

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII FARMACEUTYCZNEJ



Anna Juszcak

**Trwałość peryndoprylu w fazie stałej oraz synteza nowych pochodnych
inhibitorów konwertazy angiotensyny**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Dr hab. n. farm. Beata Stanisław, prof. UM

Promotor pomocniczy:

Dr n. farm. Wojciech Szczołko

Poznań 2019

Słowa kluczowe:

perindopryl

inhibitory konwertazy angiotensyny

trwałość

synteza

antyoksydacja

Praca została wykonana
w **Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej**
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
we współpracy z
Katedrą i Zakładem Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
i przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
celem uzyskania stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych
przez
magistra farmacji Annę Juszcak

Serdeczne podziękowania składam:

PANI DR HAB. N. FARM. BEACIE JADWIDZE STANISZ, PROF. UM

Promotorowi niniejszej pracy,

za opiekę na przebiegiem pracy, pomoc merytoryczną oraz stworzenie warunków sprzyjających pracy naukowej

PANU DR N. FARM. WOJCIECHOWI SZCZOŁKO

Promotorowi Pomocniczemu niniejszej pracy,

za opiekę nad przebiegiem badań syntetycznych, liczne dyskusje,
cenne uwagi i wszelką okazaną pomoc

PANU DR N. FARM JACKOWI KUJAWSKIEMU

za wkład włożony w realizację badań *in silico*

PANU DR HAB. N. FARM. PAWŁOWI RAMOSOWI

za pomoc w badaniach nad właściwościami antyoksydacyjnymi

PANU PROF. DR HAB. N. FARM. TOMASZOWI GOŚLIŃSKIEMU

za umożliwienie i pomoc w realizacji części syntetycznej pracy

Pracę dedykuję:

Rodzicom

Spis treści

1.	Wstęp.....	1
2.	Układ renina-angiotensyna-aldosteron.....	3
2.1	Mechanizm działania układu renina-angiotensyna-aldosteron.....	3
2.2	Inhibitory konwertazy angiotensyny	8
2.2.1	Klasyfikacja I-ACE.....	8
2.2.2	Mechanizm i skutki działania.....	10
2.3	Perspektywy rozwoju grupy I-ACE.....	11
2.3.1	I-ACE w pediatrii.....	12
2.3.2	I-ACE w zaburzeniach neurologicznych	14
2.3.3	Leczenie uzależnień	19
2.3.4	Związek między I-ACE a otyłością	20
2.3.5	Nowotwory.....	21
2.4	Trwałość leku w fazie stałej	23
2.4.1	Cechy wpływające na stabilność leku.....	23
2.4.2	Reaktywność a trwałość leku w fazie stałej.....	24
2.5	Mechanizm rozkładu dikarboksyłowych I-ACE	25
2.5.1	Energia aktywacji reakcji rozkładu	26
2.6	Metoda analityczna do badań nad stabilnością substancji leczniczej	27
2.7	Walidacja metody analitycznej.....	27
2.7.1	Krzywa kalibracji.....	28
2.7.2	Czułość metody.....	28
2.7.3	Dokładność metody.....	30
2.7.4	Precyzja metody	30
2.7.5	Stabilność substancji leczniczych	31
2.7.6	Selektywność	32
2.8	Charakterystyka peryndoprylu.....	32
2.8.1	Właściwości peryndoprylu oraz rodzaje soli dostępnych w lecznictwie	32
2.8.2	Farmakokinetyka.....	33
2.8.3	Dawkowanie.....	34
2.8.4	Bezpieczeństwo i tolerancja.....	35
2.9	Terapia skojarzona.....	35
2.9.1	Ogólne założenia i korzyści	36
2.9.2	Zasady łączenia leków	36

2.9.3	Preparaty złożone	37
2.9.4	Połączenie I-ACE z diuretykiem.....	38
2.9.5	Peryndopryl i hydrochlorotiazyd w preparatach złożonych.....	39
2.10	Metody analityczne oznaczania peryndoprylu	40
2.11	Poszukiwanie nowych pochodnych I-ACE	41
2.12	Wyznaczenie wartości <i>LogP</i>	43
3.	Cel badań.....	46
4.	Badania trwałości peryndoprylu z tert-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu.....	48
4.1	Materiały do badań i odczynniki	48
4.2	Metoda analityczna do oznaczania peryndoprylu z tert-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu.....	49
4.3	Procedury	50
4.4	Wyniki	56
4.4.1	Rewalidacja metody RP-HPLC.....	56
4.4.2	Ocena trwałości peryndoprylu z tert-butyloaminą (PER _t) i argininianu peryndoprylu .	61
4.4.3	Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość PER _t oraz PER _a	87
4.5	Wpływ hydrochlorotiazidu na trwałość PER _t oraz PER _a	95
4.6	Analiza produktów rozkładu PER _t oraz PER _a	106
4.7	Badania trwałości PER _t oraz PER _a w preparatach handlowych	110
4.7.1	Preparaty z PER _t	111
4.7.2	Preparaty z PER _a	120
4.8	Badanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych I-ACE.....	129
5.	Synteza oraz analiza właściwości nowych pochodnych I-ACE.....	134
5.1	Ścieżki syntezy	134
5.1.1	Uwagi ogólne	138
5.1.2	Stosowane rozpuszczalniki i reagenty	138
5.2	Szczegółowy opis syntezy i charakterystyki otrzymanych związków	139
5.3	Badania właściwości biologicznych oraz fizykochemicznych związków I – IX	144
5.3.1	Wyznaczenie <i>LogP</i> dla związków I-IX metodą obliczeniową.....	146
5.3.2	Badanie właściwości antyoksydacyjnych związków I - IX	147
	*Dla porównania, kwas L-askorbinowy testowano w tych samych warunkach.	149
5.3.3	Badania aktywności biologicznej związków I-IX wobec acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy	149
5.4	Badania trwałości związków I-IX	151
5.4.1	Opracowanie i walidacja metody HPLC do oceny trwałości związków I-IX.....	151

Selektywność metody.....	151
Liniowość metody.....	153
Granica wykrywalności i oznaczalności metody HPLC	162
5.4.2 Warunki badań kinetycznych.....	162
5.4.3 Porównanie trwałości badanych związków z solami peryndoprylu.....	181
5.5 Badania in silico	183
6. Omówienie wyników	188
ETAP PIERWSZY	189
ETAP DRUGI	206
Synteza nowych pochodnych I-ACE	206
7. Wnioski	214
Etap I - Trwałość soli peryndoprylu w fazie stałej.....	214
Etap II - Synteza i właściwości nowych pochodnych I - IX	214
8. Bibliografia	215
9. Załączniki.....	229
10. Streszczenie.....	239

Wykaz skrótów

A	współczynnik częstotliwości
a	współczynnik kierunkowy prostej
a(RH%)	wartość nachylenia funkcji $lnk = f(RH\%)$
ACE	(ang. <i>angiotensin-converting enzyme</i>) enzym konwertujący angiotensynę
ACE-2	(ang. <i>angiotensin-converting enzyme type 2</i>) enzym konwertujący angiotensynę 2
AChE	acetylocholinoesteraza
AGT	angiotensynogen
ANG	angiotensyna
AT₁	endogenny receptor dla angiotensyny II typu 1
AT₂	endogenny receptor dla angiotensyny II typu 2
b	wyraz wolny prostej
BuChE	butyrylocholinoesteraza
c	stężenie
c_∞	stężenie w czasie nieskończonym
c₀	stężenie punkcie czasowym t_0
c_t	stężenie w punkcie czasowym t
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrohydrazyl
E_a	energia aktywacji reakcji
ESI	jonizacja typu elektrosprej
GC	chromatografia gazowa
h	stała kwantowa Planck'a
HPLC	(ang. <i>high performance liquid chromatography</i>) wysokosprawna chromatografia cieczowa
I-ACE	inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę
k	stała szybkości reakcji
k_B	stała Boltzman'a
LC	chromatografia cieczowa
LOD	(ang. <i>limit of detection</i>) granica wykrywalności
LogP	współczynnik podziału oktanol/woda
LOQ	(ang. <i>limit of quantitation</i>) granica oznaczalności
m	masa odwazki
MS	(ang. <i>mass spectroscopy</i>) spektroskopia mas
n	liczba prób
NADPH	zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
R	uniwersalna stała gazowa

r	współczynnik korelacji
RAA	(ang. <i>renin-angiotensin system</i>) układ renina-angiotensyna
RH	wilgotność względna powietrza
RP	(ang. <i>reversed phase</i>) odwrócone fazy
RSD	względne odchylenie standardowe
S	odchylenie standardowe pojedynczego wyniku
S9	system aktywacji metabolicznej
S_a	odchylenie standardowe współczynnika kierunkowego prostej
S_b	odchylenie standardowe wyrazu wolnego prostej
S_y	odchylenie standardowe punktu od prostej
t	(kinetyka) czas trwania testu kinetycznego
t	(statystyka) wartość statystyki (test t-Studenta)
$t_{0,1}$	czas, w którym rozkładowi ulegnie 10% leku
$t_{0,5}$	czas połowicznego rozkładu
T; temp	temperatura
TGF-β	(ang. <i>transforming growth factor beta</i>) transformujący czynnik wzrostu β
t_i	temperatura topnienia
UV	(ang. <i>ultraviolet</i>) promieniowanie nadfioletowe
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) czynnik wzrostu śródbłónka
VIS	promieniowanie elektromagnetyczne leżące w zakresie światła widzialnego
w/w	ilościowy stosunek wagowy
W_z	współczynnik zmienności
x	ułamek substancji rozłożonej
x_a	oznaczona ilość analitu w próbce
\bar{x}	wartość średnia wszystkich pomiarów
x_i	wynik pojedynczego pomiaru
μ	rzeczywista zawartość analitu
λ	długość fali
λ_{max}	maksimum absorpcji
ΔH^\ddagger	entalpia aktywacji reakcji
ΔS^\ddagger	entropia aktywacji reakcji

Wykaz rycin

Ryc. 2.1 Schemat układu renina-angiotensyna-aldosteron i jego wpływu na ciśnienie krwi	3
Ryc. 2.2 Przekształcenia w układzie RAA oraz skutek jego działania na receptory	6
Ryc. 2.3 Wzory wybranych I-ACE, posiadających większe powinowactwo do tkankowego lub osocznego ACE	10
Ryc. 2.4 Wpływ układu RAA na procesy prozapalne, prowadzące do miażdżycy naczyń	12
Ryc. 2.5 Wpływ układu RAA na proces nowotworzenia	22
Ryc. 2.6 Przekształcenie się I-ACE w nieaktywne pochodne, na przykładzie peryndoprylu (.....	25
Ryc. 2.7 Preferowane łączenia leków hipotensyjnych w terapiach kombinowanych	37
Ryc. 2.8 Wizualizacja interakcji między peryndoprylatem a aminokwasami kieszeni enzymu.	42
Ryc. 2.9 Położenie peryndoprylatu (kolor zielony) w obrębie kieszeni enzymu 2x94.pdb	42
Ryc. 2.10 Struktura cząsteczki projektowanych I-ACE z zaznaczonymi miejscami modyfikacji.	43
Ryc. 2.11 Wykres obrazujący korelację między LogP a rozpuszczalnością i przenikalnością przez błony biologiczne	44
Ryc. 4.1 I - Chromatogram PER_t (P ; $t_R - 5,5$ min), wzorca wewnętrznego (W ; $t_R - 9,5$ min); II - Chromatogram PER_t (P ; $t_R - 5,5$ min), produktu rozkładu (R ; $t_R - 3,5$ min), wzorca wewnętrznego (W ; $t_R - 9,5$ min); III - Chromatogram PER_a (P ; $t_R - 5,5$ min), wzorca wewnętrznego (W ; $t_R - 9,5$ min); IV - Chromatogram PER_a (P ; $t_R - 5,5$ min), produktu rozkładu (R ; $t_R - 3,5$ min), wzorca wewnętrznego (W ; $t_R - 9,5$ min).	56
Ryc. 4.2 Prostoliniowa zależność $P/P_{wz}=f(c[\%])$ peryndoprylu z tert-butyloaminą.	57
Ryc. 4.3 Prostoliniowa zależność $P/P_{wz}= f(c[\%])$ argininianu peryndoprylu.	58
Ryc. 4.4 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 333$ K i $RH = 0\%$	62
Ryc. 4.5 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 343$ K i $RH = 0\%$	63
Ryc. 4.6 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 348$ K i $RH = 0\%$	64
Ryc. 4.7 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 353$ K i $RH = 0\%$	65
Ryc. 4.8 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 363$ K i $RH = 0\%$	66
Ryc. 4.9 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_t w $RH = 0\%$	67
Ryc. 4.10 Rozkład PER_t w $T = 333$ K i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t[h])$	69
Ryc. 4.11 Rozkład PER_t w $T = 343$ K i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t[h])$	70
Ryc. 4.12 Rozkład PER_t w $T = 348$ K i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t[h])$	71
Ryc. 4.13 Rozkład PER_t w $T = 353$ K i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t[h])$	72
Ryc. 4.14 Rozkład PER_t w $T = 363$ K i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t[h])$	73
Ryc. 4.15 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_t w $RH = 76,4\%$	74
Ryc. 4.16 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 353$ K i $RH = 0\%$	76

Ryc. 4.17 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 0\%$	77
Ryc. 4.18 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 373\text{ K}$ i $RH = 0\%$	78
Ryc. 4.19 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 383\text{ K}$ i $RH = 0\%$	79
Ryc. 4.20 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_a w $RH = 0\%$	80
Ryc. 4.21 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 76,4\%$	82
Ryc. 4.22 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 343\text{ K}$ i $RH = 76,4\%$	83
Ryc. 4.23 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 353\text{ K}$ i $RH = 76,4\%$	84
Ryc. 4.24 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 76,4\%$	85
Ryc. 4.25 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_a w $RH = 76,4\%$	86
Ryc. 4.26 Rozkład PER_t w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 50,9\%$; A- wykres przedstawiający półlogarytmiczną zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t[h])$...	88
Ryc. 4.27 Rozkład PER_t w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 66,5\%$; A- wykres przedstawiający półlogarytmiczną zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t[h])$...	89
Ryc. 4.28 Wykres zależności stałej rozpadu $k [s^{-1}]$ od wilgotności względnej $RH [\%]$ dla PER_t	90
Ryc. 4.29 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 50,9\%$	92
Ryc. 4.30 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 66,5\%$	93
Ryc. 4.31 Wykres $\ln k_i = f(RH\%)$ w temp. 333 K dla PER_a	94
Ryc. 4.32 Chromatogramy: I - MM I; II - MM I po teście kinetycznym; III – MM II; IV - MM II po teście kinetycznym.....	95
Ryc. 4.33 Rozkład PER_t w MM I; $T = 333\text{ K}$ i $RH = 50,9\%$; A - wykres półlogarytmicznej zależności $c(\%) = f(t)$; B – wykres zależności $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t)$	97
Ryc. 4.34 Rozkład PER_t w MM I; $T = 333\text{ K}$ i $RH = 66,5\%$; A - wykres półlogarytmicznej zależności $c(\%) = f(t)$; B – wykres półlogarytmicznej zależności $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t)$	98
Ryc. 4.35 Rozkład PER_t w MM I; $T = 333\text{ K}$ i $RH = 76,4\%$; A - wykres półlogarytmicznej zależności $c(\%) = f(t)$; B – wykres półlogarytmicznej zależności $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t)$	99
Ryc. 4.36 Zależność stałej rozkładu $k [s^{-1}]$ od wilgotności względnej $RH [\%]$ dla PER_t w MM I.....	100
Ryc. 4.37 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w MM II w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 50,9\%$	102
Ryc. 4.38 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w MM II w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 66,5\%$	103
Ryc. 4.39 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w MM II w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 76,4\%$	104
Ryc. 4.40 Wykres zależności stałej rozpadu $k [s^{-1}]$ od wilgotności względnej $RH [\%]$ dla PER_a w MM II.....	105
Ryc. 4.41 Widma analizy ESI/MS: A - dla PER_t przed procesem inkubacji; B - dla PER_t po procesie inkubacji.....	106

Ryc. 4.42 Widma analizy ESI/MS: A - dla MM I przed procesem inkubacji; B - dla MM I po procesie inkubacji.	107
Ryc. 4.43 Widma analizy ESI/MS: A - dla PER _a przed procesem inkubacji; B - dla PER _a po procesie inkubacji.	108
Ryc. 4.44 Widma analizy ESI/MS: A - dla MM II przed procesem inkubacji; B - dla MM II po procesie inkubacji.	109
Ryc. 4.45 Proponowany mechanizm rozkładu peryndoprylu.	110
Ryc. 4.46. Chromatogramy wykreślone dla: I - W _{wz} PER _t ; II - W _{wz} PER _t po teście kinetycznym; III - W _{wz} PER _b ; IV - W _{wz} PER _a po teście kinetycznym (T= 303K, RH = 76,4%, t = 400 h).	111
Ryc. 4.47 Rozkładu PER _t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w T = 303 K i RH = 76,4%, A- półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t); B – wykres przedstawiający zależność $c/(c_0 - c_t) = f(t)$	112
Ryc. 4.48 Rozkładu PER _t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w T = 313 K i RH = 76,4%, A- półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t); B – półlogarytmiczny wykres zależności $c/(c_0 - c_t) = f(t)$	113
Ryc. 4.49 Rozkładu PER _t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w T = 313 K i RH = 76,4%, A- półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t); B – półlogarytmiczny wykres zależności $c/(c_0 - c_t) = f(t)$	114
Ryc. 4.50 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER _t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w RH = 76,4%.	115
Ryc. 4.51 Rozkład PER _t w tabletkach w T = 303 K i RH = 76,4%, A - półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t); B - półlogarytmiczny wykres zależności $c/(c_0 - c_t) = f(t)$	116
Ryc. 4.52 Rozkład PER _t w tabletkach w T = 313 K i RH = 76,4%, A - półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t); B – półlogarytmiczny wykres zależności $c/(c_0 - c_t) = f(t)$	117
Ryc. 4.53 Rozkład PER _t w tabletkach w T = 323 K i RH = 76,4%, A- półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t); B - półlogarytmiczny wykres zależności $c/(c_0 - c_t) = f(t)$	118
Ryc. 4.54 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER _t w tabletkach w RH = 76,4%.	119
Ryc. 4.55 Półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t) reakcji rozkładu PER _a w tabletkach w T = 303 K i RH = 76,4%.	121
Ryc. 4.56 Półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t) reakcji rozkładu PER _a w tabletkach w T = 313 K i RH = 76,4%.	122
Ryc. 4.57 Półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t) reakcji rozkładu PER _a w tabletkach przepołowionych w T = 323 K i RH = 76,4%.	123
Ryc. 4.58 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER _a w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w RH = 76,4%.	124
Ryc. 4.59 Półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t) reakcji rozkładu PER _a w tabletkach w T = 303 K i RH = 76,4%.	125
Ryc. 4.60 Półlogarytmiczny wykres zależności c(%) = f(t) reakcji rozkładu PER _a w tabletkach w T = 313 K i RH = 76,4%.	126
Ryc. 4.61 Półlogarytmiczny wykres zależności C(%) = f(t) reakcji rozkładu PER _a w tabletkach w T = 323 K i RH = 76,4%.	127
Ryc. 4.62 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER _a w tabletkach w RH = 76,4%.	128
Ryc. 4.63 Struktura chemiczna cząsteczki DPPH, (•) - niesparowany elektron	129

Ryc. 4.64 Widmo UV-Vis DPPH w alkoholu metylowym; (a) w zakresie długości fali od 300 nm do 700 nm, (b) w zakresie długości fali od 420 nm do 600 nm, gdzie oznacza się maksymalną absorpcję (517 nm).....	129
Ryc. 4.65 Widma UV-Vis roztworu DPPH oddziałującego z (a) cilazaprylem, (b) imidaprylem, (c) peryndoprylem [wyniki badań obu soli były porównywalne], (d) ramiprylem, (e) chinaprylem i (f) lizynoprylem, zarejestrowane w temperaturze pokojowej ($\lambda = 450-600$). 130	130
Ryc. 4.66 Wartości absorbancji w 30 minucie oddziaływania badanych I-ACE z roztworem DPPH. 131	131
Ryc. 5.1 Ścieżka syntezy z użyciem: kwasu 2-indolinokarboskylowego oraz indoliny.	134
Ryc. 5.2 Struktura związku I z przypisanymi wartościami przesunięć NMR.	135
Ryc. 5.3 Ścieżka syntezy z użyciem: kwasu 2-indolinokarboskylowego, indoliny, chlorku 2-chloropropionylu, chlorku chloro acetylu.	136
Ryc. 5.4 Struktury nowosynteżowanych związków.	137
Ryc. 5.5 Wartości absorbancji w 30 minucie oddziaływania badanych związków I-IX z roztworem DPPH.....	147
Ryc. 5.6 Widma UV-Vis roztworu DPPH oddziałującego ze związkami: (a) I, (b) II, (c) III, (d) IV, (e) V, (f) VI, (g) VII, (h) VII oraz (i) IX. zarejestrowane w temperaturze pokojowej ($\lambda = 450-600$ nm).	148
Ryc. 5.7 Chromatogramy dla związków I-IX oraz ich wzorców wewnętrznych.	152
Ryc. 5.8 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku I	153
Ryc. 5.9 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku II	154
Ryc. 5.10 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku III	155
Ryc. 5.11 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku IV	156
Ryc. 5.12 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku V	157
Ryc. 5.13 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku VI	158
Ryc. 5.14 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku VII	159
Ryc. 5.15 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku VIII	160
Ryc. 5.16 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku IX	161
Ryc. 5.17 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu I w $T = 363$ K i $RH = 74,6\%$	163
Ryc. 5.18 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu I w $T = 363$ K i $RH = 0\%$	164
Ryc. 5.19 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu II w $T = 363$ K i $RH = 74,6\%$	165
Ryc. 5.20 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu II w $T = 363$ K i $RH = 0\%$	166
Ryc. 5.21 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu III w $T = 363$ K i $RH = 74,6\%$	167
Ryc. 5.22 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu III w $T = 363$ K i $RH = 0\%$	168
Ryc. 5.23 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu IV w $T = 363$ K i $RH = 74,6\%$	169
Ryc. 5.24 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu IV w $T = 363$ K i $RH = 0\%$	170
Ryc. 5.25 Póllogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu V w $T = 363$ K i $RH = 74,6\%$	171

Ryc. 5.26 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu V w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 0\%$	172
Ryc. 5.27 Półlogarytmiczny wykres zależności $C(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu VI w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 74,6\%$	173
Ryc. 5.28 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu VI w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 0\%$	174
Ryc. 5.29 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu VII w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 74,6\%$	175
Ryc. 5.30 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu VII w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 0\%$	176
Ryc. 5.31 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu VIII w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 74,6\%$	177
Ryc. 5.32 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu VIII w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 0\%$	178
Ryc. 5.33 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu IX w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 74,6\%$	179
Ryc. 5.34 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu IX w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 0\%$	180
Ryc. 5.35 Położenie wygenerowanych w rankingu pierwszych struktur („póz”) badanych ligandów względem liganda referencyjnego.	185
Ryc. 5.36 Położenie pierwszej wygenerowanej w rankingu struktury („pozy”) ligandu III względem liganda referencyjnego.	185
Ryc. 5.37 Położenie pierwszej wygenerowanej w rankingu struktury („pozy”) ligandu IV względem liganda referencyjnego.	185
Ryc. 5.38 Położenie pierwszej wygenerowanej w rankingu struktury („pozy”) ligandu V względem liganda referencyjnego.	186
Ryc. 5.39 Położenie pierwszej wygenerowanej w rankingu struktury („pozy”) ligandu VIII względem liganda referencyjnego.	186
Ryc. 5.40 Wizualizacja interakcji między pierwszą pozą liganda VIII (kolor czerwony) a kieszenią enzymu 2c6n.pdb.....	187
Ryc. 5.41 Wizualizacja interakcji między pierwszą pozą liganda VIII a kieszenią enzymu 2c6n.pdb w odległości 5Å od liganda	188
Ryc. 5.42 Wizualizacja interakcji między lizynoprylem a aminokwasami kieszeni enzymu.....	188
Ryc. 6.1 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t , $RH = 0\%$ w temp. od 333 K do 363 K , gdzie (♦) 333 K , (■) 343 K , (▲) 348 K , (x) 353 i (●) 363 K	192
Ryc. 6.2 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a , $RH = 0\%$ w temp. od 353 K do 383 K , gdzie (■) 353 K , (▲) 363 K , (♦) 373 K , i (●) 383 K	193
Ryc. 6.3 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t , $RH = 76,4\%$ w temp. od 333 K do 363 K , gdzie (♦) 333 K , (■) 343 K , (▲) 348 K , (x) 353 i (●) 363 K	194
Ryc. 6.4 Wykres zależności $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t , $RH = 76,4\%$ w temp. od 333 K do 363 K , gdzie (♦) 333 K , (■) 343 K , (▲) 348 K , (x) 353 i (●) 363 K	194
Ryc. 6.5 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a , $RH = 76,4\%$ w temp. od 353 K do 383 K , gdzie (♦) 333 K , (■) 343 K , (▲) 353 K , (●) w 363 K	195
Ryc. 6.6 Po lewej - wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu, po prawej - wykres zależności $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t w RH od $50,9\%$ do $76,4\%$ i temp. 333 K , gdzie: (♦) $RH = 50,9\%$, (■) $RH = 66,35\%$, (▲) $RH = 76,4\%$	197

Ryc. 6.7 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w RH od 50,9% do 76,4% i temp. 333 K, gdzie: (♦)RH = 50,9%, (■)RH = 66,35%, (▲)RH = 76,4%.....	197
Ryc. 6.8 Porównanie $t_{0,5}$ dla wybranych I-ACE w temp. 363 K i RH 76,4%.....	198
Ryc. 6.9 Porównanie nachyleń prostych a (z równania $y = a RH\% + b$) dla PER_t in pure i PER_a in pure oraz MM I i MM II w temp. 333 K i RH od 50,9% do 76,4%.....	199
Ryc. 6.10 Zależność stałej rozkładu ($k[1/s]$) od wilgotności względnej RH 50,9% - 76,4% dla PER_t in pure (♦) i MM I (●), temp. 333 K.....	200
Ryc. 6.11 Zależność stałej rozkładu ($k[1/s]$) od wilgotności względnej RH 50,9% - 76,4% dla PER_a in pure (▲) i MM II (■), temp. 333 K.....	201
Ryc. 6.12 Wykres zależności $\ln c/(c_0 - c_t) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t w tabletkach – po prawej- w całości, po lewej - przepołowionych, w RH 76,4 % i temp. (♦) 303 K, (■) 313 K, (▲) 323 K.	203
Ryc. 6.13 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w tabletkach – po prawej- w całości, po lewej - przepołowionych, w RH 76,4 % i temp. (♦)303 K, (■)313 K, (▲) 323 K.	203
Ryc. 6.14 Porównanie czasów $t_{0,5}$ dla badanych PER_t i PER_a w całości oraz w formie przepołowionej, temp. od 303 K do 323 K, RH 76,4%.....	204
Ryc. 6.15 Obliczona procentowa wartość hamowania wolnych rodników dla badanych substancji z grupy I-ACE, po 30 minutach oddziaływania z DPPH.....	205
Ryc. 6.16 Ścieżki syntezy nowych związków I – IX.....	207
Ryc. 6.17 Obliczona procentowa wartość hamowania wolnych rodników dla badanych substancji po 30 minutach oddziaływania z DPPH.	208
Ryc. 6.18 Wyznaczone wartości LogP dla związków I – IX.	209
Ryc. 6.19 Porównanie czasów $t_{0,5}$ dla związków I - IX oraz soli peryndoprylu w warunkach RH 74,6% oraz RH 0% i T 363 K.	211
Ryc. 6.20 Porównanie stałych rozkładu k dla związków I – IX oraz PER_t i PER_a w T 363 K i RH 0% oraz RH 76,4%.....	211
Ryc. 6.21 Wizualizacja interakcji między pierwszą pozą ligandu VIII a kieszenią enzymu 2c6n.pdb w odległości 5Å od ligandu	213

Wykaz tabel

Tabela 2.1 Podział I-ACE o przebadanej przenikalności przez barierę krew - mózg (opracowanie własne, źródło: Sink K., 2009).....	16
Tabela 2.2 Charakterystyka soli peryndoprylu.....	33
Tabela 4.1 Wyniki oznaczenia roztworów peryndoprylu z tert-butyloaminą oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	57
Tabela 4.2 Wyniki oznaczenia roztworów argininianu peryndoprylu oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	58
Tabela 4.3 Wyniki oznaczenia precyzji i stopnia odzysku metody HPLC dla PER_t (dokładność metody).....	59
Tabela 4.4 Wyniki oznaczenia precyzji i stopnia odzysku metody HPLC dla PER_a (dokładność metody).....	60
Tabela 4.5 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	62
Tabela 4.6 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 343 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	63
Tabela 4.7 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 348 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	64
Tabela 4.8 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 353 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	65
Tabela 4.9 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	66
Tabela 4.10 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t w RH = 0%.....	67
Tabela 4.11 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	69
Tabela 4.12 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 343 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	70
Tabela 4.13 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 348 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	71
Tabela 4.14 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 353 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	72
Tabela 4.15 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	73
Tabela 4.16 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t w RH = 76,4% w T = 333 K – 363 K.....	74
Tabela 4.17 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 353 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	76
Tabela 4.18 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	77
Tabela 4.19 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 373 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	78
Tabela 4.20 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 383 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	79
Tabela 4.21 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a w RH = 0%.....	80

Tabela 4.22 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	82
Tabela 4.23 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 343 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	83
Tabela 4.24 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 353 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	84
Tabela 4.25 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	85
Tabela 4.26 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a w $RH = 76,4\%$	86
Tabela 4.27 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 50,9\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	88
Tabela 4.28 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 66,5\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	89
Tabela 4.29 Parametry kinetyczne rozkładu PER_t w $T = 333 K$ i zmiennych wartościach wilgotności względnej	90
Tabela 4.30 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 50,9\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	92
Tabela 4.31 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 66,5\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	93
Tabela 4.32 Parametry kinetyczne dla reakcji rozkładu PER_a w $T = 333 K$	94
Tabela 4.33 Zmiany stężenia PER_t w MM I w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 50,9\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	97
Tabela 4.34 Zmiany stężenia PER_t w MM I w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 66,5\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	98
Tabela 4.35 Zmiany stężenia PER_t w MM I w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	99
Tabela 4.36 Parametry kinetyczne dla reakcji PER_t w MM I w $T = 333 K$ i zmiennych wartościach wilgotności względnej.....	100
Tabela 4.37 Zmiany stężenia PER_a w MM II w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 50,9\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	102
Tabela 4.38 Zmiany stężenia PER_a w MM II w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 66,5\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	103
Tabela 4.39 Zmiany stężenia PER_a w MM II w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 76,5\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	104
Tabela 4.40 Parametry kinetyczne dla reakcji PER_a w MM II w $T = 333 K$ i zmiennych wartościach wilgotności względnej.....	105
Tabela 4.41 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 303 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	112
Tabela 4.42 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 313 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	113
Tabela 4.43 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 323 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	114

Tabela 4.44 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w $RH = 76,4\%$	115
Tabela 4.45 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 303 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi .	116
Tabela 4.46 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 313 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi .	117
Tabela 4.47 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 323 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi .	118
Tabela 4.48 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t w tabletkach w $RH = 76,5\%$	119
Tabela 4.49 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 303 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	121
Tabela 4.50 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 313 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	122
Tabela 4.51 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 323 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.....	123
Tabela 4.52 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a w tabletkach przepołowionych w $RH = 76,5\%$	124
Tabela 4.53 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 303 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi .	125
Tabela 4.54 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 313 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi .	126
Tabela 4.55 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 323 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi .	127
Tabela 4.56 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a w tabletkach w $RH = 76,5\%$	128
Tabela 4.57 Obliczona procentowa wartość hamowania wolnych rodników dla I-ACE po 30 minutach oddziaływania z DPPH.....	131
Tabela 5.1 Wartości przesunięć chemicznych w studiach strukturalnych dla związku I	135
Tabela 5.2 LogP związków I-IX wyznaczony z użyciem platformy ALOGPS.....	146
Tabela 5.3 LogP związków I-IX wyznaczony z użyciem programu miLogP	147
Tabela 5.4 Obliczona procentowa wartość hamowania wolnych rodników dla związków I-IX	149
Tabela 5.5 Wyniki badań aktywności związków I-IX wobec AChE i BuChE.....	149
Tabela 5.6 Właściwości fizykochemiczne związków I-IX	150
Tabela 5.7 Wyniki oznaczenia związku I oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej	153
Tabela 5.8 Wyniki oznaczenia roztworów II metodą HPLC oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej	154
Tabela 5.9 Wyniki oznaczenia roztworów III metodą HPLC oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	155
Tabela 5.10 Wyniki oznaczenia roztworów IV metodą HPLC oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	156
Tabela 5.11 Wyniki oznaczenia roztworów V metodą HPLC oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	157

Tabela 5.12 Wyniki oznaczenia roztworów VI metodą HPLC oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	158
Tabela 5.13 Wyniki oznaczenia roztworów VII metodą HPLC oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	159
Tabela 5.14 Wyniki oznaczenia roztworów VIII metodą HPLC oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	160
Tabela 5.15 Wyniki oznaczenia roztworów IX metodą HPLC oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej.....	161
Tabela 5.16 Granica wykrywalności i oznaczalności związków I – IX metody HPLC	162
Tabela 5.17 Zmiany stężenia związku I w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	163
Tabela 5.18 Zmiany stężenia związku I w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	164
Tabela 5.19 Zmiany stężenia związku II w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	165
Tabela 5.20 Zmiany stężenia związku II w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	166
Tabela 5.21 Zmiany stężenia związku III w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	167
Tabela 5.22 Zmiany stężenia związku III w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	168
Tabela 5.23 Zmiany stężenia związku IV w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	169
Tabela 5.24 Zmiany stężenia związku IV w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	170
Tabela 5.25 Zmiany stężenia związku V w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	171
Tabela 5.26 Zmiany stężenia związku V w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	172
Tabela 5.27 Zmiany stężenia związku VI w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	173
Tabela 5.28 Zmiany stężenia związku VI w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	174
Tabela 5.29 Zmiany stężenia związku VII w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	175
Tabela 5.30 Zmiany stężenia związku VII w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	176
Tabela 5.31 Zmiany stężenia związku VIII w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	177
Tabela 5.32 Zmiany stężenia związku VIII w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	178
Tabela 5.33 Zmiany stężenia związku IX w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi	179
Tabela 5.34 Zmiany stężenia związku IX w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.	180

Tabela 5.35 Porównanie trwałości badanych związków z trwałością solami peryndoprylu w RH = 76,4% i w temperaturze 363 K.	181
Tabela 5.36 Porównanie trwałości badanych związków z trwałością solami peryndoprylu w RH = 0% i w temperaturze 363 K.	182
Tabela 5.37 Energia powinowactwa („binding affinity”) zadokowanych struktur („Pose”) badanych izosterów I - IX	184
Tabela 6.1 Wyniki walidacji metody RP-HPLC dla PER _a i PER _t	190
Tabela 6.2 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER _b , RH = 0% w temp. od 333 K do 363 K.	192
Tabela 6.3 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER _a , RH = 0% w temp. od 353 K do 383 K.	193
Tabela 6.4 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER _b , RH = 76,4% w temp. od 333 K do 363 K.	195
Tabela 6.5 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER _a , RH = 76,4% w temp. od 353 K do 383 K.	196
Tabela 6.6 Stałe szybkości rozkładu PER _t in pure oraz w mieszaninie modelowej (MM I) z HTH, T = 333 K.	200
Tabela 6.7 Stałe szybkości rozkładu PER _a in pure oraz w mieszaninie modelowej (MM II) z HTH, T = 333 K.	201
Tabela 6.8 Parametry termodynamiczne wyznaczone dla PER _t i PER _a przechowywanych w tabletkach w całości oraz w formie przepołowionej, temp. od 303 K do 323 K, RH 76,4%.	204

Wykaz procedur

<i>Procedura 1. Przygotowanie buforu fosforanowego o pH 2,0</i>	50
<i>Procedura 2. Przygotowanie fazy ruchomej</i>	50
<i>Procedura 3. Przygotowanie roztworu peryndoprylu z tert-butyloaminą / argininianu peryndoprylu o stężeniu 0,4 mg/ml – roztwór porównawczy</i>	50
<i>Procedura 4. Przygotowanie próbek peryndoprylu z tert-butyloaminą / argininianu peryndoprylu do analizy kinetycznej</i>	50
<i>Procedura 5. Przygotowanie roztworu chlorowodoru oksymetazoliny o stężeniu 0,025 mg/ml- wzorzec wewnętrzny</i>	51
<i>Procedura 6. Przygotowanie roztworów peryndoprylu z tert-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu w zakresie stężeń 0,004% do 0,040%</i>	51
<i>Procedura 7. Precyzja i dokładność</i>	51
<i>Procedura 8. Badania kinetyczne PER_t i PER_a</i>	52
<i>Procedura 9. Przygotowywanie mieszanin modelowych z hydrochlorotiazylem (HTH)</i>	52
<i>Procedura 10. Oznaczanie mieszanin modelowych MM I oraz MM II</i>	53
<i>Procedura 11. Przygotowanie tabletek z PER_t i PER_a do badań kinetycznych</i>	53
<i>Procedura 12. Przygotowanie roztworu DPPH</i>	55
<i>Procedura 13. Przygotowanie próbek do badania właściwości antyoksydacyjnych</i>	55
<i>Procedura 14. Przygotowanie związków I - IX do badania właściwości antyoksydacyjnych</i>	144
<i>Procedura 15. Wykonanie badania aktywności biologicznej związków I - IX wobec acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy</i>	144
<i>Procedura 16. Przygotowanie fazy ruchomej do badania związków I – IX</i>	144
<i>Procedura 17. Przygotowanie roztworu o stężeniu 0,2 mg/ml - roztwór porównawczy (roztwory A związków I – IX)</i>	145
<i>Procedura 18. Przygotowanie roztworów wzorców wewnętrznych</i>	145
<i>Procedura 19. Przygotowanie roztworów związków I – IX – roztwory porównawcze</i>	145
<i>Procedura 20. Przygotowanie roztworu substancji poddanej testowi kinetycznemu (roztwory N_i związków I – IX)</i>	146

1. Wstęp

W ostatnich latach zostało wdrożonych wiele programów profilaktyki chorób układu sercowo-naczyniowego, mimo to, schorzenia te nadal stanowią wiodący problem zdrowotny w krajach rozwiniętych. Globalny zasięg nadciśnienia tętniczego stale rośnie i szacuje się, iż w roku 2025 populacja chorych osiągnie 1,5 miliarda. Globalnie oznacza to co piątą osobę z podwyższonym ciśnieniem krwi, natomiast w krajach rozwiniętych (w tym w Polsce) co trzecią. [1] Ze względu na perspektywę tak szerokiego stosowania leków hipotensyjnych, wysoce uzasadnione wydaje się pogłębianie wiedzy z zakresu trwałości substancji leczniczych stosowanych w terapii układu krążenia, a także poszukiwania nowych cząsteczek o takim działaniu, gdyż według prof. A. Januszewicza „...w ostatnich latach w dziedzinie farmakoterapii nadciśnienia tętniczego nie odnotowano żadnego istotnego postępu we wprowadzeniu nowych leków hipotensyjnych”. [2]

Substancja lecznicza musi być trwała, aby zagwarantować pacjentowi najwyższą jakość terapii. Z tego powodu stabilność leku stanowi niezwykle istotny etap w toku rozwoju badań nad związkami farmakologicznie czynnymi. Na trwałość substancji leczniczej mogą mieć wpływ różne czynniki, jednakże do głównych zalicza się czynniki fizyczne (przede wszystkim temperaturę i wilgotność), a także czynniki chemiczne (wpływ innych substancji na cząsteczkę leku i ich reaktywność). Istotne jest poznanie zachodzących zmian, aby możliwie unikać czynników znacząco zmniejszających jakość preparatu farmaceutycznego. [3, 4]

Peryndopryl, którego trwałość stała się głównym tematem niniejszej pracy doktorskiej, jest przedstawicielem inhibitorów konwertazy angiotensyny (I-ACE), grupy leków należących do jednych z najczęściej stosowanych w chorobach układu sercowo-naczyniowego. Wcześniejsze badania I-ACE pokazały, iż związki te są cząsteczkami nietrwałymi, łatwo ulegającymi degradacji (hydrolizie i cyklizacji) w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza. [5-9] Cząsteczka I-ACE, która uległa hydrolizie, nie jest w stanie skutecznie inhibować enzymu, co wiąże się z brakiem efektu hipotensyjnego i kwestionuje powodzenie oraz bezpieczeństwo terapii.

Wielu pacjentów z nadciśnieniem jest w wieku zaawansowanym i często występują u nich także choroby neurodegeneracyjne lub choroby o podłożu zapalnym. Schorzenia te są powiązane przede wszystkim ze stresem oksydacyjnym, a nadmierna aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) może mieć wpływ na generowanie większej ilości reaktywnych form tlenu w ustroju. Z danych zawartych w literaturze wynika, iż u pacjentów leczonych inhibitorami układu RAA obserwuje się spowolnienie postępu chorób neurodegeneracyjnych i zmniejszanie ognisk stanu zapalnego. [10]

W ramach rozprawy doktorskiej została dokonana analiza trwałości dwóch soli peryndoprylu: *tert*-butyloaminy oraz argininy. Analiza dotyczyła soli peryndoprylu w czystej substancji, w postaci farmaceutycznej – tabletkach oraz w obecności hydrochlorotiazynu (stosowanego często w terapii skojarzonej razem z I-ACE). Ponieważ w dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących badań nad właściwościami antyoksydacyjnymi, ten problem badawczy także został podjęty w niniejszej pracy.

Rozwijając myśl na temat braku postępu we wprowadzaniu nowych leków hipotensyjnych, podjęto się opracowania i syntezy dziewięciu nowych pochodnych I-ACE. Zaplanowane modyfikacje cząsteczek eliminowały miejsca najbardziej podatne na degradację. Nowosyntezywane związki także zostały poddane: badaniom trwałości, badaniom biologicznym, analizie siły wiązania się z enzymem konwertującym angiotensynę (*in silico*) oraz analizie potencjału antyoksydacyjnego.

Uzyskane wyniki mogą posłużyć jako wskazówki do kolejnych eksperymentów, które wpłyną na progres w poszukiwaniu substancji leczniczych o ulepszonej strukturze i właściwościach fizykochemicznych, które mogłyby jednocześnie leczyć/wspomagać terapie różnych jednostek chorobowych, nie tylko nadciśnienia.

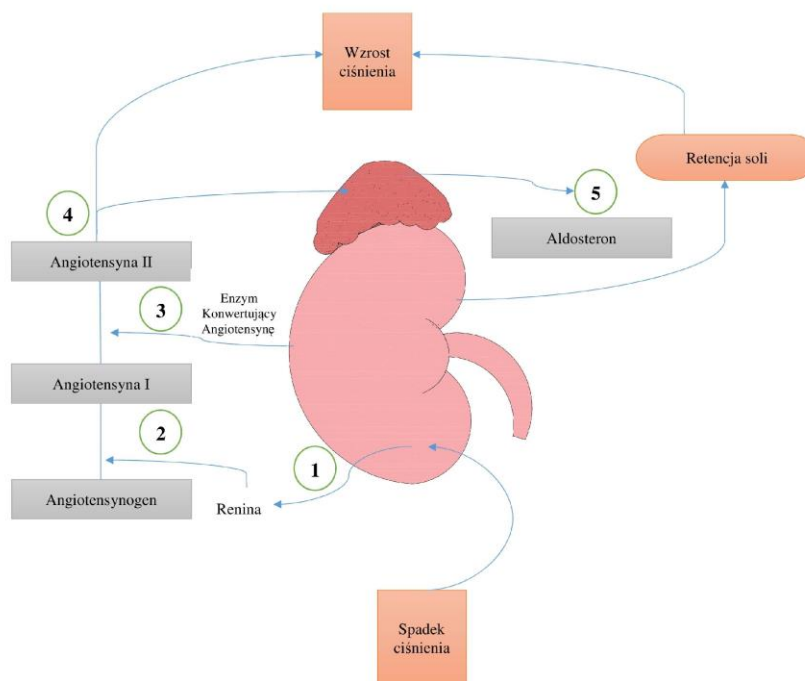
I Część teoretyczna

2. Układ renina-angiotensyna-aldosteron

W celu pełnego zrozumienia I-ACE, w poniższej części pracy zostały przedstawione podstawy teoretyczne, pomocne przy wyjaśnieniu mechanizmu działania, a także kierunku modyfikacji cząsteczek w zaplanowanych badaniach eksperymentalnych.

2.1 Mechanizm działania układu renina-angiotensyna-aldosteron

Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) bierze kluczowy udział w regulacji ciśnienia tętniczego, odgrywając rolę w przepływie płynów ustrojowych przez tkanki, stojąc na straży homeostazy wodno-elektrolitowej oraz prawidłowego przebiegu procesów związanych ze wzrostem i proliferacją komórek (**Ryc. 2.1**). Kiedy układ ten ulega nadmiernej aktywacji, jego efekторы wykazują wiele niekorzystnych działań, prowadząc nawet do trwałego uszkodzenia narządów, w tym serca, naczyń krwionośnych oraz nerek. [11]



Ryc. 2.1 Schemat układu renina-angiotensyna-aldosteron i jego wpływu na ciśnienie krwi (opracowanie własne).

Renina

Pierwszym elementem układu RAA jest renina – enzym proteolityczny, który jest wytwarzany w komórkach aparatu przykłębuszkowego nerek, a także w komórkach głównych kanalików zbiorczych nefronów korowych i przyrdzeniowych. W komórkach aparatu przykłębuszkowego powstaje preprorenina, która ulega przemianie do proreniny i następnie do reniny. Do czynników mających wpływ na wytwarzanie tego enzymu należą: ciśnienie w obrębie naczyń doprowadzających krew do kłębuszka nerkowego, układ współczulny i szereg związków hormonalno-humoralnych. Wydzielanie reniny zwiększa się przy wzroście aktywności układu współczulnego, np. podczas zmniejszania stymulacji receptorów sercowo-płucnych, baroreceptorów i chemoreceptorów oraz podczas stresu, wraz ze wzrostem adrenaliny we krwi. Poza nerkami, synteza reniny zachodzi także w nadnerczach, mózgu oraz sercu. Do niedawna uważano, iż prorenina nie ma istotnego znaczenia klinicznego, jednakże wykazano, że poprzez swój receptor (niezależnie od wpływu angiotensyny II [Ang II]) może oddziaływać na proces włóknienia nerek, patogenezę przewlekłej choroby nerek, szczególnie u pacjentów chorych na cukrzycę, gdzie ponadto może przyczyniać się do rozwoju procesów zapalnych w obrębie siatkówki oka. [12,13]

Angiotensynogen

Angiotensynogen jest wytwarzany przede wszystkim w komórkach wątroby, ale może być syntetyzowany także w innych narządach i tkankach m.in. w sercu, płucach, nerkach i tkance tłuszczowej. Wyniki badań doświadczalnych sugerują, że syntetyzowany w mózgu angiotensynogen może również odgrywać bardzo istotną rolę w rozwoju nadciśnienia tętniczego.

Uwolniona do krążenia systemowego renina odczepia od angiotensynogenu decapeptyd – angiotensynę I (Ang I), która jest przekształcana przez enzym konwertujący angiotensynę I (ACE 1) do aktywnego biologicznie oktapeptydu, tj. Ang II (Ang 1-8). W ostatnich latach poznano również dokładniej inne szlaki przemiany peptydów angiotensynowych. Przy udziale enzymu konwertującego typu 2 (ACE 2) z angiotensynogenu powstają również inne angiotensyny – m.in. angiotensyna 1-9, 1-7 i 1-5, które wykazują działanie przeciwstawne do angiotensyny II. [12]

Angiotensyny

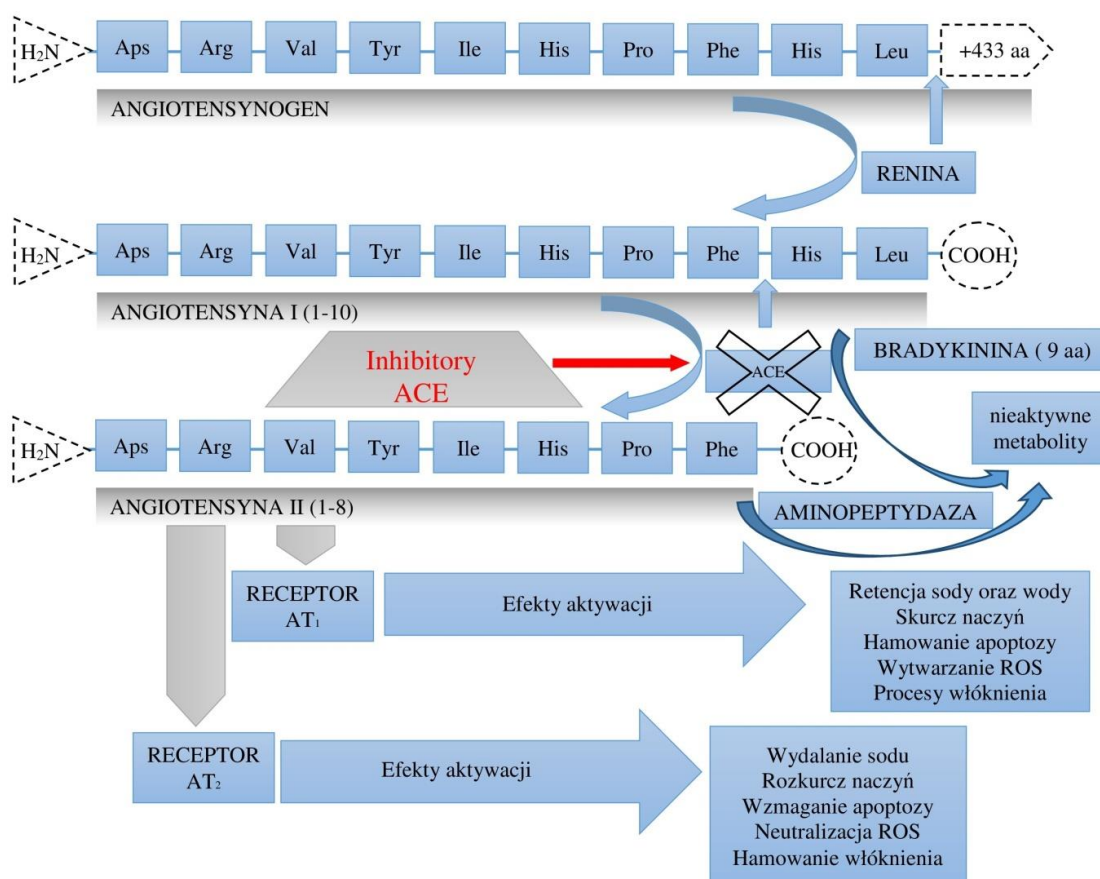
Angiotensyna II ma niekorzystny wpływ na śródbłonek naczyniowy, prowadząc do jego dysfunkcji, wzrostu stresu oksydacyjnego, mając wpływ na pęknięcie blaszki miażdżycowej. Angiotensyna II ma także niekorzystny wpływ na mięsień sercowy, przyczyniając się do apoptozy komórek mięśnia sercowego, nasilaniu przebudowy i procesu włóknienia. Co więcej, angiotensyna II powoduje proliferację komórek mezangium w kłębuszkach nerkowych, stymulując działanie czynników wzrostowych, co także prowadzi do ich włóknienia, ponadto nasila insulinooporność tkankową (**Ryc. 2.2**).

Aminopeptydazy mogą przekształcić angiotensynę II w haptopeptyd – angiotensynę 2-8 – lub bezpośrednio heksapeptyd – angiotensynę 3-8. Skutkiem działania enzymu ACE 2 z Ang I może powstać także nonapeptyd angiotensyna 1-9, która ulega dalszym przebudowom w heptapeptyd – angiotensynę 1-7. Angiotensyna 1-7 powstaje również bezpośrednio z angiotensyny II w wyniku działania ACE 2. Wiadomo, że angiotensyna 1-7 wywiera działanie antyproliferacyjne i wazodylatacyjne poprzez oddziaływanie na specyficzny receptor (tzw. masR receptor).

Enzymy, odpowiedzialne za przekształcanie peptydów angiotensynowych, nazywa się angiopeptydazami. Większość z nich, z wyjątkiem ACE, może przekształcać jedynie peptydy syntezowane lokalnie, w poszczególnych tkankach. Do tej grupy należy między innymi propyl-endopeptydaza (PEP), naturalna endopeptydaza (NEP), propyl-karboksypeptydaza, katepsyna, chymaza tkankowa, elastaza i tkankowy aktywator plazminogenu. Badania sugerują, że tkankowe angiopeptydazy odgrywają istotną rolę, w takich stanach patologicznych jak zawał serca, kardiomiopatia i tętniak aorty. Wśród nich wyróżnia się aminopeptydaza A, biorąca udział w powstawaniu angiotensyny III, która wyróżnia się dużą aktywnością w splocie naczyniówkowym, a także we wszystkich strukturach pnia mózgu oraz układu limbicznego, w których stwierdzono obecność ACE 1. [12, 13]

ACE 1 – to karboksypeptydaza dipeptydyłowa należąca do grupy metalopeptydaz cynkowych, zwana też kininazą II. Jej główną funkcją jest synteza angiotensyny II z angiotensyny I, charakteryzując się też zdolnością rozkładania bradykininy i innych peptydów, np.: substancji P. Większość (około 90%) można zlokalizować w tkankach na komórkach śródbłonna, przede wszystkim w obrębie płuc, również nerek, jelit, choć może także występować w obrębie jąder i w postaci rozpuszczalnej we krwi.

ACE 2 – enzym ten, podobnie jak ACE 1, jest także metalopeptydazą cynkową, wykazując, jednakże działanie odwrotne w porównaniu do ACE 1, przez co niweluje negatywne skutki jego aktywacji nie tylko w odniesieniu do zaburzeń ze strony układu krążenia, ale także innych schorzeń, takich jak np. ostra niewydolność oddechowa. Zostało udowodnione, że ACE 2 wywiera ochronny wpływ na śródbłonek poprzez redukcję stresu oksydacyjnego powstającego w wyniku działania Ang II, tym samym redukując ryzyko tworzenia się blaszki miażdżycowej. Obniżanie poziomu stresu oksydacyjnego zaobserwowano również w nerkach, gdzie ACE 2 występuje zarówno w ścianie naczyń, jak i w komórkach kanalików nerkowych. Ograniczenie wytwarzania reaktywnych związków tlenu łączyły się tu z hamowaniem działania Ang II poprzez receptory AT₁ w jądrze komórkowym. Eliminacja genu ACE 2 rzutuje serią negatywnych powikłań, należą do nich: stwardnienie kłębuszków nerkowych, albuminuria, zwłóknienie przestrzeni śródmiąższowej i peroksydacja lipidów. [12, 14]



Ryc. 2.2 Przekształcenia w układzie RAA oraz skutek jego działania na receptory (opracowanie własne).

