

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII FARMACEUTYCZNEJ



Rozprawa doktorska

TRWAŁOŚĆ CILAZAPRILU W FAZIE STAŁEJ

Sylwia Katarzyna Paszun

Promotor: dr hab. Beata Jadwiga Stanisiz

Poznań 2013

Serdeczne podziękowania pragnę złożyć

PANI DR HAB. BEACIE JADWIDZE STANISZ

za życzliwość,
poświęcony czas,
opiekę naukową oraz
wszelkie cenne wskazówki

PANI PROF. DR HAB. ANNIE JELIŃSKIEJ

za umożliwienie wykonania pracy

PANI DR ANNIE ZALEWSKIEJ

za okazaną pomoc w badaniach reologicznych

KOLEŻANKOM I KOLEGOM Z ZAKŁADU CHEMII FARMACEUTYCZNEJ

za wsparcie i porady

RODZINIE, PRZYJACIOŁOM I MEMU LUBEMU

za okazaną miłość i nieustanne dodawanie mi otuchy

NARODOWEMU CENTRUM NAUKI

za finansowanie pracy w latach 2011 - 2013

Pracę dedykuję

MOIM UKOCHANYM RODZICOM

Spis treści

1	Wstęp	1
2	Nadciśnienie tętnicze i inhibitory konwertazy angiotensyny	3
2.1	Nadciśnienie tętnicze	4
2.2	Diagnoza nadciśnienia tętniczego	4
2.3	Terapia nadciśnienia tętniczego	5
2.4	Inhibitory konwertazy angiotensyny	6
3	Cel badań	14
4	Wybór metody do badań trwałości cilazaprilu	16
4.1	Metoda analityczna do badań kinetycznych	17
4.2	Proces walidacji metody analitycznej	17
4.3	Metody oznaczania cilazaprilu - przegląd piśmiennictwa	19
4.4	Szczegółowe cele dotyczące metody analitycznej do oceny trwałości cilazaprilu	21
4.5	Materiały i metody	22
4.6	Obliczenia	23
4.7	Wybór metody analitycznej do oceny trwałości cilazaprilu	23
4.8	Metoda HPLC z detekcją UV	24
4.9	Metoda spektrofotometrii klasycznej i pochodnych widm	37
4.10	Podsumowanie	38
5	Trwałość cilazaprilu w substancji	39
5.1	Badania kinetyczne cilazaprilu w substancji	41
5.2	Charakterystyka cilazaprilu	41
5.3	Reakcje substancji leczniczych w fazie stałej	42
5.4	Kinetyka rozkładu substancji leczniczej w fazie stałej	43
5.5	Zależność Arrhenius'a	45

5.6	Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu <i>w substancji</i>	46
5.7	Materiały i metody	47
5.8	Procedury	48
5.9	Wyniki i ich omówienie	51
5.10	Podsumowanie	88
6	Trwałość cilazaprilu w obecności wybranych substancji pomocniczych	89
6.1	Substancje pomocnicze w tabletkach	90
6.2	Substancje pomocnicze stosowane w tabletkach z cilazapilem	91
6.3	Szczegółowe cele badania wpływu substancji pomocniczych na trwałość cilazaprilu	100
6.4	Materiały i metody	101
6.5	Procedury	101
6.6	Wyniki i ich omówienie	103
6.7	Podsumowanie	117
7	Trwałość cilazaprilu w tabletkach	118
7.1	Wiadomości ogólne o tabletkach	119
7.2	Metody wytwarzania tabletek	119
7.3	Opakowanie tabletek	121
7.4	Trwałość tabletek	123
7.5	Tabletki z cilazapilem	124
7.6	Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu w tabletkach	126
7.7	Materiały i metody	127
7.8	Procedury	127
7.9	Wyniki i ich omówienie	129
7.10	Podsumowanie	151
8	Trwałość cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu	152
8.1	Terapia niekontrolowanego nadciśnienia tętniczego	153
8.2	Diuretyki	154
8.3	Charakterystyka hydrochlorotiazydu	155
8.4	Lek złożony	155
8.5	Szczegółowe cele badania wpływu hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu	157
8.6	Materiały i metody	158
8.7	Procedury	158
8.8	Wyniki i ich omówienie	160
8.9	Podsumowanie	177

9	Trwałość cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej	178
9.1	Nadciśnienie u dzieci	179
9.2	Terapia nadciśnienia u dzieci	180
9.3	Płyny pediatryczne	182
9.4	Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej .	183
9.5	Materiały i metody	184
9.6	Procedury	184
9.7	Wyniki i ich omówienie	187
9.8	Podsumowanie	197
10	Omówienie wyników	198
11	Wnioski	218
	Streszczenie	221
	Abstract	224
	Wykaz skrótów	227
	Bibliografia	231
	Oświadczenia	241

Spis rycin

2.1	Schemat terapii złożonej w leczeniu nadciśnienia tętniczego	6
2.2	Układ renina-angiotensyna-aldosteron	9
2.3	Schemat wiązania się cilazaprilatu z centrami aktywnymi enzymu konwertującego angiotensynę	13
4.1	Selektywność metody HPLC - pilotażowe badanie kinetyczne	28
4.2	Liniowość metody - benzokaina (IS)	30
4.3	Liniowość metody - chlorowodorek oksymetazoliny (IS)	31
4.4	Ocena selektywności metody spektrofotometrycznej	38
5.1	Wzór strukturalny cilazaprilu	41
5.2	Selektywność metody HPLC wobec cilazaprilu <i>w substancji</i>	51
5.3	Dobór modelu kinetycznego ($RH > 0 \%$)	52
5.4	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 25,0 \%$)	55
5.5	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$)	56
5.6	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 60,5 \%$)	57
5.7	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$)	58
5.8	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	59
5.9	Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu <i>w substancji</i>	60
5.10	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	61
5.11	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	63
5.12	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 348 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	64
5.13	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 353 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	65
5.14	Powierzchnia charakteryzująca rozkład cilazaprilu	67
5.15	Dobór modelu kinetycznego $RH = 0 \%$	69
5.16	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 373 \text{ K}$, $RH = 0 \%$)	73
5.17	Rozkład cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0 \%$)	76

5.18	Rozkład cilazaprilu w substancji ($T = 383 \text{ K}$, $RH = 0 \%$)	78
5.19	Rozkład cilazaprilu w substancji ($T = 393 \text{ K}$, $RH = 0 \%$)	80
5.20	Chromatogram i widma MS cilazaprilu substancji	83
5.21	Chromatogram i widma MS produktu rozkładu cilazaprilu substancji $RH = 76,4 \%$	84
5.22	Chromatogram i widma MS produktu rozkładu cilazaprilu $RH = 0 \%$	85
5.23	Widmo IR cilazaprilu w substancji	86
5.24	Widma IR produktu rozkładu cilazaprilu substancji	87
5.25	Mechanizm rozkładu cilazaprilu w substancji	88
6.1	Wzór strukturalny hypromelozy	92
6.2	Wzór strukturalny laktozy	94
6.3	Wzór strukturalny skrobi	95
6.4	Wzór strukturalny stearylofumaranu sodu.	97
6.5	Selektywność metody HPLC wobec substancji pomocniczych	103
6.6	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie H ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$)	104
6.7	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie H ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$)	105
6.8	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie H ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	106
6.9	Porównanie rozkładów: cilazaprilu w substancji i mieszaninie H	107
6.10	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie L ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$)	108
6.11	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie L ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$)	109
6.12	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie L ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	110
6.13	Porównanie rozkładów: cilazaprilu w substancji i mieszaninie L	111
6.14	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie S ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$)	112
6.15	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie S ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$)	112
6.16	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie S ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	113
6.17	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie T ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$)	114
6.18	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie T ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$)	115
6.19	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie T ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	115
6.20	Porównanie rozkładów: cilazaprilu w substancji i mieszaninie T	116
6.21	Wpływ substancji pomocniczych na trwałość cilazaprilu	117
7.1	Schemat przedstawiający blister	122
7.2	Schemat produkcji tabletek z cilazaprilem	124
7.3	Selektywność metody HPLC wobec składników leku A i B	129
7.4	Rozkład cilazaprilu w leku A ($T = 318 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	131
7.5	Rozkład cilazaprilu w leku A ($T = 323 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	132
7.6	Rozkład cilazaprilu w leku A ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	133
7.7	Rozkład cilazaprilu w leku A ($T = 338 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	135
7.8	Rozkład cilazaprilu w leku A ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	137

7.9	Rozkład cilazaprilu w leku B ($T = 318$ K, $RH = 76,4$ %)	140
7.10	Rozkład cilazaprilu w leku B ($T = 323$ K, $RH = 76,4$ %)	141
7.11	Rozkład cilazaprilu w leku B ($T = 333$ K, $RH = 76,4$ %)	142
7.12	Rozkład cilazaprilu w leku B ($T = 338$ K, $RH = 76,4$ %)	146
7.13	Rozkład cilazaprilu w leku B ($T = 343$ K, $RH = 76,4$ %)	148
7.14	Porównanie trwałości cilazaprilu w tabletkach i <i>substancji</i>	151
8.1	Mechanizm działania tiazydów	154
8.2	Wzór strukturalny hydrochlorotiazydu	155
8.3	Selektywność metody HPLC wobec hydrochlorotiazydu	160
8.4	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie HCTZ ($T = 343$ K, $RH = 50,9$ %) . . .	162
8.5	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie HCTZ ($T = 343$ K, $RH = 66,5$ %) . . .	163
8.6	Rozkład cilazaprilu w mieszaninie HCTZ ($T = 343$ K, $RH = 76,4$ %) . . .	164
8.7	Porównanie rozkładów: cilazaprilu w <i>substancji</i> i mieszaninie HCTZ	165
8.8	Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu	166
8.9	Rozkład cilazaprilu w leku H ($T = 323$ K, $RH = 76,4$ %)	168
8.10	Rozkład cilazaprilu w leku H ($T = 328$ K, $RH = 76,4$ %)	169
8.11	Rozkład cilazaprilu w leku H ($T = 333$ K, $RH = 76,4$ %)	170
8.12	Rozkład cilazaprilu w leku H ($T = 338$ K, $RH = 76,4$ %)	172
8.13	Rozkład cilazaprilu w leku H ($T = 343$ K, $RH = 76,4$ %)	174
8.14	Porównanie trwałości cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu	177
9.1	Selektywność metody HPLC wobec składników zawiesiny z cilazaprilem . .	187
9.2	Trwałość cilazaprilu w zawieszynie A przechowywanej w butelce szklanej . .	188
9.3	Trwałość cilazaprilu w zawieszynie A przechowywanej w butelce z tworzywa PET	189
9.4	Trwałość cilazaprilu w zawieszynie B przechowywanej w butelce szklanej . .	189
9.5	Trwałość cilazaprilu w zawieszynie B przechowywanej w butelce z tworzywa PET	190
9.6	Pomiar pH podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny A w butelce szklanej	190
9.7	Pomiar pH podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny A w butelce PET	191
9.8	Pomiar pH podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny B w butelce szklanej	192
9.9	Pomiar pH podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny B w butelce PET	192
9.10	Krzywe tiksotropowe zawiesiny A	195
9.11	Krzywe tiksotropowe zawiesiny B	196

9.12	Zmiany lepkości pozornej podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny A	197
9.13	Zmiany lepkości pozornej podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny B	197
10.1	Selektywność metod HPLC i spektrofotometrii	202
10.2	Rozkład cilazaprilu w <i>substancji</i>	205
10.3	Wpływ temperatury i wilgotności na czas połowicznego rozkładu cilazaprilu w <i>substancji</i>	207
10.4	Rozkład cilazaprilu w <i>substancji</i> w zerowej wilgotności względnej powietrza	208
10.5	Porównanie kinetyki i mechanizmów rozkładu dikarboksyłowych inhibitorów konwertazy angiotensyny	211
10.6	Porównanie energii aktywacji reakcji rozkładu dikarboksyłowych enzymów konwertazy angiotensyny	212
10.7	Wpływ substancji pomocniczych na trwałość cilazaprilu w substancji i postaci leku	213
10.8	Rola ochronna opakowania handlowego tabletek z cilazaprilem	215
10.9	Wpływ hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu w substancji i postaci leku	216

Spis tabel

2.1	Klasyfikacja prawidłowego ciśnienia i nadciśnienia tętniczego	5
4.1	Optymalizacja parametrów metody HPLC	25
4.2	Selektywność metody HPLC - procedury	27
4.3	Selektywność metody HPLC	28
4.4	Liniowość metody - benzokaina (IS)	30
4.5	Liniowość metody - chlorowodurek oksymetazoliny (IS)	31
4.6	Precyzja metody - poziom niski	32
4.7	Precyzja metody - poziom średni	33
4.8	Precyzja metody - poziom wysoki	33
4.9	Charakterystyka mieszanin modelowych i parametrów dotyczących dokładności	35
4.10	Dokładność - mieszanina M1	35
4.11	Dokładność - mieszanina M2	36
4.12	Dokładność - mieszanina M3	36
4.13	Zawartość cilazaprilu w tablecie	37
5.1	Matematyczne modele reakcji w fazie stałej	44
5.2	Plan badań trwałości cilazaprilu <i>w substancji</i>	49
5.3	Dobór modelu kinetycznego ($RH > 0\%$)	53
5.4	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363\text{ K}$, $RH = 25,0\%$)	55
5.5	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363\text{ K}$, $RH = 50,9\%$)	56
5.6	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363\text{ K}$, $RH = 60,5\%$)	57
5.7	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363\text{ K}$, $RH = 66,5\%$)	58
5.8	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 363\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	59
5.9	Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu <i>w substancji</i>	60
5.10	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	62

5.11	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$) . . .	63
5.12	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 348 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$) . . .	64
5.13	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 353 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$) . . .	65
5.14	Zależność Arrhenius'a dla cilazaprilu <i>w substancji</i>	66
5.15	Ocena przydatności powierzchni rozkładu do wyznaczania parametrów rozkładu cilazaprilu	68
5.16	Dobór modelu kinetycznego ($RH = 0 \%$)	70
5.17	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 373 \text{ K}$, $RH = 0 \%$) - etap końcowy	74
5.18	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 373 \text{ K}$, $RH = 0 \%$) - etap początkowy	75
5.19	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0 \%$) - etap końcowy	76
5.20	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0 \%$) - etap początkowy	77
5.21	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 383 \text{ K}$, $RH = 0 \%$) - etap końcowy	78
5.22	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 383 \text{ K}$, $RH = 0 \%$) - etap początkowy	79
5.23	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 393 \text{ K}$, $RH = 0 \%$) - etap końcowy	80
5.24	Parametry rozkładu cilazaprilu <i>w substancji</i> ($T = 393 \text{ K}$, $RH = 0 \%$) - etap początkowy	81
5.25	Zależność Arrhenius'a dla cilazaprilu <i>w substancji</i> ($RH > 0 \%$)	82
5.26	Analiza widma IR cilazaprilu <i>w substancji</i>	86
6.1	Plan badań wpływu substancji pomocniczych na trwałość cilazaprilu . . .	102
6.2	Parametry rozkładu cilazaprilu w obecności hypromelozy ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$)	105
6.3	Parametry rozkładu cilazaprilu w obecności hypromelozy ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	106
6.4	Porównanie rozkładów cilazaprilu: <i>w substancji</i> i mieszaninie H	107
6.5	Parametry rozkładu cilazaprilu w obecności laktozy jednowodnej ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$)	109
6.6	Parametry rozkładu cilazaprilu w obecności laktozy jednowodnej ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	110
6.7	Porównanie rozkładów cilazaprilu: <i>w substancji</i> i mieszaninie L	111
6.8	Parametry rozkładu cilazaprilu w obecności talku ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	116
6.9	Porównanie rozkładów cilazaprilu: <i>w substancji</i> i mieszaninie T	117

7.1	Charakterystyka składu leku A i B	125
7.2	Plan badań trwałości cilazaprilu w tabletkach	128
7.3	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A bez opakowania ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	133
7.4	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A w opakowaniu ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	134
7.5	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku A ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) .	134
7.6	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A bez opakowania ($T = 338\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	135
7.7	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A w opakowaniu ($T = 338\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	136
7.8	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku A ($T = 338\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) .	136
7.9	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A bez opakowania ($T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	137
7.10	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A w opakowaniu ($T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	138
7.11	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku A ($T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) .	138
7.12	Zależność Arrhenius'a dla leku A	139
7.13	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku B bez opakowania ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	143
7.14	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku B w opakowaniu ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	144
7.15	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku B ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) .	145
7.16	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku B bez opakowania ($T = 338\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	146
7.17	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku B w opakowaniu ($T = 338\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	147
7.18	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku B ($T = 338\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) .	147
7.19	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku B bez opakowania ($T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	148
7.20	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku B w opakowaniu ($T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$)	149
7.21	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku B ($T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) .	149
7.22	Zależność Arrheniusa dla leku B	150
8.1	Charakterystyka składu leku H	156
8.2	Plan badań wpływu hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu	159
8.3	Parametry rozkładu cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu ($T = 343\text{ K}$, $RH = 50,9\%$)	162

8.4	Parametry rozkładu cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazynu ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$)	163
8.5	Parametry rozkładu cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazynu ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	164
8.6	Porównanie rozkładów cilazaprilu: w <i>substancji</i> i mieszaninie HCTZ	165
8.7	Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazynu	166
8.8	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku H bez opakowania ($T = 328 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	169
8.9	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku H bez opakowania ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	170
8.10	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku H w opakowaniu ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	171
8.11	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku H ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$) .	171
8.12	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku H bez opakowania ($T = 338 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	172
8.13	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku H w opakowaniu ($T = 338 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	173
8.14	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku H ($T = 338 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$) .	173
8.15	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku H bez opakowania ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	174
8.16	Parametry rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku H w opakowaniu ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)	175
8.17	Ocena funkcji ochronnej opakowania leku H ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$) .	175
8.18	Zależność Arrhenius'a dla cilazaprilu w leku H	176
9.1	Plan badań trwałości cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej	185
9.2	Ocena smaku płynnej postaci leku z cilazaprilem	188
9.3	Ocena pH zawiesiny A	191
9.4	Ocena pH zawiesiny B	193
9.5	Parametry reologiczne zawiesin z cilazaprilem	194

1

Wstęp

Trwałość leku jest cechą każdego produktu farmaceutycznego. Gwarantuje ona, że przez cały, ustalony okres ważności substancja biologicznie czynna zawarta w leku zachowa swoje właściwości i skuteczność. [1] Korzystne jest, szczególnie z ekonomicznego punktu widzenia, aby okres ważności był jak najdłuższy a preparat farmaceutyczny możliwie najbardziej trwały. Jednak w rzeczywistości, każdy lek prędzej czy później ulega rozkładowi, ponieważ jest układem fizykochemicznym podlegającym nieustannym zmianom. [2, 3]

Na trwałość leku wpływa wiele czynników. Wśród nich wyróżnia się czynniki fizyczne (temperatura i wilgoć), działaniu którym poddawany jest lek w każdym etapie przechowywania, produkcji i dystrybucji. Niemalże znaczenie dla stabilności leku mają także czynniki chemiczne, do których zaliczamy reaktywność substancji leczniczej, substancji pomocniczych i materiału opakowaniowego gotowej postaci leku. Ostateczna trwałość postaci leku jest wypadkową wszystkich powyżej wymienionych elementów, dlatego też ważne jest poznanie charakteru i istotności zachodzących interakcji. [4]

Cilazapril będący obiektem dociekań niniejszej pracy doktorskiej, jest lekiem szeroko stosowanym w terapii nadciśnienia i niewydolności serca. I choć jest lekiem efektywnym, terapia nim jest droga. Do ceny preparatu z pewnością przyczynia się krótka (trzy lata i mniej) data ważności. Cilazapril w swojej budowie chemicznej zawiera ugrupowanie estrowe, które z jednej strony jest niezbędne w procesie wchłaniania i zapewnienia odpowiedniej biodostępności leku, natomiast z drugiej strony jego wrażliwość na hydrolityczny rozkład może przyczyniać się do nietrwałości cilazaprilu. [5, 6, 7]

Ze względu na fakt, że w światowej literaturze nie ma doniesień na temat trwałości cilazaprilu postanowiono zbadać to zagadnienie możliwe najbardziej wnikliwie. W hipotezie badawczej założono, że cilazapril jest nietrwałą substancją leczniczą a czynniki środowiska oraz substancje współwystępujące w postaci leku wpływają na jego stabilność.

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy stanowią odpowiedzi na pytania dotyczące trwałości cilazaprilu w fazie stałej. Dotyczą one kinetycznego opisu reakcji degradacji, mechanizmu rozkładu cilazaprilu *w substancji* oraz interakcji zachodzących między cilazaprilem a substancjami: pomocniczymi oraz biologicznie czynną (hydrochlorotiazidem), które są używane w produkcji tabletek z cilazaprilem. Analiza ścieżek rozkładu, stałych szybkości reakcji rozkładu oraz czynników wpływających na rozkład cilazaprilu dostarcza wiedzy odnośnie czynników destabilizujących molekułę cilazaprilu. Uzyskane wiadomości mogą być użyte jako drogowskazy w poszukiwaniach takich postaci leku, które gwarantują większą trwałość cilazaprilu.

Dla lepszej czytelności pracy wyniki poszczególnych eksperymentów zaprezentowano w oddzielnych ROZDZIAŁACH.

Nadciśnienie tętnicze i inhibitory konwertazy angiotensyny

2.1	Nadciśnienie tętnicze	4
2.2	Diagnoza nadciśnienia tętniczego	4
2.3	Terapia nadciśnienia tętniczego	5
2.4	Inhibitory konwertazy angiotensyny	6
2.4.1	Historia powstania inhibitorów konwertazy angiotensyny	6
2.4.2	Układ renina-angiotensyna-aldosteron	8
2.4.3	Efekty farmakologiczne inhibitorów konwertazy angiotensyny	10
2.4.4	Podział inhibitorów konwertazy angiotensyny	12
2.4.5	Cilazapril	13

2.1 Nadciśnienie tętnicze

Nadciśnienie tętnicze jest chorobą, której globalny zasięg przyjmuje rozmiary epidemii. [8]

Szacuje się, że na całym świecie w roku 2025 populacja chorych na nadciśnienie osiągnie 1,5 miliarda, co oznacza, że co piąta osoba będzie miała podwyższone ciśnienie krwi. Problem ten dotyczy głównie krajów rozwiniętych, które paradoksalnie dysponują wiedzą, lekami i środkami zapobiegawczymi.

Niepokojącym faktem jest nie tylko skala występowania, ale także zjawisko niekontrolowanego nadciśnienia tętniczego. W 2005 roku w Stanach Zjednoczonych dotyczyło to około 40 milionów dorosłych. W tym samym czasie w Polsce 29 % populacji kraju chorowało na nadciśnienie, ale tylko 10 - 14 % było leczonych efektywnie. Ukazuje się w tym przypadku paradoks, że mimo dużych możliwości współczesnej terapii, ogromu wiedzy, wciąż wiele osób nie jest skutecznie leczonych. [9, 10, 11, 12, 13]

Niekontrolowane nadciśnienie tętnicze powoduje w organizmie ogromne spustoszenie związane przede wszystkim ze zmianami chorobowymi w naczyniach krwionośnych. Konsekwencjami są powikłania takie jak: zawał, choroba wieńcowa, nefropatia czy retinopatia, przyczyniające się do zwiększonej umieralności w tej populacji pacjentów. Dlatego też niezmiernie istotne w leczeniu nadciśnienia jest, aby stosowane leki nie tylko skutecznie obniżały ciśnienie, ale także przyczyniały się do ochrony i poprawy stanu naczyń krwionośnych. [14, 15, 16]

Z powyższych względów bardzo istotna jest wczesna diagnoza i skuteczne leczenie nadciśnienia, które prowadzą do prewencji występowania chorób sercowo-naczyniowych. [8]

2.2 Diagnoza nadciśnienia tętniczego

Rozpoznanie nadciśnienia dokonuje się na różne sposoby: poprzez pomiar ciśnienia tętniczego u lekarza, na podstawie dokumentacji domowych pomiarów ciśnienia przez pacjenta lub poprzez całodobowe monitorowanie ciśnienia (ABPM). [17] Zmierzone wartości ciśnienia klasyfikuje się według wytycznych, w Polsce obowiązują rozporządzenia *Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego*. (TABELA 2.1)

TABELA 2.1
Klasyfikacja prawidłowego ciśnienia i nadciśnienia tętniczego [17]

Kategoria	Ciśnienie skurczowe	Ciśnienie rozkurczowe <i>mmHg</i>	
OPTYMALNE	<120	i	<80
PRAWIDŁOWE	120-129	i/lub	80-84
WYSOKIE PRAWIDŁOWE	130-139	i/lub	85-89
NADCIŚNIENIE TĘTNICZE			
I STOPNIA	140-159	i/lub	90-99
II STOPNIA	160-179	i/lub	100-109
III STOPNIA	≥180	i/lub	≥110
IZOLOWANE NADCIŚNIENIE TĘTNICZE SKURCZOWE	≥140	i	<90

2.3 Terapia nadciśnienia tętniczego

Leczenie nadciśnienia tętniczego ma na celu obniżenie ciśnienia krwi do poziomów prawidłowych i prewencji powikłań narządowych. Jest zagadnieniem niezmiernie skomplikowanym, gdyż w wielu przypadkach u pacjentów z nadciśnieniem stwierdza się współistniejące zaburzenia, między innymi: gospodarki lipidowej, metabolizmu glukozy, masy ciała. [12]

Terapia nefarmakologiczna obejmuje zmianę stylu życia, która przede wszystkim spowoduje obniżenie podwyższonego ciśnienia krwi do poziomów prawidłowych i jeśli to konieczne prowadzi ubytku masy ciała.

Główne zalecenia dotyczą [8, 17]:

- zmiany nawyków żywieniowych: poprzez spożycie większej ilości warzyw i owoców, rezygnacji z pożywienia wysoko przetworzonego, z tłuszczów nasyconych na korzyść nienasyconych, a także ograniczenia stosowania soli kuchennej,
- wprowadzenia regularnej, podwyższonej aktywności fizycznej,
- zaprzestania palenia papierosów oraz picia alkoholu.

Terapia nefarmakologiczna dotyczy każdego chorującego na nadciśnienie tętnicze, niezależnie od klasyfikacji. Przedstawione powyżej zalecenia powinny być wprowadzone przez pacjentów z nadciśnieniem tętniczym trwale, nie należy o nich zapominać nawet w wypadku wprowadzeniu leczenia farmakologicznego. [8, 17]

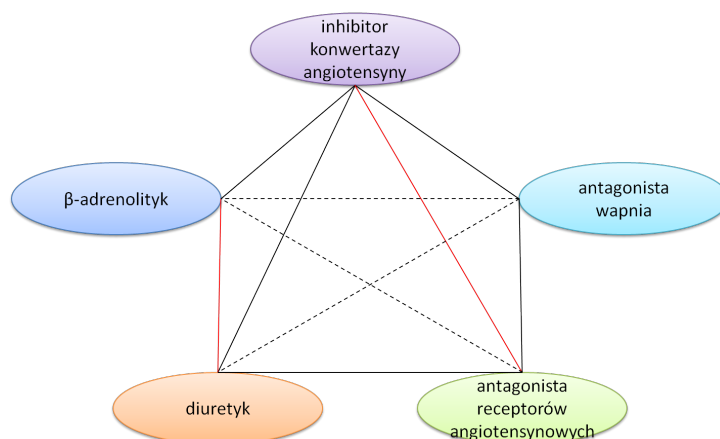
Terapia farmakologiczna jest wdrażana w dwojaki sposób. W przypadku nadciśnienia I stopnia, wtedy gdy trzymiesięczna modyfikacja stylu życia nie przynosi oczekiwanych

rezultatów lub równoległe ze zmianą stylu życia, gdy pomiary ciśnienia wskazują na II i III stopień nadciśnienia. [17]

W leczeniu nadciśnienia według wytycznych *Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego* stosuje się pięć grup leków z udowodnionym wpływem na rokowanie pacjenta:

- diuretyki tiazydowe
- β -adrenolityki
- antagoniści wapnia
- inhibitory konwertazy angiotensyny
- antagoniści receptorów angiotensynowych

Leki dobiera się indywidualnie biorąc po uwagę występujące czynniki ryzyka, choroby współistniejące oraz ogólny stan zdrowia pacjenta. W zależności od potrzeb terapia może składać się z jednego leku lub mieć charakter leczenia skojarzonego. [17] (RYCINA 2.1)



RYCINA 2.1

Schemat terapii złożonej w leczeniu nadciśnienia tętniczego, gdzie czarną linią ciągłą oznaczono połączenia preferowane, przerywaną - możliwe, natomiast czerwoną - przeciwwskazane [17].

2.4 Inhibitory konwertazy angiotensyny

Inhibitory konwertazy angiotensyny mają już trzy dekady długą historię stosowania w lecznictwie. Są lekami szeroko używanymi w terapii nadciśnienia, stabilnej, przewlekłej niewydolności serca, zawale serca i cukrzycowej nefropatii. [18, 19]

2.4.1 Historia powstania inhibitorów konwertazy angiotensyny

Synteza i odkrycie inhibitorów konwertazy angiotensyny są wpisane w historię eksperymentów naukowych zgłębiających pytania dotyczące nadciśnienia i związanego z nim

układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA). Wyniki tych badań układają się niczym części złożonej układanki, dając nam dziś wspaniały obraz fizjologii i patofizjologii układu renina-angiotensyna-aldosteron.

Odkrycie pierwszego leku hipotensyjnego z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny jest ściśle związane z badaniami nad bradykininą, substancjami z nią związanymi oraz z brazylijską żmiją *Bothrops Jararaca*.

Naukowiec Rocha e Silva prowadził badania nad właściwościami jadu żmii *Bothrops Jararaca*. Odkrył on, że podczas inkubowania osocza z tym jadem uwalniana jest nowa substancja obniżająca ciśnienie i działająca rozkurczowo na mięśnie gładkie. Substancję tę nazwano bradykininą. Bradykininę wkrótce zsyntezowano i okazało się, że ta naturalna pochodząca z jadu węża, działa silniej niż ta zsyntezowana. Za ten stan rzeczy odpowiadał BPF (*bradykinin potentiating factor*, czynnik potęgujący działanie bradykininy). BPF w 1965 roku został dokładnie opisany przez Sergio Ferreira, jako mieszanina małych peptydów potęgujących działanie bradykininy. Sergio Ferreira swoje badania przeprowadził, jako członek grupy badawczej Johna Vane'a, późniejszego laureata nagrody Nobla w dziedzinie badań nad prostaglandynami.

W dalszych badaniach okazało się, że dezaktywacja bradykininy i aktywacja angiotensyny zachodzi w taki sam sposób, przez usunięcie dwóch aminokwasów z karboksylowego końca substratu. Stanowiło to dowód na to, że ten sam enzym jest odpowiedzialny za przemianę bradykininy do postaci nieaktywnej oraz angiotensyny I do angiotensyny II. Natomiast czynnik potęgujący działanie bradykininy okazał się być jednocześnie czynnikiem hamującym działanie angiotensyny II. [20]

W taki właśnie sposób odkryto naturalne inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę, które pod względem budowy chemicznej były nona i undekapeptydami zawierającymi w swojej strukturze cykliczny aminokwas prolinę. Stały się one prototypami przy otrzymywaniu syntetycznych inhibitorów konwertazy angiotensyny.

W 1967 roku wcześniej wspomniany John Vane zaprezentował firmie Squibb, w której był konsultantem, swoją koncepcję istotności enzymu konwertującego angiotensynę oraz jego inhibitorów, jako głównych regulatorów ciśnienia tętniczego o potencjalnie dużym znaczeniu nie tylko fizjologicznym, ale także i medycznym. Tym samym zachęcił dział badań do zainteresowania się enzymem konwertującym angiotensynę i jego inhibitorami. Kiedy zaczęto badania nad utworzeniem doustnego inhibitora konwertazy angiotensyny układ RAA, którego częścią jest enzym konwertujący angiotensynę, był bardzo słabo poznany i dodatkowo nie był szeroko akceptowany przez środowisko medyczne, jako istotny czynnik regulujący ciśnienie tętnicze a enzym konwertujący angiotensynę był znaleziony tylko w płucach i był ciągle słabo scharakteryzowaną peptydazą. [21]

W 1970 roku pracownicy firmy Squibb: Miguel Ondetti – specjalista w dziedzinie syntezy peptydów i biochemik David Cushman wyizolowali i zsyntezowali nonapeptyd z mieszaniny BPF i nazwali go teprotydem. [21, 22]

Teprotyd charakteryzował się dużą aktywnością i stabilnością, natomiast jego wadą był brak działania po podaniu doustnym. Działanie hipotensyjne teprotydu było potwierdzone w badaniach klinicznych na ludziach i zwierzętach. Jednak iniekcje nie są preferowaną drogą podania w terapii nadciśnienia, dlatego zaistniała konieczność wynalezienia takiego związku, który byłby wchłaniany z przewodu pokarmowego. [23]

W 1972 roku, podczas badań klinicznych, które potwierdzały działanie hipotensyjne inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę, okazało się, że cząsteczka teprotydu jest za duża, aby przeniknąć barierę jelitową a ponadto jest trawiona przez enzymy przewodu pokarmowego. Do postępu przyczyniło się zauważenie przez Cushman'a podobieństwa pomiędzy dwoma enzymami: karboksypeptydazą A (enzymem trzustkowym, którego struktura przestrzenna była już poznana) a enzymem konwertującym angiotensynę. Badając właściwości enzymu konwertującego angiotensynę, przez analogię do karboksypeptydazy A został stworzony hipotetyczny model enzymu konwertującego angiotensynę – cynkowej metaloproteazy z centrum aktywnym podobnym do centrum aktywnego karboksypeptydazy A. [21, 24]

Powyższe przełomowe odkrycia pozwoliły zmodyfikować cząsteczkę teprotydu i zaprojektować cząsteczkę kaptoprilu. W 1975 roku zaprojektowany kaptopril zsyntezowano. Był to pierwszy inhibitor konwertazy angiotensyny wchłaniający się z przewodu pokarmowego. Rok później rozpoczęto badania kliniczne i w 1981 roku kaptopryl był wprowadzony do leczenia pod nazwą handlową Capoten. Początki stosowania kaptoprilu były ciężkie. Ze względu na stosowanie dużych dawek leku, występowało wiele działań niepożądanych. Pomimo trudności można śmiało stwierdzić, że wprowadzenie kaptoprilu do leczenia rozpoczęło nowe podejście w terapii nadciśnienia. [25, 26]

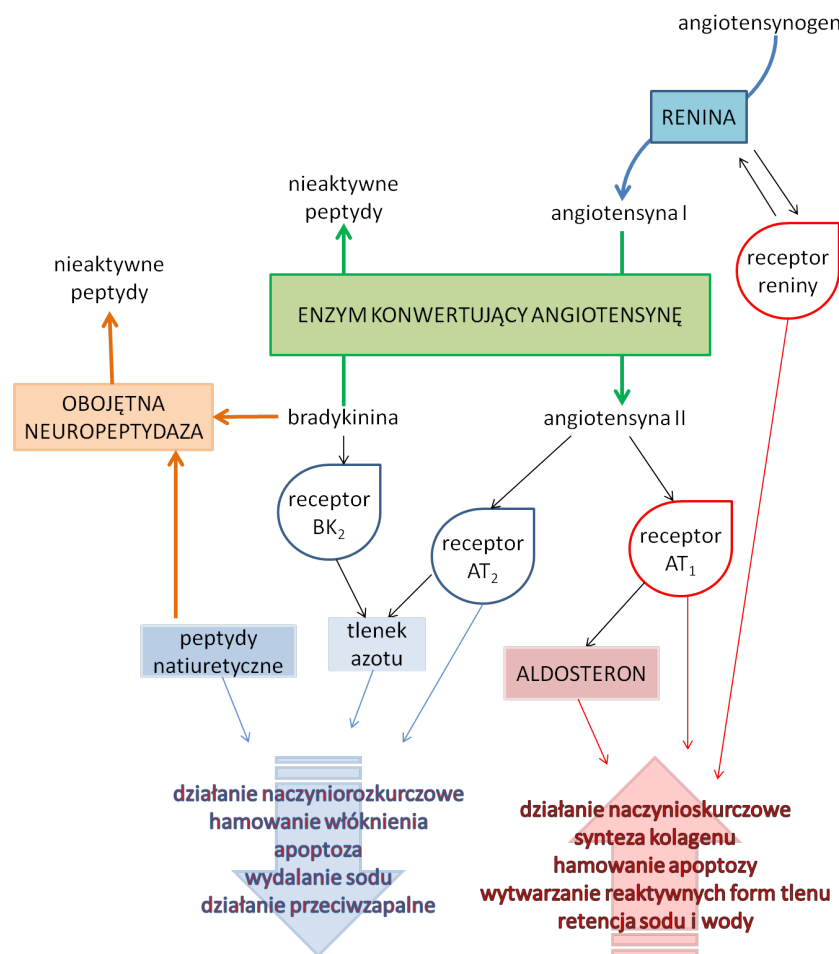
2.4.2 Układ renina-angiotensyna-aldosteron

Układ renina-angiotensyna-aldosteron jest ważnym układem enzymatyczno-hormonalnym regulującym ciśnienie krwi, zapewniającym równowagę wodno-elektrolitową i homeostazę płynów w organizmie człowieka. (RYCINA 2.2)

Renina jest wytwarzana głównie przez komórki aparatu przykłębuszkowego nerek znajdującego się w ścianie tętniczki doprowadzającej krew do kłębuszka nerkowego. Uwolniona do krwi inicjuje kaskadę układu RAA. Pod względem budowy chemicznej jest glikoproteiną, natomiast pod względem działania enzymem - proteazą asparaginową. Jej substratem jest angiotensynogen, z którego tworzy dekapeptyd - angiotensynę I. [18, 22, 27]

Angiotensyna I w ustroju przekształcana jest do oktapeptydu - angiotensyny II za pośrednictwem enzymu konwertującego angiotensynę. Enzym konwertujący angiotensynę jest niespecyficzną metalopeptydazą zawierającą w swej budowie jon cynku. Jej substratami jest wiele peptydów: wspomniana wcześniej angiotensyna I a także angiotensyna II i bradykinina.

Centra aktywne enzymu konwertującego angiotensynę są także celem działania leków, które stanowią inhibitory konwertazy angiotensyny. [28, 29]



RYCINA 2.2

Schemat układu renina-angiotensyna-aldosteron [15].

Angiotensyna II jest jednym z najsilniej działających naczynioskurczowo związków. Oddziałuje na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych, korę nadnerczy, nerki i mózg. Jest kluczowym regulatorem ciśnienia krwi i objętości płynów pozakomórkowych. Efekty jej działania są następujące [18, 30]:

- powoduje skurczenie tętniczek i wzmożoną sekrecję adrenaliny,
- stymuluje syntezę i wydzielanie aldosteronu z kory nadnerczy,
- pobudza pragnienie,

- hamuje sekrecję reniny,
- powoduje wzmożoną syntezę wazopresyny z centralnego układu nerwowego,
- inicjuje wzrost i podziały komórek mięśniowych serca i naczyń.

Angiotensyna II działa poprzez wiązanie ze specyficznymi dla niej receptorami AT₁ i AT₂. Aktywacja receptorów AT₁ odpowiada za powyżej opisane działanie angiotensyny II, natomiast pobudzenie AT₂ przypuszczalnie ogranicza niektóre z tych niekorzystnych efektów. [31]

Aldosteron jest hormonem steroidowym. Jedną z pełnionych przez niego funkcji jest działanie antynatiuretyczne spowodowane zwiększoną reabsorbcją jonów sodu z kanalika bliższego nerki. [18, 22]

2.4.3 Efekty farmakologiczne inhibitorów konwertazy angiotensyny

Typową odpowiedzią organizmu po podaniu inhibitorów konwertazy angiotensyny, która gwarantuje ich efekt farmakologiczny jest wzrost sekrecji reniny, aktywności reninowej osocza i poziomu angiotensyny I wraz z jednoczesną redukcją stężeń angiotensyny II i aldosteronu we krwi. Podczas długiej terapii, dzięki alternatywnej ścieżce aktywacji poprzez chymazy, obserwuje się powolny wzrost poziomów angiotensyny II i aldosteronu. Należy jednak pamiętać, że ten efekt kompensacyjny nie jest duży i nie znosi efektu hipotensyjnego terapii. [30, 32]

Inhibicja enzymu konwertującego angiotensynę powoduje także zahamowanie rozkładu bradykininy do nieaktywnych peptydów. Zwiększające się stężenie bradykininy we krwi korzystnie wpływa na system sercowo-naczyniowy i niestety przyczynia się także do występowania kaszlu u niektórych chorych.

Bradykinina poprzez uwalnianie tlenu azotu z endotelium naczyń działa naczyniorozkurczowo, dodatkowo przyczynia się do wzrostu reninowej aktywności osocza. [30]

Głównym efektem działania inhibitorów konwertazy angiotensyny jest rozkurcz naczyń, który prowadzi do obniżania wartości ciśnienia krwi, zmniejszenia się oporu w naczyniach obwodowych i zminimalizowania obciążenia lewej komory serca, powodującego zahamowanie procesu jej przerostu. [30]

Oprócz działania hipotensyjnego inhibitory konwertazy angiotensyny w organizmie człowieka spełniają szereg innych funkcji:

- przywracają prawidłową funkcję śródbłonna naczyń, dzięki:

- zahamowaniu wydzielania angiotensyny II, która w stężeniach fizjologicznych zwiększa produkcję nadtlenków, powoduje oksydację lipoprotein o niskiej gęstości, ułatwiając ich wnikanie do ścian naczyń, stymuluje powstawanie cytokin, które przyciągają monocyty, powoduje wydzielanie endoteliny o działaniu mitogennym i naczynioskurczowym
- obniżaniu stanu zapalnego poprzez zredukowaną sekrecję działających prozapalnie cytokin
- uwalnianiu tlenku azotu, który działa naczyniorozkurczowo, zapobiega wnikaniu monocytów do wnętrza naczyń, hamuje przyczepność i aktywację płytek krwi zapobiegając krzepnięciu
- hamują postęp miażdżycy, stabilizując płytkę miażdżycową, redukując powstawanie wolnych rodników i utlenionych form lipoprotein o niskiej gęstości
- działają przeciwzakrzepowo i fibrynolityczne poprzez hamowanie agregacji płytek krwi oraz pobudzanie sekrecji inhibitora aktywacji plazminogenu (PAI-1)
- zwiększają wrażliwość na baroreceptorów bodźce i zmniejszają aktywność nerwowego układu współczulnego
- poprawiają wrażliwość na insulinę i przyczyniają się do poprawy metabolizmu glukozy
- hamują proteinurię u pacjentów z współwystępującą cukrzycą, tym samym spowalniają progresję cukrzycowej nefropatii
- wpływają na poprawę profilu lipidowego krwi: triglicerydów, cholesterolu i lipoprotein o dużej gęstości
- zatrzymują proces remodelingu lewej komory serca po zawale tym samym nie dopuszczając do rozwoju niewydolności poprzez inhibicję aktywowanego przez zawał układu RAA w tkance serca

Wszystkie wyżej wymienione korzyści terapeutyczne są niezmiernie istotne w leczeniu nadciśnienia i niewydolności serca, szczególnie z towarzyszącymi mu chorobami współistniejącymi i powikłaniami. [29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38]

Inhibitory konwertazy angiotensyny charakteryzują się także działaniami niepożądanymi, do najczęstszych należą:

- hipotensja - spowodowana brakiem działania angiotensyny II, która może wystąpić po pierwszej dawce leku, szczególnie u pacjentów z dużą osoczną aktywnością reniny, [29]

- suchy, uporczywy kaszel - spowodowany gromadzeniem się w układzie oddechowym bradykininy i substancji P, powodujących uwrażliwienie nerwów czuciowych przewodu oddechowego, [39, 40]
- hiperkaliemia - mająca swój powód w spadku wydzielania aldosteronu, jest częsta u pacjentów z niewydolnością serca, u osób starszych, z uszkodzoną funkcją nerek i cukrzycą. [29]

2.4.4 Podział inhibitorów konwertazy angiotensyny

Inhibitory konwertazy angiotensyny ze względu na rodzaj ligandu łączącego z jodem cynku enzymu można podzielić na trzy kategorie [29, 31]:

- grupa sulfhydrylowa
 - kaptopril
- grupa karboksylowa
 - benazepril
 - chinapril
 - cilazapril
 - enalapril
 - lisinopril
 - perindopril
 - ramipril
 - spirapril
- grupa fosforylowa
 - fosinopril

Wśród wyżej wymienionych związków można wyróżnić:

- związki, stosowane w postaci aktywnej (kaptopril, lisinopril) oraz
- substancje podawane w postaci nieczynnych biologicznie pro-leków (cilazapril, enalapril), których aktywacja zachodzi w organizmie

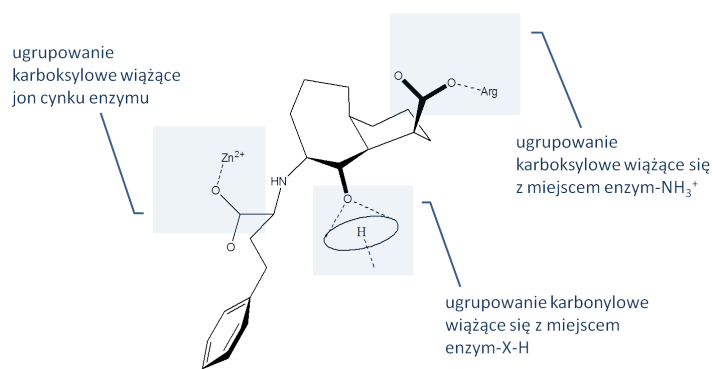
Powyższe podziały wykazują na różnorodność związków należących do tej grupy leków i choć wszystkie charakteryzują się takim samym mechanizmem działania, to powinowactwo do tkanek i właściwości farmakokinetyczne odbiegają od siebie. [29] Różnice te nie stanowią wady, lecz mogą być korzystnie wykorzystane przy wyborze optymalnego leku dla pacjenta. [18]

2.4.5 Cilazapril

Cilazapril jest związkiem, którego trwałość chemiczną oceniono w niniejszej pracy.

Należy on do grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny. Molekuła cilazaprilu została zaprojektowana przed syntezą, w procesie wnikliwego poznania trójwymiarowej budowy enzymu konwertującego angiotensynę pod kątem wymagań koniecznych do jego inhibicji. (RYCINA 2.3)

Siedmioczłonowy pierścień obecny w budowie cilazaprilu przyjmuje konformację przestrzenną, gwarantującą lepsze dopasowanie się do enzymu, zapewniając mu większą siłę działania w porównaniu z kaptoprilem czy enalaprilem. [41]



RYCINA 2.3

Schemat trójwymiarowego dopasowania się cilazaprilu do miejsc aktywnych enzymu konwertującego angiotensynę [41].

Cilazapril jest pro-lekiem dobrze wchłanianym z przewodu pokarmowego. Po wchłonięciu, w wątrobie ulega deestryfikacji do biologicznie czynnej postaci cilazaprilatu. Maksymalne stężenie cilazaprilu we krwi jest osiągane przez cilazapril dwie godziny po podaniu, natomiast przez cilazaprilat po trzech godzinach. Cilazapril nie łączy się z albuminami osocza, zamiast tego łączy się silnie z krążącym we krwi enzymem konwertującym angiotensynę. Lek ten działa przez całą dobę i z tego względu jest stosowany raz dziennie (okres półtrwania wynosi 9 - 10 godzin). Standardowa dawka cilazaprilu wynosi 1,25 - 5 mg a w niewydolności nerek 0,5 - 2,5 mg. Eliminowany z organizmu jest głównie przez nerki (80 %). [29, 42]

Na rynku farmaceutycznym dostępne są tabletki z cilazaprilem, stosowane w monoterapii oraz tabletki zawierające oprócz cilazaprilu hydrochlorotiazyd, które znalazły swoje zastosowanie w leczeniu skojarzonym nadciśnienia tętniczego.

3

Cel badań

Celem niniejszej pracy doktorskiej jest ocena i analiza trwałości chemicznej cilazaprilu w fazie stałej. Badanie trwałości substancji leczniczej jest procesem złożonym obejmującym szereg zagadnień.

Szczegółowe cele dotyczące poszczególnych problemów badawczych przedstawiono w odpowiednich ROZDZIAŁACH, według poniższego schematu:

1. Metoda analityczna do badań kinetycznych

.....ROZDZIAŁ 4, strona 21

2. Trwałość cilazaprilu w *substancji*

.....ROZDZIAŁ 5, strona 46

3. Trwałość cilazaprilu w obecności *substancji pomocniczych*

.....ROZDZIAŁ 6, strona 100

4. Trwałość cilazaprilu w *tabletkach* preparatów handlowych

.....ROZDZIAŁ 7, strona 126

5. Trwałość cilazaprilu w obecności *hydrochlorotiazydu*

.....ROZDZIAŁ 8, strona 157

6. Trwałość cilazaprilu w *zawieszinie pediatrycznej*

.....ROZDZIAŁ 9, strona 183

Wybór metody do badań trwałości cilazaprilu

4.1	Metoda analityczna do badań kinetycznych	17
4.2	Proces walidacji metody analitycznej	17
4.2.1	Selektywność	18
4.2.2	Liniowość	18
4.2.3	Wykrywalność i oznaczalność	18
4.2.4	Precyzja	19
4.2.5	Dokładność	19
4.3	Metody oznaczania cilazaprilu - przegląd piśmiennictwa	19
4.4	Szczegółowe cele dotyczące metody analitycznej do oceny trwałości cilazaprilu	21
4.5	Materiały i metody	22
4.5.1	Materiały	22
4.5.2	Metody analityczne	22
4.5.3	Dodatkowa aparatura i materiały	23
4.6	Obliczenia	23
4.7	Wybór metody analitycznej do oceny trwałości cilazaprilu	23
4.8	Metoda HPLC z detekcją UV	24
4.8.1	Optymalizacja metody HPLC	24
4.8.2	Walidacja metody HPLC	27
4.9	Metoda spektrofotometrii klasycznej i pochodnych widm	37
4.10	Podsumowanie	38

4.1 Metoda analityczna do badań kinetycznych

Pierwszym problemem badawczym, związanym z analizą trwałości jakiegokolwiek substancji, jest zagadnienie dotyczące wyboru metody analitycznej.

Metoda do badań kinetycznych substancji leczniczej lub leku powinna pozwolić na dokładne i precyzyjne oznaczenie substancji leczniczej w obecności produktów rozkładu a także substancji będących składnikami postaci farmaceutycznej. Dodatkowe atuty metody analitycznej stanowią korzystne cechy ekonomiczne, niska toksyczność używanych w jej przebiegu odczynników, krótki czas trwania analizy oraz powszechna dostępność aparatury. [43]

W niniejszej pracy przy wyborze metody analitycznej w pierwszym rzędzie kierowano się jej dostępnością. Z tego względu selekcja metody została dokonana z dwóch metod:

- wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV oraz
- spektrofotometrii klasycznej (A) i pochodnych widm (D_1 , D_2 , D_3).

Obie metody są szeroko stosowane w analizie farmaceutycznej i z tego względu są metodami z wyboru. [44]

4.2 Proces walidacji metody analitycznej

W celu ustalenia wiarygodności danych uzyskanych daną metodą analityczną przeprowadza się jej walidację. [45]

Walidacja jest procesem weryfikacyjnym obejmującym ocenę szeregu parametrów charakteryzujących metodę pod względem:

- selektywności,
- zakresu,
- liniowości,
- wykrywalności,
- oznaczalności,
- precyzji oraz
- dokładności. [3]

Spełnienie przez metodę wymogów walidacji jest dowodem na to, że uzyskane w przebiegu badań kinetycznych wyniki będą dokładne, precyzyjne i rzeczywiste. [46]

4.2.1 Selektywność

Selektywność jest cechą określającą czy dana metoda jednoznacznie oznaczy badaną substancję leczniczą w obecności innych składników. W przypadku oceny trwałości leku, tymi innymi składnikami, które mogą pojawiać się w próbie badanej są: produkty rozkładu, substancje pomocnicze i inne substancje biologicznie czynne. [3, 45, 46, 47]

Selektywność względem produktów rozkładu jest niezmiernie istotna w badaniach kinetycznych. Podczas rozkładu leku powstają produkty o budowie i właściwościach fizykochemicznych podobnych do związku macierzystego, co może przyczyniać się do niemożliwości osiągnięcia selektywności metody.

Z powyższych względów, w pracy selektywność została oceniona w dwojaki sposób: poprzez analizę mieszanin modelowych z cilazaprilem oraz w przebiegu pilotażowego badania kinetycznego ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

4.2.2 Liniowość

Liniowością metody analitycznej nazywamy zdolność do uzyskiwania w toku analizy takich wartości pomiarowych, które są proporcjonalne do stężenia lub ilości substancji w badanej próbce. [45, 46]

Krzywa kalibracyjna przedstawiająca zależność wskazań detektora, jako funkcji stężenia, opisuje liniowość metody. Charakteryzuje się ona równaniem regresji oraz parametrami prostej wyznaczonymi metodą najmniejszych kwadratów: a - współczynnikiem kierunkowym oraz r - współczynnikiem korelacji bliskim jedności. Wartość wyrazu wolnego - b - powinna być statystycznie równa zero. [47, 48]

4.2.3 Wykrywalność i oznaczalność

Granica wykrywalności (DL) jest to najmniejsze stężenie substancji badanej w próbce, które może być wykryte dana metodą. Oblicza się ją z wykorzystaniem krzywej kalibracyjnej:

$$DL = 3,3 \cdot \frac{s_y}{a} \quad (4.1)$$

gdzie s_y to odchylenie standardowe, natomiast a to współczynnik kierunkowy krzywej wzorcowej. [3, 47]

Granice oznaczalności (QL) określa się jako najmniejsze stężenie analitu w próbce, które można oznaczyć ilościowo. Wyznacza się ją według wzoru [3, 47]:

$$QL = 10 \cdot \frac{s_y}{a} \quad (4.2)$$

4.2.4 Precyzja

Precyzja jest parametrem określającym zgodność pomiędzy wynikami uzyskanymi podczas wielokrotnie powtarzanej analizy tej samej próbki. [45, 46, 47]

Miarą precyzji jest odchylenie standardowe pojedynczego wyniku S oraz współczynnik zmienności W_z . [47]

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (4.3)$$

$$W_z = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (4.4)$$

gdzie x_i opisuje pojedynczy wynik, \bar{x} to średnia ze wszystkich uzyskanych w badaniu wyników, natomiast n to liczba prób.

Metodę można uznać za precyzyjną, gdy wartość wyznaczonego współczynnika zmienności jest niższa niż 2 %. [44, 47]

4.2.5 Dokładność

Dokładność jest cechą wskazującą, że wyniki otrzymane za pomocą danej metody są zgodne lub bliskie wartości rzeczywistej. [3, 45, 46, 47]

Parametrem określającym dokładność jest procent odzysku analitu w odniesieniu do wartości przyjętej za rzeczywistą.

$$\text{Odzysk} = \frac{\text{zawartość oznaczona} \cdot 100\%}{\text{zawartość rzeczywista}} \quad (4.5)$$

Kryterium akceptacji danej metody jako dokładnej stanowi odzysk 98 - 102 %. [44]

4.3 Metody oznaczania cilazaprilu - przegląd piśmiennictwa

Rozważania dotyczące wyboru metody analitycznej do oceny trwałości cilazaprilu rozpoczęto od przeglądu publikacji dotyczących analizy cilazaprilu, które ukazały się w międzynarodowych czasopismach naukowych.

Wynikiem jest przedstawione poniżej zestawienie szeregu metod, którymi oznaczano cilazapril:

- w płynach biologicznych
 - enzymatyczna metoda immunologiczna [49]
 - chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas z dodatnią jonizacją [50]
 - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją amperometryczną [51]
 - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fotometryczną [52]
 - kapilarna elektroforeza strefowa [53]
 - gradientowa wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych fazach [54]
- w postaciach farmaceutycznych i *substancji*
 - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją amperometryczną [51]
 - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fotometryczną [52, 55]
 - kapilarna elektroforeza strefowa [53]
 - woltamperometria [56, 57]
- w obecności hydrochlorotiazydu
 - spektrofotometria [58, 59, 60]
 - kapilarna elektroforeza [61]
- w mieszaninach z innymi inhibitorami konwertazy angiotensyny
 - wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa sprzężona z densytometrią [62]
 - woltameteria zmiennoprądowa prostokątna [63]
 - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fotometryczną [64]
 - kapilarna elektroforeza [65, 66]

Jak wynika z przeglądu literatury, jak dotąd nie opracowano metody do badań trwałości cilazaprilu.

4.4 Szczegółowe cele dotyczące metody analitycznej do oceny trwałości cilazaprilu

Do szczegółowych celów badań dotyczących wyboru metody analitycznej do badań kinetycznych cilazaprilu w fazie stałej zaliczono:

Wybór metody analitycznej przydatnej do badania trwałości cilazaprilu:

- metoda HPLC z detekcją UV
- metoda spektrofotometryczna.

Optymalizacja warunków wybranej metody.

Walidacja wybranej metody obejmująca:

- selektywność,
- liniowość i zakres pomiaru,
- granicę detekcji i oznaczalności,
- precyzję oraz
- dokładność.

4.5 Materiały i metody

4.5.1 Materiały

- cilazapril jednowodny (numer serii: 1621816, Biofarm)
- diwodorofosforan potasu (POCh)
- kwas orto-fosforowy 95 % (POCh)
- acetonitryl HPLC grade (Merck)
- metanol cz.d.a. (POCh)
- woda destylowana
- wzorce wewnętrzne:
 - benzokaina (Hoechst AG)
 - chlorowoderek oksymetazoliny (Sigma-Aldrich)

4.5.2 Metody analityczne

Metoda HPLC

System chromatograficzny złożony był z:

- pompy chromatograficznej Shimadzu LC-6A
- detektora spektrofotometrycznego Shimadzu SPD-6AV UV-VIS
- reodyny 7725 z pętlą dozującą o objętości 20 μ l
- integratora pików Shimadzu C-R6A Chromatopac
- kolumn chromatograficznych (Merck)
 - LiChroCART[®] 250-4 HPLC-Cradridge, LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m)
 - LiChroCART[®] 250-4 HPLC-Cradridge, LiChrospher[®] 100 RP-8 (10 μ m)

Metoda spektrofotometryczna

Została przeprowadzona z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS, Lambda 20, firmy Perkin Elmer. Charakteryzowała się następującymi parametrami pracy:

- szerokość spektralna wiązki promieniowania wychodzącego z monochromatora - 1,0 nm,

- szybkość wykonywania widma - 240 nm/min,
- przyrost długości fali - 1,0 nm.

Widma spektrofotometryczne były rejestrowane w zakresie 200 nm do 300 nm w warstwie 1 cm i stanowiły zależności absorbancji (A), pierwszej (D1), drugiej (D2) oraz trzeciej (D3) pochodnej jako funkcji długości fali.

4.5.3 Dodatkowa aparatura i materiały

- komory cieplne KBC-125W (WAMED)
- płuczka ultradźwiękowa
- waga analityczna Satorius Extend ED 124S (Satorius)
- pHmetr Toledo MP225 (Mettler)
- sączonek szklany ze szkła spiekanego o średnicy porów 0,45 μm (Millipore)
- sączki ilościowe twarde 390 (Munktell)
- laboratoryjny sprzęt szklany

4.6 Obliczenia

Obliczenia oraz analiza statystyczna zostały dokonane w programie Excel, Gnumeric oraz Statistica.

4.7 Wybór metody analitycznej do oceny trwałości cilazaprilu

Wybór i opracowanie metody analitycznej stanowią pierwszy problem badawczy poprzedzający właściwe studiowanie trwałości leku. Podłoże teoretyczne stanowił przegląd piśmiennictwa światowego. Podsumowując go można stwierdzić, że mimo iż istnieją doniesienia przedstawiające analizę cilazaprilu, żadne z nich nie prezentuje metody wykorzystywanej do badań kinetycznych.

4.8 Metoda HPLC z detekcją UV

4.8.1 Optymalizacja metody HPLC

Procedury

Przygotowanie faz ruchomych podczas procesu optymalizacji metody

Fazy ruchome zostały przygotowane poprzez zmieszanie acetonitrylu, buforu fosforanowego (0,001 mol/l, pH = 2,0) i/lub metanolu w odpowiednich proporcjach przedstawionych w TABELI 4.1, przesączenie przez sącdek ze szkła spiekanego o średnicy porów 0,45 μm i 15 minutowe odgazowanie w płuczce ultradźwiękowej.

Przygotowanie wybranej fazy ruchomej do badań kinetycznych

Faza ruchoma została przygotowana poprzez zmieszanie acetonitrylu, buforu fosforanowego (0,001 mol/l, pH = 2,0) i metanolu (60 : 30 : 10 v/v/v), przesączeniu przez sącdek ze szkła spiekanego o średnicy porów 0,45 μm i 15 minutowym odgazowaniu w płuczce ultradźwiękowej.

Przygotowanie buforu fosforanowego o pH = 2,0 (0,001 mol/l)

Na wadze analitycznej odważono dokładnie 0,0681 g diwodorofosforanu potasu i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 500 ml, dodano 400 ml wody destylowanej, wytrząsano do rozpuszczenia, następnie doprowadzono 85 % kwasem orto-fosforowym do pH = 2,0 i uzupełniono wodą do objętości 500,0 ml.

Przygotowanie próbek do analizy HPLC

Badaną próbkę cilazaprilu (0,0100 g) przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 25 ml, następnie rozpuszczano i uzupełniano metanolem do objętości 25,0 ml.

Do 1,0 ml roztworu badanego dodano 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego i poddawano analizie HPLC.

W pracy wykorzystano dwa wzorce wewnętrzne metanolowy roztwór benzokainy o stężeniu 0,02 % lub metanolowy roztwór chlorowodorku oksymetazoliny o stężeniu 0,02 % w zależności od czasów retencji substancji obserwowanych na chromatogramach według TABELI 4.3.

Omówienie optymalizacji

Opierając się na przeglądzie piśmiennictwa, postanowiono dokonać próby przystosowania do badań trwałości cilazaprilu metodę HPLC z detekcją UV, która z powodzeniem była wykorzystywana w badaniach stabilności enalaprilu. [67]

TABELA 4.1
Optymalizacja parametrów metody HPLC

Kolumna	Faza ruchoma (v/v/v)			Przepływ [ml/min]	Detekcja [nm]	Wynik
	acetonitryl	metanol	bufor fosforanowy			
RP-8	50	-	50	1,0	218	Odrzucono
	<i>Opis:</i> szerokie i niskie piki, czas analizy: około 14 minut					
	60	-	40	1,0	212	Odrzucono
	<i>Opis:</i> szerokie piki, czas analizy: około 11 minut					
	60	-	40	1,2	212	Odrzucono
	<i>Opis:</i> wysokie ciśnienie, czas analizy: około 10 minut					
50	20	30	1,0	212	Odrzucono	
<i>Opis:</i> szerokie piki, czas analizy: około 14 minut						
RP-18	50	20	30	1,2	212	Odrzucono
	<i>Opis:</i> szerokie piki, wysokie ciśnienie, czas analizy: około 11 minut					
	60	10	30	1,0	212	Odrzucono
	<i>Opis:</i> szerokie piki, czas analizy: około 13 minut					
	50	20	30	1,0	212	Odrzucono
	<i>Opis:</i> wąskie i wysokie piki, czas analizy: około 13 minut					
60	10	30	1,2	212	Odrzucono	
<i>Opis:</i> wąskie i wysokie piki, wysokie ciśnienie, czas analizy: około 8 minut						
	60	10	30	1,0	212	Zaakceptowano
<i>Opis:</i> wąskie i wysokie piki, czas analizy: około 9 minut						

Ze względu na fakt, że enalapril charakteryzuje się zbliżoną do cilazaprilu budową chemiczną [68] i właściwościami (wartości pKa grup karboksylowych wynoszą odpowiednio 2.97 dla enalaprilu [69] i 2.35 dla cilazaprilu [70]) założono, że poprzez podobieństwo, z zastosowaniem parametrów metody:

- kolumna - RP-8
- faza ruchoma: acetonitryl - bufor fosforanowy (pH = 2,0, 0,001 mol/l) (50 : 50 v/v)

cilazapril także będzie prezentował rozdział chromatograficzny, który będzie stanowił podstawę do dalszej optymalizacji.

Cilazapril i jego produkt degradacji w warunkach opisanych powyżej były wymywane z kolumny osobno w czasie krótszym niż 15 minut, jednakże kształty pików na chromatogramie (ostrość i symetria) nie były satysfakcjonujące.

TABELA 4.1 przedstawia cały proces optymalizacji metody HPLC.

W celu uzyskania zadowalających wyników przetestowane zostały dwa rodzaje kolumn chromatograficznych, różne składy fazy ruchomej, analityczne długości fali i szybkości przepływu fazy ruchomej.

