



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

Mikołaj Piekarski

**Trwałość chlorowodorku
[(N-piperidyno)metyleno]daunorubicyny
w roztworach wodnych i w fazie stałej**

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: Prof. dr hab. Anna Jelińska

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

Poznań 2013

Składam serdeczne podziękowania

*Pani Prof. dr hab. Annie Jelińskiej
za cierpliwość, przekazaną wiedzę, wsparcie
i wszelką pomoc w przygotowaniu pracy*

*Pani Prof. dr hab. Mariannie Zając
za cenne rady, życzliwość
i pomoc w przygotowaniu pracy*

*Koleżankom i Kolegom
z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej
za miłą atmosferę w trakcie badań oraz wszelką pomoc*

*Pani Prof. dr hab. Irenie Oszczapowicz
Z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie
za udostępnienie substancji do badań*

*Rodzicom, Bratu i Żonie
za wiarę, wsparcie i motywację do pracy*

Spis treści

1. WSTĘP	7
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	15
2.1. Antracykliny - wiadomości ogólne	15
2.2. Budowa chemiczna	15
2.3. Mechanizm działania antybiotyków antracyklinowych	17
2.4. Antracykliny stosowane w leczeniu	19
2.5. Działania niepożądane antybiotyków antracyklinowych	20
2.6. Oporność na terapię	23
2.7. Modyfikacje antybiotyków antracyklinowych	25
2.7.1. Modyfikacje chemiczne antybiotyków antracyklinowych	26
2.7.2. Nowe postacie leku antybiotyków antracyklinowych	31
2.8. Ocena jakości antybiotyków antracyklinowych	33
2.9. Badania trwałości	35
3. CEL PRACY	37
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	39
4.1. Substancja badana	39
4.2. Odczynniki	39
4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy	40
4.4. Metody analityczne stosowane w ocenie trwałości <i>N</i> -[(piperydino)metyleno]daunorubicyny (PPD)	41
4.4.1. Metoda HPLC	42
4.4.2. Metoda UV-VIS	47
4.5. Ocena trwałości PPD w roztworach wodnych.....	49
4.5.1. Warunki badań kinetycznych	49
4.5.2. Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu PPD	50
4.6. Ocena trwałości PPD w roztworach do podania parenteralnego	79
4.7. Ocena fototrwałości PPD w roztworach wodnych	85
4.8. Ocena trwałości PPD w fazie stałej	94
4.8.1. Metoda analityczna	94
4.8.2. Ocena trwałości PPD testem przyspieszonego starzenia	94
4.8.3. Parametry kinetyczne reakcji	95

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW	99
6. WNIOSKI	117
7. STRESZCZENIE	119
8. PIŚMIENNICTWO	125

1. WSTĘP

Choroby nowotworowe to obecnie jedno z głównych wyzwań nowoczesnej medycyny. Ich duża różnorodność, wysoka śmiertelność, wzrastająca zapadalność oraz utrudniona prewencja powodują ciągle zainteresowanie nauki tymi schorzeniami [1]. Wiele multidyscyplinarnych ośrodków badawczych na świecie prowadzi badania nad patogenezą zmian nowotworowych, obecnością markerów umożliwiającymi wczesne wykrycie choroby, czy wreszcie poszukiwaniem nowych leków przeciwnowotworowych. Mimo znacznych postępów w pracach, choroby nowotworowe wciąż są jednak schorzeniami niedostatecznie poznanymi, a ich pełne zrozumienie będzie kamieniem milowym medycyny, tak jak penicylina była postępowaniem w walce z mikroorganizmami chorobotwórczymi [2].

Komórki nowotworowe to komórki własne organizmu, które nabrały cech złośliwych i w efekcie działają na szkodę organizmu gospodarza. Wydaje się, że główną przyczyną takich przemian są mutacje kodu genetycznego. Mutacje te mogą być wynikiem działania wielu czynników – kancerogenów, które można podzielić na:

- fizyczne – promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe [3]
- chemiczne – należy tu wiele związków o zróżnicowanej budowie, np. nitrozoaminy, aromatyczne policykliczne węglowodory, aminy aromatyczne czy niektóre pierwiastki jak arsen czy nikiel
- biologiczne – uwarunkowania genetyczne, wirusy onkogenne – wirus Epstein-Barr, wirus mięsaka Kaposiego, wirus brodawczaka ludzkiego [4].

Cechy, które odróżniają komórki nowotworowe od zdrowych komórek organizmu to:

- ich zdolność do niekontrolowanego wzrostu (proliferaacji)
- utrata zdolności do przejścia w stan apoptozy – czyli naturalnej, programowanej śmierci komórki
- zdolność do tworzenia przerzutów, w tym przerzutów odległych.

Mimo, iż sam proces nowotworzenia może mieć różną przyczynę i początek, przebieg wszystkich schorzeń nowotworowych jest podobny i składa się z kilku etapów. Pierwszym etapem jest tzw. inicjacja. W wyniku działania kancerogenu dochodzi do pojedynczej mutacji w DNA. Dotyczy to głównie genów odpowiedzialnych za podział i różnicowanie komórek. Czasami inicjacja odbywa się samoistnie, bez udziału czynników kancerogennych. Następnym etapem jest etap promocji. W wyniku następujących po sobie mutacji dochodzi do pogłębienia zmian w materiale genetycznym, co powoduje zaburzenia w ekspresji genów oraz procesach regulacyjnych komórki. Progresja to trzeci etap nowotworzenia. W wyniku trwałych i nieodwracalnych zmian w kariotypie dochodzi do powstania komórek zdolnych do nieskończonej proliferacji, naciekania na komórki i tkanki sąsiadujące i do tworzenia przerzutów. Należy zaznaczyć, iż aby doszło do powstania guza muszą zajść wszystkie wymienione wyżej etapy. Wystąpienie tylko jednego z nich – np. samej inicjacji, nie pogłębionej przez promocję – nie powoduje powstania komórek nowotworowych. Zmiany te zachodzą z różną szybkością, zależną od wielu czynników, takich jak rodzaj nowotworu czy podatność osobnicza. W przypadku niektórych chorób nowotworowych, od zainicjowania do pełnego rozwoju choroby mija wiele lat, chociaż niekiedy czas ten jest mierzony w miesiącach [5, 6].

Istnieje kilka teorii wyjaśniających jakie mutacje i których genów powodują powstanie komórek nowotworowych. Jedną z nich jest teoria aktywacji protoonkogenów do onkogenów. Protoonkogeny to geny występujące normalnie w materiale genetycznym. Poprzez ingerencję w ich strukturę w wyniku np. mutacji punktowej, zwielokrotnienia genu, czy translokacji chromosomowej, następuje przemiana protoonkogenu w onkogen. Produkty białkowe tych ostatnich to onkoproteiny, które regulują procesy podziałów komórkowych. Zwiększona ekspresja tych genów powoduje nasilone podziały komórkowe i praktyczną „nieśmiertelność” komórek. Najczęstsze protoonkogeny ludzkie to np. RAS, MYC, ERBB1 i MDM2 [7, 8].

Inną teorią wyjaśniającą powstawanie komórek nowotworowych jest teoria inaktywacji genów supresorowych. Geny te niekiedy są nazywane antyonkogenami. Ich aktywność polega na stabilizacji i normalizacji procesów podziałowych w komórkach. Przykładem może być gen kodujący białko p53, które ma za zadanie sprawdzać poprawność procesu replikacji DNA, aktywację procesów naprawczych w przypadku wykrycia błędów oraz ewentualne kierowanie komórki na drogę apoptozy w przypadku niemożliwości przeprowadzenia naprawy DNA. Inaktywacja lub wyciszenie tego genu powoduje nagromadzanie się zmian w materiale genetycznym, co w następstwie prowadzi do zaburzenia procesów wewnątrzkomórkowych. Inne znane geny supresorowe to np. BRCA1, RB, APC. Możliwe, że pełne poznanie podstaw biochemicznych zmian zachodzących zarówno w genach supresorowych, jak i protoonkoge-

nach pozwoli w przyszłości na opracowanie molekularnych terapii przeciwnowotworowych, działających na źródło choroby [8, 9].

Ciekawą teorią, mającą ścisły związek z rozwojem choroby nowotworowej, jest teoria komórek macierzystych. Komórki macierzyste to komórki, które nie uległy jeszcze procesowi pełnego różnicowania. Jeśli są tworzone podczas podziału komórek nowotworowych, to mogą się one oderwać od głównej masy guza i wraz z płynami biologicznymi – krew i chłonka – mogą być transportowane w inne miejsce w organizmie. Tam następnie mogą tworzyć nowe ogniska nowotworzenia. Teoria ta pozwala w pewien sposób wyjaśnić jak powstają przerzuty w chorobach nowotworowych oraz również wyjaśnia jak komórki nowotworowe przekazują sobie np. geny oporności na leki. Jest proces podobny do powstawania oporności bakterii na antybiotyki, jednak różniący się brakiem wektora przekazującego mutację. W przypadku komórek macierzystych, zmutowane szczepy komórkowe powstają z nich *de novo* i od początku zawierają już odpowiednio zmutowany materiał genetyczny [10, 11].

Mimo, iż niektóre komórki nowotworowe produkują pewne charakterystyczne dla nich markery – jak chociażby marker PSA w przypadku raka prostaty – to jednak wczesna diagnostyka na podstawie badań biochemicznych jest utrudniona. Często wykrycie zmiany musi być poprzedzone badaniem obrazowym – tomografia komputerowa (CT), rezonans magnetyczny (NMR) czy protonowa tomografia emisyjna (PET) oraz histopatologicznym, po zlokalizowaniu guza, co niekiedy oznacza już zaawansowane stadium choroby, znacznie zmniejszające szanse na powodzenie terapii. Potwierdza to, iż wczesna diagnostyka w przypadku chorób nowotworowych jest utrudniona. Nie do końca wyjaśniony mechanizm ich powstawania powoduje także utrudnioną prewencję [12].

Leczenie chorób nowotworowych to proces żmudny, długotrwały, bardzo obciążający pacjenta i niezwykle kosztowny. Wymaga on zaangażowania wielu specjalistów z zakresu medycyny, ale również z innych dziedzin nauki – jak np. fizycy w przypadku opracowywania schematów leczenia radiologicznego. W różni się trzy główne grupy metod leczenia nowotworów:

- metody chirurgiczne
- radioterapię
- farmakoterapię – zaliczamy tu chemioterapię, hormonoterapię oraz immunoterapię [2].

Wybór metody leczenia zależy od rodzaju nowotworu, jego położenia, stopnia zaawansowania i agresywności. Obecnie bardzo często stosuje się terapie łączone, wykorzystujące metody z dwóch różnych grup. Dobrym przykładem jest chemioterapeutyczne zmniejszenie ma-

sy guza przy użyciu leków cytostatycznych, a następnie przeprowadzenie zabiegu resekcji guza, po którym następuje kolejna seria podawania leku. Można też łączyć chemio- i radioterapię lub radioterapię i zabiegi chirurgiczne. Stosowanie kilku metod pozwala na uzyskanie lepszego efektu terapeutycznego niż w przypadku monoterapii.

Metody chirurgiczne są metodami z wyboru w przypadku nowotworów narządowych. Polegają one na usunięciu całej masy guza wraz z tzw. marginesem bezpieczeństwa, czyli szerokim na kilka cm pasem zdrowych komórek okalających zmianę nowotworową. Zabieg resekcji guza jest uznawany za najskuteczniejszą metodę leczenia nowotworów. Ma on jednak swoje ograniczenia. W przypadku dużych guzów lub takich, które są zlokalizowane we wrażliwych miejscach – np. mózg – przeprowadzenie operacji jest często niemożliwe. Stosuje się wówczas uprzednie zmniejszenie masy guza przy użyciu leków lub radioterapii, a następnie usunięcie pozostałej zmiany. Można również usunąć część masy nowotworowej, a następnie przeprowadza się chemio- lub radioterapię mającą na celu zniszczenie pozostałych komórek. Chirurgię stosuje się również w leczeniu paliatywnym, gdzie zabieg nie ma na celu usunięcia całej zmiany, a jedynie zmniejszenie jej rozmiaru co poprawia komfort pacjenta i przedłuża jego życie [13].

Radioterapia to fizyczna metoda leczenia zmian nowotworowych, wykorzystująca promieniowanie jonizujące do naświetlania komórek nowotworowych. W zależności od umiejscowienia źródła promieniowania względem guza wyróżniamy:

- teleradioterapię – źródło promieniowania umiejscowione jest poza organizmem
- brachyterapię – źródło promieniowania znajduje się w bezpośrednim kontakcie z tkankami nowotworowymi (umiejscowione jest dojamowo, śródtkankowo, powierzchniowo) i często ma postać cienkich igieł wkłuwanych w zmiany nowotworowe.

Brachyterapia powoduje mniej uogólnionych działań niepożądanych niż teleterapia i jest również bardziej ukierunkowana na same komórki nowotworowe, ale w niektórych przypadkach jest niemożliwa do przeprowadzenia. Źródłem promieniowania mogą być urządzenia do wytwarzania promieniowania X, promieniowania cząstkowego (β lub γ), naturalne pierwiastki promieniotwórcze lub izotopy promieniotwórcze. Radioterapia może być metodą leczenia radykalnego, jak również leczenia wspomagającego lub paliatywnego. W tym ostatnim przypadku ma na celu zmniejszenie objawów i dolegliwości towarzyszących chorobie, nie prowadzi natomiast do wyleczenia [14].

Metody leczenia farmakologicznego nowotworów obejmują chemioterapię, hormonoterapię oraz immunoterapię. Hormonoterapia znajduje zastosowanie w przypadku nowotworów

hormonozależnych – rak piersi, prostaty, jądra – i polega na podawaniu odpowiednich hormonów w celu wytworzenia środowiska niesprzyjającego rozwojowi komórek nowotworowych [2]. Immunoterapia ma natomiast na celu pobudzenie odpowiedzi immunologicznej organizmu wobec komórek nowotworowych. Stosuje się w niej np. cytokiny czy przeciwciała monoklonalne. Jest to najnowsza z metod farmakologicznych stosowanych w terapii nowotworowej i obecnie przeżywa znaczny rozwój związany z wprowadzaniem do leczenia coraz to nowszych przeciwciał monoklonalnych, ukierunkowanych na dane komórki nowotworowe. Zanim jednak metoda znajdzie się w standardach leczniczych minie jeszcze trochę czasu, gdyż trzeba zebrać odpowiednie dane na temat skuteczności tych leków w większych populacjach ludzkich oraz na temat bezpieczeństwa ich stosowania. Mimo wszystko wiąże się duże nadzieje z tą grupą leków [15].

Chemioterapia to metoda najszerzej stosowana z farmakologicznych metod leczenia nowotworów. Polega ona na niszczeniu komórek nowotworowych poprzez podawanie pacjentowi leków cytostatycznych lub cytotoksycznych i jest jedną z głównych metod leczenia systemowego. Stosuje się ją w leczeniu nowotworów rozsianych, guzów nieoperacyjnych oraz w przypadku nowotworów krwi, np. białaczki różnego typu. Bardzo duże znaczenie ma jako terapia uzupełniająca leczenie chirurgiczne lub radioterapię (terapia adjuwantowa lub neo-adjuwantowa).

Podstawowym problemem w przypadku chemioterapii jest bardzo duża toksyczność tych leków. Jest to spowodowane bardzo małym zróżnicowaniem ogólnym komórek nowotworowych od komórek zdrowych organizmu. Powoduje to małą selektywność w działaniu leków w stosunku do komórek nowotworowych. Leki działają tak samo na komórki guza, jak na komórki zdrowe. Szczególnie narażone na ich działanie są komórki szybkodzielące się, czyli poza komórkami nowotworowymi są to np. komórki mieszków włosowych, komórki nabłonka przewodu pokarmowego czy też prawidłowe komórki krwi. Stąd też wynikają bardzo charakterystyczne działania niepożądane występujące podczas chemioterapii, takie jak wypadanie włosów, stany zapalne przewodu pokarmowego (wymioty, biegunki), czy też częste zmiany w obrazie krwi, jak neutropenia, trombocytopenia czy leukopenia [16]. Na leczenie najlepiej reagują komórki nowotworów szybko rosnących, jak np. białaczki. Nowotwory wolno rosnące są często odporne na leczenie (gruczolak przewodu pokarmowego).

Mając na uwadze nieswoistość działania leków przeciwnowotworowych oraz ich dużą toksyczność, odpowiednie zaplanowanie terapii jest trudne. Należy w nim uwzględnić takie czynniki jak mechanizm działania leków, ich farmakokinetykę, sposób dawkowania oraz czas

trwania terapii. Dzięki latom praktyki udało się ustalić pewne ogólne zasady prowadzenia skutecznej i racjonalnej chemioterapii:

- leczenie należy rozpocząć jak najwcześniej – wczesna diagnoza oraz szybkie rozpoczęcie leczenia znacząco zwiększają szanse chorego na pełny powrót do zdrowia
- należy stosować polichemioterapię – łączenie różnych leków o odmiennych mechanizmach działania i innych działaniach niepożądanych znacząco zwiększa skuteczność terapii oraz jej bezpieczeństwo
- należy stosować największe tolerowane dawki w odpowiednich odstępach czasowych – stosowanie mniejszych dawek w sposób ciągły jest znacznie mniej skuteczne
- sposób dawkowania oraz kojarzenia leków powinien powodować maksymalne zniszczenie komórek nowotworowych przy minimalnym wpływie na komórki zdrowe
- główną zasadą nowoczesnej chemioterapii jest zniszczenie wszystkich komórek nowotworowych
- chronofarmakoterapia, czyli dostosowanie podawania leków do pory dnia, pozwala na zwiększenie skuteczności terapii
- uwzględnienie wpływu leku na określony etap cyklu komórkowego – komórki będące w fazie G1, S, G2 i M są wrażliwe na działanie leków, komórki w fazie G0 są nie wrażliwe [17].

Ze względu na wpływ na cykl komórkowy leki cytostatyczne możemy podzielić na:

- nieswoiste
- swoiste dla cyklu, niszczące komórki będące w cyklu komórkowym, należą tu wszystkie leki alkilujące oraz antybiotyki cytostatyczne z wyjątkiem bleomycyny
- swoiste dla fazy, niszczące komórki będące w określonej fazie cyklu – np. antymetabolity działają na komórki w fazie S, alkaloidy w fazie M, bleomycyna w fazie G2, a asparaginaza w fazie G1.

W planowaniu chemioterapii, istotne znaczenie ma także wykorzystanie zjawiska „mobilizacji” i „synchronizacji”. Polega to na przyspieszeniu przejścia komórek z fazy spoczynku G0 do cyklu komórkowego, a następnie zatrzymaniu jak największej liczby komórek w danej fazie cyklu. Następnie podaje się lek działający na kolejną fazę cyklu, co powoduje zniszczenie komórek uprzednio zsynchronizowanych [2].

Obecnie znanych jest bardzo wiele leków przeciwnowotworowych o bardzo różnej budowie chemicznej i pochodzeniu. Ze względu na mechanizm działania leki cytostaticzne można podzielić na następujące grupy:

- leki alkilujące - chlormetyna, cyklofosfamid, ifosfamid, trofosfamid, chlorambucil, melfalan, tiotepa, triazykwon, busulfan, treosulfan, streptozocyna, karmustyna, lomustyna, semustyna, prokarbazyna, dakarbazyna, temozolamid, cisplatyna, karboplatyna, oksaliplatyna, iproplatyna, spiroplatyna
- antymetabolity cytostaticzne – kwasu foliowego (metotreksat, edatreksat, trimetreksat, raltitreksed), puryn (merkaptopuryna, azatiopryna, tioguanina, kladrybina), pirymidyn (fluorouracyl, kapecytabina, floksurydyna), nukleozydów (cytarabina, gemcytabina, fludarabina, pentostatyna, azacytydyna)
- inhibitory topoizomerazy DNA – topotekan, irinotekan, kamptotekan
- antybiotyki – antracykliny (daunorubicyna, doksorubicyna, epirubicyna, idarubicyna, akklarubicyna, zorubicyna), daktynomycyna, bleomycyna, mitomycyna
- alkaloidy – winkrystyna, winblastyna, winorelbina, windezyna
- taksoidy – docetaksel, paklitaksel
- lignany – etopozyd, tenipozyd
- enzymy – asparaginaza, pegaspargaza
- antyhormony i hormony – glikokortykosteroidy (prednizon, prednizolon, deksametazon, hydrokortyzon), estrogeny (etynyloestradiol, dietylostilbestrol, fosfestrol, chlorotriazen, estramustyna), antyestrogeny (tamoksyfen), androgeny (metylotestosteron, drostanolon, testolakton, proponian testosteronu), antyandrogeny (cyproteron, flutamid, finasteryd, nilutamid), gestageny (medroksyprogesteron, megestrol), antygestageny (mifepriston), analogi gonadoreliny (buserelina, goserelina, triptorelina, leuprorelina), inhibitory aromatazy (aminoglutetimid, letrozol, eksemestan, anastrozol)
- inne – mitoksantron, hydroksykarbamid, pentostatyna, miltefozyna, imatinib, gefitinib, mitotan, amsakryna, tretynoina, alitretynoina [2, 17].

Obecnie głównym problemem, obok toksyczności leków przeciwnowotworowych, jest narastająca oporność komórek na leczenie. Mechanizm powstawania oporności wyjaśniłem wcześniej opisując teorie komórek macierzystych, natomiast typy oporności mogą być różnorodne. Prawie wszystkie stosowane cytostatyki niszczą komórki nowotworowe poprzez mechanizm zaprogramowanej śmierci komórek – apoptozy. Uszkodzenia genetyczne zachodzące w komórkach nowotworowych wywołują zaburzenia mechanizmów sygnalizacji w przebiegu

apoptozy, a przez to zmniejszają podatność komórek nowotworowych na apoptozę. Uwarunkowania genetyczne mogą być również przyczyną oporności wielolekowej (Multi Drug Resistance – MDR). Większa aktywność procesów naprawczych lub niezdolność wywołania skutecznych uszkodzeń DNA jest przyczyną nieuruchamiania mechanizmów programowanej śmierci i prowadzi do wytworzenia fenotypu komórek opornych na chemioterapię [18].

Również dla antybiotyków antracyklinowych opisano wiele możliwych dróg powstawania oporności. Jedną z nich jest nadekspresja genu ABCG2 (kodującego białko transportera leków) prowadząca do zmniejszenia stężenia leku wewnątrz komórek nowotworowych, a więc do jego nieskuteczności. Nadekspresja genu Skp2 (kinaza białkowa 2 właściwa dla fazy S) uniemożliwia zahamowanie przejścia komórek nowotworowych do fazy S cyklu komórkowego poprzez zmniejszenie poziomu inhibitora p27kip1, co skutkuje brakiem odpowiedzi na zastosowany cytostatyk. Również zaburzenia funkcji proteolitycznej kaspaz prowadzą do powstania komórek opornych na działanie leków przeciwnowotworowych. Kaspazy są enzymami z rodziny proteaz cysteinowych i uczestniczą w końcowym etapie apoptozy (faza efektorowa apoptozy). Przykładem może być brak ekspresji kaspazy 8 w komórkach nerwiaka niedojrzałego (neuroblastoma), które stają się odporne na genotoksyczne działanie doksorubicyny [19, 20].

Problem oporności nie jest poważny jak oporność bakterii na antybiotyki, jednak nie pozwala spokojnie patrzeć w przyszłość terapii przeciwnowotworowej. Znaczny postęp w zrozumieniu biochemicznych mechanizmów procesu nowotworzenia daje nadzieję na przełamanie tej bariery w przyszłości. Jednym ze sposobów osiągnięcia tego celu jest poszukiwanie nowych pochodnych leków obecnie stosowanych, o większej skuteczności klinicznej i równocześnie obniżonej toksyczności. Przykładem takiego działania są nowe pochodne antybiotyków antracyklinowych, czyli leków o ugruntowanej pozycji w terapii onkologicznej. Nowe pochodne, zachowując skuteczność leków wyjściowych, charakteryzują się lepszym profilem bezpieczeństwa oraz zdolnością do pokonania bariery oporności, co daje nadzieje na uzyskanie znacznie skuteczniejszej terapii tymi lekami.

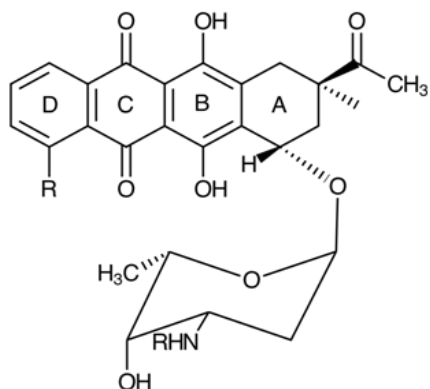
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Antracykliny - wiadomości ogólne

Antybiotyki antracyklinowe zostały odkryte w latach 50 XX wieku. Dwie niezależne grupy badawcze, z Francji i Włoch, badały czerwony barwnik wyizolowany ze szczepu grzybów *Streptomyces peucetius vel cesius*. Okazało się, że wykazuje on właściwości przeciwnowotworowe. Związek został nazwany daunorubicyna i wkrótce został wprowadzony do terapii. Dalsze badania związków wyizolowanych ze szczepów *Streptomyces* doprowadziły do uzyskania doksorubicyny i innych pochodnych. Związki te wykazywały bardzo dużą skuteczność wobec różnego typu białaczek i mięsaków. Później wykazano, iż mogą być skuteczne w terapii nowotworów litych, jak np. rak piersi. Wydawało się, iż antracykliny okażą się bardzo dobrymi lekami – były łatwo rozpuszczalne w wodzie, a także nie wykazywały szczególnie niebezpiecznych działań niepożądanych. Niestety kilka lat po wprowadzeniu ich do leczenia zaczęto notować bardzo dużą liczbę niewydolności serca u pacjentów leczonych uprzednio antracyklinami. Okazało się, iż kardiotoksyczność tych związków jest ściśle zależna od całkowitej dawki leku przyjętej przez pacjenta. Fakt ten powoduje dużo problemów, a nawet czasem wymusza zaprzestanie terapii tymi lekami, nawet jeśli odpowiedź terapeutyczna jest zadowalająca.

2.2. Budowa chemiczna

Antybiotyki antracyklinowe to związki o budowie glikozydowej. Aglikon (cząsteczkę niecukrową) stanowi w nich charakterystyczny układ skondensowanych 6-cio członowych pierścieni antrachinowych, połączonych poprzez wiązanie glikozydowe z cząsteczką aminocukru – daunozaminy (Rycina 1).

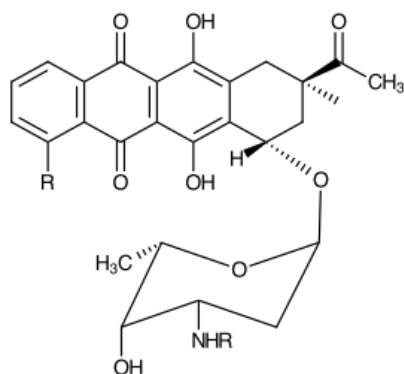


Rycina 1.
Budowa chemiczna antybiotyków antracyklinowych.

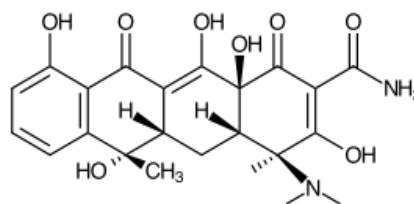
Charakterystyczne dla takiej budowy jest występowanie wielu centrów izomeryzacji optycznej w cząsteczce antracyklin, co powoduje występowanie wielu izomerów optycznych jednego związku. Izomery te bardzo często różnią się między sobą siłą działania przeciwnowotworowego oraz częstością i nasileniem występowania działań niepożądanych, a niektóre izomery są wręcz pozbawione aktywności farmakologicznej

Potwierdza to istnienie ścisłej zależności pomiędzy budową chemiczną antybiotyków antracyklinowych, a ich aktywnością farmakologiczną. Dodatkowo można zauważyć podobieństwo pomiędzy budową chemiczną antracyklin, a inną grupą antybiotyków – tetracyklin. Tetracykliny to związki działające bakteriostatycznie, a nie przeciwnowotworowo, jednak także w ich cząsteczce występuje charakterystyczny układ skondensowanych pierścieni, który jest odpowiedzialny za ich aktywność farmakologiczną (Rycina 2).

a



b



Rycina 2.
Porównanie budowy chemicznej antybiotyków antracyklinowych (*a*) i tetracyklin (*b*).

2.3. Mechanizm działania antybiotyków antracyklinowych

Pomimo znacznego postępu w wielu dziedzinach chemii, biologii, biologii molekularnej oraz biochemii, pełny mechanizm działania przeciwnowotworowego antybiotyków antracyklinowych pozostaje nadal niewyjaśniony. Pewne jest to, iż jest to mechanizm wielokierunkowy, obejmujący wpływ na różne struktury komórkowe. W chwili obecnej wydaje się, iż aktywność przeciwnowotworowa antracyklin jest wynikiem opisanych poniżej procesów.

- Interkalacja łańcuchów DNA, na którą ma wpływ budowa chemiczna antracyklin. Pierścienie B, C, D są płaskie, co umożliwia im wniknięcie w płaszczyźnie prostopadłej do osi DNA pomiędzy pary zasad. Następnie dochodzi do wytworzenia wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczką antracykliny a resztami guaninowymi i cytozynowymi DNA. Pierścień A aglikonu oraz reszta cukrowa nie wnikają pomiędzy pary zasad i pozostają na zewnątrz nici DNA, jednak również odgrywają istotną rolę w całym procesie interkalacji. Stabilizują one powstały kompleks antracyklina – DNA i uniemożliwiają jego rozerwanie. Powstanie kompleksu interkalator – DNA powoduje szereg zmian topologicznych w materiale genetycznym. Pary zasad ulegają rozluźnieniu, podwójna helisa ulega rozkręceniu, często dochodzi do skrętu w przeciwnym kierunku niż naturalnie, w efekcie czego dochodzi do zahamowania procesów transkrypcji, a następnie syntezy białek.
- Zwiększenie ilości wolnych rodników w komórkach. Cząsteczki antybiotyków antracyklinowych zawierają układ chinonu, który przy udziale NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450 oraz jonów żelaza, ulega redukcji do hydrochinonu, czemu towarzyszy wytworzenie rodnika hydroksylowego oraz anionorodnika ponadtlenkowego. Wytworzone rodniki powodują peroksydację lipidowych struktur komórek i w efekcie ich lizę.
- Zahamowanie aktywności enzymu topoizomerazy II. Topoizomeraza II jest ATP-zależnym enzymem, odpowiedzialnym za zachowanie poprawności struktury podwójnej helisy DNA. Zahamowanie tego enzymu powoduje rozkręcenie oraz rozerwanie podwójnej struktury helisy DNA, stabilizację zaistniałej fragmentacji materiału genetycznego i w efekcie zahamowanie syntezy RNA oraz białek. Wydaje się, iż poza interkalacją DNA, hamowanie topoizomerazy II jest jednym z najważniejszych mechanizmów działania przeciwnowotworowego antybiotyków antracyklinowych. Główną rolę

odgrywają tu pierścień A oraz reszta cukrowa (Rycina 1), gdyż pozostają one na zewnątrz podwójnej helisy DNA i przez to mogą reagować bezpośrednio z enzymem, który porusza się właśnie po zewnętrznej stronie nici DNA.

- Alkilacja DNA, czyli nieodwracalne przyłączane grupy alkilowej do azotu N7 guaniny w DNA. Antracykliny nie są jednak klasycznymi związkami alkilującymi i ta ich właściwość jest jedynie ich cechą dodatkową, znacznie rzadziej zachodzącą niż w przypadku chlorambucilu czy busulfanu.
- Wpływ na aktywność helikazy DNA, która jest ATP-zależnym enzymem odpowiedzialnym za oddzielenie dwóch nici DNA od siebie. Zahamowanie aktywności tego enzymu powoduje destabilizację struktury DNA i może być przyczyną indukcji procesu apoptozy w komórce.
- Sieciowanie („cross-linking”) DNA. Antracykliny mają zdolność do łączenia ze sobą dwóch różnych nici DNA lub różnych fragmentów tej samej nici. Powoduje to zmianę topologii materiału genetycznego oraz zahamowanie aktywności wielu enzymów. W efekcie replikacja DNA jest zatrzymana, także procesy syntezy białek ulegają zatrzymaniu. Powoduje o przejście komórki w stan apoptozy i jej śmierć.
- Bezpośredni wpływ antracyklin na błony komórkowe. Antybiotyki antracyklinowe mają właściwości lipofilne, dlatego też mogą oddziaływać bezpośrednio z błonami komórkowymi i zmieniać ich właściwości, np. ich przepuszczalność. W efekcie dochodzi do zaburzenia homeostazy wewnątrzkomórkowej i śmierci komórki [21 - 24].

Wymienione procesy zachodzą z różną aktywnością, lecz każdy z nich ma istotne znaczenie dla aktywności przeciwnowotworowej antybiotyków antracyklinowych. Z powodu intensywnej replikacji komórki nowotworowe są szczególnie wrażliwe na działanie antracyklin, gdyż ich materiał genetyczny jest ciągle poddawany działaniu różnych enzymów, co ułatwia penetrację leku. Także osłabione procesy naprawcze w komórkach nowotworowych wpływają korzystnie na działanie antracyklin. Wielokierunkowy mechanizm działania tych leków często gwarantuje ich skuteczność terapeutyczną, ale też powoduje problemy z możliwością wystąpienia wielu działań niepożądanych.

2.4. Antracykliny stosowane w leczeniu

Obecnie znanych jest około 2000 różnych pochodnych antybiotyków antracyklinowych, zarówno naturalnych, jak i półsyntetycznych, uzyskanych metodami inżynierii genetycznej. Z tej dużej grupy około 600 związków jest obecnie badanych pod kątem ich przydatności w leczeniu. W Polsce obecnie zarejestrowane i stosowane w leczeniu są 3 związki z tej grupy:

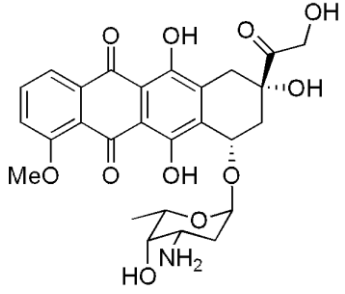
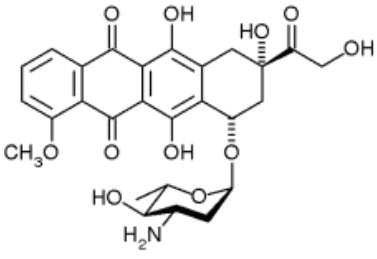
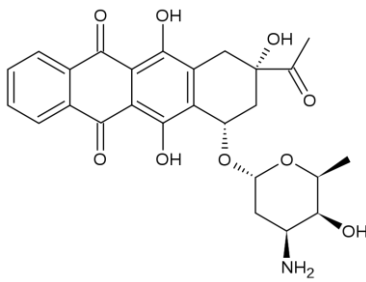
- doksorubicyna – preparaty ADRIBLASTYNA (PFEIZER), ADRIMEDAC (MEDAC), BIORUBINA (IBiA), CAELYX (SCHERING-PLOUGH), DOXORUBICIN-EBEWE (EBEWE), DOXORUBICINUM ACCORD (ACCORD HEALTHCARE), MYOCET (CEPHALON)
- epirubicyna – preparaty BIOEPICYNA (IBiA), EPIMEDAC (MEDAC), EPIRUBICIN ACCORD (ACCORD HEALTHCARE), EPIRUBICIN-EBEWE (EBEWE), EPISINDAN (ACTAVIS GROUP), FARMORUBICIN (PFIZER EUROPE)
- idarubicyna – preparat ZAVEDOS (PFIZER EUROPE)

Wszystkie są stosowane jako leki do podania parenteralnego, w postaci iniekcji lub infuzji dożylnych. Dodatkowo z wymienionych preparatów, CAELYX oraz MYOCET, zawierają doksorubicynę w postaci liposomalnej. Antracykliny stosowane w Polsce są przedstawione w tabeli 1.

Wskazania do stosowania antracyklin są szerokie i obejmują takie schorzenia jak: rak piersi, rak płuc, rak pęcherza moczowego, mięsaki kości i tkanek miękkich, chłoniak nieziarniczy, choroba Hodgkina, ostra białaczka limfoblastyczna, ostra białaczka mieloblastyczna, ostra białaczka nielimfoblastyczna, rak żołądka, rak jajnika, rak okrężnicy i odbytnicy [25].

W USA dodatkowo stosuje się daunorubicynę i valrubicynę (tylko w raku pęcherza moczowego), a w Japonii dodatkowo aklarubicynę. W innych krajach europejskich stosowane są takie same antracykliny, jak w Polsce, czasem tylko dodatkowo zarejestrowana jest także daunorubicyna.

Tabela 1. Antracykliny stosowane w Polsce

Związek	Budowa chemiczna
DOKSORUBICYNA	
EPIRUBICYNA	
IDARUBICYNA	

2.5. Działania niepożądane antybiotyków antracyklinowych

Dobra tolerancja antracyklin oraz ich duża skuteczność powoduje, że one są chętnie stosowane w terapii zarówno dorosłych, jak i dzieci. Niestety nie są to leki pozbawione działań niepożądanych.

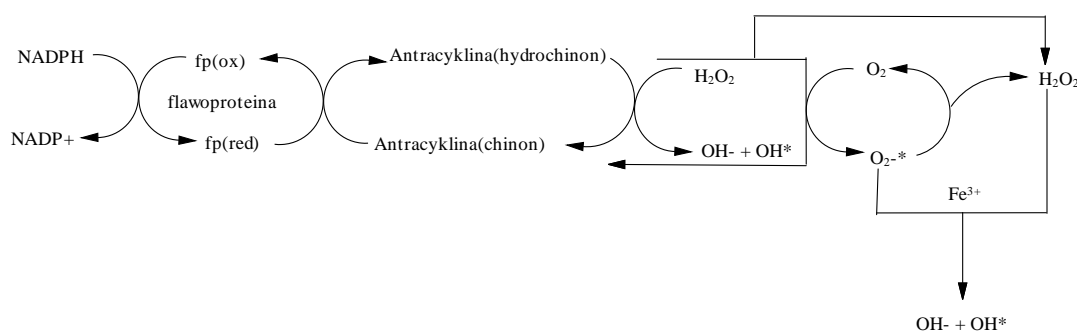
Większość leków przeciwnowotworowych działa na komórki ulegające intensywnym podziałom. Komórki nowotworowe należą do takich, ale również komórki krwi, układu rozrodczego czy mieszków włosowych. Dlatego też zmiany w obrazie krwi w postaci neutropenii, granulocytopenii, małopłytkowości, zaburzenia w czynności układu rozrodczego, czy też wypadanie włosów, to charakterystyczne objawy uboczne terapii przeciwnowotworowej. Antracykliny nie są wyjątkiem i przy stosowaniu tych leków również spotykamy się z takimi działaniami.