Receptory angiotensyn

Angiotensyny wywierają swoje działanie poprzez wpływ na dwa typy receptorów błonowych: AT₁ i AT₂ dla angiotensyny II i III, receptora MAS dla angiotensyny 1-7 oraz receptora AT₄ dla angiotensyny IV. Działając na receptor AT₁, angiotensyna II pośredniczy w wielu procesach, m.in. w uwalnianiu aldosteronu, z następującą retencją sodu i wody, uwalnianiu adrenaliny i endoteliny (efekt neurohormonalny), prowadzi do skurczu naczyń, zwiększając kurczliwość mięśnia sercowego, a także proliferację i przerost komórek, ponadto działa prozapalnie. Ang II działa także aterogennie, gdyż stymulacja receptora AT₁ powoduje niekorzystne zmiany parametrów lipidowych i koagulologicznych, co prowadzi do rozwoju blaszki miażdżycowej. Stymulacja receptora AT₁ powoduje też wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz nasilenie procesów włóknienia w różnych narządach. [13]

Działanie angiotensyny II za pośrednictwem receptora AT₂ ma w pewnym stopniu charakter odwrotny do efektów po wpływie na receptor AT₁, dochodzi wtedy do redukcji działania presyjnego angiotensyny II oraz spowolnieniu apoptozy komórek, w układzie krążenia powoduje nasilenie syntezy tlenku azotu, prostaglandyny I₂ i bradykininy. Pobudzenie receptora AT₂ powoduje wazodylatację małych naczyń. Funkcja receptorów AT₂ jest jednak znacznie bardziej złożona, gdyż mogą one przekazywać też sygnały analogiczne do receptora AT₁, indukując między innymi ekspresję czynnika jądrowego NF-κB, przez co mogą powstawać procesy zapalne i zwłóknieniowe. [12, 14]

Aldosteron

Aldosteron jest ostatnim elementem układu RAA. Jego synteza odbywa się głównie w warstwie kłębuszkowej nadnerczy, pod wpływem angiotensyny II oraz podwyższonego stężenia jonów potasowych w osoczu. Hormon ten potęguje wchłanianie zwrotne sodu w cewce nerkowej dalszej, jednocześnie podwyższając wydalanie potasu i jonów wodorowych do światła cewki, co więcej przyczynia się do powstawania wolnych rodników tlenowych (ROS), hamuje fibrylizację, nasila proces włóknienia ściany naczyniowej, a także przerost mięśnia sercowego oraz tkanki śródmiąższowej nerek.

Hamując aktywność układu RAA, poprzez stosowanie leków mających punkty uchwytu na różnych ogniwach tego układu, możliwe jest zmniejszenie aktywności reninowej osocza i tym samym powstawania Ang I. Takie działanie wykazują inhibitory konwertazy angiotensyny – I-ACE, poprzez hamowanie konwersji angiotensyny I do angiotensyny II,

sartany – poprzez blokowanie receptora dla angiotensyny II typu 1 oraz receptora mineralokortykoidowego. Blokowanie różnych ogniw układu RAA jest szeroko wykorzystywane w terapii nadciśnienia tętniczego, schorzeń układu sercowo-naczyniowych i chorób nerek. [12]

2.2 Inhibitory konwertazy angiotensyny

Inhibitory konwertazy angiotensyny I (I-ACE, *angiotensin-converting enzyme inhibitors*) należą w tej chwili do najważniejszej grupy leków stosowanych w terapii układu krążenia i wykroczyły poza granice hipertensjologii i kardiologii – 30 lat od ich pierwszej przeprowadzonej terapii wciąż są odnajdywane kolejne wskazania do ich stosowania. Plasują się w czołowej pozycji wśród leków stosowanych w terapii nadciśnienia tętniczego na świecie. Swoje zastosowanie na wielu płaszczyznach zawdzięczają złożonemu mechanizmowi działania w jednym z najważniejszych układów hormonalnych w układzie krążenia. Działanie I-ACE nie poprzestaje na redukcji powstawania angiotensyny II, która powoduje wzrost ciśnienia tętniczego i idącym za tym konsekwencji. Oprócz efektu hipotensyjnego, I-ACE wykazują działanie antyproliferacyjne, nefroprotekcyjne, a nawet przeciwzakrzepowe. I-ACE stosuje się w monoterapii łagodnego do umiarkowanego nadciśnienia tętniczego, w cięższych postaciach w leczeniu skojarzonym. W szczególności za efektywne uważa się ich połączenie z małą dawką diuretyku lub blokerem kanału wapniowego. Pozytywną cechą większości związków z tej grupy jest łagodny początek działania, długotrwały efekt hipotensyjny, a stosowanie preparatów w jednej dawce dobowej ułatwia systematyczne prowadzenie długotrwałej farmakoterapii. Dotychczasowe badania nie wykazały, że długo działające I-ACE zakłócałyby rytm dobowy ciśnienia tętniczego. [15-17]

2.2.1 Klasyfikacja I-ACE

Spośród różnych dostępnych klasyfikacji największe znaczenie ma podział ze względu na budowę chemiczną i farmakokinetyczną. [12, 17] W zależności od struktury chemicznej wykazującej powinowactwo do jonów cynku zawartych w enzymie konwertazy angiotensyny można wyróżnić 3 klasy I-ACE:

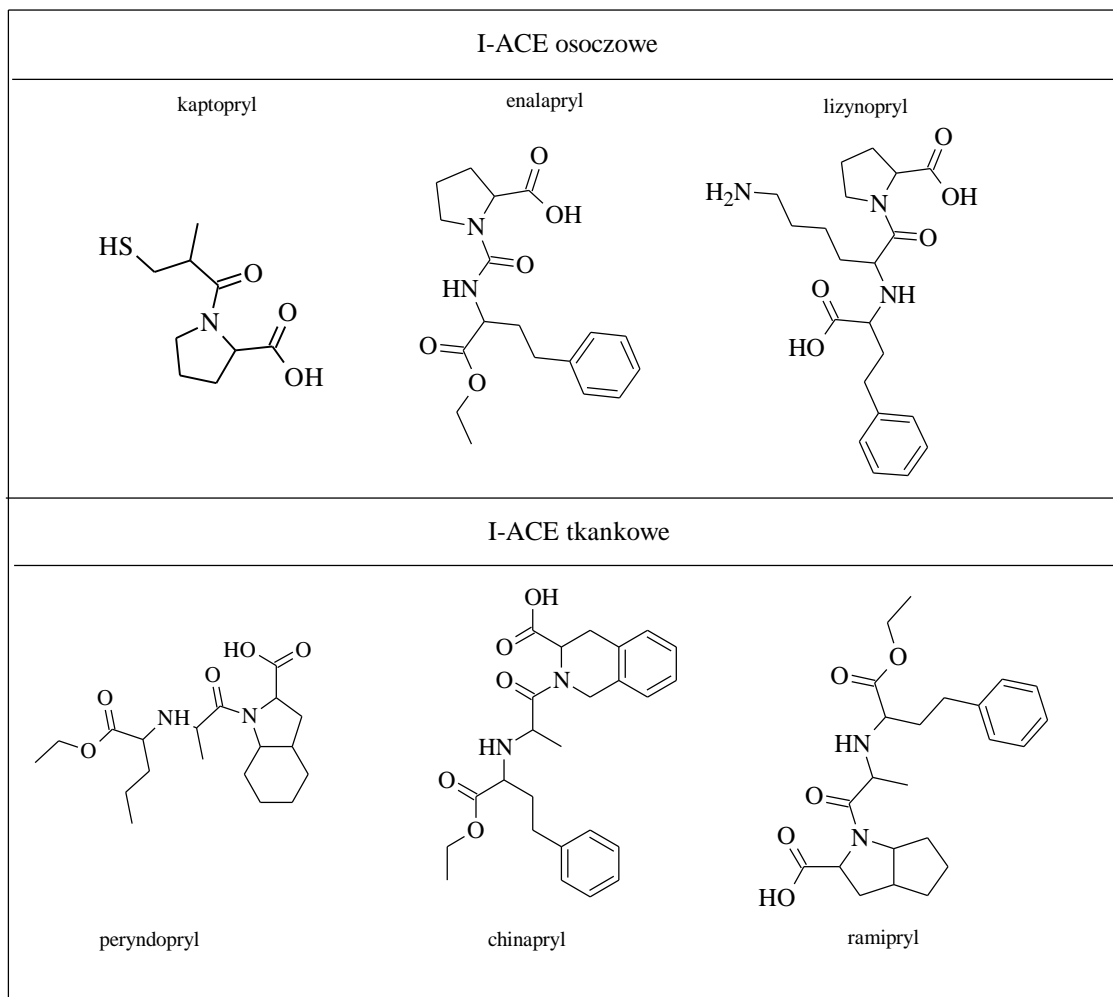
- *Klasa 1* - związki zawierające w budowie grupę sulfhydrylową, należy do niej: kaptopryl, wykazujący największą dostępność biologiczną, ale także najkrótszy okres biologicznego półtrwania oraz zofenopryl i rentiapryl,
- *Klasa 2* - związki zawierające grupę karboksylową, do której zalicza się większość dostępnych na rynku leków z grupy I-ACE np. benazepryl, enalapryl, moeksypryl, lizynopryl, chinapryl, ramypryl, trandolapryl,
- *Klasa 3* - leki zawierające grupę fosfonową, przedstawicielem jest fozynopryl.

Ze względu na różnice farmakokinetyczne I-ACE można podzielić na trzy grupy:

- *Grupa I* - kaptopryl i związki mu pokrewne, które są dostępne w postaci czynnej i podlegają dalszym przemianom metabolicznym,
- *Grupa II* - dostępne w postaci proleków, które pod wpływem enzymów wątrobowych ulegają przekształceniu aktywnych metabolitów, np. enalapryl, cilazapryl, benzapryl, peryndopryl,
- *Grupa III* - lizynopryl, który nie jest prolekiem i nie wymaga aktywacji w wątrobie, nie wiąże się z białkami osocza i jest wydalany z moczem w postaci niezmienionej.

Istnieje także kryterium powinowactwa do tkankowego ACE, według tego podziału wyróżniamy (**Ryc. 2.3**):

- *I-ACE Osoczowe* - liofobowe, które mają większe powinowactwo do osoczowego ACE, osiągają wyższe stężenie w osoczu niż w tkankach, np. kaptopryl, enalapryl, lizynopryl. Ich zaletą jest dobre wchłanianie się z przewodu pokarmowego.
- *I-ACE Tkankowe* - 90% ludzkiego ACE znajduje się w tkankach, głównie w śródbłonku naczyń płucnych czy nerkach, a pozostałe 10% krąży we krwi. Inhibitory tkankowe charakteryzują się znaczną lipofilnością i co za tym idzie hamują głównie tkankowy ACE (takie działanie wykazuje: chinapryl, peryndopryl, ramipryl). Są to I-ACE o długim czasie działania, które wykazują aktywność poprzez swoje metabolity. Ich działanie utrzymuje się przez 24 godziny, dzięki czemu mogą być przyjmowane raz na dobę. [16,17]



Ryc. 2.3 Wzory wybranych I-ACE, posiadających większe powinowactwo do tkankowego lub osoczowego ACE (opracowanie własne, źródło: Januskiewicz A., 2005).

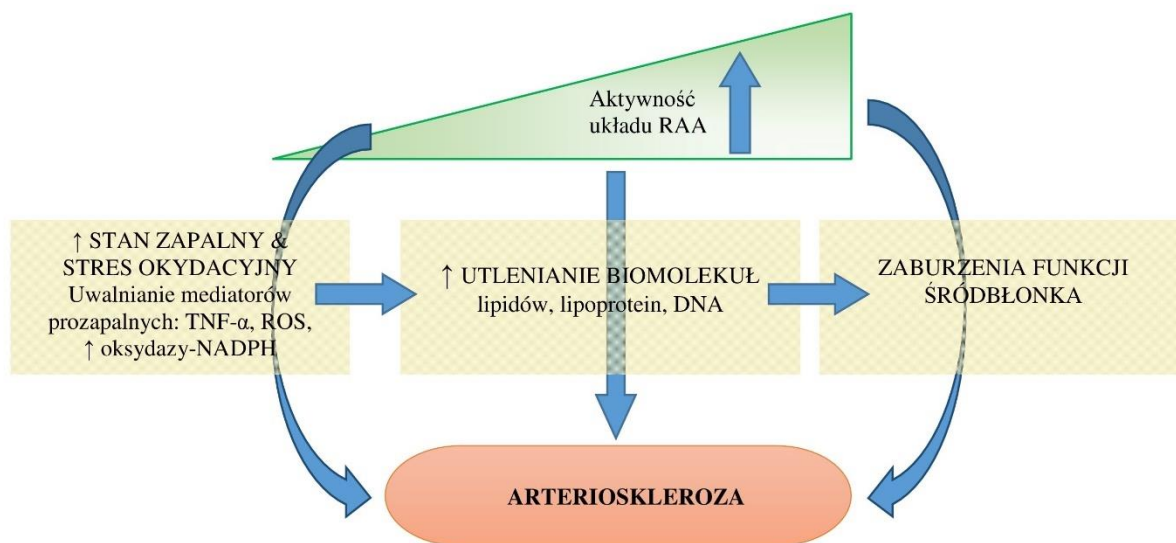
2.2.2 Mechanizm i skutki działania

I-ACE hamują działanie enzymu przekształcającego angiotensynę I w angiotensynę II, a konsekwencją tego działania jest szereg modyfikacji hormonalnych, hemodynamicznych i strukturalnych oraz zmian zachodzących w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Dochodzi do zmniejszenia stężenia angiotensyny II, aldosteronu, amin katecholowych oraz wazopresyny, zwiększeniu ulega stężenie kinin, prostacyklin i tlenku azotu, co może częściowo uzasadniać działanie wazodilacyjne, antyproliferacyjne i antytrombotyczne. Spadek biodegradacji bradykininy prowadzi do wzrostu jej stężenia we krwi, czego następstwem jest występowanie suchego kaszlu jako efektu ubocznego zażywania leków z tej grupy. Modyfikacje hemodynamiczne prowadzą do rozkurczu mięśni gładkich naczyń, zmniejszenia oporu obwodowego i ciśnienia tętniczego bez zmian częstości rytmu

serca. Efekty strukturalne są widoczne w hamowaniu proliferacji komórek mięśni gładkich i wytwarzania kolagenu przez fibroblasty, zmniejszeniu apoptozy komórek mięśnia sercowego oraz regresji przerostu lewej komory serca. [12-17]

2.3 Perspektywy rozwoju grupy I-ACE

Układ RAA jest obecny przede wszystkim w układzie krążenia, jednakże występuje także w innych tkankach i narządach, np. w wątrobie czy w mózgowiu. Aktywatorem tego układu jest angiotensyna II, oktapeptyd o działaniu hipertensyjnym. Z obecnych danych piśmiennictwa wiadomo już, że angiotensyna II ma także inne działanie w naszym organizmie, a mianowicie indukuje oksydazy NADPH, tym samym jest odpowiedzialna za tworzący się komórkowy stres oksydacyjny i produkcję reaktywnych form tlenu (RFT). Konsekwencją nagromadzenia RFT w organizmie może być m.in. utlenianie lipidów w błonach komórkowych czy lipoprotein w DNA, prowadząc do odpowiedzi ze strony układu immunologicznego, czyli do wytwarzania cytokin prozapalnych (TNF- α). Wykazano, że I-ACE hamując aktywność mediatorów prozapalnych i NADPH oksydazy, zmniejszają tym samym stres oksydacyjny komórki, dodatkowo podwyższają funkcje obronne tkanek do neutralizowania RFT, co ma duże znaczenie w chorobach na tle zapalnym np. arteriosklerozy czy zwłóknienia wątroby (**Ryc 2.4**). [12, 18, 19] Lokalny RAA występuje również w ośrodkowym układzie nerwowym, a jego aktywacja wpływa negatywnie na komórki nerwowe i neurotransmitery, co może prowadzić do powstawania chorób neurodegeneracyjnych. Już w latach 90-tych zaobserwowano zależność między hamowaniem układu RAA, a poprawą zdolności kognitywnych i dobrego samopoczucia u pacjentów leczonych I-ACE. Hamowanie mózgowego RAA może być potencjalnym celem terapeutycznym chorób neurologicznych, takich jak choroba Parkinsona, Alzheimer, demencja czy nawet leczenie uzależnień. W wywiadach klinicznych zauważono, że pacjenci z chorobą Parkinsona i jednocześnie z nadciśnieniem, którzy byli leczeni I-ACE, wykazywali lepszą reakcję motoryczną po zażywaniu prekursorów dopaminy. [18-21] Fakt ten może świadczyć o pozytywnym wpływie inhibicji układu RAA na neurotransmitery. Biorąc pod uwagę tak szerokie perspektywy, jakie może dać blokowanie układu RAA w układach, tkankach i narządach w organizmie, wysoce uzasadniona wydaje się perspektywa poszerzania horyzontów w tej płaszczyźnie nauki (**Ryc. 2.4**).



Ryc. 2.4 Wpływ układu RAA na procesy prozapalne, prowadzące do miażdżycy naczyń (opracowanie własne, źródło: Wzgarda A., 2017).

2.3.1 I-ACE w pediatrii

I-ACE to grupa środków farmakologicznych szeroko stosowanych wśród pacjentów pediatrycznych, uznawana za najlepszy wybór w leczeniu nadciśnienia tętniczego, szczególnie jeśli występują takie współistniejące schorzenia, jak: niewydolność serca (zarówno w leczeniu, jak i profilaktyce, szczególnie w dystrofii Duchenne'a), dysfunkcja skurczowa, choroba wieńcowa, przewlekłe choroby nerek (m.in. w zespole nerczycowym, zespole hemolityczno-mocznicowym [HUS] i zespole Alporta) lub cukrzyca typu I. [22]

Choroby nerek

Korzyści dla pacjentów z chorobami nerek wynikają z obniżania ciśnienia wewnątrz kłębuszkowego poprzez rozszerzanie tętniczek eferentnych, co prowadzi do obniżenia ciśnienia filtracyjnego, a w konsekwencji – zmniejszenia białkomoczu. Efekt ten jest obserwowany zarówno u dzieci, jak i u dorosłych. [23, 24] W opornym na sterydy zespole nerczycowym (SRNS) zmniejszenie białkomoczu powoduje opóźnienie pogorszenia czynności nerek, a remisja białkomoczu przewiduje dobre długoterminowe rokowania. Połączenie wysokich dawek antagonistów receptora angiotensyny II (ARB) z wysokimi dawkami I-ACE jest bezpieczne i skuteczne w zmniejszaniu białkomoczu w dziecięcym SRNS. [25]

Skuteczność leczenia I-ACE badano również u dzieci z zespołem Alporta (AS), który jest dziedziczną chorobą nerek charakteryzującą się uporczywym krwiomoczem, białkomoczem i postępującą niewydolnością nerek. Udowodniono, że wczesne, długotrwałe leczenie I-ACE i ARB jest skuteczne oraz dobrze tolerowane u dzieci z AS. Hamowanie białkomoczu przez stosowanie I-ACE i ARB ma taką samą skuteczność u dzieci z ciężkimi i mniej poważnymi mutacjami w genie COL4A3, która jest jedną z mutacji odpowiedzialnych za występowanie AS. [26]

Badań przeprowadzane w Argentynie wskazują na działanie antyproteinuryczne I-ACE w HUS u dzieci, czyli drugą najbardziej rozpowszechnioną przyczyną przewlekłej niewydolności nerek (CRF). Wykazano, że podawanie I-ACE lub ARB ma korzystny wpływ na dzieci cierpiące na HUS bez poważnych zdarzeń niepożądanych. Enalapryl wywiera dwa różne działania na nerki: pierwsze, pojawiające się w pierwszych dniach po rozpoczęciu leczenia, zmiany hemodynamiczne i drugie, czyli efekt antyproteinuryczny, który pojawia się później. Również leczenie zarówno I-ACE, jak i ARB może oferować synergistyczną blokadę RAS, ponieważ stwierdzono, że zmniejszenie białkomoczu było znacznie większe po dodaniu losartanu. Niezbędne jest zaplanowanie dalszych prospektywnych badań, ponieważ efekty te są związane z renoprotekcją w długim terminie. [27]

Niewydolność serca

Innym schorzeniem, gdzie wykorzystuje się I-ACE, jest długotrwałe leczenie niewydolności serca. Ta grupa leków jest szczególnie wskazana u dzieci z niewydolnością serca (HF) spowodowaną kardiomiopatią lewej komory. Randomizowane badania u dorosłych pacjentów wielokrotnie wykazały, że w optymalnych dawkach leki te zmniejszają objawy i poprawiają przeżycie pacjentów, natomiast badania u dzieci koncentrują się głównie na monitorowaniu markerów hemodynamicznych. Zostały wykazane korzyści w zakresie przeżycia dla dzieci z kardiomiopatią (CM) i HF. [28]

W dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD) brak dystrofiny w tkance sercowej prowadzi do śmierci kardiomiocytów i zwłóknienia z klinicznym obrazem CM i późnego HF. Badania wykazały, że zastosowanie peryndoprylu u chłopców z DMD może opóźnić postęp przebudowy lewej komory (LV), co więcej, po długotrwałym leczeniu I-ACE zmniejsza się zaawansowanie zwłóknienia mięśni dystroficznych. Wczesne włączenie

do leczenia peryndoprylu jest zalecane, gdyż opóźnia wystąpienie i postęp znacznej dysfunkcji LV u dzieci z DMD. [29, 30]

Niestety terapia I-ACE wykazała niewielką skuteczność w CM indukowanej antracykliną. Retrospektywny przegląd statystyk pacjentów onkologicznych szpitali pediatrycznych z HF leczonych doksorubicyną, wykazał, że leczenie enalaprylem było związane tylko z przemijającą poprawą obciążenia następczego i dysfunkcji skurczowej lewej komory. [32]

Nadpobudliwość psychoruchowa

Interesującą hipotezą dotyczącą niekonwencjonalnych zastosowań I-ACE jest sugestia, że mogą one mieć pozytywny wpływ na leczenie zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD). Istnieją badania sugerujące, że narażenie środowiskowe dzieci na ołów może prowadzić do zwiększenia wystąpienia ADHD. Kontakt organizmu z ołowiem powoduje silny stres oksydacyjny i hamuje wytwarzanie energii poprzez hamowanie kinazy kreatynowej i kinazy pirogronianowej. Ta ostatnia może być związana z modelem niedoboru energii w ADHD. Biorąc pod uwagę działanie antyoksydacyjne i chelatujące wywierane przez kaptopryl, wysnuto hipotezę, że kaptopryl może działać jako *zmiatacz* wolnych rodników i poprawiać moderowanie energii w ADHD. Chociaż bardzo interesująca, hipoteza ta wymaga szerszych badań. [33]

W porównaniu z innymi lekami przeciwnadciśnieniowymi, I-ACE mają obecnie najwięcej dowodów na poparcie ich szerokiego stosowania w populacji pediatrycznej.

2.3.2 I-ACE w zaburzeniach neurologicznych

RAA występuje lokalnie w wielu tkankach w organizmie, a w niektórych z nich funkcja ta jest wciąż nieznana. Mózg ma także swój lokalny układ RAA, który jest silnie związany z zaburzeniami neurodegeneracyjnymi, dlatego hamowanie ośrodkowego RAA może być potencjalnym celem terapeutycznym dla chorób neurologicznych, takich jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera, otępienie, spadek zdolności poznawczych lub leczenie uzależnień. [34-36]

Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (PD) dotyczy 1,5% światowej populacji w wieku powyżej 65 lat. PD wiąże się ze stopniowym zmniejszaniem się liczby neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej i prążkowie. Strategie leczenia opierają się głównie na zapewnieniu neuroprotekcji poprzez odwrócenie lub spowolnienie procesu neurodegradacji, która jest odpowiedzialna za dysfunkcje motoryczne. [37] Mózgowy RAS może być ważnym celem w PD ze względu na zróżnicowane spektrum aktywności I-ACE: właściwości antyoksydacyjnych, modulację czynnika wzrostu hepatocytów (HGF), aktywację syntazy NO w komórkach astrogleju hipokampa i zdolność do zwiększania poziomu dopaminy i poprawiania reakcji na jej prekursory.

Receptory angiotensyny I zostały znalezione na neuronach dopaminergicznych i istnieje znacząca interakcja pomiędzy angiotensyną I i dopaminą. Objawy PD występują w wyniku degeneracji istoty czarnej i utraty neuronów dopaminergicznych, co jest związane ze zmniejszoną liczbą receptorów angiotensyny I w mózgu, co może być kolejnym kluczowym celem leczenia choroby. [35] I-ACE, które przenikają barierę krew-mózg i są aktywne w ośrodkowym układzie nerwowym, zwiększają syntezę i uwalnianie dopaminy w ciele prążkowanym. [38]

Reaktywne formy tlenu (ROS) są wysoce toksyczne dla neuronów dopaminergicznych, stąd progresja PD może być wywołana także przez stres oksydacyjny, na który narażone są komórki. Te I-ACE, które mogą przenikać przez barierę krew-mózg, a zatem są aktywne w ośrodkowym układzie nerwowym, mogą wspomagać leczenie PD. Mechanizm ich działania antyoksydacyjnego opiera się na fakcie, że angiotensyna jest jednym z aktywatorów oksydaz zależnych od NADPH, które są źródłem ROS i znajdują się w całej istocie czarnej i ciele prążkowanym w mózgu. W ten sposób hamowanie syntezy angiotensyny chroni komórki przed uszkodzeniami wywołanymi przez wolne rodniki. [37, 39]

Właściwości antyoksydacyjne i regulacja poziomu dopaminy nie są jedynymi powodami, dla których I-ACE mogą być bardzo istotne w leczeniu PD. Również wpływ na HGF i jego receptor kinazy tyrozynowej c-Met pokazał nowe możliwości działania. Glikoproteina HGF jest mitogennym, morfogennym i motogennym czynnikiem wzrostu, który chroni neurony dopaminergiczne. Szlak receptora HGF/c-MET jest kluczowym układem trwałości neuronów motorycznych i czuciowych. Zastosowanie HGF jako leku stwarza problemy: bardzo wysokie koszty produkcji HGF i nieprawdopodobieństwo

osiągnięcia pożądanego celu, w którym potrzebna jest neuroprotekcja (z powodu braku możliwości przenikania przez barierę krew-mózg przez dużą glikoproteinę). Można to rozwiązać, zastępując HGF drobnocząsteczkowymi biomimetykami, takimi jak I-ACE. I-ACE przenikające barierę krew-mózg (**Tabela 2.1**) mogą aktywować system HGF i działać neuroprotekcyjnie oraz promować synaptogenezę.

Tabela 2.1 Podział I-ACE o przebadanej przenikalności przez barierę krew - mózg
(opracowanie własne, źródło: Sink K., 2009)

I-ACE przenikające barierę krew-mózg	I-ACE nieprzenikające bariery krew-mózg
Kaptopryl	Ramipryl
Peryndopryl	Chinapryl
Fozynopryl	Moeksepryl
Lizynopryl	Enalapryl
Trandolapryl	Benazepryl
Zofenopryl	

Wczesne badania nad rolą I-ACE w ośrodkowym układzie nerwowym ujawniły związek między leczeniem I-ACE w chorobach neurologicznych, a lepszą oceną jakości życia. [41] Ocenę jakości życia po leczeniu I-ACE zweryfikowano na podstawie oceny nastroju [42] subiektywnego samopoczucia [43, 44] lub funkcji poznawczych, takich jak polepszenie pamięci. [47-52] Mechanizm tego działania jest nadal niejasny, niemniej jednak istnieje silna korelacja między poziomem dopaminy i poprawą funkcji poznawczych. Wpływ I-ACE na poziom dopaminy jest silny - w ciągu jednego tygodnia podawanie peryndoprylu szczurom zwiększało poziom dopaminy w ciele prażkowym o 2,5 raza. [49, 50, 53] Badania pacjentów z PD leczonych peryndoprylem wykazały, że mają lepszą odpowiedź motoryczną na prekursor dopaminy. [37, 38]

Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (AD) to neurodegeneracyjne zaburzenie pracy mózgu, które powoduje demencję i zmiany osobowości, które dotyczą ponad 20 milionów ludzi na całym świecie. AD rozpoczyna się powoli, a wczesnymi objawami są krótkotrwała

utrata pamięci i nietypowe zachowanie. Zmiany neuropatologiczne w mózgu pacjentów są spowodowane przez złogi włókniste amyloidu β ($A\beta$), które zmieniają strukturę synaps i zaburzają komunikację neuronalną. Przeprowadzone badania wykazały, że I-ACE mogą być stosowane pomocniczo u pacjentów z zanikami pamięci czy z zaburzeniami funkcji poznawczych. [55-57]

W perspektywach leczenia AD jest również bierze się pod uwagę stosowanie I-ACE, ponieważ istnieje istotna korelacja między mózgowym systemem RAS a demencją. Zwiększenie aktywności ACE obserwowano u pacjentów cierpiących na AD, które można modulować przez zastosowanie I-ACE, które są przepuszczalne przez barierę krew-mózg (BBB). [40, 58] Badania obserwacyjne prowadzą do wniosku, że dochodzące do mózgu I-ACE spowalniają tempo pogorszenia funkcji poznawczych u pacjentów z AD o 65%, w porównaniu z nie penetrującymi BBB I-ACE (**Tabela 2.1**) lub blokerami kanału wapniowego. W przeprowadzonym badaniu, wśród wszystkich pacjentów przyjmujących alternatywne leki przeciwnadciśnieniowe tylko grupa przyjmująca kaptopryl i peryndopryl miała znacznie niższe ryzyko otępienia i AD. [58] To zmniejszenie ryzyka wystąpienia AD można przypisać zmniejszeniu poziomu stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych w mózgowiu.

Stany zapalne mózgu mogą być wywołane przez $A\beta$, który gromadzi się w mózgowiu pacjentów z AD. $A\beta$ odpowiada za aktywację mikrogleju, astrocytów, a także za zwiększenie stresu oksydacyjnego, co prowadzi do defektu neuronalnego i spadku funkcji poznawczych. Wpływ $A\beta$ na RAS jest oczywisty, ponieważ $A\beta$ podawany bezpośrednio do tkanki mózgowej zwiększa aktywność ACE. [59]

Substancja mózgowa P (SP) jest kluczowym czynnikiem, który ma duży wpływ na poziom $A\beta$. SP może zwiększać aktywność neprylizyny - która jest zdolna do degradacji $A\beta$, *ipso facto* ma pozytywny wpływ na przebieg AD. I-ACE zwiększają poziom SP, a zatem obniżają akumulację $A\beta$ i powstającego stanu zapalnego. [58, 60]

Dokładne badanie roli penetrujących BBB I-ACE w tym procesie zostało przeprowadzone przy użyciu modeli zwierzęcych. Główne odkrycie w tym badaniu wskazuje, że peryndopryl nie tylko hamuje ACE mózgu, ale także jest odpowiedzialny za upośledzenie aktywacji glejowej i stres oksydacyjny. Terapia z I-ACE penetrującymi BBB może mieć znaczący korzystny wpływ nie tylko na zapobieganie, ale także na leczenie łagodnej do umiarkowanej postaci AD. [55, 59]

Pamięć

Proces uczenia się i pamięci u ludzi jest bardzo złożony i wymaga zaangażowania wielu neuroprzekaźników. Ważny proces tej drogi jest regulowany przez cholinergiczny układ neuronalny. Osłabienie pamięci może być spowodowane przez środki antycholinergiczne, jak skopolamina (SC), a I-ACE mogą zmniejszyć lub wyeliminować to działanie. Zwierzęta z amnezją skopolaminową wykazują wyższą aktywność acetylocholinesterazy (AChE), którą można hamować za pomocą I-ACE (w badaniu podawano kaptopryl, peryndopryl, enalapryl i ramipryl). Podawanie SC prowadziło również do zwiększenia poziomu malonaldehydu (MDA) w mózgu zwierząt, a tym samym indukowało stres oksydacyjny. Leczenie wstępne I-ACE zapobiegło wytwarzaniu stresu oksydacyjnego poprzez obniżanie poziomu MDA. [59-62]

Migrena

Migrena jest skomplikowanym zaburzeniem, w którym relacje z innymi grupami leków nie są w pełni rozpoznawane. Niemniej jednak leki profilaktyczne zmniejszające bóle głowy mają duże znaczenie dla pacjentów, którzy nie reagują na leczenie tryptanami (około 40%). Jedną z grup uznawanych za środki zapobiegawcze są I-ACE, ponieważ istnieje korelacja między aktywnością RAS a atakami migreny. W rzeczywistości badania kliniczne dowiodły, że podawanie I-ACE (lizynoprylu, enalaprylu) zmniejsza zasięg ataków u pacjentów z nadciśnieniem i normotensją. W badaniach wykazano, że ich stosowanie spowodowało zmniejszenie takich parametrów jak czas trwania bólu, częstość występowania bólu, a efekt był istotny u około 20% pacjentów w porównaniu z grupą placebo. Niestety, mechanizm tego działania jest wciąż nieodkryty, ale prawdopodobne procesy mogą obejmować pobudzenie aktywności układu współczulnego, zwiększenie syntezy prostacykliny, stymulację degradacji bradykininy, substancji P i enkefaliny oraz silne działanie antyoksydacyjne. Nadal potrzeba więcej badań w tym zakresie. Niemniej jednak I-ACE mogą mieć klinicznie istotny profilaktyczny wpływ na leczenie migreny. [63, 64]

Udar

Badanie PROGRESS (*Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study*) i inna niezależna analiza wykonana przez Chapmana i in. udowodniło, że peryndopryl nie tylko

skutecznie obniża ciśnienie krwi, ale także istotnie zmniejsza ryzyko udaru. Terapia I-ACE jest bardzo korzystna dla pacjentów po incydencie udaru mózgu lub przemijającym ataku niedokrwiennym, a efekt ten można zaobserwować również u pacjentów normotensywnych. Ryzyko upośledzenia funkcji poznawczych i otępienia jest silnie związane z incydem udaru. Obniżenie ciśnienia krwi oczywiście zmniejsza ryzyko samego incydentu, niemniej jednak peryndopryl (szczególnie w połączeniu z indapamidem) ma większy korzystny wpływ niż inne leki przeciwnadciśnieniowe dla pacjentów po udarze mózgu, tj. ryzyko wystąpienia demencji można zmniejszyć o 30%, a ryzyko pogorszenia funkcji poznawczych o 50%. [65, 66]

Ponieważ pacjenci z chorobami naczyniowymi mózgu mają większe ryzyko wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych i niewydolności serca, efekt podawania I-ACE jest bardzo korzystny, zmniejszając ryzyko zaburzeń ze strony układu krążenia, oraz zmniejszając ryzyko samego udaru o ponad 40%. Peryndopryl może być uważany za pierwszorzędowy środek terapeutyczny dla wszystkich pacjentów z zaburzeniami mózgowo-naczyniowymi, ponieważ nie powoduje ani hipotensji, ani dysfunkcji nerek. [38, 65, 66]

2.3.3 Leczenie uzależnień

Właściwości poprawiające funkcje kognitywne, polepszenie samopoczucia i możliwe działanie przeciwdepresyjne to tylko niektóre z zalet I-ACE, które są w pewnym stopniu korzystne także dla pacjentów bez nadciśnienia. [49, 50, 67, 68]

Biorąc pod uwagę, że RAS ma wpływ na neuroprzekaźniki, takie jak dopamina i norepinefryna, może zostać uznany za nowy cel w leczeniu uzależnienia od substancji odurzających. Pod tym względem farmakoterapia I-ACE może być nową perspektywą nie tylko ze względu na wpływ na układ krwionośny, ale także na obniżenie lęku, osłabienie symulacji lekowych i stymulację układów dopaminergicznych. [69-71]

Badanie wykorzystania I-ACE w leczeniu uzależnień było przedmiotem zainteresowania naukowców od lat 90. XX wieku, kiedy odkryto wpływ angiotensyny na zmianę zachowania. Wczesne badania przeprowadzone na szczurach i myszach uzależnionych od etanolu dowiodły, że wiązanie Ang II z centralnymi receptorami AT-1 jest prawdopodobnie odpowiedzialne za zachowania poszukujące środka odurzającego u osób uzależnionych. Genetycznie zmodyfikowane myszy z nadekspresją

angiotensynogenu wykazywały większe spożywanie alkoholu. Przeciwnie, zaobserwowano odwrotny efekt w modelach mysich z uszkodzonym genem, czyli zmniejszonym poziomem angiotensynogenu. Również iniekcje samej Ang II zwiększają spożycie alkoholu. [72, 73] Nadużywanie kokainy i przypuszczalnie innych substancji odurzających znacznie zwiększa aktywność ACE. [74-78]

Okazuje się, że ciśnienie krwi spowodowane przez metamfetaminę lub kokainę jest zależne od receptora AT-1 i może być zaburzone przez wstępną terapię niską dawką I-ACE. Ponadto terapia byłaby również korzystna ze względu na ochronę przed zdarzeniami sercowymi lub kardi toksycznymi działaniami narkotyków. I-ACE, które mają właściwości dopaminergiczne, mogą ograniczać użycie kokainy przez odwracanie lub kompensowanie regulacji negatywnej (*down-regulation*) w układzie dopaminergicznym w następstwie długotrwałego zażywania narkotyków. Angiotensyna II jest również odpowiedzialny za wzmocnienie działania noradrenaliny, co przyczynia się do działania met amfetaminy. [76]

Co więcej, sugeruje się, że odstępianie od nadużywania kokainy może aktywować czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF), co może być również jednym z czynników zwiększających szansę na powrót do narkotyku, związanych ze stresem. I-ACE zmniejszają uwalnianie CRF, w przeciwieństwie do angiotensyny II. [79, 80]

Co więcej, wszystkie korzyści z leczenia I-ACE można uzyskać również u nosicieli wirusa HIV. [68]

Inne badanie dowiodło, że angiotensyna II może wpływać na układ opioidowy. Mechanizm ten opiera się nie tylko na zmianie poziomu dopaminy, ale także na podniesieniu poziomu endogennych opioidów. Potwierdzenie tej hipotezy wynika z faktu, że pozytywny wpływ I-ACE na pamięć i uczenie się może zostać przewyżczonej przez nalokson (lek stosowany do blokowania skutków przedawkowania opioidów). [50, 81] Stąd, zastrzyki angiotensyny II podawane zwierzętom z uzależnieniem opioidowym nasiliły objawy odstawienia. Podawanie kaptoprylu u gryzoni uzależnionych od morfiny zmniejszyło częstotliwość samoaplikowania narkotyku i objawy odstawienia. [82]

2.3.4 Związek między I-ACE a otyłością

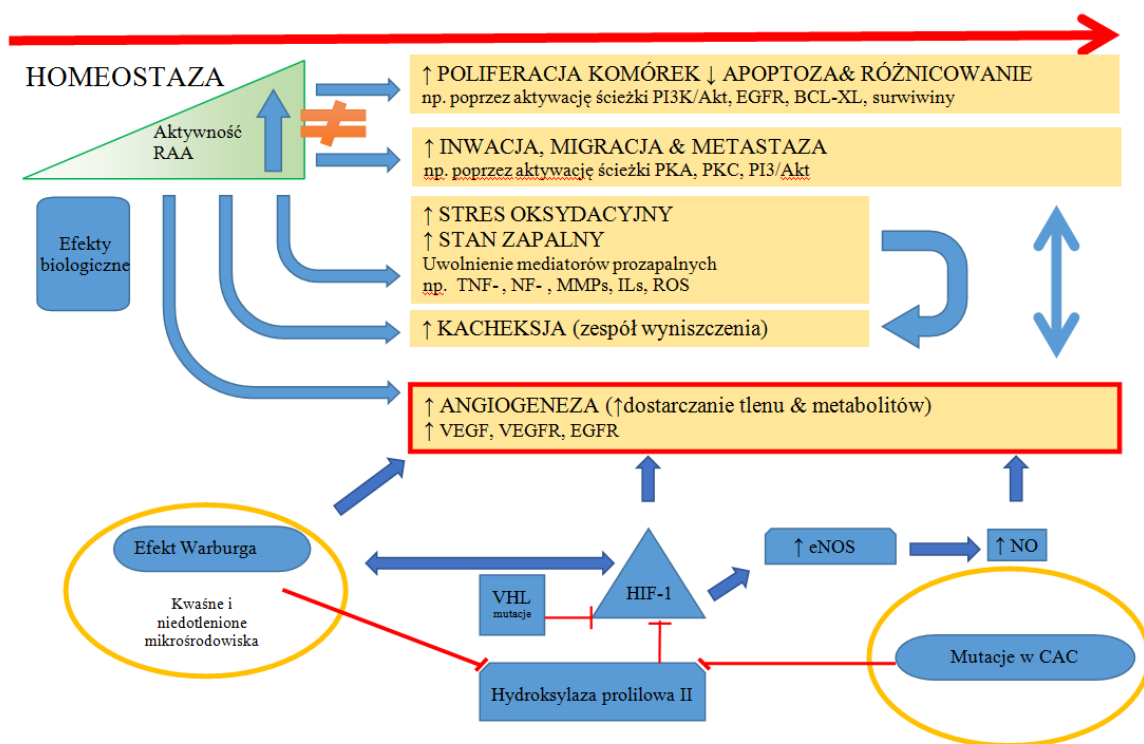
W ostatnich latach dramatycznie wzrosła liczba populacji z nadwagą, co, szczególnie w krajach rozwiniętych, osiąga rozmiar epidemii. Podstawowy mechanizm drastycznego

skokowego przyrostu masy ciała przy braku nadmiaru kalorii w diecie pozostaje niejasny, a dostępne opcje leczenia farmakologicznego są ograniczone, dlatego duże znaczenie mają poszukiwania możliwych sposobów zapobiegania i leczenia otyłości.

Grupa I-ACE zyskuje na znaczeniu w tej kwestii, ponieważ odkryto, iż w tkance tłuszczowej istnieje lokalny RAS, który jest w stanie wytworzyć wszystkie składowe systemu: angiotensynogen, ACE i AT1-R. Rola I-ACE w RAS znajdującym się w tkance tłuszczowej była przez długi czas pomijana, jednakże obecnie adipocyty i angiotensyna II są uważane za jedne z najważniejszych punktów uchwytu pod kątem endokrynej regulacji apetytu i magazynowania energii. Wykazano, że RAS i angiotensyna II odgrywają ważną rolę w rozwoju i różnicowaniu adipocytów, w związku z czym lokalny RAS może być poszukiwanym łącznikiem między otyłością i nadciśnieniem, a wysoka aktywność tego układu zwiększa ryzyko chorób sercowo-naczyniowych i insulinooporności. Nie jest więc zaskoczeniem, że obniżenie aktywności RAS może być korzystne zarówno w leczeniu otyłości jak i zwiększaniu wrażliwości na insulinę. Wykazano, że podawanie I-ACE (w badaniu zastosowano peryndopryl, kaptopryl, enalapryl i ramipryl) prowadzi do utraty wagi zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u ludzi. Podawanie I-ACE u szczurów z normotensją prowadziło do redukcji masy ciała poprzez zmniejszanie ilości przyjmowanego pokarmu, zwiększenie poziomu leptyny oraz wrażliwości na insulinę, a także ograniczenie ekspresji mRNA markerów stanu zapalnego, co było niezależne od jakichkolwiek efektów hipotensyjnych czy modyfikacji profilu lipidowego we krwi. [83-86]

2.3.5 Nowotwory

Potencjalne właściwości przeciwnowotworowe I-ACE przypisuje się ich właściwościom do zmniejszania stężenia angiotensyny II, która jest silnym bodźcem do proliferacji i wzrostu guzów. Wiele badań przeprowadzonych niezależnych ośrodkach potwierdziło korzystny efekt różnych I-ACE na zmniejszanie się masy guza oraz liczby występujących przerzutów (**Ryc. 2.5**). Mechanizm jaki wywiera układ RAA oraz jego hamowanie zostało przedstawione na rycinie poniżej.



Ryc. 2.5 Wpływ układu RAA na proces nowotworzenia (opracowanie własne, źródło: Wzgarda A., 2017).

Szczególne właściwości antyproliferacyjne i proapoptotyczne w przypadku nowotworów płuc i nerek wykazuje kaptopryl, który zwiększa poziom angiotatyny, która jest silnym, endogennym środkiem hamującym angiogenezę guzów. [87, 88] W badaniu na liniach komórek białaczki K562 wykazał pozytywny efekt, poza kaptoprylem, a także trandolapryl. [89] W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, iż enalapryl postępowanie raka w modelu zwierzęcym złośliwości płuc poprzez hamowanie proliferacji komórek progenitorowych w śledzionie, ponadto podobne działanie ma w przypadku komórek nerwiaka niedojrzałego. [90, 91] Istnieją dane epidemiologiczne wspierające wprowadzenie I-ACE do terapii przeciwnowotworowych. [92-94] Niemniej jednak, ze względu na brak odpowiednio skonstruowanych, randomizowanych badań klinicznych wykorzystanie tych leków bezpośrednio w onkologii nadal pozostaje kwestią przyszłości. [87]

2.4 Trwałość leku w fazie stałej

Wysoka trwałość preparatów leczniczych jest cechą gwarantującą wydajność procesu produkcji oraz jakość przechowywania i transportu leków, a co za tym idzie, powodzenie farmakoterapii. Tylko posiadając wiedzę o mechanizmie oraz kinetyce rozkładu preparatów leczniczych możliwe jest podjęcie niezbędnych kroków zapewniających trwałość substancji leczniczych lub wpływ na wydłużanie ich czasu $t_{0,1}$ i $t_{0,5}$.

2.4.1 Cechy wpływające na stabilność leku

Stabilność preparatu leczniczego wpisuje się w definicję utrzymania przez substancję właściwości fizykochemicznych, terapeutycznych oraz toksykologicznych w czasie określanym jako termin przydatności. Jednakże, każda substancja chemiczna podlega ciągłemu działaniu procesów fizycznych i chemicznych, zarówno podczas produkcji, jak i podczas przechowywania, co może prowadzić do przyspieszonego rozkładu preparatów farmaceutycznych. [95]

Rozkład substancji czynnej w preparacie w konsekwencji prowadzi do spadku siły działania farmakologicznego, co więcej, produkty degradacji leku mogą być toksyczne dla pacjenta i może to prowadzić do poważnych powikłań. [96, 97]

Dlatego też trwałość substancji leczniczych stanowi kluczowy element zapewnienia optymalnej jakości preparatu farmaceutycznego, przy czym preparaty w postaci tabletek należą do form najczęściej przyjmowanych przez pacjentów (ponad 80%), co tym bardziej potwierdza konieczność analiz stabilności produktów leczniczych w fazie stałej. [97 -99]

Do oceny stabilności substancji leczniczej w fazie stałej należy przede wszystkim:

- ustalić mechanizm oraz szybkość rozkładu leku,
- zidentyfikować produkty rozkładu,
- ocenić wpływ czynników środowiskowych na parametry kinetyczne reakcji.

Na trwałość substancji leczniczej w postaci farmaceutycznej jaką jest tabletkę, mają wpływ także:

- dobór innych substancji w masie tabletkowej (aktywnych lub pomocniczych),
- zachowanie odpowiednich warunków podczas procesu produkcji,
- jakość opakowania,
- warunki transportu i przechowywania. [97-99]

2.4.2 Reaktywność a trwałość leku w fazie stałej

Reaktywność substancji jest podstawową przyczyną procesu rozkładu substancji leczniczej. Destabilizacja w ciałach stałych przebiega inaczej niż w przypadku roztworów czy gazów, gdzie ruchliwość cząsteczek nie jest tak bardzo ograniczona i proces rozpadu zachodzi znacznie szybciej. W fazie stałej cząsteczki substancji leczniczej są ciasno ułożone i posiadają niewielką energię kinetyczną, wykonując jedynie drgania wokół swojego położenia przestrzennego. Ograniczenie to, niwelujące duży ruch cząsteczek, może zostać zmniejszone poprzez rozluźnienie się struktury układu, co zwiększa szybkość dyfuzji oraz ilość zderzeń między cząsteczkami, co może prowadzić do wytworzenia nowych wiązań chemicznych. Takie miejsca nie występują w całej objętości fazy stałej, a mają miejsce w centrach aktywnych, nazywanych też zarodkami, których może przybywać w czasie w całej strukturze. Do ekspansji centrów aktywnych mogą przyczyniać się:

- obecność wody,
- temperatura,
- ciśnienie,
- stopień rozdrobnienia substancji,
- właściwości fizykochemiczne (higroskopijność, rozpuszczalność),
- postać krystaliczna,
- dyfuzja produktu reakcji.

Szybkość postępu reakcji rozkładu jest powiązana z energią kinetyczną, która jest potrzebna do rozerwania wiązań elementów substratu i utworzenia nowych w cząsteczce produktu. Fragmenty dysponujące nadmiarem energii kinetycznej mogą stać się aktywatorami nowej fazy, po oddzieleniu się ze struktury przejściowej. Tworzenie się zarodków nie przebiega w sposób jednorodny, największe nagromadzenie aktywatorów znajduje się na warstwach powierzchniowych sieci krystalicznej, dlatego też stopień sproszkowania substancji ma istotny wpływ na szybkość jej dezintegracji. Rosnące aktywatory tworzą nową strukturę produktu, przesuwając fazę reakcyjną do głębi struktury krystalicznej. Końcowym etapem reakcji rozkładu jest odseparowanie substratu od produktu w wyniku dysproporcji objętości właściwych między fazami. [100]

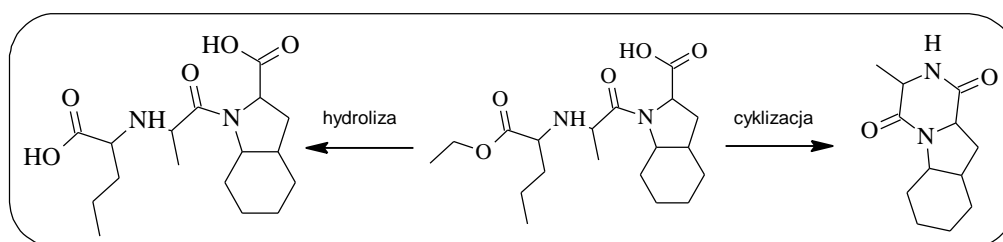
Do rodzajów reakcji jakie zachodzą podczas rozkładu substancji w fazie stałej należą m. in.:

- utlenianie,
- cyklizacja,
- hydroliza,
- dezaminacja. [101]

2.5 Mechanizm rozkładu dikarboksylowych I-ACE

Dikarboksylowe I-ACE, które są prolekami (w tym peryndopryl), rozkładają się w fazie stałej najczęściej w wyniku dwóch reakcji (**Ryc. 2.6**):

- **hydrolizy**, należącej do najczęściej spotykanych mechanizmów dezintegracji cząsteczek, które posiadają w swojej budowie grupę: estrową, amidową, sulfonową, sulfonamidową, imidową lub laktamową [102]; jako, że większość I-ACE posiada w swojej budowie ugrupowanie estrowe, warunkuje to ich skłonność do rozkładu hydrolitycznego; co istotne, zhydrolizowane pochodne I-ACE nie są w pełni biodostępne;
- **cyklizacji**, która zachodzi pomiędzy sąsiadującymi resztami aminokwasowymi w cząsteczce, prowadząc do powstania pochodnej diketopiperazynowej, co jest jednym z poważniejszych problemów dla producentów leków, z powodu trudności późniejszego oczyszczenia substancji czynnej. [100, 103, 104]



Ryc. 2.6 Przekształcenie się I-ACE w nieaktywne pochodne, na przykładzie peryndoprylu (opracowanie własne).

Wyznaczenie parametrów reakcji rozkładu i dobranie adekwatnego modelu matematycznego wymaga kinetycznej analizy rozkładu substancji leczniczej i jednoczesnym monitorowaniu przebiegu reakcji. Istnieją różne metody wykonywania testów rozkładu substancji aktywnych, opierające się na analizie zmian zachodzących w badanym leku, pod wpływem negatywnych czynników zewnętrznych takich jak: temperatura, wilgoć czy promieniowanie UV. [106]

Metoda izotermiczna polega na badaniu trwałości leku w kilku stałych temperaturach i wilgotnościach względnych powietrza. Metodę tę możemy podzielić na:

- testy długoterminowe, gdzie badana substancja lecznicza/preparat farmaceutyczny jest przechowywany w rzeczywistych warunkach, mimo, że jest najbardziej wiarygodnym testem, nie pozwala uzyskać wyników w krótkim czasie,
- testy stresowe/przyspieszone, w których stosuje się warunki podwyższonych temperatur i wilgotności względnych powietrza, co czyni reakcje rozkładu bardziej dynamiczną i obniża czas trwania analiz. [106-108]

2.5.1 Energia aktywacji reakcji rozkładu

Energia aktywacji to najmniejsza ilość energii niezbędna w reakcji do przekształcenia substratów w produkty. Ponieważ szybkość wielu reakcji wzrasta wraz z rosnącą temperaturą, można opisać prostoliniową zależność częstości relaksacji z energią aktywacji, za pomocą stałych szybkości reakcji (k [1/s]) jako funkcji odwrotności temperatury, w jakiej zachodzi reakcja ($1/T$ [1/K]), co matematycznie opisał Svanty Arrhenius za pomocą równania:

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

gdzie: A - czynnik częstości, E_a - energia aktywacji, R - uniwersalna stała gazowa ($R = 8,3114$ [J/(K·mol)]), T - temperatura w K.

Im silniej stała szybkości reakcji jest zależna od temperatury, tym większa jest energia aktywacji, jej ujemna wartość świadczy o redukcji szybkości reakcji wraz ze wzrostem temperatury, a wartość zerowa wskazuje na brak zależności między szybkością reakcji a temperaturą.

Z wyznaczonych parametrów Arrhenius'a możliwe jest wyznaczenie parametrów termodynamicznych aktywacji reakcji:

- entalpii:

$$H = E_a - R \cdot T$$

- entropii:

$$S = R \cdot (\ln A - \ln k_B T/h)$$

gdzie: R - uniwersalna stała gazowa ($R = 8,3114$ [J/(K·mol)]), T - temperatura - w K, h - stała kwantowa Planck'a ($h = 6,6256 \cdot 10^{-34}$ [J/s]), k_B - stała Boltzman'a ($1,3805 \cdot 10^{-23}$ [J/K]) [106-108].

2.6 Metoda analityczna do badań nad stabilnością substancji leczniczej

Odpowiednia procedura jest kluczowym elementem przy właściwym wykonywaniu analizy stabilności substancji leczniczych. Dobór metody analitycznej używanej do badań jest oparty o właściwości fizykochemiczne leku oraz możliwości jego oznaczenia wobec produktów rozkładu i innych składników preparatu farmaceutycznego.

Do kryteriów doboru odpowiedniej metody należą:

- wysoka selektywność,
- dokładność i precyzja,
- czułość metody, czyli jak najniższy limit oznaczalności i wykrywalności,
- niski koszt,
- krótki czas analizy,
- dostępność aparatury,
- niska toksyczność odczynników.

W niniejszej pracy przy selekcji odpowiedniej metody analitycznej kierowano się wyżej wspomnianymi cechami, dlatego wybrano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z detekcją UV.

2.7 Walidacja metody analitycznej

Warunkiem wiarygodnej pracy analitycznej jest poddanie wykonywanej metody procesowi walidacji. Celem walidacji jest stwierdzenie czy proces analizy według danej metody przebiega w sposób rzetelny i daje miarodajne wyniki.

Walidację wykonuje się bezwzględnie dla wszystkich nowych metod, jest również przeprowadzana dla metod, które są modyfikowane na jakimkolwiek etapie analizy.