Pomysł na dodatek metanolu do fazy ruchomej składającej się z acetonitrylu i buforu fosforanowego i użycie kolumny RP-18 został zapożyczony z metody HPLC do oznaczania cilazaprilu i cilazaprilatu w moczu [52], w której to została użyta kolumna RP-18 a fazę ruchomą stanowił metanol i 0,001 mol/l kwas fosforowy (50:50, v/v).

Zarówno metanol dodany do fazy ruchomej, jak i użycie kolumny RP-18 nie wpłynęło na czasy retencji, jednak zmieniło wygląd i kształt chromatogramu. Piki cilazaprilu i produktu rozkładu były węższe, wyższe, bardziej ostre i symetryczne.

Efekt końcowy procesu optymalizacji stanowią parametry metody HPLC dające satysfakcjonujący rozdział chromatograficzny cilazaprilu i jego produktu rozkładu zarówno w *substancji*, jak i postaciach farmaceutycznych:

- faza stacjonarna
 - kolumna LiChroCART[®] 250-4 HPLC-Cradridge, LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m)
- faza ruchoma
 - acetonitryl-metanol-bufor fosforanowy (60 : 10 : 30 v/v/v)
- temperatura pomiaru
 - otaczająca
- szybkość przepływu fazy ruchomej
 - 1,0 ml/minutę
- analityczna długość fali
 - 212 nm

4.8.2 Walidacja metody HPLC

Selektywność metody

Procedury

Ocenę selektywności dokonano w próbkach, które przygotowano według procedur zamieszczonych w poszczególnych ROZDZIAŁACH przedstawionych w TABELI 4.2.

TABELA 4.2
Procedury dotyczące oceny selektywności metody HPLC

Przedmiot badania*	ROZDZIAŁ	STRONA
cilazapril: <i>w substancji</i>	5.8	48
w obecności substancji pomocniczych w postaci leku A i B	6.5	101
w obecności hydrochlorotiazydu w zawieszynie	8.7	158
	9.6	184

Analiza selektywności została uzupełniona o wyniki pilotażowego badania kinetycznego ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$, $t = 70 \text{ h}$, $n = 9$).

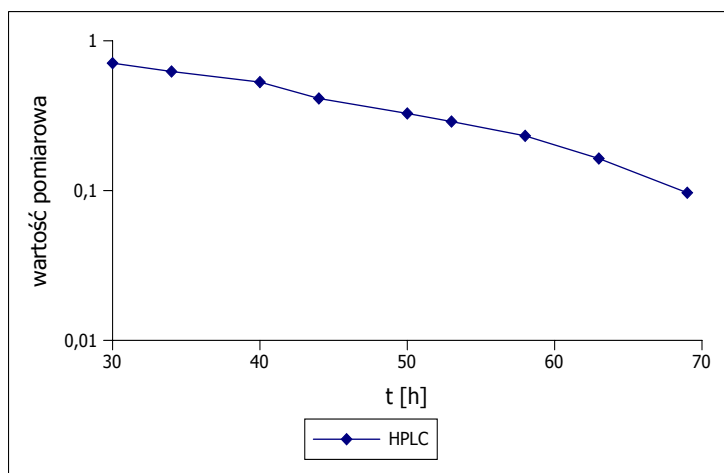
Wynik

Metoda HPLC z detekcją UV jest selektywna względem cilazaprilu, jego produktów rozkładu, substancji pomocniczych stosowanych w postaci leku (tabletki i zawiesina) oraz hydrochlorotiazydu. Bezpośredni dowód stanowią chromatogramy (TABELA 4.3) oraz obserwowane podczas testu pilotażowego zmiany sygnału analitycznego wskazujące na rozkład substancji badanej. (RYCINA 4.1)

TABELA 4.3

Selektywność metody HPLC, gdzie PRODUKT 1 to główny produkt rozkładu cilazaprilu, PRODUKT 1' to produkt poboczny, HCTZ to hydrochlorotiazyd, natomiast IS to wzorce wewnętrzne, odpowiednio BEN - benzokaina i OXY - chlorowodorek oksymetazoliny

	CILAZAPRIL	PRODUKT 1	PRODUKT 1'	HCTZ	BEN (IS)	OXY (IS)	RYCINA (STRONA)
czas retencji [min]	8,9	3,1	7,8	2,3	2,8	12,6	
cilazapril:							
<i>w substancji</i>							
(RH > 0 %)	•	•			•		5.2(51)
(RH = 0 %)	•	•	•			•	5.2(51)
z hypromelożą							
	•	•			•		6.5(103)
z laktozą							
	•	•			•		6.5(103)
ze skrobią							
	•	•			•		6.5(103)
z talkiem							
	•	•			•		6.5(103)
w tabletkach							
	•	•			•		7.3(129)
z HCTZ							
	•	•		•		•	8.3(160)
w zawieszynie							
	•	•			•		9.1(187)



RYCINA 4.1

Selektywność metody HPLC - pilotażowe badanie kinetyczne.

Liniowość, zakres metody, wykrywalność, oznaczalność

Procedury

Liniowość metody HPLC wyznaczono w zakresie stężeń cilazaprilu 0,001 - 0,048 %. Metanolowe roztwory cilazaprilu o stężeniach 0,001, 0,002, 0,004, 0,008, 0,012, 0,016, 0,020, 0,024, 0,028, 0,032, 0,036, 0,040 oraz 0,048 % przygotowano metodą seryjnych rozcieńczeń.

Przygotowano próby: 1,0 ml roztworu cilazaprilu o określonym stężeniu mieszano z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego i poddawano je analizie HPLC.

Krzywe kalibracyjne wyznaczono z wykorzystaniem dwóch wzorców: metanolowego roztworu benzokainy o stężeniu 0,02 % oraz metanolowego roztworu chlorowodoru oksy-metazoliny o stężeniu 0,02 %.

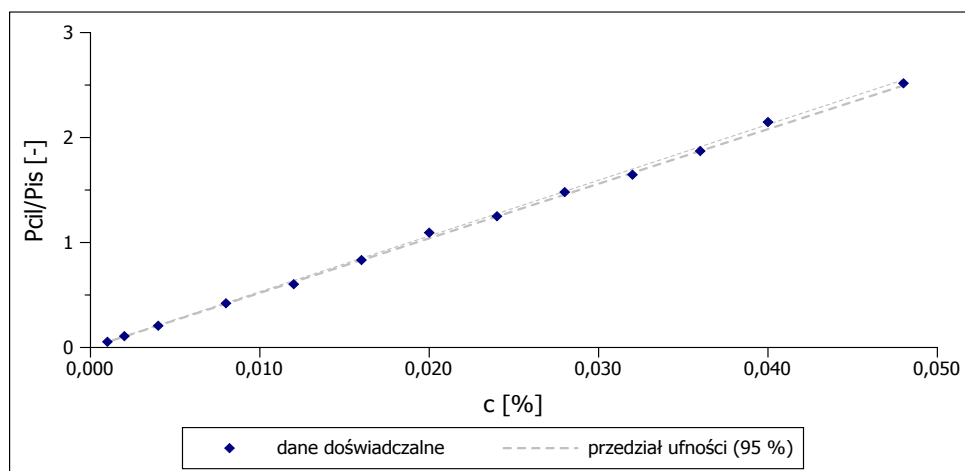
Wynik

Liniowość metody została oceniona przez sporządzenie wykresów zależności sygnału otrzymanego z aparatu, za który przyjęto P_{cil}/P_{IS} jako funkcji stężenia cilazaprilu oraz następującą analizę regresji. P_{cil} to pole powierzchni pod pikiem będącym sygnałem pochodzącym od cilazaprilu, natomiast P_{IS} odpowiednio od wzorca wewnętrznego.

W niniejszej pracy do analizy użyto dwóch wzorców wewnętrznych, stąd też liniowość została oceniona dwukrotnie z użyciem każdego z nich. (RYCINY 4.2, 4.3 i TABELE 4.4, 4.5)

Zakres metody został ustalony w granicach stężeń 0,001 - 0,048 %.

Wzorzec wewnętrzny - benzokaina



RYCINA 4.2

Diagram korelacyjny przedstawiający liniowość metody HPLC ($y = a \cdot x$) z wykorzystaniem benzokainy, jako wzorca wewnętrznego z zaznaczonym 95 % przedziałem ufności współczynnika kierunkowego prostej.

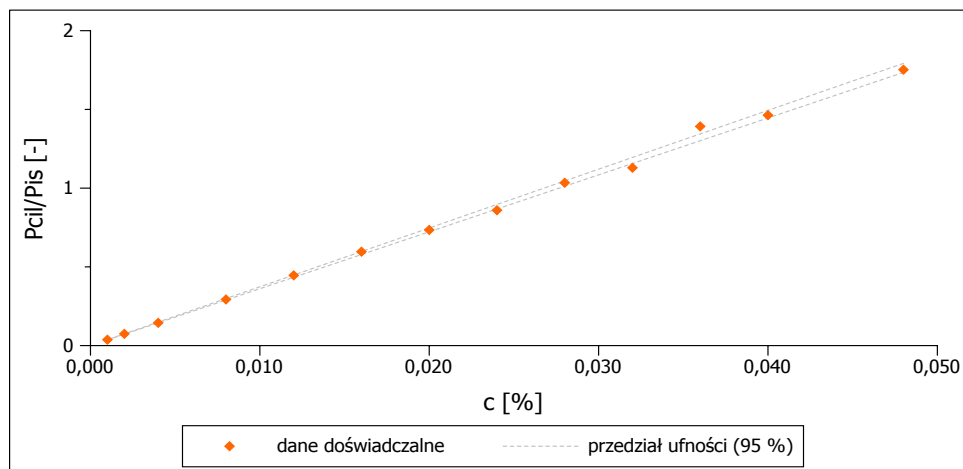
TABELA 4.4

Tabela korelacyjna przedstawiająca dane doświadczalne i wyznaczone metodą najmniejszych kwadratów parametry prostej wraz z analizą statystyczną z wykorzystaniem benzokainy, jako wzorca wewnętrznego

n	c [%]	P _{cil} /P _{IS} [-]	Parametry prostej		
				$y = a \cdot x + b$	$y = a \cdot x$
1	0,001	0,0542	a	52,6395	52,5572
2	0,002	0,1078	Δa	1,0186	0,9753
3	0,004	0,2071	S_a	0,4628	0,4431
4	0,008	0,4210	b	-0,0026*	
5	0,012	0,6029	Δb	0,0260	
6	0,016	0,8328	S_b	0,0118	
7	0,020	1,0937	S_y	0,0246	0,0235
8	0,024	1,2501	r	0,9996	0,9996
9	0,028	1,4803	*Analiza statystyczna wykazała, że współczynnik kierunkowy b		
10	0,032	1,6460	statystycznie nie różni się od zera		
11	0,036	1,8715	TEST t-Student'a		
12	0,040	2,1477	$(t = 0,2177) < (t_{\alpha; df=n-1} = 2,2010)$		
13	0,048	2,5167			

Wyznaczone z krzywej kalibracyjnej granice wykrywalności i oznaczalności wynosiły odpowiednio 0,0015 % oraz 0,0045 %.

Wzorzec wewnętrzny - chlorowodorek oksymetazoliny



RYCINA 4.3

Diagram korelacyjny przedstawiający liniowość metody HPLC ($y = a \cdot x$) z wykorzystaniem chlorowodoru oksymetazoliny, jako wzorca wewnętrznego z zaznaczonym 95 % przedziałem ufności współczynnika kierunkowego prostej.

TABELA 4.5

Tabela korelacyjna przedstawiająca dane doświadczone i wyznaczone metodą najmniejszych kwadratów parametry prostej wraz z analizą statystyczną z wykorzystaniem chlorowodoru oksymetazoliny, jako wzorca wewnętrznego

n	c [%]	Pcil/PIS [-]	Parametry prostej		
			$y = a \cdot x + b$	$y = a \cdot x$	
1	0,001	0,0373	a	36,7443	36,7427
2	0,002	0,0746	Δa	1,1016	1,0547
3	0,004	0,1445	S_a	0,5005	0,4792
4	0,008	0,2930	b	-0,000050*	
5	0,012	0,4461	Δb	0,0281	
6	0,016	0,5964	S_b	0,0128	
7	0,020	0,7344	S_y	0,0266	0,0254
8	0,024	0,8596	r	0,9990	0,9990
9	0,028	1,0341	*Analiza statystyczna wykazała, że współczynnik kierunkowy b statystycznie nie różni się od zera TEST t-Student'a ($ t = 0,0039 < (t_{\alpha, df=n-1} = 2,2010)$)		
10	0,032	1,1293			
11	0,036	1,3921			
12	0,040	1,4634			
13	0,048	1,7522			

Wyznaczone z krzywej kalibracyjnej granice wykrywalności i oznaczalności wynosiły odpowiednio 0,0023 % oraz 0,0069 %.

Metoda HPLC jest liniowa o czym świadczy wysoki współczynnik korelacji, dodatkowo jego dodatnia wartość wskazuje na korelację dodatnią - wraz ze wzrostem stężenia analitu wzrastają wartości sygnału metody.

Precyzja

Procedury

Precyzja metody została wyznaczona na trzech poziomach stężeń cilazaprilu niskim (0,010 %), średnim (0,020 %) oraz wysokim (0,040 %). Roztwory charakteryzujące się odpowiednią zawartością cilazaprilu przygotowano przez rozpuszczenie odpowiednich ilości cilazaprilu w metanolu.

Przygotowano dziesięć prób: 1,0 ml roztworu cilazaprilu o określonym stężeniu zmieszany z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego i każdą z nich poddawano trzykrotnie analizie HPLC.

Wynik

Precyzja metody została wyznaczona na trzech poziomach stężeń cilazaprilu. (TABELA 4.6, 4.7, 4.8)

Oznaczone metodą HPLC stężenia obliczono zgodnie ze wzorem:

$$c [\%] = \frac{\frac{P_{BADcil}}{P_{IS}}}{\frac{P_{WZcil}}{P_{IS}}} \cdot c_{WZ} \quad (4.6)$$

gdzie P [-] to pola powierzchni pod pikami chromatogramu odpowiednio dla cilazaprilu badanego (BAD), wzorcowego (WZ) oraz wzorca wewnętrznego (IS), natomiast c_{WZ} [%] to stężenie wzorcowe analitu.

TABELA 4.6
Precyzja metody - poziom niski

n	P_{cil}/P_{IS} [-] wzorzec	P_{cil}/P_{IS} [-] badany*	c [%]
1	2,0909	0,5277	0,0101
2	2,0988	0,5266	0,0101
3	2,0921	0,5206	0,0099
4		0,5252	0,0100
5		0,5198	0,0099
6		0,5318	0,0102
7		0,5239	0,0100
8		0,5155	0,0098
9		0,5253	0,0100
10	$\frac{P_{WZcil}}{P_{IS}} = 2,0939$	0,5302	0,0101
<i>Średnia</i>		0,0100	
<i>S</i>		0,000094	
<i>W_z</i> [%]		0,9425	

*średnia z trzech pomiarów

TABELA 4.7
Precyzja metody - poziom średni

n	P_{cil}/P_{IS} [-] wzorzec	P_{cil}/P_{IS} [-] badany*	c [%]
1	2,0919	1,0405	0,0199
2	2,0803	1,0225	0,0196
3	2,0984	1,0270	0,0197
4		1,0345	0,0198
5		1,0516	0,0201
6		1,0482	0,0201
7		1,0427	0,0200
8		1,0243	0,0196
9		1,0330	0,0198
10	$\frac{P_{WZcil}}{P_{IS}} = 2,0902$	1,0345	0,0198

OCENA PRECYZJI		
<i>Średnia</i>		0,0198
<i>S</i>		0,00019
<i>W_z</i> [%]		0,9503

*średnia z trzech pomiarów

TABELA 4.8
Precyzja metody - poziom wysoki

n	P_{cil}/P_{IS} [-] wzorzec	P_{cil}/P_{IS} [-] badany*	c [%]
1	1,9472	1,9697	0,0405
2	1,9435	1,9146	0,0394
3	1,9441	1,9505	0,0401
4		1,9320	0,0397
5		1,9317	0,0397
6		1,9215	0,0395
7		1,8986	0,0390
8		1,9492	0,0401
9		1,9378	0,0399
10	$\frac{P_{WZcil}}{P_{IS}} = 1,9449$	1,9442	0,0400

OCENA PRECYZJI		
<i>Średnia</i>		0,0398
<i>S</i>		0,00042
<i>W_z</i> [%]		1,0456

*średnia z trzech pomiarów

Metoda jest precyzyjna, na co wskazują wartości współczynników zmienności $< 2\%$.

Dokładność

Procedury

Dokładność metody oceniono za pomocą odzysku cilazaprilu z mieszanin modelowych złożonych z tabletek zawierających cilazapril (lek A) dodatkowo obciążonych znaną ilością cilazaprilu *w substancji* (50, 100 i 150 %).

W celu przygotowania mieszanin modelowych odważono dokładnie na wadze analitycznej i przeniesiono ilościowo do trzech moździerzy porcelanowych:

- mieszanina M1 - sześć tabletek o masie 1,2285 g oraz 0,0156 g cilazaprilu
- mieszanina M2 - sześć tabletek o masie 1,2123 g oraz 0,0300 g cilazaprilu
- mieszanina M3 - sześć tabletek o masie 1,2129 g oraz 0,0456 g cilazaprilu.

Substancje w każdym moździerzu rozdrabniano i rozcierano przez 30 minut za pomocą pistla do uzyskania homogenicznych mieszanin fizycznych.

Z każdej mieszaniny przygotowano 10 odważek o masie 0,1000 g. Odważki przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych o pojemności 25 ml, następnie do każdej dodano z biurety 10,0 ml metanolu i wytrząsano przez 20 minut. Przezroczyste roztwory uzyskano po przesączeniu przez twardy sączek ilościowy 390 (Munktell).

Przygotowanie prób do analizy polegało na zmieszaniu 1,0 ml roztworu cilazaprilu z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego. Każdą próbę poddawano trzykrotnie analizie HPLC.

Wynik

W niniejszej pracy z powodu braku wzorców dokładność oceniono za pomocą mieszanin modelowych, w których próbki badane, jakie stanowią tabletki, obciążono znaną ilością cilazaprilu.

Z wyników oznaczeń zawartość cilazaprilu w kolejnych mieszaninach M1, M2, M3 obliczono według wzoru:

$$x[g] = \frac{\frac{P_{BADcil}}{P_{IS}}}{\frac{P_{WZcil}}{P_{IS}}} \cdot c_{WZ} \cdot \frac{V}{100} \cdot \frac{M}{m} \quad (4.7)$$

gdzie P [-] to pola powierzchni pod pikami chromatogramu odpowiednio dla cilazaprilu badanego (BAD), wzorcowego (WZ) oraz wzorca wewnętrznego (IS), c_{WZ} [%] to stężenie wzorcowe analitu, V [-] odpowiada współczynnikowi rozcieńczeń, M to masa całej mieszaniny modelowej [g], natomiast m opisuje masę odważki [g].

Wszystkich obliczeń dokonano na podstawie danych eksperymentalnych oraz charakterystyki mieszanin modelowych (TABELA 4.9). Uzyskane wartości odzysku są wysokie (TABELA 4.10, 4.11, 4.12) i spełniają kryteria akceptacji.

TABELA 4.9

Charakterystyka mieszanin modelowych i parametrów dotyczących dokładności

<i>mieszanina</i>	masa			rzeczywista zawartość cilazaprilu* [g]
	tabletek [g]	cilazaprilu [g]	mieszaniny [g]	
M1	1,2285	0,0156	1,2441	0,0450
M2	1,2123	0,0300	1,2423	0,0594
M3	1,2129	0,0456	1,2585	0,0750
*zawartość cilazaprilu w tabletkce	0,0049 [g]			
c_{WZ}	0,04 [%]			
V	10 [-]			
m	0,1000 [g]			

*zawartość cilazaprilu w tabletkce leku A oznaczona metodą HPLC (TABELA 4.13)

TABELA 4.10

Dokładność - mieszanina M1

n	P_{cil}/P_{IS} [-] wzorzec*	P_{cil}/P_{IS} [-] badany*	x [g]	odzysk [%]
1	2,0505	1,8011	0,0146	97,1349
2		1,8276	0,0148	98,5636
3		1,8261	0,0148	98,4858
4		1,7994	0,0146	97,0449
5		1,8270	0,0148	98,5307
6		1,7841	0,0144	96,2186
7		1,8254	0,0148	98,4458
8		1,8051	0,0146	97,3538
9		1,8321	0,0148	98,8091
10		1,8592	0,0150	100,2694
OCENA ODZYSKU				
<i>Średnia</i>			98,0857	
S			1,1555	
W_z [%]			1,1781	

*średnia z trzech pomiarów

TABELA 4.11
Dokładność - mieszanina M2

n	P_{cil}/P_{IS} [-] wzorzec*	P_{cil}/P_{IS} [-] badany*	x [g]	odzysk [%]
1		2,4398	0,0195	98,3382
2		2,4017	0,0192	96,8043
3		2,4612	0,0196	99,2027
4		2,4524	0,0196	98,8476
5	2,0755	2,4499	0,0196	98,7462
6		2,4409	0,0195	98,3826
7		2,4326	0,0194	98,0482
8		2,4424	0,0195	98,4454
9		2,4280	0,0194	97,8660
10		2,4864	0,0198	100,2166
OCENA ODZYSKU				
	<i>Średnia</i>	98,4898		
	<i>S</i>	0,8910		
	W_z [%]	0,9047		

*Średnia z trzech pomiarów

TABELA 4.12
Dokładność - mieszanina M3

n	P_{cil}/P_{IS} [-] wzorzec*	P_{cil}/P_{IS} [-] badany*	x [g]	odzysk [%]
1		3,0912	0,0250	99,9666
2		3,0963	0,0250	100,1321
3		3,0388	0,0246	98,2727
4		3,0750	0,0249	99,4438
5	2,0755	3,1010	0,0251	100,2820
6		3,0912	0,0250	99,9658
7		3,0802	0,0249	99,6108
8		3,0989	0,0251	100,2163
9		3,0782	0,0249	99,5466
10		3,0605	0,0247	98,9734
OCENA ODZYSKU				
	<i>Średnia</i>	99,6410		
	<i>S</i>	0,6290		
	W_z [%]	0,6313		

*Średnia z trzech pomiarów

Zawartość cilażaprilu w tabletkach leku A

Średnia masa tabletki na podstawie 20 wyników wynosi $0,2049 \pm 0,0027$ g (*średnia* \pm *S*).

TABELA 4.13
Zawartość cilażaprilu w tabletkach mierzona metodą HPLC

<i>n</i>	Masa tabletkowa [g]	P_{cil}/P_{IS} [-] wzorzec*	P_{cil}/P_{IS} [-] badany*	Zawartość [g]
1	0,1017		1,2745	0,0048
2	0,0998		1,2696	0,0049
3	0,0995		1,2460	0,0048
4	0,1005		1,3117	0,0050
5	0,1003	2,1477	1,2821	0,0049
6	0,1005		1,3090	0,0050
7	0,1008		1,2551	0,0048
8	0,1008		1,2598	0,0048
9	0,1001		1,3146	0,0050
10	0,1008		1,2855	0,0049
ZAWARTOŚĆ CILAZAPRILU W TABLETCE				
	<i>Średnia</i>		0,0049	
	<i>S</i>		0,0001	
	W_z [%]		1,9680	

*średnia z trzech pomiarów

4.9 Metoda spektrofotometrii klasycznej i pochodnych widm

Równoległe z opracowaniem i walidacją metody HPLC dokonano także próby zastosowania metody spektrofotometrycznej do badań kinetycznych cilażaprilu w fazie stałej.

Metoda ta jednakże została wykluczona z rozważań ze względu na brak selektywności w stosunku do produktu rozkładu cilażaprilu przy wybranych analitycznych długościach fali. (RYCINA 4.4)

Procedury

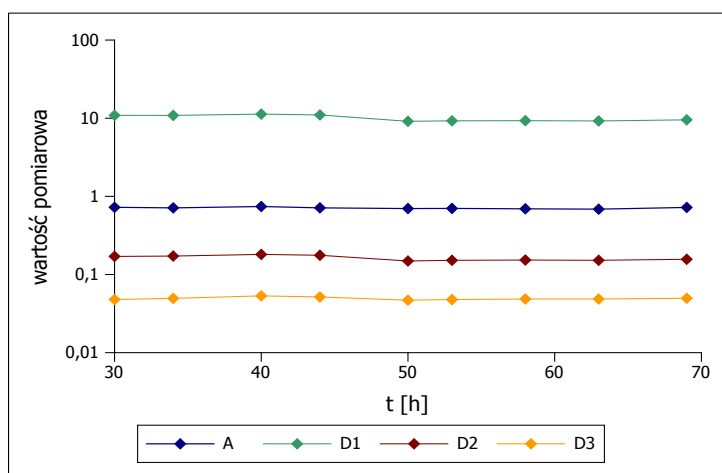
Przygotowanie próbek do analizy spektrofotometrycznej

Badaną próbkę cilażaprilu (0,0100 g) przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 25 ml, dodano 15 ml metanolu, wytrząsano do rozpuszczenia i uzupełniano metanolem do objętości 25,0 ml. Następnie, z powstałego roztworu pobierano 0,5 ml i uzupełniano metanolem do 10,0 ml. Powstały roztwór mieszano i poddawano analizie spektrofotometrycznej, wykreślając widma spektralne klasyczne (A) i pochodnych (D1, D2, D3) w zakresie od 200 do 300 nm.

Pilotażowe badanie kinetyczne

Ocena selektywności została przeprowadzona za pomocą pilotażowego badania kinetycznego ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$, $t = 70 \text{ h}$, $n = 9$), którego procedura została przedstawiona na stronie 48.

Wynik



RYCINA 4.4

Ocena selektywności metody spektrofotometrii klasycznej i pochodnych widm.

Brak selektywności wyklucza możliwość wykorzystania danej metody w badaniach kinetycznych.

4.10 Podsumowanie

Metoda HPLC z detekcją UV została zaadoptowana do badań kinetycznych trwałości cilazaprilu w fazie stałej.

Proces walidacji potwierdził jej selektywność, liniowość metody, precyzję i dokładność, potwierdzając tym samym jej wiarygodność i miarodajność.

Trwałość cilazaprilu w substancji

5.1	Badania kinetyczne cilazaprilu w substancji	41
5.2	Charakterystyka cilazaprilu	41
5.3	Reakcje substancji leczniczych w fazie stałej	42
5.3.1	Reakcje pro-leków dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny	42
5.4	Kinetyka rozkładu substancji leczniczej w fazie stałej	43
5.5	Zależność Arrhenius'a	45
5.6	Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu w substancji	46
5.7	Materiały i metody	47
5.8	Procedury	48
5.9	Wyniki i ich omówienie	51
5.9.1	Selektywność metody HPLC	51
5.9.2	Wybór matematycznego modelu kinetycznego rozkładu cilazaprilu w substancji w obecności wilgoci w powietrzu	51
5.9.3	Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w substancji w obecności wilgoci w powietrzu	53
5.9.4	Wpływ zmiennej wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu w substancji	54
5.9.5	Wpływ zmiennej temperatury na trwałość cilazaprilu w substancji w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza	61
5.9.6	Płaszczyzna trwałości cilazaprilu	67
5.9.7	Wybór matematycznego modelu kinetycznego rozkładu cilazaprilu w substancji przy braku wilgoci w powietrzu	68
5.9.8	Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w substancji w warunkach braku wilgoci w powietrzu	71
5.9.9	Wpływ zmiennej temperatury na trwałość cilazaprilu w substancji w warunkach braku wilgoci w powietrzu	73
5.9.10	Identyfikacja produktów rozkładu	82

5.9.11 Proponowany mechanizm rozkładu cilazaprilu	88
5.10 Podsumowanie	88

5.1 Badania kinetyczne cilazaprilu *w substancji*

Zmiany warunków środowiska otaczającego (temperatury i wilgotności względnej powietrza) mogą negatywnie wpływać na chemiczną trwałość substancji biologicznie czynnej i powodować zmiany, które obniżają jej jakość, bezpieczeństwo i skuteczność terapeutyczną.

Tylko znając i rozumiejąc mechanizm oraz kinetykę rozkładu leku możliwe jest podjęcie niezbędnych kroków poprawiających trwałość czy obniżających chemiczną reaktywność substancji leczniczych.

W niniejszym ROZDZIALE przedstawiono wyniki eksperymentów dotyczące trwałości cilazaprilu *w substancji* obejmujące wpływ zmiennej temperatury i wilgotności względnej powietrza. Badania zostały przeprowadzone metodą testu izotermicznego. Analizę ilościową przeprowadzono metodą HPLC. Kinetyczne rozważania zostały uzupełnione identyfikacją produktu rozkładu, dzięki czemu możliwe było zaproponowanie mechanizmu reakcji rozkładu cilazaprilu *w substancji*.

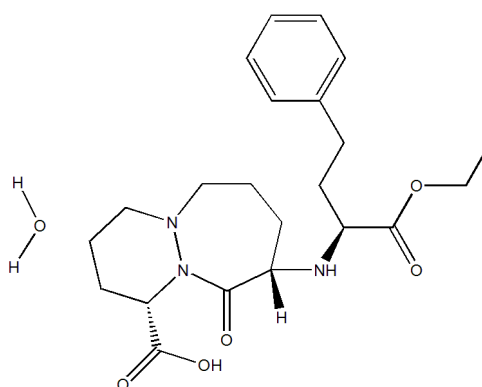
5.2 Charakterystyka cilazaprilu

Synonimy

Cilazaprilum, Cylazapryl

Wzór chemiczny

$C_{22}H_{31}N_3O_5, H_2O$ (RYCINA 5.1)



RYCINA 5.1

Wzór strukturalny cilazaprilu - kwasu (1*S*,9*S*)-9-[[*(1S)*-1-(etoksykarbonylo)-3-fenylopropylo] amino] -10-oksooktahydro-6*H*-pirydazylo[1,2-*a*][1,2] -diazepino-1-karboksylowego jednowodnego.

Masa cząsteczkowa

435,5 u

Wygląd

Krystaliczny proszek koloru białego lub prawie białego. [55]

5.3 Reakcje substancji leczniczych w fazie stałej

Reakcje rozkładu w ciałach stałych przebiegają w odmienny sposób niż w układach homogenicznych, jakie stanowią gazy czy roztwory. [71] Ruchliwość cząstek w fazie stałej jest mocno ograniczona i z tego względu każda reakcja przebiega w etapach, w których można obserwować:

- rozluźnienie cząsteczek w miejscu reakcji,
- zmianę strukturalną cząsteczki - właściwą reakcję,
- wytworzenie produktu rozkładu początkowo w formie stałego roztworu z substratem reakcji oraz
- oddzielenie produktu rozkładu od substratu. [4]

Z powyższych faktów wynika, że reakcje nie zachodzą jednakowo w całej substancji stałej. Mają one miejsce tylko w miejscach aktywnych zwanych zarodkami, przy czym w trakcie reakcji miejsc aktywnych w strukturze ciała stałego przybywa. Do rozprzestrzeniania się zarodków reakcji i zwiększenia ruchliwości cząstek przyczynia się dyfuzja produktu reakcji przez strukturę ciała stałego a także obecność wody. [4]

W fazie stałej obserwujemy takie reakcje jak: utlenianie, cyklizację, hydrolizę i dezaminację. [72]

5.3.1 Reakcje pro-leków dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny

Pro-leki dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny rozkładają się w fazie stałej w wyniku dwóch reakcji: hydrolizy oraz wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. [4]

Hydroliza jest główną drogą reakcji degradacji leków zawierających ugrupowania estrowe i amidowe.

Do jej przebiegu niezbędna jest cząsteczka wody, przy czym w fazie stałej jej dostęp jest ograniczony. To woda powoduje atak nukleofilowy w mechanizmie reakcji. Dodatkowo na hydrolizę duży wpływ ma budowa związku chemicznego (podstawniki elektronodonorowe i duże podstawniki powodujące efekt steryczny ją hamują, natomiast elektronoakceptorowe przyspieszają). [72]

Ugrupowanie amidowe jest mniej podatne na reakcję hydrolizy ze względu na mniejszą elektronoujemność atomu azotu oraz fakt, że aminowa grupa opuszczająca jest gorsza niż alkoholowa w estrach. [72]

Cyklizacja, której wynikiem jest powstanie pochodnych diketopiperazyny, przebiega w kilku etapach. Początek polega na deprotonizacji reagującej aminy, następnie zachodzi addycja neutralnego azotu do sąsiadującej grupy karbonylowej ugrupowania karboksylowego. Tworzy się stan przejściowy, z którego następuje odszczepienie cząsteczki wody i formułuje się ostateczny produkt rozkładu. [4, 73, 74]

5.4 Kinetyka rozkładu substancji leczniczej w fazie stałej

Celem kinetycznej analizy rozkładu jest stworzenie dokładnego opisu reakcji poprzez dobór odpowiedniego modelu matematycznego i wyznaczenie parametrów reakcji. [75]

Metody badań kinetyki rozkładu leku są różne. W ich przebiegu poddaje się badaną substancję działaniu negatywnych czynników zewnętrznych, jednocześnie obserwując zachodzące w niej zmiany. [75]

Metoda izotermiczna polega na badaniu substancji w kilku stałych temperaturach i wilgotnościach względnych powietrza. W zależności od zastosowanych temperatur wyróżnia się:

- test długoterminowy - w którym badane próbki poddaje się realnym warunkom przechowywania i choć jest miarodajny, nie pozwala uzyskać wyników w krótkim czasie,
- test stresowy i przyspieszony - gdzie stosuje się warunki podwyższonych temperatur i wilgotności względnych powietrza, przyspieszających reakcję rozkładu i skracających czas trwania analizy. [3]

Uzyskane podczas testów wyniki tworzą krzywe rozkładu przedstawiające zmiany ilościowe substratu w czasie reakcji. [76] Interpretacja krzywych rozkładu następuje poprzez różniczkowe równania kinetyczne, które w scałkowanej postaci tworzą prostoliniowe zależności zmian ilościowych badanej substancji jako funkcji czasu. [77]

Ogólna postać wyżej wspomnianych równań przedstawia się następująco:

$$f(x) = k \cdot t \quad (5.1)$$

gdzie $f(x)$ to scałkowana postać równania teoretycznego modelu matematycznego (TABELA 5.1), k jest stałą szybkości reakcji, natomiast x ułamkiem substancji rozłożonej. [75, 78]

TABELA 5.1

Matematyczne modele reakcji w fazie stałej z uwzględnieniem scałkowanych postaci równań kinetycznych [78]

Symbol	Model	Scałkowana postać $f(x) = k \cdot t$
<i>Modele powstawania miejsc aktywnych</i>		
P2	zależność potęgowa	$x^{1/2}$
P3	zależność potęgowa	$x^{1/3}$
P4	zależność potęgowa	$x^{1/4}$
A2	Avrami-Erofeyev	$[-\ln(1-x)]^{1/2}$
A3	Avrami-Erofeyev	$[-\ln(1-x)]^{1/3}$
A4	Avrami-Erofeyev	$[-\ln(1-x)]^{1/4}$
B1	Prout-Tompkins	$\ln[x/(1-x)] + c$
<i>Modele kontrakcji geometrycznych kształtów</i>		
R2	kontrakcja powierzchni	$1 - (1-x)^{1/2}$
R2	kontrakcja objętości	$1 - (1-x)^{1/3}$
<i>Modele dyfuzji</i>		
D1	dyfuzja jednowymiarowa	x^2
D2	dyfuzja dwuwymiarowa	$[(1-x)\ln(1-x)] + x$
D3	dyfuzja trójwymiarowa - Jander	$[1 - (1-x)^{1/3}]^2$
D4	Ginstling-Brounshtein	$1 - (2/3)x - (1-x)^{2/3}$
<i>Modele rzędu reakcji</i>		
F0/R1	zerowy rząd	x
F1	pierwszy rząd	$-\ln(1-x)$
F2	drugi rząd	$[1/(1-x)] - 1$
F3	trzeci rząd	$(1/2)[(1-x)^{-2} - 1]$

Wybór odpowiedniego modelu polega na statystycznym sprawdzeniu dopasowania modelu do danych eksperymentalnych (*model-fitting*). [78]

Każdy model stanowi teoretyczny, matematyczny opis danych uzyskanych podczas doświadczeń. Ma za zadanie nie tylko matematycznie przekształcić dane w zależność prostoliniową, z której można obliczyć stałą szybkości reakcji, ale także tłumaczy mechaniczne procesy zachodzące w substancji podczas reakcji. Wyróżnia się modele: powstania miejsc aktywnych, kontrakcji geometrycznych kształtów, dyfuzji i rzędów reakcji. [78]

Metoda nieizotermiczna jest alternatywą metody izotermicznej. Zwana jest także metodą dynamiczną, z tego względu, że przebiega ze zmienną temperaturą. Technika ta polega na ogrzewaniu próbki i jednoczesnym monitorowaniu przebiegu reakcji. Wyniki tworzą zależność zmian stężenia substartu jako funkcji temperatury reakcji. [76]

5.5 Zależność Arrhenius'a

Szybkość wielu reakcji rośnie wraz ze wzrostem temperatury. Prostoliniową zależność stałych szybkości reakcji (k [1/s]) jako funkcji odwrotności temperatury ($1/T$ [1/K]) matematycznie opisał S. Arrhenius:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (5.2)$$

Parametr A nosi nazwę czynnika przedwykładniczego lub czynnika częstości, natomiast E_a to energia aktywacji reakcji. Energia aktywacji to najmniejsza energia, jaką muszą mieć substraty, aby przekształcić się w produkty. Im większa jest energia aktywacji, tym silniej stała szybkości reakcji zależy od temperatury, jej zerowa wartość świadczy o tym, że szybkość reakcji nie zależy od temperatury, natomiast ujemna, że szybkość reakcji maleje ze wzrostem temperatury. [77]

Z wyznaczonych parametrów Arrhenius'a możliwe jest wyznaczenie parametrów termodynamicznych charakteryzujących reakcję [3]:

Entalpii aktywacji reakcji według wzoru:

$$H_{akt} = E_a - R \cdot T \quad (5.3)$$

Entropii aktywacji reakcji według wzoru:

$$S_{akt} = R \cdot \left(\ln A - \ln \frac{k_B \cdot T}{h} \right) \quad (5.4)$$

gdzie R jest uniwersalną stałą gazową ($R = 8,3114$ [J/(K·mol)]), T temperaturą wyrażoną w K, h - stałą kwantową Planck'a ($h = 6,6256 \cdot 10^{-34}$ [J/s]) a k_B stałą Boltzman'a ($1,3805 \cdot 10^{-23}$ [J/K]).

5.6 Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu *w substancji*

Do szczegółowych celów dotyczących badań trwałości cilazaprilu *w substancji* zaliczono:

Poznanie trwałości cilazaprilu *w substancji* w podwyższonej temperaturze oraz

- obecności i
- braku wilgoci w powietrzu.

Ustalenie kinetycznego mechanizmu rozkładu cilazaprilu *w substancji* na podstawie krzywych rozkładu metodą *model-fitting*.

Wyznaczenie stałych szybkości reakcji rozkładu cilazaprilu *w substancji* w warunkach

- stałej temperatury i zmiennej wilgotności względnej powietrza,
- zmiennej temperatury i stałej podwyższonej wilgotności względnej powietrza,
- zmiennej temperatury i zerowej wilgotności względnej powietrza.

Wyznaczenie prostoliniowej zależności określającej wpływ wilgotności względnej powietrza na rozkład cilazaprilu.

Wyznaczenie zależności Arrhenius'a oraz parametrów termodynamicznych w warunkach podwyższonej i zerowej wilgotności względnej powietrza.

Wyznaczenie trójwymiarowej zależności między temperaturą, wilgotnością względną powietrza i stałą szybkości reakcji rozkładu.

Porównanie trwałości cilazaprilu i innych podobnych w budowie inhibitorów konwertazy angiotensyny.

Identyfikacja produktu rozkładu cilazaprilu.

Zaproponowanie mechanizmu rozkładu cilazaprilu.

Cele osiągnięto w toku testów kinetycznych, analizy ilościowej, jakościowej i następującej analizy matematycznej oraz statystycznej uzyskanych wyników.

5.7 Materiały i metody

Materiały

- opisane w ROZDZIALE 4.5.1 na stronie 22 oraz
- jodek sodu (POCh)
- bromek sodu (POCh)
- jodek potasu (POCh)
- azotan sodu (POCh)
- chlorek sodu (POCh)
- bromek potasu (POCh)

Metoda analityczna

- HPLC opisana w ROZDZIALE 4.5.2 na stronie 22

Metody identyfikacji

- HPLC-MS
 - faza stacjonarna: kolumna – Symmetry C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm)
 - faza ruchoma: metanol
 - szybkość przepływu fazy ruchomej: 0,5 ml/min
 - objętość nastrzyku: 20 μl
 - zakres rejestrowanych mas: od $m/z = 150$ do $m/z = 600$ metodą jonizacji elektrorozpylania ESI
 - temperatura badań: 293 K
- IR
 - spektrofotometr IR IRAffinity-1 Shimadzu
 - tabletkarka firmy Pye Unicam
 - waga analityczna torsyjna (0 - 50 i 0 - 500) – WT typ PRL T-4

Metoda izotermiczna charakteryzuje się trzema parametrami:

- temperaturą
- wilgotnością względną powietrza (dla testów w $RH > 0 \%$) oraz
- brakiem wilgoci w powietrzu (dla testów w $RH = 0 \%$)

Odpowiednią *temperaturę* badań kinetycznych zapewniono w komorach cieplnych KBC-125W (WAMED). Komory gwarantowały stałą temperaturę podczas trwania testu (dokładność kontroli temperatury wynosi ± 1 K).

Podwyższoną wilgotność względną powietrza uzyskano w eksykatorach zawierających nasycone roztwory soli nieorganicznych będących w kontakcie z nadmiarem soli przez cały czas trwania testu. Poniżej zostały wymienione sole z odpowiadającymi im wilgotnościami względnymi powietrza:

- jodek sodu - 25,0 %
- bromek sodu - 50,9 %
- jodek potasu - 60,5 %
- azotan sodu - 66,5 %
- chlorek sodu - 76,4 %

Zamknięte eksykatory umieszczono w komorach cieplnych rozgrzanych do temperatury eksperymentu.

Warunki *zerowej wilgotności względnej powietrza* osiągnięto z wykorzystaniem łąźni piaskowych umieszczonych bezpośrednio w komorach cieplnych zapewniających niezbędną podczas badania temperaturę.

W celu otrzymania odpowiednich warunków w każdym przypadku eksykatory i łąźnie piaskowe były umieszczane w nagranych komorach cieplnych 24 godziny przed rozpoczęciem testów kinetycznych.

5.8 Procedury

Przygotowanie próbek cilazaprilu *w substancji*

Przygotowanie próbek do testów kinetycznych polegało na dokładnym odważeniu 0,0100 g cilazaprilu *w substancji* do szklanych fiolek z ciemnego szkła o pojemności 5 ml.

Warunki testów kinetycznych

Warunki każdego testu zapewniono w eksykatorach z nasyconymi roztworami soli nieorganicznych lub łąźniach piaskowych. Dokładna specyfikacja warunków została opisana na stronie 48.

Przygotowane próby poddano testom kinetycznym według poniższego schematu (TABELA 5.2).

TABELA 5.2

Plan badań kinetycznych - ocena trwałości cilazaprilu w substancji w warunkach podwyższonej i zerowej wilgotności względnej powietrza

Przedmiot badania	Temperatura [K]	Wilgotność względna powietrza [%]	
Cilazapril w substancji	363	25,0	
		50,9	
		60,5	
		66,5	
		76,4	
	333	76,4	343
			348
			353
			363
			373
	378	0	383
			383
			393
			393

W określonych punktach czasowych zależnych od szybkości reakcji rozkładu (t [h]) losowo wyciągano próbki z komór cieplnych i eksykatorów ($RH > 0\%$) lub łąźni piaskowych ($RH = 0\%$), chłodzono do temperatury pokojowej, następnie analizowano ilościowo metodą HPLC.

Przygotowanie próbek do analizy ilościowej HPLC

Próbki cilazaprilu w substancji poddane testom kinetycznym. Zawartość każdej fiołki przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 25 ml używając metanolu jako rozpuszczalnika. Przeniesione składniki wytrząsano do rozpuszczenia, następnie uzupełniono badany roztwór metanolem do 25,0 ml.

Objętość 1,0 ml przezroczystego roztworu badanego mieszano z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego i poddawano analizie HPLC. W przypadku testów w podwyższonej wilgotności względnej powietrza stosowano jako wzorzec wewnętrzny metanолоwy roztwór benzokainy o stężeniu 0,02 %, natomiast dla prób poddawanych testom przy zerowej wilgot-

ności względnej powietrza metanolewy roztwór chlorowodoru oksymetazoliny o stężeniu 0,02 %.

Próby cilazaprilu *w substancji* niepoddane testom kinetycznym. Dokładnie odważony cilazapril *w substancji* (0,0100 g) przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 25 ml, następnie rozpuszczano i uzupełniano metanolem do 25,0 ml. Powstały roztwór mieszano.

Objętość 1,0 ml przezroczystego roztworu badanego mieszano z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (metanolewy roztwór benzokainy o stężeniu 0,02 % dla $RH > 0$ % lub metanolewy roztwór oksymetazoliny o stężeniu 0,02 % dla $RH = 0$ %) i poddawano analizie HPLC.

Przygotowanie prób do analizy jakościowej w podczerwieni

Badaną substancję odważono na wadze torsyjnej w ilości $0,00100 \pm 0,00005$ g oraz 0,30000 g wysuszonego bromku potasu. Następnie odważone składniki ucierano w agatowym moździerzku do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Przygotowaną mieszaninę tabletkowano. Uzyskaną tabletkę o wymiarach 1,3 x 0,1 cm analizowano.

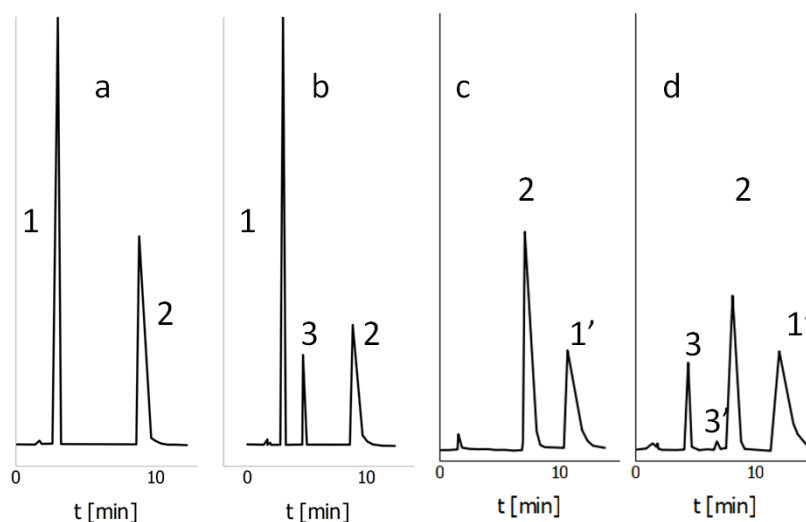
Przygotowanie prób do analizy jakościowej HPLC-MS

Badaną substancję w ilości 0,0100 g rozpuszczono metanolem w kolbie miarowej o pojemności 25 ml i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 25,0 ml. Powstały roztwór mieszano i poddawano analizie HPLC-MS.

5.9 Wyniki i ich omówienie

5.9.1 Selektywność metody HPLC

Chromatogramy potwierdzające selektywność metody HPLC względem cilazaprilu, jego produktów rozkładu i wzorców wewnętrznych przedstawia RYCINA 5.2.



RYCINA 5.2

Selektywność metody HPLC względem cilazaprilu (2), produktów rozkładu (3 - główny i 3') wzorców wewnętrznych: benzokaininy (1) i chlorowodorku oksymetazolininy (1'). Chromatogramy dotyczą: a), c) cilazaprilu w czasie t_0 testu kinetycznego z zastosowaniem różnych wzorców wewnętrznych i w jego trakcie w warunkach b) $RH = 76,4\%$ i d) $RH = 0\%$.

5.9.2 Wybór matematycznego modelu kinetycznego rozkładu cilazaprilu w substancji w obecności wilgoci w powietrzu

Kinetyczny model matematyczny do analizy danych eksperymentalnych rozkładu cilazaprilu w fazie stałej w warunkach obecności wilgoci w powietrzu został wybrany na podstawie techniki *model-fitting*.

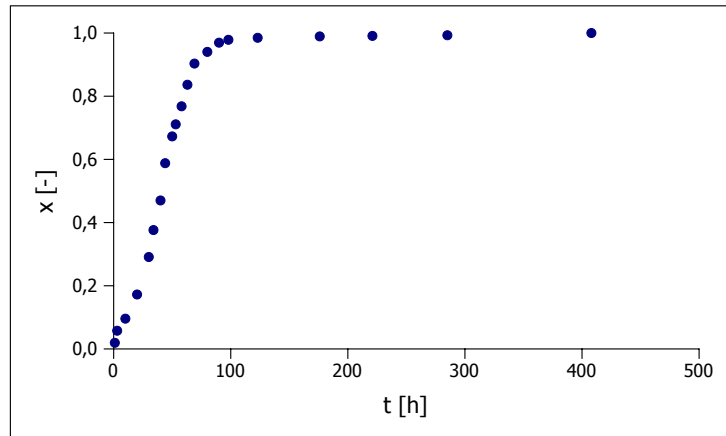
W celu doboru odpowiedniego równania kinetycznego stężenia cilazaprilu uzyskane w toku eksperymentów przekształcono matematycznie w postać ułamka substancji rozłożonej według zależności:

$$x = 1 - \frac{c}{c_0} \quad (5.5)$$

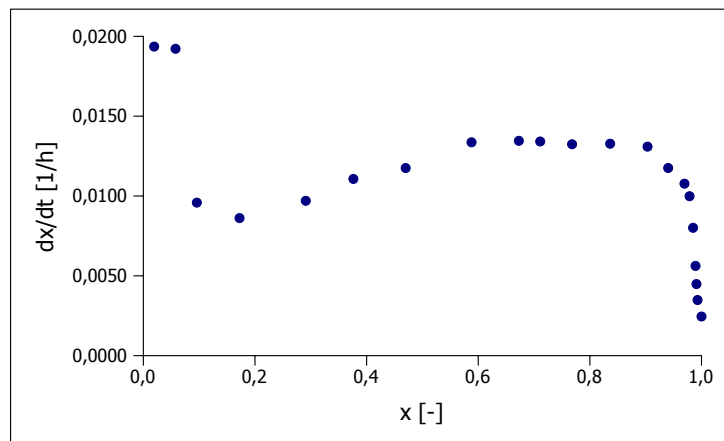
i dokonano analizy:

- wykresów przedstawiających zależności $f(t) = x$ oraz $f(x) = \frac{dx}{dt}$ (RYCINA 5.3) oraz
- współczynników korelacji r (TABELA 5.3) charakteryzujących zależności uzyskane

poprzez analizę danych eksperymentalnych przedstawionymi w TABELI 5.1 równaniami modeli kinetycznych.



(a)



(b)

RYCINA 5.3

Analiza wykresów mająca na celu dobór modelu kinetycznego w warunkach $RH > 0\%$, gdzie (a) przedstawia zależność $f(t) = x$, natomiast (b) $f(x) = \frac{dx}{dt}$ ($T = 363\text{ K}$, $RH = 76,4\%$).

Sigmoidalny kształt krzywej rozkładu i najbliższa jedności korelacja danych wskazują, że matematyczny model kinetyczny Prout-Tompkins'a jest adekwatny do opisu danych doświadczalnych trwałości cilazaprilu *w substancji* w obecności wilgoci w powietrzu.

TABELA 5.3

Dobór modelu kinetycznego ($T = 363\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) do opisu danych doświadczalnych rozkładu cilazaprilu w substancji - współczynniki korelacji r zależności uzyskanych podczas analizy danych doświadczalnych różnymi równaniami kinetycznymi, gdzie t opisuje cały czas trwania testu a $(t)'$ jest skorygowanym czasem uwzględniającym eksperymentalne punkty należące tylko do okresu przyspieszenia reakcji

Symbol	$f(x) = k \cdot t$ r	$f(x) = k \cdot (t)'$ r
<i>Modele powstawania miejsc aktywnych</i>		
P2	0,612	0,915
P3	0,589	0,906
P4	0,576	0,902
A2	0,856	0,996
A3	0,826	0,991
A4	0,808	0,986
B1*	0,850	0,997
<i>Modele kontrakcji geometrycznych kształtów</i>		
R2	0,775	0,985
R3	0,840	0,994
<i>Modele dyfuzji</i>		
D1	0,717	0,970
D2	0,825	0,989
D3	0,920	0,988
D4	0,812	0,993
<i>Modele rzędu reakcji</i>		
F0/R1	0,662	0,939
F1	0,905	0,995
F2	0,972	0,894
F3	0,946	0,786
*Model B1 - najlepsza korelacja danych		

5.9.3 Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w substancji w obecności wilgoci w powietrzu

Półlogarytmiczny wykres zależności stężenia cilazaprilu jako funkcji czasu testu kinetycznego charakteryzuje się sigmoidalnym kształtem. Na krzywej rozkładu wyodrębnić można okres indukcji, w którym rozkład substancji jest minimalny, następujące po nim przyspieszenie reakcji z gwałtownym jej przebiegiem i kończący reakcję okres zakończenia.

Liniową zależność Prout-Tompkins'a, niezbędną do obliczenia parametrów rozkładu otrzymuje się po przekształceniu równania do postaci:

$$\ln \frac{c}{c_0 - c} = a \cdot t + b \quad (5.6)$$

gdzie c jest procentowym stężeniem cilazaprilu w próbkach poddanych testowi kinetycznemu, c_0 - stężeniem cilazaprilu w próbkach nierozłożonych (100 %), t - czas przebywania próbki w warunkach kinetycznych wyrażony w godzinach, a - współczynnik nachylenia prostej, natomiast b - wyraz wolny (a i b wyznaczone zostało metodą najmniejszych kwadratów). Wartości błędów standardowych były obliczone dla $\alpha = 0,05$ i stopniach swobody $df = n - 2$.

Obserwowane stałe szybkości reakcji dla okresów przyspieszenia poszczególnych procesów k [1/s] obliczono na podstawie nachylenia prostej. Liczba 3600 użyta jest tu w celu przeliczenia godzin na sekundy.

$$k = -\frac{a}{3600} \quad (5.7)$$

Innym ważnym parametrem, który wyznaczono jest czas 50 % rozkładu cilazaprilu. Jak wynika z RÓWNANIA 5.6 wynosi on:

$$t_{0,5} = \frac{\ln(1) - b}{a} \quad (5.8)$$

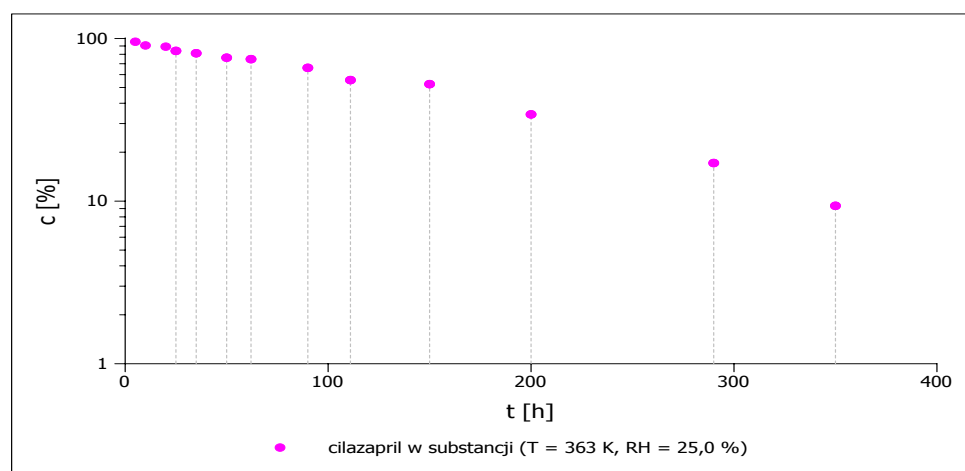
Natomiast okres indukcji, wyznaczano graficznie i przyjmowano, że trwa on do pierwszego punktu eksperymentalnego, który już należy do okresu przyspieszenia. Na wszystkich RYCINACH zamieszczonych w pracy punkty eksperymentalne należące do okresu przyspieszenia zostały oznaczone pionowymi, przerywanymi liniami.

5.9.4 Wpływ zmiennej wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu w substancji

W stałej temperaturze ($T = 363$ K) rosnąca wilgotność względna powietrza (25,0 - 76,4 %) przyspiesza rozkład cilazaprilu. Świadczą o tym zmniejszające się okresy indukcji i zwiększające się wartości obserwowanych stałych szybkości reakcji.

Krzywe rozkładu cilazaprilu w tych warunkach zostały przedstawione na RYCINACH 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 i 5.8. Natomiast odpowiadające im dane eksperymentalne wraz z obliczonymi parametrami umieszczono w TABELACH 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 oraz 5.8.

Rozkład cilazaprilu jest wolniejszy w niższych wilgotnościach względnych powietrza. Wskazują na to obserwowane stałe szybkości reakcji, które wraz ze wzrostem wilgotności względnej powietrza zmieniają się według prostoliniowej półlogarytmicznej zależności o nachyleniu dodatnim $\ln k = (0,0358 \pm 0,0055) \cdot RH + (-13,5262 \pm 0,2309)$. (RYCINA 5.9, TABELA 5.9)

$T = 363 \text{ K}, RH = 25,0 \%$


RYCINA 5.4

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 363 \text{ K}, RH = 25,0 \%$).

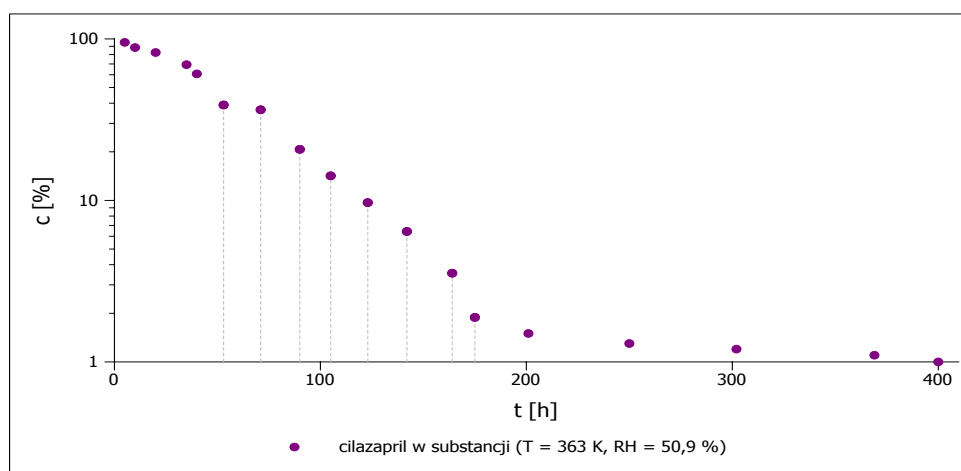
TABELA 5.4

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363 \text{ K}, RH = 25,0 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	25	1,9795	1,6620	83,9604	5,2346
2	35	1,9795	1,6072	81,1945	4,3176
3	50	1,9795	1,5093	76,2488	3,2103
4	62	1,9795	1,4786	74,6955	2,9519
5	90	1,9795	1,3076	66,0575	1,9462
6	111	1,9795	1,0991	55,5234	1,2484
7	150	1,9795	1,0379	52,4350	1,1024
8	200	1,9795	0,6763	34,1642	0,5189
9	290	1,9795	0,3396	17,1537	0,2071
10	350	1,9795	0,1853	9,3619	0,1033

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0118$	$\Delta a = 0,00087$	$S_a = 0,00038$
$b = 1,7894$	$\Delta b = 0,1497$	$S_b = 0,0649$
$S_y = 0,1258$	$r = -0,996$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$3,27 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$2,47 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	152

$T = 363 \text{ K}, RH = 50,9 \%$


RYCINA 5.5

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 363 \text{ K}, RH = 50,9 \%$).

TABELA 5.5

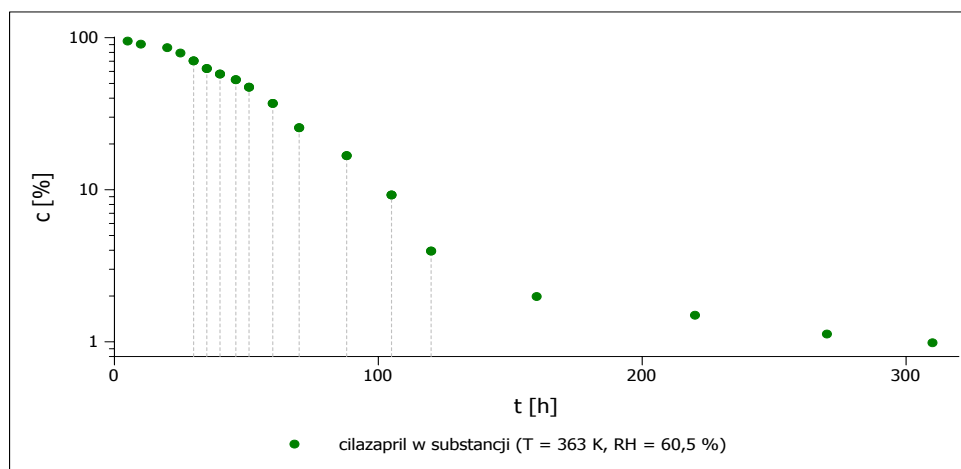
Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363 \text{ K}, RH = 50,9 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	53	1,9555	0,7623	38,9845	0,6389
2	71	1,9555	0,7123	36,4261	0,5730
3	90	1,9555	0,4050	20,7105	0,2612
4	105	1,9555	0,2777	14,2032	0,1655
5	123	1,9555	0,1895	9,6902	0,1073
6	142	2,1363	0,1372	6,4229	0,0686
7	164	2,1363	0,0757	3,5420	0,0367
8	175	2,1363	0,0403	1,8863	0,0192

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0285$	$\Delta a = 0,0035$	$S_a = 0,0014$
$b = 1,2514$	$\Delta b = 0,4247$	$S_b = 0,1736$
$S_y = 0,1636$	$r = -0,993$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$7,92 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$9,64 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	44

$T = 363 \text{ K}$, $RH = 60,5 \%$



RYCINA 5.6

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 60,5 \%$).

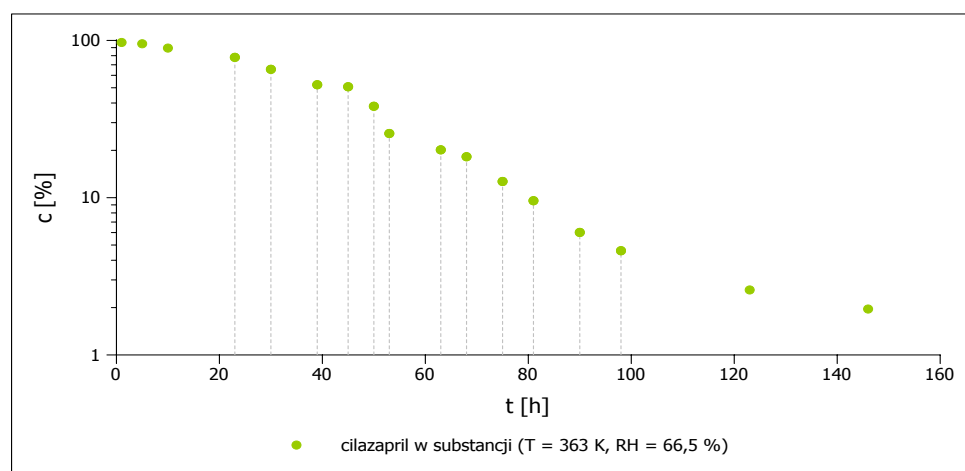
TABELA 5.6

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363 \text{ K}$, $RH = 60,5 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	$P_{\text{cil}}/P_{\text{IS}}$ dla t_0 [h]	$P_{\text{cil}}/P_{\text{IS}}$ dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	30	1,9083	1,3436	70,4089	2,3794
2	35	1,9083	1,1958	62,6631	1,6783
3	40	1,9083	1,1003	57,6548	1,3615
4	46	1,9083	1,0100	52,9276	1,1244
5	51	1,9083	0,9017	47,2483	0,8957
6	60	1,9083	0,7052	36,9521	0,5861
7	70	1,9083	0,4881	25,5754	0,3436
8	88	1,9083	0,3198	16,7567	0,2013
9	105	1,9083	0,1763	9,2406	0,1018
10	120	1,9083	0,0754	3,9512	0,0411

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0428$	$\Delta a = 0,0025$	$S_a = 0,0011$
$b = 2,0627$	$\Delta b = 0,1735$	$S_b = 0,0752$
$S_y = 0,0980$	$r = -0,998$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,19 \cdot 10^{-5}$
Δk [1/s]	$6,81 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	48

$T = 363 \text{ K}, RH = 66,5 \%$


RYCINA 5.7

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 363 \text{ K}, RH = 66,5 \%$).

