	
110	0,3395	57	
140	0,2711	46	
160	0,2322	39	
180	0,1983	33	
200	0,1734	29	
220	0,1640	28	
240	0,1426	24	
270	0,1167	20	
300	0,0926	16	



Rozkład fotochemiczny – filtr  $\lambda_{maks} = 510 \text{ nm}$



Rycina 42. Zmiany absorbancji podczas naświetlania PMD (filtr  $\lambda_{maks} = 510 \text{ nm}$ ).



Rycina 43. Półlogarytmiczna zależność  $c$  [%] =  $f(t)$  dla PMD – filtr  $\lambda_{maks} = 510 \text{ nm}$ .

Tabela 49. Parametry fotodegradacji PMD - filtr  $\lambda_{\text{maks}} = 510 \text{ nm}$

t [min]	Absorbancja A	c [%] <sub>i</sub>	Parametry kinetyczne reakcji rozkładu
0	0,4593	100	$a \pm \Delta a = -9,34 \cdot 10^{-2} \pm 0,01$ $S_a = 2,25 \cdot 10^{-3}$ $b \pm \Delta b = 98,56 \pm 1,04$ $S_b = 0,0192$ $r = -0,9959$ $k = (1,56 \pm 0,93) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $t_{0,5} = 7,4 \text{ [min]}$ $t_{0,1} = 1,1 \text{ [min]}$
1	0,4113	90	
2	0,3833	83	
3	0,3526	77	
4	0,3100	67	
5	0,2880	63	
6	0,2549	55	
7	0,2252	49	
8	0,2062	45	
10	0,1657	36	
11	0,1650	33	
12	0,1499	31	
13	0,1422	28	
17	0,1292	24	

#### Wydajność kwantowa procesu fotodegradacji

Wydajnością kwantową określa się stosunek liczby cząsteczek ulegających fotodegradacji do liczby fotonów absorbowanych przez daną objętość, w określonym przedziale czasowym. W analizie rozkładu fotochemicznego substancji wydajność kwantowa stanowi jeden z najważniejszych parametrów.

#### Wydajność kwantowa źródła promieniowania – filtr 365 nm

Prowadząc naświetlanie prób z użyciem filtru 365 nm założono średnią długość fali padającego światła  $\lambda = 365 \text{ nm}$ . Wykorzystując radiometr zaopatrzony w sensor 365 nm zmierzono natężenie promieniowania i uzyskano średnią wartość:

$$5,2340 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} = 0,0872 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$$

Następnie obliczono energię pojedynczego kwantu promieniowania dla  $\lambda = 365 \text{ nm}$ :

$$E = h \cdot c / \lambda = 5,442 \cdot 10^{-19} \text{ [J]}$$

$h$  = stała Plancka,  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

$c$  = prędkość światła,  $c = 2,998 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$

Energii równej 0,0872 J odpowiada  $0,1604 \cdot 10^{18}$  kwantów, ponieważ dla  $\lambda = 365 \text{ nm}$  1 J odpowiada  $1,838 \cdot 10^{18}$  kwantów.

Uwzględniając powierzchnię kuwety ( $2,5 \text{ cm}^2$ ), obliczono wydajność kwantową promieniowania, czyli liczbę padających na układ kwantów:

$$I_0 = 4,0110 \cdot 10^{17} \text{ kwantów} \cdot \text{s}^{-1}$$

*Wydajność kwantowa źródła promieniowania – filtr 510 nm*

Prowadząc naświetlanie prób z użyciem filtru 510 nm założono średnią długość fali padającego światła  $\lambda = 510 \text{ nm}$ . Wykorzystując radiometr zaopatrzony w sensor 510 nm zmierzono natężenie promieniowania i uzyskano średnią wartość:

$$5,2340 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} = 0,0872 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$$

Następnie obliczono energię pojedynczego kwantu promieniowania dla  $\lambda = 510 \text{ nm}$ :

$$E = h \cdot c / \lambda = 3,89 \cdot 10^{-19} \text{ [J]}$$

$h$  = stała Plancka,  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

$c$  = prędkość światła,  $c = 2,998 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$

Energii równej 0,0872 J odpowiada  $0,2241 \cdot 10^{18}$  kwantów, ponieważ dla  $\lambda = 510 \text{ nm}$  1 J odpowiada  $2,57 \cdot 10^{18}$  kwantów.

Uwzględniając powierzchnię kuwety ( $2,5 \text{ cm}^2$ ), obliczono wydajność kwantową promieniowania, czyli liczbę padających na układ kwantów:

$$I_0 = 5,672 \cdot 10^{17} \text{ kwantów} \cdot \text{s}^{-1}$$

Na podstawie wartości  $I_0$  obliczono ilość kwantów absorbowanych przez próbkę:

$$I_{\text{abs}} = I_0 (1 - 10^{-A})$$

$I_{\text{abs}}$  = liczba kwantów promieniowania emitowanego przez lampę

$A$  = absorbancja

Wydajność kwantową fotoderadacji dla danego procentu konwersji PMD obliczono ze wzoru:

$$\Phi = \Delta c \cdot N_A / I_{\text{abs}} \cdot t$$

$\Delta c \cdot N_A$  = różnica liczby cząsteczek przed naświetlaniem i po danym czasie naświetlania

$I_{\text{abs}}$  = liczba kwantów promieniowania absorbowanego przez próbkę

$t$  = czas [s]

Wartości wydajności kwantowych PMD obliczono korzystając z programu udostępnionego przez Zakład Fotochemii Wydziału Chemii UAM. Wartości pozornych wydajności kwantowych dla poszczególnych czasów naświetlania ekstrapolowano do początkowego stężenia badanych związków, otrzymując wartości rzeczywistych wydajności kwantowych.

Do obliczeń wykorzystano molowe współczynniki absorpcji PMD, których wartości wyznaczono zgodnie z równaniem:

$$\varepsilon = A/c \cdot l$$

$\varepsilon$  = molowy współczynnik absorpcji [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

$A$  = absorbancja

$c$  = stężenie badanego roztworu [mol/l]

$l$  = długość drogi optycznej (1 cm)

Obliczone średnie wartości molowych współczynników absorpcji dla PMD wynosiły:

- $3,45 \cdot 10^3$ , promieniowanie wzbudzające  $\lambda = 365$  nm
- $1,05 \cdot 10^4$ , promieniowanie wzbudzające  $\lambda = 510$  nm
- $1,21 \cdot 10^4$ , promieniowanie wzbudzające  $\lambda = 480$  nm

Tabela 50. Wydajności kwantowe rozkładu fotochemicznego PMD - filtr  $\lambda_{maks} = 365 \text{ nm}$ 

Lp.	t [s]	$A_i$	Pozorna wydajność kwantowa $\Phi_i$	% konwersji
1	0	0,5956	0	0
2	5	0,5682	$9,79 \cdot 10^{-5}$	4,60
3	10	0,5633	$5,77 \cdot 10^{-5}$	5,42
4	20	0,5413	$4,85 \cdot 10^{-5}$	9,12
5	30	0,5252	$4,19 \cdot 10^{-5}$	11,82
6	40	0,5025	$4,16 \cdot 10^{-5}$	15,63
7	50	0,4839	$3,01 \cdot 10^{-5}$	18,75
8	55	0,4581	$4,47 \cdot 10^{-5}$	23,09
9	60	0,4431	$4,54 \cdot 10^{-5}$	25,60
10	65	0,4398	$4,28 \cdot 10^{-5}$	26,16
11	70	0,4193	$4,50 \cdot 10^{-5}$	29,60
12	75	0,4056	$4,53 \cdot 10^{-5}$	31,90
13	100	0,3526	$4,34 \cdot 10^{-5}$	40,80
14	110	0,3395	$4,16 \cdot 10^{-5}$	43,00
15	140	0,2711	$4,14 \cdot 10^{-5}$	54,48
16	160	0,2322	$4,06 \cdot 10^{-5}$	61,01
17	180	0,1983	$3,94 \cdot 10^{-5}$	66,71
18	200	0,1734	$3,77 \cdot 10^{-5}$	70,89
19	220	0,1640	$3,51 \cdot 10^{-5}$	72,46
20	240	0,1426	$3,37 \cdot 10^{-5}$	76,06
21	270	0,1167	$3,17 \cdot 10^{-5}$	80,41
22	300	0,0926	$2,01 \cdot 10^{-5}$	84,45
23	330	0,0856	$2,76 \cdot 10^{-5}$	85,63
24	360	0,0749	$2,58 \cdot 10^{-5}$	87,42

Tabela 51. Wydajności kwantowe rozkładu fotochemicznego PMD - filtr  $\lambda_{maks} = 510 \text{ nm}$ 

Lp.	t [s]	$A_i$	Pozorna wydajność kwantowa $\Phi_i$	% konwersji
1	0	0,4593	0	0
2	1	0,4113	$3,28 \cdot 10^{-4}$	10,45
3	2	0,3833	$2,59 \cdot 10^{-4}$	16,55
4	3	0,3526	$2,43 \cdot 10^{-4}$	23,23
5	4	0,3100	$2,55 \cdot 10^{-4}$	32,51
6	5	0,2880	$2,34 \cdot 10^{-4}$	37,30
7	6	0,2549	$2,33 \cdot 10^{-4}$	44,50
8	7	0,2252	$2,28 \cdot 10^{-4}$	50,97
9	8	0,2062	$2,16 \cdot 10^{-4}$	55,11
10	10	0,1657	$2,00 \cdot 10^{-4}$	63,92
11	11	0,1650	$1,83 \cdot 10^{-4}$	64,08
12	12	0,1499	$1,76 \cdot 10^{-4}$	67,36
13	13	0,1422	$1,67 \cdot 10^{-4}$	69,04
14	15	0,1688	$1,32 \cdot 10^{-4}$	63,25
15	17	0,1292	$1,33 \cdot 10^{-4}$	71,87
16	19	0,1316	$1,18 \cdot 10^{-4}$	71,35
17	21	0,1044	$1,15 \cdot 10^{-4}$	77,27
18	23	0,1000	$1,07 \cdot 10^{-4}$	78,23
19	24	0,0997	$1,03 \cdot 10^{-4}$	78,31

## 4.8. Ocena trwałości PMD w fazie stałej

### 4.8.1. Metoda analityczna

Do oceny trwałości PMD w fazie stałej zastosowano metodę HPLC, opisana w rozdziale 4.4. Próbki badanej substancji o masie 5,0 mg, poddane uprzednio rozkładowi i ochłodzone do temperatury pokojowej, rozpuszczano w mieszaninie acetonitryl – woda (1:1) i przenoszono ilościowo do kolby miarowej, uzupełniając taką samą mieszaniną do 10,0 ml. Do 1,0 ml roztworu dodawno 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego.

#### *Roztwór chlorowodoru chininy*

W kolbie miarowej pojemności 100 ml, rozpuszczono 10,0 mg chlorowodoru chininy, wymieszano i uzupełniono wodą do 100,0 ml.

Na kolumnę wprowadzono po 20  $\mu$ l analizowanych próbek. W obliczeniach uwzględniono stosunek wielkości pola powierzchni piku PMD do wielkości pola powierzchni wzorca wewnętrznego (chlorowodorek chininy).

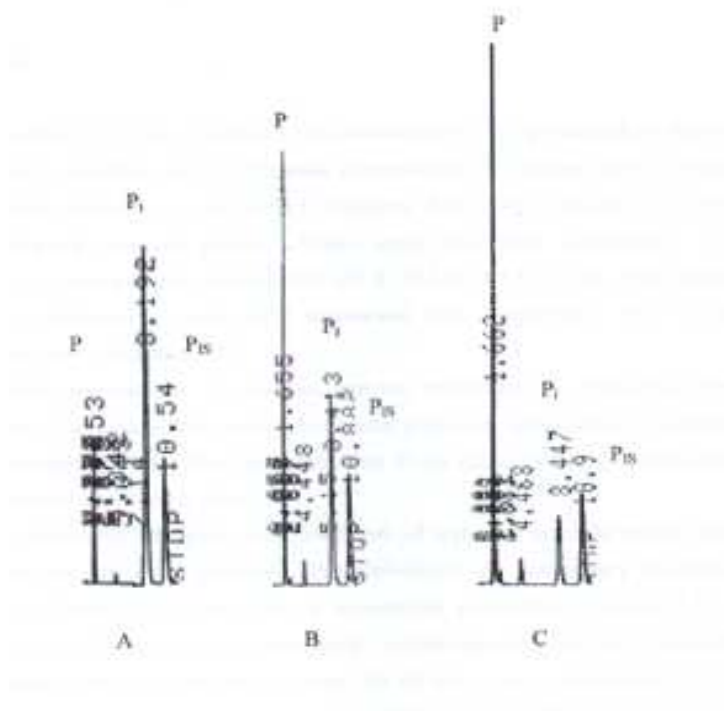
Zastosowana metoda HPLC została uprzednio zwalidowana, stąd dokonano jedynie jej rewalidacji. W celu potwierdzenia przydatności metody do badania trwałości PMD w fazie stałej, sprawdzono jej selektywność oraz liniowość w zakresie stężeń stosowanych w badaniach w fazie stałej.

#### *Selektywność metody*

W przedziale czasu 0–30 minut na chromatogramach rejestrowano następujące sygnały:

- substancji badanej ( $P_i$ ) – PMD,  $t_R \sim 8$  min
- wzorca wewnętrznego ( $P_{IS}$ ) – chlorowodorek chininy,  $t_R \sim 10$  min
- produktów rozkładu PMD (P);  $t_R \sim 2$  min i 5 min (Rycina 44).

W warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza RH  $\sim 76,4\%$ , stosunek wielkości piku PMD do wielkości piku wzorca wewnętrznego w przedziale czasu  $t_0 \rightarrow t_\infty$  maleje od wartości  $(P_i/P_{wz})_{\max} \rightarrow 0$ .



Rycina 44.

Chromatogramy HPLC PMD poddanej przyspieszonemu starzeniu w temperaturze 373 K, RH ~76,4%:

A – po czasie  $t = 0$  h

B – po czasie  $t = 86$  h

C – po czasie  $t = 99$  h

gdzie:

$P_1$  – PMD;  $t_R \sim 8$  min,

$P_{IS}$  – wzorzec wewnętrzny – chlorowodorku chininy,  $t_R \sim 10$  min

P – produkty rozkładu PMD;  $t_R \sim 2$  min i 5 min.

Metoda HPLC o podanych w rozdziale 4.4 parametrach rozdzielania jest selektywna dla PMD w obecności wzorca wewnętrznego i produktów jej rozkładu w fazie stałej.

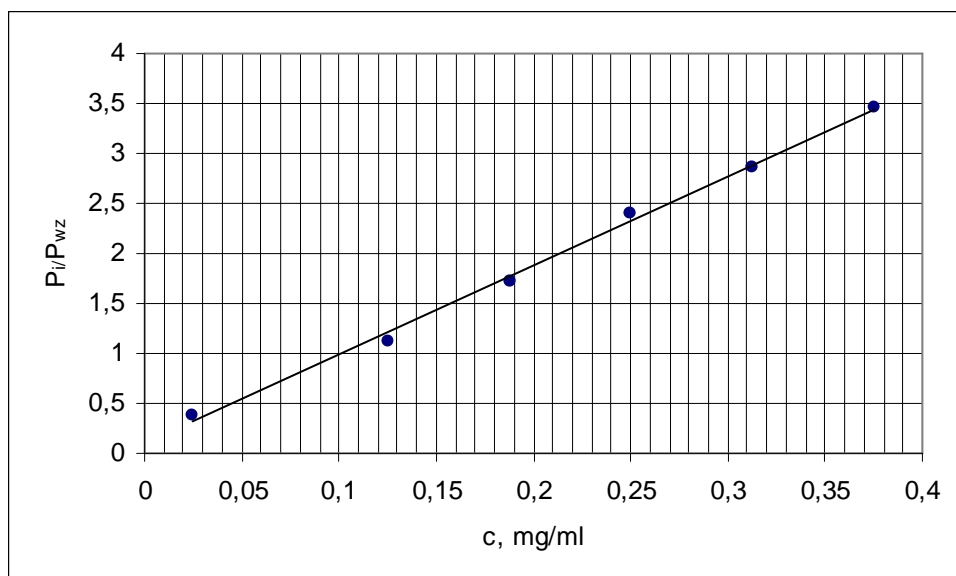
#### *Liniowość metody*

Badanie liniowości przeprowadzono analogicznie, jak w opisano w rozdziale 4.4, rozszerzając zakres stężenia substancji badanej do 0,375 mg/ml, co odpowiada 150% wartości nominalnej stężenia substancji badanej w badaniach w fazie stałej.