Procesowi walidacji podlegają wszystkie etapy analizy:

- określenie zakresu prostoliniowości krzywej kalibracji,
- wyznaczenie czułości metody,
- badanie dokładności i precyzji metody,
- wyznaczenie odzysku analitu,
- wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności,
- oznaczenie stabilności analitu,
- oszacowanie selektywności metody.

2.7.1 Krzywa kalibracji

Kalibracja przyrządu jest czynnością wstępnej walidacji. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej ma na celu ustalenie równania zależności pomiędzy generowanym przez aparat sygnałem (Y) a zawartością badanej substancji (c) w próbie:

$$Y = f(c)$$

gdzie: Y – wielkość mierzona, c – stężenie analitu.

Najczęściej:

$$Y = ac$$

gdzie: a – współczynnik proporcjonalności, wyznaczony w procesie kalibracji, c – stężenie analitu

Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej stosuje się wiarygodne materiały odniesienia. Jeżeli krzywa kalibracyjna jest podstawą wielokrotnych analiz, musi być ona wykonywana każdorazowo w dniu analizy.

Liniowość wskazań

Liniowość to przedział ilości analizowanej substancji, dla którego sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego jest proporcjonalny do zawartości. Zależność Y jest prostoliniowa w określonym zakresie badanych stężeń. Fundamentalną rolę posiada pomiarowy zakres wskazań, czyli przedział pomiędzy najwyższym i najniższym stężeniem analizowanej substancji, jaki może zostać ustalony za pomocą metody pomiarowej, z zakładaną dokładnością oraz liniowością. Przy niższych stężeniach zakres liniowy kończy się dolną granicą oznaczalności, a zakrzywienie może być wynikiem szumów aparaturowych. Za koniec zakresu prostoliniowego uznaje się punkt, w którym odchylenie od prostoliniowości nie przewyższa wartości 3%.

2.7.2 Czulość metody

Czulością metody analitycznej określa się nachylenie krzywej kalibracyjnej. Czulość wyraża zmiany sygnałów, które wynikają ze zmian ilości analizowanej substancji. Im większa jest zmiana sygnału przy nieznacznej zmianie stężenia analitu, tym lepsza jest czulość metody.

Matematycznie parametr ten jest wyrażany współczynnikiem kierunkowym wykresu kalibracji.

Czułość metody określają również *granice wykrywalności i oznaczalności*.

Granice wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności i oznaczalności są parametrami, które odgrywają kluczową rolę w procesie walidacji metody. Przyczynami problemów ze zrozumieniem i wyznaczeniem tych parametrów jest mnogość definicji opisujących pojęcia oraz trudności praktyczne w wyznaczaniu bazowej wartości determinującej granicę wykrywalności – wielkość poziomu szumów urządzenia pomiarowego. Najważniejszymi definicjami są:

- *stosunek sygnału do szumu (signal to noise ratio – S/N)* – wielkość bezwymiarowa, która jest zależnością sygnału do średniego poziomu szumu dla danej próby. Określa on wpływ poziomu szumu na względny błąd pomiarowy.
- *granica wykrywalności (limit of detection – LOD)* – to minimalna ilość substancji możliwa do wykrycia za pomocą danej metody analitycznej. Wymiar tej wartości to zawartość substancji badanej, np. mg/dm³. Ma ona ścisłe powiązanie z poziomem szumu. Przyjmuje się, że wartość granicy wykrywalności to trzykrotny poziom szumów:

$$LOD = 3,3 S_y/a$$

gdzie: S_y – odchylenie standardowe; a – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

- *granica oznaczalności (limit of quantification – LOQ)* – to najmniejsze stężenie substancji możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą analityczną z określoną dokładnością i precyzją. Wartość LOQ jest zawsze wielokrotnością wyznaczonej wartości granicy wykrywalności, a najczęściej $LOQ = 3 LOD$:

$$LOQ = 10 S_y/a$$

2.7.3 Dokładność metody

Dokładność to poziom zgodności między wynikiem lub średnią z kilku oznaczeń a prawdziwą zawartością badanej substancji w próbce. Dokładność może być wyznacznikiem wielkości błędu. Zdefiniować można:

- *dokładność pojedynczego oznaczenia* – możliwa do oznaczenia jako błąd standardowy, gdyż nie znana jest zawartość rzeczywista w próbce,
- *dokładność metody* – określana na podstawie średniej wartości z pomiarów uzyskanych na tej samej próbce i tą samą metodą. Badaną próbką jest wzorzec, w którym znana jest zawartość badanej substancji.

Parametrem określającym dokładność danej metody jest odzysk. Aby go wyznaczyć, próbę dzieli się na dwie części i do jednej dodaje się znaną ilość analitu (s). Po przeprowadzeniu oznaczenia próby z dodatkiem analitu ($x + s$) i pierwotnej (x), oblicza się odzysk R według wzoru:

$$R(\%) = \frac{(x + s) - (x)}{s} \cdot 100$$

Akceptowalny odzysk zależy od stężenia badanej substancji – dla stężenia 1% substancji badanej średni odzysk wynosi 97-103%.

2.7.4 Precyzja metody

Precyzją metody jest stopień zgodności między wynikami uzyskanymi tą samą metodą i na tej samej próbce przy kilkukrotnym powtórzeniu oznaczenia. Precyzję można też sprecyzować jako rozrzut wyników przy powtarzanych analizach w stosunku do średniego wyniku z oznaczeń. Im precyzja jest większa, tym mniejszy jest rozrzut.

Przy powtarzanych analizach nigdy nie uzyskuje się dwóch identycznych wyników, a prawidłowe wyniki układu się zawsze zgodnie z rozkładem Gaussa w kształcie krzywej. Najlepszym wyznacznikiem precyzji jest odchylenie standardowe S . Za zmniejszenie precyzji oznaczeń odpowiedzialny jest błąd przypadkowy.

Z precyzją wiążą się także definicje:

- **powtarzalności oznaczeń**, gdy analiza wykonywana jest w tych samych warunkach, na tych samych urządzeniach, tą samą metodą, przez tego samego analityka, w możliwie najkrótszym czasie. Miarą powtarzalności jest *RSD*;
- **RSD** to względne odchylenie standardowe (*relative standard deviation*), niezależne od jednostek w jakich prowadzona jest analiza. Jest ilorazem wartości odchylenia standardowego (*S*) oraz średniej z wartości pomiarów (*x*)

$$RSD = \frac{S}{x}$$

RDS jest liczbą mniejszą od 1 i wyrażane może być także w procentach jako współczynnik zmienności (*coefficient of variance*) - CV%;

- **odtwarzalności oznaczeń**, gdy wyniki otrzymywane są w sposób niezależny, tą samą metodą i na tej samej próbce, ale przez różnych analityków, w różnych laboratoriach oraz na różnych urządzeniach. Opracowanie takich wyników daje wartość *RDS odtwarzalności*.

Precyzja oznaczeń jest zależna od stężenia analitu w badanej próbce. Przyjmuje się, że opracowana metoda spełnia wymogi, gdy $CV\% = 2^{(1 - 0,5 \log c)}$ gdzie *c* to stężenie badanej substancji.

2.7.5 Stabilność substancji leczniczych

Nie tylko substancje farmaceutyczne ulegają przemianom fizykochemicznym i biochemicznym w czasie przechowywania, lecz dotyczy to również odczynników przygotowanych do analizy. Doświadczenie powinno być przeprowadzane na świeżo sporządzonych roztworach. Jeżeli analiza trwa długo lub przewiduje się korzystanie z odczynników lub roztworów substancji badanych przez dłuższy okres czasu, należy ustalić ich stabilność. Jej miarą jest trwałość roztworów przynajmniej przez 48 godzin, czyli gdy sygnał po tym czasie zmienia się $\leq 2\%$ w porównaniu z sygnałem próbki oznaczonej zaraz po przygotowaniu.

2.7.6 Selektywność

Selektywność to możliwość oznaczenia jednego składnika w złożonej próbce, bez nakładania się sygnałów od substancji towarzyszących. Określając selektywność bada się, czy dana metoda chromatograficzna pozwala zidentyfikować i oznaczyć badaną substancję, a także czy otrzymane piki chromatograficzne pochodzą na pewno od niej oraz czy nie nakładają się z sygnałami od innych substancji (np. zanieczyszczeń czy produktów rozkładu). W tym celu wyznacza się czasy retencji t_R dla składników próbki w danych warunkach rozdzału chromatograficznego i dowodzi, że piki tych substancji nie interferują. Można także posłużyć się dodatkowo innymi technikami spektroskopowymi, np. widmami masowymi, IR, UV/VIS dla wyizolowanego składnika i porównać z widmami wzorca.

Co więcej, oprócz wymienionych parametrów, dla każdej metody analitycznej należy rozważyć także inne czynniki, które mogą powodować jej niedokładność/niepowtarzalność. W przypadku metod chromatograficznych należy zwrócić uwagę na:

- czystość rozpuszczalników, służących do przygotowywania analiz oraz fazy ruchomej,
- jakość odczynników, używanych np. do reakcji barwnych w procesie wywoływania chromatogramów (przy chromatografii cienkowarstwowej) lub derywatywacji substancji przed wykonaniem oznaczenia (przy chromatografii gazowej),
- temperaturę, wilgotność i ciśnienie atmosferyczne w laboratorium – które mogą mieć wpływ na czasy retencji.

2.8 Charakterystyka peryndoprylu

2.8.1 Właściwości peryndoprylu oraz rodzaje soli dostępnych w lecznictwie

Peryndopryl, należący do grupy I-ACE, pod względem budowy chemicznej jest zaliczany do związków zawierających grupę karboksylową. Jest estrowym prolekiem, szeroko stosowanym na całym świecie. [109-111] W lecznictwie najczęściej stosowane są dwie sole: *tert*-butyloaminy oraz argininian – **Tabela 2.2**.

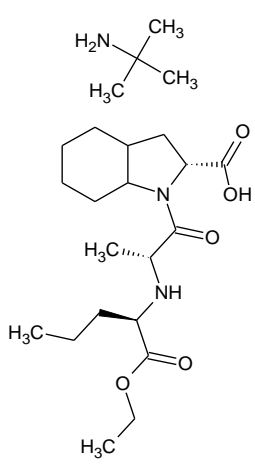
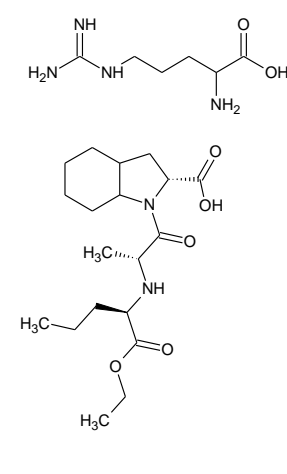
Nazwa chemiczna – kwas (2S,3aS,7aS) -1-[(2S)-1-2-{(2S)-1-etoksy-1-oksopentan-2-yl]amino]propanoilo}-2,3,3a,4,5,6,7,7a-oktahydroindolo-2-karboksylowy.

Masa molowa – 368,47 g/mol.

Wzór chemiczny – $C_{19}H_{32}N_2O_5$.

Rozpuszczalność: substancja łatwo rozpuszczalna w wodzie i etanolu (96%), dość trudno rozpuszczalna w chlorku metylenu.

Tabela 2.2 Charakterystyka soli peryndoprylu

Nazwa soli	Peryndopryl <i>tert</i> -butyloaminy	Peryndopryl argininianu
Synonimy	Peryndopryl erbuminy	-
Masa molowa soli	441,60 g/mol	528,64 g/mol
Wzór chemiczny	$C_{23}H_{43}N_2O_5$	$C_{24}H_{44}N_6O_7$
Wzór strukturalny		

2.8.2 Farmakokinetyka

Peryndopryl bardzo dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego. Jako prolek ulega biotransformacji, w wyniku której ma miejsce hydroliza z otrzymaniem peryndoprylatu (ok. 16,8% podanej dawki). Pokarm nie wpływa na farmakokinetykę peryndoprylu, ale redukuje jego konwersję do formy aktywnej, dlatego lek należy spożywać przed posiłkami. [112, 113] Przekształcanie peryndoprylu do peryndoprylatu w skutek hydrolizy ma miejsce przede wszystkim w wątrobie, jednakże proces ten zachodzi również w osoczu oraz ścianach jelit. Po wchłonięciu peryndopryl podlega efektowi pierwszego przejścia tworząc również glukuronid peryndoprylu, który w dalszej kolejności jest hydrolizowany do glukuronidu peryndoprylatu. Związek ten, w porównaniu z peryndoprylatem, charakteryzuje się słabym

powinowactwem do ACE. Po podaniu doustnym znakowanego radioaktywnie peryndoprylu dawka zostaje w 75% wydalona z moczem w ciągu 96 godzin oraz w 25% z kałem. Peryndoprylat oraz glukuronid peryndoprylatu jest usuwany przez nerki. Peryndoprylat wiąże się z białkami osocza – głównie z enzymem konwertującym angiotensynę (ok. 20%), a objętość dystrybucji wolnego metabolitu wynosi 0,2 l/kg. [112 -114]

Na podstawie badań farmakokinetycznych średnia dostępność biologiczna peryndoprylu u młodych, zdrowych ochotników (wieku od 23 do 36 lat) wynosi od 65,6% do 95,15%, w zależności od metody użytej do badania. Współwystępowanie nadciśnienia tętniczego nie wpływa znacząco na jego farmakokinetykę. Związek ten jest szybko przekształcany do aktywnych i nieaktywnych metabolitów. W dawkach terapeutycznych zarówno peryndopryl, jak i peryndoprylat charakteryzują się farmakokinetyką liniową. [112] Peryndoprylat jest wydalany wraz z moczem, a jego biologiczny okres półtrwania sięga 17 h, a co za tym idzie, stężenie w stanie stacjonarnym jest ustalane w okresie 4 dni. Proces wydalania leku jest wolniejszy u osób w podeszłym wieku, a także w przypadku pacjentów z niewydolnością serca lub nerek. U chorych z marskością wątroby także dochodzi do zmian we właściwościach farmakokinetycznych – obserwowane jest zmniejszenie klirensu wątrobowego o 50%. Należy zaznaczyć, iż w takiej sytuacji nie jest konieczna modyfikacja dawkowania, gdyż ilość powstającego aktywnego metabolitu nie ulega zmianie względem ilości u osób zdrowych. [113, 114] Stężenie w stanie stacjonarnym wymagane do zahamowania 50% aktywności ACE (IC_{50}) wynosi 3,6 nmol/L. Maksymalna inhibicja aktywności ACE w stanie stacjonarnym następuje po 2 - 4 h od podania 2, 4 lub 8 mg peryndoprylu, a w osoczu utrzymuje się powyżej 70% w czasie 24 h od podania leku. Mechanizm ten nie jest zależny od wieku oraz przynależności do grupy etnicznej, natomiast znacząco wzrasta po wielokrotnym podaniu w porównaniu do pojedynczej dawki u pacjentów z ciężką niewydolnością nerek. W farmakoterapii nadciśnienia tętniczego peryndopryl skutecznie obniża ciśnienie skurczowe i rozkurczowe krwi oraz utrzymuje uzyskany efekt przez co najmniej 24 h. [114-116]

2.8.3 Dawkowanie

W terapii nadciśnienia tętniczego stosuje się preparaty zawierające peryndopryl w dawce od 4 do 10 mg. Początkowo jest zalecane podanie 4 - 5 mg leku, a po pierwszym miesiącu terapii, w miarę potrzeby, można zwiększyć ilość do 10 mg. W przypadku,

gdy pacjent choruje także na nadciśnienie naczyniowo-nerkowe, zaburzenia wodno-elektrolitowe lub ciężkie nadciśnienie tętnicze wówczas leczenie należy rozpoczynać w warunkach szczególnego nadzoru medycznego z obniżeniem początkowej dawki leku do 2,5 mg. Taką samą ilość substancji czynnej powinien zażywać pacjent stosujący jednocześnie leki moczopędne. Równocześnie wskazane jest zaprzestanie podawania leków zwiększających diurezę na okres 2-3 dni przed rozpoczęciem terapii peryndoprylem, a jeżeli nie jest to możliwe, wówczas należy monitorować czynność nerek oraz stężenie potasu we krwi. Do grupy o zwiększonym ryzyku nadmiernej reakcji zalicza się także chorych w podeszłym wieku, z ciężką niewydolnością serca lub nerek, a także osoby stosujące równocześnie preparaty rozszerzające naczynia. U pacjentów z niewydolnością nerek podawana ilość leku jest ustalana na podstawie pomiarów klirensu kreatyniny. [114-116]

2.8.4 Bezpieczeństwo i tolerancja

Peryndopryl jest dobrze tolerowanym I-ACE. Najnowsze badania wskazują, że częstość występowania kaszlu wynosi 5%. Z terapii lekiem wycofało się 2% pacjentów i stanowi to najmniejszą wartość wśród badanych inhibitorów ACE. Obrzęk naczynioruchowy występuje w 0,1% przypadków. Inne możliwe działania niepożądane (> 1%) to niedociśnienie tętnicze, hiperkaliemia, zaburzenia czynności nerek, ból i zawroty głowy, zmęczenie oraz nudności. Przeciwwskazaniem do stosowania jest obecność jednostronnego bądź obustronnego zwężenia tętnic nerkowych oraz ciąża. [110, 113-116]

2.9 Terapia skojarzona

U większości pacjentów cierpiących na nadciśnienie tętnicze i stosujących monoterapię, istnieje niskie prawdopodobieństwo osiągnięcia celów terapeutycznych. Preparaty dostępne na rynku pozwalają na obniżenie ciśnienia skurczowego maksymalnie o 20 mm Hg, a rozkurczowego o 10 mm Hg. Analizując, monoterapia daje pozytywne skutki w leczeniu jedynie łagodnego nadciśnienia. Badania kliniczne potwierdzają, iż u ok. 66% populacji chorych, aby utrzymać wartość ciśnienia rozkurczowego poniżej 90 mm Hg konieczna jest terapia skojarzona. Zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego u większości pacjentów wskazane jest stosowanie minimum dwóch leków o działaniu hipotensyjnym, a 20% chorych powinno przyjmować co najmniej trzy leki. Co więcej, zaleca się stosowanie preparatów złożonych będących połączeniem dwóch lub większej ilości leków

hipotensyjnych zawartych w jednej tabletkie, ze względu na łatwość stosowania i lepszą współpracę z pacjentem. [117-119]

2.9.1 Ogólne założenia i korzyści

Główną zaletą terapii skojarzonej jest poprawa kontroli ciśnienia tętniczego jak i tolerancji leczenia. Jest to możliwe do osiągnięcia przez zażywanie preparatów o działaniu addycyjnym bądź synergistycznym. [117] Addycyjny efekt hipotensyjny towarzyszący terapii kombinowanej powoduje 5-krotnie lepszą skuteczność w porównaniu do podwojonej dawki leku stosowanego w monoterapii. [118] Co więcej, obserwuje się silniejsze działanie hipotensyjne, przy jednoczesnym zmniejszeniu możliwości występowania działań niepożądanych. Dodatkowo, prawidłowo skojarzone leki hipotensyjne wpływają nefroprotekcynie oraz kardioprotekcynie. W porównaniu, przy stosowaniu monoterapii podwojenie stosowanej dawki nasila efekt terapeutyczny jedynie o 30%, zwiększając 2-krotnie ryzyko nasilenia działań niepożądanych. Rozpoczynanie leczenia nadciśnienia tętniczego od terapii skojarzonej skutkuje szybszym rezultatem. Zauważono również, że pacjenci stosujący kombinację leków rzadziej przerywają leczenie z powodu efektów ubocznych niż ci, którzy stosowali monoterapię. Zmniejszone ryzyko działań niepożądanych oraz czynników choroby wieńcowej korzystnie wpływają na analizę stosunku kosztów do skuteczności. Stosowanie preparatów złożonych redukuje dzienną liczbę przyjmowanych tabletek, co wpływa na komfort pacjentów i zwiększa efektywność leczenia, oraz jest uzasadnione z przyczyn ekonomicznych. [117]

2.9.2 Zasady łączenia leków

Jednoczesne stosowanie leków hipotensyjnych należących do różnych klas jest zalecane, jeżeli:

- mechanizmy ich działania są różne i uzupełniają się pomiędzy sobą,
- istnieje przewaga skuteczności leczenia skojarzonego w porównaniu z terapią poszczególnymi jego składnikami,
- następuje minimalizacja skutków ubocznych poszczególnych preparatów.

Do preferowanych, podstawowych połączeń lekowych w terapii nadciśnienia tętniczego należą:

- I-ACE + antagonisty wapnia,

- I-ACE + diuretyk,
- antagonist receptoru angiotensynowego + antagonist wapnia,
- antagonist receptoru angiotensynowego + diuretyk. [119]

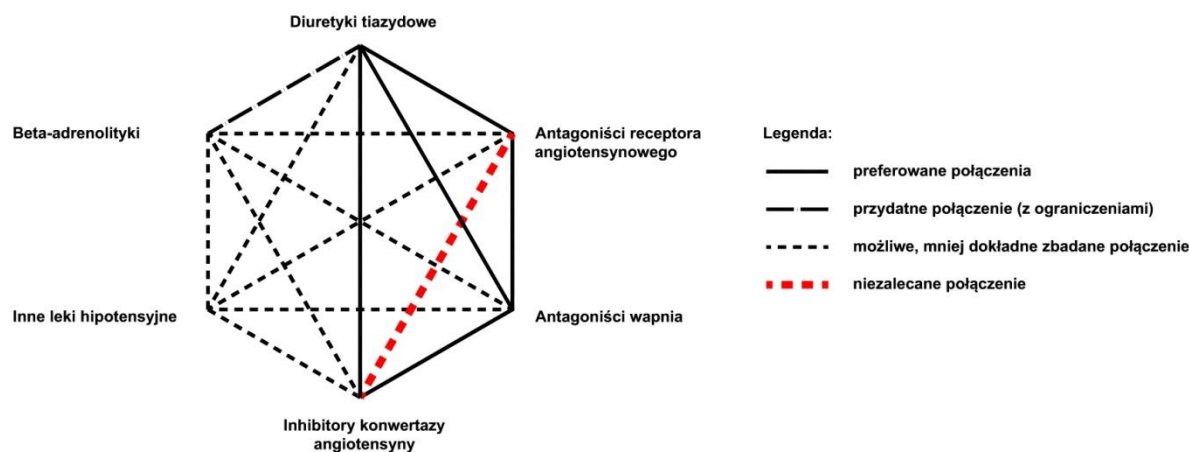
Do możliwych połączeń należą:

- β -adrenolityk + antagonist wapnia,
- diuretyk + antagonist wapnia.

Przeciwwskazane połączenia stanowią

- I-ACE + antagonist receptoru angiotensynowego,
- diuretyk + β -adrenolityk. [115]

Wymienione zależności zostały zobrazowane na **Rycinie 2.7**.



Ryc. 2.7 Preferowane łączenia leków hipotensyjnych w terapiach kombinowanych (opracowanie własne, źródło: Tykarski A., 2015 [114]).

2.9.3 Preparaty złożone

Zgodnie z wytycznymi, rekomendowane jest rozpoczynanie terapii nadciśnienia tętniczego połączeniem małych dawek leków. Idealny preparat, stanowiący połączenie dwóch różnych substancji o działaniu przeciwnadciśnieniowym, musi spełniać następujące wymagania:

- utrzymywać zdecydowanie lepszą kontrolę parametrów ciśnienia tętniczego niż każdy z wchodzących w skład preparatu lek stosowany w monoterapii,
- wywoływać mniej działań niepożądanych niż każda ze składowych preparatu stosowana w monoterapii,
- wpływać korzystnie na efekt metaboliczny,

- redukować zmiany narządowe,
- polepszać współpracę pacjenta z lekarzem,
- pod względem farmakokinetycznym oraz farmakodynamicznym substancje wchodzące w skład preparatu nie powinny kolidować ze sobą. [117, 121]

2.9.4 Połączenie I-ACE z diuretykiem

Liczne badania kliniczne dowodzą o znacznej skuteczności połączenia I-ACE z diuretykiem w terapii nadciśnienia, na skutek uzupełniania się mechanizmów działania. [116-118, 121] Diuretyk wpływa na zahamowanie reabsorpcji zwrotnej jonów chlorkowych i sodowych oraz pobudza diurezę. W efekcie, następuje spadek objętości wewnątrznaczyniowej, co obniża wartość ciśnienia tętniczego. Zmniejszenie oporu obwodowego jest efektem spadku wrażliwości ścian naczyń na wpływ endogennych substancji prowadzących do ich obkurczania. I-ACE zmniejszają ilość angiotensyny II poprzez hamowanie enzymu konwertującego, co prowadzi do rozszerzenia naczyń oporowych, spadku produkcji aldosteronu oraz endoteliny. I-ACE działają na śródbłonek i układ bradykininowy, zwiększając uwalnianie substancji o działaniu naczyniorozszerzającym i nasilają efekt hipotensyjny, prowadząc także do obniżenia oporu obwodowego bez zmian częstości rytmu serca oraz pojemności minutowej. Zmniejszone zostaje także uwalnianie wazopresyny i aktywność układu adrenergicznego. I-ACE niwelują mechanizmy kompensacyjne, które pojawiają się na skutek zażywania diuretyku tiazydowego. Ponadto, włączenie tej grupy do leczenia tiazydami zapobiega postępowi zaburzeń elektrolitowych oraz metabolicznych, przede wszystkim zwiększaniu hiperurykemi, hipokaliemii czy insulinooporności, które mogą towarzyszyć terapii diuretykami. [118]

W Polsce dostępne są następujące połączenia I-ACE i diuretyku [119]:

- peryndopryl i indapamid,
- ramipryl i hydrochlorotiazyd,
- lizynopryl i hydrochlorotiazyd,
- enalapryl i hydrochlorotiazyd,
- cilazapryl i hydrochlorotiazyd,

- chinapryl i hydrochlorotiazyd,
- benazepryl i hydrochlorotiazyd,
- zofenopryl i hydrochlorotiazyd.

2.9.5 Peryndopryl i hydrochlorotiazyd w preparatach złożonych

Rozpoczęcie terapii nadciśnienia tętniczego od kombinacji małymi dawkami I-ACE z lekiem moczopędnym uważa się za uzasadniony wybór. W obowiązujących wytycznych ugruntowaną pozycję, opartą o szereg badań klinicznych, posiada połączenie peryndoprylu i indapamidu. Oba leki wykazują synergizm działania hipotensyjnego, co więcej, metaboliczna neutralność indapamidu klasyfikuje połączenie jako optymalne. [120, 121] Pośród I-ACE, peryndopryl w preparatach złożonych zajmuje pierwszą pozycję. Jego długi okres działania zapewnia całodobową skuteczność, ponadto korzystne działanie plejotropowe u pacjentów z chorobami towarzyszącymi utwierdza go na pozycji lidera. [122, 123]

Hydrochlorotiazyd obecny w preparacie złożonym w dawce 12,5 mg lub 25 mg wykazuje większą skuteczność od monoterapii poszczególnymi składowymi. Badania kliniczne dowodzą, że stosowanie większych dawek związku, powyżej 50 mg na dobę, nie nasila efektu hipotensyjnego, a jedynie zwiększa skutki uboczne. Zmniejszanie dawki diuretyku tiazydowego skutkuje wzrostem tolerancji na lek i jednocześnie ogranicza szkodliwy wpływ na metabolizm.

Synergistyczne działanie peryndoprylu i hydrochlorotiazylu jest udowodnione badaniami klinicznymi. Skuteczność w obniżaniu ciśnienia jest spowodowana różnymi, a jednocześnie uzupełniającymi się mechanizmami. Przeprowadzając badanie na grupie pacjentów, wykazano, iż połączenie peryndoprylu w dawce 4 mg i hydrochlorotiazylu w dawce 12,5 mg jest bardzo skuteczne i dobrze tolerowane. Ponadto, w grupie stosującej kombinację wykazano większy spadek ciśnienia niż u pacjentów stosujących monoterapię, a parametry farmakokinetyczne nie wykazywały istotnych różnic u obu grup. W przypadku terapii kojarzonej chorzy zgłaszali niewielkie i niespecyficzne działania niepożądane, co istotne, nie występowały częściej w grupie otrzymującej jeden preparat. Nie zaobserwowano także istotnych różnic mas ciała chorych, czy zmian w parametrach laboratoryjnych. [122]

Na rynku polskim brak jest gotowego preparatu zawierającego jednocześnie peryndopryl oraz hydrochlorotiazyl. [124]

2.10 Metody analityczne oznaczania peryndoprylu

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Do oznaczania peryndoprylu w preparatach farmaceutycznych najszersze zastosowanie znalazła metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w odwróconym układzie faz. [125] Omawianą substancję czynną analizowano w preparatach złożonych w połączeniu z losartanem, amlodypiną oraz indapamidem, Metoda HPLC wykorzystywana jest również do oddzielenia i identyfikacji zanieczyszczeń soli peryndoprylu znajdujących się w preparatach farmaceutycznych, a także do odróżnienia analizowanej substancji aktywnej od produktów rozpadu, a także do oznaczania w osoczu. [124 -133] Fazę stacjonarną stanowiły najczęściej kolumny chromatograficzne C18 oraz rzadziej C8 lub C2, natomiast jako fazę ruchomą najczęściej używano mieszanin acetonitrylu i buforu fosforanowego (w zakresie pH od 2 do 3,6). Stosowano również dodatek kwasu heptano-sulfonowego, trietyloaminy, nadchloranu sodu, metanolu oraz kwasu nadchlorowego. [125]

Prawie we wszystkich publikacjach sugeruje się detekcję leku metodą spektrofotometrii UV. Przy oznaczaniu substancji w preparatach złożonych detekcji dokonuje się przy wspólnej długości fali oraz przy λ_{\max} fal dla każdej z analizowanych substancji. Bardzo rzadko używano również detektora z matrycą diodową (PDA) co umożliwiło zarejestrowanie całego widma dla oznaczanego związku. [134-136]

Chromatografia cienkowarstwowa

Peryndopryl można analizować także za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), co wykorzystano przy jego oznaczaniu w preparacie z amlodypiną oraz indapamidem. [137-138]

Metody spektrofotometryczne

Analizy peryndoprylu w preparatach farmaceutycznych dokonano również metodami optycznymi, gdzie wykorzystywano technikę spektrofotometrii klasycznej oraz metodę spektrofotometrii pochodnej. [139] Jedna z metod opierała się na tworzeniu ekstrahowalnego barwnego kompleksu leku z odczynnikiem *Indigo Carmine*, inna na reakcji grupy aminowej z 2,4-dinitrofluorobenzenem. [140, 141] Kolejne zaproponowane metody opierały się na tworzeniu trójskładnikowego kompleksu między cynkiem (II), eozyną i peryndoprylem,

który ekstrahowano chloroformem lub na reakcji leku z jodem w dichlorometanie, w wyniku czego powstaje barwny kompleks. [142]

Jest możliwe także oznaczanie peryndoprylu inną selektywną i czułą techniką jaką jest metodą spektrofluorometryczną. Lek oznacza się po reakcji z chlorkiem dansylu w środowisku alkalicznym, w wyniku której powstaje wysoce fluorescencyjna pochodna. Metoda jest uznawana za porównywalnie dokładną z HPLC. [143]

Chromatografia gazowa

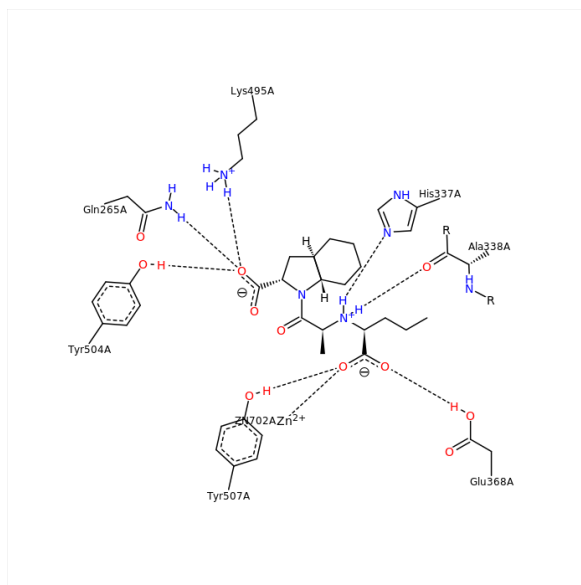
Użyta metoda polega na derywatywacji peryndoprylu bromkiem pentafluorobenzylu w acetonie, stosując węglan potasu jako zasadowy katalizator. Nie stwarzając drastycznych warunków, wysoce polarny i nietlotny peryndopryl może derywatywować do pochodnej oznaczalnej przy użyciu metody chromatografii gazowej. Metoda okazała się także skuteczna przy analizie peryndoprylu w tabletkach. [144]

2.11 Poszukiwanie nowych pochodnych I-ACE

Ze względu na fakt, iż leki z grupy I-ACE w toku badań nad ich stabilnością, okazały się być nietrwałe w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza [145-153], chemia medyczna ciągle poszukuje nowych związków o takim samym profilu farmakologicznym, lecz o zwiększonej trwałości. Szczególny nacisk kładzie się na modyfikacje takich miejsc w strukturze cząsteczki, które są odpowiedzialne za szybki rozkład leku:

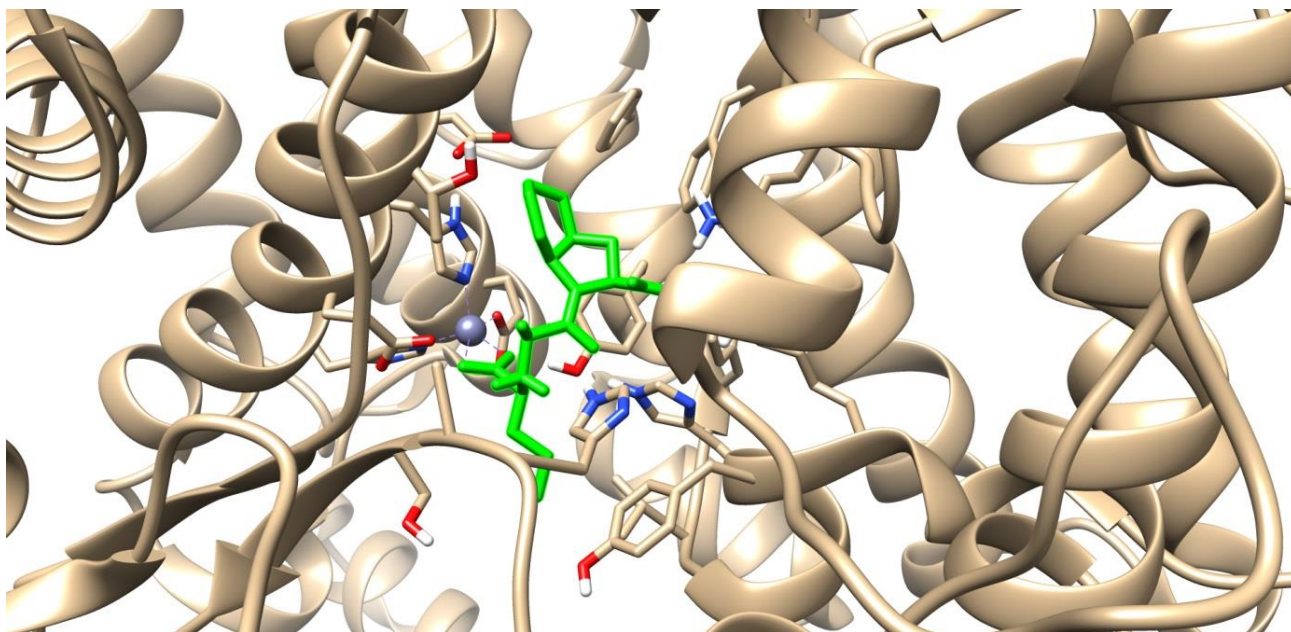
- ugrupowanie estrowe – niezwykle nietrwałe, prowadzące do hydrolizy,
- bezpośrednie położenia grupy amidowej i pierścienia – odpowiedzialne za wewnątrz cząsteczkową cyklizację.

Znając położenie centrów aktywnych I-ACE względem enzymu konwertującego angiotensynę (**Ryc. 2.8** i **2.9**), można dokonuje się prób rozwoju tej grupy leków, poprzez sprawdzenie, jakie modyfikacje mogą wpłynąć pozytywnie na właściwości fizkochemiczne cząsteczek, jednocześnie nie zmniejszając ich powinowactwa do enzymu. [152, 153]



Ryc. 2.8 Wizualizacja interakcji między peryndoprylatem a aminokwasami kieszeni enzymu.

[154, 155]



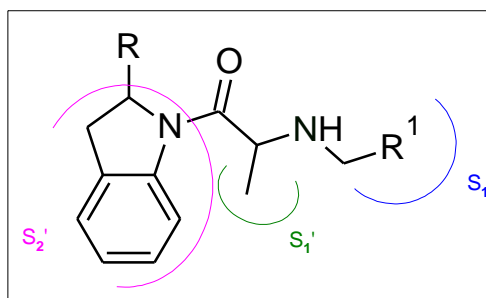
Ryc. 2.9 Położenie peryndoprylatu (kolor zielony) w obrębie kieszeni enzymu 2x94.pdb (plik pobrany z bazy Protein Data Bank). [156]

Inspirującymi badaniami były prace przeprowadzone zespół Gomez'a, w których wykazano, że ugrupowanie estrowe nie jest niezbędnym fragmentem, warunkującym działanie biologiczne, a co już może warunkować potencjalnie większą trwałość. [157]

Opierając się na powyższych badaniach, można wnioskować, iż najistotniejsze modyfikacje w cząsteczce I-ACE powinny dotyczyć:

- obszarów S_1 , S_1' , S_2' ,
- eliminacji grupy estrowej,
- eliminacji grupy karboksylowej w pierścieniu indoliny.

Można przypuszczać, iż takie modyfikacje w budowie cząsteczki (**Ryc. 2.10**) nie tylko wpłyną korzystnie na jej chemiczną trwałość, ale także dadzą możliwość wprowadzenia interesującego układu podstawników, który może zwiększać jej potencjał jako *zmiatacza wolnych rodników*.

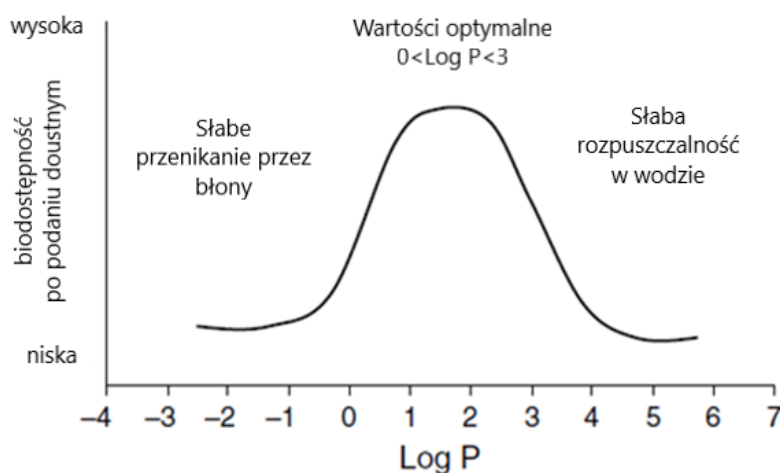


Ryc. 2.10 Struktura cząsteczki projektowanych I-ACE z zaznaczonymi miejscami modyfikacji (opracowanie własne, źródło: Gomez A., 2015).

2.12 Wyznaczenie wartości *LogP*

Jednym z najważniejszych parametrów stosowanym w zakresie przewidywania aktywności biologicznej danej substancji, a także jej toksyczności, jest lipofilowość, która warunkuje rozpuszczalność oraz przenikanie cząsteczek przez błony biologiczne. Stanowi ona powinowactwo cząsteczek do fazy hydrofobowej oraz fazy hydrofilowej, co wynika z oddziaływań międzymolekularnych zachodzących pomiędzy cząsteczkami substancji rozpuszczonej a rozpuszczalnikiem. Lipofilowość jest jednym z parametrów wykorzystywanych w projektowaniu nowych substancji leczniczych oraz w ocenie aktywności farmaceutyków dostępnych na rynku. Najczęściej większa lipofilowość wiąże się ze zwiększoną przenikalnością, warunkującą aktywność biologiczną. Zbyt duża wartość tego

parametru także nie jest pożądana, gdyż powoduje zbyt duże powinowactwo do lipidów (mogące prowadzić do absorpcji przez błony) i hamuje przenikanie przez warstwy hydrofilowe. Odpowiednia wartość $LogP$ gwarantuje optymalne wartości i ułatwiony transport przez błony biologiczne (**Ryc. 2.11**). [168, 169]



Ryc. 2.11 Wykres obrazujący korelację między $LogP$ a rozpuszczalnością i przenikalnością przez błony biologiczne (opracowanie własne, źródło: Kujawski J., 2012).

Lipofilowość substancji leczniczych można wyznaczyć:

- metodą ekstrakcyjną w układzie oktanol – woda,
- metodą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz,
- metodą czyli wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz,
- metodami teoretycznymi z zastosowaniem odpowiednich programów obliczeniowych (np. *miLogP*, *ALOGPS*).

3. Cel badań

W niniejszej części pracy doktorskiej zaprezentowana zostanie szczegółowa analiza trwałości peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu:

- w postaci czystej substancji,
- w mieszaninie modelowej z hydrochlorotiazylem,
- w preparacie farmaceutycznym.

Przedstawiona zostanie również synteza nowych pochodnych I-ACE w celu określenia wpływu budowy na:

- trwałość,
- właściwości biologiczne,
- właściwości antyoksydacyjne.

Szczegółowe cele problemów badawczych dotyczyły:

I. Walidacji metod analitycznych do badań kinetycznych.

II. Oceny trwałości peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu *in pure* w warunkach:

- a. stałej, podwyższonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76,4\%$) oraz podwyższonej temperatury,
- b. stałej, obniżonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 0,0\%$) oraz podwyższonej temperatury,
- c. stałej, podwyższonej temperatury ($T = 333\text{ K}$) i podwyższonej wilgotności powietrza ($RH\ 50,9\% - 76,4\%$).

III. Oceny wpływu hydrochlorotiazidu na trwałość peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu w mieszaninach modelowych w warunkach stałej, podwyższonej temperatury ($T = 333\text{ K}$) i podwyższonej wilgotności powietrza ($RH\ 50,9\% - 76,4\%$).

IV. Oceny trwałości peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu w preparatach handlowych w warunkach stałej, podwyższonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76,4\%$) oraz podwyższonej temperatury.

- V. Oceny właściwości antyoksydacyjnych wybranych inhibitorów konwertazy angiotensyny.
- VI. Syntezę nowych pochodnych inhibitorów konwertazy angiotensyny, oraz ocenę ich właściwości:
- a. antyoksydacyjnych,
 - b. biologicznych, poprzez:
 - oszacowanie aktywności biologicznej związków wobec acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE),
 - przenikalności przez błony biologiczne - wyznaczenie wartości $LogP$,
 - oszacowanie zdolności inhibowania enzymu konwertującego angiotensynę – *in silico*.
 - c. fizykochemicznych, poprzez badanie trwałości w warunkach:
 - stałej, podwyższonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76,4\%$) oraz podwyższonej temperatury,
 - stałej, obniżonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 0,0\%$) oraz podwyższonej temperatury.

II. Część doświadczalna ETAP I

4. Badania trwałości peryndoprylu z tert-butyloaminą (PER_t) oraz argininianu peryndoprylu (PER_a)

4.1 Materiały do badań i odczynniki

Materiały

- peryndopryl *tert*-butyloaminy, Bachem, seria L-2780-004-020,
- peryndopryl argininy, Apotex Pharmachem India, serial PEPFA00912,
- tabletki Prestarium 5 mg i 10 mg, Les Laboratoires Servier, serie 333494 i 482569,
- tabletki Prenessa 4 mg i 8 mg, KRKA-POLSKA, serie P36182 i P32921,
- hydrochlorotiazyd, Sigma-Aldrich, seria XP2807,
- chlorowodorek oksymetazoliny, Sigma-Aldrich, seria FP6729

Odczynniki

- woda bidestylowana,
- kwas orto-fosforowy 95%, POCh S.A., Gliwice,
- diwodorofosforan (V) potasu (KH₂PO₄), POCh S.A., Gliwice,
- acetonitryl, jakość HPLC, Merck, Darmstadt, Niemcy,
- metanol, cz.d.a., POCh S.A. Gliwice,
- chlorek sodu, POCh S.A., Gliwice,
- bromek sodu, POCh S.A., Gliwice,
- azotan sodu, POCh S.A., Gliwice,
- bromek potasu, POCh S.A., Gliwice.

Aparatura

- spektrofotometr UV-VIS, Lambda 20, Perkin Elmer,
- wysokosprawny chromatograf cieczowy wyposażony w:
 - pompę LC-6A, Shimadzu,
 - detektor UV-VIS, SPO-6AV, Shimadzu,

- integrator c-RGA, Chromatopac, Shimadzu,
- dozownik z pętlą dozującą Rheodyne Berkeley, California 7125, USA,
- kolumnę LiChrospher ® 100 RP-18

Sprzęt pomocniczy

- komory cieplne KBC-125W, WAMED,
- mikrostrzykawka 100 µl, Hamilton,
- płuczka ultradźwiękowa,
- waga analityczna Satorius Extend ED 124S, Satorius,
- sączek szklany ze szkła spiekanego o średnicy porów 0,22 µm, Millipore,
- sączki ilościowe twarde 390, Munktell,
- laboratoryjny sprzęt szklany (kolbki, pipety, naczynka wagowe),
- aparat kwarcowy do podwójnej destylacji wody Haraeus, Niemcy.

4.2 Metoda analityczna do oznaczania peryndoprylu z tert-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu

Analizę kinetyki rozkładu peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu w fazie stałej przeprowadzono metodą RP-HPLC z detekcją UV stosując następujące parametry rozdzału:

- faza stacjonarna: kolumna chromatograficzna LiChrospher ® 100 RP-18 (5 µm), o wymiarach 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt),
- faza ruchoma: acetonitryl – bufor fosforanowy pH 2,0 (70 : 30 v/v),
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,2 ml/min,
- długość fali detektora: 215 nm,
- temperatura badań: niekontrolowana,
- wzorzec wewnętrzny: metanolowy roztwór chlorowodoru oksymetazolinu 0,025 mg/ml,
- objętość nastrzyku: 20 µl.

4.3 Procedury

Procedura 1. Przygotowanie buforu fosforanowego o pH 2,0

Odważano 0,0681g diwodorofosforanu potasu, rozpuszczano w około 400 ml wody destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Roztwór doprowadzano do pH 2,0 85% kwasem orto-fosforowym i uzupełniano wodą destylowaną do kreski.

Procedura 2. Przygotowanie fazy ruchomej

Odmierzano odpowiednie objętości acetonitrylu oraz buforu fosforanowego o pH 2,0, tak aby zachować stosunek objętościowy 70:30 v/v. Następnie zmieszaną fazę ruchomą, przesączano przez sącze ze szkła spiekane o wielkości porów 0,45 μm , umieszczano w łaźni ultradźwiękowej na 20 minut w celu odgazowania.

Procedura 3. Przygotowanie roztworu peryndoprylu z tert-butyloaminą / argininianu peryndoprylu o stężeniu 0,4 mg/ml – roztwór porównawczy

Odważano 10,0 mg badanej substancji do kolby miarowej pojemności 25 ml. Dodawano około 20 ml metanolu, mieszano do rozpuszczenia substancji, uzupełniano tym samym rozpuszczalnikiem do kreski i zmieszano (roztwór A).

Procedura 4. Przygotowanie próbek peryndoprylu z tert-butyloaminą / argininianu peryndoprylu do analizy kinetycznej

Do szklanych fiolek o pojemności 5 ml odważano po 10,0 mg badanej substancji, które ogrzewano w komorach cieplnych, w wybranych warunkach stosowanych w badaniach kinetycznych. W określonych odstępach czasu próbki wyjmowano z komory cieplnej i po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, przenoszono ilościowo do kolb miarowych o pojemności 25 ml. Substancje rozpuszczano w metanolu i uzupełniano tym samym rozpuszczalnikiem do 25,0 ml (roztwór B).

Procedura 5 Przygotowanie roztworu chlorowodorku oksymetazoliny o stężeniu 0,025 mg/ml-wzorzec wewnętrzny

Odważano 10,0 mg chlorowodorku oksymetazoliny do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuszczano w 10 ml metanolu i uzupełniano rozpuszczalnikiem do kreski. Pobierano 25,0 ml tego roztworu, przenoszono i uzupełniano metanolem do 100 ml (roztwór wzorca wewnętrznego - W_w).

Wykonanie oznaczenia:

Do 1,0 ml roztworu A i B dodawano po 1,0 ml roztworu W_w , otrzymując roztwory A_1 i B_1 . Roztwory A_1 i B_1 nanoszono na kolumnę chromatograficzną (20 μ l) i otrzymywano chromatogramy.

Procedura 6. Przygotowanie roztworów peryndoprylu z tert-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu w zakresie stężeń 0,004% do 0,040%

Do kolby miarowej pojemności 50 ml odważano dokładnie 20,0 mg badanej substancji. Dodawano 30 ml metanolu mieszano do rozpuszczenia, uzupełniano tym samym rozpuszczalnikiem do kreski (roztwór podstawowy). Pobierano 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 ml roztworu podstawowego, przenoszono do kolb miarowych o pojemności 10 ml i uzupełniano metanolem do kreski, otrzymując roztwory L_i .

Wykonanie oznaczenia:

Do 1,0 ml roztworów L_i dodawano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego (sporządzonego wg *Procedury 5*). Nanoszono 20 μ l na kolumnę chromatograficzną i wykreślano chromatogramy.

Procedura 7. Precyzja i dokładność

Precyzję metody RP-HPLC określano na podstawie obliczonej wartości W_z , a dokładność wyznaczano na podstawie odzysku [%]. Parametry wyznaczone zostały zgodnie z poniższym postępowaniem, stosując wzory zamieszczone w **Rodziale 2.7**. Roztwory porównawcze sporządzano zgodnie z *Procedurą 3*. Dla każdego stężenia przygotowano 6 prób mieszając 1,0 ml odpowiedniego roztworu z 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego.

Analizę RP-HPLC dla każdej próby przeprowadzano w przedziale czasowym trzech kolejnych dni, powtarzając każdy pomiar trzykrotnie. Wartość stężenia PER_t i PER_a oznaczonego oraz odzysku obliczono ze wzoru:

$$c [\%] = \frac{P_{Per}/P_{oks}}{P_{PERwz}} \cdot Wz [\%] \cdot \frac{V}{100} \cdot \frac{M}{m} \cdot \frac{100}{z}$$

gdzie P_{Per} - pole powierzchni pików chromatogramu odpowiednio roztworu badanego PER_t lub PER_a , roztworu wzorcowego (P_{PERwz}) oraz wzorca wewnętrznego (*oks*), Wz [%] - stężenie roztworu wzorcowego P_{PERtwz} lub P_{PERawz} , V - współczynnik rozcieńczenia, m - odważka, z - wartość rzeczywista.

Przygotowano roztwory PER_t oraz PER_a w metanolu o stężeniach 0,004% oraz 0,040%. Dla każdego stężenia przygotowano 6 prób i każdą serię oznaczano w trzech kolejnych dniach, powtarzając każdy pomiar trzykrotnie.

Procedura 8. Badania kinetyczne PER_t i PER_a

Do fiolek szklanych o pojemności 5 ml odważano po 10,0 mg PER_t lub PER_a i umieszczano w łaźni piaskowej (dla warunków obniżonej wilgotności względnej powietrza $RH = 0\%$) lub ekcykatorach, gdzie warunki odpowiedniej wilgotności względnej uzyskano stosując nasycone roztwory odpowiednich soli nieorganicznych (NaBr – 50,9%, $NaNO_3$ – 66,5%, NaCl – 76,4%). Łaźnie piaskowe i ekcykatory umieszczano w komorach cieplnych o temperaturze: 333K, 343K, 353 K, 363 K, 373 K oraz 383 K. W określonych odstępach czasu wyjmowano fiołki z komory cieplnej. Ochładzano próbki do temperatury pokojowej, rozpuszczano w 25,0 ml metanolu (roztwór B_i).

Do 1,0 ml roztworu B_i dodawano 1,0 ml roztworu W_w , zmieszano - roztwory P_i . Na kolumnę chromatograficzną наносono po 20 μ l analizowanych roztworów P_i i rejestrowano chromatogramy.

Procedura 9. Przygotowywanie mieszanin modelowych z hydrochlorotiazdem (HTH)

Mieszanina modelowa peryndopryl tert-butyloaminy - hydrochlorotiazd – (MM I)

Mieszaninę modelową PER_t i HTH przygotowano przez homogenzację obu składników w moździerzu przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Ze względu na stosowanie w leczeniu preparatów z PER_t w dawce 4 mg lub 8 mg, natomiast preparatów z HTH w dawce 12,5 mg lub 25 mg, substancje łączono w stosunku 8:12,5 (w/w).

Mieszanina modelowa peryndopryl argininy - hydrochlorotiazyd - MM II

Mieszaninę modelową PER_a i HTH przygotowano przez homogenizację obu składników w moździerz przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Ze względu na stosowanie w leczeniu preparatów z PER_a w dawce 5 mg lub 10 mg, natomiast preparatów z HTH w dawce 12,5 mg lub 25 mg, substancje łączono w stosunku 10:12,5 (w/w).

Procedura 10. *Oznaczanie mieszanin modelowych MM I oraz MM II*

Do fiolek odważono 15,0 mg MM I oraz MM II. Odważone próbki wstawiano do eksykatorów umieszczonych w komorze cieplnej $T = 333$ K. Warunki odpowiedniej wilgotności względnej w eksykatorach uzyskiwano stosując nasycone roztwory odpowiednich soli nieorganicznych (NaBr – 50,9%, NaNO₃ – 66,5%, NaCl – 76,4%). Po określonym czasie próbki wyjmowano, po ochłodzeniu do temperatury pokojowej rozpuszczano w 25,0 ml metanolu. Do 1,0 ml tak przygotowanego roztworu dodawano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, otrzymując roztwory M_i. Na kolumnę chromatograficzną наносono 20 µl roztworów M_i i rejestrowano chromatogramy.

Procedura 11. *Przygotowanie tabletek z PER_t i PER_a do badań kinetycznych*

- określenie średniej masy tabletki

Zważono pojedynczo dokładnie 30 tabletek preparatów: Prestarium 5 mg i 10 mg (substancja czynna PER_t) oraz Prenessa 4 mg i 8 mg (substancja czynna PER_a) i obliczono średnie masy tabletek,

- analiza zawartości tabletek

Tabletkę Prenessa w dawce PER_t 4 mg lub Prestarium w dawce PER_a 5 mg, umieszczono w kolbce miarowej o pojemności 50 ml i dodano 1,0 ml wody. Po rozpadzie tabletki dodano 24,0 ml metanolu. Zawartość wytrząsano przez 15 minut, przesączano przez podwójny sączek bibułowy. Do 1,0 ml tak przygotowanego roztworu dodano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, otrzymując roztwory T_i. Na kolumnę chromatograficzną наносono 20 µl roztworu T_i i rejestrowano chromatogramy. Zawartość PER_t i PER_a obliczono dla kolejnych 10 prób.