TABELA 5.7

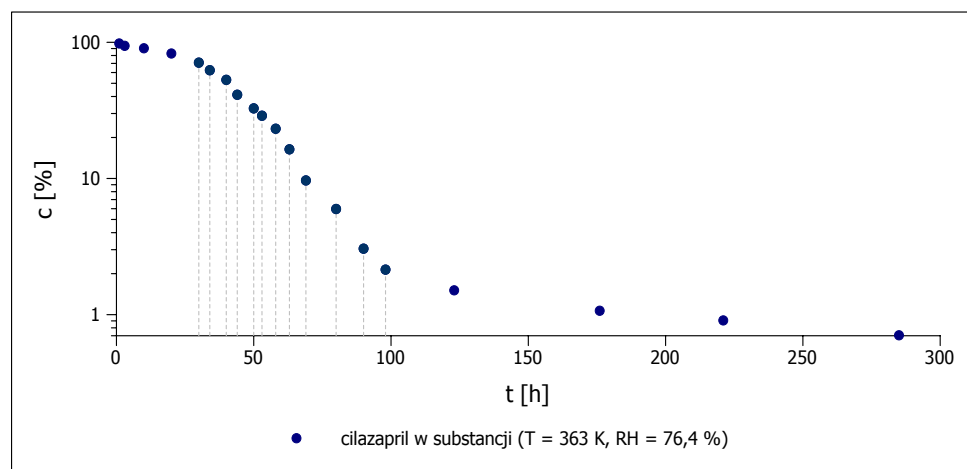
Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363 \text{ K}, RH = 66,5 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	23	1,9682	1,5361	78,0448	3,5547
2	30	1,9682	1,2891	65,4948	1,8981
3	39	1,9682	1,0287	52,2625	1,0948
4	45	1,9682	0,9988	50,7447	1,0302
5	50	1,9682	0,7506	38,1370	0,6165
6	53	1,9682	0,5039	25,5998	0,3441
7	63	1,9682	0,3965	20,1474	0,2523
8	68	1,9682	0,3585	18,2146	0,2227
9	75	1,9682	0,2496	12,6796	0,1452
10	81	2,1363	0,2043	9,5642	0,1058
11	90	2,1363	0,1284	6,0125	0,0640
12	98	2,1363	0,0982	4,5990	0,0482

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0570$	$\Delta a = 0,0052$	$S_a = 0,0023$
$b = 2,3656$	$\Delta b = 0,3284$	$S_b = 0,1474$
$S_y = 0,1815$	$r = -0,992$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,58 \cdot 10^{-5}$
Δk [1/s]	$1,43 \cdot 10^{-6}$
$t_{0,5}$ [h]	42

$$T = 363 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 5.8

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 5.8

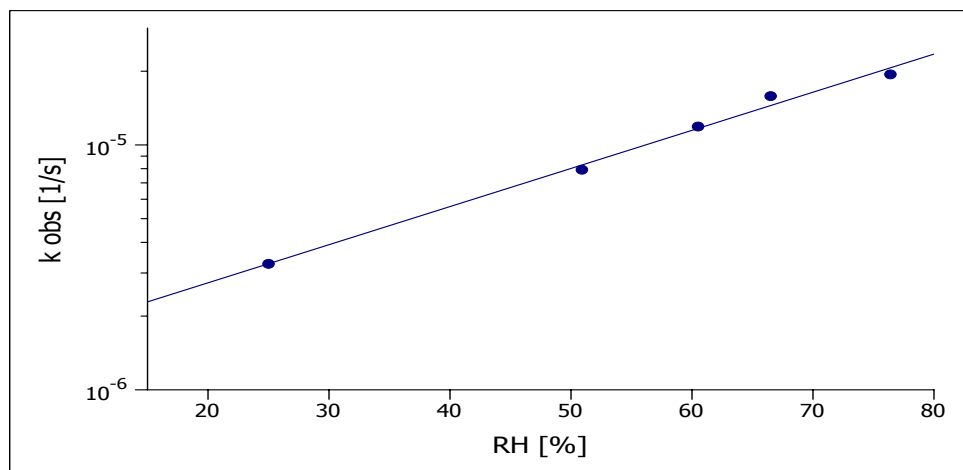
Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	30	1,9614	1,3907	70,9010	2,4365
2	34	1,9614	1,2233	62,3677	1,6573
3	40	1,9614	1,0395	52,9987	1,1276
4	44	1,9614	0,8082	41,2027	0,7008
5	50	1,9614	0,6418	32,7225	0,4864
6	53	1,9614	0,5668	28,8990	0,4064
7	58	1,9614	0,4549	23,1918	0,3019
8	63	2,1363	0,3497	16,3687	0,1957
9	69	2,1363	0,2066	9,6709	0,1071
10	80	2,1363	0,1275	5,9686	0,0635
11	90	2,1363	0,0652	3,0525	0,0315
12	98	2,1363	0,0457	2,1410	0,0219

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0699$	$\Delta a = 0,0038$	$S_a = 0,0017$
$b = 2,8327$	$\Delta b = 0,2385$	$S_b = 0,1233$
$S_y = 0,1233$	$r = -0,997$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,94 \cdot 10^{-5}$
Δk [1/s]	$1,06 \cdot 10^{-6}$
$t_{0,5}$ [h]	41

Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu *w substancji*
 ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 25,0 - 76,4 \%$)



RYCINA 5.9

Wpływ zmiennej RH na trwałość cilazaprilu - półlogarytmiczny wykres obserwowanej stałej szybkości reakcji rozkładu cilazaprilu w substancji (k [1/s]) jako funkcji wilgotności względnej powietrza (RH [%]) w warunkach kinetycznych ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 25,0 - 76,4 \%$).

TABELA 5.9

Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu w substancji - parametry prostej opisanej $\ln k = f(RH)$

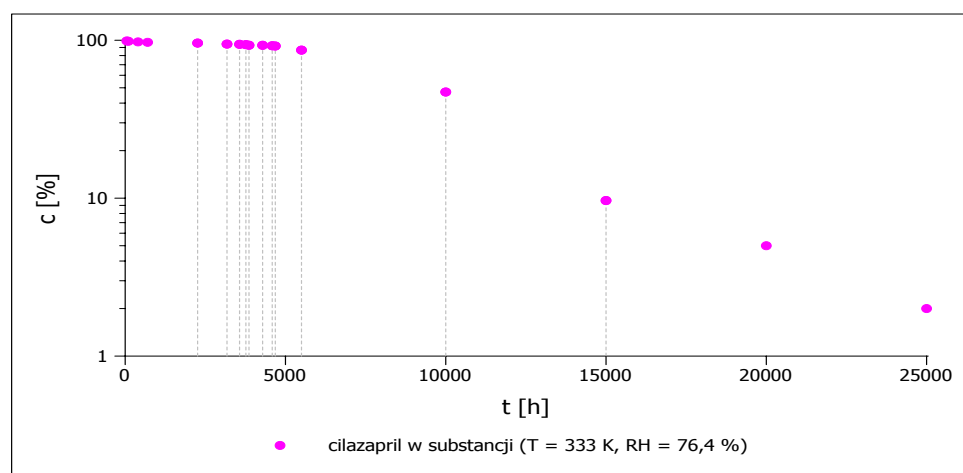
Parametry prostej $\ln k = a \cdot RH + b$	
$a \pm \Delta a$	$0,0358 \pm 0,0055$
S_a	0,017
$b \pm \Delta b$	$-13,5262 \pm 0,2309$
S_b	0,1021
S_y	0,0683
r	0,997

5.9.5 Wpływ zmiennej temperatury na trwałość cilazaprilu *w substancji* w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza

Drugim czynnikiem, który negatywnie wpływa na trwałość cilazaprilu *w substancji* jest temperatura. Wraz ze wzrostem tego parametru przy zachowaniu stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76,4\%$) rozkład jest szybszy. Wartości okresu indukcji ulegają skróceniu, podczas gdy obserwowane stałe szybkości reakcji rosną. (RYCINY 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 i 5.8 oraz TABELI 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 oraz 5.8)

Zależność obserwowanej stałej szybkości reakcji od temperatury została opisana równaniem Arrhenius'a. Charakteryzuje się wysokim współczynnikiem korelacji i równaniem $\ln k = (-20025,30 \pm 2500,26) \cdot \frac{1}{T} + (44,21 \pm 7,19)$. Korzystając z równania Arrhenius'a wyznaczono również parametry termodynamiczne reakcji rozkładu cilazaprilu *w substancji*, które zostały przedstawione w TABELI 5.14.

$$T = 333 \text{ K}, RH = 76,4\%$$



RYCINA 5.10

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4\%$).

TABELA 5.10

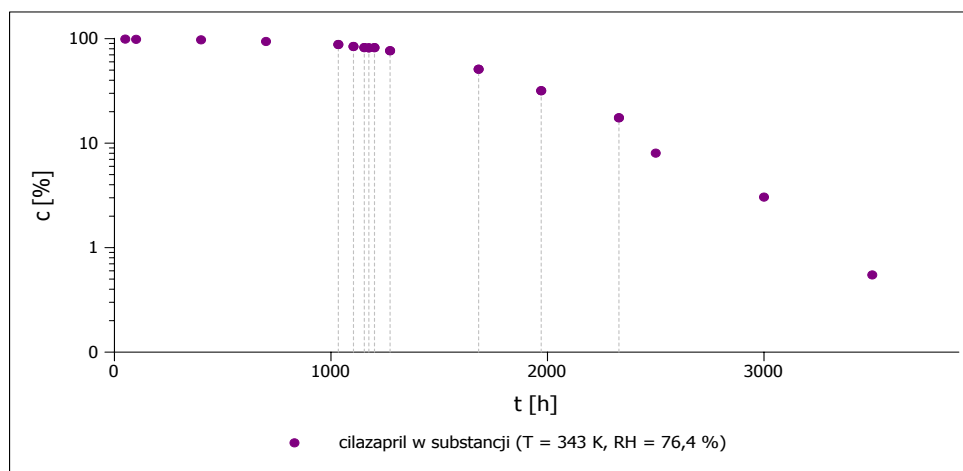
Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 333$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2259	1,9783	1,8992	96,0029	24,0183
2	3765	1,9783	1,8557	93,7995	15,1277
3	4683	1,9783	1,8193	91,9617	11,4404
4	3176	1,9783	1,8710	94,5768	17,4393
5	3568	1,9783	1,8650	94,2736	16,4630
6	3862	1,9783	1,8402	93,0189	13,3243
7	4287	1,9091	1,7743	92,9382	13,1607
8	4587	1,9091	1,7622	92,3040	11,9938
9	5500	1,9091	1,6533	86,5976	6,4613
10	10000	1,9091	0,8977	47,0230	0,8876
11	15000	1,9091	0,1844	9,6599	0,1069

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,00044$	$\Delta a = 0,000021$	$S_a = 0,0000095$
$b = 4,3411$	$\Delta b = 0,1403$	$S_b = 0,0620$
$S_y = 0,1114$	$r = -0,998$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,22 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$5,94 \cdot 10^{-9}$
$t_{0,5}$ [h]	9905

$$T = 343 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 5.11

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 5.11

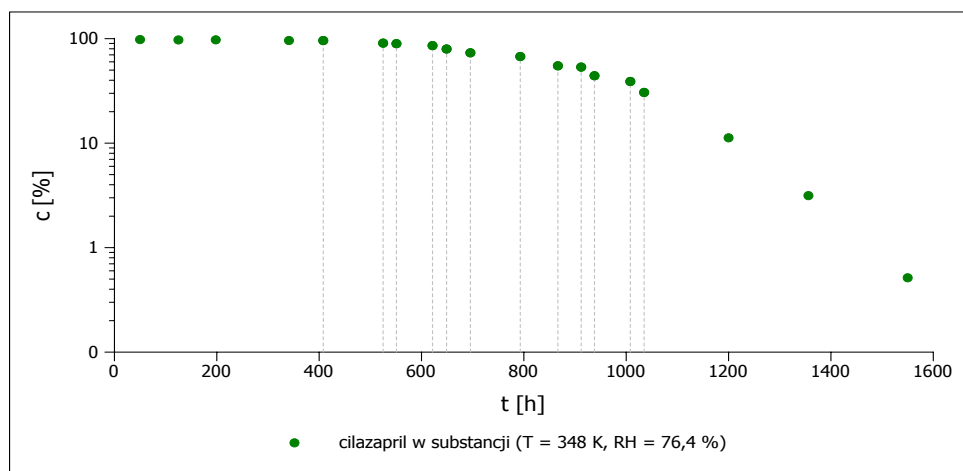
Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	1034	2,0427	1,7963	87,9360	7,2891
2	1104	2,0427	1,7194	84,1740	5,3187
3	1154	2,0427	1,6778	82,1365	4,5980
4	1175	2,0427	1,6680	81,6561	4,4514
5	1201	2,0427	1,6762	82,0590	4,5738
6	1273	2,0427	1,5652	76,6224	3,2776
7	1682	1,9783	1,0085	50,9797	1,0400
8	1971	1,9783	0,6282	31,7525	0,4653
9	2330	1,9783	0,3459	17,4845	0,2119

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0027$	$\Delta a = 0,00015$	$S_a = 0,000064$
$b = 4,7221$	$\Delta b = 0,2256$	$S_b = 0,0954$
$S_y = 0,0817$	$r = -0,998$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$7,61 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$4,18 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	1724

$$T = 348 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 5.12

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 348 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 5.12

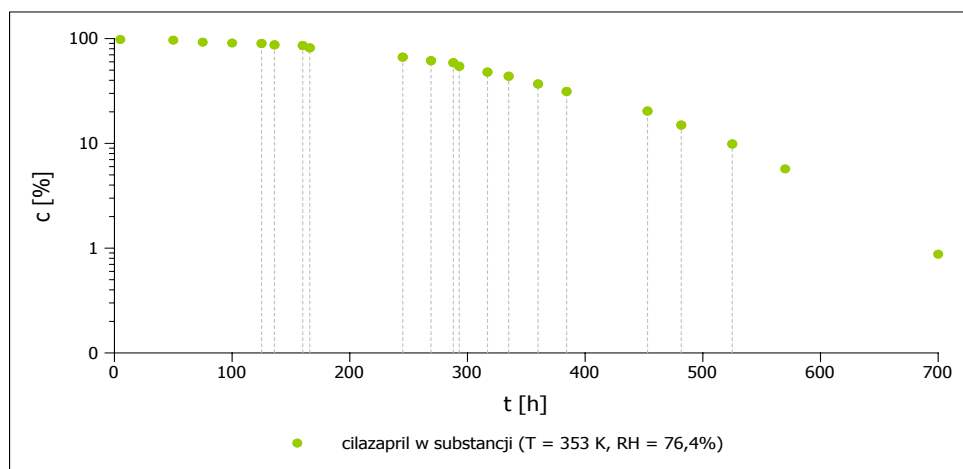
Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 348 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	408	2,0834	1,9984	95,9199	23,5090
2	525	2,0414	1,8505	90,6508	9,6961
3	551	2,0414	1,8286	89,5782	8,5953
4	621,5	2,0414	1,7513	85,7924	6,0385
5	649	2,0158	1,6048	79,6118	3,9048
6	695,5	1,9913	1,4580	73,2202	2,7342
7	793	1,9913	1,3437	67,4802	2,0751
8	866,5	1,9091	1,0495	54,9739	1,2209
9	912	1,9091	1,0208	53,4686	1,1491
10	938	2,0427	0,9020	44,1544	0,7907
11	1008	2,0427	0,7951	38,9214	0,6372
12	1035	2,0427	0,6244	30,5672	0,4402

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0060$	$\Delta a = 0,00046$	$S_a = 0,00021$
$b = 5,4306$	$\Delta b = 0,3596$	$S_b = 0,1614$
$S_y = 0,1414$	$r = -0,994$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,66 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$1,29 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	908

$$T = 353 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 5.13

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 353 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 5.13

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 353 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	125	1,5571	1,3989	89,8384	8,8410
2	136	1,5571	1,3563	87,1007	6,7524
3	160	1,5571	1,3362	85,8114	6,0479
4	166	1,5571	1,2701	81,5675	4,4252
5	245	2,0682	1,3756	66,5138	1,9863
6	269	2,0682	1,2724	61,5211	1,5988
7	288	2,0682	1,2172	58,8537	1,4304
8	293	2,0682	1,1253	54,4104	1,1935
9	317	2,0682	0,9906	47,8968	0,9193
10	335	2,0414	0,8924	43,7154	0,7767
11	360	2,0414	0,7531	36,8919	0,5846
12	384,25	2,0414	0,6389	31,2981	0,4556
13	453	2,0414	0,4155	20,3517	0,2555
14	481,5	2,0414	0,3052	14,9485	0,1758
15	525	2,0414	0,2014	9,8646	0,1094

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0107$	$\Delta a = 0,00072$	$S_a = 0,00034$
$b = 3,3664$	$\Delta b = 0,2359$	$S_b = 0,1092$
$S_y = 0,1567$	$r = -0,994$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$2,96 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$2,01 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	316

$$T = 363 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$

Wyniki przedstawione na RYCINIE 5.8 i w TABELI 5.8 na stronie 59.

Zależność Arrhenius'a ($T = 333 - 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)

TABELA 5.14

Parametry prostej opisującej zależność Arrhenius'a - półlogarytmiczną funkcję liniową stałych szybkości reakcji (k [1/s]) i odwrotności temperatury ($1/T$ [1/K]) dla reakcji rozkładu cilazaprilu w substancji w warunkach kinetycznych $T = 333 - 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ oraz obliczone parametry termodynamiczne

Parametry prostej zależności Arrhenius'a	
$\ln k = a \cdot \frac{1}{T} + \ln A$	
$a \pm \Delta a$	$-20025,30 \pm 2500,26$
S_a	785,75
$\ln A \pm \Delta \ln A$	$44,21 \pm 7,19$
S_b	2,26
S_y	0,15
r	0,998
Parametry termodynamiczne	
E_a [kJ/mol]	166,50
ΔE_a	20,79
H_{akt} [kJ/mol]	164,02
ΔH_{akt}	23,27
S_{akt} [J/(K mol)]	122,68
ΔS_{akt}	185,11

5.9.6 Płaszczyzna trwałości cilazaprilu

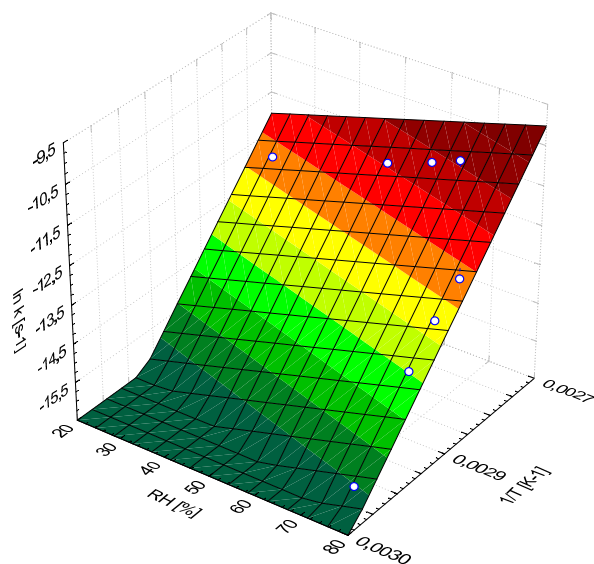
Proste opisujące zależności między kluczowymi parametrami rozkładu cilazaprilu: temperaturą, wilgotnością względną powietrza i obserwowaną stałą szybkości reakcji stały się punktem wyjścia do wyznaczenia płaszczyzny trwałości cilazaprilu *w substancji*. (RYCINA 5.14)

Wyznaczoną płaszczyznę opisuje równanie:

$$\ln k = 43,139 - 20537,9 \cdot \frac{1}{T} + 0,034 \cdot RH \quad (5.9)$$

Dzięki powyższej formule możliwe jest wyznaczenie parametru przewidującego szybkość reakcji przy znajomości dwóch podstawowych warunków przechowywania: wilgotności względnej powietrza i temperatury. O przydatności ustalonej zależności świadczy fakt braku istotnych statystycznie różnic pomiędzy parametrami wyznaczonymi eksperymentalnie i obliczonymi. (TABELA 5.15)

Tym samym równanie płaszczyzny można uznać za ważne narzędzie służące do przewidywania trwałości cilazaprilu *w substancji*.



RYCINA 5.14

Trójwymiarowa zależność pomiędzy parametrami rozkładu: zlogarytmowaną obserwowaną stałą szybkości rozkładu, wilgotnością względną powietrza i odwrotnością temperatury.

TABELA 5.15

Ocena przydatności wyznaczonego RÓWNANIA 5.9 powierzchni rozkładu cilazaprilu do wyznaczania stałej szybkości reakcji statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej, na przykładzie zależności $\ln k = f(RH)$ i $\ln k = f(\frac{1}{T})$

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
<i>Test I - $\ln k = f(RH)$</i>	
Hipotezy	
$H0: a_1 = a_2$	
$H1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Parametry doświadczalne	Parametry obliczone
$n = 5$	$n = 5$
$\ln y = 0,0358x - 13,5262$	$\ln y = 0,0340x - 13,4392$
$S_{a1 - a2} = 0,0018$	
$ t = 1,0568$	
$t(\alpha = 0,05; df = 6) = 2,4469$	
<i>Test II - $\ln k = f(\frac{1}{T})$</i>	
Hipotezy	
$H0: a_1 = a_2$	
$H1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Parametry doświadczalne	Parametry obliczone
$n = 5$	$n = 5$
$\ln y = -20025,30x + 44,21$	$\ln y = -20537,90x + 45,74$
$S_{a1 - a2} = 754,53$	
$ t = 0,6793$	
$t(\alpha = 0,05; df = 6) = 2,4469$	
Weryfikacja hipotez (<i>Test I i II</i>) wykazała, że $t(\alpha; df) > t $ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy $H0$. Współczynniki regresji a tym samym doświadczalne i obliczone stałe szybkości reakcji nie różnią się statystycznie.	

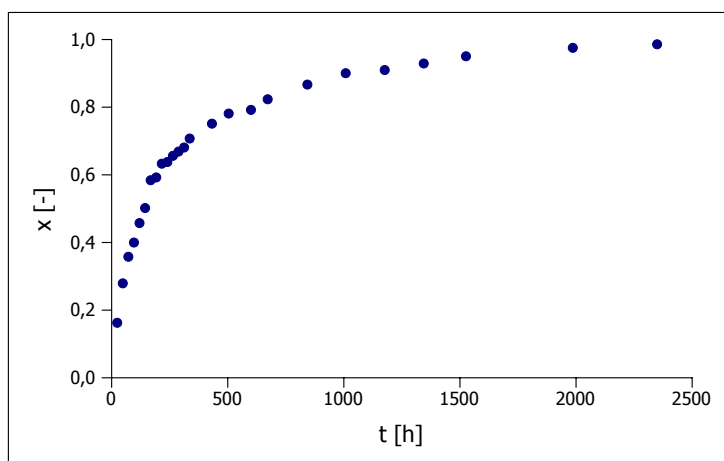
5.9.7 Wybór matematycznego modelu kinetycznego rozkładu cilazaprilu *w substancji* przy braku wilgoci w powietrzu

Kinetyczny model matematyczny do analizy danych eksperymentalnych rozkładu cilazaprilu *w substancji* w warunkach braku wilgoci w powietrzu został wybrany na podstawie techniki *model-fitting*.

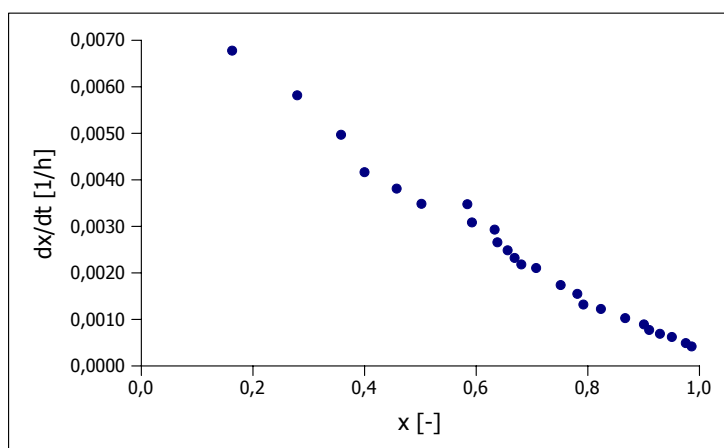
Dobór odpowiedniego równania kinetycznego wymagał w pierwszym rzędzie matematycznego przekształcenia danych eksperymentalnych - stężeń cilazaprilu - w postać ułamka substancji rozłożonej według RÓWNANIA 5.5 przedstawionego na stronie 51.

Następnie dokonano analizy:

- wykresów przedstawiających zależności $f(t) = x$ oraz $f(x) = \frac{dx}{dt}$ (RYCINA 5.15) oraz
- współczynników korelacji r (TABELA 5.16) charakteryzujących zależności uzyskane poprzez analizę danych eksperymentalnych przedstawionymi w TABELI 5.1 równaniami modeli kinetycznych.



(a)



(b)

RYCINA 5.15

Analiza wykresów mająca na celu dobór modelu kinetycznego w warunkach $RH = 0\%$, gdzie (a) przedstawia zależność $f(t) = x$, natomiast (b) $f(x) = \frac{dx}{dt}$ ($T = 373\text{ K}$, $RH = 0\%$).

TABELA 5.16

Dobór modelu kinetycznego ($T = 373\text{ K}$, $RH = 0\%$) do opisu danych doświadczalnych rozkładu cilazaprilu w substancji - współczynniki korelacji r zależności uzyskanych podczas analizy danych doświadczalnych różnymi równaniami kinetycznymi, gdzie t opisuje cały czas trwania testu a $(t)'$ jest skorygowanym czasem uwzględniającym eksperymentalne punkty należące tylko do etapu końcowego reakcji

Symbol	$f(x) = kt$ r	$f(x) = k(t)'$ r
<i>Modele powstawania miejsc aktywnych</i>		
P2	0,745	0,895
P3	0,722	0,891
P4	0,709	0,889
A2	0,953	0,991
A3	0,928	0,986
A4	0,913	0,983
B1	0,954	0,996
<i>Modele kontrakcji geometrycznych kształtów</i>		
R2	0,920	0,969
R2	0,952	0,984
<i>Modele dyfuzji</i>		
D1	0,887	0,929
D2	0,946	0,965
D3	0,993	0,998
D4	0,971	0,982
<i>Modele rzędu reakcji</i>		
F0/R1	0,805	0,907
F1*	0,992	0,999
F2	0,896	0,903
F3	0,769	0,785
*Model F1 - najlepsza korelacja danych		

Podczas analizy danych wszystkimi modelami matematycznymi, eksperymentalne punkty początku reakcji rozkładu w powtarzalny sposób odbiegały od wyznaczonych za pomocą modelu zależności prostoliniowych. Taki przebieg krzywych rozkładu wskazuje na dwuetapowy przebieg reakcji rozkładu.

Do interpretacji etapu końcowego zaadoptowano matematyczny model reakcji pierwszego rzędu (F1) ze względu na wysoki współczynnik korelacji danych eksperymentalnych i graficzną ocenę krzywych opisujących reakcję rozkładu.

Natomiast etap początkowy objaśniono używając metody odejmowania. [43]

5.9.8 Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu *w substancji* w warunkach braku wilgoci w powietrzu

Półlogarytmiczny wykres stężenia cilazaprilu jako funkcji czasu testu kinetycznego jest krzywoliniowy, dwu-wykładniczy. Charakteryzuje się wyraźnie zaznaczonymi dwoma etapami reakcji rozkładu. Etap końcowy ma prostoliniowy przebieg. Natomiast etap początkowy rozkładu cilazaprilu, którego punkty doświadczalne zaznaczono na wykresach przerywanymi liniami pionowymi, jest szybszy i bardziej gwałtowny.

Poniżej przedstawiono szczegółową analizę obserwowanej reakcji rozkładu.

Etap końcowy

Malejące stężenie cilazaprilu *w substancji* etapu końcowego przy braku wilgoci w powietrzu stanowi funkcję wykładniczą i świadczy pośrednio o tym, że rozkład zachodzi zgodnie z matematycznym modelem reakcji pierwszego rzędu.

Liniowa zależność, niezbędna do obliczenia parametrów rozkładu przedstawia się następująco:

$$\ln c = a \cdot t + b \quad (5.10)$$

gdzie c jest procentowym stężeniem cilazaprilu w próbkach poddanych testom kinetycznym, t - czas przechowywania próbki w warunkach kinetycznych wyrażonym w godzinach, a to współczynnik nachylenia prostej, natomiast b - wyraz wolny (wartości a i b wyznaczone zostały metodą najmniejszych kwadratów).

Obserwowane stałe szybkości reakcji etapu końcowego reakcji rozkładu zostały wyznaczone z nachylenia prostej i przeliczone według RÓWNANIA 5.7 opisanego na stronie 54.

Etap początkowy

Punkty eksperymentalne należące do początku reakcji nie da się wytłumaczyć prostym modelem kinetycznym, co wskazuje na złożoność reakcji rozkładu cilazaprilu w tym czasie.

Wybór odpowiedniego modelu matematycznego został oparty na porównaniu krzywej rozkładu z obserwowanymi krzywymi rozkładu w piśmiennictwie. Okazało się, że podobny mechanizm kinetyczny rozkładu zaobserwowano dla uwodnionych soli penicyliny w braku wilgoci w powietrzu (mechanizm ten przypuszcza występowanie następczych reakcji). [43]

W obu przypadkach półlogarytmiczna krzywa rozkładu cilazaprilu w czasie wskazuje na dwu-wykładniczy model matematyczny.

Dane eksperymentalne przemawiają za faktem, że obserwowana stała szybkości reakcji rozkładu (k' [1/s]) w tym przypadku jest wypadkową stałych szybkości reakcji dwóch równocześnie zachodzących procesów (k_1 i k_2).

Analizę danych z okresu początkowego przeprowadzono techniką odejmowania, która zakłada następującą zależność pomiędzy stałymi szybkościami reakcji $k_1 \gg k_2$, gdyż

jedynie wtedy podczas analizy możemy przyjąć, że $e^{a \cdot t} \rightarrow 0$.

Pierwszym etapem techniki odejmowania było wyznaczenie stałej szybkości reakcji etapu końcowego (k_2), według RÓWNANIA 5.10.

Drugi etap obejmował zastosowanie techniki odejmowania. Polega ona na wyliczeniu stałej szybkości reakcji k_1 ze współczynnika kierunkowego prostej opisanej równaniem:

$$\ln(c - c') = a \cdot t + b \quad (5.11)$$

gdzie c jest stężeniem uzyskanym doświadczalnie, natomiast c' zostało ekstrapolowane z wykorzystaniem równania etapu końcowego reakcji, a - współczynnikiem kierunkowym prostej, z którego wyliczono stałą szybkości reakcji k_1 według RÓWNANIA 5.7 ze strony 54, natomiast b wyrazem wolnym.

Postulowany matematyczny model tłumaczy hipoteza, która zakłada, że zaabsorbowana woda, którą cilazapril posiada w swojej strukturze jest odpowiedzialna za obserwowane zjawisko. Przypuszcza się, że pierwszy etap reakcji rozkładu obejmuje dwie reakcje rozkładu cilazaprilu o różnych szybkościach reakcji:

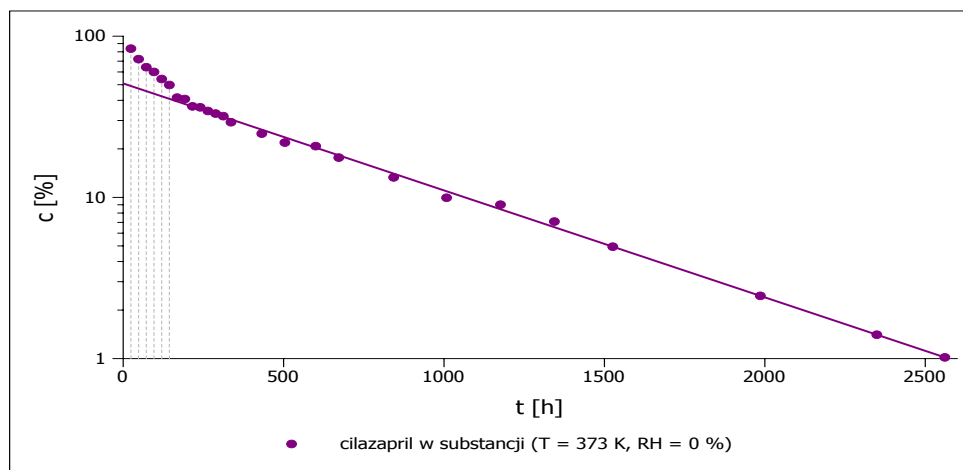
- k_1 - krótki i szybki etap rozkładu cilazaprilu najprawdopodobniej w jednocząsteczkowej warstwie wilgoci zawartej w substancji,
- k_2 - trwający przez cały czas testu kinetycznego rozkład w całej substancji.

5.9.9 Wpływ zmiennej temperatury na trwałość cilazaprilu w substancji w warunkach braku wilgoci w powietrzu

W warunkach braku wilgoci w powietrzu wzrastająca temperatura przyspiesza reakcje rozkładu cilazaprilu. Stałe szybkości reakcji etapu początkowego i końcowego rosną a czas trwania etapu początkowego maleje. (RYCINY 5.16, 5.17, 5.18, 5.19 oraz TABELA 5.17, 5.18, 5.19, 5.20, 5.21, 5.22, 5.23, 5.24)

Równania Arrhenius'a przedstawiają zależność stałych szybkości reakcji od temperatury. Są one prostoliniowe zarówno dla początkowego etapu, jak i końcowego. Z wyznaczonych parametrów termodynamicznych wynika, że etap początkowy charakteryzuje się mniejszą energią aktywacji niż końcowy. (TABELA 5.25)

$$T = 373 \text{ K}, RH = 0 \%$$



RYCINA 5.16

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 373 \text{ K}$, $RH = 0 \%$).

TABELA 5.17

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 373$ K, $RH = 0$ % dla etapu końcowego reakcji wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]
1	168	1,5816	0,6578	41,5898
2	192	1,5816	0,6448	40,7652
3	216	1,5816	0,5805	36,7005
4	240	1,5816	0,5727	36,2068
5	264	1,5816	0,6103	38,5878
6	288	1,5816	0,4829	30,5345
7	312	1,5816	0,5425	34,3019
8	336	1,5816	0,4629	29,2653
9	432	1,4686	0,3653	24,8721
10	504	1,4686	0,3214	21,8852
11	600	1,4686	0,3055	20,8011
12	672	1,4686	0,2593	17,6594
13	843	1,5636	0,2081	13,3103
14	1008	1,5636	0,1556	9,9507
15	1176	1,5636	0,1410	9,0150
16	1344	1,4006	0,0992	7,0834
17	1526	1,4006	0,0693	4,9473
18	1986	1,4006	0,0343	2,4511
19	2349	1,4006	0,0197	1,4071
20	2561	1,4006	0,0143	1,1078

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0015$	$\Delta a = 0,000032$	$S_a = 0,000015$
$b = 3,9303$	$\Delta b = 0,0354$	$S_b = 0,0168$
$S_y = 0,0489$	$r = -0,999$	

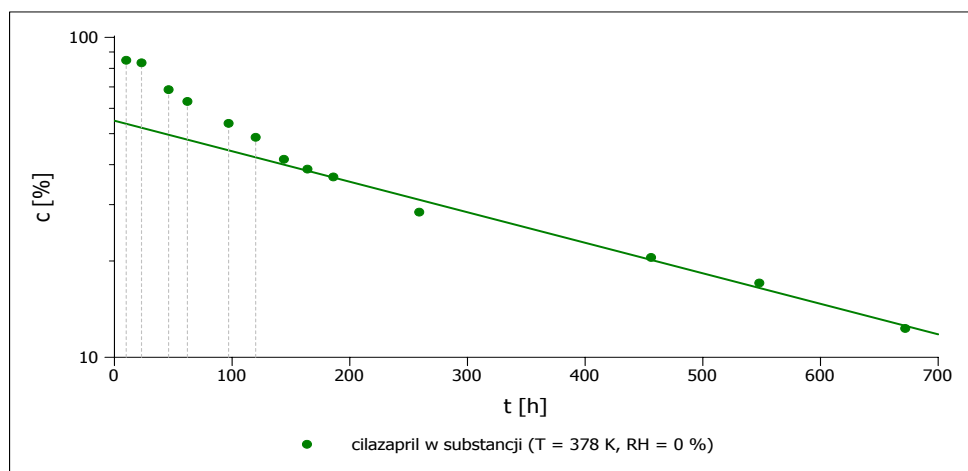
PARAMETRY KINETYCZNE	
k_2 [1/s]	$4,24 \cdot 10^{-7}$
Δk_2 [1/s]	$8,78 \cdot 10^{-9}$

TABELA 5.18

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 373$ K, $RH = 0$ % dla etapu początkowego reakcji wraz z wyznaczonymi metodą odejmowania parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%] (c)' [%]	c-(c)' [%]
1	24	1,5816	1,3244	83,7332 49,0879	34,6452
2	48	1,5816	1,1400	72,0744 47,3207	24,7537
3	72	1,5816	1,0157	64,2190 45,6171	18,6020
4	96	1,5816	0,9492	60,0141 43,9748	16,0393
5	120	1,5816	0,8581	54,2557 42,3916	11,8641
6	144	1,5816	0,7879	49,8130 40,8654	8,9476
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,0109$		$\Delta a = 0,0013$		$S_a = 0,00048$	
$b = 3,7652$		$\Delta b = 0,1256$		$S_b = 0,0452$	
$S_y = 0,0486$		$r = -0,996$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k_1 [1/s]				$3,02 \cdot 10^{-6}$	
Δk_1 [1/s]				$3,73 \cdot 10^{-7}$	

$T = 378 \text{ K}$, $RH = 0 \%$



RYCINA 5.17

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0 \%$).

TABELA 5.19

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 378 \text{ K}$, $RH = 0 \%$ dla etapu końcowego reakcji wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]
1	144	1,5001	0,6238	41,5831
2	164	1,5001	0,5812	38,7420
3	186	1,5001	0,5494	36,6214
4	259	1,5001	0,4264	28,4266
5	456	1,2975	0,2662	20,5181
6	548	1,2975	0,2215	17,0699
7	672	1,2975	0,1597	12,3071

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0022$	$\Delta a = 0,00024$	$S_a = 0,000093$
$b = 4,0051$	$\Delta b = 0,0953$	$S_b = 0,0371$
$S_y = 0,0480$	$r = -0,996$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k_2 [1/s]	$6,10 \cdot 10^{-7}$
Δk_2 [1/s]	$6,65 \cdot 10^{-8}$

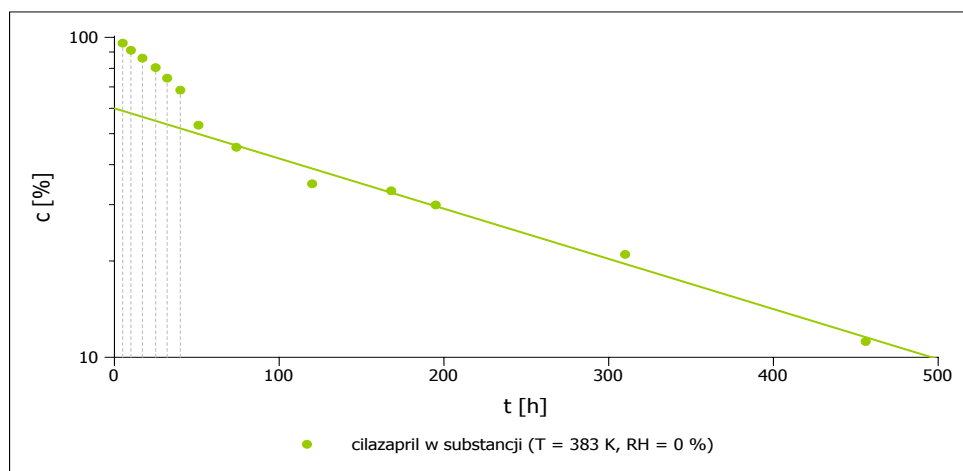
TABELA 5.20

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 378$ K, $RH = 0$ % dla etapu początkowego reakcji wraz z wyznaczonymi metodą odejmowania parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%] (c)' [%]	c-(c)' [%]
1	10	1,5001	1,2721	84,7983 53,6867	31,1116
2	23	1,5001	1,2491	83,2666 52,1756	31,0910
3	46	1,2975	0,8906	68,6360 49,6055	19,0305
4	62	1,2975	0,8181	63,0513 47,8927	15,1586
5	97	1,2975	0,6987	53,8493 44,3493	9,5000
6	120	1,2975	0,6321	48,7137 42,1648	6,5489

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0147$	$\Delta a = 0,0021$	$S_a = 0,00077$
$b = 3,6580$	$\Delta b = 0,1530$	$S_b = 0,0551$
$S_y = 0,0736$	$r = -0,995$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k_1 [1/s]	$4,10 \cdot 10^{-6}$
Δk_1 [1/s]	$5,97 \cdot 10^{-7}$

$T = 383 \text{ K}, RH = 0 \%$


RYCINA 5.18

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 383 \text{ K}, RH = 0 \%$).

TABELA 5.21

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 383 \text{ K}, RH = 0 \%$ dla etapu końcowego reakcji wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]
1	51	1,5001	0,7973	53,1497
2	74	1,4400	0,6529	45,3403
3	120	1,2975	0,4523	34,8621
4	168	1,2975	0,4300	33,1380
5	195	1,4400	0,4311	29,9346
6	310	1,4400	0,3019	20,9675
7	456	1,2975	0,1453	11,2002

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0036$	$\Delta a = 0,00049$	$S_a = 0,00019$
$b = 4,0943$	$\Delta b = 0,1152$	$S_b = 0,0448$
$S_y = 0,0664$	$r = -0,993$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k_2 [1/s]	$1,00 \cdot 10^{-6}$
Δk_2 [1/s]	$1,35 \cdot 10^{-7}$

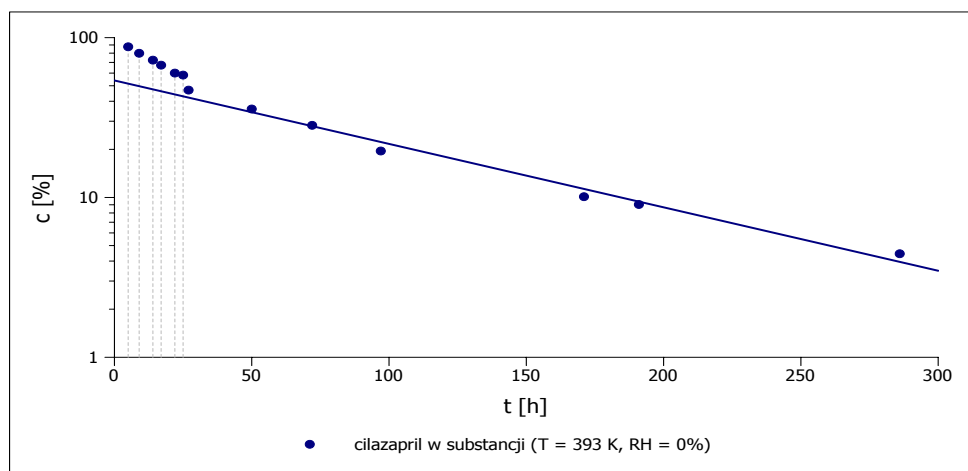
TABELA 5.22

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 383$ K, $RH = 0$ % dla etapu początkowego reakcji wraz z wyznaczonymi metodą odejmowania parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%] (c)' [%]	c-(c)' [%]
1	5	1,2975	1,2444	95,9092 58,9220	36,9872
2	10	1,2975	1,1823	91,1215 57,8675	33,2540
3	17	1,2975	1,1173	86,1090 56,4228	29,6862
4	25	1,5001	1,2067	80,4415 54,8158	25,6257
5	32	1,5001	1,1184	74,5519 53,4473	21,1046
6	40	1,5001	1,0262	68,4077 51,9251	16,4826

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0224$	$\Delta a = 0,0040$	$S_a = 0,0015$
$b = 3,7482$	$\Delta b = 0,0995$	$S_b = 0,0358$
$S_y = 0,0433$	$r = -0,992$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k_1 [1/s]	$6,22 \cdot 10^{-6}$
Δk_1 [1/s]	$1,12 \cdot 10^{-6}$

$T = 393 \text{ K}, RH = 0 \%$


RYCINA 5.19

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w warunkach kinetycznych ($T = 393 \text{ K}, RH = 0 \%$).

TABELA 5.23

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 393 \text{ K}, RH = 0 \%$ dla etapu końcowego reakcji wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]
1	27	1,4400	0,6763	46,9650
2	50	1,4400	0,5151	35,7712
3	72	1,2975	0,3669	28,2745
4	97	1,2975	0,2534	19,5323
5	171	1,4400	0,1456	10,1133
6	191	1,4400	0,1302	9,0392
7	286	1,4400	0,0640	4,4459

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0091$	$\Delta a = 0,0012$	$S_a = 0,00048$
$b = 3,9882$	$\Delta b = 0,1892$	$S_b = 0,0736$
$S_y = 0,1083$	$r = -0,993$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k_2 [1/s]	$2,54 \cdot 10^{-6}$
Δk_2 [1/s]	$3,42 \cdot 10^{-7}$

TABELA 5.24

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w substancji w wyniku rozkładu w $T = 393$ K, $RH = 0$ % dla etapu początkowego reakcji wraz z wyznaczonymi metodą odejmowania parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%] (c)' [%]	c-(c)' [%]
1	5	1,2975	1,1376	87,6786 51,5461	36,1325
2	9	1,2975	1,0361	79,8525 49,6961	30,1564
3	14	1,2975	0,9383	72,3176 47,4766	24,8410
4	17	1,2975	0,8729	67,2778 46,1928	21,0850
5	22	1,2975	0,7788	60,0247 44,1298	15,8949
6	25	1,2975	0,7566	58,3121 42,9364	15,3757

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0449$	$\Delta a = 0,0064$	$S_a = 0,0023$
$b = 3,8138$	$\Delta b = 0,1071$	$S_b = 0,0386$
$S_y = 0,0390$	$r = -0,995$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k_1 [1/s]	$1,25 \cdot 10^{-5}$
Δk_1 [1/s]	$1,77 \cdot 10^{-6}$

Zależność Arrhenius'a ($T = 373 - 393 \text{ K}$ i $RH = 0 \%$)

TABELA 5.25

Parametry prostej opisującej zależność Arrhenius'a - półlogarytmiczną funkcję liniową stałych szybkości reakcji (k_1, k_2 [1/s]) i odwrotności temperatury ($1/T$ [1/K]) dla reakcji rozkładu cilazaprilu w substancji w warunkach kinetycznych $T = 373 - 393 \text{ K}$, $RH = 0 \%$ oraz obliczone parametry termodynamiczne

Parametry prostej opisującej zależność Arrhenius'a		
	k_1	k_2
<i>Parametry prostej $\ln k = a \frac{1}{T} + \ln A$</i>		
a	-10551,48	-13307,36
Δa	1550,88	2517,01
S_a	360,42	584,94
$\ln A$	15,55	20,95
$\Delta \ln A$	4,06	6,60
S_b	0,94	1,53
S_y	0,04	0,06
r	-0,999	-0,998
<i>Parametry termodynamiczne</i>		
E_a [kJ/mol]	87,73	110,64
ΔE_a	12,90	20,93
H_{akt} [kJ/mol]	85,25	108,17
ΔH_{akt}	15,37	23,41
S_{akt} [J/(K mol)]	-115,62	-70,71
ΔS_{akt}	211,12	190,07

5.9.10 Identyfikacja produktów rozkładu

Analizie jakościowej identyfikacyjnej metodą spektrofotometrii w podczerwieni oraz HPLC-MS poddano trzy próby:

- PRÓBA 1 - cilazapril w substancji w celu potwierdzenia tożsamości

oraz w celu identyfikacji

- PRÓBA 2 - produkt rozkładu cilazaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76 \%$, $t = 408 \text{ h}$)
- PRÓBA 3 - produkt rozkładu cilazaprilu ($T = 373 \text{ K}$, $RH = 0 \%$, $t = 2608 \text{ h}$)

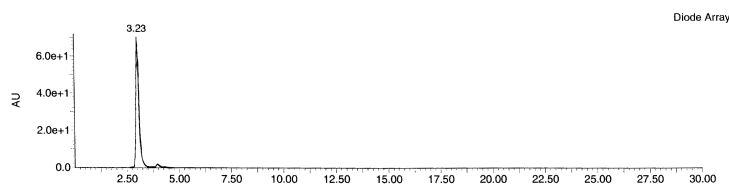
HPLC-MS

Potwierdzenie tożsamości cilazaprilu. Przedstawiony na RYCINIE 5.20 chromatogram HPLC-MS przedstawia obecność piku pochodzącego od jednej substancji o czasie retencji 3,23 minuty. Widma mas dla wymienionego powyżej czasu retencji charakteryzują się pasmami o wartości m/z odpowiadające jonom

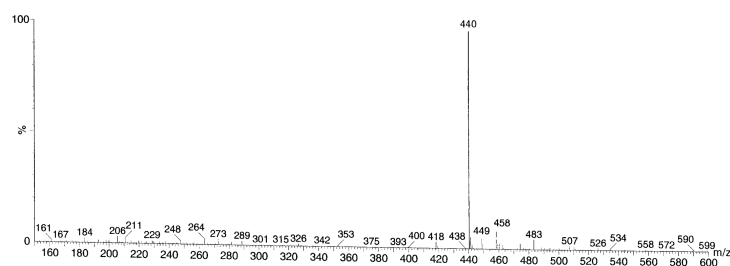
- $[M - H^+]^-$ o $m/z = 416$

- $[M + Na^+]^+$ o $m/z = 440$

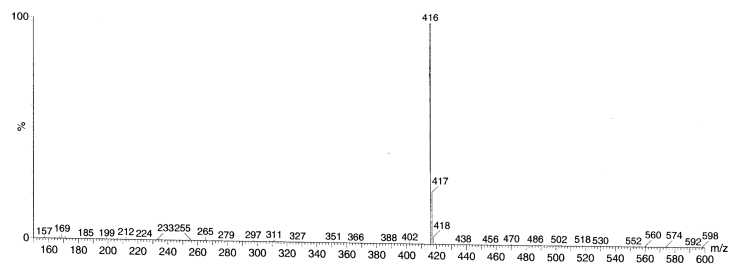
które wskazują na związek o masie cząsteczkowej 417 u. Dodatkowo wykreślone widmo w nadfiolecie posiada maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 211$ nm.



(a)



(b)



(c)

RYCINA 5.20

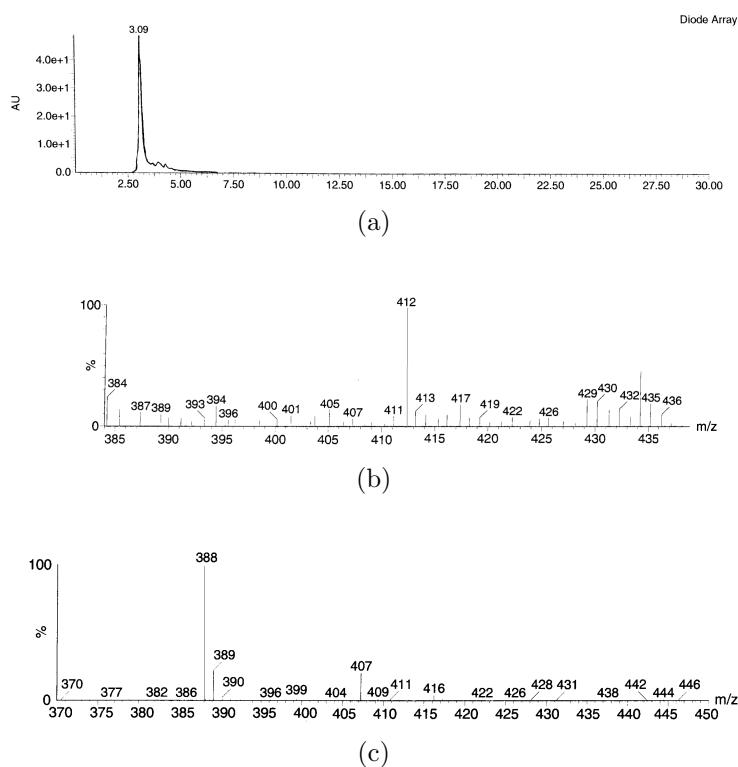
PRÓBA 1 - chromatogram (a) i widma MS cilazaprilu w substancji (b) postać kationowa i (c) postać anionowa.

Analiza produktu rozkładu cilazaprilu $RH = 76,4$ %. Przedstawiony na RYCI-NIE 5.21 chromatogram HPLC-MS przedstawia obecność pików pochodzących od jednej substancji o czasie retencji 3,09 minuty. Widma mas dla wymienionego powyżej czasu retencji charakteryzują się pasmami o wartości m/z odpowiadające jonom

- $[M - H^+]^-$ o $m/z = 388$
- $[M + Na^+]^+$ o $m/z = 412$

które wskazują na związek o masie cząsteczkowej 389 u. Wykreślone dla produktu rozkładu widmo w nadfiolecie posiada maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 204$ nm.

Zidentyfikowanym związkiem jest cilazaprilat.



RYCINA 5.21

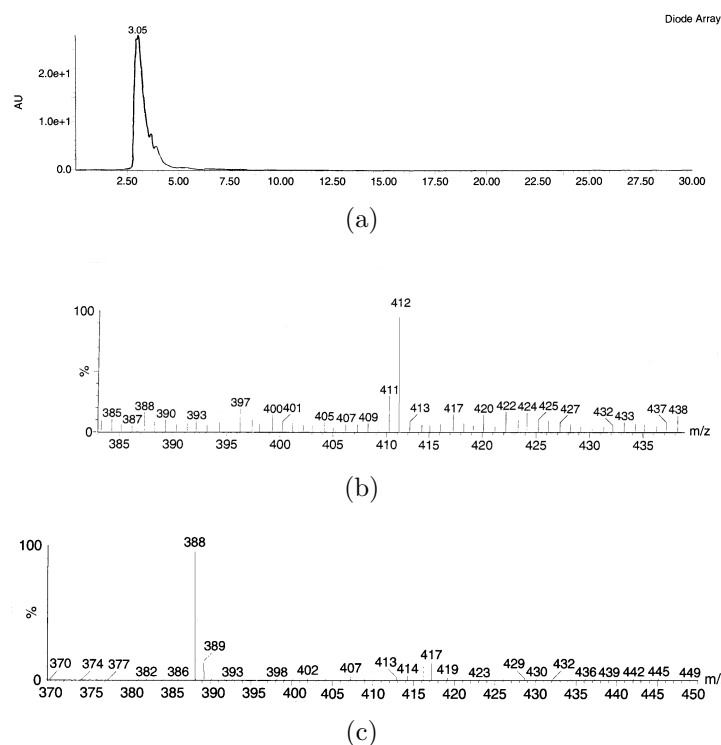
PRÓBA 2 - chromatogram (a) i widma MS produktu rozkładu cilazaprilu (b) postać kationowa i (c) postać anionowa.

Analiza produktu rozkładu cilazaprilu $RH = 0\%$. Przedstawiony na RYCINIE 5.22 chromatogram HPLC-MS przedstawia obecność piku pochodzącego od jednej substancji o czasie retencji 3,09 minuty. Widma mas dla wymienionego powyżej czasu retencji charakteryzują się pasmami o wartości m/z odpowiadające jonom

- $[M - H]^-$ o $m/z = 388$
- $[M + Na]^+$ o $m/z = 412$

które wskazują na związek o masie cząsteczkowej 389 u. Wykreślone dla produktu rozkładu widmo w nadfiolecie posiada maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 206$ nm.

Zidentyfikowanym związkiem jest cilazaprilat.

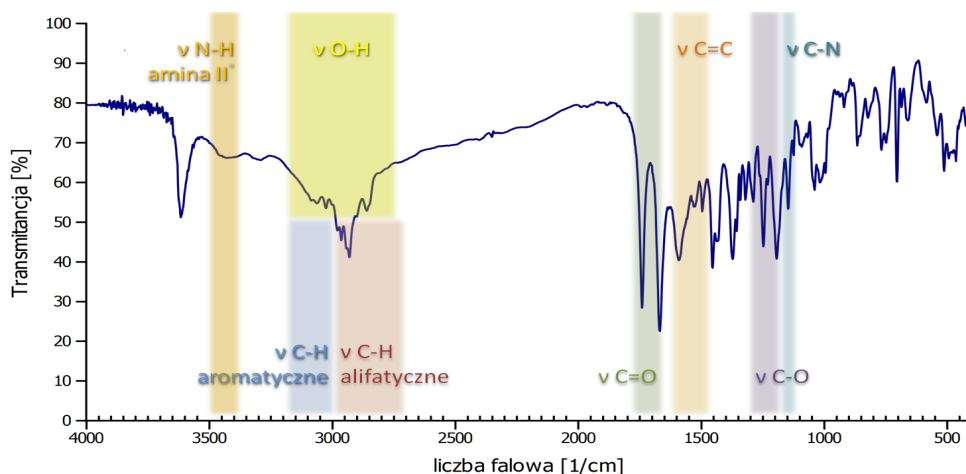


RYCINA 5.22

PRÓBA 3 - chromatogram (a) i widma MS produktu rozkładu cilazaprilu (b) postać kationowa i (c) postać anionowa.

Spektrofotometria w podczerwieni - IR

Potwierdzenie tożsamości cilazaprilu. Analiza widma IR cilazaprilu *w substancji* (RYCINA 5.23) potwierdza jego tożsamość. Zaobserwowano pasma odpowiadające drganiom grup funkcyjnych, które cząsteczka cilazaprilu posiada w swojej strukturze: karbonylowej, estrowej, amidowej, aminowej, węgla pierścienia aromatycznego i alifatycznych. (TABELA 5.26). Ze względu na złożoną budowę związku pasma o podobnym charakterze nakładają się.



RYCINA 5.23

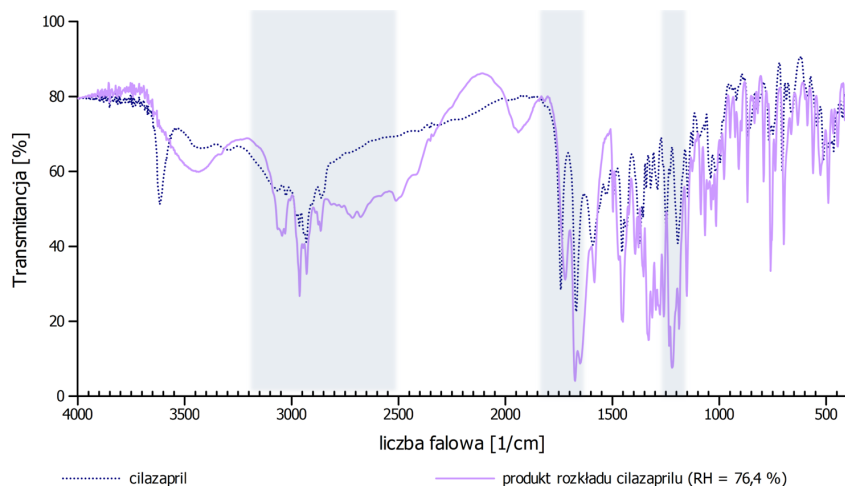
Widmo IR cilazaprilu w substancji.

TABELA 5.26

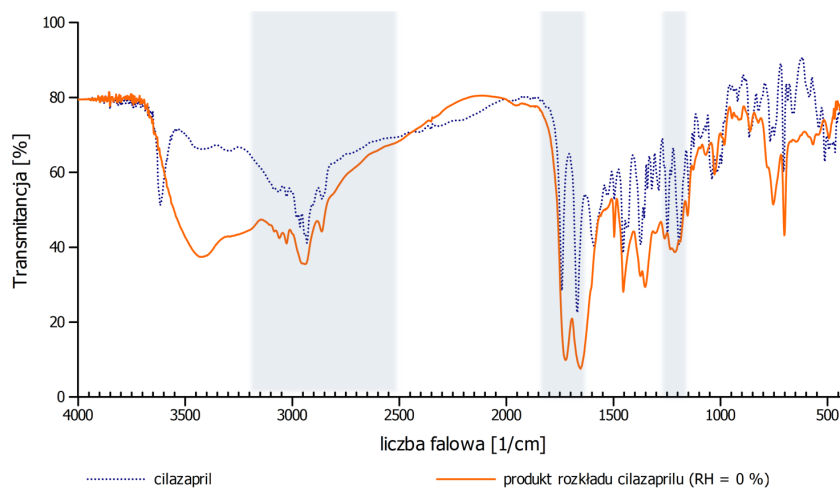
Analiza widma IR cilazaprilu w substancji - opis charakterystycznych głównych pasm

Wiązanie	Pasma absorpcji [1/cm]	Opis
C-H	2932, 2860	drgania rozciągające alifatyczne
	1454	drgania zginające (CH ₂)
	1373	drgania zginające (CH ₃)
	3026	drgania rozciągające pierścienia aromatycznego
C=C	1591	pierścień aromatyczny
N-H	3282	pojedyncze pasmo amina II rzędowa
O-H	2500-3000	szerokie pasmo pokrywające się z pasmami drgań C-H
C=O	1668	amidowe
	1742	estrowe
C-O	1248, 1194	rozciągające drgania, dwa pasma charakterystyczne dla estrów
C-N	1148	drgania rozciągające

Analiza produktu rozkładu cilazaprilu w substancji. Eksploracja porównawcza widm produktu rozkładu cilazaprilu w substancji z widmami cilazaprilu została przedstawiona na RYCINIE 5.24. Obserwowane zmiany w widmach potwierdzają, że produktem rozkładu jest cilazaprilat, który powstaje z cilazaprilu w reakcji deestryfikacji.



(a)



(b)

RYCINA 5.24

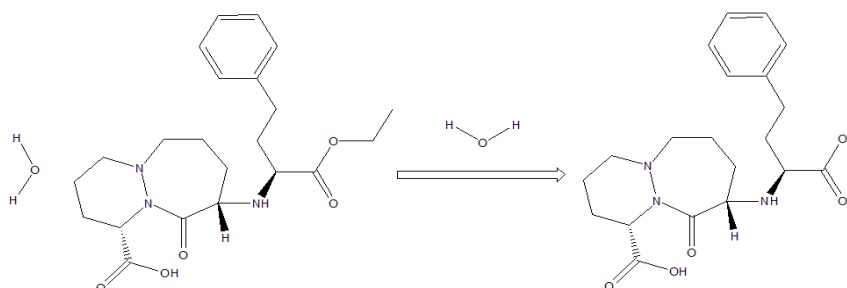
Widma IR produktu rozkładu cilazaprilu substancji w warunkach (a) $RH = 76,4\%$ i (b) $RH = 0\%$.

Na widmach IR produktu rozkładu cilazaprilu spostrzeżono pasma świadczące o destryfikacji (przemianie estru do kwasu karboksylowego)

- w zakresie pasm rozciągających C-H grup alkilowych i aromatycznych (2500 - 3300 1/cm) pojawia się szerokie pasmo drgań rozciągających O-H, wskazujące na fakt, że zwiększa się liczba tych ugrupowań w cząsteczce,
- pasmo drgań rozciągających C=O dla produktu rozkładu przesuwają się w kierunku mniejszej liczby falowej, co jest zjawiskiem charakterystycznym dla kwasów karboksylowych,
- pasmo rozciągające C-O produktu rozkładu pojawia się w obszarze 1210 - 1320 1/cm, podczas gdy dla estrowej formy cilazaprilu występuje ono w zakresie 1000 - 1300 1/cm i ma postać dwóch pasm.

5.9.11 Proponowany mechanizm rozkładu cilazaprilu

Na podstawie wyników identyfikacji produktu rozkładu możliwe jest ustalenie prawdopodobnego mechanizmu rozkładu. Postuluje się, że cilazapril *w substancji* rozkłada się poprzez reakcję deestryfikacji do cilazaprilatu. (RYCINA 5.25)



RYCINA 5.25

Mechanizm rozkładu cilazaprilu w substancji.

5.10 Podsumowanie

Cilazapril *w substancji* jest nietrwały chemicznie. Reakcja rozkładu jest przyspieszana zarówno przez wzrastającą temperaturę, jak i wilgotność względną powietrza. Z tego względu zarówno podczas przechowywania substancji, procesów technologicznych postaci leku należy ograniczać kontakt cilazaprilu z tymi czynnikami.