Tabela 52. Zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  i ocena statystyczna prostych  $y = ax + b$  i  $y = ax$

Lp.	c, mg/ml	$P_i/P_{wz} = f(c)$	Ocena statystyczna prostych	
			$y = ax + b$	$y = ax$
1.	0,025	0,3721	$a = 8,945 \pm 0,668$ $b = 0,0892 \pm 0,1616$ $S_a = 0,2407$ $S_b = 0,05832$ $S_y = 0,06861$ $t_a = 37,16$ $t_b = 1,529$ $r = 0,9986$	$a = 9,268 \pm 0,598$ $S_a = 0,2153$ $S_y = 0,06137$ $r = 0,9986$
2.	0,125	1,1245		
3.	0,188	1,7261		
4.	0,250	2,4003		
5.	0,313	2,8547		
6.	0,375	3,4621		

Wykonano wykres zależności  $P_i/P_{wz} = f(c)$ ; (c, mg/ml) (Rycina 45).



Rycina 45. Zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  PMD.

Wykres zależności  $P_i/P_{wz} = f(c)$  jest prostoliniowy. Obliczono parametry prostych  $y = ax + b$  i  $y = ax$  (Tabela 52). Stwierdzono, że wyznaczona z powyższej zależności wartość  $t_b = 1,529$  jest mniejsza od wartości krytycznej  $t_{0,05}(4) = 2,776$ , stąd wartość współczynnika  $b = 0,0892 \pm 0,1616$  jest nieistotna ( $b = 0$ ).



#### 4.8.2. Ocena trwałości PMD testem przyśpieszonego starzenia

Do szklanych fiolek, pojemności 5 ml, odważono po 5,0 mg substancji badanej (PMD). Fiolki zawierające próbki substancji przeznaczone do badania wpływu temperatury w atmosferze powietrza o wilgotności względnej RH ~76,4%, wstawiono do eksykatorów zawierających nasycony roztwór chlorku sodu [123]. Eksykatory umieszczono w komorach cieplnych o temperaturze odpowiednio: 343 K, 353 K, 363 K, 373 K. Przed umieszczeniem próbek, eksykatory z nasyconymi roztworami soli, utrzymywane były w podwyższonej temperaturze jedną dobę.

Próbki badane w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0%, wstawiono do łaźni piaskowej, umieszczonej w komorze cieplnej o temperaturze 373 K. Przed umieszczeniem fiolek, łaźnia piaskowa utrzymywana była w temperaturze 373 K jedną dobę.

W określonych odstępach czasu, zależnych od szybkości rozkładu, próbki wyjmowano z eksykatorów lub łaźni piaskowej. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, próbki z substancją badaną rozpuszczano w mieszaninie acetonitrylu z wodą (1:1). Roztwory przenoszono ilościowo do kolb miarowych i uzupełniano taką samą mieszaniną rozpuszczalników do 10,0 ml. Otrzymane roztwory mieszano i sączono. Do 1,0 ml roztworu, dodawano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego. Po wymieszaniu mieszadłem magnetycznym, na kolumnę chromatograficzną наносzono po 20  $\mu$ l analizowanych roztworów i rejestrowano chromatogramy.

Rejestrowano następujące sygnały:

- PMD o czasie retencji  $t_R \sim 8$  min,
- Chlorowodoru chininy (wzorzec wewnętrzny) o czasie retencji  $t_R \sim 10$  min.

Graficznie wyniki zostały przedstawione w postaci półlogarytmicznych wykresów  $P_i/P_{wz})_t / (P_i/P_{wz})_0 \cdot 100 = f(t)$ .

### 4.8.3. Parametry kinetyczne reakcji

Na podstawie zmian stężenia PMD w czasie, stwierdzono, że w atmosferze powietrza o wilgotności względnej RH ~76,4%, w podwyższonej temperaturze, rozkład zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu (Rycina 46).

Stałą szybkości reakcji autokatalitycznej obliczono z wzoru:

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = k_{\text{obs}} \cdot t + \gamma$$

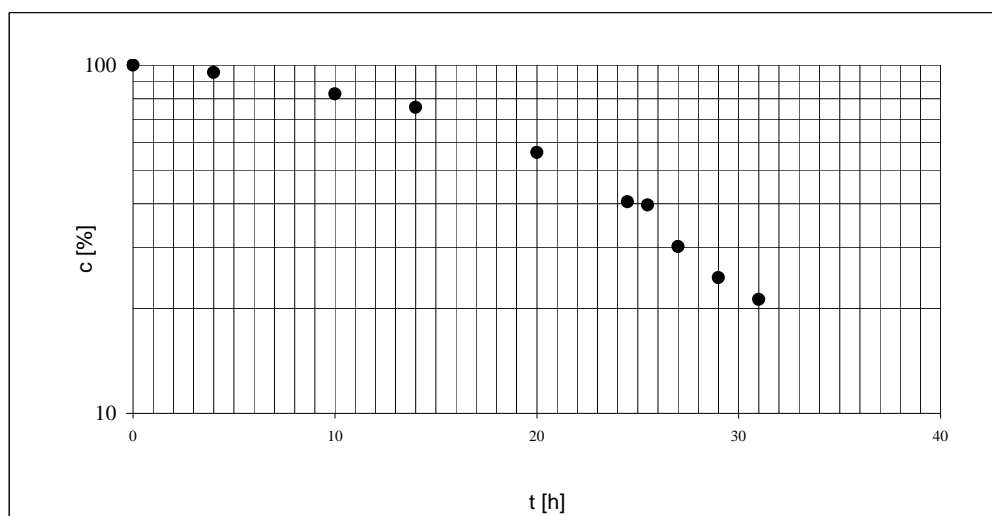
gdzie:

$$P_t/(P_0 - P_t) = c_t/(c_0 - c_t),$$

$c_0$  i  $c_t$  – charakteryzują stężenie substratu w czasie  $t = 0$  i  $t$ ,

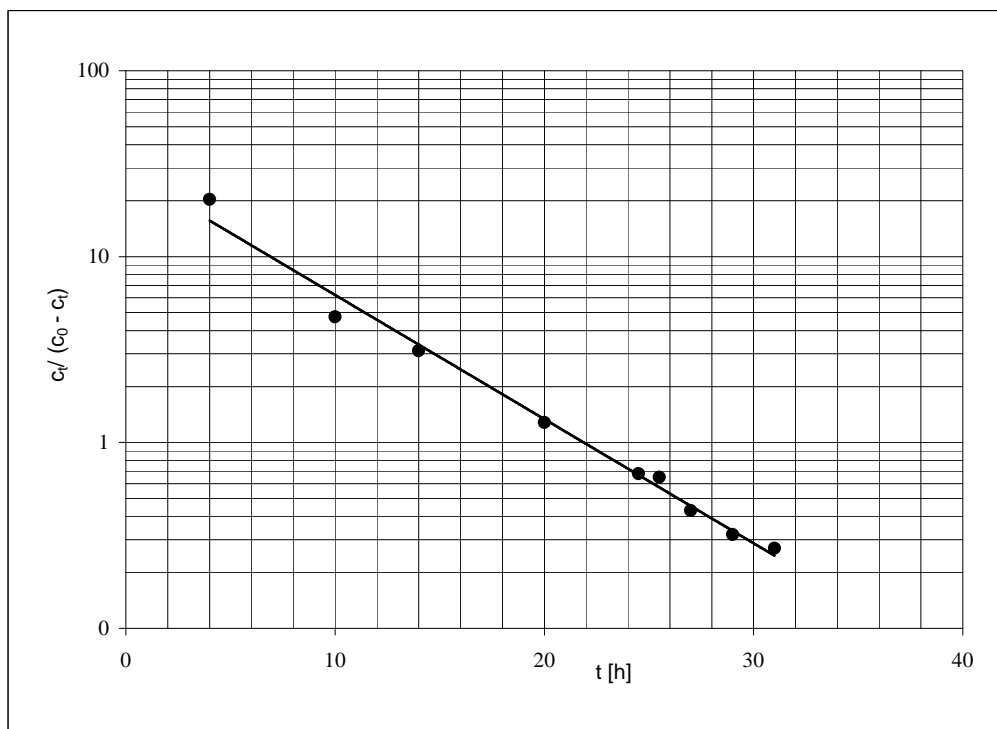
$(c_0 - c_t)$  – charakteryzuje stężenie produktu w czasie  $t$ ,

$\gamma$  – stała związana z okresem indukcji.



Rycina 46. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 353 K, przy wilgotności względnej powietrza ~76,4%.

Półlogarytmiczny wykres  $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$  jest prostoliniowy (Rycina 47), a jego nachylenie jest miarą szybkości reakcji ( $-\gamma = k_{\text{obs}}$ ).



Rycina 47. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c_i/(c_0 - c_i) = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 353 K, przy wilgotności względnej powietrza ~76,4%.

Rozkład PMD w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0%, w temperaturze 373 K, zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.

W czasie  $t_0 \rightarrow t_\infty$ , wartości  $P_i/P_{wz} \rightarrow 0$ .

Stałe szybkości reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu obliczono z wzoru:

$$\ln P_i/P_{wz} = \ln P_0/P_{wz} - k_{obs} \cdot t$$

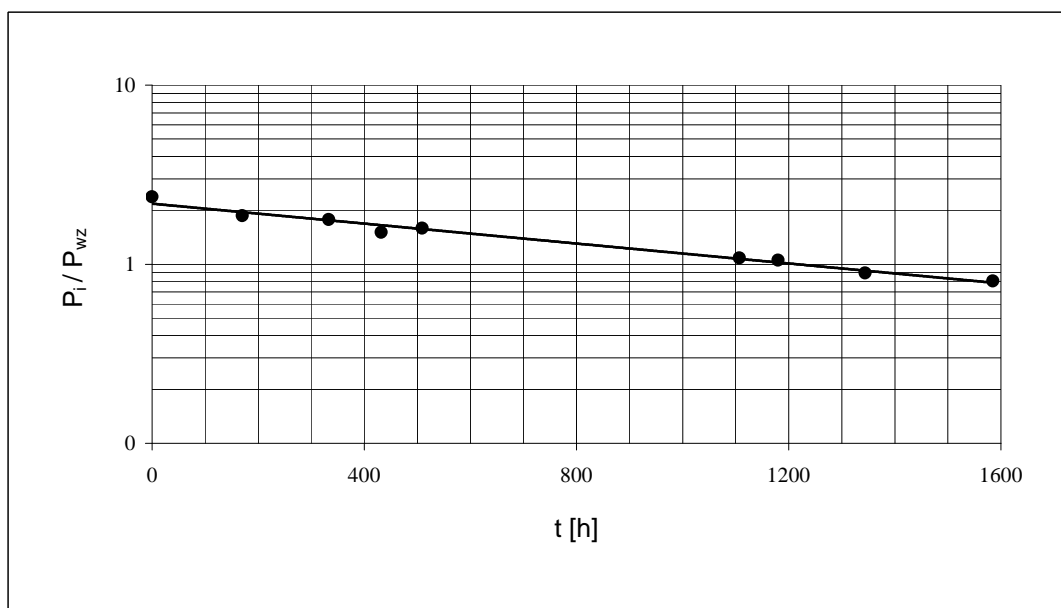
gdzie:

$P_i$  i  $P_0$  – pole powierzchni piku PMD w czasie  $t$  i  $t = 0$

$P_{wz}$  – pole powierzchni piku wzorca wewnętrznego

$k_{obs}$  – obserwowana stała szybkości reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu

Półlogarytmiczny wykres  $P_i/P_{wz} = f(t)$  jest prostoliniowy (Rycina 48), a jego nachylenie jest miarą szybkości reakcji ( $-k_{obs}$ ).



Rycina 48. Półlogarytmiczny wykres zależności  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 373 K, przy wilgotności względnej powietrza 0%.

Obliczono także okres półtrwania i czas rozkładu 10% substancji, korzystając z wzorów:

$$t_{0,5} = b/k$$

$$t_{0,1} = (b - 2,197)/k$$

Dla prostoliniowych wykresów  $\ln P_i/P_{wz} = f(t)$  oraz  $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$ , obliczono metodą najmniejszych kwadratów następujące parametry statystyczne równań  $y = ax + b$ :  $a \pm \Delta a$ ,  $b \pm \Delta b$ , błędy standardowe:  $S_a$ ,  $S_b$ ,  $S_y$  oraz współczynniki korelacji liniowej  $r$ . Wartości  $\pm \Delta a$  oraz  $\pm \Delta b$  obliczono dla  $f = n - 2$  stopni swobody dla  $\alpha = 0,05$ .

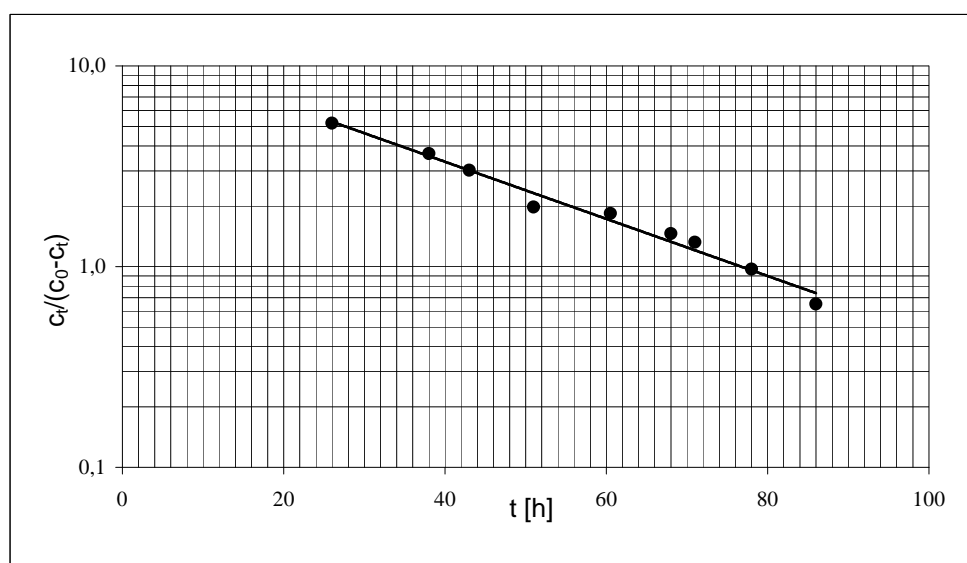
Prostoliniowe wykresy posłużyły do obliczenia parametrów kinetycznych i termodynamicznych reakcji. Do obliczeń matematycznych wykorzystano arkusz kalkulacyjny MsExcel.

Wyniki badań przedstawiono na rycinach 49–54 i w tabelach 53–58.

*Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w podwyższonej temperaturze, RH~76,4%*

Tabela 53. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 343 K, RH ~76,4%

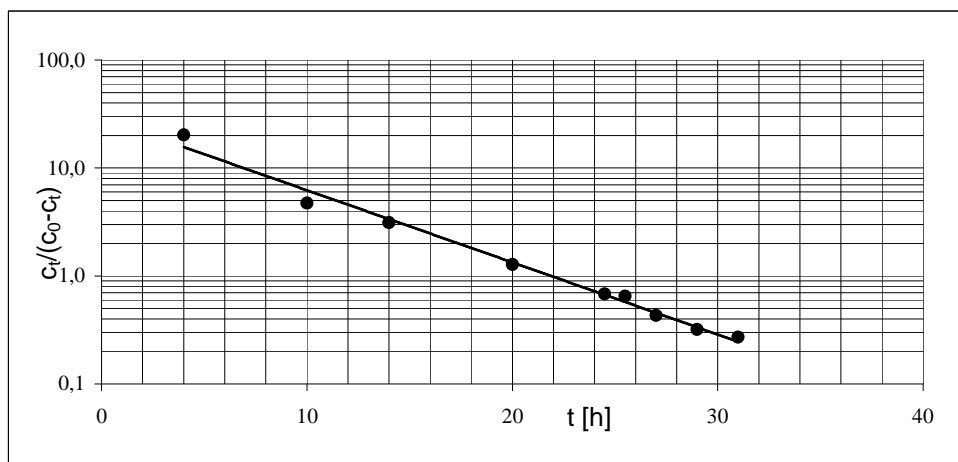
Lp.	t[h]	c[%]	$c_t/(c_0-c_t)$	Parametry kinetyczne reakcji	
1.	0	100	-	$(a \pm \Delta a)$ [h <sup>-1</sup> ]	$(-32,8 \pm 4,1) \cdot 10^{-3}$
2.	26	83,85	5,1900	$S_a$	$17,22 \cdot 10^{-4}$
3.	38	78,52	3,6600	$b \pm \Delta b$	$-2,51 \pm 0,24$
4.	43	75,11	3,0200	$S_b$	$104,9 \cdot 10^{-3}$
5.	51	66,41	1,9800	$(k \pm \Delta k)$ [s <sup>-1</sup> ]	$(0,910 \pm 0,113) \cdot 10^{-5}$
6.	60,5	64,83	1,8400	r	-0,990
7.	68	59,33	1,4600	$S_y$	0,096
8.	71	56,94	1,3200	$t_{0,5}$	78,4
9.	78	49,14	0,9700	$t_{0,1}$	9,57
10.	86	39,24	0,6500	n	9



Rycina 49. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$ , reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 343 K, RH ~76,4%.