łaniami niepożądanymi. Najczęściej są to jednak objawy przemijające i ustępują po zakończeniu terapii. Często też nie powodują konieczności zaprzestania terapii czy zmniejszenia dawki.

Inną grupą działań niepożądanych spotykanych przy terapii wszystkimi lekami przeciwnowotworowymi są objawy ze strony układu pokarmowego. Bardzo częste są nudności, wymioty i biegunki, często będące wynikiem bezpośredniego działania leków na śluzówkę układu pokarmowego. Często również pojawiają się nadżerki i owrzodzenia błon śluzowych jamy ustnej. Objawy te są najczęściej w pełni odwracalne i ustępują po zakończeniu terapii. Dodatkowo opracowane są schematy postępowania w celu zabezpieczenia pacjenta przed nudnościami i wymiotami. W tym celu stosuje się kombinacje leków antiemetycznych, najczęściej przy użyciu ondansetronu i deksametazonu lub prednizolonu, rzadziej tioetyloperazyny.

Przy stosowaniu leków w postaci liposomalnej charakterystycznym objawem ubocznym jest zespół dłoń-stopą. Ma on postać zaczerwienienia, spuchnięcia i owrzodzenia powierzchni skóry na dłoniach i stopach i histologicznie jest podobny do rumienia wielopostaciowego. Ulega cofnięciu po zakończeniu terapii.

Najważniejszym i najbardziej charakterystycznym dla antracyklin działaniem niepożądanym jest ich zależna od dawki kardiotoxycyżność. Mechanizm jej powstawania jest ściśle związany z mechanizmem działania przeciwnowotworowego antracyklin, a dokładniej ze zwiększaniem przez antracykliny produkcji wolnych rodników i nasilaniem przez to stresu oksydacyjnego wewnątrz komórek. W kardiomiocytach przy udziale NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450 oraz jonów żelaza, dochodzi do metabolizmu antracyklin, w wyniku którego powstają znaczne ilości rodników hydroksylowych oraz anionorodników ponadtlenkowych (Rycina 3).



Rycina 3.

Mechanizm indukowania produkcji wolnych rodników przez antybiotyki antracyklinowe.

Powstałe rodniki niszczą struktury błonowe komórek oraz ich materiał genetyczny, powodując ich śmierć. Kardiomiocyty są szczególnie narażone na takie procesy, ponieważ zawierają

duże ilości jonów żelaza. Próbuje się dokładnie wyjaśnić mechanizm indukowania kardiotoxyczności przez antracykliny, a teoria wolnorodnikowa wydaje się być najbardziej prawdopodobna.

Wyróżniamy dwa typy kardiotoxyczności powodowanej przez antracykliny – ostrą i przewlekłą (odległą). Toksyczność ostra pojawia się bardzo szybko po zakończeniu podawania leku (kilka godzin), a czasem nawet już w trakcie podawania. Bardzo często wynika ze zbyt dużej szybkości wlewu. Objawami są najczęściej zaburzenia rytmu, objawy zapalenia osierdza i mięśnia sercowego, rzadziej niedokrwienie i niewydolność lewokomorowa. Są objawami całkowicie odwracalnymi i nie powodują trwałych uszkodzeń serca. Nie są też przeciwwskazaniem do dalszej terapii przy użyciu antracyklin. Świadomość o możliwości wystąpienia kardiotoxyczności ostrej oraz odpowiednie podejście do terapii powodują, iż obecnie rzadko dochodzi do jej wystąpienia.

Kardiotoxyczność przewlekła występuje znacznie później niż ostra. Często okres ten wynosi od kilku miesięcy do nawet kilkunastu lat po zakończeniu terapii przy użyciu antracyklin. Zmiany powstałe w tym okresie są najczęściej nieodwracalne i prowadzą do zaburzeń rytmu serca oraz, w wyniku postępującej degeneracji kardiomiocytów, do zastoinowej niewydolności serca. Ta ostatnia bardzo często wymaga przeszczepu serca, a nie zdiagnozowana prowadzi do śmierci pacjenta.

Kardiotoxyczność antracyklin jest ściśle zależna od całkowitej dawki przyjętej przez pacjenta i ryzyko jej wystąpienia znacznie wzrasta, gdy całkowita dawka przekracza 550 mg/m^2 [26]. Jedynie epirubicyna charakteryzuje się większym profilem bezpieczeństwa i pozwala na stosowanie skumulowanej dawki ok. 1000 mg/m^2 . Ważnym czynnikiem w zapewnieniu bezpiecznej terapii antracyklinami jest więc monitorowanie całkowitej dawki przyjętej przez pacjenta i konieczne uwzględnienie jej w przypadku ponownego stosowania antracyklin (np. wznowa nowotworu). Z racji tego, iż proces powstawania kardiomiopatii przebiega przy znacznym udziale jonów żelaza, próbuje się również stosować związki chelatujące te jony jako rodzaj prewencji przed skutkami odległymi stosowania antracyklin. Jeden z takich związków – deksrazoksan (preparat Cardioxane) – jest już wprowadzony do terapii i często pozwala ograniczać ryzyko późniejszych powikłań. Ma on dużo większe powinowactwo do żelaza niż antracykliny oraz dodatkowo powoduje jego przejście na +3 stopień utlenienia, a zatem nie może ono uczestniczyć w wytwarzaniu wolnych rodników (Rycina 4). Dawkę deksrazorsanu ustala się jako 1:10 w stosunku do dawki antracykliny i podaje się ok. 30 min przed podaniem antybiotyku. Terapię rozpoczyna się już przy pierwszym podaniu leku i w żaden sposób nie wpływa ona na skuteczność działania przeciwnowotworowego. Dodatkowo

ważne jest regularne badanie czynności serca u pacjentów leczonych antracyklinami, takie jak regularne badania EKG czy echo serca [21, 27, 28].

2.6. Oporność na terapię

Zjawisko oporności komórek nowotworowych na terapię jest problemem dotyczącym nie tylko terapii przy użyciu antracyklin, ale również innych leków przeciwnowotworowych. Jest to stosunkowo nowy problem i nie jest on tak poważny jak np. oporność bakterii na antybiotyki, lecz powoduje czasem duże problemy w prowadzeniu terapii i przyczynia się do niepowodzeń. Ogólnie można przyjąć, iż oporność komórek nowotworowych na leki jest bardzo podobna do oporności bakterii, lecz trzeba zaznaczyć różnice między tymi procesami.

Wyróżniamy dwa typy oporności komórek nowotworowych – pierwotną i nabytą. Oporność pierwotna, podobnie jak ma to miejsce u bakterii, oznacza całkowitą niewrażliwość danych komórek na dany lek lub grupę leków. Oznacza to, że komórki nie posiadają receptorów dla danego leku, lub też ich szlaki metaboliczne po aktywacji danego receptora różnią się od tych występujących w komórkach wrażliwych. U bakterii jest podobnie – pewne szczepy są z natury niewrażliwe na pewne rodzaje antybiotyków.

Oporność nabyta pojawia się najczęściej już po rozpoczęciu terapii, często przy podawaniu kolejnego cyklu chemioterapii, a także w przypadku wznowy i konieczności powtórzenia terapii danym lekiem. Stanowi dość duży problem, gdyż nie ma obecnie możliwości przewidzenia ryzyka jej wystąpienia. W przypadku oporności nabytej bakterii możemy dość trafnie przewidzieć czy istnieje ryzyko wystąpienia zakażenia szczepami opornymi, biorąc pod uwagę historię pacjenta czy też wykonując standardowe antybiotykokramy.

Zjawisko oporności komórek nowotworowych na leki, bez względu na jej typ, jest procesem złożonym z wielu czynników, które działając razem powodują nieskuteczność terapii. Bardzo istotną rolę w tym procesie odgrywa nadekspresja genów pewnych typów enzymów. Przykładem takiego genu, którego nadekspresja może prowadzić do powstania oporności na chemioterapię, jest gen kodujący glikoproteinę P, i inne geny kodujące enzymy z grupy ATP-zależnych pomp błonowych. Białka takie mają możliwość wychwycenia cząsteczki leku, która dostała się do wnętrza komórki i wyrzucenia jej do środowiska zewnątrzkomórkowego, a tym samym uniemożliwienie dotarcia leku do miejsca swojej aktywności. Innym przykładem, charakterystycznym dla oporności na antracykliny, jest nadekspresja genu kodującego białko ABCG2. Jest to białko transportera leków, działającego na podobnej zasadzie co wymienione

białka pomp błonowych. Innym charakterystycznym genem, którego nadekspresja warunkuje powstanie oporności, jest gen MDR1 (gen oporności wielolekowej, ang. Multi Drug Resistance).

Innym mechanizmem oporności komórek jest modyfikowanie szybkości przejść komórki w kolejne fazy cyklu komórkowego. Nadekspresja genu Skp², który koduje kinazę białkową 2 typową dla fazy S, powoduje zahamowanie przejścia komórki do fazy S cyklu komórkowego. Jest to spowodowane zmniejszeniem poziomu inhibitora p27kip1, a efektem takiego działania jest niewrażliwość komórki na cytostatyki.

Kolejnym mechanizmem oporności jest modyfikowanie szlaków apoptotycznych w komórce nowotworowej. Leki przeciwnowotworowe działają głównie poprzez wywoływanie takich zmian w komórkach, które wymuszają ich przejście do apoptozy, czyli programowanej śmierci. Mutacje w obrębie genów kodujących białka tej fazy powodują zahamowanie procesu apoptozy i tym samym nieśmiertelność komórek. Przykładem mogą być zaburzenia funkcji enzymów z grupy kaspaz. Kaspazy to białka proteolityczne, biorące udział w końcowej fazie apoptozy – tzw. faza efektorowa apoptozy. Zahamowanie ich funkcji może prowadzić do powstania komórek niezdolnych do samodzielnej śmierci (niezdolnych do apoptozy). Brak ekspresji genu kodującego kaspazę 8 powoduje powstanie opornych na doksorubicynę komórek nerwiaka niedojrzałego (neuroblastoma) [18, 19, 20, 29, 30].

Poza ustaleniem mechanizmów powstawania oporności oraz szlaków, które w oporności ulegają zakłóceniu, istotne jest również wyjaśnienie czy komórki nowotworowe mogą przekazywać sobie geny oporności, i, jeśli mogą, w jaki sposób do tego dochodzi. Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić, iż faktycznie komórki nowotworowe mogą przekazywać sobie geny oporności – podobnie jak bakterie. Prowadzi to często do powstania opornych przerzutów w miejscach bardzo oddalonych od guza pierwotnego i często niekompatybilnych z nim histologicznie. Niestety nie wyjaśniono jeszcze dokładnego mechanizmu tego procesu, jednak istnieje kilka teorii na ten temat, z których bardzo prawdopodobna wydaje się teoria nowotworowych komórek macierzystych. Komórki macierzyste występują naturalnie w organizmie i charakteryzują je następujące cechy:

- zdolność do samoregeneracji – spowodowane jest to zwiększoną aktywnością enzymów telomeraz w tych komórkach
- heterogenność – czyli brak ukierunkowania histologicznego; oznacza to, że takie komórki mogą się przekształcić w każdy rodzaj tkanki
- oporność na apoptozę – takie komórki są praktycznie nieśmiertelne.

Komórki macierzyste mogą powstawać przy podziale każdego typu komórek organizmu i mogą krążyć w krwioobiegu. W przypadku komórek nowotworowych również powstają komórki macierzyste, ale ponieważ są one zmienione i zawierają zmutowany materiał genetyczny, nazywamy je nowotworowymi komórkami macierzystymi. Komórki takie mogą krążyć we krwi i tworzyć nowe ogniska nowotworowe, zawierające także geny oporności na leki, w różnych miejscach organizmu. Co ciekawe, nowotworowe komórki macierzyste są wrażliwe na czynniki środowiskowe i w różnych warunkach mogą prowadzić bądź do powstania nowotworu, bądź ulegają wyciszeniu i nie prowadzą do powstania guza [31, 32].

Oporność komórek nowotworowych to problem cały czas intensywnie badany, co pozwala mieć nadzieję, że w przyszłości uda się ten proces opanować, bądź przewidzieć możliwość jego wystąpienia, co zdecydowanie poprawi skuteczność terapii.

2.7. Modyfikacje antybiotyków antracyklinowych

Antybiotyki antracyklinowe są lekami o ugruntowanej pozycji w terapii onkologicznej, wykazującymi dobrą skuteczność kliniczną. Są dobrze tolerowane przez pacjentów, jednak ich działania niepożądane, głównie kardiotoksyczność, oraz fakt pojawiania się zjawiska oporności komórek nowotworowych powodują, że poszukuje się nowych pochodnych tej grupy leków, które przy zachowaniu lub zwiększeniu aktywności przeciwnowotworowej, wykazywałyby większy profil bezpieczeństwa oraz zdolność pokonywania bariery oporności.

Możemy obecnie wyróżnić dwie drogi uzyskiwania nowych pochodnych antybiotyków antracyklinowych:

- modyfikacje chemiczne struktury antracyklin
- tworzenie nowoczesnych postaci leków, zwiększające skuteczność terapeutyczną antracyklin.

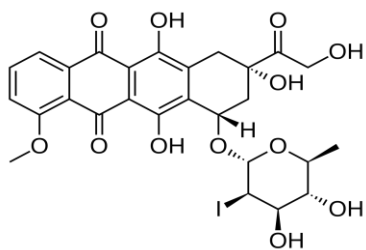
2.7.1. Modyfikacje chemiczne antybiotyków antracyklinowych

Duża cząsteczka antracyklin umożliwia liczne modyfikacje ich struktury. Modyfikowana może być zarówno część aglikonowa związku, jak i reszta cukrowa. Podkreślić jednak należy, iż nie wszystkie modyfikacje przynoszą pożądany skutek, a niektóre wręcz prowadzą do związków o dużo wyższej toksyczności niż związek wyjściowy.

Modyfikacje części aglikonowej antybiotyków były jednymi z pierwszych poszukiwań nowych pochodnych tej grupy. Nowe pochodne o zmodyfikowanych pierścieniach B, C, D (Rycina 1) nie wykazały jednak zadowalających efektów. Często również wykazywały znacznie większą toksyczność, zwłaszcza jeśli modyfikacje polegały na wprowadzeniu atomu chlorowca do któregoś z wymienionych pierścieni. Wiązało się to ze zwiększoną lipofilnością cząsteczki, a tym samym z łatwiejszą penetracją przez błony komórkowe i kumulowaniem się leku w organizmie. Również zamiana ugrupowania antrachinonowego na dużo prostsze, uwodornione układy naftalenu lub antracenu nie przyniosły poprawy aktywności związku, a wręcz spowodowały jej obniżenie. Niektóre pochodne co prawda wykazywały aktywność cytotoksyczną, ale dawki konieczne do uzyskania takiego efektu były kilkakrotnie wyższe od dawek związków wyjściowych [33]. Spowodowało to zmianę kierunku poszukiwań nowych pochodnych na związki modyfikowane w reszcie cukrowej oraz pierścieniu A aglikonu (Rycina 1).

Dzięki poznaniu mechanizmu aktywności przeciwnowotworowej antracyklin ustalono, że pierścień A oraz reszta cukrowa mają kluczowe znaczenie dla aktywności terapeutycznej antracyklin. Te części cząsteczki pozostają na zewnątrz spirali DNA, ale przez to odgrywają główną rolę w stabilizacji powstałego kompleksu antracyklina – DNA, zapobiegają wysunięciu się płaskich pierścieni spomiędzy par zasad, a także odpowiadają za hamowanie topoizomerazy II [21, 22]. Dodatkowo wykazano, że nie tylko sam rodzaj podstawnika ma znaczenie dla aktywności związku. Istotne znaczenie ma również konformacja tego podstawnika. Badania dwóch identycznych pochodnych 4'-epidaunorubicyny, różniących się jedynie konformacją podstawnika w pozycji C2' wykazały, że jeden z izomerów wykazuje znaczną aktywność przeciwnowotworową, a drugi jest jej całkowicie pozbawiony [34, 35].

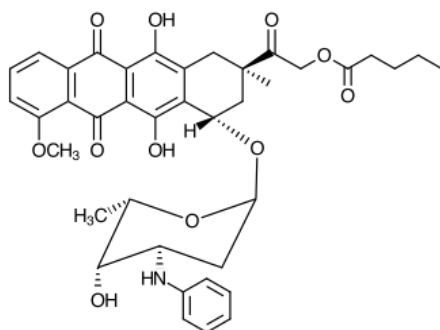
Usunięcie ugrupowania metoksyowego z pozycji C4 doksorubicyny oraz wprowadzenie w pozycje C3' oraz C4' grup hydroksylowych, aminowych lub metoksyfenylowych, pozwoliło uzyskać grupę związków pochodnych annamycyny (Rycina 4), które wykazały bardzo dużą zdolność do hamowania topoizomerazy II.



Rycina 4.
Struktura annamycyny.

Kompleksy enzym – antracyklina były w tym przypadku dużo trwalsze i inhibicja enzymatyczna była dużo efektywniejsza, co powodowało wyższą aktywność przeciwnowotworową wymienionych związków [36].

Wprowadzenie ugrupowania formamidowego w pozycję C3' reszty cukrowej pozwoliło uzyskać dużą grupę pochodnych. Badania *in vitro* wykazały, iż związki takie wykazują znacznie mniejszą tendencję do tworzenia wolnych rodników w porównaniu do daunorubicyny i doksorubicyny. Powoduje to, że te pochodne stwarzają dużo mniejsze ryzyko wystąpienia kardiotoksyczności w trakcie terapii. Pozytywną cechą jest również utrzymanie aktywności terapeutycznej związków wyjściowych [37, 38]. Ciekawym jest fakt, iż związki takie nie reagowały z topoizomerazą II. Powoduje to możliwość pokonania bariery oporności w komórkach, które zawierają zmutowany enzym. Wykazano, że komórki ze zmutowanym genem były nadal wrażliwe na tak zmodyfikowane pochodne [39].



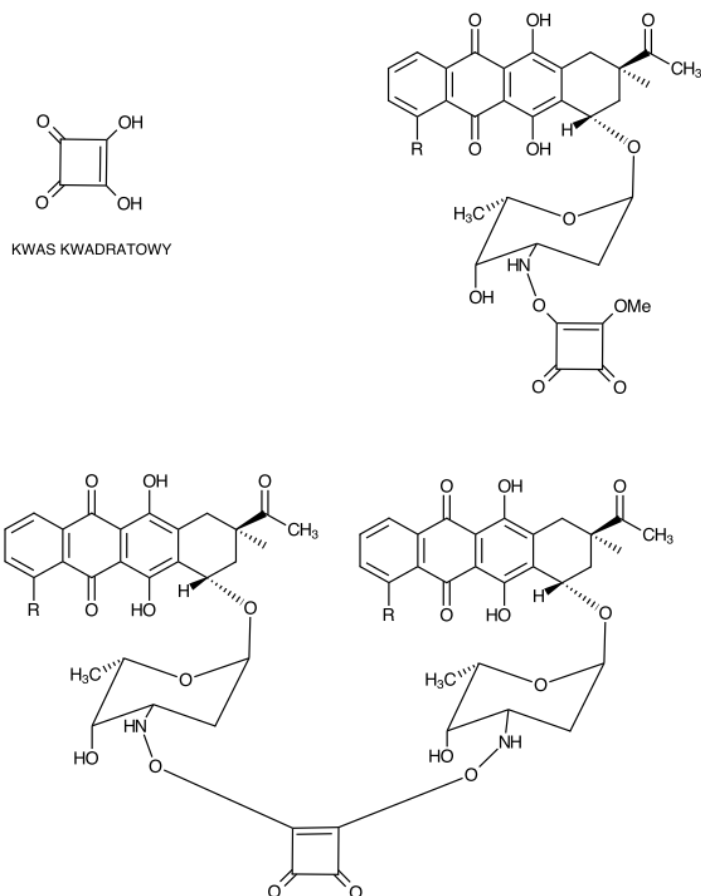
Rycina 5.
Struktura pochodnej z łańcuchem walerianowym i ugrupowaniem benzylovym.

Przykładem pochodnej, w której modyfikacji podlegała zarówno reszta cukrowa, jak i pierścień A aglikonu, jest pochodna zawierająca grupę benzylovą w pozycji C3' oraz łańcuch walerianowy w pozycji C14 pierścienia A (Rycina 5). Pochodna ta wykazuje znaczną aktywność przeciwnowotworową oraz jest w stanie pokonać barierę oporności komórek.

Dodatkowo, działa kardioprotekcyjnie, a nie kardiotoksycznie, jak większość antracyklin. Jest to spowodowane podobieństwem strukturalnym łańcucha walerianowego do diacyloglicerolu. Diacyloglicerol to silny aktywator kaskady sygnałowej białka kinazy proteinowej C (PKC). Aktywacja tej kaskady pozwala utrzymać homeostazę w komórkach będących w stanie silnego stresu oksydacyjnego np. przy wzroście ilości wolnych rodników. Główne znaczenie ma w tym przypadku PKC-ε, która uruchamia około 36 różnych procesów skutkujących zmniejszeniem stresu wewnątrz komórek mięśnia sercowego i utrzymaniem homeostazy. Jest to bardzo

ciekawy przykład związku, który chroni organizm przed działaniami niepożądanymi, które sam może wywołać [40]. Inne pochodne z łańcuchami O-acylowymi w pozycji C14 wykazywały podobne właściwości [41].

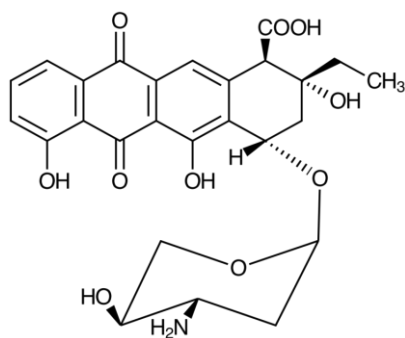
Ciekawe pochodne uzyskano po przeprowadzeniu kondensacji znanych antracyklin (w postaci chlorowodorków) z estrami dietylowymi kwasu kwadratowego. Kondensacja zachodziła w pozycji C3' reszty cukrowej i w zależności od pH środowiska reakcji, powstawały produkty będące mono (pH poniżej 7) lub diamidami (pH powyżej 7) (Rycina 6).



Rycina 6.

Struktura kwasu kwadratowego oraz produktów kondensacji z antracyklinami.

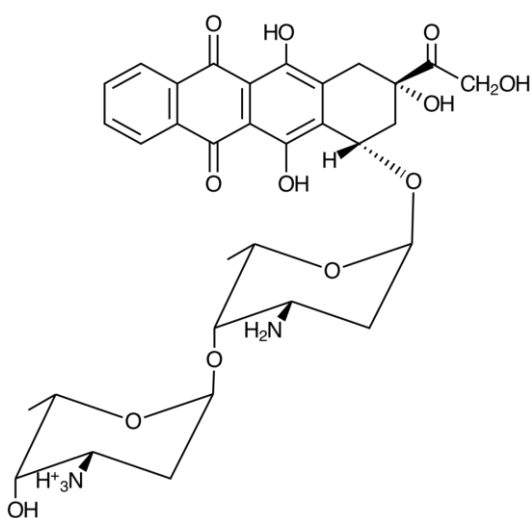
Wykazano znaczną aktywność takich związków, zwłaszcza w stosunku do komórek białaczki. Diamidy wykazywały wyższą aktywność niż monoamidy. Pochodne daunorubicyny były bardziej aktywne niż pochodne doksorubicyny. Zwiększenie aktywności uzyskano także poprzez tworzenie dimerów uzyskanych diamidów. Przeprowadzono także syntezę asymetrycznych diamidów, które zawierały dwie różne cząsteczki antracyklin w swojej strukturze. Związki takie wykazywały aktywność podobną do daunorubicyny w stosunku do komórek białaczki [42, 43].



Rycina 7.
Struktura 11-aklacynomycyny X.

Inną metodą uzyskiwania nowych pochodnych jest tworzenie polisacharydów antracyklin. Przykładem takiego związku może być 11-aklacynomycyna X (Rycina 7). Jest to trisacharyd otrzymany ze szczepów *Streptomyces galilaeus*. Wykazuje on znaczną aktywność, zwłaszcza w stosunku do komórek białaczki oraz mięsaków.

Dodatkowo charakteryzuje się znacznie mniejszą kardiotoxycnością niż tradycyjne antracykliny. Na modelach zwierzęcych potwierdzono, że związek ten jest szybko absorbowany po podaniu dożylnym i jest eliminowany w ciągu 24 godzin w postaci niezmienionej, praktycznie tylko z żółcią. Jest to pożądana cecha, gdyż zmniejsza ryzyko wystąpienia nefropatii, często towarzyszącej chemioterapii [44, 45].



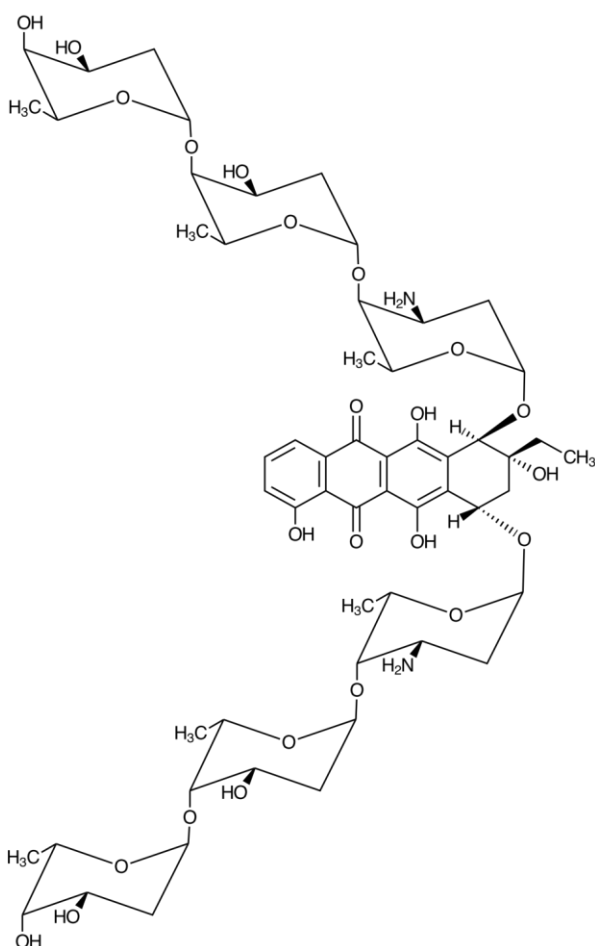
Rycina 8.
Struktura sabarubicyny.

Innym polisacharydem jest sabarubicyna. Jest to pochodna doksorubicyny - disacharyd, w którym druga reszta cukrowa jest połączona glikozydowo w pozycji C4' pierwszej reszty cukrowej (Rycina 8). Związek ten wykazuje większą aktywność niż doksorubicyna, jest w stanie pokonać barierę oporności w komórkach, a także wykazuje znacznie mniejszą kardiotoxycność. Istotne jest również to, że wymaga stosowania znacznie mniejszych dawek niż związek wyjściowy.

W badaniach klinicznych fazy I i II związek wykazywał kardiotoxycność u znacznie mniejszej liczby pacjentów oraz skutki tej kardiotoxycności były znacznie mniej poważne, prowadzące do zmniejszonego ryzyka wystąpienia zastoinowej niewydolności serca [46, 47]. Głównym problemem w terapii tym związkiem była neutropenia, która często zmuszała do obniżenia dawki. Wykazano również niski wpływ sabarubicyny na mitochondrialny DNA

(mDNA), a teoria takiego wpływu jest również sprawdzana w przypadku badania mechanizmu działania antybiotyków antracyklinowych [48, 49].

Amrubicyna jest przykładem antybiotyku antracyklinowego o zmodyfikowanym układzie cukrowym. Częsteczka cukru w tym związku nie zawiera grupy aminowej, natomiast w pozycjach C3' i C4' znajdują się grupy hydroksylowe. Związek ten jest zarejestrowany do leczenia drobnokomórkowego i niedrobnokomórkowego raka płuc w Japonii. Wykazuje dobrą skuteczność, przy odsetku odpowiedzi klinicznych na poziomie 53% [50]. Istotne znaczenie ma również to, że metabolit amrubicyny – amrubicynol – także wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, co pozwala uzyskać dłuższe działanie leku. Głównym działaniem niepożądanym jest silna hepatotoksyczność tego leku, a także zmiany w rozmazie krwi, głównie pod postacią neutropenii [51]. Obecnie związek ten znajduje się w badaniach klinicznych w USA [52].



Rycina 9.
Struktura kosmomycyny D.

Ze szczepu *Streptomyces olindensis* udało się wyizolować kolejną ciekawą pochodną antracyklinową – kosmomycynę D (Rycina 9).

Jest to podwójny trisacharyd. Wykazano, że jest on w stanie indukować apoptozę na podobnym poziomie co doksorubicyna, i jest to proces zależny od czasu. Największy stopień indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych występował po 96 godzinach od podania leku. Kosmomycyna wywołuje również mniej fragmentacji DNA niż doksorubicyna, co jest jednym z mechanizmów działania antracyklin, i jest to związane z różnicami w budowie pomiędzy tymi dwoma związkami [53, 54, 55].

Wymienione przykłady pozwalają mieć nadzieję, że w niedalekiej przyszłości uda się znaleźć nowe pochodne antybiotyków antracyklinowych, które przy zachowaniu skuteczności klinicznej, będą równocześnie powodować znacznie mniej działań niepożądanych.

2.7.2. Nowe postacie leku antybiotyków antracyklinowych

Tworzenie nowych postaci leków dla związków stosowanych w terapii jest drugim ze sposobów zwiększania skuteczności leków oraz ograniczenia ich działań niepożądanych. Osiągnięcia w chemii, biologii oraz medycynie pozwalają nie tylko lepiej zrozumieć patomechanizm choroby, ale również opracować nowoczesne postacie leków, które umożliwią utrzymanie odpowiednich stężeń leku we krwi, powodują większą penetrację leku do miejsca działania, oraz pozwalają minimalizować ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Postacie takie jak aerozole wziewne do leczenia astmy, tabletki o przedłużonym uwalnianiu, systemy transdermalne czy implanty lekowe wszczepiane podskórnym, to tylko niektóre z przykładów nowych postaci leku wynalezionych w drugiej połowie XX wieku, a które istotnie zmieniły terapię wielu chorób. Dla leków stosowanych dożylnie, a do takich należą antybiotyki antracyklinowe, najnowocześniejszą postacią leku, z którą wiąże się również duże nadzieje, są formułacje liposomalne.

Liposomy są fosfolipidami, które mogą być pochodzenia naturalnego lub też można je wytworzyć sztucznie. Zazwyczaj mają kształt małych kuleczek, których jądro stanowi faza wodna o średnicy ok. 1 μm , otoczona podwójną warstwą fosfolipidową, o strukturze przypominającej naturalne błony komórkowe. Całość ma średnicę ok. 5 μm . W fazie wodnej umieszcza się lek, natomiast zewnętrzna warstwa fosfolipidów może być wzbogacana o np. apolipoproteiny. Takie działanie ma na celu ukierunkowanie działania liposomów na komórki zawierające np. specyficzne receptory dla apolipoproteiny, co pozwoliło by odróżnić komórki chore od komórek zdrowych. Takie działanie jest przykładem dążenia do stworzenia terapii celowanej, oszczędzającej komórki zdrowe organizmu.

Zamykanie leków cytotoksycznych, w tym antracyklin, w liposomy ma na celu:

- zwiększenie efektywności terapii
- uzyskanie tego samego efektu klinicznego przy zastosowaniu mniejszych dawek
- przełamanie bariery oporności komórek
- zmniejszenie występowania działań niepożądanych, w tym kardiotoksyczności [56].

Obecnie jest zarejestrowanych kilka preparatów liposomalnych antracyklin, głównie daunorubicyny i doksorubicyny.

W Niemczech oraz Szwajcarii przeprowadzono badania kliniczne z zastosowaniem pegylowanej liposomalnej doksorubicyny w terapii raka piersi. Wykazano zadowalającą skuteczność takiej formuacji, dającej odpowiedzi kliniczne nawet u pacjentów uprzednio leczonych antracyklinami. Najpoważniejsze działania niepożądane dotyczyły alergicznych reakcji skórnych, zespołu dłoń-stopą oraz leukopenii [57]. We Włoszech zbadano skuteczność pegylowanej liposomalnej doksorubicyny w połączeniu z gemcytabiną stosowanych również w terapii raka piersi. Działania niepożądane objawiały się głównie w postaci zespołu dłoń-stopą oraz infekcji grzybiczych. Zanotowano jedynie kilka groźnych epizodów ze strony układu krwionośnego [58].

W badaniach laboratoryjnych znajduje się kompleks liposomalnej doksorubicyny z ligandem białkowym. Ligand ten jest kierunkowany na komórki niedrobnokomórkowego raka płuc. Taki kompleks reagowałby tylko z komórkami chorymi, omijając komórki zdrowe. Pozwoliłoby to na zwiększenie efektywności terapii w sposób znaczący [59].

Oprócz zamykania antracyklin w liposomy, próbuje się również modyfikować sposób ich podawania pacjentom. Przeprowadzono badanie porównujące skuteczność liposomalnej doksorubicyny stosowanej w klasycznym wlewie dożylnym z liposomalną doksorubicyną podawaną przez zestawy do izolowanej perfuzji w płucach. Zestawy takie mają kształt niewielkich implantów wykonanych z tworzywa sztucznego, które wszczepia się bezpośrednio w tkankę guza lub jego najbliższe sąsiedztwo. Stwierdzono znacznie wyższe stężenia doksorubicyny w tkance guza po podaniu z zestawów do izolowanej perfuzji. Powodowało to znacznie lepszą odpowiedź kliniczną oraz znacznie mniejsze ryzyko działań niepożądanych, w tym uszkodzenia zdrowej tkanki płuc [60].

Innym sposobem zwiększania skuteczności liposomalnych postaci antybiotyków antracyklinowych, jest ich stosowanie w terapii łączonej z lekami o działaniu antyangiogennym. Komórki guzów nowotworowych są komórkami intensywnie dzielącymi się i mającymi bardzo duże zapotrzebowanie na tlen i składniki odżywcze. Wydzielają one bardzo dużo substancji indukujących tworzenie nowych naczyń krwionośnych, tak by zapewnić sobie odpowiedni przepływ krwi. Łączenie liposomalnej doksorubicyny z lekiem hamującym angiogenezę – kombretastatyną – jest przykładem nowoczesnej chemioterapii, w której oprócz leków działających przeciwnowotworowo, podaje się również leki wspomagające ich działanie. Taka kombinacja wykazała znacznie lepszą skuteczność niż monoterapia liposomalną doksorubicyną.

bicyną. Istotne jest również zachowanie odpowiednich odstępów czasowych przy podawaniu tych leków [61].

Próbuje się również łączyć klasyczne antracykliny z glikolem polietylenowym w procesie tzw. pegylacji. Można stosować liniowe lub rozgałęzione cząsteczki tego polimeru, a uzyskane pochodne różnią się od siebie skutecznością kliniczną. Kilka najbardziej obiecujących pochodnych jest poddanych dalszym testom [62].

Najnowocześniejszą postacią leku dożylnego są skomplikowane kompleksy cząsteczek pro-leku połączonych z enzymem, który jest aktywowany przez przyłączone do niego przeciwciało. Przykładem takiego kompleksu może być pro-daunorubicyna połączona z β -galaktozydazą oraz przeciwciałem przeciwko antygenowi p97. W wyniku interakcji przeciwciała z antygenem znajdującym się na powierzchni komórek nowotworowych dochodziło do aktywacji enzymu, który z kolei przekształcał pro-lek w jego aktywną formę. Taka kombinacja wykazała znacznie większą skuteczność w badaniach laboratoryjnych [63]. Podobne wyniki uzyskano dla doksorubicyny aktywowanej enzymatycznie w leczeniu raka prostaty. Obiecujące wyniki uzyskano również dla terapii wielolekowych wykorzystujących pegylowaną doksorubicynę w leczeniu raka jajnika, nawet u pacjentów w zaawansowanym stadium choroby [64, 65].

Podsumowując można stwierdzić, że antracykliny są stale rozwijane i mogą być nadal skuteczne w terapii wielu nowotworów. Główne kierunki rozwoju tej grupy obejmują:

- modyfikacje reszty cukrowej, głównie w pozycjach C3' i C4'
- tworzenie di- i trisacharydów oraz podwójnych glikozydów
- tworzenie liposomalnych form tych leków
- tworzenie zaawansowanych kompleksów lek-PEG, lek-białko oraz pro-lek-enzym-białko [66].

2.8. Ocena jakości antybiotyków antracyklinowych

Antybiotyki antracyklinowe, jak wszystkie leki, muszą spełniać określone wymogi jakościowe. Metody, którymi można badać czystość tych substancji są szczegółowo opisane w Farmakopeach obowiązujących w danym kraju. W Polsce obowiązująca obecnie jest Farmakopea Polska IX, która jest zgodna z Farmakopeą Europejską 7.0.

Tabela 2 zawiera przykłady metod analitycznych stosowanych w analizie antybiotyków antracyklinowych. Metody te podzielono w zależności czy próbka jest próbką czystej substancji lub czy została pobrana z materiału biologicznego.

Tabela 2.