- Badania kinetyczne tabletek z PER_t

Tabletki A – tabletki Prenessa 4 mg

Przełożone tabletki Prenessa w dawce PER_t 4 mg, umieszczano we fiolkach o pojemności 5 ml i wstawiano do komory cieplnej o wybranej temperaturze. Po określonym czasie fiołki wyjmowano, przełożone tabletki ważono, umieszczano w kolbach miarowych o pojemności 50 ml i dodawano do każdej 1,0 ml wody. Po rozpadzie przełożonych tabletek dodawano 24,0 ml metanolu. Zawartość wytrząsano przez 15 minut, przesączano przez podwójny sącdek bibułowy. Do 1,0 ml tak przygotowanego roztworu badanego dodano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, otrzymując roztwory TA_i . Na kolumnę chromatograficzną наносono 20 μ l roztworu TA_i i rejestrowano chromatogramy.

Tabletki B – Prenessa 8 mg

Tabletki Prenessa w dawce PER_t 8 mg, umieszczono we fiolkach o pojemności 5 ml i wstawiano do komory cieplnej o wybranej temperaturze. Po określonym czasie fiołki wyjmowano, następnie tabletki umieszczono w kolbach miarowych o pojemności 50 ml i dodawano 1,0 ml wody. Po rozpadzie tabletek dodawano 24,0 ml metanolu. Zawartość wytrząsano przez 15 minut, przesączano przez podwójny sącdek bibułowy. Do 1,0 ml tak przygotowanego roztworu oraz roztworu wzorca wewnętrznego, otrzymując roztwory TB_i . Na kolumnę chromatograficzną наносono 20 μ l roztworu TB_i i rejestrowano chromatogramy.

- Badania kinetyczne tabletek z PER_a

Tabletki C – Prestarium 5 mg

Przełożone tabletki Prestarium w dawce PER_a 5 mg, umieszczano we fiolkach o pojemności 5 ml i wstawiano do komory cieplnej o wybranej temperaturze. Po określonym czasie fiołki wyjmowano, przełożone tabletki ważono, umieszczano w kolbach miarowych o pojemności 50 ml i dodawano 1,0 ml wody. Po rozpadzie przełożonych tabletek dodawano 24,0 ml metanolu. Zawartość wytrząsano przez 15 minut, przesączano przez podwójny sącdek bibułowy. Do 1,0 ml tak przygotowanego roztworu dodano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, otrzymując roztwory TC_i . Na kolumnę chromatograficzną наносono 20 μ l roztworu TC_i i rejestrowano chromatogramy.

Tabletki D – Prestarium 10 mg

Tabletki Prestarium w dawce PER_t 10 mg, umieszczano we fiolkach o pojemności 5 ml i wstawiano do komory cieplnej o wybranej temperaturze. Po określonym czasie fiolki wyjęto, następnie tabletki umieszczano w kolbach miarowych o pojemności 50 ml i dodawano do każdej 1,0 ml wody. Po rozpadzie tabletek dodawano 24,0 ml metanolu. Zawartość wytrząsano przez 15 minut, następnie, przesączano przez podwójny sączek bibułowy. Do 1,0 ml tak otrzymanego roztworu dodano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, otrzymując roztwory TD_i. Na kolumnę chromatograficzną nanoszono 20 µl roztworu TD_i i rejestrowano chromatogramy.

Procedura 12. Przygotowanie roztworu DPPH

Do kolby miarowej 100 ml odważono 19,71 mg DPPH, rozpuszczano w 30 ml alkoholu metylowego, uzupełniano do 100,0 ml tym samym rozpuszczalnikiem, otrzymując stężenie 0,5 mM. Otrzymany roztwór rozcieńczano tak, by jego absorbanca przy długości fali $\lambda = 517$ nm wynosiła około 1,23.

Procedura 13. Przygotowanie próbek do badania właściwości antyoksydacyjnych

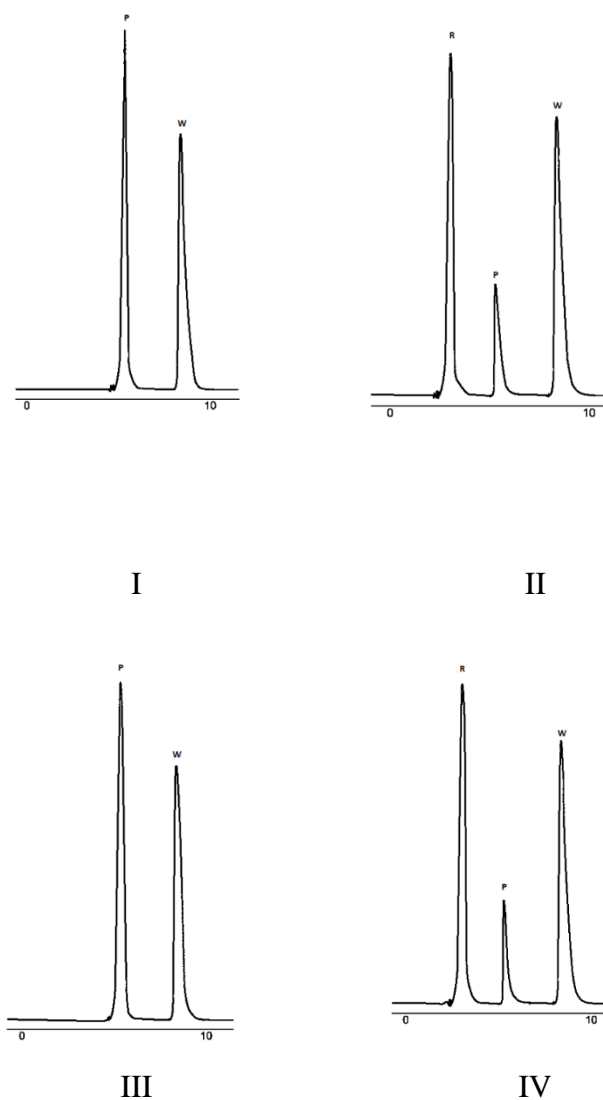
Odważano dokładnie po 50,0 mg cilazaprylu, imidaprylu, peryndoprylu, ramiprylu, chinaprylu oraz lizynoprylu, dodawano do każdego związku 1,5 ml roztworu DPPH. Mierzono absorbancję w temperaturze pokojowej po 1, 3, 6, 9, 12, 15 i 30 minutach oddziaływania wybranych substancji I-ACE z DPPH. Rejestrowano widma absorbancji w zakresie 420 - 600 nm stosując spektrofotometr UV-Vis Genesys 10 S (Thermo Scientific Company, Massachusetts, USA) z oprogramowaniem VISIONlite (Thermo Scientific Company, Massachusetts, USA) oraz Origin 2016 (OriginLab Company, Illinois, USA).

4.4 Wyniki

4.4.1 Rewalidacja metody RP-HPLC

Selektywność metody

Selektywność metody względem peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu potwierdzono analizując wykreślone chromatogramy. Roztwory do badań przygotowano wg *Procedur 3, 4, 5*. Chromatogramy przedstawia **Ryc. 4.1**.



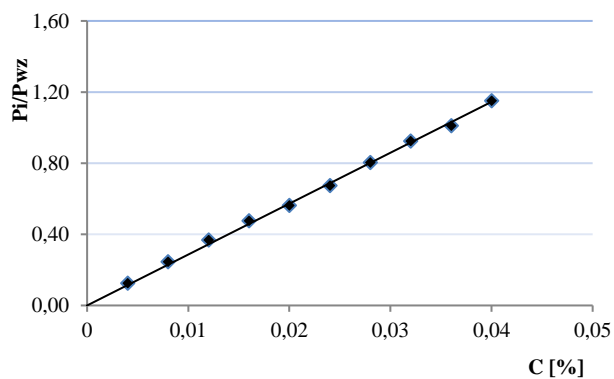
Ryc. 4.1 **I** - Chromatogram PER_i (P; t_R – 5,5 min), wzorca wewnętrznego (W; t_R – 9,5 min); **II** - Chromatogram PER_i (P; t_R – 5,5 min), produktu rozkładu (R; t_R – 3,5 min), wzorca wewnętrznego (W; t_R – 9,5 min); **III** - Chromatogram PER_a (P; t_R – 5,5 min), wzorca wewnętrznego (W; t_R – 9,5 min); **IV** - Chromatogram PER_a (P; t_R – 5,5 min), produktu rozkładu (R; t_R – 3,5 min), wzorca wewnętrznego (W; t_R – 9,5 min).

Liniowość metody analitycznej

Wyznaczono dwie krzywe wzorcowe w zakresie stężeń 0,004% do 0,040% dla metanолоwych roztworów peryndoprylu z PER_t oraz PER_a . wg *Procedury 6*. Wyniki wraz z oceną statystyczną zamieszczono w **Tabelach 4.1 i 4.2.** oraz na **Ryc. 4.2 i 4.3.**

Tabela 4.1 Wyniki oznaczenia roztworów peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów L_i [%]	P_i/P_{wz}
1.	1,0	0,004	0,125
2.	2,0	0,008	0,245
3.	3,0	0,012	0,368
4.	4,0	0,016	0,476
5.	5,0	0,020	0,563
6.	6,0	0,024	0,674
7.	7,0	0,028	0,804
8.	8,0	0,32	0,924
9.	9,0	0,036	1,011
10.	10,0	0,040	1,150



Ryc. 4.2 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz}=f(c[\%])$ peryndoprylu z *tert*-butyloaminą.

Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz}=f(c)$; $y = ax + b$: $a \pm \Delta a = 27,961 \pm 0,80$;

$b \pm \Delta b = 0,0186 \pm 0,019$; $S_y = 0,013$; $S_a = 0,348$; $S_b = 0,008$; $r = 0,999$

Ocena statystyczna równania prostej; $P_i/P_{wz}=f(c)$ $y = ax$: $a \pm \Delta a = 28,62 \pm 0,74$;

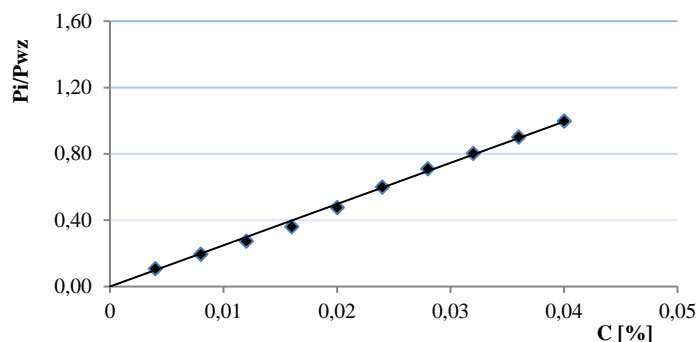
$S_a = 0,328$; $S_y = 0,012$; $r = 0,999$

LOD = 0,014; LOQ = 0,042

Wartość współczynnika b prostej $y = ax + b$ jest nieistotna, co wykazano testem t -Studenta; $\frac{b}{S_b} = 2,16$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{\alpha,f}(8) = 2,306$

Tabela 4.2 Wyniki oznaczenia roztworów argininianu peryndoprylu oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów L_i [%]	P_i/P_{wz}
1.	1,0	0,004	0,369
2.	2,0	0,008	0,647
3.	3,0	0,012	0,879
4.	4,0	0,016	1,179
5.	5,0	0,020	1,553
6.	6,0	0,024	1,902
7.	7,0	0,028	2,190
8.	8,0	0,32	2,468
9.	9,0	0,036	2,778
10.	10,0	0,040	3,148



Ryc. 4.3 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c[\%])$ argininianu peryndoprylu.

Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c)$; $y = ax + b$: $a \pm \Delta a = 77,660 \pm 2,73$;

$b \pm \Delta b = 0,0027 \pm 0,068$; $S_y = 0,0430$; $S_a = 1,184$; $S_b = 0,029$; $r = 0,999$

Ocena statystyczna równania prostej; $P_i/P_{wz} = f(c)$ $y = ax$: $a \pm \Delta a = 277,76 \pm 2,528, 62 \pm 0,74$;

$S_a = 1,117$; $S_y = 0,0405$; $r = 0,999$

LOD = 0,017; LOQ = 0,052

Wartość współczynnika b prostej $y = ax + b$ jest nieistotna, co wykazano testem t -Studenta; $\frac{b}{S_b} = 0,0938$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{\alpha,f}(8) = 2,306$

Precyzja i dokładność metody analitycznej

Przygotowano roztwory peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz argininianu peryndoprylu w metanolu o stężeniach 0,004% oraz 0,040%. Dla każdego stężenia przygotowano 6 prób. Do 1,0 ml roztworu peryndoprylu z *tert*-butyloaminą lub argininianu peryndoprylu, o odpowiednim stężeniu, dodano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego.

Każdą próbę oznaczano przez trzy kolejne dni, powtarzając każdy pomiar trzykrotnie. Precyzję i dokładność metody RP-HPLC określono na podstawie wyników 6 oznaczeń zawartości PER_t i PER_a w roztworach o trzech różnych stężeniach, przygotowanych zgodnie z *Procedurą 7*. Wyniki przedstawiono w **Tabelach 4.3 - 4.4**.

Tabela 4.3 Wyniki oznaczenia precyzji i stopnia odzysku metody HPLC dla PER_t (dokładność metody)

Dzień badania	Stężenie rzeczywiste w próbce badanej [%]	Stężenie oznaczone w próbce badanej [%]	Odzysk [%]	SD	W _z [%]
1	0,004	0,0040 ± 0,00003	99,25 ± 0,24	0,0062	1,55
	0,040	0,0402 ± 0,00004	100,35 ± 0,93	0,0799	1,99
2	0,004	0,0040 ± 0,00003	101,10 ± 0,14	0,0062	1,54
	0,040	0,0402 ± 0,00003	100,89 ± 0,52	0,0796	1,98
3	0,004	0,0040 ± 0,00001	99,59 ± 0,42	0,0062	1,56
	0,040	0,0401 ± 0,00003	100,26 ± 0,78	0,0802	2,00

Tabela 4.4 Wyniki oznaczenia precyzji i stopnia odzysku metody HPLC dla PER_a (dokładność metody)

Dzień badania	Stężenie rzeczywiste w próbce badanej [%]	Stężenie oznaczone w próbce badanej [%]	Odzysk [%]	SD	W _z [%]
1	0,004	0,0040 ± 0,00005	98,99 ± 0,94	0,0059	1,47
	0,040	0,0403 ± 0,00003	101,22 ± 0,25	0,0801	1,99
2	0,004	0,0040 ± 0,00002	101,11 ± 0,54	0,0060	1,49
	0,040	0,0401 ± 0,00002	100,19 ± 0,82	0,0795	1,98
3	0,004	0,0040 ± 0,00001	99,19 ± 0,72	0,0059	1,48
	0,040	0,0402 ± 0,00002	100,98 ± 0,68	0,0791	1,97

Podsumowanie

Po przeanalizowaniu powyższych danych stwierdzono, iż opracowana metoda RP-HPLC spełnia najważniejsze kryteria walidacji: selektywność, liniowość, precyzję, dokładność, co potwierdza wiarygodność uzyskanych wyników. Metoda mogła zostać zastosowana do dalszych badań.

4.4.2 Ocena trwałości peryndoprylu z *tert*-butyloaminą (PER_t) i argininianu peryndoprylu (PER_a)

Wpływ temperatury na trwałość PER_t i PER_a

Kinetyczny model obserwowanych reakcji rozkładu peryndoprylu z *tert*-butyloaminą i argininianu peryndoprylu w warunkach stałej wilgotności względnej powietrza i różnych temperaturach ustalono na podstawie modelowania matematycznego poprzez dobór odpowiedniego równania, które w wiarygodny sposób opisuje przebieg reakcji i umożliwia analizę parametrów kinetycznych. Analizując zmiany stężenia badanych substancji zachodzące w wybranych warunkach, uzyskano półlogarytmiczne zależności stężenia substratu (c[%]) od czasu $t_0 \rightarrow t_\infty$.

Badanie trwałości peryndoprylu z *tert*-butyloaminą

- **RH = 0%**

Analizując krzywe rozkładu peryndoprylu z *tert*-butyloaminą w warunkach testowych (RH=0%, T = 333 K - 363 K) ustalono, że rozkład związku zachodzi zgodnie z kinetycznym modelem reakcji pierwszego rzędu. Przy zależnościach prostoliniowych, gdzie rozkład zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu, stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

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

gdzie:

c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0

c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t

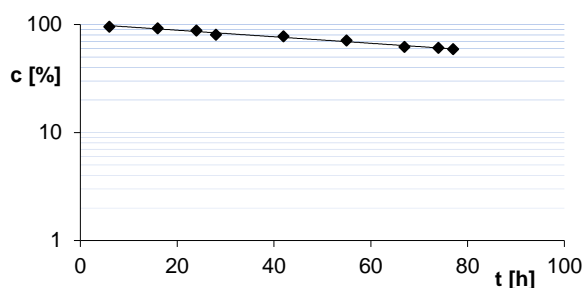
k – stała szybkości reakcji [s^{-1}]

t – czas [h]

Wyniki przedstawiono w **Tabelach 4.5 - 4.10** oraz na **Rycinach 4.4 - 4.9**.

Tabela 4.5 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

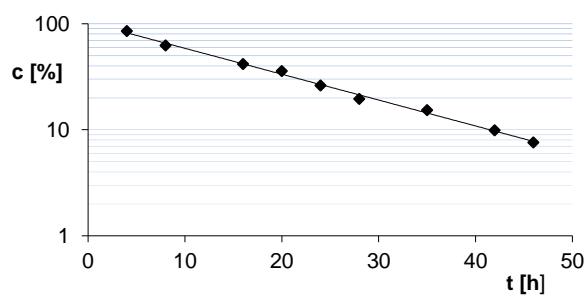
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	6	95,7	$a \pm \Delta a = -0,007 \pm 0,0007$ $b \pm \Delta b = 4,624 \pm 0,039$ $S_y = 0,024$ $S_a = 0,0003$ $S_b = 0,016$ $r = -0,992$
2	16	92,3	
3	24	87,9	
4	28	80,8	
5	42	78,1	
6	55	71,1	Parametry kinetyczne
7	67	62,3	$k \pm \Delta k = 1,93 \cdot 10^{-6} \pm 2,18 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 99,37 [h]$ $t_{0,1} = 15,11 [h]$
8	74	60,8	
9	77	59,1	



Ryc. 4.4 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 333 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 4.6 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 343 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	4	85,2	$a \pm \Delta a = -0,056 \pm 0,003$ $b \pm \Delta b = 4,633 \pm 0,091$ $S_y = 0,055$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,038$ $r = -0,997$
2	8	62,5	
3	16	41,6	
4	20	35,9	
5	24	26,1	
6	28	19,5	Parametry kinetyczne
7	35	15,3	$k \pm \Delta k = 1,56 \cdot 10^{-5} \pm 8,97 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 12,33 [h]$ $t_{0,1} = 1,87 [h]$
8	42	9,9	
9	46	7,6	



Ryc. 4.5 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 343 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 4.7 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 348 K przy $RH = 0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	2	69,8	$a \pm \Delta a = -0,178 \pm 0,018$ $b \pm \Delta b = 4,622 \pm 0,183$ $S_y = 0,098$ $S_a = 0,008$ $S_b = 0,077$ $r = -0,994$
2	4	58,1	
3	6	35,9	
4	8	21,5	
5	10	17,2	Parametry kinetyczne
6	14	9,4	$k \pm \Delta k = 4,95 \cdot 10^{-5} \pm 5,13 \cdot 10^{-6} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 3,89 [h]$ $t_{0,1} = 0,59 [h]$
7	16	5,8	

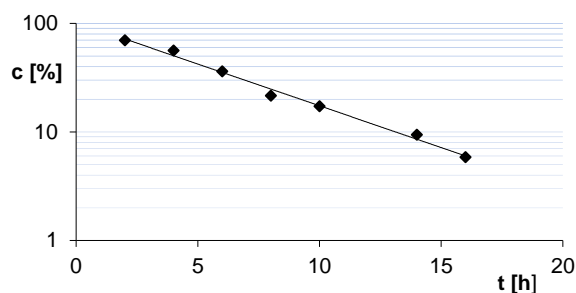
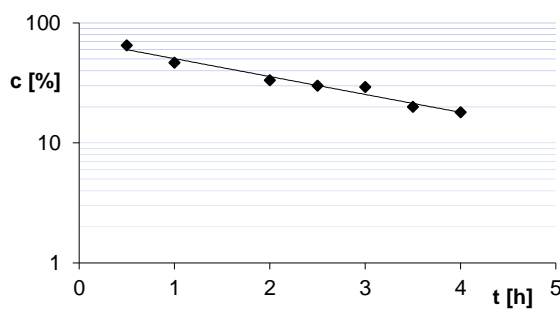
**Ryc. 4.6** Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 348 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 4.8 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 353 K przy $RH = 0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

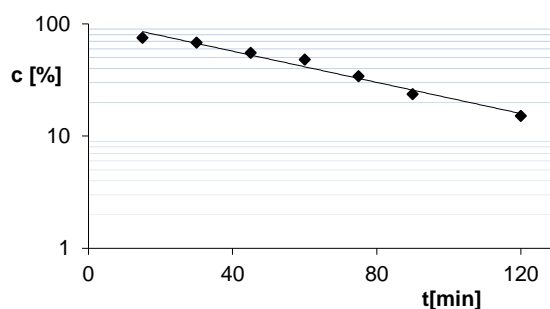
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	0,5	65,9	$a \pm \Delta a = -0,343 \pm 0,084$ $b \pm \Delta b = 4,270 \pm 0,214$ $S_y = 0,108$ $S_a = 0,030$ $S_b = 0,091$ $r = -0,976$
2	1	45,9	
3	2	33,2	
4	2,5	30,8	
5	3	30,1	Parametry kinetyczne
6	3,5	19,9	$k \pm \Delta k = 9,54 \cdot 10^{-5} \pm 2,03 \cdot 10^{-5} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 2,02 [h]$ $t_{0,1} = 0,31 [h]$
7	4	17,9	



Ryc. 4.7 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 353 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 4.9 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy $RH = 0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

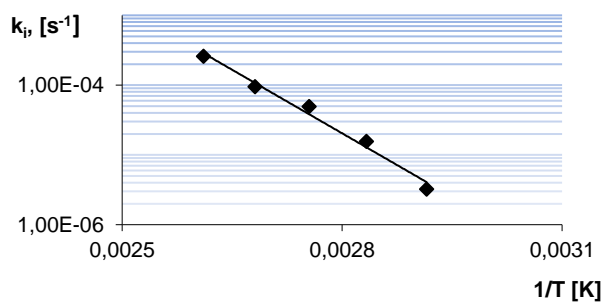
Lp.	t [min]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	15	75,1	$a \pm \Delta a = -0,016 \pm 0,002$ $b \pm \Delta b = 4,686 \pm 0,189$ $S_y = 0,100$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,079$ $r = -0,987$
2	30	68,1	
3	45	55,2	
4	60	48,0	
5	75	34,2	Parametry kinetyczne
6	90	23,8	$k \pm \Delta k = 2,60 \cdot 10^{-4} \pm 3,54 \cdot 10^{-5} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 44,3 [min]$ $t_{0,1} = 6,7 [min]$
7	120	15,1	



Ryc. 4.8 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_t w $T = 363$ K i $RH = 0\%$.

Tabela 4.10 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t w RH = 0%

Lp.	T [K]	1/T	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	333	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,93 \cdot 10^{-6} \pm 2,18 \cdot 10^{-7}$
2	343	$2,91 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,57 \cdot 10^{-5} \pm 8,97 \cdot 10^{-7}$
3	348	$2,87 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 4,95 \cdot 10^{-5} \pm 5,13 \cdot 10^{-6}$
4	353	$2,83 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 9,54 \cdot 10^{-5} \pm 2,03 \cdot 10^{-5}$
5	363	$2,75 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 2,60 \cdot 10^{-4} \pm 3,54 \cdot 10^{-5}$
Parametry równania $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a = -15363,55 \pm 4835,54$ $b \pm \Delta b = 32,05 \pm 13,35$ $S_y = 0,365$ $S_a = 19741,91$ $S_b = 4,809$ $r = -0,986$		$E_a = 127,74 \pm 40,20$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 125,26 \pm 42,68$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = 0,021 \pm 0,134$ [kJ/(K·mol)]	

**Ryc. 4.9** Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_t w RH = 0%.

- **RH = 76,4%**

Reakcja rozkładu PER_t w warunkach podwyższonej względnej wilgotności powietrza (RH = 76,4%) i temperaturze (333 K – 363 K) zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej.

Dla zależności wykładniczych, gdzie rozkład związku zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej, stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

$$\ln c_t / (c_0 - c_t) = c - k \cdot t$$

gdzie:

c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0 ,

c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t ,

c – wyrażenie odnoszące się do okresu indukcji,

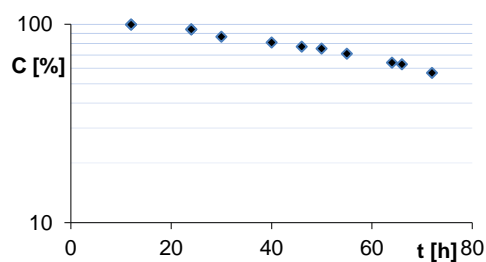
k – stała szybkości, [s^{-1}],

t – czas, [h].

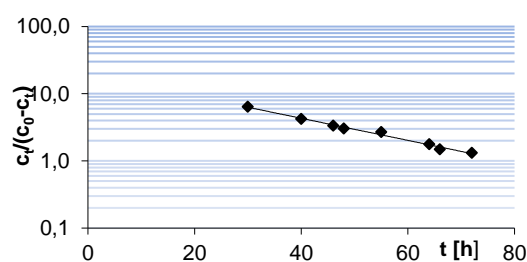
Wyniki badań zostały przedstawione w **Tabelach 4.11-4.16** oraz na **Rycinach 4.10-4.16**.

Tabela 4.11 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	12	99,4	*	$a \pm \Delta a = -0,038 \pm 0,004$ $b \pm \Delta b = 19,570 \pm 1,22$ $S_y = 0,059$ $S_a = 0,0015$ $S_b = 0,085$ $r = -0,995$
2	24	94,1	*	
3	30	86,5	6,40	
4	40	80,9	4,23	
5	46	77,1	3,37	
6	48	75,3	3,04	Parametry kinetyczne
7	55	73,0	2,70	$k \pm \Delta k = 1,05 \cdot 10^{-5} \pm 1,03 \cdot 10^{-6} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 78,62 [h]$ $t_{0,1} = 20,54 [h]$
8	64	63,9	1,77	
9	66	59,7	1,48	
10	72	56,9	1,32	



A

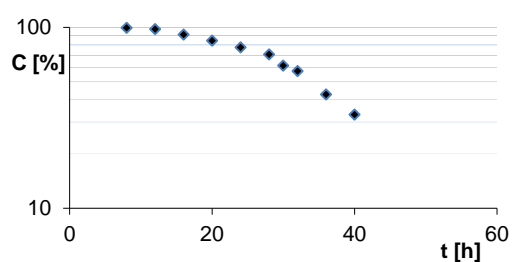


B

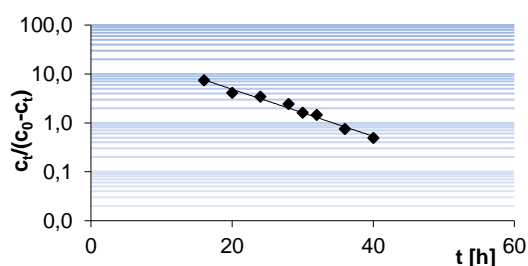
Ryc. 4.10 Rozkład PER_t w $T = 333 K$ i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t[h])$.

Tabela 4.12 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 343 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	8	100,0	*	$a \pm \Delta a = -0,110 \pm 0,015$ $b \pm \Delta b = 44,750 \pm 1,540$ $S_y = 0,134$ $S_a = 0,006$ $S_b = 0,185$ $r = -0,991$
2	12	97,6	*	
3	16	88,1	7,4	
4	20	80,3	4,07	
5	24	77,5	3,44	
6	28	70,7	2,41	
7	30	61,5	1,59	Parametry kinetyczne
8	32	59,3	1,45	$k \pm \Delta k = 3,10 \cdot 10^{-5} \pm 4,15 \cdot 10^{-6} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 34,92$ [h] $t_{0,1} = 14,47$ [h]
9	36	42,6	0,744	
10	40	32,9	0,49	



A

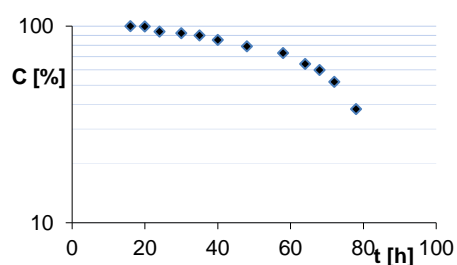


B

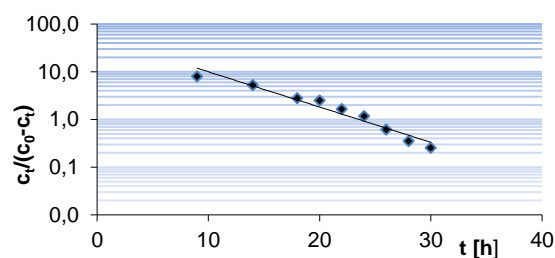
Ryc. 4.11 Rozkład PER_t w $T = 343$ K i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t[h])$.

Tabela 4.13 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 348 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	2	100,0	*	$a \pm \Delta a = -0,170 \pm 0,033$ $b \pm \Delta b = 54,71 \pm 2,09$ $S_y = 0,277$ $S_a = 0,014$ $S_b = 0,320$ $r = -0,975$
2	4	99,4	*	
3	6	98,6	*	
4	9	89,0	9,00	
5	14	84,2	4,05	
6	18	73,8	3,54	
7	20	72,6	2,57	Parametry kinetyczne
8	22	62,5	1,87	$k \pm \Delta k = 4,72 \cdot 10^{-5} \pm 9,26 \cdot 10^{-6} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 23,68$ [h] $t_{0,1} = 10,78$ [h]
9	24	54,3	1,88	
10	26	38,2	0,62	
11	28	26,1	0,35	
12	30	20,4	0,26	



A

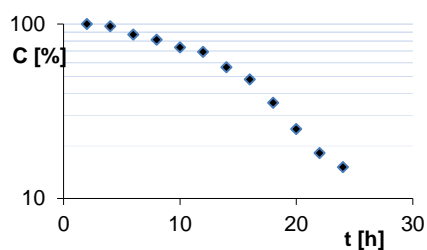


B

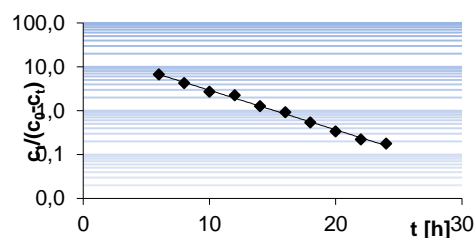
Ryc. 4.12 Rozkład PER_t w $T = 348$ K i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t[h])$.

Tabela 4.14 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 353 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	2	87,1	*	$a \pm \Delta a = -0,207 \pm 0,011$ $b \pm \Delta b = 23,301 \pm 1,304$ $S_y = 0,090$ $S_a = 0,005$ $S_b = 0,081$ $r = -0,997$
2	4	81,2	*	
3	6	87,1	6,69	
4	8	81,2	4,26	
5	10	73,3	2,70	
6	12	69,1	2,22	
7	14	56,4	1,28	
8	16	48,2	0,93	Parametry kinetyczne
9	18	35,4	0,54	$k \pm \Delta k = 5,76 \cdot 10^{-5} \pm 3,14 \cdot 10^{-6} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 15,16$ [h] $t_{0,1} = 4,58$ [h]
10	20	25,0	0,33	
11	22	18,2	0,22	
12	24	15,1	0,17	



A

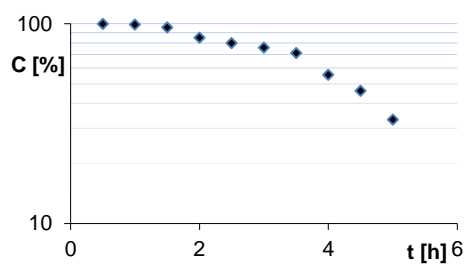


B

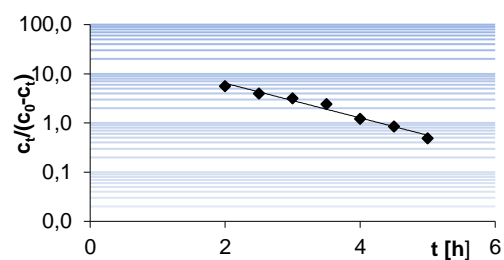
Ryc. 4.13 Rozkład PER_t w $T = 353K$ i $RH = 76,4\%$; A- półlogarytmiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t[h])$.

Tabela 4.15 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	0,5	100,0	*	$a \pm \Delta a = -0,812 \pm 0,14$ $b \pm \Delta b = 32,66 \pm 1,66$ $S_y = 0,151$ $S_a = 0,057$ $S_b = 0,207$ $r = -0,988$
2	1	99,2	*	
3	1,5	98,5	*	
4	2	85,2	5,66	
5	2,5	80,0	4,00	
6	3	76,1	3,16	Parametry kinetyczne
7	3,5	71,3	2,44	$k \pm \Delta k = 2,25 \cdot 10^{-4} \pm 3,88 \cdot 10^{-5} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 4,29$ [h] $t_{0,1} = 1,58$ [h]
8	4	55,5	1,22	
9	4,5	46,2	0,85	
10	5	33,1	0,49	



A

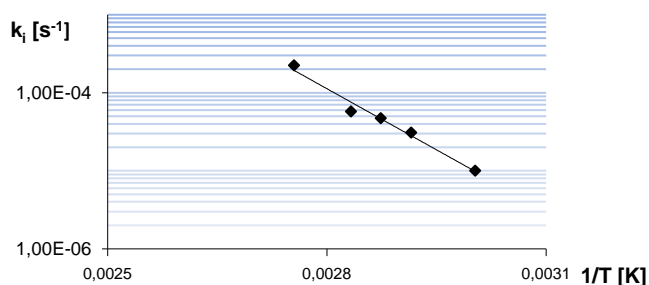


B

Ryc. 4.14 Rozkład PER_t w $T = 363K$ i $RH = 76,4\%$; A- półlogarymiczny wykres przedstawiający zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t[h])$.

Tabela 4.16 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t w RH = 76,4% w T = 333 K – 363 K

Lp.	T [K]	1/T	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	333	$3,00 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,005 \cdot 10^{-5} \pm 1,15 \cdot 10^{-5}$
2	343	$2,91 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 3,10 \cdot 10^{-5} \pm 4,15 \cdot 10^{-6}$
3	348	$2,87 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 4,72 \cdot 10^{-5} \pm 1,09 \cdot 10^{-5}$
4	353	$2,83 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 5,76 \cdot 10^{-5} \pm 23,13 \cdot 10^{-5}$
5	363	$2,75 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 2,25 \cdot 10^{-4} \pm 3,59 \cdot 10^{-4}$
Parametry równania $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a = -12001,05 \pm 2851,40$ $b \pm \Delta b = 24,51 \pm 8,20$ $S_y = 0,190$ $S_a = 1027,31$ $S_b = 2,97$ $r = -0,989$		$E_a = 99,78 \pm 23,70$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 97,30 \pm 26,18$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = 0,41 \pm 0,17$ [kJ/(K·mol)]	

**Ryc. 4.15** Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_t w RH = 76,4%.

Badanie trwałości argininianu peryndoprylu

- **RH = 0%**

Uzyskane krzywe rozkładu PER_aw warunkach testowych (RH = 0%, T = 353 K - 383 K) wykazały zależność prostoliniową. Przy zależnościach prostoliniowych, gdzie rozkład zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu, stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

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

gdzie:

c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0

c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t

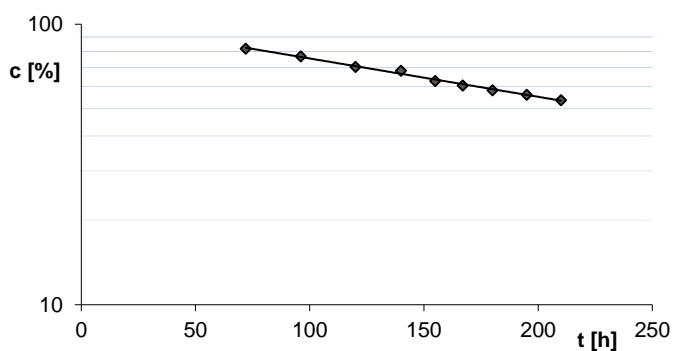
k – stała szybkości reakcji [s^{-1}]

t – czas [h]

Wyniki przedstawiono w **Tabelach 4.17- 4.26** oraz na **Rycinach 4.16- 4.26**.

Tabela 4.17 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 353 K przy $RH = 0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

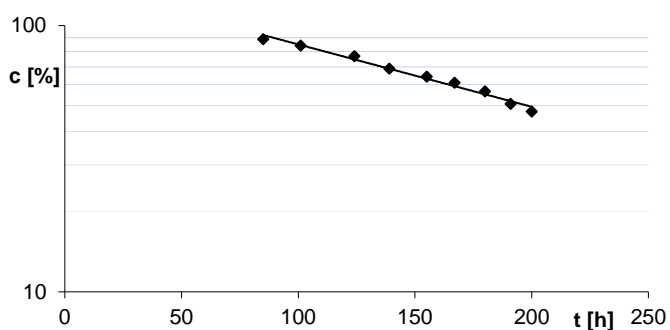
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	72	82,3	$a \pm \Delta a = -0,00361 \pm 0,00025$ $b \pm \Delta b = 4,624 \pm 0,037$ $S_y = 0,0255$ $S_a = 0,00012$ $S_b = 0,0224$ $r = -0,994$
2	96	76,8	
3	120	70,6	
4	140	68,4	
5	155	62,8	
6	167	60,6	Parametry kinetyczne
7	180	58,2	$k \pm \Delta k = 1,00 \cdot 10^{-6} \pm 7,04 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 191,53 [h]$ $t_{0,1} = 29,13 [h]$
8	195	56,1	
9	210	53,7	



Ryc. 4.16 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 353 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 4.18 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy $RH = 0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

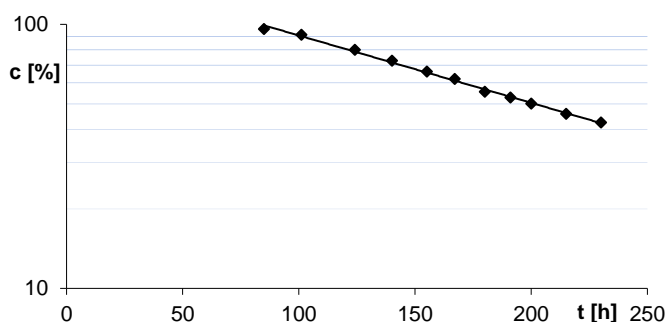
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	85	89,2	$a \pm \Delta a = -0,0529 \pm 0,0002$ $b \pm \Delta b = 4,96 \pm 0,049$ $S_y = 0,024$ $S_a = 0,00012$ $S_b = 0,023$ $r = -0,997$
2	101	84,3	
3	124	76,9	
4	139	68,9	
5	155	64,3	
6	167	61,1	Parametry kinetyczne
7	180	56,6	$k \pm \Delta k = 1,47 \cdot 10^{-6} \pm 7,27 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 130,83 [h]$ $t_{0,1} = 19,89 [h]$
8	191	50,8	
9	200	47,6	



Ryc. 4.17 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 363 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 4.19 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 373 K przy $RH = 0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

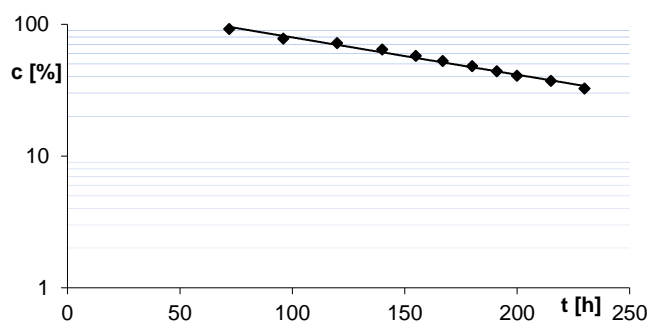
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	85	96,0	$a \pm \Delta a = -0,0060 \pm 0,0002$ $b \pm \Delta b = 166,32 \pm 1,04$ $S_y = 0,019$ $S_a = 0,0001$ $S_b = 0,018$ $r = -0,998$
2	101	91,3	
3	124	80,1	
4	140	72,9	
5	155	66,3	
6	167	62,1	Parametry kinetyczne
7	180	55,6	$k \pm \Delta k = 1,66 \cdot 10^{-6} \pm 5,79 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 115,49 [h]$ $t_{0,1} = 17,66 [h]$
8	191	52,8	
9	200	50,1	
10	215	45,8	
11	230	42,5	



Ryc. 4.18 Półlogarymiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 373 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 4.20 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 383 K przy $RH = 0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

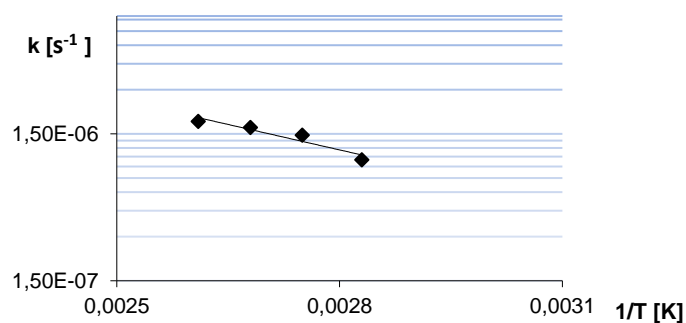
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	72	92,0	$a \pm \Delta a = -0,0065 \pm 0,0003$ $b \pm \Delta b = 5,03 \pm 0,06$ $S_y = 0,03$ $S_a = 0,0001$ $S_b = 0,027$ $r = -0,997$
2	96	78,1	
3	120	71,9	
4	140	64,3	
5	155	57,5	
6	167	52,6	Parametry kinetyczne
7	180	48,2	$k \pm \Delta k = 1,82 \cdot 10^{-6} \pm 8,8 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 105,45 [h]$ $t_{0,1} = 16,04 [h]$
8	191	44,1	
9	200	40,6	
10	215	37,2	
11	230	32,5	



Ryc. 4.19 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 383 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 4.21 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a w RH = 0%

Lp.	T [K]	1/T	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	353	$2,83 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,00 \cdot 10^{-6} \pm 7,04 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
2	363	$2,75 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,47 \cdot 10^{-6} \pm 7,27 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
3	373	$2,768 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,66 \cdot 10^{-6} \pm 5,79 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
4	383	$2,61 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,82 \cdot 10^{-6} \pm 8,8 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
Parametry równania $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a = -2656,4 \pm 1946,16$ $b \pm \Delta b = -6,224 \pm 5,29$ $S_y = 0,099$ $S_a = 611,615$ $S_b = 1,663$ $r = -0,951$		$E_a = 22,08 \pm 16,18$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 19,61 \pm 18,67$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = -0,19 \pm 0,20$ [kJ/(K·mol)]	

**Ryc. 4.20** Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_a w RH = 0%.

- **76,4%**

Uzyskane krzywe rozkładu PER_a w warunkach testowych ($RH = 76,4\%$, $T = 353\text{ K} - 383\text{ K}$) wykazały półlogarytmiczną zależność prostoliniową. Przy zależnościach prostoliniowych, gdzie rozkład zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu, stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

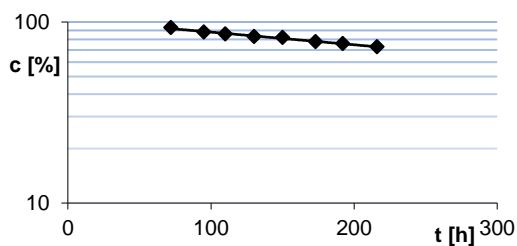
$$\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$$

gdzie: c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0 , c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t , k – stała szybkości reakcji [s^{-1}], t – czas [h]

Wyniki przedstawiono w **Tabelach 4.22 - 4.26** oraz na **Rycinach 4.21 - 4.25**.

Tabela 4.22 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

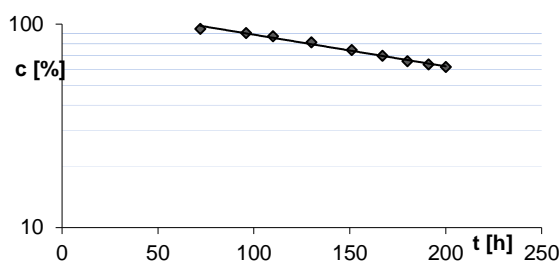
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	72	92,9	$a \pm \Delta a = -0,0016 \pm 0,0002$ $b \pm \Delta b = 4,63 \pm 0,025$ $S_y = 0,009$ $S_a = 7,17 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,011$ $r = -0,994$
2	95	88,2	
3	110	86,1	
4	130	82,9	
5	150	79,8	
6	173	78,1	Parametry kinetyczne
7	192	76,0	$k \pm \Delta k = 4,43 \cdot 10^{-7} \pm 4,71 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 434,37 [h]$ $t_{0,1} = 66,10 [h]$
8	216	73,1	



Ryc. 4.21 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 333 K$ i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.23 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 343 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

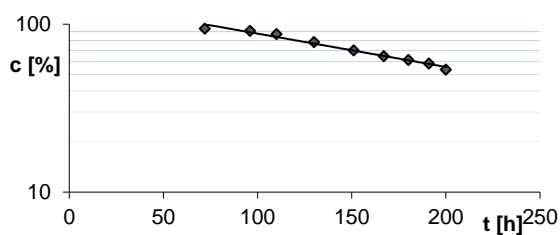
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	72	95,1	$a \pm \Delta a = -0,00356 \pm 0,00016$ $b \pm \Delta b = 4,84 \pm 0,03$ $S_y = 0,0165$ $S_a = 7,49 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0141$ $r = -0,997$
2	96	90,6	
3	110	87,4	
4	130	81,4	
5	151	74,8	
6	167	69,9	Parametry kinetyczne
7	180	65,8	$k \pm \Delta k = 9,91 \cdot 10^{-7} \pm 4,48 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 194,23 [h]$ $t_{0,1} = 29,54 [h]$
8	191	63,4	
9	200	61,7	



Ryc. 4.22 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 343 K$ i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.24 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 353 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

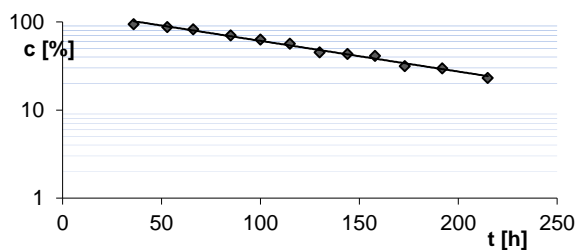
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	72	94,1	$a \pm \Delta a = -0,005 \pm 0,0002$ $b \pm \Delta b = 4,97 \pm 0,053$ $S_y = 0,028$ $S_a = 0,0001$ $S_b = 0,024$ $r = -0,996$
2	96	91,5	
3	110	87,4	
4	130	78,4	
5	151	69,8	
6	167	64,6	Parametry kinetyczne
7	180	61,2	$k \pm \Delta k = 1,35 \cdot 10^{-6} \pm 7,83 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 142,4 [h]$ $t_{0,1} = 21,6 [h]$
8	191	58,4	
9	200	53,7	



Ryc. 4.23 Półlogarymiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 353 K$ i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.25 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

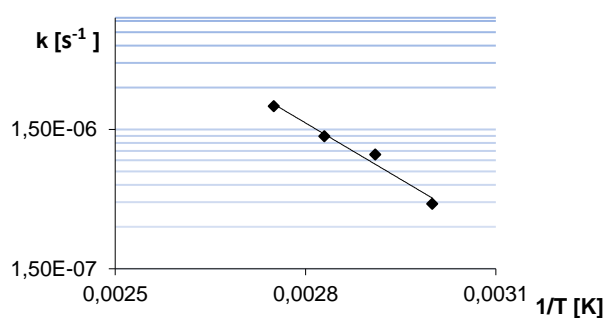
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	36	94,5	$a \pm \Delta a = -0,008 \pm 0,0004$ $b \pm \Delta b = 4,91 \pm 0,059$ $S_y = 0,044$ $S_a = 0,0001$ $S_b = 0,027$ $r = -0,997$
2	53	87,9	
3	66	82,4	
4	85	70,4	
5	100	63,5	
6	115	56,7	Parametry kinetyczne
7	130	45,3	$k \pm \Delta k = 2,22 \cdot 10^{-6} \pm 1,05 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 86,46 [h]$ $t_{0,1} = 13,15 [h]$
8	144	43,5	
9	158	41,4	
10	173	31,6	
11	192	29,8	
12	215	23,2	



Ryc. 4.24 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 363 K$ i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.26 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a w RH= 76,4%

Lp.	T [K]	1/T	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	333	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 4,43 \cdot 10^{-7} \pm 4,71 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
2	343	$2,91 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 9,91 \cdot 10^{-7} \pm 4,48 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
3	353	$2,83 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,35 \cdot 10^{-6} \pm 7,83 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
4	363	$2,75 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 2,22 \cdot 10^{-6} \pm 1,05 \cdot 10^{-7}$ [s ⁻¹]
Parametry równania $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a = -6204,81 \pm 2409,27$ $b \pm \Delta b = 4,09 \pm 6,93$ $S_y = 0,140$ $S_a = 757,15$ $S_b = 2,163$ $r = -0,985$		$E_a = 51,89 \pm 20,03$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 49,11 \pm 22,50$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = -0,21 \pm 0,18$ [kJ/(K·mol)]	



Ryc. 4.25 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_a w RH = 76,4%.

4.4.3 Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość PER_t oraz PER_a

- PER_t

Reakcja rozkładu PER_t w warunkach podwyższonej temperatury ($T = 333\text{ K}$) oraz względnej wilgotności powietrza (50,9% – 76,4%) zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej.

Dla zależności wykładniczych, gdzie rozkład związku zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej, stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

$$\ln c_t / (c_0 - c_t) = c - k \cdot t$$

gdzie:

c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0 ,

c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t ,

c – wyrażenie odnoszące się do okresu indukcji,

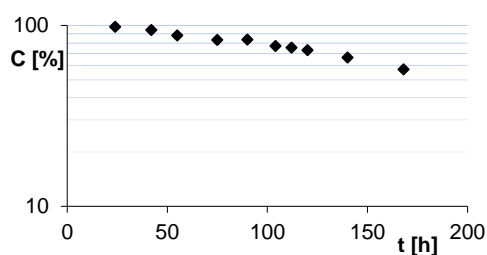
k – stała szybkości, [s^{-1}],

t – czas, [h].

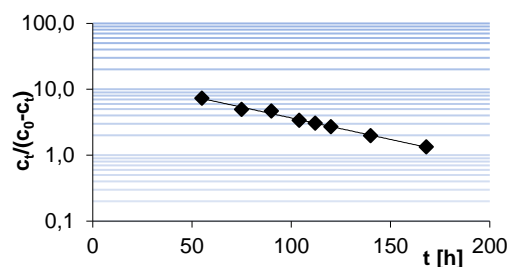
Wyniki badań zostały przedstawione w w **Tabelach 4.27- 4.29** oraz na **Rycinach 4.26- 4.28**.

Tabela 4.27 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 50,9% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	24	98,7	*	$a \pm \Delta a = -0,150 \pm 0,001$ $b \pm \Delta b = 2,81 \pm 0,22$ $S_y = 0,080$ $S_a = 0,0008$ $S_b = 0,095$ $r = -0,990$
2	45	96,2	*	
3	55	88,1	7,33	
4	75	83,3	4,98	
5	90	82,5	4,71	
6	104	77,2	3,38	
7	112	75,5	3,08	
8	120	73,0	2,70	Parametry kinetyczne
9	140	66,5	1,98	$k \pm \Delta k = 4,19 \cdot 10^{-6} \pm 3,54 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$
10	168	57,2	1,33	$t_{0,5} = 186,69 [h]$ $t_{0,1} = 40,56 [h]$



A

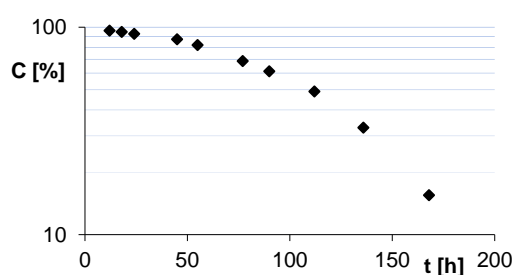


B

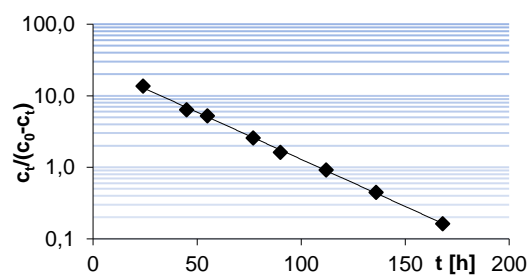
Ryc. 4.26 Rozkład PER_t w $T = 333 K$ i $RH = 50,9\%$; A- wykres przedstawiający półlogarytmiczną zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t[h])$.

Tabela 4.28 Zmiany stężenia PER_t w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 66,5% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	12	98,5	*	$a \pm \Delta a = -0,029 \pm 0,002$ $b \pm \Delta b = 3,22 \pm 0,24$ $S_y = 0,103$ $S_a = 0,0008$ $S_b = 0,080$ $r = -0,998$
2	18	96,2	*	
3	24	93,2	13,7	
4	45	87,5	7,00	
5	55	82,1	4,59	
6	77	68,8	2,20	
7	90	61,4	1,59	
8	112	49,1	0,96	Parametry kinetyczne
9	136	32,9	0,49	$k \pm \Delta k = 8,14 \cdot 10^{-6} \pm 5,30 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 109,25 [h]$ $t_{0,1} = 34,2 [h]$
10	168	15,5	0,183	



A



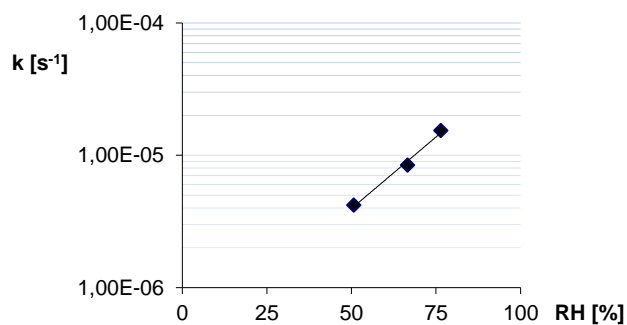
B

Ryc. 4.27 Rozkład PER_t w $T = 333 K$ i $RH = 66,5\%$; A- wykres przedstawiający półlogarytmiczną zależność $c(\%) = f(t[h])$; B – wykres przedstawiający zależność $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t[h])$.

Tabela 4.29 Parametry kinetyczne rozkładu PER_t w T = 333 K i zmiennych wartościach wilgotności względnej

Lp.	RH [%]	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	50,9	$k \pm \Delta k = 4,19 \cdot 10^{-6} \pm 5,5 \cdot 10^{-7}$
2	66,5	$k \pm \Delta k = 8,14 \cdot 10^{-6} \pm 3,66 \cdot 10^{-7}$
3	76,4*	$k \pm \Delta k = 1,05 \cdot 10^{-5} \pm 1,11 \cdot 10^{-6}$
Parametry równania $\ln k = f(\text{RH} [\%])$		
$a \pm \Delta a = 0,036 \pm 0,014$		
$b \pm \Delta b = - 14,189 \pm 1,21$		
$S_y = 0,079$		
$S_a = 0,004$		
$S_b = 0,280$		
$r = -0,993$		

*Szczegółowe wartości dla RH = 74,6% znajdują się na str. 68



Ryc. 4.28 Wykres zależności stałej rozpadu k [s⁻¹] od wilgotności względnej RH [%] dla PER_t.