Tabela 54. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 353 K, RH ~76,4%

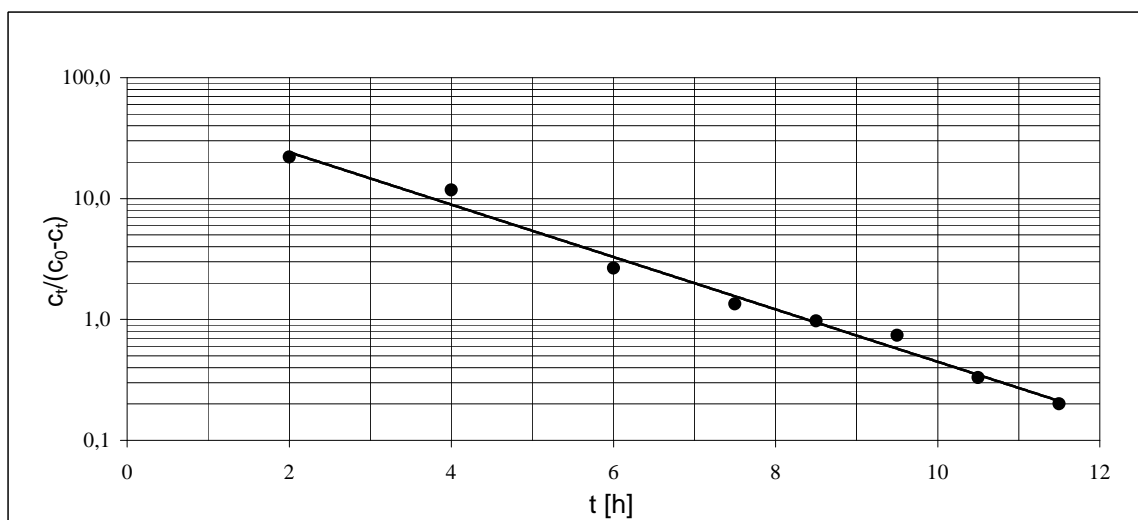
Lp.	t[h]	c[%]	$c_t/(c_0-c_t)$	Parametry kinetyczne reakcji	
1.	0	100	-	$(a \pm \Delta a)$ [ $h^{-1}$ ]	$(-153,8 \pm 14,4) \cdot 10^{-3}$
2.	4	95,3	20,2800	$S_a$	$60,8 \cdot 10^{-4}$
3.	10	82,59	4,7400	$b \pm \Delta b$	$3,36 \pm 0,32$
4.	14	75,65	3,1100	$S_b$	$135,8 \cdot 10^{-3}$
5.	20	56,08	1,2800	$(k \pm \Delta k)$ [ $s^{-1}$ ]	$(4,27 \pm 0,39) \cdot 10^{-5}$
6.	24,5	40,52	0,6800	r	-0,994
7.	25,5	39,65	0,6500	$S_y$	0,159
8.	27	30,12	0,4300	$t_{0,5}$	22,0
9.	29	24,52	0,3200	$t_{0,1}$	7,60
10.	31	21,23	0,2700	n	9



Rycina 50. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$ , reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 353 K, RH ~76,4%.

Tabela 55. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 363 K, RH ~76,4%

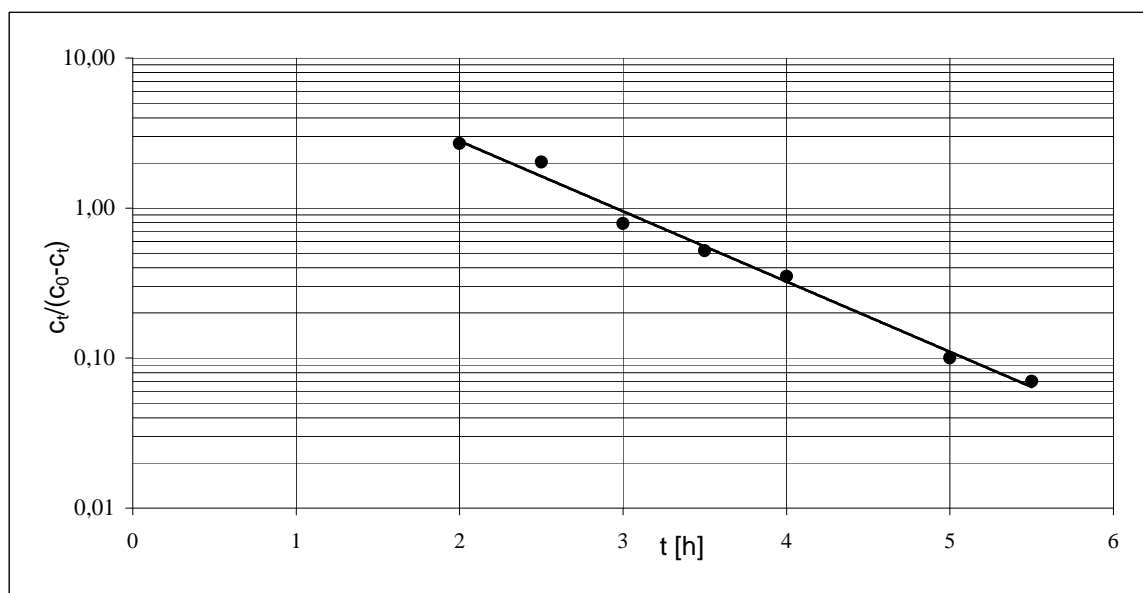
Lp.	t[h]	c[%]	$c_t/(c_0-c_t)$	Parametry kinetyczne reakcji	
1.	0	100	-	$(a \pm \Delta a) [h^{-1}]$	$(-498,9 \pm 54,9) \cdot 10^{-3}$
2.	2	95,66	22,0400	$S_a$	$224,2 \cdot 10^{-4}$
3.	4	92,18	11,7900	$b \pm \Delta b$	$4,18 \pm 0,44$
4.	6	72,7	2,6600	$S_b$	$180,3 \cdot 10^{-3}$
5.	7,5	57,25	1,3400	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(13,9 \pm 1,5) \cdot 10^{-5}$
6.	8,5	49,2	0,9700	r	-0,993
7.	9,5	42,66	0,7400	$S_y$	0,193
8.	10,5	24,85	0,3300	$t_{0,5}$	8,39
9.	11,5	16,53	0,2000	$t_{0,1}$	3,98
				n	8



Rycina 51. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$ , reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 363 K, RH ~76,4%.

Tabela 56. Zmiany stężenia oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 373 K, RH ~76,4%

Lp.	t[h]	c[%]	$c_t/(c_0-c_t)$	Parametry kinetyczne reakcji	
				$(a \pm \Delta a)$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$(-1078,2 \pm 122,0) \cdot 10^{-3}$
1.	0	100	-	$S_a$	$474,5 \cdot 10^{-4}$
2.	2	72,92	2,6900	$b \pm \Delta b$	$3,18 \pm 0,47$
3.	2,5	67,04	2,0300	$S_b$	$181,8 \cdot 10^{-3}$
4.	3	44,08	0,7900	$(k \pm \Delta k)$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$(29,9 \pm 3,1) \cdot 10^{-5}$
5.	3,5	34,39	0,5200	r	-0,995
6.	4	25,94	0,3500	$S_y$	0,148
7.	5	8,71	0,1000	$t_{0,5}$	2,94
8.	5,5	6,69	0,0700	$t_{0,1}$	0,91
				n	7

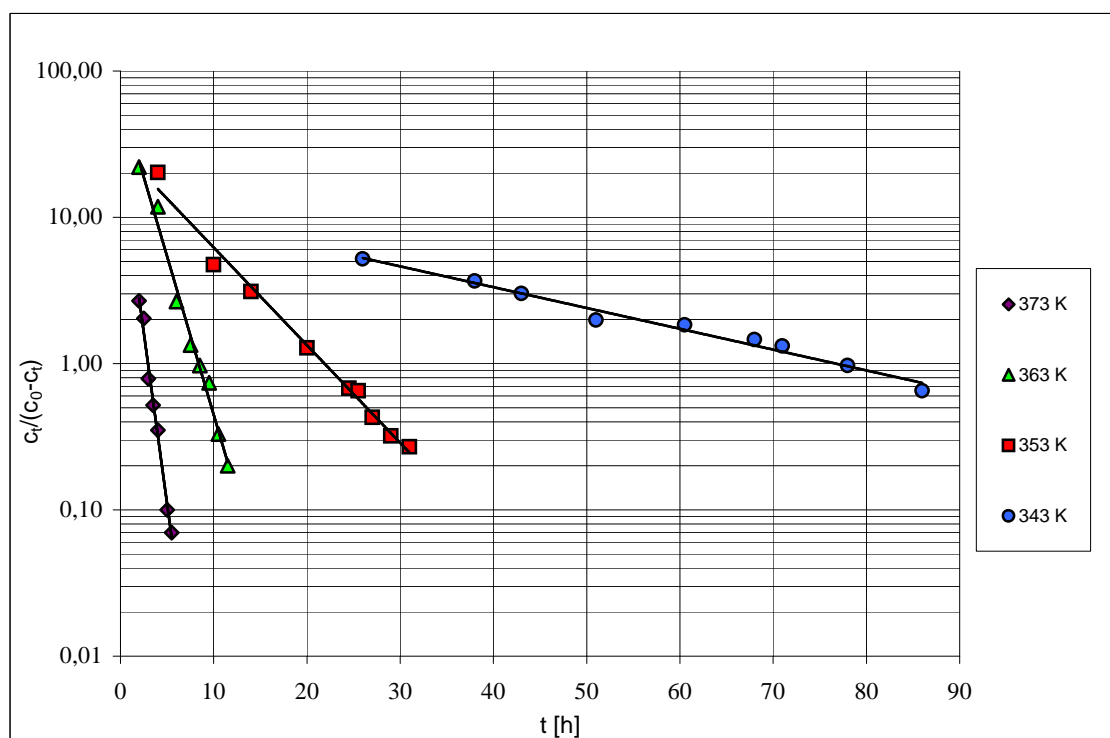


Rycina 52. Półlogarytmiczny wykres zależności  $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$ , reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 373 K, RH ~76,4%.



Tabela 57. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, RH ~76,4%

Parametry kinetyczne	343 K	353 K	363 K	373 K
	RH ~76,4%			
$(a \pm \Delta a) \cdot 10^{-3}, [h^{-1}]$	$-32,8 \pm 4,1$	$-153,8 \pm 14,4$	$-498,9 \pm 54,9$	$-1078,2 \pm 122,0$
$S_a$	$17,2 \cdot 10^{-4}$	$60,80 \cdot 10^{-4}$	$224,23 \cdot 10^{-4}$	$474,5 \cdot 10^{-4}$
$b \pm \Delta b$	$2,51 \pm 0,24$	$3,36 \pm 0,32$	$4,18 \pm 0,44$	$3,18 \pm 0,47$
$S_b$	$104,9 \cdot 10^{-3}$	$135,9 \cdot 10^{-3}$	$180,30 \cdot 10^{-3}$	$181,8 \cdot 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k) \cdot 10^{-5}, [s^{-1}]$	$0,910 \pm 0,113$	$4,27 \pm 0,39$	$13,9 \pm 1,5$	$29,9 \pm 3,1$
r	-0,990	-0,994	-0,993	-0,995
$t_{0,5}$	78,4	21,96	8,39	2,94
$t_{0,1}$	9,57	7,60	3,98	0,91
n	9	9	8	7

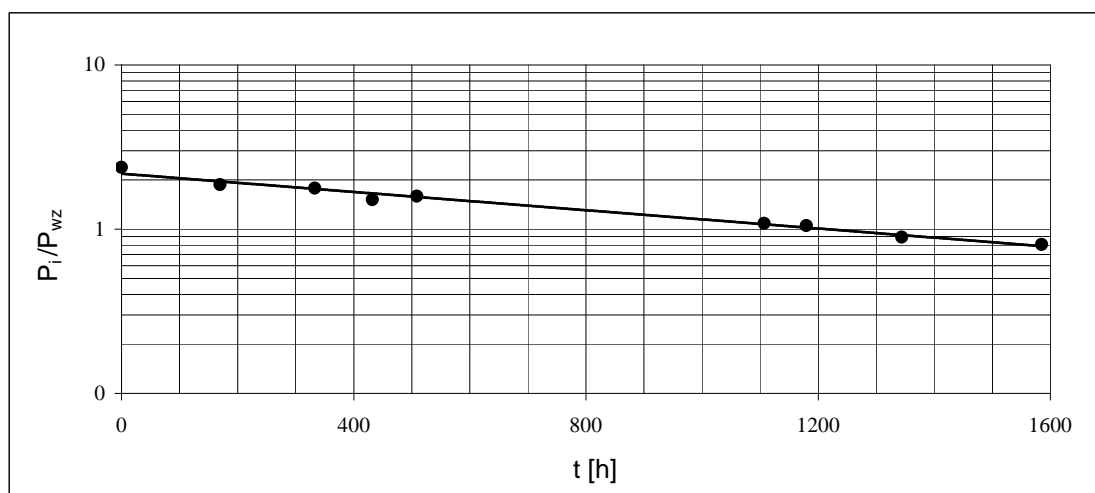


Rycina 53. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$ , reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, RH ~76,4%.

*Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 373 K, RH = 0%*

Tabela 58. Zmiany stężenia PMD oraz parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 373 K, RH = 0%

Lp.	t[h]	P <sub>i</sub> /P <sub>Is</sub>	Parametry kinetyczne reakcji	
			(a ± Δa) [h <sup>-1</sup> ]	(-0,641 ± 0,078) · 10 <sup>-3</sup>
1.	0	2,3746	S <sub>a</sub>	0,333 · 10 <sup>-4</sup>
2.	170	1,8666	b ± Δb	2,17 ± 1,08
3.	333	1,7767	S <sub>b</sub>	30,5 · 10 <sup>-3</sup>
4.	432	1,5079	(k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]	(0,0178 ± 0,00218) · 10 <sup>-5</sup>
5.	509	1,5869	r	-0,991
6.	1107	1,0840	S <sub>y</sub>	0,053
7.	1180	1,0524	t <sub>0,5</sub>	1082,8
8.	1344	0,8944	t <sub>0,1</sub>	164,7
9.	1585	0,8045	n	9



Rycina 54. Półlogarytmiczny wykres zależności  $P_i/P_{wz} = f(t)$ , reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, w temperaturze 373 K, RH = 0%.

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

---

Odpowiednia jakość leku, w tym jego trwałość, jest jednym z warunków bezpiecznej farmakoterapii. W badaniu trwałości stosuje się testy stresowe, przyspieszone i długoterminowe. Celem testów stresowych jest ocena podatności substancji leczniczej na zmiany, izolacja i identyfikacja produktów rozkładu oraz ustalenie mechanizmu rozkładu.

Testy stresowe obejmują:

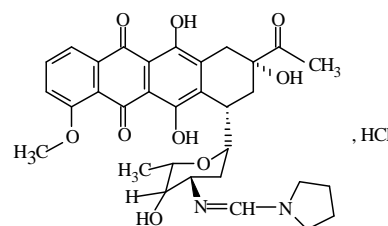
- hydrolizę w środowisku kwasowym, zasadowym i obojętnym
- utlenianie nadtlakiem wodoru
- fotolizę
- wpływ wilgotności względnej powietrza i temperatury.

Antybiotyki antracyklinowe są podatne na rozkład pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych, zarówno w roztworach, jak i w fazie stałej. Najbardziej podatnym miejscem na rozkład antybiotyków antracyklinowych jest wiązanie glikozydowe, które jest niezbędne dla aktywności cytotoksycznej.

Celem podjętych badań była ocena trwałości

*N*-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyny (PMD):

- w roztworach wodnych
- w roztworach do podania parenteralnego
- pod wpływem światła.



Dodatkowo oceniono trwałość PMD w fazie stałej.

Ocena trwałości danego związku pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych jest możliwa tylko wówczas, jeżeli zastosowane zostaną w badaniu odpowiednie metody analityczne, które umożliwią ocenę zmian stężenia substratu obok tworzących się produktów rozkładu. Wszystkie zastosowane metody analityczne muszą być uprzednio walidowane.

W badaniu trwałości metodą z wyboru jest metoda HPLC. Także w moich badaniach zastosowałam metodę HPLC, którą poddałam walidacji [118]. Zastosowałam następujące parametry rozdzielania:

- kolumna: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) o wymiarach 125 × 4 mm, Merck Darmstadt, Niemcy
- faza ruchoma: mieszanina (1:1) roztworów A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>:
  - roztwór A<sub>1</sub>: metanol, acetonitryl (1:9 V/V)
  - roztwór A<sub>2</sub>: 2,88 g laurylosiarczanu sodu, 1,6 ml kwasu fosforowego(V) (85%), woda ad 1000 ml (m/V/V)
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,5 ml/min
- detektor: spektrofotometr UV, λ = 254 nm
- wzorzec wewnętrzny: roztwór chlorowodoru chininy.