Przykłady metod analitycznych stosowanych w badaniach jakościowo-ilościowych antybiotyków antracyklinowych

Substancja	Metoda
<i>Próbki czystej substancji</i>	
Epirubicyna	Metoda HPLC z detekcją UV [67]
Idarubicyna	Metoda HPLC z detekcją fluorescencyjną [68]
Dokсорubicyna, epirubicyna oraz 8 innych leków cytotoxycznych	Metoda HPLC z detekcją MS – próbki pobierane z powierzchni roboczych w szpitalach [69]
Daunorubicyna, dokсорubicyna i ich aglikony	Metoda HPLC z detekcją fluorescencyjną – preparaty farmaceutyczne [70]
<i>Próbki z materiału biologicznego</i>	
Idarubicyna	Metoda HPLC z detekcją fluorescencyjną – osocze [68]
Daunorubicyna, dokсорubicyna, epirubicyna, idarubicyna i ich metabolity	Metoda HPLC z detekcją fluorescencyjną – osocze, ślina [71]
Daunorubicyna, dokсорubicyna, epirubicyna, idarubicyna i ich metabolity	Metoda HPLC z detekcją MS – osocze [72]
Epirubicyna i jej metabolit	Metoda HPLC z detekcją fluorescencyjną – osocze, ślina [73]
Dokсорubicyna i jej metabolit oraz cyklofosfamid	Metoda HPLC z detekcją MS – osocze [74]
Dokсорubicyna, daunorubicyna, epirubicyna oraz docetaksel i paklitaksel	Metoda HPLC z detekcją UV – osocze [75]
Dokсорubicyna i jej metabolit	Metoda HPLC z detekcją chemiluminescencyjną po aktywacji światłem – osocze [76]
Dokсорubicyna, epirubicyna i ich metabolity	Metoda HPLC z detekcją elektrochemiczną – osocze [77]

Główną metodą stosowaną w analizie antybiotyków antracyklinowych jest metoda wysokiej sprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem różnego typu detektorów. Głównym typem detekcji jest detekcja fluorescencyjna, stosowana często w analizie tej grupy związków. Przy badaniu materiału biologicznego istotne znaczenie ma również detektor MS, zwłaszcza jeśli prowadzona jest analiza jakościowa substratów i ich produktów. Istotne znaczenie ma fakt, że wszystkie typy detektorów charakteryzują się podobnymi wartościami zakresu oznaczalności [78].

2.9. Badania trwałości

Celem badania trwałości substancji czynnej lub produktu leczniczego jest określenie do jakich przemian chemicznych lub fizycznych dochodzi w czasie, pod wpływem czynników otoczenia [79-86]. W badaniach tych uwzględnia się wpływ m.in. temperatury, wilgotności względnej powietrza, tlenu i światła. Badania takie umożliwiają określenie terminu ważności substancji czynnej i postaci leku oraz warunki ich przechowywania. Bardzo ważnym czynnikiem w tym badaniu jest także dobór odpowiedniego opakowania substancji i postaci leku, bowiem testy przyspieszonego starzenia powinny być przeprowadzane w opakowaniu ostatecznym. Niewłaściwe opakowanie może w sposób istotny wpływać na trwałość leków.

Badania trwałości produktu leczniczego w opakowaniu ostatecznym wykonuje się w określonych warunkach przechowywania w czasie, który będzie odpowiadał magazynowaniu, transportowi oraz użyciu przez pacjenta. Wśród badania trwałości produktu leczniczego wyróżnia się badania długookresowe, pośrednie, przyspieszone i stresowe. Każde z tych badań ma ściśle zdefiniowane warunki i czas prowadzenia badania.

Lek jest uznawany za trwały, jeżeli odpowiada specyfikacji w czasie badań długookresowych, natomiast w czasie badań przyspieszonych nie dochodzi w nim do istotnych zmian, takich jak:

- zmiana zawartości substancji czynnej o 5% w stosunku do wartości początkowej
- powstanie produktu rozkładu, który przekracza kryterium akceptacji
- niespełnienie kryterium akceptacji dla parametru wygląd, właściwości fizyczne, pH oraz uwalnianie.

W badaniach trwałości uwzględnia się także badanie fotostabilności nowych substancji czynnych oraz nowych postaci leków. Termin fotostabilność odnosi się nie tylko do rozkładu spowodowanego ekspozycją na światło, ale także do procesów związanych z tworzeniem

rodników, transferem energii i luminescencją. Podczas badania fotostabilności należy zwrócić uwagę na tzw. efekt temperaturowy i umieszczać równoległe z próbami badanymi próby odniesienia, owinięte w folię aluminiową oraz zapewnić odpowiednie rozmieszczenie prób i kontrolować natężenie promieniowania. Do badań trwałości produktów leczniczych został opracowany schemat decyzyjny, na podstawie którego określa się poziom dopuszczalnych zmian.

3. CEL PRACY

Badania trwałości substancji leczniczych są jednym z podstawowych elementów kompleksowej oceny ich jakości i są uregulowane odpowiednimi przepisami. Celem mojej pracy była ocena trwałości nowej pochodnej daunorubicyny, zmodyfikowanej w pozycji C3' daunozaminy – *N*-[(piperidyno)metyleno]daunorubicyny (PPD) w roztworach wodnych, obejmująca trwałość w roztworach o standaryzowanym pH oraz roztwory płynów infuzyjnych. Dodatkowo wykonano również badania trwałości tej substancji w fazie stałej oraz badania fototrwałości roztworu substancji. Ocenę zmian stężenia badanego związku wykonano stosując wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz, z detekcją UV.

Do zrealizowania założeń celu pracy niezbędne było:

- opracowanie metody oznaczania, pozwalającej na obserwację zmian stężenia substratu w obecności produktów jego rozkładu i wzorca wewnętrznego (HPLC)
- przeprowadzenie walidacji metod, obejmującej selektywność, liniowość, precyzję, granicę wykrywalności i oznaczalności metody
- wykonanie badań kinetycznych, obejmujących ogólną i właściwą katalizę kwasowo-zasadową
 - wpływ stężenia jonów wodorowych
 - wpływ rodzaju i stężenia składników buforów
 - wpływ siły jonowej
- zinterpretowanie:
 - ogólnej i właściwej katalizy kwasowo-zasadowej i wyznaczenie katalitycznych stałych szybkości reakcji cząstkowych
 - wpływu temperatury na szybkość rozkładu
 - wpływu siły jonowej na szybkość rozkładu
- określenie trwałości PPD w płynach infuzyjnych powszechnie stosowanych w lecznictwie
- określenie fotostabilności PPD w roztworach wodnych

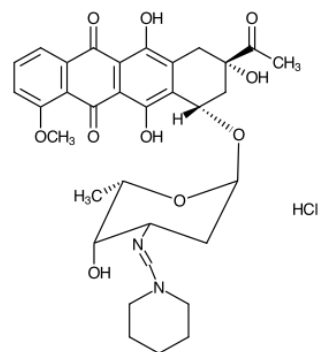
– określenie trwałości PPD w fazie stałej.

N-[(piperydino)metyleno]daunorubicyna (PPD) jest jedną z czterech amidynowych pochodnych daunorubicyny, otrzymanych w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Inne pochodne – *N*-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyna (PMD), *N*-[(morfolino)metyleno]daunorubicyna (MMD) i *N*-[(heksahydroazepin-1-ylo)metyleno]daunorubicyna (HMD) były także przedmiotem badań w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Substancja badana

Chlorowodorek *N*-[(piperydyno)metyleno]daunorubicyny (PPD), otrzymany w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Substancja krystaliczna, o charakterystycznym, czerwonym zabarwieniu.



4.2. Odczynniki

- Acetonitryl, chromatograficznie czysty; POCH Gliwice
- Chininy chlorowodorek, cz.d.a.; Sigma Aldrich – wzorec wewnętrzny
- Kwas borowy, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Kwas octowy, odważka analityczna; POCH Gliwice
- Kwas fosforowy(V), 85%, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Kwas solny, odważka analityczna; POCH Gliwice
- Metanol, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Potasu diwodorofosforan, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Sodu chlorek; POCH Gliwice
- Sodu edetynian, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Sodu laurylosiarczan, cz.d.a.; Sigma Aldrich
- Sodu octan, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Sodu wodorotlenek, odważka analityczna; POCH Gliwice
- Woda demineralizowana z aparatu do demineralizacji USF T – 801965/8903
- Roztwory płynów infuzyjnych (Tabela 3)

Tabela 3.

Roztwory infuzyjne wykorzystane w badaniach

Rodzaj roztworu	Producent	Objętość [ml]
Aqua pro injectione	Polpharma	5
0,9% Natrium Chloratum pro injectione	Polpharma	5
5% Glucosum	Fresenius Kabi	100
10% Injectio Glucosi	Baxter Terpol	250
20% Injectio Glucosi	Baxter Terpol	250
Solutio Ringeri	Baxter Terpol	250
Solutio Ringeri Lactate	Fresenius Kabi	500
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (1:1)	Fresenius Kabi	250
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1)	Fresenius Kabi	250
Płyn pediatryczny wyrównawczy	Baxter Terpol	250
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	Fresenius Kabi	250
Jonosteril® Basic z glukozą	Fresenius Kabi	500
20% Mannitol	Fresenius Kabi	100

4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy

- Wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC Shimadzu:
 - detektor Shimadzu SPD-20A Prominence UV/Vis Detector
 - dozownik z pętlą dozującą Rheodyne Berkeley 7120
 - integrator komputerowy POL LAB Chroma wersja 2006
 - komputer Fujitsu Simens
 - pompa Shimadzu LC-20AT Prominence LIQUID CHROMATOGRAPH
 - termostat Shimadzu CTO-10AS VP Column Oven
- Spektrofotometr UV-160A Shimadzu, z oprogramowaniem PC160Plus
- Radiometr typ VLX-3W z sensorem CX-365, Viber Lourmat
- Wysokociśnieniowa lampa UV-VIS z palnikiem rtęciowym, HBO-50 Nova
- Zestaw lamp odpowiadających standardowi D-65
- Waga analityczna Sartorius BP210S
- pH-metr Elmetron CP-401

- Aparat do demineralizacji wody USF T-801965/8903, kolumna jonowymienna Sera-dest USF800 z węzłem połączeniowym, komorą pomiarową, konduktorem diodowym LSM i dystrybutorem
- Ultratermostat Fisherbrand FBH-612
- Mikrostrzykawka 50 μ l Microliter Hamilton Co, Reno Nevada USA
- Mieszadło REAX top 451
- Lodówka z zamrażalnikiem Polar typ TS136U wersja 638
- Igły Micropoint 1,6 \times 40 mm MIFAM S.A. Milanówek, Polska
- Strzykawki 10 ml Romed, Holandia
- Ampułki polietylenowe Polpharma, Polska
- Kuwety okrągłe kwarcowe do naświetlań o pojemności 2,8 ml i grubości warstwy $l = 1$ cm oraz kuwety podłużne kwarcowe do naświetlań o pojemności 2,5 ml i grubości warstwy $l = 1$ cm Hellma
- Filtr szklany 365 nm oraz 510 nm Pyrex
- Stoper
- Pakiet oprogramowania MS Office
- Program ChemDoodle

4.4. Metody analityczne stosowane w ocenie trwałości *N*-[(piperydino)metyleno]daunorubicyny (PPD)

Do badania trwałości PPD w roztworach wodnych oraz w fazie stałej zastosowano metodę HPLC z detekcją UV, która umożliwia obserwację zmian stężeń substratu w czasie reakcji rozkładu w obecności produktów rozkładu [87]. Parametry rozdziału chromatograficznego były następujące:

- *kolumna*: Lichrospher 100RP-18 (5 μ m) o wymiarach 125 \times 4 mm, Merck Darmstadt, Niemcy
- *faza ruchoma*: acetonitryl : 2,88 g/l roztwór laurylosiarczanu sodu z dodatkiem 1,6 ml kwasu fosforowego(V) 85% : metanol (9:10:1 V/V/V)
- szybkość przepływu: 1,5 ml/min
- detekcja: UV przy $\lambda = 254$ nm
- wzorzec wewnętrzny: roztwór chlorowodoru chininy o stężeniu 50 μ g/ml

W badaniach podatności PPD na rozkład pod wpływem światła, zastosowano metodę UV-VIS.

Przeprowadzono walidację metod w celu potwierdzenia ich przydatności w oznaczaniu trwałości PPD [88]. Walidacji podlegały następujące parametry:

- selektywność
- liniowość
- precyzja
- granica wykrywalności i oznaczalności.

4.4.1. Metoda HPLC

Do walidacji metody HPLC użyto:

- substancji badanej – próbki nierozłożonej oraz próbki poddanej rozkładowi w:
 - 0,30 mol/l kwasie solnym w temperaturze 333 K
 - w 0,10 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 313 K
 - w fazie stałej w temperaturze 373 K, przy RH~76,4%
- chlorowodoru chininy – wzorzec wewnętrzny.

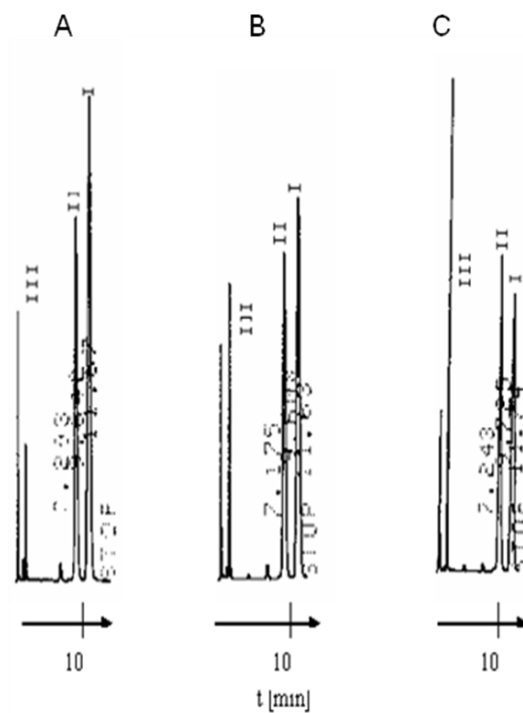
Selektywność metody

W przedziale czasu 0 – 15 min na chromatogramach zarejestrowano piki:

- substancji badanej PPD, $t_R \sim 12,0$ min
- wzorca wewnętrznego, $t_R \sim 10$ min
- produktów rozkładu PPD

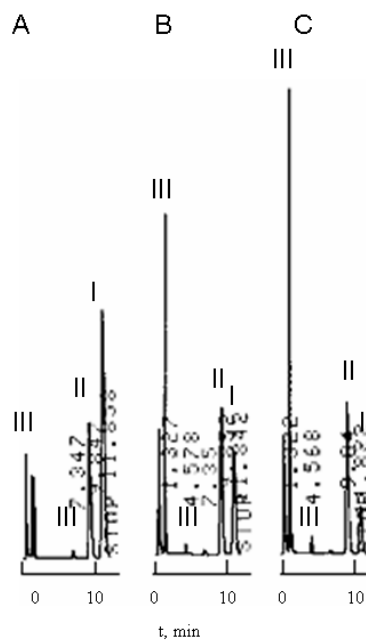
(Rycina 10, 11, 12).

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



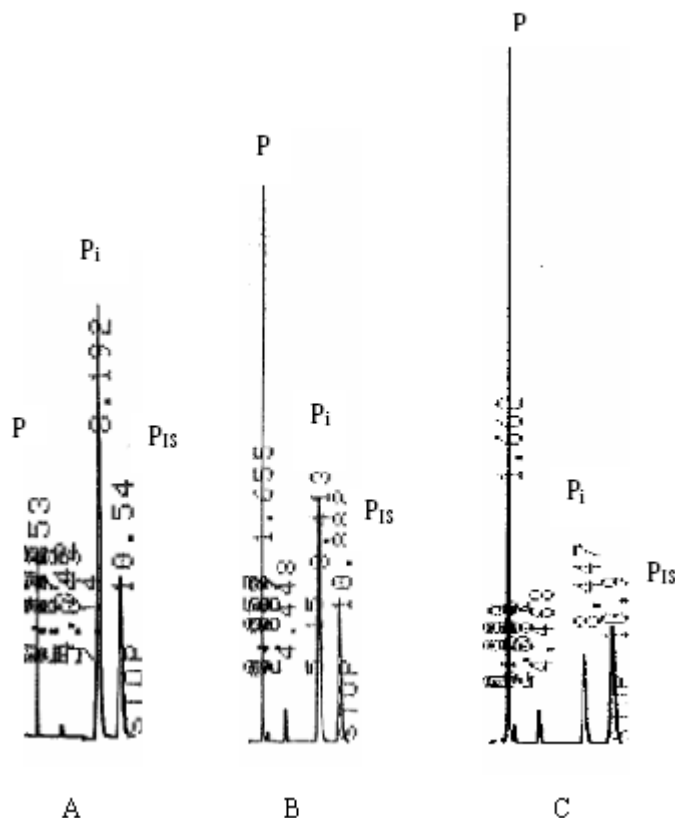
Rycina 10.

Chromatogramy HPLC PPD w 0,30 mol/l HCl ($\mu = 0,50$ mol/l), w temperaturze 333 K, po $t = 0$ min (A), $t = 5$ min (B), $t = 15$ min (C); I = PPD, II = chlorowodorek chininy (wzorec wewnętrzny), III – produkty rozkładu.



Rycina 11.

Chromatogramy HPLC PPD w 0,10 mol/l roztworze wodorotlenku sodu ($\mu = 0,50$ mol/l) w temperaturze 313 K, po $t = 0$ min (A), $t = 5$ min (B), $t = 15$ min (C); I = PPD, II = chlorowodorek chininy (wzorec wewnętrzny), III – produkty rozkładu.



Rycina 12.

Chromatogramy HPLC PPD poddanej przyspieszonemu starzeniu w temperaturze 373 K, przy RH~76,4%: A – po czasie $t = 0$ h; B – po czasie $t = 86$ h; C – po czasie $t = 99$ h; P_i – PPD; $t_R \sim 12$ min, P_{IS} – wzorzec wewnętrzny – chlorowodorek chininy; $t_R \sim 10$ min, P – produkty rozkładu PPD; $t_R \sim 2$ min i 5 min.

Liniowość metody

Liniowość metody określono dla zakresu stężeń PPD od 0,0080 mg/ml do 0,2500 mg/ml. Wzorcem wewnętrznym był roztwór chlorowodoru chininy o stężeniu 50 μ g/ml.

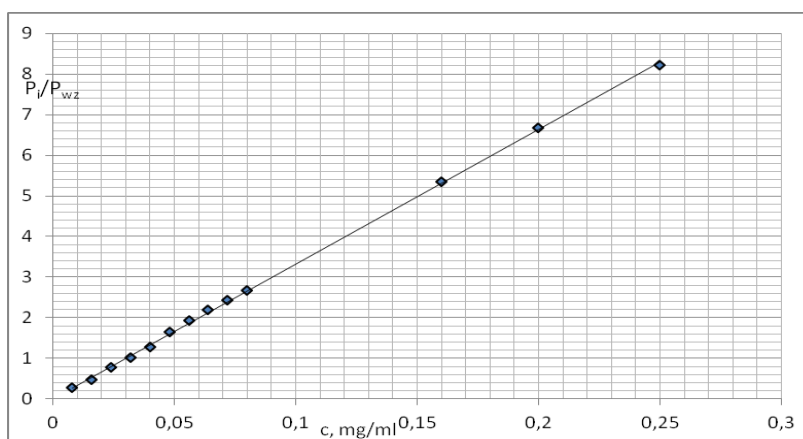
Roztwór substancji badanej

8,0 mg substancji badanej rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do 25,0 ml. Roztwór podstawowy rozcieńczono, uzyskując po dodaniu do 1,0 ml roztworu badanego 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, roztwory o stężeniu od 0,008 mg/ml do 0,2500 mg/ml.

Tabela 4.

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

L.p.	c [mg/ml]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna prostych	
			$y = ax + b$	$y = ax$
1	0,0080	0,2740	$a = 33,16 \pm 0,42$ $b = -0,01326 \pm 0,04528$ $S_a = 0,1898$ $S_b = 0,02057$ $S_y = 0,04947$ $t_b = 0,6444$ $r = 0,9998$	$a = 33,25 \pm 0,40$ $S_a = 0,1817$ $S_y = 0,04737$ $r = 0,9998$
2	0,0160	0,4851		
3	0,0240	0,7725		
4	0,0320	1,0263		
5	0,0400	1,2892		
6	0,0480	1,6430		
7	0,0560	1,9412		
8	0,0640	2,1906		
9	0,0720	2,4350		
10	0,0800	2,6815		
11	0,1600	5,3501		
12	0,2000	6,6700		
13	0,2500	8,2345		



Rycina 13.

Zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla PPD w zakresie stężeń od 0,0080 do 0,2500 mg/ml.

Wykres zależności $P_i/P_{wz} = f(c)$ jest prostoliniowy (Rycina 13). Na podstawie obliczonych parametrów prostych (Tabela 4) stwierdzono, że wyznaczona z powyższej zależności wartość t_b jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,05}$ i stąd wartość współczynnika b jest nieistotna ($b = 0$), zatem zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ opisuje równanie $y = ax$.

Precyzja metody

W celu określenia precyzji metody, przygotowano po 8 roztworów PPD o stężeniu odpowiednio: 0,04 mg/ml, 0,053 mg/ml i 0,08 mg/ml (Tabela 5). Roztwory zawierały dodatek wzorca wewnętrznego.

Tabela 5.
Wyniki oznaczania PPD w roztworach o stężeniu 0,04, 0,053 i 0,08 mg/ml

L.p.	c = 0,04 mg/ml		c = 0,053 mg/ml		c = 0,08 mg/ml	
	P _i /P _{wz}	Parametry statystyczne	P _i /P _{wz}	Parametry statystyczne	P _i /P _{wz}	Parametry statystyczne
1	1,7780	$\bar{x}_{sr} = 1,6920$ $s^2 = 6,8780 \cdot 10^{-3}$ $s = 0,0892$ $S_y = 0,0293$ $W_z = 4,90 \%$	3,1497	$\bar{x}_{sr} = 3,2710$ $s^2 = 1,4800 \cdot 10^{-2}$ $s = 0,1216$ $S_y = 0,0430$ $W_z = 3,72 \%$	4,9704	$\bar{x}_{sr} = 4,8630$ $s^2 = 5,3560 \cdot 10^{-2}$ $s = 0,2314$ $S_y = 0,0818$ $W_z = 4,58 \%$
2	1,7710		3,5496		5,1977	
3	1,7853		3,2938		5,1104	
4	1,6785		3,1868		4,6118	
5	1,6533		3,2790		4,8717	
6	1,6388		3,2355		4,8960	
7	1,6839		3,2399		4,6962	
8	1,5463		3,2347		4,5499	

\bar{x}_{sr} – wartość średnia; s^2 – wariancja; s – odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_y – względne odchylenie standardowe; W_z – współczynnik zmienności

Metodę można uznać za precyzyjną, gdyż uzyskane wartości współczynnika zmienności W_z nie przekraczają 5%.

Granica wzkrzalności i oznaczalności

Granice wzkrzalności obliczono ze wzoru $DL = 3,3 S_y/a$ i wynosi ona 5,25 µg/ml, natomiast granice oznaczalności ze wzoru $QL = 10 S_y/a$ i wynosi ona 16,03 µg/ml.

Zakres i czułość metody

Zakres metody to przedział pomiędzy najwyższym i najniższym stężeniem substancji badanej, przy którym oznaczanie jest prowadzone z odpowiednią precyzją w liniowym zakresie stężeń substancji. Dla zastosowanych parametrów rozdzielania wynosi on od 0,016 do 0,250 mg/ml.

Metoda jest czuła, gdyż przy niewielkiej zmianie wartości oznaczanej obserwowano znaczący przyrost wartości mierzonej. Miarą czułości metody jest nachylenie krzywej wzorcowej, które wynosi $33,25 \pm 0,40$.

4.4.2. Metoda UV-VIS

Do oceny fototrwałości PPD w roztworach wodnych wykorzystano metodę UV-VIS [89]. Natężenie światła mierzone radiometrem mieściło się w zakresie $86,0 - 89,0 \text{ mW/cm}^2$, a w czasie 1 min rejestrowano energię $5,10 - 5,30 \text{ J/cm}^2$.

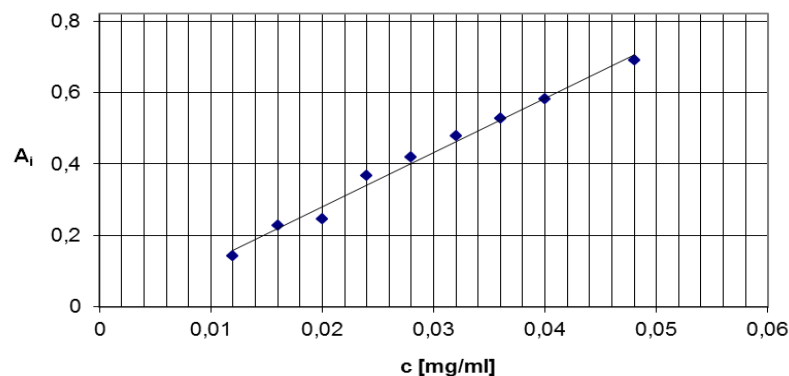
Liniowość metody

Przygotowano roztwory wzorcowe PPD w zakresie stężeń od 0,012 do 0,06 mg/ml. i wykreślono widma w zakresie 200 – 800 nm (Tabela 6). Wykonano wykresy zależności absorbancji próbki A_i przy 480 nm, od stężenia c . Wykresy te były prostoliniowe (Rycina 14). Wyznaczono parametry prostych $y = ax + b$ oraz $y = ax$, zbadano istotność współczynnika b i stwierdzono, że wartość bezwzględna t_b jest mniejsza od wartości krytycznej ($t_{obl} = 0,0027 < t_{0,05} = 2,262$). Stwierdzono więc, że wartość współczynnika b jest nieistotna ($b = 0$).

Tabela 6.

Zależność $A_i = f(c)$ dla PPD i ocena statystyczna prostych $y = ax + b$ i $y = ax$

Lp.	c [mg/ml]	A_i	Ocena statystyczna prostych	
			$y = ax + b$	$y = ax$
1	0,012	0,4200	$a = 14,21 \pm 1,38$ $b = 0,001 \pm 0,048$ $r = 0,9930$ $t_b = 0,0027$ $S_a = 0,5986$ $S_b = 0,0207$ $S_y = 0,0268$	$a = 14,22 \pm 1,30$ $r = 0,9930$ $S_a = 0,5644$ $S_y = 0,0252$
2	0,016	0,2800		
3	0,020	0,2450		
4	0,024	0,3670		
5	0,028	0,4180		
6	0,032	0,4780		
7	0,036	0,5290		
8	0,040	0,5814		
9	0,048	0,6890		
10	0,060	0,8164		



Rycina 14.
Zależność $A_i = f(c)$ dla PPD w roztworze wodnym przy $\lambda = 480$ nm.

Precyzja metody

W celu określenia precyzji metody przygotowano cztery serie roztworów PPD o stężeniach 0,020 (A1), 0,024 (A2), 0,032 (A3) i 0,040 mg/ml (A4), i wykonano po 6 oznaczeń dla każdej serii przy długości fali $\lambda = 480$ nm (Tabela 7, 8).

Tabela 7.
Wyniki oznaczania PPD o stężeniu A1, A2, A3 i A4

Lp.	A1 = 0,020 mg/ml	A2 = 0,024 mg/ml	A3 = 0,032 mg/ml	A4 = 0,040 mg/ml
1	0,2862	0,4084	0,5229	0,6260
2	0,2885	0,4106	0,5230	0,6286
3	0,2924	0,4155	0,5242	0,6284
4	0,2948	0,4160	0,5266	0,6284
5	0,2950	0,4164	0,5263	0,6297
6	0,2961	0,4188	0,5262	0,6292

Tabela 8.
Ocena statystyczna wyników wyznaczania precyzji metody UV-VIS dla PPD

Parametr	Roztwór A1	Roztwór A2	Roztwór A3	Roztwór A4
Wartość średnia A_{sr}	$2,92 \cdot 10^{-1}$	$4,14 \cdot 10^{-1}$	$5,25 \cdot 10^{-1}$	$6,28 \cdot 10^{-1}$
Wariancja	$1,59 \cdot 10^{-1}$	$1,55 \cdot 10^{-1}$	$2,93 \cdot 10^{-1}$	$1,63 \cdot 10^{-1}$
Odchylenie standardowe pojedynczego wyniku: S	$4,00 \cdot 10^{-3}$	$3,90 \cdot 10^{-3}$	$1,70 \cdot 10^{-3}$	$1,30 \cdot 10^{-3}$
Względne odchylenie standardowe: S_x	$1,60 \cdot 10^{-3}$	$1,60 \cdot 10^{-3}$	$7,00 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-4}$
Współczynnik zmienności: W_z [%]	0,136	0,950	0,326	0,203

Granica wykrywalności i oznaczalności metody UV-VIS

Granica wykrywalności (DL) dla PPD wynosi $5,85 \cdot 10^{-3}$ mg/ml, natomiast granica oznaczalności (QL) wynosi $1,78 \cdot 10^{-2}$ mg/ml.

4.5. Ocena trwałości PPD w roztworach wodnych

4.5.1. Warunki badań kinetycznych

Wszystkie badane roztwory były chronione przed światłem

Trwałość PPD w roztworach wodnych badano w zakresie pH od 0,43 do 13,54, zachowując stałą wartość siły jonowej $\mu = 0,50$ mol/l.

Odpowiednie pH uzyskano stosując następujące roztwory buforowe:

- kwas solny o stężeniu od 0,01 mol/l do 0,50 mol/l; pH 0,43 – 2,05
- bufor fosforanowy ($\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$); pH 1,70 – 2,81
- bufor octanowy ($\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$); pH 3,96 – 5,55
- bufor fosforanowy ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$); pH 5,82 – 7,30
- bufor boranowy ($\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NaOH}$); pH 7,64 – 9,21
- roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu od 0,05 do 0,50 mol/l; pH 12,60 do 13,54.

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

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

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

Wartości współczynników aktywności (f_{HCl} i f_{NaOH}) zaczerpnięto z piśmiennictwa, lub otrzymano poprzez interpolację danych literaturowych [88].

Roztwory buforowe (25 ml) o określonej wartości pH, przygotowano z dodatkiem Na₂EDTA (0,004 mol/l) i termostatowano w odpowiedniej temperaturze. Po ogrzaniu roztworu do temperatury badania, dodawano 1,0 ml roztworu substancji badanej (PPD) o stężeniu 2 mg/ml i mieszano.

W określonych odstępach czasu, zależnych od szybkości rozkładu PPD, pobierano 1,0 ml analizowanego roztworu, który natychmiast chłodzono w wodzie z lodem. Roztwory o pH powyżej 8, doprowadzono do pH ok. 2 kwasem solnym o odpowiednim stężeniu. Do roztworu dodawano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, mieszano i wprowadzano na kolumnę chromatograficzną 20 µl roztworu. Rejestrowano sygnały substancji badanej, produktów rozkładu i wzorca wewnętrznego.

4.5.2. Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu PPD

Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu PPD w roztworach wodnych wyznaczono stosując metodę HPLC z detekcją UV. Interpretację zmian stężenia substratu jako funkcję czasu przeprowadzono wykorzystując stosunek pola powierzchni piku PPD do pola powierzchni piku wzorca wewnętrznego. Półlogarytmiczne wykresy $P_i/P_{wz} = f(t)$ są opisane równaniem reakcji pseudopierwszego rzędu :

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

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

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

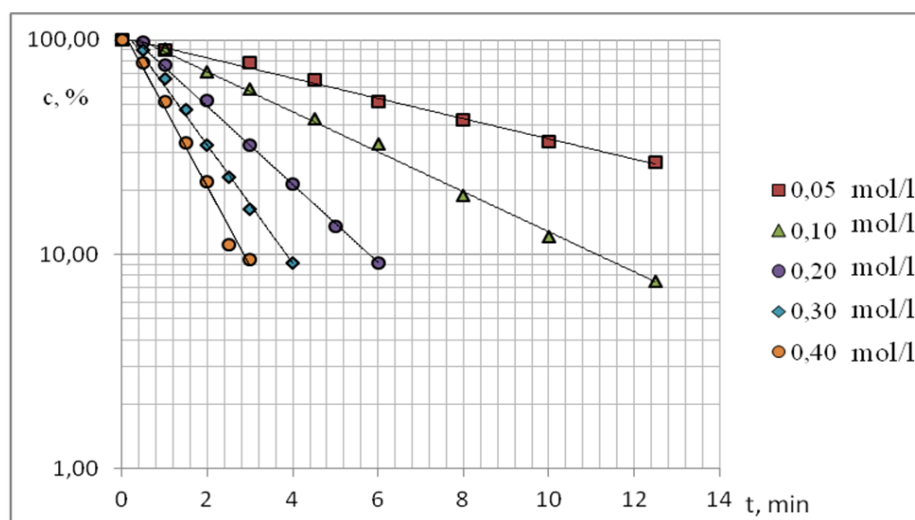
Do interpretacji w/w prostoliniowych wykresów, obliczono metodą najmniejszych kwadratów następujące parametry równania $y = ax + b$: $a \pm \Delta a$, $b \pm \Delta b$, błędy standardowe S_a , S_b , S_y oraz współczynnik korelacji linowej r . Wartości $\pm \Delta a$ i $\pm \Delta b$ obliczono dla $f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

Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 15 – 49 i w tabelach 9 – 32. Graficznie wyniki zostały przedstawione w postaci półlogarytmicznych wykresów $c, \% = f(t)$.

Tabela 9.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w kwasie solnym, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

Warunki reakcji HCl [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,40	$-(0,847 \pm 0,02)$	$4,53 \times 10^{-2}$	$(14,1 \pm 1,9) \times 10^{-3}$	-0,993	7
0,30	$-(0,634 \pm 0,055)$	$2,26 \times 10^{-2}$	$(10,6 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	-0,996	8
0,20	$-(0,419 \pm 0,028)$	$1,12 \times 10^{-2}$	$(6,98 \pm 0,46) \times 10^{-3}$	-0,998	8
0,10	$-(0,215 \pm 0,011)$	$4,49 \times 10^{-3}$	$(3,58 \pm 0,18) \times 10^{-3}$	-0,998	9
0,05	$-(0,109 \pm 0,008)$	$3,25 \times 10^{-3}$	$(1,84 \pm 0,13) \times 10^{-3}$	-0,997	8



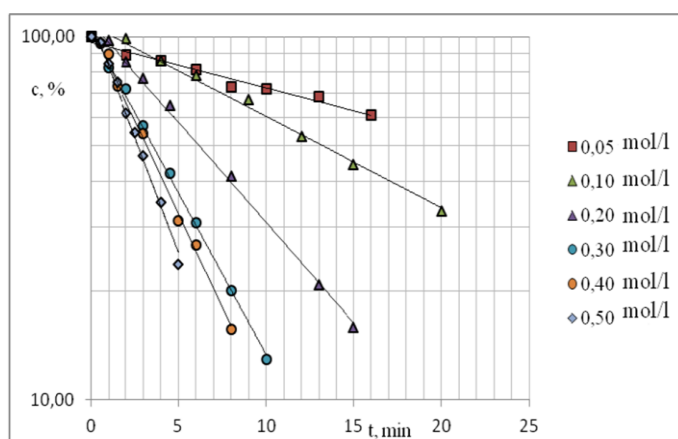
Rycina 15.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w kwasie solnym, w temperaturze 343 K, ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 10.

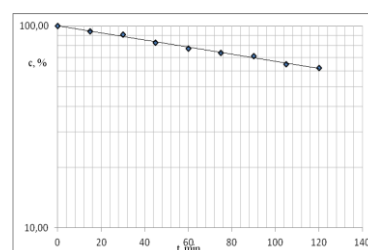
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PMD w kwasie solnym, w temperaturze 333 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

Warunki reakcji HCl [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(0,294 \pm 0,028)$	$1,18 \times 10^{-2}$	$(4,89 \pm 0,47) \times 10^{-3}$	-0,994	9
0,40	$-(0,237 \pm 0,015)$	$0,617 \times 10^{-2}$	$(3,96 \pm 0,25) \times 10^{-3}$	-0,998	8
0,30	$-(0,206 \pm 0,008)$	$0,332 \times 10^{-2}$	$(3,43 \pm 0,14) \times 10^{-3}$	-0,999	8
0,20	$-(0,127 \pm 0,008)$	$0,326 \times 10^{-2}$	$(2,11 \pm 0,13) \times 10^{-3}$	-0,998	8
0,10	$-(0,0578 \pm 0,0055)$	$0,226 \times 10^{-2}$	$(0,963 \pm 0,092) \times 10^{-3}$	-0,995	8
0,05	$-(0,0289 \pm 0,0050)$	$0,205 \times 10^{-2}$	$(0,481 \pm 0,084) \times 10^{-3}$	-0,985	8
0,01	$-(0,405 \pm 0,029) \times 10^{-2}$	$0,123 \times 10^{-3}$	$(0,676 \pm 0,049) \times 10^{-4}$	-0,997	9



Rycina 16.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w kwasie solnym, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50$ mol/l).



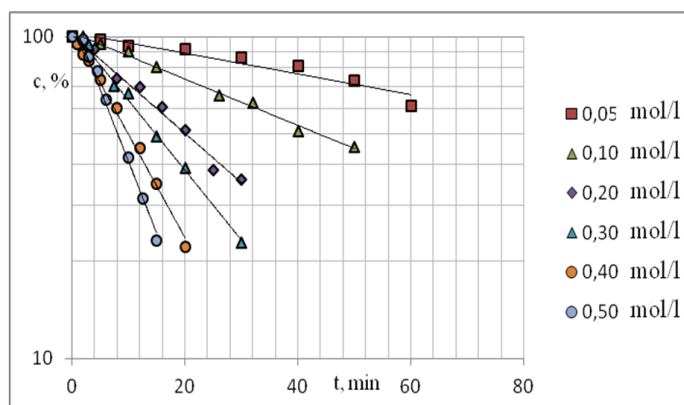
Rycina 17.

Półlogarytmiczny wykres zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w 0,01 mol/l kwasie solnym, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

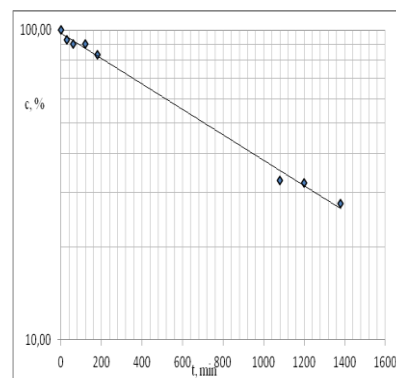
Tabela 11.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w kwasie solnym, w temperaturze 323 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

Warunki reakcji HCl [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(10,3 \pm 1,3) \times 10^{-2}$	$0,517 \times 10^{-2}$	$(17,2 \pm 2,1) \times 10^{-4}$	-0,993	8
0,40	$-(7,39 \pm 0,48) \times 10^{-2}$	$0,202 \times 10^{-2}$	$(12,3 \pm 0,80) \times 10^{-4}$	-0,997	9
0,30	$-(5,00 \pm 0,30) \times 10^{-2}$	$0,126 \times 10^{-2}$	$(8,34 \pm 0,50) \times 10^{-4}$	-0,998	9
0,20	$-(3,53 \pm 0,40) \times 10^{-2}$	$0,170 \times 10^{-2}$	$(5,88 \pm 0,67) \times 10^{-4}$	-0,992	9
0,10	$-(1,66 \pm 0,13) \times 10^{-2}$	$0,054 \times 10^{-2}$	$(2,76 \pm 0,21) \times 10^{-4}$	-0,996	9
0,05	$-(0,741 \pm 0,208) \times 10^{-2}$	$0,851 \times 10^{-3}$	$(1,24 \pm 0,35) \times 10^{-4}$	-0,963	8
0,01	$-(9,48 \pm 0,22) \times 10^{-4}$	$1,17 \times 10^{-3}$	$(0,158 \pm 0,010) \times 10^{-4}$	-0,998	8



Rycina 18.