Woda (zarówno ta zawarta w powietrzu, jak i substancji) wywiera negatywny wpływ na stabilność cilazaprilu. Jest to związane z mechanizmem rozkładu, którym jest deestryfikacja - hydroliza estru, gdzie cząsteczka wody jest kluczowa. Powstający produkt rozkładu zmniejsza dostępność farmaceutyczną leku, gdyż cilazaprilat nie wchłania się z przewodu pokarmowego.

Trwałość cilazaprilu w obecności wybranych substancji pomocniczych

6.1	Substancje pomocnicze w tabletkach	90
6.2	Substancje pomocnicze stosowane w tabletkach z cilazapilem	91
6.2.1	Hypromeloza	92
6.2.2	Laktoza jednowodna	93
6.2.3	Skrobia kukurydziana	95
6.2.4	Stearylofumaratan sodu	97
6.2.5	Talk	98
6.3	Szczegółowe cele badania wpływu substancji pomocniczych na trwałość cilazaprilu	100
6.4	Materiały i metody	101
6.5	Procedury	101
6.6	Wyniki i ich omówienie	103
6.6.1	Selektywność metody HPLC	103
6.6.2	Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w obecności substancji pomocniczych	103
6.6.3	Wpływ hypromelozy na trwałość cilazaprilu	104
6.6.4	Wpływ laktozy jednowodnej na trwałość cilazaprilu	108
6.6.5	Wpływ skrobi kukurydzianej na trwałość cilazaprilu	112
6.6.6	Wpływ talku na trwałość cilazaprilu	114
6.7	Podsumowanie	117

6.1 Substancje pomocnicze w tabletkach

Trwałość każdej postaci leku, zależy od wielu czynników. Wpływają na nią, między innymi: właściwości substancji leczniczej, proces produkcji oraz substancje pomocnicze, konieczne do uzyskania pożądanej postaci leku. Niniejszy ROZDZIAŁ zostanie poświęcony tym ostatnim.

International Pharmaceutical Excipients Council (IPEC) jest organizacją zajmującą się jakością substancji pomocniczych w przemyśle farmaceutycznym. Zrzesza producentów i odbiorców końcowych tychże substancji. Od czasu kiedy powstała (1991 rok) jej cele skupiają się na substancjach pomocniczych. Przyczynia się do powstawania i następującej harmonizacji standardów i wytycznych, promuje nowe związki, optuje za rozwojem dobrej praktyki.

Według definicji *IPEC* substancje pomocnicze to substancje bezpieczne, niebędące substancją biologicznie czynną, które w postaci leku zostały umieszczone intencjonalnie. Celowość stosowania wiąże się z szeregiem funkcji, jakie mają spełniać rozpoczynając od ułatwienia procesu produkcji, zwiększenia i wspomaganie trwałości, biodostępności, akceptowalności przez pacjenta, umożliwienia identyfikacji produktu czy też innych funkcji przyczyniających się do ogólnego bezpieczeństwa, skuteczności leku i trwałości podczas dostarczania, przechowywania i stosowania. [79]

Spełnianie wielorakich funkcji przez substancje pomocnicze w postaci leku, jest możliwe dzięki ich ogromnemu wyborowi. Wyróżniamy w tej grupie związki o różnej budowie chemicznej i właściwościach fizycznych. [80]

W technologii postaci leku, jaką jest tabletki, używane są:

- substancje wypełniające
- substancje poślizgowe
- substancje wiążące
- substancje zwilżające
- substancje ułatwiające rozpad tabletki
- substancje powlekające
- substancje kolorujące i słodzące. [1, 81]

Selekcja odpowiednich składników postaci leku jest procesem skomplikowanym i trudnym. Wymaga rozważenia fizycznych, chemicznych i biologicznych właściwości wszystkich składników leku. [1]

Wybór ten powinien być podjęty na podstawie trzech wytycznych. Pierwszą z nich jest zgodność z substancją leczniczą. W tym przypadku należy przeanalizować wszystkie substancje pomocnicze pod względem posiadania takich grup funkcyjnych, które mogą uczestniczyć w reakcjach przyspieszających rozkład leku. Duże znaczenie ma także wilgoć i woda hydratacyjna substancji. Drugą wytyczną jest wpływ na skuteczność leku, czyli na uwalnianie substancji czynnej z postaci leku. Ostatnią, choć równie ważną wytyczną jest koszt przygotowania postaci leku. [81]

Efektom końcowym jest lek, który ma być trwały fizycznie oraz chemicznie, skuteczny, dobry i łatwy do przyjęcia oraz dobrze tolerowany. [1]

Z wyżej wymienionej definicji *IPEC* jasno wynika, że substancje pomocnicze nie powinny wykazywać działania terapeutycznego. Fakt, że zasadniczo tworzą postać leku i co za tym idzie występują w niej w ilości dużo większej niż substancja czynna, z jednej strony z pewnością przyczynia się do ich korzystnego wpływu na trwałość, bezpieczeństwo i skuteczność leku, natomiast z drugiej strony może prowadzić do interakcji. Ich wpływ na substancję czynną jest znany tylko z opisów przypadków i może być zarówno fizyczny, jak i chemiczny. W konsekwencji zmianie mogą ulegać właściwości fizykochemiczne substancji czynnej, czy też stałe szybkości jej rozkładu. [82]

Choć historycznie substancje pomocnicze uważano za inertne, z chemicznego punktu widzenia nie można ich nazwać absolutnie nieaktywnymi. Każdy związek chemiczny charakteryzuje się specyficzną dla siebie reaktywnością. W przypadku substancji pomocniczych jest ona mała, jednak przy zaistnieniu określonych warunków chemicznych i fizycznych powolne reakcje rozkładu i interakcji pomiędzy składnikami postaci leku mogą zachodzić, tym bardziej, że w postaci leku znajdują się w dużych ilościach. Zdarza się również, że zawierają grupy funkcyjne, które mogą uczestniczyć w przemianach fizycznych i reakcjach chemicznych prowadzących do rozkładu leku. [83, 84] Jedną z możliwości wystąpienia interakcji jest płaszczyzna lek-substancja pomocnicza. Dodatkowo substancje pomocnicze, oprócz uczestniczenia w reakcji rozkładu, mogą być źródłem wilgoci w postaci leku. Szczególne znaczenie ma ten fakt dla leków wrażliwych na wilgoć, gdyż w takim przypadku woda może wpływać na trwałość leku. [72]

Choć większość substancji pomocniczych przyspiesza rozkład leku, niektóre z nich stabilizują ją pełniąc rolę ochronną dla substancji leczniczej w postaci leku. [85]

6.2 Substancje pomocnicze stosowane w tabletkach z cilazapilem

Składnikami rdzenia tabletek zawierających cilazapril, według kart charakterystyki leku, są następujące substancje pomocnicze: hypromeloza, laktoza jednowodna, skrobia kukurydziana, stearylofumaran sodu i talk. Ich właściwości oraz zastosowanie w technologii

wytwarzania tabletek opisano poniżej.

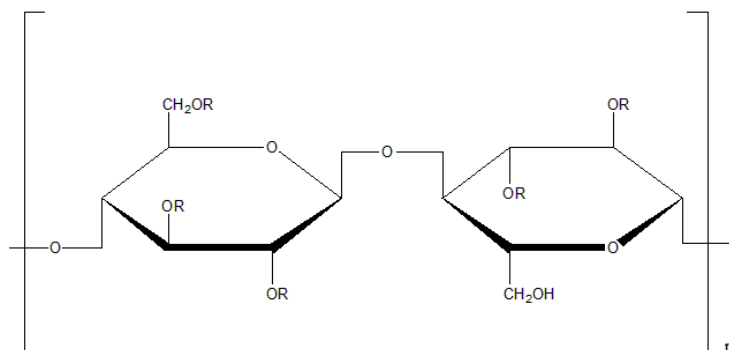
6.2.1 Hypromeloza

Synonimy

Hypromellosum, Hypromellose

Wzór chemiczny

Hypromeloza pod względem budowy chemicznej jest hydroksypropylometylocelulozą, czyli celulozą częściowo O - metylowaną i O - (2 - hydroksypropylowaną) (RYCINA 6.1).



RYCINA 6.1

Wzór strukturalny hypromelozy, gdzie podstawnikiem R jest: H, CH₃ lub CH₃CH(OH)CH₂.

Masa cząsteczkowa

Około 10000 – 1500000 u

Wygląd

Biały, żółtawobiały lub szarawobiały proszek (włóknisty lub w formie granulek), bez smaku i zapachu.

Opis

Hypromeloza jest pochodną celulozy. Wytwarzana jest z celulozy alkalicznej poddanej działaniu chlorometanu i tlenu propylenu (w wyniku reakcji powstają metylowe i hydroksypropylowe etery celulozy). Końcowym etapem produkcji jest oczyszczanie i proszkowanie. Reakcja metylowania i hydroksypropylowania dostarcza pochodnych o różnym stopniu podstawienia. Farmakopea amerykańska (USP) rodzaje hypromelozy opisuje czterocyfrową liczbą, gdzie pierwsze dwie liczby określają przybliżoną procentową zawartość grup metoksylowych, natomiast pozostałe dwie hydroksypropylowych.

Jest substancją stabilną, aczkolwiek higroskopijną po wysuszeniu. Absorbuje wilgoć z otoczenia w dużych ilościach, przy czym ilość ta zależy od początkowej zawartości wilgoci, wilgotności względnej powietrza i temperatury.

Właściwości funkcjonalne

Jest pochodną celulozy najczęściej używaną w produkcji matryc hydrofilowych, czyli takich, których jednym ze składników jest hydrofilowy polimer pęczniący. W technologii postaci tabletek może spełniać trzy funkcje w zależności od zastosowanych stężeń.

Rola hypromelozy, jako substancji wiążącej realizuje się w stężeniu 2 - 5 % (w/w) zarówno w procesie mokrej, jak i suchej granulacji oraz bezpośredniej kompresji.

Działanie opóźniające uwalnianie substancji czynnej z tabletki wykazuje hypromeloza o dużej gęstości (10 - 80 % (w/w)). W tym przypadku wydłużony efekt terapeutyczny jest uzyskiwany w wyniku stopniowego pęcznienia powierzchni tabletki stykającej się z wodą. Tworząca się warstwa żelu warunkuje kontrolowane uwalnianie substancji leczniczej.

Jako błonotwórcza substancja powlekająca stosowana jest w stężeniach 2 - 20 % (w/w). Mniej lepkie rodzaje hypromelozy wymagają użycia wody jako rozpuszczalnika a bardziej lepkie rozpuszczalników organicznych.

Niezdolności farmaceutyczne

Wykazuje niezgodności z substancjami utleniającymi.

Działania niepożądane

Substancja nietoksyczna i niedrażniąca, choć nadmierna podaż może działać przeczyszczająco. [55, 86, 87]

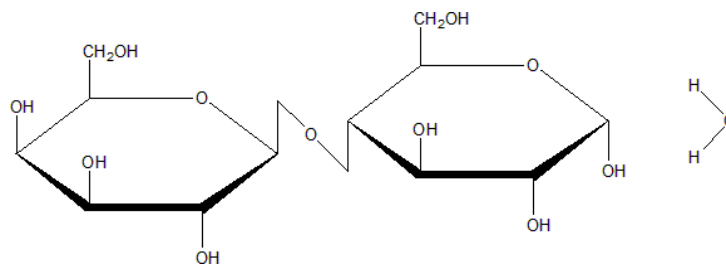
6.2.2 Laktoza jednowodna

Synonimy

Lactosum monohydricum, Lactose monohydrate

Wzór chemiczny

$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ (RYCINA 6.2)



RYCINA 6.2

Wzór strukturalny 0- β -D-galaktopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- α -D-glukopiranozyi jednowodnej.

Masa cząsteczkowa

360,3 u

Wygląd

Biały lub prawie biały krystaliczny proszek, bez zapachu, o lekko słodkim smaku.

Opis

Laktoza jest disacharydem pochodzenia naturalnego, pozyskiwanym głównie z mleka. W stanie stałym występuje w formie krystalicznej i amorficznej, a także w wielu postaciach izomerycznych, na co wpływ ma sposób krystalizacji i warunki suszenia.

Jest cukrem redukującym. Może reagować z pierwszo- i drugorzędownymi grupami aminowymi. Reakcja Millard'a zachodzi według mechanizmu addycji/przegrupowania i skutkuje zmianą barwy na brązową lub żółtobrązową.

Laktoza w substancji zawiera wodę krystaliczną w ilości około 5 % (w/w) wody krystalicznej, przy całkowitej zawartości wody w zakresie 4,5 - 5,5 % (w/w). Procesy, którym poddawana jest podczas produkcji postaci leku mogą wpływać na jej hydratację i strukturę.

Właściwości funkcjonalne

W przemyśle farmaceutycznym jest często stosowana (forma amorficzna, jak również krystaliczna) jako substancja wypełniająca tabletki oraz kapsułki. Dodatkowo laktoza zwiększa sypkość masy tabletkowej i ułatwia jej plastyczną deformację.

Laktoza dostępna jest w postaci gatunków charakteryzujących się różnymi właściwościami fizycznymi, takimi jak: stopień rozdrobnienia czy płynięcie proszku. Duży wybór pozwala dobrać odpowiednią formę laktozy w zależności od używanej aparatury i metody wytwarzania (granulacja na mokro, bezpośrednie tabletkowanie).

Niezgodności farmaceutyczne

Laktoza może pleśnieć w warunkach dużej wilgotności względnej powietrza $> 80\%$. Podczas przechowywania, szczególnie w obecności wysokiej wilgotności względnej powietrza i temperatury zmienia kolor na brązowy. Brązowienie następuje także w wyniku reakcji Milard'a zachodzącej pomiędzy laktozą a substancjami takimi jak: aminokwasy, aminofilina, pochodne amfetaminy i lisinopril.

Działania niepożądane

Działania niepożądane są głównie skutkiem nietolerancji laktozy. Choroba ta jest konsekwencją braku jelitowego enzymu - laktazy, który prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego. [55, 72, 86, 88, 89, 90]

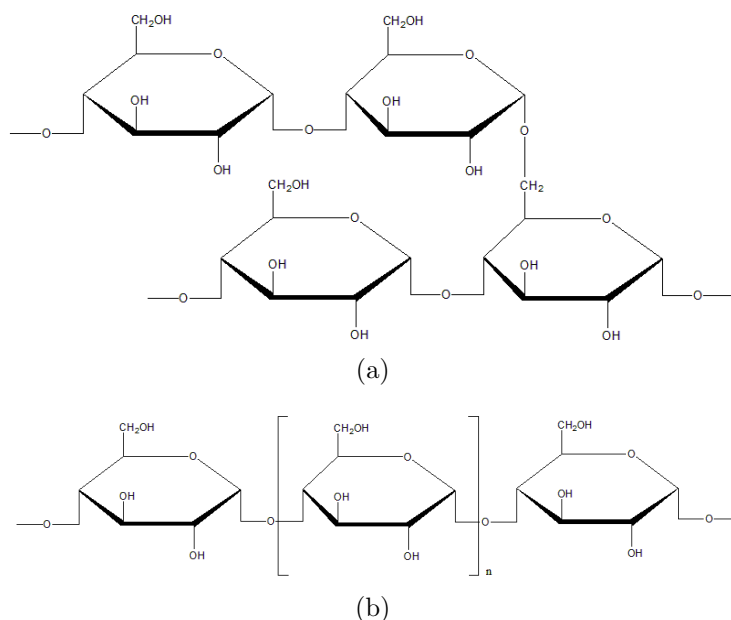
6.2.3 Skrobia kukurydziana

Synonimy

Maydis amyllum, Maize starch

Wzór chemiczny

$(C_6H_{10}O_5)_n$, gdzie $n = 300 - 1000$ (RYCINA 6.3)



RYCINA 6.3

Wzór strukturalny skrobi składającej się z (a) rozgałęzionej amylopektyny i (b) łańcuchowej amylozy (gdzie $n = 300 - 1000$).

Masa cząsteczkowa

50000 - 160000 u

Wygląd

Substancja bez smaku i zapachu. Ma postać delikatnego białego proszku złożonego z małych sferycznych lub owalnych ziaren, których rozmiar i kształt są charakterystyczne dla źródła pochodzenia.

Opis

Skrobia jest polisacharydem stanowiącym materiał zapasowy roślin. Składa się z dwóch polimerów o budowie opartej na α -glukozie: rozgałęzionej amylopektyny i nierozgałęzionej amylozy o mniejszej masie cząsteczkowej.

W zależności od rośliny, z której jest pozyskiwana wyróżniamy skrobię ziemniaczaną, ryżową, pszeniczną i kukurydzianą. Różnią się one od siebie wielkością ziarna, sypkością, i zdolnością pęcznienia.

Szybko absorbuje wilgoć z otoczenia, wykazuje właściwości higroskopijne. Przy wilgotności względnej powietrza około 50 % zawartość wilgoci w skrobi kukurydzianej wynosi 11 % a handlowe jej preparaty zawierają około 10 - 14 % wody.

Właściwości funkcjonalne

Skrobia kukurydziana, ze względu na właściwości adsorbujące i utrzymujące wilgoć, znalazła swoje zastosowanie, jako substancja wypełniająca, wiążąca, poślizgowa i ułatwiająca rozpad tabletki. Funkcję wiążącą spełnia w postaci świeżo przyrządzonej pasty o stężeniu 5 - 25 % w procesie granulacji na mokro. Ze względu na stopień pęcznienia w wodzie wynoszący 5 - 6 % należy do jednych z najczęściej używanych substancji ułatwiających rozpad tabletki. W tym celu stosuje się ją w stężeniu 3 - 15 %. Skrobia przyczynia się do wytworzenia w tabletkce kapilar, dzięki którym możliwa jest penetracja wody do jej wnętrza. Działanie poślizgowe spełnia wysuszona, w ilości do 5 % postaci leku.

Oprócz niewątpliwych zalet, wykorzystanie skrobi ma pewne wady. Należą do nich: zwiększanie kruchości tabletki oraz niestabilność fizyczna skrobi w postaci past i roztworów. Substancja ta jest stabilna jedynie w suchej postaci. Dodatek wody sprawia, że jest ona podatna na działanie drobnoustrojów. [86, 90]

Niezdolności farmaceutyczne

Brak

Działania niepożądane

Skrobia to substancja jadalna, generalnie nietoksyczna i niepowodująca podrażnień.

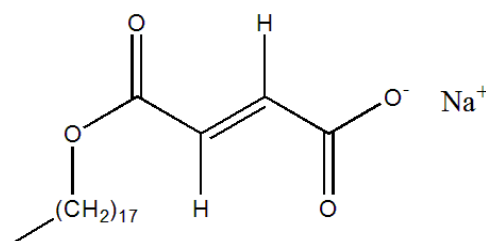
6.2.4 Stearylofumaran sodu

Synonimy

Natrii stearylīs fumaras, Sodium stearyl fumarate

Wzór chemiczny

$C_{22}H_{39}NaO_4$ (RYCINA 6.4)



RYCINA 6.4

Wzór strukturalny stearylofumaranu sodu.

Masa cząsteczkowa

390,5 u

Wygląd

Występuje w postaci drobnego, białego proszku ze skupiskami płaskich lub okrągłych większych cząstek.

Opis

Stearylofumaran sodu jest związkiem produkowanym w procesie syntezy chemicznej. Powstaje w wyniku reakcji alkoholu stearylowego z bezwodnikiem maleinowym, następującej izomeryzacji produktu i przekształcenia jego w sól sodową.

Substancja ta zawiera wodę w ilości ≤ 5 %.

Właściwości funkcjonalne

W technologii postaci tabletek i kapsułek używany jest, jako substancja smarująca w stężeniach 0,5 - 2 % (w/w).

Niezgodności farmaceutyczne

Wykazuje niezgodność z octanem chlorheksydyny.

Działania niepożądane

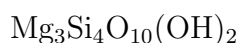
Substancja nietoksyczna i niepowodująca podrażnień. [86]

6.2.5 Talk

Synonimy

Talcum, Talc

Wzór chemiczny



Masa cząsteczkowa

379,3 u

Wygląd

Substancja w formie lekkiego, jednorodnego, białego lub prawie białego proszku. Tłustawa w dotyku, bez zapachu, ale nieprzyjemna w smaku.

Opis

Talk jest uwodnionym krzemianem magnezu pochodzenia naturalnego, poddanego procesom, proszkowania i oczyszczania. Jednak mimo to, w substancji tej zawarte są, w różnych ilościach, towarzyszące minerały (chloryty, magnezyty, kalcyt i dolomit).

Talk absorbuje nieznaczne ilości wody podczas przechowywania w temperaturze 298 K i wilgotności względnej powietrza 90 %.

Właściwości funkcjonalne

W tabletkach stosowany jest, jako substancja poślizgowa w stężeniu 1 - 3 % a według niektórych źródeł aż 10 %. Jej zadaniem jest zmniejszenie tarcia pomiędzy cząsteczkami proszku lub ziarnami granulatu. Pełni także funkcje przeciwbrylające oraz wypełniającą (5 - 30 %).

Znaczenie talku w technologii postaci tabletki stopniowo maleje z powodu niekorzystnego działania, jakim jest spowolnienie rozpadu tabletki i jej zmniejszona odporność mechaniczną.

Niezgodności farmaceutyczne

Jest to substancja stabilna, wykazująca wyłącznie niezgodności ze związkami zawierającymi czwartorzędowe ugrupowanie amoniowe.

Działania niepożądane

Talk nie wchłania się z przewodu pokarmowego, dlatego jest uważany za substancję nietoksyczną. Jednak działa drażniąco na śluzówkę żołądka, wywołując w niektórych przypadkach *talkogranulomię*. [55, 86, 90]

6.3 Szczegółowe cele badania wpływu substancji pomocniczych na trwałość cilazaprilu

Do szczegółowych celów dotyczących badań trwałości cilazaprilu w obecności substancji pomocniczych zaliczono:

Poznanie wpływu na trwałość cilazaprilu w fazie stałej wybranych substancji pomocniczych:

- hypromelozy,
- laktozy jednowodnej,
- skrobi kukurydzianej oraz
- talku.

Wyznaczenie stałych szybkości reakcji rozkładu cilazaprilu w obecności wybranych substancji pomocniczych w stałej temperaturze $T = 333$ K i $RH = 50,9, 66,5, 76,4$ %.

Porównanie rozkładu cilazaprilu w mieszaninach modelowych z cilazaprilem w *substancji* w celu ustalenia jak, która substancja pomocnicza oddziałuje na trwałość cilazaprilu.

Poznanie wpływu zwiększającej się wilgotności względnej powietrza na rozkład cilazaprilu w mieszaninach modelowych z wybranymi substancjami pomocniczymi.

Cele osiągnięto w toku testów kinetycznych, analizy ilościowej i następującej analizy matematycznej oraz statystycznej uzyskanych wyników.

6.4 Materiały i metody

Materiały

- opisane w ROZDZIALE 4.5.1 na stronie 22 oraz
- hypromeloza (Biofarm)
- laktoza jednowodna (Biofarm)
- skrobia kukurydziana (Sigma-Aldrich)
- talk (Biofarm)

Metoda

- HPLC opisana w ROZDZIALE 4.5.2

6.5 Procedury

Przygotowanie mieszanin modelowych z substancjami pomocniczymi

W celu przygotowania mieszanin modelowych 1:1 (w/w) cilazaprilu z wybranymi substancjami pomocniczymi odważono dokładnie na wadze analitycznej i przeniesiono ilościowo do czterech moździerzy porcelanowych:

- mieszanina H - 0,500 g cilazaprilu oraz 0,500 g hypromelozy
- mieszanina L - 0,500 g cilazaprilu oraz 0,500 g laktozy jednowodnej
- mieszanina S - 0,500 g cilazaprilu oraz 0,500 g skrobi kukurydzianej
- mieszanina T - 0,500 g cilazaprilu oraz 0,500 g talku.

Substancje w każdym moździerzu rozdrabniano i rozcierano przez 30 minut za pomocą pistla do uzyskania homogenicznych mieszanin fizycznych.

Warunki testów kinetycznych

Wykonanie prób do testów polegało na dokładnym odważeniu 0,0200 g każdej mieszaniny modelowej do szklanych fiolek z ciemnego szkła.

Warunki każdego testu zapewniono w ekzykatorach z nasyconymi roztworami soli nieorganicznych ($RH = 50,9, 66,5, 76,4 \%$) umieszczonych w komorach do badań kinetycznych ustawionych na temperaturę 333 K. Dokładną specyfikację warunków opisano w ROZDZIALE 5.7.

Przygotowane próby poddano testom kinetycznym według poniższego schematu (TABELA 6.1).

TABELA 6.1

Plan badań kinetycznych - wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu w obecności wybranych substancji pomocniczych

Przedmiot badania	Temperatura [K]	Wilgotność względna powietrza [%]
Mieszanina H	333	50,9
		60,5
		76,4
Mieszanina L	333	50,9
		60,5
		76,4
Mieszanina S	333	50,9
		60,5
		76,4
Mieszanina T	333	50,9
		60,5
		76,4

Próbki kolejno wyjmowano z eksykatorów i komór cieplnych po określonym czasie t [h] zależnym od szybkości reakcji rozkładu. Chłodzono do temperatury pokojowej i analizowano metodą HPLC.

Przygotowanie próbek do analizy HPLC

Próbki - mieszaniny modelowe cilazaprilu z substancjami pomocniczymi poddane testom kinetycznym. Zawartość każdej fiołki przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml i następnie ekstrahowano 25,0 ml metanolu. Powstałą zawiesinę/roztwór (w zależności od badanej substancji pomocniczej) wytrząsano przez 30 minut, po czym sączono przez twardy sączek ilościowy 390 (Munktell).

1,0 ml przeźroczystego roztworu badanego mieszano z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (metanолоwый roztwór benzokainy o stężeniu 0,02 %) i poddawano analizie HPLC.

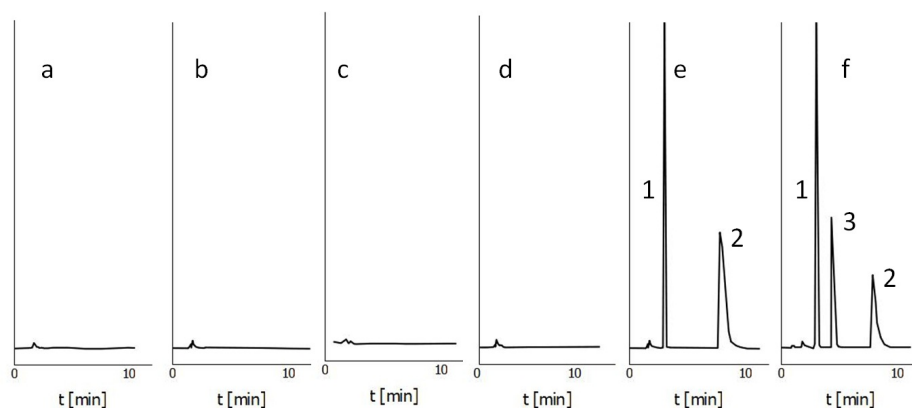
Próbki wzorcowe - mieszaniny modelowe cilazaprilu z substancjami pomocniczymi niepoddane testom kinetycznym. Dokładnie odważoną badaną mieszaninę modelową niepoddaną testom kinetycznym (0,0200 g) przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml i następnie ekstrahowano 25,0 ml metanolu. Powstałą zawiesinę/roztwór (w zależności od badanej substancji pomocniczej) wytrząsano przez 30 minut, po czym sączono przez twardy sączek ilościowy 390 (Munktell).

1,0 ml przezroczystego roztworu badanego mieszano z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (metanolowy roztwór benzokainy o stężeniu 0,02 %) i poddawano analizie HPLC.

6.6 Wyniki i ich omówienie

6.6.1 Selektywność metody HPLC

Chromatogramy potwierdzające selektywność metody HPLC względem cilazaprilu, jego produktu rozkładu, hypromelozy, laktozy, skrobi kukurydzianej i talku przedstawia RYCINA 6.5.



RYCINA 6.5

Selektywność metody HPLC względem cilazaprilu, produktu rozkładu oraz substancji pomocniczych. Chromatogramy dotyczą a) hypromelozy, b) laktozy, c) skrobi kukurydzianej, d) talku, e) cilazaprilu (2) w mieszaninie modelowej w czasie t_0 testu kinetycznego i f) w jego trakcie z widocznym produktem rozkładu (3), pik (1) odpowiada wzorcowi wewnętrznemu.

6.6.2 Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w obecności substancji pomocniczych

Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w obecności substancji pomocniczych nie ulega zmianie w porównaniu z cilazaprilem *w substancji*. Za tym faktem przemawia ten sam produkt rozkładu obserwowany na chromatogramach (RYCINA 6.5) oraz kształt krzywych rozkładu cilazaprilu.

Wykres zależności stężenia cilazaprilu, jako funkcji czasu testu kinetycznego ma charakterystyczny sigmoidalny kształt, co wskazuje na reakcję autokatalityczną pierwszego rzędu względem stężenia substratu.

Matematycznie reakcję rozkładu opisano posługując się zależnością Prout-Tompkins'a, wyznaczając z niej parametry kinetyczne.

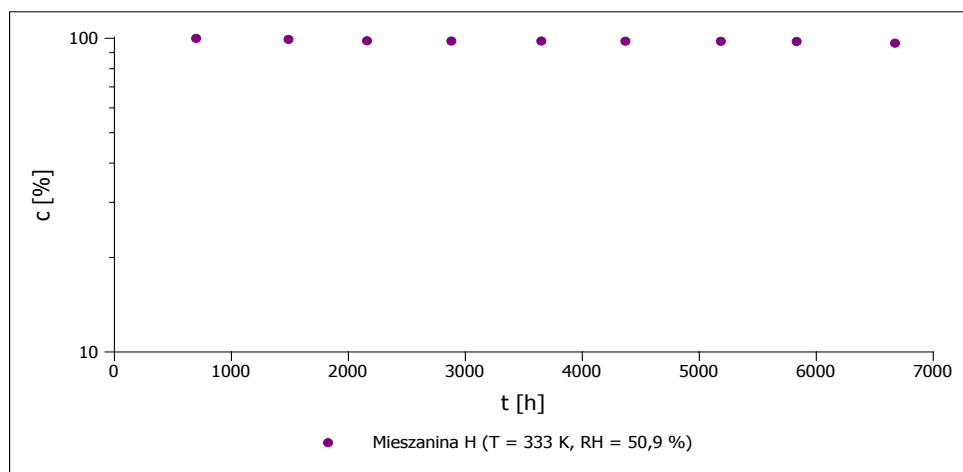
6.6.3 Wpływ hypromelozy na trwałość cilazaprilu

W stałej temperaturze ($T = 333 \text{ K}$), rosnąca wilgotność względna powietrza (50,9 - 76,4 %) przyspiesza rozkład cilazaprilu. Dane doświadczalne dostarczają na to dwa dowody.

Pierwszym z nich jest skrócenie okresu indukcji wraz ze zwiększającą się wilgotnością względną powietrza, co można zaobserwować na RYCINACH 6.6, 6.7, 6.8.

Drugim jest zwiększenie wartości stałej szybkości reakcji. Parametr ten wyznaczony na podstawie RÓWNANIA 5.6 wraz ze wzrostem wilgotności względnej powietrza z 66,5 % na 76,4 % zwiększa swoją wartość niemalże trzykrotnie. (TABELLE 6.2, 6.3)

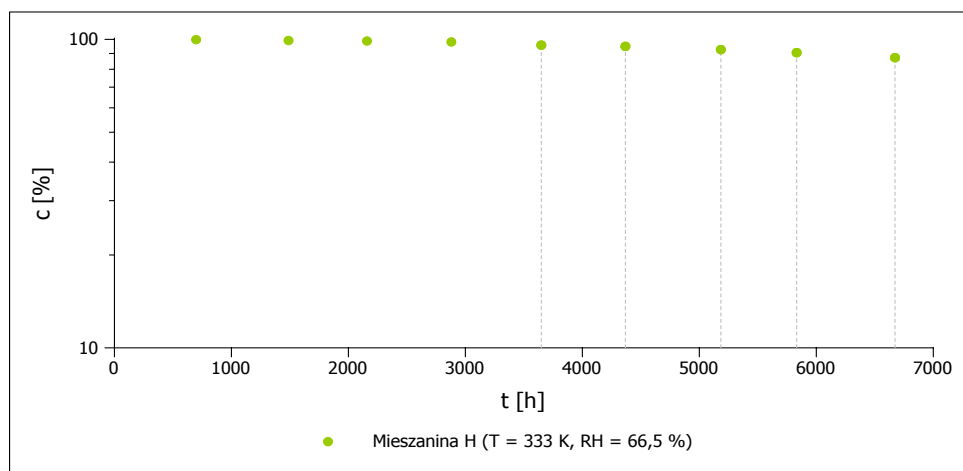
$T = 333 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$



RYCINA 6.6

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej H w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$).

$T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$



RYCINA 6.7

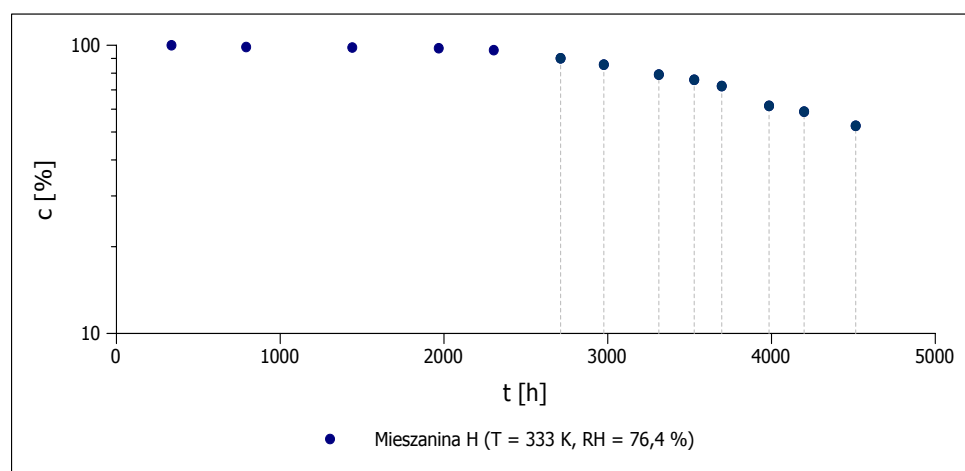
Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej H w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$).

TABELA 6.2

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w mieszaninie modelowej H w wyniku rozkładu w $T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	3649	2,0113	1,9264	95,7788	22,6899
2	4368	2,0113	1,9088	94,9019	18,6150
3	5184	2,0113	1,8632	92,6339	12,5756
4	5832	2,0113	1,8214	90,5587	9,5918
5	6673	2,0113	1,7541	87,2101	6,8187
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,00041$		$\Delta a = 0,000054$		$S_a = 0,000017$	
$b = 4,6524$		$\Delta b = 0,2826$		$S_b = 0,0888$	
$S_y = 0,0402$		$r = -0,997$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k [1/s]				$1,14 \cdot 10^{-7}$	
Δk [1/s]				$1,50 \cdot 10^{-8}$	
$t_{0,5}$ [h]				11386	

$T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$



RYCINA 6.8

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej H w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 6.3

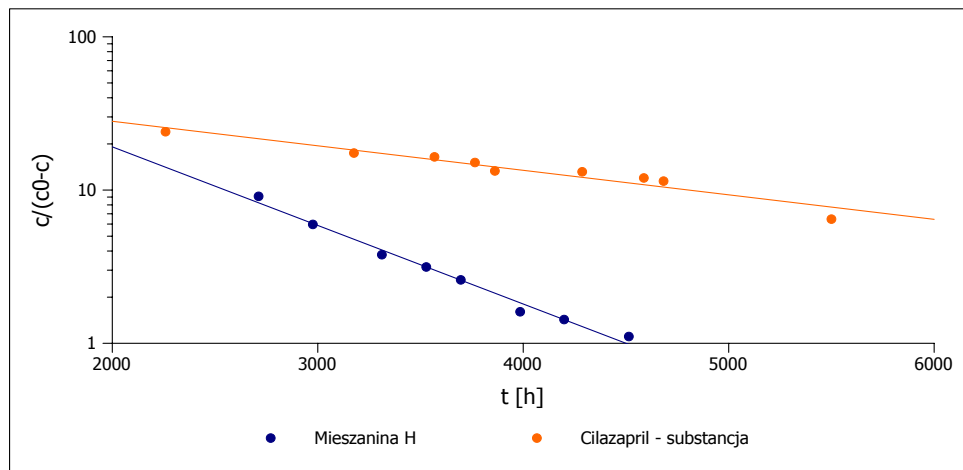
Zmiany w czasie stężenia cilazaprilu (c [%]) w mieszaninie modelowej H w wyniku rozkładu w $T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2687	1,9213	1,7311	90,1005	9,1010
2	2977	1,7169	1,4705	85,6486	5,9638
3	3311	1,8803	1,4873	79,1000	3,7847
4	3528	1,9556	1,4841	75,8904	3,1477
5	3646	1,8649	1,3459	72,1700	2,5932
6	3985	1,9556	1,2051	61,6256	1,6058
7	4199	1,9556	1,1505	58,8317	1,4290
8	4514	1,9556	1,0276	52,5456	1,1072
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,0012$		$\Delta a = 0,00013$		$S_a = 0,000053$	
$b = 5,2723$		$\Delta b = 0,4700$		$S_b = 0,1921$	
$S_y = 0,0857$		$r = -0,994$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k [1/s]				$3,26 \cdot 10^{-7}$	
Δk [1/s]				$3,58 \cdot 10^{-8}$	
$t_{0,5}$ [h]				4497	

Ocena wpływu hypromelozy na rozkład cilazaprilu

Jak już wcześniej wspomniano, hypromeloza nie ma wpływu na kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w fazie stałej. Różnice dotyczą oddziaływania na szybkość reakcji.

Hypromeloza przyspiesza rozkład cilazaprilu w mieszaninie modelowej. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy stałymi szybkości rozkładu cilazaprilu: w substancji i mieszaninie H. (RYCINA 6.9, TABELA 6.4)



RYCINA 6.9

Wykres przedstawiający rozkład cilazaprilu w substancji i mieszaninie H w $T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$ według modelu Prout-Tompkins'a.

TABELA 6.4

Porównanie rozkładów cilazaprilu w substancji i mieszaninie H w warunkach ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H0: a_1 = a_2$	
$H1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Mieszanina H	Cilazapril - substancja
$n = 8$	$n = 9$
$\ln y = -0,0012x + 5,2723$	$\ln y = -0,00044x + 4,3411$
$S_{a1 - a2} = 7,8 \cdot 10^{-5}$	
$t = 9,3905$	
$t(\alpha = 0,05; df = 13) = 2,1604$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) \leq t$ dlatego odrzucono $H0$ na korzyść $H1$. Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie	

6.6.4 Wpływ laktozy jednowodnej na trwałość cilazaprilu

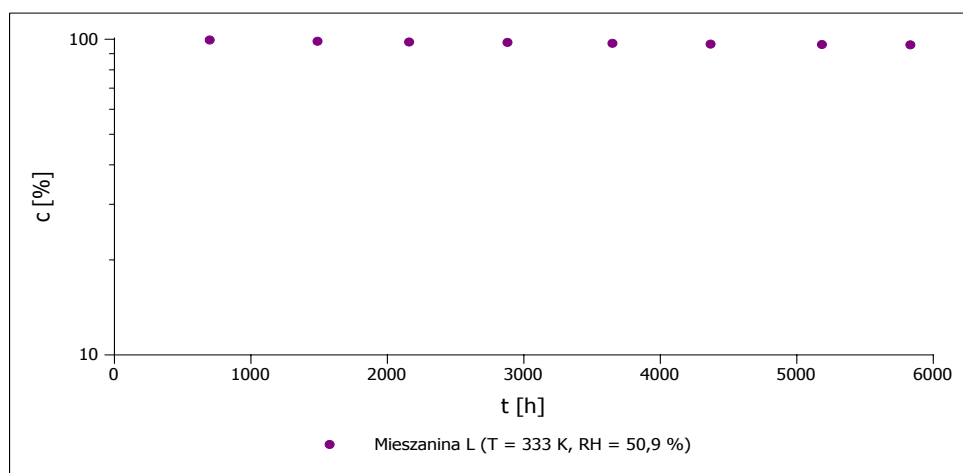
Laktoza również nie wpływa na kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w fazie stałej. Reakcja Millard'a charakterystyczna dla laktozy została wykluczona, gdyż podczas testu kinetycznego nie zaobserwowano zmiany barwy mieszaniny modelowej na brązową a na chromatogramach nie obserwowano dodatkowego produktu rozkładu.

W stałej temperaturze ($T = 333\text{ K}$), rosnąca wilgotność względna powietrza (50,9 - 76,4 %) przyspiesza rozkład cilazaprilu.

Okres indukcji ulega skróceniu wraz ze zwiększającą się wilgotnością względną powietrza. (RYCINY 6.10, 6.11, 6.12)

Natomiast obserwowana stała szybkości reakcji, zwiększa swoją wartość. Wraz ze wzrostem wilgotności względnej powietrza z 66,5 % na 76,4 % powiększa się około dziewięciokrotnie. (TABELA 6.5, 6.6)

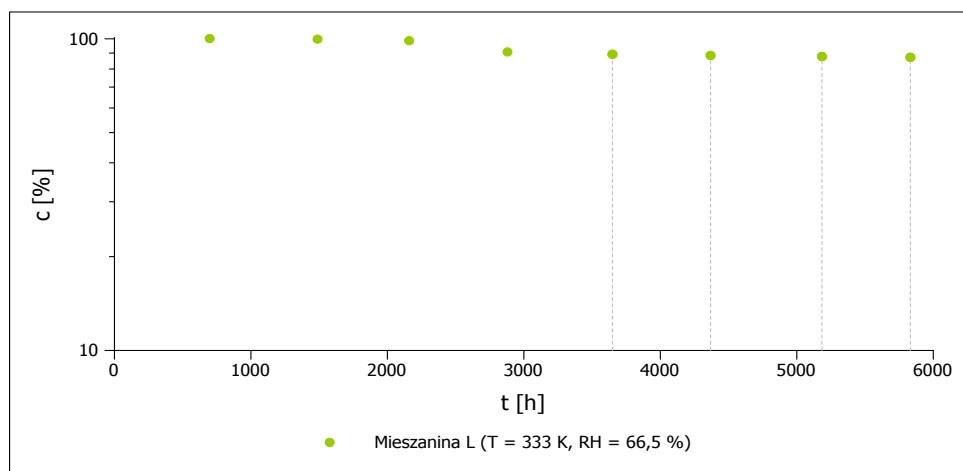
$T = 333\text{ K}$, $RH = 50,9\%$



RYCINA 6.10

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej L w warunkach kinetycznych ($T = 333\text{ K}$, $RH = 50,9\%$).

$T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$



RYCINA 6.11

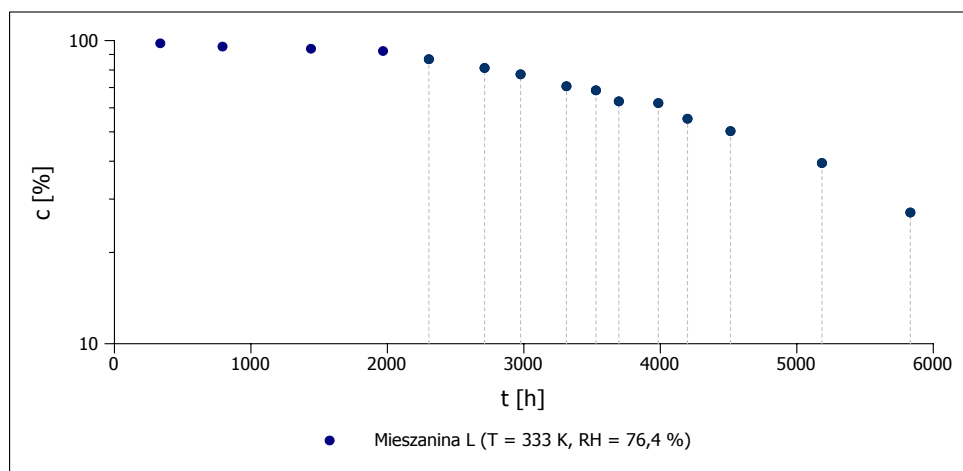
Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej L w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$).

TABELA 6.5

Zmiany w czasie stężenia cilazaprilu (c [%]) w mieszaninie modelowej L w wyniku rozkładu w $T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	3649	1,8002	1,6059	89,2106	8,2684
2	4368	1,8002	1,5918	88,4240	7,6386
3	5184	1,8002	1,5797	87,7551	7,1667
4	5832	1,8002	1,5699	87,2094	6,8183
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,000087$		$\Delta a = 0,000024$		$S_a = 0,0000055$	
$b = 2,4238$		$\Delta b = 0,1145$		$S_b = 0,0266$	
$S_y = 0,0091$		$r = -0,996$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k [1/s]				$2,42 \cdot 10^{-8}$	
Δk [1/s]				$6,59 \cdot 10^{-9}$	
$t_{0,5}$ [h]				27784	

$T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$



RYCINA 6.12

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej L w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 6.6

Zmiany w czasie stężenia cilazaprilu (c [%]) w mieszaninie modelowej L w wyniku rozkładu w $T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2302	2,3918	2,0765	86,8175	6,5858
2	2687	1,9595	1,5916	81,2248	4,3262
3	2977	1,9595	1,5167	77,4024	3,4252
4	3311	1,8535	1,3104	70,6987	2,4128
5	3528	1,8796	1,2883	68,5400	2,1786
6	3646	2,2042	1,3895	63,0387	1,7055
7	3985	1,8796	1,1692	62,2049	1,6458
8	4199	1,8796	1,0381	55,2296	1,2336
9	4514	1,8796	0,9449	50,2706	1,0109
10	5184	1,8796	0,7415	39,4515	0,6516
11	5832	1,8796	0,5093	27,0954	0,3717

PARAMETRY PROSTEJ

$a = -0,00078$	$\Delta a = 0,000058$	$S_a = 0,000026$
$b = 3,5601$	$\Delta b = 0,2289$	$S_b = 0,1012$
$S_y = 0,0855$	$r = -0,995$	

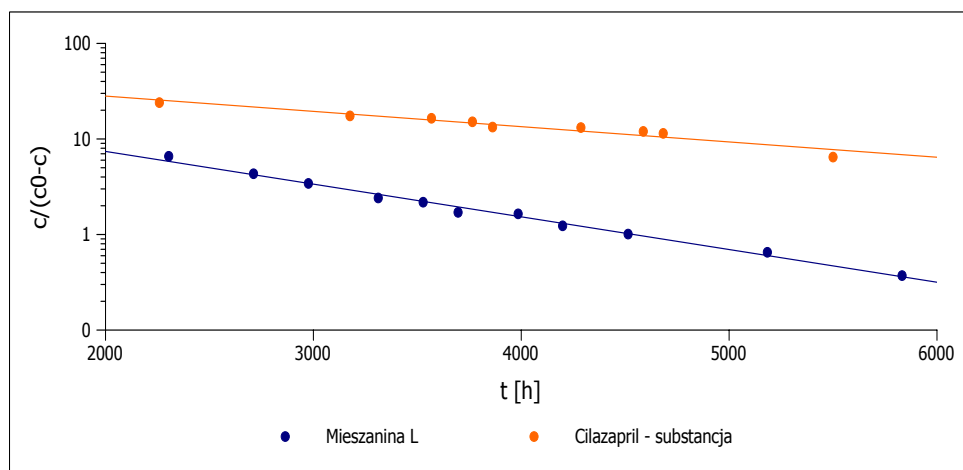
PARAMETRY KINETYCZNE

k [1/s]	$2,18 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$1,60 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	4541

Ocena wpływu laktozy jednowodnej na rozkład cilazaprilu

Choć laktoza jednowodna nie ma wpływu na kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w fazie stałej, różnice dotyczą oddziaływania na szybkość reakcji.

Laktoza jednowodna przyspiesza rozkład cilazaprilu w mieszaninie modelowej. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy stałymi szybkości rozkładu cilazaprilu: w substancji i mieszaninie L. (RYCINA 6.13, TABELA 6.7)



RYCINA 6.13

Wykres przedstawiający rozkład cilazaprilu w substancji i mieszaninie L w $T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$ według modelu Prout-Tompkins'a.

TABELA 6.7

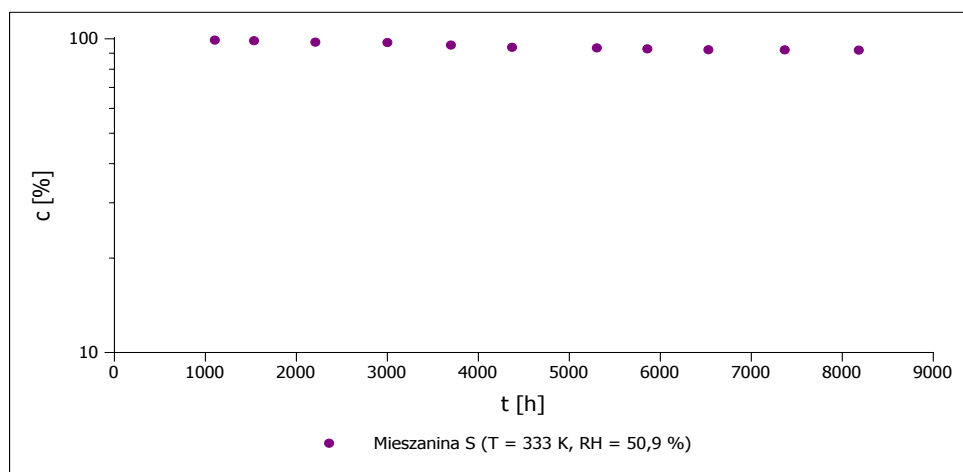
Porównanie rozkładów cilazaprilu w substancji i mieszaninie L w warunkach ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H0: a_1 = a_2$	
$H1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i> Mieszanina L $n = 11$	<i>Populacja 2</i> Cilazapril - substancja $n = 9$
$\ln y = -0,00078x + 3,5601$	$\ln y = -0,00044x + 4,3411$
$S_{a1 - a2} = 5,06 \cdot 10^{-5}$	
$t = 6,7494$	
$t(\alpha = 0,05; df = 16) = 2,1199$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) \leq t$ dlatego odrzucono $H0$ na korzyść $H1$. Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie	

6.6.5 Wpływ skrobi kukurydzianej na trwałość cilazaprilu

Skrobia kukurydziana wpływa korzystnie na trwałość cilazaprilu. W $T = 333\text{ K}$ obserwowano we wszystkich wilgotnościach względnych powietrza objętych badaniem $RH = 50,9 - 76,4\%$ tylko okres indukcji reakcji, nawet przy dwukrotnie dłużej trwającym teście kinetycznym. (RYCINY 6.14, 6.15, 6.16)

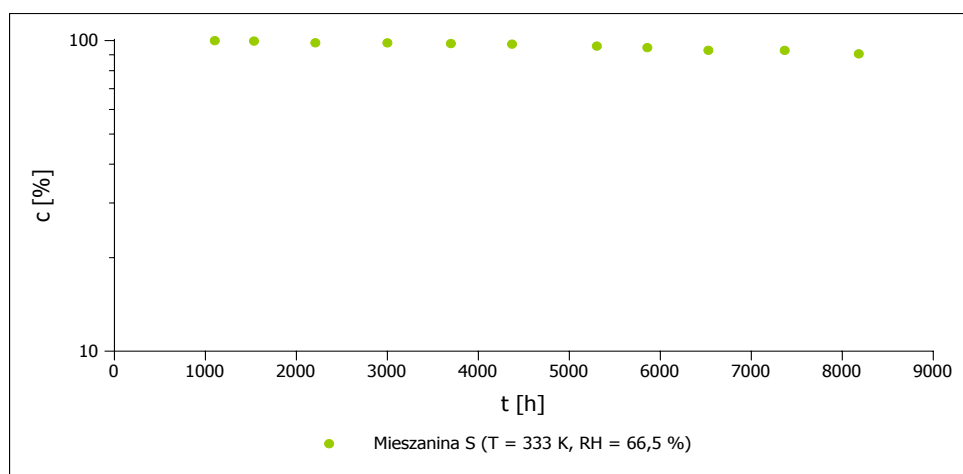
$T = 333\text{ K}$, $RH = 50,9\%$



RYCINA 6.14

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej S w warunkach kinetycznych ($T = 333\text{ K}$, $RH = 50,9\%$).

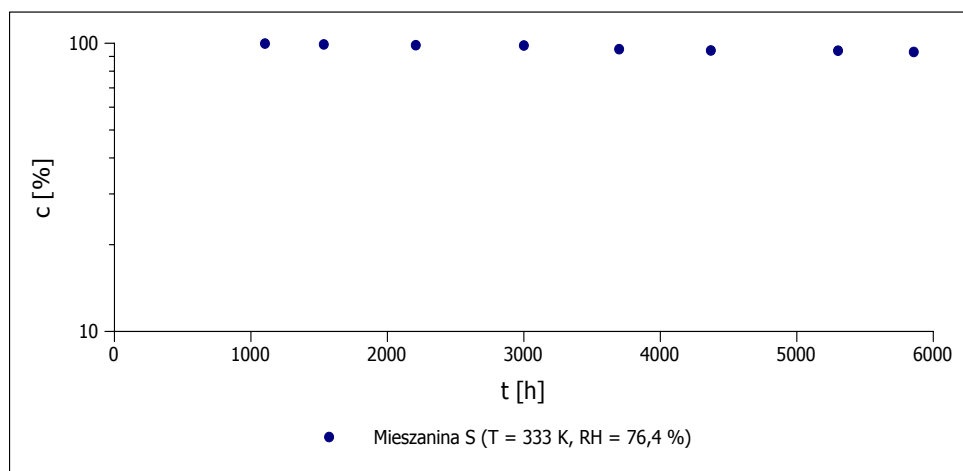
$T = 333\text{ K}$, $RH = 66,5\%$



RYCINA 6.15

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej S w warunkach kinetycznych ($T = 333\text{ K}$, $RH = 66,5\%$).

$T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$



RYCINA 6.16

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej S w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

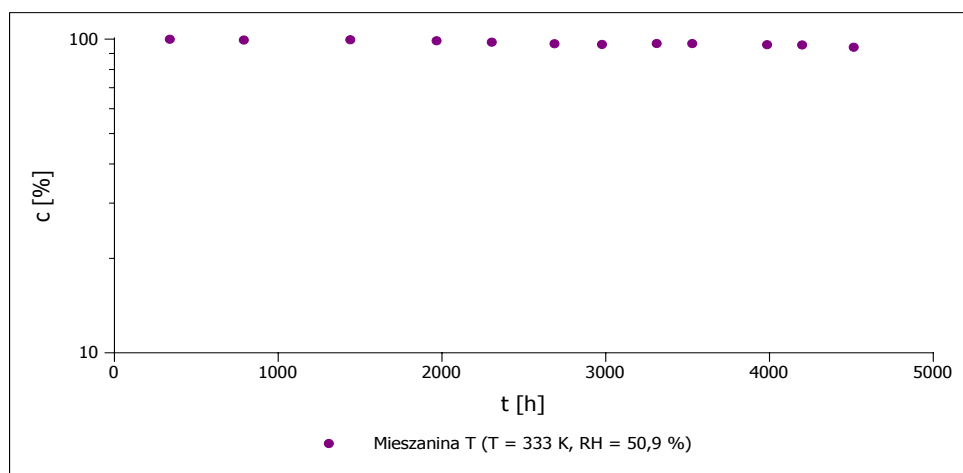
6.6.6 Wpływ talku na trwałość cilazaprilu

Talk jest substancją pomocniczą, która także nie zmienia kinetycznego mechanizmu rozkładu cilazaprilu.

W mieszaninie modelowej T podczas testów kinetycznych wartość stałej szybkości reakcji oraz czas trwania okresu indukcji ulegały zmianom. Drugi parametr skraca się wraz ze wzrostem wilgotności względnej powietrza. (RYCINY 6.17, 6.18, 6.19)

Okres przyspieszenia w czasie trwania testu zaobserwowano tylko dla najwyższej zastosowanej wilgotności względnej powietrza. Obliczona stała szybkości reakcji wynosi: $1,86 \cdot 10^{-7} \pm 2,71 \cdot 10^{-8}$ (TABELA 6.8).

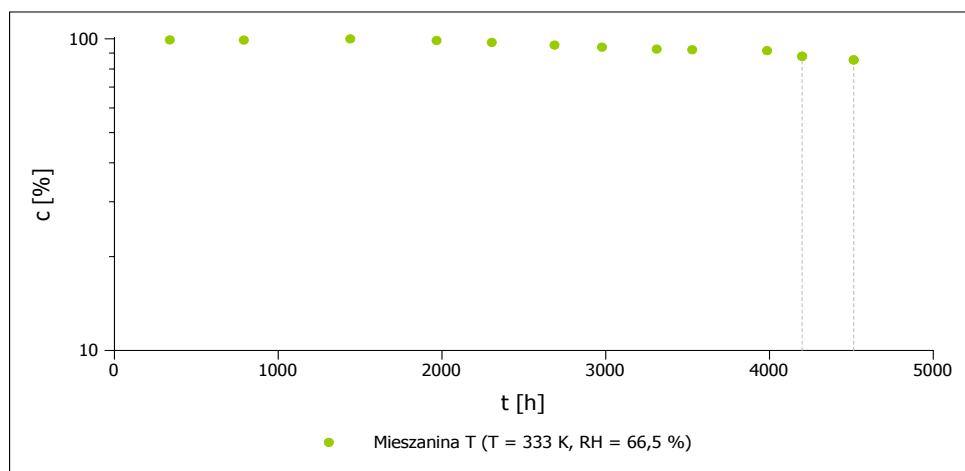
$$T = 333 \text{ K}, RH = 50,9 \%$$



RYCINA 6.17

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej T w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$).

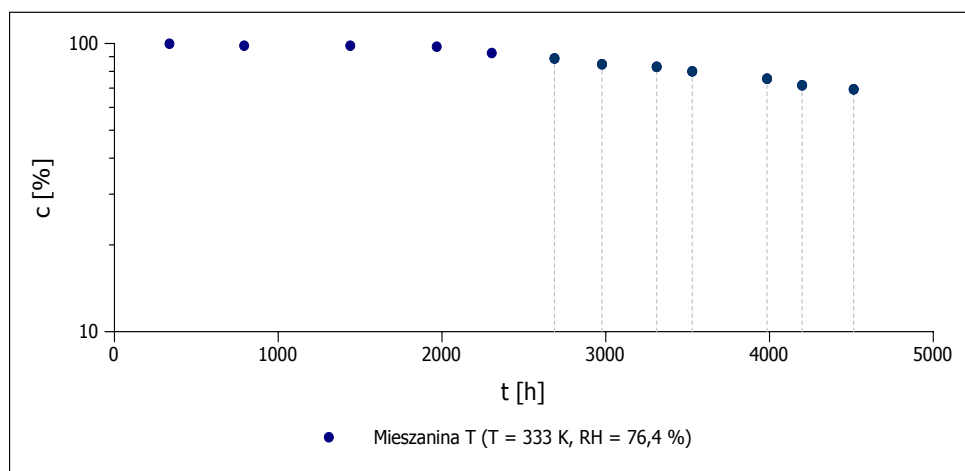
$T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$



RYCINA 6.18

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej T w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$).

$T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$



RYCINA 6.19

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie modelowej T w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 6.8

Zmiany w czasie stężenia cilazaprilu (c [%]) w mieszaninie modelowej T w wyniku rozkładu w $T = 333$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

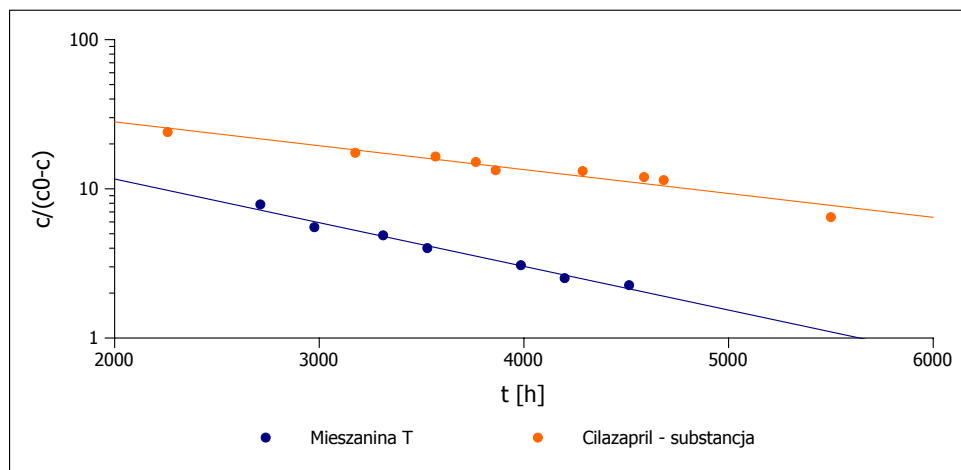
n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2687	2,1577	1,9142	88,7159	7,8620
2	2977	2,1577	1,8274	84,6920	5,5325
3	3311	2,1557	1,7890	82,9893	4,8786
4	3528	2,1430	1,7150	80,0264	4,0066
5	3985	2,1430	1,6174	75,4744	3,0774
6	4199	2,1430	1,5343	71,5945	2,5204
7	4514	2,1430	1,4859	69,3353	2,2611

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,00067$	$\Delta a = 0,000098$	$S_a = 0,000038$
$b = 3,7824$	$\Delta b = 0,3567$	$S_b = 0,1388$
$S_y = 0,0619$	$r = -0,992$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,86 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$2,71 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	5651

Ocena wpływu talku na rozkład cilazaprilu

Talk przyspiesza rozkład cilazaprilu w mieszaninie modelowej. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy stałymi szybkości rozkładu cilazaprilu: w substancji i mieszaninie T. (RYCINA 6.20, TABELA 6.9)



RYCINA 6.20

Wykres przedstawiający rozkład cilazaprilu w substancji i mieszaninie T w $T = 333$ K, $RH = 76,4$ % według modelu Prout-Tompkins'a.

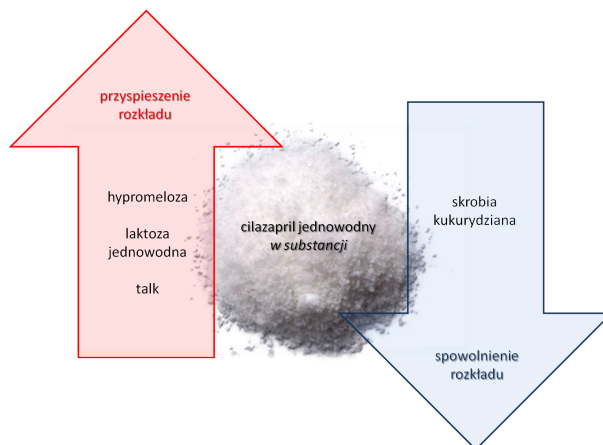
TABELA 6.9

Porównanie rozkładów cilazaprilu w substancji i mieszaninie T w warunkach ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Mieszanina T	Cilazapril - substancja
$n = 7$	$n = 9$
$\ln y = -0,00067x + 3,7824$	$\ln y = -0,00044x + 4,3411$
$S_{a_1 - a_2} = 7,43 \cdot 10^{-5}$	
$t = 3,1082$	
$t(\alpha = 0,05; df = 12) = 2,1788$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) \leq t$ dlatego odrzucono H_0 na korzyść H_1 . Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie	

6.7 Podsumowanie

Substancje pomocnicze używane przez producentów do produkcji tabletek z cilazapilem wpływają na trwałość cilazaprilu w leku. (RYCINA 6.21)



RYCINA 6.21

Wpływ substancji pomocniczych na trwałość cilazaprilu.

Przeprowadzone badania wskazują, że działanie stabilizujące chemicznie cilazapril w mieszaninie modelowej ma wyłącznie skrobia kukurydziana.

Pozostałe zbadane substancje pomocnicze przyspieszają rozkład cilazaprilu wpływając zarówno na czas indukcji reakcji oraz obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu. Przy czym najmniejszy negatywny wpływ na obserwowaną stałą szybkości reakcji ma talk a następnie w kolejności laktoza i hypromeloza (porównanie dotyczy $RH = 76,4\%$ i $T = 333\text{ K}$).