W obliczeniach uwzględniano stosunek wielkości piku PMD do wielkości piku wzorca wewnętrznego.

Przeprowadzona walidacja metody wykazała, że metoda jest:

- selektywna dla PMD w obecności produktów jej rozkładu oraz wzorca wewnętrznego
- liniowa w zakresie stężeń od 0,010 do 0,375 mg/ml, a zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  opisuje równanie  $y = (8,912 \pm 0,265) \cdot x$
- precyzyjna, o czym świadczą niskie wartości współczynników zmienności (do 2%)
- czuła, bowiem można rejestrować widoczny przyrost wartości mierzonej przy małej zmianie wartości oznaczanej.

### *Trwałość N-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyny (PMD) w roztworach wodnych*

Badania trwałości PMD w roztworach wodnych polegały na:

- wyznaczeniu obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu w zakresie pH od 0,44 do 10,00, w temperaturze 313 K, 323 K, 333 K i 343 K oraz przy pH powyżej 12 w temperaturze 298 K, 303 K, 308 K i 313 K
- wyznaczeniu stałych  $k_{pH}$ , charakteryzujących właściwą katalizę kwasowo-zasadową
- opisanu zależności  $\log k_{pH} = f(pH)$  odpowiednim równaniem kinetycznym
- obliczeniu katalitycznych stałych szybkości reakcji cząstkowych
- wyznaczeniu parametrów termodynamicznych reakcji cząstkowych.

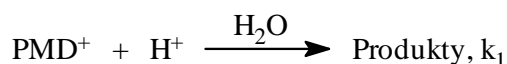
## Ogólna kataliza kwasowo-zasadowa

W badaniach kinetycznych mamy do czynienia z ogólną katalizą kwasowo-zasadową, jeżeli przy stałej wartości pH i siły jonowej, przy różnych stężeniach składników buforu, szybkość reakcji zmienia się wraz ze wzrostem stężenia buforu. W celu wykazania czy składniki buforów stosowanych w badaniach trwałości PMD wykazują efekt katalityczny, przeprowadzono badania szybkości jej rozkładu przy stałej wartości pH i sile jonowej 0,50 mol/l, dla czterech lub trzech różnych stężeń składników stosowanych buforów.

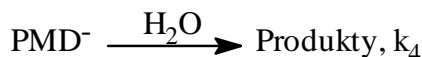
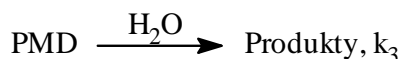
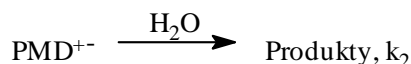
Stwierdzono, że składniki buforu fosforanowego (pH = 1,83–3,19 i pH = 5,91–7,54), octanowego (pH = 3,88–6,04) i boranowego (pH = 7,51–9,70), zastosowane w badaniu trwałości PMD nie wykazują efektu katalitycznego, co potwierdzono porównując uzyskane wyniki testem równoległości. Zatem wyznaczone obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu w badanym zakresie pH są równe  $k_{pH}$ .

Wyznaczone w szerokim zakresie pH wartości  $k_{pH}$  posłużyły do interpretacji wpływu stężenia jonów wodorowych na trwałość PMD. Wykonano wykres zależności  $\log k_{pH} = f(\text{pH})$  (Rycina 55), który wskazuje, że w roztworach wodnych PMD, przy zerowym stężeniu składników buforów, możliwe są następujące reakcje:

- hydroliza protonowanych cząsteczek PMD katalizowana jonami wodorowymi



- spontaniczna reakcja hydrolizy pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu

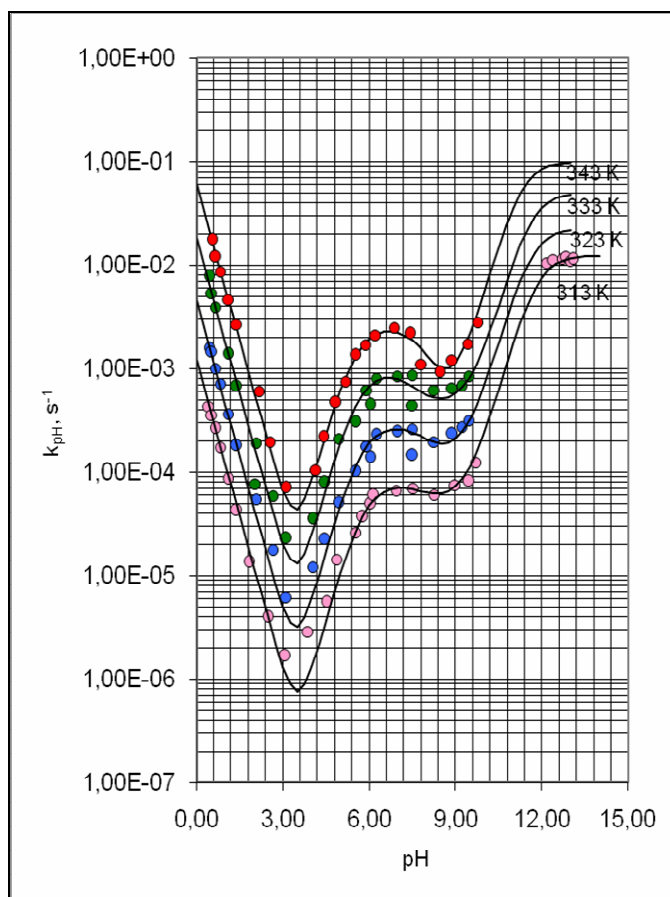


Całkowita szybkość reakcji jest równa sumie powyższych reakcji cząstkowych:

$$k_{pH} = k_1 a_{\text{H}^+} f_1 + k_2 f_2 + k_3 f_3 + k_4 f_4$$

Ułamki stężeń poszczególnych form PMD ( $f_1$ – $f_4$ ) wyznaczono z odpowiednich równań, przyjmując następujące wartości  $pK_a$ :

- w temperaturze 343 K: 5,50, 7,80, 11,27
- w temperaturze 333 K: 5,60, 7,40, 11,60
- w temperaturze 323 K: 5,70, 7,80, 11,60
- w temperaturze 313 K: 5,60, 7,80, 11,80.

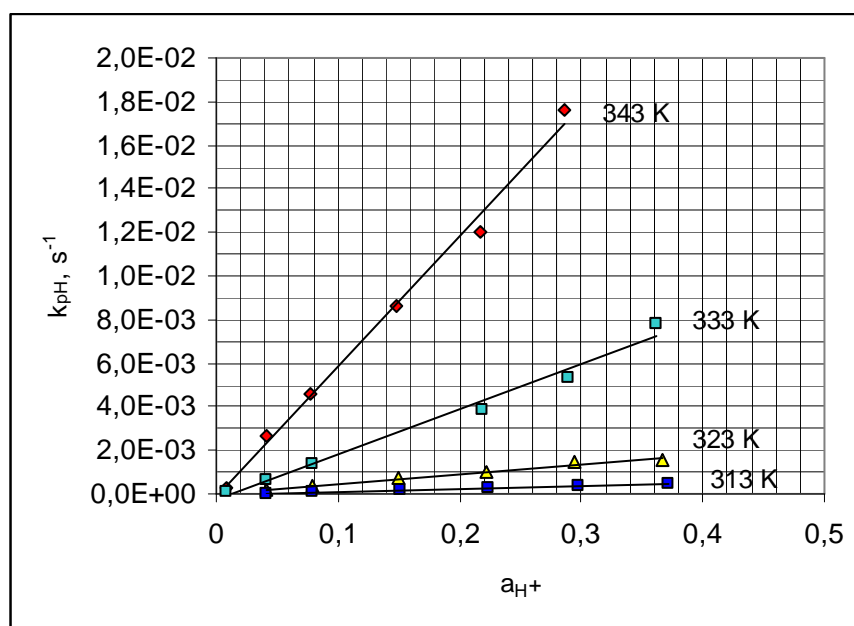


Rycina 55. Profil  $\log k_{pH} = f(\text{pH})$  reakcji rozkładu PMD w roztworach wodnych w temperaturze 313 K, 323 K, 333 k i 343 K.

Punktory – wartości doświadczalne, linia ciągła – profil teoretyczny.

Następnie wyznaczono poszczególne katalityczne stałe szybkości. Celem wyznaczenia katalitycznej stałej  $k_1$ , wykonano wykres  $k_{pH} = f(a_{H^+})$ , uwzględniając wartości  $k_{pH}$  z zakresu pH od 0,44 do ok. 2,0 (Rycina 56).

Wykresy zależności  $k_{pH} = f(a_{H^+})$  są prostoliniowe, a ich nachylenie jest równe wartości  $k_1$  w danej temperaturze.



Rycina 56. Zależność  $k_{pH} = f(a_{H^+})$  reakcji rozkładu PMD w roztworach wodnych.

Katalityczne stałe szybkości  $k_4$  zostały wyznaczone z wartości  $k_{pH}$  w zakresie pH powyżej 12, jako wartość średnia obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu w danej temperaturze. Wartości te zostały wyznaczone w temperaturze 298 K, 303 K, 308 K i 313 K, a następnie z zależności Arrheniusa ( $\ln k_i = f(1/T)$ ), wyznaczono wartości  $k_4$  w temperaturze 323 K, 333 K i 343 K.

W dalszej części interpretacji zależności  $\log k_{pH} = f(pH)$  wyznaczono wartości  $k'_{pH}$  z równania

$$k'_{pH} = k_{pH} - (k_1 a_{H^+} f_1 + k_4 f_4) = k_2 f_2 + k_3 f_3$$

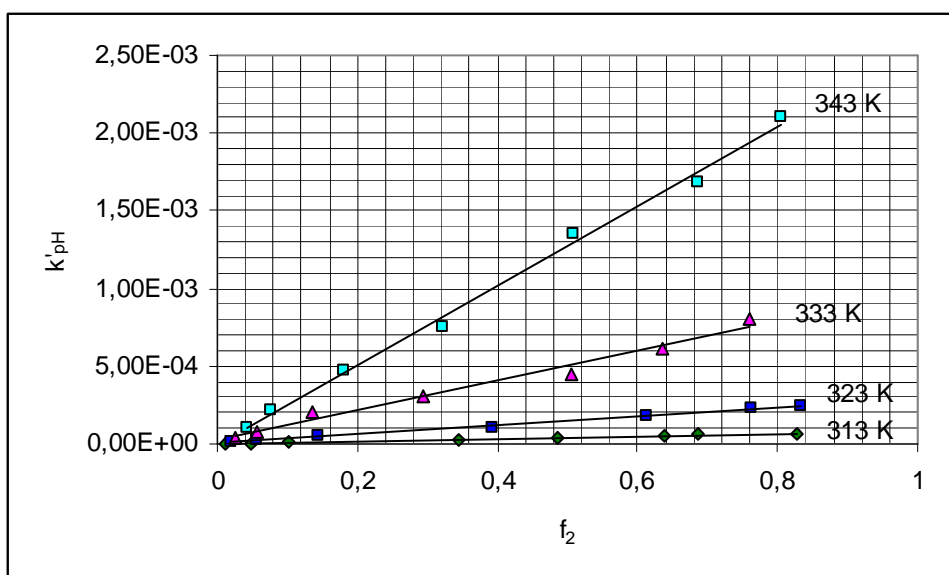
a następnie wykonano wykresy  $k'_{pH} = f(f_2)$ , uwzględniając wartości  $k_{pH}$  z zakresu pH od 4,16 do 6,22 (Rycina 57). Wykresy te są prostoliniowe, a wartość  $k'_{pH}$  dla  $f_2 = 1$  odpowiada katalitycznej stałej szybkości  $k_2$ .

Katalityczną stałą szybkości  $k_3$  wyznaczono jako wartość średnią, z zależności

$$k''_{pH} = k_{pH} - (k_1 a_{H^+} f_1 + k_2 f_2 + k_4 f_4)$$

uwzględniając wartości  $k_{pH}$  w zakresie pH od 6,87 do 9,43. W tym zakresie pH ułamek stężenia formy  $f_3 \rightarrow 1$ .

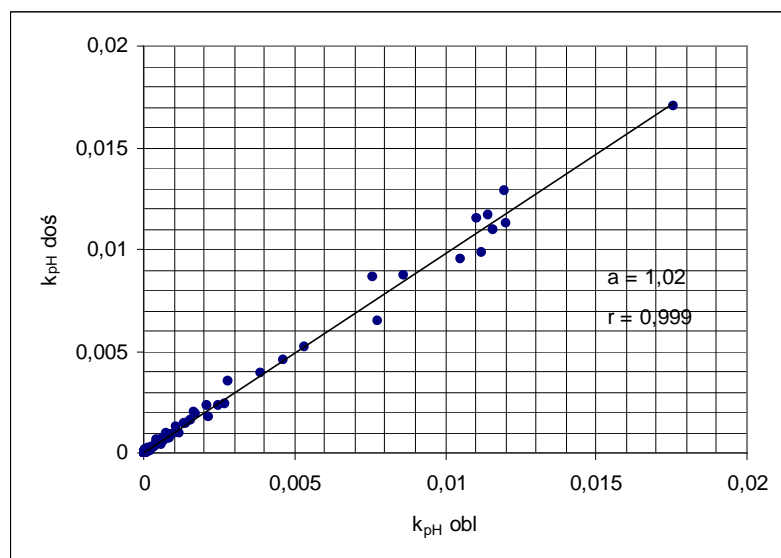
Wyznaczone katalityczne stałe szybkości poszczególnych reakcji cząstkowych przedstawiono w tabeli 59.



Rycina 57. Zależność  $k'_{pH} = f(f_2)$  reakcji rozkładu PMD w roztworach wodnych.

Wartości katalitycznych stałych szybkości reakcji ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  i  $k_4$ ), wykorzystano do obliczenia profilu  $\log k_{pH} = f(pH)$ . Obliczony profil przedstawiono na rycinie 55 linią ciągłą, natomiast wartości  $k_{pH}$  wyznaczone doświadczalnie, zaznaczono punktami.

Zgodność profilu obliczonego z profilem wyznaczonym doświadczalnie oraz liniowa zależność wartości  $k_{obl}$  względem wartości  $k$  wyznaczonych doświadczalnie ( $r = 0,999$ ,  $a = 1,02$ ,  $n = 97$ , Rycina 58), potwierdza prawidłowość zastosowanego równania kinetycznego.



Rycina 58. Zależność  $k_{obl} = f(k_{dos})$  reakcji rozkładu PMD w roztworach wodnych ( $a = 1,02$ ;  $r = 0,999$ ,  $n = 97$ ).



Wartości katalitycznych stałych szybkości posłużyły do wyznaczenia zależności Arrheniusa (Rycina 59) – zależności między katalityczną stałą szybkości reakcji a odwrotnością temperatury bezwzględnej:

$$k_i = A e^{-E_a/RT}$$

Równanie powyższe po zlogarytmowaniu przyjmuje postać:

$$\ln k_i = \ln A - E_a/RT$$

gdzie:

$k_i$  – katalityczna stała szybkości reakcji rozkładu,  
 $A$  – współczynnik częstości; jego wymiar jest taki sam jak stałej szybkości reakcji;  
 $E_a$  – energia aktywacji  
 $R$  – uniwersalna stała gazowa  $8,3144 \text{ [J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}]$   
 $T$  – temperatura bezwzględna [K].

Energię aktywacji ( $E_a$ ), entalpię ( $\Delta H^\ddagger$ ) i entropię ( $\Delta S^\ddagger$ ) obliczono z podanych poniżej wzorów:

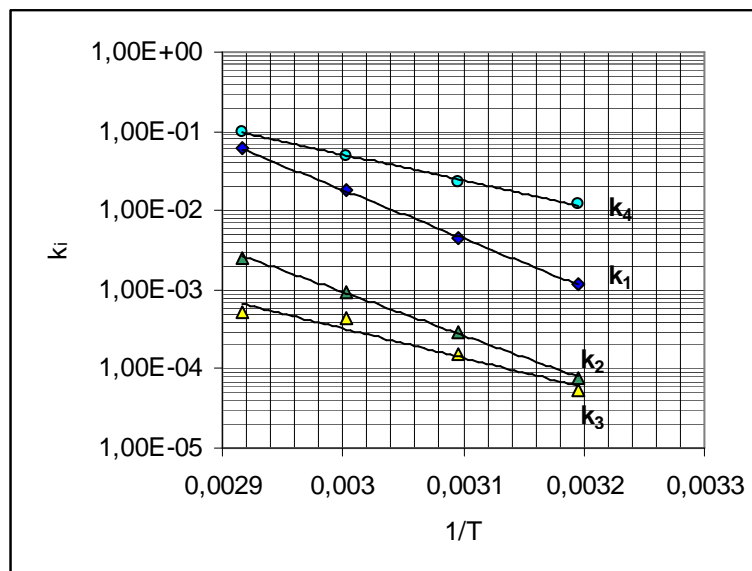
$$E_a = -aR \text{ [J mol}^{-1}\text{]}$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \text{ [J mol}^{-1}\text{]}$$

$$\Delta S^\ddagger = R [\ln A - \ln (kT/h)] \text{ [J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}\text{]}$$

gdzie:

$a$  – nachylenie wykresu  $\ln k_i = f(1/T)$ , ma wartość ujemną  $-a = E_a/R$   
 $k$  – stała Boltzmanna  $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ [J} \cdot \text{K}^{-1}\text{]}$   
 $h$  – stała Plancka  $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ [J} \cdot \text{s]}$



Rycina 59. Półlogarytmiczna zależność  $k_i = f(1/T)$  reakcji rozkładu PMD w roztworach wodnych.