Półlogarytmiczny wykres zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w kwasie solnym, w temperaturze 323 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

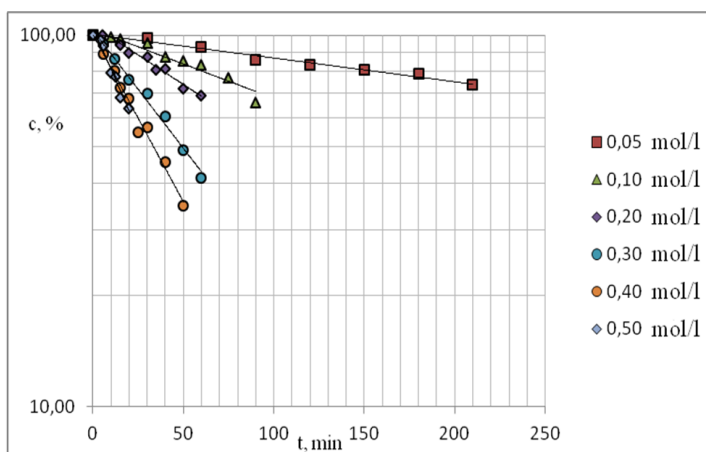
Rycina 19.

Półlogarytmiczny wykres zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w 0,01 mol/l kwasie solnym, w temperaturze 323 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

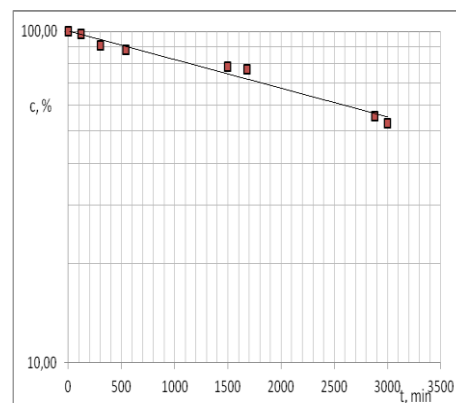
Tabela 12.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w kwasie solnym, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

Warunki reakcji, HCl [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(2,59 \pm 0,49) \times 10^{-2}$	$2,02 \times 10^{-3}$	$(4,32 \pm 0,82) \times 10^{-4}$	-0,982	8
0,40	$-(2,07 \pm 0,23) \times 10^{-2}$	$0,963 \times 10^{-3}$	$(3,46 \pm 0,38) \times 10^{-4}$	-0,993	9
0,30	$-(1,46 \pm 0,15) \times 10^{-1}$	$0,623 \times 10^{-3}$	$(2,43 \pm 0,25) \times 10^{-4}$	-0,995	8
0,20	$-(0,972 \pm 0,126) \times 10^{-2}$	$0,533 \times 10^{-3}$	$(1,62 \pm 0,21) \times 10^{-4}$	-0,982	9
0,10	$-(0,426 \pm 0,093) \times 10^{-2}$	$0,401 \times 10^{-3}$	$(0,709 \pm 0,154) \times 10^{-4}$	-0,966	10
0,05	$-(0,147 \pm 0,021) \times 10^{-2}$	$0,086 \times 10^{-3}$	$(0,245 \pm 0,035) \times 10^{-4}$	-0,990	8
0,01	$-(7,92 \pm 0,84) \times 10^{-4}$	$1,38 \times 10^{-5}$	$(0,132 \pm 0,026) \times 10^{-4}$	-0,986	8



Rycina 20.

Półlogarytmiczny wykres zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w kwasie solnym, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

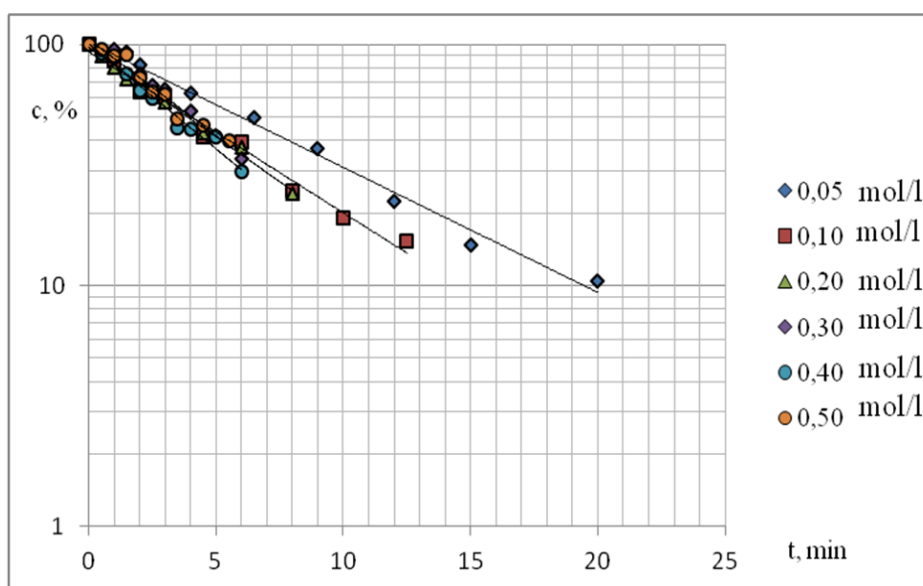
Rycina 21.

Półlogarytmiczny wykres zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w 0,01 mol/l kwasie solnym, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 13.

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

Warunki reakcji, NaOH [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(0,184 \pm 0,030)$	$1,32 \times 10^{-2}$	$(3,07 \pm 0,51) \times 10^{-3}$	-0,980	10
0,40	$-(0,201 \pm 0,025)$	$1,09 \times 10^{-2}$	$(3,35 \pm 0,42) \times 10^{-3}$	-0,988	10
0,30	$-(0,197 \pm 0,025)$	$1,08 \times 10^{-2}$	$(3,29 \pm 0,41) \times 10^{-3}$	-0,988	10
0,20	$-(0,171 \pm 0,014)$	$0,597 \times 10^{-3}$	$(2,85 \pm 0,024) \times 10^{-3}$	-0,996	9
0,10	$-(0,154 \pm 0,018)$	$0,768 \times 10^{-3}$	$(2,56 \pm 0,30) \times 10^{-3}$	-0,991	9
0,05	$-(0,119 \pm 0,012)$	$0,495 \times 10^{-3}$	$(1,99 \pm 0,20) \times 10^{-3}$	-0,995	8



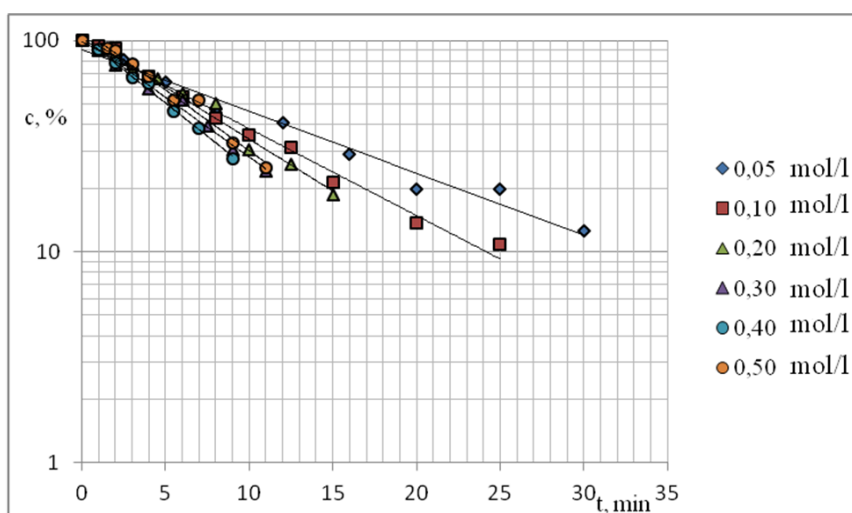
Rycina 22.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $P_i/P_{wz} = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 14.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 308 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

Warunki reakcji, NaOH [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(1,33 \pm 0,17) \times 10^{-1}$	$0,769 \times 10^{-2}$	$(2,22 \pm 0,29) \times 10^{-3}$	-0,985	11
0,40	$-(1,44 \pm 0,11) \times 10^{-1}$	$0,458 \times 10^{-2}$	$(2,40 \pm 0,19) \times 10^{-3}$	-0,997	8
0,30	$-(1,30 \pm 0,12) \times 10^{-1}$	$0,537 \times 10^{-2}$	$(2,17 \pm 0,21) \times 10^{-3}$	-0,993	10
0,20	$-(1,13 \pm 0,12) \times 10^{-1}$	$0,521 \times 10^{-2}$	$(1,89 \pm 0,20) \times 10^{-3}$	-0,992	10
0,10	$-(0,948 \pm 0,080) \times 10^{-1}$	$0,355 \times 10^{-2}$	$(1,58 \pm 0,13) \times 10^{-3}$	-0,994	11
0,05	$-(0,675 \pm 0,090) \times 10^{-1}$	$0,382 \times 10^{-2}$	$(1,13 \pm 0,15) \times 10^{-3}$	-0,989	9



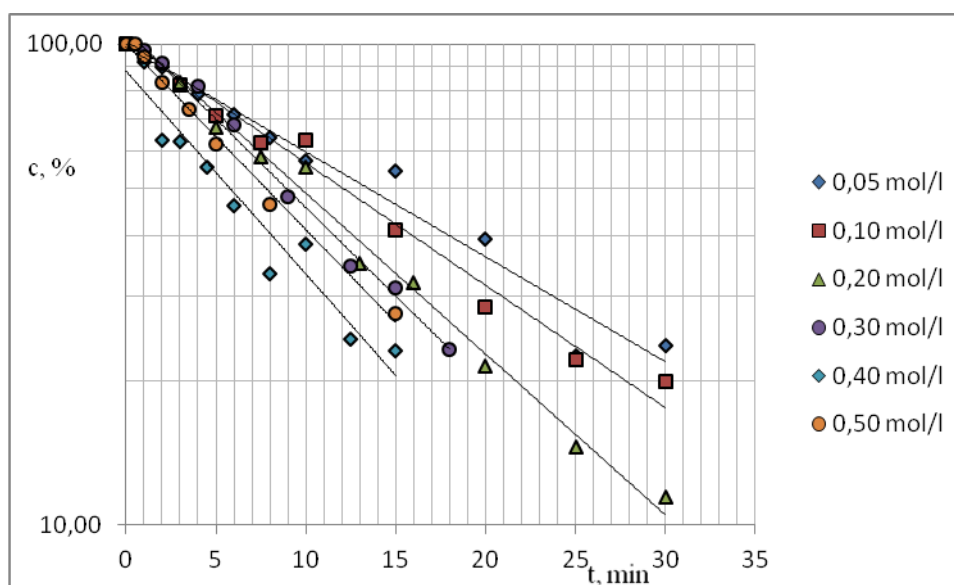
Rycina 23.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 308 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 15.

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

Warunki reakcji, NaOH [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(0,876 \pm 0,139) \times 10^{-1}$	$0,602 \times 10^{-2}$	$(1,46 \pm 0,23) \times 10^{-3}$	-0,982	10
0,40	$-(0,971 \pm 0,199) \times 10^{-1}$	$0,861 \times 10^{-2}$	$(1,62 \pm 0,33) \times 10^{-3}$	-0,970	10
0,30	$-(0,847 \pm 0,068) \times 10^{-1}$	$0,288 \times 10^{-2}$	$(1,41 \pm 0,11) \times 10^{-3}$	-0,996	9
0,20	$-(0,770 \pm 0,063) \times 10^{-1}$	$0,280 \times 10^{-2}$	$(1,28 \pm 0,10) \times 10^{-3}$	-0,994	11
0,10	$-(0,586 \pm 0,070) \times 10^{-1}$	$0,302 \times 10^{-2}$	$(0,976 \pm 0,116) \times 10^{-3}$	-0,990	10
0,05	$-(0,502 \pm 0,082) \times 10^{-1}$	$0,354 \times 10^{-2}$	$(0,837 \pm 0,136) \times 10^{-3}$	-0,981	10



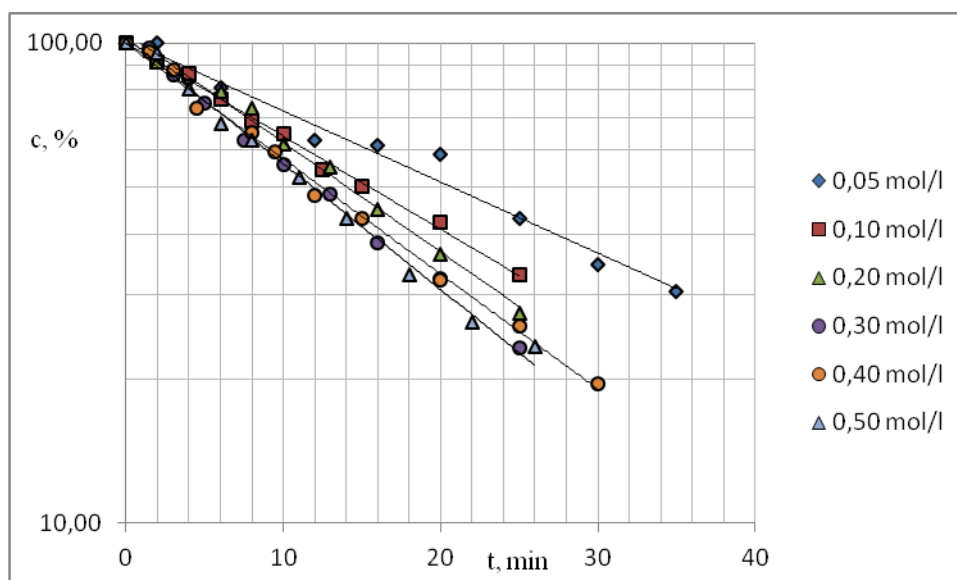
Rycina 24.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 303 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 16.

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

Warunki reakcji, NaOH [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(0,604 \pm 0,040) \times 10^{-1}$	$0,177 \times 10^{-2}$	$(1,01 \pm 0,07) \times 10^{-3}$	-0,996	11
0,40	$-(0,552 \pm 0,029) \times 10^{-1}$	$0,126 \times 10^{-2}$	$(0,919 \pm 0,048) \times 10^{-3}$	-0,998	11
0,30	$-(0,590 \pm 0,027) \times 10^{-1}$	$0,118 \times 10^{-2}$	$(0,983 \pm 0,045) \times 10^{-3}$	-0,998	10
0,20	$-(0,525 \pm 0,039) \times 10^{-1}$	$0,165 \times 10^{-2}$	$(0,874 \pm 0,065) \times 10^{-3}$	-0,997	9
0,10	$-(0,447 \pm 0,024) \times 10^{-1}$	$0,106 \times 10^{-2}$	$(0,744 \pm 0,041) \times 10^{-3}$	-0,998	10
0,05	$-(0,338 \pm 0,060) \times 10^{-1}$	$0,252 \times 10^{-2}$	$(0,563 \pm 0,099) \times 10^{-3}$	-0,981	9



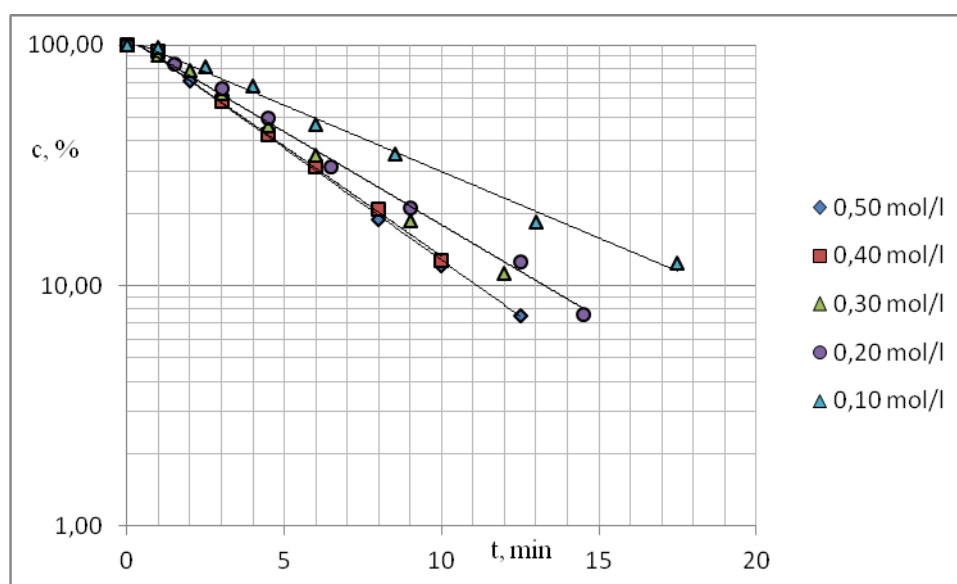
Rycina 25.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $P_i/P_{wz} = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 298 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 17.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w 0,10 mol/l kwasie solnym w temperaturze 343 K, $\mu = 0,10$ mol/l, 0,2 mol/l, 0,3 mol/l, 0,4 mol/l, 0,50 mol/l

Warunki reakcji , μ [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(2,15 \pm 0,11) \times 10^{-1}$	$4,49 \times 10^{-3}$	$(3,58 \pm 0,18) \times 10^{-3}$	0,998	9
0,40	$-(2,11 \pm 0,16) \times 10^{-1}$	$6,16 \times 10^{-3}$	$(3,51 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	0,998	7
0,30	$-(1,90 \pm 0,11) \times 10^{-1}$	$4,34 \times 10^{-3}$	$(3,16 \pm 0,11) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,20	$-(1,78 \pm 0,12) \times 10^{-1}$	$4,68 \times 10^{-3}$	$(2,97 \pm 0,19) \times 10^{-3}$	0,998	8
0,10	$-(1,27 \pm 0,11) \times 10^{-1}$	$4,42 \times 10^{-3}$	$(2,12 \pm 0,18) \times 10^{-3}$	0,996	8



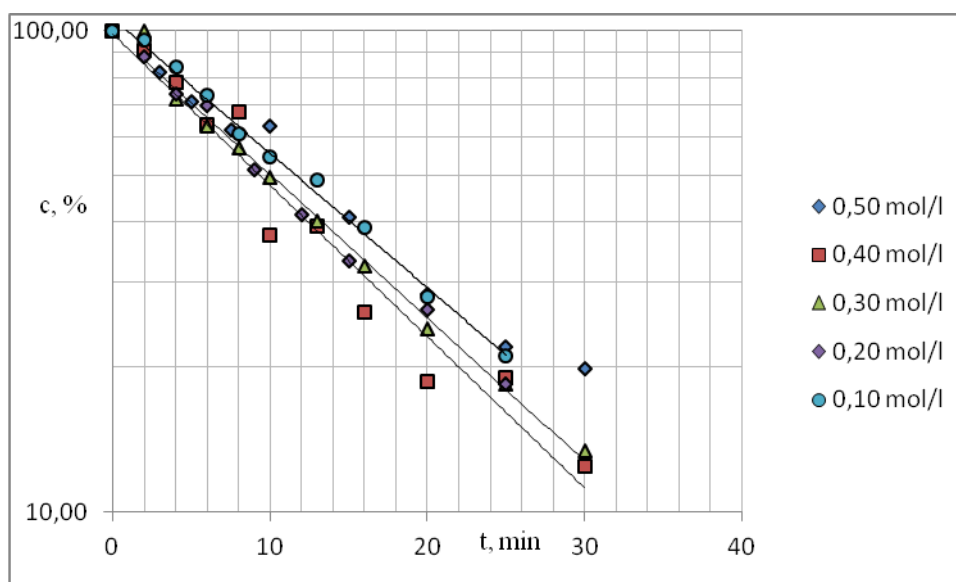
Rycina 26.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w 0,10 mol/l kwasie solnym w temperaturze 343 K, $\mu = 0,10$ mol/l, 0,2 mol/l, 0,3 mol/l, 0,4 mol/l, 0,50 mol/l.

Tabela 18.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w roztworze wodorotlenku sodu, w temperaturze 308 K ($\mu = 0,10$ mol/l, 0,2 mol/l, 0,3 mol/l, 0,4 mol/l, 0,50 mol/l)

Warunki reakcji, μ [mol/l]	$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	S_a	$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	r	n
0,50	$-(0,586 \pm 0,070) \times 10^{-1}$	$0,302 \times 10^{-2}$	$(0,976 \pm 0,116) \times 10^{-3}$	-0,990	10
0,40	$-(0,724 \pm 0,116) \times 10^{-1}$	$0,512 \times 10^{-2}$	$(1,21 \pm 0,0,19) \times 10^{-3}$	-0,978	11
0,30	$-(0,686 \pm 0,052) \times 10^{-1}$	$0,224 \times 10^{-2}$	$(1,14 \pm 0,05) \times 10^{-3}$	-0,996	10
0,20	$-(0,682 \pm 0,048) \times 10^{-1}$	$0,204 \times 10^{-2}$	$(1,14 \pm 0,08) \times 10^{-3}$	-0,997	9
0,10	$-(0,644 \pm 0,040) \times 10^{-1}$	$0,171 \times 10^{-2}$	$(1,07 \pm 0,07) \times 10^{-3}$	-0,997	10



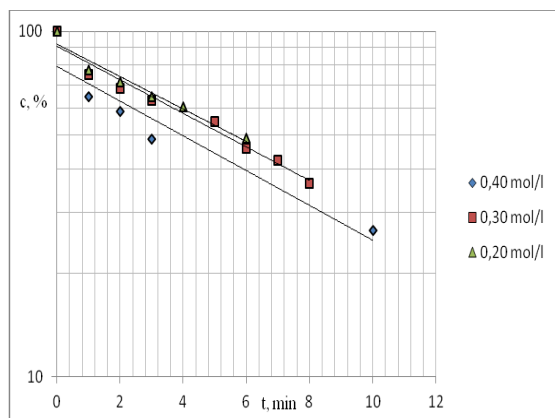
Rycina 27.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w 0,10 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 308 K, $\mu = 0,10$ mol/l, 0,20 mol/l, 0,30 mol/l, 0,40 mol/l i 0,5 mol/l.

Tabela 19.

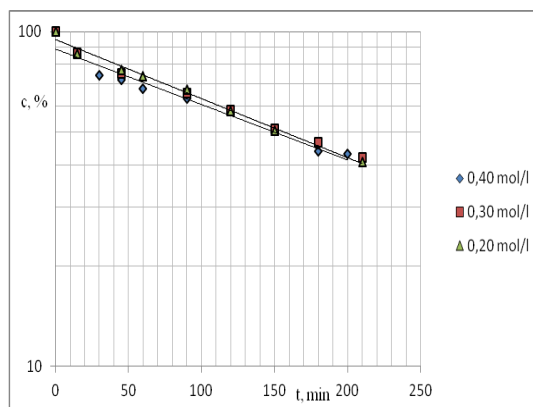
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

pH = 1,70			
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[H_3PO_4] = 0,227$ $[KH_2PO_4] = 0,173$ 0,4000	$[H_3PO_4] = 0,171$ $[KH_2PO_4] = 0,129$ 0,3000	$[H_3PO_4] = 0,114$ $[KH_2PO_4] = 0,086$ 0,2000
$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	$-(1,16 \pm 0,53) \times 10^{-1}$	$-(1,12 \pm 0,20) \times 10^{-1}$	$-(1,08 \pm 0,34) \times 10^{-1}$
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(1,93 \pm 0,89) \times 10^{-3}$	$(1,87 \pm 0,33) \times 10^{-3}$	$(1,80 \pm 0,52) \times 10^{-3}$
S_a	$S_a = 2,18 \times 10^{-2}$	$S_a = 8,09 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^{-2}$
r	-0,951	-0,985	-0,975
n	5	8	6
Test równoległości: 0,4/0,2 $t_0 = 0,26$, $t_k = 2,36$			
pH = 2,81			
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[H_3PO_4] = 0,0466$ $[H_2PO_4^-] = 0,3534$ 0,4000	$[H_3PO_4] = 0,03495$ $[H_2PO_4^-] = 0,26505$ 0,3000	$[H_3PO_4] = 0,0233$ $[H_2PO_4^-] = 0,1767$ 0,2000
$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	$-(3,81 \pm 0,81) \times 10^{-3}$	$-(3,91 \pm 0,43) \times 10^{-3}$	$-(4,06 \pm 0,41) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(6,35 \pm 1,35) \times 10^{-5}$	$(6,52 \pm 0,72) \times 10^{-5}$	$(6,77 \pm 0,68) \times 10^{-5}$
S_a	$3,30 \times 10^{-4}$	$1,77 \times 10^{-4}$	$S_a = 1,68 \times 10^{-4}$
r	-0,978	-0,994	-0,995
n	8	8	8
Test równoległości: 0,4/0,2 $t_0 = 0,67$, $t_k = 2,18$			
pH = 2,60			
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[H_3PO_4] = 0,08823$ $[H_2PO_4^-] = 0,21180$ 0,3000		
$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	$-(1,47 \pm 0,10) \times 10^{-2}$		
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(2,44 \pm 0,17) \times 10^{-4}$		
S_a	$4,10 \times 10^{-4}$		
r	-0,9980		
n	7		



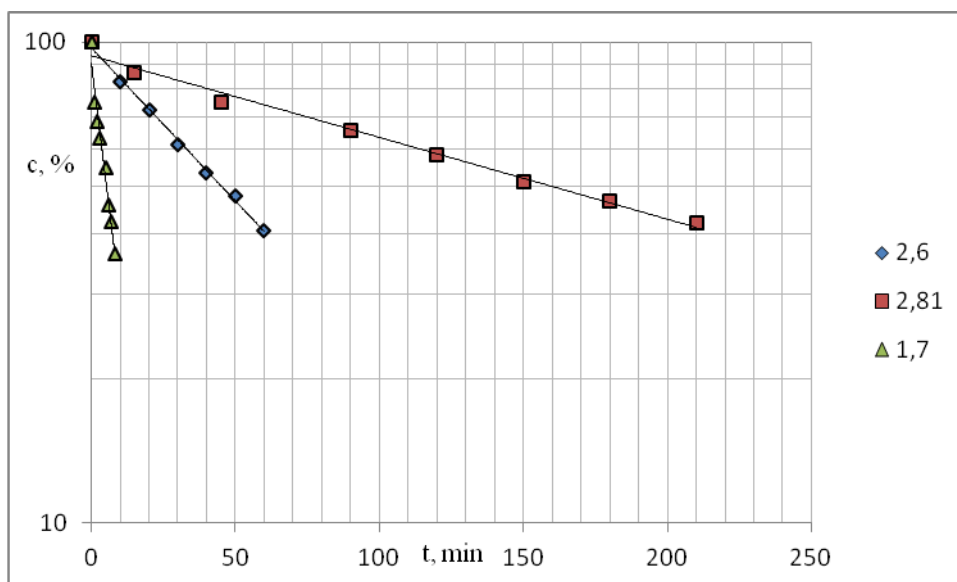
Rycina 28.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 1,70 w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).



Rycina 29.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 2,81 w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).



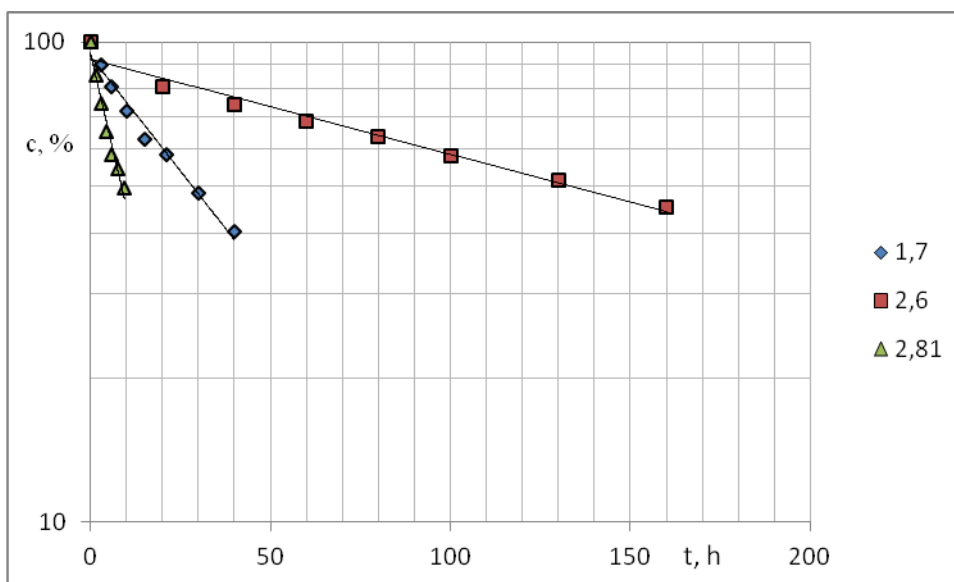
Rycina 30.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 1,70, 2,60 i 2,81, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).

Tabela 20.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym, w temperaturze 333 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

	pH = 1,70	pH = 2,60	pH = 2,81
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[H ₃ PO ₄] = 0,227 [KH ₂ PO ₄] = 0,173 0,400	[H ₃ PO ₄] = 0,118 [KH ₂ PO ₄] = 0,282 0,400	[H ₃ PO ₄] = 0,047 [KH ₂ PO ₄] = 0,353 0,400
$(a \pm \Delta a)$ [h ⁻¹]	$-(2,20 \pm 0,32) \times 10^{-2}$	$-(4,57 \pm 0,72) \times 10^{-3}$	$-(7,38 \pm 1,32) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(3,67 \pm 0,53) \times 10^{-4}$	$(7,61 \pm 1,21) \times 10^{-5}$	$(2,05 \pm 0,37) \times 10^{-5}$
S_a	$1,31 \times 10^{-3}$	$2,96 \times 10^{-4}$	$5,38 \times 10^{-3}$
r	-0,990	-0,988	-0,987
n	8	8	7



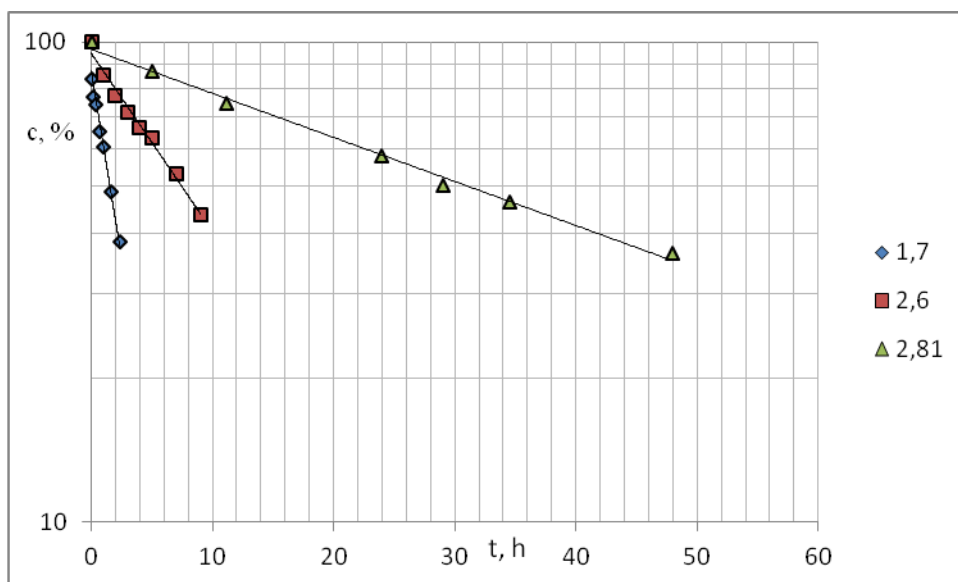
Rycina 31.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 1,70, 2,60 i 2,81 w temperaturze 333 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 21.

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

	pH = 1,70	pH = 2,60	pH = 2,81
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,227$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,173$ 0,400	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,118$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,282$ 0,400	$[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,047$ $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,353$ 0,400
$(a \pm \Delta a) [\text{h}^{-1}]$	$-(35,9 \pm 7,62) \times 10^{-2}$	$-(8,56 \pm 0,94) \times 10^{-2}$	$-(2,11 \pm 0,18) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}]$	$(9,96 \pm 2,11) \times 10^{-5}$	$(2,38 \pm 0,26) \times 10^{-5}$	$(5,87 \pm 0,50) \times 10^{-6}$
S_a	$5,18 \times 10^{-3}$	$3,85 \times 10^{-3}$	$7,31 \times 10^{-4}$
r	-0,978	-0,994	-0,997
n	8	8	7



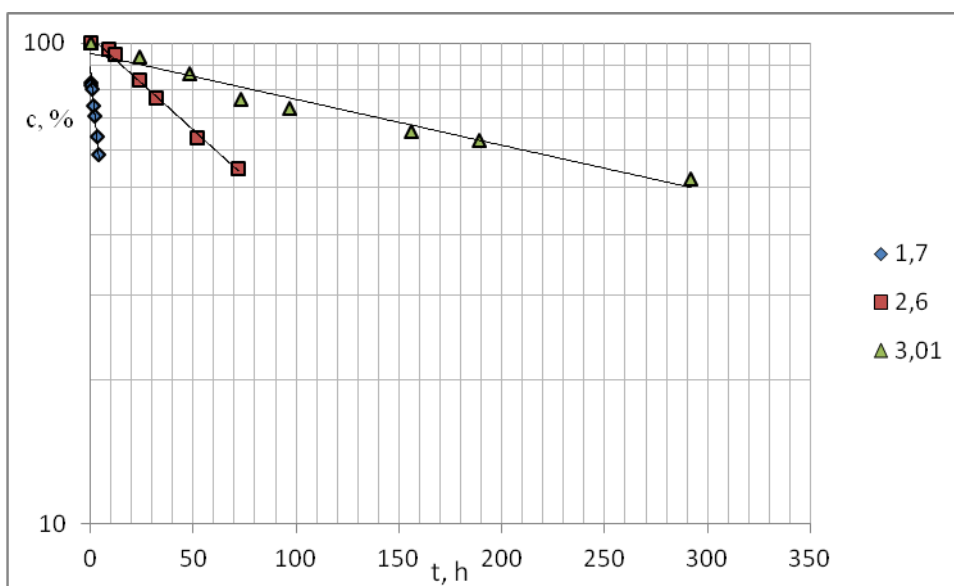
Rycina 32.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $P_i/P_{wz} = f(t)$ reakcji rozkładu PMD w buforze fosforanowym o pH 1,70, 2,60 i 2,81 w temperaturze 323 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).

Tabela 22.

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

	pH = 1,70	pH = 2,60	pH = 3,01
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[H ₃ PO ₄] = 0,227 [KH ₂ PO ₄] = 0,173 0,400	[H ₃ PO ₄] = 0,118 [KH ₂ PO ₄] = 0,282 0,400	[H ₃ PO ₄] = 0,047 [KH ₂ PO ₄] = 0,353 0,400
$(a \pm \Delta a)$ [h ⁻¹]	$-(10,44 \pm 2,9) \times 10^{-2}$	$-(8,91 \pm 0,86) \times 10^{-3}$	$-(2,20 \pm 0,42) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(2,89 \pm 0,095) \times 10^{-5}$	$(2,48 \pm 0,24) \times 10^{-6}$	$(6,11 \pm 1,17) \times 10^{-7}$
S_a	$2,33 \times 10^{-4}$	$3,53 \times 10^{-4}$	$1,72 \times 10^{-4}$
r	0,950	0,996	0,982
n	8	7	8



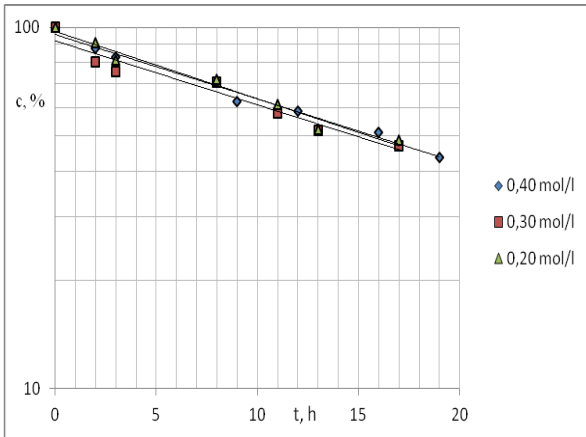
Rycina 33.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 1,70, 2,60, 3,01 w temperaturze 323 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 23.

