



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

Artur Firlej

**Trwałość chlorowodoru  
epirubicyny w roztworach wodnych**

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: Prof. zw. dr hab. Anna Jelińska

Poznań 2016

Słowa kluczowe: chlorowodorek epirubicyny,  
HPLC,  
trwałość w roztworach wodnych,  
parametry kinetyczne i termodynamiczne,  
wpływ światła, temperatury i wilgotności względnej  
powietrza

*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 Zajęc  
za cenne rady, życzliwość  
i pomoc w przygotowaniu pracy*

*Pani Dr Agnieszce Sobczak i Pani Mgr Monice Leśniewskiej  
za pomoc w wykonaniu badań trwałości w fazie stałej*

*Pani Prof. dr hab. Jadwidze Mielcarek  
Z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej  
za pomoc w wykonaniu badań fototrwałości*

*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*

*Państwu Barbarze i Michałowi Maruszewskim  
za życzliwość i wszelką pomoc*

*Żonie i dzieciom  
za wiarę, wsparcie i motywację do pracy*

*Pracę dedykuję moim ukochanym Rodzicom*



# SPIS TREŚCI

---

|   |    |
|---|----|
| 1. WSTĘP .....  | 7  |
| 2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA .....  | 13 |
| 2.1. Budowa chemiczna i parametry farmakokinetyczne antracyklin .....                                 | 13 |
| 2.1.1. Budowa chemiczna .....   | 13 |
| 2.1.2. Parametry farmakokinetyczne .....  | 14 |
| 2.2. Mechanizmy działania antracyklin .....   | 15 |
| 2.3. Zastosowanie i działania niepożądane epirubicyny .....   | 20 |
| 2.3.1. Zastosowanie epirubicyny w lecznictwie .....   | 20 |
| 2.3.2. Działania niepożądane antracyklin .....  | 28 |
| 2.4. Dotychczasowy stan badań trwałości chlorowodorku epirubicyny .....                               | 31 |
| 2.5. Metody analityczne stosowane w ocenie jakości chlorowodorku epirubicyny wg FP X/Ph. Eur. 8 ..... | 34 |
| 2.6. Porównanie wybranych metod HPLC epirubicyny i innych antracyklin ...                             | 37 |
| 3. CEL PRACY .....  | 41 |
| 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA .....  | 43 |
| 4.1. Substancja badana .....  | 43 |
| 4.2. Odczynniki .....   | 43 |
| 4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy .....   | 44 |
| 4.4. Metody analityczne stosowane w ocenie trwałości chlorowodorku epirubicyny (EPI) .....            | 45 |
| 4.4.1. Metoda HPLC i jej walidacja .....  | 46 |
| 4.4.2. Metoda UV-VIS i jej walidacja .....  | 51 |
| 4.5. Ocena trwałości EPI w roztworach wodnych .....   | 53 |
| 4.5.1. Warunki badań kinetycznych .....   | 53 |
| 4.5.2. Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI .....   | 54 |
| 4.6. Ocena trwałości EPI w fazie stałej .....   | 89 |
| 4.7. Ocena fototrwałości EPI w roztworach wodnych .....   | 94 |
| 4.7.1. Ocena fotostabilności zgodnie z wymaganiami Przewodnika ICH Q1B ..                             | 94 |
| 4.7.2. Badania trwałości fotochemicznej EPI w roztworach wodnych .....                                | 97 |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW ..... | 105 |
| 6. WNIOSKI .....           | 125 |
| 7. STRESZCZENIE .....      | 127 |
| 8. PIŚMIENNICTWO .....     | 131 |

# 1. WSTĘP

---

Z szacunków Światowej Organizacji Zdrowia wynika, że rocznie na świecie na skutek choroby nowotworowej umiera ponad 8 milionów ludzi. Na pierwszym miejscu pod względem częstości występowania i śmiertelności jest rak płuca u mężczyzn i rak piersi u kobiet. Kolejne „miejsca” w statystykach zachorowalności zajmują nowotwory jelita grubego, prostaty oraz żołądka [1]. W Polsce, podobnie jak na świecie, nowotwory są drugą przyczyną zgonów wśród osób dorosłych, po chorobach układu sercowo-naczyniowego. Co roku odnotowuje się ok. 155 000 nowych zachorowań i ok. 93 000 zgonów, a osób żyjących z chorobą nowotworową jest ok. 500 000 [2]. Nadal rośnie całkowity współczynnik umieralności na nowotwory, chociaż do tego może się także przyczyniać rosnąca średnia długość życia [3]. Te ponure statystyki nie odzwierciedlają jednak całej prawdy o nowotworach. Po pierwsze, nowotwory to cały szereg około stu różnorodnych jednostek chorobowych, mających swój początek w pierwotnej i wtórnych mutacjach pewnych klas genów zwanych protoonkogenami oraz genami supresorowymi, które poprzedzają o kilka do kilkunastu lat moment wykrycia zmiany chorobowej. Stąd bardzo istotna w leczeniu jest rola wczesnej diagnostyki i profilaktyki. Przykładami protoonkogenów są: *erbB*, *src*, *C-ras*, *N-ras* – sterują one wytwarzaniem białek błony komórkowej, kluczowych w procesach przekazywania sygnałów między komórkami. Z kolei białka cytoplazmatyczne kodują onkogeny takie jak *H-ras*, *K-ras* i inne, a białka jądra komórkowego: *myc*, *fos*, *erb-A*. Na skutek różnych nieprawidłowości w podziale materiału genetycznego, np. mutacji punktowej, amplifikacji, translokacji, insercji i in., dochodzi do aktywacji ww. genów i niekontrolowanego nasilenia procesów, którymi kierują produkty onkogenów, czyli białka. To z kolei stopniowo przyczynia się do powstania nowotworu. Geny supresorowe, np. *p53*, *APC* i in. odpowiedzialne są za produkcję białek działających hamująco na wzrost komórek poprzez proces apoptozy, czyli programowanej śmierci komórek. W wyniku zmian w strukturze tych genów, ich produkty nie działają poprawnie i komórki zyskują „nieśmiertelność” [4]. Oprócz ww. klas genów zidentyfikowano i potwierdzono wpływ

materiału genetycznego wirusów na proces nowotworowy. Przykładami mogą być HPV – wirus brodawczaka ludzkiego oraz EBV – wirus Epsteina-Barra. Z uwagi na podobieństwo w budowie genów wirusowych do protoonkogenów oraz w wyniku wbudowania się ich w DNA gospodarza, pojawia się działanie sprzyjające powstaniu guza. Należy pamiętać jednak, że nowotwór jest wynikiem wielu procesów, które muszą zaistnieć po kolei [5]. Wyróżnia się zwykle następujące etapy procesu nowotworzenia:

- inicjacja pod wpływem ekspozycji na karcynogen o charakterze chemicznym (np. pochodne benzenu), fizycznym (promieniowanie jonizujące) lub biologicznym (wirusy onkogenne, *Helicobacter Pylori*)
- promocja, w której główną rolę odgrywają białka ułatwiające i nasilające nieprawidłowe podziały komórkowe
- progresja, która prowadzi na zasadzie kumulacji błędów do selekcji komórek o coraz większej autonomii i ostatecznie do powstania nowotworu

Okresy inicjacji i promocji mają charakter odwracalny, gdyż istnieją procesy naprawcze, a jeśli one zawiodą, komórka wchodzi na drogę apoptozy. Dopiero w wyniku progresji powstaje guz, który rozwija własne naczynia krwionośne i może ulegać metastazji, czyli przerzutom. Wynika stąd, że na proces nowotworzenia bardzo duży wpływ ma środowisko, nasze zachowania, nałogi – szczególnie palenie papierosów, dieta, rodzaj wykonywanej pracy itd.

Dzięki coraz lepszemu zrozumieniu procesu nowotworzenia na poziomie molekularnym, wyłania się możliwość nowych, a także modyfikacji klasycznych terapii przeciwnowotworowych. Długa droga terapii przeciwnowotworowej prowadzi od początkowo jedynej stosowanej metody chirurgicznego usunięcia guza, poprzez chemioterapię (iperyt azotowy był pierwszym chemioterapeutyką), radioterapię, hormonoterapię, immunoterapię do tzw. terapii celowanej, oszczędzającej zdrowe komórki. Na etapie badań klinicznych są metody terapii genowej, polegającej na umieszczaniu w komórkach prawidłowych kopii genów, których uszkodzenia przyczyniły się do rakowacenia komórek. Wszystko to sprawia, że coraz skuteczniej udaje się opanować nowotworzenie i tym samym wydłużać czas remisji choroby, co może spowodować, że z choroby nieuleczalnej i śmiertelnej nowotwory staną się chorobą uleczalną i przewlekłą.

Od momentu wprowadzenia do leczenia iperytu azotowego w chemioterapii nowotworów przybyło około stu leków, stosowanych w mono- i politerapiach, a także jako



terapia adjuwantowa. Obecnie stosowane chemioterapeutyki, uwzględniając mechanizm działania, można podzielić na następujące grupy [6,7,8]:

- antymetabolity cytostatyczne
  - antymetabolity kwasu foliowego (metotreksat, pemetreksed, pralatreksad))
  - antagoniści pirymidyn (fluorouracyl, floksurydyna, kapecytabina, tegafur)
  - antagoniści puryn (merkaptopuryna, tioguanina)
  - inhibitory DNA metylotransferazy (azacytydyna, decytabina, nelarabina)
  - inhibitory polimerazy DNA (cytarabina, fludarabina, gemcytabina, kladrybina, klofarabina)
  - inhibitory reduktazy rybonukleotydowej (pentostatyna)
- leki alkilujące DNA
  - analogi iperytu azotowego (bendamustyna, chlorambucil, mechloretramina, melfalan, tiotepa)
  - oksafosfinany (cyklofosfamid, ifosfamid, trofosfamid)
  - pochodne azyrydyny (tioTEPA)
  - estry kwasu metanosulfonowego (busulfan, treosulfan)
  - pochodne nitrozomocznika (karmustyna, lomustyna, nimustyna)
  - prokarbazyna i triazenony (dakarbazyna, prokarbazyna, temozolomid)
  - niektóre antybiotyki (mitomycyna)
  - organiczne związki kompleksowe platyny (cisplatyna, karboplatyna, oksaliplatyna, pikoplatyna, satraplatyna)
  - inne leki alkilujące DNA (altretamina, estramustyna)
- leki interkalujące DNA
  - antybiotyki antracyklinowe (daunorubicyna, doksorubicyna, epirubicyna, idarubicyna, walrubicyna)
  - aktynomycyny (daktynomycyna)
  - pochodne antracenodionu (mitoksantron)
  - pochodne akrydyny (amsakryna)
- inhibitory topoizomeraz DNA
  - antybiotyki antracyklinowe (daunorubicyna, doksorubicyna, epirubicyna, idarubicyna, walrubicyna)
  - epipodofilotoksyny (etopozyd, tenipozyd)

- kamptotecyny (irinotekan, topotekan)
- inhibitory mitozy
  - taksany (docetaksel, kabazitaksel, paklitaksel)
  - alkaloidy barwinka i ich pochodne (winblastyna, winkrystyna, winorelbina, winflunina)
  - epotylony (iksabepilon)
- inhibitory kinazy tyrozynowej
  - inhibitory Bcr-Abl (imatinib, nilotinib, dasatinib)
  - inhibitory EGFR i EGFR/HER2 (erlotinib, gefitinib, lapatinib)
  - inhibitory VEGFR (sunitinib, sorafenib, pazopanib)
  - inhibitory mTOR (rapamycyna, temsirolimus, ewerolimus)
- inhibitory deacetylazy histonu (romidepsyna, worinostat)
- inhibitory proteasomu (bortezomib)
- przeciwciała monoklonalne
  - anty CD20 (ibritumobab, ofatumubab, rytuksymab, tositumobab)
  - anty CD33 (gemtuzumab)
  - anty CD52 (alemtuzumab)
  - anty EGFR (cetuksymab, panitumubab)
  - anty HER2 (trastuzumab)
  - anty VEGF (bewacizumab)
- immunomodulatory (lenalidomid, talidomid, interferony)
- hormony i antyhormony
  - analogi gonadoreliny (buserelina, goserelina, leuprorelina, nafarelina, triptorelina,
  - gestageny (megestrol, medroksyprogesteron) i antygestageny (mifepriston)
  - estrogeny (fosfestrol, estramustyna) i antyestrogeny (tamoksyfen)
  - antyandrogeny (bikalutamid, flutamid, cyproteron)
  - inhibitory aromatazy (aminoglutetimid, anastrozol, letrozol, eksemestan)
  - inhibitory 5 $\alpha$ -reduktazy (finasteryd, dutasteryd)
  - glikokortykosteroidy (prednizolon, prednizon)
- inne leki przeciwnowotworowe: antybiotyki (bleomycyna), enzymy (asparaginaza), trójtlenek arsenu, retinoidy.

Leki przeciwnowotworowe wykazując różnorodne mechanizmy działania, zawsze wpływają na proliferację komórek – także tych zdrowych, co wiąże się z całym szeregiem działań ubocznych i niepożądanych. Komórki nowotworowe w bardzo niewielkim stopniu różnią się od zdrowych. Podstawowa różnica tkwi w niepoohamowanym, niekontrolowanym rozroście, prowadzącym do inwazyjności i zdolności tworzenia ognisk przerzutowych. Komórki mogą znajdować się w różnej fazie cyklu komórkowego, a leki przeciwnowotworowe mogą działać [9]:

- nieswoiście dla cyklu komórkowego
- swoiście dla cyklu komórkowego, znacznie słabiej działające w fazie  $G_0$ , czyli w spoczynku (np. cyklofosfamid, doksorubicyna)
- swoiście dla danej fazy cyklu. W fazie S, czyli wzmożonej syntezy DNA najsilniej działają antymetabolity, w fazie M, czyli mitozie – alkaloidy i lignany, w fazie  $G_2$ , czyli wzroście komórki przed mitozą – bleomycyna, a w fazie  $G_1$ , czyli wzroście komórki po mitozie - asparaginaza

Stąd chemioterapeutyki stosuje się często wg określonych schematów, a poszukując nowych leków dąży się do obniżenia ich toksyczności, przy zachowaniu zakresu oddziaływania na dane typy nowotworów. Ten sposób postępowania daje kolejne generacje danej grupy leków.

Wśród antybiotyków antracyklinowych wyróżnia się:

- antracykliny I generacji (daunorubicyna, doksorubicyna)
- antracykliny II generacji (epirubicyna, aklarubicyna, zorubicyna, idarubicyna, pirarubicyna)
- antracykliny III generacji (plikamycyna).

Cząsteczka antybiotyku antracyklinowego składa się z aglikonu oraz połączonej z nim wiązaniami glikozydowymi daunozyminy. Aglikon stanowią cztery sześciocłonowe pierścienie, z których dwa są aromatyczne.

Epirubicyna należy do II generacji antybiotyków antracyklinowych, będąc półsyntetyczną pochodną doksorubicyny, w którym aminocukier – daunozyminę zastąpiono akozaminą. Dzięki temu zakres działania pozostał bez zmian, a obniżyła się toksyczność substancji. Mechanizm działania antybiotyków antracyklinowych polega na interkalacji (wciskaniu się) w płaszczyźnie prostopadłej do osi DNA lub RNA między dwie sąsiednie zasady łańcucha, co w konsekwencji uniemożliwia transkrypcję i translację. Dzięki wiązaniom wodorowym powstaje kompleks antrachinono-guaninowy, stabilizowany powstaniem dodatkowych

wiązań między strukturą antrachinonu a guaniną oraz cytozyną. Obecność daunozaminy lub akozaminy umożliwia większą stabilność powstałego kompleksu. Leki te powodują także wzmożone powstawanie wolnych rodników przy udziale reduktazy NADPH-cytochromu P-450, co przyczynia się do znacznej ich kardiotoxyczności, zależnej od dawki i prowadzącej do nieodwracalnej kardiomiopatii. Podanie koenzymu Q-10 i nieprzekraczanie ogólnej dawki 450-500 mg/m<sup>2</sup> zmniejsza to niekorzystne działanie [10]. Można również zaobserwować silne działanie miejscowe drażniące tej grupy leków, prowadzące do martwicy przy nieostrożnym podaniu poza żyłę. Pomimo tego antybiotyki antracyklinowe mają szerokie i zróżnicowane zastosowanie w leczeniu. Są one stosowane głównie w terapii różnego typu ostrych białaczek, a także w raku piersi, jajników, śluzówki macicy, przełyku, wątroby, trzustki, żołądka, jąder, szpiczaku mnogim, chłoniaku nieziarniczym, neuroblastomie, nowotworach w obrębie głowy i szyi, mięsaku Kaposiego oraz mięsaku Swinga [11].

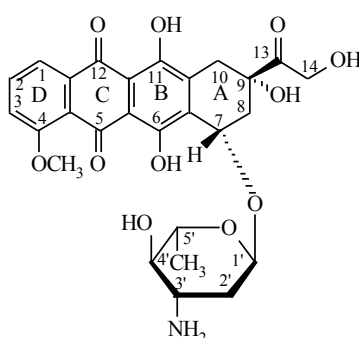
W celu zapewnienia bezpieczeństwa terapii, producenci leków zobowiązani są do przestrzegania zasad Dobrej Praktyki Wytwarzania, co m.in. wiąże się z zapewnieniem kontroli jakości substancji użytych do wytwarzania substancji czynnej, jak i samego leku na każdym etapie wytwarzania. Należy również określić termin ważności specyfiku. Jakość leku zależy m.in. od jego trwałości fizycznej, chemicznej, enzymatycznej i biologicznej. Lek może ulegać zmianom fizycznym (parowanie, adsorpcja, absorpcja, sedymentacja), przez co zmienić się może zawartość substancji czynnej, bądź może ona być nierównomiernie rozmieszczona, co utrudnia dawkowanie. Lek może także ulegać inaktywacji częściowej bądź całościowej lub może się zwiększyć jego toksyczność w wyniku reakcji chemicznych, np. utleniania, hydrolizy, polimeryzacji. Stąd, aby ustalić optymalne warunki produkcji i przechowywania leku, przeprowadza się cały szereg testów, mających na celu rozkład badanej substancji w zależności od temperatury, pH, wilgotności i innych czynników [12]. Tego typu badania mogą także być przydatne w ustalaniu mechanizmu rozkładu związku i identyfikacji produktów powstałych w jego wyniku. Ważnym i trudnym zadaniem badacza jest dobór odpowiednich metod analitycznych oraz warunków, w jakich należy przeprowadzić testy. Zwieńczeniem tych wszystkich wysiłków jest stabilizacja preparatu, tak, aby pacjent miał pewność, że zaordynowany mu lek posiada określoną aktywność farmakologiczną, zgodną z oczekiwaniami oraz deklaracjami producenta.

## 2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

---

### 2.1. Budowa chemiczna i parametry farmakokinetyczne antracyklin

#### 2.1.1. Budowa chemiczna



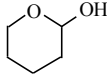
Na strukturę antybiotyków antracyklinowych składają się: aglikon, będący czteropierścieniowym (pierścienie A, B, C, D) chromoforem oraz reszta cukrowa. Pierścień B to układ hydrochinonu, pierścień C stanowi strukturę chinonu. W pierścieniu D w pozycji C-4 występuje grupa metoksylova, pierścień A posiada w pozycji C-9 łańcuch boczny z grupą karbonylową. Za oddziaływanie na poziomie molekularnym w komórce odpowiadają grupy: karbonylowa, hydroksylowa oraz aminowa. Elementem koniecznym do interakcji z makrocząsteczkami komórki jest również aminocukier (daunozamina), połączona wiązaniem glikozydowym z C-7 pierścienia A, złożona z reszty 3-amino-2,3,6-trideoksy-L-fukozy.

Pierwsze antracykliny – dokсорubicynę i daunorubicynę wyizolowano pięćdziesiąt lat temu z grzyba *Streptococcus peucetius var. caesius*. Budowę chemiczną różnią się one tylko grupą hydroksylową przy C-14, lecz ta niewielka zmiana pociąga za sobą inne zastosowanie kliniczne obu związków. Dokсорubicyna znalazła zastosowanie w leczeniu nowotworów piersi, guzów litych u dzieci, mięsaków tkanek miękkich i agresywnych chłoniaków, natomiast daunorubicynę stosuje się w ostrych białaczkach limfoblastycznych i mieloblastycznych [13]. Z kolei epimeryzacja w dokсорubicynie grupy hydroksylowej przy C-4' daunozaminy, dająca pochodną o nazwie epirubicyna, nie zmienia istotnie zastosowania

klinicznego, ale pozwala niemal dwukrotnie podwyższyć dawkę skumulowaną w stosunku do doksorubicyny, bez zwiększenia kardiotoxyczności [14]. Powstawanie oporności na leczenie, obok kardiotoxyczności, to dwa główne powody skłaniające do poszukiwania pochodnych o korzystniejszych właściwościach [15].

Tabela 1.

Antybiotyki antracyklinowe stosowane w lecznictwie

| Antybiotyk    | R <sub>1</sub>                        | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub>  |
|---------------|---------------------------------------|----------------|------------------|----------------|---|
| Doksorubicyna | O                                     | OH             | OCH <sub>3</sub> | H              | OH  |
| Daunorubicyna | O                                     | H              | OCH <sub>3</sub> | H              | OH  |
| Karminomycyna | O                                     | H              | OH               | H              | OH  |
| Idarubicyna   | O                                     | H              | H                | H              | OH  |
| Epirubicyna   | O                                     | OH             | OCH <sub>3</sub> | OH             | H   |
| Zorubicyna    | N-NH-CO-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> | H              | OCH <sub>3</sub> | H              | OH  |
| Pirarubicyna  | O                                     | OH             | OCH <sub>3</sub> | H              |  |

### 2.1.2. Parametry farmakokinetyczne

Epirubicynę podaje się zazwyczaj we wlewie dożylnym, w dawce 60-90 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała, raz na 3 tygodnie. Lek posiada trójfazowy biologiczny okres półtrwania, wynoszący 5 min., 1 h, 20–40 h [16]. Liniowa zależność stężenia epirubicyny od czasu utrzymuje się w granicach od 60 do 150 mg/m<sup>2</sup>. Charakteryzuje ją szeroka i szybka dystrybucja do tkanek. Wiązanie z białkami, głównie albuminami wynosi 77%, niezależnie od stężenia leku. Metabolizm odbywa się głównie w wątrobie i polega na:

- redukcji grupy ketonowej C-13, w wyniku czego powstaje epirubicynol
- sprzężeniu z kwasem glukuronowym epirubicyny lub epirubicynolu,

- tworzeniu aglikonów dokсорubicyny i dokсорubicynolu po hydrolizie grupy aminocukrowej,
- utraty aminocukru w wyniku reakcji redoks, prowadzącej do powstania 7-deoksyaglikonu dokсорubicyny i 7-deoksyaglikonu dokсорubicynolu.

Główny metabolit – epirubicynol jest 10-krotnie mniej aktywny od epirubicyny i nie osiąga stężeń terapeutycznych we krwi. Epirubicyna i jej metabolity wydalane są z żółcią i w mniejszym stopniu przez nerki [17].

Oprócz stosowania dożylnego istnieją sposoby podania leku dopęcherzowe, w przypadku powierzchniowych postaci raka pęcherza moczowego lub przy zapobieganiu nawrotom po resekcji przezcewkowej. Dożylnie zalecane dawki bywają różne, w zależności od rodzaju nowotworu. Zwykle stosowana dawka waha się w granicach 60-120 mg/m<sup>2</sup>, ale w terapii uzupełniającej raka piersi z przerzutami do węzłów pachowych wynosi 100-120 mg/m<sup>2</sup>, a u pacjentów z rakiem płuc początkowo 135 mg/m<sup>2</sup>. Przy podaniu we wlewie należy zwrócić uwagę na możliwość wynaczynienia, stąd też nie wstrzykuje się leku bezpośrednio. Czas wlewu wynosi zwykle 3 do 20 min, aby obniżyć ryzyko wystąpienia zakrzepicy.

Dopęcherzowo epirubicynę podaje się przez cewnik. Pacjent 12 godzin przed zabiegiem nie powinien nic pić, aby nie rozcieńczać leku, natomiast po podaniu leku powinien przez godzinę zmieniać pozycję ciała, tak aby lek miał jak największy kontakt z powierzchnią pęcherza. Metoda powyższa nie nadaje się do leczenia guzów inwazyjnych, naciekających śluzówkę pęcherza moczowego.

## 2.2. Mechanizmy działania antracyklin

Postuluje się kilka mechanizmów działania wyjaśniających efekt terapeutyczny, a także toksyczny antracyklin. Związki te powodują modyfikację struktury DNA, która może zachodzić na zasadzie interkalacji, tworzenia wiązań kowalencyjnych lub zmian w budowie zasad azotowych. Ostatnia z modyfikacji odbywa się na drodze reakcji redoks, które mogą przebiegać dzięki obecności ugrupowania chinonu w cząsteczkach antracyklin.

Antracykliny wiążą się odwracalnie z DNA. W badaniach krystalograficznych wykazano, że oddziałują one z sekwencjami 5'-GC-3' i 5'-CG-3'. Na tworzenie takich kompleksów interkalacyjnych pozwala antracyklinom aromatyczny płaski pierścień, wsuwający się między pary zasad w DNA. Całość stabilizuje cząsteczka daunozaminy usytuowująca się w rowku

mniejszym helisy [18]. Obserwuje się wydłużenie helisy DNA, zmniejszenie elastyczności i odkształcenie całej cząsteczki. Podstawowe znaczenie w mechanizmie interkalacji pełnią siły elektrostatyczne oraz wiązania wodorowe – stąd brak grupy OH w pozycji C-9 pochodnej antracyklinowej skutkuje niemożnością tworzenia takich wiązań w obecności wody, co prowadzi do utraty działania przeciwnowotworowego tych związków. W stabilizowaniu powyższych kompleksów istotne są także oddziaływania van der Waalsa oraz wiązania jonowe (daunozamina posiada ładunek dodatni) [19]. Przeprowadzono również interesujące badania wykazujące zależności wiązania cząsteczki antracykliny do DNA, w zależności od modyfikacji jej cząsteczki polegającej na dimeryzacji lub zamianie atomu wodoru grupą OH w pozycji C-14.

Lepsze zrozumienie procesu powstawania kompleksów interkalacyjnych i dzięki temu przewidzenie, jak zachowa się cząsteczka antracykliny po zamianie różnych podstawników było możliwe na podstawie badań termodynamicznych i kinetycznych. Wynika z nich m.in., że energia swobodna obniżyła się o 1 kcal/mol, po usunięciu grup OH w pozycji C-9 i C-14 (to one tworzą wiązania wodorowe), natomiast zamiana grupy NH<sub>2</sub> w pozycji 3' na grupę OH obniża energię swobodną wiązania o 0,7 kcal/mol [20].

Antracykliny mogą tworzyć wiązania kowalencyjne z DNA w obecności formaldehydu. W warunkach *in vitro* źródłem CH<sub>2</sub>O był Tris, reagujący z Fe<sup>2+</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reakcja Fentona). *In vivo* przypuszczalnie źródłem formaldehydu jest autokatalityczna reakcja doksorubicyny w pozycji C-13 z udziałem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz utlenianie przez rodniki hydroksylowe poliamin np. sperminy, przy czym każdy z tych mechanizmów uzależniony jest od zdolności wiązania Fe<sup>2+</sup> przez doksorubicynę [21,22]. Stąd pomysł zastosowania koniugatów antracyklin z formaldehydem. Okazało się, że owe dimeryczne struktury, hydrolizując tworzą aktywne monomery z atomem węgla pochodzącym z CH<sub>2</sub>O, który wiąże się z grupą 3'-NH<sub>2</sub> daunozaminy. Z kolei, w wyniku interkalacji takiego kompleksu powstaje wiązanie kowalencyjne z grupą 2-NH<sub>2</sub> guaniny jednej nici DNA oraz silne wiązania wodorowe z guaniną w drugiej nici. Takie niespotykane występowanie interkalacji razem z wiązaniem kowalencyjnym z jednej strony i wiązaniem wodorowym z drugiej, nazywane jest „wirtualnym” wiązaniem międzyniciowym. Antracykliny nie posiadające grupy NH<sub>2</sub> w pozycji 3' nie mogą tworzyć wiązań kowalencyjnych. Jeśli taka grupa jest obecna, jej konfiguracja stereochemiczna nie ma znaczenia na powstanie takiego wiązania. Swoistość wiązania antybiotyków antracyklinowych z DNA badano metodami krystalograficznymi oraz metodą footprinting, czyli odcisku stopy. Wykazano, że miejscem najczęściej chronionym



przed cięciem DN-azą I była sekwencja 5'-GC-3', natomiast sąsiadujące sekwencje wpływają na ułożenie się w mniejszym rowku DNA aminocukru [23].

Kolejnym rozpatrywanym mechanizmem działania antracyklin, ważnym o tyle, że prawdopodobnie odpowiedzialnym za działanie niepożądane tych związków, jest tworzenie reaktywnych form tlenu. Reaktywne formy tlenu to wysoce agresywne cząsteczki w rodzaju anionorodnika nadadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ), nadtlenku wodoru, czy rodniaka hydroksylowego ( $OH^{\cdot}$ ), powstające w wyniku przeniesienia elektronu z NADH lub NADPH na pierścień C dokсорubicyny i przekształcenia chinonu w semichinon oraz spontanicznego przejścia semichinonu ponownie w chinon, z równoczesną redukcją tlenu. W powyższych reakcjach mogą uczestniczyć także enzymy oksydoredukcyjne np. cytochrom P450, mitochondrialna dehydrogenaza NADH. Bardzo duża reaktywność powstających cząsteczek powoduje wiele uszkodzeń w strukturach komórkowych, gdyż na reakcję z nimi podatne są białka, lipidy, węglowodany i kwasy nukleinowe. Najbardziej szkodliwe są pęknięcia nici DNA lub RNA, gdyż wiąże się to z dużym ryzykiem mutacji. Wykazano wzrost ilości typowych produktów reakcji chromatyny z rodniakiem hydroksylowym tj. 8-hydroksyguaninę, 8-hydrokysadeninę i 5-hydroksyuracyl po ekspozycji na epidokсорubicynę oraz powrót po 24 godzinach poziomu tych związków do stężeń kontrolnych [24]. Istnieje także pośredni sposób oddziaływania antracyklin przez wolne rodniki na zasady azotowe w DNA – w wyniku tworzenia się dialdehydu malonowego, jako końcowego produktu peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w komórce, w dalszej reakcji z deoksyguanozyną powstaje struktura pirymidopurynonu. Antracykliny umożliwiają również reakcję przenoszenia grup oksopropenyłowych z dialdehydu malonowego na DNA. Powyższe zmiany w strukturze DNA w konsekwencji mogą prowadzić do dużych insercji i delecji [25].

Wszystkie powyżej opisane mechanizmy działania antracyklin prowadzą do zaburzeń w budowie DNA. Wpływając na aktywność enzymów i czynników transkrypcyjnych, zaburzają namnażanie się komórek. Zahamowanie replikacji DNA obserwowano w wielu przypadkach, przy czym efekt ten występował w dość szerokim zakresie stężeń 0,1–5  $\mu\text{mol/l}$ . [26]. Przypuszcza się, że antracykliny powodują wzrost aktywności p53, co pociąga za sobą większą aktywność silnego inhibitora kinaz zależnych od cyklin – białka p21<sup>waf/cip1</sup>, związanego przez jądrowy antygen proliferujących komórek, co objawia się hamowaniem syntezy DNA zależnej od polimerazy DNA [27]. W badaniach nad wpływem antracyklin na aktywność polimeraz lepszym modelem jest polimeraza RNA i to na jej przykładzie wykazano wpływ hamujący kowalencyjnego wiązania się dokсорubicyny z DNA na proces elongacji łańcucha RNA [28]. Antybiotyki antracyklinowe wpływają nie tylko na polimerazę

DNA i elongację łańcucha polinukleotydowego, ale mogą także wchodzić w interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi na zasadzie współzawodnictwa o miejsce regulatorowe na nici DNA, z którym kowalencyjnie się wiążą. Wiązanie z sekwencją GpC wpływało na przykład na oddziaływanie czynnika transkrypcyjnego Sp1, rozpoznającego fragmenty bogate w pary G-C. Antracykliny hamują także czynniki E2F1 oraz E2F4, które rozpoznają pary A-T i G-C występujące obok siebie.

Bardzo ważny jest także wpływ antybiotyków antracyklinowych na aktywność topoizomerazy II. Zablokowanie jej działania powoduje stabilizację kompleksów przeciętych nici DNA z topoizomerazą i śmierć komórki na skutek niemożności kontynuowania podziału. W procesie relaksacji superheliksu DNA topoizomeraza I odpowiada za przecięcie jednego łańcucha polinukleotydowego i utworzenie kompleksu rozszczepiającego. Topoizomeraza II przecina oba łańcuchy, aby mogły zajść dalsze procesy replikacji, transkrypcji, rekombinacji lub naprawy DNA. W momencie powstania kompleksu rozszczepiającego i kowalencyjnego połączenia się topoizomerazy II z DNA, przyłącza się antracyklina, co uniemożliwia ponowne połączenie się nici. Stąd powstanie trwałych kompleksów topoizomeraza II – DNA – antracyklina działa toksycznie na komórkę. Ważną rolę w stabilizowaniu tych kompleksów odgrywa reszta cukrowa, która umiejscawia się w bruzdzie mniejszej helisy DNA. Usunięcie grup  $\text{NH}_2$  przy C-3' reszty cukrowej powoduje wzrost siły hamującej na topoizomerazę, a rodzaj podstawnika w tym położeniu ma wpływ na swoistość wiązania z enzymem. Ponadto dodanie drugiej reszty cukru w pozycji aksjalnej w stosunku do pierwszej dawało pochodne bardziej aktywne, niż w pozycji ekwatorialnej [29]. Stężenie antracyklin potrzebne do zahamowania topoizomerazy I było dwa rzędy wielkości większe (10–100  $\mu\text{mol/l}$ ) od stężeń hamujących topoizomerazę II (0,1–1  $\mu\text{mol/l}$ ).

Podobne jak w przypadku topoizomerazy II, antracykliny tworzą nieodwracalne kompleksy z helikazą (innym enzymem rozplatającym nici DNA poprzez rozrywanie wiązań wodorowych między nimi) i DNA. Taki mechanizm sugerują niskie stężenia dokсорubicyny, przy których dochodzi do zablokowania rozplatania nici DNA (efektywne stężenie hamujące w 50% aktywność helikazy dla dokсорubicyny wynosi 0,4  $\mu\text{mol/l}$ ). Wiązania kowalencyjne między DNA a antracyklinami powstają dopiero w dużo wyższych stężeniach [30].

Biorąc pod uwagę stężenia, w jakich występują antracykliny w tkankach (0,1–0,5  $\mu\text{M}$ ) oraz fakt wnikanía ich cząsteczek do podwójnej warstwy lipidowej w błonach komórkowych, należy uwzględnić możliwość hamowania innych enzymów uczestniczących w reakcjach redoks lub transporcie przez błonowy. Jednym z takich enzymów jest oksydaza cytochromu c, znajdująca się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, będąca ostatnim ogniwem w reakcji

łańcucha oddechowego. Prawdopodobnie wpływ na ten właśnie enzym powoduje występowanie kardiotoksyczności antracyklin [31]. Dokсорubicyna wpływa hamująco na oksydazę cytochromu c w wyniku oddziaływań elektrostatycznych na kardiolipinę – ujemnie naładowany fosfolipid, nieodzowny dla prawidłowej aktywności oksydazy.

Istnieje bardzo dużo doniesień wskazujących na wpływ antracyklin na różne szlaki metaboliczne prowadzące do apoptozy komórek. Jest to o tyle istotne, że obok działania antyproliferacyjnego związków przeciwnowotworowych, zawsze brana pod uwagę jest ich zdolność do wywoływania apoptozy komórek. Są to dwa podstawowe wyznaczniki skuteczności w niszczeniu komórek rakowych. Obok hamowania topoizomerazy II oraz wzrostu aktywności p53 postuluje się coraz więcej mechanizmów, które mogą zaistnieć w zakresie stężeń terapeutycznych, pozwalającym antracyklinom indukować apoptozę. Przykładem jest stymulacja kinaz JNK i aktywacja c-Jun/AP-1 [32]. Nie bez znaczenia jest także aktywacja proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2, tj. Bak i Bax, przyczyniająca się do uwalniania cytochromu c z mitochondriów, współgrająca z hamowaniem aktywności szlaku kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K/Akt. Jest to tym ważniejsze, że wiele typów nowotworów wykazuje nadmierną ekspresję PI3K [33].

Nie mniej istotny jest wpływ antracyklin na homeostazę żelaza w komórce. Za jej utrzymanie odpowiadają efekty związane ze współdziałaniem dwóch białek tj. ferrytyny (przechowywanie żelaza w bezpiecznej dla komórki postaci) i receptora transferyny – TfR (wychwyt żelaza z płynów zewnątrzkomórkowych). Dokсорubicyna hamuje uwalnianie żelaza, prawdopodobnie na skutek tworzenia wolnych rodników i ich indukcyjnego wpływu na potranslacyjne modyfikacje ferrytyny. Jednocześnie może ona powodować wzrost uwalniania żelaza z innych białek, np. mitochondrialnej akonitazy (także na skutek reakcji redoks). Zachodzące procesy stają się jeszcze bardziej skomplikowane, gdyż akonitaza przekształca się wtedy w białko IRP-1, odpowiadające za regulację ekspresji mRNA TfR (wzrost) i ferrytyny (spadek). W rezultacie pobieranie żelaza przez komórkę wzrasta, przy spadku jego magazynowania. Wzrost puli wolnego żelaza jest pożądanym mechanizmem adaptacyjnym komórki w odpowiedzi na jego niedobór, ale w sytuacji, gdy ilość żelaza jest wystarczająca, ale wzrasta na skutek indukowanego przez dokсорubicynę przekształcenia akonitazy w IRP-1, dochodzi do toksycznego zatrucia komórki żelazem [34]. Następują wtedy wolnorodnikowe reakcje żelaza z  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$ , aktywujące NF- $\kappa$ B lub wywołujące dysfunkcję mitochondriów, co prowadzi do apoptozy komórki. Mechanizm ten wyjaśnia kardiotoksyczny wpływ antracyklin oraz ochronne działanie w tym procesie antyoksydantów, przeciwciał przeciwko TfR i chelatorów żelaza.

## 2.3. Zastosowanie i działania niepożądane epirubicyny

### 2.3.1. Zastosowanie epirubicyny w leczeniu

Wśród wielu badań przeprowadzanych z użyciem epirubicyny, na uwagę zasługuje terapia neoadjuwantowa podana w sześciu cyklach, z użyciem cisplatyny i ifosfamidu u chorych na kostniakomięsaka, rzadki nowotwór tkanki kostnej [35]. Autorzy uznali terapię za dobrze tolerowaną, o kardiotoksyczności w stopniu 3–4, wartą aby w dalszej kolejności przeprowadzić badania III fazy. Pięcioletnie przeżycie wahało się w granicach 41,9% i 48,2%.

Z kolei u 43 chorych na zaawansowany nowotwór nosogardzieli postanowiono podać trzy cykle adjuwantowej terapii złożonej z cisplatyny, epirubicyny i bleomycyny, po zaaplikowaniu cisplatyny w połączeniu z 5-fluorouracylem i radioterapią [36]. W ten sposób dążono do osiągnięcia większej redukcji rozrostu tkanki nowotworowej. Stwierdzono, że powyższy schemat odznacza się ryzykiem toksyczności możliwym do przyjęcia, przy dobrej efektywności (3-letnia przeżywalność na poziomie 65–70%, wobec 62–80% w innych badaniach randomizowanych) i postanowiono kontynuować badania. Podobnie zaprojektowano chemioterapię, tym razem neoadjuwantową złożoną z cisplatyny i epirubicyny, u 110 pacjentów z zaawansowanym nowotworem nosogardzieli z następczą radioterapią i podaniem dodatkowo cisplatyny [37]. Stwierdzono, że powyższy schemat leczenia jest bezpieczny i efektywny. U 79% chorych odnotowano całkowitą remisję, a u 21% częściową. W zależności od stopnia zaawansowania nowotworu odnotowano 3-letnie przeżycie u 89% (stopień IIB) i 69% (stopień IVB) chorych. W wyniku działania toksycznego kuracji zmarła jedna osoba.

W celu ustalenia optymalnego schematu chemoterapii u pacjentów z drugim co do częstości pod względem umieralności na świecie nowotworem, tj. guzem żołądka, poddano testom kombinację: oksaliplatyny, 5-fluorouracylu z leukoworyną i epirubicyną [38]. Całość badań przeszło 35 chorych z zaawansowanym nowotworem żołądka. W ocenie autorów pracy, efektywność i tolerancja terapii okazały się być lepsze od wcześniejszych badań z użyciem antracyklin. W porównaniu z innymi schematami, gdzie wiodącym czynnikiem leczniczym był 5-fluorouracyl, także otrzymano lepsze rezultaty. Podobnym schematem leczniczym posłużyli się badacze z Danii [39]. Postanowili oni zastąpić 5-fluorouracyl kapecytabiną, z uwagi na łatwość podania tej drugiej pacjentowi – nie jest potrzebne centralne

wklucie, niosące ryzyko zakrzepicy i infekcji. Badaniom poddano 53 pacjentów, z czego tylko 7 zrezygnowało z powodu toksyczności terapii. Efektywność powyższego schematu była podobna do innych, jednakże dużo łatwiej można było podać pacjentom leki co trzeci tydzień. W innym ośrodku badawczym postanowiono sprawdzić zasadność stosowania terapii złożonej z epirubicyny, cisplatyny i docetakselu u chorych z guzem żołądka [40]. Do testu zakwalifikowano 46 pacjentów, przy czym 65% z nich miało przerzuty w wątrobie, a u 61% nie można było przeprowadzić resekcji guza, ze względu na stopień zaawansowania choroby. Proponowany schemat określono jako skuteczny i dobrze tolerowany przez pacjentów z zaawansowanym nowotworem, podobny do innych wcześniej stosowanych. Profil bezpieczeństwa uznano za satysfakcjonujący. Podobne schematy lecznicze zastosowano jako terapię adjuwantową zarówno przed, jak i po radioterapii z infuzją 5-fluorouracylu [41]. Badaniom poddano 54 chorych z gruczolakorakiem żołądka. Podano im jeden cykl terapii adjuwantowej złożonej z epirubicyny, cisplatyny i 5-fluorouracylu (ECF), a następnie przeprowadzono naświetlania i wlew 5-fluorouracylu, by zakończyć terapię dwoma cyklami ECF. Prowadzono także badania porównawcze różnych schematów leczniczych w przypadku nowotworów górnego odcinka przewodu pokarmowego tak, aby określić najwyższe dawki tolerowane i optymalne [42]. 14 pacjentów zakwalifikowano do pierwszego, a 11 do drugiego schematu. Autorzy, oprócz ustalenia ww. dawek, podkreślili, że w wyniku leczenia żaden pacjent nie zmarł, do czego bardzo przyczyniła się obecność dietyka i w związku z tym odpowiedni sposób odżywiania się. W związku z coraz szerszym stosowaniem nowoczesnych leków, takich jak przeciwciała monoklonalne, próbuje się również w trudnym leczeniu zaawansowanych nowotworów przełyku i żołądka połączyć konwencjonalne schematy chemioterapii z matuzumabem [43]. Trudność w przydzielaniu pacjenta do testów polega na określeniu dodatkowo immunohistochemicznie aktywności EGFR. Tak więc w przypadku tego badania, z 45 chorych do leczenia zakwalifikowano 21. Wykazano wysoki stopień odpowiedzi pacjentów na terapię, jej dobrą tolerancję oraz ustalono dawkę matuzumabu na poziomie 800 mg na tydzień. W podobnych badaniach użyto kombinacji epirubicyny, oksaliplatyny i kapecytabiny w połączeniu lub bez panitumumabu [44]. Podsumowując, epirubicyna stanowi ważny składnik w chemioterapii nowotworów przewodu pokarmowego. Jej działania niepożądane można z powodzeniem kontrolować, a w połączeniu z nowoczesną terapią celowaną, stanowi szansę na coraz skuteczniejsze leczenie [45].