Tabela 59. Katalityczne stałe szybkości i parametry termodynamiczne reakcji rozkładu PMD w roztworach wodnych

T, K	1/T	$k \pm \Delta k$	Ocena statystyczna zależności $k_i = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
$k_1$ [ $\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$ ]				
313	$3,195 \cdot 10^{-3}$	$(1,19 \pm 0,04) \cdot 10^{-3}$	$r = -0,9997$ $a = -14081,5 \pm 1060,3$ $b = 38,23 \pm 3,24$	$E_a = 117,1 \pm 8,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta H^\ddagger = 114,6 \pm 8,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1*}$ $\Delta S^\ddagger = 73,1 \pm 26,9 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1*}$
323	$3,096 \cdot 10^{-3}$	$(4,42 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$		
333	$3,003 \cdot 10^{-3}$	$(1,78 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$		
343	$2,916 \cdot 10^{-3}$	$(5,99 \pm 0,65) \cdot 10^{-2}$		
$k_2$ [ $\text{s}^{-1}$ ]				
313	$3,195 \cdot 10^{-3}$	$(7,68 \pm 0,93) \cdot 10^{-5}$	$r = -0,9993$ $a = -12590,8 \pm 1389,8$ $b = 30,79 \pm 4,24$	$E_a = 104,7 \pm 11,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta H^\ddagger = 102,2 \pm 11,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1*}$ $\Delta S^\ddagger = -11,3 \pm 35,3 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1*}$
323	$3,096 \cdot 10^{-3}$	$(2,88 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$		
333	$3,003 \cdot 10^{-3}$	$(9,50 \pm 1,57) \cdot 10^{-4}$		
343	$2,916 \cdot 10^{-3}$	$(2,56 \pm 0,20) \cdot 10^{-3}$		
$k_3$ [ $\text{s}^{-1}$ ]				
313	$3,195 \cdot 10^{-3}$	$5,31 \cdot 10^{-5}$	$r = -0,9703$ $a = -8549,6 \pm 6484,1$ $b = 17,6 \pm 19,8$	$E_a = 71,1 \pm 53,9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta H^\ddagger = 68,6 \pm 53,9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1*}$ $\Delta S^\ddagger = -98,3 \pm 164,7 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1*}$
323	$3,096 \cdot 10^{-3}$	$1,52 \cdot 10^{-4}$		
333	$3,003 \cdot 10^{-3}$	$4,40 \cdot 10^{-4}$		
343	$2,916 \cdot 10^{-3}$	$5,22 \cdot 10^{-4}$		
$k_4$ [ $\text{s}^{-1}$ ]				
313	$3,195 \cdot 10^{-3}$	$1,23 \cdot 10^{-2}$	$r = -0,9980$ $a = -7678,0 \pm 1486,6$ $b = 20,1 \pm 4,5$	$E_a = 63,8 \pm 12,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta H^\ddagger = 61,4 \pm 12,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1*}$ $\Delta S^\ddagger = -78,0 \pm 37,8 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1*}$
323	$3,096 \cdot 10^{-3}$	$2,24 \cdot 10^{-2}$		
333	$3,003 \cdot 10^{-3}$	$4,98 \cdot 10^{-2}$		
343	$2,916 \cdot 10^{-3}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$		

\* dla temperatury 298 K

Najniższą energię aktywacji wykazuje reakcja hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody monoanionu PMD.

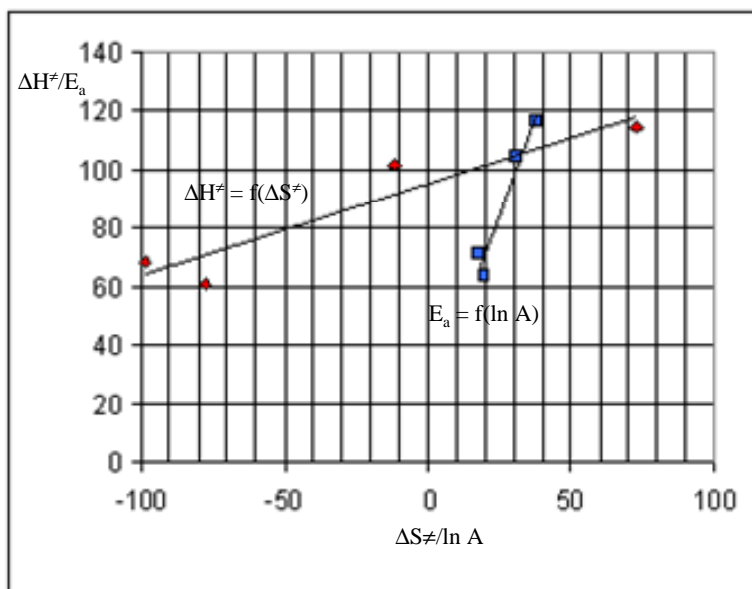
Entropia aktywacji, czyli różnica stanu przejściowego danej reakcji oraz jej stanu początkowego, zależy tylko od funkcji podziału, nie zależy natomiast od początkowej energii aktywacji. Jeżeli w stanie przejściowym możliwość ruchów jest ograniczona lub zahamowana, wówczas  $\Delta S^\ddagger$  maleje i przyjmuje tym bardziej ujemne wartości, im silniej jest ograniczona swoboda ruchów reagentów w kompleksie aktywnym. Ujemne entropie aktywacji są charakterystyczne dla reakcji dwucząsteczkowych, podczas których dwie cząsteczki łączą się w jeden kompleks aktywny.

Wyższa entropia aktywacji reakcji katalizowanej jonami wodorowymi w porównaniu z reakcją spontaniczną jest uzasadniona dodatnim udziałem entropii reakcji protonowania.

Parametry termodynamiczne reakcji spontanicznej hydrolizy PMD maleją wraz ze zmianą ładunku cząsteczki  $\text{PMD}^{+} > \text{PMD} > \text{PMD}^{-}$ , co może być związane z większą solwatacją jonów  $\text{PMD}^{+}$ .

Dla katalizowanej jonami wodorowymi reakcji hydrolizy cząsteczek  $\text{PMD}^{+}$  oraz hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody cząsteczek  $\text{PMD}^{+}$ ,  $\text{PMD}$  i  $\text{PMD}^{-}$  obserwuje się prostoliniowe zależności  $\Delta H^{\ddagger} = f(\Delta S^{\ddagger})$  i  $E_a = f(\ln A)$  (Rycina 60).

Można zatem przyjąć, że wszystkie te reakcje przebiegają według jednolitego mechanizmu, jako reakcje dwucząsteczkowe.

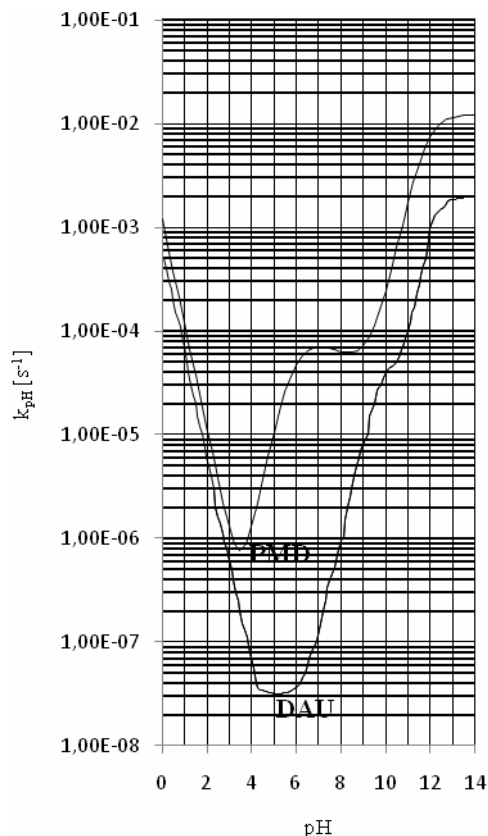


Rycina 60. Zależność  $\Delta H^{\ddagger} = f(\Delta S^{\ddagger})$  i  $E_a = f(\ln A)$  dla katalizowanej jonami wodorowymi reakcji hydrolizy cząsteczek  $\text{PMD}^{+}$  oraz hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody cząsteczek  $\text{PMD}^{+}$ ,  $\text{PMD}$  i  $\text{PMD}^{-}$ .

### Porównanie profilu $\log k_{pH} = f(pH)$ daunorubicyny i PMD

Porównując zależności  $\log k_{pH} = f(pH)$  reakcji rozkładu daunorubicyny i PMD (Rycina 61) można stwierdzić, iż w całym zakresie pH, PMD ulega rozkładowi szybciej niż daunorubicyna. Najmniejsza różnica w szybkości reakcji jest obserwowana w środowisku kwasowym, gdzie dominującą reakcją jest rozkład katalizowany jonami wodorowymi, natomiast w zakresie pH od ok. 3,5 do ok. 10 różnica szybkości rozkładu PMD i

daunorubicyny jest duża. Jest to zakres, w którym dominującą reakcją jest reakcja hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody cząsteczek obojętnych, jonów obojętnych i monoanionów PMD.



Rycina 61.

Profil  $\log k_{pH} = f(pH)$  daunorubicyny (DAU) i *N*-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyny (PMD) w temperaturze 313 K.

### Wpływ siły jonowej

Interpretację wpływu siły jonowej przeprowadzono stosując równanie Brönsteda-Bjerruma:

$$\log k_{obs} = \log k_0 + 2QZ_A Z_B \frac{\sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}}$$

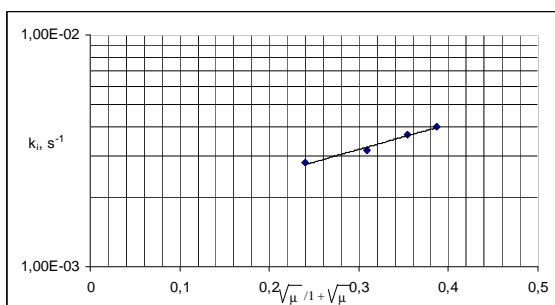
gdzie:

- $k_i$  – obserwowane stałe szybkości reakcji wyznaczone w 0,10 mol/l kwasie solnym, w temperaturze 343 K i w roztworach wodorotlenku sodu 0,10 mol/l w temperaturze 308 K; badania prowadzono stosując roztwory o sile jonowej odpowiednio: 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 i 0,50 mol/l
- $k_0$  – wartość stałej szybkości reakcji przy wartości siły jonowej równej zero
- $Z_A$  i  $Z_B$  – ładunek reagujących cząsteczek
- $\mu$  – wartość siły jonowej
- $2Q = 1,02$  w temperaturze 25°C w roztworach wodnych

Wykonano wykresy  $\log k_{\text{obs}} = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$  (Rycina 62–63), a następnie zależności te oceniono statystycznie (Tabela 60).

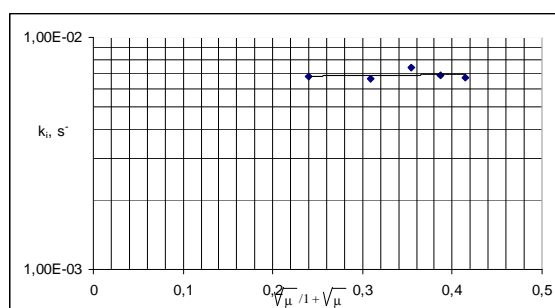
Stwierdzono, że w środowisku kwasu solnego o stężeniu 0,10 mol/l, występuje dodatni efekt solny ( $a = 1,08 \pm 0,45$ ), co znajduje potwierdzenie w zaproponowanym kinetycznym mechanizmie reakcji hydrolizy cząsteczek protonowanych PMD pod wpływem jonów wodorowych.

W roztworze wodorotlenku sodu (0,10 mol/l) występował zerowy efekt solny ( $a = 0,04 \pm 0,52$ ), co potwierdza, iż w tym zakresie pH ma miejsce reakcja spontaniczna pod wpływem wody, a nie reakcja monoanionów PMD, katalizowana jonami wodorotlenowymi.



Rycina 62.

Zależność  $\log k_i = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$  reakcji rozkładu PMD w 0,10 mol/l kwasie solnym w temperaturze 343 K.



Rycina 63.

Zależność  $\log k_i = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$  reakcji rozkładu PMD w 0,10 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 308 K.

Przeprowadzone badania trwałości PMD w roztworach wodnych wykazały, że:

- w warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej badany związek wykazuje największą trwałość w zakresie pH od ok. 2 do ok. 4
- składniki buforu octanowego, buforów fosforanowych oraz buforu boranowego nie wykazują efektu katalitycznego
- najniższą energią aktywacji charakteryzuje się reakcja spontanicznej hydrolizy pod wpływem wody monoanionu PMD
- w kwasie solnym występuje dodatni efekt solny, natomiast w roztworach wodorotlenku sodu – zerowy efekt solny.

Tabela 60. Wpływ siły jonowej na szybkość reakcji rozkładu PMD w 0,10 mol/l kwasie solnym (343 K) i 0,10 mol/l roztworze wodorotlenku sodu (308 K)

Lp.	$\sqrt{\mu} / 1 + \sqrt{\mu}$	$k_i, s^{-1}$	Parametry równania $\log k_i = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$
0,10 mol/l HCl; 343 K			
1.	0,2403	$(2,80 \pm 0,17) 10^{-3}$	$a = 1,0849 \pm 0,4509$ $r = 0,9907$
2.	0,3090	$(3,18 \pm 0,19) 10^{-3}$	
3.	0,3539	$(3,73 \pm 0,16) 10^{-3}$	
4.	0,3874	$(4,00 \pm 0,13) 10^{-3}$	
0,1 mol/l NaOH; 308 K			
1.	0,2403	$(6,76 \pm 0,27) 10^{-3}$	$a = 0,04395 \pm 0,51576$ $r = 0,1547$
2.	0,3090	$(6,64 \pm 0,51) 10^{-3}$	
3.	0,3539	$(7,43 \pm 0,43) 10^{-3}$	
4.	0,3874	$(6,84 \pm 0,29) 10^{-3}$	
5.	0,4142	$(6,72 \pm 0,36) 10^{-3}$	

### Trwałość PMD w roztworach do podania parenteralnego [121]

Badania trwałości PMD przeprowadzono w 13 roztworach (Tabela 8), w temperaturze pokojowej, 2–8°C oraz -16°C. Badania trwałości w temperaturze 2–8°C przeprowadzono tylko z użyciem tych roztworów, w których w temperaturze pokojowej stwierdzono ubytek substancji badanej. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 39–42 i na rycinach 33–36.

W przeprowadzonych badaniach w wybranych roztworach do podania parenteralnego, jako trwale definiowano te roztwory, w których ubytek stężenia substratu nie przekraczał 10% wartości początkowej.

Analizując zmiany stężenia PMD stwierdzono, że:

- w temperaturze pokojowej nie zaobserwowano ubytku substratu po 24 h w następujących rozpuszczalnikach: Aqua pro Injectione, Injectio Glucosi 20%, mieszaninie 5% glukozy i 0,9% chlorku sodu (1:1), natomiast w tym samym czasie w 5% roztworze glukozy i Solutio Ringeri Lactate ubytek substratu po 24 godzinach nie przekroczył 10% wartości początkowej. W pozostałych roztworach ubytek substratu był powyżej 10% wartości początkowej, przy czym największy ubytek zaobserwowano w 10% roztworze glukozy i 20% roztworze mannitolu, w których po 24 h stwierdzono 68,30% lub 70,29% początkowej zawartości substratu

- w temperaturze 2–8°C PMD zachowywała odpowiednią trwałość w większości badanych roztworów. Po 24 h przechowywania ubytek substratu przekraczał nieznacznie 10% wartości początkowej w Injectio Ringeri Lactate oraz Jonosteril®Basic z glukozą
- po 30 dniowym przechowywaniu w temperaturze -16°C, PMD zachowała wymaganą zawartość tylko w przypadku przechowywania w 5, 10 i 20% roztworze glukozy, w Solutio Ringeri, Solutio Ringeri Lactate, w mieszaninie 5% glukozy i 0,9% chlorku sodu (1:1), w płynie pediatrycznym wyrównawczym, w płynie fizjologicznym, wieloelektrolitowym izotonicznym oraz w Jonosterilu® Basic z glukozą. W tych warunkach badania PMD wykazywała najmniejszą trwałość w Aqua pro Iniectione – ubytek substratu wyniósł ok. 30% wartości początkowej.