- **PER_a**

Uzyskane krzywe rozkładu w warunkach podwyższonej temperatury ($T = 333 \text{ K}$) oraz względnej wilgotności powietrza ($RH = 50,9\% - 76,4\%$) wykazały zależność prostoliniową. Przy zależnościach prostoliniowych, gdzie rozkład zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu, stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

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

gdzie:

c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0 ,

c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t ,

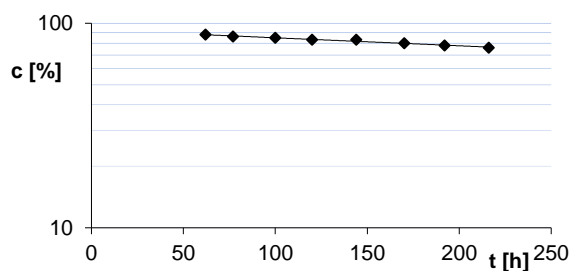
k – stała szybkości reakcji [s^{-1}],

t – czas [h].

Wyniki przedstawiono w **Tabelach 4.30- 4.32** oraz na **Rycinach 4.29- 4.31**.

Tabela 4.30 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 50,9% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

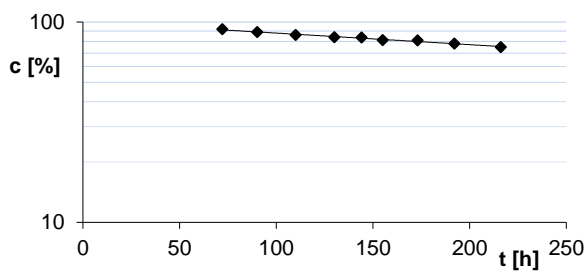
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	62	88,1	$a \pm \Delta a = -0,001 \pm 0,0001$ $b \pm \Delta b = 92,91 \pm 1,02$ $S_y = 0,008$ $S_a = 5,81 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,011$ $r = -0,989$
2	77	86,4	
3	100	84,9	
4	120	83,1	
5	144	82,9	
6	170	80,2	Parametry kinetyczne
7	192	78,0	$k \pm \Delta k = 2,49 \cdot 10^{-7} \pm 3,81 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 771,34 [h]$ $t_{0,1} = 117,1 [h]$
8	216	76,4	



Ryc. 4.29 Półlogarymiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 333$ K i $RH = 50,9\%$.

Tabela 4.31 Zmiany stężenia PER_a w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 66,5% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	72	92,2	$a \pm \Delta a = -0,013 \pm 0,0001$ $b \pm \Delta b = 4,611 \pm 0,022$ $S_y = 0,009$ $S_a = 6,69 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,010$ $r = -0,991$
2	90	88,9	
3	110	86,2	
4	130	84,1	
5	144	83,9	
6	155	81,2	
7	173	79,9	Parametry kinetyczne
8	192	78,1	$k \pm \Delta k = 3,69 \cdot 10^{-7} \pm 4,67 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 521,05 [h]$ $t_{0,1} = 79,25 [h]$
9	216	75,0	

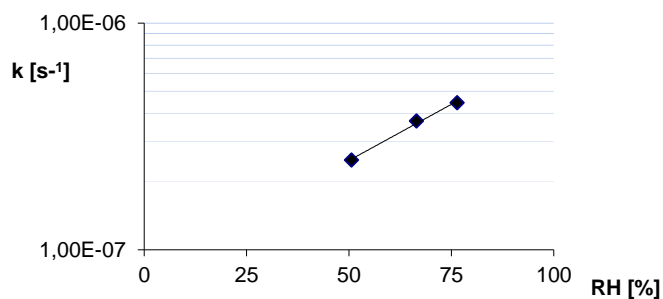


Ryc. 4.30 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu PER_a w $T = 333 K$ i $RH = 66,5\%$.

Tabela 4.32 Parametry kinetyczne dla reakcji rozkładu PER_a w T = 333 K i zmiennych wartościach wilgotności względnej

Lp.	RH [%]	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	50,9	$k \pm \Delta k = 2,49 \cdot 10^{-7} \pm 3,81 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
2	66,5	$k \pm \Delta k = 3,69 \cdot 10^{-7} \pm 4,67 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
3	76,4*	$k \pm \Delta k = 4,43 \cdot 10^{-7} \pm 4,71 \cdot 10^{-8}$ [s ⁻¹]
Parametry równania $\ln k = f(\text{RH} [\%])$		
$a \pm \Delta a = 0,023 \pm 0,007$ $b \pm \Delta b = -16,35 \pm 0,442$ $S_y = 0,029$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,102$ $r = -0,997$		

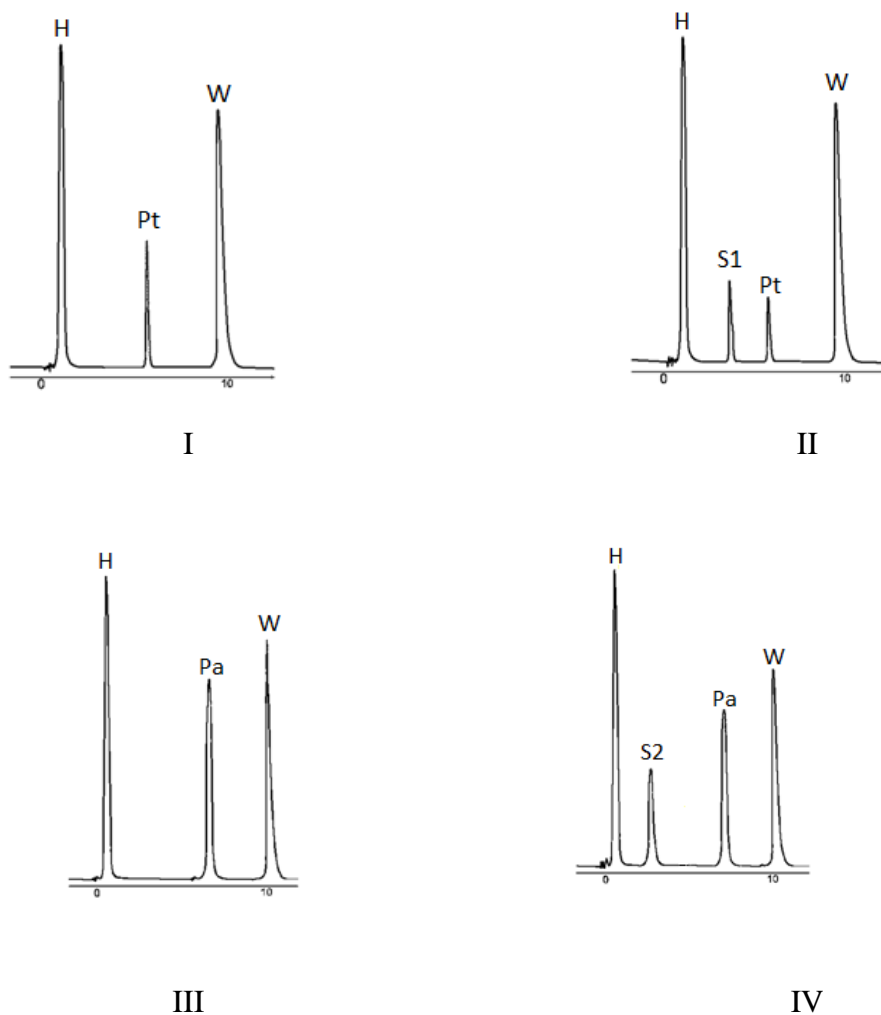
*Szczegółowe wartości dla RH = 74,6% znajdują się na str. 81



Ryc. 4.31 Wykres $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$ w temp. 333 K dla PER_a.

4.5 Wpływ hydrochlorotiazylu na trwałość PER_t oraz PER_a

Selektywność metody stosowanej do badań PER_t oraz PER_a w mieszaninach modelowych (MM I oraz MM II) z hydrochlorotiazylu (HTH) została potwierdzona po analizie próbek przed testem kinetycznym oraz po teście kinetycznym w T= 333 K, t = 4 h, RH = 76,4%, co przedstawia **Ryc. 4.32**.



Ryc. 4.32 Chromatogramy: I - MM I; II - MM I po teście kinetycznym;
III – MM II; IV - MM II po teście kinetycznym.

Gdzie: Pt - peryndopryl z *tert*-butyloaminą (t_R – 5,5 min), W - wzorzec wewnętrzny (t_R – 9,5 min), H – hydrochlorotiazyl (t_R – 2,5 min), Pa - argininian peryndoprylu (t_R – 5,5 min), S1, S2 - produkty rozkładu (t_R – 4,0; 3,0 min).

Zaobserwowano różny kinetyczny mechanizm rozkładu PER_t i PER_a w obecności HTH w warunkach $T = 333\text{ K}$, $RH = 50,9\% - 76,4\%$. Rozkład PER_t zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej, stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

$$\ln c_0 / (c_0 - c_t) = c - k \cdot t$$

gdzie: c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0 ,

c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t ,

c – wyrażenie odnoszące się do okresu indukcji,

k – stała szybkości, [s^{-1}],

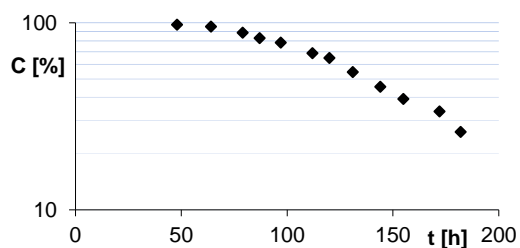
t – czas, [h].

Wyniki dla PER_t przedstawiono w **Tabelach 4.33 - 4.36** oraz na **Rycinach 4.33 - 4.36**.

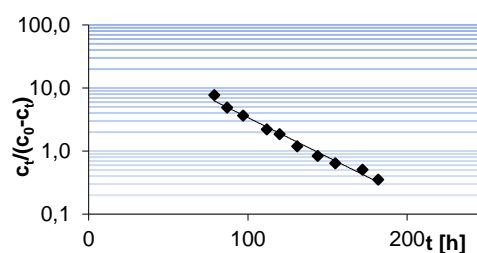
• **PER_t**

Tabela 4.33 Zmiany stężenia PER_t w MM I w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 50,9% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c _t [%]	c _t / (c ₀ - c _t)	Parametry prostej y = ax + b
1	48	97,8	*	$a \pm \Delta a = -0,028 \pm 0,002$ $b \pm \Delta b = 4,10 \pm 0,378$ $S_y = 0,134$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,167$ $r = -0,992$
2	64	95,4	*	
3	79	88,6	7,77	
4	87	83,0	4,88	
5	97	78,5	3,64	
6	112	68,9	2,22	
7	120	65,0	1,85	
8	131	54,5	1,19	Parametry kinetyczne
9	144	45,6	0,84	$k \pm \Delta k = 8,00 \cdot 10^{-6} \pm 7,94 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 142,44 [h]$ $t_{0,1} = 66,2 [h]$
10	155	39,1	0,64	
11	172	33,7	0,51	
12	182	26,1	0,35	



A

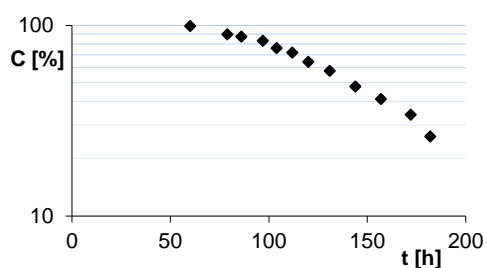


B

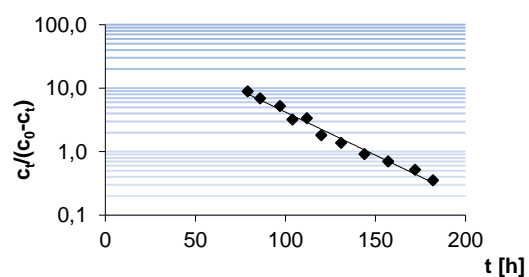
Ryc. 4.33 Rozkład PER_t w MM I; T = 333 K i RH = 50,9%; A - wykres półlogarytmicznej zależności c(%) = f(t); B - wykres zależności $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.34 Zmiany stężenia PER_t w MM I w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 66,5% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	60	99,2	*	$a \pm \Delta a = -0,032 \pm 0,002$ $b \pm \Delta b = 4,66 \pm 0,22$ $S_y = 0,1084$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,100$ $r = -0,993$
2	79	89,9	8,9	
3	86	87,4	6,93	
4	97	82,0	4,55	
5	104	78,2	3,57	
6	112	70,1	2,33	
7	120	67,0	2,03	Parametry kinetyczne
8	131	62,1	1,63	$k \pm \Delta k = 8,99 \cdot 10^{-6} \pm 4,7 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 143,12 [h]$ $t_{0,1} = 30,12 [h]$
9	144	48,8	0,95	
10	157	41,1	0,69	
11	172	29,1	0,41	
12	182	23	0,29	



A

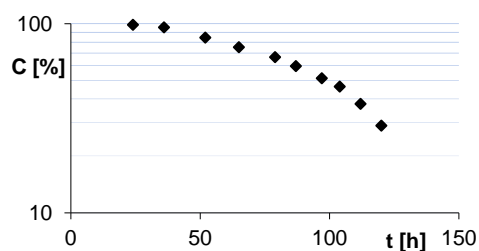


B

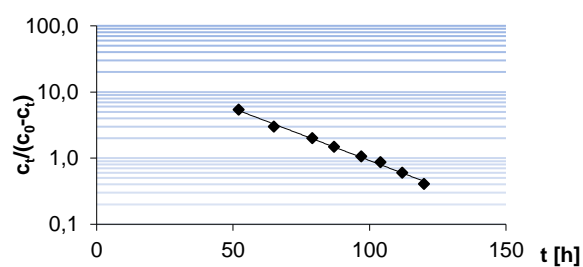
Ryc. 4.34 Rozkład PER_t w MM I; T = 333 K i RH = 66,5%; A - wykres półlogarytmicznej zależności $c(\%) = f(t)$; B – wykres półlogarytmicznej zależności $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.35 Zmiany stężenia PER_t w MM I w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej $y = ax + b$
1	24	98,4	*	$a \pm \Delta a = -0,035 \pm 0,002$ $b \pm \Delta b = 3,47 \pm 0,147$ $S_y = 0,0119$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,06$ $r = -0,996$
2	36	95,6	*	
3	52	84,3	5,36	
4	65	75,0	3,00	
5	79	66,5	1,99	
6	87	59,7	1,05	
7	97	51,4	1,06	
8	104	46,5	0,87	Parametry kinetyczne
9	112	37,5	0,60	$k \pm \Delta k = 9,89 \cdot 10^{-6} \pm 3,7 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 97,41 [h]$ $t_{0,1} = 35,7 [h]$
10	120	28,9	0,41	



A

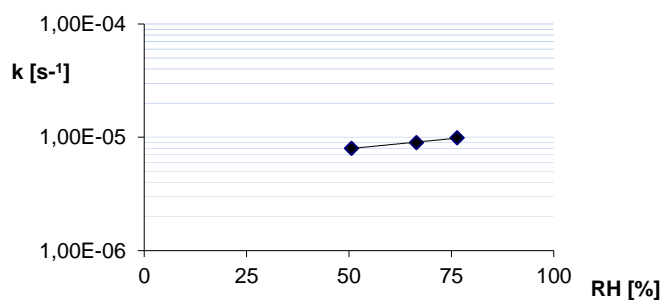


B

Ryc. 4.35 Rozkład PER_t w MM I; $T = 333 K$ i $RH = 76,4\%$; A - wykres półlogarytmicznej zależności $c(\%) = f(t)$; B - wykres półlogarytmicznej zależności $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.36 Parametry kinetyczne dla reakcji PER_t w MM I w $T = 333\text{ K}$ i zmiennych wartościach wilgotności względnej

Lp.	RH [%]	$k \pm \Delta k$ [s^{-1}]
1	50,9	$k \pm \Delta k = 8,00 \cdot 10^{-6} \pm 7,94 \cdot 10^{-7}$
2	66,5	$k \pm \Delta k = 8,99 \cdot 10^{-6} \pm 4,7 \cdot 10^{-7}$
3	76,4	$k \pm \Delta k = 9,89 \cdot 10^{-6} \pm 3,7 \cdot 10^{-7}$
Parametry równania $\ln k = f(\text{RH} [\%])$		
$a \pm \Delta a = 0,0081 \pm 0,004$		
$b \pm \Delta b = -12,15 \pm 0,29$		
$S_y = 0,019$		
$S_a = 0,001$		
$S_b = 0,069$		
$r = -0,992$		

**Ryc. 4.36** Zależność stałej rozkładu k [s^{-1}] od wilgotności względnej RH [%] dla PER_t w MM I.

- **PER_a**

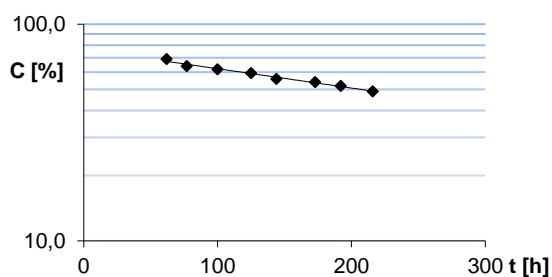
Reakcja rozkładu PER_a zachodzi zgodnie z modelem reakcji kinetycznej pierwszego rzędu, stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

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

gdzie: c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0 , c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t , k – stała szybkości reakcji [s^{-1}], t – czas [h]

Tabela 4.37 Zmiany stężenia PER_a w MM II w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 50,9\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

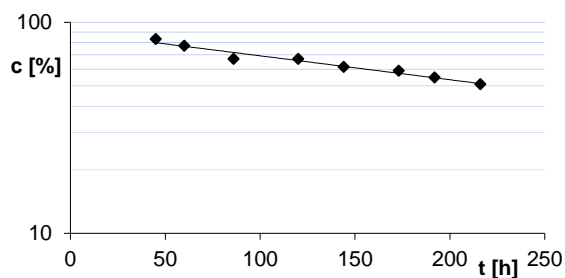
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej; $y = ax + b$
1	62	69,6	$a \pm \Delta a = -0,002 \pm 0,0002$ $b \pm \Delta b = 76,53 \pm 1,03$ $S_y = 0,015$ $S_a = 0,0001$ $S_b = 0,015$ $r = -0,992$
2	77	64,2	
3	100	62,1	
4	125	59,5	
5	144	56,2	
6	173	54,00	Parametry kinetyczne
7	192	52,1	$k \pm \Delta k = 5,70 \cdot 10^{-7} \pm 0,72 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 337,16 [h]$ $t_{0,1} = 51,27 [h]$
8	216	48,9	



Ryc. 4.37 Półlogarymiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w MM II w $T = 333 K$ i $RH = 50,9\%$.

Tabela 4.38 Zmiany stężenia PER_a w MM II w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy $RH = 66,5\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

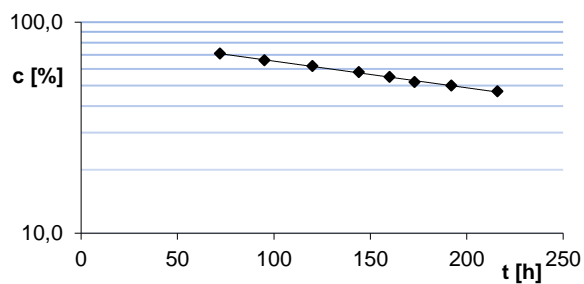
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	45	83,3	$a \pm \Delta a = -0,0026 \pm 0,0005$ $b \pm \Delta b = 4,500 \pm 0,076$ $S_y = 0,036$ $S_a = 0,0002$ $S_b = 0,031$ $r = -0,979$
2	60	77,2	
3	86	66,9	
4	120	67,0	
5	144	61,3	
6	173	58,8	Parametry kinetyczne
7	192	54,7	$k \pm \Delta k = 7,25 \cdot 10^{-7} \pm 1,49 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 265,6 [h]$ $t_{0,1} = 40,3 [h]$
8	216	50,9	



Ryc. 4.38 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w MM II w $T = 333 K$ i $RH = 66,5\%$.

Tabela 4.39 Zmiany stężenia PER_a w MM II w wyniku rozkładu w temperaturze 333 K przy RH = 76,5 % wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

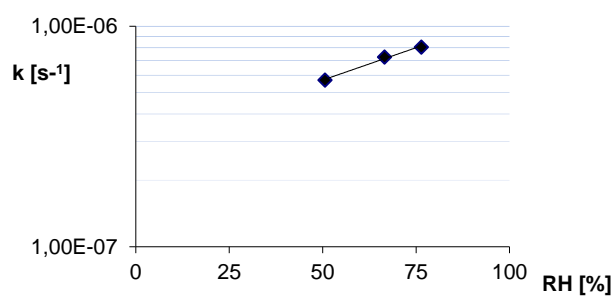
Lp.	t [h]	c_t [%]	Parametry prostej $y = ax + b$
1	72	71,1	$a \pm \Delta a = -0,0029 \pm 0,0001$ $b \pm \Delta b = 4,47 \pm 0,025$ $S_y = 0,009$ $S_a = 6,72 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,010$ $r = -0,998$
2	95	66,0	
3	120	62,2	
4	144	57,9	
5	160	55,0	
6	173	52,3	Parametry kinetyczne
7	192	49,7	$k \pm \Delta k = 8,06 \cdot 10^{-7} \pm 0,42 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 238,7 [h]$ $t_{0,1} = 36,3 [h]$
8	216	47,1	



Ryc. 4.39 Półlogarymiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w MM II w $T = 333$ K i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.40 Parametry kinetyczne dla reakcji PER_a w MM II w $T = 333\text{ K}$ i zmiennych wartościach wilgotności względnej

Lp.	RH [%]	$k \pm \Delta k$ [s^{-1}]
1	50,9	$k \pm \Delta k = 5,70 \cdot 10^{-7} \pm 0,72 \cdot 10^{-7}$ [s^{-1}]
2	66,5	$k \pm \Delta k = 7,25 \cdot 10^{-7} \pm 0,56 \cdot 10^{-7}$ [s^{-1}]
3	76,4	$k \pm \Delta k = 8,06 \cdot 10^{-7} \pm 0,42 \cdot 10^{-7}$ [s^{-1}]
Parametry równania $\ln k = f(\text{RH} [\%])$		
$a \pm \Delta a = 0,00135 \pm 0,005$ $b \pm \Delta b = -15,05 \pm 0,334$ $S_y = 0,021$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,077$ $r = -0,996$		

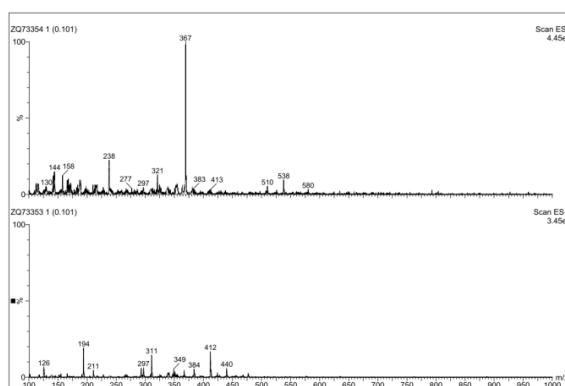


Ryc. 4.40 Wykres zależności stałej rozpadu k [s^{-1}] od wilgotności względnej RH [%] dla PER_a w MM II.

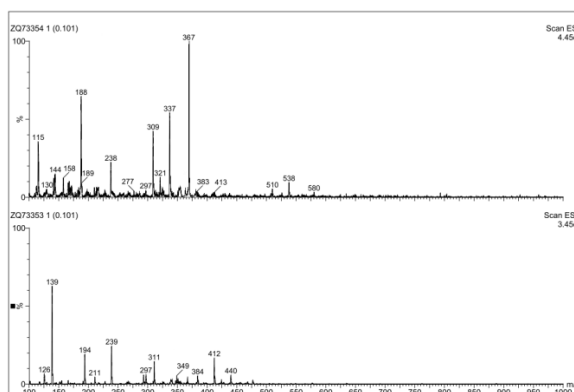
4.6 Analiza produktów rozkładu PER_t oraz PER_a

Do identyfikacji produktów degradacji PER_t oraz PER_a została zastosowana analiza spektrometryczna ESI/MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*), wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu w ramach usług komercyjnych. Badaniu zostały poddane próbki PER_t oraz PER_a a także mieszanin modelowych MM I oraz MM II - przed inkubacją oraz po inkubacji (dla PER_t i MM I temp. = 363 K, RH = 76,4 %, t = 0,5 h; dla PER_a i MM II temp. = 363 K, RH = 76,4 %, t = 5,0 h). Analizy wykazały, iż obecność HTH w mieszaninie modelowej nie ma wpływu na drogę degradacji PER_t oraz PER_a, gdzie obserwuje się takie same produkty rozkładu. Wyniki analiz przedstawiono na Ryc. 4.41- 4.44.

- PER_t



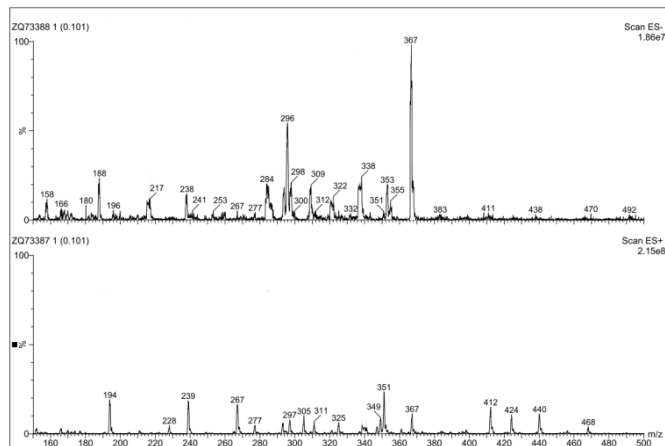
A



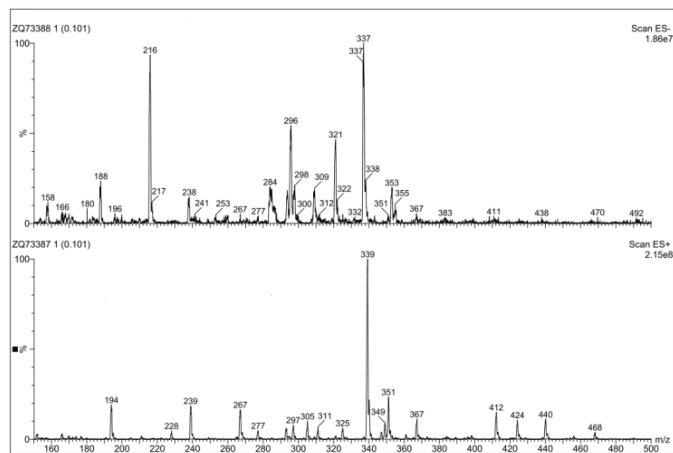
B

Ryc. 4.41 Widma analizy ESI/MS: **A** - dla PER_t przed procesem inkubacji;
B - dla PER_t po procesie inkubacji.

Część doświadczalna – Etap I



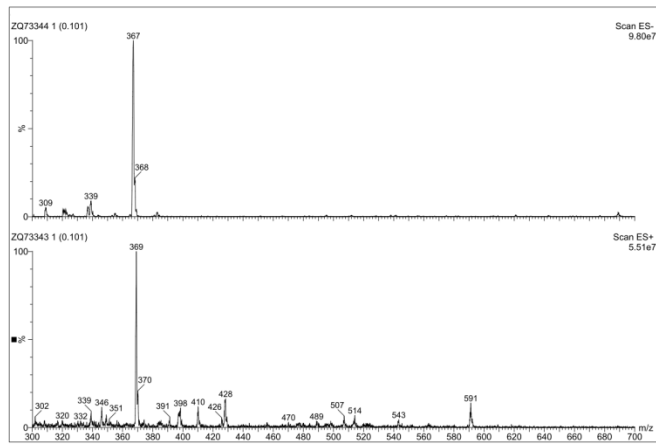
A



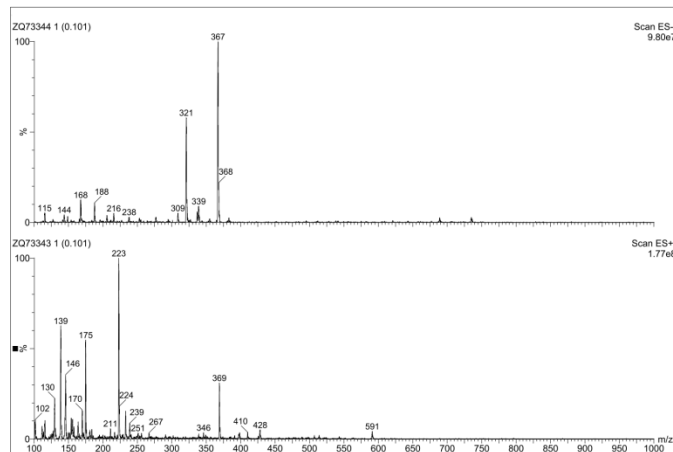
B

Ryc. 4.42 Widma analizy ESI/MS: **A** - dla MM I przed procesem inkubacji;
B - dla MM I po procesie inkubacji.

- **PER_a**



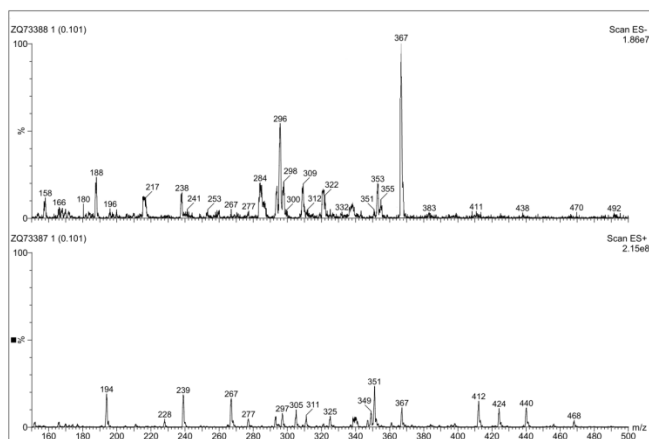
A



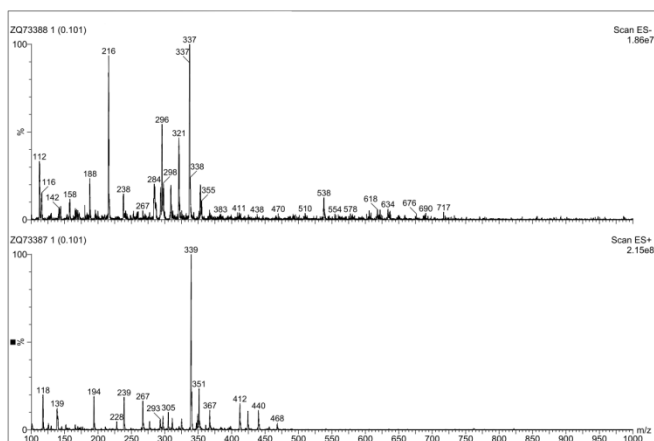
B

Ryc. 4.43 Widma analizy ESI/MS: **A** - dla PER_a przed procesem inkubacji;
B - dla PER_a po procesie inkubacji.

Część doświadczalna – Etap I



A



B

Ryc. 4.44 Widma analizy ESI/MS: **A** - dla MM II przed procesem inkubacji;
B - dla MM II po procesie inkubacji.

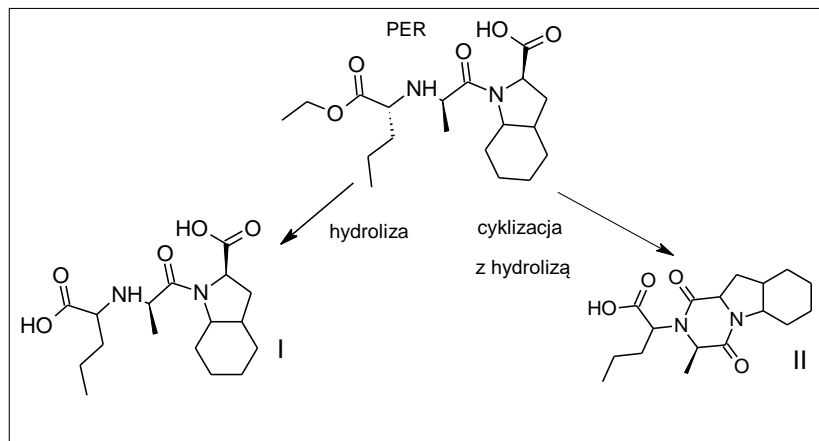
Gdzie:

~ ES + 369 - peryndopryl

~ ES +/- 339/337 –peryndoprylat (produkt degradacji I - Ryc. 4.45)

~ ES – 321 – pochodna diketopiperazynowa (produkt degradacji II – Ryc. 4.45)

~ ES + 298 –hydrochlorotiazyd



Ryc. 4.45 Proponowany mechanizm rozkładu peryndoprylu.

4.7 Badania trwałości PER_t oraz PER_a w preparatach handlowych

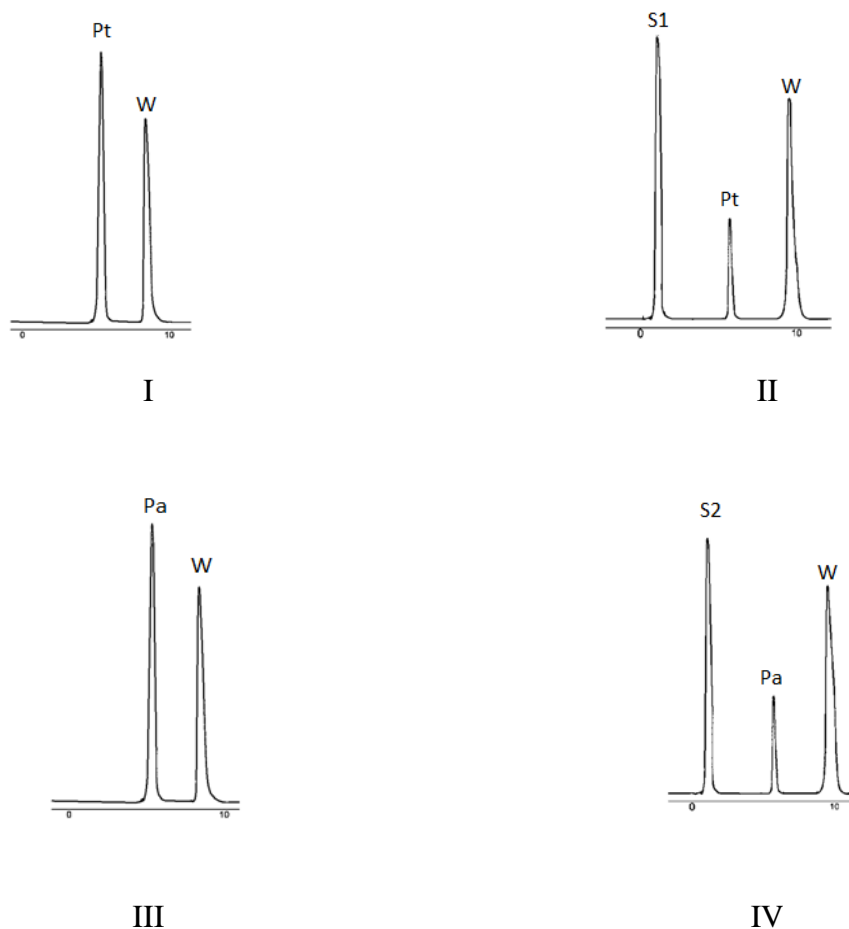
Oceniono trwałość PER_t oraz PER_a w tabletkach:

- rozłamanych na dwie połówki, bez opakowania handlowego,
- przechowywanych w całości, bez opakowania handlowego.

Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono analizę parametrów kinetycznych obserwowanych reakcji rozkładu. Badanie przeprowadzono zgodnie z *Procedurą nr 9*.

Selektywność

Selektywność określono na podstawie analizy HPLC chromatogramów badanych rozworów zawierających mieszaninę oksymetazoliny (wzorca wewnętrznego - W_w) z PER_t oraz PER_a z preparatów handlowych. Przeanalizowano także próbki zawierające mieszaninę W_w z PER_t oraz PER_a z preparatów handlowych, które były poddane testom kinetycznym ($T= 303\text{ K}$, $RH = 76,4\%$, $t = 200\text{ h}$). Chromatogramy przedstawia **Ryc. 4.46**.



Ryc. 4.46. Chromatogramy wykreślone dla: I - W_w z PER_t ; II - W_w z PER_t po teście kinetycznym; III - W_w z PER_a , IV - W_w z PER_a po teście kinetycznym ($T = 303K$, $RH = 76,4\%$, $t = 400$ h).

Gdzie: *Pt* – peryndopryl z *tert*-butyloaminą ($t_R = 5,5$ min), *Pa*- argininian peryndoprylu ($t_R = 5,5$ min), *W*- wzorzec wewnętrzny ($t_R = 9,5$ min), *S1*, *S2* – produkty degradacji ($t_R = 1,5$ min; 2,0 min).

4.7.1 Preparaty z PER_t – Prenessa 4 mg i 8 mg

Reakcja rozkładu PER_t w tabletkach w warunkach $RH = 76,4\%$ i temperatury w zakresie 303 K – 323 K zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej, a stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

$$\ln c_t / (c_0 - c_t) = c - k \cdot t$$

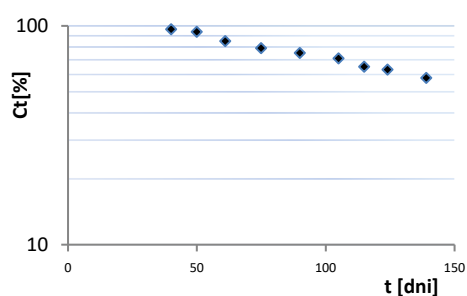
gdzie: c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0 , c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t , c – wyrażenie odnoszące się do okresu indukcji, k – stała szybkości, [s^{-1}], t – czas, [h].

Wyniki zostały przedstawione w **Tabelach 4.41- 4.49** oraz **Rycinach 4.47 – 4.54**.

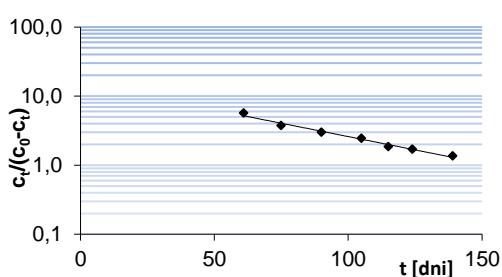
• **Tabletki Prenessa 4 mg - przepołowione**

Tabela 4.41 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 303 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [dni]	c_t [%]	$c_t/(c_0 - c_t)$	Parametry prostej
1	40	95,5	*	$a \pm \Delta a = -0,018 \pm 0,002$ $b \pm \Delta b = 2,73 \pm 0,252$ $S_y = 0,066$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,102$ $r = -0,992$
2	50	92,8	*	
3	61	85,2	5,66	
4	75	79,1	3,76	
5	90	75,0	3,00	
6	105	70,9	2,44	
7	115	65,2	1,85	Parametry kinetyczne
8	124	63,3	1,70	$k \pm \Delta k = 2,05 \cdot 10^{-7} \pm 2,78 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 86,40$ [dni]
9	139	57,7	1,36	



A

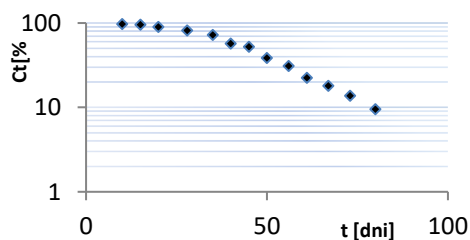


B

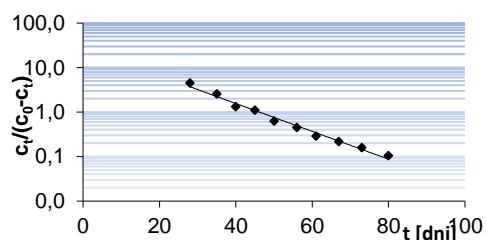
Ryc. 4.47 Rozkładu PER_t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w $T = 303$ K i RH = 76,4%, A- półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$; B – wykres przedstawiający zależność $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.42 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 313 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [dni]	c_t [%]	$c_t/(c_0 - c_t)$	Parametry prostej
1	10	97,5	*	$a \pm \Delta a = -0,072 \pm 0,007$ $b \pm \Delta b = 3,33 \pm 0,397$ $S_y = 0,159$ $S_a = 0,003$ $S_b = 0,175$ $r = -0,992$
2	15	95,6	*	
3	20	89,9	*	
4	28	82,3	4,55	
5	35	72,2	2,57	
6	40	57,1	1,32	
7	45	52,5	1,10	
8	50	56,4	0,63	
9	56	38,6	0,45	
10	61	31,1	0,29	$k \pm \Delta k = 8,34 \cdot 10^{-7} \pm 8,23 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 46,19$ [dni] $t_{0,1} = 15,72$ [dni]
11	67	25,5	0,22	
12	73	13,8	0,16	
13	80	9,5	0,10	



A

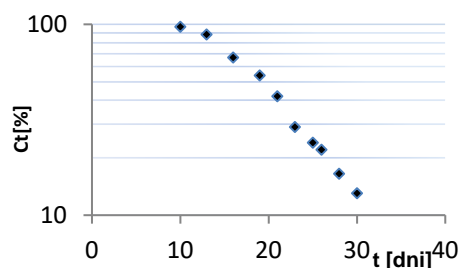


B

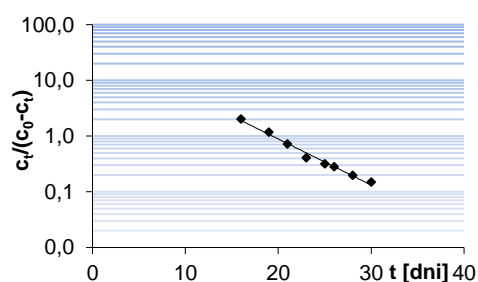
Ryc. 4.48 Rozkładu PER_t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w $T = 313$ K i $RH = 76,4\%$, A- półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$; B – półlogarytmiczny wykres zależności $c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.43 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 323 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [dni]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej
1	10	97,1	*	$a \pm \Delta a = -0,019 \pm 0,007$ $b \pm \Delta b = 3,688 \pm 0,514$ $S_y = 0,113$ $S_a = 0,009$ $S_b = 0,215$ $r = -0,993$
2	13	88,3	*	
3	16	67,0	2,03	
4	19	54,2	1,17	
5	21	42,1	0,72	
6	23	29,8	0,41	
7	25	24,5	0,31	
8	26	22,2	0,28	Parametry kinetyczne
9	28	16,5	0,19	$k \pm \Delta k = 2,20 \cdot 10^{-6} \pm 2,49 \cdot 10^{-7} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 19,3$ [dni] $t_{0,1} = 7,83$ [dni]
10	30	13,7	0,15	



A

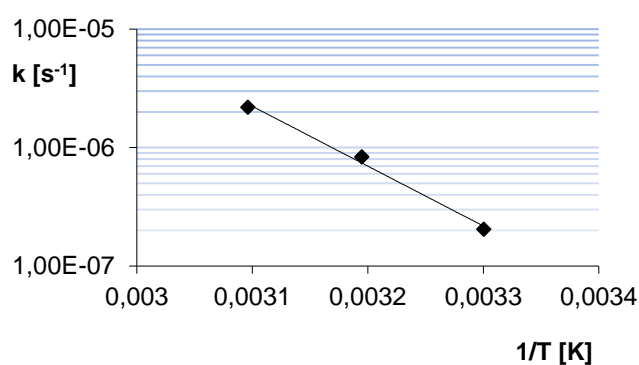


B

Ryc. 4.49 Rozkładu PER_t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w $T = 313$ K i $RH = 76,4\%$, A- półlogarytmiczny wykres zależności $c_t(\%) = f(t)$; B – półlogarytmiczny wykres zależności $c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.44 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w RH = 76,4 %

Lp.	T [K]	1/T	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	303	$3,03 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 2,05 \cdot 10^{-7} \pm 2,78 \cdot 10^{-8}$
2	313	$3,19 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 8,34 \cdot 10^{-7} \pm 8,13 \cdot 10^{-8}$
3	323	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 2,20 \cdot 10^{-6} \pm 2,49 \cdot 10^{-7}$
Parametry równania $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a = -11631,76 \pm 4343,70$ $b \pm \Delta b = 23,046 \pm 13,89$ $S_y = 0,146$ $S_a = 1009,46$ $S_b = 3,22$ $r = -0,996$		$E_a = 96,711 \pm 0,361$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 94,23 \pm 38,59$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = -0,053 \pm 0,129$ [kJ/(K·mol)]	

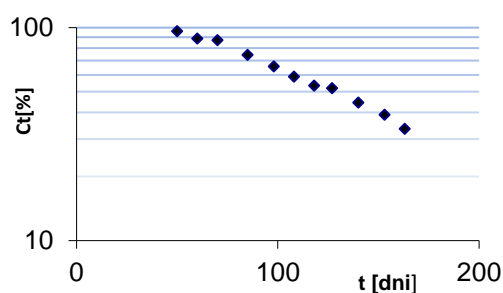


Ryc. 4.50 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_t w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w RH = 76,4%.

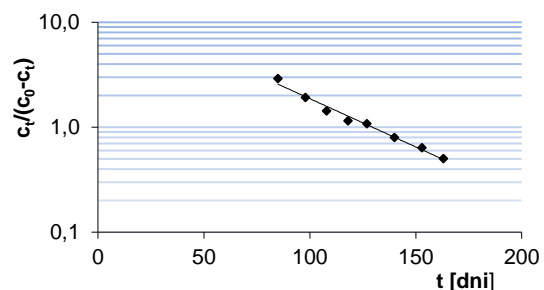
• **Tabletki Prenessa 8 mg**

Tabela 4.45 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 303 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [dni]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej
1	50	96,3	*	$a \pm \Delta a = -0,021 \pm 0,003$ $b \pm \Delta b = 2,745 \pm 0,347$ $S_y = 0,083$ $S_a = 0,001$ $S_b = 0,146$ $r = -0,991$
2	60	88,9	*	
3	70	87,4	*	
4	85	74,5	2,92	
5	98	65,8	1,92	
6	108	58,8	1,43	
7	118	53,5	1,15	
8	127	52,0	1,08	
9	140	44,5	0,80	Parametry kinetyczne
10	153	39,1	0,64	$k \pm \Delta k = 2,45 \cdot 10^{-7} \pm 3,17 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 129,6$ [dni] $t_{0,1} = 25,8$ [dni]
11	163	33,5	0,503	



A

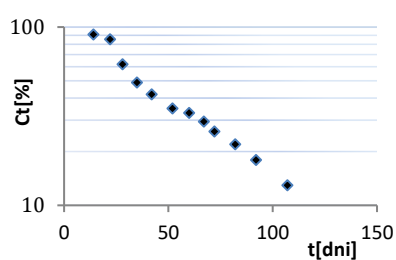


B

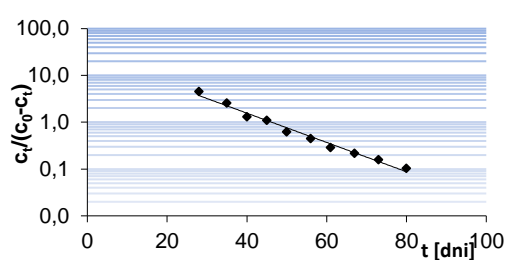
Ryc. 4.51 Rozkład PER_t w tabletkach w $T = 303$ K i $RH = 76,4\%$, A - półlogarytmiczny wykres zależności $c_t(\%) = f(t)$; B - półlogarytmiczny wykres zależności $c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.46 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 313 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [dni]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej
1	14	94,5	*	$a \pm \Delta a = -0,025 \pm 0,002$ $b \pm \Delta b = 0,800 \pm 0,169$ $S_y = 0,084$ $S_a = 0,0011$ $S_b = 0,075$ $r = -0,992$
2	18	89,8	*	
3	28	55,0	1,22	
4	35	47,0	0,89	
5	42	44,2	0,78	
6	52	35,4	0,54	
7	60	33,1	0,49	
8	67	32,3	0,47	
9	72	26,2	0,35	$k \pm \Delta k = 2,87 \cdot 10^{-7} \pm 2,88 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 32,17$ [dni] $t_{0,1} = 5,6$ [dni]
10	82	19,9	0,28	
11	92	20,0	0,25	
12	107	13,2	0,15	



A

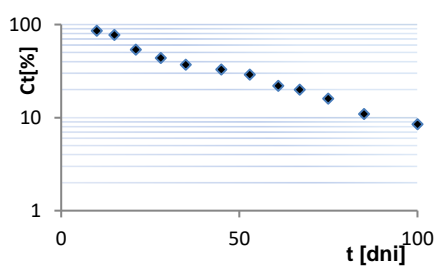


B

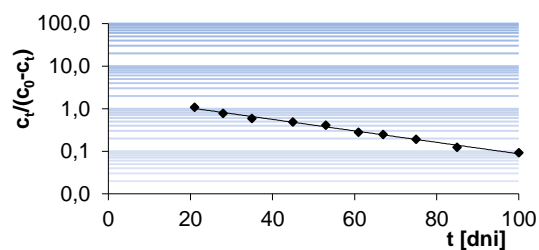
Ryc. 4.52 Rozkład PER_t w tabletkach w $T = 313$ K i $RH = 76,4\%$, A - półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$; B – półlogarytmiczny wykres zależności $c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.47 Zmiany stężenia PER_t (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 323 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [dni]	c_t [%]	$c_t / (c_0 - c_t)$	Parametry prostej
1	10	86,0	*	$a \pm \Delta a = -0,031 \pm 0,002$ $b \pm \Delta b = 0,661 \pm 0,138$ $S_y = 0,075$ $S_a = 0,0009$ $S_b = 0,0061$ $r = -0,996$
2	15	77,4	*	
3	21	52,7	1,1	
4	28	44,2	0,78	
5	35	37,8	0,59	
6	45	33,0	0,49	
7	53	29,2	0,40	
8	61	22,3	0,28	Parametry kinetyczne
9	67	20,0	0,25	$k \pm \Delta k = 3,59 \cdot 10^{-7} \pm 2,58 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 21,30$ [dni] $t_{0,1} = 4,9$ [dni]
10	75	16,1	0,19	
11	85	11,3	0,12	
12	100	8,5	0,09	



A

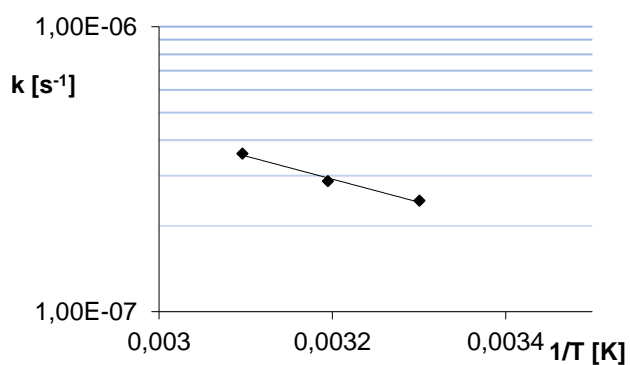


B

Ryc. 4.53 Rozkład PER_t w tabletkach w $T = 323$ K i $RH = 76,4\%$, A- półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$; B - półlogarytmiczny wykres zależności $c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$.

Tabela 4.48 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t w tabletkach w RH = 76,5%

Lp.	T [K]	1/T	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	303	$3,03 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 2,45 \cdot 10^{-7} \pm 3,17 \cdot 10^{-8}$
2	313	$3,19 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 2,87 \cdot 10^{-7} \pm 2,88 \cdot 10^{-8}$
3	323	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 3,59 \cdot 10^{-7} \pm 2,58 \cdot 10^{-8}$
Parametry równania $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a = -1865,55 \pm 945,76$ $b \pm \Delta b = -9,07 \pm 3,024$ $S_y = 0,031$ $S_a = 219,79$ $S_b = 0,70$ $r = -0,993$		$E_a = 15,507 \pm 7,86$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 13,029 \pm 10,34$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = -0,320 \pm 0,219$ [kJ/(K·mol)]	



Ryc. 4.54 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_t w tabletkach w RH = 76,4%.

4.7.2 Preparaty z PER_a

Przeprowadzone badania wykazały, że reakcja rozkładu argininianu peryndoprylu w warunkach względnej wilgotności powietrza RH = 76,4% i temperaturach w zakresie 303 K – 323 K zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu, a stałą szybkości reakcji względem stężenia substratu obliczono korzystając ze wzoru:

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

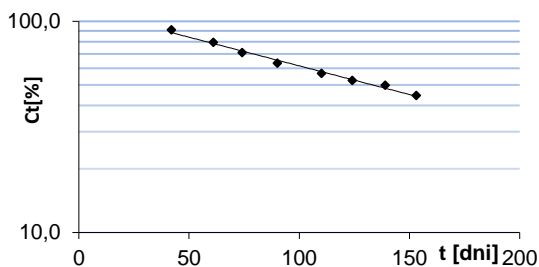
Gdzie: c_0 – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t_0 , c_t – stężenie procentowe badanej substancji w czasie t , k – stała szybkości reakcji [s^{-1}], t – czas [h].

Poszczególne wyniki zostały przedstawione w **Tabelach 4.49- 4.56** oraz **Ryc. 4.55 – 4.62**.