Epirubicyna jest istotnym i skutecznym lekiem stosowanym także w nowotworach piersi. Jej przewagę nad gemcytabiną w pomenopauzalnym leczeniu nowotworu piersi zauważyli lekarze w wieloośrodkowym, randomizowanym, europejskim badaniu [46]. Jednym

z przykładów takiego użycia epirubicyny jest zastosowanie jej w sekwencyjnej terapii w połączeniu z kapecytabiną i/lub winorelbiną u osób z wczesnym, wysokiego ryzyka nowotworem piersi (z zajętymi czterema węzłami chłonnymi), po chirurgicznym usunięciu piersi i węzłów [47]. W badaniu brało udział 51 pacjentów, a dawka epirubicyny wynosiła  $150 \text{ mg/m}^2$  co 2 tygodnie. Okazało się, że zastosowanie samej kapecytabiny, po terapii sekwencyjnej epirubicyną i paklitakselem powodowało mniejszy efekt toksyczny. Podobną sekwencyjną terapię epirubicyną i docetakselem zastosowano z powodzeniem u pacjentów z miejscowo zaawansowanym rakiem piersi [48]. Oprócz podkreślenia głównej roli epirubicyny w powyższym schemacie terapeutycznym, autorzy sugerowali zastosowanie dodatkowo terapii biologicznych (anty-HER2 i inne) w celu uzyskania odpowiedzi na leczenie. Na potrzebę zastosowania indywidualnie dopasowanej terapii u chorych z guzem piersi wysokiego ryzyka zwrócili uwagę autorzy pracy zamieszczonej w czasopiśmie Lancet [49]. Inne badanie, mające na celu ustalenie toksyczności oraz najwyższej tolerowanej dawki leków zostało podobnie zaprojektowane, z tym że obok docetakselu i cyklofosfamidu, epirubicynę podano w dawkach  $75 \text{ mg/m}^2$  lub  $100 \text{ mg/m}^2$  co 2 tygodnie przez 6 cykli. Dla zmniejszenia działań niepożądanych dołączono 6 mg filgrastimu [50]. Autorzy wykazali, że powyższy schemat pozwoli na opracowanie badań randomizowanych w przyszłości, z uwagi na osiągnięte dobre wyniki przeżywalności, gdyż niekiedy po przeprowadzeniu chemioterapii okazuje się, że mimo dobrze zapowiadających się wyników odnośnie toksyczności, obserwuje się stosunkowo niskie wskaźniki ogólnego i pięcioletniego przeżycia [51]. Podobnie jak w przypadku nowotworu żołądka, także leczenie nowotworu piersi próbuje uzupełnić się nowoczesnymi przeciwciałami monoklonalnymi. Sukces, jak dotychczas odniosła grupa badaczy przeprowadzając randomizowane testy z użyciem trastuzumabu w połączeniu z paklitakselem i epirubicyną [52]. Tak dobrych wyników nie udało osiągnąć się innym badaczom, mimo, że zastosowali połączenie pierwszego wyboru w terapii neoadjuwantowej raka piersi. 181 pacjentów poddano czterem cyklom chemioterapii złożonej z epirubicyny ( $90 \text{ mg/m}^2$ ) i cyklofosfamidu ( $600 \text{ mg/m}^2$ ) oraz dodano gefitynib (250 mg) – inhibitor receptora naskórkowego czynnika wzrostu [53]. Autorzy podkreślają, że podobne połączenia nastęrczają trudność w postaci ustalenia odpowiednich pacjentów, u których gefitynib mógłby najlepiej zadziałać. Wielu chorych musiało przerwać badania z uwagi na nasilenie efektów ubocznych terapii w postaci nudności, wypadania włosów i ogólnego wycieńczenia. Wielu badaczy próbuje znaleźć czynniki prognostyczne, pozwalające z wyprzedzeniem określić trafność zastosowanego schematu leczniczego u danego pacjenta. Typuje się topoizomerazę II $\alpha$ , onkoproteinę c-erbB2, p53 białko supresorowe, receptory estrogenowe (ER)

i progesteronowe (PR). Spośród tych czynników ustalono znaczącą zależność między nadekspresją c-erbB2 oraz ER a odpowiedzią na leczenie antracyklinami u osób z zaawansowanym nowotworem piersi. Nie zaobserwowano takiej zależności w przypadku topoizomerazy II $\alpha$ , mimo, że enzym ten jest jednym z punktów uchwytu działania antracyklin [54]. W nowszych badaniach [55] wykazano przydatność oceny ekspresji genu zapobiegającego apoptozie BCL-2 oraz promotora apoptozy komórkowej BAD w przewidywaniu odpowiedzi na terapię lekami przeciwnowotworowymi. Inne badania immunologiczne [56] wskazują, że ze względu na wzrost cytotoksyczności komórek NK po terapii adjuwantowej 5-fluorouracylem, epirubicyną oraz cyklofosfamidem z lub bez radioterapii, korzystne jest zastosowanie dodatkowej terapii celowanej przeciwciałami monoklonalnymi, gdyż te swój efekt leczniczy zawdzięczają interakcjom z układem immunologicznym.

Terapie z zastosowaniem epirubicyny próbuje się wdrożyć również w przypadku nowotworu prostaty. W 2002 roku opublikowano badanie, które miało określić przydatność epirubicyny u chorych na hormonalnie oporną odmianę nowotworu prostaty, trudno poddającą się leczeniu [57]. Epirubicynę podawano w dawce 30 mg/m<sup>2</sup> co tydzień przez 6 lub 12 cykli. Pacjenci dobrze tolerowali leczenie, nie wystąpiły u żadnego z nich problemy z niewydolnością zastoinową serca. Stwierdzono, że terapia ma pozytywne działanie na jakość życia i dalsze przeżycie. Inni badacze do epirubicyny dołączyli docetaksel w cotygodniowych dawkach, z uwagi na doniesienia o poprawie tolerancji lub efektywności [58]. Podobnie, jak w badaniach z epirubicyną, także tutaj nie zdarzył się żaden przypadek kardiotoxyczności, a pozostałe działania niepożądane były słabo nasilone i całkowicie odwracalne, a leczenie okazało się efektywne. Porównano również terapię konwencjonalną w zaawansowanym raku prostaty tj. docetaksel z prednizonem ze schematem złożonym z epirubicyny i docetakselu. Badania były wykonane z podwójną grupą kontrolną. Zakwalifikowano ostatecznie 72 pacjentów i wykazano, że terapia jest wykonalna, dobrze tolerowana i ma przewagę nad konwencjonalną [59].

Powszechnie akceptuje się rolę antracyklin w schematach chemioterapeutycznych stosowanych w leczeniu chłoniaków, np. ABVD (doksorubicyna, bleomycyna, winblastyna, dakarbazyna). Uważa się także, że epirubicyna obarczona jest mniejszym działaniem kardiotoxycznym, stąd postanowiono zmodyfikować ten schemat leczniczy zastępując doksorubicynę, epirubicyną. Wykluczono także dakarbazynę i zastąpiono winblastynę winorelbina [60]. Okazało się jednak, że wystąpiło dużo wznowień choroby. Autorzy postulują dłuższe i szersze badania w celu uzyskania lepszych schematów leczniczych,

charakteryzujących się mniejszą liczbą wznowień choroby. W razie wystąpienia nawrotu choroby potrzebna jest terapia ratunkowa. Taką skuteczną terapię ratunkową, złożoną z ifosfamid, etopozydu i epirubicyny opracowano dla chorych z chłoniakiem nieziarniczym i chorobą Hodgkina [61]. Dodatkowo terapia ta nie powoduje dużej toksyczności sercowej, czy nerkowej i bardzo dobrze mobilizuje komórki macierzyste, co bardzo pomaga osobom przygotowanym do przeszczepu. Inną terapią zastosowaną u młodych pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym zajmował się zespół lekarzy niemieckich [62]. Chemioterapia składała się z jednego cyklu złożonego z ifosfamid, etopozydu, winkrystyny i deksametazonu, po czym trzech cykli epirubicyny, cyklofosfamid, winkrystyny i deksametazonu oraz jednego cyklu karboplatyny, etopozydu i deksametazonu. Dodatkowo od 2002 roku podawano rytuksymab 1-2 razy przed każdym cyklem. Autorzy podkreślają konieczność zastosowania czynnika stymulującego powstawanie granulocytów (G-CSF) w razie wystąpienia 4 poziomu leukocytopenii, co w szczególności następowało po 1 i 5 cyklu chemioterapii. Leczenie uznano za efektywne i polecono porównać je w przyszłych badaniach randomizowanych ze standardowym schematem R-CHOP (rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizolon).

W 1995 roku lekarze z Japonii postanowili zastosować u 49-letniej pacjentki z rzadkim nowotworem komórek Sertoliego-Leydiga nowy schemat terapii karboplatyny (CBDCA) w połączeniu z etopozydem i epirubicyną [63]. Po roku i czterech miesiącach po operacji u pacjentki nie zaobserwowano śladów powrotu choroby lub metastazy. Stosując podobny schemat (cyklofosfamid, epirubicyna, carboplatyna) przeprowadzono badania u 29 pacjentek z rakiem jajnika w Polsce [64]. U 58% pacjentek stwierdzono całkowitą remisję, a u 45% częściową remisję. Autorzy opracowali schemat postępowania w przypadku podejrzenia wystąpienia tego nowotworu, ze względu na bardzo wysoki odsetek pacjentek z chorobą zaawansowaną zgłaszających się na leczenie. Metoda zastosowana w przypadku mniejszego zaawansowania nowotworu dałaby lepsze wyniki. W poszukiwaniach skuteczniejszego leczenia grupa badaczy zwiększyła dawkę cyklofosfamid z  $500 \text{ mg/m}^2$  do  $1800 \text{ mg/m}^2$  (plus filgrastim  $5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ) w schemacie sześciocyklowym podawanym co trzy tygodnie: cyklofosfamid, epirubicyna i cisplatyna (CEP) [65]. Niestety, nie dało to efektu spodziewanego. Oprócz wzrostu toksyczności zintensyfikowanej terapii, skuteczność była podobna w obu przypadkach. Z nowszych rozwiązań, jakich podejmują się badacze w poszukiwaniu zwiększenia efektywności leczenia należy podkreślić użycie w terapii adenowirusów onkolitycznych Ad5/3-delta24. Z uwagi na uzupełniające się działanie chemioterapii i wirusoterapii, postanowiono połączyć obie w przypadku opornego na leczenie



gruczolakoraka jajnika [66]. W badaniu na myszach stwierdzono, że pojedyncza dawka wirusa była równie skuteczna, jak wielokrotna. Lepszy efekt leczniczy uzyskano w przypadku łączonej terapii wirusem i epirubicyną lub gemcytabiną, niż zastosowanie tych czynników osobno.

Do stosunkowo rzadkich, ale i trudno poddających się leczeniu nowotworów zaliczane są nowotwory trzustki, w przypadku których często stosuje się jedynie terapię paliatywną. Ocenę takiej terapii, złożonej z cisplatyny, epirubicyny i 5-fluorouracylu, u 28 pacjentów cierpiących na zaawansowane nowotwory zewnątrzwartrobowe dróg żółciowych i trzustki przeprowadzono w latach 1997-2004 w Krakowie [67]. Terapia okazała się być dobrze tolerowana i efektywna. Jednoroczny okres przeżycia osiągnęło 25% osób z nowotworem dróg żółciowych i 16,7% z nowotworem trzustki. Porównywalne wyniki osiągnięto przy monoterapii gemcytabiną. W celu wyznaczenia maksymalnych tolerowanych dawek u pacjentów z zaawansowanym rakiem trzustki zastosowano intensywny schemat PEFG (cisplatyna, epirubicyna, 5-fluorouracyl i gemcytabina). Taka intensywna terapia zmniejszyła stopień toksyczności hematologicznej w porównaniu z tradycyjnym kursem chemioterapii (neutropenia wystąpiła u 26% wobec 86% chorych, trombocytopenia u 4% wobec 58% chorych) i przez to zmniejszyła liczbę pacjentów, którzy byli zmuszeni do rezygnacji z leczenia [68]. W odpowiedzi na problem znacząco małego odsetka chorych po usunięciu trzustki przystępujących do chemioterapii, zaprojektowano badania, mające na celu ustalenie zarówno terapii przed resekcją, jak i po zabiegu [69]. Porównywano także, czy czterolekowy schemat cisplatyna, epirubicyna, fluorouracyl i gemcytabina da lepsze rezultaty lecznicze niż zastosowanie samej gemcytabiny [70]. Nowotwór trzustki należy do bardzo źle rokujących, stąd każda najmniejsza nawet korzyść terapeutyczna ma znaczenie. U pacjentów zaobserwowano więcej przypadków neutropenii i trombocytopenii, ale też lepsze okazały się wskaźniki przeżywalności rocznej 38,5% wobec 21,3%.

Opisano także zastosowanie epirubicyny w leczeniu zaawansowanego, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [71]. U 27 pacjentów zastosowano trzy cykle chemioterapii. Nie odnotowano działania kardiotoksycznego, a leukopenia występowała u 8 z 18 chorych, którzy przeszli cały kurs chemoterapii. Pozostałe działania niepożądane, jak wymioty, mdłości czy łysienie występowały w stopniu umiarkowanym. Stwierdzono efektywność indukcyjną terapii, co u niektórych pacjentów z późniejszą radioterapią lub/i zabiegiem chirurgicznym mogło ustabilizować chorego.

U chorych na nowotwór pęcherza leczeniem z wyboru jest przeciętna resekcja komórek guza, lecz u 40-80% choroba powraca. U tych chorych postanowiono wdrożyć

terapię zapobiegawczą. Pacjentów podzielono na trzy grupy. Pierwsza otrzymywała epirubicynę 20 mg/40 ml natychmiast i w ciągu 24 godzin po zabiegu, druga 50 mg/100 ml, a trzecia placebo (grupa kontrolna) [72]. Średni czas przeżycia bez nawrotu choroby wynosił w pierwszej grupie 24, w drugiej 38 i w trzeciej 13 miesięcy. Dwukrotne podanie epirubicyny w dawce 50 mg po zabiegu w ciągu 24 godzin okazało się leczeniem efektywnym, z akceptowalnym poziomem toksyczności. Podjęto także próbę oceny długotrwałych efektów różnych terapii stosowanych w niemięśniowym, inwazyjnym raku pęcherza. Wśród badań, uwzględniono także te, gdzie zastosowano epirubicynę (jako natychmiastowe lub jako długotrwałe leczenie). Autorzy przyznają, że często trudno było oszacować wpływ zastosowanego leczenia, ze względu na błędy w metodyce niektórych testów, choć generalnie nie obserwowano większej poprawy w wyniku wdrożenia leczenia epirubicyną i/lub mitomicyną po usunięciu guza [73]. Zaobserwowano większą redukcję postępów choroby w czasie, w stosunku do innych terapii, w przypadku leczenia immunologicznego BCG (szczepionką przeciwgruźliczą).

W literaturze opisano przypadek 28-letniej pacjentki z bardzo rzadkim nowotworem szyjki macicy o bardzo złym rokowaniu [74]. Pacjentka zgłosiła się w 23,5 tygodniu ciąży i określono u niej stan zaawansowania guza macicy na poziomie IIb. W 29 tygodniu, po zakończeniu ciąży przez cesarskie cięcie, u pacjentki zastosowano karboplatynę (CBDCA)/etopozyd i epirubicynę, co spowodowało obkurczenie guza i umożliwiło radykalną histerektomię. Po sześciu latach od wdrożenia leczenia pacjentka żyje i nie ma oznak choroby. Chemioterapię złożoną z cisplatyny ( $75 \text{ mg/m}^2$ ), paklitakselu ( $175 \text{ mg/m}^2$ ) oraz ifosfamidu ( $5 \text{ g/m}^2$ ) lub epirubicyny ( $80 \text{ mg/m}^2$ ) oceniano pod względem przydatności u pacjentek z zachowaną płodnością w stadium IB1 raka szyjki macicy, jako terapię neoadjuwantową. Terapia była przygotowaniem do zabiegu konizacji zimnym nożem i limfadenektomii w obrębie miednicy [75]. Po 69 miesiącach nie zaobserwowano nawrotu choroby, a 6 pacjentek urodziło w sumie 9 zdrowych dzieci. U jednej kobiety odnotowano poronienie w pierwszym trymestrze. Stąd wniosek, że przedstawiony powyżej schemat terapeutyczny pozwala na późniejszą oszczędną ingerencję chirurgiczną, pełne wyzdrowienie i w konsekwencji umożliwia pacjentkom urodzenie zdrowego dziecka.

W 1997 roku opisano przypadek bardzo rzadkiego nowotworu wątroby – włókniakomięsaka w przestrzeni pozaotrzewnowej u 34-letniej kobiety. Obecność guza stwierdzono metodami obrazowymi i potwierdzono histopatologicznie. Rak ten ma złe rokowanie, ze względu na częste pooperacyjne wznowy odrastania guza. Do leczenia wdrożono cykl chemoterapii złożony z cyklofosfamid, winkrystyny, epirubicyny

i dakarbazyny [76]. Wystąpiła bardzo dobra odpowiedź na zastosowane leczenie, bez ostrego działania toksycznego. Schemat kontynuowano przez pięć cykli, co znacznie zmniejszyło wielkość guza. Uznano ten wynik jako całkowitą odpowiedź na leczenie. Za standardowe leczenie wątrobowokomórkowego nowotworu uznaje się przetłuszczające podanie epirubicyny w formie emulsji W/O/W. Aby ocenić skuteczność tego postępowania leczniczego przeanalizowano retrospektywnie 18 przypadków [77]. Czas przeżycia od momentu zastosowania procedury w pierwszym roku wyniósł 94%, w drugim i trzecim 76%, a efektywna odpowiedź na leczenie (czyli całkowita plus częściowa) wyniosła 78%, zatem uznano metodę za skuteczną u pacjentów cierpiących na wątrobowokomórkową odmianę nowotworu po resekcji wątroby. Podobną jak powyżej metodę (TACE-epirubicyna) stosuje się w nieoperacyjnym raku wątroby (zabieg można przeprowadzić jedynie w 20% przypadków), jako terapię paliatywną. Jednak bardzo często nowotwór wykazuje dużą oporność na leczenie epirubicyną, doksorubicyną czy mitomicyną, co skutkuje niskimi wskaźnikami przeżywalności trzyletniej. W celu zwiększenia skuteczności metody postanowiono zastosować analogi platyny [78]. Do badania przystąpiło 152 pacjentów. Jedynie u 4% uzyskano pełną odpowiedź, u 18% częściową odpowiedź na leczenie, a 125 zmarło, co obrazuje bardzo złe rokowanie w przypadku tego nowotworu. W 50% udało się wydłużyć do 1,4 roku okres przeżycia u tych pacjentów, którzy zareagowali na terapię, stąd autorzy rekomendują powyższy schemat u tych chorych, którzy nie zareagowali na TACE-epirubicyna. Osobny problem stanowi określenie właściwej terapii w przypadku dzieci cierpiących na nowotwory wątroby, z uwagi na bardzo mało badań. Niewielką grupę 20 pacjentów w wieku poniżej 16 lat, cierpiących na hepatoblastoma lub nowotwór wątrobowokomórkowy objęto terapią złożoną z epirubicyny, cisplatyny i etopozydu. Część z nich przeszła 4 cykle chemioterapii (z większością usuniętej wątroby), a część 6 cykli [79]. Spośród 13 pacjentów chorujących na hepatoblastoma, u dwóch stwierdzono przerzuty do płuca, jeden z nich zmarł. U pozostałych przez różną ilość miesięcy nie stwierdzono żadnych śladów choroby. W przypadku 7 pacjentów chorych na nowotwór wątrobowokomórkowy, 4 osoby zmarły, 1 miała przeszczep wątroby, u 2 pozostałych nie stwierdzono śladów choroby. Autorzy postulują dalsze badania i wskazują na potencjalną skuteczność terapii, w szczególności zawierającej etopozyd u dzieci cierpiących na pierwotne nowotwory wątroby.

### 2.3.2. Działania niepożądane antracyklin

Antracykliny, podobnie jak inne leki przeciwnowotworowe, są substancjami bardzo toksycznymi dla komórek organizmu, a z drugiej strony po pewnym czasie pojawić się może oporność komórek nowotworowych na te związki. Te dwa ograniczenia stanowią nieustanne wyzwanie dla nowych badań, które pozwolą je przeczłonyć.

Głównym działaniem niepożądanym antracyklin jest supresja szpiku, zwykle o największym nasileniu w drugim tygodniu terapii. Poza tym może wystąpić zapalenie jamy ustnej, łysienie oraz zaburzenia żołądkowo-jelitowe. Obserwuje się także zmiany skórne, przy podaniu donaczyniowym, będące łagodną reakcją zapalną, ale także ciężkie miejscowe powikłania narządowe przy napromienianiu tkanek, nawet jeśli oba procesy nie przebiegały równocześnie. Najpoważniejszym efektem ubocznym po antybiotykach antracyklinowych jest kardiotoxycznosc. Istnieje ścisły związek pomiędzy skumulowaną podaną dawką i indukcją kardiomiopatii. Nie należy przekraczać skumulowanej dawki 500 mg/m<sup>2</sup> dla daunorubicyny i 450–600 mg/m<sup>2</sup> dla doksorubicyny. Stosowanie epirubicyny, pochodnej o wyższym indeksie terapeutycznym, nie chroni przed wystąpieniem uszkodzenia serca. Rozróżnia się dwa typy kardiomiopatii. Postać ostra, występująca nawet po 24 godzinach od podania dawki antybiotyku, ze zmianami odcinka ST i załamka T oraz zaburzeniami rytmu [80], co może prowadzić do ciężkiego zespołu pericarditis-myocarditis, objawiającego się zaburzeniami przewodzenia bodźców, niewydolnością serca i wysiękiem osierdziowym. Postać przewlekła, charakteryzująca się niewydolnością krążenia niereagującą na glikozydy, o śmiertelności sięgającej 50%, związana jest z przekroczeniem dawki skumulowanej i jest następstwem odległym, mogącym występować nawet po latach od zakończenia terapii. Na poziomie komórkowym obserwuje się rozszerzenie retikulum sarkoplazmatycznego, utratę miofibrilli, pęcznienie mitochondriów i wzrost liczby lizosomów. Technikami pozwalającymi wcześniej wykryć rozwój niewydolności krążenia są angiografia radionuklidowa, określająca frakcję wyrzutową oraz echokardiografia, uwidaczniająca nieprawidłowości w kurczliwości i rozmiarach komór. Proponuje się wiele mechanizmów odpowiedzialnych za kardiotoxyczne działanie antracyklin. Są to oddziaływania inne, niż te powodujące efekt przeciwnowotworowy. Wymienia się np. zwiększenie peroksydacji lipidów [81], enzymatyczną aktywację mitochondrialnych kinaz kreatynowych (MtCK) [82], wpływ na ekspresję genów, czy na poziom Ca<sup>2+</sup>-ATP-azy.

Obok działań niepożądanych, głównym problemem klinicznym, związanym ze stosowaniem antracyklin jest oporność komórek nowotworowych o charakterze pierwotnym

lub nabytym. Ważnym czynnikiem genetycznym w postawianiu oporności jest nadekspresja genu MDR1, stąd intensywnie poszukuje się nietoksycznych inhibitorów dla produktów genów tego rodzaju. W przełamaniu oporności zastosowanie znalazły synteza proleków oraz formułowanie postaci liposomalnych. Poprzez takie strategie realizuje się idee tzw. terapii celowanej, oszczędzającej komórki organizmu. Można tego dokonać dwoma sposobami. Jednym jest otoczenie cząsteczek antybiotyku specjalną warstwą izolującą po to, by dotarły do celu nie uszkadzając na swojej drodze komórek zdrowych. Druga polega na wyposażeniu cząsteczki antybiotyku w nośnik swoiście rozpoznawalny przez komórki nowotworu. Liposomalne postaci leku to przykład pierwszej strategii. Dzięki tej technologii znacznie poprawiają się parametry farmakokinetyczne leku, takie jak: zmniejszenie eliminacji, akumulacja w tkance nowotworowej, przy mniejszym gromadzeniu się leku w innych komórkach oraz wydłużony czas uwalniania leku. Spada wówczas toksyczność substancji, można dostarczyć większą dawkę do obszaru objętego nowotworem oraz polepsza się stabilność leku [83]. Nie do końca poznano w jaki sposób następuje uwalnianie antracyklin z liposomów w obszarze guza. Przypuszcza się, że rolę destabilizującą strukturę liposomalną mogą pełnić: niskie pH płynu śródmiąższowego okolic guza, bądź uwalnianie lipaz z rozpadających się komórek guza, czy też metabolizowanie ich przez fagocyty. W leczeniu stosuje się m. in następujące preparaty: Doxil lub Caelyx – doksorubicynę stabilizowaną sterycznie z płaszczem polietylenoglikolu, DaunoXome – liposomalną daunorubicynę oraz doksorubicynę, pozyskiwaną dzięki wykorzystaniu cytrynianu. Postacie lizosomalne posiadają korzystniejsze parametry farmakokinetyczne i są lepiej tolerowane przez pacjentów, charakteryzują się także mniejszymi działaniami niepożądanymi, w stosunku do związków wyjściowych, przy czym najlepiej sprawdził się Doxil. Skuteczność tego preparatu wykazano w przypadku pacjentów z glejakami i wtórnymi guzami mózgu [84], rakiem jajnika, nie reagującym na cisplatynę i paklitaksel [85] oraz w przypadku mięsaka Kaposiego w AIDS [86].

Obiecujące wydają się być również modyfikacje antracyklin w celu otrzymania proleków. Cząsteczki te wykazują działanie przeciwnowotworowe po proteolitycznej aktywacji w obszarze guza, na skutek działających tam enzymów. Przykładem może być związek L-377.202, będący kowalencyjnym połączeniem doksorubicyny i *N*-glutarylo[4-hydroksypropylo]-Ala-Ser-cykloheksaglicylo-Glu-Ser-Leu. W komórkach guza prostaty, po hydrolizie uwalnia się doksorubicyna lub jej połączenie z Leu, co kilkakrotnie podnosi skuteczność leku [87]. Podobnie lepszą aktywność wykazano w przypadku tetrapeptydu CIP-0004Na

(N-sukcynylo- $\beta$ -Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-Doksorubicyna), aktywowanego przez nowotworową peptydazę [88].

W celu uzyskania wybiórczego gromadzenia się doksorubicyny w komórkach wątroby, a co za tym idzie – osiągnięcie spadku toksyczności, zastosowano jeszcze inne podejście. Połączono ją z kopolimerem *N*-(2-hydroksypropylo)metakrylamidowym, zawierającym fragment rozpozwalny dla komórek wątroby [89]. Wybiórczość tkankową próbuje osiągnąć się metodami immunologicznymi, np. poprzez sprzężanie liposomowej doksorubicyny z przeciwciałami przeciwko ludzkiemu nabłonkowemu czynnikowi wzrostu 2 (HER2/neu). Uzyskano w ten sposób zmniejszenie toksyczności oraz większą aktywność przeciwnowotworową [90].

## 2.4. Dotychczasowy stan badań trwałości chlorowodoru epirubicyny [91]

Dotychczasowe badania trwałości chlorowodoru epirubicyny obejmowały:

- ocenę trwałości chlorowodoru epirubicyny w roztworach do wstrzyknięć
- izolację i identyfikację zanieczyszczeń/produktów rozkładu.

Ocenie trwałości poddano roztwory do wstrzyknięć chlorowodoru epirubicyny o pH 3,0

- w temp. 2–8°C po 0, 1, 2, 3, 6, 9 i 12 miesiącach przechowywania
- w temp. 25°C po 0, 1, 3 i 6 miesiącach przechowywania

Próbki analizowano metodą HPLC stosując następujące parametry rozdzielania:

*Kolumna:* C18 (Intersil-ODS 3 V (wielkość cząstek 5 µm) o wymiarach 250 mm × 4,6 mm

*Faza ruchoma*

- *faza A:* 0,1% kwas trifluoroctowy
- *faza B:* acetonitryl, metanol, kwasu trifluoroctowy (80:20:0,1 V/V)

*Szybkość przepływu:* 1,0 ml/min

*Temperatura:* 35°C

*Detekcja:* spektrofotometryczna (254 nm)

Analizowane próbki przed wprowadzeniem na kolumnę rozcieńczano wodą w stosunku 1:1 i doprowadzono kwasem fosforowym (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) do pH 2,5.

Stosując podane warunki wykryto 4 zanieczyszczenia.

*Izolacja zanieczyszczeń*

Do izolacji zanieczyszczeń zastosowano preparatywną chromatografię cieczową.

*Kolumna:* Intersil ODS-3 (6 µm.) o wymiarach 250 mm x 20 mm

*Faza ruchoma:* chromatografia gradientowa

- *faza A:* 0,1% kwas trifluoroctowy, mieszanina acetonitrylu, metanolu i kwasu trifluoroctowego (80:20:0,1 V/V/V) w stosunku 80:20
- *faza B:* acetonitryl, metanol, kwasu trifluoroctowy (80:20:0,1 V/V)

*Detekcja:* spektrofotometryczna (254 nm)

Zebrane frakcje odparowano w próżni, a następnie poddano liofilizacji.

## Identyfikacja zanieczyszczeń

Do identyfikacji zanieczyszczeń/produktów rozkładu zastosowano tandemową spektrometrię mas (LC-MS/MS) z jonizacją metodą elektrorozpraszania (*Electrospray, ESI*) oraz spektrometrię  $^1\text{H NMR}$ .

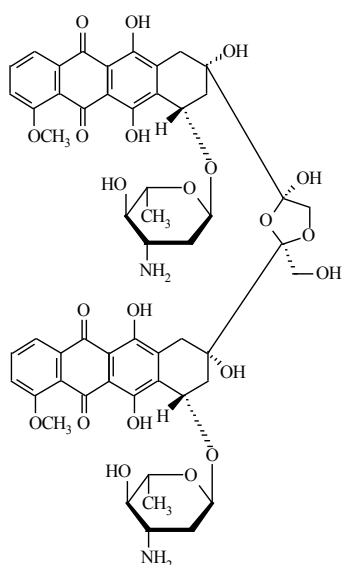
*Spektrometria mas.* Widma mas związków I – IV wykonano używając azotu jako gazu i potencjału 20 eV (związki I i II) lub 22 eV (związki III i IV). Próbki zostały rozpuszczone w mieszaninie wody i acetonitrylu (50:50).

*Spektrometria  $^1\text{H NMR}$ .* Widma zarejestrowano przy 300 MHz stosując następujące rozpuszczalniki DMSO- $d_6$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  i  $\text{CF}_3\text{COOD}$  i tetrametylosilan jako wzorzec ( $\delta=0,00$ ).

## Zidentyfikowane związki

Związek I jest dimerem epirubicyny opisanym w Ph. Eur./FP, pozostałe produkty nie były dotychczas opisane w piśmiennictwie.

### Związek I: dimer epirubicyny



Jon molekularny  $[\text{M}+\text{H}]^+$  przy  $m/z$  1087 wskazywał na wyższą masę cząsteczkową od epirubicyny (543 Da). Fragmentacja tego jonu przebiegała począwszy od utraty dwóch cząsteczek cukru, następnie cząsteczki wody i wreszcie jednej cząsteczki epirubicyny. Jon molekularny i jego jony potomne wskazywały na dimer epirubicyny, co potwierdziło widmo NMR, różniące się od macierzystej epirubicyny sygnałem protonu grupy metylenowej

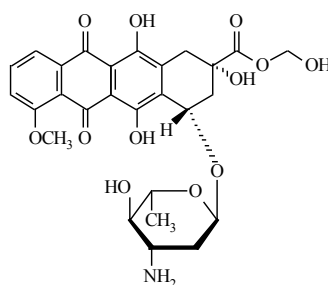


podstawnika przy C14. Sygnał protonu w tej pozycji dla związku I był obserwowany przy 3,60 ppm, natomiast w przypadku epirubicyny przy 4,56 ppm.

#### Związek II

Jon molekularny  $[M+H]^+$  związku II wystąpił przy m/z 1105. Jego fragmentacja sugerowała strukturę złożoną z dwóch cząsteczek epirubicyny. Nie przeprowadzono analizy tego związku metodą NMR, ze względu na problem ze stabilnością i odpowiednią ilością próbki.

*Związek III: alfahydroksymetyloester epirubicyny (ester hydroksymetylowy kwasu 4-(4-amino-5-hydroksy-6-metylotetrahydropiran-2-yloksy)-2,5,12-trihydroksy-7-metoksy-6,11-dioksy-1,2,3,4,6,11-heksahydronaftaceno-2-karboksylowego)*



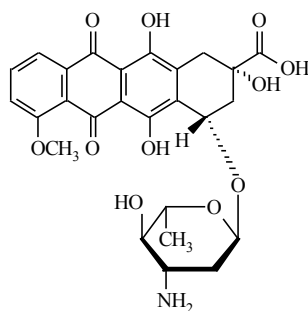
Jon molekularny zanieczyszczenia III  $[M+H]^+$  wystąpił w widmie przy m/z 560. Jego jony potomne powstały poprzez odłączenie cząsteczki wody, jednej cząsteczki cukru i następnie jednej cząsteczki cukru z łańcuchem bocznym.

Związek III, w roztworze wodnym o odczynie kwasowym, ogrzewany 30 min w temp. 80°C rozkłada się do związku IV.

W widmie mas tej próbki zarejestrowano dwa jony molekularne  $[M+H]^+$ , odpowiednio przy m/z 560 (związek III) i 530 (związek IV).

Analiza metodą NMR, nie wykazała różnic w położeniach sygnałów protonów pierścieni A, B, C i D oraz reszty cukrowej w widmach epirubicyny i związku III. Jedynie sygnał protonów grupy metylenowej łańcucha przy C14 dla związku III wystąpił przy 6,32 ppm natomiast w przypadku epirubicyny przy 4,56 ppm. Wszystkie badania potwierdziły strukturę tego zanieczyszczenia jako alfahydroksymetyloester epirubicyny, która wcześniej nie była opisana w piśmiennictwie.

*Związek IV: kwas 4-(4-amino-5-hydroksy-6-metylotetrahydropiran-2-yloksy)-2,5,12-trihydroksy-7-metoksy-6,11-dioksy-1,2,3,4,6,11-heksahydronaftaceno-2-karboksylowy*



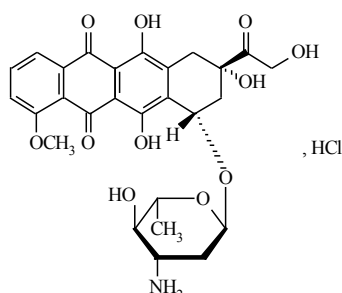
Jon molekularny  $[M+H]^+$  związku IV wystąpił w widmie przy  $m/z$  530, natomiast adduktu sodowego  $[M+Na]^+$  przy  $m/z$  552. Fragmentacja polegała na odszczepieniu w pierwszej kolejności cząsteczki cukru, następnie cząsteczki wody i w ostatnim etapie cząsteczki  $CO_2$ .

Widmo NMR związku IV, różni się od widma epirubicyny brakiem sygnału protonów grupy metylenowej podstawnika przy C14. W przypadku epirubicyny sygnał protonów grupy metylenowej występuje przy 4,56 ppm.

Autorzy cytowanej pracy określili, że prawdopodobny mechanizm rozkładu epirubicyny w środowisku kwasowym może przebiegać według następującego schematu:

- kondensacja 2 cząsteczek epirubicyny z utworzeniem dimeru (związek I)
- przegrupowanie oksydacyjne w podstawniku przy C14 z utworzeniem związku III
- hydroliza ugrupowania estrowego związku III i utworzenie związku IV
- utlenienie podstawnika w pozycji C14 prowadząca do związku IV.

## 2.5. Metody analityczne stosowane w ocenie jakości chlorowodoru epirubicyny wg FP X/Ph. Eur. 8 [93]



Do potwierdzenia tożsamości chlorowodoru epirubicyny polecane są następujące badania:

- porównanie widm w podczerwieni substancji badanej i porównawczej
- porównanie czasów retencji substancji badanej i porównawczej metodą chromatografii cieczowej
- reakcja z azotanem srebra w środowisku kwasowym ( $HNO_3$ ) – reakcja jonu chlorkowego.

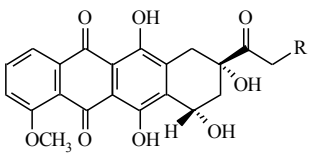
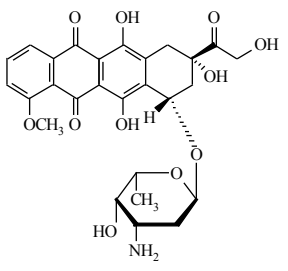
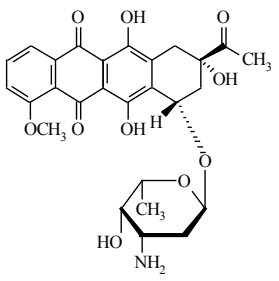
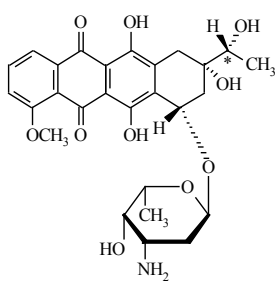
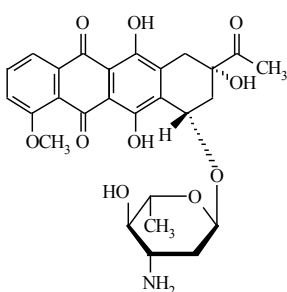
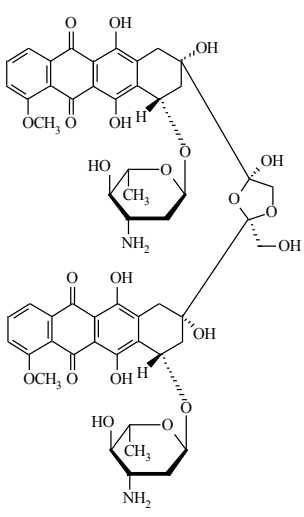
Badanie substancji pokrewnych (Tabela 2) i oznaczanie zawartości wykonuje się metodą chromatografii cieczowej.

Parametry metody HPLC, używanej do potwierdzenia tożsamości, badania substancji pokrewnych i oznaczania zawartości są następujące:

- *kolumna*: długość 0,25 m, średnica wewnętrzna 4,6 mm
- *faza nieruchoma*: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami trimetylosililowymi (6  $\mu\text{m}$ )
- *temperatura*: 35°C
- *faza ruchoma*: zmieszać 17 objętości metanolu, 29 objętości acetonitrylu i 54 objętości roztworu zawierającego laurylosiarczan sodu (3,7 g/l) i 2,8% (V/V) rozcieńczonego kwasu fosforowego
- *szybkość przepływu*: 2,5 ml/min
- *detekcja*: spektrofotometryczna przy 254 nm
- *wprowadzenie*: 10  $\mu\text{l}$  roztworu badanego i roztworów porównawczych
- *czas analizy*: 3,5-krotność czasu retencji epirubicyny ( czas retencji = ok. 9,5 min).

Tabela 2.

Analizowane substancje pokrewne

|  |  |
|--|--|
|  <p>A. R = OH; doxorubicynon<br/>B. R = H; daunorubicynon</p> |  <p>C. Doxorubicyna</p>                            |
|  <p>D. Daunorubicyna</p>                                      |  <p>E. Dihydrodaunorubicyna (i epimer przy C*)</p> |
|  <p>F. <i>epi</i>-Daunorubicyna</p>                         |  <p>G. Dimer epirubicyny</p>                     |

## 2.6. Porównanie wybranych metod HPLC epirubicyny i innych antracyklin

Tabela 3.

Porównanie wybranych metod HPLC epirubicyny oraz innych antybiotyków antracyklinowych.

| Warunki analizy HPLC   | Zastosowanie   | Piśmiennictwo |
|--|--|---------------|
| <p><i>Kolumna:</i> 250×4,6 mm, żel krzemionkowy trimetylosililowy (6 µm)</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> mieszanina metanolu, acetonitrylu i roztworu zawierającego 3,7 g/l laurylosiarczanu sodu i 2,8% V/V rozcieńczonego kwasu fosforowego(V) (17:29:54)</p> <p><i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 2,5 ml/min</p> <p><i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 254 nm</p> | <p>Badanie tożsamości, oznaczenie chlorowodoru epirubicyny oraz badanie substancji pokrewnych (czystość)</p>   | [92]          |
| <p><i>Kolumna:</i> 300×3,9 mm, Lichrosorb RP8 (10 µm)</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> mieszanina acetonitrylu i wody (50:50 V/V) doprowadzona do kwasem chlorowym (VII) do pH 2</p> <p><i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,5 ml/min lub 2,0 ml/min</p> <p><i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 254 i 546 nm (dla daunorubicyny przy 254 i 436 nm)</p>                  | <p>Badanie trwałości 6 antracyklin w czterech płynach infuzyjnych w temp. 25°C</p>   | [94]          |
| <p><i>Kolumna:</i> 100×4,6 mm, C18 Hypersil ODS (5 µm)</p> <p><i>Przedkolumna:</i> 20×4,6 mm, C18 Hypersil ODS (5 µm)</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> mieszanina acetonitrylu i buforu mrówczanowego doprowadzonego do pH 4 (45:55 V/V)</p> <p><i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 2,0 ml/min</p> <p><i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 254 i 565 nm</p>               | <p>Badanie trwałości doksorubicyny, epirubicyny, daunorubicyny i pirarubicyny w workach PVC do podania pozajelitowego w czasie 24 h</p>  | [95]          |
| <p><i>Kolumna:</i> 300×4 mm, Varian C18 RP MCH-10 Micropak</p> <p><i>Faza ruchoma:</i></p> <p>A: mieszanina buforu fosforanowego (10 mmol/l) i 3% (V/V) acetonitrylu oraz bufor</p> <p>B: 100% acetonitryl, elucja gradientowa</p> <p><i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 2,0 ml/min</p> <p><i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 235 nm</p>                          | <p>Badanie trwałości daunorubicyny, cytarabiny i etopozyny w roztworach 5% dekstrozy oraz 0,45% NaCl zarówno w mieszaninie, jak i oddzielnie w czasie 72 h</p>   | [96]          |
| <p><i>Kolumna:</i> 125×4 mm, Lichrosorb RP8 (5 µm)</p> <p><i>Faza ruchoma:</i> mieszanina 0,01 mol/l NaCl (pH 2,25) oraz acetonitrylu (70:30 V/V lub 60:40 V/V)</p> <p><i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,0 ml/min</p> <p><i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 480 nm oraz spektrofotometr fluorescencyjny przy 465 nm (wzbudzenie) i 550 nm (emisja)</p>         | <p>Badanie wpływu cyklodekstryny na trwałość chemiczną w roztworach wodnych daunorubicyny i doksorubicyny w zależności od struktury i stężenia cyklodekstryny, pH i obecności innych związków zwiększających rozpuszczalność</p> | [97]          |

|   |  |       |
|---|--|-------|
| <p><i>Kolumna:</i> 125×4 mm, ChromCart® Nucleosil 100 C18 AB (5 µm)<br/> <i>Przedkolumna:</i> 8×3 mm, Nucleosil 100 z grupami fenylowymi (5 µm)<br/> <i>Faza ruchoma:</i> mieszanina acetonitrylu i kwasu 1-heptanosulfonowego 0,2% o pH 4, elucja gradientowa<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1 ml/min<br/> <i>Detektor:</i> spektrofotometr fluorescencyjny przy 482 nm (wzbudzenie) i 550 nm (emisja)</p>          | <p>Walidacja metody oznaczania doksorubicyny w czterech różnych matrycach biologicznych (płyn poinfuzyjny, surowica, tkanki z niskim lub wysokim poziomem doksorubicyny) przy perfuzji płuca izolowanego</p>               | [98]  |
| <p><i>Kolumna:</i> 250×4,6 mm, C18 Intersil-ODS 3 V (5 µm)<br/> <i>Faza ruchoma A :</i> 0,1% kwas trifluoroctowy<br/> <i>Faza ruchoma B:</i> acetonitryl, metanol, kwas trifluoroctowy 80:20:0,1 V/V) , elucja gradientowa<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,0 ml/min<br/> <i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 254 nm</p>   | <p>Identyfikacja zanieczyszczeń degradacji epirubicyny w roztworze wodnym; do identyfikacji zanieczyszczeń zastosowano metody LC-MS i NMR</p>  | [91]  |
| <p><i>Kolumna:</i> 250×4,6 mm, Hypersil (5 µm)<br/> <i>Faza ruchoma:</i> mieszanina 14% (V/V) acetonitrylu, 30% (V/V) metanolu i 56% kwasu fosforowego (0,085% m/V), zawierającego laurylosiarczan sodu (0,2% m/V)<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,2 ml/min<br/> <i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 256 nm</p>   | <p>Badanie trwałości epirubicyny w roztworach do wstrzyknięć dożylnych, w różnych temperaturach, imitujących warunki przechowywania (84 dni w temp. 8°C), transportu (2 h w temp. 25°C) oraz w żyłę (1 h w temp. 37°C)</p> | [99]  |
| <p><i>Kolumna:</i> 250×4,6 mm, C18 z przedkolumną<br/> <i>Faza ruchoma:</i> acetonitryl-woda (60:40 V/V)<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,0 ml/min<br/> <i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 232 nm</p>   | <p>Badanie wzajemnego wpływu na farmakokinetykę epirubicyny i docetakselu u pacjentów z rakiem piersi z przerzutami</p>  | [100] |
| <p><i>Kolumna:</i> 250×4,6 mm, Zorbax Eclipse XDB-C8 (5 µm)<br/> <i>Faza ruchoma:</i> mieszanina roztworu A (0,4% laurylosiarczanu sodu o pH 2,0) i roztworu B (metanol:acetonitryl 1:1 V/V) (40:60 V/V)<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 2 ml/min<br/> <i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 254 nm</p>   | <p>Walidacja metody równoczesnego oznaczania 7 antracyklin (epirubicyny, doksorubicyny, idarubicyny, doksorubicynonu, daunorubicynonu, daunorubicyny, epi-daunorubicyny)</p>   | [101] |
| <p><i>Kolumna:</i> 250×4,6 mm, Technocroma SA Spherisorb fenyl (5 µm)<br/> <i>Faza ruchoma:</i> mieszanina 1 mmol/l kwasu fosforowego i 2,4 mmol/l NaOH, zawierająca 45% mieszaniny acetonitrylu z metanolem i laurylosiarczan sodu (1 mol/l), doprowadzona do pH 4,6<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,8 ml/min<br/> <i>Detektor:</i> spektrofotometr przy 254 nm</p>  | <p>Badanie trwałości roztworu do wstrzyknięć epirubicyny (2 mg/ml) w 0,9% roztworze NaCl po inkubacji w 70°C</p>   | [102] |
| <p><i>Kolumna:</i> 250×4,6 mm, Spherisorb ODS1 (5 µm) z przedkolumną C18<br/> <i>Faza ruchoma:</i> mieszanina acetonitrylu i buforu (35:65 V/V) (bufor: 60 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zawierający 0,05% trietanolaminy, doprowadzony kwasem cytrynowym do pH 4,2)<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,0 ml/min<br/> <i>Detektor:</i> spektrofotometr fluorescencyjny przy 480 (wzbudzenie) i 560 (emisja)</p> | <p>Oznaczenie stężenia epirubicyny i jej metabolitów we krwi w czasie 96 godzinowego podania podczas chemioterapii</p>   | [103] |

|  |   |              |
|--|---|--------------|
| <p><i>Kolumna:</i> 200×4,6 mm, LiChrosorb RP18 (10 μm)<br/> <i>Faza ruchoma:</i> mieszanina acetonitrylu i wody 29:71 zawierająca 50 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0,05% (V/V) trietanolaminy doprowadzona kwasem cytrynowym do pH 4,6<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,0 ml/min.<br/> <i>Detektor:</i> elektrochemiczny</p>   | <p>Oznaczenie epirubicyny i doksorubicyny oraz ich głównych metabolitów we krwi</p> | <p>[104]</p> |
| <p><i>Kolumna:</i> 100×5 mm, Apex II ODS (5 μm)<br/> <i>Przedkolumna:</i> długość – 50 mm, LiChrosorb RP18 (10 μm)<br/> <i>Faza ruchoma:</i> mieszanina acetonitrylu i buforu 1:2,25 (bufor: 19 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> doprowadzony 100 mmol/l kwasem fosforowym do pH 4,0)<br/> <i>Szybkość przepływu fazy ruchomej:</i> 1,0 ml/min<br/> <i>Detektor:</i> spektrofotometr fluoresencyjny przy 480 nm (wzbudzenie) i 580 nm (emisja)</p> | <p>Oznaczenie epidoksorubicyny i jej metabolitów we krwi</p>                        | <p>[105]</p> |



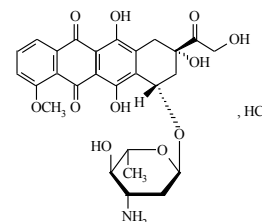


### 3. CEL PRACY

---

Badania trwałości substancji leczniczych są jednym z podstawowych elementów kompleksowej oceny ich jakości i są uregulowane odpowiednimi przepisami. Uzyskane wyniki służą do sformułowania informacji o trwałości, mającej zapewnić jakość, skuteczność i bezpieczeństwo leku.