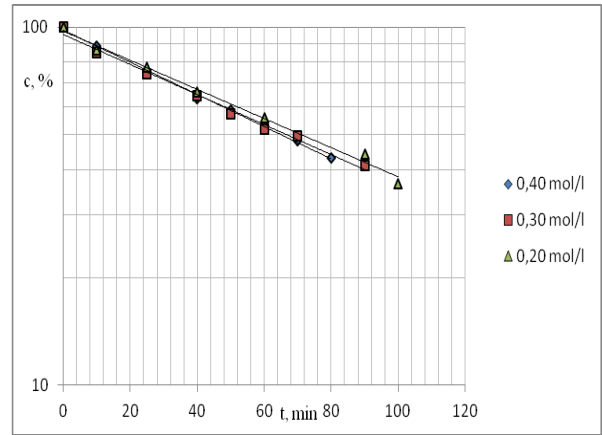
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

	pH = 3,96		
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[CH ₃ COOH] = 0,320 [CH ₃ COO ⁻] = 0,080 0,400	[CH ₃ COOH] = 0,240 [CH ₃ COO ⁻] = 0,060 0,300	[CH ₃ COOH] = 0,160 [CH ₃ COO ⁻] = 0,040 0,200
$(a \pm \Delta a)$ [h ⁻¹]	$-(4,10 \pm 0,50) \times 10^{-2}$	$-(4,13 \pm 0,11) \times 10^{-2}$	$-(4,29 \pm 0,76) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(1,14 \pm 0,15) \times 10^{-5}$	$(1,15 \pm 0,30) \times 10^{-5}$	$(1,19 \pm 0,21) \times 10^{-5}$
S_a	$2,04 \times 10^{-3}$	$4,22 \times 10^{-3}$	$2,97 \times 10^{-3}$
r	-0,994	-0,975	-0,988
n	7	7	7
Test równoległości: 0,4/0,2 $t_0 = 0,77$, $t_k = 2,2$			
	pH = 4,59	pH = 5,06	
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[CH ₃ COOH] = 0,180 [CH ₃ COO ⁻] = 0,120 0,300	[CH ₃ COOH] = 0,090 [CH ₃ COO ⁻] = 0,210 0,300	
$(a \pm \Delta a)$ [min ⁻¹]	$-(2,64 \pm 0,25) \times 10^{-3}$	$-(5,47 \pm 0,41) \times 10^{-3}$	
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(4,40 \pm 0,41) \times 10^{-5}$	$(9,12 \pm 0,68) \times 10^{-5}$	
S_a	$1,01 \times 10^{-4}$	$1,68 \times 10^{-4}$	
r	-0,996	-0,998	
n	8	7	
	pH = 5,55		
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[CH ₃ COOH] = 0,040 [CH ₃ COO ⁻] = 0,360 0,400	[CH ₃ COOH] = 0,030 [CH ₃ COO ⁻] = 0,270 0,300	[CH ₃ COOH] = 0,020 [CH ₃ COO ⁻] = 0,180 0,200
$(a \pm \Delta a)$ [min ⁻¹]	$-(1,03 \pm 0,05) \times 10^{-2}$	$-(9,66 \pm 0,93) \times 10^{-3}$	$-(9,37 \pm 0,93) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(1,72 \pm 0,08) \times 10^{-4}$	$(1,61 \pm 0,15) \times 10^{-4}$	$(1,56 \pm 0,16) \times 10^{-4}$
S_a	$2,02 \times 10^{-4}$	$3,54 \times 10^{-4}$	$3,82 \times 10^{-4}$
r	-0,999	-0,995	-0,996
n	8	8	7
Test równoległości: 0,4/0,2 $t_0 = 2,15$, $t_k = 2,20$			



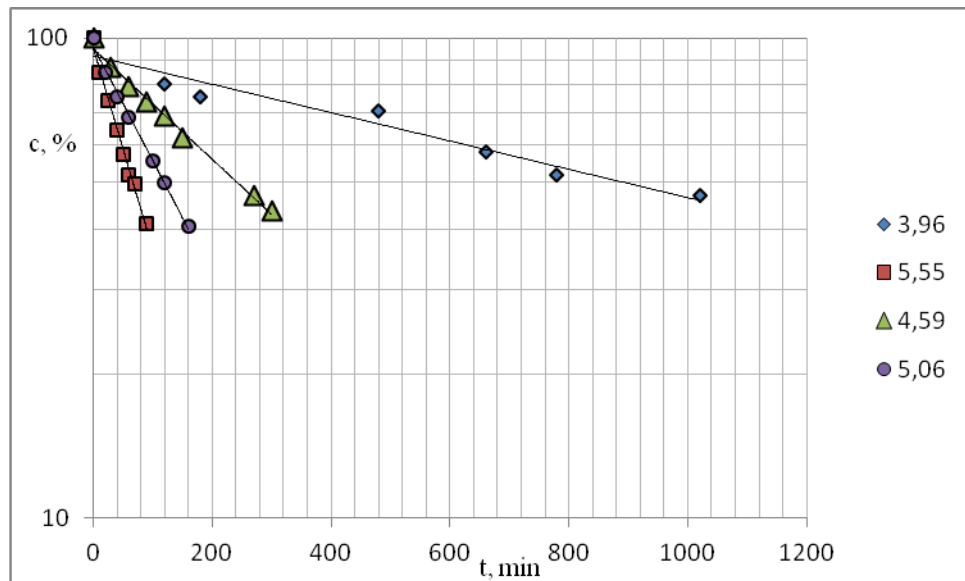
Rycina 34.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym o pH 3,96, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).



Rycina 35.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym o pH 5,55, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).



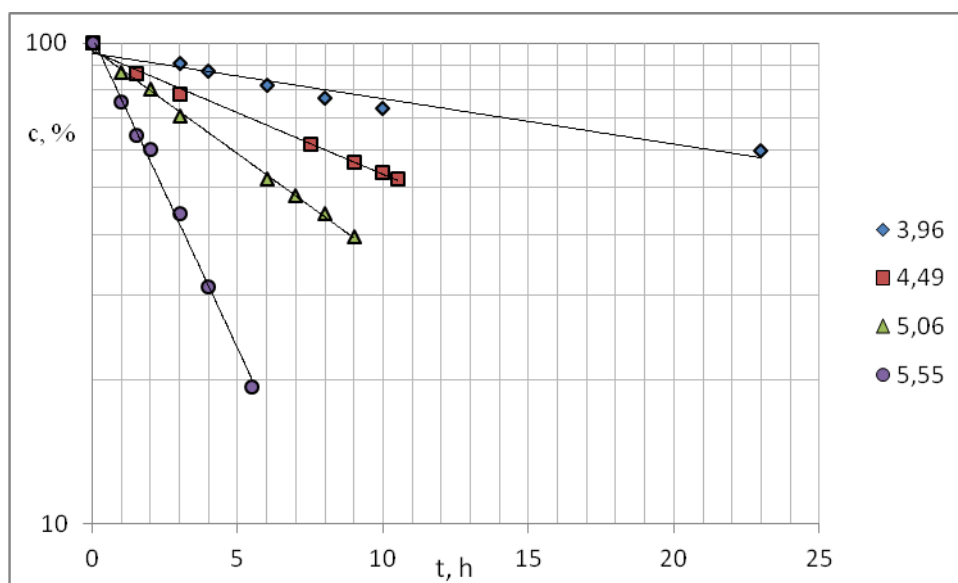
Rycina 36.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym o pH 3,96; 4,59; 5,06 i 5,55, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).

Tabela 24.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym, w temperaturze 333 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

[pH]	pH = 3,96	pH = 4,49
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[CH ₃ COOH] = 0,240 [CH ₃ COO ⁻] = 0,060 0,300	[CH ₃ COOH] = 0,180 [CH ₃ COO ⁻] = 0,120 0,300
($a \pm \Delta a$) [h ⁻¹]	$-(2,17 \pm 0,53) \times 10^{-2}$	$-(5,90 \pm 0,56) \times 10^{-2}$
($k \pm \Delta k$) [s ⁻¹]	$(6,03 \pm 1,49) \times 10^{-6}$	$(1,64 \pm 0,16) \times 10^{-5}$
S_a	$2,18 \times 10^{-3}$	$2,28 \times 10^{-3}$
r	0,976	0,996
n	7	7
[pH]	pH = 5,06	pH = 5,55
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[CH ₃ COOH] = 0,090 [CH ₃ COO ⁻] = 0,210 0,300	[CH ₃ COOH] = 0,030 [CH ₃ COO ⁻] = 0,270 0,300
($a \pm \Delta a$) [h ⁻¹]	$-(1,01 \pm 0,05) \times 10^{-1}$	$-(2,98 \pm 0,22) \times 10^{-1}$
($k \pm \Delta k$) [s ⁻¹]	$(2,80 \pm 0,14) \times 10^{-5}$	$(8,29 \pm 0,62) \times 10^{-5}$
S_a	$2,11 \times 10^{-3}$	$9,11 \times 10^{-3}$
r	0,999	0,998
n	8	7



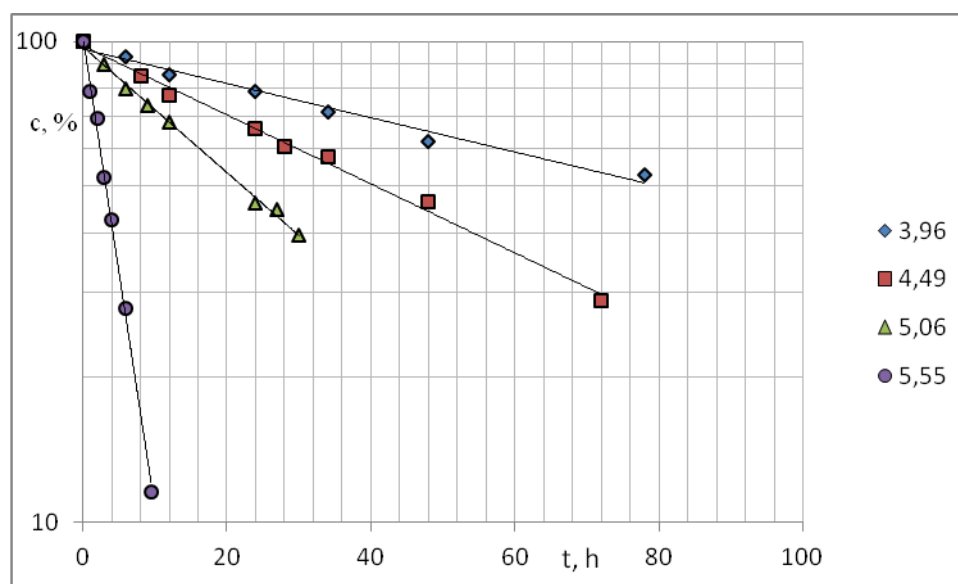
Rycina 37.

Półlogarymiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym o pH 3,96; 4,49; 5,06 i 5,55, w temperaturze 343 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 25.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym, w temperaturze 323 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

[pH]	pH = 3,96	pH = 4,49
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[CH ₃ COOH] = 0,240 [CH ₃ COO ⁻] = 0,060 0,300	[CH ₃ COOH] = 0,180 [CH ₃ COO ⁻] = 0,120 0,300
$(a \pm \Delta a)$ [h ⁻¹]	$-(8,17 \pm 1,45) \times 10^{-3}$	$-(1,65 \pm 0,13) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(2,27 \pm 0,40) \times 10^{-6}$	$(4,59 \pm 0,36) \times 10^{-6}$
S_a	$5,93 \times 10^{-4}$	$5,34 \times 10^{-4}$
r	-0,987	-0,997
n	7	8
Warunki reakcji [pH]	pH = 5,06	pH = 5,55
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[CH ₃ COOH] = 0,090 [CH ₃ COO ⁻] = 0,210 0,300	[CH ₃ COOH] = 0,030 [CH ₃ COO ⁻] = 0,270 0,300
$(a \pm \Delta a)$ [h ⁻¹]	$-(3,01 \pm 1,83) \times 10^{-2}$	$-(0,225 \pm 0,13)$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(8,371 \pm 0,51) \times 10^{-6}$	$(6,26 \pm 0,37) \times 10^{-5}$
S_a	$7,47 \times 10^{-4}$	$5,48 \times 10^{-3}$
r	-0,998	-0,998
n	8	7



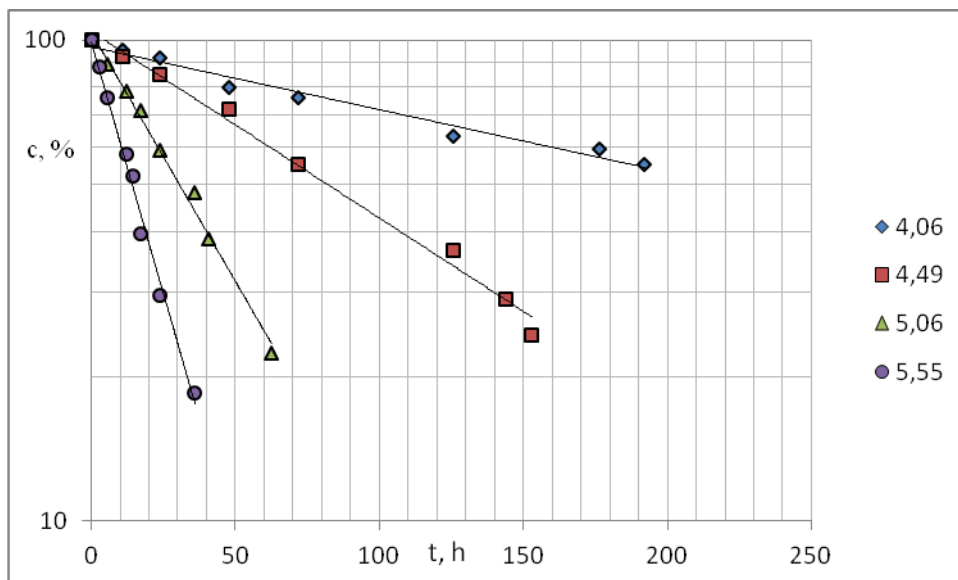
Rycina 38.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym o pH 3,96, 4,49, 5,06 i 5,55, w temperaturze 323 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 26.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

[pH]	pH = 4,06	pH = 4,00
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,240$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,060$ 0,300	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,180$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,120$ 0,300
$(a \pm \Delta a)$ [h^{-1}]	$-(3,00 \pm 0,49) \times 10^{-3}$	$-(8,93 \pm 1,47) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(8,33 \pm 1,37) \times 10^{-7}$	$(2,48 \pm 0,41) \times 10^{-6}$
S_a	$2,01 \times 10^{-4}$	$3,41 \times 10^{-4}$
r	-0,987	-0,996
n	8	8
[pH]	pH = 5,06	pH = 5,56
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,090$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,210$ 0,300	$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,030$ $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,270$ 0,300
$(a \pm \Delta a)$ [h^{-1}]	$-(2,38 \pm 0,37) \times 10^{-2}$	$-(4,81 \pm 0,80) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(6,62 \pm 1,02) \times 10^{-6}$	$(1,33 \pm 0,22) \times 10^{-5}$
S_a	$8,56 \times 10^{-4}$	$1,87 \times 10^{-5}$
r	0,996	0,996
n	8	8



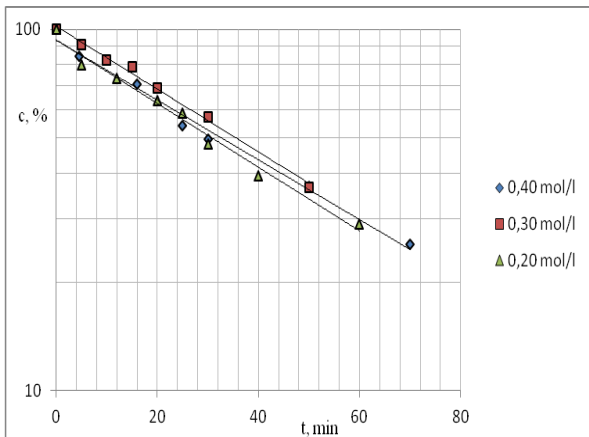
Rycina 39.

Półlogarymiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze octanowym o pH 4,06, 4,49, 5,06 i 5,55, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 27.

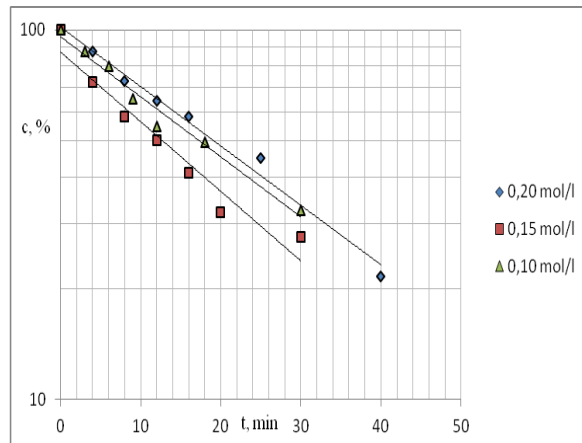
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

	pH = 6,35		
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[H_2PO_4^-] = 0,340$ $[HPO_4^{2-}] = 0,060$ 0,400	$[H_2PO_4^-] = 0,255$ $[HPO_4^{2-}] = 0,045$ 0,300	$[H_2PO_4^-] = 0,170$ $[HPO_4^{2-}] = 0,030$ 0,200
$(a \pm \Delta a)$ [h^{-1}]	$-(1,91 \pm 0,23) \times 10^{-2}$	$-(2,00 \pm 0,17) \times 10^{-2}$	$-(2,03 \pm 0,25) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(3,18 \pm 0,38) \times 10^{-4}$	$(3,34 \pm 0,29) \times 10^{-4}$	$(3,39 \pm 0,42) \times 10^{-4}$
S_a	$8,84 \times 10^{-4}$	$6,86 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-3}$
r	-0,995	-0,997	-0,992
n	7	7	8
Test równoległości: 0,4/0,2 $t_0 = 0,92$, $t_k = 2,20$			
	pH = 6,58	pH = 6,81	
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[H_2PO_4^-] = 0,140$ $[HPO_4^{2-}] = 0,060$ 0,200	$[H_2PO_4^-] = 0,080$ $[HPO_4^{2-}] = 0,120$ 0,200	
$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	$-(2,60 \pm 0,37) \times 10^{-2}$	$-(1,93 \pm 0,32) \times 10^{-2}$	
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(4,34 \pm 0,61) \times 10^{-4}$	$(3,22 \pm 0,54) \times 10^{-4}$	
S_a	$1,43 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-3}$	
r	-0,993	-0,990	
n	7	7	
	pH = 7,28		
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[H_2PO_4^-] = 0,040$ $[HPO_4^{2-}] = 0,160$ 0,200	$[H_2PO_4^-] = 0,030$ $[HPO_4^{2-}] = 0,120$ 0,150	$[H_2PO_4^-] = 0,020$ $[HPO_4^{2-}] = 0,080$ 0,100
$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	$-(3,70 \pm 0,50) \times 10^{-2}$	$-(3,85 \pm 0,84) \times 10^{-2}$	$-(3,74 \pm 0,66) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(6,17 \pm 0,83) \times 10^{-4}$	$(6,41 \pm 1,40) \times 10^{-4}$	$(6,23 \pm 1,10) \times 10^{-4}$
S_a	$1,95 \times 10^{-3}$	$3,26 \times 10^{-3}$	$2,57 \times 10^{-3}$
r	-0,993	-0,983	-0,988
n	7	7	7
Test równoległości: 0,2/0,1 $t_0 = 0,12$, $t_k = 2,28$			



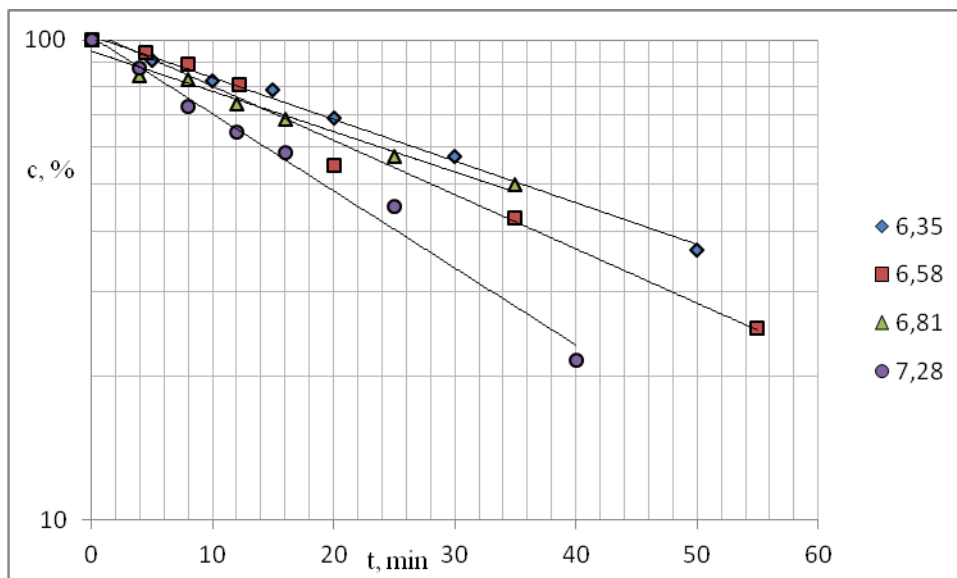
Rycina 40.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 6,35, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).



Rycina 41.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 7,28, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).



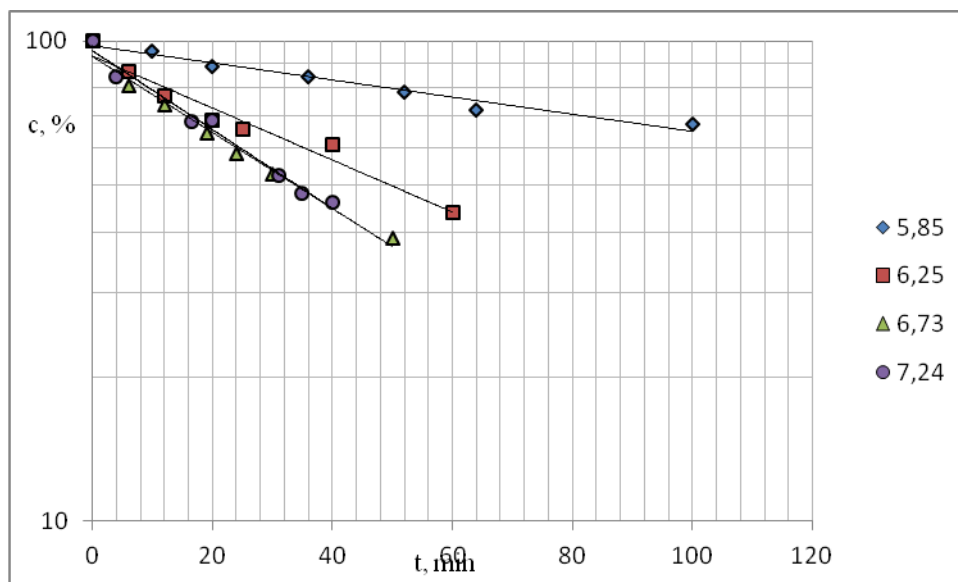
Rycina 42.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 6,35, 6,58, 6,81 i 7,28, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).

Tabela 28.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym, w temperaturze 308 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

	pH = 5,85	pH = 6,25
Stężenie składników buforu [mol/l]	[H ₂ PO ₄ ⁻] = 0,255 [HPO ₄ ²⁻] = 0,045	[H ₂ PO ₄ ⁻] = 0,140 [HPO ₄ ²⁻] = 0,060
B _T [mol/l]	0,300	0,200
(a ± Δa) [min ⁻¹]	$-(3,90 \pm 0,54) \times 10^{-3}$	$-(1,25 \pm 0,28) \times 10^{-2}$
(k ± Δk) [s ⁻¹]	$(6,50 \pm 0,90) \times 10^{-5}$	$(2,08 \pm 0,47) \times 10^{-4}$
S _a	$2,23 \times 10^{-4}$	$1,14 \times 10^{-3}$
r	-0,990	-0,980
n	8	7
	pH = 6,73	pH = 7,24
Stężenie składników buforu [mol/l]	[H ₂ PO ₄ ⁻] = 0,080 [HPO ₄ ²⁻] = 0,120	[H ₂ PO ₄ ⁻] = 0,040 [HPO ₄ ²⁻] = 0,160
B _T [mol/l]	0,200	0,200
(a ± Δa) [min ⁻¹]	$-(1,83 \pm 0,28) \times 10^{-2}$	$-(1,89 \pm 0,27) \times 10^{-2}$
(k ± Δk) [s ⁻¹]	$(3,04 \pm 0,46) \times 10^{-4}$	$(3,15 \pm 0,45) \times 10^{-4}$
S _a	$1,07 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-3}$
r	-0,992	-0,992
n	7	7



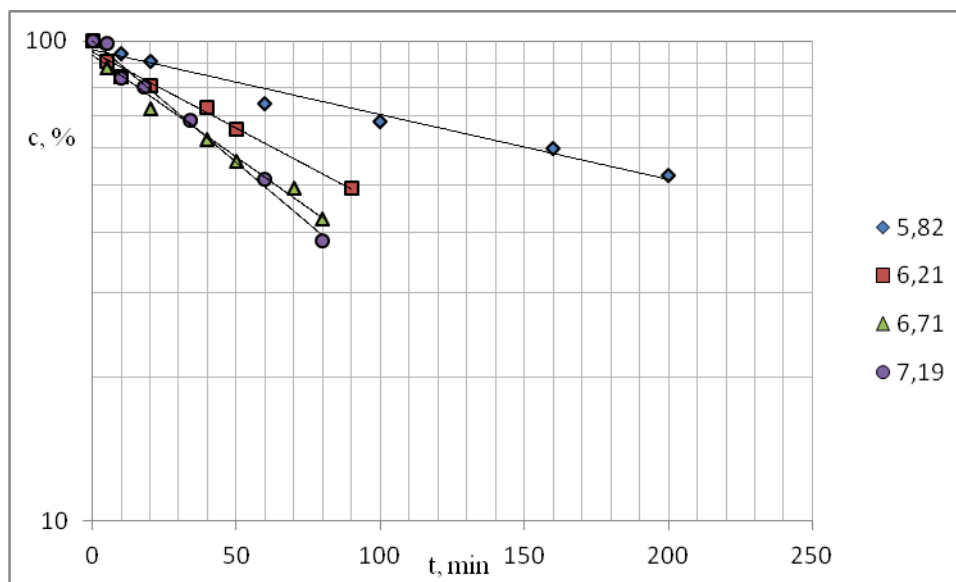
Rycina 43.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 5,85, 6,25, 6,73 i 7,24, w temperaturze 308 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 29.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym, w temperaturze 303 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

	pH = 5,82	pH = 6,21
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[H_2PO_4^-] = 0,255$ $[HPO_4^{2-}] = 0,045$ 0,300	$[H_2PO_4^-] = 0,140$ $[HPO_4^{2-}] = 0,060$ 0,200
$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	$-(3,11 \pm 0,53) \times 10^{-3}$	$-(7,31 \pm 1,09) \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(5,18 \pm 0,89) \times 10^{-5}$	$(1,22 \pm 0,18) \times 10^{-4}$
S_a	$2,18 \times 10^{-4}$	$4,46 \times 10^{-4}$
r	-0,988	-0,991
n	7	7
	pH = 6,71	pH = 7,19
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	$[H_2PO_4^-] = 0,080$ $[HPO_4^{2-}] = 0,120$ 0,200	$[H_2PO_4^-] = 0,030$ $[HPO_4^{2-}] = 0,120$ 0,150
$(a \pm \Delta a)$ [min^{-1}]	$-(9,77 \pm 1,32) \times 10^{-3}$	$-(1,17 \pm 0,13) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s^{-1}]	$(1,63 \pm 0,22) \times 10^{-4}$	$(1,94 \pm 0,22) \times 10^{-4}$
S_a	$5,38 \times 10^{-4}$	$5,45 \times 10^{-4}$
r	-0,991	-0,995
n	8	7



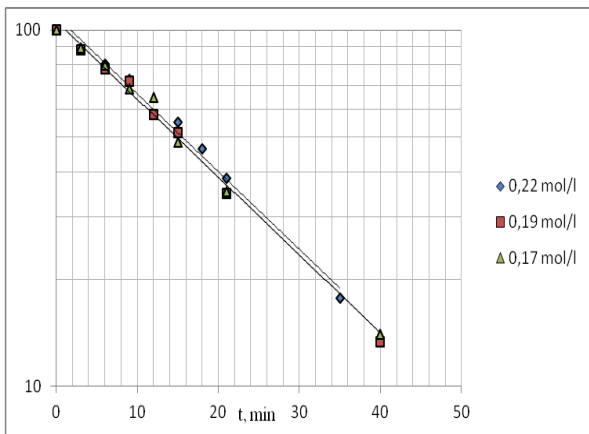
Rycina 44.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze fosforanowym o pH 5,82, 6,21, 6,71 i 7,19, w temperaturze 303 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 30.

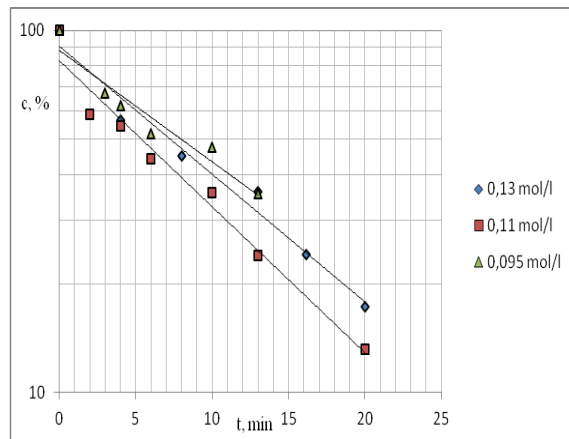
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze boranowym, w temperaturze 313 K, ($\mu = 0,50$ mol/l)

pH = 7,72			
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[NaBO ₂] = 0,0189 [H ₃ BO ₃] = 0,2023 0,2212	[NaBO ₂] = 0,0165 [H ₃ BO ₃] = 0,1770 0,1935	[NaBO ₂] = 0,0141 [H ₃ BO ₃] = 0,1517 0,1658
($a \pm \Delta a$) [min ⁻¹]	$-(5,02 \pm 0,57) \times 10^{-2}$	$-(5,12 \pm 0,34) \times 10^{-2}$	$-(5,03 \pm 0,41) \times 10^{-2}$
($k \pm \Delta k$) [s ⁻¹]	$(8,37 \pm 0,95) \times 10^{-4}$	$(8,54 \pm 0,57) \times 10^{-4}$	$(8,38 \pm 0,69) \times 10^{-4}$
S_a	$2,32 \times 10^{-3}$	$1,41 \times 10^{-3}$	$1,69 \times 10^{-3}$
r	-0,995	-0,998	-0,997
n	7	8	8
Test równoległości: 0,2212/0,1658 $t_0 = 0,03$, $t_k = 2,20$			
pH = 9,15			
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[NaBO ₂] = 0,1139 [H ₃ BO ₃] = 0,0122 0,1261	[NaBO ₂] = 0,0997 [H ₃ BO ₃] = 0,0107 0,1104	[NaBO ₂] = 0,0854 [H ₃ BO ₃] = 0,0091 0,0945
($a \pm \Delta a$) [min ⁻¹]	$-(8,13 \pm 1,66) \times 10^{-2}$	$-(9,29 \pm 1,87) \times 10^{-2}$	$-(7,08 \pm 2,74) \times 10^{-2}$
($k \pm \Delta k$) [s ⁻¹]	$(1,35 \pm 0,28) \times 10^{-3}$	$(1,55 \pm 0,31) \times 10^{-3}$	$(1,18 \pm 0,46) \times 10^{-3}$
S_a	$6,80 \times 10^{-3}$	$7,26 \times 10^{-3}$	$9,86 \times 10^{-3}$
r	-0,996	-0,985	-0,963
n	6	7	7
Test równoległości: 0,1261/0,0945 $t_0 = 0,85$, $t_k = 2,31$			
pH	7,91	8,33	8,84
Stężenie składników buforu [mol/l] B_T [mol/l]	[NaBO ₂] = 0,0390 [H ₃ BO ₃] = 0,1321 0,1711	[NaBO ₂] = 0,0586 [H ₃ BO ₃] = 0,0628 0,1214	[NaBO ₂] = 0,0770 [H ₃ BO ₃] = 0,0261 0,1031
($a \pm \Delta a$) [min ⁻¹]	$-(6,47 \pm 1,12) \times 10^{-2}$	$-(6,89 \pm 1,21) \times 10^{-2}$	$-(6,75 \pm 0,77) \times 10^{-2}$
($k \pm \Delta k$) [s ⁻¹]	$(1,07 \pm 0,20) \times 10^{-3}$	$(1,15 \pm 0,20) \times 10^{-3}$	$(1,13 \pm 0,13) \times 10^{-3}$
S_a	$4,81 \times 10^{-3}$	$4,70 \times 10^{-3}$	$3,13 \times 10^{-3}$
r	-0,986	-0,989	-0,994
n	7	7	8



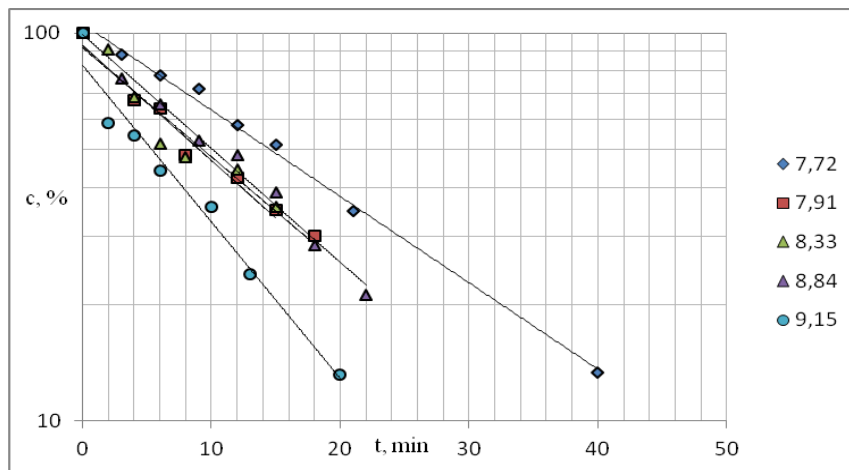
Rycina 45.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze boranowym o pH 7,72 w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).



Rycina 46.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze boranowym o pH 9,15 w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).



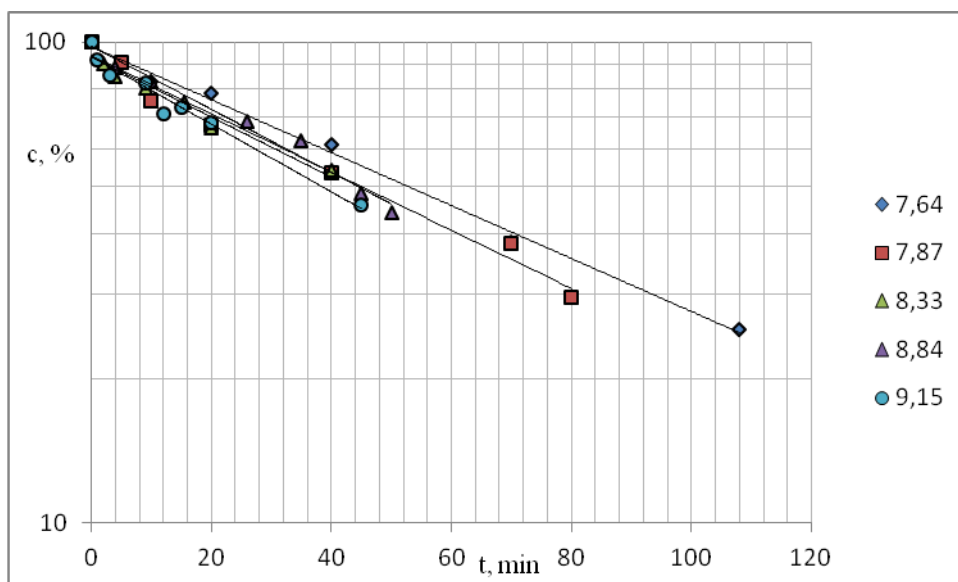
Rycina 47.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze boranowym o pH 7,72, 7,91, 8,33, 8,84 i 9,15, w temperaturze 313 K ($\mu = 0,50 \text{ mol/l}$).

Tabela 31.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze boranowym, w temperaturze 303 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

[pH]	pH = 7,64	pH = 7,87	pH = 8,33
Stężenie składników buforu, [mol/l] B_T [mol/l]	[NaBO ₂] = 0,0165 [H ₃ BO ₃] = 0,1770 0,1935	[NaBO ₂] = 0,0390 [H ₃ BO ₃] = 0,1321 0,1711	[NaBO ₂] = 0,0586 [H ₃ BO ₃] = 0,0628 0,1214
$(a \pm \Delta a)$ [min ⁻¹]	$-(1,27 \pm 0,10) \times 10^{-2}$	$-(1,39 \pm 0,22) \times 10^{-2}$	$-(1,44 \pm 0,33) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(2,11 \pm 0,14) \times 10^{-4}$	$(2,32 \pm 0,37) \times 10^{-4}$	$(2,40 \pm 0,55) \times 10^{-4}$
S_a	$4,12 \times 10^{-4}$	$8,53 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^{-3}$
R	-0,997	-0,991	-0,979
N	7	7	7
[pH]	pH = 8,84		pH = 9,15
Stężenie składników buforu, [mol/l] B_T [mol/l]	[NaBO ₂] = 0,0770 [H ₃ BO ₃] = 0,0261 0,1031		[NaBO ₂] = 0,0997 [H ₃ BO ₃] = 0,0107 0,1104
$(a \pm \Delta a)$ [min ⁻¹]	$-(1,51 \pm 0,24) \times 10^{-2}$		$-(1,62 \pm 0,30) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(2,52 \pm 0,40) \times 10^{-4}$		$(2,69 \pm 0,50) \times 10^{-4}$
S_a	$9,84 \times 10^{-4}$		$1,21 \times 10^{-3}$
r	-0,990		-0,984
n	7		8



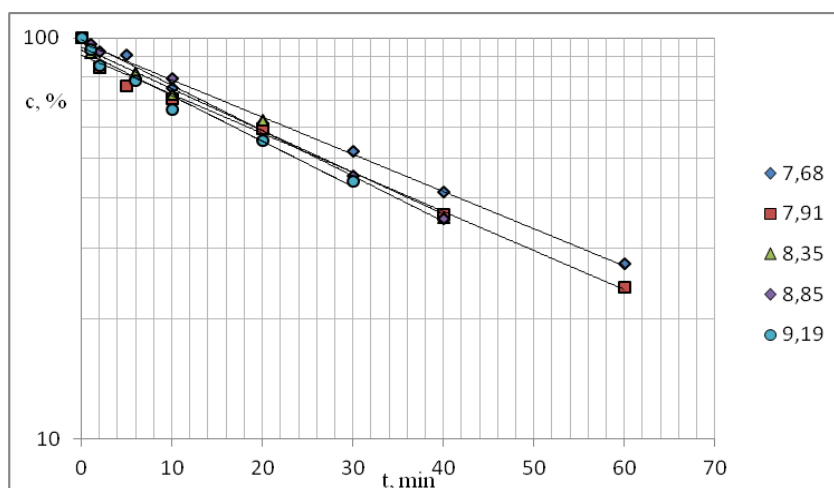
Rycina 48.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze boranowym o pH 7,64, 7,87, 8,33, 8,84 i 9,15, w temperaturze 303 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

Tabela 32.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w buforze boranowym, w temperaturze 308 K ($\mu = 0,50$ mol/l)

[pH]	pH = 7,68	pH = 7,91	pH = 8,35
Stężenie składników buforu, [mol/l] B_T [mol/l]	[NaBO ₂] = 0,0165 [H ₃ BO ₃] = 0,1770 0,1935	[NaBO ₂] = 0,0390 [H ₃ BO ₃] = 0,1321 0,1711	[NaBO ₂] = 0,0586 [H ₃ BO ₃] = 0,0628 0,1214
$(a \pm \Delta a)$ [min ⁻¹]	$-(2,14 \pm 0,17) \times 10^{-2}$	$-(2,24 \pm 0,26) \times 10^{-2}$	$-(2,39 \pm 0,32) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(3,56 \pm 0,28) \times 10^{-4}$	$(3,74 \pm 0,43) \times 10^{-4}$	$(3,99 \pm 0,53) \times 10^{-4}$
S_a	$6,83 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-3}$	$1,29 \times 10^{-3}$
r	-0,997	-0,995	-0,993
n	7	7	7
[pH]	pH = 8,85		pH = 9,19
Stężenie składników buforu, [mol/l] B_T [mol/l]	[NaBO ₂] = 0,0770 [H ₃ BO ₃] = 0,0261 0,1031		[NaBO ₂] = 0,0997 [H ₃ BO ₃] = 0,0107 0,1104
$(a \pm \Delta a)$ [min ⁻¹]	$-(2,61 \pm 0,23) \times 10^{-2}$		$-(2,61 \pm 0,51) \times 10^{-2}$
$(k \pm \Delta k)$ [s ⁻¹]	$(4,35 \pm 0,38) \times 10^{-4}$		$(4,35 \pm 0,85) \times 10^{-4}$
S_a	$8,81 \times 10^{-4}$		$1,97 \times 10^{-3}$
r	-0,997		-0,986
n	7		7



Rycina 49.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w buforze boranowym o pH 7,68, 7,91, 8,35, 8,85 i 9,19, w temperaturze 308 K ($\mu = 0,50$ mol/l).