### *Fototrwałość PMD w roztworach wodnych [122]*

Badania fototrwałości substancji i produktów leczniczych są regulowane dokumentem *Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products* (Q1B), który jest dokumentem obowiązującym od 1998 roku.

Wiele leków, w tym antybiotyki antracyklinowe, są podatne na rozkład pod wpływem światła. Ekspozycja na światło bardzo często prowadzi do niekorzystnych zmian leku, powstałe produkty fotolizy mogą powodować działania niepożądane.

### *Metoda analityczna i jej walidacja*

Do oceny zmian stężenia w czasie reakcji fotodegradacji zastosowano metodę spektrofotometryczną z detekcją w zakresie światła widzialnego przy  $\lambda = 480$  nm. Zaletą metody UV jest czas analizy oraz możliwość wykonywania pomiarów w tej samej kuwecie, w której prowadzono naświetlanie.

Przeprowadzono walidację metody UV i stwierdzono, że jest ona:

- liniowa w zakresie stężeń od 0,06 do 0,12 mg/ml
- precyzyjna, co potwierdzają wartości współczynnika zmienności poniżej 2%
- czuła, gdyż możliwa jest rejestracja widocznego przyrostu wartości mierzonej przy małej zmianie wartości oznaczanej.

W badaniach fotostabilności, w pierwszym etapie określa się czy substancja jest fotostabilna czy też fotolabilna. W tym celu stosuje się aktynometr chemiczny, którym jest roztwór chlorowodoru chininy. Ekspozycję na promieniowanie prowadzi się do zmiany absorbancji roztworu aktynometru chemicznego  $\Delta A = 0,9$ . Jeżeli w tych samych warunkach absorbancja substancji badanej nie ulegnie zmianie, substancję uznaje się jako fotostabilną. PMD ulegała znaczącemu rozkładowi w czasie gdy absorbancja aktynometru chemicznego zmieniła się o 0,2, a zatem według wytycznych ICH należy ją uznać za fotolabilną.

Do oceny ilościowej procesu fotodegradacji, badane roztwory poddano ekspozycji na promieniowanie o  $\lambda_{\text{maks}} = 365$  nm i 510 nm. W czasie ekspozycji na promieniowanie obserwowano zmiany w widmie absorpcji, z zanikiem pasma absorpcji w maksimum przy około 480 nm. Procesowi fotodegradacji towarzyszyło całkowite odbarwienie badanego roztworu podczas naświetlania promieniowaniem o  $\lambda_{\text{maks}} = 510$  nm lub zmniejszenie intensywności zabarwienia roztworu przy ekspozycji na promieniowanie o  $\lambda_{\text{maks}} = 365$  nm.

Podczas ekspozycji wodnego roztworu PMD na promieniowanie, absorbancja zmieniała się od  $c_0 \rightarrow 0$ ; otrzymano liniową zależność  $\ln c = f(t)$ , a zatem reakcja fotodegradacji przebiegała zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Z zależności  $\ln c = f(t)$  wyznaczono obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu, które w podanych warunkach wynoszą:

- $\lambda = 365$  nm;  $k = (1,04 \pm 0,03)10^{-4} \text{ s}^{-1}$
- $\lambda = 365$  nm;  $k = (1,56 \pm 0,93)10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Stosując radiometr zaopatrzony w odpowiedni sensor, możliwe było wyznaczenie pozornych wydajności kwantowych, a następnie przez ekstrapolację do zerowego czasu naświetlania – rzeczywistych wydajności kwantowych  $\Phi$ , które wynosiły odpowiednio  $5,73 \cdot 10^{-5}$  dla  $\lambda = 365$  nm i  $3,37 \cdot 10^{-4}$  dla  $\lambda = 510$  nm. Wydajności kwantowe zmian stężenia substratu i pierwotnych reakcji fotochemicznych, zgodnie z prawem Starka-Einsteina, powinny być równe jedności. Wyższe wartości  $\Phi$  mogą wskazywać na wtórne procesy fotochemiczne, generowane przez pierwotne produkty rozkładu. W przypadku reakcji w roztworach wodnych, wydajności kwantowe przyjmują często wartości niższe od jedności, co może być spowodowane dezaktywacją cząsteczek badanego związku przez cząsteczki rozpuszczalnika.



### *Trwałość PMD w fazie stałej*

Badania w fazie stałej przeprowadzono w atmosferze powietrza o wilgotności względnej ~76,4% oraz 0%. Zmiany stężenia substratu analizowano metodą HPLC, stosując parametry rozdzielania takie same, jak w przypadku badań w roztworach wodnych. Z uwagi na fakt iż zastosowano inne stężenia substratu, procedurę opisaną w roztworach poddano rewalidacji, oceniając jej selektywność i liniowość w rozszerzonym zakresie stężeń. Potwierdzono, że metoda jest selektywna dla PMD w obecności produktów rozkładu powstających w fazie stałej oraz zastosowanego wzorca wewnętrznego, jest także liniowa w zastosowanym zakresie stężeń.

Rozkład PMD w podwyższonej temperaturze, przy RH ~76,4% zachodził zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu, natomiast przy RH = 0% zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.

Rozkład daunorubicyny w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej zachodził także zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu [124].

Z zależności Arrheniusa wyznaczono parametry równania  $\ln k_i = f(1/T)$  (Rycina 64), na podstawie których wyznaczono energię aktywacji oraz parametry termodynamiczne reakcji rozkładu PMD w fazie stałej, przy RH ~76,4%. Testem równoległości wykazano, że wartości nachylenia wykresów  $\ln k_i = f(1/T)$  PMD i daunorubicyny nie różnią się istotnie statystycznie  $t_{\text{obl}} = 0,821 < t_{0,05}(5) = 2,571$ , a zatem podatność obu związków na wpływ temperatury przy RH ~76,4% jest taka sama. Obliczone parametry termodynamiczne porównano z parametrami otrzymanymi dla daunorubicyny (DAU) (Tabela 61).

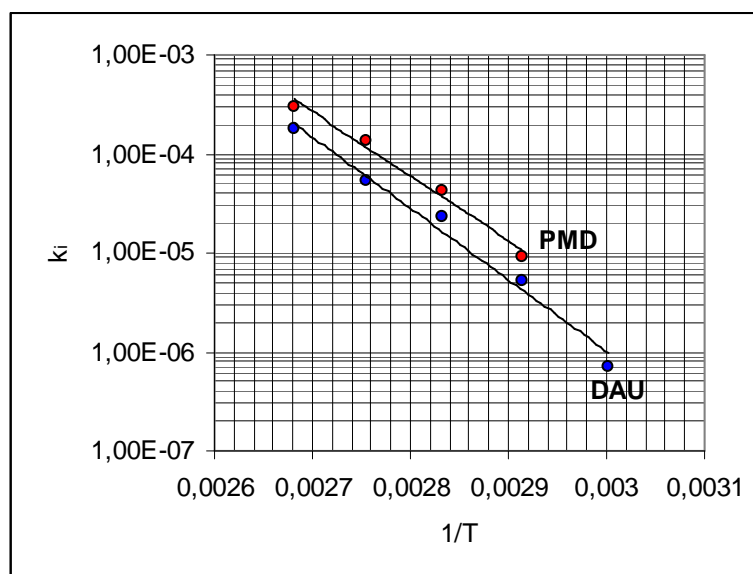
Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, iż:

- kinetyczny mechanizm rozkładu PMD zależy od warunków przechowywania. W atmosferze powietrza o RH ~76,4% rozkład zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu, natomiast przy RH = 0% zgodnie z równaniem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu
- nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych we wpływie temperatury na rozkład PMD i DAU.

Tabela 61. Parametry równania  $\ln k_i = f(1/T)$  oraz parametry termodynamiczne reakcji rozkładu PMD i DAU w atmosferze powietrza o RH ~76,4%

PMD					
Lp.	T [K]	$1/T \cdot 10^{-3}$	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	Parametry równania $\ln k_i = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
1.	343	2,915	$(0,91 \pm 0,11) \cdot 10^{-5}$	$a = -14647 \pm 4145$ $S_a = 963,5$ $b = 31,3 \pm 11,6$ $r = -0,9961$ $S_y = 0,173$	$E_a = 121,8 \pm 34,5 [kJ/mol]$ $\Delta H^\ddagger = 119,3 \pm 36,9 [kJ/mol]^*$ $\Delta S^\ddagger = 15,3 \pm 148,5 [J/(K \cdot mol)]^*$
2.	353	2,833	$(4,27 \pm 0,39) \cdot 10^{-5}$		
3.	363	2,755	$(13,8 \pm 1,5) \cdot 10^{-5}$		
4.	373	2,681	$(29,9 \pm 3,1) \cdot 10^{-5}$		
DAU					
Lp.	T [K]	$1/T \cdot 10^{-3}$	$(k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	Parametry równania $\ln k_i = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
1.	333	3,003	$(7,12 \pm 0,81) \cdot 10^{-7}$	$a = -16581 \pm 3972$ $S_a = 1248$ $b = 35,9 \pm 11,3$ $r = -0,9916$ $S_y = 0,318$	$E_a = 138,2 \pm 33,5 [kJ/mol]$ $\Delta H^\ddagger = 135,2 \pm 35,1 [kJ/mol]^*$ $\Delta S^\ddagger = 149,3 \pm 303,2 [J/(K \cdot mol)]^*$
2.	343	2,915	$(5,32 \pm 0,71) \cdot 10^{-6}$		
3.	353	2,833	$(2,26 \pm 0,38) \cdot 10^{-5}$		
4.	3673	2,755	$(5,25 \pm 1,95) \cdot 10^{-5}$		
	373	2,681	$(17,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$		

\* w temp. 298 K



Rycina 64. Półlogarytmiczna zależność  $k_i = f(1/T)$  reakcji rozkładu PMD i DAU w fazie stałej, RH 76,4%.

## 6. WNIOSKI

---

1. *N*-[(Pirolidyno)metyleno]daunorubicyna (PMD) w roztworach wodnych ulega rozkładowi zgodnie z kinetyką reakcji pseudopierwszego rzędu względem stężenia substratu. W reakcji rozkładu występuje tylko właściwa kataliza kwasowo-zasadowa, na którą składają się:

- hydroliza protonowanych cząsteczek PMD katalizowana jonami wodorowymi
- hydroliza spontaniczna pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu.

W warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej, PMD jest najbardziej trwała w roztworach o pH od ok. 2 do ok. 4. Najniższą energię aktywacji wykazuje reakcja hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody monoanionu PMD. PMD wykazuje znaczące różnice w trwałości w porównaniu do związku macierzystego – daunorubicyny. Największe różnice w trwałości obserwowane są w zakresie pH od ok. 4 do ok. 12.

2. Optymalnymi pod względem trwałości roztworami do podania parenteralnego PMD są roztwory Injectio Glucosi 20%, mieszanina 5% glukozy i 0,9% chlorku sodu (1:1). Największe zmiany stężenia PMD w temperaturze pokojowej zaobserwowano w 10% roztworze glukozy i 20% roztworze mannitolu.
3. Rozkład fotochemiczny PMD zachodzi wg równania reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Szybkość reakcji fotodegradacji zależy od długości fali promieniowania i jest większa w przypadku promieniowania o długości fali 510 nm niż 365 nm.
4. Kinetyczny mechanizm rozkładu PMD w fazie stałej zależy od warunków przechowywania. W warunkach podwyższonej temperatury i podwyższonej wilgotności względnej powietrza rozkład zachodził zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu, podczas gdy przy RH = 0 reakcja rozkładu zachodziła zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.



## 7. STRESZCZENIE

---

Celem badań była ocena trwałości *N*-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyny (PMD) w roztworach wodnych, w warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej, w roztworach do podania parenteralnego oraz pod wpływem światła. Dodatkowo wyznaczono kinetyczny mechanizm rozkładu PMD w fazie stałej oraz określono wpływ temperatury na trwałość PMD przy RH ~76,4%. Do oceny zmian stężenia badanego związku zastosowano metodę HPLC, natomiast w przypadku reakcji fotodegradacji – metodę UV–VIS.

W metodzie HPLC zastosowano podane poniżej parametry rozdzielania, które umożliwiły śledzenie zmian substratu w obecności produktów rozkładu i wzorca wewnętrznego:

- kolumna: LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) o wymiarach 125 × 4 mm, Merck Darmstadt, Niemcy
- faza ruchoma: mieszanina (1:1) roztworów A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>:
  - roztwór A1: metanol, acetonitryl (1:9 V/V)
  - roztwór A2: 2,88 g laurylosiarczanu sodu, 1,6 ml kwasu fosforowego(V) (85%), woda ad 1000 ml (m/V/V)
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,5 ml/min
- detektor: spektrofotometr UV, λ = 254 nm
- wzorzec wewnętrzny: roztwór chlorowodoru chininy.

Metodę HPLC oraz UV–VIS poddano walidacji, określając następujące parametry: selektywność, liniowość, precyzję, granicę wykrywalności i granicę oznaczalności.

Badania kinetyczne reakcji rozkładu PMD w roztworach wodnych wykonano w zakresie pH od 0,42 do ok. 10 w temperaturze 313 K, 323 K, 333 K i 343 K, natomiast w pH powyżej 12 w temperaturze 298 K, 303 K, 308 K i 313 K. Rozkład PMD w roztworach wodnych zachodził zgodnie z modelem reakcji pseudopierwszego rzędu względem stężenia substratu i opisany był następującym równaniem:

$$\ln c_t = \ln c_0 - k_{\text{obs}} \cdot t$$

W żadnym z badanych roztworów buforowych nie zaobserwowano występowania ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej, zatem w całym zakresie pH, wyznaczona wartość obserwowanej stałej szybkości reakcji  $k_{\text{obs}} = k_{\text{pH}}$ .

Na właściwą katalizę kwasowo-zasadową reakcji rozkładu PMD składają się następujące reakcje cząstkowe:

- reakcja rozkładu protonowanych cząsteczek PMD pod wpływem jonów wodorowych
- hydroliza spontaniczna pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu.

Całkowita szybkość reakcji jest opisana następującym równaniem:

$$k_{\text{pH}} = k_1 a_{\text{H}^+} f_1 + k_2 f_2 + k_3 f_3 + k_4 f_4$$

Uwzględniając wartości  $k_{\text{pH}}$  z zakresu pH od 0,42 do ok. 2,0, z zależności  $k_{\text{pH}} = f(a_{\text{H}^+})$  wyznaczono katalityczną stałą szybkości  $k_1$ , która jest równa nachyleniu powyższego wykresu.

Katalityczną stałą szybkości  $k_4$  wyznaczono z zakresu pH powyżej 12, jako wartość średnią z uzyskanych wartości  $k_{\text{pH}}$ , a następnie z zależności Arrheniusa obliczono wartości katalitycznej stałej szybkości reakcji w temperaturze 323 K, 333 K i 343 K.

Katalityczną stałą szybkości  $k_2$  wyznaczono z zależności  $k'_{\text{pH}} = f(f_2)$ , uwzględniając wartości  $k'_{\text{pH}}$  w którym ułamek stężenia formy  $f_2 + f_3 \rightarrow 1$  ( $k'_{\text{pH}} = k_{\text{pH}} - (k_1 a_{\text{H}^+} f_1 + k_4 f_4)$ ). Katalityczna stała szybkości  $k_2$  jest równa wartości  $k'_{\text{pH}}$  dla  $f_2 = 1$ .

Katalityczną stałą szybkości  $k_3$  wyznaczono jako wartość średnią z wartości  $k''_{\text{pH}} = k_{\text{pH}} - (k_1 a_{\text{H}^+} f_1 + k_2 f_2 + k_4 f_4)$ , z zakresu pH 6,87–9,43.

W warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej, PMD wykazuje największą trwałość w zakresie pH 3–4.

Wyznaczone katalityczne stałe szybkości reakcji posłużyły do wyznaczenia energii aktywacji, a następnie parametrów termodynamicznych reakcji – entalpii i entropii reakcji.

W badaniach trwałości PMD w powszechnie stosowanych roztworach do podania parenteralnego, jako trwało definiowano te roztwory, w których ubytek substratu nie przekraczał 10% wartości początkowej. Badania prowadzono w temperaturze pokojowej, w temperaturze 2–8°C oraz -16°C.

Stwierdzono, że PMD zachowuje wymagana trwałość

- w temperaturze pokojowej po 24 h przechowywania w: Aqua pro injectione, Glucosum 5% et Natrium Chloratum 0,9% (1:1), Injectio Glucosi 5%, Injectio Glucosi 20%, Solutio Ringeri Lactate

- w temperaturze 2–8°C po 24 h przechowywania w: 0,9% Solutio Natrii Chloratii, 5% Glucosum, Injectio Glucosi 10%, Glucosum 5% et Natrium Chloratum 0,9% (2:1), Solutio Ringeri Lactate, płynie pediatrycznym wyrównawczym i w płynie fizjologicznym wieloelektrolitowym izotonicznym
- w temperaturze -16°C po 30 dniach przechowywania w: 5% Glucosum, Injectio Glucosi 10% i 20%, Injectio Solutionis Ringeri, Solutio Ringeri Lactate, Glucosum 5% et Natrium Chloratum 0,9% (2:1), płynie pediatrycznym wyrównawczym, płynie fizjologicznym wieloelektrolitowym izotonicznym oraz w roztworze Jonosteril Basic z glukozą

PMD w roztworach wodnych jest związkiem podatnym na rozkład fotochemiczny, który zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Przeprowadzone badania potwierdziły konieczność chronienia roztworów substancji badanej przed światłem.