Trwałość cilazaprilu w tabletkach

7.1	Wiadomości ogólne o tabletkach	119
7.2	Metody wytwarzania tabletek	119
7.2.1	Tabletkowanie po uprzedniej granulacji	119
7.2.2	Bezpośrednia kompresja	121
7.3	Opakowanie tabletek	121
7.3.1	Bliстер z folii OPA/Alu/PVC	122
7.4	Trwałość tabletek	123
7.5	Tabletki z cilazapilem	124
7.6	Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu w tabletkach	126
7.7	Materiały i metody	127
7.8	Procedury	127
7.9	Wyniki i ich omówienie	129
7.9.1	Selektywność metody HPLC	129
7.9.2	Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w tabletkach	129
7.9.3	Lek oryginalny A	130
7.9.4	Lek generyczny B	139
7.9.5	Porównanie trwałości cilazaprilu w leku A i B z cilazapilem w substancji	150
7.10	Podsumowanie	151

7.1 Wiadomości ogólne o tabletkach

Każda postać leku powinna być trwała, atrakcyjna i wygodna w użyciu. Jedną z tradycyjnych, powszechnie stosowanych formułacji jednodawkowych jest tabletkę. Zasadniczą jej część stanowi rdzeń, w którego skład wchodzi substancje biologicznie czynne (jedna lub wiele) i substancje pomocnicze. Często rdzeń jest dodatkowo powlekany otoczkami poprawiającymi trwałość, smak, wygląd oraz profil uwalniania. [91]

W poprzednim ROZDZIALE opisano trwałość cilazaprilu w mieszaninach modelowych z substancjami pomocniczymi używanymi do wytwarzania tabletek. Należy mieć jednak na uwadze fakt, że na trwałość tabletki wpływają nie tylko substancje pomocnicze. Jest to zagadnienie złożone, w którym należy brać pod uwagę szereg czynników. Końcowa trwałość substancji leczniczej w postaci leku jest wypadkową:

- oddziaływania ze wspomnianymi uprzednio substancjami pomocniczymi,
- wpływu wszystkich procesów, jakim poddawana jest masa tabletkowa podczas wytwarzania tabletki,
- jakości otoczki oraz opakowania, a także
- influencji warunków przechowywania i transportowania produktu leczniczego.

7.2 Metody wytwarzania tabletek

Tabletkowanie jest końcowym procesem otrzymywania tabletki. Polega on na prasowaniu jednorodnych objętości proszku/granulatu pomiędzy dwoma stemplami. Siła nacisku kilku ton sprawia, że właściwości proszku/granulatu zmieniają się. Stopniowo zmniejsza się porowatość, odległość między cząstkami, dodatkowo ulegają one fragmentacji i deformacji a ostatecznie łączą się formując tabletkę. [90, 91]

Niewiele substancji leczniczych posiada właściwości niezbędne do produkcji tabletek o pożądanej jakości. Z tego względu w większości przypadków przed właściwym tabletkowaniem poddaje się je złożonej, wstępnej obróbce przy użyciu substancji pomocniczych. [91] Przy czym, wyboru procedury dokonuje się w oparciu o charakterystykę substancji leczniczej i wybranych substancji pomocniczych. [5]

7.2.1 Tabletkowanie po uprzedniej granulacji

Większość substancji biologicznie czynnych występuje w postaci sypkich, jednolitych proszków o niskiej gęstości, które jedynie po dalszej obróbce można poddać tabletkowaniu.

Granulacja jest procesem, dzięki któremu proszek zyskuje nową jakość. Cząstki masy tabletkowej są przekształcane w porowate, sferyczne struktury, które mają większe

rozmiary i gęstość. Granulat charakteryzuje się lepszymi właściwościami płynięcia, jednorodnością zawartości, zdolnością do tabletkowania i niewielkim pyleniem. [92] Podsumowując, granulacja to proces, który ma na celu uzyskanie dogodnych dla przemysłu farmaceutycznego właściwości proszku. [93]

Granulacja na mokro

Tradycyjną metodą wstępnej obróbki substancji leczniczej przed tabletkowaniem jest granulacja na mokro. Metoda składa się z kilku etapów. W pierwszej kolejności, dla zapewnienia odpowiedniej masy tabletkowej, następuje mieszanie substancji aktywnej z wypełniającą. Następnie, cząstki proszku powstałej mieszanki łączy się za pomocą wodnego lub alkoholowego roztworu substancji wiążącej. Dalej ma miejsce suszenie do odpowiedniej zawartości wilgoci. W tym miejscu granulat poddawany jest działaniu podwyższonej temperatury. Ostatnim etapem poprzedzającym tabletkowanie jest przesiewanie granulatu oraz mieszanie ze środkiem poślizgowym i ułatwiającym rozpad tabletki.

Struktura powstałego granulatu, a także wilgoć w nim zawarta korzystnie wpływa na jakość kompresji podczas tabletkowania: polepsza deformację i sprawia, że zwiększona zostaje powierzchnia kontaktu pomiędzy cząstkami.

Oprócz niewątpliwych zalet, granulacja na mokro ma pewne wady. W kontekście trwałości leku niekorzystne jest użycie wody przy formowaniu granulatu oraz wysoka temperatura podczas suszenia. Czynniki te mogą przyczynić się do występowania i szybszego zachodzenia reakcji rozkładu leku (w szczególności reakcji hydrolizy). [91]

Granulacja na sucho

Substancje lecznicze wrażliwe na wilgoć powinny być wytwarzane w toku suchych procesów produkcji. [5]

Granulacja na sucho jest alternatywą opisaną powyżej techniki, w której pominięte zostaje użycie roztworu substancji wiążącej i w konsekwencji suszenie w podwyższonej temperaturze. Rozwiązanie to polega na kontrolowanym prasowaniu przygotowanych proszków pomiędzy dwoma walcami lub za pomocą tabletkowania. [94]

Przebieg granulacji na sucho jest także wieloetapowy. Na początku łączy się i miesza składniki tabletki w postaci stałej: substancję biologicznie czynną, wypełniającą, poślizgową i opcjonalnie wiążącą. Dalej następuje kompresja wymieszanych składników do postaci granulatu. Kolejno otrzymany granulat jest rozdrabniany i przesiewany. Natomiast ostatni etap poprzedzający tabletkowanie polega na ponownym dodaniu do granulatu substancji poślizgowej. [91]

Tabletki otrzymane techniką granulacji na sucho, choć charakteryzują się zmniejszoną odpornością na zgniatanie, wyróżniają się większą trwałością chemiczną wyprodukowanych preparatów. Ten korzystny wpływ warunkuje pominięcie wody i podwyższonej

temperatury podczas granulacji. [93]

7.2.2 Bezpośrednia kompresja

Najprostszym procesem produkcji tabletek jest bezpośrednia kompresja. Technologia ta obejmuje tylko etapy mieszania substancji leczniczej z substancjami pomocniczymi i następującą kompresję masy tabletkowej, w wyniku której otrzymuje się gotową postać leku.

Kluczowym komponentem w tym przypadku jest substancja wypełniająca. To ona musi nadawać właściwości umożliwiające uformowanie tabletki całej masy tabletkowej, a więc mieszance substancji czynnej z pozostałymi substancjami pomocniczymi (poślizgową i ułatwiającą rozpad). [91]

Światowe trendy w technologii postaci tabletki dążą do coraz szerszego stosowania metody bezpośredniej kompresji. Jednak kierunek ten jest spowalniany poprzez wady tej technologii. Podczas produkcji pojawia się niebezpieczeństwo rozdziału poszczególnych składników proszku przed tabletkowaniem, co może wpływać na jednolitość zawartości substancji leczniczej w tabletkach. Ponadto niewiele substancji charakteryzuje się właściwościami koniecznymi w metodzie bezpośredniej kompresji: dobrym płynięciem proszku, zdolnością cząstek do trwałego łączenia się pod wpływem działania siły zgniatającej i możliwością usunięcia wytworzonej tabletki z matrycy. Dlatego w wielu przypadkach granulacja z użyciem substancji pomocniczych jest wciąż niezbędna. [91, 95]

7.3 Opakowanie tabletek

Opakowanie stanowi integralną część finalnego produktu farmaceutycznego. W dzisiejszych czasach przemysł farmaceutyczny dysponuje dużym arsenałem różnego rodzaju opakowań. Dzięki temu możliwy jest dobór opakowania odpowiednio do wymagań produktu, w sposób korzystny zarówno dla trwałości leku, jak i ekonomicznie. W przypadku leku niewrażliwego na wilgoć wybór opakowania będzie podyktowany głównie jego wyglądem i kosztem. Funkcja ochronna będzie miała znaczenie dla leku wrażliwego na podwyższoną wilgotność względną otaczającego środowiska. Oprócz stabilizacji opakowanie może dodatkowo wpływać na trwałość fizyczną produktu: dezintegrację, twardość i wygląd tabletki. [96]

Tabletki są postacią leku pakowaną w butelki lub blistry, przy czym stosowanie tych ostatnich jest w wielu aspektach bardziej korzystne. Blister chroni lek przed rozkładem przez cały okres ważności, stanowi dogodną formę transportowania leku a umieszczona na nim informacja, obejmująca nazwę, datę ważności i serię produktu ułatwia stosowanie i zwiększa *compliance* z pacjentem. [97]

Ogólna budowa blistra przedstawia się następująco. We wgłębieniach folii umieszczone są pojedynczo tabletki, następnie opakowanie zamykane jest folią nieprzepuszczalną dla

gazów i zgrzewane. [90]

Opakowanie dla dostępnych na rynku polskim tabletek z cilazaprilem stanowi blister z folii OPA/Alu/PVC. [7, 6] Biorąc pod uwagę fakt, że cilazapril należy do substancji leczniczych wrażliwych na wilgoć, blister jest jednym z kluczowych elementów zapewniających jego trwałość.

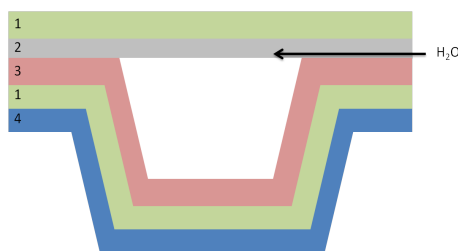
7.3.1 Blister z folii OPA/Alu/PVC

Opakowanie, którym jest blister z folii OPA/Alu/PVC składa się z trzech komponentów (RYCINA 7.1):

- warstwy formującej blister
- warstwy pokrywającej i
- zgrzewanej warstwy uszczelniającej. [97]

Warstwa formująca blister to część opakowania, z której na zimno formowane są kieszonki na tabletki. Ma bezpośredni kontakt z tabletką, dlatego musi być z nią kompatybilna.

W przypadku opisywanego blistra warstwę formującą stanowi trójwarstwowy laminat. Jego środkową powłokę tworzy aluminium (Alu), zewnętrzną orientowany poliamid (OPA). Połączenie to zwiększa wytrzymałość elastyczną aluminium, właściwość konieczną do uformowania kieszeni blistra. Zewnętrzna warstwa złożona jest z chlorku poliwinylowego (PVC), który wraz z aluminiową warstwą pokrywającą zapewnia uszczelnienie blistra. Przepuszczalność pary wodnej jest wyeliminowana całkowicie, w warunkach $T = 293 \text{ K}$ i $RH = 85 \%$ wynosi ona $0 \text{ g/m}^2/\text{dzień}$. [97, 98]



RYCINA 7.1

Schemat przedstawiający blister z zaznaczonymi składowymi 1) Alu, 2) lak uszczelniający pod wpływem ciepła, 3) PVC, 4) OPA, strzałka ukazuje prawdopodobne miejsce przenikania wilgoci do wnętrza blistra. [98]

Warstwa pokrywająca zamyka blister. Wyjęcie tabletki z opakowania następuje w wyniku przerwania ciągłości tej powłoki. Zbudowana jest ona z folii aluminiowej o różnej grubości i jest nieprzepuszczalna dla wody. [97, 98]

Warstwa uszczelniająca łączy plastikowy blister z warstwą formującą blister. Dzieje się to za sprawą laku, którym pokryta jest warstwa pokrywająca. Pod wpływem zgrzewania łączy blister w całość, gwarantując jego integralność. [97]

Tak przygotowany blister powinien stanowić nieprzepuszczalne dla gazów opakowanie gwarantujące stałą zawartość wilgoci w produkcie przez cały okres ważności tabletki i zapewniając ochronę wrażliwego na wilgoć leku do czasu jego użycia. [99]

Należy mieć jednak na uwadze fakt, że zła jakość blistrów może zmieniać właściwości barierowe prowadząc do nietrwałości leku. Grubość laku uszczelniającego stanowi newralgiczny punkt blistra. Udowodniono, że stosowanie laków o dużej gęstości powoduje napływ wilgoci do wnętrza blistra przez utworzone podczas zgrzewania kanały powietrzne. [98]

7.4 Trwałość tabletek

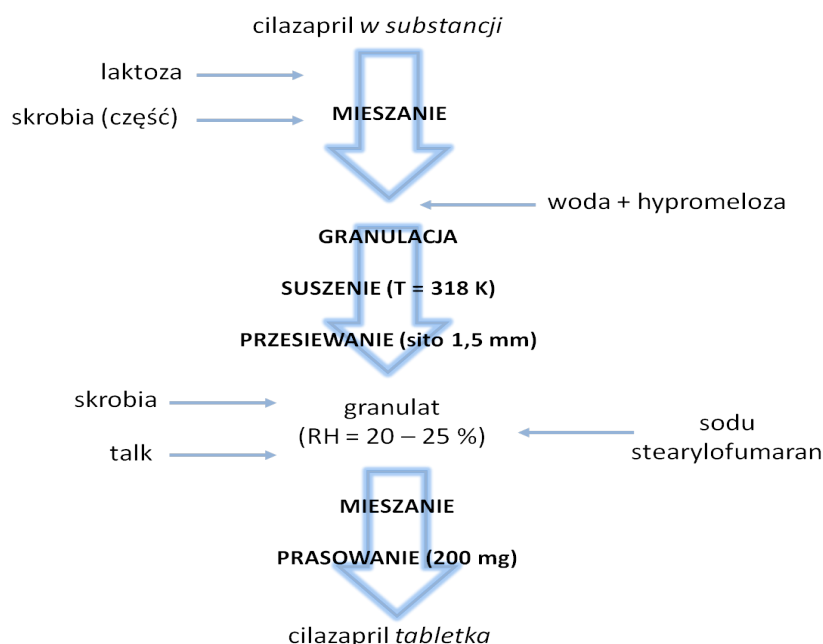
Trwała postać leku to taka, która zachowuje swoją siłę działania, zapewniając jednocześnie bezpieczeństwo stosowania. Siłę działania określa brak istotnych zmian w stężeniu składnika biologicznie czynnego ($100 \pm 5\%$) w czasie trującym od wyprodukowania do zużycia leku przez pacjenta, natomiast za bezpieczeństwo odpowiada brak toksycznych produktów rozkładu.

Data ważności gotowego produktu leczniczego jest ustalana na podstawie czasu, w którym produkt w ściśle określonych warunkach przechowywania spełnia określone wymagania dotyczące właściwości fizycznych i chemicznych leku i jego postaci. [96]

Istotne znaczenie dla trwałości leków wrażliwych na wilgoć ma woda zawarta w tabletkach. Choć jest korzystna podczas produkcji, wspomagając prasowanie i wytrzymałość mechaniczną tabletki, jej obecność może destabilizować lek. [91] Zawartość wody w postaci leku zależy nie tylko od początkowej jej zawartości, ale także od przepuszczalności opakowania, aktywności wody, warunków środowiska i właściwości substancji tworzących tabletkę. [100]

7.5 Tabletki z cilazaprilem

Tabletki z cilazaprilem są przygotowywane w procesie granulacji na mokro. Schemat produkcji tychże tabletek przedstawiono na RYCINIE 7.2.



RYCINA 7.2

Schemat przedstawiający produkcję tabletek z cilazaprilem z wykorzystaniem granulacji na mokro opracowany na podstawie [81].

Użyte w produkcji substancje pomocnicze spełniają rozmaite funkcje. Laktoza stanowi substancję wypełniającą tabletki razem ze skrobią, która jest dodawana do masy tabletkowej przed i po granulacji pełniąc dodatkowo rolę środka rozsadzającego. Wodny roztwór hypromelozy zastosowano jako substancję wiążącą podczas granulacji na mokro. Funkcje poślizgowe pełnią w tym procesie: talk, stearylofumarany sodu oraz także wspomnianą wcześniej skrobia. [81]

Część praktyczna niniejszego ROZDZIAŁU poświęcona jest trwałości dwóch preparatów handlowych z cilazaprilem, wytwarzanych przez różnych producentów. Preparaty poddane badaniu trwałości oznaczono nazwami: lek A i lek B. Lek A jest lekiem oryginalnym, natomiast lek B jednym z generycznych odpowiedników. TABELA 7.1 przedstawia charakterystykę i opis składu jakościowego badanych leków z uwzględnieniem opakowania, które w obu przypadkach stanowi blister. Jakościowa kompozycja rdzenia tabletek jest identyczna, różnice dotyczą otoczki leku. [6, 7]

TABELA 7.1

Opis składu leku A i B - według kart charakterystyki leku [7, 6]

Lek	A (oryginalny)	B (generyczny)
Postać leku	tabletki	tabletki
Data ważności	36 miesięcy	18 miesięcy
<i>Skład rdzenia</i>	cilazapril jednowodny hypromeloza laktoza jednowodna skrobia kukurydziana stearylofumarany sodu talk	
<i>Skład otoczki</i>	tytanu dwutlenek hypromeloza talk tlenek żelaza	
		laktoza jednowodna makrogol 6000
<i>Opakowanie handlowe</i>	laminat trójwarstwowy OPA/Alu/PVC	

Krótkie okresy ważności leków z cilazaprillem wskazują na niską trwałość cilazaprilu w tak przygotowanych tabletkach. Z tego względu podejmowane są działania mające na celu opracowanie nowych postaci leku, które w bardziej skuteczny sposób będą chronić molekułę cilazaprilu przed rozkładem. Dowodem na te poszukiwania są patenty [5, 101], które na podstawie cilazaprilu opisują jak podwyższyć trwałość wrażliwej na wilgoć substancji biologicznie czynnej w tabletkach.

Na trwałość cilazaprilu w tabletkach korzystnie wpływa:

- zastosowanie, jako substancji wiążącej kopowidonu w ilości 5 - 10 % całkowitej masy tabletkowej, który zmiata wodę i charakteryzuje się niską higroskopijnością
- użycie odpowiedniego rozpuszczalnika dla substancji wiążącej, który dla cilazaprilu zależy od ilości substancji biologicznie czynnej w wysuszonym granulacie
 - rozpuszczalnika alkoholowego, gdy zawartość cilazaprilu wynosi do 1,7 %
 - wody, gdy zawartość cilazaprilu wynosi powyżej 1,7 %
- ustalenie masy tabletkowej w taki sposób, aby zawartość wrażliwej na wilgoć substancji biologicznie czynnej wynosiła 0,6 - 2,7 % masy ogółem
- stosowanie otoczki tabletki, która stanowi barierę dla wilgoci zawartej w otaczającym środowisku, składającej się z alkoholu poliwinylowego, talku, glikolu polietylenowego, środka zmętniającego (dwutlenek tytanu) i/lub kolorującego (tlenek żelaza)
- zastosowanie opakowania stanowiącego barierę dla wilgoci.

7.6 Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu w tabletkach

Do szczegółowych celów dotyczących badań trwałości cilazaprilu w tabletkach zaliczono:

Poznanie trwałości cilazaprilu w dwóch wybranych postaciach farmaceutycznych

- leku oryginalnego A
- leku generycznego B.

Ustalenie kinetycznego mechanizmu rozkładu cilazaprilu na podstawie krzywych rozkładu.

Wyznaczenie stałych szybkości reakcji rozkładu cilazaprilu w leku A i B w stałej wilgotności względnej powietrza $RH = 76,4 \%$ oraz zmiennej temperaturze $T = 318, 323, 338, 333$ i 343 K.

Wyznaczenie zależności Arrhenius'a dla tabletek leku A i B.

Porównanie trwałości cilazaprilu w dwóch wybranych postaciach farmaceutycznych.

Poznanie ochronnej roli opakowania, które stanowi blister dla tabletek leku A i B.

Cele osiągnięto w toku testów kinetycznych, analizy ilościowej i następującej analizy matematycznej oraz statystycznej uzyskanych wyników.

7.7 Materiały i metody

Materiały

- opisane w ROZDZIALE 4.5.1 na stronie 22 oraz
- lek A bez opakowania handlowego (seria: E0102B01)
- lek A w opakowaniu handlowym (seria: E0102B01)
- lek B bez opakowania handlowego (seria: 02661)
- lek B w opakowaniu handlowym (seria: 02661)

Metoda

- HPLC opisana w ROZDZIALE 4.5.2

7.8 Procedury

Warunki testów kinetycznych

Lek bez opakowania

Przygotowanie próbek do testów polegało na umieszczeniu wyjętych z blistra tabletek i umieszczeniu ich w szklanych fiolkach z ciemnego szkła. Każda próba zawierała po dwie tabletki, odpowiednio leku A i B.

Lek w opakowaniu

Przygotowanie próbek do testów polegało na umieszczeniu tabletek w blisterach w szklanych fiolkach z ciemnego szkła. Każda próba zawierała po dwie tabletki w blisterach, odpowiednio leku A i B.

Warunki testów zapewniono w eksykatorach z nasyconym roztworami chlorku sodu umieszczonych w komorach do badań kinetycznych. Dokładną specyfikację warunków opisano w ROZDZIALE 5.7 na stronie 48.

Przygotowane próby poddano testom kinetycznym według schematu według TABELI 7.2.

TABELA 7.2

Plan badań kinetycznych - ocena trwałości cilazaprilu w tabletkach dwóch preparatów handlowych A i B bez opakowania handlowego oraz w nim

Przedmiot badania	Temperatura [K]	Wilgotność względna powietrza [%]
Lek A bez opakowania	318	76,4
	323	
	333	
	338	
	343	
Lek A w opakowaniu	318	76,4
	323	
	333	
	338	
	343	
Lek B bez opakowania	318	76,4
	323	
	333	
	338	
	343	
Lek B w opakowaniu	318	76,4
	323	
	333	
	338	
	343	

Próbki były wyjmowane z eksykatorów i komór cieplnych po czasie zależnym od szybkości rozkładu t [h]. Chłodzone do temperatury pokojowej i analizowane metodą HPLC.

Przygotowanie próbek do analizy HPLC

Próbki poddane testom kinetycznym. Każdą tabletkę (wyjętą z blistra - w przypadku analizy tabletek w opakowaniu) przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Następnie ekstrahowano 25,0 ml metanolu poprzez wytrząsanie przez 30 minut, podczas którego następowała całkowita dezintegracja tabletki. Kolejno powstałą zawiesinę sączone przez twardy sączonek ilościowy 390 (Munktell) w celu uzyskania przezroczystego przesącza.

1,0 ml roztworu badanego mieszano z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (metanowy roztwór benzokainy o stężeniu 0,02 %) i poddawano analizie HPLC.

Próby z cilazaprilem niepoddanym testom kinetycznym. Dokładnie odważono niepoddaną testom kinetycznym sproszkowaną masę tabletkową badanego leku odpowiadającą średniej masie tabletki. Dla leku A średnia masa tabletki wynosi $0,2049 \pm 0,0027$ g

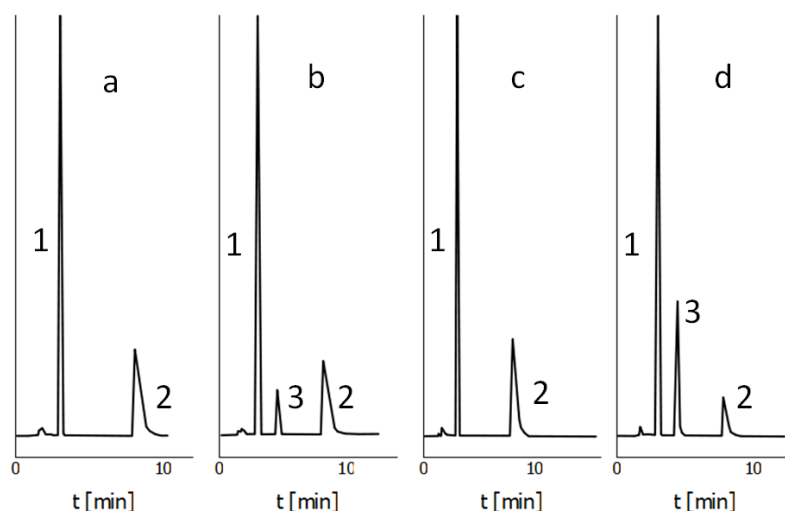
a dla leku B $0,2500 \pm 0,0025$ g. Odważony proszek przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml i następnie ekstrahowano 25,0 ml metanolu. Powstałą zawiesinę wytrząsano przez 30 minut, po czym sączono przez twardy sączek ilościowy 390 (Munktell).

1,0 ml przezroczystego roztworu badanego mieszano z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (metanolowy roztwór benzokainy o stężeniu 0,02 %) i poddawano analizie HPLC.

7.9 Wyniki i ich omówienie

7.9.1 Selektywność metody HPLC

Chromatogramy przedstawiające selektywność metody HPLC względem cilazaprilu, jego produktu rozkładu w obecności substancji pomocniczych wchodzących w skład tabletki leku A i B przedstawia RYCINA 7.3.



RYCINA 7.3

Selektywność metody HPLC względem cilazaprilu (2), produktu rozkładu (3) oraz składników tabletki leku A i B. Chromatogramy dotyczą: a) leku A w czasie t_0 testu kinetycznego i b) w jego trakcie oraz c) leku B w czasie t_0 testu kinetycznego i d) w jego trakcie, pik (1) odpowiada wzorcowi wewnętrznemu.

7.9.2 Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w tabletkach

Kinetyczny mechanizm reakcji rozkładu cilazaprilu w postaci leku, jaką są tabletki nie różni się niczym od tego charakteryzującego degradację cilazaprilu *w substancji*. Świadczą o tym dwa fakty: powstawanie podczas rozkładu produktu o tym samym czasie retencji (RYCINA 7.3) oraz przebieg krzywych rozkładu cilazaprilu o charakterystycznym sigmoidalnym kształcie wskazującym na reakcję autokatalityczną pierwszego rzędu względem stężenia substratu.

Rozkład cilazaprilu także w tym przypadku charakteryzuje się dwoma parametrami:

- okresem indukcji reakcji, za który przyjęto czas do pierwszego punktu eksperymentalnego, który należy do okresu przyspieszenia oraz
- obserwowaną stałą szybkości reakcji, wyznaczoną dla okresu przyspieszenia reakcji metodą najmniejszych kwadratów z równania Prout-Tompkins'a

Z równania Prout-Tompkins'a wyznaczono również czas 50 % rozpadu cilazaprilu.

Wyznaczono także zależność Arrhenius'a wykorzystującą relację obserwowanych stałych szybkości reakcji od odwrotności temperatury. Dzięki niej możliwe było wyznaczenie parametrów termodynamicznych dotyczących reakcji rozkładu cilazaprilu w tabletkach dwóch preparatów handlowych (leku A i B).

7.9.3 Lek oryginalny A

W stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76,4\%$) wzrost temperatury (318 - 343 K) negatywnie wpływał na trwałość cilazaprilu w tabletkach leku A. Przyspieszenie rozkładu substancji biologicznie czynnej w tabletkach wyrażało się obserwowanymi zmianami w parametrach rozkładu cilazaprilu. (RYCINY 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8 i TABELE 7.3, 7.6, 7.9)

Wartości charakteryzujące okres indukcji malały wraz ze zwiększającą się temperaturą, co można zaobserwować na wymienionych powyżej RYCINACH.

Drugim parametrem, którego wartości zmieniały się pod wpływem temperatury była obserwowana stała szybkości reakcji. Wraz ze wzrostem temperatury z 333 K do 338 K zwiększa swoją wartość ponad trzykrotnie, przy czym kolejny wzrost temperatury o 5 K powoduje ponad dwukrotny wzrost jej wartości.

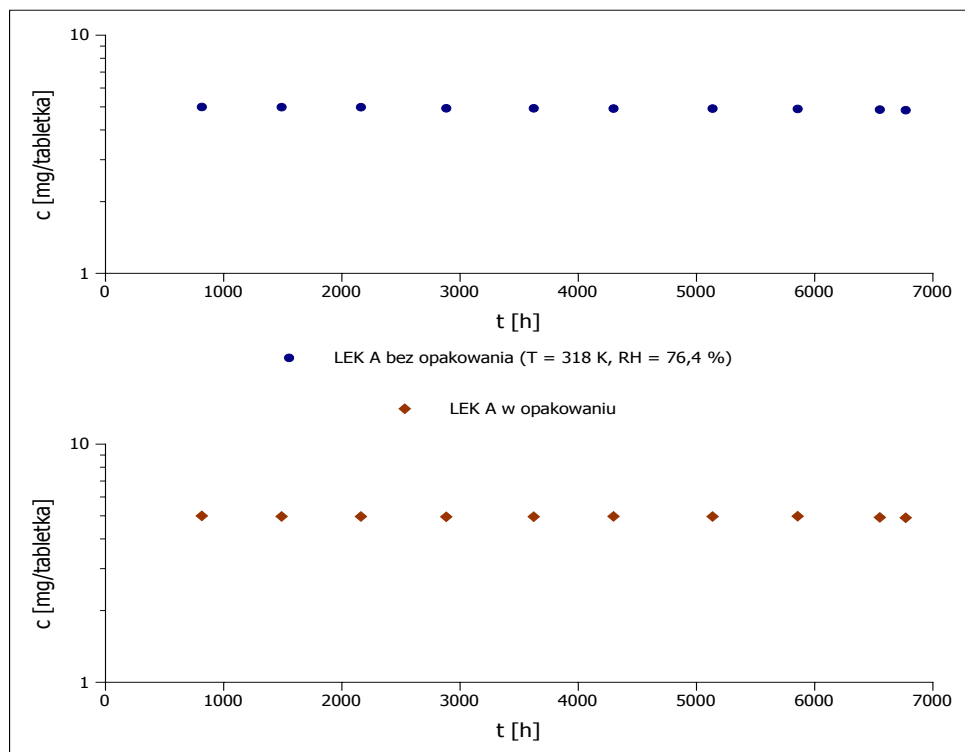
Roli ochronnej blistra nie zaobserwowano w temperaturach $T = 318\text{ K}$ i $T = 323\text{ K}$, gdzie okres indukcji trwał przez cały czas testu (RYCINY 7.4, 7.5) a rozkład cilazaprilu w tabletkach bez i w opakowaniu przebiegał podobnie. Rozbieżności były zaobserwowane dla leku A w temperaturach $T = 333, 338$ oraz 343 K , gdzie wydłużał się okres indukcji. (RYCINY 7.6, 7.7, 7.8 i TABELE 7.4, 7.7, 7.10)

W wyżej wymienionych temperaturach wartości obserwowanych stałych szybkości reakcji dla leku A w opakowaniu były mniejsze od tych wyznaczonych dla tabletek bez opakowania, jednak te zmiany dla $\alpha = 0,05$ są nieistotne statystycznie (TABELE 7.5, 7.8 i 7.11).

Zależność Arrhenius'a dla rozkładu cilazaprilu w leku A zarówno bez opakowania, jak i w nim jest prostoliniowa (TABELA 7.12). Wyznaczono na jej podstawie parametry ter-

modynamiczne charakteryzujące degradację cilazapirilu. Energia aktywacji rośnie niemalże dwukrotnie dla leku A w opakowaniu, co świadczy o ochronnej roli opakowania.

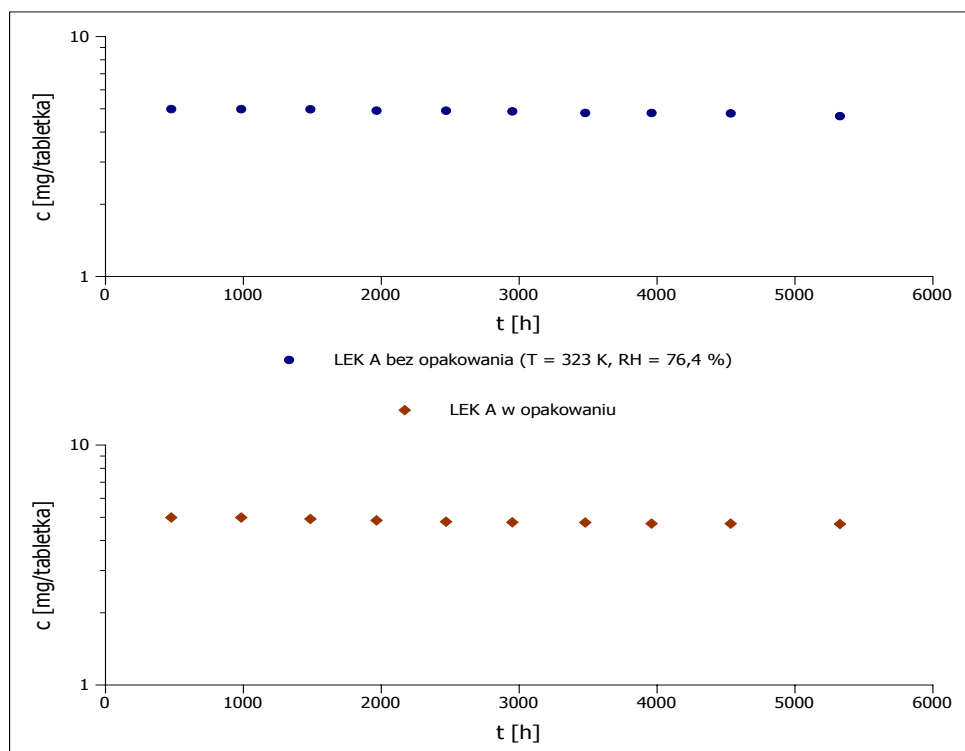
$$T = 318 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 7.4

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazapirilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku A bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 318 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

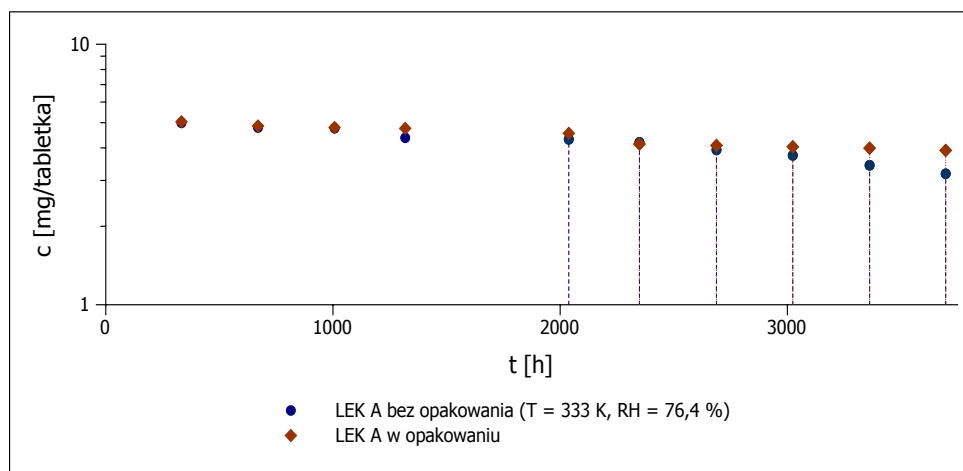
$$T = 323 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 7.5

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku A bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 323 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

$$T = 333 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 7.6

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku A bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 7.3

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku A bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2038	1,0441	0,9224	4,4173	$\bar{c} = 4,3156$
		1,0441	0,8799	4,2139	
2	2349	1,0441	0,8594	4,1156	$\bar{c} = 4,2022$
		1,0441	0,8956	4,2888	
3	2688	1,0441	0,8351	3,9991	$\bar{c} = 3,9317$
		1,0441	0,8069	3,8643	
4	3024	1,0830	0,8085	3,7327	$\bar{c} = 3,7443$
		1,0830	0,8135	3,7559	
5	3362	1,0830	0,7259	3,3516	$\bar{c} = 3,4303$
		1,0830	0,7600	3,5091	
6	3697	1,0830	0,6858	3,1662	$\bar{c} = 3,1830$
		1,0830	0,6931	3,1998	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,00079$	$\Delta a = 0,000075$	$S_a = 0,000027$
$b = 3,4752$	$\Delta b = 0,2181$	$S_b = 0,0786$
$S_y = 0,0376$	$r = -0,998$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$2,20 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$2,08 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	4381

TABELA 7.4

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku A w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 333$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2349	1,0830	0,8211	3,7911	4,8145
		1,0830	0,9723	4,4891	
2	2688	1,0413	0,8515	4,0888	4,4873
		1,0413	0,8515	4,0888	
3	3024	1,0413	0,8075	3,8775	4,2142
		1,0413	0,8757	4,2047	
4	3362	1,0413	0,8144	3,9104	3,9572
		1,0413	0,8481	4,0723	
5	3697	1,0413	0,8150	3,9134	3,6014
		1,0413	0,8150	3,9134	

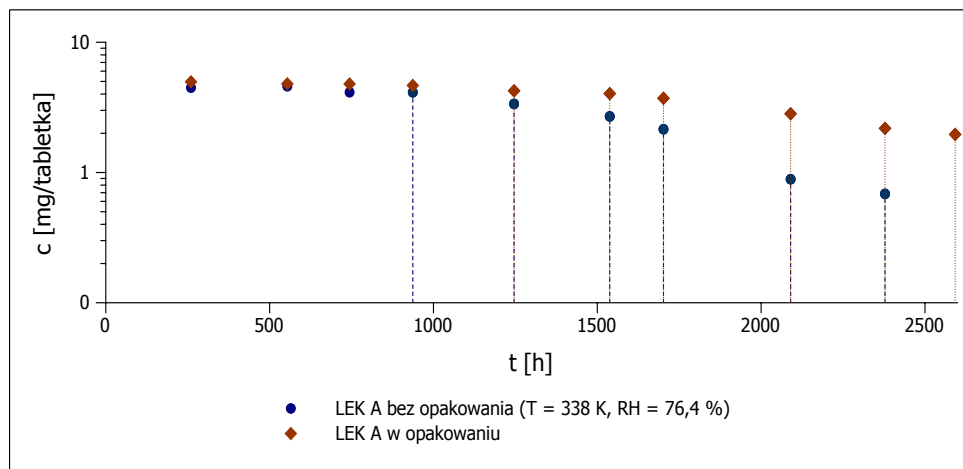
PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,00021$	$\Delta a = 0,000027$	$S_a = 0,0000099$
$b = 2,0674$	$\Delta b = 0,0840$	$S_b = 0,0302$
$S_y = 0,0105$	$r = -0,997$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$5,82 \cdot 10^{-8}$
Δk [1/s]	$7,62 \cdot 10^{-9}$
$t_{0,5}$ [h]	9865

TABELA 7.5

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku A ($T = 333$ K, $RH = 76,4$ %) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek A bez opakowania	Lek A w opakowaniu
$n = 6$	$n = 5$
$\ln y = -0,00079x + 3,4752$	$\ln y = -0,00021x + 2,0674$
$S_{a_1 - a_2} = 0,00041$	
$ t = 1,4390$	
$t(\alpha = 0,05; df = 7) = 2,3646$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) > t $ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 .	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji nie różnią się statystycznie.	

$T = 338 \text{ K}, RH = 76,4 \%$


RYCINA 7.7

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 338 \text{ K}, RH = 76,4 \%$).

TABELA 7.6

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku A bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 338 \text{ K}, RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	937	0,9491	0,7933	4,1795	4,7295
		0,9491	0,7735	4,0752	
2	1246	1,0948	0,7252	3,3117	2,0524
		1,0948	0,7472	3,4122	
3	1538	1,0948	0,6000	2,7402	1,1697
		1,0948	0,5805	2,6509	
4	1702	1,0948	0,4765	2,1763	0,7537
		1,0948	0,4645	2,1214	
5	2090	1,0948	0,2128	0,9719	0,2159
		1,0948	0,1760	0,8038	
6	2378	1,0948	0,1420	0,6486	0,1588
		1,0948	0,1581	0,7221	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0024$	$\Delta a = 0,00037$	$S_a = 0,00013$
$b = 3,8239$	$\Delta b = 0,6320$	$S_b = 0,2277$
$S_y = 0,1574$	$r = -0,994$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$6,79 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$1,02 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	1565

TABELA 7.7

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku A w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 338$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

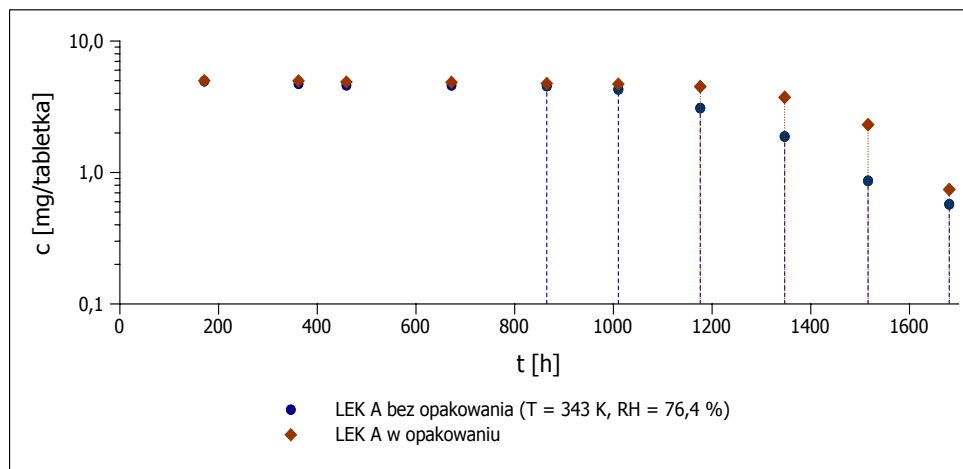
n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	1246	1,0435	0,8718	4,1773	$\bar{c}=4,2387$
		1,0435	0,8974	4,3001	
2	1538	1,0435	0,8415	4,0322	$\bar{c}=4,0345$
		1,0435	0,8425	4,0367	
3	1702	1,0435	0,8070	3,8666	$\bar{c}=3,7163$
		1,0435	0,7442	3,5661	
4	2090	1,0435	0,5793	2,7759	$\bar{c}=2,8259$
		1,0435	0,6002	2,8760	
5	2378	1,0435	0,4825	2,3117	$\bar{c}=2,1832$
		1,0435	0,4288	2,0546	
6	2592	1,0435	0,7519	3,6026	$\bar{c}=1,9618$
		1,0435	0,0670	0,3210	
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,0017$		$\Delta a = 0,00027$		$S_a = 0,000098$	
$b = 3,9636$		$\Delta b = 0,5391$		$S_b = 0,1942$	
$S_y = 0,1134$		$r = -0,994$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k [1/s]		$4,81 \cdot 10^{-7}$			
Δk [1/s]		$7,56 \cdot 10^{-8}$			
$t_{0,5}$ [h]		2288			

TABELA 7.8

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku A ($T = 338$ K, $RH = 76,4$ %) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek A bez opakowania	Lek A w opakowaniu
$n = 6$	$n = 6$
$\ln y = -0,0024x + 3,8239$	$\ln y = -0,0017x + 3,9636$
$S_{a1 - a2} = 0,0012$	
$ t = 0,5901$	
$t(\alpha = 0,05; df = 8) = 2,3060$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) > t $ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 .	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji nie różnią się statystycznie.	

$$T = 343 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 7.8

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 7.9

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku A bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	865	0,9687	0,7800	4,0257	10,0432
		0,9687	0,9821	5,0688	
2	1010	0,9687	0,8751	4,5164	6,0497
		0,9687	0,7876	4,0651	
3	1176	0,8966	0,5348	2,9826	1,6159
		0,8966	0,5729	3,1947	
4	1347	0,8966	0,2848	1,5881	0,6015
		0,8966	0,3887	2,1675	
5	1516	0,8966	0,1784	0,9952	0,2091
		0,8966	0,1317	0,7342	
6	1680,5	0,9687	0,1002	0,5170	0,1295
		0,9687	0,1219	0,6292	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0057$	$\Delta a = 0,00091$	$S_a = 0,00033$
$b = 7,2917$	$\Delta b = 1,1832$	$S_b = 0,4262$
$S_y = 0,2266$	$r = -0,993$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,58 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$2,53 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	1279

TABELA 7.10

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku A w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 343$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	1176	0,8762 0,8762	0,8126 0,7663	4,6371 4,3728	$\bar{c}=4,5050$ 9,1007
2	1347	0,8762 0,8762	0,6507 0,6577	3,7134 3,7534	$\bar{c}=3,7334$ 2,9476
3	1516	0,8762 0,8762	0,3947 0,4152	2,2522 2,3694	$\bar{c}=2,3108$ 0,8593
4	1680,5	0,9281 0,9281	0,1584 0,1171	0,8536 0,6309	$\bar{c}=0,7423$ 0,1743
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,0078$		$\Delta a = 0,0014$		$S_a = 0,00050$	
$b = 11,4703$		$\Delta b = 2,0050$		$S_b = 0,7223$	
$S_y = 0,1884$		$r = -0,996$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k [1/s]		$2,16 \cdot 10^{-6}$			
Δk [1/s]		$3,86 \cdot 10^{-7}$			
$t_{0,5}$ [h]		1475			

TABELA 7.11

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku A ($T = 343$ K, $RH = 76,4$ %) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek A bez opakowania	Lek A w opakowaniu
$n = 6$	$n = 4$
$\ln y = -0,0057x + 7,2917$	$\ln y = -0,0078x + 11,4703$
$S_{a1 - a2} = 0,0040$	
$ t = 0,5202$	
$t(\alpha = 0,05; df = 6) = 2,4469$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) > t $ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 .	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji nie różnią się statystycznie.	

Zależność Arrhenius'a ($T = 333 - 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)

TABELA 7.12

Parametry prostej opisującej zależność Arrhenius'a - półlogarytmiczną funkcję liniową stałych szybkości reakcji (k [1/s]) i odwrotności temperatury ($1/T$ [1/K]) dla reakcji rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A bez i z uwzględnieniem opakowania handlowego w warunkach kinetycznych $T = 333-343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ oraz obliczone parametry termodynamiczne

Lek A - zależność Arrhenius'a		
	bez opakowania	w opakowaniu
<i>Parametry prostej $\ln k = a \cdot \frac{1}{T} + \ln A$</i>		
a	-22537,44	-41310,86
Δa	2087,97	46648,78
S_a	1642,61	3671,40
$\ln A$	52,39	107,48
$\Delta \ln A$	61,76	138,04
S_b	4,86	10,85
S_y	0,10	0,23
r	-0,997	-0,996
<i>Parametry termodynamiczne</i>		
E_a [kJ/mol]	187,36	343,48
ΔE_a	173,53	387,86
H_{akt} [kJ/mol]	184,91	341,00
ΔH_{akt}	176,01	390,33
S_{akt} [J/(K mol)]	190,70	648,79
ΔS_{akt}	268,60	902,84

7.9.4 Lek generyczny B

Wzrost temperatury (318 - 343 K) przy zachowaniu stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76,4 \%$) przyspiesza rozkład cilazaprilu również w tabletkach leku B. (RYCINY 7.9, 7.10, 7.11, 7.12, 7.13 i TABELA 7.13, 7.16, 7.19)

Obserwowano zmiany w okresach indukcji w poszczególnych temperaturach, co zostało przedstawione na wymienionych powyżej RYCINACH. Przy czym warto zaznaczyć, że wartości okresów indukcji są mniejsze dla leku B w porównaniu z lekiem A a zjawisko to zostało ujęte przez producenta leku B w krótszej dacie ważności preparatu.

Wartości obserwowanej stałej szybkości reakcji rosną wraz ze zwiększającą się temperaturą, co ukazane jest w liniowej zależności Arrhenius'a, której parametry opisano w TABELI 7.22. Zmiana temperatury z 333 K do 338 K jest powodem niemalże trzykrotnego wzrostu obserwowanej stałej szybkości reakcji, natomiast z 338 K do 343 K podnosi tą wartość ponad dwa razy.

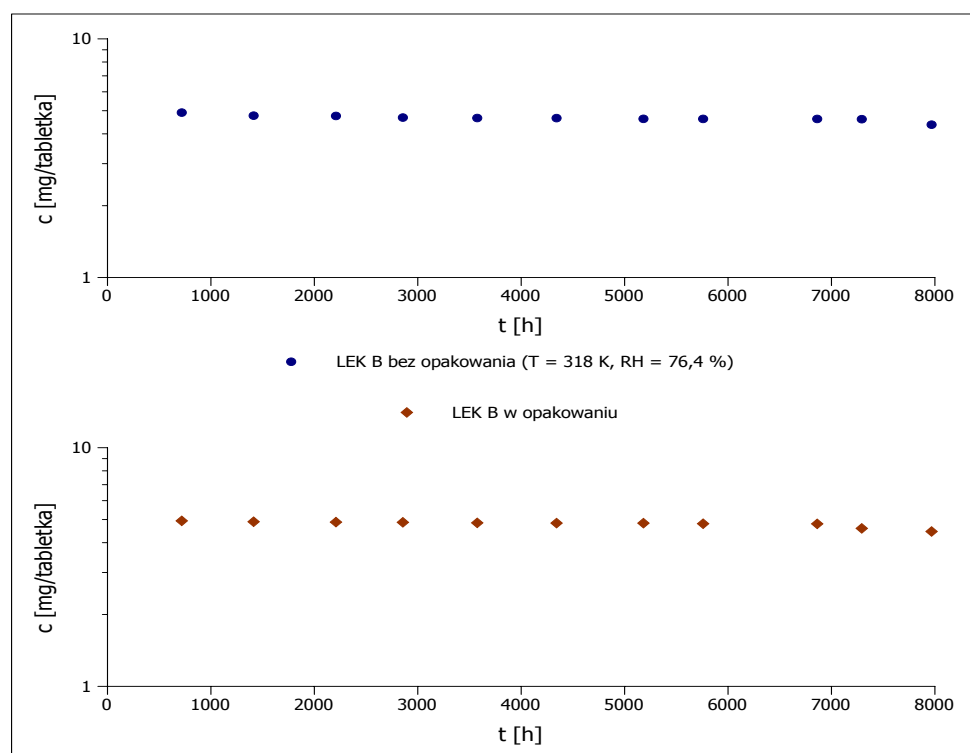
W przypadku leku B nie obserwowano korzystnego wpływu blistra na trwałość cilazaprilu w temperaturach w $T = 318 \text{ K}$ i $T = 323 \text{ K}$, gdzie ma miejsce tylko okres indukcji a rozkład cilazaprilu w tabletkach bez i w opakowaniu przebiega podobnie. (RYCINY 7.9, 7.10). W wyższych temperaturach 333 - 343 K, gdzie rozkład cilazaprilu charakteryzuje

się wyraźnie zaznaczonym okresem przyspieszenia reakcji, nie obserwowano również zmian czasu indukcji dla tabletek umieszczonych w blistrze. (RYCINY 7.11, 7.12, 7.13 i TABELLE 7.14, 7.17, 7.20).

Różnice w parametrach opisujących rozkład tabletek w opakowaniu dotyczą wartości obserwowanych stałych szybkości reakcji. Przy czym, okazują się one zaskakująco większe od tych wyznaczonych dla tabletek bez opakowania, jednak różnice te dla $\alpha = 0,05$ są nieistotne statystycznie (TABELLE 7.15, 7.18 i 7.21).

Na brak roli ochronnej blistra wskazuje także energia aktywacji reakcji rozkładu cila-zaprilu w leku B wyznaczona na podstawie równania Arrhenius'a.

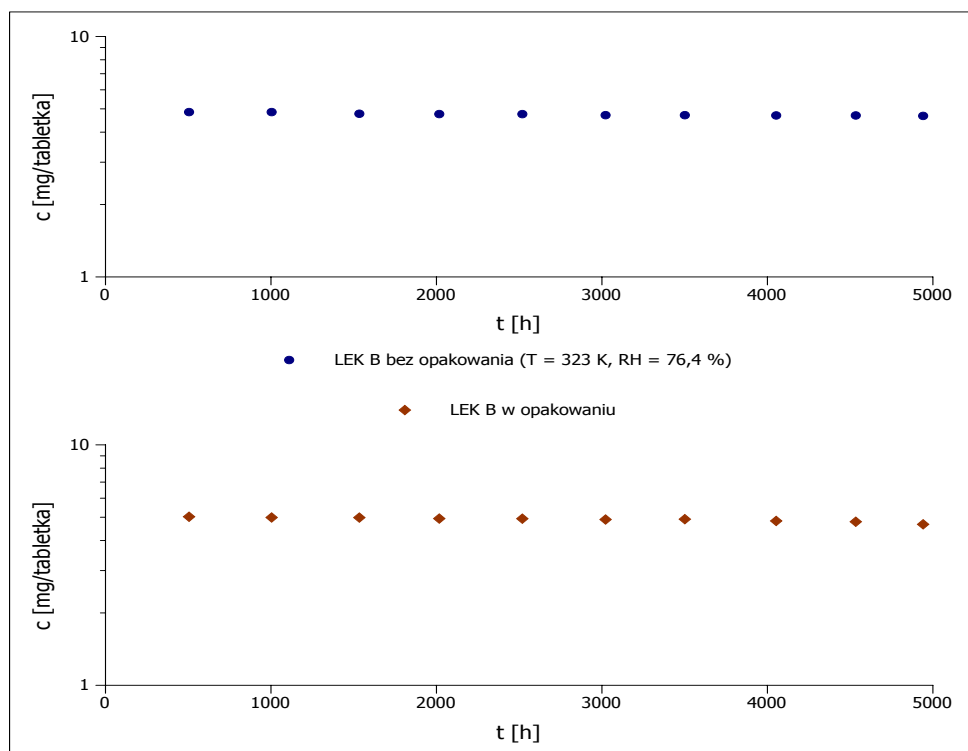
$$T = 318 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 7.9

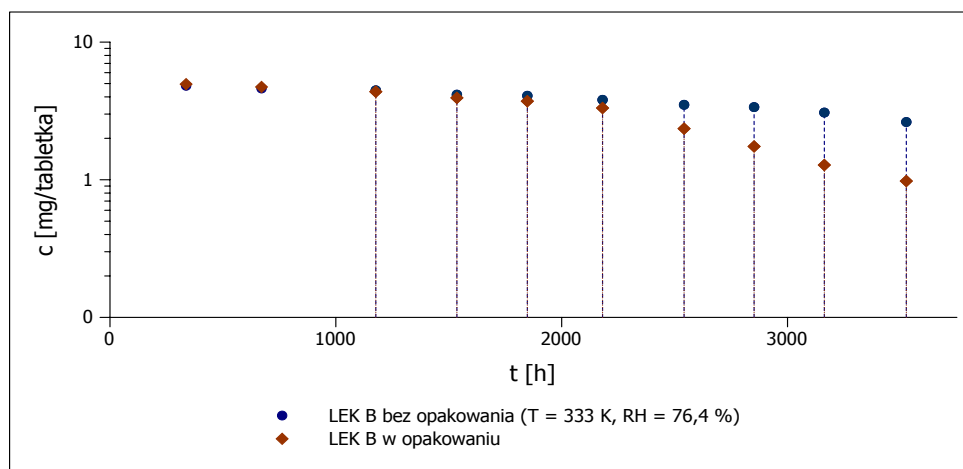
Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia citaloprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku B bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 318 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

$$T = 323 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 7.10

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku B bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 323 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

$T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ 

RYCINA 7.11

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku B bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 7.13

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku B bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 333$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	1177	1,1816	1,0579	4,4765	8,3645
		1,1816	1,0529	4,4556 $\bar{c}=4,4661$	
2	1536	1,1816	0,9741	4,1221	4,8960
		1,1816	0,9882	4,1818 $\bar{c}=4,1520$	
3	1848	1,1738	0,9693	4,1288	4,4036
		1,1738	0,9439	4,0205 $\bar{c}=4,0747$	
4	2181	1,1738	0,8918	3,7988	3,1927
		1,1738	0,8959	3,8161 $\bar{c}=3,8075$	
5	2542	1,1738	0,7986	3,4017	2,3413
		1,1738	0,8464	3,6054 $\bar{c}=3,5036$	
6	2852	1,1738	0,7956	3,3888	2,0706
		1,1738	0,7875	3,3545 $\bar{c}=3,3716$	
7	3163	1,0782	0,6585	3,0540	1,6004
		1,0782	0,6685	3,1003 $\bar{c}=3,0772$	
8	3526	1,0782	0,5389	2,4992	1,1071
		1,0782	0,5941	2,7550 $\bar{c}=2,6271$	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0008$	$\Delta a = 0,000097$	$S_a = 0,00004$
$b = 2,9454$	$\Delta b = 0,2406$	$S_b = 0,0983$
$S_y = 0,0857$	$r = -0,993$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$2,22 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$2,70 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	3682

TABELA 7.14

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku B w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 333$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	1177	1,1687	1,0691	4,5739	6,8327
		1,1687	0,9699	4,1494 $\bar{c}=4,3616$	
2	1536	1,1687	0,8986	3,8446	3,6920
		1,1687	0,9406	4,0241 $\bar{c}=3,9343$	
3	1848	1,1687	0,8842	3,7831	2,9131
		1,1687	0,8558	3,6614 $\bar{c}=3,7222$	
4	2181	1,1687	0,7909	3,3837	1,9789
		1,1687	0,7618	3,2593 $\bar{c}=3,3215$	
5	2542	1,1880	0,5640	2,3737	0,8881
		1,1880	0,5536	2,3299 $\bar{c}=2,3518$	
6	2852	1,1880	0,5973	2,5137	0,5365
		1,1880	0,2324	0,9781 $\bar{c}=1,7459$	
7	3163	1,1880	0,4683	1,9712	0,3440
		1,1880	0,1397	0,5882 $\bar{c}=1,2797$	
8	3526	1,1880	0,0641	0,2696	0,2434
		1,1880	0,4011	1,6881 $\bar{c}=0,9789$	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0015$	$\Delta a = 0,00015$	$S_a = 0,000061$
$b = 3,6796$	$\Delta b = 0,3669$	$S_b = 0,1500$
$S_y = 0,1308$	$r = -0,995$	

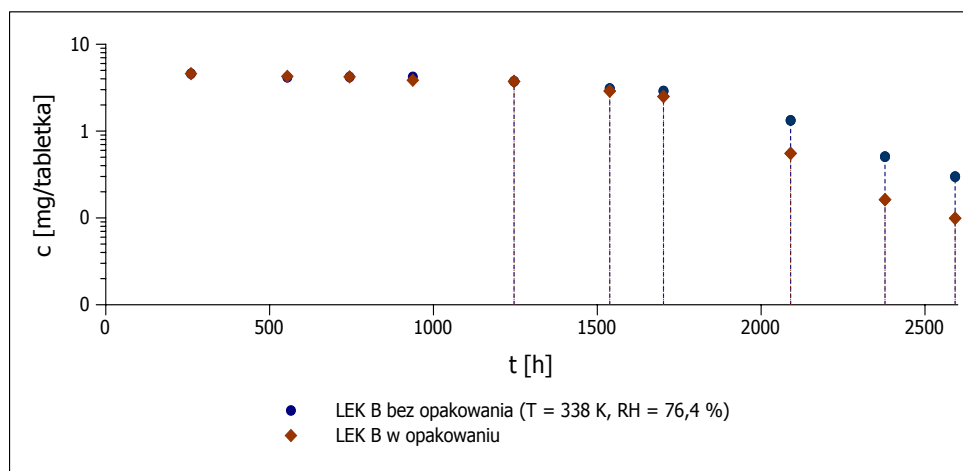
PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$4,08 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$4,12 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	2503

TABELA 7.15

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku B ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H0: a_1 = a_2$	
$H1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek B bez opakowania	Lek B w opakowaniu
$n = 8$	$n = 8$
$lny = -0,0008x + 2,9454$	$lny = -0,0015x + 3,6796$
$S_{a1 - a2} = 0,00059$	
$ t = 1,1468$	
$t(\alpha = 0,05; df = 12) = 2,1788$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) > t $ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy $H0$.	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji nie różnią się statystycznie.	

$$T = 338 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 7.12

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku B bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 338 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 7.16

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku B bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 338 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	1246	1,0330	0,7521	3,6405	$\bar{c} = 3,7399$
		1,0330	0,7932	3,8393	
2	1538	1,0330	0,6413	3,1041	$\bar{c} = 3,0912$
		1,0330	0,6360	3,0784	
3	1702	1,0330	0,5956	2,8828	$\bar{c} = 2,8920$
		1,0330	0,5994	2,9012	
4	2090	1,0330	0,3009	1,4565	$\bar{c} = 1,3283$
		1,0330	0,2479	1,2000	
5	2378	1,0330	0,1143	0,5531	$\bar{c} = 0,5081$
		1,0330	0,0957	0,4630	
6	2592	1,0330	0,0549	0,2658	$\bar{c} = 0,2990$
		1,0330	0,0686	0,3322	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0030$	$\Delta a = 0,00057$	$S_a = 0,00021$
$b = 5,0631$	$\Delta b = 1,1387$	$S_b = 0,4102$
$S_y = 0,2395$	$r = -0,991$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$8,29 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$1,60 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	1697

TABELA 7.17

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku B w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 338$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]	
1	1246	1,0606	0,8141	3,8379	$\bar{c} = 3,7307$	2,9393
		1,0606	0,7687	3,6236		
2	1538	1,0606	0,6100	2,8758	$\bar{c} = 2,8915$	1,3713
		1,0606	0,6167	2,9071		
3	1702	1,0606	0,6378	3,0066	$\bar{c} = 2,5014$	1,0011
		1,0606	0,4235	1,9962		
4	2090	1,0606	0,1095	0,5162	$\bar{c} = 0,5537$	0,1245
		1,0606	0,1254	0,5911		
5	2378	1,0606	0,0689	0,3246	$\bar{c} = 0,1623$	0,0335
		1,0606	0	0		
6	2592	1,0606	0,0421	0,1982	$\bar{c} = 0,0991$	0,0202
		1,0606	0	0		

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0040$	$\Delta a = 0,00074$	$S_a = 0,00027$
$b = 6,3550$	$\Delta b = 1,4640$	$S_b = 0,5274$
$S_y = 0,3079$	$r = -0,991$	

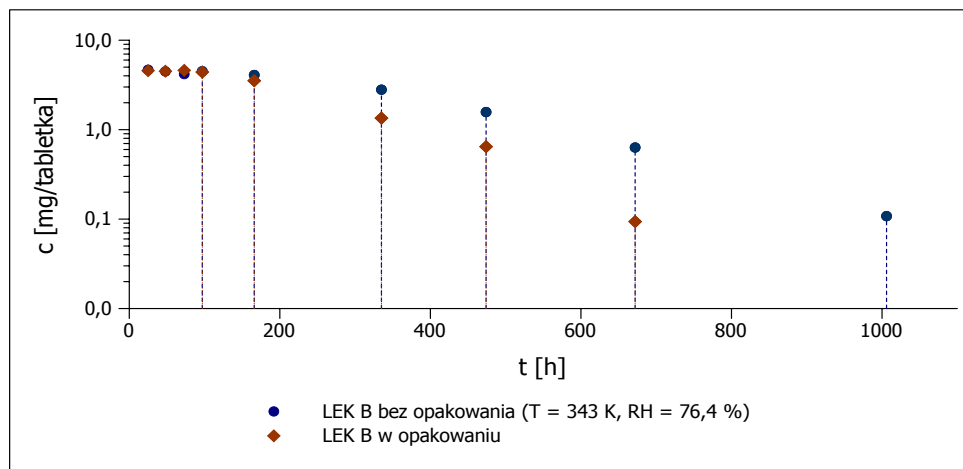
PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,11 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$2,05 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	1591

TABELA 7.18

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku B ($T = 338$ K, $RH = 76,4$ %) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek B bez opakowania	Lek B w opakowaniu
$n = 6$	$n = 6$
$\ln y = -0,0030x + 5,0631$	$\ln y = -0,0040x + 6,3550$
$S_{a1 - a2} = 0,0018$	
$ t = 0,5603$	
$t(\alpha = 0,05; df = 8) = 2,3060$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) > t $ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 .	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji nie różnią się statystycznie.	

$$T = 343 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 7.13

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku B bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 7.19

Zmiany zawartości cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku B bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	97	1,2094	1,1468	4,7412	8,9606
		1,2094	1,0291	4,2548	
2	166	1,1205	0,8842	3,9457	4,4432
		1,1205	0,9451	4,2172	
3	335	1,1205	0,6165	2,7511	1,2712
		1,1205	0,6378	2,8459	
4	474	1,1205	0,3825	1,7069	0,4590
		1,1611	0,3342	1,4391	
5	672	1,1611	0,1388	0,5978	0,1445
		1,1611	0,1544	0,6650	
6	1006	1,1611	0,0501	0,2159	0,0221
		0	0	0	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0065$	$\Delta a = 0,00081$	$S_a = 0,00029$
$b = 2,5621$	$\Delta b = 0,4493$	$S_b = 0,1619$
$S_y = 0,2222$	$r = -0,996$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,82 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$2,26 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	392

TABELA 7.20

Zmiany w czasie zawartości cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku B w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 343$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	97	1,2094	1,0594	4,3800	$\bar{c} = 4,4066$
		1,2094	1,0723	4,4332	
2	166	1,1814	0,8202	3,4715	$\bar{c} = 3,5233$
		1,1814	0,8447	3,5751	
3	335	1,1814	0,3306	1,3992	$\bar{c} = 1,3466$
		1,1814	0,3057	1,2940	
4	474	1,1814	0,1692	0,7160	$\bar{c} = 0,6452$
		1,1814	0,1357	0,5744	
5	672	0	0	0	$\bar{c} = 0,0938$
		1,1814	0,0443	0,1875	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0100$	$\Delta a = 0,0020$	$S_a = 0,00061$
$b = 2,6847$	$\Delta b = 0,7948$	$S_b = 0,2498$
$S_y = 0,2865$	$r = -0,994$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$2,77 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$5,43 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	269

TABELA 7.21

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku B ($T = 343$ K, $RH = 76,4$ %) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek B bez opakowania	Lek B w opakowaniu
$n = 6$	$n = 5$
$\ln y = -0,0065x + 2,5621$	$\ln y = -0,0100x + 2,6847$
$S_{a1 - a2} = 0,0034$	
$ t = 1,0107$	
$t(\alpha = 0,05; df = 7) = 2,3646$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) > t $ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 .	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji nie różnią się statystycznie.	