Celem mojej pracy była ocena trwałości chlorowodoru epirubicyny (EPI) w roztworach wodnych, w zakresie pH 0,42 – 9,95 oraz fototrwałości. Dodatkowo postanowiono określić kinetyczny mechanizm rozkładu EPI w fazie stałej oraz wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza na szybkość rozkładu.



W badaniach kinetycznych leków, ze względu na konieczność prowadzenia dużej liczby oznaczeń niezbędnych do interpretacji właściwej i ogólnej katalizy w roztworach wodnych, obok selektywności metody analitycznej, istotne są także: krótki czas analizy, jej koszt, oraz stosowanie nietoksycznych odczynników chemicznych.

Do oceny zmian stężenia badanego związku w roztworach wodnych i w fazie stałej postanowiono zastosować wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz, z detekcją UV, natomiast do oceny podatności na rozkład pod wpływem światła metodą UV-VIS.

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)
- wykazanie możliwości zastosowania metody UV-VIS do oceny procesu fotodegradacji EPI
- przeprowadzenie walidacji metod
- wykonanie badań kinetycznych, obejmujących ogólną i właściwą katalizę kwasowo-zasadową
  - wpływ stężenia jonów wodorowych

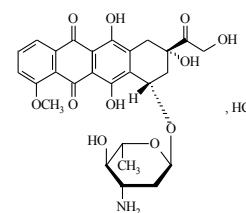
- wpływ rodzaju i stężenia składników buforów
- wpływ siły jonowej
- wpływ temperatury
- zinterpretowanie:
  - ogólnej i właściwej katalizy kwasowo-zasadowej i wyznaczenie katalitycznych stałych szybkości reakcji cząstkowych
  - wpływu temperatury na szybkość rozkładu
  - wpływu siły jonowej na szybkość rozkładu
- określenie fotostabilności EPI w roztworach wodnych
- określenie trwałości EPI w fazie stałej.

## 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

---

### 4.1. Substancja badana

Chlorowodorek epirubicyny, otrzymany w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Substancja krystaliczna, o charakterystycznym, pomarańczowo-czerwonym zabarwieniu.



Substancja rozpuszcza się w wodzie i w metanolu, trudno rozpuszcza się w bezwodnym etanolu, praktycznie nie rozpuszcza się w acetonie. pH wodnego roztworu (5 mg/ml) wynosi od 4,0 do 5,5.

### 4.2. Odczynniki

- Acetonitryl, chromatograficznie czysty; POCH Gliwice
- Chlorowodorek papaweryny; Sigma Aldrich
- 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
- Metylu hydroksybenzoesan (nipagina M), 99%; Sigma Aldrich
- 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

### 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 µl Microliter Hamilton Co, Reno Nevada USA
- Mieszadło REAX top 451
- 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 chlorowodorku epirubicyny (EPI)

Do badania trwałości EPI 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. Parametry rozdzielania chromatograficznego były następujące:

- *kolumna*: Lichrospher RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ) o wymiarach 250  $\times$  4 mm, Merck Darmstadt, Niemcy; *faza nieruchoma*: żel krzemionkowy z grupami oktadecylsililowymi
- *faza ruchoma*: mieszanin równych objętości acetonitrylu i roztworu zawierającego 2,88 g/l laurylosiarczanu sodu i 2,25 ml/l kwasu fosforowego(V) 85% (V/V)
- *szybkość przepływu*: 1 ml/min
- *detekcja*: UV przy  $\lambda = 254 \text{ nm}$
- *wprowadzenie*: 50  $\mu\text{l}$
- *wzorzec wewnętrzny*:
  - roztwór chlorowodorku papaweryny o stężeniu 0,050 mg/ml (badania trwałości w roztworach)
  - roztwór nipaginy M w mieszaninie acetonitrylu i wody (1:1) o stężeniu 0,025 mg/ml (badania trwałości w fazie stałej)

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

Przeprowadzono walidację metod w celu potwierdzenia ich przydatności w oznaczaniu trwałości EPI. Walidacji podlegały następujące parametry:

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

#### 4.4.1. Metoda HPLC i jej walidacja

Do walidacji metody HPLC użyto:

- substancji badanej – próbki nierozłożonej oraz próbki poddanej rozkładowi w:
  - 0,05 mol/l kwasie solnym w temperaturze 363 K
  - w roztworze buforu boranowego o pH 9,79 w temperaturze 333 K
  - w fazie stałej w temperaturze 333 K, przy RH~76,4% i w temperaturze 393 K przy RH = 0%
- chlorowodoru papaweryny lub nipaginy M – wzorzec wewnętrzny.

#### *Selektywność metody*

W przedziale czasu 0 – 15 min na chromatogramach zarejestrowano podane poniżej piki.

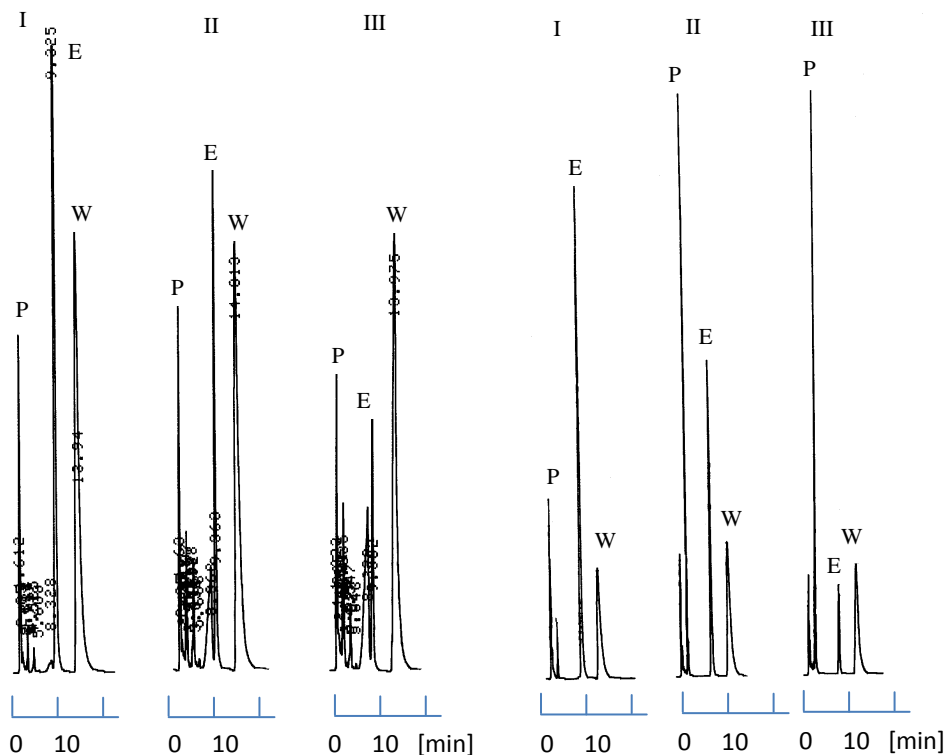
W roztworach wodnych

- substancji badanej (E),  $t_R \sim 9$  min
- wzorca wewnętrznego (W),  $t_R \sim 14$  min
- produktów rozkładu EPI (P) (Rycina 1, 2).

W fazie stałej

- substancji badanej (E),  $t_R \sim 8$  min
- wzorca wewnętrznego ( $W_w$ ),  $t_R \sim 3,5$  min
- produktów rozkładu EPI (A) (Rycina 3, 4).

Metoda jest selektywna dla EPI w obecności produktów rozkładu oraz wzorca wewnętrznego, zarówno w badaniach w roztworach wodnych, jak i w fazie stałej.

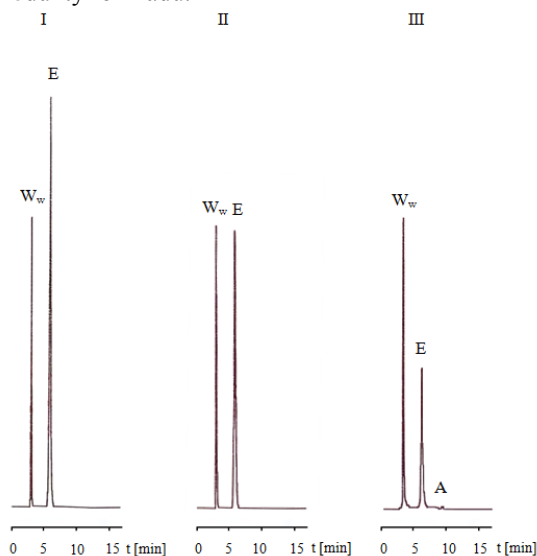


Rycina 1.

Chromatogramy HPLC EPI w 0,5 mol/l HCl ( $\mu = 0,50$  mol/l), w temperaturze 363 K, po  $t = 0$  min (I),  $t = 10$  min (II),  $t = 30$  min (III); E - epirubicyna, W = chlorowoderek papaweryny (wzorec wewnętrzny), P – produkty rozkładu.

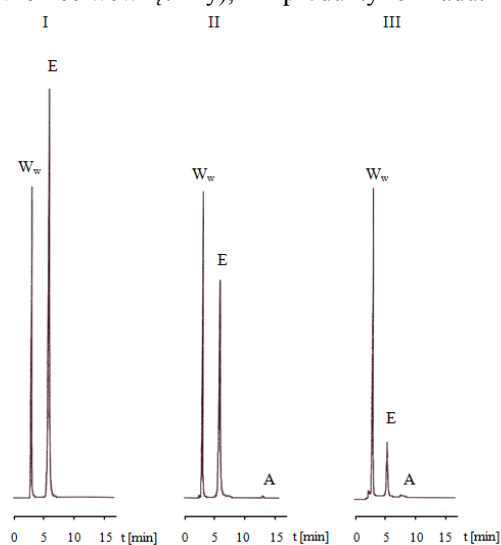
Rycina 2.

Chromatogramy HPLC EPI roztworze buforu boranowego o pH 9,79 ( $\mu = 0,50$  mol/l) w temperaturze 333 K, po  $t = 0$  min (I),  $t = 10$  min (II),  $t = 20$  min (III); E - epirubicyna, W = chlorowoderek papaweryny (wzorec wewnętrzny), P – produkty rozkładu.



Rycina 3.

Chromatogramy HPLC EPI poddanej przyspieszonemu starzeniu w temperaturze 333 K, przy RH  $\sim 76,4\%$ : po czasie  $t = 0$  h (I); po czasie  $t = 169,5$  h (II); po czasie  $t = 339$  h (III); E - epirubicyna,  $W_w$  = nipagina M (wzorec wewnętrzny), A – produkty rozkładu.



Rycina 4.

Chromatogramy HPLC EPI poddanej przyspieszonemu starzeniu w temperaturze 393 K, przy RH 0%: po czasie  $t = 0$  h (I); po czasie  $t = 11$  h (II); po czasie  $t = 170,5$  h (III); E - epirubicyna,  $W_w$  = nipagina M (wzorec wewnętrzny), A – produkty rozkładu.

## Liniowość metody

Liniowość metody określono dla zakresu stężeń EPI

- od 0,02 mg/ml do 0,20 mg/ml (roztwory wodne)
- od 0,0075 mg/ml do 0,1500 mg/ml (faza stała)

### Roztwór substancji badanej

7,5 mg substancji badanej rozpuszczono w fazie ruchomej i uzupełniono fazą ruchomą do 25,0 ml. Roztwór podstawowy rozcieńczono, uzyskując po dodaniu do 1,0 ml roztworu badanego 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, roztwory o odpowiednim stężeniu.

Tabela 4.

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

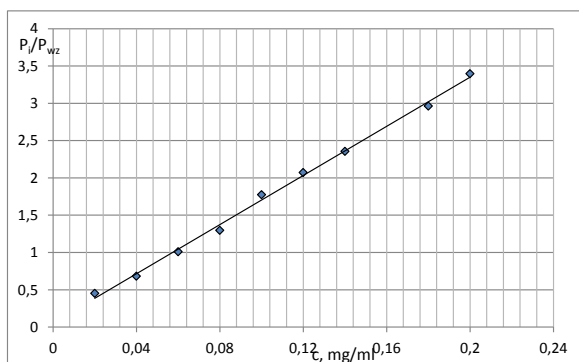
| L.p. | c [mg/ml] | $P_i/P_{wz}$ | Ocena statystyczna prostych  |   |
|------|-----------|--------------|--|---|
|      |           |              | $y = ax + b$   | $y = ax$  |
| 1    | 0,02      | 0,4502       | $a = 16,5 \pm 0,8$<br>$b = (5,63 \pm 9,37) 10^{-2}$<br>$S_a = 0,340$<br>$S_b = 0,0407$<br>$S_y = 0,0592$<br>$t_b = 1,38$<br>$r = 0,9985$ | $a = 16,9 \pm 0,7$<br>$S_a = 0,318$<br>$S_y = 0,0553$<br>$r = 0,9985$ |
| 2    | 0,04      | 0,6807       |  |   |
| 3    | 0,06      | 1,0090       |  |   |
| 4    | 0,08      | 1,2956       |  |   |
| 5    | 0,10      | 1,7726       |  |   |
| 6    | 0,12      | 2,0697       |  |   |
| 7    | 0,14      | 2,3536       |  |   |
| 8    | 0,18      | 2,9614       |  |   |
| 9    | 0,20      | 3,3948       |  |   |

Tabela 5.

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

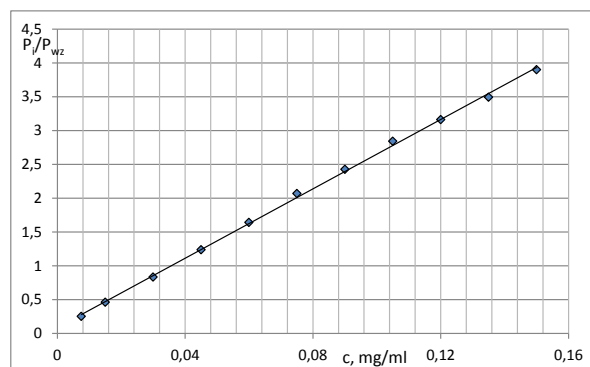
| L.p. | c [mg/ml] | $P_i/P_{wz}$ | $y = ax + b$   |
|------|-----------|--------------|--|
| 1    | 0,0075    | 0,2511       | $a = 25,6 \pm 0,6$<br>$b = (8,82 \pm 5,13) 10^{-2}$<br>$S_a = 0,256$<br>$S_b = 0,0227$<br>$S_y = 0,0393$<br>$t_b = 3,89$<br>$r = 1,0000$ |
| 2    | 0,0150    | 0,4612       |  |
| 3    | 0,0300    | 0,8324       |  |
| 4    | 0,0450    | 1,2366       |  |
| 5    | 0,0600    | 1,6416       |  |
| 6    | 0,0750    | 2,0667       |  |
| 7    | 0,0900    | 2,4264       |  |
| 8    | 0,1050    | 2,8402       |  |
| 9    | 0,1200    | 3,1613       |  |
| 10   | 0,1350    | 3,4931       |  |
| 11   | 0,1500    | 3,8994       |  |





Rycina 5.

Zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  dla EPI w zakresie stężeń od 0,02 do 0,20 mg/ml.



Rycina 6.

Zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  dla EPI w zakresie stężeń od 0,0075 do 0,1500 mg/ml.

Wykresy zależności  $P_i/P_{wz} = f(c)$  są prostoliniowe (Rycina 5, 6). Na podstawie obliczonych parametrów prostych (Tabela 4, 5) stwierdzono, że:

- w roztworach wodnych wyznaczona z powyższej zależności wartość  $t_b = b/S_b = 1,384$  jest mniejsza od wartości krytycznej  $t_{0,5(7)} = 2,365$ , stąd wartość współczynnika  $b$  jest nieistotna ( $b = 5,63 \pm 9,37 \cdot 10^{-2}$ ), zatem zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  opisuje równanie  $y = ax$ .
- w fazie stałej wyznaczona z powyższej zależności wartość  $t_b = b/S_b = 3,89$  jest większa od wartości krytycznej  $t_{0,5(9)} = 2,365$ , a zatem wartość współczynnika  $b$  jest istotna ( $b = 8,82 \pm 5,13 \cdot 10^{-2}$ ) i zależność  $P_i/P_{wz} = f(c)$  opisuje równanie  $y = ax + b$ .

### Precyzja metody

W celu określenia precyzji metody, przygotowano po 8 (roztwory wodne) lub 6 (faza stała) roztworów EPI o stężeniach podanych w tabelach 6 i 7. Roztwory zawierały dodatek wzorca wewnętrznego.

Tabela 6.

Wyniki oznaczania EPI w roztworach o stężeniu 0,06, 0,10 i 0,14 mg/ml

| L.p. | c = 0,06 mg/ml                  |  | c = 0,10 mg/ml                  |  | c = 0,14 mg/ml                  |  |
|------|---------------------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|--|
|      | P <sub>i</sub> /P <sub>wz</sub> | Parametry statystyczne   | P <sub>i</sub> /P <sub>wz</sub> | Parametry statystyczne   | P <sub>i</sub> /P <sub>wz</sub> | Parametry statystyczne   |
| 1    | 1,009                           | $x_{\text{sr}} = 1,021$<br>$s^2 = 2,149 \cdot 10^{-4}$<br>$s = 1,466 \cdot 10^{-2}$<br>$S_y = 5,184 \cdot 10^{-3}$<br>$W_z = 1,44\%$ | 1,773                           | $x_{\text{sr}} = 1,765$<br>$s^2 = 1,054 \cdot 10^{-3}$<br>$s = 3,246 \cdot 10^{-2}$<br>$S_y = 1,147 \cdot 10^{-2}$<br>$W_z = 1,84\%$ | 2,354                           | $x_{\text{sr}} = 2,366$<br>$s^2 = 1,495 \cdot 10^{-3}$<br>$s = 3,866 \cdot 10^{-2}$<br>$S_y = 1,367 \cdot 10^{-2}$<br>$W_z = 1,63\%$ |
| 2    | 1,037                           |  | 1,785                           |  | 2,372                           |  |
| 3    | 1,028                           |  | 1,692                           |  | 2,314                           |  |
| 4    | 1,029                           |  | 1,768                           |  | 2,384                           |  |
|      | 1,008                           |  | 1,759                           |  | 2,418                           |  |
|      | 1,008                           |  | 1,797                           |  | 2,339                           |  |
| 5    | 1,042                           | 1,758  | 2,416                           |  |                                 |  |
| 6    | 1,008                           | 1,787  | 2,329                           |  |                                 |  |

$x_{\text{sr}}$  – wartość średnia;  $s^2$  – wariancja;  $s$  – odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_y$  – względne odchylenie standardowe;  $W_z$  – współczynnik zmienności

Tabela 7.

Wyniki oznaczania EPI w roztworach o stężeniu 0,05, 0,10 i 0,15 mg/ml

| L.p. | c = 0,05 mg/ml                  |  | c = 0,10 mg/ml                  |  | c = 0,15 mg/ml                  |  |
|------|---------------------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|--|
|      | P <sub>i</sub> /P <sub>wz</sub> | Parametry statystyczne   | P <sub>i</sub> /P <sub>wz</sub> | Parametry statystyczne   | P <sub>i</sub> /P <sub>wz</sub> | Parametry statystyczne   |
| 1    | 1,3518                          | $x_{\text{sr}} = 1,3620$<br>$s^2 = 8,18 \cdot 10^{-5}$<br>$s = 9,05 \cdot 10^{-3}$<br>$S_y = 3,69 \cdot 10^{-3}$<br>$W_z = 0,66\%$ | 2,9197                          | $x_{\text{sr}} = 2,9066$<br>$s^2 = 3,71 \cdot 10^{-4}$<br>$s = 1,93 \cdot 10^{-2}$<br>$S_y = 7,86 \cdot 10^{-3}$<br>$W_z = 0,66\%$ | 3,8367                          | $x_{\text{sr}} = 3,8602$<br>$s^2 = 9,20 \cdot 10^{-4}$<br>$s = 3,03 \cdot 10^{-2}$<br>$S_y = 1,24 \cdot 10^{-2}$<br>$W_z = 0,79\%$ |
| 2    | 1,3556                          |  | 2,8745                          |  | 3,8242                          |  |
| 3    | 1,3741                          |  | 2,8996                          |  | 3,8403                          |  |
| 4    | 1,3549                          |  | 2,9005                          |  | 3,8999                          |  |
| 5    | 1,3676                          |  | 2,9181                          |  | 3,8782                          |  |
| 6    | 1,3680                          |  | 2,9274                          |  | 3,8816                          |  |

$x_{\text{sr}}$  – 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 2%.

### Granica wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności obliczono ze wzoru  $DL = 3,3 S_y/a$ , natomiast natomiast granicę oznaczalności ze wzoru  $QL = 10 S_y/a$  i wynosi ona

- metoda dla roztworów wodnych  $DL = 0,01005$  mg/ml EPI,  $QL = 0,0305$  mg/ml EPI
- metoda dla fazy stałej  $DL = 0,00506$  mg/ml EPI,  $QL = 0,0153$  mg/ml.

#### 4.4.2. Metoda UV-VIS i jej walidacja

Do oceny fototrwałości EPI w roztworach wodnych wykorzystano metodę UV–VIS.

##### *Liniowość*

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

Wykonano wykres  $A_i = f(c)$ , gdzie:

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

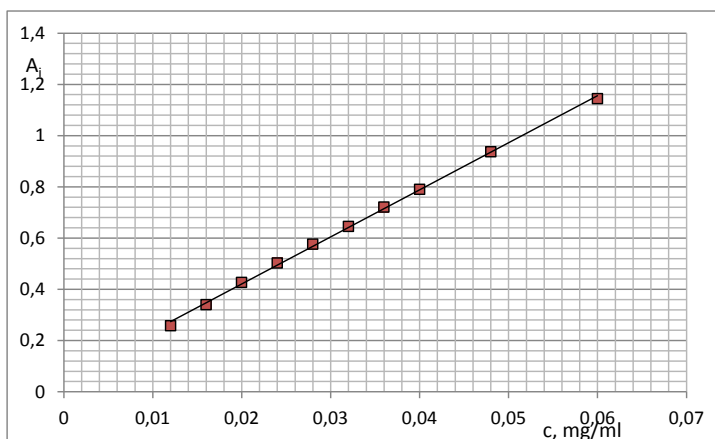
$c$  = stężenie badanego roztworu  $A_1 - A_{10}$  (mg/ml)

Wykres zależności  $A_i = f(c)$  dla EPI jest prostoliniowy. Parametry prostej  $y = ax + b$  i jej ocenę statystyczną przedstawiono w tabeli 8 (wartość  $t_b = b/S_b = 7,58$  jest większa od wartości krytycznej  $t_{0,5(8)} = 2,306$ ). Do obliczeń wykorzystano arkusz kalkulacyjny Excel XP.

Tabela 8.

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

| Lp. | c [mg/ml] | $A_i$  | Ocena statystyczna prostej<br>$y = ax + b$  |
|-----|-----------|--------|---|
| 1   | 0,012     | 0,2580 | $a = 18,38 \pm 0,47$<br>$b = 0,053 \pm 0,016$<br>$r = 0,9995$<br>$t_b = 7,5787$<br>$S_a = 0,2031$<br>$S_b = 0,0070$<br>$S_y = 0,0091$ |
| 2   | 0,016     | 0,3400 |   |
| 3   | 0,020     | 0,4270 |   |
| 4   | 0,024     | 0,5020 |   |
| 5   | 0,028     | 0,5760 |   |
| 6   | 0,032     | 0,6450 |   |
| 7   | 0,036     | 0,7210 |   |
| 8   | 0,040     | 0,7904 |   |
| 9   | 0,048     | 0,9366 |   |
| 10  | 0,060     | 1,1443 |   |



Rycina 7.

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

### Precyzja

W celu określenia precyzji metody oznaczania EPI przygotowano cztery serie o stężeniach 0,020 mg/ml, 0,024 mg/ml, 0,032 mg/ml i 0,040 mg/ml (roztwory wodne) i wykonano 6 oznaczeń dla każdej serii (Tabela 9, 10). Wartość absorbancji prób mierzono przy długości fali  $\lambda = 480$  nm.

Tabela 9.

Wyniki oznaczania PPD o stężeniu  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  i  $A_4$

| Lp. | $A_1 = 0,020$ mg/ml | $A_2 = 0,024$ mg/ml | $A_3 = 0,032$ mg/ml | $A_4 = 0,040$ mg/ml |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1   | 0,4422              | 0,5174              | 0,6606              | 0,8061              |
| 2   | 0,4420              | 0,5178              | 0,6600              | 0,8060              |
| 3   | 0,4429              | 0,5174              | 0,6604              | 0,8076              |
| 4   | 0,4426              | 0,5185              | 0,6614              | 0,8074              |
| 5   | 0,4428              | 0,5191              | 0,6618              | 0,8087              |
| 6   | 0,4437              | 0,5206              | 0,6604              | 0,8087              |

Tabela 10.

Ocena statystyczna wyników wyznaczania precyzji metody UV-VIS dla EPI

| Parametr  | Roztwór $A_1$        | Roztwór $A_2$        | Roztwór $A_3$        | Roztwór $A_4$        |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Wartość średnia $P_{\text{sr}}$                 | $4,43 \cdot 10^{-1}$ | $5,18 \cdot 10^{-1}$ | $6,61 \cdot 10^{-1}$ | $8,07 \cdot 10^{-1}$ |
| Wariacja  | $3,60 \cdot 10^{-1}$ | $5,35 \cdot 10^{-1}$ | $4,71 \cdot 10^{-1}$ | $1,41 \cdot 10^{-1}$ |
| Odchylenie standardowe pojedynczego wyniku: $S$ | $6,00 \cdot 10^{-4}$ | $1,20 \cdot 10^{-3}$ | $7,00 \cdot 10^{-4}$ | $1,20 \cdot 10^{-3}$ |
| Względne odchylenie standardowe: $S_x$          | $2,00 \cdot 10^{-4}$ | $5,00 \cdot 10^{-4}$ | $3,00 \cdot 10^{-4}$ | $5,00 \cdot 10^{-4}$ |
| Współczynnik zmienności: $W_z$ [%]              | $1,35 \cdot 10^{-1}$ | $2,39 \cdot 10^{-1}$ | $1,04 \cdot 10^{-1}$ | $1,47 \cdot 10^{-1}$ |

Granica wykrywalności (DL) dla EPI wynosi  $1,43 \cdot 10^{-3}$  mg/ml, natomiast granica oznaczalności (QL) wynosi  $4,34 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.

## 4.5. Ocena trwałości EPI w roztworach wodnych

### 4.5.1. Warunki badań kinetycznych

*Wszystkie badane roztwory były chronione przed światłem*

Trwałość EPI w roztworach wodnych badano w zakresie pH od 0,42 do 9,95, 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 0,42 – 1,36
- bufor fosforanowy ( $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ); pH 2,15 – 3,40
- bufor octanowy ( $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$ ); pH 4,01 – 5,89
- bufor fosforanowy ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); pH 6,18 – 7,45
- bufor boranowy ( $\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NaOH}$ ); pH 7,73 – 9,95
- roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 mol/l

Siłę jonową roztworów doprowadzono do stałej wartości 0,50 mol/l stosując roztwór 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:

$$\text{pH} = -\log f_{\text{HCl}} [\text{HCl}] \quad \dots 1$$

$$\text{pH} = \text{pK}_w + \log f_{\text{NaOH}} \quad \dots 2$$

Wartości współczynników aktywności ( $f_{\text{HCl}}$  i  $f_{\text{NaOH}}$ ) zaczerpnięto z piśmiennictwa, lub otrzymano poprzez interpolację danych literaturowych [12].

Roztwory buforowe (24,0 ml) o określonej wartości pH, przygotowano z dodatkiem  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (0,004 mol/l) i termostatowano w odpowiedniej temperaturze. Po ogrzaniu roztwo-

ru do temperatury badania, dodawano 1,0 ml roztworu substancji badanej (EPI) o stężeniu 2 mg/ml i mieszano.

W określonych odstępach czasu, które zależały od szybkości rozkładu EPI, 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 wprowadzono na kolumnę chromatograficzną 50  $\mu$ l roztworu. Rejestrowano sygnały substancji badanej, produktów rozkładu i wzorca wewnętrznego.

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

Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI w roztworach wodnych wyznaczono stosując metodę HPLC z detekcją UV przy 254 nm. Interpretację zmian stężenia substratu jako funkcję czasu przeprowadzono wykorzystując stosunek pola powierzchni piku EPI do pola powierzchni piku wzorca wewnętrznego. Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  lub  $c, \% = f(t)$  są opisane równaniem reakcji pseudopierwszego rzędu:

$$\ln (P_i/P_{wz})_t = \ln (P_i/P_{wz})_0 - k_{obs} \cdot t \quad \dots 3$$

$(P_i/P_{wz})_t$  i  $(P_i/P_{wz})_0$  – stosunek pola powierzchni piku EPI do pola powierzchni piku wzorca wewnętrznego po czasie  $t$  i  $t_0$ ; analogicznie  $c_t$  i  $c_0$  – stężenie EPI po czasie  $t$  i  $t_0$ . W przedziale czasu od  $t_0$  do  $t_\infty$  wartości  $P_i/P_{wz}$  lub  $c, \% \rightarrow 0$ .

Półlogarytmiczne wykresy zależności  $P_i/P_{wz} = f(t)$  lub  $c, \% = f(t)$  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.

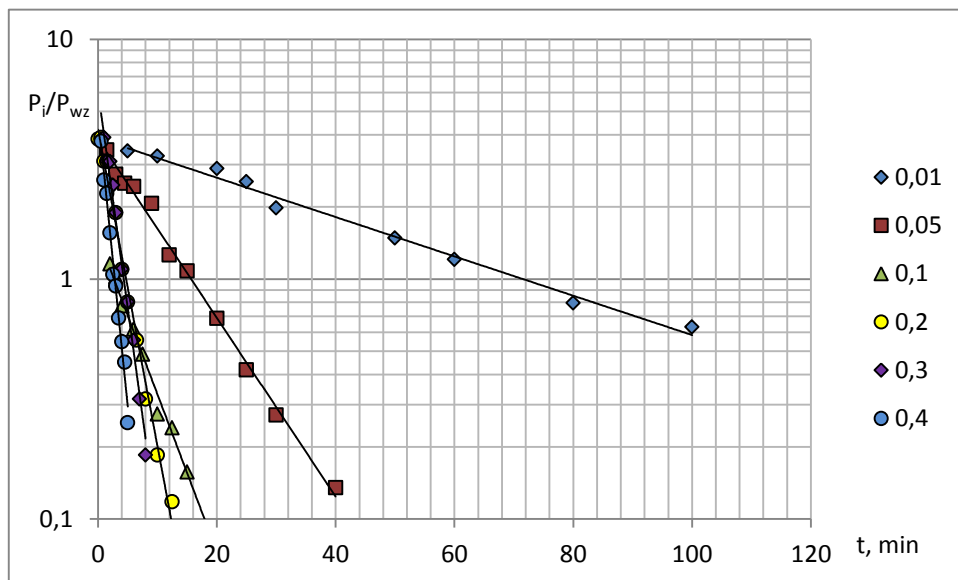
Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 8 – 31 i w tabelach 11 – 33. Graficznie wyniki zostały przedstawione w postaci półlogarytmicznych wykresów  $P_i/P_{wz} = f(t)$  lub  $c, \% = f(t)$ .

*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI w kwasie solnym*

Tabela 11.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w kwasie solnym w temperaturze 363 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

| Warunki reakcji               | Parametry kinetyczne                   |                                      |                     |         |     |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------|---------|-----|
|                               | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$               | $r$     | $n$ |
| [HCl] = 0,40 mol/l, pH = 0,58 | $-(0,560 \pm 0,051)$                   | $(9,34 \pm 0,85) \cdot 10^{-3}$      | $2,2 \cdot 10^{-2}$ | -0,9938 | 10  |
| [HCl] = 0,30 mol/l, pH = 0,65 | $-(0,417 \pm 0,038)$                   | $(6,94 \pm 0,63) \cdot 10^{-3}$      | $1,7 \cdot 10^{-2}$ | -0,9927 | 11  |
| [HCl] = 0,20 mol/l, pH = 0,81 | $-(0,304 \pm 0,022)$                   | $(5,07 \pm 0,37) \cdot 10^{-3}$      | $9,9 \cdot 10^{-3}$ | -0,9947 | 12  |
| [HCl] = 0,10 mol/l, pH = 1,10 | $-(0,151 \pm 0,012)$                   | $(2,52 \pm 0,20) \cdot 10^{-3}$      | $5,0 \cdot 10^{-3}$ | -0,9961 | 9   |
| [HCl] = 0,05 mol/l, pH = 1,22 | $-(8,58 \pm 0,48) \cdot 10^{-2}$       | $(1,43 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$      | $2,1 \cdot 10^{-3}$ | -0,9973 | 11  |
| [HCl] = 0,01 mol/l, pH = 1,38 | $-(1,89 \pm 0,18) \cdot 10^{-2}$       | $(3,15 \pm 0,29) \cdot 10^{-4}$      | $7,6 \cdot 10^{-4}$ | -0,9944 | 9   |



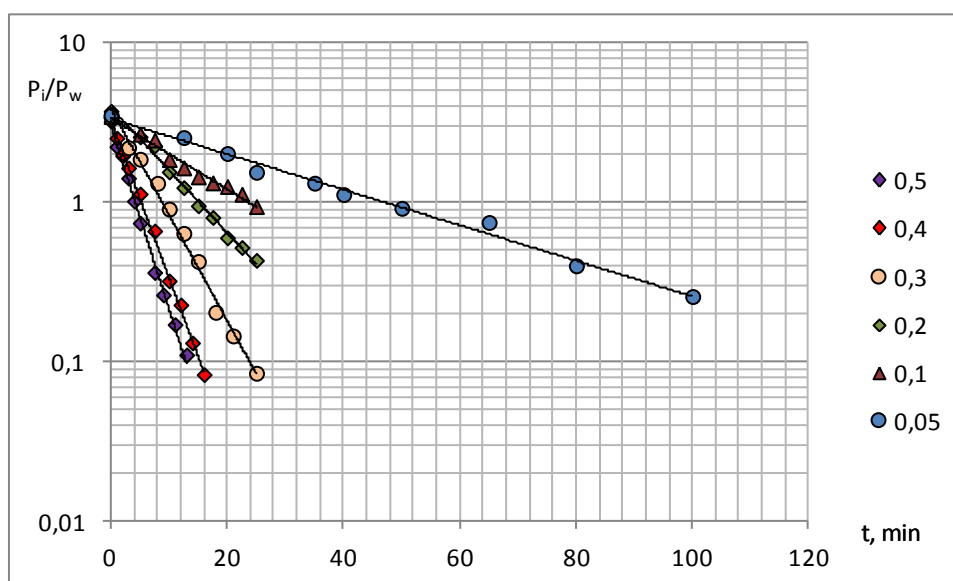
Rycina 8.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w kwasie solnym (0,01 – 0,40 mol/l) w temperaturze 363 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 12.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w kwasie solnym w temperaturze 353 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

| Warunki reakcji               | Parametry kinetyczne                   |                                      |         |         |     |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|---------|---------|-----|
|                               | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$   | $r$     | $n$ |
| [HCl] = 0,50 mol/l, pH = 0,43 | $-(2,65 \pm 0,17) \cdot 10^{-1}$       | $(4,42 \pm 0,28) \cdot 10^{-3}$      | 0,00722 | -0,9970 | 10  |
| [HCl] = 0,40 mol/l, pH = 0,53 | $-(2,27 \pm 0,08) \cdot 10^{-1}$       | $(3,79 \pm 0,13) \cdot 10^{-3}$      | 0,00341 | -0,9991 | 10  |
| [HCl] = 0,30 mol/l, pH = 0,65 | $-(1,53 \pm 0,11) \cdot 10^{-1}$       | $(2,55 \pm 0,19) \cdot 10^{-3}$      | 0,00490 | -0,9959 | 10  |
| [HCl] = 0,20 mol/l, pH = 0,82 | $-(0,905 \pm 0,062) \cdot 10^{-1}$     | $(1,51 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$      | 0,00268 | -0,9965 | 10  |
| [HCl] = 0,10 mol/l, pH = 1,09 | $-(0,513 \pm 0,060) \cdot 10^{-1}$     | $(8,56 \pm 0,99) \cdot 10^{-4}$      | 0,00258 | -0,9900 | 10  |
| [HCl] = 0,05 mol/l, pH = 1,36 | $-(0,257 \pm 0,022) \cdot 10^{-1}$     | $(4,28 \pm 0,36) \cdot 10^{-4}$      | 0,00093 | -0,9947 | 10  |



Rycina 9.

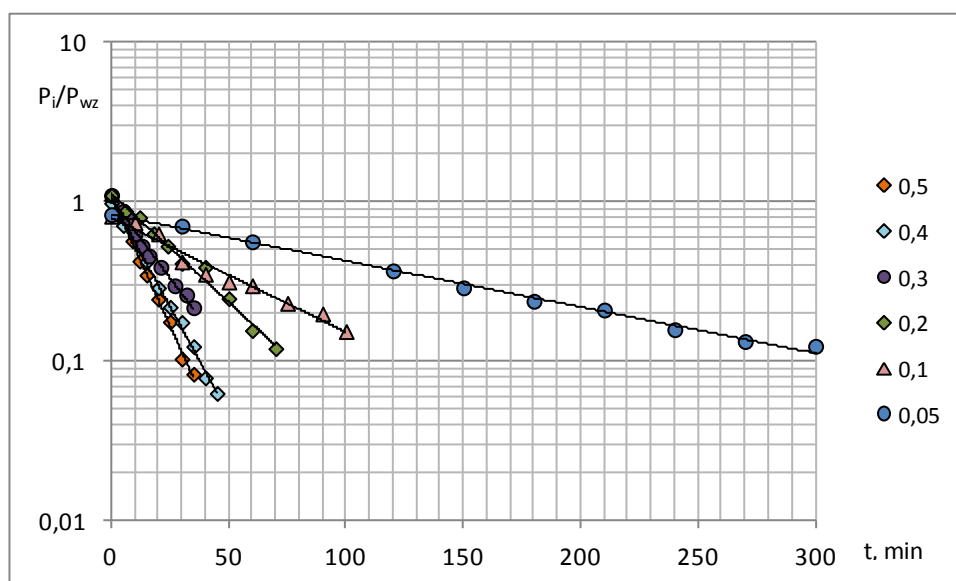
Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w kwasie solnym (0,05 – 0,50 mol/l) w temperaturze 353 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).



Tabela 13.

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

| Warunki reakcji               | Parametry kinetyczne                 |                                      |         |         |     |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------|---------|-----|
|                               | $a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$   | $r$     | $n$ |
| [HCl] = 0,50 mol/l, pH = 0,43 | $-(0,747 \pm 0,047) \cdot 10^{-1}$   | $(1,25 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$      | 0,00203 | -0,9970 | 10  |
| [HCl] = 0,40 mol/l, pH = 0,53 | $-(0,622 \pm 0,040) \cdot 10^{-1}$   | $(1,04 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$      | 0,00172 | -0,9969 | 10  |
| [HCl] = 0,30 mol/l, pH = 0,65 | $-(0,456 \pm 0,042) \cdot 10^{-1}$   | $(7,60 \pm 0,71) \cdot 10^{-4}$      | 0,00184 | -0,9936 | 10  |
| [HCl] = 0,20 mol/l, pH = 0,82 | $-(0,313 \pm 0,028) \cdot 10^{-1}$   | $(5,22 \pm 0,47) \cdot 10^{-4}$      | 0,00123 | -0,9938 | 10  |
| [HCl] = 0,10 mol/l, pH = 1,09 | $-(0,164 \pm 0,023) \cdot 10^{-1}$   | $(2,74 \pm 0,39) \cdot 10^{-4}$      | 0,00100 | -0,9853 | 10  |
| [HCl] = 0,05 mol/l, pH = 1,36 | $-(0,666 \pm 0,040) \cdot 10^{-2}$   | $(1,11 \pm 0,07) \cdot 10^{-4}$      | 0,0102  | -0,9974 | 10  |



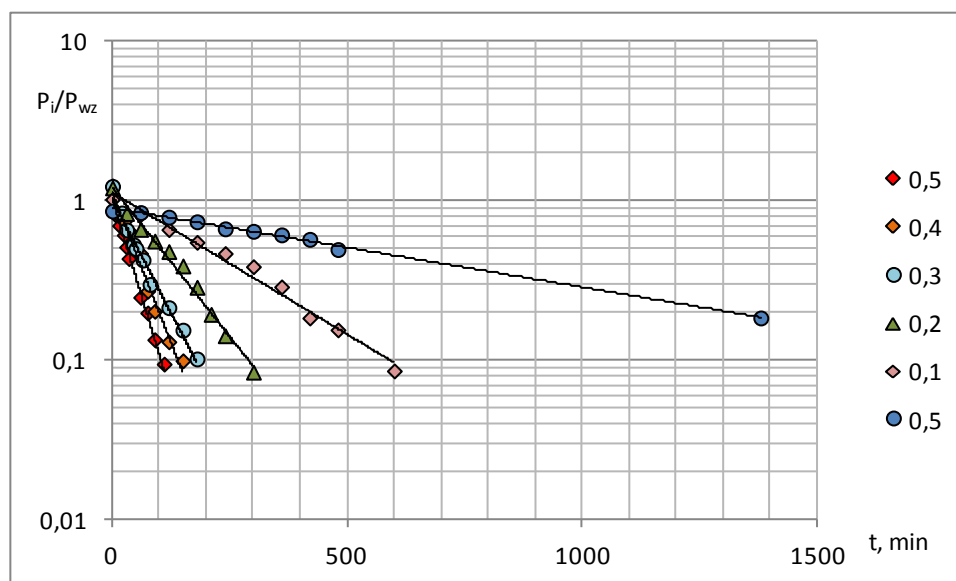
Rycina 10.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w kwasie solnym (0,05 – 0,50 mol/l) w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 14.

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

| Warunki reakcji               | Parametry kinetyczne                 |                                      |                      |         |     |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|---------|-----|
|                               | $a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$                | $R$     | $n$ |
| [HCl] = 0,50 mol/l, pH = 0,44 | $-(2,25 \pm 0,18) \cdot 10^{-2}$     | $(3,75 \pm 0,30) \cdot 10^{-4}$      | 0,000783             | -0,9952 | 10  |
| [HCl] = 0,40 mol/l, pH = 0,54 | $-(1,72 \pm 0,20) \cdot 10^{-2}$     | $(2,88 \pm 0,33) \cdot 10^{-4}$      | 0,000849             | -0,9905 | 10  |
| [HCl] = 0,30 mol/l, pH = 0,66 | $-(1,31 \pm 0,14) \cdot 10^{-2}$     | $(2,19 \pm 0,23) \cdot 10^{-4}$      | 0,000607             | -0,9916 | 10  |
| [HCl] = 0,20 mol/l, pH = 0,83 | $-(0,859 \pm 0,081) \cdot 10^{-2}$   | $(1,43 \pm 0,14) \cdot 10^{-4}$      | 0,000353             | -0,9933 | 10  |
| [HCl] = 0,10 mol/l, pH = 1,11 | $-(0,409 \pm 0,042) \cdot 10^{-2}$   | $(0,682 \pm 0,070) \cdot 10^{-4}$    | 0,000181             | -0,9922 | 10  |
| [HCl] = 0,05 mol/l, pH = 1,39 | $-(0,114 \pm 0,006) \cdot 10^{-2}$   | $(0,191 \pm 0,010) \cdot 10^{-4}$    | $2,41 \cdot 10^{-5}$ | -0,9982 | 10  |



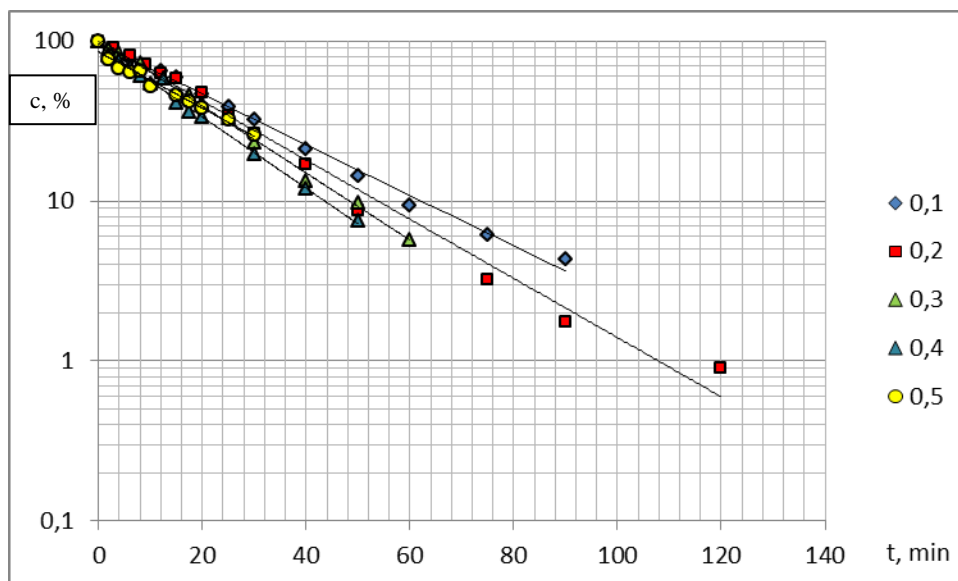
Rycina 11.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w kwasie solnym (0,05 – 0,50 mol/l) w temperaturze 333 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 15.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w 0,05 mol/l kwasie solnym w temperaturze 363 K,  $\mu = 0,50$  mol/l,  $\mu = 0,40$  mol/l,  $\mu = 0,30$  mol/l,  $\mu = 0,20$  mol/l,  $\mu = 0,10$  mol/l

| Warunki reakcji                        | Parametry kinetyczne                   |                                      |                      |         |     |
|--|--|--------------------------------------|----------------------|---------|-----|
|  | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$                | $r$     | $n$ |
| [HCl] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,50$ mol/l | $-(5,46 \pm 0,062) \cdot 10^{-2}$      | $(9,10 \pm 1,03) \cdot 10^{-4}$      | $27,8 \cdot 10^{-4}$ | -0,9885 | 11  |
| [HCl] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,40$ mol/l | $-(5,13 \pm 0,27) \cdot 10^{-2}$       | $(8,50 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$      | $7,92 \cdot 10^{-4}$ | -0,9989 | 13  |
| [HCl] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,30$ mol/l | $-(4,83 \pm 0,20) \cdot 10^{-2}$       | $(8,04 \pm 0,34) \cdot 10^{-4}$      | $0,90 \cdot 10^{-3}$ | -0,9982 | 12  |
| [HCl] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,20$ mol/l | $-(4,26 \pm 0,30) \cdot 10^{-2}$       | $(7,10 \pm 0,51) \cdot 10^{-4}$      | $1,39 \cdot 10^{-3}$ | -0,9936 | 14  |
| [HCl] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,10$ mol/l | $-(3,64 \pm 0,18) \cdot 10^{-2}$       | $(6,07 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$      | $0,83 \cdot 10^{-3}$ | -0,9971 | 13  |



Rycina 12.