4.6. Ocena trwałości PPD w roztworach do podania parenteralnego

Trwałość PPD w roztworach do podania parenteralnego zbadano w następujących warunkach:

- w temperaturze pokojowej (22°C), po 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h przechowywania
- w temperaturze od 2 do 8°C, po 0 h, 6 h, 24 h przechowywania
- w temperaturze -16°C, po 0 i 30 dniach przechowywania [90].

W sterylnych polietylenowych ampułkach o pojemności 5 ml, zawierających 5,0 ml roztworu do podania parenteralnego (Tabela 3), rozpuszczono 1,5 mg PPD i przechowywano w podanych powyżej warunkach.

W określonych odstępach czasu pobierano 0,5 ml tak przygotowanego roztworu i dodawano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego – 0,05 mg/ml roztwór chlorowodoru chininy. Otrzymane roztwory analizowano opisaną w rozdziale 4.4 metodą HPLC. Wszystkie roztwory chroniono przed dostępem światła.

Ubytek stężenia substratu po czasie t (wyrażony w procentach) obliczono przyjmując stężenie po czasie $t = 0$ jako 100%.

Wyniki badań trwałości PPD w roztworach do podania parenteralnego przedstawiono w tabelach 33 – 36 i na rycinach 50 – 53.

Tabela 33.

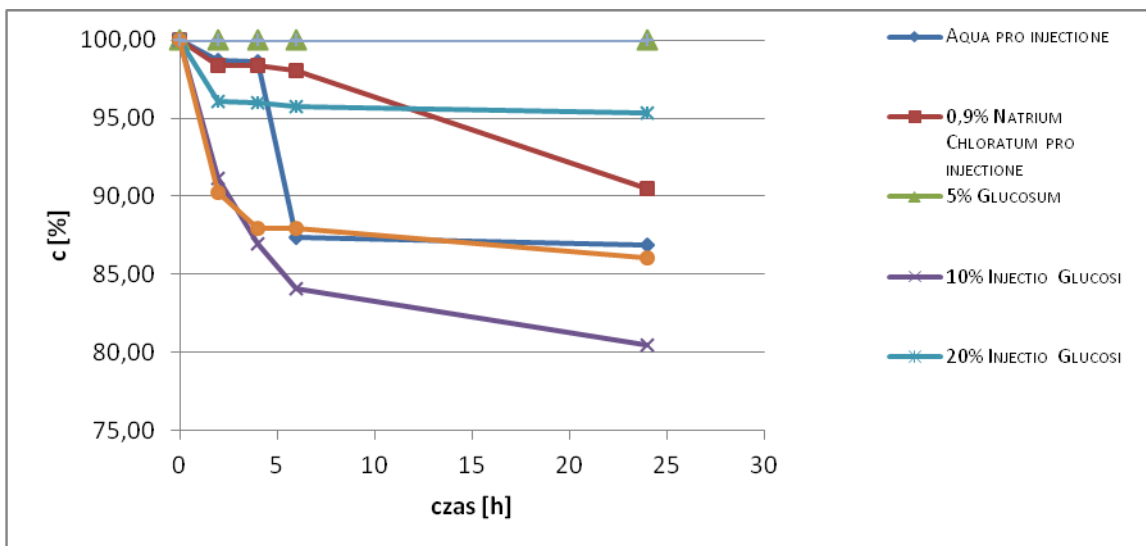
Wyniki badania trwałości PPD w roztworach do podania parenteralnego przechowywanych w temperaturze pokojowej

Roztwór	Czas przechowywania, h	Stężenie PPD, c [%]
Aqua pro injectione	0	100,00
	2	98,70
	4	98,62
	6	87,39
	24	86,89
0,9% Natrium Chloratum pro injectione	0	100,00
	2	98,38
	4	98,36
	6	98,03
	24	90,52
5% Glucosum	0	100,00
	2	100,00
	4	100,00
	6	100,00
	24	100,00
10% Injectio Glucosi	0	100,00
	2	91,13
	4	86,92
	6	84,06
	24	80,47
20% Injectio Glucosi	0	100,00
	2	96,06
	4	96,02
	6	95,78
	24	95,31
Solutio Ringeri	0	100,00
	2	90,27
	4	87,97
	6	87,93
	24	86,04
Solutio Ringeri Lactate	0	100,00
	2	100,00
	4	100,00
	6	100,00
	24	100,00

Tabela 34.

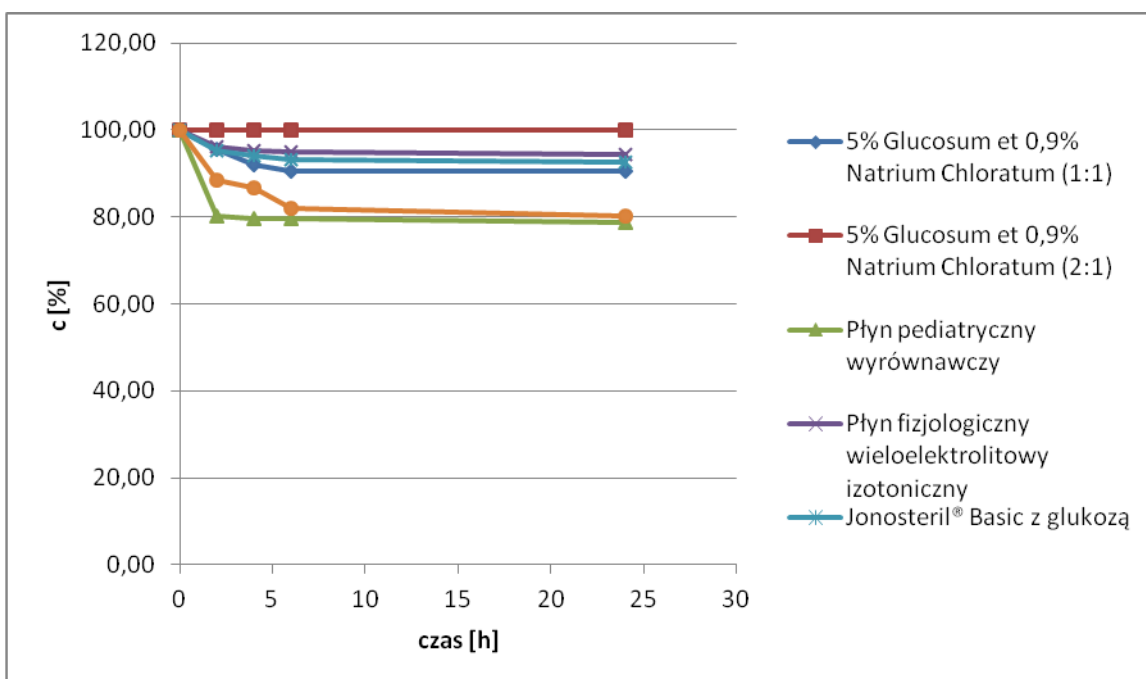
Wyniki badania trwałości PPD w roztworach do podania parenteralnego przechowywanych w temperaturze pokojowej

Roztwór	Czas przechowywania, h	Stężenie PPD, c [%]
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (1:1)	0	100,00
	2	95,56
	4	92,03
	6	90,63
	24	90,60
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1)	0	100,00
	2	100,00
	4	100,00
	6	100,00
	24	100,00
Płyn pediatriczny wyrównawczy	0	100,00
	2	80,32
	4	79,65
	6	79,47
	24	78,85
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	100,00
	2	96,10
	4	95,30
	6	95,08
	24	94,34
Jonosteril® Basic z glukozą	0	100,00
	2	95,22
	4	93,97
	6	93,11
	24	92,67
20% Mannitol	0	100,00
	2	88,50
	4	86,63
	6	82,02
	24	80,15



Rycina 50.

Wykresy zależności $c, \% = f(t)$ po przechowywaniu w temperaturze pokojowej.



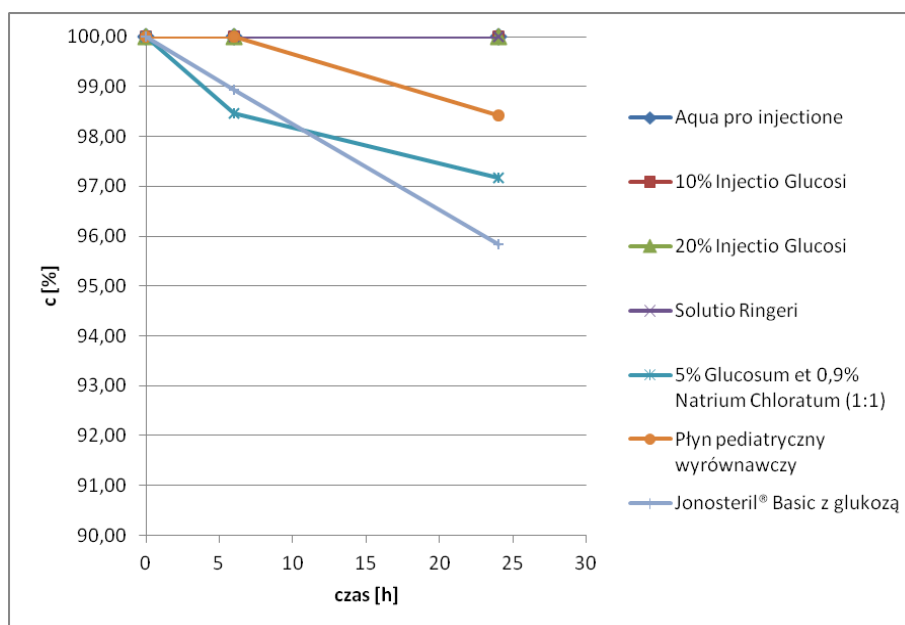
Rycina 51.

Wykresy zależności $c, \% = f(t)$ po przechowywaniu w temperaturze pokojowej.

Tabela 35.

Wyniki badania trwałości PPD w roztworach do podania parenteralnego przechowywanych w temperaturze 2 – 8°C

Roztwór	Czas przechowywania, h	Stężenie PPD, c [%]
Aqua pro injectione	0	100,00
	6	100,00
	24	100,00
10% Injectio Glucosi	0	100,00
	6	100,00
	24	100,00
20% Injectio Glucosi	0	100,00
	6	100,00
	24	100,00
Solutio Ringeri	0	100,00
	6	100,00
	24	100,00
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (1:1)	0	100,00
	6	98,46
	24	97,17
Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	100,00
	6	100,00
	24	98,41
Jonosteril® Basic z glukozą	0	100,00
	6	98,94
	24	95,84



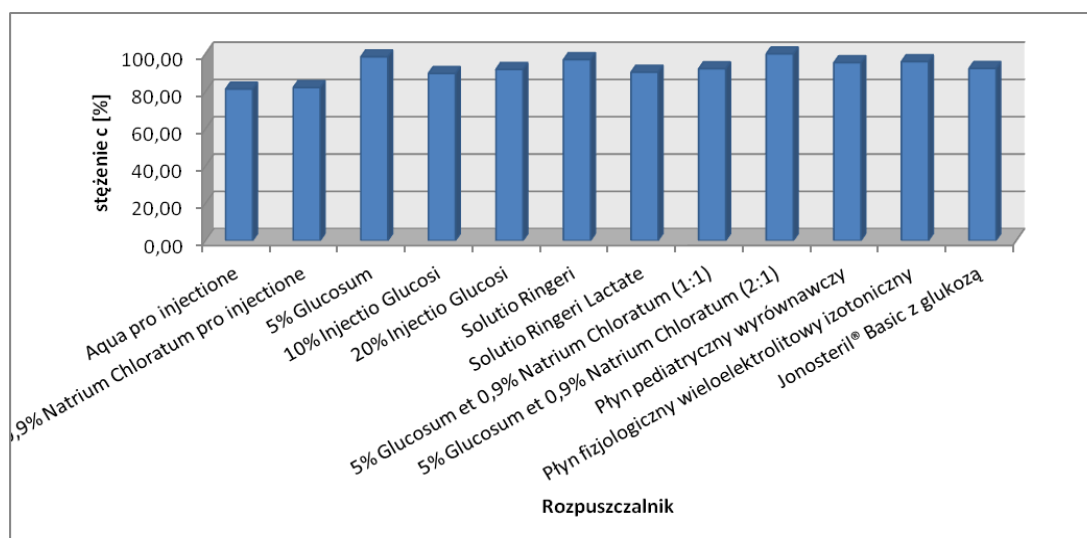
Rycina 52.

Wykresy zależności $c, \% = f(t)$ po przechowywaniu w temperaturze 2 – 8°C.

Tabela 36.

Wyniki badania trwałości PPD w roztworach do podania parenteralnego po 30 dniowym przechowywaniu w temperaturze -16°C

Roztwór	Stężenie PPD, c [%]
Aqua pro injectione	81,17
0,9% Natrium Chloratum pro injectione	82,00
5% Glucosum	98,47
10% Injectio Glucosi	89,53
20% Injectio Glucosi	91,67
Solutio Ringeri	97,00
Solutio Ringeri Lactate	90,21
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (1:1)	92,04
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1)	100,00
Płyn pediatryczny wyrównawczy	95,30
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	95,91



Rycina 53.

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

4.7. Ocena fototrwałości PPD w roztworach wodnych

Fototrwałość PPD w roztworach wodnych oceniono w roztworach o stężeniu 25,0 µg/ml, umieszczonych w cylindrycznej kuwecie kwarcowej o pojemności 2,5 ml i długości drogi optycznej $l = 1$ cm. Naświetlania były prowadzone wysokociśnieniową lampą UV z palnikiem rtęciowym HBO-50, emitującą promieniowanie w zakresie od 300 do 700 nm. Maksimum absorpcji promieniowania przy 365 i 510 nm osiągnięto stosując filtr Wood'a. Do określenia natężenia promieniowania padającego na badany układ, wykorzystano aktynometr fizyczny – radiometr typu VLX-3W, Vilber Lourmat [89].

Wstępna ocena rozkładu fotochemicznego PPD

Ocenę fotostabilności przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zamieszczonymi w Dokumencie ICH Q1B. Według Przewodnika ICH przed przystąpieniem do szczegółowych badań należy wstępnie ocenić podatność danej substancji na rozkład fotochemiczny. Wyniki te pozwalają na kwalifikację związku jako fotolabilnego lub fotostabilnego i przejście do kolejnych etapów badań.

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

Przygotowanie prób do naświetlania

Przygotowano roztwory PPD o stężeniu w zakresie 0,02 – 0,035 µg/ml. Próby naświetlano w kwarcowych kuwetach z teflonowym korkiem o długości drogi optycznej $l = 1$ cm.

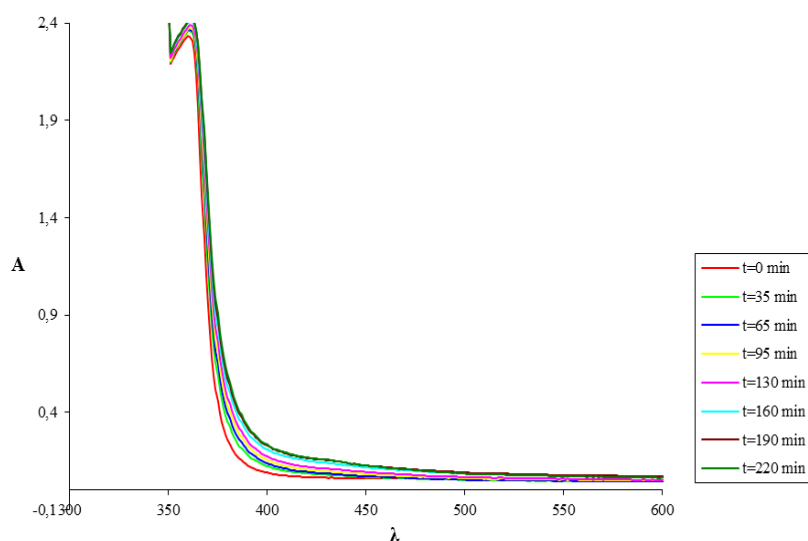
Przygotowanie roztworu chininy

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

Wykonanie badania

Podczas naświetlania prób, w określonych przedziałach czasu, wykreślano widma UV i mierzono absorbancję roztworu przy długości fali $\lambda = 400$ nm (chlorowodorek chininy) lub $\lambda = 480$ nm (badany związek). Zmiany widm roztworu chlorowodoru chininy przedstawiono na rycinie 54, a absorbancję przy $\lambda = 480$ nm w tabeli 37, natomiast PPD na rycinie 55 i w tabeli 38.

Aktynometr chemiczny



Rycina 54.

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

Tabela 37.

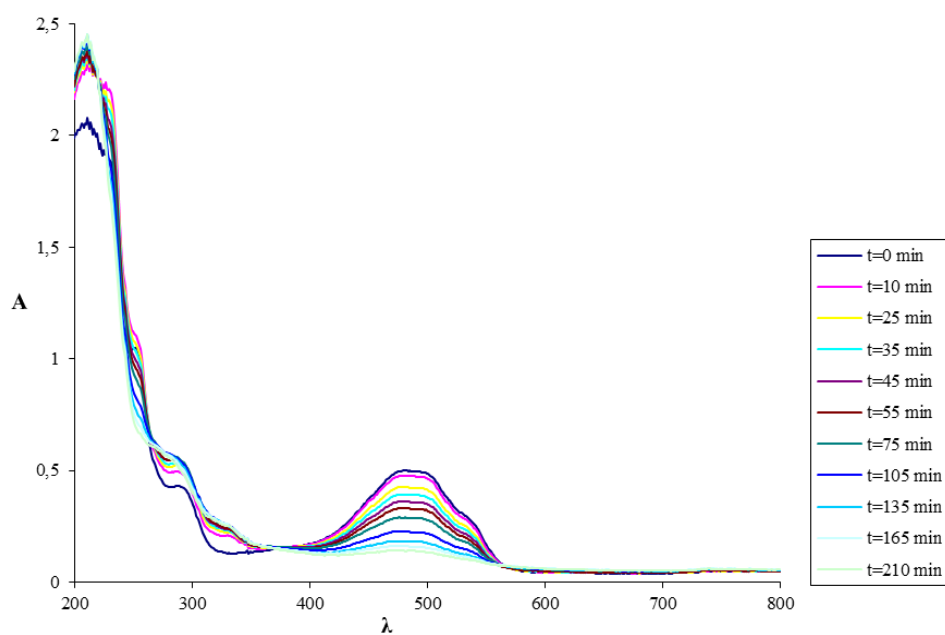
Zmiany absorbancji przy 400 nm w czasie podczas naświetlania roztworu chlorowodoru chininy

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

A_0 = absorbancja roztworu chininy przed naświetlaniem

A_t = absorbancja roztworu chininy po odpowiednim czasie naświetlania

PPD



Rycina 55.

Zmiany widma absorpcji PPD podczas naświetlania.

Tabela 38.

Zmiany absorbancji podczas naświetlania PPD

Czas naświetlania [min]	Absorbancja A_t	Różnica absorbancji $\Delta A = A_0 - A_t$
0	0,4989	0
25	0,4256	0,0733
55	0,3307	0,1682
90	0,2502	0,2487
135	0,1839	0,3150
165	0,1604	0,3385
190	0,1431	0,3558
210	0,1391	0,3598

Ocena rozkładu fotochemicznego PPD

Warunki rozkładu fotochemicznego

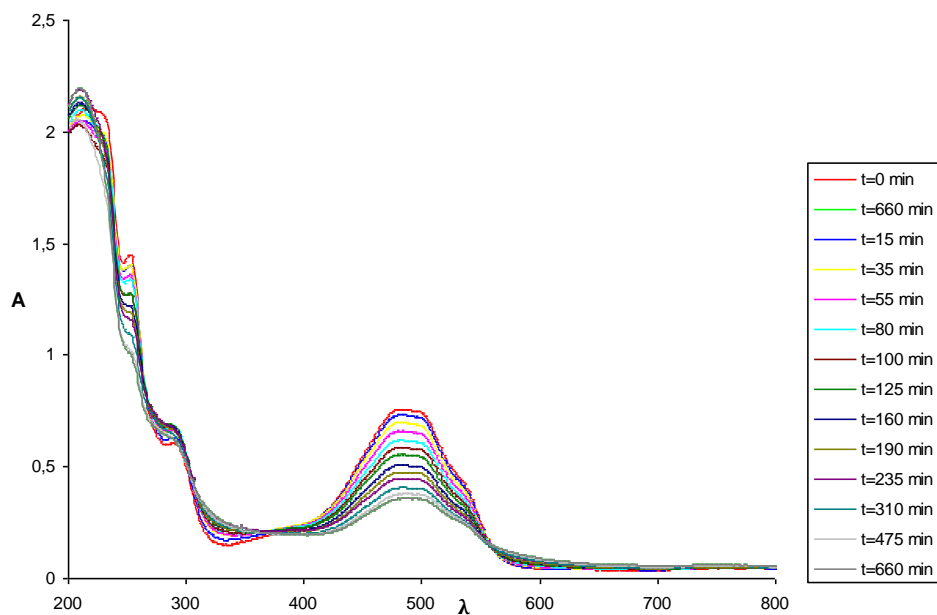
Roztwory wodne badanej substancji umieszczano w okrągłej kuwecie kwarcowej o poj. 2,8 cm³ i naświetlano wysokociśnieniową lampą UV – VIS HBO–50 z palnikiem rtęciowym, emitującą promieniowanie w zakresie 300 - 800 nm. Natężenie światła mierzone radiometrem wynosiło 86,0 – 89,0 mW/cm². W czasie 1 min rejestrowano energię 5,10 – 5,30 J/cm².

Odpowiednie warunki naświetlania uzyskano stosując filtry *Pyrex* o maksymalnej przepuszczalności światła przy długości fali $\lambda_{maks} = 365$ nm oraz $\lambda_{maks} = 510$ nm. W trakcie naświetlań mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 480$ nm (Rycina 56, 58).

Parametry kinetyczne rozkładu fotochemicznego PPD

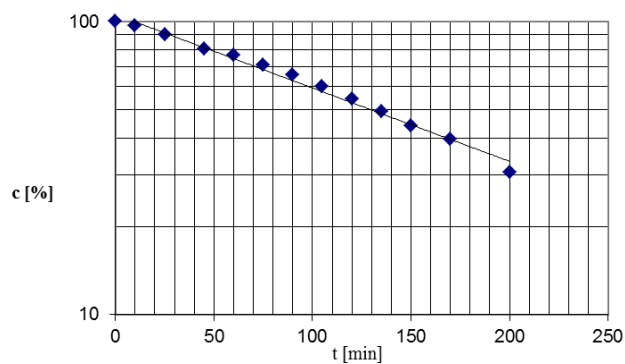
Rozkład PPD pod wpływem światła analizowano zgodnie z liniowym równaniem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu (Rycina 57, 59).

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



Rycina 56.

Zmiany absorancji podczas naswietlania PPD (filtr $\lambda_{maks} = 365 \text{ nm}$).



Parametry kinetyczne reakcji rozkładu

$$a \pm \Delta a = -(2,50 \pm 0,29) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

$$S_a = 1,17 \cdot 10^{-4}$$

$$r = -0,9960$$

$$k = (1,15 \pm 0,05) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

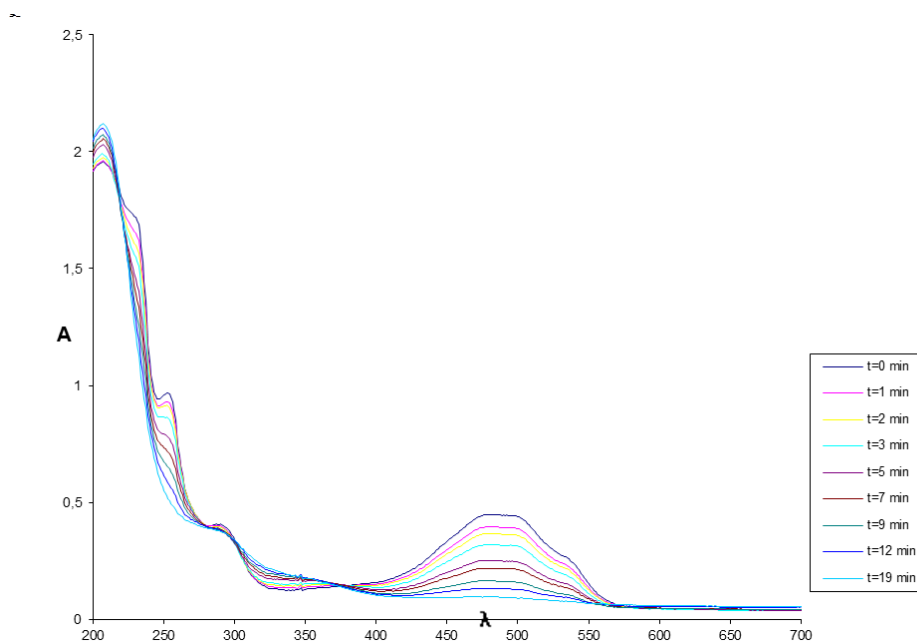
$$t_{0,5} = 100,4 \text{ min}$$

$$t_{0,1} = 1,3 \text{ min}$$

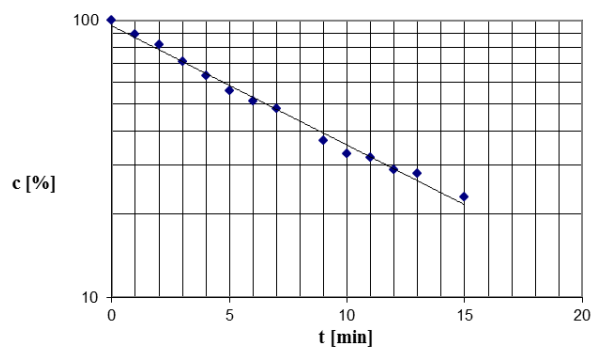
Rycina 57.

Półlogarytmiczna zależność $c, \% = f(t)$ dla PPD (filtr $\lambda_{maks} = 365 \text{ nm}$).

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



Rycina 58.
Zmiany absorbancji podczas naświetlania PPD (filtr $\lambda_{maks} = 510 \text{ nm}$).



Parametry kinetyczne reakcji rozkładu

$$a \pm \Delta a = -(9,92 \pm 0,56) \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

$$S_a = 2,61 \cdot 10^{-3}$$

$$r = -0,996$$

$$k = (1,65 \pm 0,96) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$t_{0,5} = 7,0 \text{ min}$$

$$t_{0,1} = 1,1 \text{ min}$$

Rycina 59.
Półlogarytmiczna zależność $c, \% = f(t)$ dla PPD (filtr $\lambda_{maks} = 510 \text{ nm}$).

Wydajność kwantowa procesu fotodegradacji

Wydajność kwantowa należy do najważniejszych parametrów w analizie rozkładu fotochemicznego substancji i definiuje się ją jako stosunek liczby cząsteczek ulegających fotodegradacji do liczby fotonów absorbowanych przez daną objętość w określonym przedziale czasowym.

Wydajność kwantowa źródła promieniowania – filtr 365 nm

Prowadząc naświetlanie prób z użyciem filtru 365 nm założono średnią długość fali padającego światła $\lambda = 365$ nm. Zmierzono natężenie promieniowania wykorzystując radiometr zaopatrzone w sensor 365 nm i uzyskano średnią wartość:

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

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

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

h = stała Plancka, $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$
 c = prędkość światła, $c = 2,998 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$

Ponieważ dla $\lambda = 365$ nm:

$$1 \text{ J odpowiada } 1,838 \cdot 10^{18} \text{ kwantów,}$$

dlatego energii 0,0872 J odpowiada $0,1604 \cdot 10^{18}$ kwantów.

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

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

Wydajność kwantowa źródła promieniowania – filtr 510 nm

Prowadząc naświetlanie prób z użyciem filtru 510 nm założono średnią długość fali padającego światła $\lambda = 510$ nm. Przyjęto średnią wartość natężenia promieniowania:

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

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

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

Ponieważ dla $\lambda = 510$ nm:

$$1 \text{ J odpowiada } 2,57 \cdot 10^{18} \text{ kwantów,}$$

dlatego energii 0,0872 J odpowiada $0,2241 \cdot 10^{18}$ kwantów.

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

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

Na podstawie wartości I_0 obliczono ilość kwantów absorbowanych przez próbkę korzystając ze wzoru:

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

I_{abs} = liczba kwantów promieniowania emitowanego przez lampę

A = absorbancja.

Wydajność kwantową fotodegradacji dla danego procentu konwersji badanych pochodnych obliczono ze wzoru:

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

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

I_{abs} = liczba kwantów promieniowania absorbowanego przez próbkę

t = czas [s].

Wartości wydajności kwantowych PPD obliczono, korzystając z programu udostępnionego przez Zakład Fotochemii Wydziału Chemii UAM. Wartości pozornych wydajności kwantowych dla poszczególnych czasów naświetlania ekstrapolowano do początkowego stężenia badanego związku, otrzymując wartości rzeczywistych wydajności kwantowych (Tabela 39, 40).

Do obliczeń wykorzystano molowy współczynnik absorpcji PPD, którego wartość wyznaczono zgodnie z poniższym wzorem:

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

- ε = molowy współczynnik absorpcji [$l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
 A = absorbancja
 c = stężenie badanego roztworu [mol/l]
 l = długość drogi optycznej (1 cm).

Obliczone średnie wartości molowych współczynników absorpcji dla PPD wynosiły:

- $3,20 \cdot 10^3$, promieniowanie wzbudzające, ε_{365}
- $8,01 \cdot 10^3$, promieniowanie wzbudzające, ε_{510}
- $9,21 \cdot 10^3$, promieniowanie analizowane, ε_{480}

Tabela 39.

Wydajności kwantowe fotochemicznego rozkładu PPD (filtr $\lambda_{\text{maks}} = 365 \text{ nm}$)

Lp.	t [s]	A_i	Pozorna wydajność kwantowa Φ_1	% konwersji
1	0	0,8575	0,00	0
2	5	0,8333	$8,74 \times 10^{-5}$	2,82
3	15	0,7714	$1,04 \times 10^{-5}$	10,04
4	25	0,7369	$8,71 \times 10^{-5}$	14,06
5	35	0,7010	$8,07 \times 10^{-5}$	18,25
6	45	0,6419	$8,65 \times 10^{-5}$	25,14
7	55	0,5871	$8,88 \times 10^{-5}$	31,53
8	65	0,5310	$9,07 \times 10^{-5}$	38,08
9	75	0,4978	$8,66 \times 10^{-5}$	41,95
10	85	0,4604	$8,43 \times 10^{-5}$	46,31
11	95	0,4159	$8,39 \times 10^{-5}$	51,50
12	105	0,3892	$8,05 \times 10^{-5}$	54,61
13	115	0,3771	$7,54 \times 10^{-5}$	56,02
14	135	0,3489	$6,80 \times 10^{-5}$	59,31
15	145	0,3387	$6,46 \times 10^{-5}$	60,50
16	165	0,3016	$6,08 \times 10^{-5}$	64,83
17	195	0,2827	$5,32 \times 10^{-5}$	67,03
18	245	0,2674	$4,35 \times 10^{-5}$	68,82
19	305	0,2623	$3,52 \times 10^{-5}$	69,41

Tabela 40.

Wydajności kwantowe fotochemicznego rozkładu PPD (filtr $\lambda_{\text{maks}} = 510 \text{ nm}$)

Lp.	t [s]	A_i	Wydajność kwantowa Φ_1	% konwersji
1	0	0,4481	0	0
2	1	0,3966	$4,68 \times 10^{-4}$	11,49
3	2	0,3675	$3,66 \times 10^{-4}$	17,99
4	3	0,3196	$3,89 \times 10^{-4}$	28,68
5	4	0,2844	$3,72 \times 10^{-4}$	36,53
6	5	0,2514	$3,57 \times 10^{-4}$	43,90
7	6	0,2271	$3,35 \times 10^{-4}$	49,32
8	7	0,2170	$3,00 \times 10^{-4}$	51,57
9	9	0,1657	$2,85 \times 10^{-4}$	63,02
10	10	0,1490	$2,72 \times 10^{-4}$	66,75
11	11	0,1453	$2,50 \times 10^{-4}$	67,57
12	12	0,1319	$2,39 \times 10^{-4}$	70,56
13	13	0,1255	$2,25 \times 10^{-4}$	71,99
14	15	0,1013	$2,10 \times 10^{-4}$	75,34
15	17	0,1008	$1,86 \times 10^{-4}$	77,51
16	19	0,0985	$1,67 \times 10^{-4}$	78,02

4.8. Ocena trwałości PPD w fazie stałej

4.8.1. Metoda analityczna

Do oceny trwałości PPD w fazie stałej zastosowano metodę HPLC opisaną w rozdziale 4.4.

4.8.2. Ocena trwałości PPD testem przyspieszonego starzenia

Do szklanych fiolek, pojemności 5 ml, odważono po 5,0 mg badanego związku. Fiolki zawierające próbki preparatu przeznaczone do badania wpływu temperatury w atmosferze powietrza o wilgotności względnej $RH \sim 76,4\%$, wstawiono do ekscyktorów zawierających nasycony roztwór chlorku sodu. Ekscykatory umieszczono w komorach cieplnych o temperaturze odpowiednio 343 K, 353 K, 363 K, 373 K.

Próbki przeznaczone do badania wpływu temperatury w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0%, wstawiono do łaźni piaskowej, umieszczonej w komorze cieplnej o temperaturze 373 K.

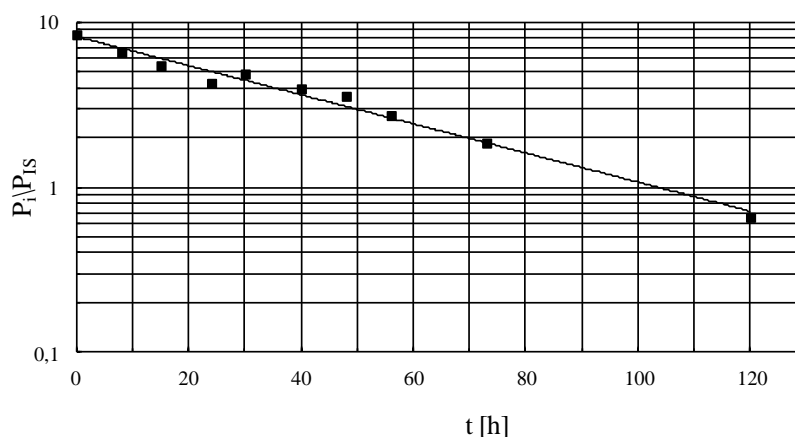
W określonych odstępach czasu, zależnych od szybkości rozkładu, próbki wyjmowano z eksykatorów lub łaźni piaskowej. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, próbki substancji badanych rozpuszczano w mieszaninie acetonitrylu z wodą (1:1). Roztwory przenoszono ilościowo do kolb miarowych i uzupełniano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

4.8.3. Parametry kinetyczne reakcji

Na podstawie zmian stężenia PPD w czasie, stwierdzono, że w atmosferze powietrza o wilgotności względnej $RH \sim 76,4\%$ i podwyższonej temperaturze, rozkład zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu (Rozdział 4.5.2).

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

Półlogarytmiczny wykres $P_i/P_{IS} = f(t)$ jest prostoliniowy (Rycina 60), a jego nachylenie jest miarą szybkości reakcji ($-k_{obs}$).



Rycina 60.

Półlogarytmiczny wykres zależności $P_i/P_{IS} = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w fazie stałej, w temperaturze 353 K, przy wilgotności względnej powietrza $\sim 76,4\%$.

Rozkład PPD w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0%, w temperaturze 373 K, zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu (Rycina 61).

Stałą szybkości reakcji autokatalitycznej obliczono ze wzoru:

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

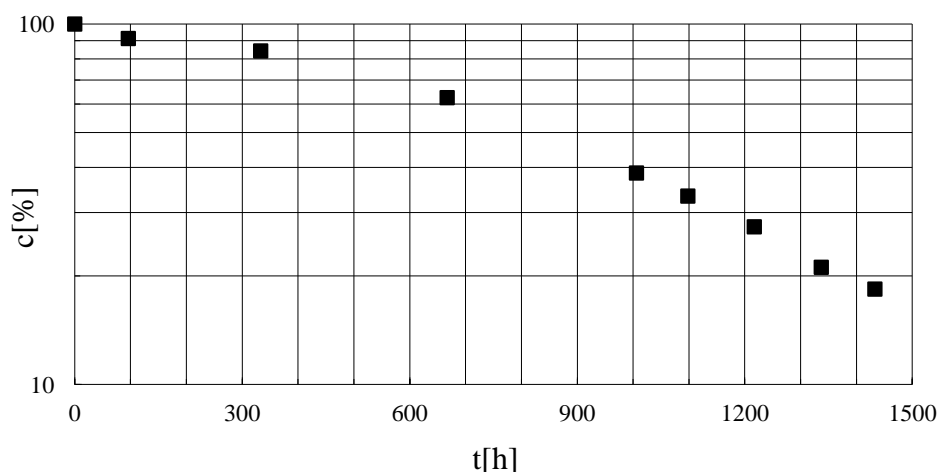
gdzie:

$$(1 - \alpha) / \alpha = P_t / (P_0 - P_t) = c_t / (c_0 - c_t),$$

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

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

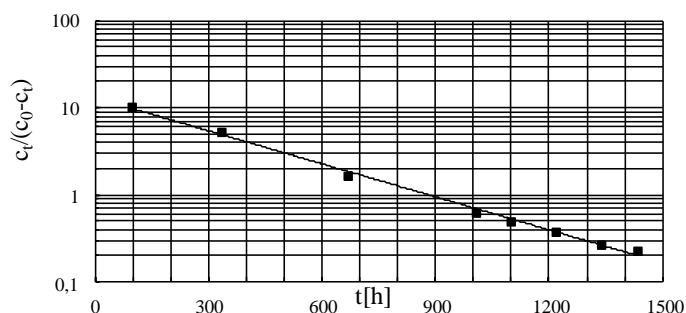
c – stała związana z okresem indukcji.