Zależność Arrhenius'a ($T = 318 - 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)

TABELA 7.22

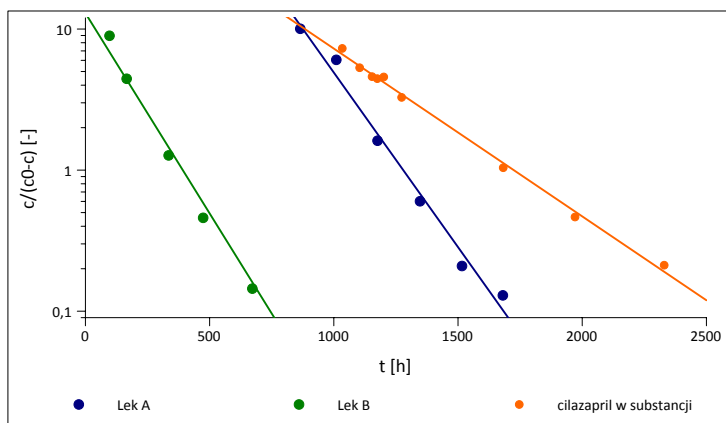
Parametry prostej opisującej zależność Arrheniusa - półlogarytmiczną funkcję liniową stałych szybkości reakcji (k [1/s]) i odwrotności temperatury ($1/T$ [1/K]) dla reakcji rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku B bez i z uwzględnieniem opakowania handlowego w warunkach kinetycznych $T = 333 - 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ oraz obliczone parametry termodynamiczne

Lek B - zależność Arrheniusa		
	bez opakowania	w opakowaniu
<i>Parametry prostej $\ln k = a \cdot \frac{1}{T} + \ln A$</i>		
a	-24008,31	-21883,26
Δa	41928,92	4579,47
S_a	3299,93	360,42
$\ln A$	56,86	51,01
$\Delta \ln A$	124,08	13,55
S_b	9,77	1,07
S_y	0,20	0,02
r	-0,991	-1,000
<i>Parametry termodynamiczne</i>		
E_a [kJ/mol]	199,62	181,95
ΔE_a	348,61	38,08
H_{akt} [kJ/mol]	197,14	179,47
ΔH_{akt}	351,09	40,55
S_{akt} [J/(K mol)]	227,85	179,23
ΔS_{akt}	786,71	132,24

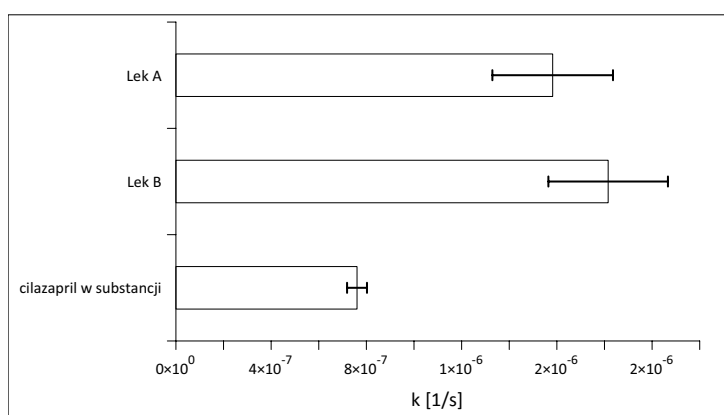
**7.9.5 Porównanie trwałości cilazaprilu w leku A i B z cilazapri-
lem w substancji**

Analiza rozkładów cilazaprilu w substancji, tabletkach leku A i B w warunkach $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ została przedstawiona na RYCINIE 7.14.

Cilazapril w substancji charakteryzuje się największą trwałością. Substancje pomocnicze użyte do produkcji tabletki przyspieszają rozkład cilazaprilu, wpływając na parametry reakcji rozkładu. Wartości obserwowanych stałych szybkości rosną zarówno w leku A, jak i B. W tabletkach leku B obserwowano dodatkowo negatywną zmianę skrócenia okresu indukcji reakcji rozkładu.



(a)



(b)

RYCINA 7.14

Porównanie trwałości cilazaprilu w substancji oraz tabletkach leku A i B ($T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$), gdzie (a) przedstawia liniowe półlogarytmiczne zależności Prout-Tompkins'a, natomiast (b) wykres słupkowy porównujący obserwowane stałe szybkości rozkładu.

7.10 Podsumowanie

Tabletka jest złożoną postacią leku. Na jej trwałość mogą wpływać różne czynniki: począwszy od składników tabletki, jej otoczki, poprzez sposób wytwarzania, opakowanie, na warunkach przechowywania kończąc.

Przeprowadzane badania dwóch postaci leku z cilazaprilem wskazują, że jego trwałość w tabletkach jest gorsza od cilazaprilu w substancji. W przypadku cilazaprilu metoda produkcji tabletki wpływa negatywnie na jego stabilność. Został tu osiągnięty kompromis, dzięki któremu produkcja tabletek jest możliwa, jednak cierpi na tym trwałość leku.

Reakcję rozkładu cilazaprilu przyspiesza także temperatura i wilgotność względna powietrza, dlatego należy unikać przechowywania tabletek z cilazaprilem w miejscach niekorzystnych (łazienka i kuchnia) a w przypadku rozdzielania leku do dozowników nie należy wyciągać ich z blistra.

Trwałość cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu

8.1	Terapia niekontrolowanego nadciśnienia tętniczego	153
8.2	Diuretyki	154
8.3	Charakterystyka hydrochlorotiazydu	155
8.4	Lek złożony	155
8.5	Szczegółowe cele badania wpływu hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu	157
8.6	Materiały i metody	158
8.7	Procedury	158
8.8	Wyniki i ich omówienie	160
8.8.1	Selektywność metody HPLC	160
8.8.2	Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu	161
8.8.3	Wpływ hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu w mieszaninie HCTZ	161
8.8.4	Lek H	167
8.8.5	Porównanie trwałości cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu z cilazapilem w <i>substancji</i> i w referencyjnym leku A	176
8.9	Podsumowanie	177

8.1 Terapia niekontrolowanego nadciśnienia tętniczego

Zdiagnozowane nadciśnienie tętnicze poddaje się terapii mającej na celu obniżenie ciśnienia krwi. Leczenie obejmuje zmianę stylu życia i farmakoterapię. Jednak w wielu przypadkach (stanowiących 10 - 25 %), mimo szeroko rozwiniętej wiedzy na ten temat i dostępności szeregu leków o różnych mechanizmach działania, nadciśnienie jest wciąż niekontrolowane. [9]

Przyczyn tych zatrwających danych epidemiologicznych jest wiele. Do najczęstszych zalicza się:

- nieprzestrzeganie przez pacjentów wytycznych dotyczących stosowania leków i zmiany stylu życia,
- zaprzestanie leczenia po pojawieniu się działań niepożądanych leku, ale także
- brak oczekiwanej odpowiedzi organizmu na monoterapię, co dotyczy połowy leczonych. [16]

Fakty tłumaczące brak efektów terapeutycznych są na tyle istotne, że pozwalają na podjęcie kroków, które finalnie przyczynią się do uregulowania wartości ciśnienia krwi. Jeśli pacjent zrezygnował z terapii, należy mu wytłumaczyć jej konieczność i uzmysłowić długoterminowe skutki niekontrolowanego nadciśnienia. W przypadku wystąpienia działań niepożądanych zmienia się lek. Natomiast, kiedy jedna substancja lecznicza nie przynosi oczekiwanego efektu stosuje się leki złożone.

Terapia skojarzona cechuje się wieloma zaletami. W porównaniu do monoterapii jest ona bardziej skuteczna a wartości docelowe ciśnienia uzyskuje się w krótszym czasie. Pozwala także na leczenie niższymi dawkami leków, dzięki czemu zapobiega występowaniu działań niepożądanych. Dodatkowy wzrost *compliance* uzyskuje się, kiedy zamiast przyjmowania kilku tabletek stosuje się jeden lek złożony. [16]

Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego w swoich najnowszych zaleceniach poleca niżej wymienione kombinacje dwóch leków:

- inhibitor konwertazy angiotensyny i diuretyk tiazydowy/tiazydopodobny,
- inhibitor konwertazy angiotensyny i antagonistę kanału wapniowego,
- antagonistę receptora angiotensyny i diuretyk,
- antagonistę receptora angiotensyny i antagonistę kanału wapniowego. [17]

Te podstawowe połączenia dwulekowe są dobrze tolerowane, skuteczne i co ważne redukują ryzyko występowania incydentów sercowo-naczyniowych. [17]

8.2 Diuretyki

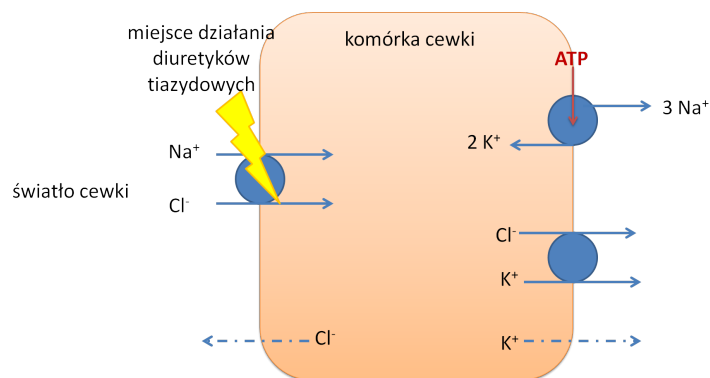
Leki moczopędne stanowią grupę leków stosowanych w leczeniu nadciśnienia i obrzęków. Miejscem ich działania są przede wszystkim nerki a głównym efektem terapeutycznym jest zwiększenie wydalania sodu i wody z organizmu. [102, 103]

Ze względu na punkt uchwytu wyróżniamy diuretyki:

- osmotyczne i inhibitory anhidrazy węglanowej - działające w obrębie cewki bliższej,
- diuretyki pętlowe,
- diuretyki tiazydowe i diuretyki oszczędzające potas - działające w obrębie cewki dalszej. [104]

Hydrochlorotiazyd, wstępujący w leku złożonym z cilazaprilem, należy do tiazydów - pochodnych sulfonamidowych benzotiazyny.

RYCINA 8.1 przedstawia mechanizm działania tiazydów. W tym przypadku efekt moczopędny po podaniu leku zostaje osiągnięty poprzez zahamowanie wchłaniania zwrotnego jonów sodu w korowym odcinku ramienia wstępującego pętli nefronu i w początkowej części kanalika dalszego. Dzieje się to przez inhibicję kotransportera Na^+/Cl^- . [105]



RYCINA 8.1

Komórkowy mechanizm działania tiazydów [104].

Konsekwencją jest wydalanie większej ilości moczu przez nerki, co tłumaczy zatrzymanie reabsorpcji jonów sodu i chloru powodujące osmotyczny transport większych ilości wody do światła cewki moczowej. Wydalana wraz z moczem woda powoduje redukcję objętości krwi i zapewnia efekt hipotensyjny. Poprawiona zostaje także wydolność serca. [61, 106]

Tiazydy przyczyniają się jednocześnie do przywrócenia dobowego rytmu ciśnienia krwi. Wydalanie chlorku sodu zapobiega retencji sodu, przez co możliwy jest nocny spadek ciśnienia krwi. [107]

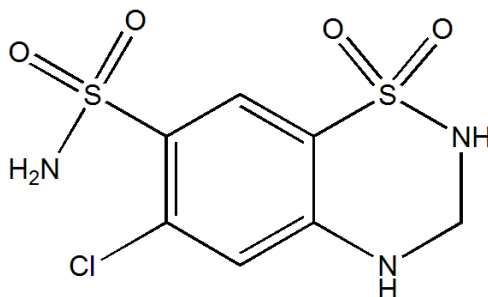
8.3 Charakterystyka hydrochlorotiazydu

Synonimy

Hydrochlorothiazidum, Hydrochlorothiazide

Wzór chemiczny

$C_7H_8ClN_3O_4S_2$ (RYCINA 8.2)



RYCINA 8.2

Wzór strukturalny 4-chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzotriazyno-7-sulfonamidu 1,1-ditlenku.

Masa cząsteczkowa

297,7 u

Wygląd

Krystaliczny proszek koloru białego lub prawie białego. [55]

8.4 Lek złożony

Leki złożone składające się z niskiej dawki inhibitora konwertazy angiotensyny i diuretyku uważane są za wysoce efektywne. Dwa różne mechanizmy działania skutkują addytywnym efektem redukującym nadciśnienie. Istnieją również dowody na to, że diuretyki potęgują działanie inhibitorów konwertazy angiotensyny na układ renina-angiotensyna-aldosteron. [9, 16]

Cilazapril w terapii skojarzonej stosuje się z hydrochlorotiazydem. [108] Na rynku farmaceutycznym dostępny jest lek złożony z tymi dwoma substancjami leczniczymi. (TABELA 8.1) W tej pracy zostanie on nazwany lekiem H.

TABELA 8.1

Opis składu leku H - według karty charakterystyki leku [109]

Lek	H
Postać leku	tabletki
Data ważności	36 miesięcy
<i>Skład rdzenia</i>	
	cilazapril jednowodny
	hydrochlorotiazyd
	hypromeloza
	laktoza jednowodna
	skrobia kukurydziana
	talk
	stearylowinian sodu
<i>Skład otoczki</i>	
	dwutlenek tytanu
	hypromeloza
	talk
	tlenek żelaza czerwony
<i>Opakowanie handlowe</i>	
laminat trójwarstwowy OPA/Alu/PVC	

Z punktu widzenia trwałości leku, dodatkowa substancja biologicznie czynna stanowi kolejny element postaci leku, który może uczestniczyć w interakcjach i reakcjach chemicznych. Może wpływać na substancję leczniczą i ją destabilizować. [72]

W niniejszym ROZDZIALE zostaną przedstawione wyniki dotyczące wpływu hydrochlorotiazynu na trwałość cilazaprilu zarówno w mieszaninie modelowej, jak i tabletkach leku H.

8.5 Szczegółowe cele badania wpływu hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu

Szczegółowe cele dotyczące badania wpływu hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu przedstawiono poniżej.

Mieszanina modelowa cilazaprilu z hydrochlorotiazydem

Poznanie wpływu hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu w mieszaninie modelowej.

Ustalenie kinetycznego mechanizmu rozkładu cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu na podstawie krzywych rozkładu.

Wyznaczenie stałych szybkości reakcji rozkładu cilazaprilu w mieszaninie modelowej w obecności hydrochlorotiazydu w stałej temperaturze $T = 343$ K i $RH = 50,9, 66,5, 76,4$ %.

Porównanie rozkładu cilazaprilu w mieszaninie modelowej z hydrochlorotiazydem z degradacją cilazaprilu w *substancji* celem ustalenia wzajemnych oddziaływań.

Poznanie wpływu zwiększającej się wilgotności względnej powietrza na rozkład cilazaprilu w mieszaninie modelowej z hydrochlorotiazydem.

Tabletki cilazaprilu z hydrochlorotiazydem

Poznanie wpływu hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu w tabletkach leku H.

Ustalenie kinetycznego mechanizmu rozkładu cilazaprilu w leku H.

Wyznaczenie stałych szybkości reakcji rozkładu cilazaprilu w leku H w stałej wilgotności względnej powietrza $RH = 76,4$ % oraz zmiennej temperaturze $T = 323, 328, 333, 338$ i 343 K.

Wyznaczenie zależności Arrhenius'a dla tabletek leku H.

Porównanie trwałości cilazaprilu w mieszaninie modelowej i postaci farmaceutycznej z hydrochlorotiazydem z trwałością postaci farmaceutycznej samego cilazaprilu i cilazaprilu w *substancji*.

Poznanie ochronnej roli opakowania, które stanowi blister dla cilazaprilu zawartego w tabletkach leku H.

Cele osiągnięto w toku testów kinetycznych, analizy ilościowej i następującej analizy matematycznej oraz statystycznej uzyskanych wyników.

8.6 Materiały i metody

Materiały

- opisane w ROZDZIALE 4.5.1 na stronie 22 oraz
- hydrochlorotiazyd *w substancji* (Sigma-Aldrich)
- lek H bez opakowania handlowego (seria: E0072E2)
- lek H w opakowaniu handlowym (seria: E0072E2)

Metoda

- HPLC opisana w ROZDZIALE 4.5.2

8.7 Procedury

Wykonanie mieszaniny modelowej z hydrochlorotiazylem (mieszanina HCTZ)

W celu wykonania mieszaniny modelowej 5 : 12,5 (w/w) cilazaprilu z hydrochlorotiazylem (stosunek ilościowy substancji czynnych odpowiada proporcjom stosowanym w leczeniu) odważono dokładnie na wadze analitycznej i przeniesiono ilościowo moździerza porcelanowego:

- mieszanina HCTZ - 0,3500 g cilazaprilu oraz 0,8750 g hydrochlorotiazylu.

Substancje w moździerzu rozdrabniano i rozcierano przez 30 minut za pomocą pistla do uzyskania homogenicznej mieszaniny fizycznej.

Warunki testów kinetycznych

Mieszanina HCTZ

Sporządzenie próbek do testów polegało na dokładnym odważeniu 0,0200 g mieszaniny modelowej do szklanych fiolek z ciemnego szkła.

Lek H bez opakowania

Przygotowanie próbek do testów polegało na wyjęciu z blistra tabletek i umieszczeniu po dwie tabletki w szklanych fiolkach z ciemnego szkła.

Lek H w opakowaniu

Przygotowanie próbek do testów polegało na umieszczeniu dwóch tabletek w blisterach w szklanych fiolkach z ciemnego szkła.

Warunki testów zapewniono w eksykatorach zawierających nasycone roztwory soli nieorganicznych umieszczonych w komorach do badań kinetycznych ustawionych na odpowiednią temperaturę. Dokładną specyfikację warunków eksperymentów kinetycznych opisano w ROZDZIALE 5.7 na stronie 48.

Przygotowane próby poddano testom kinetycznym według poniższego schematu (TABELA 8.2).

TABELA 8.2

Plan badań kinetycznych - wpływ temperatury na trwałość cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu w mieszaninie modelowej HCTZ oraz tabletkach leku H bez i w opakowaniu handlowym

Przedmiot badania	Temperatura [K]	Wilgotność względna powietrza [%]
Mieszanina HCTZ	348	50,9
		66,5
		76,4
Lek H bez opakowania	348	76,4
	338	
	333	
	328	
Lek H w opakowaniu*	348	76,4
	338	
	333	
	328	

*tabletki przechowywane w blistrach były przed analizą z nich wyjmowane

Próbki były wyjmowane z eksykatorów i komór cieplnych po ustalonym czasie zależnym od szybkości reakcji t [h]. Chłodzone do temperatury pokojowej i analizowane metodą HPLC.

Przygotowanie prób do analizy HPLC

Próbki poddane testom kinetycznym. Każdą próbkę, którą stanowiła

- mieszanina modelowa HCTZ lub
- tabletka

przenoszono ilościowo do kolby miarowej 50 ml. Następnie dodawano 25,0 ml metanolu i ekstrahowano wytrząsając przez 30 minut.

W tym czasie następowała całkowita dezintegracja tabletki. Kolejno powstałą zawiesinę sączone przez twardy sączonek ilościowy 390 (Munktell) w celu uzyskania przezroczystego przesącza.

Do 1,0 ml roztworu badanego dodano 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (metanolowy roztwór oksymetazoliny o stężeniu 0,02 %) i poddawano analizie HPLC.

Próbki z cilazapilem niepoddane testom kinetycznym. Dokładnie odważono

- mieszaninę HCTZ (0,0200 g) lub
- sproszkowaną masę tabletkową leku H odpowiadającą średniej masie tabletki ($0,2041 \pm 0,0043$ g)

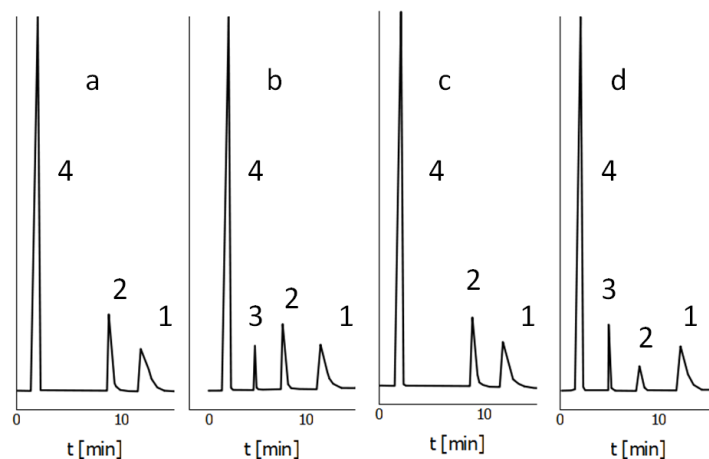
Odważony proszek przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml i następnie ekstrahowano 25,0 ml metanolu. Powstałą zawiesinę wytrząsano przez 30 minut, po czym sączono przez twardy sączek ilościowy 390 (Munktell).

1,0 ml przezroczystego roztworu badanego mieszano z 0,5 ml roztworu wzorca wewnętrznego (metanолоwый roztwór chlorowodoru oksymetazoliny o stężeniu 0,02 %) i poddawano analizie HPLC.

8.8 Wyniki i ich omówienie

8.8.1 Selektywność metody HPLC

Chromatogramy potwierdzające selektywność metody HPLC względem cilazaprilu, jego produktu rozkładu, hydrochlorotiazynu przedstawiono na RYCINIE 8.3.



RYCINA 8.3

Selektywność metody HPLC względem cilazaprilu, produktu rozkładu, hydrochlorotiazynu oraz substancji pomocniczych tabletki leku H. Chromatogramy dotyczą a) mieszaniny modelowej z hydrochlorotiazynem oraz c) tabletki leku H w czasie t_0 testu kinetycznego, natomiast b) mieszaniny HCTZ d) tabletki w czasie t testu kinetycznego z widocznym produktem rozkładu (3), pik (1) to wzorzec wewnętrzny, (2) - cilazapril a (4) - hydrochlorotiazyn.

8.8.2 Kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu

Kinetyka rozkładu cilazaprilu w mieszaninie modelowej, jak i postaci leku z hydrochlorotiazydem nie różni się od tej obserwowanej dla cilazaprilu *w substancji*. Powyższy fakt potwierdzają krzywe degradacji charakteryzujące się sigmoidalnym kształtem, świadczącym o reakcji autokatalizy pierwszego rzędu względem stężenia substratu oraz fakt, że produkt rozkładu cilazaprilu zobrazowany na chromatogramach (RYCINA 8.3) posiada taki sam czas retencji.

W związku z powyższym dane eksperymentalne opisano matematycznie w analogiczny sposób, jak w poprzednich ROZDZIAŁACH. Liniową zależność niezbędną do obliczenia parametrów rozkładu tworzy równanie Prout-Tompkins'a. Dzięki niej możliwe jest wyznaczenie obserwowanych stałych szybkości reakcji a także połowicznego czasu rozkładu cilazaprilu.

Zależność Arrhenius'a matematycznie opisująca korelację obserwowanych stałych szybkości reakcji od odwrotności temperatury została wyznaczona dla tabletek leku H. Posługując się nią wyznaczono parametry termodynamiczne dotyczące reakcji rozkładu cilazaprilu w tabletkach badanego leku złożonego.

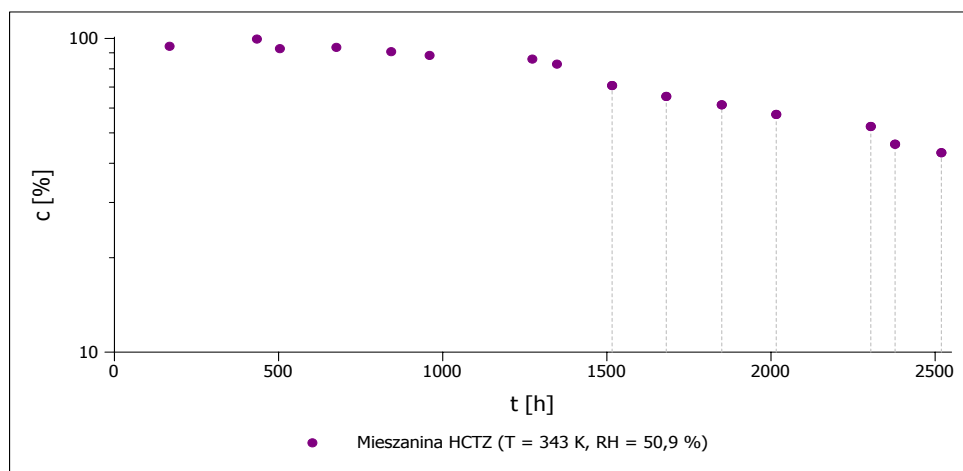
8.8.3 Wpływ hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu w mieszaninie HCTZ

W warunkach stałej temperatury ($T = 343$ K) rosnąca wilgotność względna powietrza (50,9 - 76,4 %) wpływa na przyspieszenie reakcji rozkładu cilazaprilu w mieszaninie HCTZ. Wskazują na to zmiany obejmujące długość trwania okresu indukcji, a także wartości obserwowanych stałych szybkości reakcji.

Na RYCINACH 8.4, 8.5, 8.6, przedstawiających krzywe rozkładu cilazaprilu w poddanej testom kinetycznym mieszaninie HCTZ, wyraźnie zaznaczone jest skracanie się okresu indukcji wraz z rosnącą wilgotnością względna powietrza.

Wartości obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu (TABELE 8.3, 8.4, 8.5) zwiększały się. Zmiany te zostały ujęte matematycznie w półlogarytmiczną zależność $\ln k = f(RH)$, która jest liniowa i charakteryzuje się wysokim współczynnikiem korelacji. (RYCINA 8.8 i TABELA 8.7)

$T = 343 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$



RYCINA 8.4

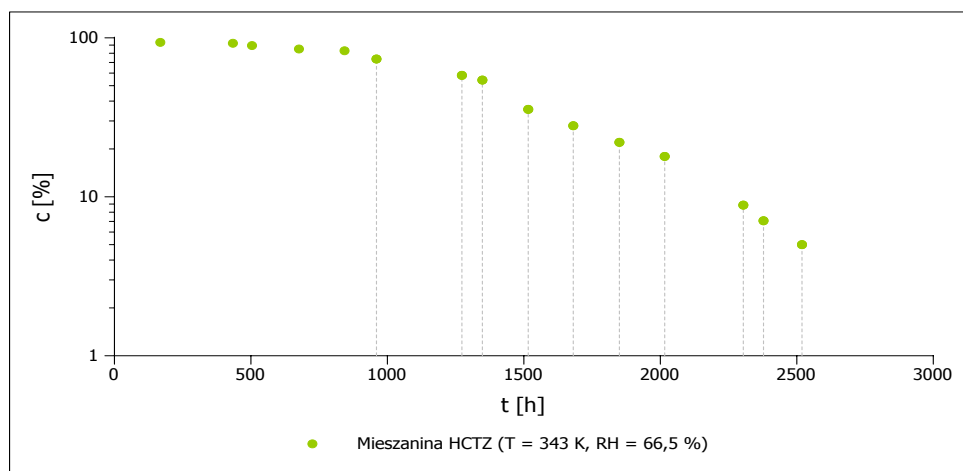
Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie HCTZ w warunkach kinetycznych ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$).

TABELA 8.3

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w mieszaninie HCTZ w wyniku rozkładu w $T = 343 \text{ K}$, $RH = 50,9 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	1516	0,7929	0,5612	70,7757	2,4218
2	1681	0,7929	0,5181	65,3378	1,8850
3	1850	0,7929	0,4871	61,4347	1,5930
4	2016	0,7929	0,4539	57,2485	1,3391
5	2304	0,7929	0,4155	52,4014	1,1009
6	2378	0,7929	0,3648	46,0092	0,8522
7	2519	0,7929	0,3427	43,2258	0,7614
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,0011$		$\Delta a = 0,00017$		$S_a = 0,000068$	
$b = 2,5247$		$\Delta b = 0,3609$		$S_b = 0,1404$	
$S_y = 0,0627$		$r = -0,991$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k [1/s]				$3,06 \cdot 10^{-7}$	
Δk [1/s]				$4,85 \cdot 10^{-8}$	
$\Delta t_{0,5}$ [h]				2289	

$T = 343 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$



RYCINA 8.5

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie HCTZ w warunkach kinetycznych ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$).

TABELA 8.4

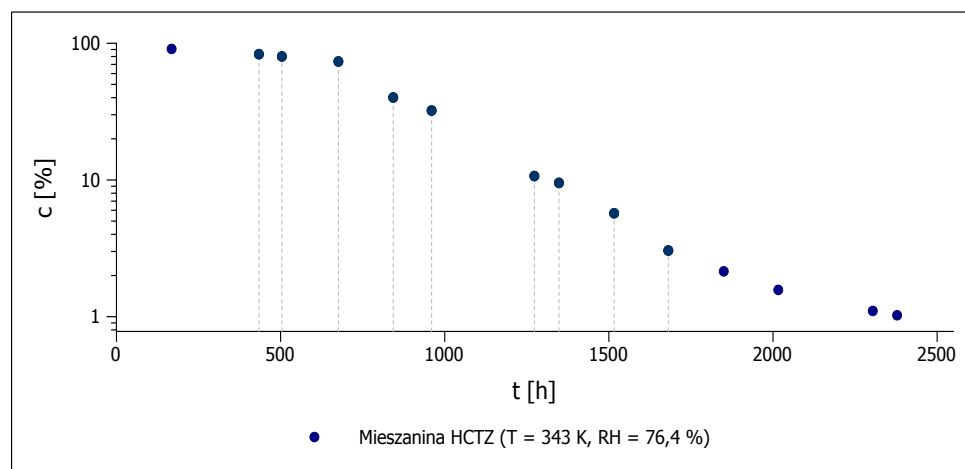
Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w mieszaninie HCTZ w wyniku rozkładu w $T = 343 \text{ K}$, $RH = 66,5 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	960	0,7896	0,5809	73,5687	2,7834
2	1273	0,7896	0,4585	58,0658	1,3847
3	1348	0,7896	0,4282	54,2292	1,1848
4	1516	0,7896	0,2801	35,4761	0,5498
5	1681	0,7896	0,2210	27,9918	0,3887
6	1850	0,7896	0,1738	22,0053	0,2821
7	2016	0,7896	0,1417	17,9429	0,2187
8	2304	0,7896	0,0700	8,8620	0,0972
9	2378	0,7896	0,0558	7,0667	0,0760
10	2519	0,7896	0,0395	5,0004	0,0526

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0025$	$\Delta a = 0,00018$	$S_a = 0,000076$
$b = 3,4521$	$\Delta b = 0,3185$	$S_b = 0,1408$
$S_y = 0,1186$	$r = -0,996$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$7,03 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$4,87 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	1363

$T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$



RYCINA 8.6

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w mieszaninie HCTZ w warunkach kinetycznych ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

TABELA 8.5

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [%]) w mieszaninie HCTZ w wyniku rozkładu w $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [%]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	434	0,8002	0,6655	83,1704	4,9419
2	504	0,8002	0,6407	80,0666	4,0167
3	676	0,8002	0,5884	73,5344	2,7785
4	843	0,8002	0,3208	40,0978	0,6694
5	960	0,8002	0,2576	32,1965	0,4748
6	1273	0,8002	0,0855	10,6830	0,1196
7	1348	0,8002	0,0762	9,5239	0,1053
8	1516	0,8002	0,0457	5,7066	0,0605
9	1681	0,8002	0,0244	3,0466	0,0314

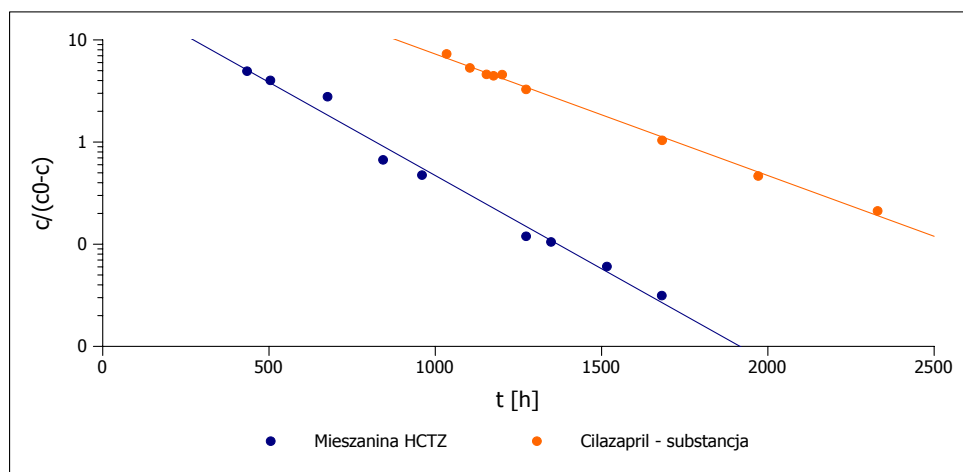
PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0042$	$\Delta a = 0,00044$	$S_a = 0,00018$
$b = 3,4484$	$\Delta b = 0,4838$	$S_b = 0,2046$
$S_y = 0,2343$	$r = -0,993$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,17 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$1,21 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	821

Ocena wpływu hydrochlorotiazydu na rozkład cilazaprilu

Hydrochlorotiazyd nie ma wpływu na kinetyczny mechanizm rozkładu cilazaprilu w fazie stałej. Różnice dotyczą oddziaływania na szybkość reakcji.

Hydrochlorotiazyd przyspiesza rozkład cilazaprilu w mieszaninie modelowej HCTZ. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy obserwowanymi stałymi szybkości rozkładu cilazaprilu: w substancji i mieszaninie HCTZ. (RYCINA 8.7, TABELA 8.6)



RYCINA 8.7

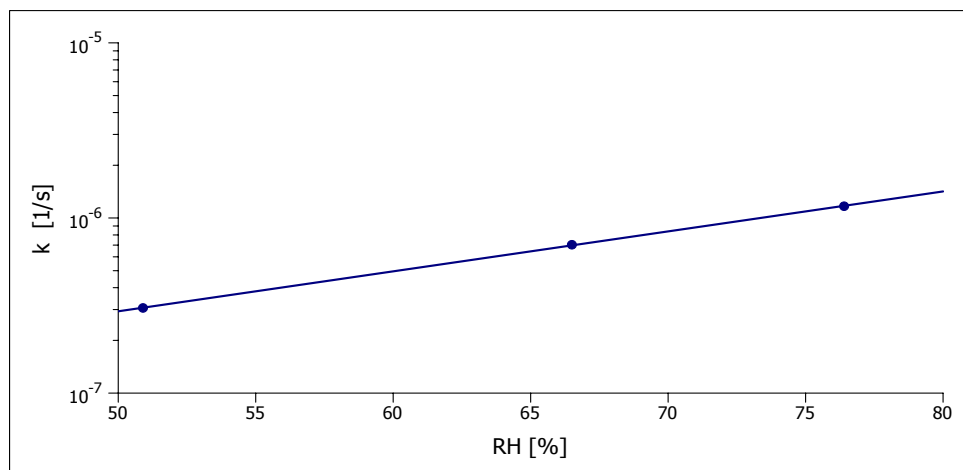
Wykres przedstawiający rozkład cilazaprilu w substancji i mieszaninie HCTZ w $T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$ według modelu Prout-Tompkins'a.

TABELA 8.6

Porównanie rozkładów cilazaprilu w substancji i mieszaninie HCTZ w warunkach ($T = 343\text{ K}$, $RH = 76,4\%$) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H0: a_1 = a_2$	
$H1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Mieszanina HCTZ	Cilazapril - substancja
$n = 9$	$n = 9$
$\ln y = -0,0042x + 3,4484$	$\ln y = -0,0027x + 4,7221$
$S_{a1 - a2} = 0,0002$	
$t = 7,467$	
$t(\alpha = 0,05; df = 14) = 2,1448$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) \leq t$ dlatego odrzucono $H0$ na korzyść $H1$. Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie	

Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 50,9 - 76,4 \%$)



RYCINA 8.8

Wpływ zmiennej RH na trwałość cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu - półlogarytmiczny wykres obserwowanej stałej szybkości reakcji rozkładu cilazaprilu ($k [1/s]$) jako funkcji wilgotności względnej powietrza ($RH [\%]$) w warunkach kinetycznych ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 50,9 - 76,4 \%$).

TABELA 8.7

Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazydu - parametry prostej opisanej $\ln k = f(RH)$

Parametry prostej	$\ln k = a \cdot RH + b$
$a \pm \Delta a$	$0,0525 \pm 0,0071$
S_a	0,00056
$b \pm \Delta b$	$-17,6690 \pm 0,4671$
S_b	0,0368
S_y	0,0102
r	1,000

8.8.4 Lek H

Rosnąca temperatura (323 - 343 K) przy zachowaniu stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76,4 \%$) negatywnie wpływa na trwałość cilazaprilu w tabletkach leku H, w którym cilazapril współistnieje nie tylko z substancjami pomocniczymi, ale także drugą substancją czynną - hydrochlorotiazylem.

Przyspieszenie rozkładu cilazaprilu w tabletkach wyraża się obserwowanymi zmianami w parametrach kinetycznych zachodzących reakcji. (RYCINY 8.9, 8.10, 8.11, 8.12, 8.13 i TABELA 8.8, 8.9, 8.12, 8.15)

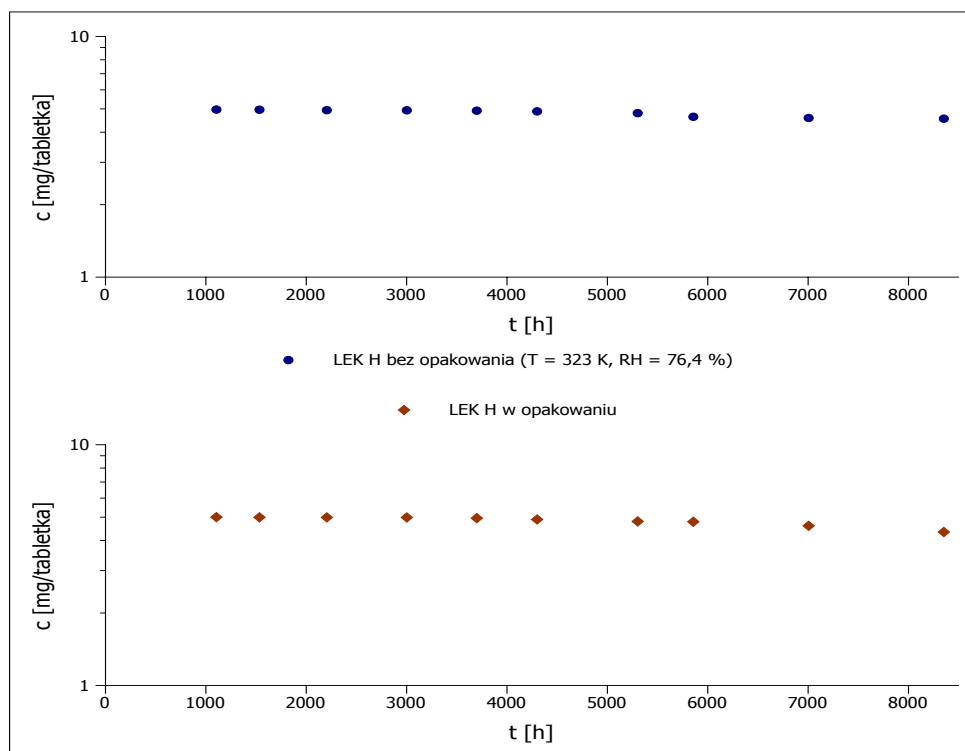
Wartości charakteryzujące okres indukcji maleją wraz ze zwiększającą się temperaturą.

Obserwowana stała szybkości reakcji jest drugim parametrem, którego wartości zmieniają się pod wpływem temperatury. Wraz ze wzrostem temperatury z 323 K do 333 K obserwowana stała szybkości reakcji zwiększa swoją wartość około dwu i pół krotnie, kolejny wzrost temperatury o 5 K powoduje ponad trzy i pół krotny wzrost jej wartości, natomiast w $T = 343$ K charakteryzuje się następnym prawie dwukrotnym skokiem wartości.

Roli ochronnej blistra nie zaobserwowano w temperaturze $T = 323$ K, gdzie okres indukcji trwał przez cały czas testu (RYCINA 8.9) a rozkład cilazaprilu w tabletkach bez i w opakowaniu przebiega podobnie. Dopiero w temperaturach $T = 328, 333, 338$ oraz 343 K zaobserwowano rozbieżności w rozkładzie w zależności od przechowywania leku w blistrze. W temperaturze 328 K okres przyspieszenia reakcji rozkładu jest widoczny tylko dla tabletki badanej bez blistra, co świadczy o jego ochronnej roli. (RYCINA 8.10) W pozostałych temperaturach, choć czas trwania okresów indukcji nie zmienia się, wartości obserwowanych stałych szybkości reakcji dla cilazaprilu w leku H chronionym przez opakowanie są mniejsze od tych wyznaczonych dla tabletek bez opakowania. (TABELA 8.10, 8.13, 8.16) Dodatkowo udowodniono, że zmiany te dla $\alpha = 0,05$ są istotne statystycznie (TABELA 8.11, 8.14 i 8.17).

Zależność Arrhenius'a dla rozkładu cilazaprilu w leku H zarówno bez opakowania, jak i w nim jest prostoliniowa (TABELA 8.18). Wyznaczono na jej podstawie parametry termodynamiczne charakteryzujące degradację cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazylu.

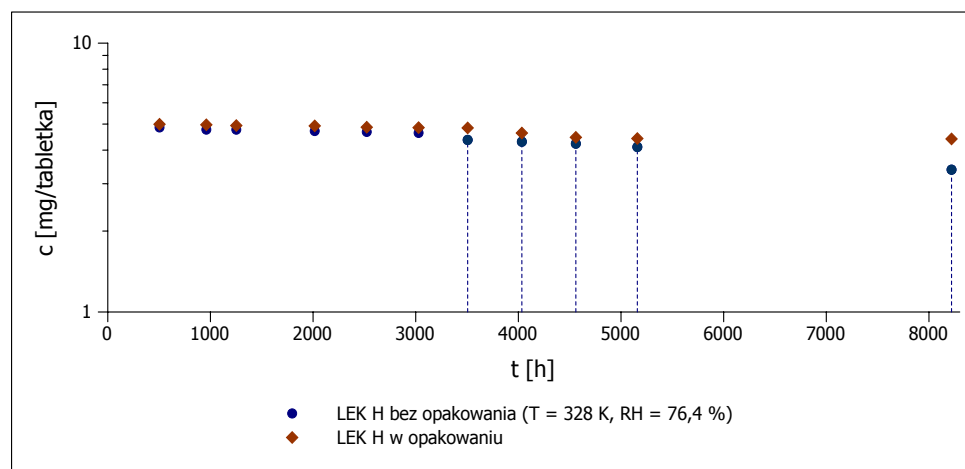
$$T = 323 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 8.9

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku H bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 323 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

$$T = 328 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 8.10

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku H bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 328 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

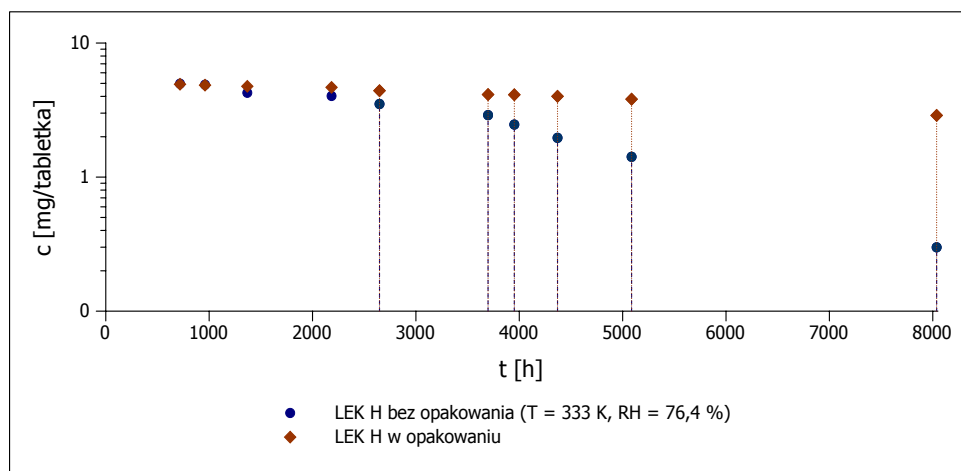
TABELA 8.8

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku H bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 328 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	3506	0,7382	0,6446	4,3662	6,8745
		0,7382	0,6443	4,3639	
2	4034	0,7382	0,6298	4,2659	6,1329
		0,7382	0,6396	4,3321	
3	4560	0,7382	0,6144	4,1618	5,4813
		0,7382	0,6341	4,2953	
4	5159	0,7382	0,6092	4,1266	4,6184
		0,7382	0,6043	4,0935	
5	8220	0,7382	0,4905	3,3224	2,0919
		0,7382	0,5083	3,4433	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,00026$	$\Delta a = 0,000015$	$S_a = 0,0000049$
$b = 2,8433$	$\Delta b = 0,0827$	$S_b = 0,0260$
$S_y = 0,0180$	$r = -0,999$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$7,09 \cdot 10^{-8}$
Δk [1/s]	$4,29 \cdot 10^{-9}$
$t_{0,5}$ [h]	11136

$T = 333 \text{ K}, RH = 76,4 \%$


RYCINA 8.11

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku H bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych ($T = 333 \text{ K}, RH = 76,4 \%$).

TABELA 8.9

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku H bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 333 \text{ K}, RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2648	0,7289	0,5085	3,4881	$\bar{c} = 3,5100$
		0,7289	0,5149	3,5318	
2	3698	0,7289	0,4227	2,8993	$\bar{c} = 2,8993$
		0,7289	0,4227	2,8993	
3	3952	0,7289	0,3586	2,4599	$\bar{c} = 2,4654$
		0,7289	0,3602	2,4708	
4	4370	0,7289	0,2754	1,8891	$\bar{c} = 1,9624$
		0,7289	0,2968	2,0356	
5	5086,5	0,7289	0,1983	1,3599	$\bar{c} = 1,4166$
		0,7289	0,2148	1,4732	
6	8037,5	0,7289	0,0436	0,2994	$\bar{c} = 0,2994$
		0,7289	0,0436	0,2993	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,00068$	$\Delta a = 0,000086$	$S_a = 0,000031$
$b = 2,6580$	$\Delta b = 0,4254$	$S_b = 0,1532$
$S_y = 0,1287$	$r = -0,996$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,89 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$2,40 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	3905

TABELA 8.10

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku H w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 333$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

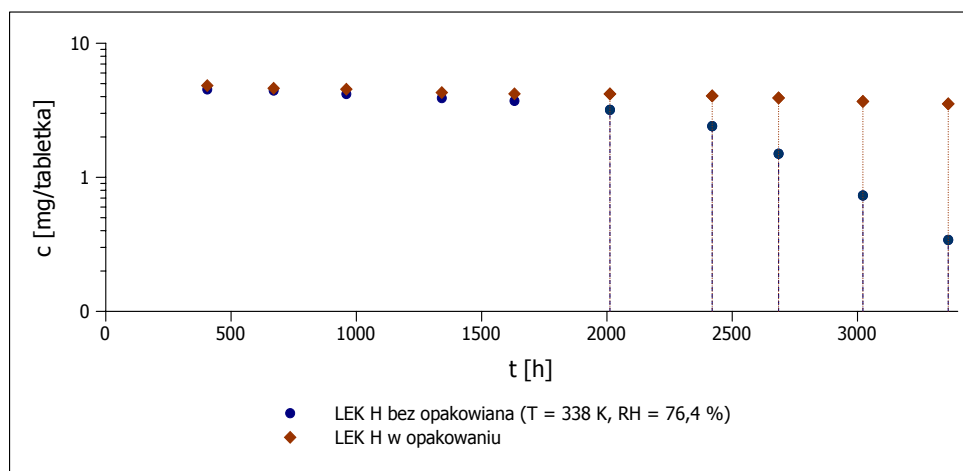
n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2648	0,7308 0,7308	0,6409 0,6485	4,3845 4,4367	$\bar{c} = 4,4106$ 7,4835
2	3698	0,7308 0,7308	0,6004 0,6067	4,1075 4,1507	$\bar{c} = 4,1291$ 4,7413
3	3952	0,7308 0,7308	0,6040 0,5987	4,1326 4,0959	$\bar{c} = 4,1143$ 4,6449
4	4370	0,7308 0,7308	0,5862 0,5846	4,0106 3,9997	$\bar{c} = 4,0051$ 4,0257
5	5086,5	0,7308 0,7308	0,5655 0,5493	3,8688 3,7582	$\bar{c} = 3,8135$ 3,2141
6	8037,5	0,7308 0,7308	0,4193 0,4243	2,8684 2,9029	$\bar{c} = 2,8856$ 1,3648
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,00031$		$\Delta a = 0,000035$		$S_a = 0,000012$	
$b = 2,7522$		$\Delta b = 0,1703$		$S_b = 0,0614$	
$S_y = 0,0515$		$r = -0,997$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k [1/s]		$8,53 \cdot 10^{-8}$			
Δk [1/s]		$9,59 \cdot 10^{-9}$			
$t_{0,5}$ [h]		8959			

TABELA 8.11

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku H ($T = 333$ K, $RH = 76,4$ %) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek H bez opakowania	Lek H w opakowaniu
$n = 6$	$n = 6$
$\ln y = -0,00068x + 2,6580$	$\ln y = -0,00031x + 2,7522$
$S_{a1 - a2} = 0,000034$	
$ t = 11,0685$	
$t(\alpha = 0,05; df = 8) = 2,3060$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) < t $ istnieją podstawy do odrzucenia hipotezy H_0 .	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie.	

$$T = 338 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 8.12

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku H bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych $T = 338 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$.

TABELA 8.12

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku H bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 338 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2012	0,7517	0,4761	3,1673	1,7576
		0,7517	0,4820	3,2064	
2	2420	0,7517	0,3679	2,4470	0,9300
		0,7517	0,3565	2,3716	
3	2685	0,7382	0,2463	1,6683	0,4284
		0,7382	0,1965	1,3311	
4	3021,5	0,7517	0,1005	0,6685	0,1715
		0,7517	0,1196	0,7957	
5	3362	0,7517	0,0561	0,3729	0,0732
		0,7517	0,0465	0,3095	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0024$	$\Delta a = 0,00047$	$S_a = 0,00015$
$b = 5,6005$	$\Delta b = 1,2922$	$S_b = 0,4061$
$S_y = 0,1550$	$r = -0,994$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$6,74 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$1,31 \cdot 10^{-7}$
$t_{0,5}$ [h]	2310

TABELA 8.13

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku H w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 338$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	2012	0,7524	0,6249	4,1525	5,1577
		0,7524	0,6356	4,2236 $\bar{c} = 4,1880$	
2	2420	0,7524	0,6055	4,0235	4,2553
		0,7524	0,6130	4,0736 $\bar{c} = 4,0486$	
3	2685	0,7524	0,5954	3,9568	3,5826
		0,7524	0,5810	3,8610 $\bar{c} = 3,9089$	
4	3021,5	0,7524	0,5547	3,6863	2,7957
		0,7524	0,5536	3,6791 $\bar{c} = 3,6827$	
5	3362	0,7524	0,5342	3,5503	2,4053
		0,7524	0,5286	3,5131 $\bar{c} = 3,5317$	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,00059$	$\Delta a = 0,000095$	$S_a = 0,000030$
$b = 2,8401$	$\Delta b = 0,2593$	$S_b = 0,0815$
$S_y = 0,0311$	$r = -0,996$	

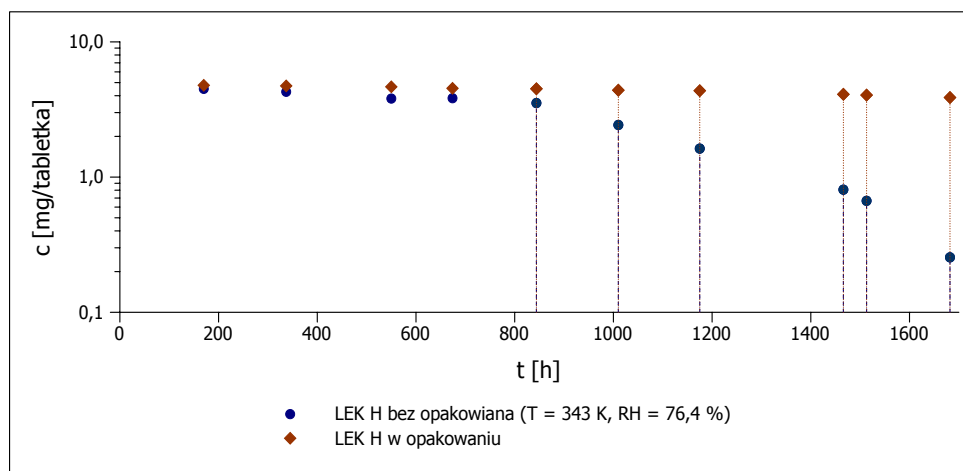
PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$1,63 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$2,63 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	4835

TABELA 8.14

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku H ($T = 338$ K, $RH = 76,4$ %) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek H bez opakowania	Lek H w opakowaniu
$n = 5$	$n = 5$
$lny = -0,0024x + 5,6005$	$lny = -0,00059x + 2,8401$
$S_{a1 - a2} = 0,00017$	
$ t = 10,6183$	
$t(\alpha = 0,05; df = 6) = 2,4469$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) < t $ istnieją podstawy do odrzucenia hipotezy H_0 .	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie.	

$$T = 343 \text{ K}, RH = 76,4 \%$$



RYCINA 8.13

Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) jako funkcji czasu (t [h]) podczas reakcji rozkładu w tabletkach leku H bez opakowania handlowego i w nim w warunkach kinetycznych $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$.

TABELA 8.15

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku H bez opakowania handlowego w wyniku rozkładu w $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	844	0,6820	0,4730	3,4678	2,4005
		0,6820	0,4899	3,5914	
2	1010	0,6820	0,3290	2,4118	0,9456
		0,6820	0,3339	2,4483	
3	1175	0,6820	0,2250	1,6499	0,4814
		0,6820	0,2182	1,5999	
4	1466	0,7484	0,1251	0,8357	0,1926
		0,7484	0,1166	0,7789	
5	1513	0,7484	0,1000	0,6684	0,1540
		0,7484	0,0997	0,6663	
6	1682	0,7484	0,0352	0,2349	0,0537
		0,7484	0,0412	0,2750	
PARAMETRY PROSTEJ					
$a = -0,0042$		$\Delta a = 0,00071$		$S_a = 0,00026$	
$b = 4,3097$		$\Delta b = 0,9312$		$S_b = 0,3355$	
$S_y = 0,1847$		$r = -0,993$			
PARAMETRY KINETYCZNE					
k [1/s]		$1,16 \cdot 10^{-6}$			
Δk [1/s]		$1,97 \cdot 10^{-7}$			
$t_{0,5}$ [h]		1029			

TABELA 8.16

Zmiany stężenia cilazaprilu (c [mg/tabletkę]) w tabletkach leku H w opakowaniu handlowym w wyniku rozkładu w $T = 343$ K, $RH = 76,4$ % dla okresu przyspieszenia wraz z wyznaczonymi parametrami: prostej i kinetycznymi

n	t [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t_0 [h]	P_{cil}/P_{IS} dla t [h]	c [mg/tabletkę]	$c/(c_0-c)$ [-]
1	844	0,7413	0,6646	4,4826	$\bar{c} = 4,4993$
		0,7413	0,6696	4,5160	
2	1010	0,7413	0,6502	4,3851	$\bar{c} = 4,3921$
		0,7413	0,6522	4,3991	
3	1175	0,7389	0,6384	4,3200	$\bar{c} = 4,3542$
		0,7389	0,6485	4,3885	
4	1466	0,7413	0,6158	4,1535	$\bar{c} = 4,0966$
		0,7413	0,5989	4,0396	
5	1513	0,7413	0,6139	4,1406	$\bar{c} = 4,0414$
		0,7413	0,5845	3,9423	
6	1682	0,7413	0,5768	3,8903	$\bar{c} = 3,8772$
		0,7413	0,5729	3,8641	

PARAMETRY PROSTEJ		
$a = -0,0011$	$\Delta a = 0,00017$	$S_a = 0,000063$
$b = 3,1637$	$\Delta b = 0,2285$	$S_b = 0,0823$
$S_y = 0,0453$	$r = -0,994$	

PARAMETRY KINETYCZNE	
k [1/s]	$3,15 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$4,83 \cdot 10^{-8}$
$t_{0,5}$ [h]	2793

TABELA 8.17

Ocena funkcji ochronnej opakowania leku H ($T = 343$ K, $RH = 76,4$ %) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST RÓWNOŚCI DWÓCH WSPÓŁCZYNNIKÓW REGRESJI	
Hipotezy	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja 1</i>	<i>Populacja 2</i>
Lek H bez opakowania	Lek H w opakowaniu
$n = 5$	$n = 5$
$\ln y = -0,0042x + 4,3097$	$\ln y = -0,0011x + 3,1637$
$S_{a_1 - a_2} = 0,00027$	
$ t = 11,1675$	
$t(\alpha = 0,05; df = 8) = 2,3060$	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(\alpha; df) < t $ istnieją podstawy do odrzucenia hipotezy H_0 .	
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie.	

Zależność Arrhenius'a ($T = 323 - 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)

TABELA 8.18

Parametry prostej opisującej zależność Arrhenius'a - półlogarytmiczną funkcję liniową stałych szybkości reakcji (k [1/s]) i odwrotności temperatury ($1/T$ [1/K]) dla reakcji rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku H bez i z uwzględnieniem opakowania handlowego w warunkach kinetycznych $T = 333 - 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ oraz obliczone parametry termodynamiczne

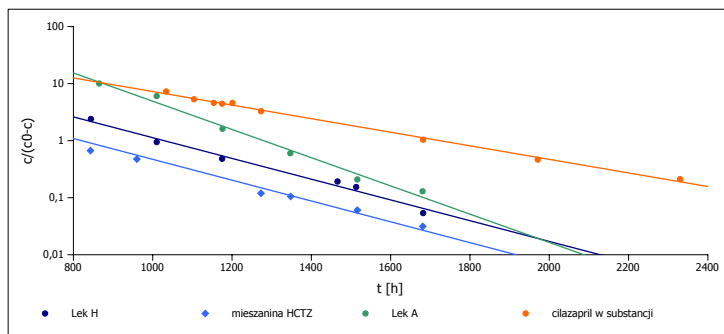
Lek H - zależność Arrhenius'a		
	bez opakowania	w opakowaniu
<i>Parametry prostej $\ln k = a \cdot \frac{1}{T} + \ln A$</i>		
a	-21769,23	-14903,02
Δa	9025,40	2324,71
S_a	2097,47	182,96
$\ln A$	49,95	28,47
$\Delta \ln A$	26,91	6,88
S_b	6,25	0,54
S_y	0,21	0,01
r	-0,991	-1,000
<i>Parametry termodynamiczne</i>		
E_a [kJ/mol]	181,00	123,91
ΔE_a	75,04	19,33
H_{akt} [kJ/mol]	178,52	121,43
ΔH_{akt}	77,52	21,81
S_{akt} [J/(K mol)]	170,38	-8,17
ΔS_{akt}	21,16	187,72

8.8.5 Porównanie trwałości cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazidu z cilazaprilem *w substancji* i w referencyjnym leku A

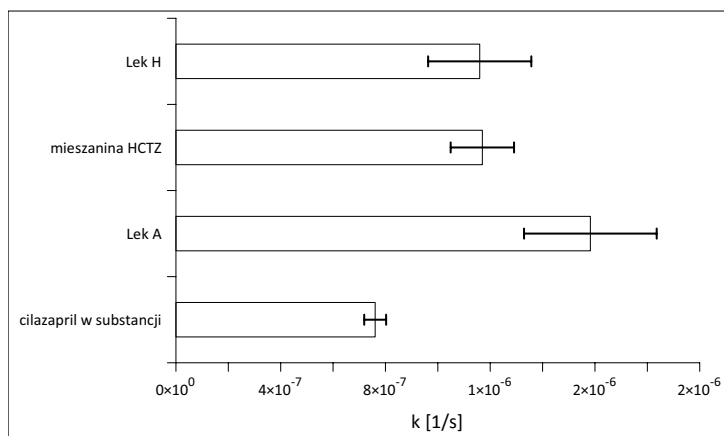
Analiza rozkładów cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazidu w mieszaninie modelowej HCTZ i postaci leku H w porównaniu z cilazaprilem *w substancji* i w tabletkach referencyjnego leku A w warunkach $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$ została przedstawiona na RYCINIE 8.14.

Z porównania wynika, że hydrochlorotiazyd przyspiesza szybkość rozkładu cilazaprilu w porównaniu z czystą *substancją*. Podobne wartości stałych szybkości reakcji obserwowane w połączeniach cilazaprilu z hydrochlorotiazidem zarówno w mieszaninie modelowej, jak i tabletkach leku H mogą wskazywać na fakt, że to właśnie hydrochlorotiazyd przyspiesza szybkość rozkładu cilazaprilu w leku H.

Mimo to, cilazapril w postaci leku H charakteryzuje się większą trwałością niż w referencyjnym leku A. Większa stabilizacja cilazaprilu w leku H może być spowodowana obecnością stearylowinianu sodu, który w tabletkach leku H jest substancją poślizgową i zastępuje stearylofumarany sodu użyte w referencyjnym leku A.



(a)



(b)

RYCINA 8.14

Porównanie trwałości cilazaprilu w obecności hydrochlorotiazylu w mieszaninie modelowej oraz tabletkach leku H z cilazapriem w substancji i w referencyjnym leku A ($T = 343$ K, $RH = 76,4$ %), gdzie (a) przedstawia liniowe półlogarytmiczne zależności Prout-Tompkins'a, natomiast (b) wykres słupkowy porównujący obserwowane stałe szybkości rozkładu.

8.9 Podsumowanie

Hydrochlorotiazyl, jako substancja chemiczna negatywnie wpływa na trwałość cilazaprilu zarówno w mieszaninie modelowej, jak i postaci leku.

Dodatkowo czynniki takie, jak podwyższona temperatura i wilgotność względna powietrza powodują dalszą destabilizację układu.

Trwałość cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej

9.1	Nadciśnienie u dzieci	179
9.2	Terapia nadciśnienia u dzieci	180
9.2.1	Terapia nefarmakologiczna	180
9.2.2	Terapia farmakologiczna	180
9.3	Płyny pediatryczne	182
9.4	Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej	183
9.5	Materiały i metody	184
9.6	Procedury	184
9.7	Wyniki i ich omówienie	187
9.7.1	Selektywność metody HPLC	187
9.7.2	Ocena trwałości chemicznej cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej	187
9.7.3	Ocena pH zawiesiny pediatrycznej z cilazapilem	190
9.7.4	Ocena właściwości reologicznych zawiesin pediatrycznych z cilazapilem	194
9.8	Podsumowanie	197

9.1 Nadciśnienie u dzieci

Historycznie nadciśnienie tętnicze w populacji dzieci było uważane za stan będący wtórną konsekwencją uszkodzenia narządów wewnętrznych organizmu: nerek, układu sercowo-naczyniowego czy endokrynnego. Jednak w dzisiejszych czasach dysponujemy dowodami, na to, że schorzenie to w wielu przypadkach ma charakter samoistny. [110]

Badania epidemiologiczne wskazują, że zjawisko występowania otyłości u dzieci przyczynia się do wzrostu zachorowalności na schorzenia przewlekłe, które w przeszłości obserwowano wyłącznie w populacji osób dorosłych. Jedną z tych chorób jest nadciśnienie tętnicze. Szacuje się, że około 5 % populacji dzieci i młodzieży posiada podwyższone wartości ciśnienia tętniczego krwi. [111] Przy czym najprawdopodobniej grupa ta jest o wiele większa a wiele przypadków nie zostało jeszcze zdiagnozowanych. [112]

Podwyższone ciśnienie krwi u dzieci niesie za sobą konsekwencje i przyczynia się do zwiększonego ryzyka występowania zachorowalności i śmiertelności z powodu incydentów sercowo-naczyniowych w dorosłym życiu. [113]

Z powyższych względów koniecznością wydaje się być włączenie pomiaru ciśnienia tętniczego do rutynowej opieki pediatrycznej. [114]

Prawidłowa, dokładna i wczesna diagnoza nadciśnienia u pacjenta, którym jest dziecko, stanowi wielkie wyzwanie dla lekarza. Tym bardziej, że nadciśnienie samoistne zazwyczaj jest bezobjawowe. [115] Główną rolę w badaniu poziomów ciśnienia spełniają dwie metody: [116]

- klasyczna osłuchowa, która choć jest powszechna, posiada pewne wady:
 - pierwszą z nich jest dobór dla pacjenta odpowiedniego rozmiaru rękawa, dla uzyskania prawidłowych wyników pomiaru
 - drugą stanowią ograniczenia metody: niemożliwość wyróżnienia nadciśnienia białego fartucha, maskowanego nadciśnienia oraz braku nocnego spadku ciśnienia krwi
- całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego (ABPM)
 - jest alternatywą pierwszej metody
 - wskazuje nadciśnienie białego fartucha, maskowane nadciśnienie oraz brak nocnego spadku ciśnienia krwi
 - wadą jest niska dostępność aparatury pomiarowej.