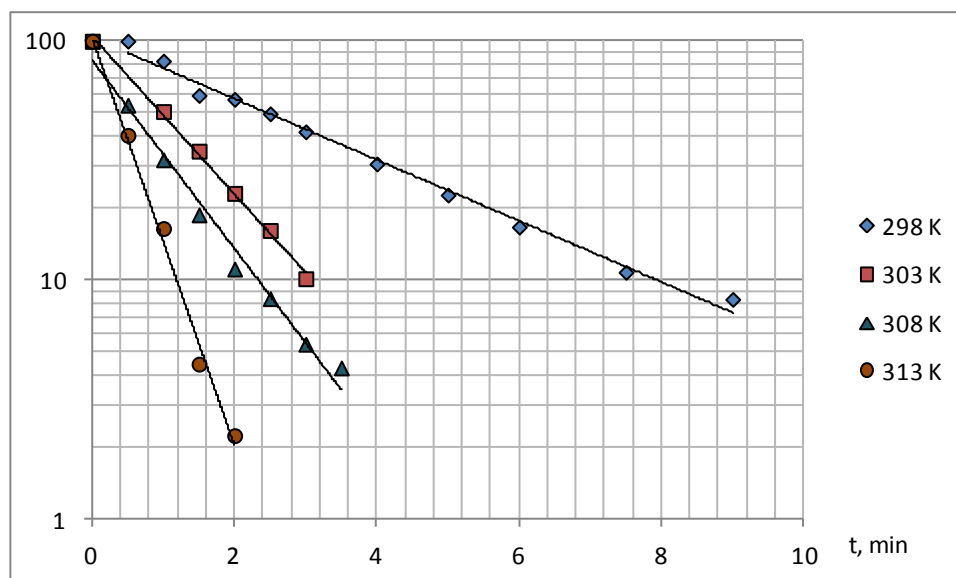
Półlogarytmiczne wykresy  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w 0,05 mol/l kwasie solnym w temperaturze 363 K ( $\mu = 0,50 - 0,10$  mol/l).

Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI w roztworze wodorotlenku sodu

Tabela 16.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w 0,05 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 298 K, 303 K, 308K i 313 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

| T, K | Parametry kinetyczne                   |                                      |                      |       |     |
|------|--|--------------------------------------|----------------------|-------|-----|
|      | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$                | $r$   | $n$ |
| 298  | $(-2,94 \pm 0,21) \cdot 10^{-1}$       | $(4,90 \pm 0,34) \cdot 10^{-3}$      | $9,14 \cdot 10^{-3}$ | 0,996 | 11  |
| 303  | $(-7,59 \pm 0,45) \cdot 10^{-1}$       | $(1,27 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$      | $1,91 \cdot 10^{-2}$ | 0,999 | 6   |
| 308  | $(-9,06 \pm 1,14) \cdot 10^{-1}$       | $(1,51 \pm 0,19) \cdot 10^{-2}$      | $4,68 \cdot 10^{-2}$ | 0,992 | 8   |
| 313  | $(-19,61 \pm 2,99) \cdot 10^{-1}$      | $(3,27 \pm 0,50) \cdot 10^{-2}$      | $9,40 \cdot 10^{-2}$ | 0,997 | 5   |



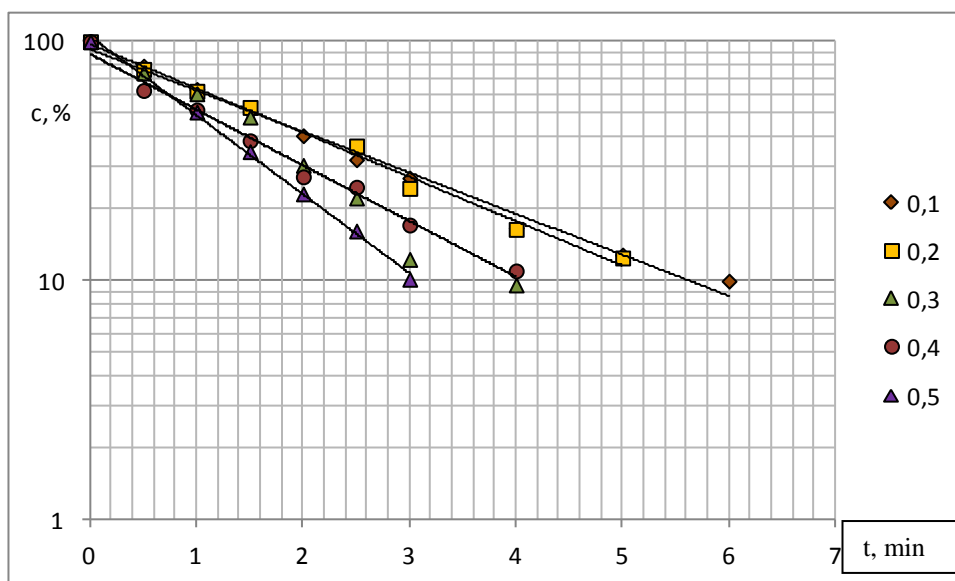
Rycina 13.

Półlogarytmiczne wykresy  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w 0,05 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 298 K, 303 K, 308K i 313 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 17.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w 0,05 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 303 K,  $\mu = 0,50$  mol/l,  $\mu = 0,40$  mol/l,  $\mu = 0,30$  mol/l,  $\mu = 0,20$  mol/l,  $\mu = 0,10$  mol/l

| Warunki reakcji                         | Parametry kinetyczne                   |                                      |                      |       |     |
|---|--|--------------------------------------|----------------------|-------|-----|
|   | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$                | $r$   | $n$ |
| [NaOH] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,50$ mol/l | $-(7,59 \pm 0,45) \cdot 10^{-1}$       | $(12,66 \pm 0,75) \cdot 10^{-3}$     | $1,91 \cdot 10^{-2}$ | 0,999 | 6   |
| [NaOH] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,40$ mol/l | $-(5,36 \pm 0,60) \cdot 10^{-1}$       | $(8,94 \pm 0,97) \cdot 10^{-3}$      | $2,37 \cdot 10^{-2}$ | 0,994 | 8   |
| [NaOH] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,30$ mol/l | $-(4,84 \pm 0,36) \cdot 10^{-1}$       | $(8,06 \pm 0,59) \cdot 10^{-3}$      | $1,50 \cdot 10^{-2}$ | 0,997 | 9   |
| [NaOH] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,20$ mol/l | $-(4,26 \pm 0,37) \cdot 10^{-1}$       | $(7,10 \pm 0,62) \cdot 10^{-3}$      | $1,51 \cdot 10^{-2}$ | 0,996 | 8   |
| [NaOH] = 0,05 mol/l, $\mu = 0,10$ mol/l | $-(3,95 \pm 0,33) \cdot 10^{-1}$       | $(6,59 \pm 0,54) \cdot 10^{-3}$      | $1,41 \cdot 10^{-2}$ | 0,995 | 10  |



Rycina 14.

Półlogarytmiczne wykresy  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w 0,05 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 303 K ( $\mu = 0,50 - 0,10$  mol/l).

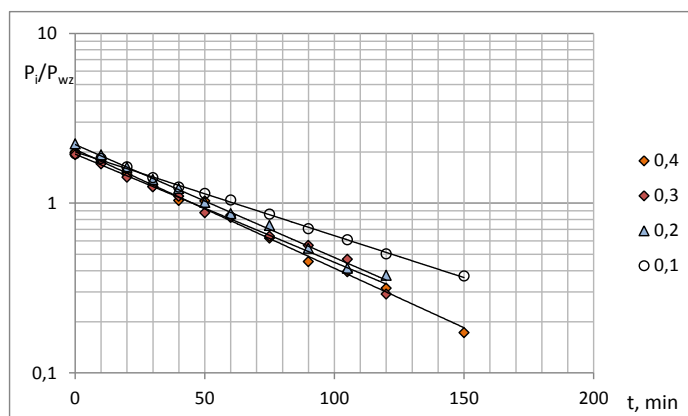
Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 2,15 – 3,40

Tabela 18.

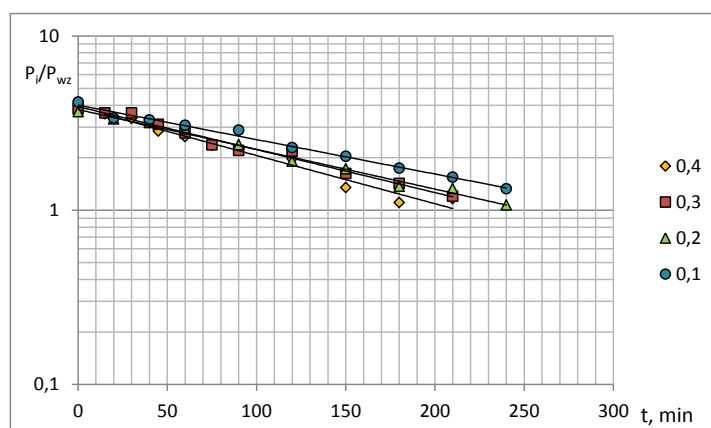
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w temperaturze 363 K,  
 $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$

| Stężenie składników buforu        |                                    |                        | Parametry kinetyczne                       |  |                |         |     |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|--|--|----------------|---------|-----|
|                                   |                                    |                        | $a \pm \Delta a \text{ [min}^{-1}\text{]}$ | $k \pm \Delta k \text{ [s}^{-1}\text{]}$ | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] | [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |  |  |                |         |     |
| pH 2,15                           |                                    |                        |  |  |                |         |     |
| 0,227                             | 0,173                              | 0,400                  | $-(1,61 \pm 0,08) 10^{-2}$                 | $(2,69 \pm 0,14) 10^{-4}$                | $3,79 10^{-4}$ | -0,9973 | 12  |
| 0,171                             | 0,129                              | 0,300                  | $-(1,47 \pm 0,13) 10^{-2}$                 | $(2,45 \pm 0,21) 10^{-4}$                | $5,60 10^{-4}$ | -0,9935 | 11  |
| 0,114                             | 0,086                              | 0,200                  | $-(1,52 \pm 0,15) 10^{-2}$                 | $(2,55 \pm 0,26) 10^{-4}$                | $6,90 10^{-4}$ | -0,9899 | 12  |
| 0,05685                           | 0,04315                            | 0,100                  | $-(1,13 \pm 0,10) 10^{-2}$                 | $(1,89 \pm 0,16) \cdot 10^{-4}$          | $4,42 10^{-4}$ | -0,9925 | 12  |
| pH 2,70                           |                                    |                        |  |  |                |         |     |
| 0,1176                            | 0,2824                             | 0,400                  | $-(6,40 \pm 0,94) 10^{-3}$                 | $(1,06 \pm 0,16) 10^{-4}$                | $4,07 10^{-4}$ | -0,9840 | 10  |
| 0,0882                            | 0,2118                             | 0,300                  | $-(5,68 \pm 0,59) 10^{-3}$                 | $(9,46 \pm 0,99) 10^{-5}$                | $2,62 10^{-4}$ | -0,9905 | 11  |
| 0,0588                            | 0,1412                             | 0,200                  | $-(5,25 \pm 0,43) 10^{-3}$                 | $(8,76 \pm 0,72) 10^{-5}$                | $1,87 10^{-4}$ | -0,9950 | 10  |
| 0,0294                            | 0,0706                             | 0,100                  | $-(4,56 \pm 0,40) 10^{-3}$                 | $(7,59 \pm 0,66) \cdot 10^{-5}$          | $1,73 10^{-4}$ | -0,9943 | 10  |
| pH 3,20                           |                                    |                        |  |  |                |         |     |
| 0,0466                            | 0,3534                             | 0,400                  | $-(3,14 \pm 0,41) 10^{-3}$                 | $(5,24 \pm 0,68) 10^{-5}$                | $1,72 10^{-4}$ | -0,9897 | 9   |
| 0,0350                            | 0,2650                             | 0,300                  | $-(2,65 \pm 0,25) 10^{-3}$                 | $(4,44 \pm 0,42) 10^{-5}$                | $1,12 10^{-4}$ | -0,9921 | 11  |
| 0,0233                            | 0,1767                             | 0,200                  | $-(2,17 \pm 0,23) 10^{-3}$                 | $(3,61 \pm 0,39) 10^{-5}$                | $1,04 10^{-4}$ | -0,9898 | 11  |
| 0,0116                            | 0,0884                             | 0,100                  | $-(1,76 \pm 0,29) 10^{-3}$                 | $(2,94 \pm 0,48) \cdot 10^{-5}$          | $1,28 10^{-4}$ | -0,9770 | 11  |

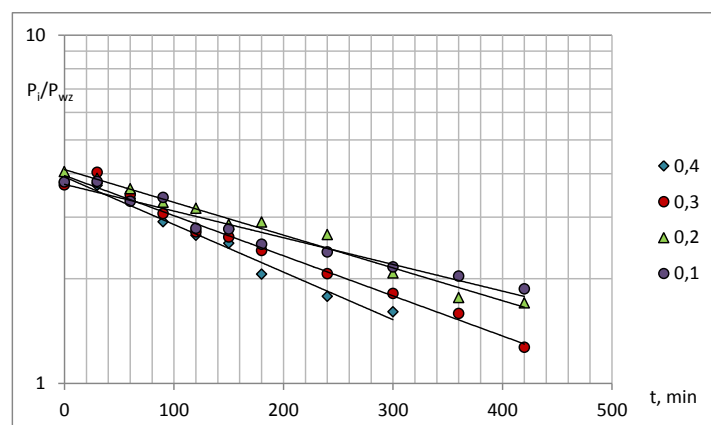
A



B



C



Rycina 15.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 2,15 (A), 2,70 (B) i 3,20 (C) w temperaturze 363 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

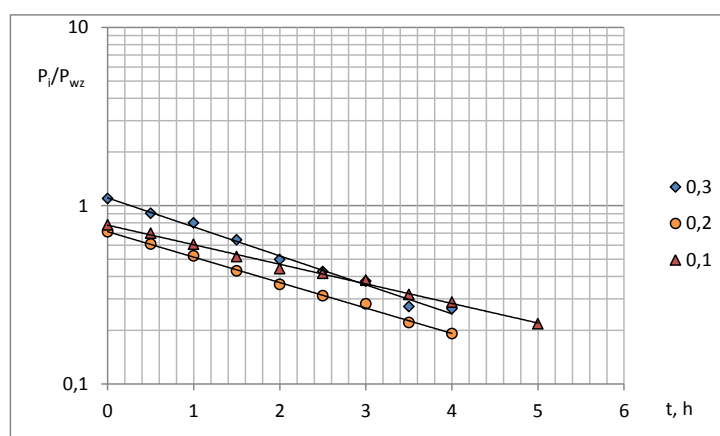
Tabela 19.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w temperaturze 353 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

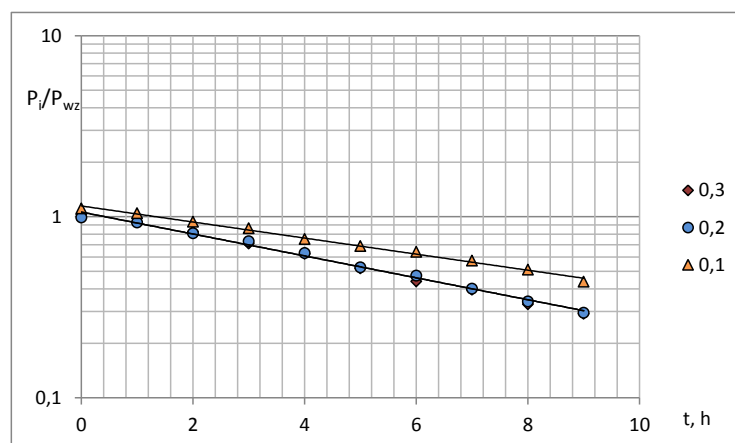
| Stężenie składników buforu        |                                    |                        | Parametry kinetyczne                |                                     |                        |         |     |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|---------|-----|
|                                   |                                    |                        | $a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ] | $k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ] | $S_a$                  | $r$     | $n$ |
| [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] | [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |                                     |                                     |                        |         |     |
| pH 2,42                           |                                    |                        |                                     |                                     |                        |         |     |
| 0,171                             | 0,129                              | 0,300                  | -(0,374 ± 0,033)                    | (1,04 ± 0,09) 10 <sup>-4</sup>      | 1,41 10 <sup>-2</sup>  | -0,9950 | 9   |
| 0,114                             | 0,086                              | 0,200                  | -(0,329 ± 0,015)                    | (9,13 ± 0,44) 10 <sup>-5</sup>      | 0,641 10 <sup>-2</sup> | -0,9987 | 9   |
| 0,05685                           | 0,04315                            | 0,100                  | -(0,253 ± 0,015)                    | (7,02 ± 0,43) · 10 <sup>-5</sup>    | 0,637 10 <sup>-2</sup> | -0,9975 | 10  |
| pH 2,84                           |                                    |                        |                                     |                                     |                        |         |     |
| 0,0882                            | 0,2118                             | 0,300                  | -(0,145 ± 0,007)                    | (4,04 ± 0,21) 10 <sup>-5</sup>      | 0,305 10 <sup>-2</sup> | -0,9982 | 10  |
| 0,0588                            | 0,1412                             | 0,200                  | -(0,139 ± 0,009)                    | (3,87 ± 0,25) 10 <sup>-5</sup>      | 0,394 10 <sup>-2</sup> | -0,9968 | 10  |
| 0,0294                            | 0,0706                             | 0,100                  | -(0,102 ± 0,006)                    | (2,84 ± 0,17) · 10 <sup>-5</sup>    | 0,272 10 <sup>-2</sup> | -0,9972 | 10  |
| pH 3,37                           |                                    |                        |                                     |                                     |                        |         |     |
| 0,0466                            | 0,3534                             | 0,400                  | -(8,28 ± 1,08) 10 <sup>-2</sup>     | (2,30 ± 0,30) 10 <sup>-5</sup>      | 0,455 10 <sup>-2</sup> | -0,9896 | 9   |
| 0,0350                            | 0,2650                             | 0,300                  | -(6,95 ± 0,48) 10 <sup>-2</sup>     | (1,93 ± 0,13) 10 <sup>-5</sup>      | 0,201 10 <sup>-2</sup> | -0,9970 | 9   |
| 0,0233                            | 0,1767                             | 0,200                  | -(6,31 ± 2,55) 10 <sup>-2</sup>     | (1,75 ± 0,07) 10 <sup>-5</sup>      | 1,08 10 <sup>-2</sup>  | -0,9112 | 9   |
| 0,0116                            | 0,0884                             | 0,100                  | -(4,16 ± 0,71) 10 <sup>-2</sup>     | (1,15 ± 0,20) · 10 <sup>-5</sup>    | 0,300 10 <sup>-2</sup> | -0,9822 | 9   |



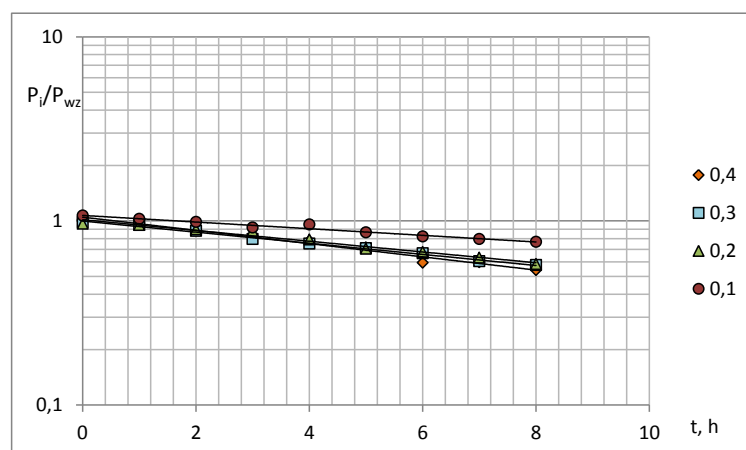
A



B



C



Rycina 16.

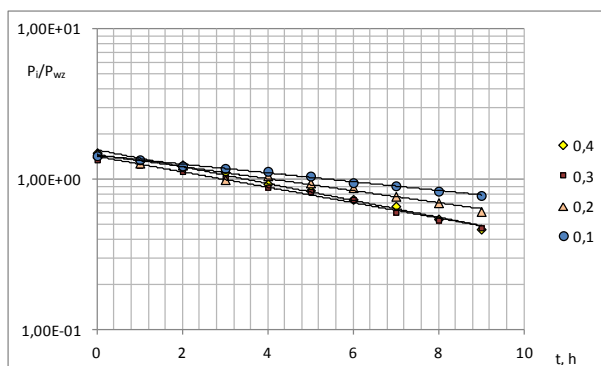
Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 2,42 (A), 2,84 (B) i 3,37 (C) w temperaturze 353 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 20.

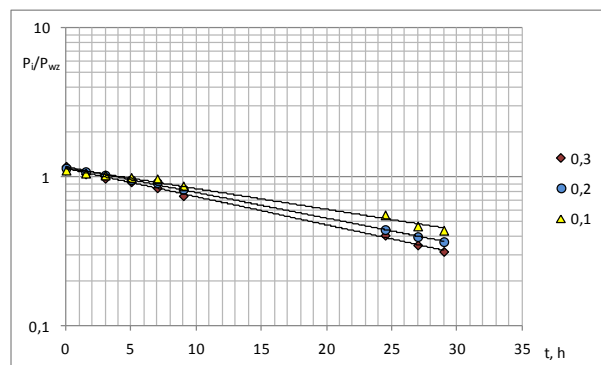
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w temperaturze 343 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

| Warunki reakcji                   |                                    |                        | Parametry kinetyczne                |                                     |                 |         |     |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|---------|-----|
|                                   |                                    |                        | $a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ] | $k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ] | $S_a$           | $r$     | $n$ |
| [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] | [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |                                     |                                     |                 |         |     |
| pH 2,40                           |                                    |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,227                             | 0,173                              | 0,400                  | $-(1,28 \pm 0,10) 10^{-1}$          | $(3,58 \pm 0,28) 10^{-5}$           | $4,36 10^{-3}$  | -0,9955 | 10  |
| 0,171                             | 0,129                              | 0,300                  | $-(1,18 \pm 0,10) 10^{-1}$          | $(3,28 \pm 0,27) 10^{-5}$           | $4,15 10^{-3}$  | -0,9951 | 10  |
| 0,114                             | 0,086                              | 0,200                  | $-(0,920 \pm 0,129) 10^{-1}$        | $(2,55 \pm 0,36) 10^{-5}$           | $5,59 10^{-3}$  | -0,9855 | 10  |
| 0,05685                           | 0,04315                            | 0,100                  | $-(1,28 \pm 0,10) 10^{-1}$          | $(1,87 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$     | $1,82 10^{-3}$  | -0,9971 | 10  |
| pH 2,98                           |                                    |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,0882                            | 0,2118                             | 0,300                  | $-(4,36 \pm 0,18) 10^{-2}$          | $(1,21 \pm 0,05) 10^{-5}$           | $0,788 10^{-3}$ | -0,9989 | 9   |
| 0,0588                            | 0,1412                             | 0,200                  | $-(3,96 \pm 0,12) 10^{-2}$          | $(1,10 \pm 0,34) 10^{-5}$           | $0,520 10^{-3}$ | -0,9994 | 9   |
| 0,0294                            | 0,0706                             | 0,100                  | $-(3,19 \pm 0,29) 10^{-2}$          | $(8,87 \pm 0,81) \cdot 10^{-6}$     | $1,22 10^{-3}$  | -0,9948 | 9   |
| pH 3,40                           |                                    |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,0466                            | 0,3534                             | 0,400                  | $-(2,33 \pm 0,23) 10^{-2}$          | $(6,48 \pm 0,65) 10^{-6}$           | $0,956 10^{-3}$ | -0,9942 | 9   |
| 0,0350                            | 0,2650                             | 0,300                  | $-(2,15 \pm 0,25) 10^{-2}$          | $(5,98 \pm 0,70) 10^{-6}$           | $1,07 10^{-3}$  | -0,9915 | 9   |
| 0,0233                            | 0,1767                             | 0,200                  | $-(1,73 \pm 0,09) 10^{-2}$          | $(4,80 \pm 0,25) 10^{-6}$           | $0,375 10^{-3}$ | -0,9983 | 9   |
| 0,0116                            | 0,0884                             | 0,100                  | $-(1,53 \pm 0,31) 10^{-2}$          | $(4,26 \pm 0,85) \cdot 10^{-6}$     | $0,130 10^{-3}$ | -0,9757 | 9   |

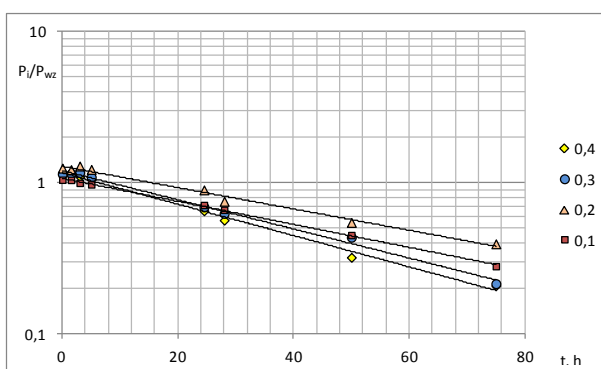
A



B



C



Rycina 17.

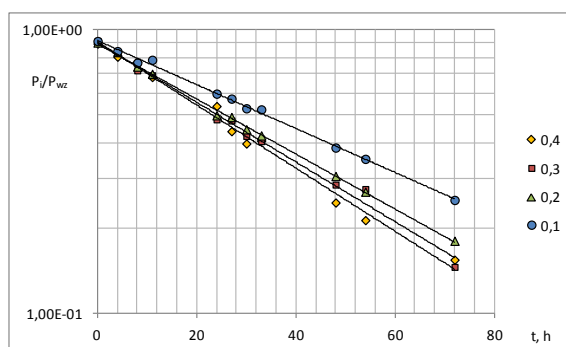
Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 2,40 (A), 2,98 (B) i 3,40 (C) w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 21.

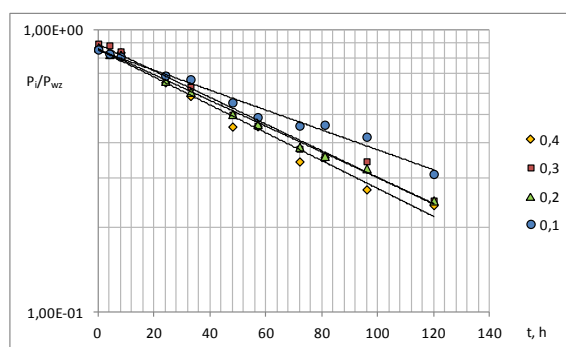
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w temperaturze 333 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

| Warunki reakcji                   |                                    |                        | Parametry kinetyczne                |                                     |                 |         |     |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|---------|-----|
|                                   |                                    |                        | $a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ] | $k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ] | $S_a$           | $r$     | $n$ |
| [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] | [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |                                     |                                     |                 |         |     |
| pH 2,37                           |                                    |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,227                             | 0,173                              | 0,400                  | $-(2,56 \pm 0,19) 10^{-2}$          | $(7,12 \pm 0,53) 10^{-6}$           | $0,846 10^{-3}$ | -0,9951 | 11  |
| 0,171                             | 0,129                              | 0,300                  | $-(2,42 \pm 0,17) 10^{-2}$          | $(6,73 \pm 0,46) 10^{-6}$           | $0,735 10^{-3}$ | -0,9959 | 11  |
| 0,114                             | 0,086                              | 0,200                  | $-(2,24 \pm 0,06) 10^{-2}$          | $(6,22 \pm 0,17) 10^{-6}$           | $0,278 10^{-3}$ | -0,9993 | 11  |
| 0,05685                           | 0,04315                            | 0,100                  | $-(1,78 \pm 0,07) 10^{-2}$          | $(4,95 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}$     | $0,316 10^{-3}$ | -0,9986 | 11  |
| pH 2,82                           |                                    |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,1176                            | 0,2824                             | 0,400                  | $-(1,14 \pm 0,11) 10^{-2}$          | $(3,17 \pm 0,31) 10^{-6}$           | $0,493 10^{-3}$ | -0,9917 | 11  |
| 0,0882                            | 0,2118                             | 0,300                  | $-(1,09 \pm 0,09) 10^{-2}$          | $(3,03 \pm 0,25) 10^{-6}$           | $0,392 10^{-3}$ | -0,9942 | 11  |
| 0,0588                            | 0,1412                             | 0,200                  | $-(1,05 \pm 0,05) 10^{-2}$          | $(2,93 \pm 0,13) 10^{-6}$           | $0,213 10^{-3}$ | -0,9982 | 11  |
| 0,0294                            | 0,0706                             | 0,100                  | $-(0,813 \pm 0,084) 10^{-2}$        | $(2,26 \pm 0,24) \cdot 10^{-6}$     | $0,370 10^{-3}$ | -0,9908 | 11  |
| pH 3,38                           |                                    |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,0466                            | 0,3534                             | 0,400                  | $-(0,729 \pm 0,060) 10^{-2}$        | $(2,03 \pm 0,17) 10^{-6}$           | $0,247 10^{-3}$ | -0,9966 | 8   |
| 0,0350                            | 0,2650                             | 0,300                  | $-(0,691 \pm 0,055) 10^{-2}$        | $(1,92 \pm 0,15) 10^{-6}$           | $0,226 10^{-3}$ | -0,9968 | 8   |
| 0,0233                            | 0,1767                             | 0,200                  | $-(0,583 \pm 0,040) 10^{-2}$        | $(1,62 \pm 0,11) 10^{-6}$           | $0,163 10^{-3}$ | -0,9977 | 8   |
| 0,0116                            | 0,0884                             | 0,100                  | $-(0,457 \pm 0,029) 10^{-2}$        | $(1,27 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$     | $0,118 10^{-3}$ | -0,9980 | 8   |

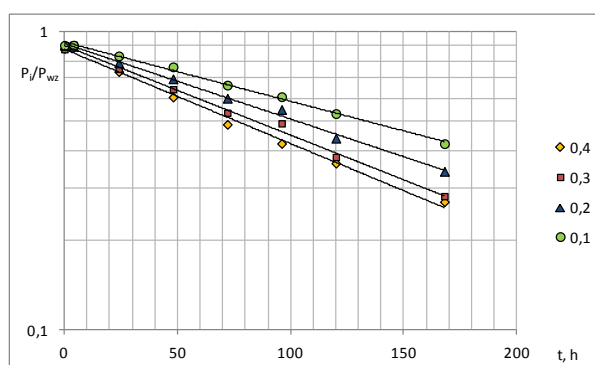
A



B



C



Rycina 18.

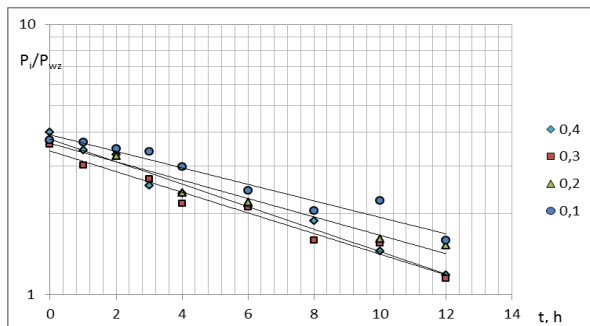
Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 2,37 (A), 2,82 (B) i 3,38 (C) w temperaturze 333 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym w zakresie pH 4,01 – 5,62

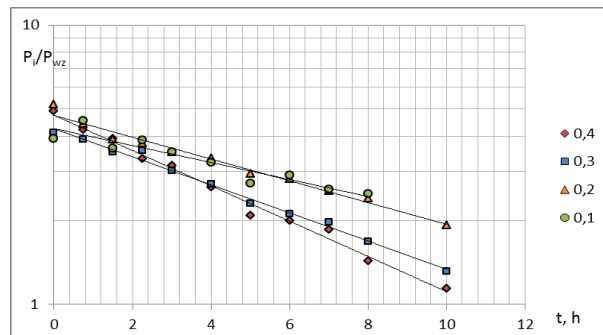
Tabela 22.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym w temperaturze 363 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

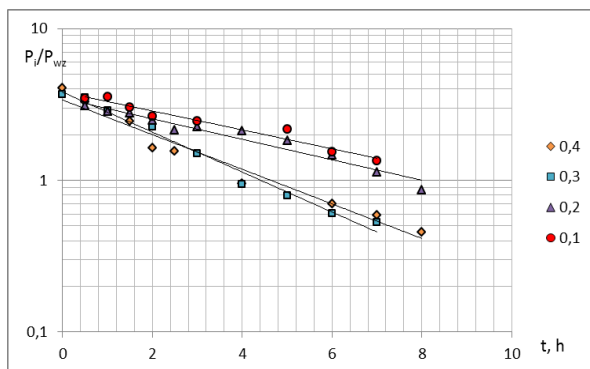
| Warunki reakcji        |                                     |                        | Parametry kinetyczne                |                                     |                |         |     |
|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|---------|-----|
|                        |                                     |                        | $a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ] | $k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [CH <sub>3</sub> COOH] | [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |                                     |                                     |                |         |     |
| pH 4,08                |                                     |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,32                   | 0,08                                | 0,40                   | $-(9,58 \pm 1,32) 10^{-2}$          | $(2,66 \pm 0,36) 10^{-5}$           | $5,56 10^{-2}$ | -0,9884 | 9   |
| 0,24                   | 0,06                                | 0,30                   | $-(8,79 \pm 1,52) 10^{-2}$          | $(2,44 \pm 0,42) 10^{-5}$           | $6,22 10^{-2}$ | -0,9813 | 8   |
| 0,16                   | 0,04                                | 0,20                   | $-(7,82 \pm 2,02) 10^{-2}$          | $(2,17 \pm 0,56) 10^{-5}$           | $7,26 10^{-2}$ | -0,9831 | 6   |
| 0,08                   | 0,02                                | 0,10                   | $-(7,03 \pm 1,51) 10^{-2}$          | $(1,95 \pm 0,42) \cdot 10^{-5}$     | $6,39 10^{-2}$ | -0,9722 | 9   |
| pH 4,52                |                                     |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,24                   | 0,16                                | 0,40                   | $-(14,5 \pm 1,1) 10^{-2}$           | $(4,04 \pm 0,29) 10^{-5}$           | $4,67 10^{-2}$ | -0,9954 | 11  |
| 0,18                   | 0,12                                | 0,30                   | $-(11,6 \pm 0,8) 10^{-2}$           | $(3,22 \pm 0,22) 10^{-5}$           | $3,48 10^{-2}$ | -0,9960 | 11  |
| 0,12                   | 0,08                                | 0,20                   | $-(8,98 \pm 0,97) 10^{-2}$          | $(2,49 \pm 0,27) 10^{-5}$           | $4,27 10^{-2}$ | -0,9899 | 11  |
| 0,06                   | 0,04                                | 0,10                   | $-(6,99 \pm 2,01) 10^{-2}$          | $(1,94 \pm 0,56) \cdot 10^{-5}$     | $8,71 10^{-2}$ | -0,9431 | 10  |
| pH 5,11                |                                     |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,12                   | 0,28                                | 0,40                   | $-(30,3 \pm 3,4) 10^{-2}$           | $(8,43 \pm 0,94) 10^{-5}$           | $1,43 10^{-2}$ | -0,9922 | 9   |
| 0,09                   | 0,21                                | 0,30                   | $-(26,3 \pm 4,5) 10^{-2}$           | $(7,30 \pm 1,24) 10^{-5}$           | $1,89 10^{-2}$ | -0,9824 | 9   |
| 0,06                   | 0,14                                | 0,20                   | $-(15,5 \pm 2,6) 10^{-2}$           | $(4,32 \pm 0,72) 10^{-5}$           | $1,85 10^{-2}$ | -0,9764 | 11  |
| 0,03                   | 0,07                                | 0,10                   | $-(14,4 \pm 3,0) 10^{-2}$           | $(3,99 \pm 0,84) \cdot 10^{-5}$     | $1,24 10^{-2}$ | -0,9784 | 8   |
| pH ok. 5,5             |                                     |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,04                   | 0,36                                | 0,40                   | $-(37,4 \pm 4,6) 10^{-2}$           | $(10,4 \pm 1,0) 10^{-5}$            | $1,95 10^{-2}$ | -0,9906 | 9   |
| 0,03                   | 0,27                                | 0,30                   | $-(35,0 \pm 8,7) 10^{-2}$           | $(9,71 \pm 2,41) 10^{-5}$           | $3,38 10^{-2}$ | -0,9774 | 7   |
| 0,02                   | 0,18                                | 0,20                   | $-(33,7 \pm 3,8) 10^{-2}$           | $(9,36 \pm 1,07) 10^{-5}$           | $1,57 10^{-2}$ | -0,9935 | 8   |
| 0,01                   | 0,09                                | 0,10                   | $-(19,1 \pm 4,1) 10^{-2}$           | $(5,51 \pm 1,15) \cdot 10^{-6}$     | $1,80 10^{-2}$ | -0,9665 | 10  |



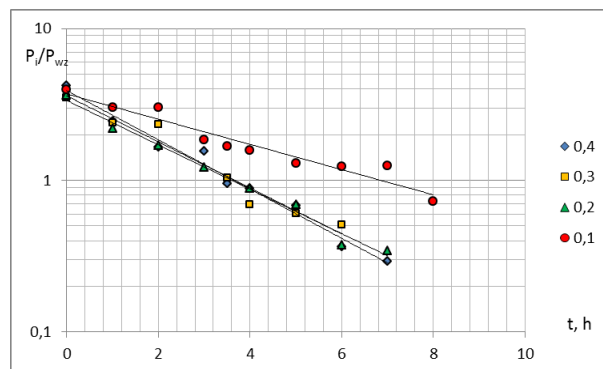
A



B



C



D

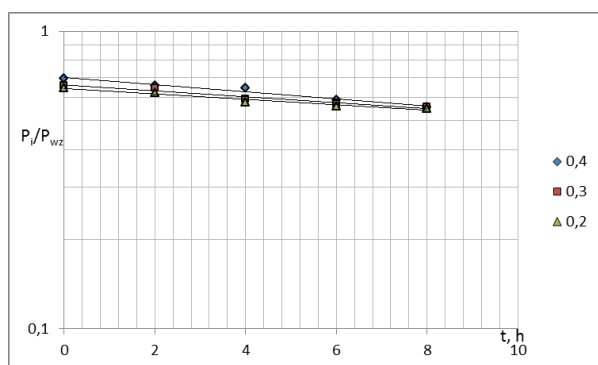
Rycina 19.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym o pH 4,08 (A), 4,52 (B), 5,11 (C) i 5,62 (D) w temperaturze 363 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

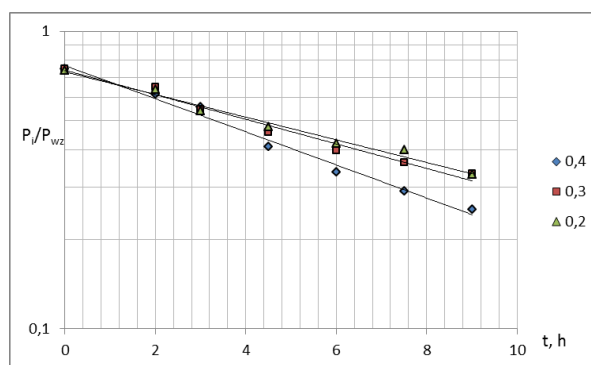
Tabela 23.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym w temperaturze 353 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

| Warunki reakcji        |                                     |                        | Parametry kinetyczne                 |                                      |                |         |     |
|------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------|---------|-----|
|                        |                                     |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [CH <sub>3</sub> COOH] | [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |                                      |                                      |                |         |     |
| pH 4,02                |                                     |                        |                                      |                                      |                |         |     |
| 0,32                   | 0,08                                | 0,40                   | $-(2,76 \pm 0,89) 10^{-2}$           | $(7,66 \pm 2,48) 10^{-6}$            | $2,81 10^{-3}$ | -0,9848 | 5   |
| 0,24                   | 0,06                                | 0,30                   | $-(2,29 \pm 1,01) 10^{-2}$           | $(6,26 \pm 2,82) 10^{-6}$            | $3,19 10^{-3}$ | -0,9721 | 5   |
| 0,16                   | 0,04                                | 0,20                   | $-(2,10 \pm 0,76) 10^{-2}$           | $(5,83 \pm 2,11) 10^{-6}$            | $2,39 10^{-3}$ | -0,9811 | 5   |
| pH 5,01                |                                     |                        |                                      |                                      |                |         |     |
| 0,12                   | 0,28                                | 0,40                   | $-(12,8 \pm 1,7) 10^{-2}$            | $(3,56 \pm 0,47) 10^{-5}$            | $6,62 10^{-3}$ | -0,9934 | 7   |
| 0,09                   | 0,21                                | 0,30                   | $-(9,51 \pm 1,65) 10^{-2}$           | $(2,64 \pm 0,46) 10^{-5}$            | $6,43 10^{-3}$ | -0,9888 | 7   |
| 0,06                   | 0,14                                | 0,20                   | $-(8,77 \pm 1,32) 10^{-2}$           | $(2,44 \pm 0,37) 10^{-5}$            | $5,12 10^{-3}$ | -0,9916 | 7   |



A



B

Rycina 20.

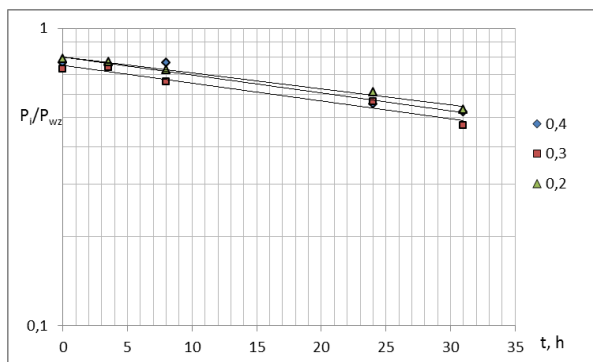
Półlogarytmiczne wykresy  $P_1/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym o pH 4,02 (A) i 5,01 (B) w temperaturze 353 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).



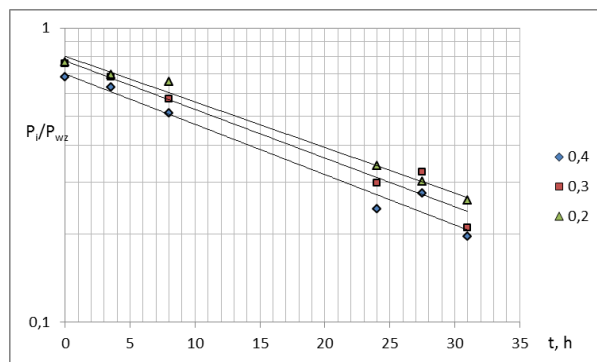
Tabela 24.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym w temperaturze 343 K,  $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ 

| Warunki reakcji        |                                     |                        | Parametry kinetyczne                     |  |                 |         |     |
|------------------------|-------------------------------------|------------------------|--|--|-----------------|---------|-----|
|                        |                                     |                        | $a \pm \Delta a \text{ [h}^{-1}\text{]}$ | $k \pm \Delta k \text{ [s}^{-1}\text{]}$ | $S_a$           | $r$     | $n$ |
| [CH <sub>3</sub> COOH] | [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |  |  |                 |         |     |
| pH 4,01                |                                     |                        |  |  |                 |         |     |
| 0,32                   | 0,08                                | 0,40                   | $-(1,39 \pm 0,60) 10^{-2}$               | $(3,85 \pm 2,48) 10^{-6}$                | $1,87 10^{-3}$  | -0,9738 | 5   |
| 0,24                   | 0,06                                | 0,30                   | $-(1,38 \pm 0,50) 10^{-2}$               | $(3,83 \pm 1,48) 10^{-6}$                | $1,67 10^{-3}$  | -0,9786 | 5   |
| 0,16                   | 0,04                                | 0,20                   | $-(1,24 \pm 0,2) 10^{-2}$                | $(3,43 \pm 0,51) 10^{-6}$                | $0,754 10^{-3}$ | -0,9945 | 5   |
| pH 5,01                |                                     |                        |  |  |                 |         |     |
| 0,12                   | 0,28                                | 0,40                   | $-(3,94 \pm 0,92) 10^{-2}$               | $(1,09 \pm 0,25) 10^{-5}$                | $3,32 10^{-3}$  | -0,9860 | 6   |
| 0,09                   | 0,21                                | 0,30                   | $-(3,81 \pm 1,02) 10^{-2}$               | $(1,06 \pm 0,28) 10^{-5}$                | $3,68 10^{-3}$  | -0,9818 | 6   |
| 0,06                   | 0,14                                | 0,20                   | $-(3,57 \pm 0,46) 10^{-2}$               | $(9,91 \pm 1,28) 10^{-6}$                | $1,66 10^{-3}$  | -0,9957 | 6   |



A



B

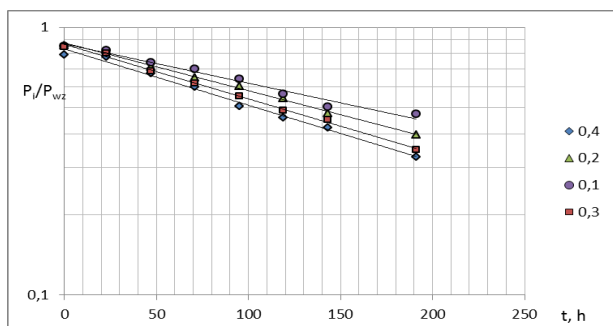
Rycina 21.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym o pH 4,01 (A) i 5,01 (B) w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

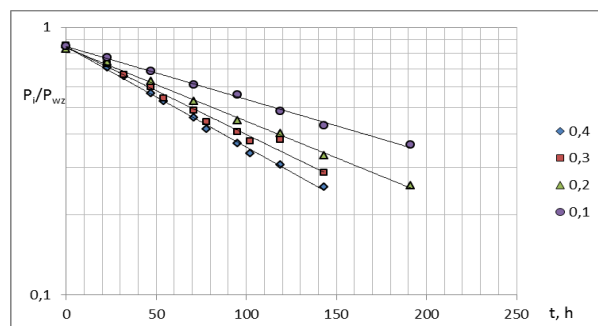
Tabela 25.