PMD jest także związkiem podatnym na rozkład w fazie stałej. Kinetyczny mechanizm jej rozkładu w fazie stałej zależy od warunków przechowywania – w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza, rozkład PMD zachodził zgodnie z równaniem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu, natomiast przy RH = 0%, zgodnie z równaniem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.





# Stability of *N*-[(pyrrolidine)methylene]daunorubicin (PMD) in aqueous solutions

*Department of Pharmaceutical Chemistry*

*Poznan University of Medical Sciences, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań*

Justyna Uszak

## Summary

The aim of these studies was to evaluate the stability of PMD in aqueous solutions, intravenous solutions and under the influence of light. Additionally, the kinetic mechanism of PMD degradation in the solid state and the influence of temperature on the stability of PMD at RH ~76.4% were determined. An HPLC method was used to determine the changes in the concentration of PMD, while a UV–VIS method was used for photodegradation studies.

The separation of PMD in the presence of its degradation products and the internal standard in the HPLC method was obtained using the following parameters:

- column: LiChrospher 100 RP–18 (5 μm) 125 × 4 mm, Merck Darmstadt, Germany
- mobile phase: mixture (1:1) of solutions A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>:
  - solution A<sub>1</sub>: methanol, acetonitrile (1:9 V/V)
  - solution A<sub>2</sub>: 2.88 g of sodium laurilsulfate, 1.6 ml of phosphoric acid(V) (85%), water ad 1000 ml (*m/V/V*)
- flow rate: 1.5 ml/min
- detector: spektrophotometer UV, λ = 254 nm
- internal standard: solution of quinine hydrochloride.

Both methods were validated with regard to selectivity, linearity, precision, limit of detection and limit of quantitation.

The kinetics of PMD degradation was studied in aqueous solutions at 313, 323, 333 and 343 K (pH 0.42–~10) and at 298, 303, 308 and 313 K (pH above 12).

The degradation of PMD in aqueous solutions was a pseudo-first-order reaction described by the following equation:

$$\ln c_t = \ln c_0 - k_{\text{obs}} \cdot t$$

Investigations of the influence of the total concentrations of buffers at constant pH and ionic strength on the  $k_{\text{obs}}$  demonstrated that in all buffers only specific acid-base catalysis occurred. Therefore in the whole pH range  $k_{\text{obs}} = k_{\text{pH}}$ .

The semilogarithmic relationship  $k_{pH} = f(pH)$  indicates that the following reactions occur in aqueous solutions of PMD:

- hydrolysis of the protonated molecules of PMD catalyzed by hydrogen ions
- spontaneous hydrolysis of PMD under the influence of water, depending on the substrate charge

The total rate of the reaction is equal to the sum of partial rates:

$$k_{pH} = k_1 a_{H^+} f_1 + k_2 f_2 + k_3 f_3 + k_4 f_4$$

The catalytic rate constants  $k_1$  were calculated from the plots  $k_{pH} = f(a_{H^+})$ , which are linear with a positive slope that is equal to  $k_1$ .

The catalytic rate constants  $k_4$  were calculated as the mean values of  $k_{pH}$  at pH above 12.

The catalytic rate constants  $k_2$  were calculated from the dependence  $k'_{pH} = f(f_2)$  at the pH range 4.16–6.22. The values of  $k'_{pH}$  for  $f_2 = 1$  are equal to  $k_2$ .

The catalytic rate constants  $k_3$  were calculated as the mean values of  $k''_{pH} = k_{pH} - (k_1 a_{H^+} f_1 + k_2 f_2 + k_4 f_4)$  at the pH range pH 6.87–9.43 where  $f_3 \rightarrow 1$ . PMD is the most stable at pH 2–4.

The catalytic rate constants were used to calculate the slope of the plots  $\ln k_i = f(1/T)$  and the values of  $\ln A$  for partial reactions. These values were used to determine the energy of activation and thermodynamic parameters – enthalpy and entropy.

In studies of PMD in parenteral solutions those solutions in which the loss of substrate concentration did not exceed 10% of the initial concentration were defined as stable. The stability was investigated after storage at room temperature (24 h), at 2–8°C (24 h) and at -16°C (30 days).

It was found that PMD demonstrated no change in its concentration under the following conditions:

- at room temperature after 24 h storage in Aqua pro Injectione, Glucosum 5% et Natrium Chloratum 0.9% (1:1), Injectio Glucosi 5%, Injectio Glucosi 20%, Solutio Ringeri Lactate
- at 2–8°C after 24 h storage in 0.9% Solutio Natrii Chloratii, 5% Glucosum, Injectio Glucosi 10%, Glucosum 5% et Natrium Chloratum 0.9% (2:1), Solutio Ringeri Lactate, compensatory pediatric solution and isotonic multielectrolytic physiological solution
- at -16°C after storing for 30 days in 5% Glucosum, Injectio Glucosi 10% and 20%, Injectio Solutionis Ringeri, Solutio Ringeri Lactate, Glucosum 5% et Natrium

Chloratum 0.9% (2:1), compensatory pediatric solution, isotonic multielectrolytic physiological solution and Jonosteril Basic with Glucosum

PMD in aqueous solutions is susceptible to photodegradation. This process is the first-order reaction. This study confirms the necessity of protecting PMD solutions from light.

PMD is also susceptible to degradation in the solid state. The kinetic mechanism of its degradation depends on storage conditions. At RH ~76.4% it is the first-order autocatalytic reaction depending on the substrate concentration, while at RH = 0% it is a first-order reaction depending on the substrate concentration.



## 8. PIŚMIENNICTWO

---

1. Zając M., Pawełczyk E., Jelińska A.:  
*Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów*  
Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2006.
2. Kunnari T. J., Ylihonko K. P. J., Klika K. D., Mantsala P. I., Hakala J. M. L.:  
*Hybrid Anthracyclines from a Genetically Engineered Streptomyces galilaeus Mutant*  
The Journal of Organic Chemistry, 65, 2851–2855, 2000.
3. Ylihonko K., Hakala J., Kunnari T., Mäntsälä P.:  
*Production of hybrid anthracycline antibiotics by heterologous expression of Streptomyces nogalater nogalamycin biosynthesis genes*  
Microbiology, 142, 1965–1972, 1996.
4. Stańczak A., Ulrichs M.:  
*Leki przeciwnowotworowe. Interkalatory.*  
Farmacja Polska, 62, 167–175, 2006.
5. Beijnen J. H., Weise G., Underberg W. J. M.:  
*Aspects of the chemical stability of doxorubicin and seven other anthracyclines in acidic solution*  
Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 7, 109–116, 1985.
6. Dine T., Cazin J., Gressier B., Luyckx M., Brunet C., Cazin M., Goudaliez F., Mallevais M. L., Toraub I.:  
*Stability and compatibility of four anthracyclines: doxorubicin, epirubicin, daunorubicin and pirarubicin with PVC infusion bags*  
Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 14, 365–369, 1992.
7. Wood M. J., Irwin W. J., Scott D. K.:  
*Stability of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin in plastic syringes and minibags*  
Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 15, 279–289, 1990.
8. Seargeant L. E., Kobrinsky N. L., Sus C. J., Nazeravich D. R.:  
*In vitro stability and compatibility of daunorubicin, cytarabine and etoposide*  
Cancer Treatment Reports, 71, 1189–1192, 1987.
9. Bouma J., Beijnen J. H., Bult A., Underberg W. J. M.:  
*Anthracycline antitumor agents. A review of physicochemical, analytical and stability properties*  
Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 8, 109–133, 1986.
10. Bekers O., Beijnen J. H., Vis B. J., Suenaga A., Otagiri M., Bult A., Underberg W. J. M.:  
*Effect of cyclodextrin complexation on the chemical stability of doxorubicin and daunorubicin in aqueous solutions*  
International Journal of Pharmaceutics, 72, 123–130, 1991.
11. Zhao P., Dash A. K.:  
*A simple HPLC method using a microbore column for the analysis of doxorubicin*  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 20, 543–548, 1999.
12. Wood M. J., Irwin W. J., Scott D. K.:  
*Photodegradation of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin measured by high-performance liquid chromatography*  
Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 15, 291–300, 1990.

13. Griese N., Blaschke G., Boos J., Hempel G.:  
*Determination of free and liposome – associated daunorubicin and daunorubicinol in plasma by capillary electrophoresis*  
Journal of Chromatography A, 979, 379–388, 2002.
14. Ciesielska E., Studzian K., Wąsowska M., Oszczapowicz I., Szmigiero L.:  
*Cytotoxicity, cellular uptake and DNA damage by daunorubicin and its new analogues with modified daunosamine moiety*  
Cell Biology and Toxicology, 21, 139–147, 2005.
15. Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Sanz A., Bravo E.:  
*Simultaneous determination of doxorubicin, daunorubicin and idarubicin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*  
Electrophoresis, 22, 134–138, 2001.
16. Smith R. G.:  
*Characterization of anthracycline antibiotics by desorption chemical ionization mass spectrometry*  
Analytical Chemistry, 54, 2006–2008, 1982.
17. Pasqualino A., Picone M. A., Traina A.:  
*Spectrofluorometric determination of daunomycin in the tissues*  
Arzneimittelforschung, 19, 774–776, 1969.
18. Beijnen J. H., van der Houwen O. A. G. J., Voskuilen M. C. H., Underberg W. J. M.:  
*Aspects of degradation kinetics of daunorubicin in aqueous solution*  
International Journal of Pharmaceutics, 31, 75–82, 1986.
19. Lachatre F., Marquet P., Ragot S., Gaulier J. M., Cardot P., Dupuy J. L.:  
*Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*  
Journal of Chromatography B, 738, 281–291, 2000.
20. Beijnen J. H., Potman R. P., van Ooijen R. D., Dribergen R. J., Voskuilen M. C. H., Renemaa J., Underberg W. J. M.:  
*Structure elucidation and characterization of daunorubicin degradation products*  
International Journal of Pharmaceutics, 34, 247–257, 1987.
21. Kelso C., Tillott V., Rojas J. D., Furlan R. L., Padilla G., Beck J. L.:  
*Mass spectrometric investigation of the DNA-binding properties of an anthracycline with two trisaccharide chains*  
Archives of Biochemistry and Biophysics, 477, 348–355, 2008.
22. Gao D., Hu J., Yang M., Li Q.:  
*Determination of daunomycin at a novel COOH/indium tin oxide ion implantation-modified electrode*  
Analytical Biochemistry, 358, 70–75, 2006.
23. Ohara K., Shin M., Larsson L. I., Fujiwara K.:  
*Improved immunocytochemical detection of daunomycin*  
Histochemistry and Cell Biology, 127, 603–608, 2007.
24. Chevrier R., Sautou V., Pinon V., Demeocq F., Chopineau J.:  
*Stability and compatibility of a mixture of the anti-cancer drugs etoposide, cytarabine and daunorubicine for infusion*  
Pharmaceutica Acta Helvetiae, 70, 141–148, 1995.
25. Beijnen J. H., Rosing H., de Vries P. A., Underberg W. J. M.:  
*Stability of Anthracycline Antitumor Agents in Infusion Fluids*  
Journal of Parenteral Science and Technology, 39, 220–222, 1985.
26. Maniez-Devos D. M., Baurain R., Lesne M., Trouet A.:  
*Degradation of doxorubicin and daunorubicin in human and rabbit biological fluids*  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 4, 353–365, 1986.
27. Islam M. S., Asker A. F.:  
*Photoprotection of daunorubicin hydrochloride with sodium sulfite*  
PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 49, 122–126, 1995.

28. Kociubińska A., Kozubek A.:  
*Liposomy w medycynie (cz.3)*  
Lek w Polsce, 11, 23–33, 2001.
29. Gabizon A., Goren D., Cohen R., Barenholz Y.:  
*Development of liposomal anthracyclines: from basis to clinical applications*  
Journal of Controlled Release, 53, 275–279, 1998.
30. Wąsowska M., Oszczapowicz I.:  
*Modyfikacje antybiotyków antracyklinowych*  
Farmacja Polska 60, 587–602, 2004.
31. Zagotto G., Gatto B., Moro S., Sissi C., Palumbo M.:  
*Anthracyclines: recent developments in their separation and quantitation*  
Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications, 764, 161–171, 2001.
32. Kyle A. H., Huxham L. A., Chiam A. S. J., Sim D. H., Minchinton A. I.:  
*Direct assessment of drug penetration into tissue using a novel application of three-dimensional cell culture*  
Cancer Research, 64, 2004.
33. Szuławska A., Czyż M.:  
*Molecular mechanisms of anthracyclines action*  
Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 60, 78–100, 2006.
34. Olson R. D., Li X., Palade P., Shadle S. E., Mushlin P. S., Gambliel H. A., Fill M., Boucek R. J. Jr, Cusack B. J.:  
*Sarcoplasmic reticulum calcium release is stimulated and inhibited by daunorubicin and daunorubicinol*  
Toxicology and Applied Pharmacology, 169, 168–176, 2000.
35. Brikenshtein V. Kh., Baranov E. P.:  
*Mechanism of daunorubicin interaction with DNA*  
Antibiotics and Medicinal Biotechnology, 30, 90–96, 1985.
36. Barone G., Guerra C. F., Gambino N., Silvestri A., Lauria A., Almerico A. M., Bickelhaupt F. M.:  
*Intercalation of daunomycin into stacked DNA base pairs. DFT study of an anticancer drug*  
Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 26, 115–130, 2008.
37. Christine A. Frederick, Loren Dean Williams, Giovanni Ughetto, Gijs A. van der Marel, Jacques H. van Boom, Alexander Rich, Andrew H. J. Wang:  
*Structural comparison of anticancer drug–DNA complexes: adriamycin and daunomycin*  
Biochemistry, 29, 2538–2549, 1990.
38. Weiss R. B.:  
*The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?*  
Seminars in Oncology, 19, 670–686, 1992.
39. Portugal J., Cashman D. J., Trent J. O., Ferrer – Miralles N., Przewłoka T., Fokt I., Priebe W., Chaires J. B.:  
*A new bisintercalating anthracycline with picomolar DNA binding affinity*  
Journal of Medicinal Chemistry, 48, 8209–8219, 2005.
40. Wąsowska M., Oszczapowicz I.:  
*Przeciwdziałanie kardiotoksyczności w terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem antybiotyków antracyklinowych*  
Farmacja Polska 57, 509–515, 2001.
41. Przybyszewski W. M., Widel M., Rzeszowska – Wolny J.:  
*Cardiotoxic consequences of ionizing radiation and anthracyclines*  
Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 60, 397–405, 2006.

42. Shadle S. E., Bammel B. P., Cusack B. J., Knighton R. A., Olson S. J., Mushlin P. S., Olson R. D.:  
*Daunorubicin cardiotoxicity: evidence for the importance of the quinone moiety in a free-radical-independent mechanism*  
Biochemical Pharmacology, 60, 1435–1444, 2000.
43. Binaschi M., Bigioni M., Cipollone A., Rossi C., Goso C., Maggi C. A., Capranico G., Animati F.:  
*Anthracyclines: Selected new developments*  
Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents, 1, 113–130, 2001.
44. Balendiran G. K.:  
*Fibrates in the chemical action of daunorubicin*  
Current Cancer Drug Targets, 9, 366–369, 2009.
45. Zucchi R., Danesi R.:  
*Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines*  
Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents, 3, 151–171, 2003.
46. Wilson D. W., Grier D., Reimer R., Bauman J. D., Preston J. F., Gabbay E. J.:  
*Structure-Activity Relationship of Daunorubicin and Its Peptide Derivatives*  
Journal of Medicinal Chemistry, 19, 381–384, 1976.
47. Roche C. J., Thomson J. A., Crothers D. M.:  
*Site selectivity of daunomycin*  
Biochemistry, 33, 926–935, 1994.
48. Villamarin S., Mansilla S., Ferrer – Miralles N., Priebe W., Portugal J.:  
*A comparative analysis of the time-dependent antiproliferative effects of daunorubicin and WP631.*  
European Journal of Biochemistry, 270, 764–770, 2003.
49. Paton C. M., Ekert H., Waters K. D., Matthews R. N., Toogood I. R.:  
*Treatment of acute myeloid leukaemia in children*  
Australian and New Zealand Journal of Medicine, 12, 143–146, 1982.
50. Sorensen K., Levitt G., Bull C., Chessells J., Sullivan I.:  
*Anthracycline dose in childhood acute lymphoblastic leukemia: issues of early survival versus late cardiotoxicity*  
Journal of Clinical Oncology, 15, 61–68, 1997.
51. Paul C., Liliemark J., Tidefelt U., Gahrton G., Peterson C.:  
*Pharmacokinetics of daunorubicin and doxorubicin in plasma and leukemic cells from patients with acute nonlymphoblastic leukemia*  
Therapeutic Drug Monitoring, 11, 140–148, 1989.
52. Andersson B., Beran M.:  
*Leukemic cell versus plasma levels of daunorubicin and daunorubicinol after infusion of daunorubicin as free drug or the DNA complex*  
Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 4, 205–207, 1980.
53. DeGregorio M. W., Holleran W. M., Macher B. A., Linker C. A., Wilbur J. R.:  
*Kinetics and sensitivity of daunorubicin in patients with acute leukemia*  
Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 13, 230–234, 1984.
54. Gottlieb A. J., Weinberg V., Ellison R. R., Henderson E. S., Terebelo H., Rafla S., Cuttner J., Silver R. T., Carey R. W., Levy R. N.:  
*Efficacy of daunorubicin in the therapy of adult acute lymphocytic leukemia: a prospective randomized trial by cancer and leukemia group B*  
Blood, 64, 267–274, 1984.