- **Tabletki Prestarium 5 mg –przełożone**

Tabela 4.49 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach przełożonych) w wyniku rozkładu w temperaturze 303 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

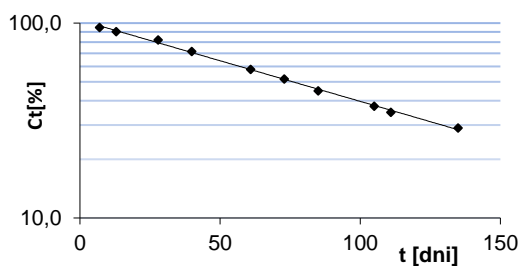
Lp.	t [dni]	c_t [%]	Parametry prostej
1	42	91,2	$a \pm \Delta a = -0,062 \pm 0,001$ $b \pm \Delta b = 4,74 \pm 0,063$ $S_y = 0,026$ $S_a = 0,0002$ $S_b = 0,026$ $r = -0,995$
2	61	79,5	
3	74	71,1	
4	90	63,3	
5	110	56,7	
6	124	52,4	Parametry kinetyczne
7	139	49,8	$k \pm \Delta k = 7,23 \cdot 10^{-8} \pm 6,96^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 110,87$ [dni] $t_{0,1} = 16,86$ [dni]
8	153	44,6	



Ryc. 4.55 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w tabletkach w $T = 303$ K i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.50 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 313 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

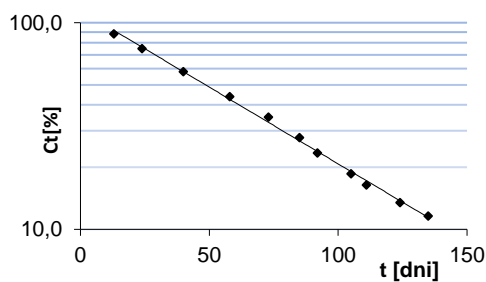
Lp.	t [dni]	c_t [%]	Parametry prostej
1	7	95,2	$a \pm \Delta a = -0,0095 \pm 0,003$ $b \pm \Delta b = 4,64 \pm 0,027$ $S_y = 0,02$ $S_a = 0,0001$ $S_b = 0,012$ $r = -0,999$
2	13	90,4	
3	28	82,1	
4	40	71,5	
5	61	57,8	
6	73	51,7	Parametry kinetyczne
7	85	45,0	$k \pm \Delta k = 1,11 \cdot 10^{-7} \pm 4,09 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 72,2$ [dni] $t_{0,1} = 10,9$ [dni]
8	105	37,5	
9	111	34,9	
10	135	29,0	



Ryc. 4.56 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w tabletkach w $T = 313$ K i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.51 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach przepołowionych) w wyniku rozkładu w temperaturze 323 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

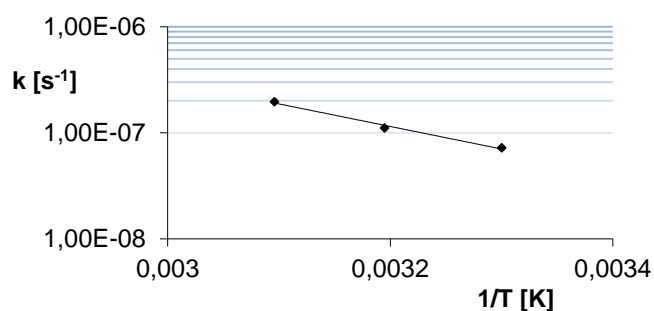
Lp.	t [dni]	c_t [%]	Parametry prostej
1	13	88,5	$a \pm \Delta a = -0,017 \pm 0,006$ $b \pm \Delta b = 4,74 \pm 1,171$ $S_y = 0,020$ $S_a = 0,0002$ $S_b = 0,024$ $r = -0,999$
2	24	75,6	
3	40	58,2	
4	58	44,1	
5	73	35,0	
6	85	27,8	Parametry kinetyczne
7	92	23,5	$k \pm \Delta k = 1,97 \cdot 10^{-7} \pm 7,14 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 40,5 [dni]$ $t_{0,1} = 6,2 [dni]$
8	105	18,6	
9	111	16,4	
10	124	13,5	
11	135	11,6	



Ryc. 4.57 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w tabletkach przepołowionych w $T = 323 K$ i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.52 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a w tabletkach przepołowionych w RH = 76,5%

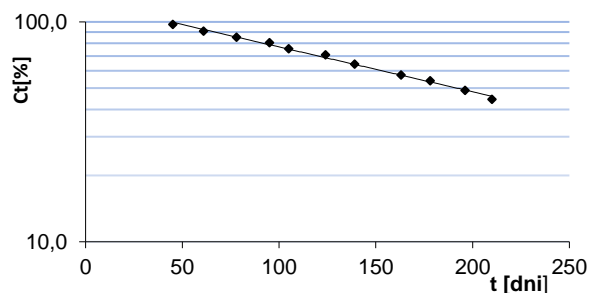
Lp.	T [K]	1/T	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	303	$3,03 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 7,23 \cdot 10^{-8} \pm 6,96 \cdot 10^{-9}$
2	313	$3,19 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,11 \cdot 10^{-7} \pm 4,08 \cdot 10^{-9}$
3	323	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,97 \cdot 10^{-7} \pm 7,14 \cdot 10^{-9}$
Parametry równania $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a = -4895,87 \pm 2150,96$ $b \pm \Delta b = -0,312 \pm 6,879$ $S_y = 0,072$ $S_a = 499,87$ $S_b = 1,59$ $r = -0,995$		$E_a = 41,45 \pm 17,88$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 39,70 \pm 20,36$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = -0,247 \pm 0,187$ [kJ/(K·mol)]	

**Ryc. 4.58** Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_a w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej w RH = 76,4%.

- **Tabletki Prestarium 10 mg**

Tabela 4.53 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 303 K przy $RH = 76,4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

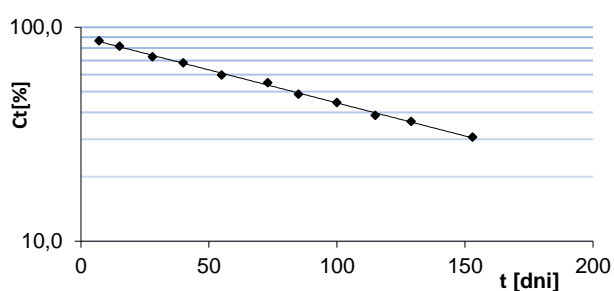
Lp.	t [dni]	c_t [%]	Parametry prostej
1	45	97,5	$a \pm \Delta a = -0,004 \pm 0,0002$ $b \pm \Delta b = 4,81 \pm 0,03$ $S_y = 0,0192$ $S_a = 0,0002$ $S_b = 0,015$ $r = -0,997$
2	61	75,6	
3	78	85,3	
4	95	80,4	
5	105	75,6	
6	124	70,8	Parametry kinetyczne
7	139	64,3	$k \pm \Delta k = 5,43 \cdot 10^{-8} \pm 2,83 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 147,6$ [dni] $t_{0,1} = 22,4$ [dni]
8	163	57,4	
9	178	54,1	
10	196	48,8	
11	210	44,5	



Ryc. 4.59 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w tabletkach w $T = 303$ K i $RH = 76,4\%$.

Tabela 4.54 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 313 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

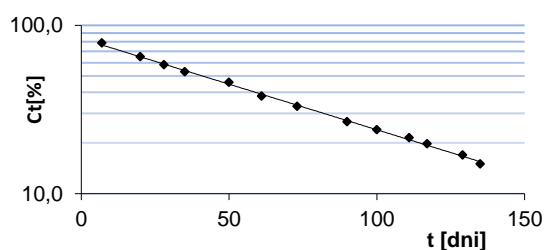
Lp.	t [dni]	c _t [%]	Parametry prostej
1	7	86,5	$a \pm \Delta a = -0,007 \pm 0,0002$ $b \pm \Delta b = 4,50 \pm 0,02$ $S_y = 0,016$ $S_a = 0,0001$ $S_b = 0,009$ $r = -0,999$
2	15	81,6	
3	28	72,9	
4	40	68,3	
5	55	59,9	
6	73	55,2	Parametry kinetyczne
7	85	48,7	$k \pm \Delta k = 8,23 \cdot 10^{-8} \pm 2,27 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 97,4$ [dni] $t_{0,1} = 14,8$ [dni]
8	100	44,5	
9	115	38,8	
10	129	36,3	
11	153	30,7	



Ryc. 4.60 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w tabletkach w T = 313 K i RH = 76,4%.

Tabela 4.55 Zmiany stężenia PER_a (w tabletkach) w wyniku rozkładu w temperaturze 323 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

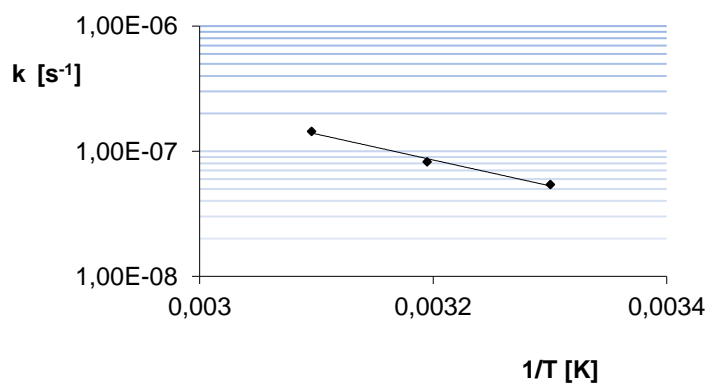
Lp.	t [dni]	c _t [%]	Parametry prostej
1	7	78,4	$a \pm \Delta a = -0,0124 \pm 0,0003$ $b \pm \Delta b = 4,42 \pm 0,027$ $S_y = 0,020$ $S_a = 0,0001$ $S_b = 0,012$ $r = -0,999$
2	20	65,1	
3	28	58,2	
4	35	52,9	
5	50	45,8	
6	61	38,0	
7	73	33,1	
8	90	26,7	Parametry kinetyczne
9	100	24,3	$k \pm \Delta k = 1,44 \cdot 10^{-7} \pm 3,74 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 55,5$ [dni] $t_{0,1} = 8,4$ [dni]
10	111	21,5	
11	117	19,8	
12	129	17,0	
13	135	15,1	



Ryc. 4.61 Półlogarytmiczny wykres zależności $C(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w tabletkach w T = 323 K i RH = 76,4%.

Tabela 4.56 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a w tabletkach w RH = 76,5%

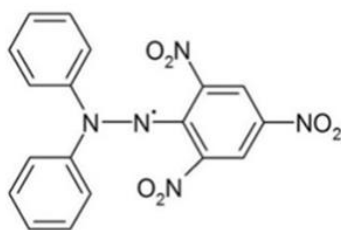
Lp.	T [K]	1/T	$k \pm \Delta k$ [s ⁻¹]
1	303	$3,03 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,304 \cdot 10^{-6} \pm 6,5 \cdot 10^{-8}$
2	313	$3,19 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 1,97 \cdot 10^{-6} \pm 6,67 \cdot 10^{-8}$
3	323	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$k \pm \Delta k = 3,46 \cdot 10^{-6} \pm 8,99 \cdot 10^{-8}$
Parametry równania $\ln k = f(1/T)$		Parametry termodynamiczne	
$a \pm \Delta a = -4763,42 \pm 2123,76$ $b \pm \Delta b = -1,03 \pm 6,79$ $S_y = 0,071$ $S_a = 493,55$ $S_b = 1,57$ $r = -0,995$		$E_a = 39,60 \pm 17,65$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 37,29 \pm 19,96$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = -0,252 \pm 0,187$ [kJ/(K·mol)]	



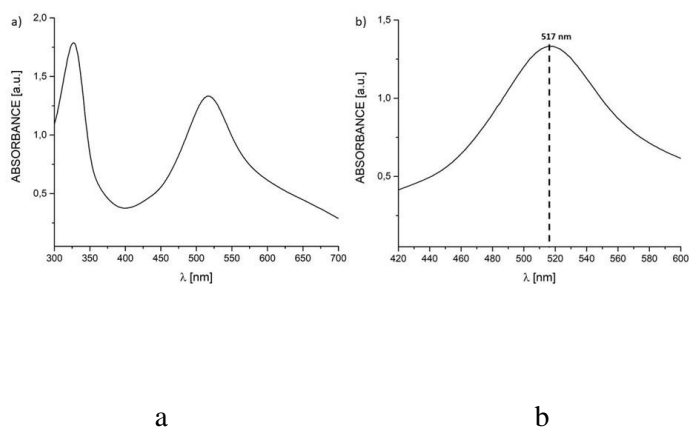
Ryc. 4.62 Wykres zależności Arrhenius'a reakcji rozkładu PER_a w tabletkach w RH = 76,4%.

4.8 Badanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych I-ACE

Celem badania było określenie zdolności przeciwutleniającej peryndoprylu oraz wybranych I-ACE z zastosowaniem 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH). Metoda kolorymetryczna UV-Vis, która wykorzystuje reakcję redukcji odczynnika DPPH, była stosowana już wcześniej [161-165]. Strukturę chemiczną cząsteczki DPPH i wraz z niesparowanym elektronem pokazano na **Ryc. 4.63**, a jego widmo UV-Vis w alkoholu metylowym przedstawiono na **Ryc. 4.64**.

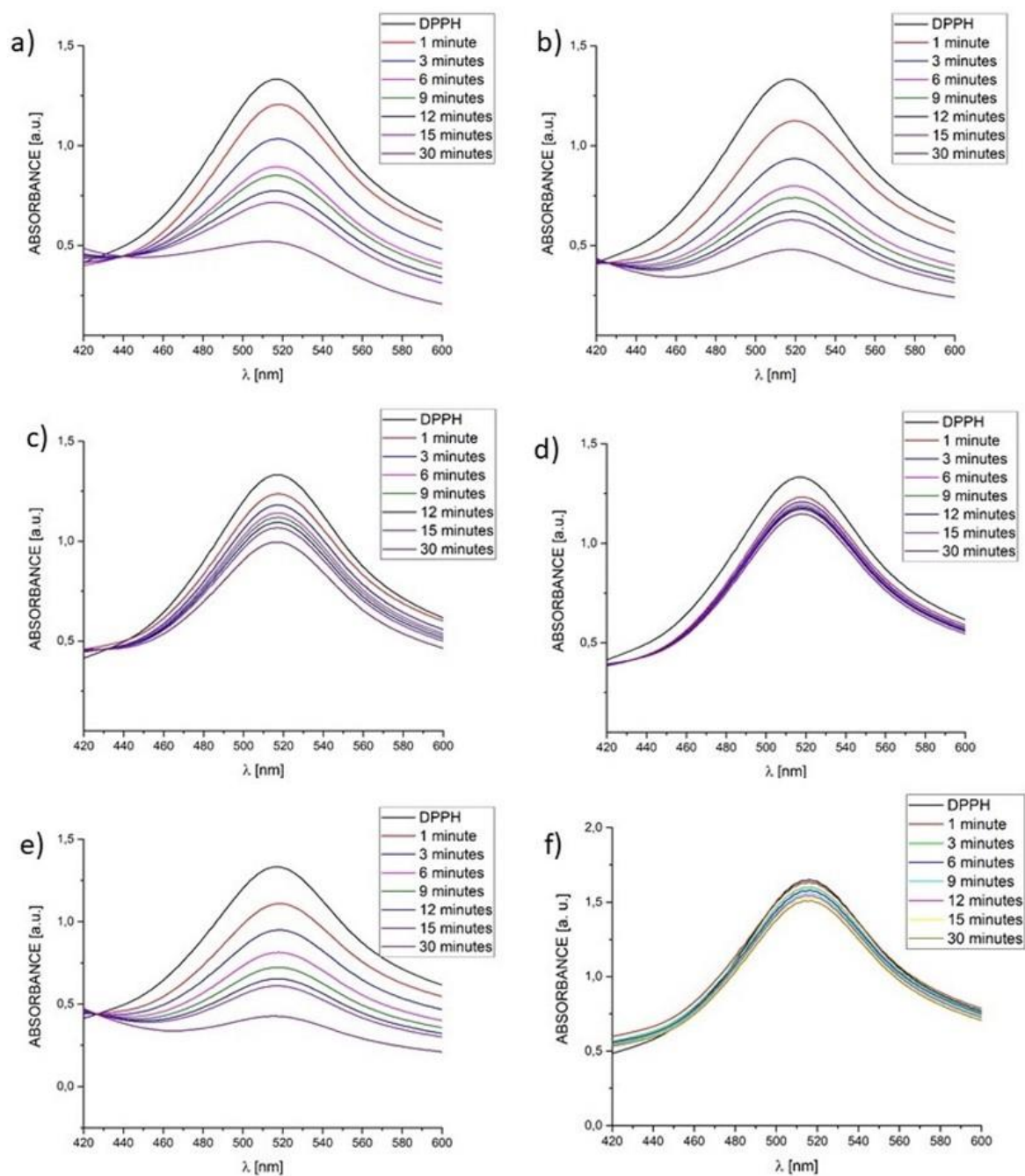


Ryc. 4.63 Struktura chemiczna cząsteczki DPPH,
(•) - niesparowany elektron

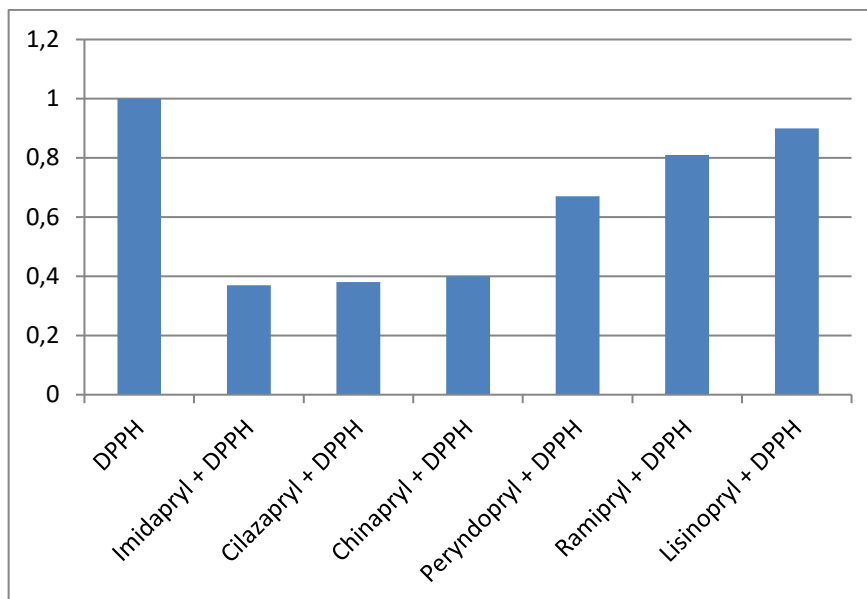


Ryc. 4.64 Widmo UV-Vis DPPH w alkoholu metylowym; (a) w zakresie długości fali od 300 nm do 700 nm, (b) w zakresie długości fali od 420 nm do 600 nm, gdzie oznacza się maksymalną absorpcję (517 nm)

Wyniki badania przedstawiono w **Tabeli 4.57** oraz na **Ryc. 4.65** i **4.66**.



Ryc. 4.65 Widma UV-Vis roztworu DPPH oddziałującego z (a) cilazaprylem, (b) imidaprylem, (c) peryndoprylem [wyniki badań obu soli były porównywalne], (d) ramiprylem, (e) chinaprylem i (f) lizynoprylem, zarejestrowane w temperaturze pokojowej ($\lambda = 450-600$).



Ryc. 4.66 Wartości absorbancji w 30 minucie oddziaływania badanych I-ACE z roztworem DPPH.

Tabela 4.57 Obliczona procentowa wartość hamowania wolnych rodników dla I-ACE po 30 minutach oddziaływania z DPPH

Badany związek	kwask L- askorbinowy*	imidapryl	cilazapryl	chinapryl	peryndopryl	ramipryl	lisinopryl
% inhibicji	100	61,8	61,2	58,9	25,3	13,9	8,4

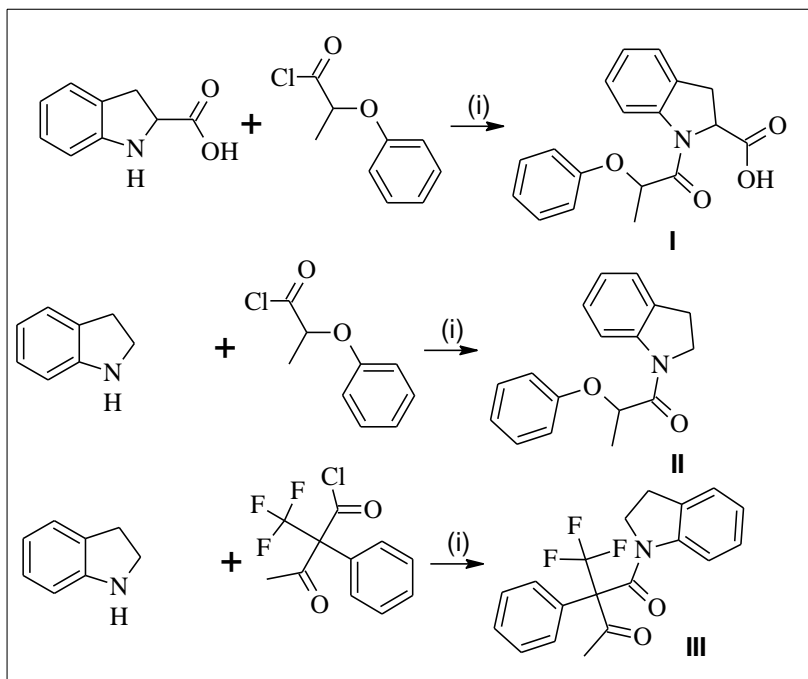
*. Roztwór kwasu L-askorbinowego przygotowano w/g *Procedury 13* i testowano w tych samych warunkach.

ETAP II

5. Synteza oraz analiza właściwości nowych pochodnych I-ACE

5.1 Ścieżki syntezy

Zaplanowano dwie ścieżki syntezy nowych pochodnych I-ACE. Pierwsza ścieżka syntezy dotyczyła reakcji kwasu indolowego oraz indoliny z kwasowymi chlorkami, co przedstawiono na **Rycinie 5.1**.

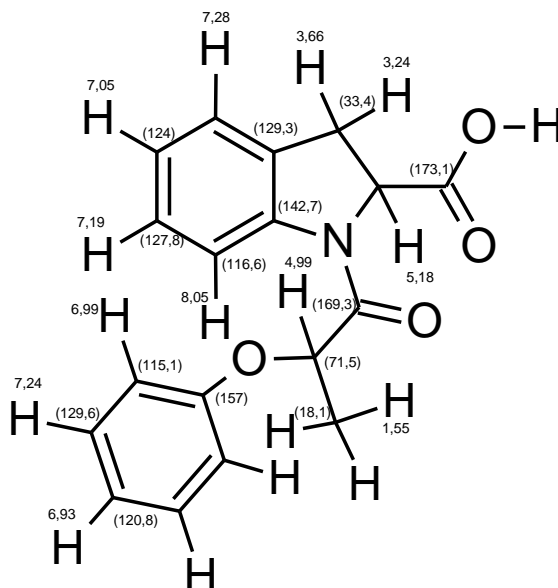


Ryc. 5.1 Ścieżka syntezy z użyciem: kwasu 2-indolinokarbosylowego oraz indoliny. Warunki reakcji i) K_2CO_3 , THF, $T = 333\text{ K}$, $t = 1\text{ h}$.

Ścieżka I

W naczyniu reakcyjnym umieszczono pochodną indolową w THF i dodano określoną ilość K_2CO_3 , następnie do mieszaniny reakcyjnej przez 30 min dodawano odpowiedni chlorek kwasowy. Zachodzącą reakcję pozostawiono ogrzewano 30 min w temp. 333 K. Mieszaninę reakcyjną przeniesiono do wody z lodem, celem gwałtownego ochłodzenia mieszaniny i strącenia osadu. Powstały kremowy osad odsączono i przemyto zimną wodą. Otrzymaną kwasową pochodną (**I**) rekrytalizowano z wody z dodatkiem węgla aktywnego w temp. 373 K. Do oczyszczenia pochodnych niekwasowych (**II**, **III**) stosowano metodę chromatografii kolumnowej, gdzie fazą stacjonarną był żel krzemionkowy, a fazą ruchomą dichlorometan:metanol w stosunku gradientowym od 50:1 do 10:1. Czystość otrzymanych

związków potwierdzono temperaturą topnienia oraz HPLC, a ich strukturę metodami MS-ES oraz technikami NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR), a także dwuwymiarowymi technikami NMR (^1H ^1H COSY, ^1H ^{13}C HMBC, ^1H ^{13}C HSQC). Obserwowane wartości przesunięć chemicznych w studiach strukturalnych dla związku **I** przedstawiono na **Ryc. 5.2** oraz w **Tabeli 5.1**.

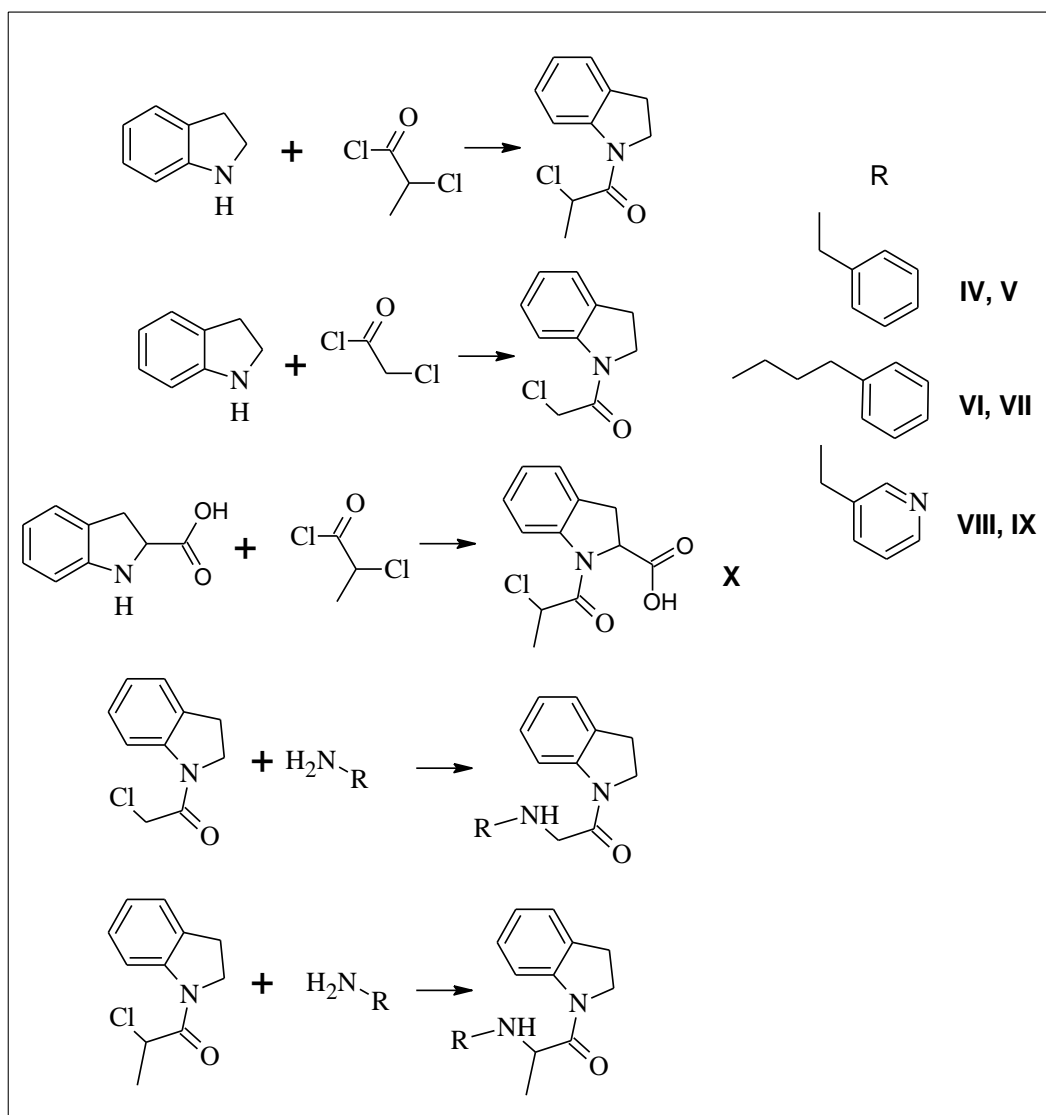


Ryc. 5.2 Struktura związku **I** z przypisanymi wartościami przesunięć NMR.

Tabela 5.1 Wartości przesunięć chemicznych w studiach strukturalnych dla związku **I**

Grupa funkcyjna	Wartość przesunięcia sygnału protonu [ppm]	Wartości przesunięć sygnałów węgla sprzężonych poprzez podaną ilość wiązań [ppm]	
		I-wiązanie	II, III, IV-wiązania
-CH ₃	1,55	18,1	71,5; 169,3
-CH (indol)	3,24; 3,66	33,4	59,8; 129,3; 124,6
-C ₆ H ₅ (indol)	7,28	124,6	129,3; 214,0; 127,2; 116,6; 142,7
-C ₆ H ₅ (indol)	7,05	124,0	124,6; 127,2; 116,6; 129,3
-C ₆ H ₅ (indol)	7,19	127,2	116,6; 124,7; 124,0; 124,6
-C ₆ H ₅ (indol)	8,05	116,6	142,7; 127,2; 124,0; 124,6; 129,3
-O-CH-CO	4,99	71,5	18,1
-C ₆ H ₅ (para)	6,93	120,8	129,6; 115,1; 157,0
-C ₆ H ₅ (meta)	7,24	129,6	115,1; 120,8; 157,0
-C ₆ H ₅ (orto)	6,99	115,1	129,6; 120,8; 157,0

Podstawą drugiej dwuetapowej ścieżki syntezy była reakcja acylacji indoliny oraz kwasu 2-indolinokarbosylowego przy użyciu chlorku 2-chloropropionylu oraz chlorku chloroacetylu. (Ryc. 5.3)



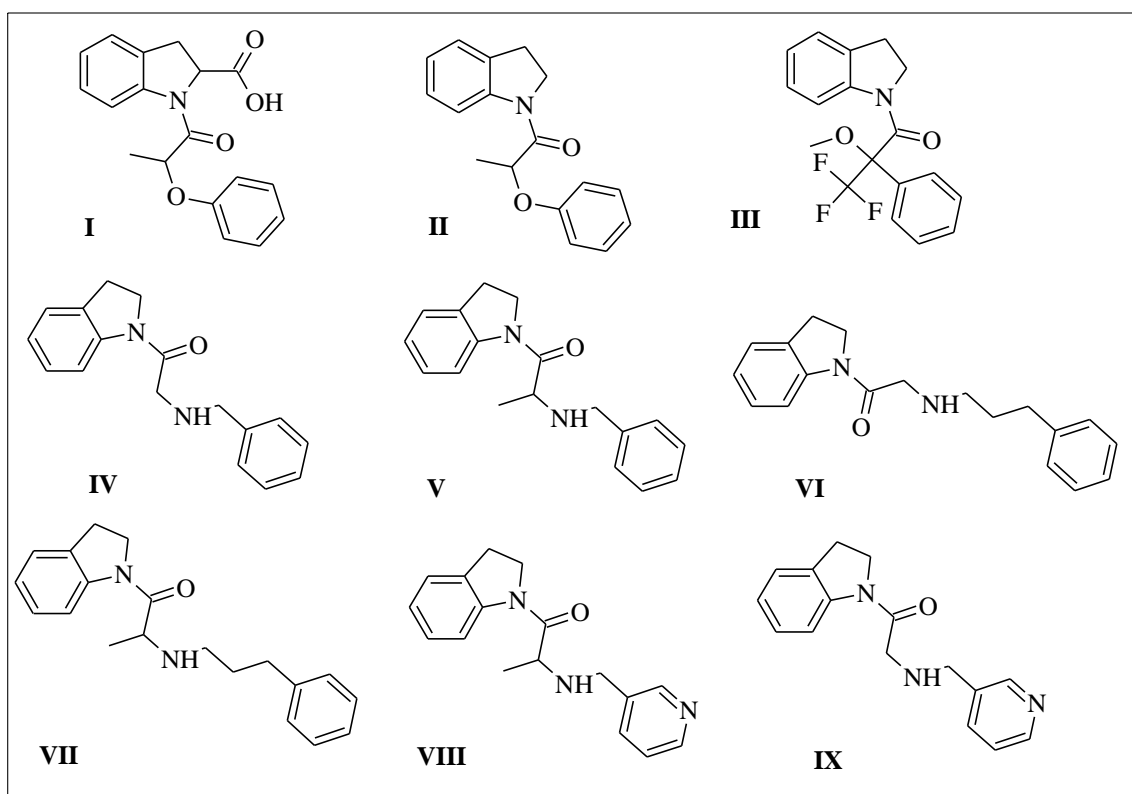
Ryc. 5.3 Ścieżka syntezy z użyciem: kwasu 2-indolinokarbosylowego, indoliny, chlorku 2-chloropropionylu, chlorku chloroacetylu. Warunki reakcji i) K_2CO_3 , THF, $T = 333\text{ K}$, $t = 1\text{ h}$.

Pierwszy etap syntezy (i) przebiegał w THF w temp. pokojowej przez 30 min. Mieszaninę reakcyjną wylewano na wodę z lodem, wytrącony osad wydzielano na lejku sitowym i poddawano oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej. Drugi etap polegał na reakcji alkilacji otrzymanych w I etapie związków z użyciem wybranych amin. Reakcja przebiegała w środowisku THF z dodatkiem K_2CO_3 jako zasady oraz KI jako aktywatora substratu (ii). Reakcję prowadzono 24 h w temp. wrzenia rozpuszczalnika. Po tym czasie mieszaninę

poreakcyjną wylewano na wodę z lodem a otrzymany osad odsączało. Otrzymane produkty końcowe oczyszczano na kolumnie chromatograficznej. Następnie substancje poddano charakterystyce fizyko-chemicznej przy użyciu metod spektroskopii UV, MS-ES oraz technik NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR), a czystość związków potwierdzono temperaturą topnienia oraz HPLC.

W zastosowanych warunkach reakcji pochodne kwasowe ulegały wewnętrznej cyklizacji, tworząc pochodne diketopiperazynowe, co zostało scharakteryzowane metodami MS ES. Badania nad związkiem **X** nie były kontynuowane (**Ryc. 5.3**).

W wyniku dwóch ścieżek syntezy otrzymano dziewięć związków o strukturach przedstawionych na **Rycinie 5.4**.



Ryc. 5.4 Struktury nowosyntezowanych związków.

5.1.1 Uwagi ogólne

- Temperatura topnienia – pomiary przeprowadzono na aparacie „Stuart” firmy Bibby Sterlin Ltd, przy użyciu otwartych kapilar, a otrzymane wyniki podano bez korekty,
- widma w nadfiolecie (UV) – wykonano na spektrofotometrze UV-VIS, Lambda 20, Perkin Elmer,
- widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) – zastosowano aparat Bruker (częstość robocza ^1H 500 MHz) w temp. pokojowej; widma wykonano we współpracy z Panią prof. dr hab. Zofią Gdaniec z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (badania finansowane z Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka dział. 2.1. nr umowy UDA-POIG.02.01.00-30-182/09); wykonywano widma ^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR oraz dwuwymiarowe 2D (^1H ^1H COSY, ^1H ^{13}C HSQC, ^1H ^{13}C HMBC); dla wartości przesunięć chemicznych zastosowano skalę δ (ppm) wobec sygnału rozpuszczalnika; w opisie widm NMR użyto skrótów: s – singlet, b – szeroki, d – dublet, t – triplet, m – multiplet,
- widma masowe – analizy MS ES wykonywano w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UMP,
- chromatografia cienkowarstwowa (TLC) - wykonywano techniką wstępującą na płytkach aluminiowych z żelom krzemionkowym F254 typ 60 oraz żelom Al_2O_3 firmy E. Merck ®; analizę wykonywano rutynowo, w celu wstępnej identyfikacji produktów;
- chromatografia kolumnowa (CC) - wykonano metodą krótkiej kolumny, z zastosowaniem żelu krzemionkowego Kieselgel 60 H (40-60 μm) firmy E. Merck ® lub żel aluminiowy firmy E. Merck ®.

5.1.2 Stosowane rozpuszczalniki i reagenty

Pełną informację na temat charakterystyki substancji chemicznych (MSDS) oraz dostęp do certyfikatów analizy wszystkich stosowanych reagentów firmy Aldrich, uzyskano dzięki usłudze eCommerce pod adresem internetowym: www.sigma-aldrich.com:

- THF (Aldrich), s 343C
- dichlorometan (Aldrich),
- metanol (POCH),
- heksan (POCH),
- octan etylu (POCH),

- węglan potasu (POCH),
- jodek potasu (POCH),
- AChE (EC 3.1.1.7, z *Electrophorus electricus* (Sigma Aldrich),
- BuChE (EC 3.1.1.8, z surowicy z rodziny *Equidae* (Sigma Aldrich),
- kwas 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoesowy) (Sigma Aldrich),
- odczynnik Ellmana (DTNB) (Sigma Aldrich),
- jodek acetylotiocholiny (ATCI) (Sigma Aldrich).

5.2 Szczegółowy opis syntezy i charakterystyki otrzymanych związków

Warunki syntezy:

I – kwas 1-(2-fenoksypropanylo)-2,3-dihydro-1*H*-indolo-2-karboksylowy;

- w kolbie okrągłodennej o objętości 100 ml umieszczono THF (30 ml), kwas 2-karboksyindolinowy (4,89 g, 30 mmol), K₂CO₃ (12,44 g, 90 mmol) oraz chlorek-2-fenoksypropanolu; reakcję prowadzono przez 2 h. w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, następnie mieszaninę wylano na wodę z lodem (200 ml), a uzyskany biały osad odsączono (9,14 g, 98%):
 - tt. 185°C, R_f (CH₂Cl₂: MeOH, 50:1) 0,26; UV (CH₂Cl₂): λ_{max}, nm (logε) 310 (4,2),
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δH, ppm 1,55 (d, 3H, CH₃), 3,24 (d, 1H), 3,63-3,66 (m, 1H), 4,96-5,0 (m, 1H), 5,17-5,2 (dd, 1H), 6,91-9,94 (t, 1H), 6,99 (d, 2H), 7,04-7,06 (t, 1H), 7,17-7,2 (t, 1H), 7,23-7,28 (m, 3H), 8,05 (d, 1H),
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δC, ppm 173,1; 169,3; 157,0; 142,7; 129,6; 129,3; 127,2; 124,6; 124,0; 120,8; 116,6; 115,1; 71,5; 59,8; 33,4; 18,1.

II – 1-(2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)-2-fenoksypropan-1-on;

- w kolbie okrągłodennej o objętości 100 ml umieszczono THF (30 ml), indolinę (3,36 ml, 30 mmol), K₂CO₃ (12,44 g 90 mmol) oraz chlorek-2-fenoksypropanolu; reakcję prowadzono przez 2 h. w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, następnie mieszaninę wylano na wodę z lodem (200 ml); osad odsączono i poddano chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, a jako eluent użyto mieszaniny CH₂Cl₂:MeOH (100:1 do 20:1) i uzyskano (6,58 g, 82%):

- tt. 154 °C, R_f (CH₂Cl₂:MeOH, 50:1) 0,84,
- UV (CH₂Cl₂): λ_{max} , nm (log ϵ) 310 (4,2),
- ¹H NMR (500 MHz; DMSO- *d*₆): δ H, ppm 1,52 (d, 3H), 3,17-3,21 (m, 2H), 4,13-4,15 (m, 1H) 4,32-4,36 (m, 1H), 5,18-5,22 (m, 1H), 6,89-6,95 (m, 3H), 7,01-7,04 (t, 1H), 7,14-7,17 (t, 1H), 7,26-7,29 (m, 3H), 8,05 (d, 1H),
- ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δ C, ppm 168,7; 157,1; 142,8; 131,9; 129,6; 126,9; 124,8; 123,8; 120,9; 116,3; 115,0; 114,7; 71,5; 47,0; 27,7; 17,0.

III – 1-(2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)-3,3,3-trifluoro-2-metoksy-2-fenylopropan-1-on

- w kolbie okrągłodennej o objętości 50 ml umieszczono THF (15 ml), indolinę (280 μ l, 2,5 mmol), K₂CO₃ (1,04 g, 7,5 mmol) oraz chlorek (R)-(-)- α -metoksytrifluorometylofenylacetylu (467 μ l, 2,5 mmol); reakcję prowadzono przez 2 h. w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, następnie mieszaninę wylano na wodę z lodem (200 ml), osad odsączono i poddano chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, jako eluent użyto mieszaniny dichlorometan:metan (100:1 do 20:1) oraz octan etylu:heksan (5:7) i uzyskano (285 mg, 34%):
 - tt. 155°C, R_f (CH₂Cl₂:MeOH, 50:1) 0,71,
 - UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} , nm (log ϵ) 310 (4,2),
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO- *d*₆): δ H, ppm 2,76-2,79 (m, 1H), 2,97-3,076 (m, 2H), 3,68 (d, 3H) 3,97-4,02 (t, 1H), 7,08-7,12 (m, 1H), 7,22-7,26 (m, 2H), 7,47-7,51 (m, 5H), 8,21 (d, 1H),
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO- *d*₆): δ C, ppm 163,1; 142,4; 132,6; 131,8; 129,8; 128,7; 127,1; 126,4; 124,9; 124,8; 117,2; 55,5; 47,6; 27,9,
 - ¹⁹F (376,5 MHz, DMSO-*d*₆): δ F, ppm - 67,27.

Reakcja acylacji indoliny przy pomocy chlorków kwasowych

W kolbie okrągło dennej o pojemności 250 ml umieszczono THF (50 ml) oraz indolinę (10,12 ml, 50 mmol), następnie przez 30 min wkraplano chlorek kwasowy (55 mmol). Reakcję prowadzono przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem (100 ml), osad odsączono i poddano oczyszczaniu na kolumnie chromatograficznej, stosując jako fazę stacjonarną żel krzemionkowy, a jako eluent mieszaninę dichlorometan : metanol (od 50:1 do 20:1).

Uzyskano:

- **2-chloro-1-(2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)propan-1-on** (9,43 g, 90%):
 - tt. 155°C, R_f (CH₂Cl₂ - MeOH, 50:1) 0,86. UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} , nm (log ϵ) 310 (4,2).
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δ H, ppm 2,75-2,81 (m, 1H), 2,95-3,07 (m, 2H), 3,68 (d, 3H) 3,95-4,02 (m, 1H), 7,08-7,12 (m, 1H), 7,22-7,26 (m, 2H), 7,47-7,51 (m, 5H), 8,21 (d, 1H).
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δ C, ppm 163,1; 142,4; 132,6; 131,8; 129,8; 128,7; 127,1; 126,4; 124,9; 124,8; 117,2; 55,5; 47,6; 27,9.
 - ¹⁹F (376,5 MHz, DMSO-*d*₆): δ F, ppm -67,27.
- **2-chloro-1-(2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)etanon** (8,51 g, 87%):
 - tt. 155°C, R_f (CH₂Cl₂:MeOH, 50:1) 0,80. UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} , nm (log ϵ) 310 (4,2).
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δ H, ppm 2,75-2,81 (m, 1H), 2,95-3,07 (m, 2H), 3,68 (d, 3H) 3,95-4,02 (m, 1H), 7,08-7,12 (m, 1H), 7,22-7,26 (m, 2H), 7,47-7,51 (m, 5H), 8,21 (d, 1H).
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δ C, ppm 163,1; 142,4; 132,6; 131,8; 129,8; 128,7; 127,1; 126,4; 124,9; 124,8; 117,2; 55,5; 47,6; 27,9.

Reakcja alkilacji amin związkami 2-chloro-1-(2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)propan-1-onem oraz 2-chloro-1-(2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)etanonem

W kolbie okrągłodennej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w chłodnicę typu Findenser umieszczono K₂CO₃ (22,5 mmol), KI (18 mmol), aminę – 1-fenylometyloaminę, 3-fenylpropanaminę lub 3-pikolyloaminę (15 mmol), 2-chloro-1-(2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)propan-1-on lub 2-chloro-1-(2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)etanon (15 mmol) oraz THF (30 ml). Reakcje prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 24 h. Następnie mieszaninę wylano na wodę z lodem (200 ml) i ekstrahowano trzykrotnie dichlorometanem (50 ml). Zebraną warstwę organiczną osuszono MgSO₄ i odparowano do sucha. Związek poddano chromatografii kolumnowej stosując jako fazę stacjonarną neutralny tlenek aluminium, a jako eluent mieszaninę dichlorometan : metanol (od 100:1 do 10:1).

Uzyskano:

- **IV – 2-(benzylamino)-1-(2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)etanon**
 - tt. 92°C, R_f (CH₂Cl₂ - MeOH, 50:1) 0,24; UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} , nm (log ϵ) 310 (4,2).
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δ H, ppm 3,08-3,14 (m, 2H), 3,46 (s, 1H), 3,60-3,67 (m, 1H) 3,77 (s, 1H), 3,87-4,02 (m, 3H), 6,98-7,00 (m, 1H), 7,14-7,17 (m, 1H), 7,21-7,29 (m, 3H), 7,31-7,38 (m, 4H), 8,09 (d, 1H).
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δ C, ppm 170,1; 169,2; 143,4; 141,0; 139,3; 132,0; 129,3; 128,7; 128,4; 127,5; 127,4; 127,1; 125,3; 116,5; 116,3; 58,1; 56,5; 53,1; 51,6; 47,1; 46,7; 28,0,

- **V – 2-(benzylamino-1-(2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)propan-1-on**
 - tt. 84°C, R_f (CH₂Cl₂:MeOH, 50:1) 0,14, UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} , nm (log ϵ) 310 (4,2),
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δ H, ppm 1,21 (d, 3H), 3,11-3,14 (t, 2H), 3,54-3,59 (m, 2H) 3,769-3,72 (d, 1H), 4,01-4,08 (m, 2H), 6,99-7,02 (t, 1H), 7,15-7,18 (t, 1H), 7,2-7,25 (m, 2H), 7,28-7,33 (m, 4H), 8,17 (d, 1H),
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δ C, ppm 173,4; 142,9; 140,5; 131,9; 128,1; 127,9; 126,9; 126,6; 124,8; 123,4; 116,3; 54,5; 50,9; 46,9; 27,5; 18,4,

- **VI – 1(2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)2-[(3-fenylpopylo)amino]etanon**
 - tt. 85°C, R_f (CH₂Cl₂ - MeOH, 50:1) 0,25; UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} , nm (log ϵ) 310 (4,2),
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δ H, ppm 1,22-1,25 (t, 1H); 1,70-1,77 (m, 2H), 2,56-2,64 (m, 3,5H), 2,81-2,84 (t, 0,5H), 3,13-3,17 (m, 2H), 3,34-3,40 (m, 4H), 3,45 (s, 1H), 3,66 (s, 1H); 4,02-4,06 (t, 1H) 4,12-4,60 (t, 1H) 6,97-7,00 (t; 1H), 7,14-7,28 (m, 7H), 8,08 (d, 1H),
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δ C, ppm 169,8; 169,0; 143,1; 143,0; 142,2; 142,1; 131,5; 128,4; 128,3; 128,2; 128,1; 127,0; 126,9; 125,9; 125,6; 125,5; 124,8; 124,7; 123,2; 62,6; 57,3; 53,7; 52; 51,8; 48,6; 46,7; 46,1; 32,9; 31,4; 29,2; 27,6; 27,5; 7,2

- **VII – 1-(2,3-dihydro-1*H*-indol-1ylo)-2-[(3-fenylopropylo)amino]propan-1-on**
 - tt. 85°C, R_f (CH₂Cl₂:MeOH, 50:1) 0,2; UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max}, nm (logε) 310 (4,2)
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δH, ppm 1,16 (d, 3H); 1,63-1,77 (m, 2H); 2,38-2,42 (m, 1H), 2,553-2,59 (t, 2H), 3,10-3,15 (t, 2H), 3,50-3,53 (m, 1H), 4,02-4,09 (m, 1H), 4,16-4,21 (m, 1H); 6,96-7,00 (t; 1H), 7,10-7,17 (m, 4H), 7,21-7,24 (m, 3H), 8,13 (d, 1H)
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δC, ppm 174,1; 143,4; 142,6; 132,3; 128,7; 128,6; 127,3, 126,0; 125,2; 123,8; 116,7; 55,5; 47,4; 47,1; 33,3; 32,2; 27,9; 18,8

- **VIII – 1-(2,3-dihydro-1*H*-indol-1ylo)-2-[(3-pirydynylometylo)amino]propan-1-on**
 - tt. 77°C, R_f (CH₂Cl₂:MeOH, 50:1) 0,13; UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max}, nm (logε) 310 (4,2)
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δH, ppm 1,2 (d, 3H); 3,12-3,15 (t, 2H), 3,56-3,62 (m, 2H), 3,73 (d, 1H), 4,01-4,14 (m, 2H), 6,99-7,02 (t, 1H), 7,14-7,18 (t, 1H), 7,24 (d, 1H), 7,31-7,33 (m, 1H), 7,74 (d, 1H), 8,15 (d, 1H), 8,42 (d, 1H), 8,51 (s, 1H)
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆): δC, ppm 173,2; 149,2; 147,9; 142,9; 135,9; 135,6; 131,9; 127,9; 124,7; 123,4; 123,3; 116,3; 54,7; 48,3; 46,9; 27,5; 18,3

- **IX - 1-(2,3-dihydro-1*H*-indol-1ylo)-2-[(3-pirydynylometylo)amino]etanon**
 - tt. 80°C, R_f (CH₂Cl₂ - MeOH, 50:1) 0,18; UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max}, nm (logε) 310 (4,2),
 - ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆): δH, ppm 3,07-3,14 (m, 2H), 3,47 (s, 1H), 3,69 (s, 1H), 3,80 (s, 1H), 4,00-4,03 (m, 2H), 6,98-7,00 (m, 1H), 7,14-7,17 (m, 1H), 7,21-7,24 (t, 1H), 7,30-7,36 (m, 1H), 7,76-8,20 (m, 1H), 8,08-8,10 (t, 1H), 8,44-8,45 (d, 1H), 8,54 (d, 1H),
 - ¹³C NMR (125 MHz; DMSO- *d*₆): δC, ppm 169,5; 168,5; 149,9; 149,3; 148,2; 147,9; 142,9; 136,4; 136,0; 131,5; 126,9; 124,7; 123,3; 115,8; 56,2; 55,1; 51,1; 50,0; 46,6; 46,1; 27,5.

5.3 Badania właściwości biologicznych oraz fizykochemicznych związków I – IX

Procedury:

Procedura 14. Przygotowanie związków I - IX do badania właściwości antyoksydacyjnych

Odważono dokładnie po 50,0 mg z badanych związków I-IX, dodano 1,5 ml roztworu 0,5 mM DPPH. Absorbancja była mierzona w temperaturze pokojowej po 1, 3, 6, 9, 12, 15 i 30 minutach oddziaływania związku z DPPH. Rejestrowano widma absorbancji w zakresie 420 - 600 nm stosując spektrofotometr UV-Vis Genesys 10 S (Thermo Scientific Company, Massachusetts, USA) z programem VISIONlite (Thermo Scientific Company, Massachusetts, USA) oraz program Origin 2016 (OriginLab Company, Illinois, USA).

Procedura 15. Wykonanie badania aktywności biologicznej związków I - IX wobec acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy

Badanie opierało się na pomiarze blokowania enzymów AChE i BuChE. Roztwór podstawowy badanych związków rozpuszczono w minimalnej objętości DMSO (1%) i rozcieńczono stosując roztwór buforowy (PBS, pH 8,0). W 96-studzienkowych płytkach umieszczono: 76 μ L 0,4 mg/ml DTNB, 14 μ l roztworu badanego związku, ATCI (40 μ l - 1 mM lub 2 mM odpowiednio dla AChE i BuChE) oraz 10 μ l AChE (2 U/ml) lub 10 ml BuChE (4 U/ml) przygotowanego w PBS (pH 8,0). W zależności od związku stosowano stężenia w zakresie 0,06 - 10 mM. Absorbancję mierzono w różnych odstępach czasu przez 15 minut przy długości fali 412 nm, stosując aparat Synergy H1 (Biotek). Reakcję kontrolną przeprowadzono stosując próbkę rozpuszczalnika bez testowanych związków. Wartości IC₅₀ dla hamowania AChE i BuChE są przedstawione w zakresie milimolarnym.

Przygotowanie buforu fosforanowego o pH 2,0 – wg Procedury 1

Procedura 16. Przygotowanie fazy ruchomej do badania związków I – IX

Odmierzono odpowiednie objętości acetonitrylu i buforu fosforanowego o pH 2,0, tak aby zachować stosunek objętościowy 65:35 v/v. Następnie zmieszaną fazę ruchomą przesączono przez sącdek ze szkła spiekanego o wielkości porów 0,45 μ m i pozostawiono w łaźni ultradźwiękowej w celu odgazowania przez 20 min.

Procedura 17. Przygotowanie roztworu o stężeniu 0,2 mg/ml - roztwór porównawczy (roztwory A związków I – IX)

Do kolby miarowej pojemności 25 ml odważono po 5,00 mg badanego związku (I - IX). Dodano 20 ml metanolu wymieszano do rozpuszczenia i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do kreski.

Procedura 18. Przygotowanie roztworów wzorców wewnętrznych

Roztwór chlorowodorku prokainy o stężeniu 0,05 mg/ml – wzorzec wewnętrzny dla związków III - IX

Odważono 50,00 mg chlorowodorku prokainy, przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuszczono w metanolu i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do kreski, pobrano 10,0 ml tego roztworu i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 100,0 ml (roztwór W_{wp}).

Roztwór chlorowodorku bupiwakainy o stężeniu 0,05 mg/ml – wzorzec wewnętrzny dla związków I i II

Odważono 50,00 mg chlorowodorku bupiwakainy, przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuszczono w metanolu i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do kreski, 10,0 ml tego roztworu pobrano i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 100,0 ml (roztwór W_{wb}).

Procedura 19. Przygotowanie roztworów związków I – IX – roztwory porównawcze

Do kolby miarowej pojemności 50 ml odważono 20,00 mg związku (I - IX). Dodano 30 ml metanolu mieszano do rozpuszczenia i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do kreski. Pobrano 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 ml roztworu, przeniesiono do kolb miarowych pojemności 10 ml i uzupełniono metanolem do kreski, otrzymując roztwory H_i.

Wykonanie oznaczenia:

Do 1,0 ml roztworu H_i dodano 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, zmieszano, nanoszono na kolumnę chromatograficzną 20 µl i wykreślono chromatogramy. Wyniki zamieszczono w poniższych **Tabelach 5.6-5.14** oraz na **Rycinach 5.8-5.16**.

Procedura 20. Przygotowanie roztworu substancji poddanej testowi kinetycznemu (roztwory N_i związków I – IX)

Do fiolek szklanych pojemności 5 ml odważano po 5,0 mg substancji I - IX i umieszczano w łaźni piaskowej (dla warunków obniżonej wilgotności względnej powietrza RH = 0%) lub ekсыkatorach, gdzie warunki odpowiedniej wilgotności względnej uzyskano stosując nasycony roztwór NaCl (RH = 76,4%). Łaźnie piaskowe i ekсыkatory umieszczano w komorach cieplnych o temperaturze: 363 K. W określonych odstępach czasu wyjmowano fiołki z komory cieplnej. Ochładzano próbki do temperatury pokojowej, substancję rozpuszczano w 25,0 ml metanolu.

Do 1,0 ml tak otrzymanego roztworu dodawano 1,0 ml roztworu W_{wb} lub W_{wp} , otrzymując roztwory N_i . Na kolumnę chromatograficzną nanoszono po 20 μ l analizowanych roztworów N_i i rejestrowano chromatogramy.

5.3.1 Wyznaczenie $LogP$ dla związków I-IX metodą obliczeniową

Wartości $LogP$ wyznaczone były w oparciu o metodologię *in silico* opisaną w literaturze [169, 170], z wykorzystaniem oprogramowania: *ALOGPS 2.1* oraz *miLogP* [171]. Wyniki przedstawiono w **Tabelach 5.2** oraz **5.3**.