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

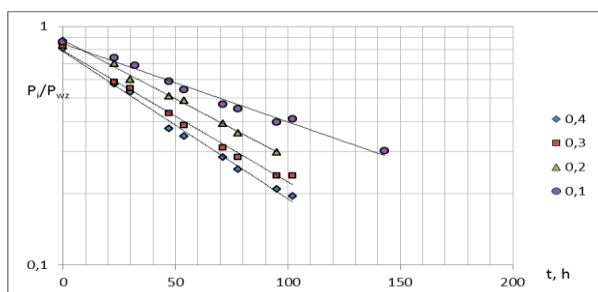
| Warunki reakcji        |                                     |                        | Parametry kinetyczne                |                                     |                |         |     |
|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|---------|-----|
|                        |                                     |                        | $a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ] | $k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [CH <sub>3</sub> COOH] | [CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |                                     |                                     |                |         |     |
| pH 4,41                |                                     |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,32                   | 0,08                                | 0,40                   | $-(4,84 \pm 0,47) 10^{-3}$          | $(1,34 \pm 0,13) 10^{-6}$           | $1,93 10^{-4}$ | -0,9952 | 8   |
| 0,24                   | 0,06                                | 0,30                   | $-(4,69 \pm 0,28) 10^{-3}$          | $(1,30 \pm 0,08) 10^{-6}$           | $1,13 10^{-4}$ | -0,9983 | 8   |
| 0,16                   | 0,04                                | 0,20                   | $-(4,12 \pm 0,27) 10^{-3}$          | $(1,14 \pm 0,07) 10^{-6}$           | $1,13 10^{-4}$ | -0,9977 | 8   |
| 0,08                   | 0,02                                | 0,10                   | $-(3,38 \pm 0,52) 10^{-3}$          | $(0,938 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$    | $2,14 10^{-4}$ | -0,9882 | 8   |
| pH 4,75                |                                     |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,24                   | 0,16                                | 0,40                   | $-(8,62 \pm 0,37) 10^{-3}$          | $(2,40 \pm 0,10) 10^{-6}$           | $1,66 10^{-4}$ | -0,9983 | 11  |
| 0,18                   | 0,12                                | 0,30                   | $-(7,53 \pm 0,71) 10^{-3}$          | $(2,09 \pm 0,20) 10^{-6}$           | $3,13 10^{-4}$ | -0,9923 | 11  |
| 0,12                   | 0,08                                | 0,20                   | $-(6,40 \pm 0,30) 10^{-3}$          | $(1,75 \pm 0,08) 10^{-6}$           | $1,22 10^{-4}$ | -0,9989 | 8   |
| 0,06                   | 0,04                                | 0,10                   | $-(4,55 \pm 0,26) 10^{-3}$          | $(1,26 \pm 0,07) \cdot 10^{-6}$     | $1,06 10^{-4}$ | -0,9984 | 8   |
| pH 5,42                |                                     |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,12                   | 0,28                                | 0,40                   | $-(1,42 \pm 0,11) 10^{-2}$          | $(3,95 \pm 0,31) 10^{-6}$           | $4,70 10^{-4}$ | -0,9962 | 9   |
| 0,09                   | 0,21                                | 0,30                   | $-(1,27 \pm 0,11) 10^{-2}$          | $(3,52 \pm 0,30) 10^{-6}$           | $4,69 10^{-4}$ | -0,9952 | 9   |
| 0,06                   | 0,14                                | 0,20                   | $-(1,13 \pm 0,07) 10^{-2}$          | $(3,15 \pm 0,20) 10^{-6}$           | $2,96 10^{-4}$ | -0,9980 | 8   |
| 0,03                   | 0,07                                | 0,10                   | $-(0,755 \pm 0,075) 10^{-2}$        | $(2,10 \pm 0,21) \cdot 10^{-6}$     | $3,25 10^{-4}$ | -0,9927 | 10  |
| pH ok. 5,89            |                                     |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,04                   | 0,36                                | 0,40                   | $-(1,77 \pm 0,24) 10^{-2}$          | $(4,92 \pm 0,67) 10^{-6}$           | $9,81 10^{-4}$ | -0,9909 | 8   |
| 0,03                   | 0,27                                | 0,30                   | $-(1,72 \pm 0,16) 10^{-2}$          | $(4,77 \pm 0,46) 10^{-6}$           | $6,73 10^{-4}$ | -0,9955 | 8   |
| 0,02                   | 0,18                                | 0,20                   | $-(1,50 \pm 0,10) 10^{-2}$          | $(4,17 \pm 0,28) 10^{-6}$           | $4,05 10^{-4}$ | -0,9978 | 8   |
| 0,01                   | 0,09                                | 0,10                   | $-(1,17 \pm 0,08) 10^{-2}$          | $(3,24 \pm 0,24) \cdot 10^{-6}$     | $3,72 10^{-4}$ | -0,9965 | 9   |



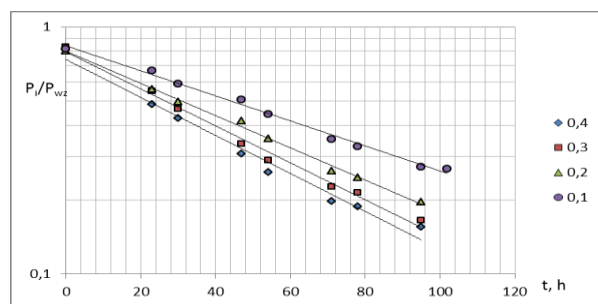
A



B



C



D

Rycina 22.

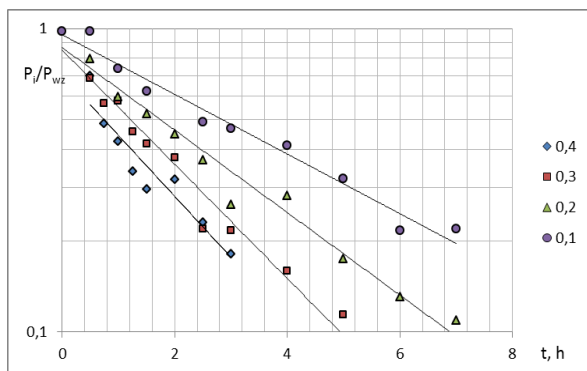
Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym o pH 4,41 (A), 4,75 (B), 5,42 (C) i 5,89 (D) w temperaturze 333 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w zakresie pH 5,91 – 7,45

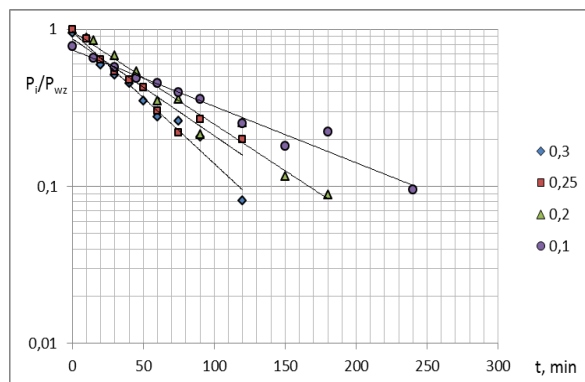
Tabela 26.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w temperaturze 363 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

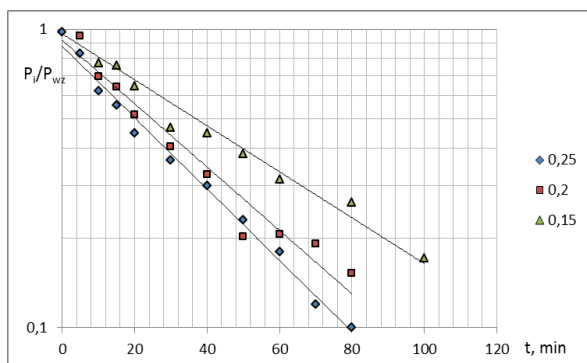
| Warunki reakcji                   |                                   |                        | Parametry kinetyczne                |                                     |                 |         |     |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|---------|-----|
|                                   |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ] | $k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ] | $S_a$           | $r$     | $n$ |
| [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] | [HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] | B <sub>T</sub> , mol/l |                                     |                                     |                 |         |     |
| pH 5,98                           |                                   |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,34                              | 0,06                              | 0,40                   | $-(46,3 \pm 15,2) 10^{-2}$          | $(1,29 \pm 0,42) 10^{-4}$           | $6,23 10^{-2}$  | -0,9497 | 8   |
| 0,25                              | 0,05                              | 0,30                   | $-(43,3 \pm 6,8) 10^{-2}$           | $(1,20 \pm 0,19) 10^{-4}$           | $2,30 10^{-2}$  | -0,9791 | 11  |
| 0,17                              | 0,03                              | 0,20                   | $-(31,3 \pm 4,0) 10^{-2}$           | $(8,70 \pm 1,10) 10^{-5}$           | $1,75 10^{-2}$  | -0,9862 | 11  |
| 0,085                             | 0,015                             | 0,10                   | $-(22,6 \pm 3,0) 10^{-2}$           | $(6,29 \pm 0,84) \cdot 10^{-5}$     | $1,31 10^{-2}$  | -0,9867 | 10  |
| pH 6,27                           |                                   |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,21                              | 0,09                              | 0,30                   | $-(1,93 \pm 0,25) 10^{-2}$          | $(3,22 \pm 0,42) 10^{-4}$           | $1,09 10^{-3}$  | -0,9875 | 10  |
| 0,175                             | 0,075                             | 0,25                   | $-(1,46 \pm 0,31) 10^{-2}$          | $(2,44 \pm 0,52) 10^{-4}$           | $1,38 10^{-3}$  | -0,9624 | 11  |
| 0,14                              | 0,06                              | 0,20                   | $-(1,36 \pm 0,22) 10^{-2}$          | $(2,27 \pm 0,36) 10^{-4}$           | $0,949 10^{-3}$ | -0,9811 | 10  |
| 0,07                              | 0,03                              | 0,10                   | $-(0,826 \pm 0,113) 10^{-2}$        | $(1,38 \pm 0,19) \cdot 10^{-4}$     | $0,499 10^{-3}$ | -0,9840 | 11  |
| pH 6,95                           |                                   |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,10                              | 0,15                              | 0,25                   | $-(2,75 \pm 0,20) 10^{-2}$          | $(4,55 \pm 0,34) 10^{-4}$           | $0,895 10^{-3}$ | -0,9953 | 11  |
| 0,08                              | 0,12                              | 0,20                   | $-(2,44 \pm 0,38) 10^{-2}$          | $(4,07 \pm 0,64) 10^{-4}$           | $1,69 10^{-3}$  | -0,9792 | 11  |
| 0,06                              | 0,09                              | 0,15                   | $-(1,77 \pm 0,23) 10^{-2}$          | $(2,96 \pm 0,38) 10^{-4}$           | $1,02 10^{-3}$  | -0,9855 | 11  |
| pH 7,22                           |                                   |                        |                                     |                                     |                 |         |     |
| 0,04                              | 0,16                              | 0,20                   | $-(4,30 \pm 0,41) 10^{-2}$          | $(7,17 \pm 0,69) 10^{-4}$           | $1,84 10^{-3}$  | -0,9918 | 11  |
| 0,03                              | 0,12                              | 0,15                   | $-(3,61 \pm 0,44) 10^{-2}$          | $(6,02 \pm 0,73) 10^{-4}$           | $1,93 10^{-3}$  | -0,9874 | 11  |
| 0,02                              | 0,08                              | 0,10                   | $-(3,04 \pm 0,31) 10^{-2}$          | $(5,14 \pm 0,52) 10^{-4}$           | $1,39 10^{-3}$  | -0,9910 | 11  |
| 0,01                              | 0,04                              | 0,05                   | $-(1,90 \pm 0,15) 10^{-2}$          | $(3,16 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$     | $0,672 10^{-3}$ | -0,9950 | 10  |



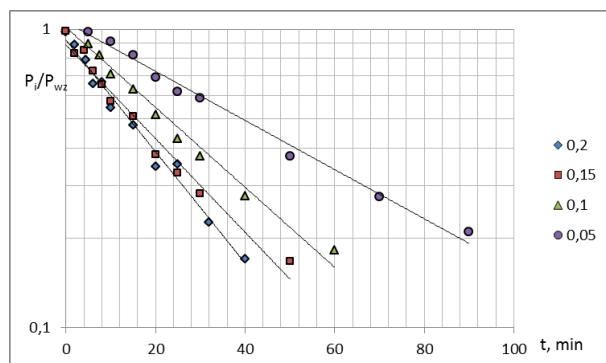
A



B



C



D

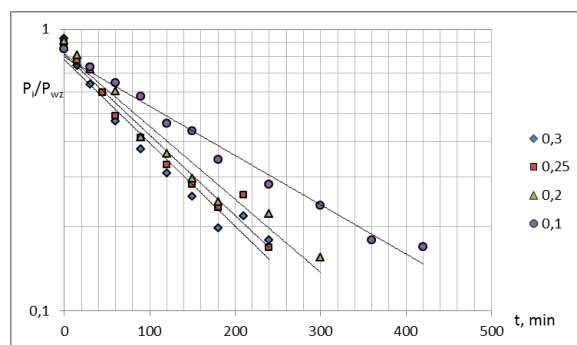
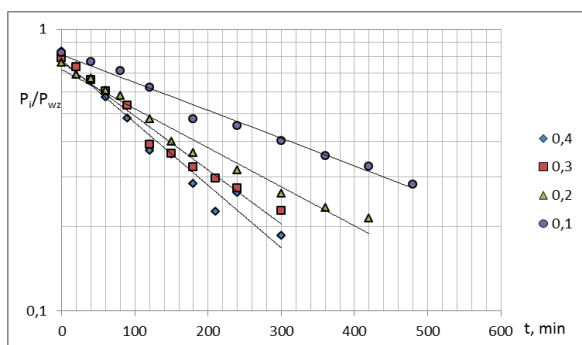
Rycina 23.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 5,98 (A), 6,27 (B), 6,95 (C) i 7,22 (D) w temperaturze 363 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 27.

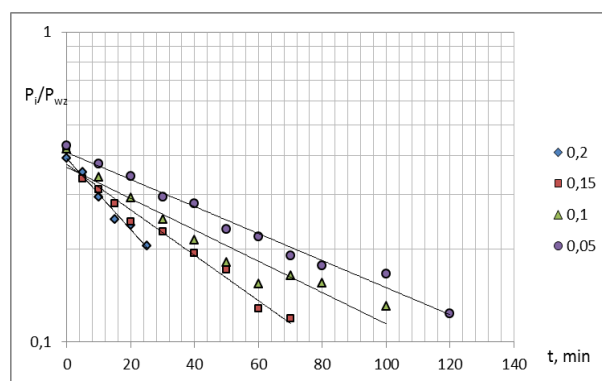
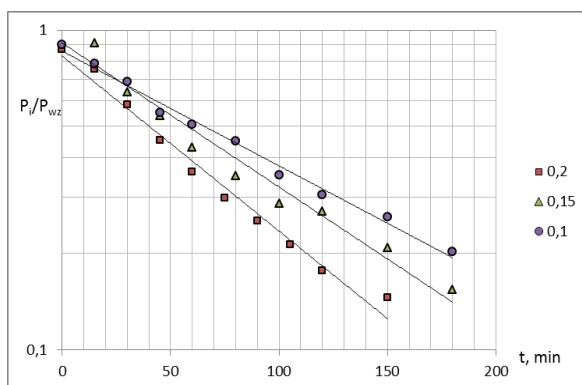
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w temperaturze 353 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

| Warunki reakcji                   |                                   |                        | Parametry kinetyczne                   |                                      |                |         |     |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|--|--------------------------------------|----------------|---------|-----|
|                                   |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ]   | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] | [HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |  |                                      |                |         |     |
| pH 5,91                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
| 0,34                              | 0,06                              | 0,40                   | $-(5,11 \pm 0,80) 10^{-3}$             | $(8,52 \pm 1,34) 10^{-5}$            | $3,28 10^{-4}$ | -0,9817 | 11  |
| 0,25                              | 0,05                              | 0,30                   | $-(4,41 \pm 0,56) 10^{-3}$             | $(7,34 \pm 0,94) 10^{-5}$            | $2,49 10^{-4}$ | -0,9859 | 11  |
| 0,17                              | 0,03                              | 0,20                   | $-(3,19 \pm 0,36) 10^{-3}$             | $(5,32 \pm 0,60) 10^{-5}$            | $1,60 10^{-4}$ | -0,9876 | 12  |
| 0,085                             | 0,015                             | 0,10                   | $-(2,27 \pm 0,24) 10^{-3}$             | $(3,78 \pm 0,41) \cdot 10^{-5}$      | $1,06 10^{-4}$ | -0,9915 | 10  |
| pH 6,33                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
|                                   |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| 0,21                              | 0,09                              | 0,30                   | $-(6,80 \pm 0,11) 10^{-3}$             | $(1,13 \pm 0,19) 10^{-4}$            | $4,92 10^{-4}$ | -0,9772 | 11  |
| 0,175                             | 0,075                             | 0,25                   | $-(6,56 \pm 0,98) 10^{-3}$             | $(1,09 \pm 0,16) 10^{-4}$            | $4,33 10^{-4}$ | -0,9810 | 11  |
| 0,14                              | 0,06                              | 0,20                   | $-(5,96 \pm 0,94) 10^{-3}$             | $(9,93 \pm 1,56) 10^{-5}$            | $4,07 10^{-4}$ | -0,9818 | 10  |
| 0,07                              | 0,03                              | 0,10                   | $-(4,02 \pm 0,40) 10^{-3}$             | $(6,71 \pm 0,66) \cdot 10^{-5}$      | $1,75 10^{-4}$ | -0,9916 | 11  |
| pH 6,92                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
| 0,08                              | 0,12                              | 0,20                   | $-(1,25 \pm 0,25) 10^{-2}$             | $(2,08 \pm 0,41) 10^{-4}$            | $1,09 10^{-3}$ | -0,9708 | 10  |
| 0,06                              | 0,09                              | 0,15                   | $-(1,04 \pm 0,15) 10^{-2}$             | $(1,73 \pm 0,25) 10^{-4}$            | $6,56 10^{-4}$ | -0,9844 | 10  |
| 0,04                              | 0,06                              | 0,10                   | $-(0,827 \pm 0,065) 10^{-2}$           | $(1,38 \pm 0,11) 10^{-4}$            | $2,81 10^{-4}$ | -0,9954 | 10  |
| pH 7,28                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
| 0,04                              | 0,16                              | 0,20                   | $-(2,64 \pm 0,49) 10^{-2}$             | $(4,39 \pm 0,82) 10^{-4}$            | $1,76 10^{-3}$ | -0,9912 | 6   |
| 0,03                              | 0,12                              | 0,15                   | $-(1,69 \pm 0,20) 10^{-2}$             | $(2,81 \pm 0,34) 10^{-4}$            | $8,76 10^{-4}$ | -0,9894 | 10  |
| 0,02                              | 0,08                              | 0,10                   | $-(1,16 \pm 0,26) 10^{-2}$             | $(1,94 \pm 0,43) 10^{-4}$            | $1,12 10^{-3}$ | -0,9652 | 10  |
| 0,01                              | 0,04                              | 0,05                   | $-(1,00 \pm 0,11) 10^{-2}$             | $(1,67 \pm 0,17) \cdot 10^{-4}$      | $4,50 10^{-4}$ | -0,9911 | 11  |



A

B



C

D

Rycina 24.

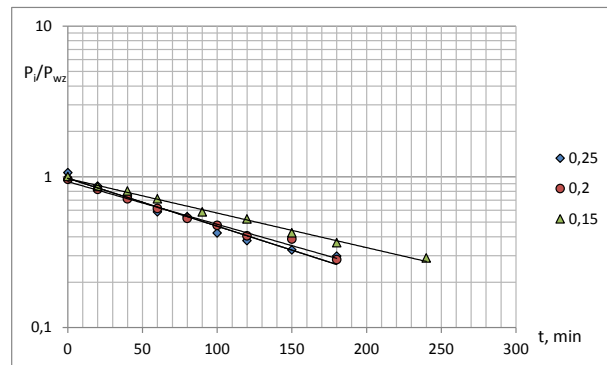
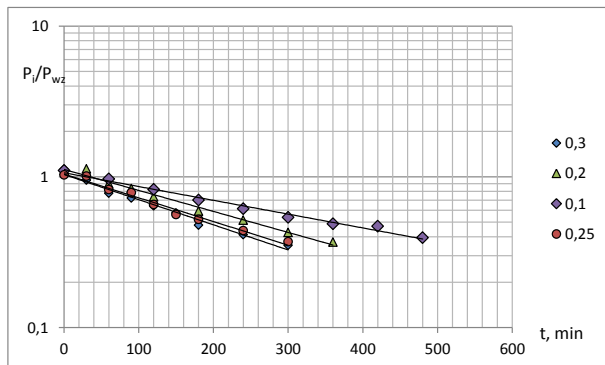
Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 5,91 (A), 6,33 (B), 6,92 (C) i 7,28 (D) w temperaturze 353 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 28.

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

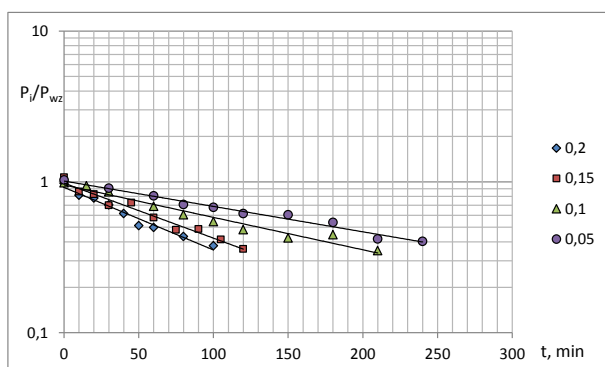
| Warunki reakcji                   |                                   |                        | Parametry kinetyczne                   |                                      |                |         |     |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|--|--------------------------------------|----------------|---------|-----|
|                                   |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ]   | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] | [HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |  |                                      |                |         |     |
| pH 6,47                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
|                                   |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| 0,21                              | 0,09                              | 0,30                   | $-(3,84 \pm 0,48) 10^{-3}$             | $(6,40 \pm 0,81) 10^{-5}$            | $2,05 10^{-4}$ | -0,9902 | 9   |
| 0,175                             | 0,075                             | 0,25                   | $-(3,62 \pm 0,45) 10^{-3}$             | $(6,03 \pm 0,75) 10^{-5}$            | $1,90 10^{-4}$ | -0,9905 | 9   |
| 0,14                              | 0,06                              | 0,20                   | $-(5,96 \pm 0,94) 10^{-3}$             | $(9,93 \pm 1,56) 10^{-5}$            | $4,07 10^{-4}$ | -0,9818 | 10  |
| 0,07                              | 0,03                              | 0,10                   | $-(4,02 \pm 0,40) 10^{-3}$             | $(6,71 \pm 0,66) \cdot 10^{-5}$      | $1,75 10^{-4}$ | -0,9916 | 11  |
| pH 6,86                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
| 0,08                              | 0,12                              | 0,20                   | $-(1,25 \pm 0,25) 10^{-2}$             | $(2,08 \pm 0,41) 10^{-4}$            | $1,09 10^{-3}$ | -0,9708 | 10  |
| 0,06                              | 0,09                              | 0,15                   | $-(1,04 \pm 0,15) 10^{-2}$             | $(1,73 \pm 0,25) 10^{-4}$            | $6,56 10^{-4}$ | -0,9844 | 10  |
| 0,04                              | 0,6                               | 0,10                   | $-(0,827 \pm 0,065) 10^{-2}$           | $(1,38 \pm 0,11) 10^{-4}$            | $2,81 10^{-4}$ | -0,9954 | 10  |
| pH 7,25                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
| 0,04                              | 0,16                              | 0,20                   | $-(2,64 \pm 0,49) 10^{-2}$             | $(4,39 \pm 0,82) 10^{-4}$            | $1,76 10^{-3}$ | -0,9912 | 6   |
| 0,03                              | 0,12                              | 0,15                   | $-(1,69 \pm 0,20) 10^{-2}$             | $(2,81 \pm 0,34) 10^{-4}$            | $8,76 10^{-4}$ | -0,9894 | 10  |
| 0,02                              | 0,08                              | 0,10                   | $-(1,16 \pm 0,26) 10^{-2}$             | $(1,94 \pm 0,43) 10^{-4}$            | $1,12 10^{-3}$ | -0,9652 | 10  |
| 0,01                              | 0,04                              | 0,05                   | $-(1,00 \pm 0,11) 10^{-2}$             | $(1,67 \pm 0,17) \cdot 10^{-4}$      | $4,50 10^{-4}$ | -0,9911 | 11  |





A

B



C

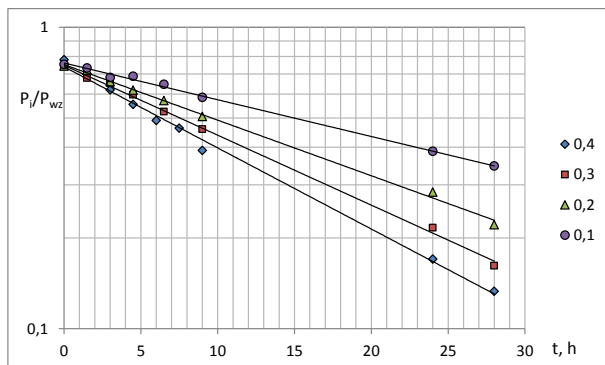
Rycina 25.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 6,47 (A), 6,86 (B) i 7,25 (C) w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

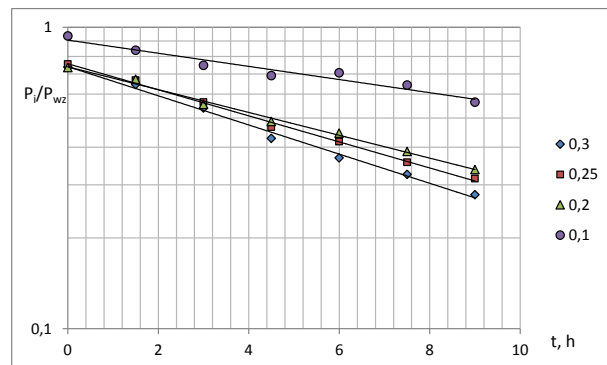
Tabela 29.

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

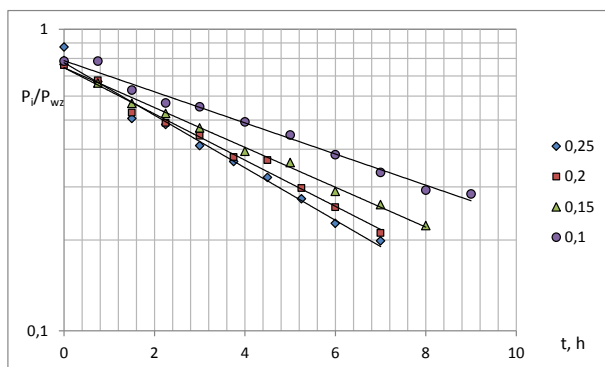
| Warunki reakcji                   |                                   |                        | Parametry kinetyczne                   |                                      |                |         |     |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|--|--------------------------------------|----------------|---------|-----|
|                                   |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ]   | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] | [HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |  |                                      |                |         |     |
| pH 6,18                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
| 0,34                              | 0,06                              | 0,40                   | $-(6,20 \pm 0,37) 10^{-2}$             | $(1,72 \pm 0,10) 10^{-5}$            | $15,5 10^{-4}$ | -0,9978 | 9   |
| 0,25                              | 0,05                              | 0,30                   | $-(5,34 \pm 0,23) 10^{-2}$             | $(1,48 \pm 0,06) 10^{-5}$            | $9,48 10^{-4}$ | -0,9991 | 8   |
| 0,17                              | 0,03                              | 0,20                   | $-(4,24 \pm 0,22) 10^{-2}$             | $(1,18 \pm 0,06) 10^{-5}$            | $9,19 10^{-4}$ | -0,9986 | 8   |
| 0,085                             | 0,015                             | 0,10                   | $-(22,6 \pm 3,0) 10^{-2}$              | $(0,780 \pm 0,043) \cdot 10^{-5}$    | $6,39 10^{-4}$ | -0,9885 | 8   |
| pH 6,59                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
|                                   |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| 0,21                              | 0,09                              | 0,30                   | $-(11,1 \pm 1,0) 10^{-2}$              | $(3,09 \pm 0,27) 10^{-5}$            | $4,02 10^{-2}$ | -0,9968 | 7   |
| 0,175                             | 0,075                             | 0,25                   | $-(9,95 \pm 0,69) 10^{-2}$             | $(2,76 \pm 0,19) 10^{-5}$            | $2,69 10^{-3}$ | -0,9982 | 7   |
| 0,14                              | 0,06                              | 0,20                   | $-(8,72 \pm 0,78) 10^{-2}$             | $(2,42 \pm 0,22) 10^{-5}$            | $3,03 10^{-3}$ | -0,9970 | 7   |
| 0,07                              | 0,03                              | 0,10                   | $-(5,02 \pm 1,38) 10^{-2}$             | $(1,39 \pm 0,38) \cdot 10^{-5}$      | $5,37 10^{-3}$ | -0,9726 | 7   |
| pH 7,15                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
| 0,10                              | 0,15                              | 0,25                   | $-(0,200 \pm 0,022)$                   | $(5,57 \pm 0,61) 10^{-5}$            | $9,54 10^{-3}$ | -0,9911 | 10  |
| 0,08                              | 0,12                              | 0,20                   | $-(0,176 \pm 0,016)$                   | $(4,90 \pm 0,43) 10^{-5}$            | $6,78 10^{-3}$ | -0,9941 | 10  |
| 0,06                              | 0,09                              | 0,15                   | $-(0,152 \pm 0,009)$                   | $(4,22 \pm 0,26) 10^{-5}$            | $4,07 10^{-3}$ | -0,9971 | 10  |
|                                   |                                   |                        | $-(0,119 \pm 0,011) 10^{-2}$           | $(3,30 \pm 0,29) \cdot 10^{-5}$      | $4,69 10^{-3}$ | -0,9931 | 11  |
| pH 7,45                           |                                   |                        |  |                                      |                |         |     |
| 0,04                              | 0,16                              | 0,20                   | $-(0,237 \pm 0,033)$                   | $(6,59 \pm 0,96) 10^{-5}$            | $1,41 10^{-2}$ | -0,9879 | 9   |
| 0,03                              | 0,12                              | 0,15                   | $-(0,202 \pm 0,026)$                   | $(5,62 \pm 0,72) 10^{-5}$            | $1,10 10^{-2}$ | -0,9899 | 9   |
| 0,02                              | 0,08                              | 0,10                   | $-(0,168 \pm 0,015)$                   | $(4,66 \pm 0,42) 10^{-5}$            | $6,41 10^{-3}$ | -0,9949 | 9   |
| 0,01                              | 0,04                              | 0,05                   | $-(0,109 \pm 0,010)$                   | $(3,05 \pm 0,31) \cdot 10^{-5}$      | $4,51 10^{-3}$ | -0,9933 | 10  |



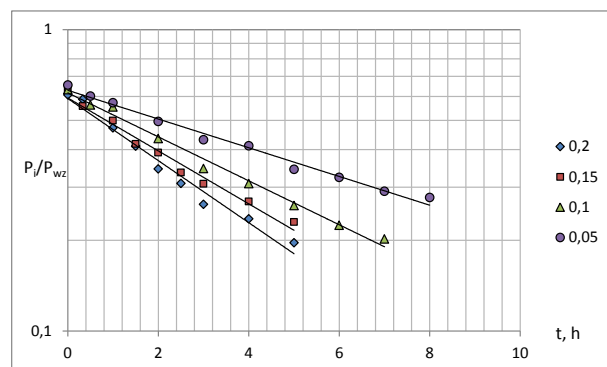
A



B



C



D

Rycina 26.

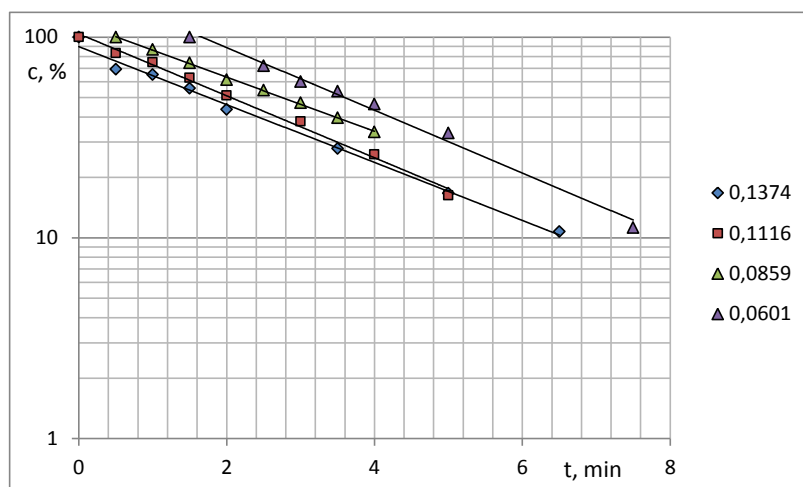
Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym o pH 6,18 (A), 6,59 (B), 7,15 (C) i 7,45 (D) w temperaturze 333 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym w zakresie pH 7,66 – 9,89*

Tabela 30.

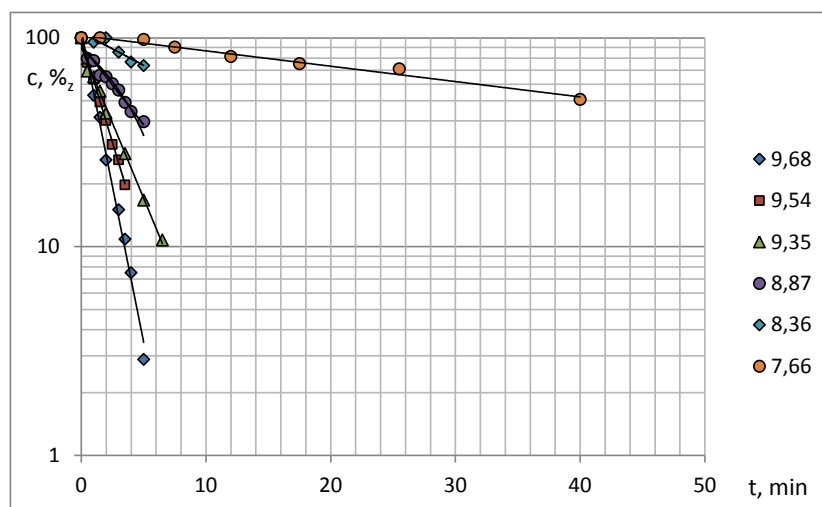
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym w temperaturze 353 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

| Warunki reakcji      |                                   |                        | Parametry kinetyczne                |                                     |                |         |     |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|---------|-----|
|                      |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ] | $k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [NaBO <sub>2</sub> ] | [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |                                     |                                     |                |         |     |
| pH 9,35              |                                   |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,1026               | 0,03475                           | 0,13735                | $-(0,3321 \pm 0,0266)$              | $(5,54 \pm 0,44) 10^{-3}$           | $1,09 10^{-2}$ | -0,9968 | 8   |
| 0,0834               | 0,02824                           | 0,11162                | $-(0,3553 \pm 0,0276)$              | $(5,92 \pm 0,46) 10^{-3}$           | $1,13 10^{-2}$ | -0,9970 | 8   |
| 0,06414              | 0,02172                           | 0,08586                | $-(0,3101 \pm 0,0119)$              | $(5,17 \pm 0,20) 10^{-5}$           | $4,86 10^{-3}$ | -0,9993 | 8   |
| 0,04490              | 0,01520                           | 0,06010                | $-(0,3598 \pm 0,0412)$              | $(5,99 \pm 0,69) \cdot 10^{-5}$     | $1,60 10^{-2}$ | -0,9951 | 7   |
| pH 7,66              |                                   |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,01415              | 0,1517                            | 0,16585                | $-(1,693 \pm 0,253) 10^{-2}$        | $(2,82 \pm 0,42) 10^{-4}$           | $1,03 10^{-3}$ | -0,9890 | 8   |
| pH 8,36              |                                   |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,03341              | 0,1132                            | 0,14661                | $-(7,249 \pm 3,138) 10^{-2}$        | $(1,21 \pm 0,53) 10^{-3}$           | $1,22 10^{-2}$ | -0,9355 | 7   |
| pH 8,87              |                                   |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,05861              | 0,06278                           | 0,12139                | $-(0,1750 \pm 0,0231)$              | $(2,92 \pm 0,39) 10^{-3}$           | $1,00 10^{-2}$ | -0,9871 | 10  |
| pH 9,54              |                                   |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,08543              | 0,009144                          | 0,09457                | $-(0,4551 \pm 0,0181)$              | $(7,59 \pm 0,30) 10^{-3}$           | $7,40 10^{-3}$ | -0,9992 | 8   |
| pH 9,68              |                                   |                        |                                     |                                     |                |         |     |
| 0,09563              | 0,003744                          | 0,09937                | $-(0,6860 \pm 0,0514)$              | $(1,14 \pm 0,09) 10^{-2}$           | $2,18 10^{-2}$ | -0,9965 | 9   |



Rycina 27.

Półlogarytmiczne wykresy  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym o pH 9,35 w temperaturze 353 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).



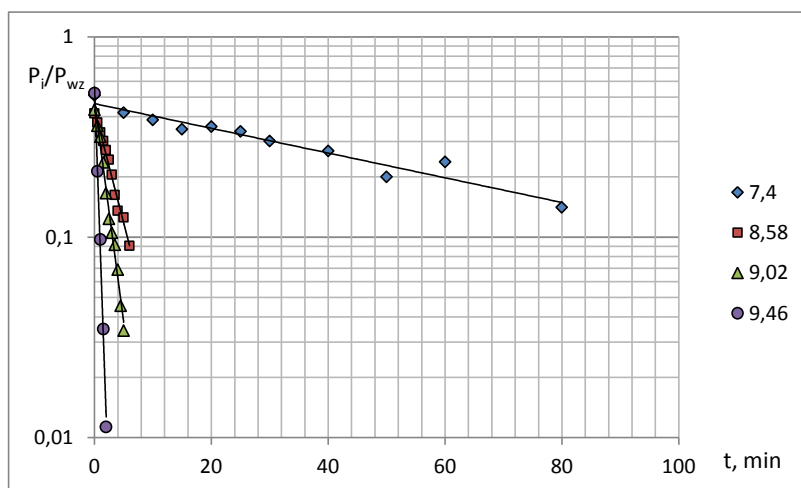
Rycina 28.

Półlogarytmiczne wykresy  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym o pH 9,68, 9,54, 9,35, 8,87, 8,36 i 7,66 w temperaturze 353 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 31.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym w temperaturze 363 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

| Warunki reakcji      |                                   |                        | Parametry kinetyczne                   |                                      |                      |         |     |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------|--|--------------------------------------|----------------------|---------|-----|
|                      |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$                | $r$     | $n$ |
| [NaBO <sub>2</sub> ] | [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |  |                                      |                      |         |     |
| pH 7,40              |                                   |                        |  |                                      |                      |         |     |
| 0,01415              | 0,1517                            | 0,16585                | $-(1,42 \pm 0,26) \cdot 10^{-2}$       | $(2,40 \pm 0,44) \cdot 10^{-3}$      | $1,16 \cdot 10^{-3}$ | -0,9713 | 11  |
| pH 8,58              |                                   |                        |  |                                      |                      |         |     |
| 0,03341              | 0,1132                            | 0,14661                | $-(0,260 \pm 0,024)$                   | $(4,34 \pm 0,40) \cdot 10^{-3}$      | $1,07 \cdot 10^{-2}$ | -0,9925 | 11  |
| pH 9,02              |                                   |                        |  |                                      |                      |         |     |
| 0,05861              | 0,06278                           | 0,12139                | $-(0,507 \pm 0,038)$                   | $(8,45 \pm 0,64) \cdot 10^{-3}$      | $1,69 \cdot 10^{-2}$ | -0,9951 | 11  |
| pH 9,46              |                                   |                        |  |                                      |                      |         |     |
| 0,08338              | 0,02824                           | 0,11162                | $-(1,90 \pm 0,24)$                     | $(3,12 \pm 0,40) \cdot 10^{-2}$      | $7,60 \cdot 10^{-2}$ | -0,9976 | 5   |



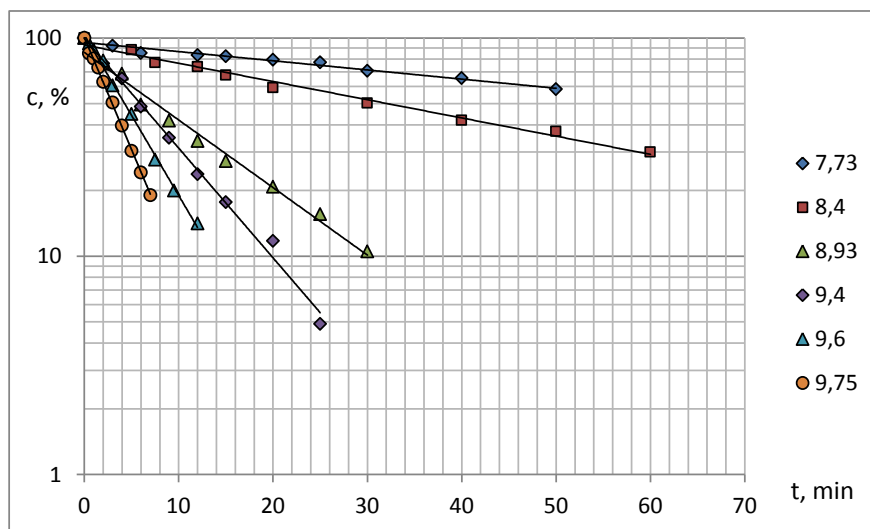
Rycina 29.

Półlogarytmiczne wykresy  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym o pH 7,40, 8,58, 9,02 i 9,46 w temperaturze 363 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).

Tabela 32.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym w temperaturze 343 K,  $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ 

| Warunki reakcji      |                                   |                        | Parametry kinetyczne                     |  |                      |         |     |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------|--|--|----------------------|---------|-----|
|                      |                                   |                        | $a \pm \Delta a \text{ [h}^{-1}\text{]}$ | $k \pm \Delta k \text{ [s}^{-1}\text{]}$ | $S_a$                | $r$     | $n$ |
| [NaBO <sub>2</sub> ] | [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |  |  |                      |         |     |
| pH 7,73              |                                   |                        |  |  |                      |         |     |
| 0,01415              | 0,1517                            | 0,16585                | $-(9,68 \pm 1,37) \cdot 10^{-3}$         | $(1,61 \pm 0,23) \cdot 10^{-4}$          | $5,94 \cdot 10^{-4}$ | -0,9853 | 10  |
| pH 8,40              |                                   |                        |  |  |                      |         |     |
| 0,03341              | 0,1132                            | 0,14661                | $-(1,92 \pm 0,19) \cdot 10^{-2}$         | $(3,20 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$          | $8,13 \cdot 10^{-4}$ | -0,9929 | 10  |
| pH 8,93              |                                   |                        |  |  |                      |         |     |
| 0,05861              | 0,06278                           | 0,12139                | $-(7,13 \pm 0,72) \cdot 10^{-2}$         | $(1,18 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$          | $3,04 \cdot 10^{-3}$ | -0,9928 | 10  |
| pH 9,40              |                                   |                        |  |  |                      |         |     |
| 0,08338              | 0,02824                           | 0,11162                | $-(0,1157 \pm 0,0085)$                   | $(1,93 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$          | $3,61 \cdot 10^{-3}$ | -0,9966 | 9   |
| pH 9,60              |                                   |                        |  |  |                      |         |     |
| 0,08543              | 0,009144                          | 0,09457                | $-(0,1692 \pm 0,0079)$                   | $(2,82 \pm 0,13) \cdot 10^{-3}$          | $3,35 \cdot 10^{-3}$ | -0,9986 | 9   |
| pH 9,75              |                                   |                        |  |  |                      |         |     |
| 0,09563              | 0,003744                          | 0,09937                | $-(0,2364 \pm 0,0080)$                   | $(3,94 \pm 0,13) \cdot 10^{-3}$          | $3,45 \cdot 10^{-3}$ | -0,9991 | 10  |



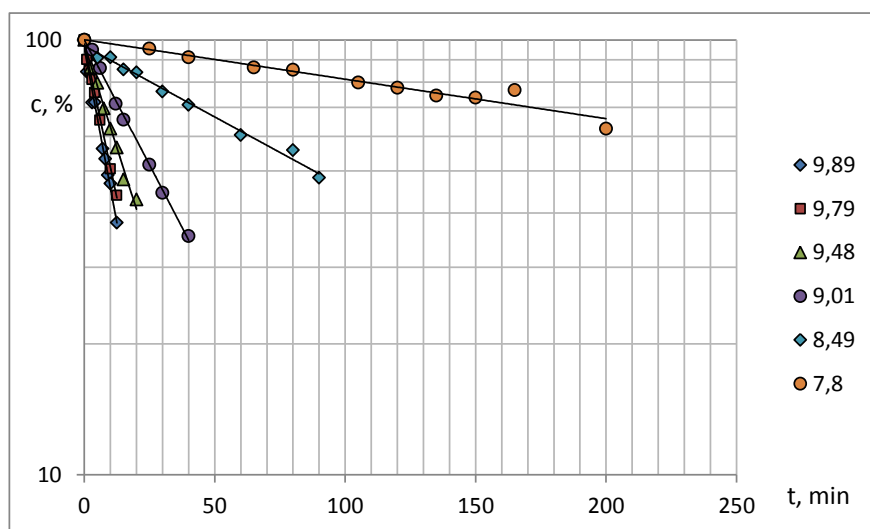
Rycina 30.

Półlogarytmiczne wykresy  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym o pH 9,75, 9,60, 9,40, 8,93, 8,40 i 7,73 w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ ).