55. de Nully Brown P., Hoffmann T., Hansen O. P., Boesen A. M., Grønbaek K., Hippe E., Jensen M. K., Thorling K., Storm H. H., Pedersen-Bjergaard J.:  
*Long-term survival and development of secondary malignancies in patients with acute myeloid leukemia treated with aclarubicin or daunorubicin plus cytosine arabinoside followed by intensive consolidation chemotherapy in a Danish national phase III trial*  
Leukemia, 11, 37–41, 1997.
56. Vogler W. R., Velez-Garcia E., Weiner R. S., Flaum M.A., Bartolucci A. A., Omura G. A., Gerber M. C., Banks P.L.:  
*A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia*  
Journal of Clinical Oncology, 10, 1103–1111, 1992.
57. Yates J., Glidewell O., Wiernik P., Cooper M. R., Steinberg D., Dosik H., Levy R., Hoagland C., Henry P., Gottlieb A., Cornell C., Berenberg J., Hutchison J. L., Raich P., Nissen N., Ellison R. R., Frelick R., James G. W., Falkson G., Silver R. T., Haurani F., Green M., Henderson E., Leone L., Holland J. F.:  
*Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: a CALGB study*  
Blood, 60, 454–462, 1982.
58. Filipiak K. J.  
*Leki wywołujące obrzęki obwodowe*  
Kardiologia w Praktyce, 2, 27–29, 2005.
59. Aleszewicz-Baranowska J., Ereciński J.:  
*Powikłania kardiologiczne leczenia choroby nowotworowej u dzieci*  
Choroby serca i naczyń, 3, 156–159, 2006.
60. Grabowska B., Stępińska J.:  
*Odległe powikłania kardiologiczne w terapii onkologicznej*  
Kardiologia Polska, 61, 296–299, 2004.
61. Kierkowska B., Kobusińska J., Stańczyk J.:  
*Antracykliny z perspektywy kardiologa*  
Polish Journal of Cardiology, 9, 283–287, 2007.
62. Deptała A., Omyła-Staszewska J., Staszewska-Skurzyńska M.:  
*Kardiotoksyczność antracyklin i kardioprotekcja. Fakty i mity.*  
Współczesna onkologia, 8, 107–111, 2004.
63. Bręborowicz E., Bręborowicz P., Litwiniuk M., Tomczak P.:  
*Kardiomiopatia po leczeniu antracyklinami jako istotny problem diagnostyczny i terapeutyczny w praktyce lekarza onkologa*  
Współczesna onkologia, 11, 204–209, 2007.
64. Rivera E.:  
*Liposomal anthracyclines in metastatic breast cancer: clinical update*  
The Oncologist, 8, 3–9, 2003.
65. Danesi R., Fogli S., Gennari A., Conte P., Del Tacca M.:  
*Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs*  
Clinical Pharmacokinetics, 41, 431–444, 2002.
66. Hortobágyi G. N.:  
*Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview.*  
Drugs, 54, 1–7, 1997.
67. Kroumpouzou G., Travers R., Allan A.:  
*Generalized hyperpigmentation with daunorubicin chemotherapy*  
Journal of the American Academy of Dermatology, 46, S1–3, 2002.
68. Borecky D. J., Stephenson J. J., Keeling J. H., Vukelja S. J.:  
*Idarubicin-induced pigmentary changes of the nails*  
Cutis, 59, 203–204, 1997.

69. Giacobetti R., Esterly N. B., Morgan E. R.:  
*Nail hyperpigmentation secondary to therapy with doxorubicin*  
American Journal of Diseases of Children, 135, 317–318, 1981.
70. Schulmeister L.:  
*A new agent for treating anthracycline extravasation*  
Clinical Journal of Oncology Nursing, 11, 387–395, 2007.
71. Goolsby T. V., Lombardo F. A.:  
*Extravasation of chemotherapeutic agents: prevention and treatment*  
Seminars in Oncology, 33, 139–143, 2006.
72. Cabriaes S., Bresnahan J., Testa D., Espina B. M., Scadden D. T., Ross M., Gill P. S.:  
*Extravasation of liposomal daunorubicin in patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma: a report of four cases*  
Oncology Nursing Forum, 25, 67–70, 1998.
73. Karczmarek-Borowska B., Matczuk M.:  
*Postępowanie przy wynaczynieniu leków stosowanych w leczeniu nowotworów*  
Współczesna Onkologia, 8, 29–32, 2004.
74. Tsavaris N. B., Komitsopoulou P., Karagiaouris P., Loukatou P., Tzannou I., Mylonakis N., Kosmidis P.:  
*Prevention of tissue necrosis due to accidental extravasation of cytostatic drugs by a conservative approach*  
Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 30, 330–333, 1992.
75. Mir O., Berveiller P., Ropert S., Goffinet F., Pons G., Treluyer J. M., Goldwasser F.:  
*Emerging therapeutic options for breast cancer chemotherapy during pregnancy*  
Annales of Oncology, 19, 607–613, 2008.
76. Colbert N., Najman A., Gorin N., Blum F., Treisser A., Lasfargues G., Cloup M., Barrat H., Duhamel G.:  
*Acute leukemia during pregnancy: favourable course of pregnancy in two patients treated with cytosine arabinoside and anthracyclines*  
Nouvelle Presse Medicale, 9, 175–178, 1980.
77. Germann N., Goffinet F., Goldwasser F.:  
*Anthracyclines during pregnancy: embryo-fetal outcome in 160 patients*  
Annales of Oncology, 15, 146–150, 2004.
78. Blatt J., Mulvihill J. J., Zeigler J. L., Young R. C., Poplack D. G.:  
*Pregnancy outcome following cancer chemotherapy*  
American Journal of Medicine, 69, 828–832, 1980.
79. Kelly H. L., Collichio F. A., Dees E. C.:  
*Concomitant pregnancy and breast cancer: options for systemic therapy*  
Breast Diseases, 23, 95–101, 2005–2006.
80. Gopalakrishnan Potti, Mervyn Israel:  
*Adriamycin analogs. Preparation of 9,10-Anhydrodaunorubicin, 9,10-Anhydroadriamycin, and Some Related Compounds*  
Journal of Medicinal Chemistry, 25, 478–481, 1982.
81. Cassinelli G., Forenza S., Rivola G., Arcamone F., Grein A., Merli S., Casazza A. M.:  
*13-Deoxycarminomycin, a New Biosynthetic Anthracycline*  
Journal of Natural Products, 48, 435–439, 1985.
82. Masquelier M., Tirzitis G., Peterson C. O., Palsson M., Amolins A., Plotniece M., Plotniece A., Makarova N., Vitols S. G.:  
*Plasma stability and cytotoxicity of lipophilic daunorubicin derivatives incorporated into low density lipoproteins*  
European Journal of Medicinal Chemistry, 35, 429–438, 2000.
83. Kule C., Ondrejickova O., Verner K.:  
*Doxorubicin, daunorubicin and mitoxantrone cytotoxicity in yeast*  
Molecular Pharmacology, 46, 1234–1240, 1994.

84. Nabholz J. M.:  
*Docetaxel-anthracycline combinations in metastatic breast cancer*  
Breast Cancer Research and Treatment, 79, S3–9, 2003.
85. Borchmann P., Hübel K., Schnell R., Engert A.:  
*Idarubicin: a brief overview on pharmacology and clinical use*  
International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology, 35, 80–83, 1997.
86. Simmons A., Vacek J. L., Meyers D.:  
*Anthracycline-induced cardiomyopathy*  
Postgraduate Medicine, 120, 67–72, 2008.
87. Ferreira A. L., Matsubara L. S., Matsubara B. B.:  
*Anthracycline-induced cardiotoxicity*  
Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal, 6, 278–281, 2008.
88. Menna P., Salvatorelli E., Minotti G.:  
*Cardiotoxicity of antitumor drugs*  
Chemical Research in Toxicology, 21, 978–989, 2008.
89. Wąsowska M., Wietrzyk J., Opolski A., Oszczapowicz J., Oszczapowicz I.:  
*Effect of Structural Modifications of Anthracyclines on the Ability to Overcome Drug Resistance of Cancer Cells*  
Anticancer Research, 26, 2009–2012, 2006.
90. Mortensen S. A., Olsen H. S., Baandrup U.:  
*Chronic anthracycline cardiotoxicity: haemodynamic and histopathological manifestations suggesting a restrictive endomyocardial disease*  
British Heart Journal, 55, 274–282, 1986.
91. Wong K. Y., Lampkin B. C.:  
*Anthracycline toxicity*  
American Journal of Pediatric Hematology, 5, 93–97, 1983.
92. Viale P. H., Yamamoto D. S.:  
*Cardiovascular toxicity associated with cancer treatment*  
Clinical Journal of Oncology Nursing, 12, 627–638, 2008.
93. Cusack B. J., Mushlin P. S., Johnson C. J., Vestal R. E., Olson R. D.:  
*Aging increases the cardiotoxicity of daunorubicin and daunorubicinol in the rat*  
Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 51, B376–384, 1996.
94. Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U.:  
*Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity*  
Molecular Pharmacology, 61, 516–523, 2002.
95. Burke B. E., Mushlin P. S., Cusack B. J., Olson S. J., Gambliel H. A., Olson R. D.:  
*Decreased sensitivity of neonatal rabbit sarcoplasmic reticulum to anthracycline cardiotoxicity*  
Cardiovascular Toxicology, 2, 41–51, 2002.
96. Steinherz L. J., Steinherz P. G., Tan C. T., Heller G., Murphy M. L.:  
*Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy*  
Journal of the American Medicinal Association, 266, 1672–1677, 1991.
97. Tokarska-Schlattner M., Zaugg M., Zuppinger C., Wallimann T., Schlattner U.:  
*New insight into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics*  
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 41, 389–405, 2006.
98. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.:  
*Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*  
Pharmacological Reviews, 56, 185–229, 2004.

99. Santostasi G., Kutty R. K., Krishna G.:  
*Increased toxicity of anthracycline antibiotics induced by calcium entry blockers in cultured cardiomyocytes*  
Toxicology and Applied Pharmacology, 108, 140–149, 1991.
100. Chen B., Peng X., Pentassuglia L., Lim C. C., Sawyer D. B.:  
*Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity*  
Cardiovascular Toxicology, 7, 114–121, 2007.
101. Pacher P., Liaudet L., Bai P., Mabley J. G., Kaminski P. M., Virág L., Deb A., Szabó E., Ungvári Z., Wolin M. S., Groves J. T., Szabó C.:  
*Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction*  
Circulation, 107, 896–904, 2003.
102. Mukhopadhyay P., Bátkai S., Rajesh M., Czifra N., Harvey-White J., Haskó G., Zsengeller Z., Gerard N. P., Liaudet L., Kunos G., Pacher P.:  
*Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity*  
Journal of the American College of Cardiology, 50, 528–536, 2007.
103. Conklin K. A.:  
*Coenzyme Q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity*  
Integrative Cancer Therapies, 4, 110–130, 2005.
104. Teixeira R. S., Valduga C. J., Benvenuti L. A., Schreier S., Maranhão R. C.:  
*Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors*  
Journal of Pharmacy and Pharmacology, 60, 1287–1295, 2008.
105. Wang Q.X., Lu X., Tian H., Jiang H., Lv G., Guo D., Wu C., Chen B.:  
*The incorporation of daunorubicin in cancer cells through the use of titanium dioxide whiskers*  
Biomaterials, 30, 4708–4715, 2009.
106. Forssen E. A., Malé-Brune R., Adler-Moore J. P., Lee M. J., Schmidt P. G., Krasieva T. B., Shimizu S., Tromberg B. J.:  
*Fluorescence imaging studies for the disposition of daunorubicin liposomes (DaunoXome) within tumor tissue*  
Cancer Research, 56, 2066–2075, 1996.
107. Eckardt J. R., Campbell E., Burris H. A., Weiss G. R., Rodriguez G. I., Fields S. M., Thurman A. M., Peacock N. W., Cobb P., Rothenberg M. L.:  
*A phase II trial of DaunoXome, liposome-encapsulated daunorubicin, in patients with meta-static adenocarcinoma of the colon*  
American Journal of Clinical Oncology, 17, 498–501, 1994.
108. Agrawal V., Paul M. K., Mukhopadhyay A. K.:  
*6-mercaptopurine and daunorubicin double drug liposomes-preparation, drug-drug interaction and characterization*  
Journal of Liposome Research, 15, 141–155, 2005.
109. Lorusso V., Manzione L., Silvestris N.:  
*Role of liposomal anthracyclines in breast cancer*  
Annals of Oncology, 18, 70–73, 2007.
110. Campos S.:  
*Liposomal anthracyclines: adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer*  
The Oncologist, 8, 10–16, 2003.
111. Drummond D. C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D. B., Papahadjopoulos D.:  
*Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors*  
Pharmacological Reviews, 51, 691–744, 1999.

112. Michieli M., Damiani D., Ermacora A., Pasolini P., Michelutti A., Michelutti T., Russo D., Pea F., Bacarani M.:  
*Liposome-encapsulated daunorubicin for PGP-related multidrug resistance*  
British Journal of Haematology, 106, 92–99, 1999.
113. Cattel L., Ceruti M., Dosio F.:  
*From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy.*  
Tumori - a Journal of Experimental and Clinical Oncology, 89, 237–249, 2003
114. Gill P. S., Espina B. M., Muggia F., Cabriales S., Tulpule A., Esplin J. A., Liebman H. A., Forssen E., Ross M. E., Levine A. M.:  
*Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin*  
Journal of Clinical Oncology, 13, 996–1003, 1995.
115. Forssen E. A., Coulter D. M., Proffitt R. T.:  
*Selective in vivo localization of daunorubicin small unilamellar vesicles in solid tumors*  
Cancer Research, 52, 3255–3261, 1992.
116. Schenk T., Pawelek Z.:  
*Badania stabilności, materiały szkoleniowe*  
XT01–XT–A–SK01, 24–26 czerwca 2003r. Brno.
117. O'Donnell K.:  
*Mean Kinetic Temperature*  
Pharma Times, 10, 11–13, 2008.
118. Łukawska M., Oszczapowicz I., Jelińska A., Cielecka-Piontek J., Zając M., Dobrowolski L., Ziółkowska G., Zalewski P., Piekarski M., Krause A., Uszak J.:  
*Development and validation of RP-HPLC metod for determination of novel derivatives of daunorubicin*  
Chemia Analityczna, 54, 907–917, 2009.
119. Jelińska A., Uszak J., Cielecka-Piontek J., Zając M., Lamberti A., Oszczapowicz I., Łukawska M.:  
*The stability of [(N-pyrrolidine)methylene]daunorubicin in aqueous solutions*  
Reactions Kinetics and Catalysis Letters, 98, 69–75, 2009.
120. *Ocena jakości substancji i produktów leczniczych*, pod red. M. Zając i A. Jelińskiej  
Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2010.
121. Cielecka-Piontek J., Jelińska A., Dołhań A., Zalewski P., Burek D., Krause A., Uszak I., Oszczapowicz I., Łukawska M.:  
*Stability of new anticancer agents in intravenous solutions*  
Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences – praca wysłana do druku
122. Zalewski P., Jelińska A., Zając M., Cielecka-Piontek J., Piekarski M., Mielcarek J., Krause A., Uszak J., Łukawska M., Oszczapowicz I.:  
*Photostability of New anticancer agents*  
Journal of Pharmacy Research, 3, 1700–17002, 2010.
123. Pawełczyk E., Hermann T. W.:  
*Podstawy trwałości leków*,  
Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1982.
124. Cielecka-Piontek J., Jelińska A., Zając M., Sobczak M., Bartold A., Oszczapowicz I.:  
*A comparison of the stability of doxorubicin and daunorubicin in solid state*  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 50, 576–579, 2009.