Rycina 61.

Półlogarytmiczny wykres zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w fazie stałej, w temperaturze 373 K, przy wilgotności względnej powietrza 0%.

Półlogarytmiczny wykres $c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$ jest prostoliniowy (Rycina 62), a jego nachylenie jest miarą szybkości reakcji ($-\gamma = k_{\text{obs}}$).



Parametry kinetyczne reakcji

$$(a \pm \Delta a) [\text{h}^{-1}] = (-2,90 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$$

$$S_a = 0,735 \cdot 10^{-4}$$

$$(k \pm \Delta k) [\text{s}^{-1}] =$$

$$(0,0808 \pm 0,0048) \cdot 10^{-5}$$

$$r = -0,998$$

$$S_y = 0,094$$

$$t_{0,5}, h = 882,8$$

$$t_{0,1}, h = 125,2$$

$$n = 8$$

Rycina 62.

Półlogarytmiczny wykres zależności $c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w fazie stałej, w temperaturze 373 K, przy wilgotności względnej powietrza 0%.

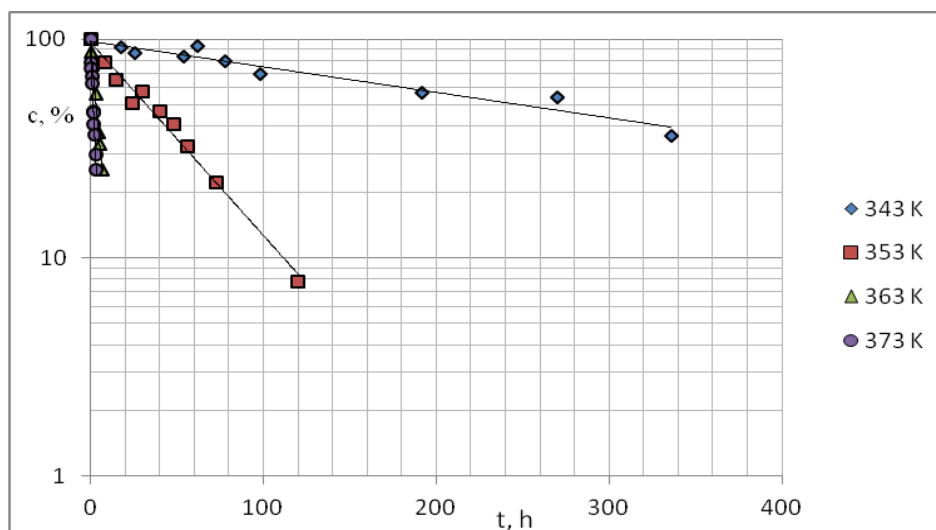
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w fazie stałej, RH ~76,4%

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu PPD w fazie stałej przy RH ~76,4% przedstawiono w tabeli 41, natomiast wykresy zależności $c, \% = f(t)$ na rycinie 63.

Tabela 41.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu chlorowodoru PPD w fazie stałej, w podwyższonej temperaturze, przy wilgotności względnej powietrza ~76,4%

Parametry kinetyczne	343 K	353 K	363 K	373 K
$(a \pm \Delta a) \times 10^{-3}$ [h ⁻¹]	$-(2,74 \pm 0,55)$	$-(20,31 \pm 2,23)$	$-(204,2 \pm 18,2)$	$-(373,8 \pm 33,2)$
S_a	$2,40 \cdot 10^{-4}$	$9,65 \cdot 10^{-4}$	$70,8 \cdot 10^{-4}$	$146,8 \cdot 10^{-4}$
$b \pm \Delta b$	$6,65 \pm 1,10$	$8,18 \pm 1,14$	$5,55 \pm 1,07$	$2,38 \pm 1,06$
S_b	$37,6 \times 10^{-3}$	$51,5 \times 10^{-3}$	$27,1 \times 10^{-3}$	$27,5 \times 10^{-3}$
$(k \pm \Delta k) \cdot 10^{-5}$ [s ⁻¹]	$(0,0762 \pm 0,015)$	$(0,564 \pm 0,062)$	$(5,68 \pm 0,51)$	$(10,4 \pm 0,9)$
r	-0,970	-0,991	-0,997	-0,993
$t_{0,5}$, h	252,91	34,12	3,39	1,85
$t_{0,1}$, h	38,46	5,18	0,51	0,28
n	10	10	7	11



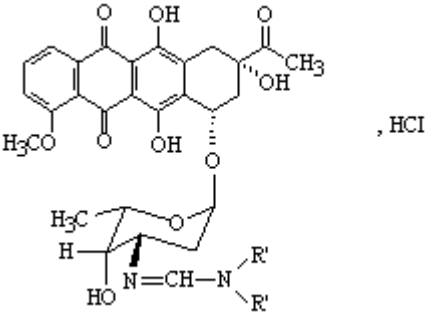

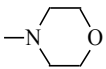
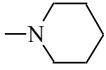
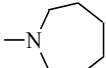
Rycina 63.

Półlogarytmiczne wykresy zależności $c, \% = f(t)$ reakcji rozkładu PPD w fazie stałej, w podwyższonej temperaturze, przy wilgotności względnej powietrza ~76,4%.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Nowoczesna medycyna cały czas stymuluje rozwój leków. Odkrywa się związki nowe, o nieznanych dotąd właściwościach, ale też modyfikuje się cząsteczki leków już znanych, tak by wykazywały one lepszą skuteczność kliniczną, a także by były bezpieczniejsze dla pacjenta. Antybiotyki antracyklinowe to przykład grupy związków stosowanych w lecznictwie od dawna, a które nadal są intensywnie rozwijane. Głównym powodem poszukiwania nowych pochodnych antracyklin jest ich kardiotoxycznosc, która może stanowić duże zagrożenie dla pacjenta i dlatego poszukuje się nowych pochodnych, które przy zachowaniu właściwości przeciwnowotworowych, byłyby pozbawione tego niebezpiecznego działania ubocznego. Dodatkowo w przypadku stosowania tej grupy leków pojawia się zjawisko oporności komórek nowotworowych na terapię, dlatego potrzebne są nowe cząsteczki zdolne do pokonania tej bariery. Wszystkie nowe leki przed wprowadzeniem do lecznictwa muszą przejść szereg testów i badań. Jednymi z tych badań są badania trwałości, które mają na celu określenie podatności danej substancji na działanie różnych czynników środowiskowych, takich jak temperatura, wilgotność czy światło, ustalenie mechanizmu rozkładu w różnych środowiskach, a także identyfikację produktów rozkładu. Wszystko to ma na celu zapewnienie odpowiednich warunków przechowywania i stosowania leków, tak by terapia była skuteczna i bezpieczna dla pacjenta.

Celem podjętych badań była ocena trwałości *N*-[(piperidyno)metyleno]daunorubicyny (PPD), jednej z czterech amidynowych pochodnych daunorubicyny, otrzymanych w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Pozostałe trzy pochodne to: *N*-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyna (PMD), *N*-[(morfolino)-metyleno]daunorubicyna (MMD) i *N*-[(heksahydroazepin-1-yl)metylene]daunorubicyna (HMD).

	Pochodna	NR'R'
	PMD	
	MMD	
	PPD	
	HMD	

Zaplanowane badania trwałości PPD obejmowały:

- opracowanie metod odpowiednich do oceny szybkości rozkładu w roztworach wodnych i w fazie stałej
- walidację metod (selektywność, liniowość, precyzja, granica wykrywalności i oznaczalności)
- badania trwałości w roztworach wodnych, z uwzględnieniem ogólnej i właściwej katalizy kwasowo-zasadowej (wpływ stężenia jonów wodorowych, rodzaju i stężenia składników buforów w zakresie pH 0,44 – 13,54 oraz siły jonowej), badania przeprowadzono w trzech lub czterech temperaturach
- ocenę trwałości w płynach infuzyjnych; w temperaturze pokojowej, 2–8⁰C oraz -16⁰C
- ocenę podatności na działanie promieniowania elektromagnetycznego o długości fali 365 nm i 510 nm
- ocenę wpływu temperatury i wilgotności względnej powietrza na trwałość w fazie stałej
- porównanie trwałości PPD ze związkiem macierzystym – daunorubicyną i innymi amidynowymi pochodnymi daunorubicyny.

W ocenie jakości substancji leczniczej oraz ocenie jej trwałości bardzo ważnym zagadnieniem jest zastosowanie odpowiedniej metody analitycznej, która powinna umożliwiać obserwację zmian stężenia substratu obok tworzących się produktów rozkładu. Zastosowana metoda musi być poddana procesowi walidacji, którego celem jest wykazanie jej przydatności do wyznaczonego badania.

W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej [87], a w przypadku badania fototrwałości metodę UV-VIS [89].

Przeprowadzona walidacja metod wykazała, że są one:

- selektywne dla PPD w obecności produktów jej rozkładu oraz wzorca wewnętrznego (HPLC)
- liniowe w zakresie badanych stężeń
- precyzyjne, o czym świadczą wartości współczynników zmienności poniżej 5%
- czułe, gdyż można rejestrować widoczny przyrost wartości mierzonej przy małej zmianie wartości oznaczanej.

Trwałość PPD w roztworach wodnych

Badania trwałości PPD w roztworach wodnych polegały na:

- wyznaczeniu obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu w zakresie pH od 0,43 do 13,08 w temperaturze 313 K, w zakresie pH 0,43 – 5,55 w temperaturze 323 K, 333 K i 343 K, w zakresie pH 5,85 – 13,37 w temperaturze 303 K i 308 K, w zakresie pH 12,12 – 13,54 w temperaturze 298 K
- wyznaczeniu stałych k_{pH} , charakteryzujących właściwą katalizę kwasowo-zasadową
- opisanu zależności $\log k_{pH} = f(pH)$ odpowiednim równaniem kinetycznym
- obliczeniu katalitycznych stałych szybkości reakcji cząstkowych
- wyznaczeniu parametrów termodynamicznych reakcji cząstkowych.

Ogólna kataliza kwasowo-zasadowa

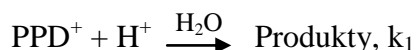
Ogólna kataliza kwasowo-zasadowa występuje wówczas, jeżeli przy stałej wartości pH i siły jonowej, przy różnych stężeniach składników buforu, szybkość reakcji zmienia się wraz ze wzrostem stężenia buforu. W celu wykazania czy składniki buforów stosowanych w badaniach trwałości PPD wykazują efekt katalityczny, przeprowadzono badania szybkości jej rozkładu przy stałej wartości pH i siły jonowej 0,50 mol/l, dla 3 różnych stężeń składników stosowanych buforów.

Stwierdzono, że składniki buforów fosforanowego, octanowego i boranowego, zastosowane w badaniach trwałości PPD, nie wykazują efektu katalitycznego, co potwierdzono po-

równując uzyskane wyniki testem równoległości. Oznacza to, że obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu w całym badanym zakresie pH są równe k_{pH} .

Wyznaczone w szerokim zakresie pH wartości k_{pH} posłużyły do interpretacji wpływu stężenia jonów wodorowych na trwałość PPD. Wykonany wykres zależności $\log k_{pH} = f(\text{pH})$ (Rycina 64) wskazuje, że w roztworach wodnych PPD, przy zerowym stężeniu składników buforów, możliwe są następujące reakcje:

- hydroliza protonowanych cząsteczek PPD katalizowana jonami wodorowymi



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



Całkowita szybkość reakcji jest równa sumie powyższych reakcji cząstkowych:

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

gdzie:

k_1 – katalityczna stała szybkości reakcji rozkładu protonowanych cząsteczek PPD pod wpływem jonów wodorowych

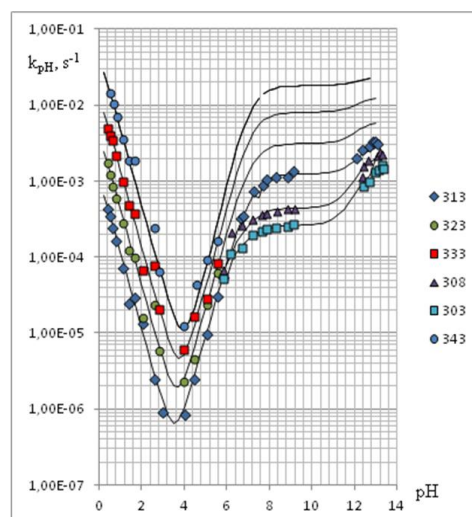
k_2 – katalityczna stała szybkości spontanicznej hydrolizy pod wpływem wody jonów obojnych PPD

k_3 – katalityczna stała szybkości spontanicznej hydrolizy pod wpływem wody cząsteczek obojętnych PPD

k_4 – katalityczna stała szybkości spontanicznej hydrolizy pod wpływem wody monoanionów PPD

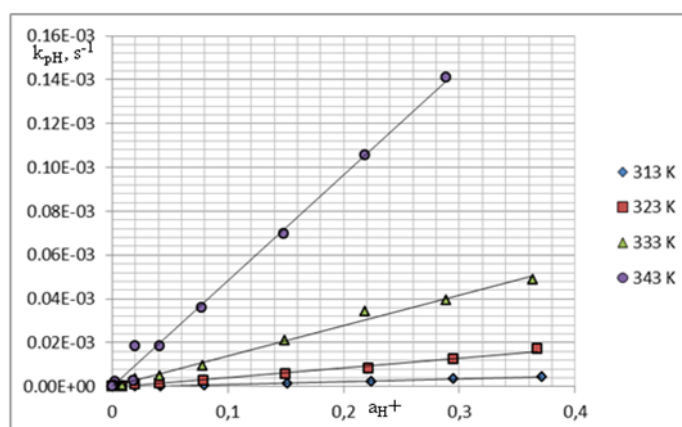
Ułamki stężeń poszczególnych form PPD ($f_1 - f_4$) wyznaczono z odpowiednich równań, a następnie wyznaczono poszczególne katalityczne stałe szybkości reakcji. Celem wyznaczenia katalitycznej stałej szybkości k_1 wykonano wykres $k_{pH} = f(a_{\text{H}^+})$, uwzględniając wartości k_{pH} z zakresu pH od 0,43 do ok. 3 (Rycina 65). Wykresy te są prostoliniowe, a ich nachylenie jest równe k_1 w danej temperaturze.

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



Rycina 64.

Profil $\log k_{pH} = f(\text{pH})$ reakcji rozkładu PPD w roztworach wodnych
 Punktory – wartości doświadczalne, linia ciągła – profil teoretyczny.



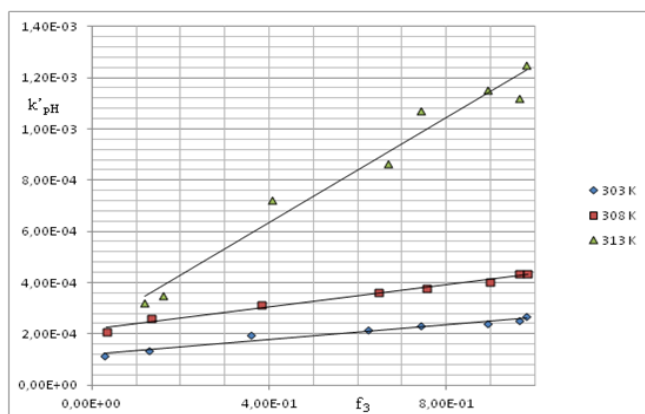
Rycina 65.

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

Dalsza interpretacja zależności $\log k_{pH} = f(\text{pH})$ pozwoliła wyznaczyć wartości k'_{pH} z równania:

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

a następnie wykonano wykresy zależności $k'_{pH} = f(f_3)$, uwzględniając wartości k_{pH} z zakresu pH od ok. 5,5 do ok. 9, w którym ułamek stężenia formy $f_2 + f_3 \rightarrow 1$. Wykresy te są prostoliniowe, a wartość k'_{pH} dla $f_3 = 1$ odpowiada katalitycznej stałej szybkości reakcji k_3 , natomiast wartość k'_{pH} dla $f_3 = 0$ odpowiada katalitycznej stałej szybkości k_2 (Rycina 66).



Rycina 66.

Zależność $k'_{pH} = f(f_3)$ reakcji rozkładu PPD w roztworach wodnych.

Wartości katalitycznych stałych szybkości reakcji k_2 i k_3 wyznaczono w temperaturze 303 K, 308 K i 313 K, a następnie z zależności Arrheniusa wartości te ekastrapolowano do temperatury 323 K, 333 K i 343 K.

Wyznaczone katalityczne stałe szybkości poszczególnych reakcji cząstkowych przedstawiono w tabeli 42. Ich wartości wykorzystano do obliczenia profilu $\log k_{pH} = f(pH)$. Obliczony profil przedstawiono na rycinie 64 linią ciągłą, natomiast wartości k_{pH} wyznaczone doświadczalnie zaznaczono punktami.

Zgodność profilu obliczonego z profilem wyznaczonym doświadczalnie oraz liniowa zależność wartości k_{obl} względem wartości k wyznaczonych doświadczalnie (Rycina 64), potwierdza prawidłowość zastosowanego równania kinetycznego.

Wartości katalitycznych stałych szybkości reakcji posłużyły do wyznaczenia zależności Arrheniusa (Rycina 67), czyli zależności pomiędzy katalityczną stałą szybkości reakcji a odwrotnością temperatury bezwzględnej:

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

Po zlogarytmowaniu równanie to przyjmuje postać:

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

gdzie:

k_i – katalityczna stała szybkości reakcji rozkładu,

A – współczynnik częstości; jego wymiar jest taki sam jak stałej szybkości reakcji

E_a – energia aktywacji

R – uniwersalna stała gazowa $8,3144; J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$

T – temperatura bezwzględna; K.

Energię aktywacji (E_a) oraz entalpię (ΔH^\ddagger) i entropię reakcji (ΔS^\ddagger) obliczono z następujących wzorów:

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

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

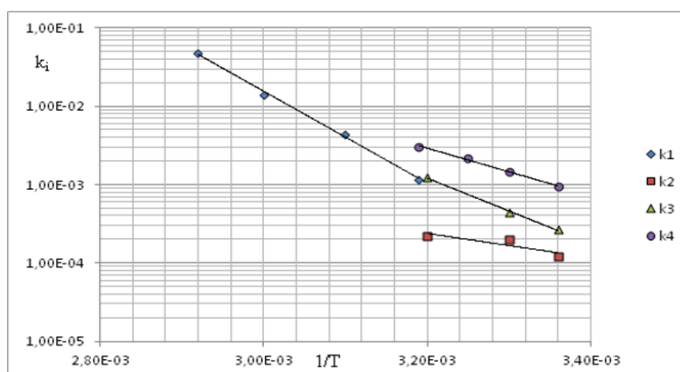
$$\Delta S^\ddagger = R [\ln A - \ln (kT/h)] \text{ [J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}\text{]}$$

gdzie:

a – nachylenie wykresu $\ln k_i = f(1/T)$; $-a = E_a/R$

k – stała Boltzmannna = $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ [J K}^{-1}\text{]}$

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



Rycina 67.

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

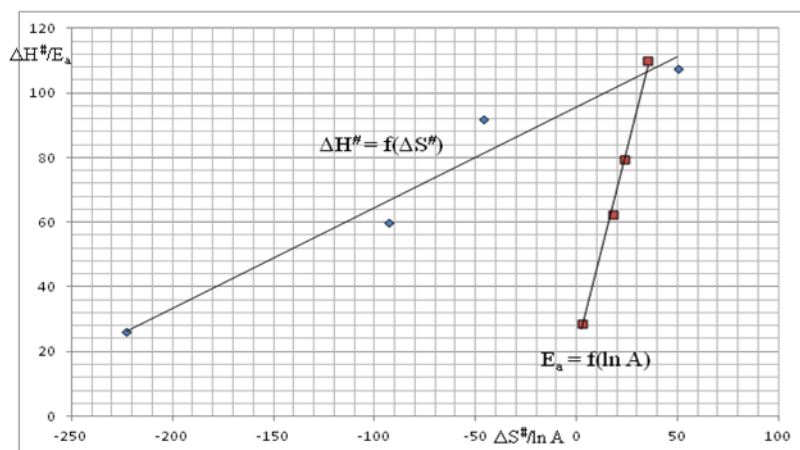
Tabela 42.

Katalityczne stałe szybkości i parametry termodynamiczne reakcji rozkładu PPD w roztworach wodnych

T, K	1/T	$k \pm \Delta k$	Zależność $k_i = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
$k_1 \text{ [mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}\text{]}$				
313	$3,195 \cdot 10^{-3}$	$(1,17 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$	$r = -0,999$ $a = -13220 \pm 1010$ $b = 35,5 \pm 3,1$	$E_a = 109,9 \pm 8,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta H^\ddagger = 107,5 \pm 8,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = 50,2 \pm 25,6 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
323	$3,096 \cdot 10^{-3}$	$(4,40 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$		
333	$3,000 \cdot 10^{-3}$	$(1,39 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$		
343	$2,915 \cdot 10^{-3}$	$(4,84 \pm 0,03) \cdot 10^{-2}$		
$k_2 \text{ [s}^{-1}\text{]}$				
303	$3,300 \cdot 10^{-3}$	$1,19 \cdot 10^{-4}$	$r = -0,850$ $a = -3440 \pm 9162$ $b = 2,64 \pm 30,1$	$E_a = 28,6 \pm 76,2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta H^\ddagger = 26,2 \pm 76,2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -222,8 \pm 250,2 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
308	$3,247 \cdot 10^{-3}$	$2,01 \cdot 10^{-4}$		
313	$3,195 \cdot 10^{-3}$	$2,21 \cdot 10^{-4}$		
$k_3 \text{ [s}^{-1}\text{]}$				
303	$3,300 \cdot 10^{-3}$	$2,66 \cdot 10^{-4}$	$r = -0,999$ $a = -9555 \pm 1065$ $b = 23,8 \pm 3,5$	$E_a = 79,4 \pm 8,9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta H^\ddagger = 81,9 \pm 8,9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -45,9 \pm 29,0 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
308	$3,247 \cdot 10^{-3}$	$4,36 \cdot 10^{-4}$		
313	$3,195 \cdot 10^{-3}$	$1,23 \cdot 10^{-3}$		
$k_4 \text{ [s}^{-1}\text{]}$				
303	$3,300 \cdot 10^{-3}$	$0,970 \cdot 10^{-3}$	$r = -0,999$ $a = -7509 \pm 690$ $b = 18,3 \pm 2,3$	$E_a = 62,4 \pm 5,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta H^\ddagger = 60,0 \pm 5,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -92,9 \pm 18,8 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
308	$3,247 \cdot 10^{-3}$	$1,50 \cdot 10^{-3}$		
313	$3,195 \cdot 10^{-3}$	$2,26 \cdot 10^{-3}$		
318	$3,145 \cdot 10^{-3}$	$3,23 \cdot 10^{-3}$		

Najniższą energię aktywacji wykazuje reakcja hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody cząsteczek obojnaczych PPD. Ujemne entropie aktywacji obserwuje się dla reakcji spontanicznych pod wpływem wody. Entropia aktywacji, czyli różnica stanu przejściowego danej reakcji oraz jej stanu początkowego nie zależy od początkowej energii aktywacji. Jeżeli w stanie przejściowym możliwość ruchów jest ograniczona lub zahamowana, wówczas ΔS^\ddagger maleje i przyjmuje bardziej ujemne wartości, im silniej jest ograniczona swoboda ruchów reagentów w kompleksie aktywnym. Ujemne entropie aktywacji są charakterystyczne dla reakcji dwucząsteczkowych, podczas których dwie cząsteczki łączą się w jeden kompleks aktywny. Wyższa entropia aktywacji reakcji katalizowanej jonami wodorowymi w porównaniu z reakcją spontaniczną może być uzasadniona dodatnim udziałem entropii reakcji protonowania.

Dla reakcji hydrolizy cząsteczek protonowanych PPD katalizowanej jonami wodorowymi oraz hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody cząsteczek PPD^+ , PPD i PPD^- uzyskano prostoliniowe zależności $\Delta H^\ddagger = f(\Delta S^\ddagger)$ oraz $E_a = f(\ln A)$ (Rycina 68), co potwierdza, że wszystkie reakcje przebiegają według takiego samego mechanizmu, jako reakcje dwucząsteczkowe.



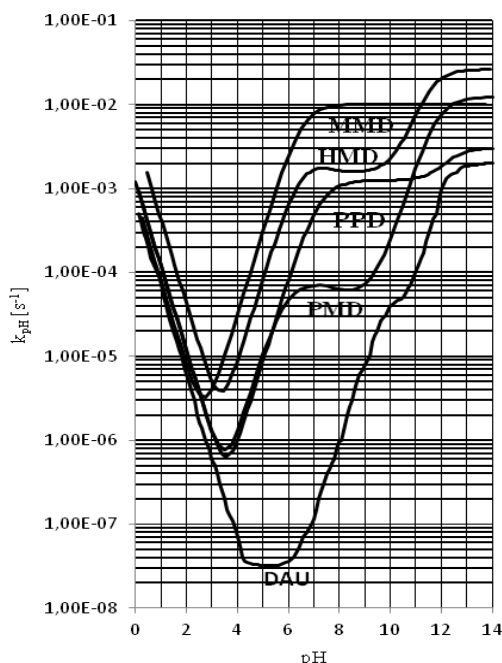
Rycina 68.

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

Porównanie profilu $\log k_{pH} = f(pH)$ daunorubicyny i jej amidynowych pochodnych

Na właściwą katalizę kwasowo-zasadową daunorubicyny [91] składają się reakcje katalizowane jonami wodorowymi i wodorotlenowymi oraz spontaniczna reakcja pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu, natomiast na właściwą katalizę kwasowo-zasadową amidy-

nowych pochodnych daunorubicyny składają się reakcje katalizowane jonami wodorowymi oraz spontaniczna reakcja pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu [92–94].



Rycina 69.

Profil $\log k_{pH} = f(\text{pH})$ daunorubicyny (DAU) i jej amidynowych pochodnych:

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

N-[(morfolino)metyleno]daunorubicyny (MMD)

N-[(pirolidyno)metyleno]daunorubicyny (PPD)

N-[(heksahydroazepinylo)metyleno]daunorubicyny (HMD)

w temperaturze 313 K.

Porównanie zależności $\log k_{pH} = f(\text{pH})$ daunorubicyny i jej czterech amidynowych pochodnych (Rycina 69) pozwala na stwierdzenie, iż:

- daunorubicyna wykazuje maksimum trwałości w zakresie pH od 4 do 6
- w całym zakresie pH, daunorubicyna jest związkiem trwalszym niż jej amidynowe pochodne
- najmniejsze różnice w szybkości reakcji rozkładu są obserwowane w środowisku kwasowym, w którym dominującą reakcją jest rozkład katalizowany jonami wodorowymi
- powyżej pH 4 amidynowe pochodne są bardziej podatne na rozkład niż daunorubicyna
- trwałość daunorubicyny i jej amidynowych pochodnych w zakresie pH od ok. 5 do 10 można przedstawić następująco: DAU \gg PMD $>$ PPD $>$ HMD $>$ MMD.

Wpływ siły jonowej

Do interpretacji wpływu siły jonowej na trwałość PPD zastosowano równanie Brönsteda-Bjerruma:

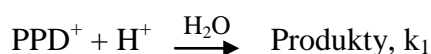
$$\log k_{\text{obs}} = \log k_0 + 2QZ_A Z_B \frac{\sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}}$$

gdzie:

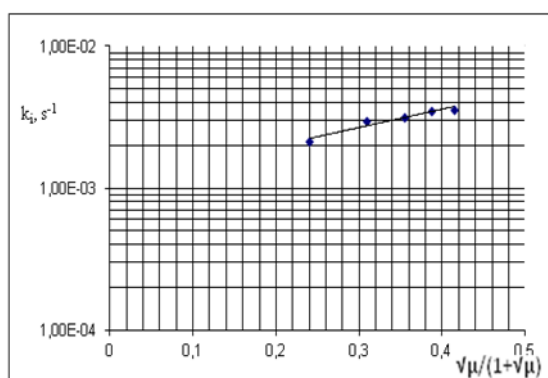
- k_i – obserwowane stałe szybkości reakcji wyznaczone w 0,10 mol/l kwasie solnym, w temperaturze 343 K i w roztworach wodorotlenku sodu 0,10 mol/l w temperaturze 308 K; badania prowadzono stosując roztwory o sile jonowej odpowiednio: 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 i 0,50 mol/l
- k_0 – wartość stałej szybkości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

Wykonano wykresy $\log k_{\text{obs}} = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$ (Rycina 70, 71) oraz obliczono parametry tego równania (Tabela 43).

Stwierdzono, że w kwasie solnym (0,10 mol/l) występuje dodatni efekt solny ($a = 1,29 \pm 0,63$), co potwierdza zaproponowany kinetyczny mechanizm reakcji hydrolizy protonowanych cząsteczek PPD pod wpływem jonów wodorowych.

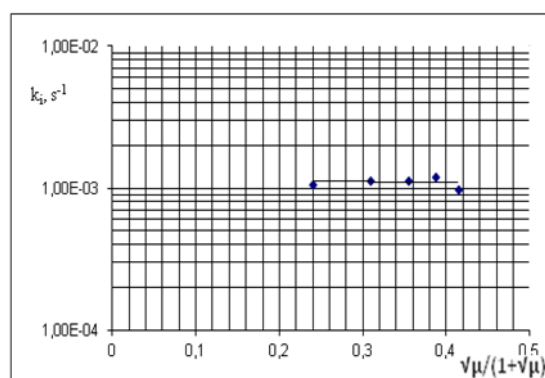


W roztworze wodorotlenku sodu (0,10 mol/l) występuje zerowy efekt solny ($a = 0,0514 \pm 0,9438$), co potwierdza, iż w tym zakresie pH ma miejsce reakcja spontaniczna pod wpływem wody, a nie reakcja monoanionów PPD, katalizowana jonami wodorotlenowymi.



Rycina 70.

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



Rycina 71.

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

Tabela 43.

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

Lp.	$\sqrt{\mu} / 1 + \sqrt{\mu}$	k_i, s^{-1}	Parametry równania $\log k_i = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$
0,10 mol/l HCl; 343 K			
1.	0,2403	$(2,12 \pm 0,18) 10^{-3}$	$a = 1,29 \pm 0,63$ $S_a = 0,197$ $r = 0,967$ $n = 5$
2.	0,3090	$(2,97 \pm 0,19) 10^{-3}$	
3.	0,3539	$(3,16 \pm 0,11) 10^{-3}$	
4.	0,3874	$(3,51 \pm 0,60) 10^{-3}$	
5.	0,4142	$(3,58 \pm 0,18) 10^{-3}$	
0,10 mol/l NaOH; 308 K			
1.	0,2403	$(1,07 \pm 0,07) 10^{-3}$	$a = -0,0514 \pm 0,9437$ $S_a = 0,297$ $r = -0,0995$ $n = 5$
2.	0,3090	$(1,14 \pm 0,08) 10^{-3}$	
3.	0,3539	$(1,14 \pm 0,05) 10^{-3}$	
4.	0,3874	$(1,21 \pm 0,19) 10^{-3}$	
5.	0,4142	$(0,976 \pm 0,116) 10^{-3}$	

Na podstawie badań przeprowadzonych w roztworach wodnych, w warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej, stwierdzono, że:

- rozkład PPD w roztworach wodnych zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu
- składniki buforu octanowego, buforów fosforanowych oraz buforu boranowego nie wykazują efektu katalitycznego w reakcji rozkładu PPD, a zatem w tych roztworach buforowych $k_{obs} = k_{pH}$
- badany związek wykazuje największą trwałość w zakresie pH od 3 do 4
- w kwasie solnym występuje dodatni efekt solny, natomiast w roztworze wodorotlenku sodu – zerowy efekt solny
- najniższą wartość energii aktywacji wykazuje reakcja spontanicznej hydrolizy pod wpływem wody cząsteczek obojnaczych PPD.

Trwałość PPD w roztworach do podania parenteralnego

Badania trwałości PPD przeprowadzono w 13 roztworach do podania parenteralnego (Tabela 3), w temperaturze pokojowej, 2–8°C oraz -16°C. Badania trwałości w temperaturze 2–8°C

przeprowadzono tylko z użyciem tych roztworów, w których w temperaturze pokojowej stwierdzono ubytek substancji badanej.

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

Z oceny zmian stężenia PPD w czasie wynikają podane poniżej stwierdzenia.

- W temperaturze pokojowej nie zaobserwowano ubytku substratu po 24 h w następujących rozpuszczalnikach: 5% Glucosum, Solutio Ringeri Lactate, 5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1), natomiast w tym samym czasie w 20% Injectio Glucosi, 5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (1:1), w płynie fizjologicznym wieloelektrolitowym izotonicznym i w Jonosterilu Basic z glukozą ubytek substratu po 24 godzinach nie przekroczył 10% wartości początkowej. W pozostałych roztworach ubytek substratu był powyżej 10% wartości początkowej, przy czym największy ubytek zaobserwowano w płynie pediatrycznym wyrównawczym oraz w 20% mannitolu, w których po 24 h stwierdzono 78,85% lub 80,15% początkowej zawartości substratu.
- W temperaturze 2–8°C PPD zachowywała odpowiednią trwałość we wszystkich badanych roztworach. Po 24 h przechowywania nie stwierdzono zmian w zawartości substratu w Aqua pro injectione, 10% Injectio Glucosi, 20% Injectio Glucosi i Solutio Ringeri.
- Po 30 dniowym przechowywaniu w temperaturze -16°C, PPD nie zachowała wymaganej zawartości w przypadku przechowywania w Aqua pro injectione, 0,9% Natrium Chloratum pro injectione i 10% Injectio Glucosi. W 5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1) zawartość substratu nie uległa zmianie. W pozostałych roztworach zawartość wynosiła od 97,00 (Solutio Ringeri) do 90,21% wartości początkowej (Solutio Ringeri Lactate).

Fototrwałość PPD w roztworach wodnych

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

Antybiotyki antracyklinowe są podatne na rozkład pod wpływem światła, dlatego wszystkie badania wykonywano chroniąc badane roztwory przed dostępem światła. Ekspozycja na

światło bardzo często prowadzi do niekorzystnych zmian leku, a powstałe produkty fotolizy mogą powodować działania niepożądane.

Do oceny zmian stężenia PPD w czasie reakcji fotodegradacji zastosowano metodę spektrofotometryczną z detekcją w zakresie światła widzialnego przy $\lambda = 480$ nm, co umożliwiło wykonanie pomiarów w tej samej kuwecie, w której prowadzono naświetlanie.

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

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

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

$$k_{\text{obs}} = (1,15 \pm 0,05)10^{-4} \text{ s}^{-1} (\lambda_{\text{maks}} = 365 \text{ nm})$$

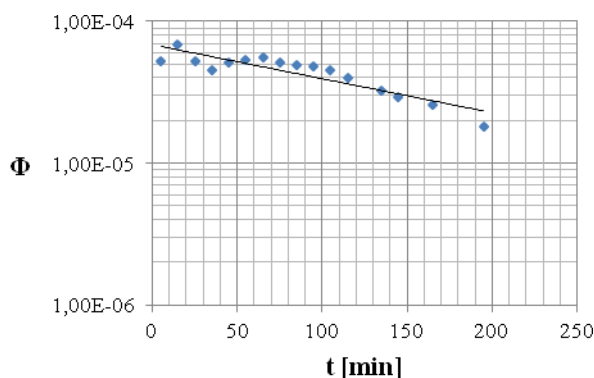
$$k_{\text{obs}} = (1,65 \pm 0,96)10^{-3} \text{ s}^{-1} (\lambda_{\text{maks}} = 510 \text{ nm})$$

Z czterech amidynowych pochodnych daunorubicyny, najbardziej podatna na rozkład pod wpływem światła o $\lambda_{\text{maks}} = 365$ nm jest pochodna heksahydroazepinyłowa, natomiast o $\lambda_{\text{maks}} = 510$ nm – pochodna piperydyniowa i pirolidynowa [89].

Stosując radiometr zaopatrzonego w odpowiedni sensor, możliwe było wyznaczenie pozornych wydajności kwantowych, a następnie przez ekstrapolację do zerowego czasu naświetlania – rzeczywistych wydajności kwantowych Φ , które wynosiły odpowiednio $4,83 \cdot 10^{-5}$ dla $\lambda = 365$ nm i $4,94 \cdot 10^{-4}$ dla $\lambda = 510$ nm. Wydajności kwantowe zmian stężenia substratu i pierwotnych reakcji fotochemicznych, zgodnie z prawem Starka-Einsteina, powinny być równe jedności. Wyższe wartości Φ mogą wskazywać na wtórne procesy fotoche-

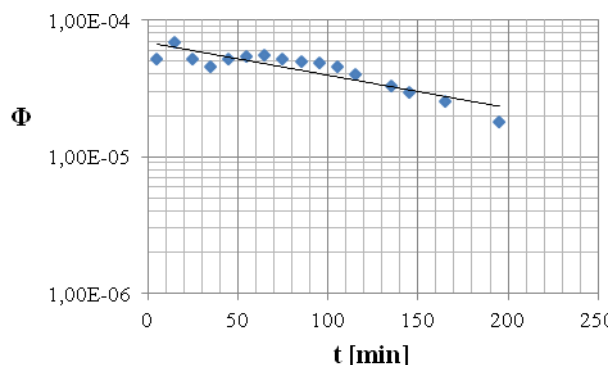
miczne, generowane przez pierwotne produkty rozkładu. W przypadku reakcji w roztworach wodnych, wydajności kwantowe przyjmują często wartości niższe od jedności, co może być spowodowane dezaktywacją cząsteczek badanego związku przez cząsteczki rozpuszczalnika.

Zależności $\ln \varphi_i = f(t)$ są prostoliniowe (Rycina 72, 73), jednakże można zaobserwować znaczny rozrzut wyników, co może być spowodowane zanieczyszczeniem badanej substancji substratami pochodzącymi z procesu syntezy i potencjalnymi produktami rozkładu, które mogą wygaszać albo nasilać procesy fotodegradacyjne macierzystego związku.



Rycina 72.

Zależności $\ln \varphi_i = f(t)$ dla PPD (filtr $\lambda_{maks} = 365$ nm).



Rycina 73.

Zależności $\ln \varphi_i = f(t)$ dla PPD (filtr $\lambda_{maks} = 510$ nm).