Tabela 33.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym w temperaturze 333 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

| Warunki reakcji      |                                   |                        | Parametry kinetyczne                 |                                      |                |         |     |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------|---------|-----|
|                      |                                   |                        | $a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ] | $k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $S_a$          | $r$     | $n$ |
| [NaBO <sub>2</sub> ] | [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ] | B <sub>T</sub> ; mol/l |                                      |                                      |                |         |     |
| pH 7,80              |                                   |                        |                                      |                                      |                |         |     |
| 0,01415              | 0,1517                            | 0,16585                | $-(2,30 \pm 0,19) 10^{-3}$           | $(3,83 \pm 0,31) \cdot 10^{-5}$      | $8,24 10^{-5}$ | -0,9943 | 11  |
| pH 8,49              |                                   |                        |                                      |                                      |                |         |     |
| 0,03341              | 0,1132                            | 0,14661                | $-(7,52 \pm 0,65) 10^{-3}$           | $(1,25 \pm 0,11) 10^{-4}$            | $2,83 10^{-4}$ | -0,9944 | 10  |
| pH 9,01              |                                   |                        |                                      |                                      |                |         |     |
| 0,05861              | 0,06278                           | 0,12139                | $-(2,65 \pm 0,14) 10^{-2}$           | $(4,42 \pm 0,23) 10^{-4}$            | $5,56 10^{-4}$ | -0,9987 | 8   |
| pH 9,48              |                                   |                        |                                      |                                      |                |         |     |
| 0,08338              | 0,02824                           | 0,11162                | $-(4,36 \pm 0,49) 10^{-2}$           | $(7,27 \pm 0,82) 10^{-4}$            | $2,01 10^{-3}$ | -0,9937 | 8   |
| pH 9,79              |                                   |                        |                                      |                                      |                |         |     |
| 0,08543              | 0,009144                          | 0,09457                | $-(6,51 \pm 0,31) 10^{-2}$           | $(1,09 \pm 0,05) 10^{-3}$            | $1,29 10^{-3}$ | -0,9988 | 8   |
| pH 9,89              |                                   |                        |                                      |                                      |                |         |     |
| 0,09563              | 0,003744                          | 0,09937                | $-(7,40 \pm 0,70) 10^{-2}$           | $(1,23 \pm 0,12) 10^{-3}$            | $3,11 10^{-3}$ | -0,9929 | 10  |



Rycina 31.

Półlogarymiczne wykresy  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w buforze boranowym o pH 9,89, 9,79, 9,48, 9,01, 8,49 i 7,80 w temperaturze 333 K ( $\mu = 0,50$  mol/l).



#### 4.6. Ocena trwałości chlorowodorku epirubicyny w fazie stałej

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

##### *Sposób przeprowadzenia badań*

Badania trwałości obejmowały wyznaczenie obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu:

- w temperaturze 393K, przy wilgotności względnej powietrza 0%
- w atmosferze powietrza o wilgotności względnej ~76,4% w temperaturze 333K, 343K, 353K, 363K i 373 K
- w temperaturze 363K, przy wilgotności względnej powietrza 50,9%, 66,5%, 76,4% i 90,0%

##### *Przygotowanie próbek EPI do badań*

Do fiolek szklanych o pojemności 2 ml odważono 5,0 mg EPI. W zależności od przeznaczenia prób postępowano z nimi jak opisano poniżej.

- Próby przeznaczone do badania trwałości w atmosferze suchego powietrza, wstawiono do łaźni piaskowej, która znajdowała się w komorze cieplnej o temperaturze 393 K od co najmniej 24 godzin.
- Próby przeznaczone do badania wpływu temperatury w atmosferze powietrza o wilgotności względnej ~76,4% wstawiono do eksykatorów zawierających nasycone roztwory chlorku sodu. Tak przygotowane eksykatory umieszczone były w komorach cieplnych o temperaturze: 333K, 343K, 353K, 363 K i 373 K, dobę przed umieszczeniem w nich prób.
- Próby przeznaczone do badania wpływu wilgotności względnej powietrza wstawiono do eksykatorów zawierających nasycone roztwory soli nieorganicznych, które utrzymywały następującą wilgotność względną: ~50,9% (nasycony roztwór bromku sodu), ~66,5% (nasycony roztwór azotanu sodu), ~76,4% (nasycony roztwór chlorku sodu) i ~90,0% (nasycony roztwór siarczanu cynku). Tak przygotowane eksykatory umieszczone były w komorze cieplnej o temperaturze 363 K dobę przed umieszczeniem w nich prób.

W określonych odstępach czasu próby wyjmowano, ochładzano do temperatury pokojowej i rozpuszczano w fazie ruchomej.

Przygotowane roztwory przenoszono do kolb miarowych o pojemności 25 ml, uzupełniano do 25,0 ml fazą ruchomą i mieszano. Pobierano 1,0 ml badanego roztworu, dodawano 1,0 ml

wzorca wewnętrznego i mieszano. Na kolumnę chromatograficzną wprowadzano 50 µl roztworu.

*Wyniki badania rozkładu EPI w fazie stałej w temperaturze 393K, przy wilgotności względnej powietrza 0%*

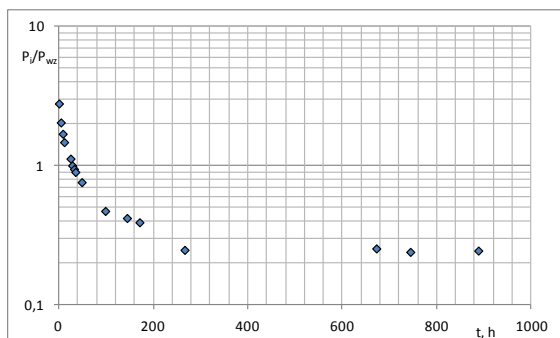
*Parametry kinetyczne rozkładu*

Zmiany stężenia EPI w temperaturze 373 K przy RH = 0% przedstawiono w tabeli 34 i na rycinie 32.

Tabela 34.

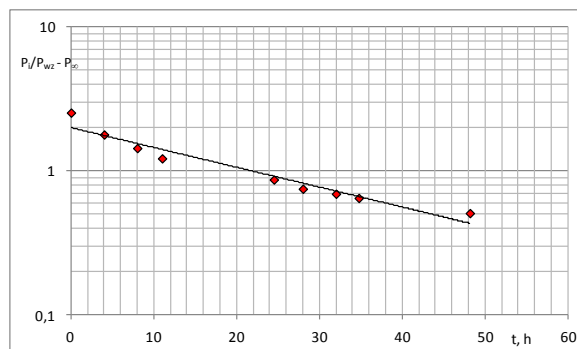
Zmiany stężenia EPI w fazie stałej w temperaturze 393K przy względnej wilgotności powietrza 0%

| Lp. | Czas, h | $P_i/P_{wz}$ | $P_i/P_{wz} - P_\infty$ | c, %  | Parametry kinetyczne reakcji rozkładu   |
|-----|---------|--------------|-------------------------|-------|---|
| 1   | 0       | 2,7944       | 2,5434                  | 100,0 | $(a \pm \Delta a) [h^{-1}] (-3,18 \pm 0,68) \cdot 10^{-2}$<br>$S_a \quad 2,89 \cdot 10^{-3}$<br>$b \pm \Delta b \quad 2,00 \pm 1,20$<br>$S_b \quad 7,54 \cdot 10^{-2}$<br>$(k \pm \Delta k) [s^{-1}] (8,84 \pm 1,90) \cdot 10^{-6}$<br>$r \quad -0,972$<br>$S_y \quad 0,133$<br>$t_{0,5} \quad 21,8 \text{ h}$<br>$t_{0,1} \quad 3,31 \text{ h}$<br>$n \quad 9$ |
| 2   | 4       | 2,0425       | 1,7915                  | 70,4  |   |
| 3   | 8       | 1,6928       | 1,4418                  | 56,7  |   |
| 4   | 11      | 1,4741       | 1,2231                  | 48,1  |   |
| 5   | 24,5    | 1,1225       | 0,8715                  | 34,3  |   |
| 6   | 28      | 1,0029       | 0,7519                  | 29,6  |   |
| 7   | 32      | 0,9449       | 0,6939                  | 27,3  |   |
| 8   | 34,75   | 0,9000       | 0,6490                  | 25,5  |   |
| 9   | 48,17   | 0,7604       | 0,5094                  | 20,0  |   |
| 10  | 98      | 0,4721       |                         |       |   |
| 11  | 144     | 0,4200       |                         |       |   |
| 12  | 170,5   | 0,3914       |                         |       |   |
| 13  | 266     | 0,2479       |                         |       |   |
| 14  | 672     | 0,2539       |                         |       |   |
| 15  | 744     | 0,2398       |                         |       |   |
| 16  | 888     | 0,2450       |                         |       |   |



Rycina 32.

Półlogarytmiczny wykres  $P_i/P_{wz} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w temperaturze 393 K przy  $RH = 0\%$ .



Rycina 33.

Półlogarytmiczny wykres  $P_i/P_{wz} - P_{\infty} = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w temperaturze 393 K przy  $RH = 0\%$ .

Na półlogarytmicznym wykresie  $P_i/P_{wz} = f(t)$  (Rycina 32), w przedziale czasu  $t_0 \rightarrow t_{\infty}$ , wartość  $P_i/P_{wz}$  maleje do wartości  $P_{\infty} > 0$ , a zatem rozkład EPI w podanych warunkach zachodzi zgodnie z mechanizmem odwracalnej reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Do interpretacji wyników reakcji rozkładu EPI w atmosferze powietrza o  $RH = 0\%$  zastosowano poniższe równanie:

$$\ln (P_i/P_{wz} - P_{\infty}) = \ln ((P_i/P_{wz})_0 - P_{\infty}) - k_{obs} \cdot t \quad \dots 4$$

$P_i/P_{wz}$  – stosunek pola powierzchni EPI do pola powierzchni wzorca wewnętrznego w czasie  $t$

$(P_i/P_{wz})_0$  – stosunek pola powierzchni EPI do pola powierzchni wzorca wewnętrznego w czasie  $t = 0$

$P_{\infty}$  – stosunek pola powierzchni EPI do pola powierzchni wzorca wewnętrznego w czasie  $t_{\infty}$

Półlogarytmiczny wykres  $P_i/P_{wz} - P_{\infty} = f(t)$  (Rycina 33) jest prostoliniowy i na jego podstawie wyznaczono obserwowaną stałą szybkości rozkładu EPI.

Rozkład chlorowodoru epidoksozubicyny w atmosferze powietrza o wilgotności względnej powyżej 50%, w podwyższonej temperaturze zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem substratu. Nachylenie wykresu  $c, \% = f(t)$  jest równe obserwowanej stałej szybkości reakcji ze znakiem ujemnym  $-k_{obs}$ ;  $c = (P_i/P_w)_t / (P_0/P_w)_0 \cdot 100\%$

Prostoliniowe wykresy posłużyły do obliczenia parametrów kinetycznych reakcji.

Stale szybkości reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu obliczono z wzoru 3 podanego w rozdziale 4.5.2.

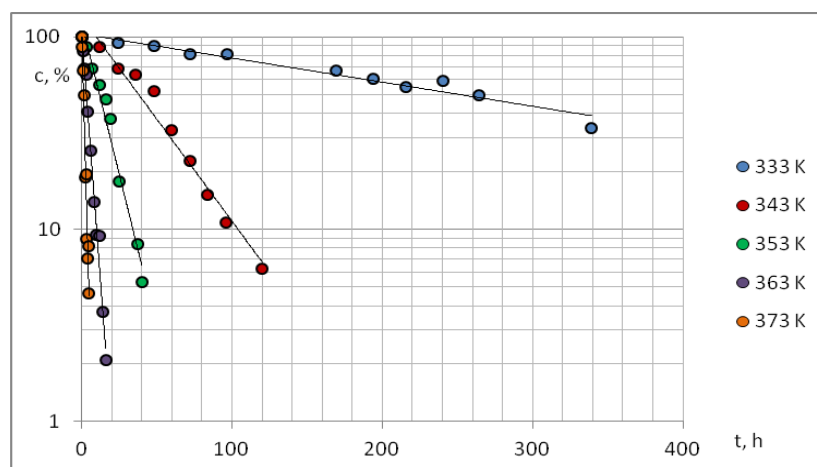
Metodą najmniejszych kwadratów obliczono parametry statystyczne równania  $y = ax + b$ , podane w rozdziale 4.5.2.

Obliczone parametry umieszczono w tabeli 35 i 36.

Wyniki badania rozkładu EPI w atmosferze powietrza o wilgotności względnej ~76,4% w temperaturze 333K, 343K, 353K, 363K i 373 K

### Parametry kinetyczne rozkładu

Zmiany stężenia EPI oraz wyznaczone parametry kinetyczne reakcji rozkładu przy RH = 76,4% w temperaturze 333 K, 343 K, 353 K, 363 K i 373 K przedstawiono na rycinie 33 i w tabeli 34.



Rycina 34.

Półlogarytmiczne zależności  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w fazie stałej przy RH ~76,4% w podanych temperaturach.

Tabela 35.

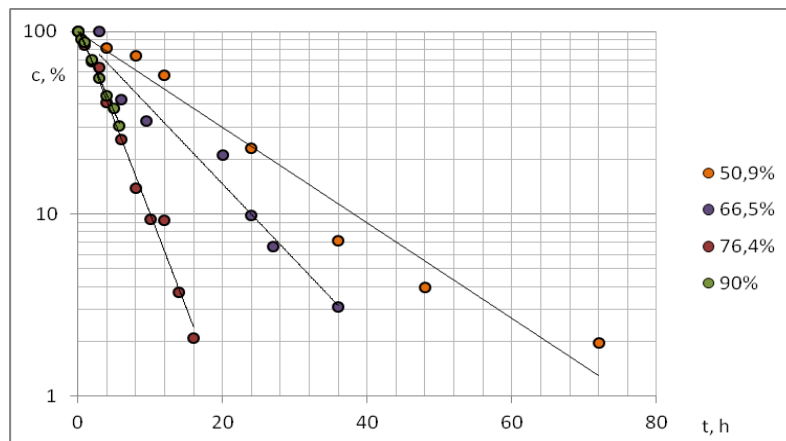
Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI przy RH = 76,4% w temperaturze 333 K, 343 K, 353 K, 363 K i 373 K

| Parametry kinetyczne                    | 333 K             | 343 K           | 353 K           | 363 K           | 373 K           |
|---|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $-(a \pm \Delta a) \times 10^2, h^{-1}$ | $0,289 \pm 0,046$ | $2,44 \pm 0,34$ | $7,27 \pm 1,08$ | $23,8 \pm 2,1$  | $64,6 \pm 8,7$  |
| $S_a \times 10^3$                       | 0,204             | 1,45            | 4,57            | 9,40            | 37,8            |
| $b \pm \Delta b$                        | $2,94 \pm 1,09$   | $3,81 \pm 1,25$ | $3,61 \pm 1,27$ | $3,13 \pm 1,20$ | $3,18 \pm 1,30$ |
| $S_b \times 10^2$                       | 3,76              | 9,60            | 10,1            | 8,14            | 11,5            |
| $(k \pm \Delta k) \times 10^6, s^{-1}$  | $0,802 \pm 0,128$ | $6,79 \pm 0,93$ | $20,2 \pm 3,0$  | $66,1 \pm 5,9$  | $180 \pm 24$    |
| r                                       | -0,9780           | -0,9867         | -0,9861         | -0,9934         | -0,9877         |
| $S_y$                                   | 0,0711            | 0,167           | 0,184           | 0,163           | 0,197           |
| n                                       | 11                | 10              | 9               | 11              | 10              |

$$c = (P_i/P_w)_t / (P_i/P_w)_0 \cdot 100$$

Wyniki badania rozkładu EPI w temperaturze 363 K przy względnej wilgotności powietrza ~50,9%, ~66,5%, ~76,4%, ~90,0%

Parametry kinetyczne rozkładu



Rycina 35.

Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c, \% = f(t)$  reakcji rozkładu EPI w fazie stałej, w temperaturze 353 K, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza.

Tabela 36.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu EPI w fazie stałej w temperaturze 363 K w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza

| Parametry kinetyczne                    | 50,9%           | 66,5%           | 76,4%           | 90,0%           |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $-(a \pm \Delta a) \times 10^2, h^{-1}$ | $6,02 \pm 1,13$ | $9,61 \pm 2,30$ | $23,8 \pm 2,1$  | $20,7 \pm 1,5$  |
| $S_a \times 10^3$                       | 4,64            | 8,93            | 9,40            | 5,99            |
| $b \pm \Delta b$                        | $2,90 \pm 1,48$ | $1,32 \pm 1,63$ | $3,13 \pm 1,20$ | $3,01 \pm 1,05$ |
| $S_b \times 10^2$                       | 16,0            | 18,9            | 8,14            | 1,99            |
| $(k \pm \Delta k) \times 10^6, s^{-1}$  | $1,67 \pm 0,32$ | $2,67 \pm 0,64$ | $6,61 \pm 0,59$ | $5,75 \pm 0,41$ |
| R                                       | -0,983          | -0,979          | -0,993          | -0,998          |
| $S_y$                                   | 0,307           | 0,266           | 0,163           | 0,0338          |
| N                                       | 8               | 7               | 11              | 8               |

Tabela 37.

Parametry prostej  $\ln k_i = f(RH\%)$  reakcji rozkładu EPI w fazie stałej w temperaturze 363 K

| Lp. | RH, % | $(k \pm \Delta k) \times 10^5, s^{-1}$ | Parametrz prostej $\ln k_i = f(RH\%)$   |
|-----|-------|--|---|
| 1   | 50,9  | $1,67 \pm 0,32$                        | $a = 0,0379 \pm 0,0334; S_a = 7,77 \cdot 10^{-3}$<br>$b = -12,9 \pm 2,4; S_b = 0,563$<br>$r = 0,960; S_y = 0,222$ |
| 2   | 66,5  | $2,67 \pm 0,64$                        |   |
| 3   | 76,4  | $6,61 \pm 0,59$                        |   |
| 4   | 90,0  | $5,75 \pm 0,41$                        |   |

## 4.7. Ocena fototrwałości EPI w roztworach wodnych

### 4.7.1. Ocena fotostabilności zgodnie z wymaganiami Przewodnika ICH Q1B

Do pełnej oceny trwałości danej substancji niezbędne jest także określenie jej podatności na rozkład fotochemiczny, który wykonuje się zgodnie z wymaganiami umieszczonymi w Przewodniku ICH Q1B. Przeprowadzone badanie, w zależności od otrzymanych wyników, pozwala na zaklasyfikowanie związku do grupy związków fotolabilnych lub fotostabilnych.

Badanie przeprowadzono w komorze do naświetleń. Zgodnie z wymaganiami zastosowano źródło promieniowania o zakresie 320-800 nm oraz użyto aktynometru chemicznego – 2% wodnego roztworu chlorowodoru chininy.

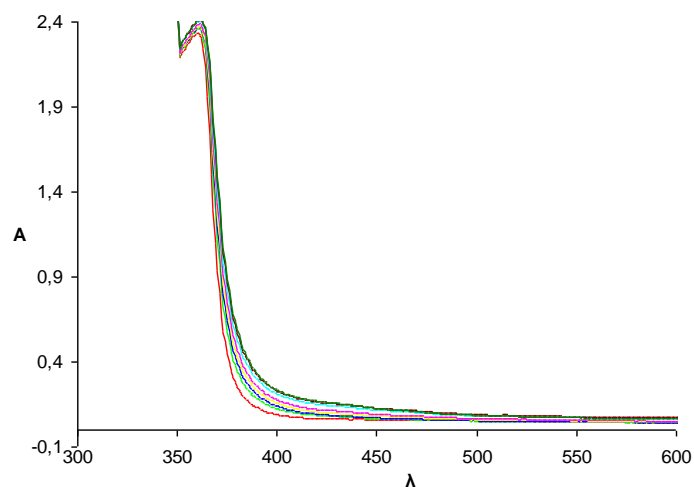
Stopień rozkładu badanej substancji określano metodą spektrofotometryczną mierząc różnicę absorbancji przy  $\lambda = 480$  nm. Dla aktynometru chemicznego umieszczonego obok próby badanej i naświetlanego równolegle, długość fali, przy której mierzono różnicę absorbancji wynosiła 400 nm.

#### *Wyniki naświetlania aktynometru chemicznego*

#### *Przygotowanie 2% roztworu chininy (aktynometr chemiczny)*

Do kolby o pojemności 50 ml odważono dokładnie 0,510 g dihydratu monochlorowodoru chininy, uzupełniono do 50,0 ml wodą, ogrzewając w temp 30°C.

W określonych punktach czasowych, wykreślano widmo UV i mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda = 400$  nm. Zmiany widma absorpcji roztworu chininy przedstawiono na rycinie 36.



Rycina 36.

Zmiany widma absorpcji podczas naświetlania aktynometru chemicznego.

Zmiany wartości absorbancji dla roztworu chlorowodoru chininy przy długości fali  $\lambda = 400$  nm przedstawiono w tabeli 38.

Tabela 38.

Zmiany absorbancji przy 400 nm podczas naświetlania roztworu chlorowodoru chininy

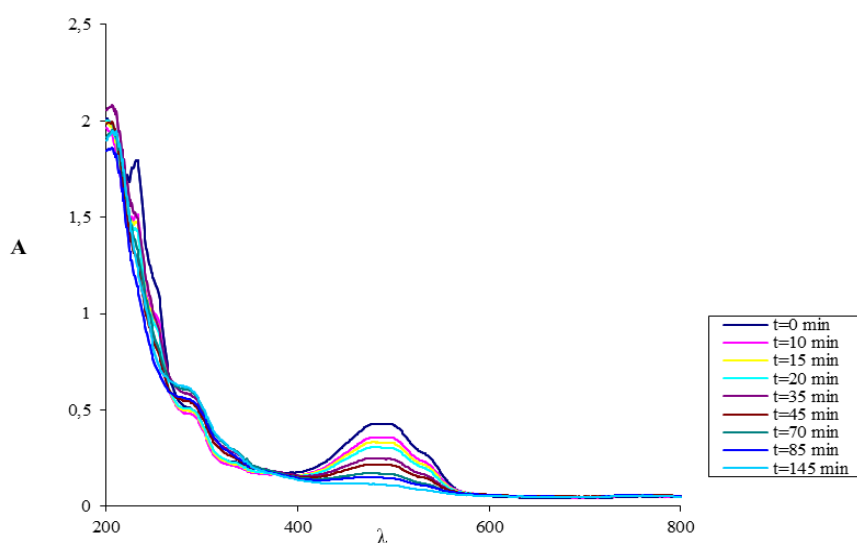
| Absorbancja przed naświetlaniem, $A_0$ | Czas naświetlania, t [min] | Absorbancja po czasie naświetlania t, $A_t$ | Różnica absorbancji $\Delta A = A_t - A_0$ |
|--|----------------------------|---|--|
| 0,0894                                 | 35                         | 0,1234                  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

## Wyniki naświetlania roztworów EPI

### Przygotowanie roztworu EPI

Przygotowano roztwór EPI o stężeniu  $2,5 \cdot 10^{-2}$  mg/ml.

W określonych punktach czasowych wykreślano widmo UV i mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda = 480$  nm. Zmiany widma roztworu EPI przedstawiono na rycinie 37 oraz w tabeli 39.



Rycina 37.

Zmiany widma absorpcji EPI podczas naświetlania.

Tabela 39.

Zmiany absorbancji podczas naświetlania EPI

| Czas naświetlania [min] | Absorbancja $A_t$ | Różnica absorbancji $\Delta A = A_0 - A_t$ |
|-------------------------|-------------------|--|
| 0                       | 0,4262            |  |
| 15                      | 0,3327            | 0,0935                                     |
| 35                      | 0,2497            | 0,1765                                     |
| 55                      | 0,1936            | 0,2326                                     |
| 70                      | 0,1716            | 0,2546                                     |
| 85                      | 0,1511            | 0,2751                                     |
| 115                     | 0,1277            | 0,2985                                     |
| 145                     | 0,1023            | <b>0,3239</b>                              |



#### 4.7.2. Badania trwałości fotochemicznej EPI w roztworach wodnych

##### *Warunki rozkładu fotochemicznego*

Roztwory wodne badanej substancji umieszczono w okrągłej kuwecie kwarcowej o poj. 2,8 cm<sup>3</sup> i naświetlano wysokociśnieniową lampą UV - VIS HBO-50 z palnikiem rtęciowym, emitującą promieniowanie w zakresie 300 - 800 nm. Natężenie światła mierzone za pomocą radiometru wynosiło 86,0 - 89,0 mW/cm<sup>2</sup>. W czasie 1 min rejestrowano energię 5,10 - 5,30 J/cm<sup>2</sup>.

Odpowiednie warunki naświetlania uzyskano stosując filtry *Pyrex* o maksymalnej przepuszczalności światła przy długości fali  $\lambda_{\text{maks}} = 365$  nm oraz  $\lambda_{\text{maks}} = 510$  nm. W trakcie naświetlań wykonano serię widm UV-Vis w zakresie 200 - 800 nm, mierząc absorbancję przy długości fali  $\lambda = 480$  nm.

##### *Parametry kinetyczne rozkładu fotochemicznego EPI*

Rozkład EPI pod wpływem światła analizowano jako zależność absorbancji od czasu ekspozycji na światło. W przypadku światła o  $\lambda_{\text{maks}} = 365$  nm, w czasie  $t \rightarrow \infty$ ,  $A \rightarrow \infty$  (Rycina 38). Po zastosowaniu techniki odejmowania otrzymano prostoliniowe półlogarytmiczne wykresy  $c_t - c_\infty = f(t)$  (Rycina 40), a zatem do wyznaczenia obserwowanych stałych szybkości w tych warunkach zastosowano równanie 4, w którym zamiast wielkości piku wprowadzono obliczoną wartość  $c$ , %. Wyznaczona z nachylenia półlogarytmicznego wykresu  $c_t - c_\infty = f(t)$  wartość nachylenia odpowiada stałej szybkości fotodegradacji ze znakiem ujemnym ( $c$ , % =  $A_t/A_0 \cdot 100\%$ ).

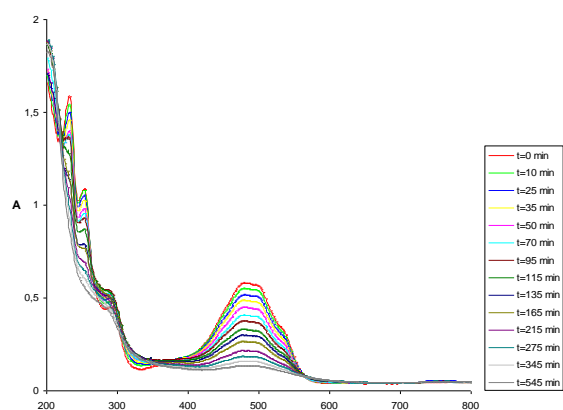
W przypadku światła o  $\lambda_{\text{maks}} = 510$  nm (Rycina 39), w czasie  $t \rightarrow \infty$ ,  $A \rightarrow 0$  (Rycina 41), a zatem nachylenie półlogarytmicznego wykresu  $c_t = f(t)$  odpowiada stałej szybkości fotodegradacji ze znakiem ujemnym (równanie 3, w którym zamiast wielkości piku wprowadzono obliczoną wartość  $c$ , %).

Obliczono także wartości czasu połowicznego rozkładu  $t_{0,5}$  oraz czasu rozkładu 10% substancji ( $t_{0,1}$ ), korzystając z podanych poniżej wzorów:

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

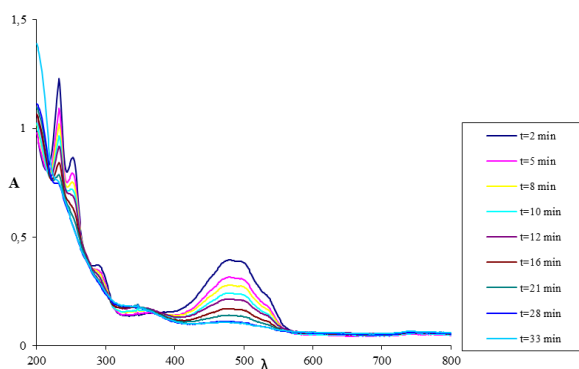
$$- t_{0,1} = \ln 1,11/k = 0,1054/k \quad \dots 6$$

Rozkład fotochemiczny – filtr  $\lambda_{maks} = 365\text{ nm}$  i  $\lambda_{maks} = 510\text{ nm}$



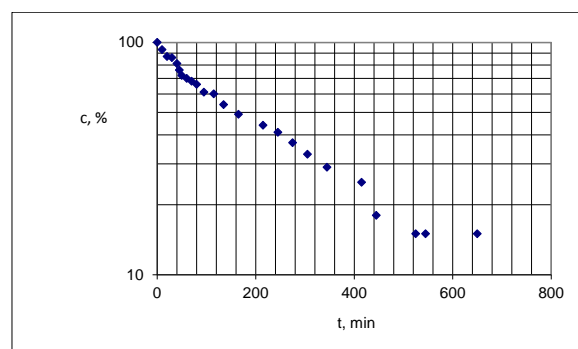
Rycina 38.

Zmiany absorbancji podczas naświetlania EPI (filtr  $\lambda_{maks} = 365\text{ nm}$ ).

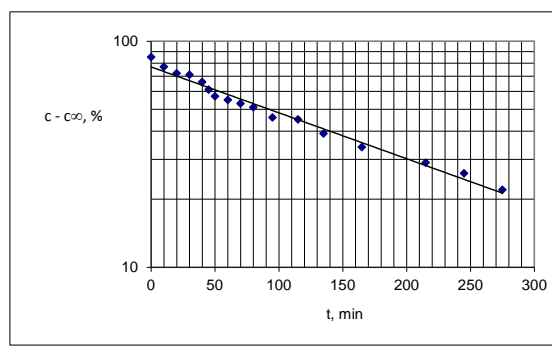


Rycina 39.

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



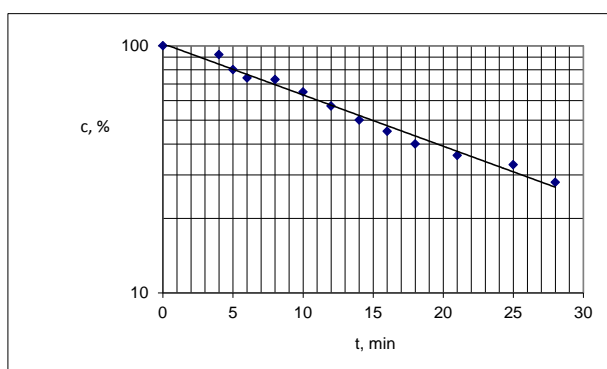
A



B

Rycina 40.

Półlogarytmiczne zależności  $c, \% = f(t)$  (A) i  $(c - c_{\infty}), \% = t(t)$  (B) dla EPI (filtr  $\lambda_{maks} = 365\text{ nm}$ ).



Rycina 41.

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

Tabela 40.

Parametry fotodegradacji EPI (filtr  $\lambda_{\max} = 365$  nm)

| t [min] | Absorbancja, A | c [%] | Parametry kinetyczne reakcji rozkładu  |
|---------|----------------|-------|--|
| 0       | 0,5818         | 100   | $a \pm \Delta a = -(4,68 \pm 0,34) \cdot 10^{-3}$<br>$S_a = 1,62 \cdot 10^{-3}$<br>$b \pm \Delta b = 76,9 \pm 1,0$<br>$S_b = 0,0205$<br>$r = -0,9911$<br>$k = (7,79 \pm 0,57) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$<br>$t_{0,5} = 148,3 \text{ min}$<br>$t_{0,1} = 22,6 \text{ min}$ |
| 10      | 0,5525         | 93    |  |
| 20      | 0,5244         | 87    |  |
| 30      | 0,4985         | 86    |  |
| 40      | 0,4748         | 81    |  |
| 45      | 0,4579         | 76    |  |
| 50      | 0,4497         | 72    |  |
| 60      | 0,4281         | 70    |  |
| 70      | 0,4072         | 68    |  |
| 80      | 0,4011         | 66    |  |
| 95      | 0,3742         | 61    |  |
| 115     | 0,3303         | 60    |  |
| 135     | 0,2995         | 54    |  |
| 165     | 0,2644         | 49    |  |
| 215     | 0,2165         | 44    |  |
| 245     | 0,2009         | 41    |  |
| 275     | 0,1848         | 37    |  |
| 305     | 0,1695         | 33    |  |
| 345     | 0,1582         | 29    |  |
| 415     | 0,1496         | 25    |  |
| 445     | 0,1411         | 18    |  |
| 525     | 0,1342         | 15    |  |
| 545     | 0,1338         | 15    |  |

Tabela 41.

Parametry fotodegradacji EPI (filtr  $\lambda_{\max} = 510$  nm)

| t [min] | Absorbancja, A | c, [%] | Parametry kinetyczne reakcji rozkładu   |
|---------|----------------|--------|---|
| 0       | 0,394          | 100    | $a \pm \Delta a = -(4,78 \pm 0,40) \cdot 10^{-2}$<br>$S_a = 1,80 \cdot 10^{-3}$<br>$b \pm \Delta b = 101,9 \pm 1,1$<br>$S_b = 0,0274$<br>$r = -0,9923$<br>$k = (7,96 \pm 0,66) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$<br>$t_{0,5} = 14,5 \text{ min}$<br>$t_{0,1} = 2,1 \text{ min}$ |
| 4       | 0,3407         | 92     |   |
| 5       | 0,3159         | 80     |   |
| 6       | 0,3109         | 74     |   |
| 8       | 0,2798         | 73     |   |
| 10      | 0,2426         | 65     |   |
| 12      | 0,2146         | 57     |   |
| 14      | 0,1946         | 50     |   |
| 16      | 0,1702         | 45     |   |
| 18      | 0,1548         | 40     |   |
| 21      | 0,1403         | 36     |   |
| 25      | 0,1197         | 33     |   |
| 28      | 0,1126         | 28     |   |

### *Wydajność kwantowa procesu fotodegradacji*

Wydajność kwantowa jest to stosunek liczby cząsteczek ulegających fotodegradacji do liczby fotonów absorbowanych przez daną objętość w określonym przedziale czasowym.

### *Wydajność kwantowa źródła promieniowania*

Prowadząc naświetlanie prób z użyciem filtru 365 nm założono średnią długość fali padającego światła  $\lambda = 365$  nm, natomiast dla filtru 510 nm  $\lambda = 510$  nm. Natężenie promieniowania zmierzono wykorzystując radiometr zaopatrzone w sensor 365 nm i 510 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 i  $\lambda = 510$  nm:

$$E = h \cdot c/\lambda = 5,442 \cdot 10^{-19} \text{ [J]} \text{ dla } \lambda = 365 \text{ nm}$$

$$E = h \cdot c/\lambda = 3,89 \cdot 10^{-19} \text{ [J]} \text{ dla } \lambda = 510 \text{ nm}$$

$h$  = 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.

W przypadku  $\lambda = 510$  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):

$$I_0 = 4,0110 \cdot 10^{17} \text{ kwantów} \cdot \text{s}^{-1} (\lambda = 365 \text{ nm})$$

$$I_0 = 5,672 \cdot 10^{17} \text{ kwantów} \cdot \text{s}^{-1} (\lambda = 510 \text{ nm})$$

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

$$I_{\text{abs}} = I_0 (1 - 10^{-A}) \quad \dots 7$$

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

$A$  = absorbancja

Wydajność kwantową fotodegradacji dla danego procentu konwersji EPI obliczono ze wzoru:

$$\Phi = \Delta c \cdot N_A / I_{\text{abs}} \cdot t \quad \dots 8$$

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

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

$t$  = czas [s]

Wartości wydajności kwantowych epirubicyny 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.

Do obliczeń wykorzystano molowe współczynniki absorpcji badanego związku, których wartość wyznaczono zgodnie z poniższym wzorem:

$$\varepsilon = A/c \cdot l \quad \dots 9$$

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

$A$  = absorbancja

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

$l$  = długość drogi optycznej (1 cm)

Obliczone średnie wartości molowych współczynników absorpcji dla EPI przedstawiono w tabeli 42, natomiast wydajności kwantowe fotochemicznego rozkładu EPI w tabeli 43 i 44.

Tabela 42.

Średnie wartości molowych współczynników absorpcji dla EPI

| Molowe współczynniki absorpcji<br>[l · mol <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> ] |  |  |
|---|--|--|
| Promieniowanie wzbudzające<br>ε <sub>365</sub>                                | Promieniowanie wzbudzające<br>ε <sub>510</sub> | Promieniowanie analizowane<br>ε <sub>480</sub> |
| 3,35 · 10 <sup>3</sup>  | 1,02 · 10 <sup>4</sup>                         | 1,20 · 10 <sup>4</sup>                         |

Wydajności kwantowe - filtr λ<sub>maks</sub> = 365 nm

Tabela 43.

Wydajności kwantowe fotochemicznego rozkładu EPI (filtr λ<sub>maks</sub> = 365 nm)

| Lp. | t [s] | A <sub>i</sub> | Pozorna wydajność kwantowa Φ <sub>i</sub> | % konwersji |
|-----|-------|----------------|---|-------------|
| 1   | 0     | 0,5818         | 0   | 0           |
| 2   | 10    | 0,5525         | 5,49 · 10 <sup>-5</sup>                   | 5,04        |
| 3   | 20    | 0,5244         | 5,37 · 10 <sup>-5</sup>                   | 9,87        |
| 4   | 30    | 0,4985         | 5,25 · 10 <sup>-5</sup>                   | 14,32       |
| 5   | 40    | 0,4748         | 5,01 · 10 <sup>-5</sup>                   | 18,39       |
| 6   | 45    | 0,4579         | 5,16 · 10 <sup>-5</sup>                   | 21,30       |
| 7   | 50    | 0,4497         | 4,95 · 10 <sup>-5</sup>                   | 22,71       |
| 8   | 60    | 0,4281         | 4,80 · 10 <sup>-5</sup>                   | 26,42       |
| 9   | 70    | 0,4072         | 4,67 · 10 <sup>-5</sup>                   | 30,01       |
| 10  | 80    | 0,4011         | 4,23 · 10 <sup>-5</sup>                   | 31,06       |
| 11  | 95    | 0,3742         | 4,09 · 10 <sup>-5</sup>                   | 35,68       |
| 12  | 115   | 0,3303         | 4,10 · 10 <sup>-5</sup>                   | 43,23       |
| 13  | 135   | 0,2995         | 3,92 · 10 <sup>-5</sup>                   | 48,52       |
| 14  | 165   | 0,2644         | 3,60 · 10 <sup>-5</sup>                   | 54,55       |
| 15  | 215   | 0,2165         | 3,18 · 10 <sup>-5</sup>                   | 62,79       |
| 16  | 245   | 0,2009         | 2,85 · 10 <sup>-5</sup>                   | 64,08       |
| 17  | 275   | 0,1848         | 2,70 · 10 <sup>-5</sup>                   | 68,24       |
| 18  | 305   | 0,1695         | 2,53 · 10 <sup>-5</sup>                   | 70,87       |
| 19  | 345   | 0,1582         | 2,29 · 10 <sup>-5</sup>                   | 72,81       |
| 20  | 415   | 0,1496         | 1,95 · 10 <sup>-5</sup>                   | 74,29       |
| 21  | 445   | 0,1411         | 1,85 · 10 <sup>-5</sup>                   | 75,75       |
| 22  | 525   | 0,1342         | 1,60 · 10 <sup>-5</sup>                   | 76,93       |
| 23  | 545   | 0,1338         | 1,53 · 10 <sup>-5</sup>                   | 77,00       |

*Wydajności kwantowe – filtr  $\lambda_{maks} = 510 \text{ nm}$*

Tabela 44.

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

| Lp. | t [s] | $A_i$  | Wydajność kwantowa $\Phi_i$ | % konwersji |
|-----|-------|--------|-----------------------------|-------------|
| 1   | 0     | 0,394  |                             |             |
| 2   | 4     | 0,3407 | $1,02 \cdot 10^{-4}$        | 13,53       |
| 3   | 5     | 0,3159 | $1,19 \cdot 10^{-4}$        | 19,82       |
| 4   | 6     | 0,3109 | $1,06 \cdot 10^{-4}$        | 21,09       |
| 5   | 8     | 0,2798 | $1,09 \cdot 10^{-4}$        | 28,98       |
| 6   | 10    | 0,2426 | $1,16 \cdot 10^{-4}$        | 38,43       |
| 7   | 12    | 0,2146 | $1,15 \cdot 10^{-4}$        | 45,53       |
| 8   | 14    | 0,1946 | $1,09 \cdot 10^{-4}$        | 50,61       |
| 9   | 16    | 0,1702 | $1,07 \cdot 10^{-4}$        | 56,80       |
| 10  | 18    | 0,1548 | $1,02 \cdot 10^{-4}$        | 60,71       |
| 11  | 21    | 0,1403 | $9,26 \cdot 10^{-5}$        | 64,39       |
| 12  | 25    | 0,1197 | $8,41 \cdot 10^{-5}$        | 69,62       |
| 13  | 28    | 0,1126 | $7,70 \cdot 10^{-5}$        | 71,42       |
| 14  | 33    | 0,1071 | $6,66 \cdot 10^{-5}$        | 72,82       |





## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

---

Chlorowodorek epirubicyny (EPI) jest półsyntetyczną pochodną dokсорubicyny i zaliczany jest do II generacji antybiotyków antracyklinowych. Podawany jest wyłącznie dożylnie, gdyż po podaniu doustnym wchłania się w niewielkim stopniu. Podobnie jak inne antracykliny, wykazuje wielokierunkowy mechanizm działania [106] i jest ważnym składnikiem wielu schematów leczenia nowotworów. Jednym z warunków skutecznej i bezpiecznej farmakoterapii jest stosowanie leku o odpowiedniej jakości oraz trwałości. Antybiotyki antracyklinowe są podatne na rozkład pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych, zarówno w roztworach wodnych, jak i w fazie stałej [107–110].

W badaniach trwałości leków stosowane są testy stresowe, przyspieszone oraz długoterminowe. Testy w warunkach stresowych pozwalają na wyznaczenie obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu oraz obliczenie parametrów termodynamicznych, a także na możliwość przewidywania trwałości. Testy stresowe wykonuje się w warunkach:

- hydrolizy w środowisku kwasowym, zasadowym i obojętnym
- fotolizy
- rozkładu pod wpływem temperatury oraz wilgotności względnej powietrza.

Wstępne badania trwałości czasami zostają włączone do tzw. stability-indicating method, podczas opracowywania metody analitycznej odpowiedniej do badań trwałości. W przypadku chlorowodoru epirubicyny takie badania zostały przeprowadzone z zastosowaniem metody HPLC, stosując kolumnę z żelom krzemionkowym z grupami oktylowymi oraz jako fazę ruchomą mieszaninę równych objętości buforu fosforanowego o pH 3,1 i acetonitrylu [111]. Autorzy określili procentowy ubytek substratu w warunkach rozkładu w: 1 mol/l roztworze wodorotlenku sodu, 1 mol/l kwasie solnym, 10% roztworze nadtlenku wodoru, wodzie (wszystkie badania prowadzono w temperaturze 60<sup>0</sup>C) oraz roztworu substancji w wodzie w temperaturze 105<sup>0</sup>C, a także roztworu w wodzie poddanego działaniu światła. Uzyskane

wyniki nie pozwalają na wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji, a jedynie na zakwalifikowanie substancji jako nietrwałej bądź trwałej w warunkach badania.

#### *Cel badań*

Celem podjętych w niniejszej rozprawie badań była ocena trwałości chlorowodorku epirubicyny (EPI):

- w roztworach wodnych, z uwzględnieniem wpływu stężenia jonów wodorowych, rodzaju i stężenia buforów, siły jonowej i temperatury
- pod wpływem światła oraz dodatkowo
- w fazie stałej – warunkach podwyższonej temperatury przy RH = 0% oraz przy RH powyżej 50%.

#### *Metody analityczne*

Badania trwałości leku ulegającego rozkładowi pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych są możliwe pod warunkiem zastosowania metody analitycznej umożliwiającej obserwację zmian stężenia substratu obok tworzących się produktów rozkładu. Zastosowana metoda musi zostać także zwalidowana w celu wykazania jej przydatności do określonego celu badania. W badaniach trwałości najczęściej stosuje się metodę HPLC, która jest także polecana przez Farmakopeę Polską X w ocenie czystości – badaniu substancji pokrewnych EPI oraz w określaniu jej zawartości. W niniejszej pracy, w ocenie trwałości EPI w roztworach wodnych i w fazie stałej zastosowałem metodę HPLC [112–113], natomiast w ocenie podatności na rozkład pod wpływem światła – metodę spektrofotometryczną UV-VIS [114]. Zastosowane metody zwalidowałem w celu udowodnienia, że są odpowiednie do wyznaczonego celu. Podsumowanie parametrów walidacyjnych przedstawiono w tabelach 45 i 46.

Wykazano, że:

- metoda HPLC jest selektywna dla substratu w obecności produktów rozkładu i wzorca wewnętrznego
- metoda UV-VIS pozwala na rejestrację zmian stężenia substratu w czasie rozkładu fotochemicznego
- zastosowane metody są liniowe w badanych zakresach stężeń
- zastosowane metody są precyzyjne i odpowiednio czułe.

Tabela 45.

Podsumowanie parametrów walidacyjnych metody HPLC oznaczania EPI w roztworach wodnych i w fazie stałej

| Badany parametr  | Kryterium akceptacji  | Wynik                                   |
|--|---|---|
| Selektywność<br>▪ wpływ substancji interferujących           | Rozdział pików substancji badanej od produktów rozkładu i wzorca wewnętrznego   | Spełnia kryteria akceptacji             |
| Precyzja<br>▪ roztwory<br>▪ faza stała                       | RSD ≤ 5%<br>RSD ≤ 5%  | RSD = 1,84<br>RSD = 0,79                |
| Liniowość<br>▪ współczynnik korelacji (r)                    | ≥ 0,990   | 0,9985 (roztwory)<br>1,000 (faza stała) |
| Granica<br>▪ detekcji<br>▪ oznaczalności                     | 0,0100 mg/ml (roztwory wodne); 0,00506 mg/ml (faza stała)<br>0,0305 mg/ml (roztwory wodne); 0,0153 mg/ml (faza stała) |   |
| Stabilność roztworu substancji badanej i wzorca wewnętrznego | Roztwory substancji badanej przechowywane w wodzie z lodem i chronione od światła zachowywały trwałość 2 h            |   |

Tabela 46.