Z użyciem platformy *ALOGPS* uwzględniającej algorytm sieci neuronalnych (ANN) wykazano, iż rozkład parametru $LogP$ dla związków I-IX przedstawia się następująco:

Tabela 5.2 $LogP$ związków I-IX wyznaczony z użyciem platformy *ALOGPS*

Badany związek	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
<i>LogP</i>	2,44	3,01	3,41	2,3	2,59	2,84	3,01	1,33	0,79

Z kolei uwzględnienie programu *miLogP* (biorącego pod uwagę wpływ grup sąsiednich, możliwość tworzenia wiązań wodorowych oraz przeniesienia ładunku) pozwoliło uzyskać następujące wyniki:

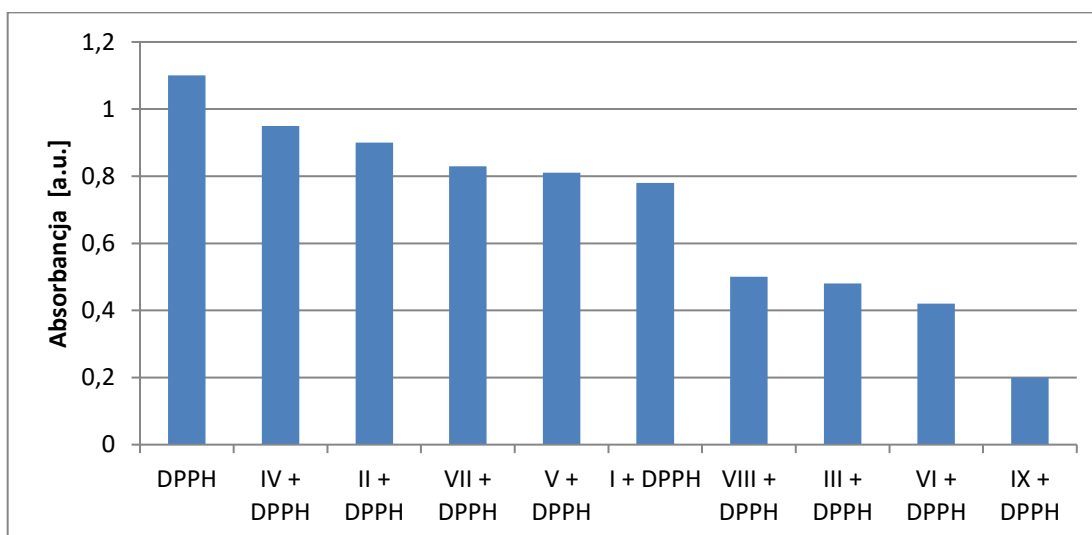
Tabela 5.3 *LogP* związków **I-IX** wyznaczony z użyciem programu *miLogP*

Badany związek	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
<i>LogP</i>	1,18	3,4	3,92	2,54	2,87	3,11	3,79	1,63	1,3

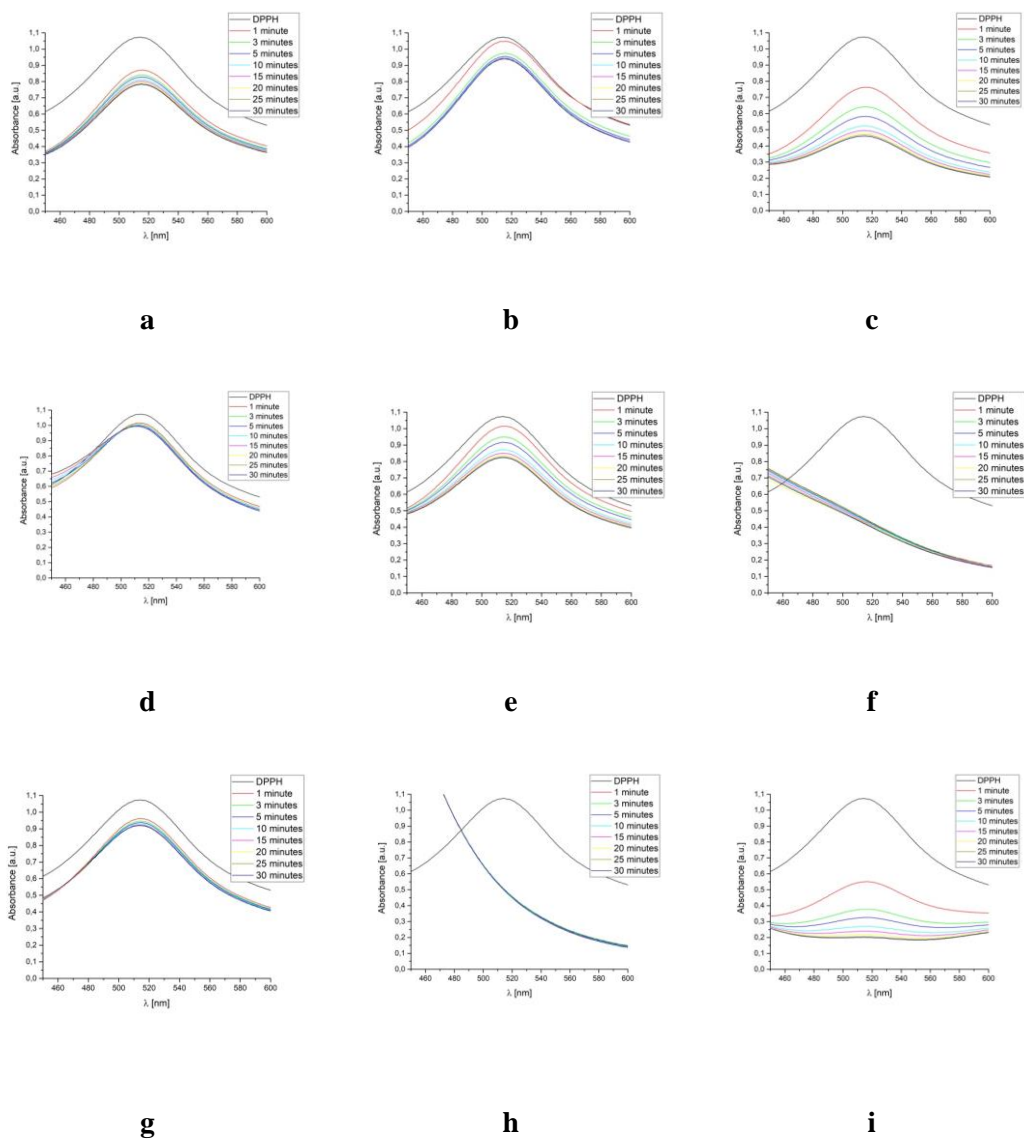
W obu przypadkach wykazano, iż najbardziej lipofilowym analogiem I-ACE okazał się związek **III**, a najbardziej hydrofilowym – **IX**. Obecność ugrupowania karbonylowego w sąsiedztwie kwasowego atomu azotu o hybrydyzacji sp^3 stanowi cechę wspólną ww. układów, jednakże silnie elektroujemny charakter ugrupowania trifluorometylowego związanego z mostkowym atomem węgla, który to połączony jest także z grupą metoksyłową, zdaje się przesądzać o bardziej lipofilowych właściwościach związku **III**. Efektu tego nie daje się zaobserwować w przypadku bardziej hydrofilowej pochodnej **IX**, gdzie zasadowy charakter drugorzędowego alifatycznego ugrupowania aminowego osłabiony wydaje się być na skutek ekranowania przez szybko rotujący system heterocyklu.

5.3.2 Badanie właściwości antyoksydacyjnych związków I - IX

Celem badania było określenie zdolności przeciwutleniającej otrzymanych związków z zastosowaniem DPPH. Opis metody został zamieszczony w **Rozdziale 3**, procedura przygotowania roztworu DPPH przebiegała zgodnie z *Procedurą 11*. Wyniki zostały przedstawione w **Tabeli 5.4** oraz na **Rycinach 5.5 i 5.6**.



Ryc. 5.5 Wartości absorbancji w 30 minucie oddziaływania badanych związków I-IX z roztworem DPPH.



Ryc. 5.6 Widma UV-Vis roztworu DPPH oddziałującego ze związkami: (a) I, (b) II, (c) III, (d) IV, (e) V, (f) VI, (g) VII, (h) VII oraz (i) IX. zarejestrowane w temperaturze pokojowej ($\lambda = 450\text{-}600\text{ nm}$).

Tabela 5.4 Obliczona procentowa wartość hamowania wolnych rodników dla związków I-IX.

Badany związek	Kwas	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
	L-askorbinowy*									
% inhibicji	100	29,1	18,2	56,4	13,6	26,4	61,8	24,5	54,5	81,8

*Dla porównania, kwas L-askorbinowy testowano w tych samych warunkach.

5.3.3 Badania aktywności biologicznej związków I-IX wobec acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy

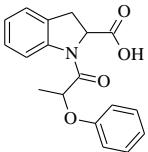
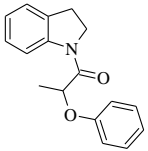
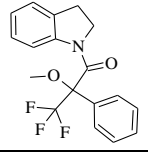
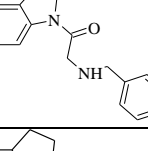
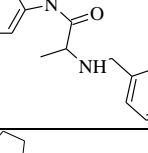
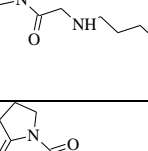
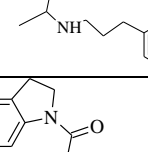
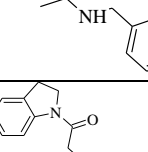
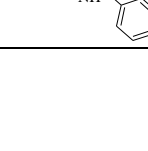
Acetylocholinoesteraza (AChE) i butyrylocholinoesteraza (BuChE) są głównymi celami inhibicji dla leków stosowanych w chorobie Alzheimera (AD). Obecnie istnieją trzy inhibitory acetylocholinoesterazy (I-AChE) zatwierdzone w farmakoterapii AD: galantamina, rywastygmina i donepezil [2, 3]. Wyniki oceny aktywności związków **I-IX** wobec AChE i BuChE zostały przedstawione w **Tabeli 5.5**.

Tabela 5.5 Wyniki badań aktywności związków **I-IX** wobec AChE i BuChE

Związek	AChE IC ₅₀ (mM)	BuChE IC ₅₀ (mM)
I	3,799	nieaktywny
II	5,150	nieaktywny
III	0,548	nieaktywny
IV	4,403	nieaktywny
V	0,598	0,708
VI	3,899	nieaktywny
VII	1,255	0,865
VIII	7,944	nieaktywny
IX	5,353	nieaktywny

Pozostałe właściwości fizykochemiczne związków **I-IX** przedstawiono w **Tabeli 5.6**.

Tabela 5.6 Właściwości fizykochemiczne związków I-IX

Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Nazwa chemiczna	Masa molowa [g/mol]	Temperatura topnienia [°C]
	C ₁₇ H ₁₈ NO ₄	kwas 1-(2-fenoksypropanylo)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indolo-2-karboksylowy	311,33	185
	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)-2-fenoksypropan-1-on	267,32	154
	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₂	1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)-3,3,3-trifluoro-2-metoksy-2-fenylpropan-1-on	335,32	155
	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O	2-(benzylamino)-1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)etanon	266,33	92
	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O	2-(benzylamino)-1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)propan-1-on	280,36	84
	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)-2-[(3-fenylpropylo)amino]etanon	294,39	85
	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)-2-[(3-fenylpropylo)amino]propan-1-on	308,41	85
	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O	1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)-2-[(3-pirydynylometrylo)amino]propan-1-on	281,35	77
	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O	1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)-2-[(3-pirydynylometrylo)amino]etanon	267,56	80

5.4 Badania trwałości związków I-IX

5.4.1 Opracowanie i walidacja metody HPLC do oceny trwałości związków I-IX

Walidację metody HPLC przeprowadzono w celu oceny jej przydatności do badania trwałości związków **I – IX**. Zastosowano następujące parametry rozdziału chromatograficznego:

- faza stacjonarna - kolumna Lichrospher RP-18, Merck Darmstadt, Niemcy,
- faza ruchoma – acetonitryl - bufor fosforanowy pH 2,0 (65:35 v/v),
- objętość nastrzyku - 20 μ l,
- szybkość przepływu fazy ruchomej – 1,2 ml/min,
- detekcja spektrofotometryczna UV – dla związku **I** - 258 nm, a dla związków **II – IX** - 256 nm.

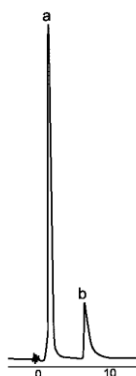
Selektywność metody

Analizując chromatogramy HPLC potwierdzono selektywność metody i przedstawiono na **Ryc. 5.7**.

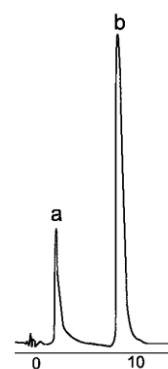
I (a – **I** ~ 5 min, b – chlorowodorek bupiwakainy ~ 9,5 min)



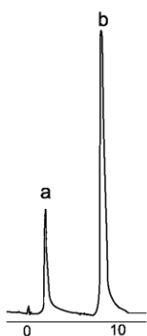
II (a – **II** ~ 3 min, b – chlorowodorek bupiwakainy ~ 9,5 min)



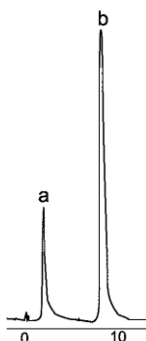
III (a – chlorowodorek prokainy ~ 6 min, b – **III** ~ 10 min)



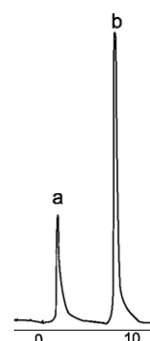
IV (a – chlorowodorek prokainy ~ 6 min, b – **IV** ~ 9 min)



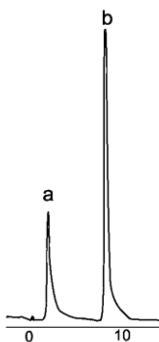
V (a – chlorowodorek prokainy ~ 6 min, b – **V** ~ 11 min)



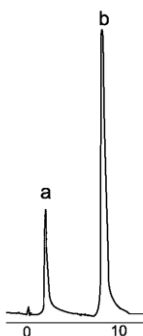
VI (a – chlorowodorek prokainy ~ 6 min, b – **VI** ~ 10,5 min)



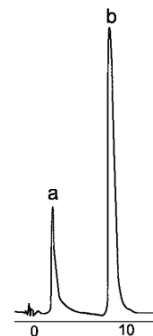
VII (a – chlorowodorek prokainy ~ 6 min, b – **VII** ~ 10,5 min)



VIII (a – chlorowodorek prokainy ~ 6 min, b – **VIII** ~ 10,5 min)



IX (a – chlorowodorek prokainy ~ 6 min, b – **IX** ~ 10,5 min)



Ryc. 5.7 Chromatogramy dla związków **I-IX** oraz ich wzorców wewnętrznych.

Liniowość metody

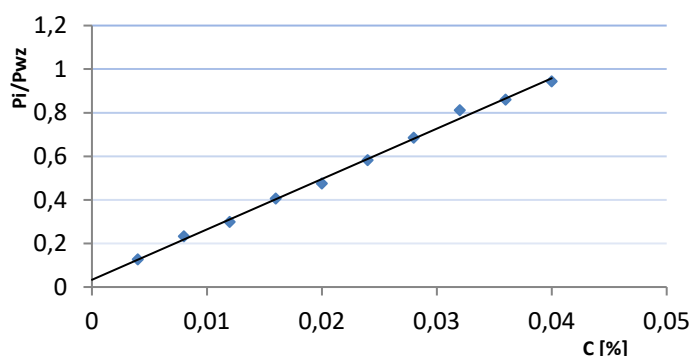
Otrzymano krzywe kalibracyjne metanolowych roztworów związków **I – IX** w zakresie stężeń od 0,004% do 0,04%. Wyniki przedstawiono w Tabelach **5.7 – 5.15** oraz rycinach **5.8 – 5.16**.

Tabela 5.7 Wyniki oznaczenia związku **I** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 26,727 \pm 1,125$ $b \pm \Delta b = -0,008 \pm 0,028$ $S_y = 0,018$ $S_a = 0,497$ $S_b = 0,001$ $r = 0,998$
1.	1,0	0,004	0,116	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 27,020 \pm 0,106$ $S_y = 0,0170$ $S_a = 0,246$ $r = 0,998$
2.	2,0	0,008	0,222	
3.	3,0	0,012	0,328	
4.	4,0	0,016	0,426	
5.	5,0	0,020	0,535	
6.	6,0	0,024	0,642	
7.	7,0	0,028	0,785	
8.	8,0	0,032	0,875	
9.	9,0	0,036	0,989	
10.	10,0	0,040	1,044	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz} = f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{S_b} = 0,664$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.



Ryc. 5.8 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **I**.

Tabela 5.8 Wyniki oznaczenia roztworów **II** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 33,015 \pm 1,962$ $b \pm \Delta b = 0,048 \pm 0,048$ $S_y = 0,010$ $S_a = 0,867$ $S_b = 0,021$ $r = 0,997$
1.	1,0	0,004	0,165	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 34,731 \pm 1,85$ $S_y = 0,029$ $S_a = 0,817$ $r = 0,997$
2.	2,0	0,008	0,294	
3.	3,0	0,012	0,452	
4.	4,0	0,016	0,585	
5.	5,0	0,020	0,711	
6.	6,0	0,024	0,839	
7.	7,0	0,028	0,993	
8.	8,0	0,032	1,147	
9.	9,0	0,036	1,257	
10.	10,0	0,040	1,300	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz}=f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{s_b} = 2,23$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.

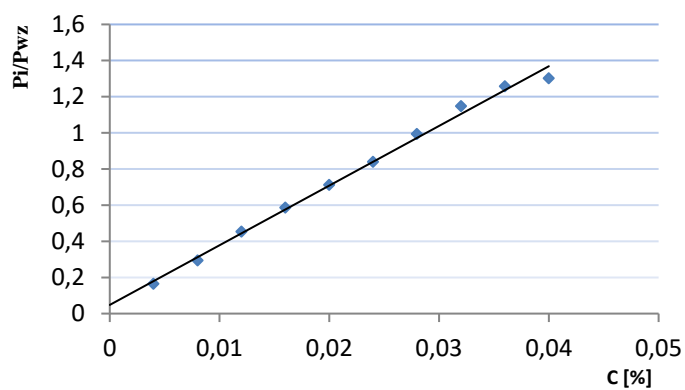
**Ryc. 5.9** Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **II**.

Tabela 5.9 Wyniki oznaczenia roztworów **III** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 38,572 \pm 0,722$ $b \pm \Delta b = -0,035 \pm 0,018$ $S_y = 0,011$ $S_a = 0,319$ $S_b = 0,008$ $r = 0,999$
1.	1,0	0,004	0,125	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 37,294 \pm 0,680$ $S_y = 0,011$ $S_a = 0,301$ $r = 0,999$
2.	2,0	0,008	0,267	
3.	3,0	0,012	0,429	
4.	4,0	0,016	0,586	
5.	5,0	0,020	0,711	
6.	6,0	0,024	0,909	
7.	7,0	0,028	1,043	
8.	8,0	0,032	1,197	
9.	9,0	0,036	1,353	
10.	10,0	0,04	1,508	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz} = f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{sb} = -4,51$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.

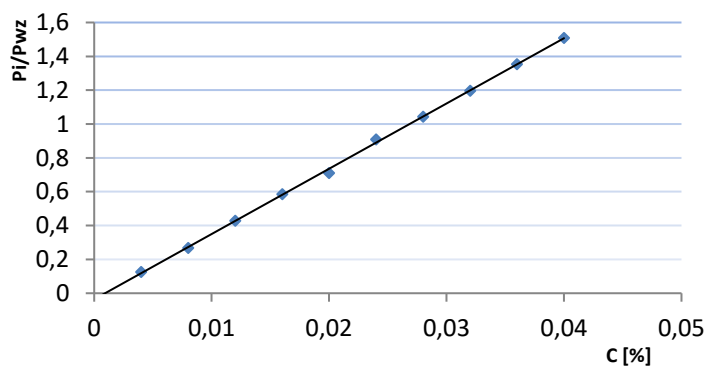
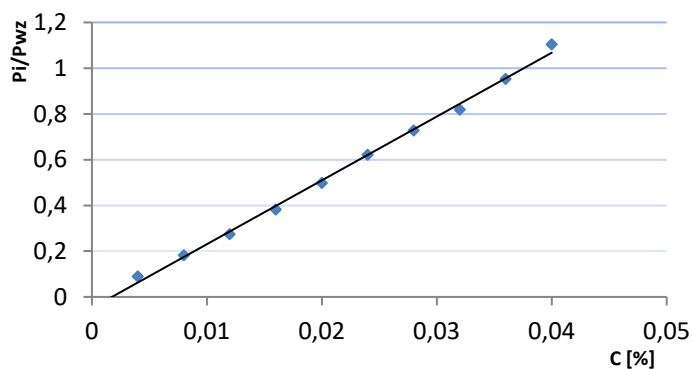
**Ryc. 5.10** Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **III**.

Tabela 5.10 Wyniki oznaczenia roztworów **IV** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 27,903 \pm 1,28$ $b \pm \Delta b = - 0,048 \pm 0,031$ $S_y = 0,0205$ $S_a = 0,566$ $S_b = 0,014$ $r = 0,998$ Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 26,17 \pm 0,1,207$ $S_y = 0,0193$ $S_a = 0,5336$ $r = 0,998$
1.	1,0	0,004	0,093	
2.	2,0	0,008	0,181	
3.	3,0	0,012	0,274	
4.	4,0	0,016	0,382	
5.	5,0	0,020	0,498	
6.	6,0	0,024	0,622	
7.	7,0	0,028	0,728	
8.	8,0	0,032	0,819	
9.	9,0	0,036	0,953	
10.	10,0	0,04	1,105	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz} = f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{S_b} = - 3,45$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.



Ryc. 5.11 Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **IV**.

Tabela 5.11 Wyniki oznaczenia roztworów **V** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 30,065 \pm 0,832$ $b \pm \Delta b = 0,832 \pm 0,018$ $S_y = 0,013$ $S_a = 0,367$ $S_b = 0,009$ $r = 0,999$ Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 30,732 \pm 0,784$ $S_y = 0,012$ $S_a = 0,346$ $r = 0,999$
1.	1,0	0,004	0,160	
2.	2,0	0,008	0,262	
3.	3,0	0,012	0,391	
4.	4,0	0,016	0,501	
5.	5,0	0,020	0,625	
6.	6,0	0,024	0,725	
7.	7,0	0,028	0,866	
8.	8,0	0,032	0,995	
9.	9,0	0,036	1,095	
10.	10,0	0,04	1,229	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz} = f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{sb} = 2,03$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.

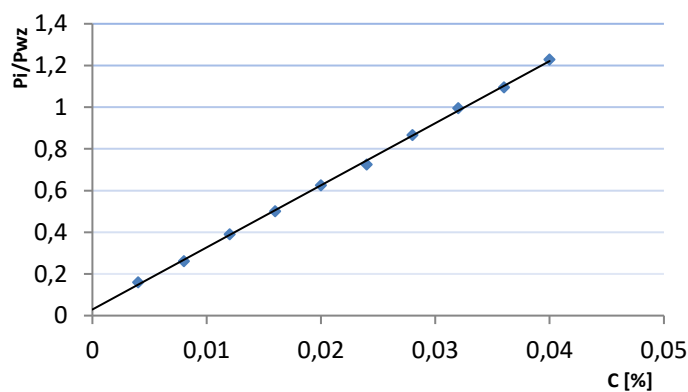
**Ryc. 5.12** Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **V**.

Tabela 5.12 Wyniki oznaczenia roztworów **VI** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz}=f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 31,564 \pm 0,706$ $b \pm \Delta b = - 0,045 \pm 0,017$ $S_y = 0,0111$ $S_a = 0,3062$ $S_b = 0,0076$ $r = 0,999$
1.	1,0	0,004	0,091	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz}=f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 29,94 \pm 0,666$ $S_y = 0,0105$ $S_a = 0,2887$ $r = 0,999$
2.	2,0	0,008	0,189	
3.	3,0	0,012	0,326	
4.	4,0	0,016	0,475	
5.	5,0	0,020	0,597	
6.	6,0	0,024	0,702	
7.	7,0	0,028	0,838	
8.	8,0	0,032	0,959	
9.	9,0	0,036	1,093	
10.	10,0	0,04	1,218	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz}=f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{s_b} = - 5,99$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.

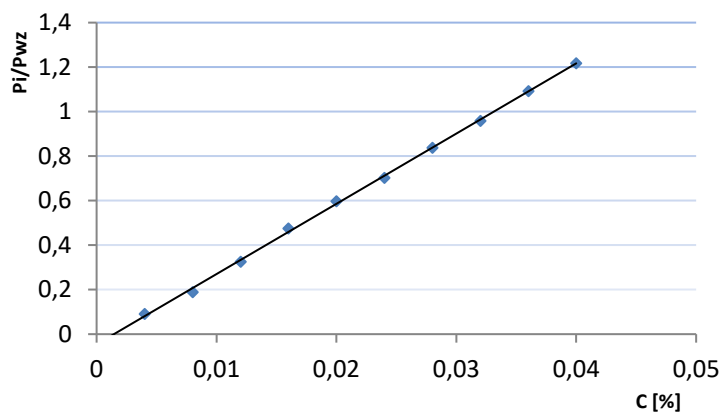
**Ryc. 5.13** Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **VI**.

Tabela 5.13 Wyniki oznaczenia roztworów **VII** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	<p>Ocena statystyczna równania prostej</p> $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 28,341 \pm 1,043$ $b \pm \Delta b = 0,011 \pm 0,026$ $S_y = 0,0167$ $S_a = 0,461$ $S_b = 0,011$ $r = 0,999$ <p>Ocena statystyczna równania prostej</p> $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 29,747 \pm 0,983$ $S_y = 0,015$ $S_a = 0,243$ $r = 0,999$
1.	1,0	0,004	0,114	
2.	2,0	0,008	0,249	
3.	3,0	0,012	0,349	
4.	4,0	0,016	0,446	
5.	5,0	0,02	0,584	
6.	6,0	0,024	0,692	
7.	7,0	0,028	0,828	
8.	8,0	0,032	0,927	
9.	9,0	0,036	1,043	
10.	10,0	0,04	1,155	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz} = f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{sb} = 0,992$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.

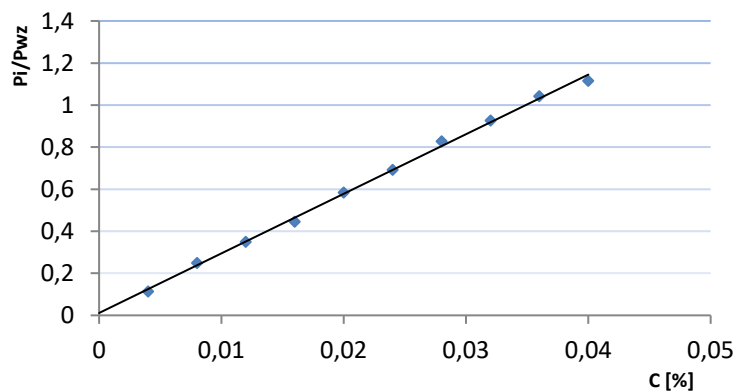
**Ryc. 5.14** Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **VII**.

Tabela 5.14 Wyniki oznaczenia roztworów **VIII** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 25,407 \pm 1,030$ $b \pm \Delta b = -0,015 \pm 0,025$ $S_y = 0,0165$ $S_a = 0,4554$ $S_b = 0,0113$ $r = 0,998$ Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 24,86 \pm 0,971$ $S_y = 0,0156$ $S_a = 0,429$ $r = 0,998$
1.	1,0	0,004	0,1083	
2.	2,0	0,008	0,1959	
3.	3,0	0,012	0,2743	
4.	4,0	0,016	0,3621	
5.	5,0	0,02	0,4784	
6.	6,0	0,024	0,6020	
7.	7,0	0,028	0,7120	
8.	8,0	0,032	0,8030	
9.	9,0	0,036	0,9023	
10.	10,0	0,04	0,9980	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz} = f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{S_b} = -1,356$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.

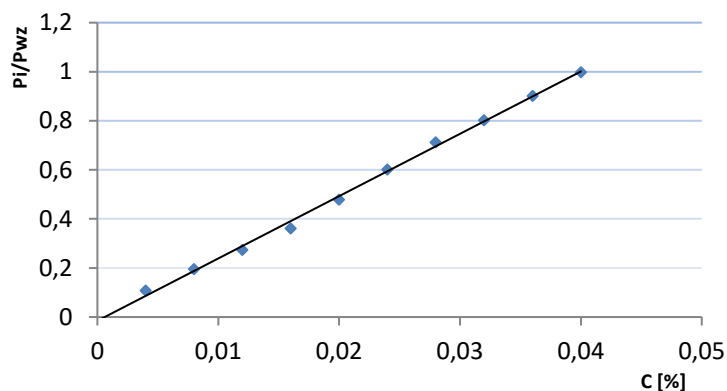
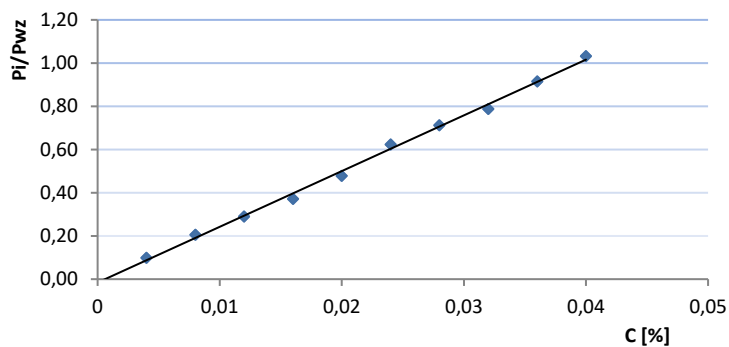
**Ryc. 5.15** Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **VIII**.

Tabela 5.15 Wyniki oznaczenia roztworów **IX** oraz ocena statystyczna krzywej wzorcowej

Lp.	Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie roztworów [%]	P_i/P_{wz}	Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax + b$ $a \pm \Delta a = 25,793 \pm 0,706$ $b \pm \Delta b = 1,131 \pm 0,016$ $S_y = 0,018$ $S_a = 0,500$ $S_b = 0,012$ $r = 0,998$ Ocena statystyczna równania prostej $P_i/P_{wz} = f(c); y = ax$ $a \pm \Delta a = 25,230 \pm 1,066$ $S_y = 0,0171$ $S_a = 0,471$ $r = 0,998$
1.	1,0	0,004	0,0987	
2.	2,0	0,008	0,2060	
3.	3,0	0,012	0,2897	
4.	4,0	0,016	0,3721	
5.	5,0	0,020	0,4789	
6.	6,0	0,024	0,6240	
7.	7,0	0,028	0,7120	
8.	8,0	0,032	0,7880	
9.	9,0	0,036	0,9156	
10.	10,0	0,04	1,0320	

Wartość współczynnika b prostej $P_i/P_{wz} = f(c)$ jest nieistotna, co wykazano testem t-Studenta;

$\frac{b}{s_b} = -1,268$; wartość ta jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{0,5}(8) = 2,306$.

**Ryc. 5.16** Prostoliniowa zależność $P_i/P_{wz} = f(c)$ dla związku **IX**.

Granica wykrywalności i oznaczalności metody HPLC

Wzory do obliczeń zostały przedstawione w rozdziale 2.7, a wyznaczone granice wykrywalności i oznaczalności dla związków **I - IX** przedstawiono w Tabeli 5.16.

Tabela 5.16 Granica wykrywalności i oznaczalności związków **I – IX** metody HPLC

Związek	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
LOD [%]	0,0020	0,0027	0,0009	0,0024	0,0011	0,0011	0,0016	0,0020	0,0022
LOQ [%]	0,0063	0,0083	0,0029	0,0073	0,0035	0,0035	0,0050	0,0062	0,0067

5.4.2 Warunki badań kinetycznych

Analizując reakcje rozkładu związków **I – IX** zachodzące w warunkach RH = 0% oraz w RH = 76,4% w temperaturze 363 K, uzyskano półlogarytmiczne prostoliniowe zależności stężenia substratu (P_i/P_{wz}) od czasu $t_0 \rightarrow t_\infty$. Otrzymane zależności można opisać równaniem:

$$\ln c_t = \ln c_0 - k t$$

gdzie: c_0 – stężenie procentowe związku w czasie t_0 ; c_t – stężenie procentowe związku w czasie t ; k – stała szybkości reakcji [s^{-1}]; t – czas [h]

Parametry wyżej opisanego równania obliczono metodą najmniejszych kwadratów. Wyniki przeprowadzonych badań trwałości zestawiono w poniższych **Tabelach 5.17 – 5.34** i na **Rycinach 5.17 – 5.34**.

Opierając się na równaniu reakcji pierwszego rzędu, korzystano ze wzorów, dzięki którym można obliczyć biologiczny okres półtrwania leku ($t_{0,5}$) oraz czas pozwalający na obliczenie rozpadu 10% substancji leczniczej ($t_{0,1}$):

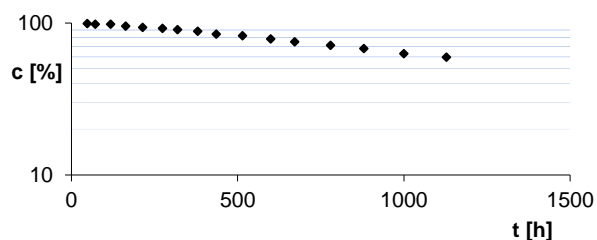
$$t_{0,5} = \frac{0,693}{k}$$

$$t_{0,1} = \frac{0,1054}{k}$$

gdzie: $t_{0,5}$ – czas rozpadu 50% leku; $t_{0,1}$ – czas rozpadu 10% leku; k – stała szybkości reakcji.

Tabela 5.17 Zmiany stężenia związku **I** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

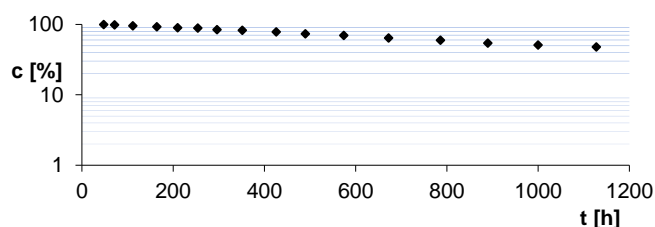
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	99,1	$a \pm \Delta a = -0,0004 \pm 3,13 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 101,79 \pm 1,018$ $S_y = 0,0192$ $S_a = 1,425 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0192$ $r = -0,992$
2	72	98,3	
3	112	98,1	
4	164	95,6	
5	192	93,6	
6	254	92,2	Parametry kinetyczne
7	296	90,5	$k \pm \Delta k = 1,21 \cdot 10^{-7} \pm 8,71 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 1588,27 [h]$ $t_{0,1} = 241,56 [h]$
8	380	87,4	
9	426	83,6	
10	490	80,6	
11	600	78,6	
12	672	75,3	
13	780	69,4	
14	880	67,8	
15	1000	66,9	
16	1128	62,5	



Ryc. 5.17 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **I** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.18 Zmiany stężenia związku **I** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	4	99,2	$a \pm \Delta a = -0,0007 \pm 0,00002$ $b \pm \Delta b = 103,85 \pm 1,01$ $S_y = 0,0125$ $S_a = 9,44 \cdot 10^{-6}$ $S_b = 0,0054$ $r = -0,998$
2	72	98,5	
3	112	95,2	
4	164	92,6	
5	210	89,6	
6	254	88,5	Parametry kinetyczne
7	296	84,2	$k \pm \Delta k = 1,953 \cdot 10^{-7} \pm 5,65 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 984,95 [h]$ $t_{0,1} = 149,80 [h]$
8	352	82,5	
9	426	77,9	
10	490	73,6	
11	574	69,6	
12	672	64,2	
13	786	59,4	
14	890	54,2	
15	1000	51,3	
16	1128	48,1	



Ryc. 5.18 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **I** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0\%$.

Tabela 5.19 Zmiany stężenia związku **II** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	99,9	$a \pm \Delta a = -0,0003 \pm 0,00002$ $b \pm \Delta b = 101,89 \pm 1,01$ $S_y = 0,0128$ $S_a = 1,03 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0056$ $r = -0,994$
2	72	99,1	
3	112	98,8	
4	164	97,6	
5	192	94,6	
6	254	92,8	Parametry kinetyczne
7	296	89,9	$k \pm \Delta k = 1,032 \cdot 10^{-7} \pm 6,17 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 1865,2 [h]$ $t_{0,1} = 283,69 [h]$
8	352	88,5	
9	426	86,9	
10	490	84,5	
11	574	81,6	
12	672	79,1	
13	786	78,5	
14	950	70,5	
15	1128	67,3	

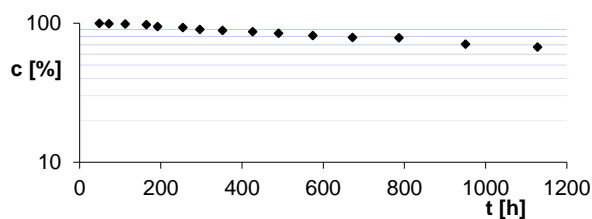
**Ryc. 5.19** Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **II** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.20 Zmiany stężenia związku **II** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	99,9	$a \pm \Delta a = -0,0052 \pm 5,84 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 101,79 \pm 1,03$ $S_y = 0,0335$ $S_a = 2,72 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0147$ $r = -0,983$
2	72	99,5	
3	112	98,2	
4	164	96,6	
5	210	93,6	
6	254	90,7	Parametry kinetyczne
7	296	86,5	$k \pm \Delta k = 1,464 \cdot 10^{-7} \pm 1,62 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 1314,72 [h]$ $t_{0,1} = 199,87 [h]$
8	352	82,5	
9	426	77,8	
10	490	75,1	
11	574	72,6	
12	672	69,5	
13	786	65,5	
14	950	63,2	
15	1128	59,63	

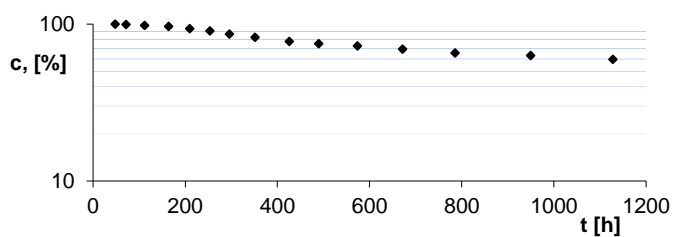
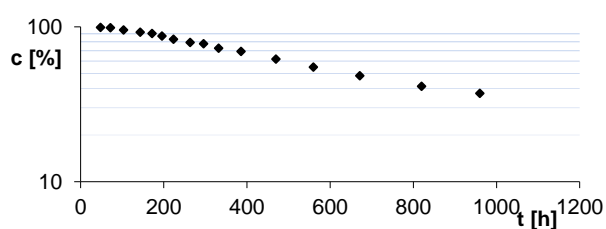
**Ryc. 5.20** Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **II** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0\%$.

Tabela 5.21 Zmiany stężenia związku **III** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

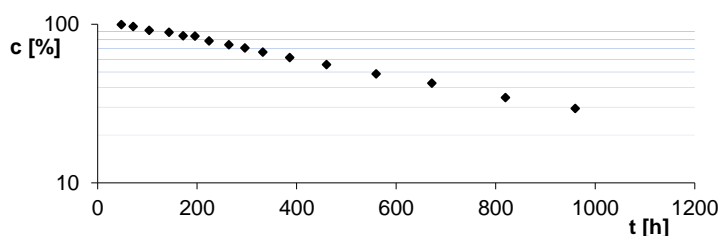
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	98,9	$a \pm \Delta a = -0,0011 \pm 4,17 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 107,45 \pm 1,02$ $S_y = 0,0203$ $S_a = 1,934 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0085$ $r = -0,998$
2	72	98,5	
3	104	95,6	
4	144	92,2	
5	172	90,7	
6	196	87,3	Parametry kinetyczne
7	224	83,3	$k \pm \Delta k = 3,192 \cdot 10^{-7} \pm 1,16 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 602,96 [h]$ $t_{0,1} = 91,06 [h]$
8	264	79,2	
9	296	77,6	
10	332	72,6	
11	386	69,5	
12	470	62	
13	560	54,9	
14	672	48,4	
15	820	41,2	
16	960	37,1	



Ryc. 5.21 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **III** w $T = 363 K$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.22 Zmiany stężenia związku **III** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

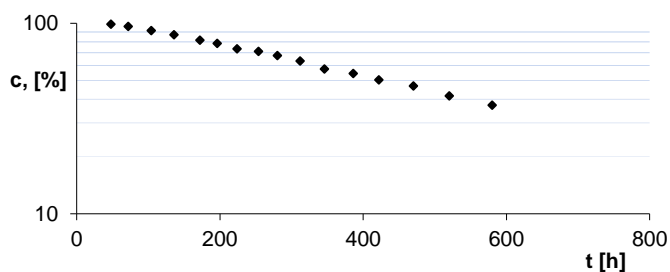
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	99,2	$a \pm \Delta a = -0,0013 \pm 3,22 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 106,35 \pm 1,01$ $S_y = 0,0157$ $S_a = 1,495 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0066$ $r = -0,999$
2	72	96,5	
3	104	91,6	
4	144	88,8	
5	172	84,6	
6	196	84,1	Parametry kinetyczne
7	224	78,6	$k \pm \Delta k = 3,798 \cdot 10^{-7} \pm 8,97 \cdot 10^{-9} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 507,01 [h]$ $t_{0,1} = 77,11 [h]$
8	264	74,2	
9	296	70,9	
10	332	66,6	
11	386	61,5	
11	460	55,6	
12	560	48,7	
13	672	42,4	
14	820	34,5	
15	960	29,4	



Ryc. 5.22 Półlogarymiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **III** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0\%$.

Tabela 5.23 Zmiany stężenia związku **IV** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

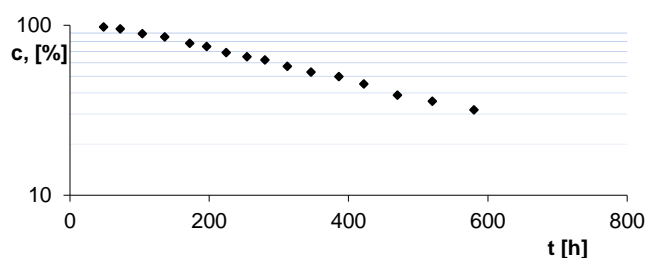
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	98,8	$a \pm \Delta a = -0,0018 \pm 5,71 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 111,6 \pm 1,01$ $S_y = 0,0165$ $S_a = 2,64 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0085$ $r = -0,998$
2	72	96,2	
3	104	91,5	
4	136	87,0	
5	172	81,5	
6	196	78,3	
7	224	73,4	Parametry kinetyczne
8	254	71,2	$k \pm \Delta k = 5,198 \cdot 10^{-7} \pm 1,587 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 370,33 [h]$ $t_{0,1} = 56,32 [h]$
9	280	67,6	
10	312	63,2	
11	346	57,5	
12	386	54,5	
13	422	50,3	
14	470	46,8	
15	520	41,5	
16	580	37,1	



Ryc. 5.23 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **IV** w $T = 363 K$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.24 Zmiany stężenia związku **IV** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

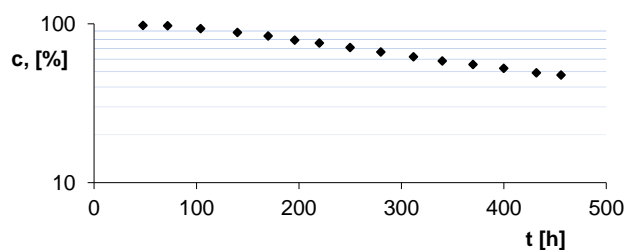
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	97,9	$a \pm \Delta a = -0,0021 \pm 6,79 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 112,96 \pm 1,02$ $S_y = 0,0196$ $S_a = 3,14 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0102$ $r = -0,998$
2	72	95,4	
3	104	89,3	
4	136	85,6	
5	172	78,4	
6	196	74,9	Parametry kinetyczne
7	224	69,1	$k \pm \Delta k = 6,07 \cdot 10^{-7} \pm 1,88 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 316,7 [h]$ $t_{0,1} = 48,12 [h]$
8	254	65,2	
9	280	62,4	
10	312	57,3	
11	346	53,1	
12	386	49,8	
13	422	45,1	
14	470	38,8	
15	520	35,7	
16	580	31,1	



Ryc. 5.24 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **IV** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0\%$.

Tabela 5.25 Zmiany stężenia związku **V** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

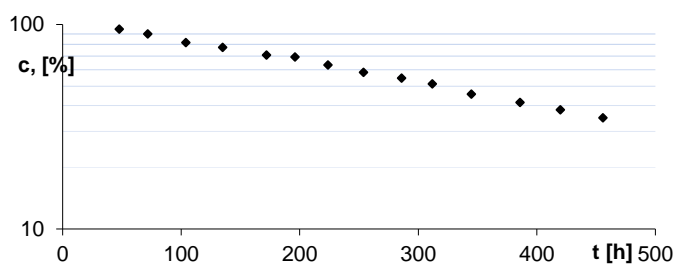
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	98,0	$a \pm \Delta a = -0,0019 \pm 8,68 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 112,89 \pm 1,02$ $S_y = 0,0199$ $S_a = 4,05 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0114$ $r = -0,997$
2	72	97,5	
3	104	93,5	
4	140	88,3	
5	170	84,2	
6	196	75,8	
7	220	71,2	Parametry kinetyczne
8	250	66,6	$k \pm \Delta k = 5,258 \cdot 10^{-7} \pm 2,412 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 366,12 [h]$ $t_{0,1} = 55,84 [h]$
9	280	62,2	
10	312	62,2	
11	340	58,5	
12	370	55,6	
13	400	52,5	
14	432	49,3	
15	456	47,8	



Ryc. 5.25 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **V** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.26 Zmiany stężenia związku **V** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

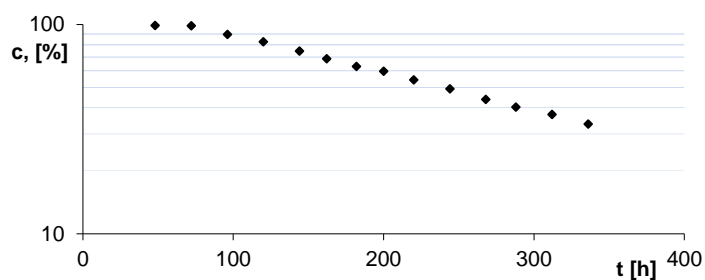
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	95,0	$a \pm \Delta a = -0,0024 \pm 8,14 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 107,91 \pm 1,02$ $S_y = 0,0177$ $S_a = 3,77 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0103$ $r = -0,998$
2	72	89,9	
3	104	81,5	
4	135	77,2	
5	172	70,8	
6	196	69,3	
7	224	63,3	Parametry kinetyczne
8	254	58,2	$k \pm \Delta k = 6,802 \cdot 10^{-7} \pm 2,26 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 283,00 [h]$ $t_{0,1} = 43,04 [h]$
9	286	54,6	
10	312	51,2	
11	345	45,6	
12	386	41,5	
13	420	38,3	
14	456	39,4	



Ryc. 5.26 Półlogarymiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **V** w $T = 363 K$ i $RH = 0\%$.

Tabela 5.27 Zmiany stężenia związku VI w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

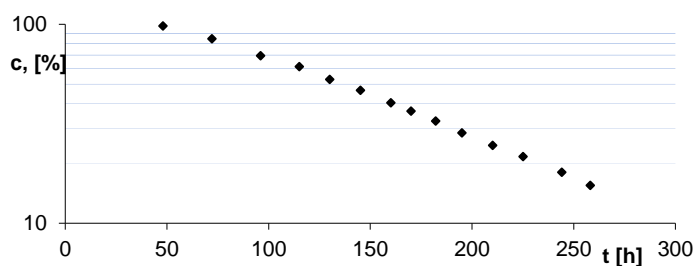
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	99,1	$a \pm \Delta a = -0,0039 \pm 1,87 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 129,88 \pm 1,04$ $S_y = 0,0282$ $S_a = 8,65 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0182$ $r = -0,997$
2	72	98,8	
3	96	89,8	
4	120	82,8	
5	144	74,8	
6	162	68,6	
7	182	63,1	Parametry kinetyczne
8	200	59,8	$k \pm \Delta k = 1,109 \cdot 10^{-6} \pm 5,19 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 173,55 [h]$ $t_{0,1} = 26,39 [h]$
9	220	54,5	
10	244	49,3	
11	268	43,9	
12	288	40,3	
13	312	37,2	
14	336	33,5	



Ryc. 5.27 Półlogarytmiczny wykres zależności $C(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu VI w $T = 363 K$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.28 Zmiany stężenia związku VI w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

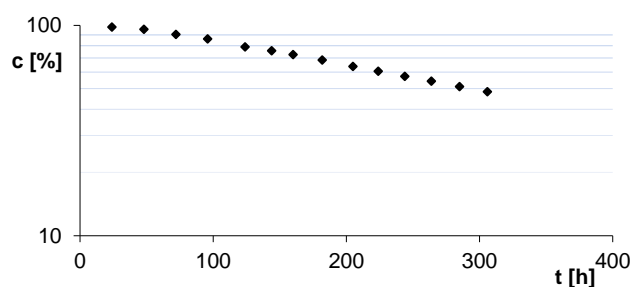
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	48	98,0	$a \pm \Delta a = -0,0089 \ 3,53 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 163,82 \pm 1,06$ $S_y = 0,037$ $S_a = 1,63 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,028$ $r = -0,998$
2	72	84,4	
3	96	69,5	
4	115	61,2	
5	130	52,8	
6	145	46,5	
7	160	40,3	Parametry kinetyczne
8	170	36,6	$k \pm \Delta k = 2,48 \cdot 10^{-6} \pm 9,81 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 77,32 [h]$ $t_{0,1} = 17,00 [h]$
9	182	32,7	
10	195	28,4	
11	210	24,6	
12	225	21,6	
13	244	18,0	
14	258	15,5	



Ryc. 5.28 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu VI w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0\%$.

Tabela 5.29 Zmiany stężenia związku **VII** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	24	98,4	$a \pm \Delta a = -0,0026 \pm 1,03 \cdot 10^{-4}$ $b \pm \Delta b = 108,95 \pm 1,02$ $S_y = 0,0153$ $S_a = 4,76 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,009$ $r = -0,998$
2	48	95,8	
3	72	90,8	
4	96	86,5	
5	124	79,2	
6	144	75,9	
7	160	72,8	Parametry kinetyczne
8	182	68,6	$k \pm \Delta k = 7,26 \cdot 10^{-7} \pm 2,85 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 265,09 [h]$ $t_{0,1} = 40,32 [h]$
9	205	63,8	
10	224	60,6	
11	244	57,3	
12	264	54,3	
13	285	51,2	
14	306	48,5	



Ryc. 5.29 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **VII** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.30 Zmiany stężenia związku **VII** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	24	98,5	$a \pm \Delta a = -0,00196 \pm 6,59 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 104,37 \pm 1,02$ $S_y = 0,0113$ $S_a = 3,05 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0062$ $r = -0,998$
2	48	93,8	
3	72	91	
4	96	85,8	
5	120	82,8	
6	144	78,8	
7	164	76,6	Parametry kinetyczne
8	185	74,1	$k \pm \Delta k = 5,44 \cdot 10^{-7} \pm 1,83 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 353,61 [h]$ $t_{0,1} = 53,78 [h]$
9	200	71,2	
10	220	67,6	
11	244	65,3	
12	268	62,3	
13	290	55,5	
14	314	55,5	
15	340	52,9	

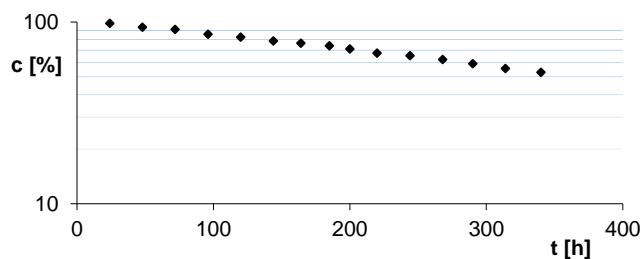
**Ryc. 5.30** Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **VII** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0\%$.

Tabela 5.31 Zmiany stężenia związku **VIII** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	24	92,7	$a \pm \Delta a = -0,0029 \pm 1,03 \cdot 10^{-4}$ $b \pm \Delta b = 101,61 \pm 1,02$ $S_y = 0,0177$ $S_a = 4,83 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0099$ $r = -0,998$
2	48	86,9	
3	72	82,5	
4	96	76,3	
5	120	72,2	
6	144	68,9	
7	164	64,6	Parametry kinetyczne
8	185	61,4	$k \pm \Delta k = 8,02 \cdot 10^{-7} \pm 2,87 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 239,88 [h]$ $t_{0,1} = 36,47[h]$
9	200	57,5	
10	220	54,1	
11	244	50,3	
12	268	46,1	
13	290	42,9	
14	314	40,08	
15	340	37,8	

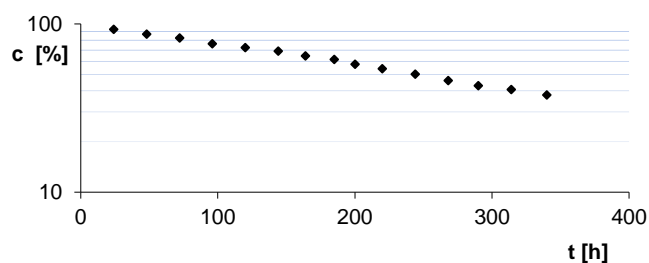
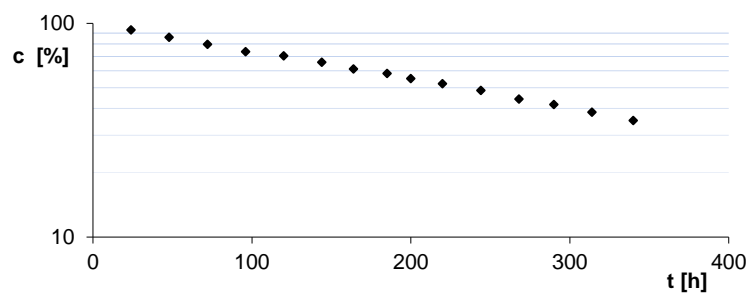
**Ryc. 5.31** Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **VIII** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.32 Zmiany stężenia związku **VIII** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

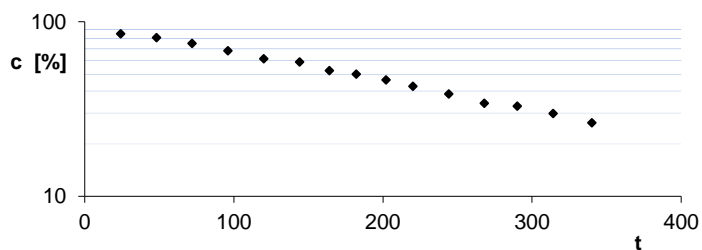
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	24	93,1	$a \pm \Delta a = -0,003 \pm 7,09 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 100,51 \pm 1,01$ $S_y = 0,0121$ $S_a = 3,30 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,0068$ $r = -0,999$
2	48	86,2	
3	72	79,9	
4	96	73,8	
5	120	70,4	
6	144	65,8	
7	164	61,2	Parametry kinetyczne
8	185	58,3	$k \pm \Delta k = 8,43 \cdot 10^{-7} \pm 1,97 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 228,26 [h]$ $t_{0,1} = 34,72 [h]$
9	200	55,2	
10	220	52,2	
11	244	48,5	
12	268	44,3	
13	290	41,7	
14	314	38,4	
15	340	35,1	



Ryc. 5.32 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **VIII** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0\%$.