Interpretacji otrzymanych wyników pomiarów dokonuje się na podstawie siatek centylowych. Siatki te są narzędziem służącym do interpretacji prawidłowego ciśnienia krwi w zależności od płci, wieku i wzrostu dziecka. Jest to niezmiernie istotne, gdyż dzieci mają

inne wartości ciśnienia krwi niż dorośli, niższe i zmieniające się z wiekiem i rozwojem dziecka.

Za prawidłowe wartości ciśnienia tętniczego przyjmuje się te poniżej 90. percentyla, przedział 90.-95. percentyl charakteryzuje wysokie prawidłowe ciśnienie, natomiast nadciśnienie występuje wtedy, gdy wartości są równe lub przekraczające 95. percentyl. [115]

Ostateczna diagnoza powinna być uzupełniona o echokardiografię, badanie dna oka, mikroalbuminurii, w celu ustalenia czy przyczyną podwyższonych wartości ciśnienia nie są uszkodzenia organów wewnętrznych. [111]

9.2 Terapia nadciśnienia u dzieci

Terapia nadciśnienia u dzieci ma na celu obniżenie jego wartości do 80.-90. percentyla w zależności od wieku, płci, wzrostu i masy ciała.

Pierwszym etapem leczenia jest terapia za pomocą środków nefarmakologicznych. Kiedy to działanie nie przynosi należytych skutków włącza się leki, przy czym zasadą jest stosowanie najmniejszej liczby środków farmakologicznych, w jak najmniejszych dawkach, redukując do minimum efekty niepożądane. Leki dobiera się często indywidualnie. Należy mieć na uwadze fakt, że terapia nadciśnienia, choć ma długą historię u pacjentów dorosłych, w populacji pediatrycznej ma wciąż charakter eksperymentu, ze względu na niewielką ilość przeprowadzonych badań.

Głównym celem obniżenia ciśnienia do wartości prawidłowych jest długoterminowa prewencja wystąpienia uszkodzeń narządów wewnętrznych i promowanie normalnego wzrostu dziecka. [113, 115]

9.2.1 Terapia nefarmakologiczna

Leczenie nefarmakologiczne stanowi pierwszy etap, który przyczynia się do unormowania ciśnienia tętniczego. Główną jego zaletą jest bezpieczeństwo i brak działań niepożądanych.

Polega na zmianie trybu życia i diety, w tym redukcji podaży sodu. Ze względu na związek nadciśnienia z otyłością pożądana jest także utrata masy ciała. Tym bardziej, że nadmiar wisceralnej tkanki tłuszczowej wytwarza wiele substancji o działaniu prozapalnym, prozakrzepowym i presyjnym.

Poleca się także włączenie do diety nienasyconych kwasów tłuszczowych, które obniżają ciśnienie krwi, prawdopodobnie w mechanizmie produkcji prostaglandyn. [113, 117]

9.2.2 Terapia farmakologiczna

Terapia środkami farmakologicznymi jest bardzo ryzykowna ze względu na brak podstawowych danych koniecznych do przeprowadzenia bezpiecznego i skutecznego leczenia. Dysponuje się tylko szczątkową wiedzą, którą stanowią doniesienia w międzynarodowych

czasopismach na temat interakcji, dystrybucji, wiązania z białkami, metabolizmu leków u dzieci. Kontrowersje stanowi także kryterium doboru prawidłowej dawki terapeutycznej dla dziecka (obliczenia oparte o masę lub powierzchnię ciała).

Dodatkową trudność stanowi brak handlowych postaci leków (płyny doustne), które mogłyby być stosowane w populacji dzieci. Niepokoje również brak informacji o wpływie terapii na wzrost i rozwój dziecka. [113]

Ze względu na wiele niewiadomych, do leczenia nadciśnienia u dzieci wybierane są przede wszystkim leki, które charakteryzują się małą ilością działań niepożądanych. Należą do nich:

- inhibitory konwertazy angiotensyny
- antagoniści receptorów angiotensynowych
- antagoniści kanału wapniowego
- w każdym wypadku powiązane z dietą i zdrowym trybem życia. [113]

Zastosowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny w pediatrii

Wśród inhibitorów konwertazy angiotensyny, które są rekomendowane w terapii nadciśnienia u dzieci znajdujemy: kaptopril, enalapril, lisinopril, benazepril, chinapril oraz fosinopril. [116]

Są one powszechnie stosowane u dzieci ze względu na występowanie niewielu działań niepożądanych. [118] Jednak mimo to, podczas terapii okresowo należy monitorować poziom potasu i kreatyniny. [116]

Inhibitory konwertazy angiotensyny są efektywne także w leczeniu niewydolności serca w populacji pediatrycznej. Wiąże się z tą grupa leków ogromne nadzieje, gdyż przypuszcza się, że również u dzieci osiągnie się z ich pomocą obniżenie śmiertelności spowodowanej niewydolnością serca. [32]

W pediatrycznej kardiologii kaptopril, enalapril a także cilazapril są szeroko stosowane, jako leki pierwszego rzutu. Efekty działania tychże inhibitorów konwertazy angiotensyny na układ RAA pacjentów pediatrycznych jest taki sam jak u dorosłych i utrzymuje się długoterminowo bez rozwinięcia tolerancji. Obniżenie ciśnienia krwi i oporu naczyniowego skutkuje w poprawie wydolności serca. Ponadto leki te zapobiegają przerostowi lewej komory i remodelingowi serca. [119]

Cilazapril w leczeniu niewydolności serca jest stosowany doustnie w dawce 0,005-0,02 mg/kg masy ciała dwa razy dziennie lub 0,03-0,04 mg/kg masy ciała raz dziennie. [119]

Pamiętając o tym, że cilazapril oprócz korzystnego działania na niewydolne serce obniża również skutecznie ciśnienie krwi, postanowiono opracować i zbadać trwałość zawiesiny pediatrycznej z cilazapilem, która z powodzeniem może być stosowana w wyżej wymienionych dwóch wskazaniach.

Celem było uzyskanie trwałej zawiesiny, prostej w przygotowaniu z tabletek w warunkach aptecznych lub domowych, co niewątpliwie przyczyniłoby się do ułatwienia opiekunom dzieci terapię cilazapilem.

9.3 Płyny pediatryczne

Leki w formie płynnej są niezbędnym elementem terapii tych pacjentów, którzy nie potrafią połknąć stałej postaci leku lub są leczeni niestandardową dawką. Zaliczamy do nich przede wszystkim dzieci. Dawkowanie w tym przypadku polega na objętościowym odmierzeniu odpowiedniej dawki.

Rynek farmaceutyczny nie dysponuje, jednak pełną gamą produktów leczniczych w postaci płynów pediatrycznych. Powody takiego stanu rzeczy są głównie ekonomiczne: małe rozmiary pediatrycznego rynku zbytu, duże koszty badań klinicznych, pojawiają się także pytania natury etycznej badania leków w tej grupie chorych.

Z powodu braku dostępności gotowych preparatów farmaceutycznych w wielu przypadkach koniecznością staje się ich wytwarzanie z podstawowych składników. Czysta substancja jest często niedostępna dla farmaceuty, stąd dawka substancji biologicznie czynnej jest pozyskiwana z istniejącej na rynku postaci leku (tabletki, bądź kapsułki). Przygotowane preparaty mogą charakteryzować się brakiem trwałości, który spowodowany jest interakcjami z *vehiculum*, substancjami pomocniczymi: buforem, korygującymi smak, rozpraszającymi, zagęszczającymi, a także opakowaniem. [1, 120]

Płyny pediatryczne powinny stanowić nie tylko samą postać leku ułatwiającą jej odmierzenie, ważne jest także, aby to była forma podania zaakceptowana przez dziecko o odpowiednim smaku zapachu i konsystencji. [121]

9.4 Szczegółowe cele badania trwałości cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej

Szczegółowe cele dotyczące zagadnienia trwałości cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej były następujące:

Przygotowanie zawiesin pediatrycznych z cilazaprilem z wykorzystaniem

- leku oryginalnego A (zawiesina A)
- leku generycznego B (zawiesina B).

Ocena przydatności metody HPLC do oznaczania cilazaprilu z zawiesinie pediatrycznej.

Zbadanie stabilności cilazaprilu w zawiesinach pediatrycznych A i B podczas czterotygodniowego przechowywania w temperaturze pokojowej ($T = 298 \text{ K}$) w zamkniętych pojemnikach szklanych lub wykonanych z tworzywa PET.

Ocena właściwości zawiesiny: smaku, pH i reologicznych.

Poznanie wpływu opakowania (butelki) na trwałość cilazaprilu w zawiesinie i na jej właściwości.

9.5 Materiały i metody

Materiały

- opisane w ROZDZIALE 4.5.1 na stronie 22 oraz
- lek A (seria: E0128B01U1)
- lek B (seria: 010312)
- *vehiculum* Ora-Blend (seria: 1125072)
- oranżowe butelki do receptury z zakrętkami o pojemności 100 ml
 - szklane wysterylizowane przed użyciem suchym gorącym powietrzem ($T = 443 \text{ K}$, $t = 2 \text{ h}$)
 - sterylne, wykonane z tworzywa PET (Pharmapack, Katowice)

Metoda analityczna

- HPLC opisana w ROZDZIALE 4.5.2

9.6 Procedury

Przygotowanie zawiesin pediatrycznych z cilazaprilem 1 mg/1 ml

Rp.

*Cilazaprilum** 100 mg
Ora-Blend ad 100 ml

M. f. Mixturae

S. Zmieszać przed użyciem

*wykorzystano gotowe tabletki z cilazaprilem (lek A i B)

W celu przygotowania zawiesiny pediatrycznej odpowiednią ilość tabletek rozkruszono za pomocą pistla a następnie dokładnie roztarto i rozdrobniono w móżdzierzu (30 minut). Do uzyskanego proszku dodano około 20 ml Ora-Blend i mieszano delikatnie do uzyskania gęstej pasty. Powstałą pastę rozcieńczano porcjami Ora-Blend. Homogenną zawiesinę przeniesiono ilościowo do wykalibrowanego cylindra miarowego, popłukując móżdziej uzupełniono do 100,0 ml Ora-Blend.

Przygotowany preparat przelano do butelki szklanej lub PET.

Warunki testu kinetycznego

Przygotowane zawiesiny (A i B) w szczelnie zamkniętych butelkach szklanych lub PET umieszczono w szafie termostatycznej (ST1+ (Pol-eko)). Przechowywano je w 298 K przez okres czterech tygodni według poniższego schematu (TABELA 9.1).

TABELA 9.1
Plan badań kinetycznych - ocena trwałości zawiesiny z cilazaprilem

Przedmiot badania	Pojemnik	Temperatura [K]	Sposób przechowywania
zawiesina A	szkło PET	298 K	pojemnik szczelnie zamknięty
zawiesina B	szkło PET		

Z zawiesin w tygodniowych odstępach czasu pobierano pobierano 10 ml i po zastosowaniu odpowiedniej, opisaney poniżej procedury, analizowano metodą HPLC.

Przygotowanie prób do analizy HPLC

Próbki - zawiesiny przechowywane w $T = 298$ K. Odważono dokładnie 2,5 ml pobranej zawiesiny do kolby miarowej o objętości 25 ml. Następnie uzupełniano metanolem do objętości 25,0 ml i wytrząsano przez 15 minut. Powstałą zawiesinę odwirowywano przez 10 minut przy obrotach 5800 rpm (wirówka MPW-54). Supernatant przesączano przez jednorazowy sącdek strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μm .

W ostatnim etapie mieszano 1,0 ml otrzymanego roztworu badanego z 0,5 ml wzorca wewnętrznego (metanolowy roztwór chlorowodoru oksymetazoliny o stężeniu 0,02 %) i poddawano analizie HPLC.

Próbki wzorcowe - zawiesiny niepoddane starzeniu. Odważono dokładnie masę tabletkową leku A lub B odpowiadającą 0,0025 g cilazaprilu do kolby miarowej o objętości 25 ml. Następnie dodano 2,5 ml Ora-blend i uzupełniano metanolem do objętości 25,0 ml i wytrząsano przez 15 minut. Powstałą zawiesinę odwirowywano przez 10 minut przy obrotach 5800 rpm (wirówka MPW-54). Supernatant przesączano przez jednorazowy sącdek strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μm .

W ostatnim etapie mieszano 1,0 ml otrzymanego roztworu badanego z 0,5 ml wzorca wewnętrznego (metanolowy roztwór chlorowodoru oksymetazoliny o stężeniu 0,02 %) i poddawano analizie HPLC.

Badanie pH

Równoległe z oceną trwałości cilazaprilu w zawiesinach, w odstępach cotygodniowych, badano również pH zawiesin. pH w każdej próbce zostało zbadane sześciokrotnie za pomocą pHmetru MP225 Toledo (Mettler).

Badanie właściwości reologicznych

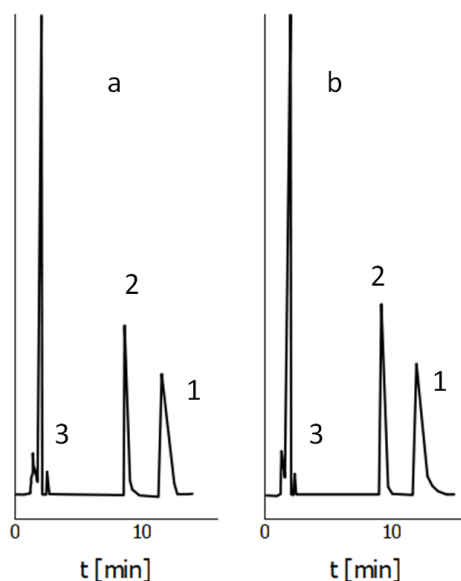
Właściwości reologiczne przygotowanych zawiesin zostały zbadane bezpośrednio po przygotowaniu zawiesin A i B oraz w odstępie czterotygodniowym, po przechowywaniu w 298 K z wykorzystaniem butelek szklanych oraz PET.

Badanie przeprowadzono z użyciem aparatu HAAKE RheoStress1 (Thermo Electro Corporation) z użyciem układu pomiarowego rotacyjnego płytka-płytko (PP35Ti reometr RS1 rotor) o szczelinie 1 mm. Temperatura układu odpowiadała temperaturze przechowywania roztworów i wynosiła 298 K (termostat HAAKE DC 30, Thermo Electro Corporation).

9.7 Wyniki i ich omówienie

9.7.1 Selektywność metody HPLC

Chromatogramy potwierdzające selektywność metody HPLC względem cilazaprilu, jego produktu rozkładu oraz substancji pomocniczych występujących w leku A, B i *vehiculum* Ora-Blend przedstawiono na RYCINIE 9.1.



RYCINA 9.1

*Selektywność metody HPLC względem cilazaprilu, produktu rozkładu oraz substancji pomocniczych występujących w leku A, B i *vehiculum* Ora-Blend. Chromatogramy dotyczą a) zawiesiny A oraz b) zawiesiny B, gdzie pik (1) odpowiada wzorcowi wewnętrznemu (2) cilazaprilowi a (3) substancjom pomocniczym obecnym w *vehiculum* Ora-Blend.*

9.7.2 Ocena trwałości chemicznej cilazaprilu w zawiesinie pediatrycznej

Niezmiernie istotnymi cechami zawiesin pediatrycznych są smak, zapach i wygląd. Powinny być one przyjemne i akceptowane przez dziecko.

Obie przygotowane zawiesiny mają konsystencję jednolitego syropu, przy czym ze względu na różnice w składzie otoczki leku A i B, charakteryzują się różnym kolorem: zawiesina A jest czerwona, natomiast B biała. Zapach zawiesin jest słodki i owocowy.

Jak wynika z TABELI 9.2 talkowy, gorzki, nieprzyjemny, wręcz nie do przyjęcia smak sproszkowanej tabletki został zamaskowany smakiem *vehiculum* Ora-Blend. Jest to zjawisko bardzo korzystne, gdyż z pewnością przyczyni się do ułatwienia stosowania leku i umożliwi współpracę z małym pacjentem.

TABELA 9.2
Ocena smaku płynnej postaci leku z cilazaprilem

Postać leku	Smak*
<i>vehiculum Ora-Blend</i>	owocowy, słodki
<i>Lek A</i>	talkowy, gorzki, nieprzyjemny
<i>Zawiesina A</i>	owocowy, słodki, ledwie wyczuwalna gorycz
<i>Lek B</i>	talkowy, gorzki, nieprzyjemny
<i>Zawiesina B</i>	owocowy, słodki, ledwie wyczuwalna gorycz

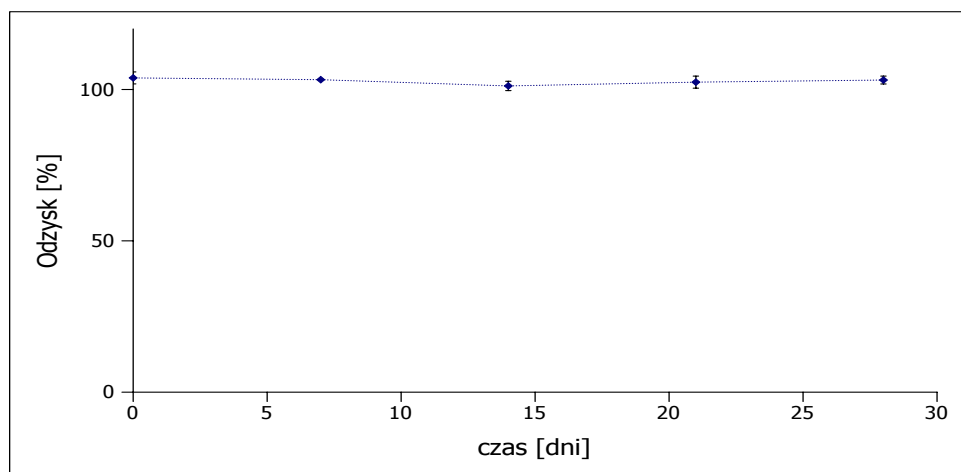
*oceniono metodą wypłucz-wypłuj (*spill-spit*)

Zawiesina A

Cilazapril zawarty w zawiesinie A przechowywanej w temperaturze pokojowej zachowuje swoją trwałość przez cztery tygodnie. Potwierdza to brak rozkładu cilazaprilu w zawiesinie. Dodatkowo materiał, z którego wykonana jest butelka nie ma wpływu na rozkład leku. (RYCINY 9.2, 9.3)

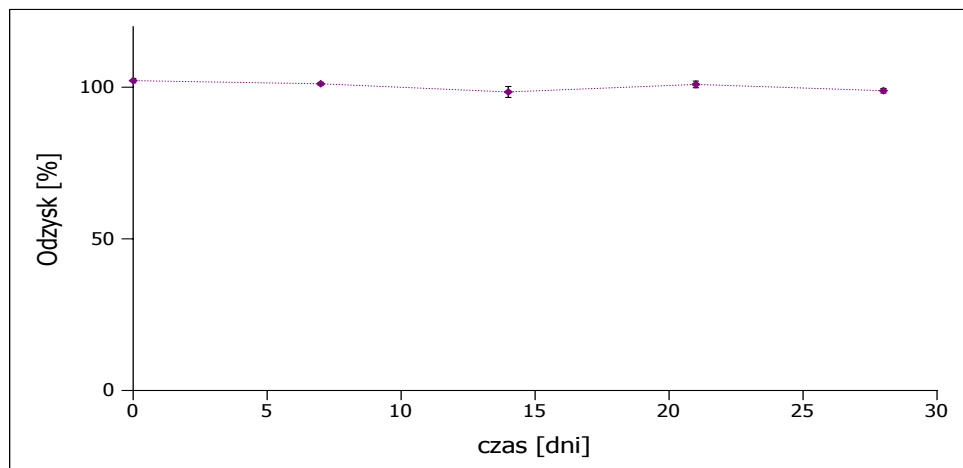
Po czterech tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej odzysk cilazaprilu (przedstawiony, jako *wartość* $\% \pm S$) wynosi:

- dla zawiesiny przechowywanej w butelce ze szkła $103,13 \pm 1,30$
- dla zawiesiny przechowywanej w butelce z PET $98,85 \pm 0,76$



RYCINA 9.2

Trwałość cilazaprilu w zawiesinie A przechowywanej w butelce szklanej ($T = 298 K$).



RYCINA 9.3

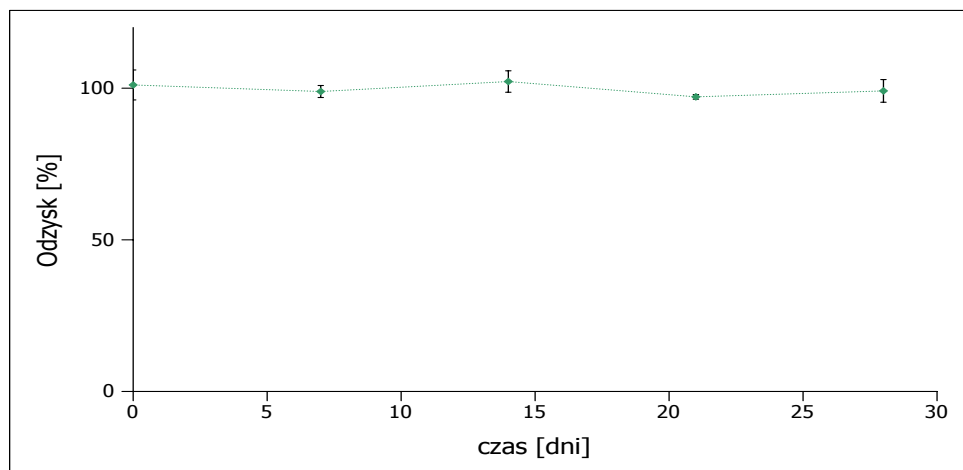
Trwałość cilazaprilu w zawiesinie A przechowywanej w butelce z tworzywa PET ($T = 298\text{ K}$).

Zawiesina B

Cilazapril zawarty w zawiesinie B przechowywanej w temperaturze pokojowej zachowuje swoją trwałość przez cztery tygodnie. Potwierdza to brak rozkładu cilazaprilu w zawiesinie. Dodatkowo materiał, z którego wykonana jest butelka nie ma wpływu na rozkład leku. (RYCINY 9.4, 9.5)

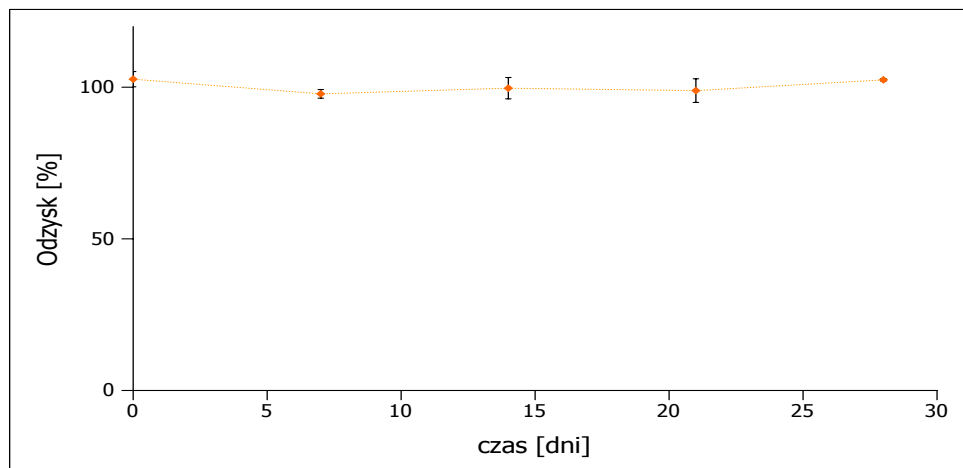
Po czterech tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej odzysk cilazaprilu (przedstawiony, jako *wartość* $\% \pm S$) wynosi:

- dla zawiesiny przechowywanej w butelce ze szkła $99,11 \pm 3,74$
- dla zawiesiny przechowywanej w butelce z PET $102,43 \pm 0,42$



RYCINA 9.4

Trwałość cilazaprilu w zawiesinie B przechowywanej w butelce szklanej ($T = 298\text{ K}$).



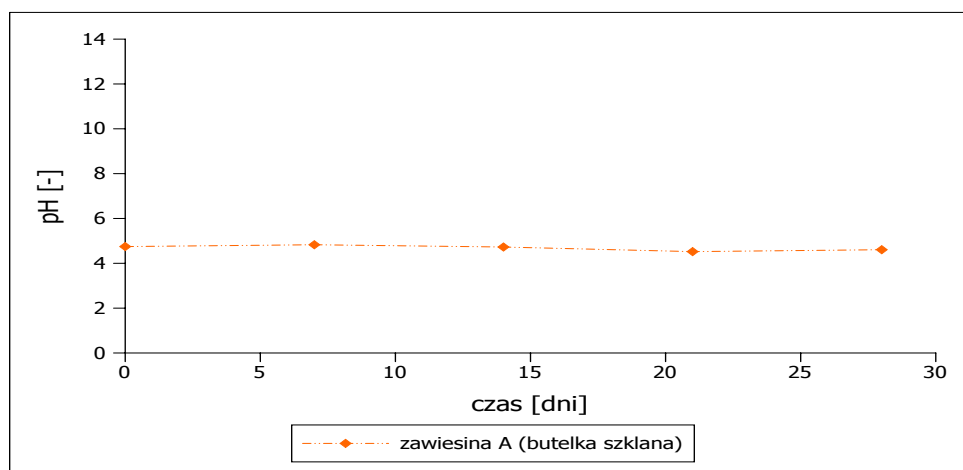
RYCINA 9.5

Trwałość citaloprilu w zawiesinie B przechowywanej w butelce z tworzywa PET ($T = 298\text{ K}$).

9.7.3 Ocena pH zawiesiny pediatrycznej z citalaprilem

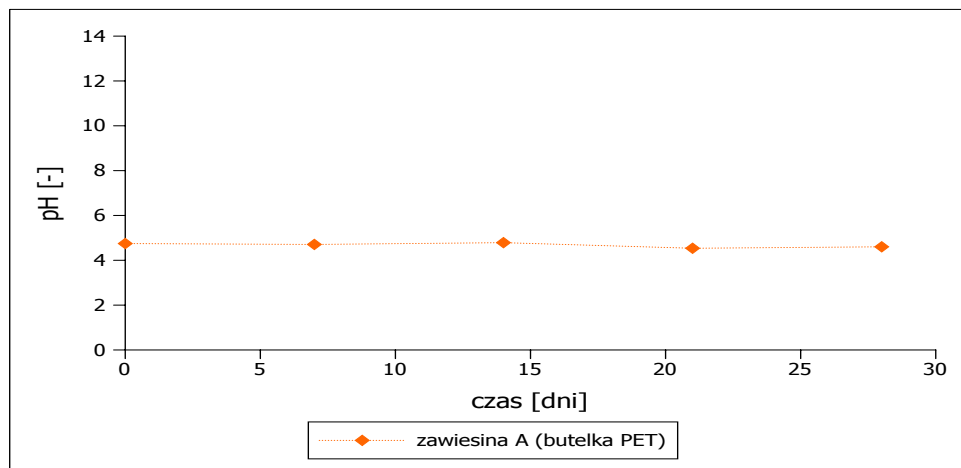
Wyniki pomiarów pH zawiesin pediatrycznych A i B wskazują na brak znaczących statystycznie zmian w wartościach pH podczas przechowywania przez cztery tygodnie w temperaturze pokojowej. Zastosowane opakowanie (butelka szklana oraz PET) również nie przyczynia się do zmian wartości tego parametru. (RYCINY 9.6, 9.7, 9.8, 9.9 i TABELLE 9.3, 9.4)

Zawiesina A



RYCINA 9.6

Pomiar pH podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny A w butelce szklanej ($T = 298\text{ K}$).



RYCINA 9.7

Pomiar pH podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny A w butelce PET ($T = 298\text{ K}$).

TABELA 9.3
Ocena pH zawiesiny A

czas [dni]	pomiar pH*	
	butelka szklana	butelka PET
0	4,7467 ± 0,0054	4,7467 ± 0,0054
7	4,8283 ± 0,0079	4,7075 ± 0,0864
14	4,7267 ± 0,0054	4,7867 ± 0,0245
21	4,5217 ± 0,0043	4,5367 ± 0,0108
28	4,6067 ± 0,0086	4,6017 ± 0,0168

*pomiaru dokonywano każdorazowo 6-krotnie

TEST ISTOTNOŚCI ZMIAN pH

H_0 : wartości = wartość w czasie 0 h

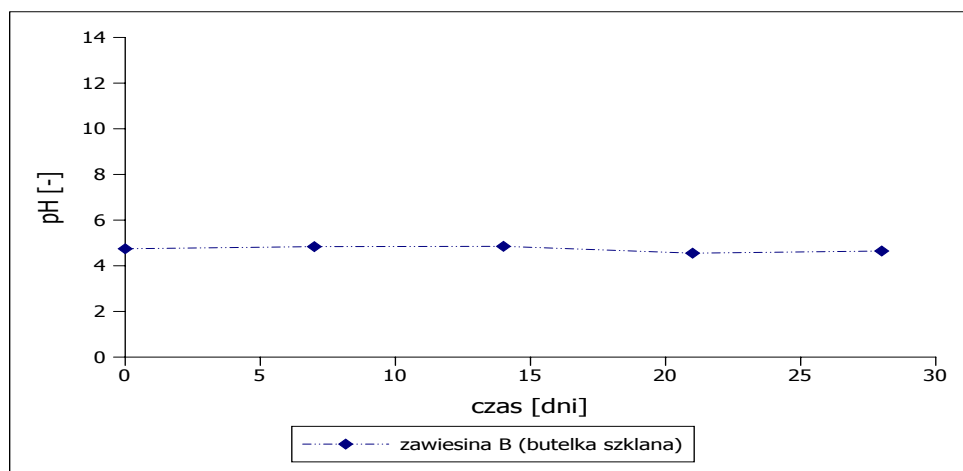
H_1 : wartości \neq wartość w czasie 0 h

$ t $	1,1180	1,5246
$t(2\alpha=0,10;f=4)$	2,1318	

Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(2\alpha;f) > |t|$ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 .

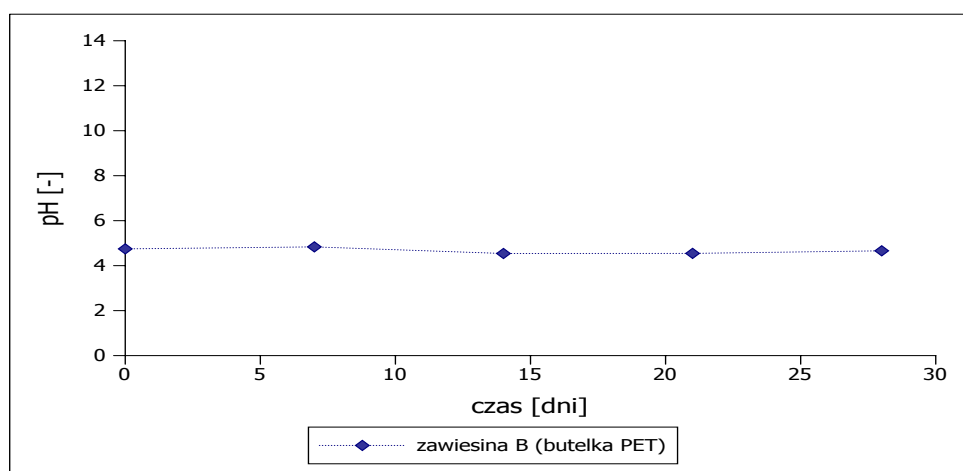
Uzyskane wyniki wartości pH nie różnią się statystycznie.

Zawiesina B



RYCINA 9.8

Pomiar pH podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny B w butelce szklanej ($T = 298\text{ K}$).



RYCINA 9.9

Pomiar pH podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny B w butelce PET ($T = 298\text{ K}$).

TABELA 9.4
Ocena pH zawiesiny B

czas [dni]	pomiar pH*	
	butelka szklana	butelka PET
0	4,7450 ± 0,0057	4,7450 ± 0,0057
7	4,8383 ± 0,0043	4,8350 ± 0,0088
14	4,8517 ± 0,0243	4,5400 ± 0,0115
21	4,5517 ± 0,0204	4,5450 ± 0,0129
28	4,6467 ± 0,0054	4,6600 ± 0,0000

*pomiaru dokonywano każdorazowo 6-krotnie

TEST ISTOTNOŚCI ZMIAN pH

H_0 : wartości = wartość w czasie 0 h

H_1 : wartości \neq wartość w czasie 0 h

$ t $	0,3205	1,3995
$t(2\alpha=0,10;f=4)$	2,1318	

Weryfikacja hipotez wykazała, że $t(2\alpha;f) > |t|$ dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 .

Uzyskane wyniki wartości pH nie różnią się statystycznie.

9.7.4 Ocena właściwości reologicznych zawiesin pediatrycznych z cilazaprilem

Przyrządzone zawiesiny poddano badaniu reologicznemu. Eksperyment przeprowadzono w dwóch punktach czasowych: tuż po przygotowaniu zawiesiny i po czterech tygodniach przechowywania ($T = 298$ K) w różnych opakowaniach (butelkach szklanych oraz wykonanych z tworzywa PET).

Oceniono lepkość badanych zawiesin oraz przeprowadzono analizę krzywych: płynięcia i tiksotropowych.

W tym celu każdą badaną zawiesinę poddawano działaniu naprężenia ścinającego τ [$N/m = Pa$], określamy je jako siłę potrzebną do pokonania sił międzycząsteczkowych zapewniających strukturę zawiesiny (sił van der Waalsa, oddziaływań dipol-dipol i wiązań wodorowych). W wyniku działania naprężenia ścinającego struktura ulega zniszczeniu, zmniejsza się jej lepkość i zawiesina zaczyna płynąć.

Krzywe płynięcia $f(\tau) = \text{szybkość ścinania}$ wskazują, że zawiesiny z cilazaprilem są ciałami pseudoplastycznymi. Obserwuje się w ich przypadku drastyczny spadek lepkości w miarę wzrostu szybkości ścinania.

Dodatkowo wraz z malejącym naprężeniem ścinającym struktura wewnętrzna układu wraca od razu do stanu poprzedniego. W przypadku badanych zawiesin krzywa wstępująca i zstępująca nie różnią się od siebie i nie obserwujemy pętli histerezy.

Do analizy danych uzyskanych w toku analizy reologicznej użyto matematycznego modelu reologicznego zaproponowanego przez Ostwald'a:

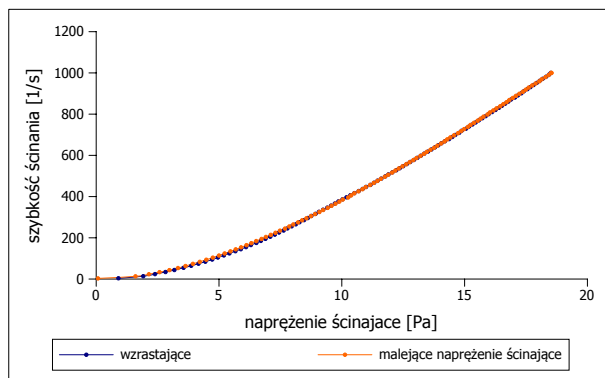
$$\tau = K(\dot{\gamma})^m \quad (9.1)$$

gdzie τ odpowiada wcześniej wspomnianemu naprężeniu ścinającemu, $\dot{\gamma}$ - szybkości ścinania, K to konsystencja, która jest stałą zależną od lepkości, natomiast m to wykładnik płynięcia. [122, 123]

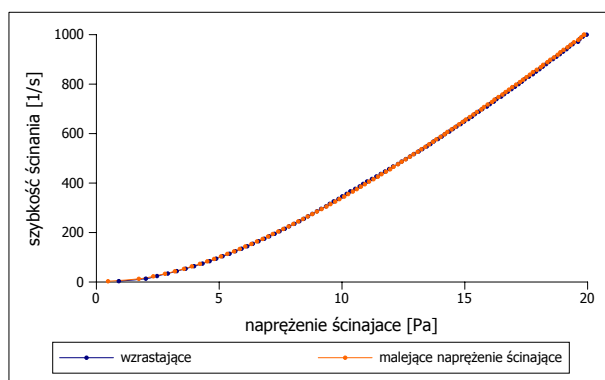
Właściwości reologiczne zawiesin przechowywanych w butelkach ze szkła lub PET oraz lepkość pozorna nie uległy istotnym zmianom podczas czterotygodniowego przechowywania w temperaturze pokojowej. (RYCINY 9.10, 9.11, 9.12, 9.13, TABELA 9.5)

TABELA 9.5
Parametry reologiczne zawiesin z cilazaprilem

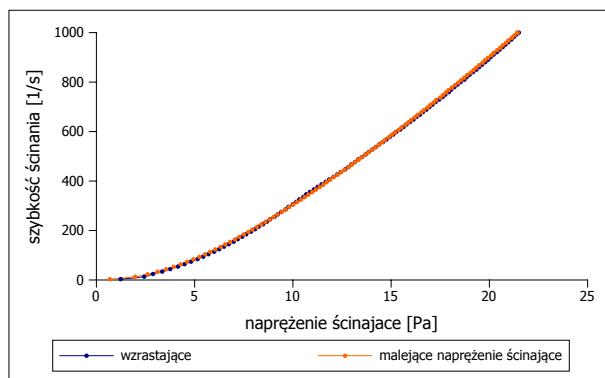
Parametr	Parametry reologiczne					
	zawiesina A			zawiesina B		
	0 tygodni	4 tygodnie		0 tygodni	4 tygodnie	
	szkło	PET		szkło	PET	
K	0,39	0,26	0,26	0,44	0,26	0,35
m	0,55	0,62	0,62	0,55	0,63	0,59



(a)



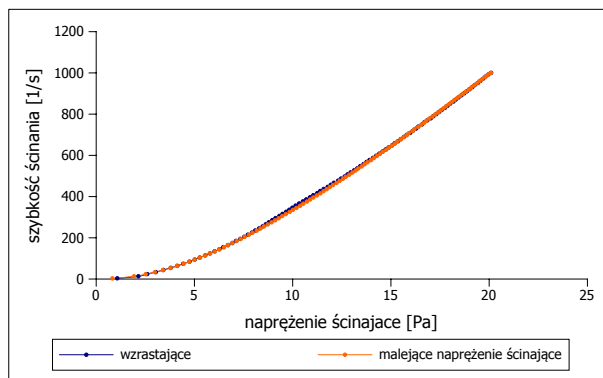
(b)



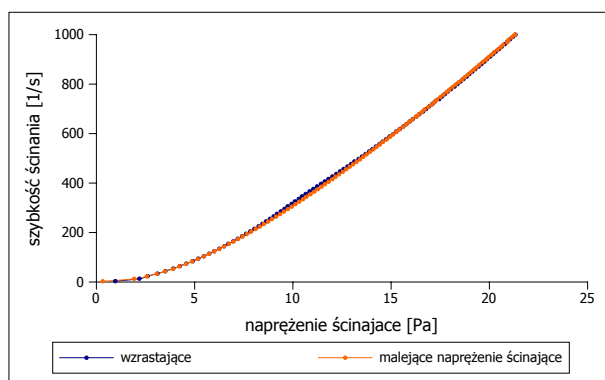
(c)

RYCINA 9.10

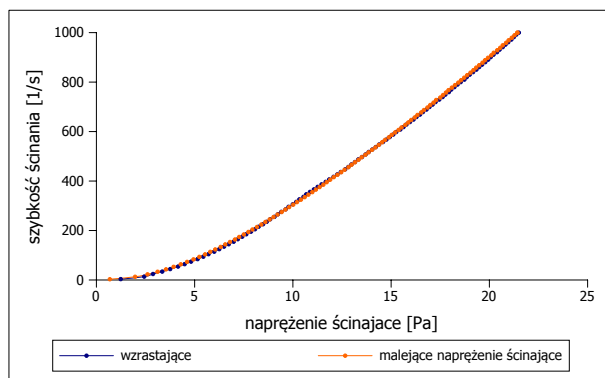
Krzywe tiksotropowe zawiesiny A: (a) świeżo przygotowanej zawiesiny, przechowywanej przez cztery tygodnie ($T = 289\text{ K}$) w butelce (b) szklanej oraz (c) wykonanej z tworzywa PET.



(a)



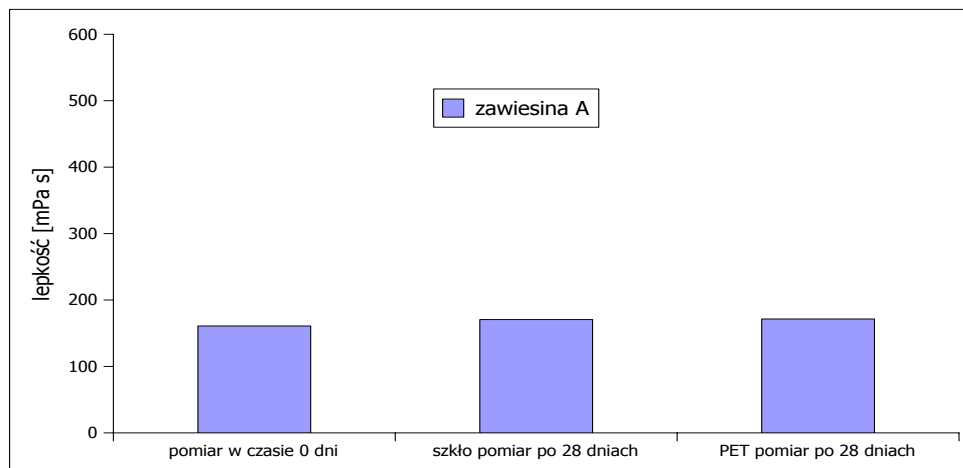
(b)



(c)

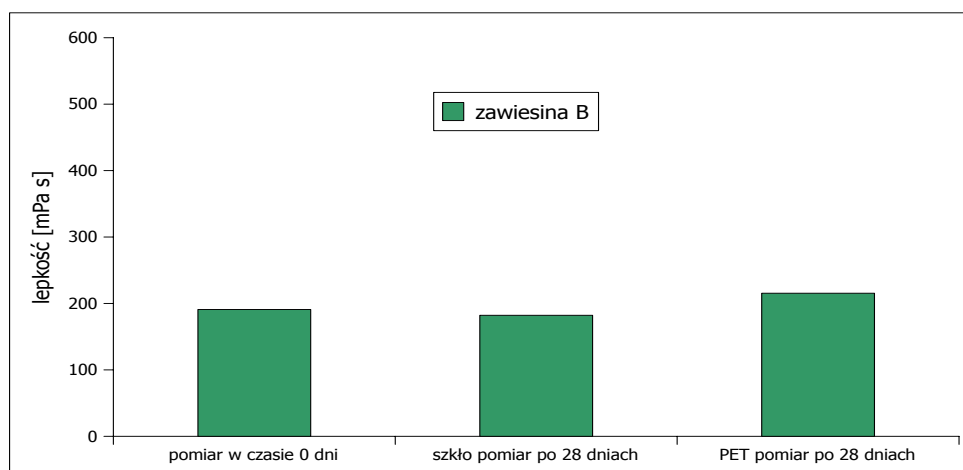
RYCINA 9.11

Krzywe tiksotropowe zawiesiny B: (a) świeżo przygotowanej zawiesiny, przechowywanej przez cztery tygodnie ($T = 289\text{ K}$) w butelce (b) szklanej oraz (c) wykonanej z tworzywa PET.



RYCINA 9.12

Zmiany lepkości pozornej podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny A w butelce PET oraz szklanej ($T = 298\text{ K}$).



RYCINA 9.13

Zmiany lepkości pozornej podczas czterotygodniowego przechowywania zawiesiny B w butelce PET oraz szklanej ($T = 298\text{ K}$).

9.8 Podsumowanie

Zawiesiny pediatryczne z cilazaprilem przygotowane z tabletek leku A i B oraz *vehiculum* Ora-Blend charakteryzują się trwałością (przez okres 28 dni). Z powodzeniem mogą być przez ten czas przechowywane w temperaturze pokojowej bez obawy pogorszenia się właściwości fizycznych, jak i chemicznych cilazaprilu w tej postaci leku.

10

Omówienie wyników

Cilazapril jest lekiem doustnym szeroko stosowanym w leczeniu nadciśnienia tętniczego oraz niewydolności serca.

W preparatach farmaceutycznych stosowany jest w postaci pro-leku, oznacza to, że forma przyjmowana przez pacjenta w chwili zastosowania jest nieaktywna biologicznie, jednak dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego. Po wchłonięciu cilazapril za pośrednictwem krwiobiegu jest transportowany do wątroby, gdzie za pośrednictwem esteraz jest przekształcany do biologicznie aktywnego cilazaprilatu. Cilazaprilat jest inhibitorem enzymu konwertującego angiotensynę. Łączy się z enzymem w jego miejscach aktywnych blokując go, tym samym zapobiegając przekształceniu angiotensyny I do angiotensyny II o silnie naczynioskurczowym działaniu. Skutkiem tejże inhibicji jest efekt hipotensyjny i poprawa wydolności całego układu sercowo-naczyniowego.

Cilazapril dodatkowo pełni ważną rolę w leczeniu nadciśnienia niekontrolowanego w połączeniu z diuretykiem tiazydowym - hydrochlorotiazydem. W terapii skojarzonej wykorzystuje się dwa mechanizmy działania leków: na układ RAA i wydalenie wody z ustroju.

Preparatami handlowymi z cilazaprilem są tabletki. W Polsce są dostępne preparaty handlowe leku oryginalnego i generycznych odpowiedników. Wszystkie preparaty farmaceutyczne charakteryzują się niską trwałością o czym świadczy krótka data ważności dopuszczonych do obrotu preparatów - 3 lata w przypadku leku oryginalnego i mniej dla postaci generycznych.

Krótką datą ważności preparatów handlowych z cilazaprilem zwróciła moją uwagę na naukowy problem, który w literaturze światowej nie jest rozwikłany. Nie istnieją żadne doniesienia na temat trwałości chemicznej tego leku *w substancji*, brak danych odnośnie interakcji z substancjami pomocniczymi stosowanymi do wytworzenia tabletki z cilazaprilem czy też z substancją czynną, która współistnieje z cilazaprilem w leku złożonym.

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej uzupełniają tę lukę. Zbadanie trwałości cilazaprilu *w substancji*, określenie wpływu hydrochlorotiazydu - substancji biologicznie czynnej współwystępującej z cilazaprilem w leku złożonym oraz substancji pomocniczych stosowanych w tabletkach, szczególnie tych wpływających negatywnie umożliwi dalsze poszukiwania, które mogą przyczynić się do poprawy trwałości cilazaprilu, wydłużenia daty ważności preparatów handlowych, co wpłynie niewątpliwie na aspekt leczniczy i ekonomiczny terapii.

Oprócz wyżej wymienionych badań nad trwałością cilazaprilu w fazie stałej w niniejszej pracy podjęto się również próby przygotowania trwałej zawiesiny pediatrycznej

z cilazaprilem z wykorzystaniem tabletek i *vehiculum* Ora-Blend. Sporządzenie płynnej postaci leku może się przyczynić ułatwieniu terapii tym pacjentom, którzy nie są w stanie połączyć tabletki (pediatryczne zastosowanie). Przydatność zawiesiny z cilazaprilem może okazać się duża ze względu na brak handlowego preparatu cilazaprilu w płynnej postaci, oraz niedogodności - gorzki, talkowy smak tabletek. Płynna postać warunkuje dodatkowo pewność podania całej dawki leku.

Badanie trwałości substancji leczniczej jest procesem złożonym, obejmującym szereg zagadnień, które analizowano w kilku etapach. W pierwszym etapie dokonano wyboru metody analitycznej do badań kinetycznych nad cilazaprilem. Następnie z wykorzystaniem wybranej, zoptymalizowanej, zwalidowanej metody oznaczano zmiany cilazaprilu w próbkach poddanych kinetycznym testom izotermicznym. Eksperymentom poddano cilazapril *w substancji*, w mieszaninach modelowych z substancjami pomocniczymi, w dwóch preparatach handlowych oraz w mieszaninie modelowej i preparacie handlowym z hydrochlorotiazidem, oceniając jednocześnie wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza. Badania zamknięto przygotowaniem zawiesiny pediatrycznej z cilazaprilem i oceną jej trwałości.

Metoda do badań kinetycznych

(ROZDZIAŁ 4, strona 16)

Niezmiernie istotnym zagadnieniem w badaniu trwałości każdej substancji leczniczej jest dobór odpowiedniej metody analitycznej, która dokładnie i precyzyjnie oznaczy substancję leczniczą w badanych próbkach w obecności produktów rozkładu, substancji wchodzących w skład postaci leku czy innych współwystępujących substancji biologicznie czynnych.

Opierając się na doniesieniach piśmiennictwa i dostępności aparatury badawczej postanowiono dokonać próby przystosowania metody spektrofotometrycznej klasycznej i pochodnych widm oraz metody HPLC z detekcją UV.

Obie metody pomiarowe bazują na absorpcji promieniowania nadfioletowego przez badaną substancję. Cilazapril posiada słabo charakterystyczny chromofor benzenowy, który wykazuje absorpcję przy krótkich długościach fali.

Metoda spektrofotometryczna

Metoda spektrofotometryczna, jest metodą szybką, co ma szczególne znaczenie w badaniu trwałości, gdzie mamy do czynienia z dużą ilością próbek do przeanalizowania. Jeśli substancja wykazuje właściwości absorpcji światła w danym zakresie, przygotowanie pró-

bek do analizy polega na rozpuszczeniu substancji i rozcieńczeniu do osiągnięcia stężeń w zakresie metody.

Dodatkowo zastosowanie techniki spektrofotometrii pochodnych widm przyczynia się do rozdzielania nakładających się pasm widma, dzięki czemu z większą precyzją można oznaczyć analityczną długość fali. [124]

Mimo wielu zalet, niestety metody spektrofotometryczne okazały się nieprzydatne do badań kinetycznych nad cilazaprilem, gdyż nie były selektywne względem cilazaprilu i jego produktu rozkładu. (RYCINA 10.1)

Przypuszcza się, że metody te mogłyby służyć badaniom trwałości, gdyby przed oznaczeniem rozdzielono składniki mieszaniny związków powstającej w wyniku rozkładu cilazaprilu podczas testów izotermicznych.

Metoda HPLC

Metoda HPLC jest metodą rozdziału. W tym przypadku składniki mieszaniny poreakcyjnej rozkładu cilazaprilu są oznaczane osobno. I choć końcowe oznaczanie także w tym przypadku bazuje na absorpcji światła, rozdział chromatograficzny gwarantuje selektywność metody.

Przy wyborze warunków metody kierowano się doniesieniami światowej literatury, dotyczących metod, które z powodzeniem były stosowane w badaniu trwałości inhibitorów konwertazy angiotensyny o podobnej do cilazaprilu budowie.

Za punkt wyjścia do dalszej optymalizacji obrano fazę ruchomą stosowaną do oznaczania enalaprilu podczas oceny jego trwałości. Skład fazy ruchomej był następujący: acetonitryl i bufor fosforanowy ($\text{pH} = 2,0$, $0,001 \text{ mol/l}$). W tych warunkach otrzymano rozdział cilazaprilu i jego produktu rozkładu w czasie poniżej 15 minut, jednak wygląd pików na chromatogramie nie był zadowalający pod względem symetrii i ostrości.

W celu uzyskania satysfakcjonującego rozdziału chromatograficznego parametry metody HPLC poddano optymalizacji. W tym procesie sprawdzano kolumny o różnej długości i wypełnieniu (RP C-8 i C-18), składy fazy ruchomej, będącej mieszaniną acetonitrylu, buforu fosforanowego o $\text{pH} = 2,0$ i/lub metanolu oraz różne prędkości przepływu.

Ostatecznie do dalszych badań przyjęto następujące parametry rozdziału:

- faza stacjonarna
 - kolumna LiChroCART[®] 250-4 HPLC-Cradridge, LiChrospher[®] 100 RP-18 ($5 \mu\text{m}$)
- faza ruchoma

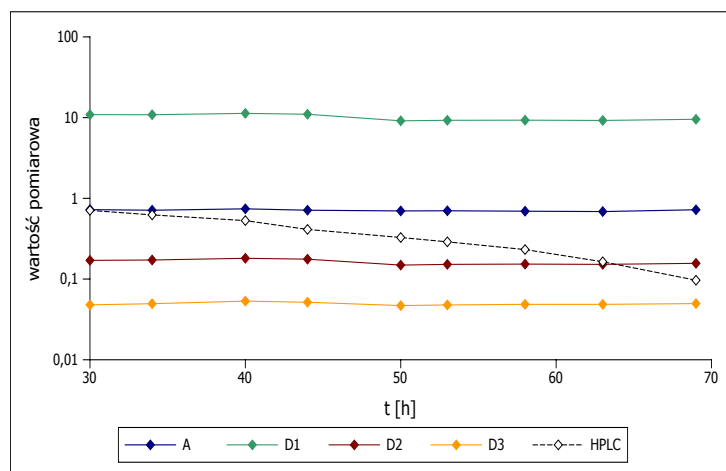
- acetonitryl-metanol-bufor fosforanowy (pH = 2,0, 0,001 mol/l) (60 : 10 : 30 v/v/v)
- temperatura pomiaru
 - otaczająca
- szybkość przepływu fazy ruchomej
 - 1,0 ml/minutę
- analityczna długość fali
 - 212 nm

Efektom końcowym optymalizacji jest rozdział chromatograficzny próbek zawierających cilazapril i jego produkty rozkładu w obecności substancji pomocniczych, przy czym piki na uzyskiwanych w toku analizy chromatogramach są ostre, symetryczne i wąskie.

Walidacja

Selektywność

Pierwszym ocenianym parametrem obu metod była selektywność. Jednak ze względu zbliżone właściwości produktu rozkładu cilazaprilu pod względem absorpcji światła metoda spektrofotometryczna w przebiegu pilotażowego badania trwałości okazała się nieprzydatna. Jak widać na RYCINIE 10.1 nie obserwowano zmian w wartościach pomiarowych próbek poddanych rozkładowi, podczas gdy przeprowadzając analizę metodą HPLC notowano zmiany.



RYCINA 10.1

Selektywność metod HPLC oraz spektrofotometrycznej (klasycznej (A) i pochodnych widm (D1, D2, D3)) względem składników próbek poddanych rozkładowi w czasie pilotażowego badania kinetycznego.

Niniejsza obserwacja świadczy o braku selektywności metody spektrofotometrycznej klasycznej i pochodnych widm względem produktu rozkładu cilazaprilu, co z drugiej strony gwarantuje rozdział chromatograficzny. Z powyższego względu metody spektrofotometryczne zostały wykluczone z eksperymentu. Dalszemu procesowi walidacji poddano metodę HPLC.

Przy długości fali 212 nm inne substancje nie mają wpływu na sygnał pochodzący od cilazaprilu, co znajduje potwierdzenie w czasach retencji poszczególnych związków. O selektywności metody wybranej HPLC świadczą czasy retencji (wyrażone w minutach) poszczególnych substancji. Cilazaprilu 8,9, głównego produktu rozkładu 3,1, pobocznego ($RH = 0\%$) 7,8, hydrochlorotiazydu 2,3. W zależności od obserwowanych na chromatogramie pików do oceny zmian w poszczególnych eksperymentach wybrano dwa wzorce wewnętrzne: benzokainę o czasie retencji 2,8 i oksymetazoliny chlorowodorek 12,6 minuty.

Dodatkowo wykazano, że substancje pomocnicze nie wpływają na powyżej opisany rozdział chromatograficzny, co ma szczególne znaczenie podczas analizy gotowych postaci leku z cilazaprilem.

Liniowość, zakres, wykrywalność, oznaczalność

Opracowana metoda HPLC jest liniowa co potwierdzają wyznaczone dwie krzywe wzorcowe (z użyciem dwóch wzorców wewnętrznych beznokainy i chlorowodoru oksymetazoliny) w zakresie stężeń cilazaprilu 0,001 - 0,048 %.

Analiza regresji prostych wskazuje na wysoką korelację między sygnałem otrzymanym z aparatu (P_{cil}/P_{IS} - pole powierzchni pod pikiem pochodzącym od cilazaprilu mierzonym względem pola powierzchni pod pikiem wzorca wewnętrznego) a stężeniem analitu, czego wyrazem są równania prostej i współczynnik korelacji bliski jedności.

Krzywa kalibracyjna - wzorzec wewnętrzny benzokaina.

Parametry prostej: $sygnał = (52,5572 \pm 0,9753) \cdot \text{stężenie cilazaprilu}$, współczynnik korelacji $r = 0,9996$, granica wykrywalności 0,0015 % oraz granica oznaczalności 0,0045 %.

Krzywa kalibracyjna - wzorzec wewnętrzny chlorowodorek oksymetazoliny.

Parametry prostej: $sygnał = (36,7427 \pm 1,0547) \cdot \text{stężenie cilazaprilu}$, współczynnik korelacji $r = 0,9990$, granica wykrywalności 0,0023 % oraz granica oznaczalności 0,0069 %.

Precyzja

Precyzję wyznaczono poprzez analizę roztworów cilazaprilu na trzech poziomach stężeń cilazaprilu niskim (0,010 %), średnim (0,020 %) oraz wysokim (0,040 %). Rozrzut wyników oznaczeń został określony poprzez obliczenie współczynnika zmienności, który wynosił dla rosnących stężeń cilazaprilu odpowiednio 0,9425, 0,9503 oraz 1,0456 %.

Dokładność

Dokładność zmierzono jako odzysk cilazaprilu (wyrażony w procentach) z mieszanin modelowych o określonej zawartości cilazaprilu (tabletki obciążone cilazaprilem na trzech poziomach 50, 100 i 150 % wyjściowej zawartości substancji). Odzysk wynosił kolejno 98,0857, 98,4898, 99,6410 %.

Ocena trwałości cilazaprilu

Badania trwałości cilazaprilu w fazie stałej przeprowadzono używając metody testu izotermicznego. Ogólna zasada przeprowadzenia testu, jest taka, że próbki badane poddaje się działaniu wilgotności względnej powietrza i temperatury o ściśle określonych z znanych wartościach. Następnie uzyskane w toku analizy ilościowej wyniki zmian zawartości badanej substancji w próbce poddaje się analizie matematycznej. Za pomocą równań matematycznych opisuje się model kinetyczny i wyznacza się parametry rozkładu.

W celu dogłębnego zbadania kinetycznych mechanizmów rządzących rozkładem cilazaprilu poddano go działaniu różnych czynników fizycznych: wilgotności powietrza, temperatury, a także chemicznych: substancji pomocniczych i substancji biologicznie czynnej.

Ocena trwałości cilazaprilu w substancji

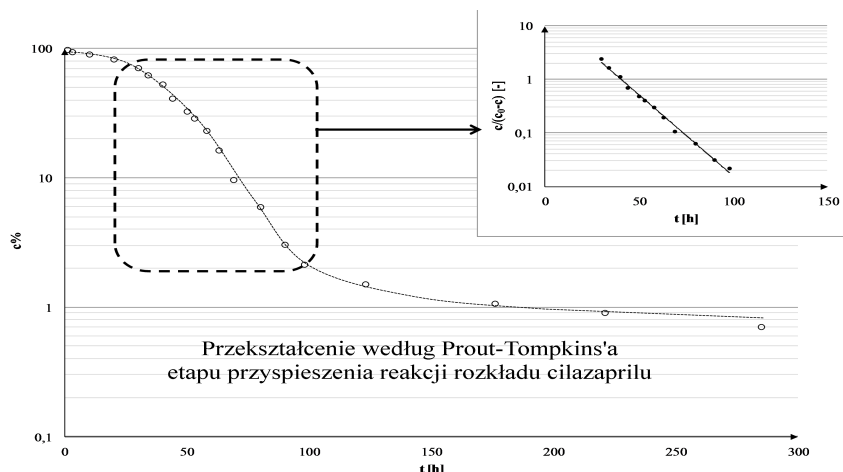
(ROZDZIAŁ 5, strona 39)

Pierwszym etapem analizy dotyczącej już samej trwałości cilazaprilu była analiza reakcji rozkładu *substancji* w warunkach podwyższonej i zerowej wilgotności powietrza oraz różnych temperatur.

Zbadanie wpływu tych czynników zewnętrznych jest niezmiernie istotne ze względu na fakt, że wilgoć jest zawsze obecna w otaczającym środowisku, stanowi dogodne środowisko reakcji rozkładu, może wpływać na szybkość reakcji lub jako reagent brać w niej udział prowadząc do hydrolizy. Natomiast podwyższona temperatura przyspiesza każdą endoenergetyczną reakcję.

Wilgotność względna powietrza > 0 %

Cilazapril w *substancji* w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza rozkłada się zgodnie z mechanizmem kinetycznym reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu. (RYCINA 10.2)



RYCINA 10.2

Rozkład cilazaprilu w substancji przedstawiony z wykorzystaniem zależności Prout-Tompkins'a ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$).

Adekwatny do matematycznego opisu model dobrano metodą *model-fitting*. Metoda ta polega na analizie współczynników korelacji danych eksperymentalnych przedstawionych za pomocą równań matematycznych i wykresów zmian w ilości substancji badanej w czasie testu izotermicznego.

Do dalszej analizy danych eksperymentalnych wybrano model Prout-Tompkins'a. Krzywa rozkładu cilazaprilu ma charakterystyczny sigmoidalny kształt z wyróżnionymi okresami indukcji, przyspieszenia i wygasania reakcji.

Reakcja rozkładu w tym modelu kinetycznym charakteryzuje się dwoma parametrami: czasem indukcji i obserwowaną stałą szybkości reakcji wyznaczoną z danych doświadczalnych okresu przyspieszenia reakcji. Im dłuższy okres indukcji a wartość obserwowanej stałej szybkości rozkładu niższa, tym większą trwałością charakteryzuje się substancja.

Ocena wpływu zmiennej wilgotności powietrza ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 25,0 - 76,4 \%$)

Wilgoć przyczynia się do wzrostu ruchliwości i mobilności cząsteczek biorących udział w reakcji. [4]

Stąd też nie dziwi fakt, że rosnąca wilgotność powietrza destabilizuje trwałość cilazaprilu. Wraz z jej wzrostem rosną wartości obserwowanych stałych szybkości reakcji zgodnie z prostoliniową półlogarytmiczną zależnością

$$\ln k = (0,0358 \pm 0,0055) \cdot RH + (-13,5262 \pm 0,2309) \quad (10.1)$$

o współczynniku korelacji $r = 0,997$.

Ocena wpływu zmiennej temperatury ($T = 333 - 363 \text{ K}$, $RH = 76,4 \%$)

Zależność szybkości reakcji od temperatury wyraża równanie Arrhenius'a. W przypadku uzyskanych danych eksperymentalnych niniejsza zależność jest prostoliniowa.

Wyznaczona zależność Arrhenius'a ma postać

$$\ln k = (-20025,30 \pm 2500,26) \cdot \frac{1}{T} + (44,21 \pm 7,19) \quad (10.2)$$

a jej współczynnik korelacji jest bliski jedności ($r = -0,998$)

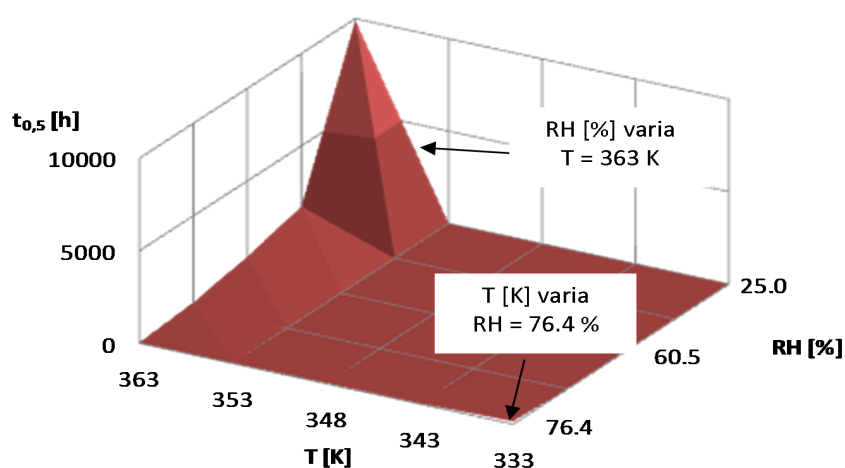
Z powyższego równania wyznaczono parametry aktywacji reakcji: Arrhenius'a oraz termodynamiczne.