Podsumowanie parametrów walidacyjnych metody spektrofotometrycznej oznaczania EPI w roztworach wodnych w badaniach podatności na rozkład pod wpływem światła

| Badany parametr                           | Kryterium akceptacji   | Wynik                        |
|---|--|------------------------------|
| Liniowość<br>▪ współczynnik korelacji (r) | ≥ 0,990  | 0,9995                       |
| Precyzja                                  | RSD ≤ 5%   | Spełnia kryterium akceptacji |
| Granica<br>▪ detekcji<br>▪ oznaczalności  | 1,43 · 10 <sup>-3</sup> mg/ml<br>4,34 · 10 <sup>-3</sup> mg/ml |                              |

#### *Ocena trwałości chlorowodoru epirubicyny w roztworach wodnych*

Badania trwałości EPI w roztworach wodnych prowadzono w czterech temperaturach (363 K, 353 K, 343 K i 333 K) i polegały one na:

- wyznaczeniu obserwowanych stałych szybkości reakcji w roztworach buforowych, w zakresie pH od 0,42 do 9,95
- potwierdzeniu lub wykluczeniu występowania ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej
- wyznaczeniu stałych  $k_{pH}$ , charakteryzujących właściwą katalizę kwasowo-zasadową
- opisanu zależności  $\log k_{pH} = f(\text{pH})$  odpowiednim równaniem
- obliczeniu katalitycznych stałych szybkości reakcji cząstkowych
- wyznaczeniu parametrów termodynamicznych reakcji cząstkowych
- określeniu wpływu siły jonowej na trwałość.

### *Obserwowane stałe szybkości reakcji*

Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu pseudopierwszego rzędu wyznaczono metodą HPLC, z równania  $\ln P_i/P_{wz} = \ln (P_i/P_{wz})_0 - k_{obs} \times t$  lub  $\ln c, \% = \ln c_0 - k_{obs} \times t$ . Dla każdej prostej, dla której wykonano od 8 do 10 pomiarów, wyznaczono parametry kinetyczne reakcji, stosując arkusz kalkulacyjny Excel.

### *Ogólna kataliza kwasowo-zasadowa*

W badaniach trwałości uwzględniających wpływ rodzaju i stężenia składników buforu, należy zawsze rozważyć możliwość wystąpienia ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej, czyli takiej sytuacji gdy przy stałej wartości pH i siły jonowej ale przy różnych stężeniach składników danego buforu, szybkość zachodzącej reakcji zmienia się wraz ze wzrostem stężenia składników buforu. W celu potwierdzenia lub wykluczenia, że składniki zastosowanych w badaniu buforów wykazują efekt katalityczny, przeprowadzono badania trwałości EPI przy stałej wartości pH i sile jonowej = 0,50 mol/l dla trzech lub czterech różnych stężeń składników danego buforu, a następnie po zastosowaniu testu równoległości potwierdzano lub wykluczono występowanie ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej.

Stwierdzono, że efekt katalityczny wykazują składniki następujących buforów:

- buforu fosforanowego w zakresie pH od 2,15 do 3,38 oraz w zakresie pH od 5,91 do 7,45 (Rycina 42 i 44)
- buforu octanowego w zakresie pH od 4,01 do 5,89 (Rycina 43).

W warunkach ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej, obserwowane stałe szybkości reakcji można opisać poniższym równaniem:

$$k_{obs} = k_{pH} + k_B[B]_T \quad \dots 10$$

gdzie:  $k_{pH}$  – stała szybkości reakcji opisująca właściwą katalizę kwasowo-zasadową

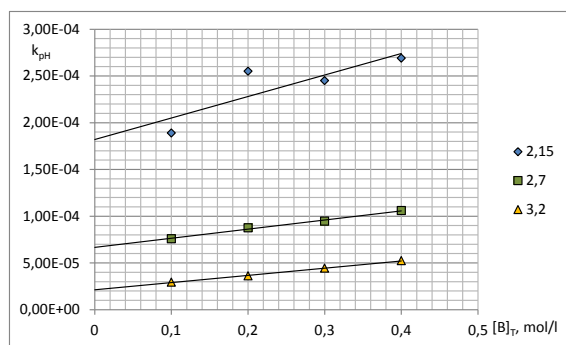
$k_B$  – stała szybkości opisująca efekt katalityczny składników buforu

$[B]_T$  – całkowite stężenie składników buforu

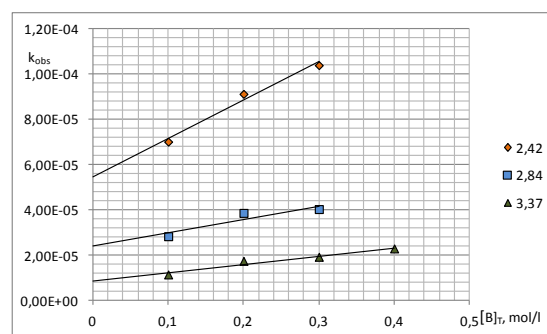
Wartość  $k_{pH}$  jest równa odcinkowi rzędnej dla  $[B]_T = 0$ .

W roztworach buforu boranowego oraz wodorotlenku sodu i kwasu solnego ma miejsce jedynie właściwa kataliza kwasowo-zasadowa, czyli wyznaczone obserwowane stałe szybkości rozkładu  $k_{obs} = k_{pH}$ .

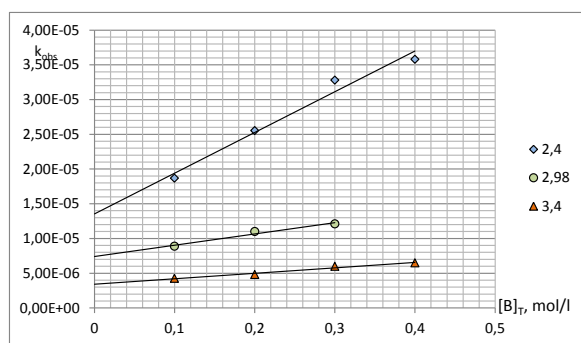
A



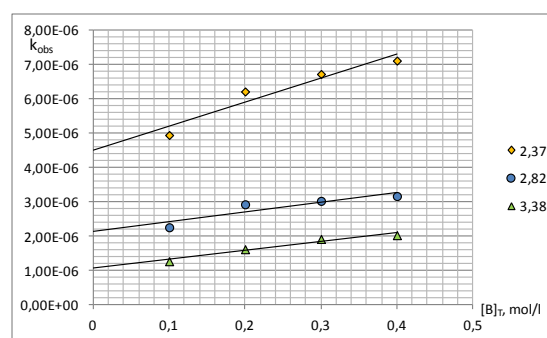
B



C



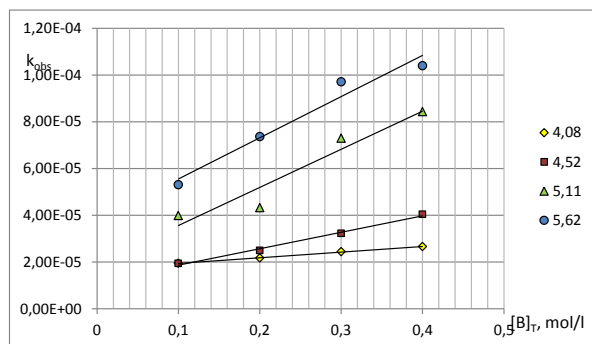
D



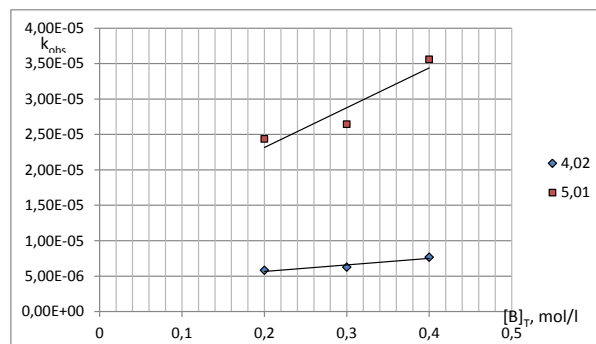
Rycina 42.

Wykresy  $k_{pH} = f([B]_T)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w temperaturze 363 K (A), 353 K (B), 343 K (C) i 333 K (D).

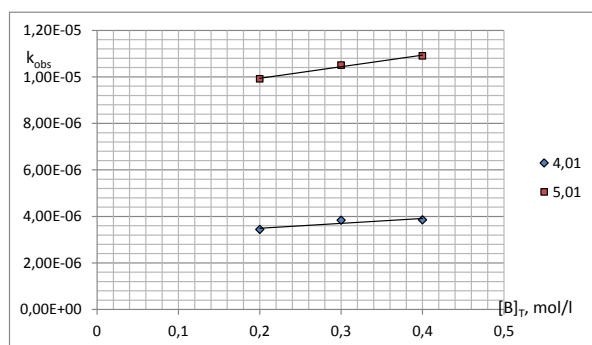
A



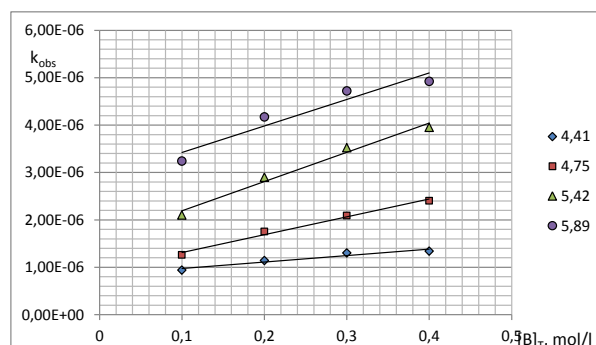
B



C

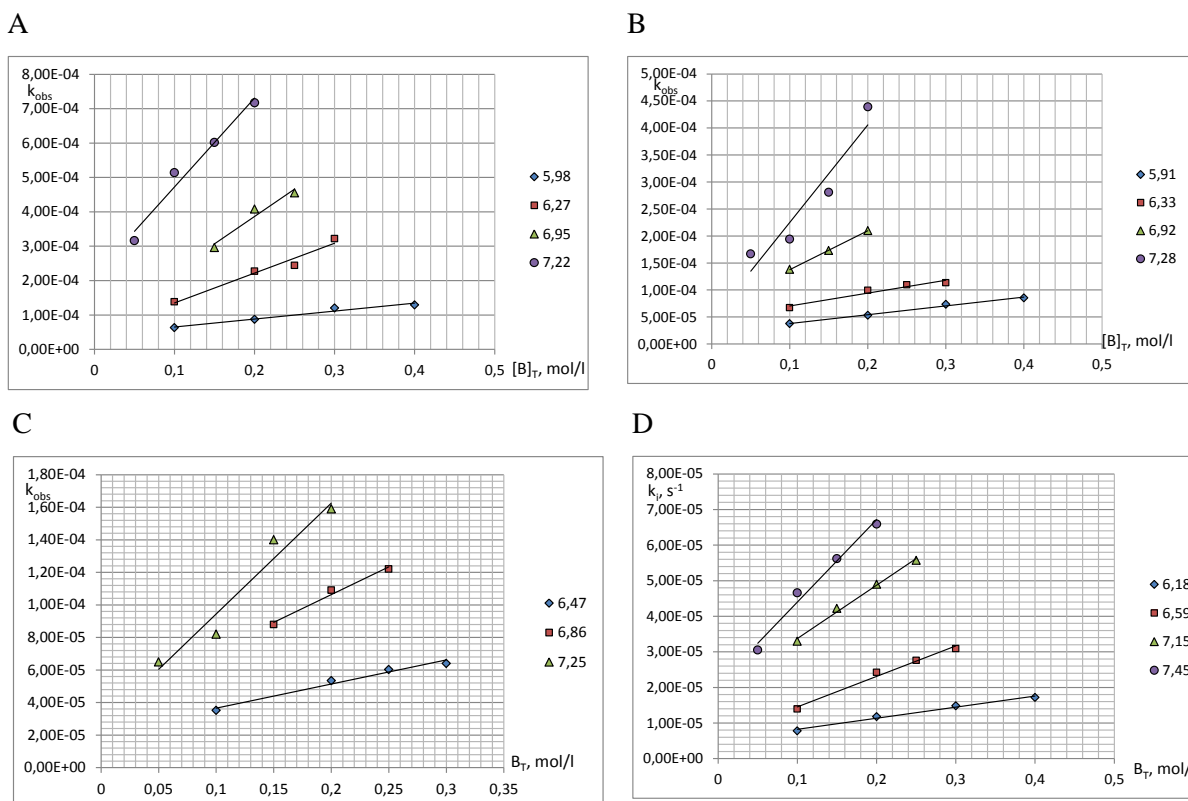


D



Rycina 43.

Wykresy  $k_{pH} = f([B]_T)$  reakcji rozkładu EPI w buforze octanowym w temperaturze 363 K (A), 353 K (B), 343 K (C) i 333 K (D).



Rycina 44.

Wykresy  $k_{pH} = f([B]_T)$  reakcji rozkładu EPI w buforze fosforanowym w temperaturze 363 K (A), 353 K (B), 343 K (C) i 333 K (D).

### Właściwa kataliza kwasowo-zasadowa

Otrzymane w badaniach przedstawionych powyżej wartości  $k_{pH}$  posłużyły do analizy wpływu stężenia jonów wodorowych (pH) na trwałość EPI w roztworach wodnych. Wyznaczona z otrzymanych wartości  $k_{pH}$  półlogarytmiczna zależność  $k_{pH} = f(pH)$  (Rycina 45) wskazuje, że w roztworach wodnych EPI, w zakresie pH od 0,42 do 9,95, możliwe są następujące reakcje:

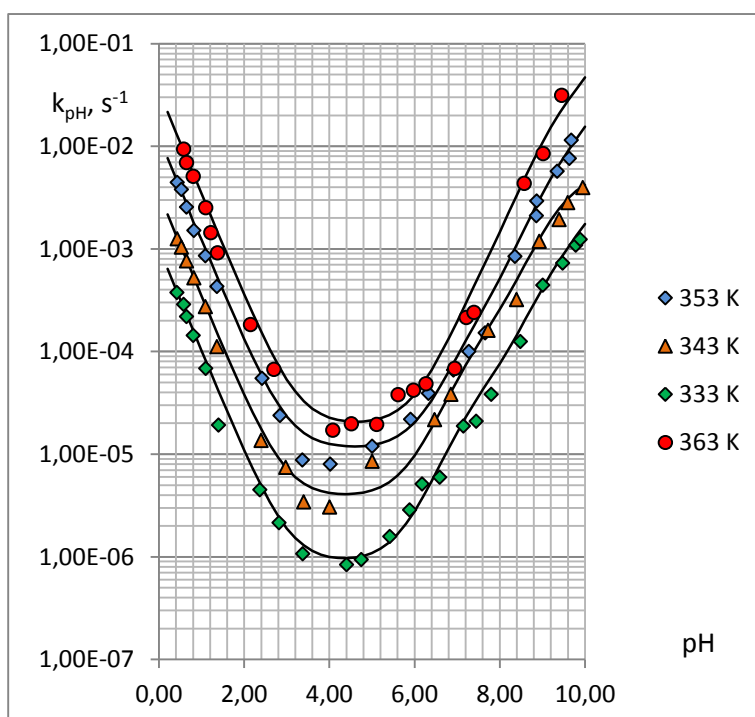
- rozkład protonowanych cząsteczek EPI katalizowany jonami wodorowymi ( $k_1$ )
- hydroliza spontaniczna pod wpływem wody cząsteczek EPI protonowanych ( $k_2$ ) i nieprotonowanych ( $k_3$ )
- rozkład cząsteczek nieprotonowanych i monoanionów EPI katalizowany jonami wodorotlenowymi ( $k_4$  i  $k_5$ )

Całkowita szybkość reakcji, opisana równaniem przedstawionym poniżej, jest równa sumie reakcji cząstkowych:

$$k_{pH} = k_1 \times a_{H^+} \times f_1 + k_2 \times f_1 + k_3 \times f_2 + (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{OH^-} \quad \dots 11$$

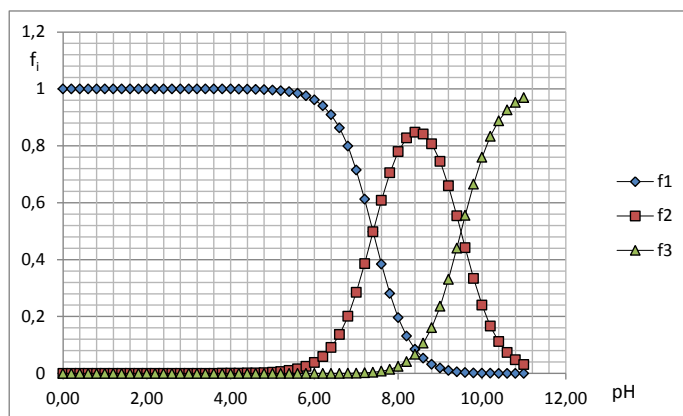
gdzie:

- $a_{H^+}$ ,  $a_{OH^-}$  aktywność jonów wodorowych i wodorotlenowych
- $f_1$ - $f_3$  ułamki stężeń poszczególnych form EPI (protonowanych, nieprotonowanych i monoanionów). Wartości  $f_1$ ,  $f_2$  i  $f_3$  zostały wyznaczone uwzględniając wartości  $pK_a$  EPI wynoszące około 7,4 and 9,5 (Rycina 46)
- $k_1$  katalityczna stała szybkości reakcji rozkładu protonowanych cząsteczek EPI pod wpływem jonów wodorowych
- $k_2$ ,  $k_3$  – katalityczne stałe szybkości spontanicznej hydrolizy pod wpływem wody cząsteczek protonowanych i nieprotonowanych EPI
- $k_4$  i  $k_5$  katalityczne stałe szybkości reakcji rozkładu cząsteczek nieprotonowanych i monoanionów EPI katalizowany jonami wodorotlenowymi



Rycina 45.

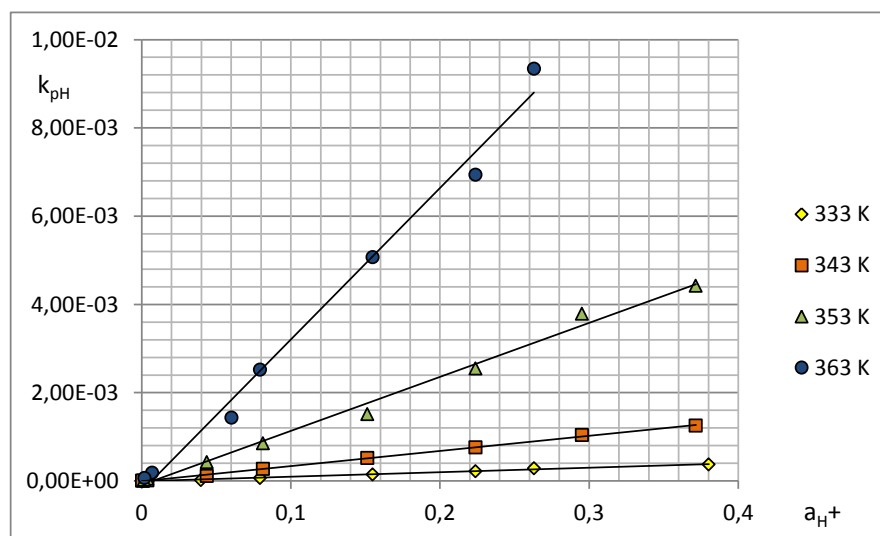
Półlogarytmiczna zależność  $k_{pH} = f(pH)$  reakcji rozkładu EPI w roztworach wodnych w temperaturze 333 K, 343 K, 353 K i 363 K. Punktory zostały wyznaczone doświadczalnie, linią ciągłą oznaczono profil teoretyczny.



Rycina 46.

Ułamki stężeń poszczególnych form jonowych EPI.

Na podstawie równania opisującego całkowitą szybkość reakcji rozkładu EPI wyznaczono poszczególne katalityczne stałe szybkości reakcji. Katalityczne stałe szybkości reakcji  $k_1$  wyznaczono z zależności  $k_{pH} = f(a_{H^+})$ , uwzględniając wartości  $k_{pH}$  z zakresu pH 0,42-3,40. W tym zakresie pH EPI występuje w postaci protonowanej. Wykresy  $k_{pH} = f(a_{H^+})$  są prostoliniowe o nachyleniu dodatnim równym  $k_1$  (Rycina 47).



Rycina 47.

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

Katalityczne stałe szybkości  $k_4$  i  $k_5$  obliczono z równania:

$$k'_{pH} = k_{pH} - (k_1 \times a_{H^+} \times f_1) = (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{OH^-} \quad \dots 12$$

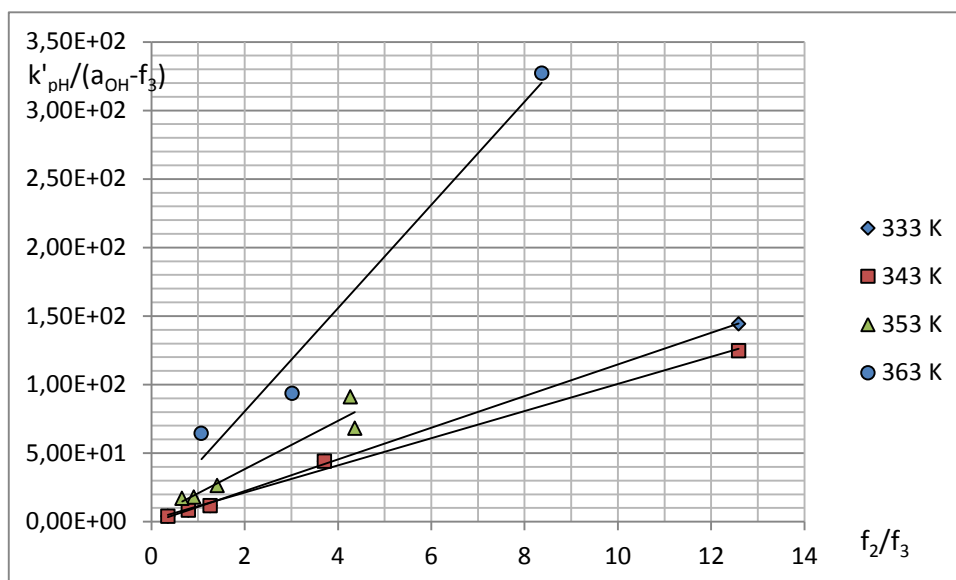


uwzględniając wartości  $k_{pH}$  z zakresu pH powyżej 8,5, w którym suma ułamków stężeń  $f_2 + f_3 \rightarrow 1$ . Wykresy  $k'_{pH}/(a_{OH^-} \times f_3) = f(f_2/f_3)$  są liniowe o nachyleniu dodatnim równym  $k_4$ , natomiast wartość b odpowiada katalitycznej stałej  $k_5$  w danej temperaturze (Rycina 48).

Katalityczne stałe szybkości  $k_2$  i  $k_3$  obliczono z następującego równania:

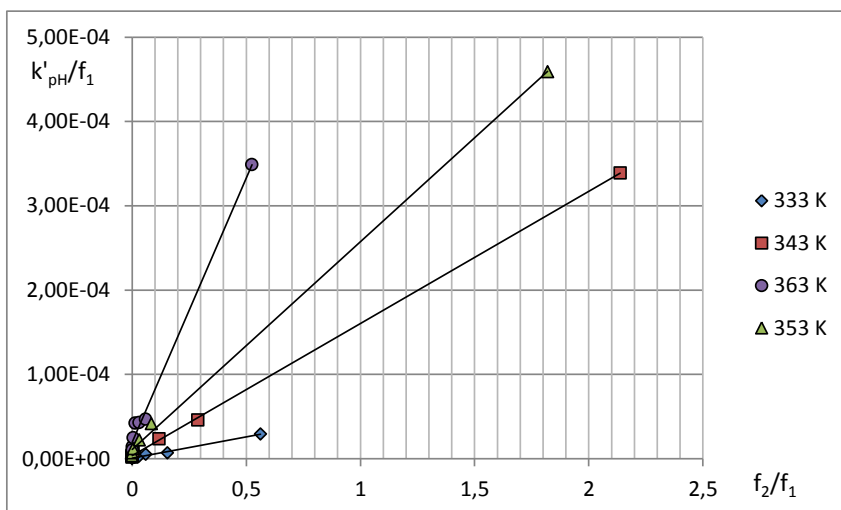
$$k'_{pH} = k_{pH} - (k_1 \times a_{H^+} \times f_1 + (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{OH^-}) = k_2 \times f_1 + k_3 \times f_2 \quad \dots 13$$

po uwzględnieniu wartości  $k_{pH}$  z zakresu pH 2,8–7, w którym suma ułamków stężeń  $f_1 + f_2 \rightarrow 1$ . Wykresy  $k'_{pH}/f_1 = f(f_2/f_1)$  są liniowe o nachyleniu dodatnim równym  $k_3$ , natomiast wartość b odpowiada katalitycznej stałej szybkości  $k_2$  (Rycina 49).



Rycina 48.

Zależność  $k'_{pH}/(a_{OH^-} \cdot f_3) = f(f_2/f_3)$  reakcji rozkładu EPI w roztworach wodnych.



Rycina 49.

Zależność  $k'_{pH}/f_1 = f(f_2/f_1)$  reakcji rozkładu EPI w roztworach wodnych.

Wyznaczone katalityczne stałe szybkości reakcji cząstkowych przedstawiono w tabeli 47 i wykorzystano je do obliczenia profilu teoretycznego. Obliczony profil przedstawiono na rycinie 45 linią ciągłą, a wartości wyznaczone doświadczalnie – punktami.

Uzyskana zgodność profilu obliczonego z profilem doświadczalnym potwierdza prawidłowość zastosowanego równania opisującego całkowitą szybkość reakcji rozkładu EPI.

### Parametry termodynamiczne

Wyznaczone wartości katalitycznych stałych szybkości reakcji posłużyły do wyznaczenia zależności Arrheniusa (Rycina 50), czyli zależności pomiędzy katalityczną stałą szybkości reakcji a odwrotnością temperatury bezwzględnej:

$$k_i = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad \dots 14$$

Po zlogarytmowaniu równanie to przyjmuje postać:

$$\ln k_i = \ln A - E_a/RT \quad \dots 15$$

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 ( $\Delta H^\ddagger$ ) i entropię reakcji ( $\Delta S^\ddagger$ ) (Tabela 47) obliczono z następujących wzorów:

$$E_a = -aR \text{ [J mol}^{-1}\text{]} \quad \dots 16$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \text{ [J mol}^{-1}\text{]} \quad \dots 17$$

$$\Delta S^\ddagger = R [\ln A - \ln (kT/h)] \text{ [J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}\text{]} \quad \dots 18$$

gdzie:

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

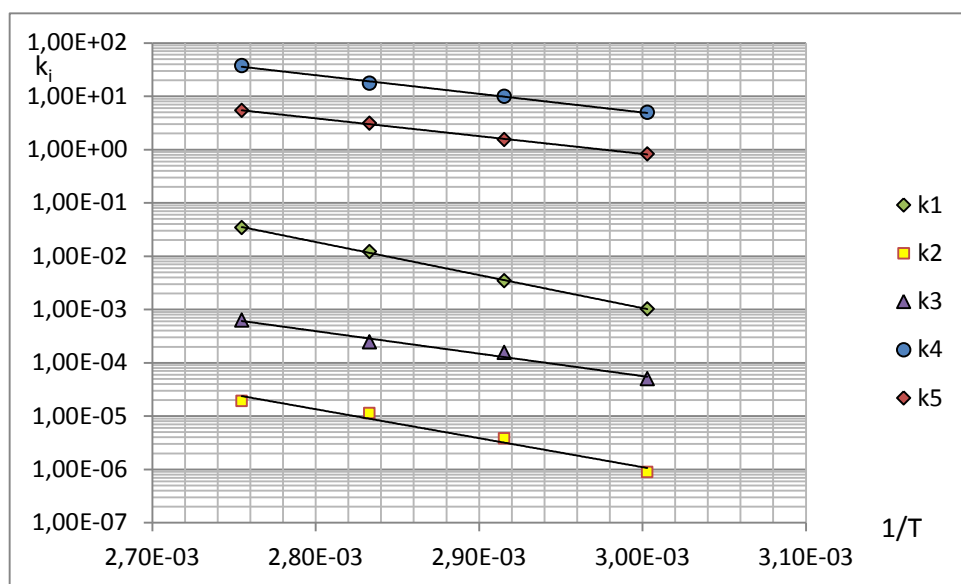
k – stała Boltzmanna =  $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ [J K}^{-1}\text{]}$

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

Tabela 47.

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

| T, K   | 1/T                  | k $\pm \Delta k$                | Zależność<br>$k_i = f(1/T)$                                 | Parametry termodynamiczne   |
|--|----------------------|---------------------------------|---|---|
| $k_1 \text{ [mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}\text{]}$ |                      |                                 |   |   |
| 333  | $3,00 \cdot 10^{-3}$ | $(1,02 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$ | r = -0,9997<br>a = -14282 $\pm$ 1030<br>b = 36,0 $\pm$ 3,3  | $E_a = 118,8 \pm 9,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta H^\ddagger = 116,3 \pm 9,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta S^\ddagger = 54,5 \pm 27,0 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$     |
| 343  | $2,92 \cdot 10^{-3}$ | $(3,44 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$ |   |   |
| 353  | $2,83 \cdot 10^{-3}$ | $(1,22 \pm 0,11) \cdot 10^{-2}$ |   |   |
| 363  | $2,75 \cdot 10^{-3}$ | $(3,43 \pm 0,41) \cdot 10^{-2}$ |   |   |
| $k_2 \text{ [s}^{-1}\text{]}$                                      |                      |                                 |   |   |
| 333  | $3,00 \cdot 10^{-3}$ | $(8,82 \pm 8,22) \cdot 10^{-7}$ | r = -0,9850<br>a = -12518 $\pm$ 6666<br>b = 23,8 $\pm$ 19,2 | $E_a = 104,1 \pm 55,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta H^\ddagger = 101,6 \pm 55,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta S^\ddagger = -46,6 \pm 159,7 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ |
| 343  | $2,92 \cdot 10^{-3}$ | $(3,79 \pm 2,75) \cdot 10^{-6}$ |   |   |
| 353  | $2,83 \cdot 10^{-3}$ | $(1,12 \pm 0,85) \cdot 10^{-5}$ |   |   |
| 363  | $2,75 \cdot 10^{-3}$ | $(1,91 \pm 0,41) \cdot 10^{-5}$ |   |   |
| $k_3 \text{ [s}^{-1}\text{]}$                                      |                      |                                 |   |   |
| 333  | $3,00 \cdot 10^{-3}$ | $(5,02 \pm 0,42) \cdot 10^{-5}$ | r = -0,9890<br>a = -9708 $\pm$ 4416<br>b = 19,3 $\pm$ 12,7  | $E_a = 80,7 \pm 36,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta H^\ddagger = 78,3 \pm 36,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta S^\ddagger = -84,0 \pm 105,7 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$   |
| 343  | $2,92 \cdot 10^{-3}$ | $(1,57 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$ |   |   |
| 353  | $2,83 \cdot 10^{-3}$ | $(2,46 \pm 0,11) \cdot 10^{-4}$ |   |   |
| 363  | $2,75 \cdot 10^{-3}$ | $(6,28 \pm 0,52) \cdot 10^{-4}$ |   |   |
| $k_4 \text{ [mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}\text{]}$ |                      |                                 |   |   |
| 333  | $3,00 \cdot 10^{-3}$ | 4,95 $\pm$ 0,65                 | r = -0,9979<br>a = -8042 $\pm$ 1579<br>b = 25,7 $\pm$ 4,5   | $E_a = 66,8 \pm 13,1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta H^\ddagger = 64,4 \pm 13,1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta S^\ddagger = -30,8 \pm 37,8 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$    |
| 343  | $2,92 \cdot 10^{-3}$ | 9,89 $\pm$ 1,21                 |   |   |
| 353  | $2,83 \cdot 10^{-3}$ | 17,6 $\pm$ 8,7                  |   |   |
| 363  | $2,75 \cdot 10^{-3}$ | 37,6 $\pm$ 19,2                 |   |   |
| $k_5 \text{ [mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}\text{]}$ |                      |                                 |   |   |
| 333  | $3,00 \cdot 10^{-3}$ | 0,821 $\pm$ 3,110               | r = -0,9993<br>a = -7678 $\pm$ 882<br>b = 22,8 $\pm$ 2,5    | $E_a = 63,8 \pm 7,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta H^\ddagger = 61,4 \pm 7,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$<br>$\Delta S^\ddagger = -54,8 \pm 21,1 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$      |
| 343  | $2,92 \cdot 10^{-3}$ | 1,44 $\pm$ 7,17                 |   |   |
| 353  | $2,83 \cdot 10^{-3}$ | 3,10 $\pm$ 24,78                |   |   |
| 363  | $2,75 \cdot 10^{-3}$ | 5,39 $\pm$ 99,46                |   |   |



Rycina 50.

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

Najniższą energię aktywacji wykazują reakcje rozkładu cząsteczek nieprotonowanych oraz monoanionu EPI katalizowane jonami wodorotlenowymi. Ujemne entropie aktywacji obserwuje się dla reakcji spontanicznych pod wpływem wody oraz reakcji katalizowanych jonami wodorotlenowymi. 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  $\Delta S^\ddagger$  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 oraz katalizowaną jonami wodorotlenowymi może być uzasadniona dodatnim udziałem entropii reakcji protonowania.

### Wpływ siły jonowej [112]

Do interpretacji wpływu siły jonowej na szybkość rozkładu EPI zastosowano równanie Brönstedta-Bjerruma:

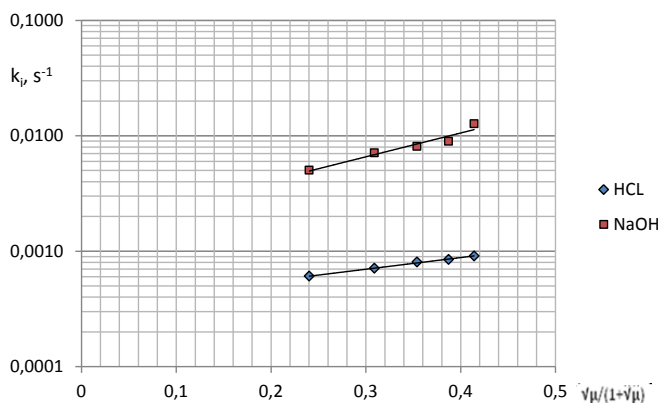
$$\log k_{\text{obs}} = \log k_0 + 2QZ_A Z_B \frac{\sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}}$$

...19

gdzie:

- $k_i$  obserwowane stałe szybkości reakcji wyznaczone w 0,05 mol/l kwasie solnym, w temperaturze 363 K i w roztworach wodorotlenku sodu 0,05 mol/l w temperaturze 303 K; badania prowadzono stosując roztwory o sile jonowej odpowiednio: 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 i 0,50 mol/l
- $k_0$  wartość stałej szybkości reakcji przy wartości siły jonowej równej zero
- $Z_A$  i  $Z_B$  ładunek reagujących cząsteczek
- $\mu$  wartość siły jonowej
- $2Q = 1,02$  w temperaturze 25°C w roztworach wodnych

Wykonano wykresy  $\log k_{\text{obs}} = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$  (Rycina 51) oraz obliczono parametry tego równania (Tabela 48).



Rycina 51.

Zależność  $\log k_i = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$  reakcji rozkładu EPI w 0,05 mol/l kwasie solnym w temperaturze 363 K oraz w 0,05 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 303 K.

Wykresy  $\log k_{\text{obs}} = f(\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu}))$  są prostoliniowe, a ich nachylenie wynosi  $2QZ_A Z_B$ . Z wyznaczonego nachylenia, znając wartość  $2Q$  w danej temperaturze, można obliczyć ładunek reagujących jonów  $Z_A$  i  $Z_B$ , co ma istotne znaczenie w ustalaniu mechanizmu reakcji rozkładu.

W 0,05 mol/l kwasie solnym w temperaturze 363 K, wyznaczona wartość  $2QZ_AZ_B = 1,01 \pm 0,11$ , natomiast w 0,05 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 303 K  $2QZ_AZ_B = 2,06 \pm 0,80$ , co może wskazywać, że w roztworach kwasu solnego ma miejsce reakcja protonowanych cząsteczek EPI z jonami wodorowymi, natomiast w środowisku silnie zasadowym, reakcja dianionu EPI z jonami wodorotlenowymi. Z uwagi na szybkość reakcji rozkładu EPI w zakresie pH powyżej 9, profil wyznaczono tylko do pH 9,95, a w tym zakresie obserwowano reakcję monoanionów EPI z jonami wodorotlenowymi.

Tabela 48.

Wpływ siły jonowej na szybkość rozkładu EPI w 0,05 mol/l kwasie solnym w temperaturze 363 K i w 0,05 mol/l roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 303 K

| L.p.                   |        | $k_i, s^{-1}$         | Parametry równania<br>$y = ax + b$   |
|------------------------|--------|-----------------------|--|
| 0,05 mol/HCl, 363 K    |        |                       |  |
| 1                      | 0,4142 | $9,100 \cdot 10^{-4}$ | $a = 1,009 \pm 0,108$<br>$r = 0,9983$<br>$S_a = 0,0339$<br>$S_y = 4,662 \cdot 10^{-3}$ |
| 2                      | 0,3874 | $8,480 \cdot 10^{-4}$ |  |
| 3                      | 0,3539 | $8,040 \cdot 10^{-4}$ |  |
| 4                      | 0,3090 | $7,100 \cdot 10^{-4}$ |  |
| 5                      | 0,2403 | $6,070 \cdot 10^{-4}$ |  |
| 0,05 mol/l NaOH, 303 K |        |                       |  |
| 1                      | 0,4142 | $1,266 \cdot 10^{-2}$ | $a = 2,062 \pm 0,795$<br>$r = 0,9679$<br>$S_a = 0,3091$<br>$S_y = 0,0513$              |
| 2                      | 0,3874 | $8,935 \cdot 10^{-3}$ |  |
| 3                      | 0,3539 | $8,059 \cdot 10^{-3}$ |  |
| 4                      | 0,3090 | $7,104 \cdot 10^{-3}$ |  |
|                        | 0,2403 | $5,024 \cdot 10^{-3}$ |  |

Przeprowadzone badania trwałości EPI w roztworach wodnych potwierdziły, że:

- rozkład EPI zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pseudopierwszego rzędu
- składniki buforu octanowego oraz buforów fosforanowych wykazują efekt katalityczny
- najniższą anergią aktywacji charakteryzują się reakcje rozkładu EPI katalizowane jonami wodorotlenowymi
- w warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej EPI wykazuje najwyższą trwałość w zakresie pH od około 3 do około 5.

### Trwałość EPI w fazie stałej [113]

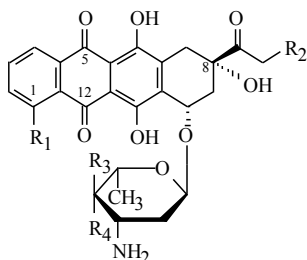
Badania w fazie stałej przeprowadzono w podwyższonej temperaturze w atmosferze powietrza o wilgotności względnej ~76,4% oraz 0%. Wpływ wilgotności względnej powietrza na szybkość rozkładu EPI badano w temperaturze 363 K. Zmiany stężenia EPI analizowano metodą HPLC, z zastosowaniem parametrów rozdzielania opisanych w badaniach w roztworach wodnych.

Rozkład EPI w podwyższonej temperaturze przy RH = 0% zachodził zgodnie z kinetyką reakcji odwracalnej pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Do wyznaczenia stałej szybkości rozkładu konieczne było w tym przypadku zastosowanie techniki odejmowania.

Rozkład EPI w podwyższonej temperaturze i RH powyżej 50% zachodził zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.

Wyznaczone stałe szybkości rozkładu w podwyższonej wilgotności względnej powietrza (RH ~74,6%) w pięciu temperaturach posłużyły do wyznaczenia zależności Arrheniusa oraz parametrów termodynamicznych reakcji, stosując wzory opisane w badaniach w roztworach wodnych.

Uzyskane wyniki badania trwałości EPI w fazie stałej porównano z wynikami badań innych antybiotyków antracyklinowych, tj. daunorubicyny i doksorubicyny (Tabela 49, Rycina 52) [110, 113].



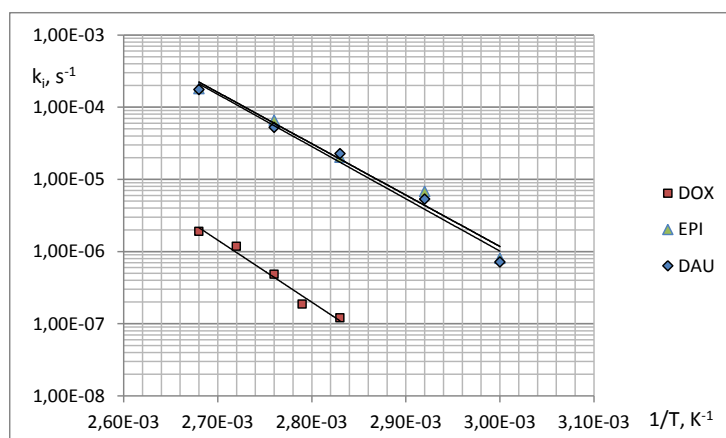
*Doxorubicin:* R<sub>1</sub> = -OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = OH, Doksorubicyna

*Daunorubicin:* R<sub>1</sub> = -OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = OH, Daunorubicyna

*Epirubicin:* R<sub>1</sub> = -OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = OH, R<sub>4</sub> = H, Epirubicyna

Rozkład doksorubicyny w podwyższonej temperaturze i podwyższonej wilgotności względnej powietrza zachodził także zgodnie z równaniem reakcji I rzędu względem stężenia substratu, natomiast w tych samych warunkach rozkład daunorubicyny miał charakter reakcji autokatalitycznej.

Analizując wpływ położenia grupy OH przy C-4' doksorubicyny i epirubicyny, można stwierdzić, iż nie wpływa on na kinetyczny mechanizm rozkładu doksorubicyny i epirubicyny, a jedynie na szybkość tego rozkładu. W badanych warunkach, epirubicyna jest bardziej podatna na rozkład niż doksorubicyna.



Rycina 52.

Półlogarytmiczne zależności  $k_i = f(1/T)$  reakcji rozkładu DAU, DOX, EPI w fazie stałej, RH ~76,4%.

Tabela 49.

Parametry prostej  $\ln k_i = f(1/T)$  oraz parametry termodynamiczne reakcji rozkładu daunorubicyny (DAU), doksorubicyny (DOX) i epirubicyny (EPI) w fazie stałej, RH = 76,4%

| T [K] | 1/T 10 <sup>-3</sup> | (k ± Δk) [s <sup>-1</sup> ]      | Parametry równania<br>$\ln k_i = f(1/T)$                      | Parametry termodynamiczne   |
|-------|----------------------|----------------------------------|---|---|
| DAU   |                      |                                  |   |   |
| 333   | 3,003                | (7,12 ± 0,81) · 10 <sup>-7</sup> | $a = -16581 \pm 3972$<br>$b = 35,9 \pm 11,3$<br>$r = -0,9916$ | $E_a = 138,2 \pm 33,5$ [kJ/mol]<br>$\Delta H^\ddagger = 108,2 \pm 41,1$ [kJ/mol]*<br>$\Delta S^\ddagger = 1,13 \pm 130,61$ [J/(K·mol)]* |
| 343   | 2,915                | (5,32 ± 0,71) · 10 <sup>-6</sup> |   |   |
| 353   | 2,833                | (2,26 ± 0,38) · 10 <sup>-5</sup> |   |   |
| 363   | 2,755                | (5,25 ± 1,95) · 10 <sup>-5</sup> |   |   |
| 373   | 2,681                | (17,5 ± 0,2) · 10 <sup>-5</sup>  |   |   |
| DOX   |                      |                                  |   |   |
| 353   | 2,833                | (1,20 ± 0,10) · 10 <sup>-7</sup> | $a = -19804 \pm 5682$<br>$b = 40,0 \pm 15,6$<br>$r = -0,988$  | $E_a = 164,7 \pm 47,2$ [kJ/mol]<br>$\Delta H^\ddagger = 162,2 \pm 49,7$ [kJ/mol]*<br>$\Delta S^\ddagger = 87,5 \pm 114,8$ [J/(K·mol)]*  |
| 358   | 2,793                | (1,87 ± 0,14) · 10 <sup>-7</sup> |   |   |
| 363   | 2,755                | (4,82 ± 0,39) · 10 <sup>-7</sup> |   |   |
| 368   | 2,717                | (1,18 ± 0,13) · 10 <sup>-6</sup> |   |   |
| 373   | 2,681                | (1,90 ± 0,14) · 10 <sup>-6</sup> |   |   |
| EPI   |                      |                                  |   |   |
| 333   | 3,003                | (8,02 ± 1,28) · 10 <sup>-7</sup> | $a = -16250 \pm 3823$<br>$b = 35,1 \pm 10,9$<br>$r = -0,992$  | $E_a = 135,1 \pm 32,2$ [kJ/mol]<br>$\Delta H^\ddagger = 133,2 \pm 32,5$ [kJ/mol]*<br>$\Delta S^\ddagger = 46,8 \pm 90,2$ [J/(K·mol)]*   |
| 343   | 2,915                | (6,79 ± 0,93) · 10 <sup>-6</sup> |   |   |
| 353   | 2,833                | (2,02 ± 0,30) · 10 <sup>-5</sup> |   |   |
| 363   | 2,755                | (6,61 ± 0,59) · 10 <sup>-5</sup> |   |   |
| 373   | 2,681                | (1,80 ± 0,24) · 10 <sup>-4</sup> |   |   |

\* dla temperatury 298 K



## Wpływ wilgotności względnej powietrza na rozkład EPI

Zależność pomiędzy wilgotnością względną powietrza a trwałością EPI opisana jest podanym poniżej równaniem:

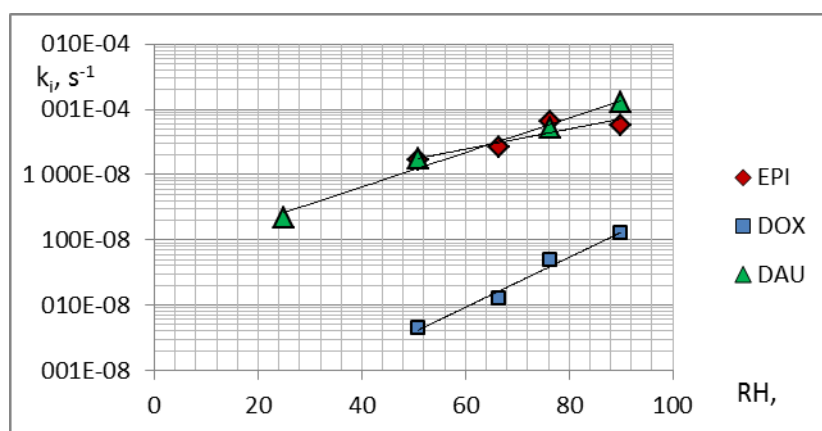
$$\ln k_i = \ln k_0 + a \cdot \text{RH}\% \quad \dots 20$$

Zgodnie z powyższym równaniem wartość nachylenia wykresu  $a$  określa wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość, natomiast wartość  $10^b = k_0$  przy  $\text{RH} = 0\%$ .