Podsumowując badania fotostabilności można stwierdzić, że

- metoda spektrofotometrii UV-VIS jest odpowiednia do badania fototrwałości PPD w roztworach wodnych i wyznaczenia obserwowanych stałych szybkości rozkładu pod wpływem światła
- rozkład PPD pod wpływem światła zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu
- wydajności kwantowe reakcji fotodegradacji PPD rzędu $10^{-4} - 10^{-5}$ wskazują na deaktywujący wpływ cząsteczek rozpuszczalnika na wzbudzone cząsteczki PPD

Trwałość PPD w fazie stałej

Badania w fazie stałej przeprowadzono w atmosferze powietrza o wilgotności względnej $\sim 76,4\%$ oraz 0% . Zmiany stężenia substratu analizowano metodą HPLC, stosując parametry rozdzielania takie same, jak w przypadku badań w roztworach wodnych.

Rozkład PPD w podwyższonej temperaturze, przy RH $\sim 76,4\%$ zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. W takich samych warunkach,

rozkład daunorubicyny oraz dwóch amidynowych pochodnych daunorubicyny –morfolinowej i pirolidynowej, zachodził zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu, podczas gdy rozkład doksorubicyny i epidokсорubicyny według modelu reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.

Przy wilgotności względnej powietrza 0%, rozkład PPD zachodził zgodnie z kinetyką reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu. W przypadku pochodnej morfolinowej i pirolidynowej, przechowywanych w takich samych warunkach, rozkład ich zachodził zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu, natomiast w przypadku epidokсорubicyny – zgodnie z modelem odwracalnej reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu [67, 95–96].

Z zależności Arrheniusa wyznaczono parametry równania $\ln k_i = f(1/T)$ (Rycina 74, tabela 44), na podstawie których wyznaczono energię aktywacji oraz parametry termodynamiczne reakcji rozkładu PPD w fazie stałej, przy RH ~76,4%. Najwyższą energię aktywacji posiada pochodna piperydynowa, która jest jednocześnie najbardziej trwała w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza i podwyższonej temperatury. Analizując wpływ położenia grupy OH w położeniu C-4' dokсорubicyny i epidokсорubicyny, można stwierdzić, iż nie wpływa ona na kinetyczny mechanizm rozkładu dokсорubicyny i epidokсорubicyny, a jedynie na szybkość tego rozkładu. W badanych warunkach, epidokсорubicyna jest bardziej podatna na rozkład niż dokсорubicyna.

Testem równoległości wykazano, że wartości nachylenia wykresów $\ln k_i = f(1/T)$ daunorubicyny, dokсорubicyny oraz amidynowych pochodnych daunorubicyny – morfolinowej, pirolidynowej i piperydynowej nie różnią się istotnie (DAU/DOX $t_{obl} = 1,19 < t_{0,05} = 2,45$; DAU/PPD $t_{obl} = 1,85 < t_{0,05} = 2,57$ PPD/PMD $t_{obl} = 2,09 < t_{0,05} = 2,78$, PPD/MMD $t_{obl} = 2,75 < t_{0,05} = 2,78$, PPD/DOX $t_{obl} = 0,703 < t_{0,05} = 2,57$), a zatem podatność wszystkich badanych związków na wpływ temperatury przy RH ~76,4% jest podobna.

Tabela 44.

Parametry prostej $\ln k_i = f(1/T)$ oraz parametry termodynamiczne reakcji rozkładu daunorubicyny (DAU), dokсорubicyny (DOX), epidokсорubicyny (EDOX) oraz amidynowych pochodnych daunorubicyny - PMD, MMD i PPD w fazie stałej, RH = 76,4%

T [K]	1/T 10 ⁻³	(k ± Δk) [s ⁻¹]	Parametry równania ln k _i = f(1/T)	Parametry termodynamiczne
PPD				
343	2,915	(0,76 ± 0,15) · 10 ⁻⁶	a = -21950 ± 13232 b = 50,1 ± 37,0 r = -0,9810	E _a = 182,5 ± 110,0 [kJ/mol] ΔH [‡] = 180,0 ± 112,5 [kJ/mol]* ΔS [‡] = 171,5 ± 62,8 [J/(K·mol)]
353	2,833	(0,56 ± 0,06) · 10 ⁻⁵		
363	2,755	(5,68 ± 0,51) · 10 ⁻⁵		
373	2,681	(10,4 ± 0,9) · 10 ⁻⁵		
MMD				
323	3,096	(1,03 ± 0,23) · 10 ⁻⁵	a = -13316 ± 4639 b = 29,6 ± 13,7 r = -0,9935	E _a = 110,7 ± 38,6 [kJ/mol] ΔH [‡] = 135,2 ± 35,1 [kJ/mol]* ΔS [‡] = 149,3 ± 303,2 [J/(K·mol)]*
333	3,003	(2,37 ± 0,25) · 10 ⁻⁵		
343	2,915	(10,1 ± 0,7) · 10 ⁻⁵		
353	2,833	(31,6 ± 8,7) · 10 ⁻⁵		
PMD				
343	2,915	(0,91 ± 0,11) · 10 ⁻⁵	a = -14647 ± 4145 b = 31,3 ± 11,6 r = -0,9961	E _a = 121,8 ± 34,5 [kJ/mol] ΔH [‡] = 119,3 ± 36,9 [kJ/mol]* ΔS [‡] = 15,3 ± 148,5 [J/(K·mol)]*
353	2,833	(4,27 ± 0,39) · 10 ⁻⁵		
363	2,755	(13,8 ± 1,5) · 10 ⁻⁵		
373	2,681	(29,9 ± 3,1) · 10 ⁻⁵		
DAU				
333	3,003	(7,12 ± 0,81) · 10 ⁻⁷	a = -16581 ± 3972 b = 35,9 ± 11,3 r = -0,9916	E _a = 138,2 ± 33,5 [kJ/mol] ΔH [‡] = 108,2 ± 41,1 [kJ/mol]* ΔS [‡] = 1,13 ± 130,61 [J/(K·mol)]*
343	2,915	(5,32 ± 0,71) · 10 ⁻⁶		
353	2,833	(2,26 ± 0,38) · 10 ⁻⁵		
363	2,755	(5,25 ± 1,95) · 10 ⁻⁵		
373	2,681	(17,5 ± 0,2) · 10 ⁻⁵		
DOX				
353	2,833	(1,20 ± 0,10) · 10 ⁻⁷	a = -19804 ± 5682 b = 40,0 ± 15,6 r = -0,988	E _a = 164,7 ± 47,2 [kJ/mol] ΔH [‡] = 162,2 ± 49,7 [kJ/mol]* ΔS [‡] = 87,5 ± 114,8 [J/(K·mol)]*
358	2,793	(1,87 ± 0,14) · 10 ⁻⁷		
363	2,755	(4,82 ± 0,39) · 10 ⁻⁷		
368	2,717	(1,18 ± 0,13) · 10 ⁻⁶		
373	2,681	(1,90 ± 0,14) · 10 ⁻⁶		
EDOX				
333	3,003	(8,02 ± 1,28) · 10 ⁻⁷	a = -16250 ± 3823 b = 35,1 ± 10,9 r = -0,992	E _a = 135,1 ± 32,2 [kJ/mol] ΔH [‡] = 133,2 ± 32,5 [kJ/mol]* ΔS [‡] = 46,8 ± 90,2 [J/(K·mol)]*
343	2,915	(6,79 ± 0,93) · 10 ⁻⁶		
353	2,833	(2,02 ± 0,30) · 10 ⁻⁵		
363	2,755	(6,61 ± 0,59) · 10 ⁻⁵		
373	2,681	(1,80 ± 0,24) · 10 ⁻⁴		

* dla temperatury 298 K

6. WNIOSKI

1. *N*-[(piperydino)metyleno]daunorubicyna (PPD) jest podatna na rozkład w roztworach wodnych. Rozkład PPD w warunkach hydrolizy oraz pod wpływem światła zachodził zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.
2. W reakcji rozkładu PPD w roztworach wodnych występuje tylko właściwa kataliza kwasowo-zasadowa, na którą składają się następujące reakcje: hydroliza protonowanych cząsteczek PPD katalizowana jonami wodorowymi oraz hydroliza spontaniczna pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu. PPD jest najbardziej trwała w zakresie pH od 3 do 4.
3. Po 24 h przechowywanych w temperaturze pokojowej roztworów PPD w powszechnie stosowanych roztworach do podania parenteralnego, nie stwierdzono zmian stężenia substratu w 5% Glucosum, Solutio Ringeri Lactate, 5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1).
4. PPD jest związkiem podatnym na rozkład pod wpływem światła. Szybkość reakcji fotodegradacji zależy od długości fali promieniowania i jest większa w przypadku promieniowania o długości fali 510 nm.
5. Kinetyczny mechanizm rozkładu PPD w fazie stałej zależy od warunków przechowywania i zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu w obecności podwyższonej wilgotności względnej powietrza lub zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu przy RH = 0%.

7. STRESZCZENIE

Celem badań była ocena trwałości *N*-[(piperydino)metyleno]daunorubicyny w roztworach wodnych i w fazie stałej. Badania w roztworach wodnych obejmowały właściwą i ogólną katalizę kwasowo-zasadową, trwałość PPD w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do podania parenteralnego oraz rozkład pod wpływem światła, natomiast w fazie stałej, wyznaczenie kinetycznego mechanizmu rozkładu PPD w warunkach podwyższonej temperatury przy RH ~74,4% oraz 0%.

Do oceny zmian stężenia substratu zastosowano metodę HPLC, natomiast w przypadku reakcji fotodegradacji – metodę UV-VIS. Zastosowane metody analityczne zostały zwalidowane z uwzględnieniem następujących parametrów: selektywność, liniowość, precyzja, granica wykrywalności i granica oznaczalności.

Badania trwałości w roztworach wodnych wykonano w zakresie pH od 0,43 do 13,54 w trzech lub czterech temperaturach. Badania w zakresie pH od 0,43 do ok. 5,5 prowadzono w temperaturze 313 K, 325 K, 333K i 343 K, natomiast powyżej pH 5,5 w temperaturze 303, 308 i 313 K. W roztworach wodorotlenku sodu badania przeprowadzono dodatkowo także w temperaturze 298 K. Rozkład PPD w roztworach wodnych zachodził zgodnie z kinetyką reakcji pseudopierwszego rzędu względem stężenia substratu i jest opisany następującym równaniem:

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

Analizując wpływ całkowitego stężenia składników badanych buforów – fosforanowych, octanowego i boranowego, nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w szybkości reakcji ze zmianą stężenia buforu, a zatem nie występowała w tym przypadku ogólna kataliza kwasowo-zasadowa, czyli w całym zakresie pH $k_{obs} = k_{pH}$.

Na właściwą katalizę kwasowo-zasadową PPD składają się podane poniżej reakcje cząstkowe:

- reakcja hydrolizy protonowanych cząsteczek PPD pod wpływem jonów wodorowych
- reakcja hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu.

Celem wyznaczenia katalitycznej stałej szybkości reakcji rozkładu protonowanych cząsteczek PPD pod wpływem jonów wodorowych, wykonano wykres $k_{pH} = f(a_{H^+})$, którego nachylenie odpowiada wartości k_1 w danej temperaturze. Katalityczną stałą szybkości hydrolizy spontanicznej monoanionów PPD wyznaczono jako wartość średnią k_{pH} z zakresu pH powyżej 12. Katalityczne stałe szybkości k_2 i k_3 wyznaczono z zależności $k'_{pH} = f(f_3)$, uwzględniając wartości k'_{pH} , w którym ułamek stężenia formy $f_2 + f_3 \rightarrow 1$ ($k'_{pH} = k_{pH} - (k_1 a_{H^+} f_1 + k_4 f_4)$). Stwierdzono, że w warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej PPD wykazuje największą trwałość w zakresie pH od 3 do 4. Wyznaczone katalityczne stałe szybkości reakcji wykorzystano do wyznaczenia energii aktywacji oraz entalpii i entropii reakcji.

Badania trwałości PPD w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do podania parenteralnego prowadzono w 13 roztworach w temperaturze pokojowej, w 7 roztworach w temperaturze 2-8°C i w 11 roztworach w temperaturze -16°C. W badaniach tych jako trwałe określano te roztwory, w których ubytek substratu nie przekraczał 10% wartości początkowej.

Analizując zmiany stężenia PPD podczas przechowywania w roztworach do podania parenteralnego stwierdzono, że:

- w temperaturze pokojowej, po 24 h przechowywania w 5% Glucosum, Solutio Ringeri Lactate, 5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1) nie zaobserwowano ubytku substratu, natomiast w tym samym czasie w 20% Injectio Glucosi, 5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (1:1), w płynie fizjologicznym wieloelektrolitowym izotonicznym i w Jonosterilu Basic z glukozą ubytek substratu po 24 godzinach nie przekroczył 10% wartości początkowej
- po 24 h przechowywania PPD w temperaturze 2-8°C nie stwierdzono zmian w zawartości substratu w następujących rozpuszczalnikach: Aqua pro injectione, 10% Injectio Glucosi, 20% Injectio Glucosi i Solutio Ringeri
- po 30 dniowym przechowywaniu w temperaturze -16°C, PPD nie zachowała wymaganej zawartości w przypadku użycia jako rozpuszczalnika Aqua pro injectione, 0,9% Natrium Chloratum pro injectione i 10% Injectio Glucosi.

Roztwory wodne PPD są podatne na rozkład pod wpływem światła. Rozkład ten zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Stwierdzono, że pochodna piperydynowa daunorubicyny, podobnie jak wszystkie antybiotyki antracyklinowe, jest podatna na rozkład pod wpływem światła i dlatego jej roztwory należy chronić przed światłem.

Określono także kinetyczny mechanizm rozkładu PPD w fazie stałej, który zależał od warunków przechowywania. Przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza, rozkład PPD zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu, podczas gdy przy $RH = 0\%$, zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu.

Uzyskane wyniki dla PPD porównano z wynikami uzyskanymi dla daunorubicyny oraz innych jej metylenowych pochodnych.

Stability of *N*-[(piperidine)methylene]daunorubicin (PPD) in aqueous solutions and in solid state

Department of Pharmaceutical Chemistry

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

Summary

The aim of this study was to evaluate the stability of *N*-[(piperidine)methylene]daunorubicin (PPD) in aqueous solutions and in solid state. Aqueous phase studies included specific and general acid-base catalysis, stability of PPD in common infusion solutions and stability of PPD solutions under the influence of light. Solid phase studies aimed at determining the kinetic mechanism of degradation of PPD in high temperature at RH ~ 74.4% and 0%.

An HPLC method was used to determine the changes in the concentration of PPD, while a UV-VIS method was used for photodegradation studies. Both methods were validated with regard to selectivity, linearity, precision, limits of detection and quantitation.

Stability studies in aqueous solutions were performed in a pH range from 0.43 to 13.54 in three or four temperatures. In the pH range from 0.43 to 5.5 studies were performed at 313 K, 325 K, 333 K and 343 K, and in pH above 5.5 at 303 K, 308 K and 313 K. In the solutions of sodium hydroxide, studies at 298 K were additionally performed. The degradation of PPD in aqueous solutions was a pseudo-first-order reaction with respect to the substrate concentration described by following equation:

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

Studies showed that the concentration of buffer components did not influence the reaction of degradation speed. Therefore, no general acid-base catalysis occurred and in the entire pH range $k_{\text{obs}} = k_{\text{pH}}$.

The specific acid-base catalysis is formed by following partial reactions:

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

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

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

The catalytic rate constants k_1 were calculated from the plots $k_{pH} = f(a_{H^+})$, which are linear with a positive slope that is equal to k_1 . The catalytic rate constants for the spontaneous hydrolysis of PPD monoanions were calculated as the mean values of k_{pH} at pH above 12. The catalytic rate constants k_2 and k_3 were calculated from the equation $k'_{pH} = f(f_3)$ using the k'_{pH} value where the concentration of forms $f_2 + f_3 \rightarrow 1$ ($k'_{pH} = k_{pH} - (k_1 a_{H^+} f_1 + k_4 f_4)$). PPD is the most stable at pH 3 – 4. The catalytic rate constants were used to determine the energy of activation, enthalpy and entropy of degradation of PPD.

Studies in common infusion solutions were performed in 13 solutions at room temperature, in 7 solutions at 2–8°C and in 11 solutions at -16°C. In this study those solutions in which the loss of substrate concentration did not exceed 10% of the initial concentration were defined as stable. It was found that:

- at room temperature after 24 hours there was no change in PPD concentration in 5% Glucosum, Solutio Ringeri Lactate, 5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1), whereas in 20% Injectio Glucosi, 5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (1:1), isotonic multielectrolyte physiologic solution and Jonosteril Basic with glucose the decrease of PPD concentration was not greater than 10%
- after 24 hours storage at 2-8°C there was no change in PPD concentration in Aqua pro injectione, 10% Injectio Glucosi, 20% Injectio Glucosi and Solutio Ringeri
- after 30 days storage at -16°C PPD did not meet the stability requirements in the following solutions Aqua pro injectione, 0,9% Natrium Chloratum pro injectione and 10% Injectio Glucosi.

Aqueous solutions of PPD are susceptible to photodegradation. This process is the first-order reaction with respect to the substrate concentration. PPD undergoes photodegradation like all other daunorubicin derivatives and therefore its solutions should be protected from light.

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

The so-obtained results have been compared with results for daunorubicin and its derivatives.

8. PIŚMIENICTWO

1. Żero P., Niemyska M., Rasztawicka M., Maciejewska D.: Biul. Wydz. Farm. AMW, 2, 2005, <http://www.farm.amwaw.edu.pl/~axzimni/biuletyn/>
2. Zając M., Pawełczyk E., Jelińska A.: *Chemia leków – podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów* Wydawnictwo Uczelniane UMiKM, 2006, 552–583.
3. Gruber F., Zamolo G., Kastelan M., Massari L. P., Cabrijan L., Peharda V., Batinac T.: *Photocarcinogenesis-molecular mechanisms* Coll Antropol, 2007, 31 Suppl 1:101–106
4. Red. Kordek R.: *Onkologia*, wyd. III, Via Medica, Gdańsk 2007
5. Appel K. E., Fiirstenberger G., Hapke H.J., Hecker E., Hildebrandt A. G., Koransky W., Marks F., Neumann H. G., Ohnesorge F.K., Schulte-Hermann R.: *Chemical cancerogenesis: definitions of frequently used terms* J Cancer Res Clin Oncol, 1990, 116:232–236
6. Marinescu I, Voiculescu N.: *Information of genome sequences and molecular basis of cancer* Rev Roum Physiol, 1991, 28(1–2):45–49
7. Shortt J., Johnstone R. W.: *Oncogenes in Cell Survival and Cell Death* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 1; 4(12)
8. Hu W., Feng Z., Levine A. J.: *The Regulation of Multiple p53 Stress Responses Is Mediated through MDM2* Genes & Cancer, 2012, 3(3–4): 199–208
9. Carr S. M., Munro S., La Thangue N. B.: *Lysine methylation and the regulation of p53* Essays Biochem, 2012, 52:79–92
10. Sampieri K., Fodde R.: *Cancer stem cells and metastasis* Semin Cancer Biol, 2012, 22(3):187–193
11. Visvader J. E., Lindeman G. J.: *Cancer stem cells: current status and evolving complexities* Cell Stem Cell, 2012, 14, 10(6):717–728
12. Pitteri S., Hanash S.: *A systems approach to the proteomic identification of novel cancer biomarkers*, Dis Markers, 2010, 28(4):233–239
13. Evans D. B.: *Surgical oncology*, J Am Coll Surg, 2000, 190(2):215–226
14. Rosenzweig K. E., Amols H., Ling C. C.: *New radiotherapy technologies*, Semin Surg Oncol, 2003, 21(3):190–195

15. Regulska K., Stanisz B., Regulski M.: *Indywidualizacja terapii przeciwnowotworowej; molekularne uwarunkowania mechanizmów działania nowoczesnych leków onkologicznych*, Postepy Hig Med Dosw, 2012, 66:855–867
16. Malhotra V., Perry M. C.: *Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window*, Cancer Biol Ther, 2003, 2(4 Suppl 1):S2–4
17. Red. Janiec W., Kurpińska J.: *Farmakodynamika*, wyd. V, PZWL, Warszawa 2005
18. Lai D., Visser-Grieve S., Yang X.: *Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response*, Biosci. Rep, 2012, 32:361–374
19. Calcagno A. M., Fostel J. M., To K. K. W., Salcido C. D., Martin S. E., Chewing K. J., Chung-Pu W., Varticovski L., Bates S., Caplen N. J., Ambudkar S. V.: *Single-step doxorubicin-selected cancer cells over-express the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes*, Br J Cancer, 2008, 6:1515–1524
20. Davidovich S., Ben-Izhak O., Shapira M., Futerman B., Hershko D. D.: *Over-expression of Skp2 is associated with resistance to preoperative doxorubicin-based chemotherapy in primary breast cancer*, Breast Cancer Res, 2008, 10:R63
21. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.: *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*, Pharmacol Rev, 2004, 56:185–229
22. Gewirtz D. A.: *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*, Biochem Pharmacol, 1999, 57:727–741
23. Müller M., Cheneval D., Carafoli E.: *Doxorubicin inhibits the phosphate-transport protein reconstituted in liposomes. A study on the mechanism of the inhibition*, Eur J Biochem, 1984, 140:447–452
24. Bos A. M., de Vries E. G., Dombernovsky P., Aamdal S., Uges D. R., Schrijvers D., Wanders J., Roelvink M. W., Hanauske A. R., Bortini S., Capriati A., Crea A. E., Vermorken J. B.: *Pharmacokinetics of MEN-10755, a novel anthracycline disaccharide analogue, in two phase I studies in adults with advanced solid tumors*, Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 48:361–369
25. Charakterystyki Produktów Leczniczych, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, <http://www.urpl.gov.pl/drugs>
26. Simunek T., Stérba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Gersl V.: *„Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*, Pharm Reports, 2009, 61:154–171
27. Mordente A., Meucci E., Silvestrini A., Martorana G. E., Giardina B.: *New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity*, Curr Med Chem, 2009, 16:1656–1672
28. Przybyszewski W. M., Wideł M., Rzeszowska-Wolny J.: *Kardiotoksyczne następstwa promieniowania jonizującego i antracyklin*, Postepy Hig Med Dosw, 2006, 60:397–405
29. Perez E. A.: *„Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer”*, Breast Cancer Res Treat, 2009, 114:195–201

30. Wąsowska M., Wietrzyk J., Opolski A., Oszczapowicz J., Oszczapowicz I.: *Effect of structural modifications of anthracyclines on the ability to overcome resistance of cancer cells*, *Anticancer Res*, 2006, 26:2009–2012
31. Gil J., Stembalska A., Pesz K. A., Szaśiadek M. M.: *Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy*, *J App Genet*, 2008, 49(2):193–199
32. Baguley B. C.: *Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer*, *Mol Biotechnol*, 2010, 46:308–316
33. Fan E., Shi W., Lowary TL.: *Synthesis of daunorubicin analogues containing truncated aromatic cores and unnatural monosaccharide residues*, *J Org Chem*, 2007, 72:2917–2928
34. Gao Y., Priebe W., Wang A. H.-J.: *Substitutions at C2' of daunosamine in the anticancer drug daunorubicin alter its DNA-binding sequence specificity*, *Eur J Biochem*, 1996, 240:331–335
35. Dutta R., Gao Y. G., Priebe W., Wang A. H.: *Binding of the modified daunorubicin WP401 adjacent to a T-G base pair induces the reverse Watson - Crick conformation: crystal structures of the WP401-TGGCCG and WP401-CGG[br5C]CG complexes*, *Nucleic Acid Res*, 1998, 26:3001–3005
36. Tervino A. V. et al.: *Enhanced topoisomerase II targeting by annamycin and related 4-demethoxy anthracycline analogues*, *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(11):1403–1410
37. Pawłowska J., Tarasiuk J., Borowski E., Wasowska M., Oszczapowicz I., Wolf C. R.: *The ability of new formamidine sugar-modified derivatives of daunorubicin to stimulate free radical formation in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase and xanthine oxidase*, *Acta Biochim Pol*, 2000, 47:141–147
38. Wąsowska M., Oszczapowicz I., Wietrzyk J., Opolski A., Madej J., Dzimira S., Oszczapowicz J.: *Influence of the structure of new anthracycline antibiotics on their biological properties*, *Anticancer Res*, 2005, 25:2043–2048
39. Kik K., Studzian K., Wasowska-Lukawska M., Oszczapowicz I., Szmigiero L.: *Cytotoxicity and inhibitory properties against topoisomerase II of doxorubicin and its formamidine derivatives*, *Acta Biochim Pol*, 2009, 56:135–142
40. Hofmann P. A., Israel M., Koseki Y., Laskin J., Gray J., Janik A., Sweatman T. W., Lothstein L.: *N-Benzyladriamycin-14-valerate (AD 198): A Non-Cardiotoxic Anthracycline That Is Cardioprotective through PKC-ε Activation*, *JPET* 2007, 323:658–664
41. Roaten J. B., Kazanietz M. G., Caloca M. J., Bertics P. J., Lothstein L., Parrill A. L., Israel M., Sweatman T. W.: *Interaction of the Novel Anthracycline Antitumor Agent N-Benzyladriamycin-14-valerate with the C1-Regulatory Domain of Protein Kinase C: Structural Requirements, Isoform Specificity, and Correlation with Drug Cytotoxicity*, *Mol Cancer Ther*, 2002, 1:483–492
42. Tevyashova A., Sztaricskai F., Batta G., Herczegh P., Jeney A.: *Formation of squaric acid amides of anthracycline antibiotics. Synthesis and cytotoxic properties*, *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14:4783–4789
43. Sztaricskai F., Sum A., Roth E., Pelyvás I. F., Sándor S., Batta G., Herczegh P., Reményi J., Miklán Z., Hudecz F.: *A new class of semisynthetic anthracycline glycoside antibiotics incorporating a squaric acid moiety*, *J Antibiot*, 2005, 58:704–714

44. Yoo B. I., Ahan K. B., Kang M. H., Moon D. C., Kwon O. S., Lee H. S., Ryu J. S., Kim T. Y., Song S., Chung Y. B.: *HPLC Analysis and Pharmacokinetic Characteristics of 11-Hydroxyaclacinomycin X (ID-6105), a Novel Anthracycline, in Rats and Beagle Dogs*, Biol Pharm Bull, 2005, 28:688–693
45. Case D. C. Jr., Ervin T. J., Boyd M. A., Bove L. G., Sonneborn H. L., Paul S. D.: *Phase II study of aclarubicin in acute myeloblastic leukemia*, Am J Clin Oncol, 1987, 10:523–526
46. Mazzini S., Scaglioni L., Animati F., Mondelli R.: *Interaction between double helix DNA fragments and the new antitumor agent sabarubicin, Men 10755*, Bioorg Med Chem, 2010, 18:1497–1506
47. Sessa C., Valota O., Geroni C.: *Ongoing phase I and II studies of novel anthracyclines*, Cardiovasc Toxicol, 2007, 7:75–79
48. Bressan A., Nardelli F., Bellarosa D., Bigioni M., Curcurù G., Curatella B., Crea A., Maggi C. A., Manzini S., Binaschi M.: *Sabarubicin (MEN 10755)-induced apoptosis is independent from mtDNA in A2780 human ovarian tumor cells*, Anticancer Res, 2007, 27:4039–4046
49. Gonzalez-Paz O., Polizzi D., De Cesare M., Zunino F., Bigioni M., Maggi C. A., Manzini S., Pratesi G.: *Tissue distribution, antitumor activity and in vivo apoptosis induction by MEN10755 in nude mice*, Eur J Cancer, 2001, 37:431–437
50. Kurata T., Okamoto I., Tamura K., Fukuoka M.: *Amrubicin for non-small-cell lung cancer and small-cell lung cancer*, Invest New Drugs, 2007, 25:499–504
51. Ettinger D. S.: *Amrubicin for the Treatment of Small Cell Lung Cancer: Does Effectiveness Cross the Pacific?*, J Thorac Oncol, 2007, 2:160–165
52. Ettinger D. S., Jotte R., Lorigan P., Gupta V., Garbo L., Alemany C., Conkling P., Spigel D. R., Dudek A. Z., Shah Ch., Salgia R., McNally R., Renschler M. F., Oliver J. W.: *Phase II Study of Amrubicin As Second-Line Therapy in Patients With Platinum-Refractory Small-Cell Lung Cancer*, J Clin Oncol, 2010, 28:2598–2603
53. Carvalho H., Garrido L. M., Furlan R. L., Padilla G., Agnoletto M., Guecheva T., Henriques J. A., Saffi J., Menck C. F.: *DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells*, Cancer Chemother Pharmacol, 2010, 65:989–994
54. Cirili M., Bachechi F., Ughetto G., Colonna F. P., Capobianco M. L.: *Interactions between morpholinyl anthracyclines and DNA*, J Mol Biol, 1993, 230:878–889
55. Nadas J., Sun D.: *Anthracyclines as effective anticancer agents*, Expert Opin Drug Discov, 2006, 1:539–548
56. Zucchi R., Danesi R.: *Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines*, Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003, 3:151–171
57. Huober J., Fett W., Nusch A., Neise M., Schmidt M., Wischnik A., Gerhardt S., Goehler T., Lück H. J., Rost A.: *A multicentric observational trial of pegylated liposomal doxorubicin for metastatic breast cancer*, BMC Cancer, 2010, 10:2
58. Adamo V., Lorusso V., Rossello R., Adamo B., Ferraro G., Lorusso D., Condemi G., Priolo D., Di Lullo L., Paglia A., Pisconti S., Scambia G., Ferrandina G.: *Pegylated liposomal doxorubicin and gemcitabine in the front-line treatment of recurrent/metastatic breast cancer: a multicentre phase II study*, Br J Cancer, 2008, 98:1916–1921

59. Chang D. K., Lin C. T., Wu C. H., Wu H. C.: *A Novel Peptide Enhances Therapeutic Efficacy of Liposomal Anti-Cancer Drugs in Mice Models of Human Lung Cancer*, PLoS ONE, 2009, 4:4171
60. Cheng C., Haouala A., Krueger T., Mithieux F., Perentes J. Y., Peters S., Decosterd L. A., Ris H. B.: *Drug uptake in a rodent sarcoma model after intravenous injection or isolated lung perfusion of free/liposomal doxorubicin*, Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, 2009, 8:635–638
61. Mitrus I., Sochanik A., Cichoń T., Szala S.: *Combination of combretastatin A4 phosphate and doxorubicin-containing liposomes affects growth of B16-F10 tumors*, Acta Biochim Pol, 2009, 56:161–165
62. Veronese F. M., Schiavon O., Pasut G., Mendichi R., Andersson L., Tsirk A., Ford J., Wu G., Kneller S., Davies J., Duncan R.: *PEG-doxorubicin conjugates: influence of polymer structure on drug release, in vitro cytotoxicity, biodistribution, and antitumor activity*, Bioconjug Chem, 2005, 16:775–784
63. DiPaola R. S., Rinehart J., Nemunaitis J., Ebbinghaus S., Rubin E., Capanna T., Ciardella M., Doyle-Lindrud S., Goodwin S., Fontaine M., Adams N., Williams A., Schwartz M., Winchell G., Wickersham K., Deutsch P., Yao S. L.: *Characterization of a novel prostate-specific antigen-activated peptide-doxorubicin conjugate in patients with prostate cancer*, J Clin Oncol, 2002, 20:1874–1879
64. Gibbs D. D., Pyle L., Allen M., Vaughan M., Webb A., Johnston S. R., Gore M. E.: *A phase I dose-finding study of combination of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil), carboplatin and paclitaxel in ovarian cancer*, Br J Cancer, 2002, 86:1379–138
65. Mavroudis D., Kouroussis Ch., Kakolyris S., Agelaki S., Kalbakis K., Androulakis N., Souglakos J., Samonis G., Georgoulas V.: *Phase I study of paclitaxel (Taxol) and pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) administered every 2 weeks in patients with advanced solid tumors*, Oncology, 2002, 62:216–222
66. Piekarski M., Jelińska A.: *Anthracyclines still prove effective in anticancer therapy* Mini Rev Med Chem 2013, 13, 627–634 .
67. Sobczak A., Jelińska A., Leśniewska M., Firlej A., Oszczapowicz I.: *Stability of epidoxorubicin in solid state*, J Pharm Biomed Anal, 2011, 54:869–872
68. Gubernator J., Chwastek G., Korycińska M., Stasiuk M., Gryniewicz G., Lewrick F., Süß R., Kozubek A.: *The encapsulation of idarubicin within liposomes using the novel EDTA ion gradient method ensures improved drug retention in vitro and in vivo*, J Control Release, 2010, 146:68–75
69. Nussbaumer S., Geiser L., Sadeghipour F., Hochstrasser D., Bonnabry P., Veuthey J. L., Fleury-Souverain S.: *Wipe sampling procedure coupled to LC-MS/MS analysis for the simultaneous determination of 10 cytotoxic drugs on different surfaces*, Anal Bioanal Chem, 2012, 402:2499–2509
70. Haneke A. C., Crawford J., Aszalos A.: *Quantitation of daunorubicin, doxorubicin, and their aglycones by ion-pair reversed-phase chromatography*, J Pharm Sci, 1981, 70:1112–1115
71. Maudens K. E., Stove C. P., Cocquyt V. F., Denys H., Lambert W. E.: *Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva*, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877:3907–3915

72. Lachâtre F., Marquet P., Ragot S., Gaulier J. M., Cardot P., Dupuy J. L.: *Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*,
J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000, 738:281–291
73. Dodde W. I., Maring J. G., Hendriks G., Wachters F. M., Groen H. J., de Vries E. G., Uges D. R.: *Determination of epirubicin and its metabolite epirubicinol in saliva and plasma by HPLC*,
Ther Drug Monit, 2003, 25:433–440
74. DiFrancesco R., Griggs J. J., Donnelly J., DiCenzo R.: *Simultaneous analysis of cyclophosphamide, doxorubicin and doxorubicinol by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*,
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 852:545–553
75. Bermingham S., O'Connor R., Regan F., McMahon G. P.: *Simultaneous determination of anthracyclines and taxanes in human serum using online sample extraction coupled to high performance liquid chromatography with UV detection*,
J Sep Sci, 2010, 33:1571–1579
76. Ahmed S., Kishikawa N., Ohyama K., Maki T., Kurosaki H., Nakashima K., Kuroda N.: *An ultrasensitive and highly selective determination method for quinones by high-performance liquid chromatography with photochemically initiated luminol chemiluminescence*,
J Chromatogr A, 2009, 1216:3977–3984
77. Ricciarello R., Pichini S., Pacifici R., Altieri I., Pellegrini M., Fattorossi A., Zuccaro P.: *Simultaneous determination of epirubicin, doxorubicin and their principal metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection*,
J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 707:219–225
78. Maudens K. E., Stove C. P., Lambert W. E.: *Quantitative liquid chromatographic analysis of anthracyclines in biological fluids*,
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879:2471–2486
79. Singh S., Bakshi M.: *Stress Tests to determine inherent stability of drugs*,
Pharmaceutical Technology On-Line 2000, 1–14
80. Carstensen J.T., Rhodes C.T.: *Drug Stability, principles and practices*
Marcel Dekker, New York, 2000
81. Glass B.D., Novak C., Brown M.E.: *The thermal and photostability of solid pharmaceuticals, a review*
J Therm Anal Cal, 2004, 77, 1013–1036
82. ICH Harmonised Tripartite Guideline,
Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A
83. Sędlak A.: *Badania fotostabilności nowych substancji*,
Przemysł Farmaceutyczny 2009, 6, 72–73.
84. Mielcarek J., Grobelny P., Osmalek T.: *Trwałość fotochemiczna substancji leczniczych i gotowych postaci leku – temat coraz bardziej aktualny*
Farm Pol, 2005, 61, 1058–1064
85. Mielcarek J., Grobelny P., Osmalek T.: *Trwałość fotochemiczna substancji leczniczych i gotowych postaci leków. Cz. 2. Sposoby oceny fotowrażliwości leków i ochrony przed rozkładem*.
Farm Pol, 2006, 62, 689–695
86. ICH Harmonised Tripartite Guideline,
Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Q1B.
87. Łukawska M., Oszczapowicz I., Jelińska A., Cielecka-Piontek J., Zając M., Dobrowolski L., Ziółkowska G., Zalewski P., Piekarski M., Krause A., Uszak J.: *Development and Validation of RP-HPLC Method for*

Determination of Novel Derivatives of Daunorubicin,
Chem Anal, 2009, 54:907–917

88. *Ocena jakości substancji i produktów leczniczych*, red. M. Zając i A. Jelińska,
Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, 2010
89. Zalewski P., Jelińska A., Zając M., Cielecka-Piontek J., Piekarski M., Mielcarek J., Krause A., Uszak J.,
Łukawska M., Oszczapowicz I.: *Photostability of New Anticancer Agents*,
J Pharm Res, 2010, 3:1700–1702
90. Cielecka-Piontek J., Jelińska A., Dołhań A., Zalewski P., Burek D., Piekarski M., Krause A., Uszak J.,
Oszczapowicz I., Łukawska M.: *Stability of new anticancer agents in intravenous solutions*
Asian J Chem, 2012, 24, 769–772
91. Beijnen J.H., van der Houwen O.A., G., J., Voskuilen M.C.H., Underberg W.J.M.: *Aspects of degradation
kinetics of daunorubicin in aqueous solutions*
Int J Pharm, 1986, 31, 75–82
92. Jelińska A., Uszak J., Cielecka-Piontek J., Zając M., Lamberti A., Oszczapowicz I., Łukawska M.:
Stability of [(N-pyrrolidine)methylene]daunorubicin in aqueous solutions
React Kinet Catal Lett, 2009, 98, 69–75
93. Zalewski P., Zając M., Jelińska A., Cielecka-Piontek J., Oszczapowicz I.: *Stability study of anticancer
agent N-[(hexahydroazepin-1-yl)methyl]daunorubicin in aqueous solutions using HPLC method*
Asian J Chem, 2011, 23, 835–838
94. Krause A., Jelińska A., Cielecka-Piontek J., Klawiter M., Zalewski P., Oszczapowicz I., Wąsowska M.:
Acid-base catalysis of N-[(morpholine)methylene]daunorubicin
Drug Dev Industr Pharm, 2012, 38, 1024–1028
95. Cielecka-Piontek J., Jelińska A., Zając M., Sobczak M., Bartold A., Oszczapowicz I.: *A comparison of the
stability of doxorubicin and daunorubicin in solid state*
J Pharm Biomed Anal, 2009, 50, 576–579
96. Zalewski P., Jelińska A., Prusinowska P., Cielecka-Piontek J., Krause A., Oszczapowicz I.: *Stability of
[(N-morpholine)methylene]daunorubicin hydrochloride in solid state*
Acta Polon Pharm, 2011, 68, 759–763.