Energia aktywacji reakcji rozkładu, która jest minimalną energią kinetyczną konieczną do wprowadzenia cząstek w stan aktywny, w którym są one zdolne do reakcji wynosi $E_a = 166,50 \pm 20,79 \text{ [kJ/mol]}$. Jej wartość dodatnia świadczy o tym, że reakcja rozkładu zachodzi szybciej, jeśli temperatura układu reagującego rośnie.

Współczynnik częstości A , który jest miarą liczby zderzeń cząstek umożliwiających zajście reakcji wynosi $1,59 \cdot 10^{19} \text{ [1/s]}$.

Entalpia aktywacji ma wartość $164,02 \pm 23,27 \text{ [kJ/mol]}$, natomiast entropia aktywacji $122,68 \pm 185,11 \text{ [J/(K} \cdot \text{mol)]}$.

Sprawdzono także, jak duży wpływ na trwałość cilazaprilu ma wrastająca temperatura i poziom wilgotności względnej powietrza poprzez analizę porównawczą zmian połowicznego czasu rozkładu cilazaprilu. Z RYCINY 10.3 wynika, że temperatura jest czynnikiem mniej wpływającym na trwałość cilazaprilu. Obniżenie temperatury nie podnosi tak drastycznie trwałości cilazaprilu, jak obniżenie poziomu wilgoci w powietrzu. To może świadczyć o fakcie, że właśnie woda w postaci wilgoci w powietrzu jest kluczowa dla nietrwałości cilazaprilu w fazie stałej.



RYCINA 10.3

Porównanie wpływu temperatury i wilgotności względnej powietrza na czas połowicznego rozkładu cilazaprilu w substancji.

Płaszczyzna trwałości cilazaprilu w substancji

Na podstawie półlogarytmicznych prostoliniowych zależności $f(RH) = \ln k$ oraz $f(1/T) = \ln k$ ustalono płaszczyznę rozkładu cilazaprilu w substancji. Jest to trójwymiarowa zależność między zlogarytmowaną obserwowaną stałą szybkości reakcji, odwrotnością temperatury i wilgotnością względną powietrza.

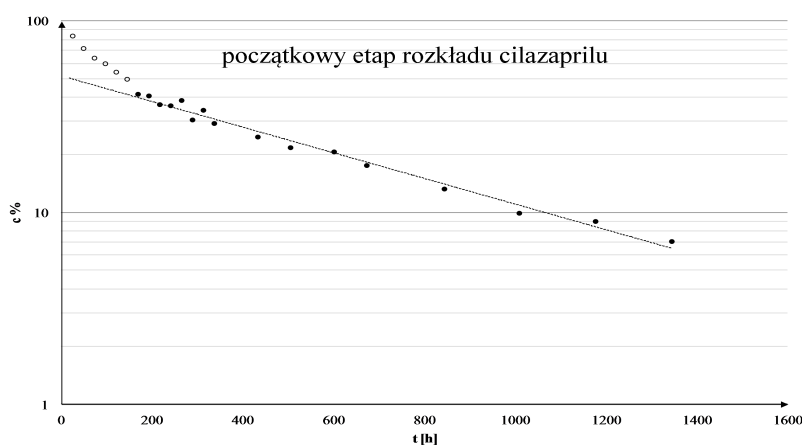
$$\ln k = 43,139 - 20537,9 \cdot \frac{1}{T} + 0,034 \cdot RH \quad (10.3)$$

Dzięki tej płaszczyźnie możliwe staje się przewidywanie szybkości przebiegu reakcji rozkładu cilazaprilu w fazie stałej w warunkach obecności wilgoci w powietrzu, kiedy znane są parametry przechowywania próbki tej substancji leczniczej (T i RH). Podsumowując jest to narzędzie pomocne w przewidywaniu trwałości cilazaprilu w substancji.

Przydatność płaszczyzny potwierdza analiza statystyczna, która wykazała brak różnic istotnych statystycznie stałych szybkości wyznaczonych eksperymentalnie z tymi obliczonymi.

Wilgotność względna powietrza = 0 %

Rozkład cilazaprilu w substancji w warunkach zerowej wilgotności względnej powietrza, czyli braku wilgoci w powietrzu nie przebiega zgodnie z modelem Prout-Tompkins'a. Krzywa rozkładu cilazaprilu nie ma charakterystycznego sigmoidalnego kształtu, lecz dwuwykładniczy. (RYCINA 10.4)



RYCINA 10.4

Rozkład cilazaprilu w substancji w zerowej wilgotności względnej powietrza ($T = 373\text{ K}$, $RH = 0\%$).

Obserwacja krzywej rozkładu a także wyniki procesu *model fitting* wskazują, że w końcowym etapie reakcji rozkład cilazaprilu zachodzi zgodnie z modelem kinetycznym reakcji pierwszego rzędu. Dane eksperymentalne początku reakcji degradacji cilazaprilu nie są tłumaczone tym modelem i ukazują złożoność reakcji rozkładu cilazaprilu w tych warunkach.

Podczas gdy w końcowym etapie cilazapril rozkłada się z szybkością reakcji k_2 , szybkość początkowego etapu jest sumą dwóch stałych szybkości rozkładu: wspomianej wcześniej k_2 , ale i k_1 obserwowanej tylko w etapie początkowym.

Obserwowane stałe szybkości rozkładu zostały obliczone z następujących zależności:

- k_2 z użyciem matematycznego kinetycznego modelu pierwszego rzędu reakcji rozkładu, natomiast
- k_1 z wykorzystaniem techniki odejmowania.

Ocena wpływu zmiennej temperatury ($T = 373 - 393 \text{ K}$, $RH = 0 \%$)

Degradacja cilazaprilu, opisana obydwoma szybkościami k_1 i k_2 zależy od temperatury, co wyrażają równania Arrhenius'a.

Wyznaczone prostoliniowe zależności Arrhenius'a mają postać

$$\ln k_1 = (-10551,48 \pm 1550,88) \cdot \frac{1}{T} + (15,55 \pm 4,06), \text{ gdzie } (r = -0,999) \quad (10.4)$$

$$\ln k_2 = (-13307,36 \pm 2517,01) \cdot \frac{1}{T} + (20,95 \pm 6,60), \text{ gdzie } (r = -0,998) \quad (10.5)$$

Z zależności powyższych wyznaczono parametry aktywacji reakcji: Arrhenius'a oraz termodynamiczne.

Wyznaczone energie aktywacji wynoszą odpowiednio $E_{a1} = 87,73 \pm 12,90$ [kJ/mol] i $E_{a2} = 110,64 \pm 20,93$ [kJ/mol]. Dodatnia wartość tego parametru świadczy o tym, że reakcja rozkładu zachodzi szybciej, jeśli temperatura układu reagującego rośnie.

Współczynniki częstotliwości wynoszą $A_1 = 5,67 \cdot 10^6$ [1/s] oraz $A_2 = 1,25 \cdot 10^9$ [1/s].

Entalpie aktywacji mają wartość $85,25 \pm 15,37$ [kJ/mol] oraz $108,17 \pm 23,41$ [kJ/mol], natomiast entropie aktywacji $-115,62 \pm 211,12$ [J/(K · mol)] oraz $-70,71 \pm 190,07$ [J/(K · mol)] odpowiednio dla rozkładu opisanego k_1 i k_2 .

Złożony model rozkładu cilazaprilu w zerowej wilgotności względnej powietrza może być prawdopodobnie wytłumaczony przez wodę, którą cilazapril posiada w formie zaabsorbowanej w swojej cząsteczce. Hipotetycznie obserwowana stała reakcji rozkładu k_1 dotyczy rozkładu tej części cilazaprilu, która jest rozpuszczona w jednocząsteczkowej warstwie wody obecnej na powierzchni substancji, natomiast k_2 jest stałą szybkości rozkładu procesu wolniejszego przebiegającego z udziałem pozostałych molekuł wody.

W literaturze w taki sposób tłumaczy się rozkład uwodnionych soli sodowych pochodnych penicylin w fazie stałej w zerowej wilgotności względnej powietrza, przebiegający również według powyżej opisanego modelu matematycznego. [43]

Podsumowując ocenę rozkładu cilazaprilu w substancji można stwierdzić, że ze względu na fakt, że zarówno temperatura, jak i wilgoć negatywnie wpływają na trwałość cilazaprilu, należy tą substancję leczniczą przechowywać w zamkniętych pojemnikach, unikając podwyższonych temperatur.

Dodatkowo, należy mieć na uwadze, że obecność i brak wilgoci w powietrzu wpływa

na zmianę kinetycznego mechanizmu rozkładu cilazaprilu.

Identyfikacja głównego produktu rozkładu cilazaprilu w substancji

Identyfikacja produktu rozkładu została przeprowadzona równoległe metodami HPLC-MS oraz IR.

Widma mas produktu rozkładu, charakteryzują się pasmami $[M - H^+]^-$ o $m/z = 388$ oraz $[M + Na^+]^+$ o $m/z = 412$, które wskazują na związek o masie cząsteczkowej 389 u. Natomiast zmiany położenia i wyglądu pasm widm IR sugerują zachodzącą podczas rozkładu cilazaprilu reakcję deestryfikacji. Powyższe dane są dowodem, na to, że produktem rozkładu reakcji jest cilazaprilat.

Reakcja hydrolizy jest powszechnie obserwowana w substancjach leczniczych posiadających w swojej budowie grupę estrową. Jednak w przypadku cilazaprilu, rozkład do cilazaprilatu w postaci leku jest niepożądany, gdyż ten drugi nie wchłania się z przewodu pokarmowego.

Porównanie trwałości cilazaprilu z innymi inhibitorami konwertazy angiotensyny o podobnej budowie

Grupa leków, jaką stanowią inhibitory konwertazy angiotensyny jest bardzo zróżnicowana pod względem budowy chemicznej.

Cilazapril należy do inhibitorów konwertazy, które po pierwsze są pro-lekami a po drugie ich biologicznie aktywna postać posiada dwie grupy karboksylowe.

Pod względem działania biologicznego cilazapril skuteczniej niż inne inhibitory konwertazy angiotensyny (enalaprilat, lisinopril, ramiprilat czy kaptopril) łączy się z enzymem docelowym, równocześnie dłużej zachowując stężenia terapeutyczne we krwi. [125]

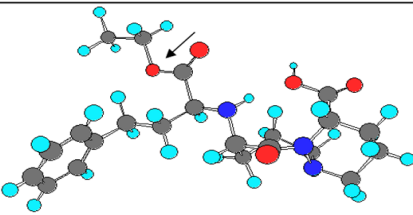
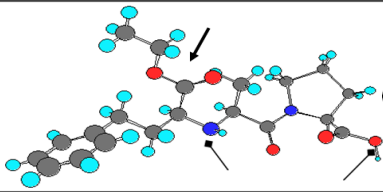
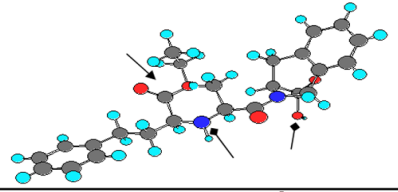
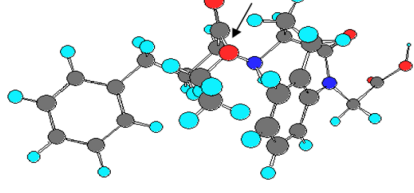
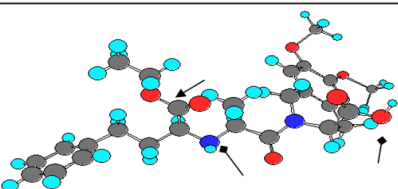
Bardziej korzystne efekty terapeutyczne cilazaprilu nie mają żadnego znaczenia dla trwałości leku. Jednak trwałość leku, pośrednio gwarantuje skuteczność terapii. Jest więc kluczowym aspektem końcowej efektywności danego leku.

Powyższe rozważania stały się punktem wyjścia do porównawczej analizy trwałości inhibitorów konwertazy angiotensyny o podobnej budowie chemicznej. Zestawiono ze sobą stabilność w fazie stałej pięciu związków:

- cilazaprilu jednowodnego
- maleinianu enalaprilu [67]
- chlorowodoru chinaprilu [126]

- chlorowodoru benazeprilu [127]
- chlorowodoru mokseprilu [128].

Porównanie dotyczyło kinetyki i mechanizmów reakcji (RYCINA 10.5) a także energii aktywacji niezbędnej do zapoczątkowania reakcji rozkładu, parametru, którego wysoka wartość świadczy o większej trwałości chemicznej związku (RYCINA 10.6).

Struktura cząsteczki	Opis reakcji rozkładu
	Cilazapril jednowodny Hydroliza (\longrightarrow) Reakcja autokatalityczna
	Enalapril maleinian Cyklizacja (\longrightarrow) i hydroliza Reakcja autokatalityczna
	Chinapril HCl Cyklizacja i hydroliza Reakcja pierwszego rzędu
	Benazepril HCl Hydroliza Reakcja pierwszego rzędu
	Moksepril HCl Cyklizacja i hydroliza Reakcja pierwszego rzędu

RYCINA 10.5

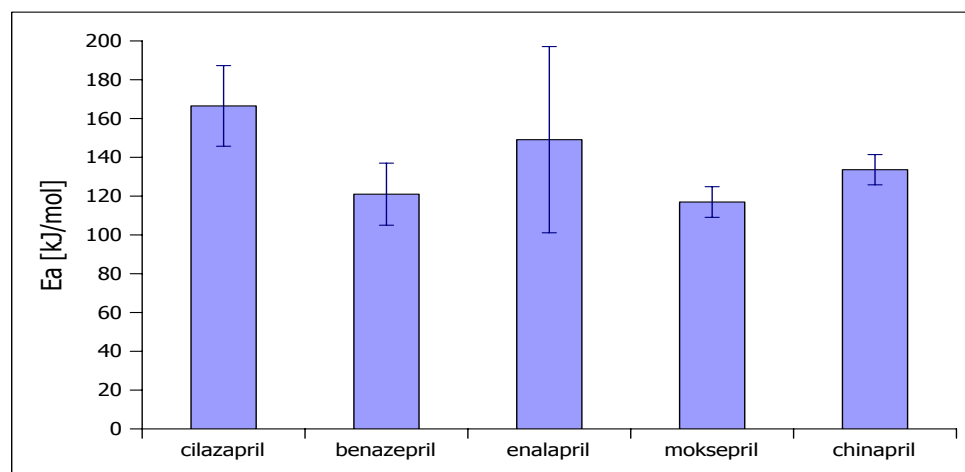
Porównanie kinetyki i mechanizmów rozkładu dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny, gdzie strzałki oznaczają prawdopodobne miejsca reakcji rozkładu.

Reakcje rozkładu obserwowane u poddanych porównaniu inhibitorów konwertazy angiotensyny były dwójakiego rodzaju: hydroliza i wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja.

Hydroliza w każdym przypadku prowadzi do powstania -prilatu, postaci biologicznie aktywnej, lecz niewchłanianej z przewodu pokarmowego. Cyklizacja skutkuje zniszczeniem struktury chemicznej inhibitora i wytworzeniem pochodnej diketopiperazyny. [4]

Na szczególną uwagę zasługują cilazapril i benazepril, w przypadku których jedyną reakcją rozkładu jest hydroliza. Brak wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w obu przypadkach można wytłumaczyć budową tych związków. Siedmioatomowy bi-cykliczny pierścień zamyka w sobie amidową grupę karbonylową i grupę karboksylową, które w innych inhibitorach uczestniczą w reakcji cyklizacji.

Stabilna budowa chemiczna ma wpływ na energię aktywacji reakcji rozkładu, która dla cilazaprilu jest największa w całym analizowanym szeregu inhibitorów.



RYCINA 10.6

Porównanie energii aktywacji reakcji rozkładu w fazie stałej dikarboksylowych enzymów konwertazy angiotensyny.

Ocena wpływu substancji pomocniczych na trwałość cilazaprilu

(ROZDZIAŁ 6, strona 89)

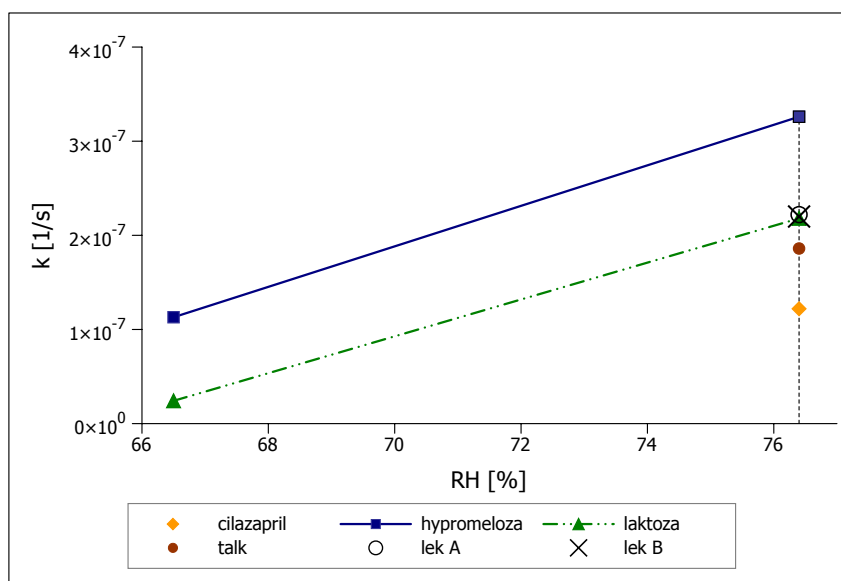
Każda postać leku zawiera w sobie oprócz substancji biologicznie czynnych substancje pomocnicze. Choć historycznie są uważane za inertne, w rzeczywistości zdarza się, że wchodzi w interakcje z substancją leczniczą. Interakcje mogą być rzeczywistymi reakcjami chemicznymi, w których biorą udział grupy funkcyjne związków i tworzy się produkt. Mogą też przebiegać w formie wpływu na szybkość reakcji rozkładu - w dwojaki sposób - przyspieszać ją i zwalniać. [84, 85, 129]

Wpływ substancji pomocniczych stosowanych w preparatach handlowych z cilazaprilem na jego trwałość zbadano w mieszaninach modelowych sporządzonych w wagowym stosunku ilościowym 1:1, w celu zmaksymalizowania prawdopodobieństwa wystąpienia interakcji.

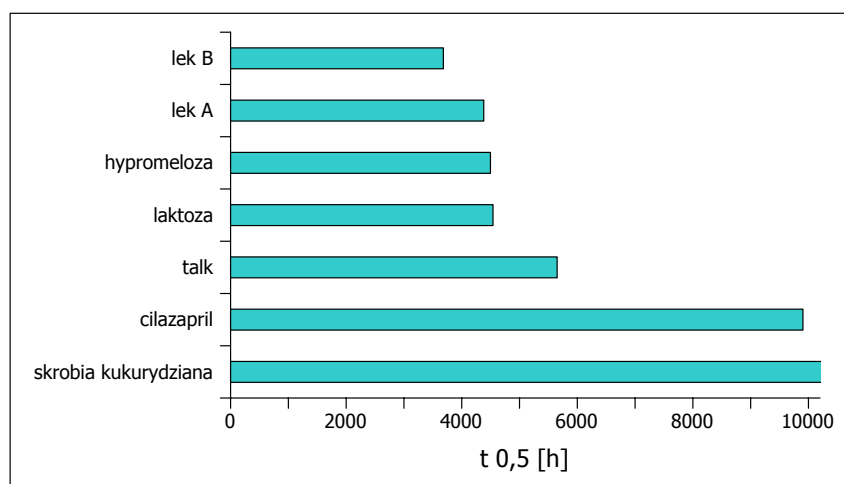
Wyniki badań ukazują, że hypromeloza, laktoza i talk przyspieszają reakcje rozkładu cilazaprilu, jednocześnie nie wpływając na mechanizm kinetyczny reakcji i produkt rozkładu, które pozostają takie same, jak w przypadku cilazaprilu *w substancji*. (RYCINA 10.7)

Dodatkowo rosnąca wilgotność względna powietrza wpływała na przyspieszenie rozkładu cilazaprilu w mieszaninach modelowych.

Celem zwiększenia trwałości układu, jaki stanowi postać leku z cilazaprilem, należy opracować taką postać leku, w której użyte są substancje pomocnicze nie wykazujące interakcji z cilazaprilem. Zamiast hypromelozy, jako środka wiążącego można zastosować kopowidon, którego stabilizujące działanie zostało udowodnione w patentach [5, 101]. Rezultaty badań wskazują także na konieczność zastąpienia substancji wypełniającej (laktozy) oraz poślizgowej (talku).



(a)



(b)

RYCINA 10.7

Porównanie (a) stałych szybkości reakcji rozkładu ($T = 333\text{ K}$ i RH rosnących) oraz (b) okresów połowicznego rozkładu cilazaprilu w substancji, mieszaninach modelowych z substancjami pomocniczymi i tabletkach leku A i B.

Jedyną substancją, która wpływała stabilizująco na trwałość cilazaprilu jest skrobia

kukurydziana. Poprawa trwałości może wiązać się ze zdolnością skrobi do zmiatania wilgoci z substancji [84], co szczególnie jest ważne dla substancji wrażliwych na wilgoć a właśnie taką substancją jest cilazapril.

Ocena trwałości cilazaprilu w tabletkach handlowych

(ROZDZIAŁ 7, strona 118)

Cilazapril w tabletkach leku oryginalnego A i generycznego B w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza i temperatury rozkłada się według tego samego kinetycznego mechanizmu rozkładu, co cilazapril *w substancji*. Do wyznaczenia stałych szybkości reakcji dla okresów przyspieszenia także w tym przypadku posłużono się metodą Prout-Tompkins'a.

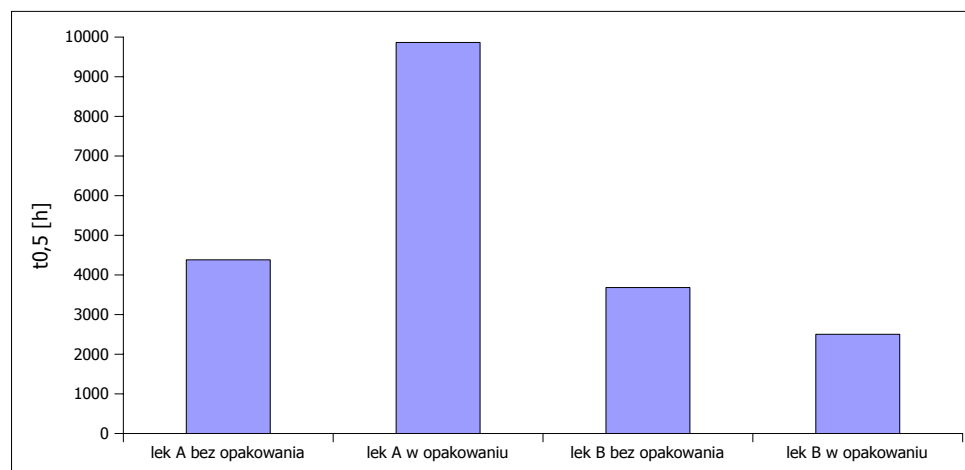
Cilazapril zarówno w leku A jak i B rozkłada się szybciej niż ma to miejsce w substancji czystej. (RYCINA 10.7)

Fakt ten wskazuje na to, że substancje pomocnicze, takie same w obu postaciach leku, użyte do sformułowania rdzenia przyspieszają rozkład cilazaprilu w takim samym stopniu.

Różnice dotyczą długości trwania okresu indukcji. Podczas gdy w leku A jest on zbliżony do tegoż okresu dla cilazaprilu w substancji, dla leku B jest on niemalże dziesięciokrotnie krótszy, co jest niekorzystnym zjawiskiem dla trwałości leku. Inny skład otoczki leku B przypuszczalnie tłumaczy obserwowane zjawisko.

Dane eksperymentalne pozwalają na ciekawe spostrzeżenie, że obserwowane stałe szybkości rozkładu leku A i B są zbliżone do tych uzyskanych w mieszaninie modelowej cilazaprilu z laktozą. Powyższy fakt można tłumaczyć składem tabletki, otóż laktoza jako wypełniacz stanowi największą część jej masy.

Opakowanie handlowe, którym dla obu postaci leku jest blister OPA/Alu/PVC chroni postaci leku przed rozkładem jedynie w leku A, w leku B w zastosowanych warunkach testu izotermicznego nie zanotowano różnic w trwałości leku w opakowaniu handlowym.



RYCINA 10.8

Porównanie okresów połowicznego rozkładu cilazaprilu w tabletkach leku A i B bez oraz w opakowaniu handlowym $T = 333\text{ K}$, $RH = 76,4\%$).

Ocena wpływu hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu

(ROZDZIAŁ 8, strona 152)

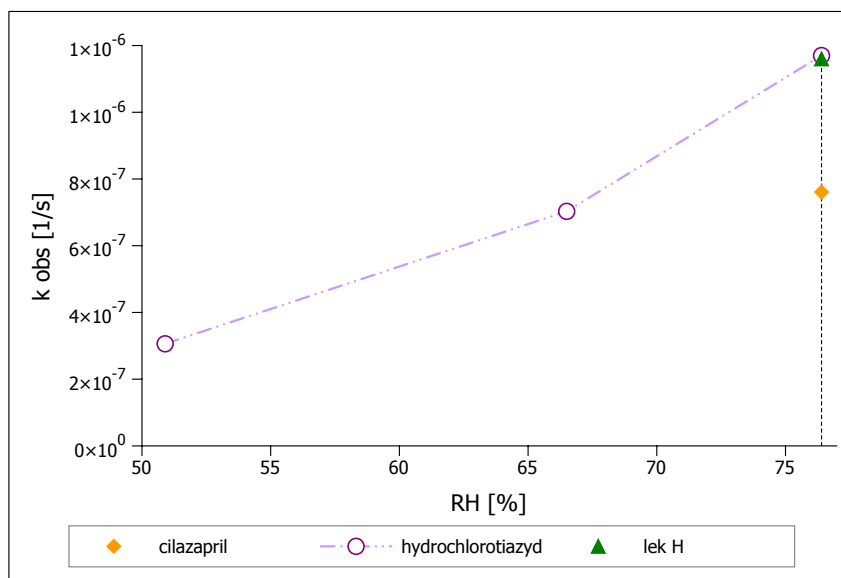
Hydrochlorotiazyd współwystępuje z cilazapilem w tabletkce leku złożonego stosowanego w terapii nadciśnienia tętniczego. Dodatkowa substancja biologicznie czynna w postaci leku tak samo, a może nawet bardziej, ze względu na skomplikowaną budowę chemiczną i mnogość grup funkcyjnych może wchodzić w interakcje z cilazapilem.

Wpływ hydrochlorotiazydu na trwałość cilazaprilu zbadano w mieszaninach modelowych sporządzonych w ilościowym stosunku wagowym 5 : 12,5 (cilazapril:hydrochlorotiazyd) stosowanym w handlowych preparatach oraz tabletkach leku H.

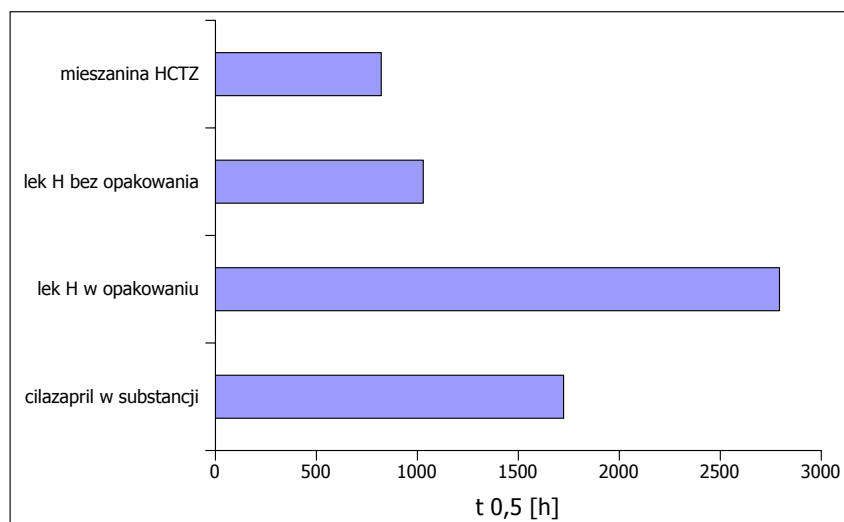
Wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że hydrochlorotiazyd zarówno w mieszaninie modelowej, jak i w tabletkach przyspiesza reakcję rozkładu cilazaprilu, nie wpływa jednak na mechanizm kinetyczny reakcji i produkt rozkładu, które pozostają takie same, jak w przypadku cilazaprilu *w substancji*.

Rosnąca wilgotność powietrza wpływała na przyspieszenie rozkładu cilazaprilu w mieszaninie modelowej z hydrochlorotiazydem. Dlatego tak jak w przypadku cilazaprilu *w substancji* oraz w mieszaninach modelowych z substancjami pomocniczymi należy chronić to połączenie substancji leczniczych przez wilgocią i przechowywać w szczelnie zamkniętych pojemnikach. (RYCINA 10.9)

Opakowanie handlowe, jakie stanowi blister OPA/Alu/PVC stabilizuje i zapewnia zwiększoną trwałość dla cilazaprilu zawartego w leku H.



(a)



(b)

RYCINA 10.9

Porównanie (a) stałych szybkości reakcji rozkładu ($T = 343\text{ K}$ i RH rosnących) oraz (b) okresów połowicznego rozkładu cilazaprilu w substancji, mieszaninie modelowej z hydrochlorotiazydem i tabletkach leku H.

Ocena trwałości cilazaprilu w zawiesinach pediatrycznych

(ROZDZIAŁ 9, strona 178)

Ze względu na fakt, że cilazapril używany jest w leczeniu populacji pediatrycznej, przygotowano zawiesinę z cilazaprilem według przepisu.

Rp.

Cilazaprilum 100 mg
Ora-Blend ad 100 ml

M. f. Mixturae

S. Zmieszać przed użyciem

Zawiesina jest prosta w przygotowaniu, co może okazać się przydatne podczas terapii. Dodatkowo będzie chętnie przyjmowana przez pacjentów, gdyż ma przyjemny słodko-owocowy smak i ładną konsystencję.

Przeprowadzone badania trwałości ($T = 298\text{ K}$, $t = 4$ tygodnie) nie wykazały zmian: w zawartości cilazaprilu w zawiesinie (odzysk mieścił się w kryterium akceptacji $100 \pm 5\%$) oraz właściwościach reologicznych zawiesin bez względu na użyte opakowanie (szkło lub PET).

Płynna postać leku z cilazaprilem i jej udowodniona czterotygodniowa trwałość może przyczynić się do ułatwienia terapii pacjentów pediatrycznych, którzy nie mogą przyjmować tabletek.

11

Wnioski

1. Zwaliowana metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV jest przydatna do oceny trwałości cilazaprilu w fazie stałej. Charakteryzuje się selektywnością względem cilazaprilu, liniowością, dokładnością oraz precyzją. Metoda może być z powodzeniem stosowana do kontroli trwałości cilazaprilu w postaci *substancji*, tabletek i zawiesin pediatrycznych.
2. Cilazapril w fazie stałej w obecności wilgoci w powietrzu rozkłada się zgodnie z mechanizmem kinetycznym reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu, który matematycznie opisuje równanie Prout-Tompkins'a. Rozkład charakteryzuje się okresem indukcji, przyspieszenia i wygasania reakcji.
3. W warunkach braku wilgoci w powietrzu cilazapril rozkłada się dwuetapowo. Pierwszy etap jest szybki, składają się na niego dwie szybkości reakcji (k_1 , k_2). Natomiast drugi wolniejszy (tylko k_2) zachodzi się zgodnie z kinetycznym mechanizmem rozkładu pierwszego rzędu.
4. Głównym produktem rozkładu cilazaprilu jest cilazaprilat, który powstaje w wyniku deestryfikacji związku macierzystego.
5. Rosnąca wilgotność względna powietrza oraz temperatura wpływa negatywnie na trwałość cilazaprilu. Podczas przechowywania i produkcji postaci leku należy chronić substancje przed wyżej wymienionymi czynnikami środowiskowymi.
6. Substancje pomocnicze stosowane do formułowania tabletki komercyjnej wchodzi w interakcję z cilazaprilem. W mieszaninach modelowych (1 : 1 w/w) hypromeloza > laktoza > talk katalizują reakcję rozkładu przyspieszając ją zgodnie z przedstawionym powyżej szeregiem. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na przyspieszenie rozkładu jest wzrost wilgotności względnej powietrza. Jedyną substancją, która działa stabilizująco na trwałość cilazaprilu jest skrobia kukurydziana.
7. Cilazapril w preparatach handlowych (tabletkach) charakteryzuje się obniżoną trwałością w porównaniu z cilazaprilem *w substancji*, co można wytłumaczyć interakcjami z substancjami pomocniczymi i destabilizującym wpływem procesu produkcji.
8. Interakcja cilazaprilu z laktozą, będąca substancją wypełniającą tabletki (60 % masy tabletki) najprawdopodobniej warunkuje szybkość rozkładu cilazaprilu w tej postaci leku.
9. Opakowanie handlowe jakie stanowi trójwarstwowy laminat OPA/Alu/PVC zapewnia ochronę postaci leku przed czynnikami zewnętrznymi tylko w przypadku leku oryginalnego. Dzięki niemu reakcje degradacji ulegają spowolnieniu.

10. Hydrochlorotiazyd współwystępujący z cilazaprilem w leku złożonym zarówno w mieszaninie modelowej (5 : 12,5 w/w) jak i handlowej postaci farmaceutycznej wpływa na przyspieszenie reakcji degradacji w porównaniu z cilazaprilem *w substancji*.
11. Zawiesiny pediatryczne (1 mg/ml) cilazaprilu w *vehiculum* Ora-Blend są trwałe podczas czterotygodniowego przechowywania w temperaturze 298 K w butelkach zamkniętych wykonanych ze szkła lub PET. Bez względu na zastosowany materiał opakowaniowy nie wykazano znaczących zmian w stężeniu cilazaprilu, pH i lepkości zawiesin.

Streszczenie

TRWAŁOŚĆ CILAZAPRILU W FAZIE STAŁEJ

Celem niniejszej pracy było zbadanie trwałości cilazaprilu w fazie stałej z uwzględnieniem wpływu zmiennej temperatury, wilgotności względnej powietrza, substancji pomocniczych użytych do formulacji tabletki, materiału opakowaniowego oraz hydrochlorotiazydu współwystępującego z cilazaprilem w leku złożonym. Cilazapril *w substancji* oraz mieszaninach modelowych poddano eksperymentom kinetycznym metodą testu izotermicznego. Analizy ilościowej cilazaprilu dokonano z wykorzystaniem opracowanej i zwalidowanej metody HPLC z detekcją UV.

Analiza identyfikacyjna (IR, HPLC-MS) daje dowody, że cilazapril *w substancji* ulega rozkładowi do cilazaprilatu w mechanizmie deestryfikacji. Jest to zjawisko o tyle niekorzystne, że powstający cilazaprilat, choć jest aktywny biologicznie, nie wchłania się z przewodu pokarmowego.

Kinetyczne mechanizmy rozkładu cilazaprilu w fazie stałej różnią się w zależności od obecności i nieobecności wilgoci w powietrzu.

W warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza cilazapril rozkłada się zgodnie z mechanizmem kinetycznym reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Krzywa rozkładu cilazaprilu ma charakterystyczny sigmoidalny kształt z wyróżnionymi okresami indukcji, przyspieszenia i wygasania reakcji. Matematyczny opis reakcji rozkładu stanowi równanie Prout-Tompkins'a ($f(t) = \ln \frac{c}{c_0 - c}$), z którego wyznacza się parametry kinetyczne. Ocena wpływu czynników fizycznych wykazała, że rozkład cilazaprilu *w substancji* przyspieszany jest zarówno poprzez wzrost otaczającej temperatury, jak i wilgotności względnej powietrza, przy czym wilgoć ma większe znaczenie niż temperatura i jest podstawowym czynnikiem determinującym rozkład. Dlatego też w celu zwiększenia trwałości, cilazapril należy przechowywać w szczelnie zamkniętych pojemnikach, unikając wysokich temperatur.

W zerowej wilgotności względnej powietrza obserwowano zmianę mechanizmu kinetycznego reakcji rozkładu. W tym przypadku degradacja cilazaprilu zachodzi dwuetapowo. Krzywa rozkładu ma kształt dwu wykładniczy. Pierwszy etap jest szybki a obserwowana stała szybkości (k') reakcji jest wypadkową procesów o dwóch szybkościach rozkładu (k_1, k_2). Natomiast następujący po nim etap drugi zachodzi zgodnie z mechanizmem reakcji pierwszego rzędu ($f(t) = \ln c$). Z powyższego równania stosując metodę "odejmowania" wyznacza się parametry kinetyczne. Wzrost temperatury układu, także w tym przypadku, prowadzi do zwiększenia obserwowanych wartości stałych szybkości reakcji.

Substancje pomocnicze używane do produkcji tabletek z cilazaprilem wpływają na

jego trwałość w dwojaki sposób. Hypromeloza, laktoza i talk, wchodzi w interakcję z cilazapilem, powodując przyspieszenie jego reakcji rozkładu. Z tego względu, w celu podniesienia trwałości cilazaprilu w preparatach farmaceutycznych, należałoby stosować je w ilościach minimalnych lub rozważyć ich zamianę na inne substancje o udowodnionym stabilizującym działaniu. Jedyną substancją, która wpływała stabilizująco na trwałość cilazaprilu jest skrobia kukurydziana. Przypuszcza się, że wzrost trwałości w tym przypadku wiąże się ze zdolnością tej substancji pomocniczej do zmiatania wilgoci.

Interakcje z substancjami pomocniczymi oraz proces produkcji tabletek, którym jest granulacja na mokro przyczyniają się do niskiej trwałości cilazaprilu w tabletkach. Trwałość cilazaprilu w dwóch zbadanych preparatach farmaceutycznych była niższa od tej obserwowanej *w substancji* oraz mieszaninach modelowych z substancjami pomocniczymi.

Hydrochlorotiazyd, który wraz z cilazapilem występuje w leku złożonym, także wchodzi z nim w interakcję. Przyspieszona zostaje także w tym przypadku reakcja rozkładu cilazaprilu zarówno w mieszaninie modelowej, jak i w tabletkach preparatu handlowego. Dodatkowo również rosnąca wilgotność powietrza wpływa na przyspieszenie rozkładu cilazaprilu w mieszaninie modelowej z hydrochlorotiazylem.

Ze względu na fakt, że cilazapril jest stosowany także w leczeniu schorzeń układu sercowo-naczyniowego u pacjentów pediatrycznych, przygotowano i następnie zbadano trwałość zawiesiny z cilazapilem. Charakteryzuje się ona łatwością sporządzenia oraz trwałością chemiczną podczas przechowywania w temperaturze pokojowej przez okres czterech tygodni.

Abstract

CILAZAPRIL STABILITY IN SOLID STATE

The presented study aimed at examination of cilazapril stability in solid state. To achieve the aim cilazapril was subjected to kinetic isothermal experiments. The influence of: various levels of temperature, air humidity, excipients present in marketed cilazapril tablets, packing material and hydrochlorothiazide, on cilazapril stability was evaluated. Quantitative analysis of cilazapril in samples was carried out by means of stability indicating, validated HPLC method with UV detection.

Identification analyses (IR, HPLC-MS) give undeniable evidence, that cilazapril degrades in the course of deesterification reaction forming cilazaprilat. This transformation has negative implications, since cilazaprilat, although biologically active, is not capable of being absorbed from gastrointestinal tract.

Kinetic mechanisms of degradation of cilazapril in solid state differ according to presence or absence of humidity in surrounding environment.

In the presence of air humidity cilazapril undergoes degradation according to the first order autocatalytic reaction. The sigmoid shape of degradation curve with clearly marked introduction, acceleration and decay period constitutes the evidence. Prout-Tompkins equation ($f(t) = \ln \frac{c}{c_0 - c}$) was applied to describe mathematically cilazapril decomposition and to determine kinetic parameters. It was also established that the decomposition process occurs more rapidly, while increasing, both, air humidity and temperature. However, the impact of air humidity is greater. Therefore, it is recommended to store cilazapril in low temperatures and hermetically closed containers.

On the other hand in the lack of moisture cilazapril decomposes in a different manner. The curve of cilazapril degradation is not sigmoidal, but two-exponential. As it results from analysis of experimental data cilazapril is decomposed according to the first-order kinetic model ($f(t) = \ln c$), but only in the terminal stage of decomposition. The initial stage observed reaction rate constant (k') is a resultant of two processes with different reaction rates (k_1, k_2). Kinetic parameters were calculated by means of 'feathering technique'. Also in this case, temperature elevation negatively affects cilazapril stability.

Excipients commonly used in cilazapril tablet formulations affect cilazapril stability. It was found that hypromellose, lactose and talc act as cilazapril destabilizing agents. In case of all mentioned above excipients degree of degradation was lower, while decreasing test humidity levels. Only maize starch stabilized cilazapril in excipient-drug mixture probably owing to a moisture scavenger properties. Hypromellose, lactose and talc negatively influence stability of cilazapril and if possible should used in minimum or substituted. Such action may provide more stable dosage form and avoid potency loss throughout

tablet shelf life.

Interactions of cilazapril with excipients and wet granulation process of tablet production contribute to the lowest stability of cilazapril in marketed pharmaceutical formulations comparing with the results obtained, while studying cilazapril *in substance* or model in mixtures with excipients.

Hydrochlorothiazide is biologically active substance, which is found together with cilazapril in fixed combination tablet formulation. Either, in this combination interaction occurs. The degradation reaction is accelerated in both, model mixture and marketed tablets. The air humidity also here acts as destabilizing agent.

Taking into consideration cilazapril application in the therapy of pediatric patients, the oral suspension was prepared. Stability examination pointed out, that cilazapril oral suspension is stable in closed containers throughout four weeks long storage at room temperature. Additionally it is easy to make from marketed pharmaceutical formulation.

Wykaz skrótów

α poziom istotności w testach statystycznych

γ szybkość ścinania

λ długość fali

τ naprężenie ścinające

A spektrofotometria klasyczna

A czynnik przedwykładniczy w zależności Arrhenius'a

A (lek) oryginalny preparat handlowy z cilazapilem

a współczynnik kierunkowy prostej

ABPM (ang. *ambulatory blood pressure monitoring*) całodobowe monitorowanie ciśnienia tętniczego

AT receptor angiotensynowy

b wyraz wolny prostej

B (lek) generyczny preparat handlowy z cilazapilem

BPF (ang. *bradykinin potentiating factor*) czynnik potęgujący działanie bradykininy

c stężenie

D spektrofotometria pochodnych widm

df stopnie swobody w testach statystycznych

DL (ang. *detection limit*) granica wykrywalności

E_a energia aktywacji reakcji

h stała kwantowa Planck'a

H (mieszanina) mieszanina modelowa cilazaprilu z hypromelozą

H (lek) preparat handlowy cilazaprilu z hydrochlorotiazylem

H_0 hipoteza zerowa testu statystycznego

H_1 hipoteza alternatywna testu statystycznego

H_{akt} entalpia aktywacji reakcji

HCTZ (mieszanina) mieszanina modelowa cilazaprilu z hydrochlorotiazylem

HPLC (ang. *high performance liquid chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa

IPEC ang. *International Pharmaceutical Excipients Council*

IR (ang. *infrared spectroscopy*) spektroskopia w podczerwieni

IS (ang. *internal standard*) wzorzec wewnętrzny

k stała szybkości reakcji

K (**reologia**) konsystencja

k_B stała Boltzman'a

L (mieszanina) mieszanina modelowa cilazaprilu z laktozą

m masa odważki

m (**reologia**) wykładnik płynięcia

MS (ang. *mass spectroscopy*) spektroskopia mas

n liczba prób

OPA/Alu/PVC laminat trójwarstwowy z orientowanego poliamidu, aluminium i chloru poliwinylu

P pole powierzchni pod pikiem na chromatogramie

PAI (ang. *plasminogen activator inhibitor*) inhibitor aktywacji plazminogenu

PET poli(tereftalan etylenu)

QL (ang. *quantitation limit*) granica oznaczalności

r współczynnik korelacji

R uniwersalna stała gazowa

RAA renina-angiotensyna-aldosteron

RH wilgotność względna powietrza

RP (ang. *reversed phase*) odwrócone fazy

rpm (ang. *revolutions per minute*) obroty na minutę

S odchylenie standardowe pojedynczego wyniku

S (mieszanina) mieszanina modelowa cilazaprilu ze skrobią kukurydzianą

S_a odchylenie standardowe współczynnika kierunkowego prostej

S_{akt} entropia aktywacji reakcji

S_b odchylenie standardowe wyrazu wolnego prostej

S_y odchylenie standardowe punktu od prostej

t czas trwania testu kinetycznego

$t_{0,5}$ okres połowicznego rozkładu

t (**statystyka**) wartość statystyki (test t-Studenta)

T temperatura

T (mieszanina) mieszanina modelowa cilazaprilu z talkiem

UV (ang. *ultraviolet*) promieniowanie nadfioletowe

V współczynnik rozcieńczeń

v/v ilościowy stosunek objętościowy

w/w ilościowy stosunek wagowy

W_z współczynnik zmienności

Bibliografia

- [1] V.L. Allen. Dosage form design and development. *Clin Ther*, 30(11):2102–2111, 2008.
- [2] C. T. Rhodes i wsp. *Drug stability. Principles and practices*. Marcel Dekker, 2000.
- [3] M. Zając i wsp. *Ocena jakości substancji leczniczych i preparatów farmaceutycznych według wymagań farmakopealnych i ICH*. Wydawnictwo Kontekst, Poznań, 2000.
- [4] S. R. Byrn i wsp. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. *Adv Drug Deliver Rev*, 48:115–136, 2001.
- [5] M. Fox. Stable formulation comprising moisture sensitive drug/s and manufacturing procedure of thereof. *United States Patent Application Publication*, (US 2007/0281000A1), 2007.
- [6] Karta charakterystyki leku B.
- [7] Karta charakterystyki leku A.
- [8] K. Grabańska i wsp. Miejsce leczenia nefarmakologicznego w prewencji i terapii nadciśnienia tętniczego. *Forum Zaburzeń Metabolicznych*, 1(2):115–122, 2010.
- [9] A. Prejbisz i wsp. *Leki złożone*. Medical education, Warszawa, 2012.
- [10] R. Cikova. The burden of hypertension and inadequate control in populations. *J Hypertens*, 24:807—809, 2006.
- [11] T.J. Wang i wsp. Epidemiology of uncontrolled hypertension in the United States: Contemporary reviews in cardiovascular medicine. *Circulation*, 112:1651–1662, 2005.

- [12] T. Zdrojewski i wsp. Rozpowszechnienie głównych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego w Polsce. Wyniki badania NATPOL PLUS. *Kardiolog Pol*, 61(Suplement4):5–26, 2004.
- [13] H. Redwood. Hypertension, society, and public policy. *Eur Heart J Suppl*, 9(SupplementB):B13–B18, 2007.
- [14] I.A. Bhutto. Effect of cilazapril on the retinal vessels in spontaneously hypertensive rats: corrosion cast and scanning electron microscopic study. *Life Sci*, 64(3):27–39, 1999.
- [15] L. Paulis i wsp. Novel therapeutic targets for hypertension. *Nat Rev Cardiol*, 7:431–441, 2010.
- [16] M. Circelli i wsp. Efficacy and safety of delapril/indapamide compared to different ACE-inhibitor/hydrochlorothiazide combinations: a meta-analysis. *Int J Gen Med*, 5:725–734, 2012.
- [17] A. Tykarski i wsp. Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym - 2011 rok. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego - próba komentarza na temat zmian i ich zasadności. *Nadciśn Tętn*, 15(4):211–235, 2011.
- [18] J.C. Song i wsp. Selective pharmacodynamics of new angiotensin converting enzyme inhibitors an update. *Clin Pharmacokinet*, 41(3):207–224, 2002.
- [19] J. Larsen i wsp. Adaptive changes in the acute haemodynamic effects of cilazapril during chronic treatment comparison with long-term clinical effect. *Eur J Clin Pharmacol*, 50:433–441, 1996.
- [20] S. H. Ferreira. Angiotensin converting enzyme: history and relevance. *Semin Perinatol*, 24(1):7–10, 2000.
- [21] C.G. Smith i wsp. The discovery of captopril. *FASEB J*, 17(8):788–798, 2003.
- [22] E. Ritz i wsp. *Leki hamujące aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron w chorobach serca, naczyń i nerek*. Medycyna Praktyczna, Kraków, 2010.
- [23] S.J. Cleland i wsp. The renin-angiotensin system and the heart: a historical review. *Heart*, 76:7–12, 1996.
- [24] M. Bogdan i wsp. Odkrycie inhibitorów konwertazy angiotensyny – historia sukcesu. *Cardiovascular Forum*, 12(3-4):96–104, 2007.
- [25] D.W. Cushman i wsp. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*, 17(4):588–592, 1991.

- [26] D.W. Cushman i wsp. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nat Med*, 5(10):1110–1112, 1999.
- [27] A. Januszewicz i wsp. *Inhibitory konwertazy angiotensyny w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego*. Medycyna Praktyczna, Kraków, 2005.
- [28] M. Sramko i wsp. Thermodynamics of binding of angiotensin-converting enzyme inhibitors to enzyme active site model. *J Mol Struc-THEOCHEM*, 869:19–28, 2008.
- [29] The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 25:1454–1470, 2004.
- [30] M Holecki i wsp. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors beyond lowering blood pressure – are they important for doctors? *Pharmacol Rep*, 63:740–751, 2011.
- [31] L. H. Opie. *Inhibitory konwertazy angiotensyny. Postęp trwa*. Via Medica, Gdańsk, 2000.
- [32] A. Schneeweiss. Cardiovascular drugs in children. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in pediatric patients. *Pediatr Cardiol*, 11:199–207, 1990.
- [33] B. Pitt. Effect of ACE inhibitors on endothelial dysfunction: unanswered questions and implications for further investigation and therapy. *Cardiovasc Drug Ther*, 10(4):469–473, 1996.
- [34] M. Fukuzawa i wsp. Angiotensin enzyme inhibitors suppress production of tumor necrosis factor - a in vitro and in vivo. *Immunopharmacology*, 36:49–55, 1997.
- [35] K. Uchida i wsp. Effects of long-term cilazapril treatment on glucose and lipid metabolism in hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Ther*, 17(4):729–734, 1995.
- [36] H. Shionoiri i wsp. Effect of cilazapril therapy on glucose and lipid metabolism in patients with hypertension. *Clin Ther*, 17(6):1126–1135, 1995.
- [37] B. Waeber i wsp. Albuminuria in diabetes mellitus relation to ambulatory versus office blood pressure and effects of cilazapril. *Am J Hypertens*, 9:1220–1227, 1996.
- [38] M. Yoshiyama i wsp. Effect of cilazapril on ventricular remodeling assessed by doppler-echocardiographic assessment and cardiac gene expression. *Cardiovasc Drug Ther*, 12:57–70, 1998.

- [39] A. Bernadette i wsp. Dechallenge and rechallenge method showed different incidences of cough among four ACE-Is. *J Clin Epidemiol*, 60:547–553, 2007.
- [40] T. Takahashi i wsp. The ACE gene polymorphism and cough threshold for capsaicin after cilazapril usage. *Respir Med*, 95:130–135, 2001.
- [41] M.R. Attwood. Chemical design of cilazapril. *Br J Clin Pharmacol*, 27:133S–137S, 1989.
- [42] A. Niklas i wsp. Biblioteka czasopisma nadciśnienie tętnicze - cilazapril. Gdańsk, 2009.
- [43] E. Pawełczyk i wsp. *Podstawy trwałości leków*. PZWL, Warszawa, 1982.
- [44] J.A. Adamovics. *Chromatographic analysis of pharmaceuticals*. Marcel Dekker, New York, 1997.
- [45] ICH Expert Working Group. Validation of analytical procedures: text and methodology. *ICH*, 2005.
- [46] J. Ermer i wsp. *Method validation in pharmaceutical analysis. A guide to best practice*. Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [47] J. Pawlaczyk i wsp. *Walidacja metod analizy chemicznej*. Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań, 2005.
- [48] A. Lemańczyk. *Statystyka... w pigułce*. Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań, 2008.
- [49] H. Tanaka i wsp. Enzyme immunoassay discrimination of a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, cilazapril, and its active metabolite. *J Pharm Sci*, 76(3):224–227, 1987.
- [50] H.-W. Lee i wsp. A liquid chromatography/positive ion tandem mass spectrometry method for the determination of cilazapril and cilazaprilat in human plasma. *Talanta*, 71:62–67, 2007.
- [51] J.A. Prieto i wsp. Quantitative determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril and its active metabolite cilazaprilat in pharmaceuticals and urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J Chromatogr B*, 714(2):285–292, 1998.
- [52] J. A. Prieto i wsp. Determination of the antihypertensive drug cilazapril and its active metabolite cilazaprilat in pharmaceuticals and urine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with photometric detection. *J Chromatogr B*, 754(1):23–34, 2001.

- [53] J.A. Prieto i wsp. Capillary zone electrophoresis applied to the determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril and its active metabolite in pharmaceuticals and urine. *J Chromatogr A*, 916:279–288, 2001.
- [54] Z. Vujic i wsp. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide, cilazapril and its active metabolite cilazaprilat in urine by gradient RP-LC. *Chromatographia*, 70(7/8):1221–1225, 2009.
- [55] Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. *Farmakopea Polska VII*. Farmakopea, Warszawa, 2008.
- [56] H.Y. Aboul-Enein i wsp. Biosensor for enantioselective analysis of S-cilazapril, S-trandolapril, and S-pentopril. *Pharm Dev Technol*, 4(2):251–255, 1999.
- [57] U. Tamer i wsp. Voltammetric determination of cilazapril in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 29:43–50, 2002.
- [58] N. Erk i wsp. Simultaneous determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by spectrophotometric methods. *Anal Lett*, 29:1963–1974, 1996.
- [59] N. Erk. Determination of active ingredients in the pharmaceutical formulations containing hydrochlorothiazide and its binary mixtures with benazepril hydrochloride, triamterene, and cilazapril by ratio spectra derivative spectrophotometry and vierordt's method. *J Pharm Biomed Anal*, 20:155–167, 1999.
- [60] E. Dinc i wsp. Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods. *J Pharm Biomed Anal*, 30:715–723, 2002.
- [61] S. Hillaert i wsp. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several inhibitors of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 924:439–449, 2001.
- [62] D. Kowalczyk i wsp. Development and validation of HPTLC-densitometric method for determination of ACE inhibitors. *Chromatographia*, 60:245–249, 2004.
- [63] J.A. Prieto i wsp. Square wave voltammetric determination of the angiotensin converting enzyme inhibitors cilazapril, quinapril and ramipril in pharmaceutical formulations. *Farmaco*, 58:343–350, 2003.
- [64] A. Gumieniczek i wsp. Determination of benazepril and cilazapril in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr R T*, 20:2135–2142, 1997.

- [65] S. Hillaert i wsp. Optimization of capillary electrophoretic separation of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J Chromatogr A*, 895:33–42, 2000.
- [66] S. Hillaert i wsp. Optimisation by experimental design of a capillary electrophoretic method for the separation of several inhibitors of angiotensin-converting enzyme using alkylosulphonates. *J Chromatogr A*, 978:231–242, 2002.
- [67] B. Stanisz. Evaluation of stability of enalapril maleate in solid phase. *J Pharm Biomed Anal*, 31:375–380, 2003.
- [68] H. Saito i wsp. *Antihypertensive drugs today*. VSP, Utrecht, Tokyo, 1992.
- [69] X.-Z. Qin i wsp. Simultaneous determination of enalapril, felodipine and their degradation products in the dosage formulation by reversedphase high-performance liquid chromatography using a spherisorb c8 column. *J Chromatogr A*, 707:245–254, 1995.
- [70] R.F. Venn. *Principles and practice of bioanalysis*. Taylor and Francis Group, 2000.
- [71] S.R. Byrn i wsp. Solid-state pharmaceutical chemistry. *Chem Mater*, 6:1148–1158, 1994.
- [72] S. Yoshioka i wsp. *Stability of drugs and dosage forms*. Kulwer Academic Publishers, 2002.
- [73] M. M. Al-Omari i wsp. Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 25:893–902, 2001.
- [74] L. Gu i wsp. Drug-excipient incompatibility studies of the dipeptide angiotensin-converting enzyme inhibitor, moexipril hydrochloride: dry powder vs wet granulation. *Pharm Res*, 7(4):379–383, 1990.
- [75] F. Rodante i wsp. Kinetic analysis of thermal decomposition for penicillin sodium salts: model-fitting and model-free methods. *J Pharm Biomed Anal*, 29:1031–1043, 2002.
- [76] A. Khawam i wsp. Basics and applications of solid-state kinetics: a pharmaceutical perspective. *J Pharm Sci*, 95(3):472–498, 2006.
- [77] P.W. Atkins. *Chemia fizyczna*. PWN, Warszawa, 2001.
- [78] A. Khawam i wsp. Solid-state kinetic models: basics and mathematical fundamentals. *J Phys Chem B*, 110(35):17315–17328, 2006.
- [79] IPEC. *The IPEC excipient composition guide*, 2009.

- [80] G. Pifferi i wsp. Quality and functionality of excipients. *Farmaco*, 54:1–14, 1999.
- [81] S. K. Niazi. *Handbook of pharmaceutical manufacturing formulation*. CRC Press, 2004.
- [82] Z. Ahmad i wsp. Drug-excipient(s) interactions and compatibility study: A review. *J Pharm Res*, 3(9):2092–2095, 2010.
- [83] G. Pifferi i wsp. The safety of pharmaceutical excipients. *Farmaco*, 58:541–550, 2003.
- [84] S. S. Bharate i wsp. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *J Excipients and Food Chem*, 1(3):3–26, 2010.
- [85] P. J. Crowley. Excipients as stabilizers. *PSTT*, 2(6):237–243, 1999.
- [86] R.C. Rowe i wsp. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press, 2006.
- [87] C.L. Li i wsp. The use of hypromellose in oral drug delivery. *JPP*, 57:533–546, 2005.
- [88] J. McMurry. *Chemia organiczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
- [89] S. Garnier i wsp. Influence of ageing, grinding and preheating on the thermal behaviour of alfa-lactose monohydrate. *Int J Pharm*, 361:131–140, 2008.
- [90] S. Janicki. *Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1998.
- [91] J. Swarbrick. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Informa healthcare, Nowy Jork, 2007.
- [92] C. Vemavarapu i wsp. Role of drug substance material properties in the processibility and performance of a wet granulated product. *Int J Pharm*, 374:96–105, 2009.
- [93] M. G. Herting i wsp. Studies on the reduction of tensile strength of tablets after roll compaction/dry granulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 70:372–379, 2008.
- [94] P. Kleinebudde. Roll compaction/dry granulation: pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Biopharm*, 58:317–326, 2004.
- [95] A. Faure i wsp. Process control and scale-up of pharmaceutical wet granulation processes. *Eur J Pharm Biopharm*, 52:269–277, 2001.

- [96] K. C. Waterman i wsp. Package selection for moisture protection for solid, oral drug products. *J Pharm Sci*, 99(11):4437–4451, 2010.
- [97] R. Pilchik. Pharmaceutical blister packaging. *Pharm Technol*, 24(11):68–78, 2000.
- [98] L. Muhlfeld i wsp. Influences of heat lacquer thickness on the quality of blister packages. *Eur J Pharm Sci*, 45:150–157, 2012.
- [99] K. Naversnik i wsp. Predicting drug hydrolysis based on moisture uptake in various packaging designs. *Eur J Pharm Sci*, 35:447–456, 2008.
- [100] Y. Chen i wsp. A new model of predicting moisture uptake by packaged solid pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 255:217–225, 2003.
- [101] M. Fox. Stable formulation comprising a moisture sensitive drug and manufacturing procedure thereof. *European Patent Office*, (EP1917973A1), 2008.
- [102] B.D. Rose. Diuretics. *Kidney Int*, 39:336–352, 1991.
- [103] K. Deventer i wsp. Stability of selected chlorinated thiazide diuretics. *J Pharm Biomed Anal*, 49:519–524, 2009.
- [104] M. Zając i wsp. *Chemia leków*. AM Poznań, Poznań, 2000.
- [105] W. Janiec i wsp. *Farmakodynamika. Podręcznik dla studentów farmacji*. PZWŁ, Warszawa, 2005.
- [106] S.A. Parekh i wsp. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide. *J Chromatogr B*, 873:59–69, 2008.
- [107] M. Fukuda i wsp. Duration until nighttime blood pressure fall indicates excess sodium retention. *Chronobiol Int*, 29(10):1412–1417, 2012.
- [108] G.S.M. Kellaway i wsp. A comparison of the efficacy of cilazapril versus cilazapril plus hydrochlorothiazide in patients with mild to moderate essential hypertension. *Eur J Clin Pharmacol*, 44:377–379, 1993.
- [109] Karta charakterystyki leku H.
- [110] D. L. Batisky. Obesity and the role of lifestyle and dietary intervention in the management of pediatric hypertension. *J Med Liban*, 58(3):171–174, 2010.
- [111] B. Valent-Moric i wsp. The importance of ambulatory blood pressure monitoring in children and adolescents. *Acta Clin Croat*, 51:59–64, 2012.
- [112] M.L. Hansen i wsp. Underdiagnosis of hypertension in children and adolescents. *JAMA*, 298(8):874–879, 2007.

- [113] M. G. Seikaly i wsp. Strategies of treatment of pediatric hypertension. *J Med Liban*, 58(3):161–166, 2010.
- [114] E. Lubre. Nadciśnienie tętnicze u dzieci i młodzieży. *Chor Serca Naczyń*, 7(3):107–111, 2010.
- [115] K. Widecka. Nadciśnienie tętnicze u dzieci i młodzieży - coraz większy problem medyczny. *Chor Serca Naczyń*, 1(2):89–96, 2004.
- [116] National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*, 114(2):555–576, 2004.
- [117] L. M. Santiago i wsp. Hypercholesterolemia and associated cardiovascular risk factors in young children and adolescents. *Rev Port Cardiol*, 21:301–313, 2002.
- [118] R F. Robinson i wsp. Pediatric treatment of chronic pediatric hypertension. *Pediatr Drugs*, 7(1):27–40, 2005.
- [119] K. Momma. ACE inhibitors in pediatric patients with heart failure. *Pediatr Drugs*, 1(8):55–69, 2006.
- [120] B. D. Glass i wsp. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared forms from commercially available products. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 9(3):398–426, 2006.
- [121] M. Muśko i wsp. Postacie leków pediatrycznych. Część I. Wymagania i podstawowe problemy - dawkowanie, połykanie, smak. *Farm Pol*, 3(66):215–220, 2010.
- [122] Z. Kembłowski. *Reometria płynów nielowtonowskich*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1973.
- [123] G. Schranm. *Reologia: podstawy i zastosowania*. Ośrodek Wydawnictw Naukowych PAN, Poznań, 1998.
- [124] M.H. Gordon i wsp. *Instrumental analysis in the biological sciences*. Springer, 1989.
- [125] J.F. Waterfall. A review of preclinical cardiovascular pharmacology of cilazapril, a new angiotensin converting enzyme inhibitor. *Br J Clin Pharmacol*, 27 (Suppl 2)(139S–150S), 1989.
- [126] B. Stanis. The stability of quinapril hydrochloride - a mixture of amorphous and crystalline forms (QHCL-AC) - in solid phase. *Acta Pol Pharm*, 60:443–450, 2003.

- [127] B. Stanisz. Liquid chromatographic studies of the stability of benazepril in pure form and in tablets. *J Liq Chromatogr R T*, 27:3103–3119, 2004.
- [128] B. Stanisz. The influence of relative humidity and temperature on stability of moexipril hydrochloride in solid phase. *Acta Pol Pharm*, 61:91–97, 2004.
- [129] A.S. Narang i wsp. Impact of excipient interactions on solid dosage form stability. *Pharm Res*, 29:2660–2683, 2012.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej p.t.:

TRWAŁOŚĆ CILAZAPRILU W FAZIE STAŁEJ

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego: doktora nauk farmaceutycznych, a złożona przeze mnie płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

14.01.2013, Sylwia Paszun

Oświadczenie

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

14.01.2013, Sylwia Paszun