Tabela 50.

Parametry równania  $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$  reakcji rozkładu EPI, daunorubicyny i doksorubicyny w temperaturze 363 K

| RH, %         | $(k \pm \Delta k), \text{s}^{-1}$ | Parametry zależności $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$   |
|---------------|-----------------------------------|---|
| Epirubicyna   |                                   |   |
| 50,9          | $(1,67 \pm 0,32) 10^{-5}$         | $a = 0,0379 \pm 0,0334; S_a = 7,77 10^{-3}$<br>$b = -12,9 \pm 2,4; S_b = 0,563$<br>$r = 0,960, S_y = 0,222$ |
| 66,5          | $(2,67 \pm 0,64) 10^{-5}$         |   |
| 76,4          | $(6,61 \pm 0,59) 10^{-5}$         |   |
| 90,0          | $(5,75 \pm 0,41) 10^{-5}$         |   |
| Doksorubicyna |                                   |   |
| 50,9          | $(4,48 \pm 0,71) 10^{-8}$         | $a = 0,0880 \pm 0,0360; S_a = 8,28 10^{-3}$<br>$b = -21,5 \pm 2,6; S_b = 0,599$<br>$r = 0,991, S_y = 0,236$ |
| 66,5          | $(1,28 \pm 0,05) 10^{-7}$         |   |
| 76,4          | $(4,82 \pm 0,39) 10^{-7}$         |   |
| 90,0          | $(1,25 \pm 0,10) 10^{-6}$         |   |
| Daunorubicyna |                                   |   |
| 25,0          | $(2,19 \pm 0,66) 10^{-6}$         | $a = 0,0663 \pm 0,0122; S_a = 6,08 10^{-3}$<br>$b = -13,3 \pm 1,7; S_b = 0,390$<br>$r = 0,992, S_y = 0,110$ |
| 50,9          | $(1,73 \pm 0,31) 10^{-5}$         |   |
| 76,4          | $(5,25 \pm 1,95) 10^{-5}$         |   |
| 90,0          | $(1,29 \pm 0,15) 10^{-4}$         |   |



Rycina 53.

Półlogarytmiczny wykres zależności  $k_i = f(\text{RH}\%)$  reakcji rozkładu epirubicyny, daunorubicyny i doksorubicyny w fazie stałej w temperaturze 363 K.

W warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza chlorowoderek epirubicyny wykazuje najmniejszą trwałość spośród porównywanych substancji. Jednocześnie jego trwałość w fazie stałej jest zależna od wilgotności względnej powietrza w mniejszym stopniu niż pozostałych antracyklin. Największą trwałością charakteryzuje się chlorowoderek doksorubicyny, co znajduje odzwierciedlenie w jego wyższej niż dla pozostałych związków wartości energii aktywacji.

Podsumowując badania w fazie stałej stwierdzono, że:

- kinetyczny mechanizm rozkładu EPI zależy od warunków przechowywania. W atmosferze powietrza o RH ~76,4% rozkład zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu, natomiast przy RH = 0% zgodnie z równaniem reakcji odwracalnej pierwszego rzędu względem stężenia substratu
- trwałość epirubicyny w fazie stałej jest porównywalna z daunorubicyną, natomiast doksorubicyna wykazuje w tych warunkach największą trwałość.

*Badania podatności na rozkład EPI pod wpływem światła [114]*

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 EPI w czasie reakcji fotodegradacji zastosowano metodę spektrofotometryczną w zakresie światła widzialnego przy  $\lambda = 480$  nm, co umożliwiło wykonanie pomiarów w tej samej kuwecie, w której prowadzono naświetlanie.

W pierwszym etapie określono czy substancja jest fotostabilna czy też fotolabilna. W tym celu zastosowano aktynometr chemiczny, którym był roztwór chlorowodoru chininy. EPI ulegała znaczącemu rozkładowi w czasie gdy absorbancja aktynometru chemicznego zmieniała 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 EPI na promieniowanie, absorbancja zmieniała się w zależności od zastosowanego promieniowania:

- od wartości  $c_0 \rightarrow c_\infty$  przy  $\lambda = 365$  nm
- od wartości  $c_0 \rightarrow 0$  przy  $\lambda = 510$  nm

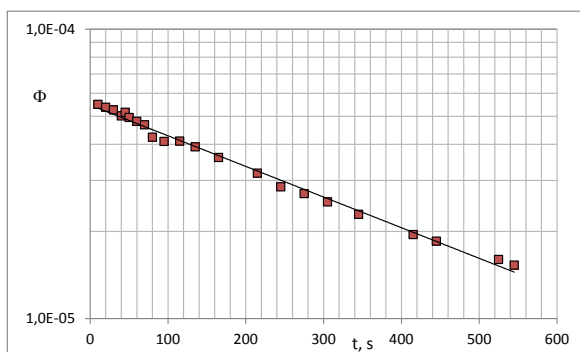
Otrzymano liniową zależność wykresu  $\ln(c - c_\infty) = f(t)$  ( $\lambda = 365$  nm) lub  $\ln c = f(t)$  ( $\lambda = 510$  nm). Z powyższych zależności wyznaczono obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu EPI, które w podanych warunkach wynoszą:

$$k_{\text{obs}} = (7,79 \pm 0,57)10^{-5} \text{ s}^{-1} (\lambda_{\text{maks}} = 365 \text{ nm})$$

$$k_{\text{obs}} = (7,96 \pm 0,66)10^{-4} \text{ s}^{-1} (\lambda_{\text{maks}} = 510 \text{ nm})$$

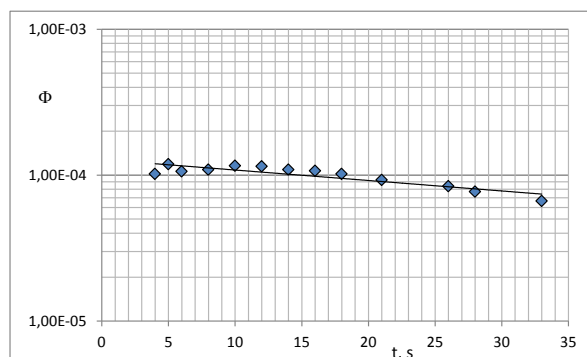
Wyznaczono także rzeczywiste wydajności kwantowe  $\Phi$ , które wynoszą odpowiednio  $6,10 \cdot 10^{-5}$  dla  $\lambda = 365$  nm i  $1,26 \cdot 10^{-4}$  dla  $\lambda = 510$  nm. Wydajności kwantowe zmian stężenia substratu i pierwotnych reakcji fotochemicznych, zgodnie z prawem Starka-Einsteina, powinny być równe jedności. Wyższe wartości  $\Phi$  mogą wskazywać na wtórne procesy fotochemiczne, generowane przez pierwotne produkty rozkładu. W przypadku reakcji w roztworach wodnych, wydajności kwantowe przyjmują często wartości niższe od jedności, co może być spowodowane deaktywacją cząsteczek badanego związku przez cząsteczki rozpuszczalnika.

Zależności  $\ln \varphi_i = f(t)$  są prostoliniowe (Rycina 54, Rycina 55), 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 54.

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



Rycina 55.

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

Podsumowując badania fotostabilności można stwierdzić, że:

- metoda spektrofotometrii UV-VIS jest odpowiednia do badania fototrwałości EPI w roztworach wodnych i wyznaczenia obserwowanych stałych szybkości rozkładu pod wpływem światła
- rozkład EPI pod wpływem światła zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu, jednakże w przypadku promieniowania o  $\lambda = 365$  nm należało zastosować technikę odejmowania
- wydajności kwantowe reakcji fotodegradacji EPI rzędu  $10^{-4} - 10^{-5}$  mogą wskazywać na deaktywujący wpływ cząsteczek rozpuszczalnika na wzbudzone cząsteczki EPI.

## 6. WNIOSKI

---

1. Chlorowodorek epirubicyny (EPI) jest podatny na rozkład w roztworach wodnych, który zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pseudopierwszego rzędu.
2. W reakcji rozkładu EPI w roztworach wodnych występuje ogólna i właściwa kataliza kwasowo-zasadowa. Efekt katalityczny wykazują składniki buforu octanowego oraz buforów fosforanowych.
3. Na właściwą katalizę kwasowo-zasadową EPI składają się następujące reakcje: hydroliza protonowanych cząsteczek EPI katalizowana jonami wodorowymi, hydroliza spontaniczna pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu oraz rozkład cząsteczek nieprotonowanych i monoanionów EPI katalizowany jonami wodorotlenowymi. EPI jest najbardziej trwała w zakresie pH od 3 do 5.
4. EPI 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 EPI w fazie stałej zależy od warunków przechowywania i zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu przy RH powyżej 50% lub zgodnie z modelem reakcji odwracalnej pierwszego rzędu przy RH = 0%.



## 7. STRESZCZENIE

---

Celem badań była ocena trwałości chlorowodoru epirubicyny (EPI) w roztworach wodnych. Badania w roztworach wodnych obejmowały wpływ stężenia jonów wodorowych i temperatury, ogólną i właściwą katalizę kwasowo-zasadową oraz rozkład pod wpływem światła. Dodatkowo wykonano badania trwałości EPI w fazie stałej, które polegały na wyznaczeniu kinetycznego mechanizmu rozkładu w warunkach podwyższonej temperatury przy RH ~74,4% oraz 0% oraz wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza.

Do oceny zmian stężenia substratu zastosowano metodę HPLC, natomiast w przypadku reakcji fotodegradacji – metodę UV-VIS. Zastosowane metody analityczne zostały zwalidowane.

Badania trwałości w roztworach wodnych wykonano w zakresie pH od 0,42 do 9,95 w czterech temperaturach (333 K, 343 K, 353 K i 363 K). Rozkład EPI w roztworach wodnych zachodził zgodnie z kinetyką reakcji pseudopierwszego rzędu względem stężenia substratu i jest opisany następującym równaniem:

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

Analizując wpływ całkowitego stężenia składników badanych buforów – fosforanowych, octanowego i boranowego, zaobserwowano różnice statystycznie istotne w szybkości reakcji ze zmianą stężenia buforu w przypadku buforu octanowego oraz buforów fosforanowych. W pozostałym zakresie pH  $k_{\text{obs}} = k_{\text{pH}}$ .

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

- reakcja hydrolizy protonowanych cząsteczek EPI pod wpływem jonów wodorowych
- reakcja hydrolizy spontanicznej pod wpływem wody, zależna od ładunku substratu
- reakcja rozkładu cząsteczek nieprotonowanych oraz monoanionów pod wpływem jonów wodorotlenowych.

Całkowita szybkość reakcji jest równa sumie poszczególnych reakcji cząstkowych:

$$k_{\text{pH}} = k_1 \times a_{\text{H}^+} \times f_1 + k_2 \times f_1 + k_3 \times f_2 + (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{\text{OH}^-}$$

Celem wyznaczenia katalitycznej stałej szybkości reakcji rozkładu protonowanych cząsteczek EPI pod wpływem jonów wodorowych, wykonano wykres  $k_{\text{pH}} = f(a_{\text{H}^+})$ , którego nachylenie odpowiada wartości  $k_1$  w danej temperaturze. Katalityczne stałe reakcji rozkładu cząsteczek nieprotonowanych i monoanionów EPI pod wpływem jonów wodorotlenowych wyznaczono z zależności  $k'_{\text{pH}} = k_{\text{pH}} - (k_1 \times a_{\text{H}^+} \times f_1) = (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{\text{OH}^-}$ , uwzględniając wartości pH powyżej 8,5, w którym  $f_2 + f_3 \rightarrow 1$ , natomiast wartości katalitycznych stałych szybkości  $k_2$  i  $k_3$  wyznaczono z zależności  $k'_{\text{pH}} = k_{\text{pH}} - (k_1 \times a_{\text{H}^+} \times f_1 + (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{\text{OH}^-}) = k_2 \times f_1 + k_3 \times f_2$ , po uwzględnieniu wartości  $k_{\text{pH}}$  z zakresu pH 2,8–7, w którym suma ułamków stężeń  $f_1 + f_2 \rightarrow 1$ .

Stwierdzono, że w warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej, EPI wykazuje największą trwałość w zakresie pH od 3 do 5. Wyznaczone katalityczne stałe szybkości reakcji wykorzystano do wyznaczenia energii aktywacji oraz entalpii i entropii reakcji.

Wykazano, że roztwory wodne EPI są podatne na rozkład pod wpływem światła. Rozkład ten zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Stałe szybkości rozkładu EPI pod wpływem światła wyznaczono metodą UV-VIS. W przypadku promieniowania o  $\lambda = 365$  nm, celem wyznaczenia  $k_{\text{obs}}$  należało zastosować technikę odejmowania.

Określono także kinetyczny mechanizm rozkładu EPI w fazie stałej, który zależał od warunków przechowywania. Przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza, rozkład EPI zachodził zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu, podczas gdy przy RH = 0%, zgodnie z modelem reakcji odwracalnej pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Uzyskane wyniki trwałości EPI w fazie stałej porównano z wynikami uzyskanymi w podobnych warunkach badania dla daunorubicyny oraz doksorubicyny.



# Stability of epirubicin hydrochloride(EPI) in aqueous solutions

*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 epirubicin hydrochloride (EPI) in aqueous solutions. Aqueous phase studies included specific and general acid-base catalysis, and stability of EPI solutions under the influence of light. Additionally, the kinetic mechanism of EPI degradation in the solid state and the influence of temperature at RH = 76.4% and relative air humidity at 363 K were determined.

An HPLC method was used to determine the changes in the concentration of EPI, while a UV-VIS method was used for photodegradation studies. Both methods were validated. Stability studies in aqueous solutions were performed in a pH range from 0.42 to 9.95 in four temperatures. The degradation of EPI in aqueous solutions was a pseudo-first-order reaction with respect to the substrate concentration described by following equation:

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

Under the conditions of this study, the rate constants depended on the total concentrations of the phosphate and acetate buffers, which indicated that the components of the buffers catalyzed the degradation of EPI (general acid-base catalysis). In order to verify that the differences between  $k_{\text{obs}}$  determined at different buffer concentrations were statistically significant the parallelism test was used. Since in the reaction solutions of EPI in HCl and borate buffer general acid-base catalysis was not observed, in that pH range the values of  $k_{\text{obs}} = k_{\text{pH}}$ .

The semilogarithmic relationship  $k_{\text{pH}} - \text{pH}$  indicated that in water solutions at pH 0.42 – 9.95 the following reactions occurred:

- degradation of the protonated molecules of EPI catalyzed by hydrogen ions
- spontaneous hydrolysis of protonated and unprotonated molecules of EPI under the influence of water

- degradation of unprotonated molecules and monoanions of EPI catalyzed by hydroxide ions.

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

$$k_{\text{pH}} = k_1 \times a_{\text{H}^+} \times f_1 + k_2 \times f_1 + k_3 \times f_2 + (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{\text{OH}^-}$$

The catalytic rate constants  $k_1$  were calculated from the plots  $k_{\text{pH}} = f(a_{\text{H}^+})$  by using the values of  $k_{\text{pH}}$  in the pH range 0.42 – 3.40. The plots were linear with a positive slope that equaled  $k_1$ .

The catalytic rate constants  $k_4$  and  $k_5$  were calculated from the equation  $k'_{\text{pH}} = k_{\text{pH}} - (k_1 \times a_{\text{H}^+} \times f_1) = (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{\text{OH}^-}$  using  $k_{\text{pH}}$  values above pH 8.5 where the concentrations  $f_2 + f_3 \rightarrow 1$ . The catalytic rate constants  $k_2$  and  $k_3$  were calculated from the equation  $k'_{\text{pH}} = k_{\text{pH}} - (k_1 \times a_{\text{H}^+} \times f_1 + (k_4 \times f_2 + k_5 \times f_3) \times a_{\text{OH}^-}) = k_2 \times f_1 + k_3 \times f_2$  using the  $k_{\text{pH}}$  values from pH 2.8 – 7, where the concentrations of  $f_1 + f_2 \rightarrow 1$ . EPI is the most stable at pH 3 – 5. The catalytic rate constants were used to determine the energy of activation, enthalpy and entropy of degradation of EPI.

Aqueous solutions of EPI are susceptible to photodegradation. In order to determine the observed rate constants a UV-VIS method was used. This process is the first-order reaction with respect to the substrate concentration. Under radiation at 365 nm the absorbance of EPI  $A \rightarrow A_\infty$  and the subtraction technique was used to determine the observed rate constant. At 510 nm  $A \rightarrow 0$ .

The kinetic mechanism of EPI degradation in solid state were also established and it depends on storage conditions. At RH > 50% it was a first-order reaction depending on the substrate concentration, while at RH = 0% it was the reversible first-order reaction depending on the substrate concentration.

The so-obtained results in the solid state were compared with results for daunorubicin and doxorubicin.

## 8. PIŚMIENNICTWO

---

1. Globocan 2012: *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. <http://www.globocan.iarc.fr>.
2. Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W.: *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2009 roku*. Centrum Onkologii Instytut M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa, 2011.
3. Didkowska J., Meder J. (red.): *Podstawy onkologii klinicznej*. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Warszawa, 2011.
4. Maśliński S., Ryżewski J. (red.): *Patofizjologia. Podręcznik dla studentów medycyny*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2007.
5. Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L.: *Robbins Patologia*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2008.
6. Zając M., Pawełczyk E., Jelińska A.: *Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów*. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, 2006.
7. Ed. Lemke T.L., Williams D.A. (ed.): *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Seventh Edition, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2013.
8. Steinhilber D., Schubert-Zsilavec M., Roth H.J.: *Chemia Medyczna. Cele leków, substancje czynne, biologia chemiczna*. Jelińska A., Pałka J., Zając M. (red. wyd. I polskiego), MedPharm Polska, Wrocław 2012.
9. Kostowski W., Herman Z. (red.): *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*. Tom I-II Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2004.
10. Danysz A., Buczek W.: *Kompendium farmakologii i farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2008.
11. Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L.: *Farmakologia Goodmana & Gilmana*. Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o., Lublin, 2007.
12. Pawełczyk E., Hermann T.: *Podstawy trwałości leków*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1982.
13. Szulawska A., Czyż M.: *Molekularne mechanizmy działania antracyklin*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (online), 2006; 60: 78–100.
14. Robert J.: *Epirubicin. Clinical pharmacology and dose-effect relationship*. Drugs, 1993; 45(Suppl.2): 20–30.
15. Wąsowska M., Oszczapowicz I.: *Modyfikacje antybiotyków antracyklinowych*. Farmacja Polska, 2004; 60: 587–602.
16. Janiec W., Krupińska J. (red.): *Farmakodynamika. Podręcznik dla studentów farmacji*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
17. <http://leki-informacje.pl/lek/charakterystyka-szczegolowa/452,farmorubicin-r-d.html>.
18. Quigley G.J., Wang A.H., Ughetto G., van der Marel G., van Boom J.H., Rich A.: *Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG)*. Proceedings of the National Academy of Science USA, 1980; 77: 7204–7208.

19. Gniazdowski M., Szmigiero L.: *Molekularne mechanizmy oddziaływania związków przeciwnowotworowych na DNA*.  
Na Pograniczu Chemii i Biologii, 2003; 7: 45–73.
20. Chaires J.B., Satyanarayana S., Suh D., Fokt I., Przewłoka T., Priebe W.: *Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA*.  
Biochemistry, 1996; 35(7): 2047–2053.
21. Taatjes D.J., Gaudiano G., Resing K., Koch T.H.: *Alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin*.  
Journal of Medicinal Chemistry, 1996; 39: 4135–4138.
22. Taatjes D.J., Gaudiano G., Resing K., Koch T.H.: *Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin*.  
Journal of Medicinal Chemistry, 1997; 40: 1276–1286.
23. Szulawska A., Gniazdowski M., Czyż M.: *Sequence specificity of formaldehyde-mediated covalent binding of anthracycline derivatives to DNA*.  
Biochemical Pharmacology, 2005; 69: 7–18.
24. Olinski R., Jaruga P., Foksinski M., Bialkowski K., Tujakowski J.: *Epirubicin-induced oxidative DNA damage and evidence for its repair in lymphocytes of cancer patients who are undergoing chemotherapy*.  
Molecular Pharmacology, 1997; 52: 882–885.
25. Plastaras J.P., Dedon P.C., Marnett L.J.: *Effects of DNA structure on oxopropenylation by the endogenous mutagens malondialdehyde and base propenal*.  
Biochemistry, 2002; 41: 5033–5042.
26. Munger C., Ellis A., Woods K., Randolph J., Yanovich S., Gewirtz D.: *Evidence for inhibition of growth related to compromised DNA synthesis in the interaction of daunorubicin with H-35 rat hepatoma*.  
Cancer Research, 1988; 48: 2404–2411.
27. Sheikh M.S., Li X.S., Chen J.C., Shao Z.M., Ordonez J.V., Fontana J.A.: *Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways*.  
Oncogene, 1994; 9: 3407–3415.
28. Cullinane C., Philips D.R.: *Introduction of stable transcriptional blockage sites by adriamycin: GpC specificity of apparent adriamycin-DNA adducts and dependence on iron(III) ions*.  
Biochemistry, 1990; 29: 5638–5646.
29. Binashi M., Bigioni M., Cipollone A., Rossi C., Goso C., Maggi C.A., Capranico G., Animati F.: *Anthracyclines: selected new development*.  
Current Medicinal Chemistry - Anticancer Agents, 2001; 1: 113–130.
30. Fornari F.A., Randolph J.K., Yalowich J.C., Ritke M.K., Gewirtz D.A.: *Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells*.  
Molecular Pharmacology, 1994; 45: 649–656.
31. Singal P.K., Deally C.M., Weinberg L.E.: *Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review*.  
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1987; 19: 817–828.
32. Laurent G., Jaffrezou J.P.: *Signaling pathways activated by daunorubicin*.  
Blood, 2001; 98: 913–924.
33. Panaretakis T., Pokrovskaja K., Shoshan M.C., Grandier D.: *Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin*.  
Journal of Biological Chemistry, 2002; 277: 44317–44326.
34. Minotti G., Ronchi R., Salvatorelli E., Menna P., Cairo G.: *Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy*.  
Cancer Research, 2001; 61: 8422–8428.

35. Basaran M., Baybek E.S., Saglam S., Eralp L., Sakar B., Atalar A.C., Bilgic B., Ozger H., Onat H.: *A phase II study of cisplatin, ifosfamide and epirubicin combination chemotherapy in adults with nonmetastatic and extremity osteosarcomas.* *Oncology*, 2007; 72: 255–260.
36. Park K.H., Kim J.S., Park J., Seo H.Y., Park Y.J., Choi I.K., Oh S. Ch., Seo J.H., Kim Ch. Y., Jung K.Y., Shin S.W., Kim Y.K., Kim J.S., Lee N.J.: *Concurrent chemoradiation followed by adjuvant chemotherapy in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma in Korea.* *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2010; 66: 643–651.
37. Al-Amro A., Al-Rajhi N., F.R.C.P.C., Khafaga Y., Memon M., Al-Hebshi A., El-Enbabi A., El-Husseiny G., Radawi A., Belal A., Allam A., El-Sebaie M.: *Neoadjuvant chemotherapy followed by concurrent chemoradiation therapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma.* *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2005; 62(2): 508–513.
38. Neri B., Pantaleo P., Giommoni E. Grifoni M., Paoletti C., Rotella V., Pantalone D., Taddei A., Mercatelli A., Tonellei P.: *Oxaliplatin, 5-fluorouracil/leucovorin and epirubicin as first-line treatment in advanced gastric carcinoma: a phase II study.* *British Journal of Cancer*, 2007; 96: 1043–1046.
39. Schoennemann KR, Jensen HA, Yilmaz M., Jensen B.V., Larsen O., Pfeiffer P.: *Phase II study of short-time oxaliplatin, capecitabine and epirubicin (EXE) as first-line therapy in patients with non-resectable gastric cancer.* *British Journal of Cancer*, 2008; 99: 858–861.
40. Di Lauro L., Belli F., Arena M.G., Carpano S., Paoletti G., Giannarelli D., Lopez M.: *Epirubicin, cisplatin and docetaxel combination therapy for metastatic gastric cancer.* *Annals of Oncology*, 2005; 16: 1498–1502.
41. Leong T., Joon D.L., Willis D., Jayamoham J., Spry N., Harvey J., Di Iulio J., Milner A., Mann G.B., Michael M.: *Adjuvant chemoradiation for gastric cancer using epirubicin, cisplatin and 5-fluorouracil before and after three-dimensional conformal radiotherapy with concurrent infusional 5-fluorouracil: a multicenter study of the transtasman radiation oncology group.* *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2011; 79(3): 690–695.
42. Sun W., Metz J.M., Gallagher M., O'Dwyer P.J., Giantonio B., Whittington R., Haller D.G.: *Two phase I studies of concurrent radiation therapy with continuous-infusion 5-fluorouracil plus epirubicin, and either cisplatin or irinotecan for locally advanced upper gastrointestinal adenocarcinomas.* *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2011; 67: 621–627.
43. Rao S., Starling N., Cunningham D., Benson M., Wotherspoon A., Lupfert C., Kurek R., Oates J., Baselga J., Hill A.: *Phase I study of epirubicin, cisplatin and capecitabine plus matuzumab in previously untreated patients with advanced oesophagogastric cancer.* *British Journal of Cancer*, 2008; 99: 868–874.
44. Okines A.F., Ashley S.E., Cunningham D., Oates J., Turner A., Webb J., Saffery C., Chua Y.J., Chau I.: *Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for advanced esophagogastric cancer: dose-finding study for the prospective multicenter, randomized, phase II/III REAL-3 Trial.* *Journal of Clinical Oncology*, 2010; 28(25): 3945–3950.
45. Hawkes E., Cunningham D., Chau Ian: *The use of epirubicin in gastric cancer.* *Advances in Oncology*, 2010 March: 4–9.
46. Feher O., Vodvarka P., Jassem J., Morack G., Advani S.H., Khoo K.S., Doval D.C., Ermisch S., Roychowdhury D., Miller M.A., von Minckwitz G.: *First-line gemcitabine versus epirubicin in postmenopausal women aged 60 or older with metastatic breast cancer: a multicenter, randomized, phase III study.* *Annals of Oncology*, 2005; 16: 899–908.
47. Mueller V., Thomssen Ch., Schmidt M., Glados M., Jackisch Ch., Heilmann V., Hinke A., Lehnert A., Borowicz H., Mobus H.: *Final results of a phase I/II pilot study of capecitabine with or without vinorelbine after sequential dose-dense epirubicin and paclitaxel in high-risk early breast cancer.* *BMC Cancer*, 2010; 10: 430.

48. Kountourakis P., Missitzis I., Doufexis D., Zobolas V., Pissakas G., Arnogiannaki N., Maliou S., Sotiropoulou A., Ardavanis A.: *Neoadjuvant sequential epirubicin and docetaxel followed by surgery-radiotherapy and post-operative docetaxel or gemcitabine/vinorelbine combination based on primary response: a multimodality approach for locally advanced breast cancer.* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2011; 137: 221–22.
49. Bergh J., Wiklund T., Erikstein B., Lidbrink E., Lindman H., Malmstrom P., Kellokumpu-Lehtinen P., Bengtsson N.O., Soderlund G., Anker G., Wist E., Ottosson S., Salminen E., Ljungman P., Holte H., Nilsson J., Blomqvist C., Wilking N.: *Talored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with marrow-supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: a randomized trial.* The Lancet, 2000; 356: 1384–1391.
50. Burdette-Radoux S., Wood M.E., Olin J.J., Laughlin R.S., Crocker A.M., Ashikaga T., Muss H.B.: *Phase I/II trial of adjuvant dose-dense docetaxel/epirubicin/cyclophosphamide (TEC) in stage II and III breast cancer.* The Breast Journal, 2007; 13(3): 274–280.
51. Abrial C., van Praagh I., Delva R., Leduc B., Fleury J., Gamelin E., Sillet-Bach I., Penault-Llorca F., Amat S., Chollet P.: *Pathological and clinical response of a primary regimen combining vinorelbine, epirubicin, and paclitaxel as neoadjuvant treatment in patients with operable breast cancer.* The Oncologist, 2005; 10: 242–249.
52. Buzdar A.U., Ibrahim N.K., Francis D., Booser D.J., Thomas E.S., Theriault R.L., Puztai L., Green M.C., Arun B.K., Giordano S.H., Cristofanilli M., Frye D.K., Smith T.L., Hunt K.K., Singletary S.E., Sahin A.A., Ewer M.S., Buchholz T.A., Berry D., Hortobagyi G.N.: *Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer.* Journal of Clinical Oncology, 2005; 23: 3676–3685.
53. Bernsdorf M., Ingvar Ch., Joergenssen L., Tuxen M.K., Jakobsen E.H., Saetersdal A., Kimper-Karl M.L., Kroman N., Balslev E., Ejlersen B.: *Effect of adding gefitinib to neoadjuvant chemotherapy in estrogen receptor negative early breast cancer in a randomized phase II trial.* Breast Cancer Research and Treatment, 2011; 126: 463–470.
54. Jaervinen T.A.H., Holli K., Kuukasjaervi T., Isola J.J.: *Predictive value of topoisomerase IIa and other prognostic factors for epirubicin therapy in advanced breast cancer.* British Journal of Cancer, 1998; 77(12): 2267–2273.
55. Bing Yu, Xin Sun, Hong-yan Shen, Feng Gao, Yuan-ming Fan, Zhi-jun Sun.: *Expression of the apoptosis-related genes BCL-2 and BAD in human breast carcinoma and their associated relationship with chemosensitivity.* Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2010; 29: 107.
56. Mozaffari F., Lindemalm Ch., Choudhury A., Granstam-Bjorneklett H., Lekander M., Nilsson B., Ojutkangas M.L., Osterborg A., Bergkvist L, Mellstedt H.: *Systemic immune effects of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide and/or radiotherapy in breast cancer: a longitudinal study.* Cancer Immunology, Immunotherapy, 2009; 58: 111–120.
57. Petrioli R., Fiaschi Al., Pozzessere D., Messinese S., Sabatino M., Marsili S., Correale P., Mangaelli A., Salvestrini F., Francini G.: *Weekly epirubicin in patients with hormone-resistant prostate cancer.* British Journal of Cancer, 2002; 87: 720–725.
58. Neri B., Molinara E., Pantaleo P., Rangan S., Crisci A., Della Melina A., Raugei A., Villari D., Nicitat G.: *Weekly administration of docetaxel and epirubicin as first-line treatment for hormone-refractory prostate carcinoma.* Oncology Research, 2009; 17: 565–570.
59. Petrioli R., Pascucci A., Conca R., Chiriaco G., Francini E., Bargagli G., Fiaschi A., Manganelli A., De Rubertis G., Barbanti G., Ponchiotti R., Francini G.: *Docetaxel and epirubicin compared with docetaxel and prednisone in advanced castrate-resistant prostate cancer: a randomised phase II study.* British Journal of Cancer, 2011; 104: 613–619.

60. Magagnoli M., Balzarotti M., Siracusano L.V., Spina M., Isa L., Morengi E., Tirelli U., Santoro A.: *High relapse rate after a brief chemotherapy course and involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin lymphoma.*  
Leukemia & Lymphoma, 2007; 48(12): 2444–2446.
61. Bishton M.J., Lush R.J., Byrne J.L., Russell N.H., Bronwen E.S., Haynes A.P.: *Ifosfamide, etoposide and epirubicin is an effective combined salvage and peripheral blood stem cell mobilisation regimen for transplant-eligible patients with non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin disease.*  
British Journal of Haematology, 2007; 136: 752–761.
62. Schutt P., Zimmermann K., Derks C., Ebeling P., Welt A., Poser M., Hense J., Metz K., Anhof J., Sandmann M., Neise M., Moritz T., Stuschke M., Niederle N., Seeber S., Nowrousian M.R.: *Anthracycline-reduced sequential combination chemotherapy for younger patients with good-prognosis aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma.*  
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2009; 135: 459–466.
63. Fujimoto A., Saitou M., Ishihara O., Takeda S., Kinoshita K., Itoyama S.: *A case of ovarian malignant Sertoli-Leidig cell tumor treated with CBDCA, etoposide and epirubicin chemotherapy.*  
Cancer & Chemotherapy, 1995; 22(12): 1843–1846.
64. Kalińska A., Staszewski A., Szczylik C., Wcisło G., Korniluk J., Sielużycka J., Nurzyński P., Kowalski P., Langiewicz P.: *Chemioterapia ogólnoustrojowa złożona z cyklofosfamidu, epirubicyny, karboplatyny w połączeniu z chemioterapią dootrzewnową z karboplatyną w terapii raka jajnika.*  
Współczesna Onkologia, 1999; 3(5): 203–207.
65. Ray-Coquard I., Paraiso D., Guastalla J.-P., Leduc B., Guichard F., Martin C., Chauvenet L., Haddad-Guichard Z., Lepille D., Orfeuvre H., Gautier H., Castera D., Pujade-Laurine D.: *Intensified dose of cyclophosphamide with G-CSF support versus standard dose combined with platinum in first-line treatment of advanced ovarian cancer a randomised study from GINECO group.*  
British Journal of Cancer, 2007; 97: 1200–1205.
66. Raki M., Särkioja M., Desmond R.A., Chen D.T., Butzow R., Hemminki A., Kanerva A.: *Oncolytic adenovirus Ad5/3-delta24 and chemotherapy for treatment of orthotopic ovarian cancer.*  
Gynecologic Oncology, 2008; 108(1): 166–172.
67. Zygulska A.L., Pawlega J.: *Assessment of the value of PEF (cisplatin, epirubicin, 5-fluorouracil) in advanced extrahepatic biliary tract and pancreatic cancer.*  
Przeгляд Lekarski, 2008; 65(12): 825–828.
68. Reni M., Cereda S., Bonetto E., Vigano M.G., Passoni P., Zerbi A., Balzano G., Nicoletti R., Staudacher C., Di Carlo V.: *Dose-intense PEFG (cisplatin, epirubicin, 5-fluorouracil, gemcitabine) in advanced pancreatic adenocarcinoma: a dose-finding study.*  
Cancer Investigation, 2007; 25: 594–598.
69. Heinrich S., Pestalozzi B., Lesurtel M., Berrevoet F., Laurent S., Delpero J.R., Raoul J.L., Bachellier P., Dufour P., Moehler M., Weber A., Lang H., Rogiers X., Clavien P.A.: *Adjuvant gemcitabine versus NEOadjuvant gemcitabine/oxaliplatin plus adjuvant gemcitabine in resectable pancreatic cancer: a randomized multicenter phase III study (NEOPAC study).*  
BMC Cancer, 2011; 11: 346.
70. Reni M., Cordio S., Milandri C., Passoni P., Bonetto E., Oliani C., Luppi G., Nicoletti R., Galli L., Bordonaro R., Passardi A., Zerbi A., Balzano G., Aldrighetti L., Staudacher C., Villa E., Di Carlo V.: *Gemcitabine versus cisplatin, epirubicin, fluorouracil and gemcitabine in advanced pancreatic cancer: a randomised, controlled, multicentre phase III trial.*  
The Lancet Oncology, 2005; 6(6): 369–375.
71. Maipang T., Waeanaarepomchai S., Panjapiyakul C., Totemchokchyakam P.: *Cisplatin-epirubicin chemotherapy for advanced unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck.*  
Head & Neck, 1993; 15: 109–114.
72. Saika T., Tsushima T., Nasu Y., Miyaji Y., Saegusa M., Takeda K., Kumon H.: *Two instillations of epirubicin as prophylaxis for recurrence after transurethral resection of Ta and T1 transitional cell bladder cancer: a prospective, randomized controlled study.*  
World Journal of Urology, 2010; 28: 413–418.

73. Weizer A.Z., Tallman Ch., Montgomery J.S.: *Long-term outcomes of intravesical therapy for non-muscle invasive bladder cancer.*  
World Journal of Urology, 2011; 29: 59–71.
74. Nagai T., Okubo T., Sakaguchi R., Seki H., Takeda S.: *Glassy cell carcinoma of the uterine cervix responsive to neoadjuvant intraarterial chemotherapy.*  
International Journal of Clinical Oncology, 2008; 13: 541–544.
75. Maneo A., Ciari S., Bonazzi Ch., Mangioni C.: *Neoadjuvant chemotherapy and conservative surgery for stage IB1 cervical cancer.*  
Gynecologic Oncology, 2008; 111(3): 438–443.
76. Isobe H., Wada Y., Ryo J., Matsushita T., Makino T., Satoh B., Kanaya S., Katayama T., Ohtoshi M.: *An effective chemotherapy regimen for liver metastasis from retroperitoneal fibrosarcoma: report of a case.*  
Japanese Journal of Surgery, 1997; 27: 463–465.
77. Ikushima I., Higashi S., Seguchi K., Ishii A., Ota Y., Shima M., Kanemaru M., Hidaka Y.: *Transarterial infusion chemotherapy with epirubicin in water-in-oil-in-water emulsion for recurrent hepatocellular carcinoma in the residual liver after hepatectomy.*  
European Journal of Radiology, 2009; 69(1): 114–119.
78. Kawamura Y., Ikeda K., Hirakawa M., Hosaka T., Kobayashi M., Saitoh S., Yatsuji H., Sezaki H., Akuta N., Suzuki F., Suzuki Y., Arase Y., Kumada H.: *Efficacy of platinum analogue for advanced hepatocellular carcinoma unresponsive to transcatheter arterial chemoembolization with epirubicin.*  
Hepatology Research, 2009; 39: 346–354.
79. Casanova M., Massimino M., Ferrari A., Spreafico F., Piva L., Coppa J., Luksch R., Cefalo G., Terenziani M., Polastri D., Bellani F.F., Mazzaferro V.: *Etoposide, cisplatin, epirubicin chemotherapy in the treatment of pediatric liver tumors.*  
Pediatric Hematology and Oncology, 2005; 22: 189–198.
80. Lipschulz S.E., Rifai N., Dalton V.M., Levy D.E., Silverman L.B., Lipsitz S.R., Colan S.D., Asselin B.L., Barr R.D., Clavell L.A., Hurwitz C.A., Moghrabi A., Samson Y., Schorin M.A., Gelber R.D., Sallan S.E.: *The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia.*  
New England Journal of Medicine, 2004; 351: 145–153.
81. Iliskovic N., Singal P.K.: *Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure.*  
American Journal of Pathology, 1997; 150: 727–734.
82. Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U.: *Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity.*  
Molecular Pharmacology, 2002; 61: 516–523.
83. de Groot F.M.H., Broxterman H.J., Adams H.P.H.M., van Vliet A., Tesser G.I., Elderkamp Y.W., Schraa A.J., Kok R.J., Molema G., Pinedo H.M., Scheeren H.W.: *Design, synthesis, and biological evaluation of a dual tumor-specific motive containing integrin-targeted plasmin-cleavable doxorubicin prodrug.*  
Molecular Cancer Therapeutics, 2002; 1: 901–911.
84. Koukourakis M.I., Koukouraki S., Fezoulidis I., Kelekis N., Kyrias G., Archimandritis S., Karkavitsas N.: *High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) In glioblastomas and in metastatic brain tumours.*  
British Journal of Cancer, 2000; 83: 1281–1286.
85. Johnston S.R.D., Gore M.E.: *Caelyx: phase II studies In ovarian cancer.*  
European Journal of Cancer, 2001; 37 (Suppl.9): 8–14.
86. Nunez M., Saballs P., Valencia M.E., Santos J., Ferrer E., Santos I., Berrocal A., Galindo M.J., Podzamczar D., Gonzalez-Lahoz J.: *Response to liposomal doxorubicin and clinical outcome of HIV-1-infected patients with Kaposi's sarcoma receiving highly active antiretroviral therapy.*  
HIV Clinical Trials, 2001; 2: 429–437.



87. DeFeo-Jones D., Garsky V.M., Wong B.K., Feng D.M., Bolyar T., Haskell K., Kiefer D.M., Leander K., McAvoy E., Lumma P., Wai J., Senderak E.T., Motzel S.L., Keenan K., Van Zwieten M., Lin J.H., Freidinger R., Huff J., Oliff A., Jones R.E.: *A peptide-doxorubicin 'prodrug' activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo*. *Nature Medicine*, 2000; 6: 1248–1252.
88. Trouet A., Passiukov A., Van Derpoorten K., Fernandez A.M., Abarca-Quinones J., Baurain R., Lobl T.J., Oliyai C., Shochat D., Dubois V.: *Extracellularly tumor-activated prodrugs for the selective chemotherapy of cancer: application to doxorubicin and preliminary in vitro and in vivo studies*. *Cancer Research*, 2001; 61: 2843–2846.
89. Seymour L.W., Ferry D.R., Anderson D., Hesslewood S., Julyan P.J., Poyner R., Doran J., Young A.M., Burtles S., Kerr D.J.: *Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee: Hepatic drug targeting: phase 1 evaluation of polymer-bound doxorubicin*. *Journal of Clinical Oncology*, 2002; 20: 1668–1676.
90. Park J.W., Hong K., Kirpotin D.B., Colbern G., Shalaby R., Baselga J., Shao Y., Nielsen U.B., Marks J.D., Moore D., Papahadjopoulos D., Benz C.C.: *Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery*. *Clinical Cancer Research*, 2002; 8: 1172–1181.
91. Kumar D., Tomar R.S., Deolia S.K., Srivastava R., Mitra M., Tyagi S.: *Isolation and characterization of degradation impurities in epirubicin hydrochloride injection*. *Journal of Chromatography B*, 2008; 869: 45–53.
92. European Pharmacopoeia 8.0  
Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France, 2014.
93. Farmakopea Polska X. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.  
Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2014.
94. Beijnen J.H., Rosing H., de Vries Ph.A., Underberg W.J.M.: *Stability of anthracycline antitumour agents in infusion fluids*. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 1985; 39(6): 220–222.
95. Dine T., Cazin J.C., Gressier B., Luyckx M., Brunet C., Cazin M., Goudaliez F., Mallevais M.L., Toraub I.: *Stability and compatibility of four anthracyclines: doxorubicin, epirubicin, daunorubicin and pirarubicin with PVC infusion bags*. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition*, 1992; 14(6): 365–370.
96. Seargeant L.E., Kobrinsky N.N., Sus C.J., Nazeravich D. R.: *In vitro stability and compatibility of daunorubicin, cytarabine, and etoposide*. *Cancer Treatment Reports*, 1987; 71 (12): 1189–1192.
97. Bekers O., Beijnen J.H., Vis B.J., Suenaga A., Ottagiri M., Bult A., Underberg W.J.M.: *Effect of cyclodextrin complexation on the chemical stability of doxorubicin and daunorubicin in aqueous solutions*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1991; 72: 123-130.
98. Kümmerle A., Krueger T., Dusmet M., Vallet C., Pan Y., Ris H.B., Decosterd L. A.: *A validated assay for measuring doxorubicin in biological fluids and tissues in an isolated lung perfusion model: matrix effect and heparin interference strongly influence doxorubicin measurements*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003; 33: 475–494.
99. Sewell G.J., Rigby-Jones A.E., Priston M.J.: *Stability of intravesical epirubicin infusion: a sequential temperature study*. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2003; 28: 349–353.
100. Ceruti M., Tagini V., Recalenda V., Arpicco S., Cattel L., Airoidi M., C.Bumma C.: *Docetaxel in combination with epirubicin in metastatic breast cancer: pharmacokinetic interactions*. *Il Farmaco*, 1999; 54: 733–739.
101. Badea I., Lazâr L., Moja D., Nikolescu D., Tudose A.: *A HPLC method for the simultaneous determination of seven anthracyclines*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005; 39: 305–309.

102. Pujol M., Munoz M., Prat J., Girona V., De Bolos J.: *Stability study of epirubicin in NaCl 0,9% injection.* Annals of Pharmacotherapy, 1997; 31: 992–995.
103. Barker I.K., Crawford S.M., Fell A.F.: *Determination of plasma concentrations of epirubicin and its metabolites by high-performance liquid chromatography during a 96-h infusion in cancer chemotherapy.* Journal of Chromatography B, 1996; 681: 323–329.
104. Ricciarerllo R., Pichini S., Pacifici R., Altieri I., Pellegrini M., Fattorossi A., Zuccaro R.: *Simultaneous determination of epirubicin, doxorubicin and their principal metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection.* Journal of Chromatography B, 1998; 707: 219–225.
105. Dobbs N.A., Twelves C.J.: *Measurement of epidoxorubicin and its metabolites by high-performance liquid chromatography using an advanced automated sample processor.* Journal of Chromatography, 1991; 572: 211–217.
106. Piekarski M., Jelińska A.: *Anthracyclines still prove effective in anticancer therapy.* Mini Review in Medicinal Chemistry 2013, 13, 627–634.
107. 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* International Journal of Pharmaceutics, 1986, 31, 75–82.
108. Beijnen J.H., van der Houwen O.A.G.J., Underberg W.J.M.: *Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solutions.* International Journal of Pharmaceutics 1986; 32: 123–131.
109. Gupta P.K., Lam C.F., Hung C.T.: *Investigation of the stability of doxorubicin hydrochloride using factorial design.* Drug Development and Industrial Pharmacy 1988; 14: 1657–1671.
110. Cielecka-Piontek J., Jelińska A., Zając M., Sobczak M., Bartold A., Oszczapowicz I.: *A comparison of the stability of doxorubicin and daunorubicin in solid state.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 50, 576–579.
111. Sreedevi A., Lakshmana Rao A., Kalyani L.: *Stability-indicating HPLC method for analysis of epirubicin in pharmaceutical dosage form.* Ino American Journal of Pharmaceutical Research, 2013; 3(10): 8249–8259.
112. Jelińska A., Zając M., Krzysztoń K., Firlej A., Oszczapowicz I.: *The use of HPLC for determining the stability of epirubicin and the influence of ionic strength on the stability of epirubicin.* Annales UMCS 2006, 19: 45–50.
113. Sobczak A., Jelińska A., Leśniewska M., Firlej A., Oszczapowicz I.: *Stability of epidoxorubicin in solid state,* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 54:869–872.
114. Zalewski P., Firlej A., Medenecka B., Jankowska J., Mielcarek J., Oszczapowicz I.: *The use of UV-VIS spectroscopy for determining the photostability of epirubicin solutions.* Annales UMCS 2009, 22: 43–48.