Tabela 5.33 Zmiany stężenia związku **IX** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 76,4% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi

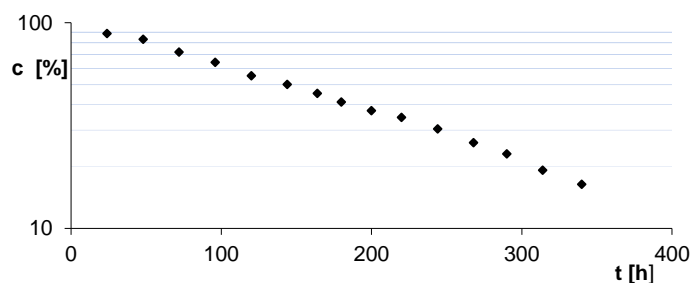
Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	24	85,16	$a \pm \Delta a = -0,0038 \pm 1,36 \cdot 10^{-4}$ $b \pm \Delta b = 97,61 \pm 1,03$ $S_y = 0,0232$ $S_a = 6,322 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,013$ $r = -0,998$
2	48	81,2	
3	72	75,1	
4	96	68,3	
5	120	61,5	
6	144	58,8	
7	164	52,4	Parametry kinetyczne
8	185	50,1	$k \pm \Delta k = 1,05 \cdot 10^{-6} \pm 3,67 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 183,00 [h]$ $t_{0,1} = 27,83[h]$
9	200	46,4	
10	220	42,6	
11	244	38,5	
12	268	34,1	
13	290	32,9	
14	314	29,8	
15	340	26,4	



Ryc. 5.33 Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **IX** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 74,6\%$.

Tabela 5.34 Zmiany stężenia związku **IX** w wyniku rozkładu w temperaturze 363 K przy RH = 0% wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi.

Lp.	t [h]	c _t [%]	Parametry prostej
1	24	88,6	$a \pm \Delta a = -0,0053 \pm 2,00 \cdot 10^{-4}$ $b \pm \Delta b = 106,46 \pm 1,04$ $S_y = 0,0343$ $S_a = 9,33 \cdot 10^{-5}$ $S_b = 0,019$ $r = -0,998$
2	48	83,2	
3	72	72,1	
4	96	64,2	
5	120	55,3	
6	144	50,2	
7	164	45,3	Parametry kinetyczne
8	180	41,1	$k \pm \Delta k = 1,47 \cdot 10^{-6} \pm 5,55 \cdot 10^{-8} [s^{-1}]$ $t_{0,5} = 130,4 [h]$ $t_{0,1} = 19,83 [h]$
9	200	37,4	
10	220	34,7	
11	244	30,5	
12	268	26,1	
13	290	23,0	
14	314	19,2	
15	340	16,4	

**Ryc. 5.34** Półlogarytmiczny wykres zależności $c(\%) = f(t[h])$ reakcji rozkładu **IX** w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0\%$.

5.4.3 Porównanie trwałości badanych związków z solami peryndoprylua) w warunkach RH = 76,4% oraz w T = 363 K – **Tabela 5.35****Tabela 5.35** Porównanie trwałości badanych związków z trwałością solami peryndoprylu w RH = 76,4% i w temperaturze 363 K.

Związek	Stała k [s ⁻¹]	t _{0,5} [h]	t _{0,1} [h]
I	$k \pm \Delta k = 1,21 \cdot 10^{-7} \pm 8,71 \cdot 10^{-9}$	t _{0,5} = 1588,27	t _{0,1} = 241,56
II	$k \pm \Delta k = 1,95 \cdot 10^{-7} \pm 5,65 \cdot 10^{-9}$	t _{0,5} = 984,95	t _{0,1} = 149,80
III	$k \pm \Delta k = 3,19 \cdot 10^{-7} \pm 1,16 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 602,96	t _{0,1} = 91,06
IV	$k \pm \Delta k = 5,19 \cdot 10^{-7} \pm 1,587 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 370,33	t _{0,1} = 56,32
V	$k \pm \Delta k = 5,25 \cdot 10^{-7} \pm 2,412 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 366,12	t _{0,1} = 55,84
VI	$k \pm \Delta k = 1,10 \cdot 10^{-6} \pm 5,19 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 173,55	t _{0,1} = 26,39
VII	$k \pm \Delta k = 7,26 \cdot 10^{-7} \pm 2,85 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 265,09	t _{0,1} = 40,32
VIII	$k \pm \Delta k = 8,02 \cdot 10^{-7} \pm 2,87 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 239,88	t _{0,1} = 36,47
IX	$k \pm \Delta k = 1,05 \cdot 10^{-6} \pm 3,67 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 183,00	t _{0,1} = 27,83
Peryndopryl tert-butyloaminy	$k \pm \Delta k = 2,25 \cdot 10^{-4} \pm 3,5 \cdot 10^{-5}$	t _{0,5} = 4,29	t _{0,1} = 1,58
Argininian perindoprylu	$k \pm \Delta k = 2,22 \cdot 10^{-6} \pm 1,05 \cdot 10^{-7}$	t _{0,5} = 86,46	t _{0,1} = 13,15

b) w warunkach RH = 0% oraz w T = 363 K – **Tabela 5.36****Tabela 5.36** Porównanie trwałości badanych związków z trwałością solami peryndoprylu w RH = 0% i w temperaturze 363 K.

Związek	Stała k [s ⁻¹]	t _{0,5} [h]	t _{0,1} [h]
I	$k \pm \Delta k = 1,95 \cdot 10^{-7} \pm 5,65 \cdot 10^{-9}$	t _{0,5} = 984,95	t _{0,1} = 149,80
II	$k \pm \Delta k = 1,46 \cdot 10^{-7} \pm 1,62 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 1314,72	t _{0,1} = 199,87
III	$k \pm \Delta k = 3,79 \cdot 10^{-7} \pm 8,97 \cdot 10^{-9}$	t _{0,5} = 507,01	t _{0,1} = 77,11
IV	$k \pm \Delta k = 6,07 \cdot 10^{-7} \pm 1,88 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 316,7	t _{0,1} = 48,12
V	$k \pm \Delta k = 6,80 \cdot 10^{-7} \pm 2,26 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 283,00	t _{0,1} = 43,04
VI	$k \pm \Delta k = 2,49 \cdot 10^{-8} \pm 9,81 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 125,4	t _{0,1} = 17,00
VII	$k \pm \Delta k = 2,41 \cdot 10^{-6} \pm 1,09 \cdot 10^{-7}$	t _{0,5} = 53,61	t _{0,1} = 53,78
VIII	$k \pm \Delta k = 8,43 \cdot 10^{-7} \pm 1,97 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 228,26	t _{0,1} = 34,72
IX	$k \pm \Delta k = 1,47 \cdot 10^{-6} \pm 5,55 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 130,4	t _{0,1} = 19,83
Peryndopryl tert-butyloaminy	$k \pm \Delta k = 2,60 \cdot 10^{-4} \pm 3,53 \cdot 10^{-5}$	t _{0,5} = 44,3	t _{0,1} = 6,7
Peryndopryl argininy	$k \pm \Delta k = 1,47 \cdot 10^{-6} \pm 7,27 \cdot 10^{-8}$	t _{0,5} = 130,83	t _{0,1} = 19,89

5.5 Badania in silico

Do rozważań mających na celu omówienie interakcji analogów I-ACE z otoczeniem chemicznym wzięto pod uwagę pochodne **I – IX**. Jako cel biologiczny, z uwagi na satysfakcjonującą rozdzielczość, wybrano pobrane z bazy Protein Data Bank białko **2c6n.pdb**, biorąc pod uwagę jego monomeryczną strukturę (łańcuch A). Mając na względzie opis oddziaływań ligand-otoczenie, wszystkie ww. analogi były w pierwszej fazie badań minimalizowane celem wytypowania rotameru o najniższej energii spośród grupy rotamerów wygenerowanych za pomocą dynamiki molekularnej (moduł „Molecular Dynamics Conformational Search” z użyciem oprogramowania *Gabedit 2.4.7*) [171,172], po czym, uzyskane w ten sposób geometrie rotamerów, były preoptymalizowane przy pomocy metodologii półempirycznej PM7 [173] z użyciem oprogramowania *Mopac 2016*. [174] Metodologia dynamiki molekularnej pozwoliła na względnie szybkie przeszukanie przestrzeni konformacyjnej, której bardziej dokładny opis został następnie dokonany z wykorzystaniem relatywnie nowego i szczegółowo sparametryzowanego hamiltonianu PM7. Implementacja formalizmu DFT (*Gaussian G16 A.03*) [175] względem wytypowanych w ww. sposób rotamerów badanych związków zaowocowała udokładnieniem, w rozumieniu mechaniki kwantowej, geometrii i pozyskaniem zoptymalizowanych struktur ligandów. Kolejną fazą badań w przebiegu realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej było zastosowanie protokołu dokowania zoptymalizowanych w wyżej wymieniony sposób analogów do struktury enzymu konwertującego angiotensynę I (2c6n.pdb). W tym celu zoptymalizowane [podejście B3LYP/6-31G(d,p) w fazie gazowej] struktury badanych ligandów w środowisku linuxowym (*Ubuntu 16.04*) za pomocą programu *Open Babel 2.3.2* [176] przekształcono do formatu plików z rozszerzeniem *.mol2. Umożliwiło to przygotowanie pliku startowego (inputu) z rozszerzeniem *.pdbqt z użyciem oprogramowania *AutoDock Tools 1.5.6* [177], niezbędnym do uruchomienia procedury dokowania. Poza wskazaniem ścieżki dostępu do plików definiujących min. ładunki, typów atomów białka oraz dokowanego ligandu (w formacie *.pdbqt) pozostałe parametry pliku konfiguracyjnego przedstawiały się następująco:

center_x = -29.093

center_y = -17.095

center_z = -33.881

size_x = 40

size_y = 40

size_z = 36

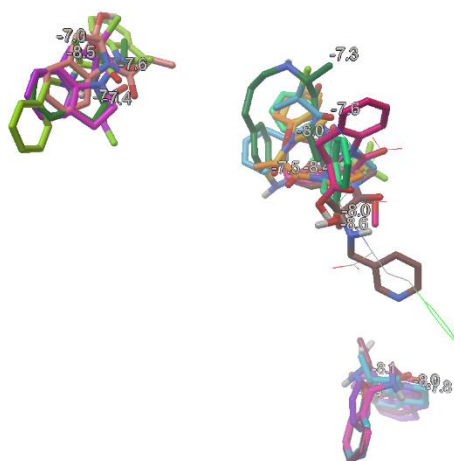
energy_range = 4

exhaustiveness = 20

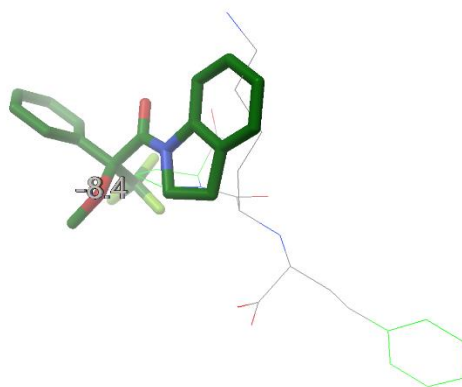
Zostały one wypracowane w toku przeprowadzonych uprzednio wielu procedur dokowania (z użyciem oprogramowania *AutoDock Vina* [178]) struktury referencyjnego liganda (lizynoprylu) po wycięciu go z natywnej struktury enzymu 2c6n.pdb i uzyskaniu satysfakcjonującego wyniku nałożenia się wygenerowanych w wyniku dokowania struktur („poses”). Tak zadokowanego liganda z geometrią oryginalnego, referencyjnego lizynoprylu wyekstrahowanego z kompleksu natywnego wariantu enzymu 2c6n.pdb. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 5.37** oraz na **Ryc. 5.35 – 5.39**.

Tabela 5.37 Energia powinowactwa („binding affinity”) zadokowanych struktur („Pose”) badanych izosterów **I - IX**

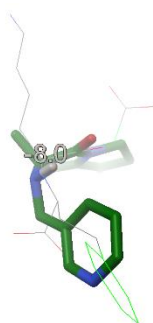
Poza	Energia powinowactwa („binding affinity”) [kcal/mol]								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
1	-8,6	-8,0	-8,4	-8,0	-8,6	-7,9	-7,3	-8,0	-7,8
2	-8,5	-7,7	-8,3	-7,4	-8,3	-7,7	-7,2	-7,9	-7,8
3	-8,2	-7,6	-8,0	-7,4	-8,2	-7,7	-7,0	-7,7	-7,6
4	---	-7,6	---	-7,3	-8,1	-7,6	-6,9	-7,7	-7,6
5	---	-7,5	---	-7,3	-8,0	-7,6	---	-7,7	-7,5
6	---	-7,5	---	-7,3	---	---	---	-7,7	---
7	---	---	---	-7,2	---	---	---	-7,7	---
8	---	---	---	-7,2	---	---	---	-7,6	---
9	---	---	---	---	---	---	---	---	---



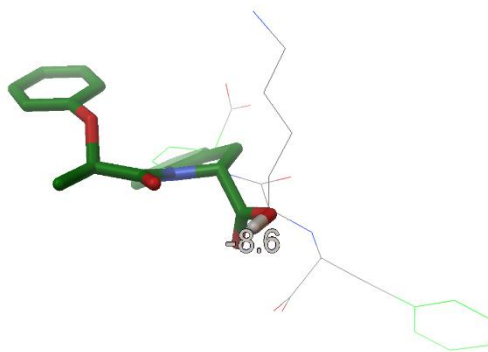
Ryc. 5.35 Położenie wygenerowanych w rankingu pierwszych struktur („póz”) badanych ligandów względem liganda referencyjnego.



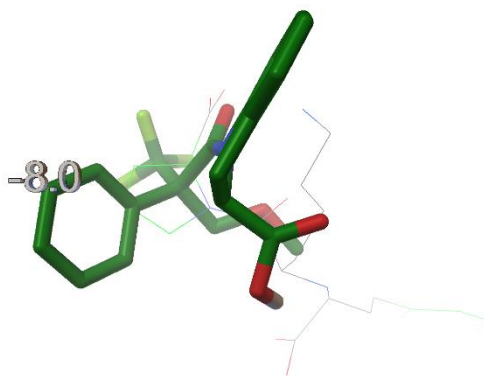
Ryc. 5.36 Położenie pierwszej wygenerowanej w rankingu struktury („pozy”) ligandu **III** względem liganda referencyjnego.



Ryc. 5.37 Położenie pierwszej wygenerowanej w rankingu struktury („pozy”) ligandu **IV** względem liganda referencyjnego.



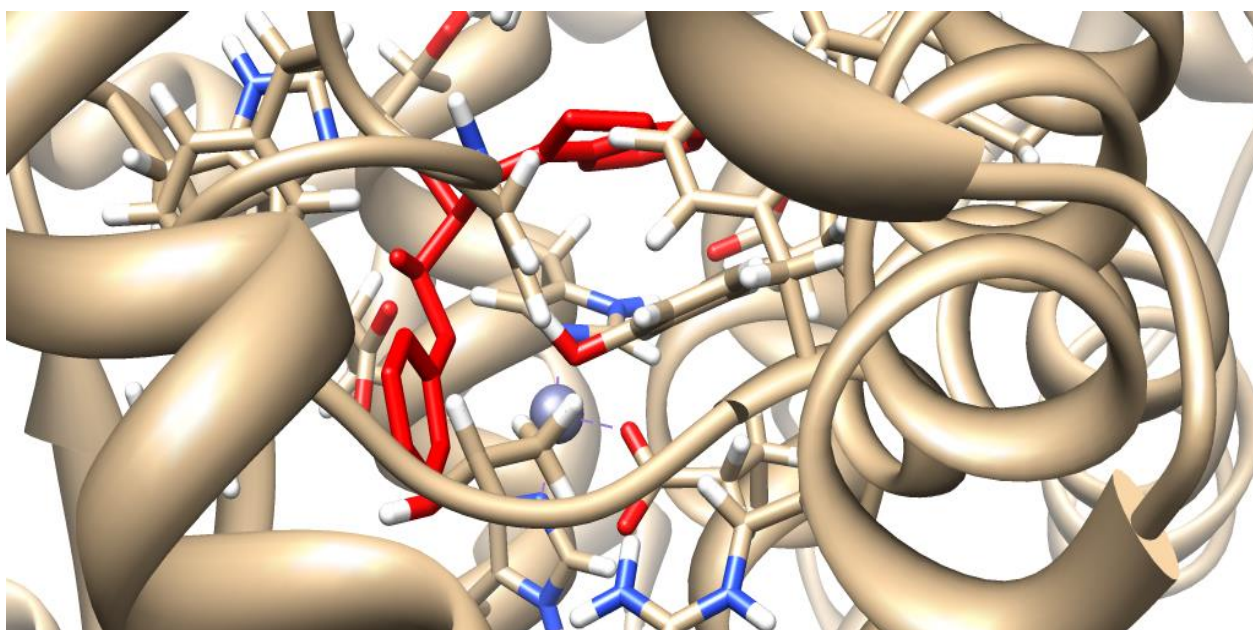
Ryc. 5.38 Położenie pierwszej wygenerowanej w rankingu struktury („pozy”) ligandu **V** względem liganda referencyjnego.



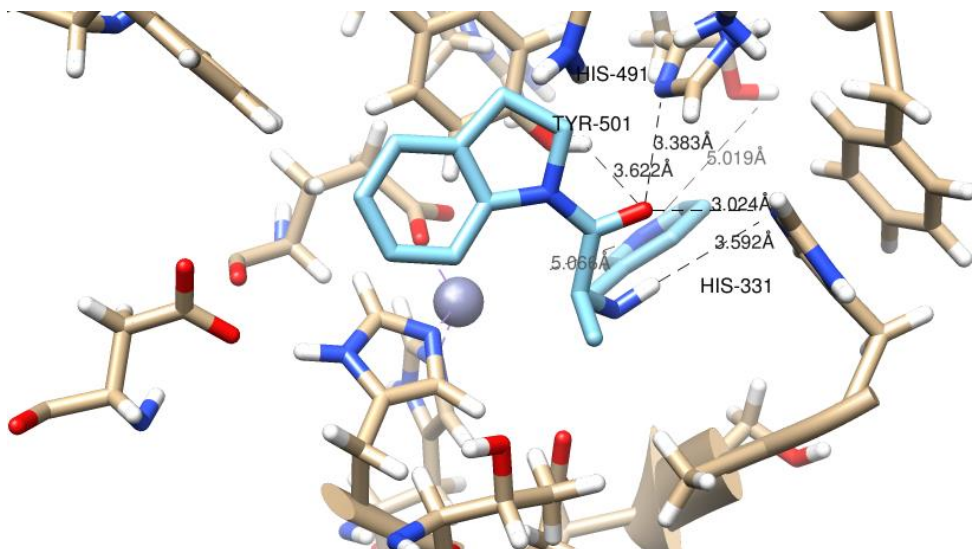
Ryc. 5.39 Położenie pierwszej wygenerowanej w rankingu struktury („pozy”) ligandu **VIII** względem liganda referencyjnego.

W obliczu tak przygotowanych parametrów dokowania w kolejnym kroku wykorzystano je do zadokowania zoptymalizowanych uprzednio badanych ligandów **I - IX**, a uzyskany ranking wygenerowanych przez program struktur („póz”, ang. *poses*) zestawiono w **Tabeli 5.36**. Zastosowana w programie funkcja skorująca jedynie wobec pochodnych **VIII** oraz **V** zaowocowała otrzymaniem aż dziewięciu póz różniących się wartością *binding affinity* wynoszącą maksymalnie ok. 0,4 kcal/mol. Z kolei z punktu widzenia najbardziej ujemnej wartości wspomnianej energii (przy zerowej wartości średniego odchylenia standardowego RMSD wygenerowanego przez program, odnoszącej się do pierwszej pozy badanych pochodnych) najkorzystniej w omawianym rankingu wypadły analogi: **I** i **V** (-8,6 kcal/mol), **II** (-8,0 kcal/mol), **III** (-8,4 kcal/mol) oraz **VIII** (-8,0 kcal/mol), przy czym pozy pierwsze pochodnych **II** i **V** zlokalizowane były w znacznej odległości od położenia referencyjnego liganda (wartości energii *binding affinity* struktur zadokowanych odległe względem położenia

lizynoprylu zaznaczono w **Tab. 5.36** kolorem czerwonym). Ponadto zauważono, iż pierwsze struktury („pozy”) rankingu odnoszące się do związków **IV** (**Ryc. 5.37**) i **V** (**Ryc. 5.38**) nie pokrywały się znacząco z płaszczyzną referencyjnego liganda (zaznaczonego cienką linią na **Ryc. 5.40** i **5.41**; wartości energii *binding affinity* struktur tychże izosterów zaznaczono w **Tab. 5.36** w pogrubiony sposób), co miało miejsce w przypadku pochodnej **VIII** (**Ryc. 5.41**). Mając na względzie interakcje natury sterycznej oraz energetycznej, dalsze rozważania poświęcono pochodnej **VIII**. Postanowiono przy tym przeanalizować w ujęciu jakościowym i ilościowym rozkład kontaktów elektrostatycznych tworzonych przez analog **VIII** w kompleksie ligand-enzym (**Ryc. 5.40** i **Ryc. 5.41**).

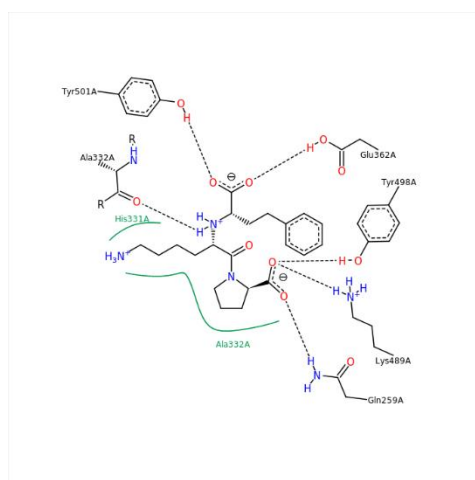


Ryc. 5.40 Wizualizacja interakcji między pierwszą pozą liganda **VIII** (kolor czerwony) a kieszenią enzymu 2c6n.pdb



Ryc. 5.41 Wizualizacja interakcji między pierwszą pozą liganda **VIII** a kieszenią enzymu 2c6n.pdb w odległości 5 Å od liganda

Wykazano przy tym, iż, mimo że jon Zn^{2+} znajdował się w odległości ok. 5 Å od endocyklicznych atomów azotu badanego związku, ligand **VIII** odznaczał się zdolnością do tworzenia trzech słabych wiązań wodorowych (w relacji donor-akceptor) z następującymi aminokwasami enzymu: Tyr-501 (oddziaływanie typu $C=O \cdots H-O$, długość wiązania 3,622 Å) oraz His-331 (oddziaływanie typu $C=O \cdots N$, długość wiązania 3,024 Å; oddziaływanie typu $H-O \cdots N$, długość wiązania 3,592 Å). Nie bez znaczenia okazała się również wykazująca stabilizujący wpływ na karbonyl liganda względna bliskość His-491 (odległość ok. 3,4 Å). Na uwagę zasługuje także fakt, iż aminokwasami kieszeni konwertazy angiotensyny tworzącymi wiązania wodorowe z badaną pochodną **VIII** były: His-331 oraz Tyr-501, które to okazują się także być istotne w interakcji referencyjnego lizynoprylu z omawianym enzymem (**Ryc. 5.42**).



Ryc. 5.42 Wizualizacja interakcji między lizynoprylem a aminokwasami kieszeni enzymu.

6. Omówienie wyników

Peryndopryl, należący do grupy I-ACE, jest lekiem szeroko stosowanym w leczeniu chorób układu krążenia, przede wszystkim w nadciśnieniu tętniczym i niewydolności serca. Jest on prolekiem zawierającym w swojej budowie ugrupowanie estrowe, w wątrobie ulega przekształceniu do aktywnego metabolitu – peryndoprylatu. Hydroliza, której jest poddawany peryndopryl w ustroju, zapewnia odpowiednią dostępność biologiczną, niemniej, w warunkach przechowywania, jest przyczyną nietrwałości. [2, 11] Fakt ten świadczy o konieczności monitorowania stabilności tej substancji i produktów leczniczych, aby zapewnić bezpieczeństwo i skuteczność terapii nadciśnienia. [9, 10] Leki z grupy I-ACE są stosowane w monoterapii, a także w terapii kombinowanej m.in. z hydrochlorotiazdem, będącym przedstawicielem diuretyków tiazydowych. Wykorzystując dwa uzupełniające się mechanizmy działania leków w terapii nadciśnienia, można obniżyć dawki podawane pacjentowi, zachowując efekt farmakologiczny, zmniejszając jednocześnie działania niepożądane.

W literaturze polskiej i światowej mało jest prac badawczych na temat stabilności peryndoprylu w substancji, w preparatach farmaceutycznych oraz brak gotowej postaci leku zawierającej peryndopryl i hydrochlorotiazyd, co zwróciło moją szczególną uwagę na ten obszar chemii medycznej. Przegląd piśmiennictwa dotyczący nowych doniesień o działaniu I-ACE stał się motywacją do pogłębienia wiedzy i dalszych badań. Mianowicie, z dostępnej literatury wiadomo, że u pacjentów, którzy byli długoterminowo leczeni tą grupą leków, obserwowano jednocześnie np. spadek objawów związanych z demencją czy obniżenie ryzyka udaru. W badaniach na modelach zwierzęcych, gdzie podawany był peryndopryl, odnotowano niższe stężenie utlenionego glutationu i podwyższony poziom glutationu zredukowanego w mózgu, co może świadczyć o protekcyjnym działaniu leku i zapobieganiu m.in. peroksydacji lipidów oraz białek. Zaobserwowany został także pozytywny wpływ I-ACE na poziomy dopaminy i hydroksylazy tyrozynowej (w modelu zwierzęcym choroby Parkinsona) oraz spadek stężenia amyloidu β (w modelu zwierzęcym choroby Alzheimera). Autorzy: K. Reardon *i in.*, Mashoody T. *i in.* oraz Dong Y. *i in.* w swoich opublikowanych badaniach sugerują, że I-ACE, a wśród tej grupy przede wszystkim peryndopryl, może wspomagać terapię chorób neurodegeneracyjnych. [38, 51, 59] Doniesienia te stały się dla mnie inspiracją do analizy potencjału antyoksydacyjnego peryndoprylu i innych leków z tej grupy.

Ze względu na nieefektywne wyniki terapii nadciśnienia, ciągle poszukuje się nowych substancji, które cechowałyby się nie tylko wielokierunkowym działaniem farmakologicznym, ale także wysoką trwałością bez względu na strefę klimatyczną. [2]

Obecne wyzwania współczesnej chemii medycznej są ukierunkowane na poszukiwania nowych substancji o ulepszonych strukturach i właściwościach fizyko-chemiczno-terapeutycznych, dlatego też w pracy doktorskiej podjęłam się opracowania i syntezy nowych związków o potencjalnym działaniu inhibującym enzym konwertazy angiotensyny.

Ze względu na złożoność badań, niniejszą pracę doktorską podzieliłam na dwa etapy. Pierwszy etap dotyczył dokładnej analizy trwałości w fazie stałej dwóch soli peryndoprylu (*in pure*) najczęściej stosowanych w leczeniu – *tert*-butyloaminy oraz argininianu oraz ich preparatów farmaceutycznych, a także mieszanin modelowych peryndoprylu z hydrochlorotiazidem. Ponadto oceniono właściwości antyoksydacyjne peryndoprylu i wybranych leków z grupy I-ACE.

Drugi etap pracy doktorskiej dotyczył syntezy związków o potencjale blokowania enzymu konwertazy angiotensyny i korzystniejszych właściwościach fizykochemicznych. Obejmował on badania struktury chemicznej i ocenę trwałości nowosyntezowanych związków w fazie stałej, a także właściwości antyoksydacyjnych, siły wiązania z enzymem (*in silico*) oraz badania biologiczne (ocena aktywności wobec AChE i BuChE).

ETAP PIERWSZY

Badanie trwałości peryndoprylu *tert*-butyloaminy i argininianu peryndoprylu

Walidacja metody analitycznej

Dobór właściwej metody pomiarowej jest gwarancją wiarygodności badania, stąd niezbędne jest przeprowadzenie jej walidacji.

Do swoich badań dotyczących oceny trwałości peryndoprylu *tert*-butyloaminy (PER_t) i argininianu peryndoprylu (PER_a) w pracy doktorskiej zastosowałam metodę RP-HPLC, która była wcześniej wykorzystana do podobnych analiz związków z grupy I-ACE. Metodę analityczną poddano rewalidacji. Oceniono parametry: selektywność, liniowość, limit

Omówienie wyników

wykrywalności, limit oznaczalności, precyzję (na poziomie niskim i wysokim) oraz dokładność.

Parametry rozdziału były następujące:

- faza stacjonarna: kolumna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm),
- faza ruchoma: acetonitryl - bufor fosforanowy (pH 2,0): 70: 30 v/v,
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,2 ml/min,
- detekcja spektrofotometryczna, analityczna długość fali: 215 nm,
- objętość nastrzyku: 20 µl,
- wzorzec wewnętrzny - metanolewy roztwór chlorowodoru oksymetazoliny (0,025 mg/ml).

Wyniki procesu rewalidacji PER_t i PER_a zostały przedstawione w **Tabeli 6.1**.

Tabela 6.1 Wyniki walidacji metody RP-HPLC dla PER_a i PER_t

Parametry	PER _a	PER _t
Zakres liniowości [%]	0,004 – 0,04	0,004 – 0,04
<i>Równanie prostej</i> $y = ax$		
Nachylenie prostej $a \pm \Delta a$	77,76 ± 2,52	28,62 ± 0,074
Odchylenie standardowe	0,0405	0,0119
Współczynnik korelacji (r)	0,999	0,999
Wartość <i>b</i> (istotność)	niestotna	niestotna
Limit wykrywalności (LOD) [%]	0,0017	0,0014
Limit oznaczalności (LOQ) [%]	0,0052	0,0042
Precyzja (RSD, niska; wysoka [%])	1,48 ; 1,98	1,55 ; 1,99
Dokładność (odzysk [%])	99,76; 100,79	99,98; 100,5

Metoda RP-HPLC spełniała wszystkie kryteria rewalidacyjne. Jest selektywna (czas retencji dla PER_t i PER_a ~ 5,5 min, produkt rozkładu ~ 3,5 min, wzorzec wewnętrzny ~ 9,5 min, Ryc. 3.1, Rodział 3), liniowa, precyzyjna, dokładna i o odpowiedniej czułości, stąd może być stosowana do badań dotyczących oceny trwałości peryndoprylu w postaci dwóch soli w fazie stałej.

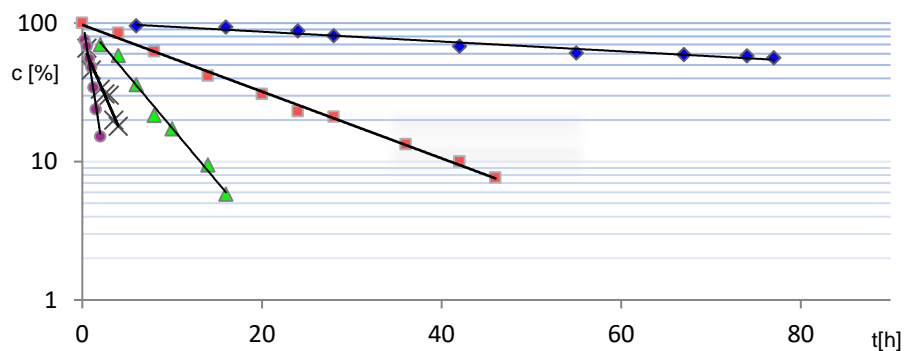
Trwałość peryndoprylu *tert*-butyloaminy i argininianu peryndoprylu w fazie stałej

Przeprowadzona metodą RP-HPLC analiza trwałości PER_t oraz PER_a w fazie stałej pozwoliła wyznaczyć parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu badanych związków. Dobranie różnych warunków w poszczególnych testach kinetycznych umożliwiło określenie wpływu najistotniejszych czynników zewnętrznych tj. wysokiej temperatury i wilgotności względnej powietrza na proces rozkładu.

- obniżona wilgotność względna powietrza $RH = 0\%$ i podwyższona temperatura

W obniżonej wilgotności względnej powietrza, zaobserwowano, iż rozkład PER_t oraz PER_a w powyższych warunkach przebiega zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. Wyznaczone stałe rozkładu posłużyły do wyznaczenia parametrów termodynamicznych. Wykresy zależności oraz obliczone parametry kinetyczne i termodynamiczne dla PER_t zostały przedstawione na **Ryc. 6.1** i w **Tabeli 6.2**, a dla PER_a na **Ryc. 6.2** i **Tabeli 6.3**, a szczegółowe dane są przedstawione w Rozdziale 4.

PER_t

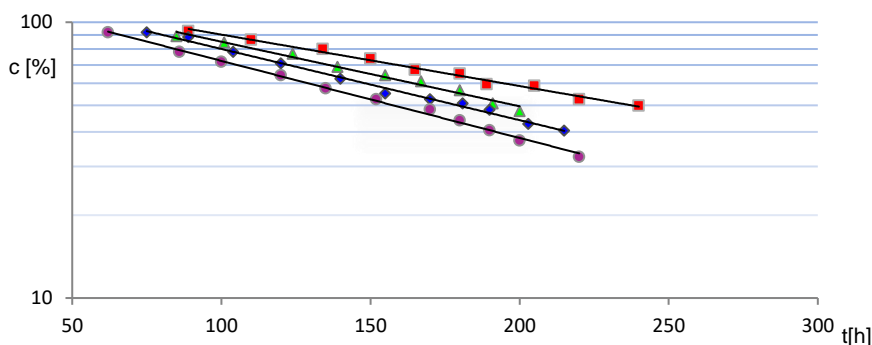


Ryc. 6.1 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t , $RH = 0\%$ w temp. od 333 K do 363 K, gdzie (♦) 333 K, (■) 343 K, (▲) 348 K, (x) 353 i (●) 363 K.

Tabela 6.2 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_t , $RH = 0\%$ w temp. od 333 K do 363 K

Parametry równania $\ln k = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
$a \pm \Delta a = -15363,55 \pm 4835,54$ $b \pm \Delta b = 32,05 \pm 13,35$ $S_y = 0,365$ $S_a = 19741,91$ $S_b = 4,809$ $r = -0,986$	$E_a = 127,74 \pm 40,20$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 125,26 \pm 42,68$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = 0,021 \pm 0,134$ [kJ/(K·mol)]

PER_a



Ryc. 6.2 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a, RH = 0% w temp. od 353 K do 383 K, gdzie (■) 353 K, (▲) 363 K, (◆) 373 K, i (●) 383 K.

Tabela 6.3 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a, RH = 0% w temp. od 353 K do 383 K

Parametry równania $\ln k = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
$a \pm \Delta a = -2656,4 \pm 1946,16$	
$b \pm \Delta b = -6,224 \pm 5,29$	$E_a = 22,086 \pm 16,18$ [kJ/mol]
$S_y = 0,099$	$\Delta H^\ddagger = 19,61 \pm 18,67$ [kJ/mol]
$S_a = 611,615$	$\Delta S^\ddagger = -0,296 \pm 0,200$ [kJ/(K·mol)]
$S_b = 1,663$	
$r = -0,951$	

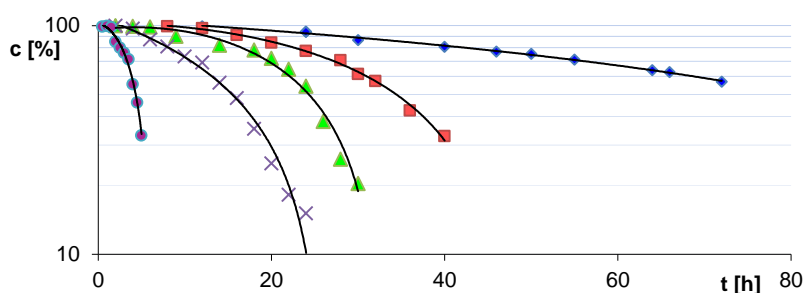
Omówienie wyników

Porównując stałe szybkości rozkładu PER_t *in pure* oraz PER_a *in pure* w obniżonej wilgotności $RH = 0\%$, zauważyłam, że w tych warunkach wzrost temperatury ma dużo większy wpływ na rozkład soli *tert*-butyloaminowej peryndoprylu. Ocenione czasy połowicznego rozkładu $t_{0,5}$ w $RH = 0\%$ i $T = 363$ K, które wynosiły odpowiednio dla PER_t 44,3 min., a dla PER_a 130,83 h, wskazują na większą nietrwałość PER_t .

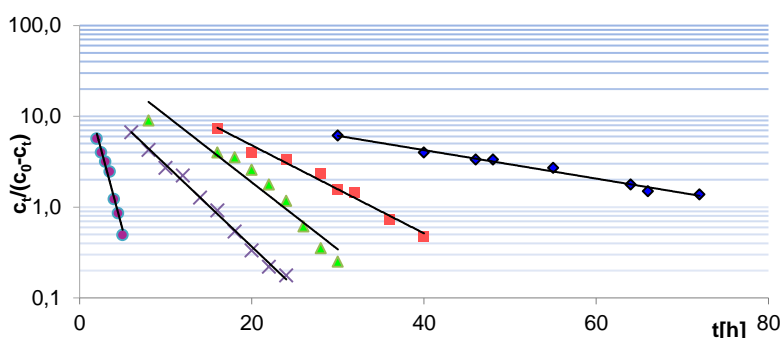
- podwyższona wilgotność względna powietrza $RH = 76,4\%$ oraz temperatura

PER_t

W tych warunkach kinetycznych PER_t *in pure* rozkłada się zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej. Zależności $\ln c(\%) = f(t)$ są sigmoidalne (**Ryc. 6.3**) natomiast zależności $\ln c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$ są prostoliniowe (**Ryc. 6.4**). Wyznaczone parametry termodynamiczne zostały przedstawione w **Tabeli 6.4**, a szczegółowe dane są przedstawione w Rozdziale 3.



Ryc. 6.3 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t , $RH = 76,4\%$ w temp. od 333 K do 363 K, gdzie (♦) 333 K, (■) 343 K, (▲) 348 K, (x) 353 i (●) 363 K.



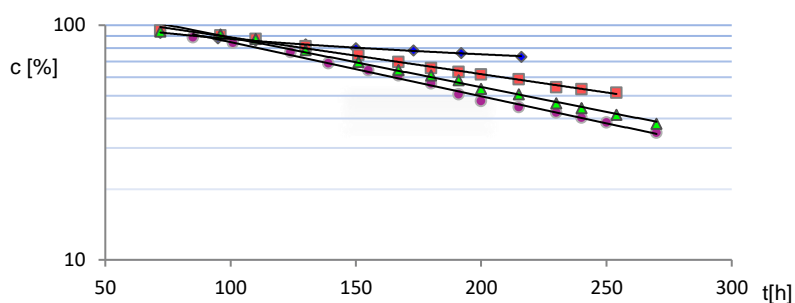
Ryc. 6.4 Wykres zależności $\ln c_t/(c_0 - c_t) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t , $RH = 76,4\%$ w temp. od 333 K do 363 K, gdzie (♦) 333 K, (■) 343 K, (▲) 348 K, (x) 353 i (●) 363 K.

Tabela 6.4 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a , RH = 76,4% w temp. od 333 K do 363 K

Parametry równania $\ln k = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
$a \pm \Delta a = -12001,05 \pm 2851,40$ $b \pm \Delta b = 24,51 \pm 8,20$ $S_y = 0,190$ $S_a = 1027,31$ $S_b = 2,97$ $r = -0,989$	$E_a = 99,78 \pm 23,70$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 97,30 \pm 26,18$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = 0,41 \pm 0,17$ [kJ/(K·mol)]

PER_a

Dla PER_a w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza krzywe rozkładu $\ln c(\%) = f(t)$ były prostoliniowe, co oznacza, że rozkład przebiega zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu – **Ryc. 6.5**, wyznaczone parametry termodynamiczne zostały umieszczone w **Tabeli 6.5**, a szczegółowe dane są przedstawione w Rozdziale 4.



Ryc. 6.5 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a , RH = 76,4% w temp. od 333 K do 363 K, gdzie (♦) 333 K, (■) 343 K, (▲) 353 K, (●) w 363 K.

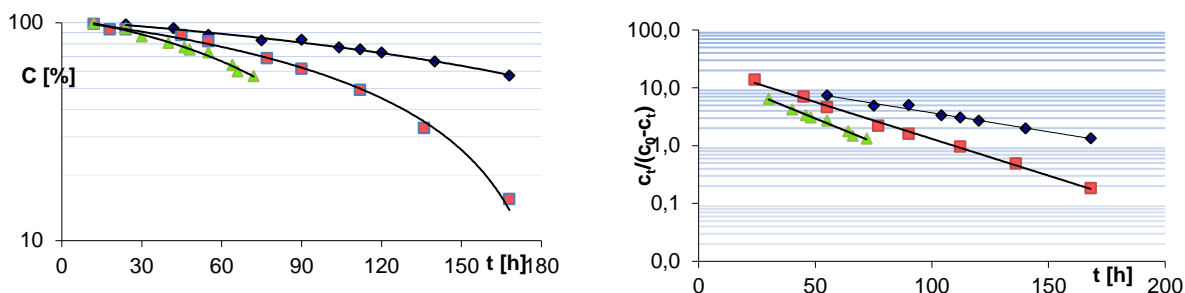
Tabela 6.5 Parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu PER_a , $RH = 76,4\%$ w temp. od 353 K do 383 K

Parametry równania $\ln k = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
$a \pm \Delta a = -6204,81 \pm 2409,27$	$E_a = 51,89 \pm 20,03$ [kJ/mol] $\Delta H^\ddagger = 49,11 \pm 22,50$ [kJ/mol] $\Delta S^\ddagger = -0,21 \pm 0,18$ [kJ/(K·mol)]
$b \pm \Delta b = 4,09 \pm 6,93$	
$S_y = 0,140$	
$S_a = 757,15$	
$S_b = 2,163$	
$r = -0,985$	

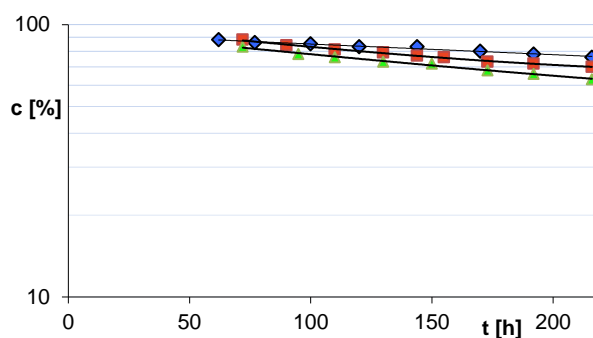
Zaobserwowałam, że podwyższona wilgotność względna powietrza przyspiesza rozkład badanych substancji. Ponieważ warunki środowiskowe miały wpływ na rozkład peryndoprylu *tert*-butyloaminy stwierdzono, że obecność wilgoci wpływa na mechanizm rozkładu związku PER_t . Takiej zależności nie zaobserwowałam przy soli argininianowej peryndoprylu, gdzie mechanizm rozkładu substancji przebiega tak samo zarówno w warunkach obniżonej, jak i podwyższonej wilgotności względnej powietrza. Stwierdziłam, że podwyższona wilgotność względna powietrza wpływa na mechanizm rozkładu tylko w przypadku PER_t . Zauważyłam także różnice w czasach połowicznego rozkładu PER_t i PER_a , które odpowiednio wynoszą: dla PER_t - 4,29 h, dla PER_a - 86,46 h (w $RH = 76,4\%$ i $T = 363$ K) i wskazują one, że większą trwałość w podwyższonej wilgotności względnej ma PER_a .

- Wpływ zmieniającej się wilgotności względnej powietrza RH od 50,9 % do 76,4% na trwałość PER_t i PER_a

Analizując wpływ różnych wilgotności względnych powietrza na trwałość PER_t (**Ryc. 6.6**) oraz PER_a (**Ryc. 6.7**), w stałej temperaturze $T = 333$ K, zaobserwowałam, iż wraz ze wzrostem poziomu $RH\%$ następuje eksponentyjalny wzrost stałych szybkości reakcji zgodnie z zależnością $\ln k = f(RH\%)$, której to wartość nachylenia określa wrażliwość badanej substancji na zmiany wilgotności. Z tego wnioskuję, iż im większa jest wartość wilgotności względnej powietrza w środowisku, gdzie przechowywana jest/będzie substancja lecznicza, tym jej trwałość jest niższa.



Ryc. 6.6 Po lewej - wykres zależności $\ln c (\%) = f(t)$ reakcji rozkładu, po prawej - wykres zależności $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t w RH od 50,9% do 76,4% i temp. 333 K, gdzie: (◆)RH = 50,9%, (■)RH = 66,35%, (▲)RH = 76,4%.

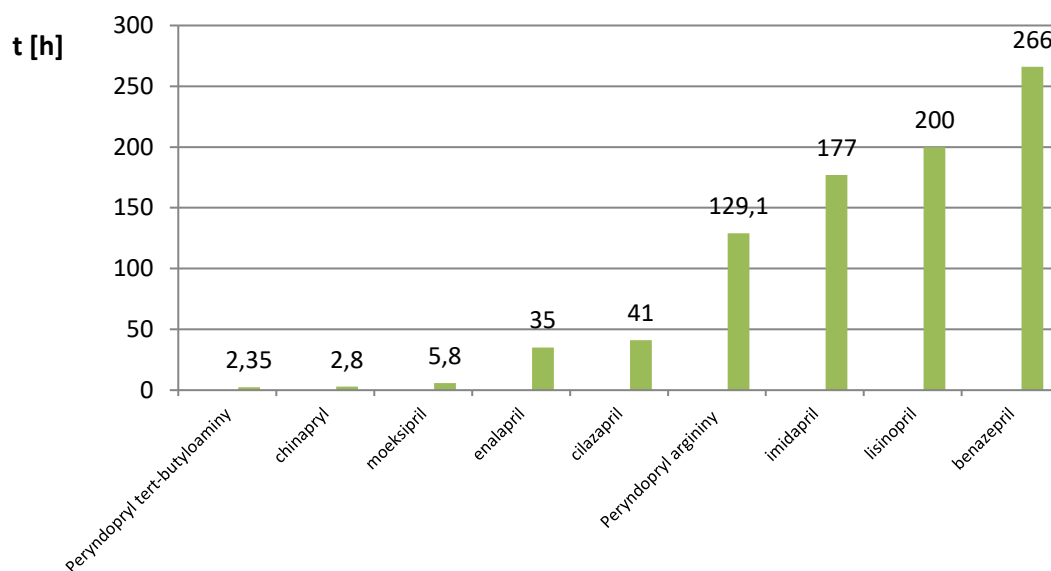


Ryc. 6.7 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w RH od 50,9% do 76,4% i temp. 333 K, gdzie: (◆)RH = 50,9%, (■)RH = 66,35%, (▲)RH = 76,4%.

Miarą oceny wpływu różnych wilgotności względnych powietrza na trwałość PER_t i PER_a jest nachylenie równania: $\ln k = f(RH [\%])$, które wynosi odpowiednio $a \pm \Delta a = 0,036 \pm 0,014$ dla PER_t oraz $a \pm \Delta a = 0,023 \pm 0,007$ dla PER_a . Analizując nachylenie prostej wywnioskowałam, iż rozkład PER_t jest bardziej wrażliwy na wilgotność względną powietrza i charakteryzuje się najniższym czasem półtrwania, tym samym zachowanie odpowiednich warunków podczas procesu produkcji, transportu i przechowywania wymaga szczególnej uwagi.

Analizując rozkład badanych substancji można wywnioskować, iż zarówno wilgotność względna powietrza jak i temperatura mają negatywny wpływ na trwałość PER_t i PER_a , szczególnie wrażliwa jest sól *tert*-butyloaminowa peryndoprylu. Substancje te należy przechowywać w pojemnikach bez dostępu wilgoci i wysokich temperatur. Jego niska stabilność jest szczególnie widoczna przy zestawieniu z innymi lekami z grupy I-ACE, przebadanymi w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej UMP (**Ryc. 6.8**).

Omówienie wyników



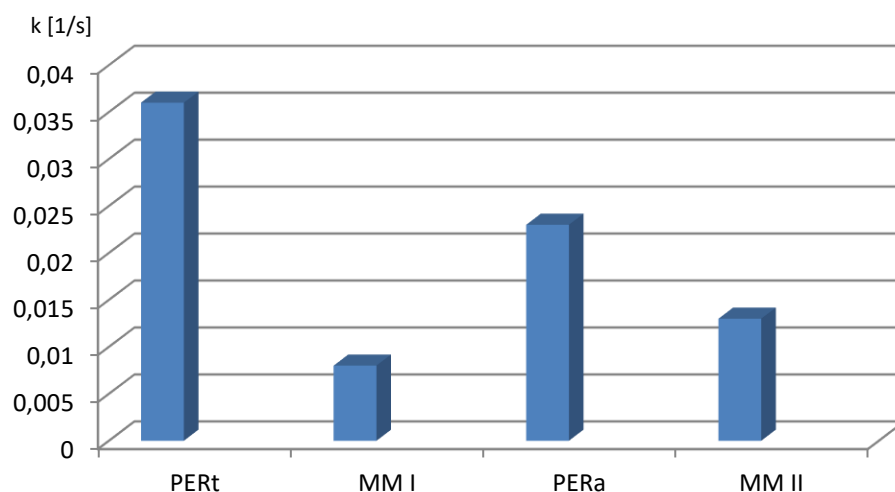
Ryc. 6.8 Porównanie $t_{0,5}$ dla wybranych I-ACE w temp. 363 K i RH 76,4%.

Wpływ hydrochlorotiazydu (HTH) na trwałość soli peryndoprylu

Przygotowano mieszaniny modelowe (MM) PER_t i PER_a z HTH w stosunku wagowym:

- 8 PER_t : 12,5 HTH (tabletki z PER_t zawierają 4 mg lub 8 mg PER_t) – MM I,
- 10 PER_a : 12,5 HTH (tabletki z PER_a zawierają 5 mg lub 10 mg PER_a) – MM II.

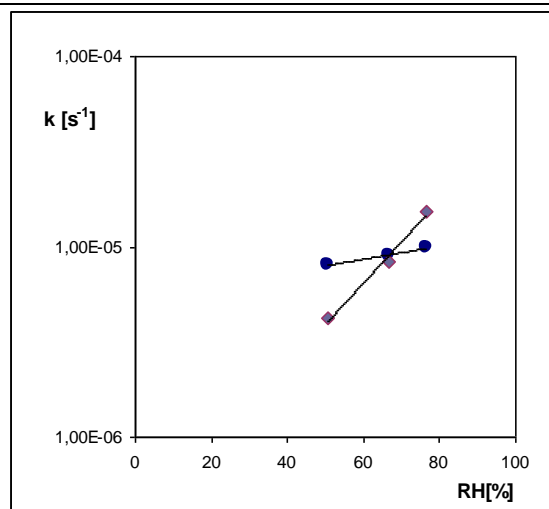
Dokonano oceny trwałości PER_t *in pure*, PER_a *in pure* oraz ich mieszanin modelowych z HTH przy RH od 50,9% do 76,4% i $T = 333$ K. Wyznaczono stałe szybkości rozkładu i oceniono zależność $\ln k_i = f(RH\%)$. Nachylenia prostej $y = a RH\% + b$ świadczą o wpływie wilgotności względnej powietrza na trwałość PER_t i PER_a w mieszaninach modelowych. Porównując te nachylenia zauważyłam, iż stabilność PER_t i PER_a wzrasta w obecności HTH (Ryc. 6.9, 6.10, 6.11, Tabela 6.6, Tabela 6.7), a bardziej protekcyjny charakter HTH zaobserwowałam w przypadku PER_t .



Ryc. 6.9 Porównanie nachyleń prostych a (z równania $y = a RH\% + b$) dla PER_t *in pure* i PER_a *in pure* oraz MM I i MM II w temp. 333 K i RH od 50,9% do 76,4%.

Tabela 6.6 Stałe szybkości rozkładu PER_t *in pure* oraz w mieszaninie modelowej (MM I) z HTH, $T = 333\text{ K}$

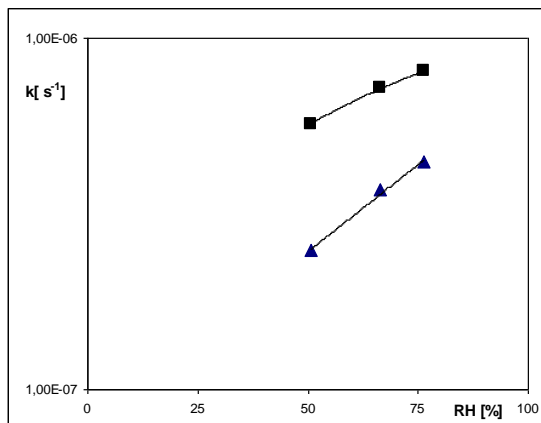
MM I (●)		
RH [%]	$k[s^{-1}]$	Parametry kinetyczne
		$y = a \text{ RH}\% + b$
76,4	$(9,89 \pm 0,37) 10^{-6}$	$a \pm \Delta a = 0,008 \pm 0,004$
66,5	$(8,99 \pm 0,47) 10^{-6}$	$b \pm \Delta b = -12,15 \pm 0,29$
50,9	$(8,00 \pm 0,79) 10^{-6}$	$r = 0,992$
		$S_b = 0,069$
		$S_y = 0,019$
PER_t <i>in pure</i> (◆)		
76,4	$(1,05 \pm 0,11) 10^{-5}$	$a \pm \Delta a = 0,036 \pm 0,014$
66,5	$(8,14 \pm 0,36) 10^{-6}$	$b \pm \Delta b = -14,19 \pm 1,21$
50,9	$(4,19 \pm 0,55) 10^{-6}$	$r = 0,993$
		$S_b = 0,280$
		$S_y = 0,0079$



Ryc. 6.10 Zależność stałej rozkładu ($k[1/s]$) od wilgotności względnej RH 50,9% - 76,4% dla PER_t *in pure* (◆) i MM I (●), temp. 333 K.

Tabela 6.7 Stałe szybkości rozkładu PER_a *in pure* oraz w mieszaninie modelowej (MM II) z HTH, $T = 333\text{ K}$

MM II (■)		
RH [%]	$k[s^{-1}]$	Parametry kinetyczne
		$y = a \text{ RH}\% + b$
76,4	$(8,06 \pm 0,42) 10^{-7}$	$a \pm \Delta a = 0,013 \pm 0,004$
66,5	$(7,25 \pm 0,56) 10^{-7}$	$b \pm \Delta b = -15,11 \pm 0,32$
50,9	$(5,70 \pm 0,72) 10^{-7}$	$r = 0,997$
		$S_b = 0,042$
		$S_y = 0,012$
PER_a <i>in pure</i> (▲)		
76,4	$(4,43 \pm 0,47) 10^{-7}$	$a \pm \Delta a = 0,023 \pm 0,007$
66,5	$(3,69 \pm 0,47) 10^{-7}$	$b \pm \Delta b = -16,35 \pm 0,442$
50,9	$(2,49 \pm 0,38) 10^{-7}$	$r = 0,997$
		$S_b = 0,102$
		$S_y = 0,029$



Ryc. 6.11 Zależność stałej rozkładu ($k[1/s]$) od wilgotności względnej RH 50,9% - 76,4% dla PER_a *in pure* (▲) i MM II (■), temp. 333 K.

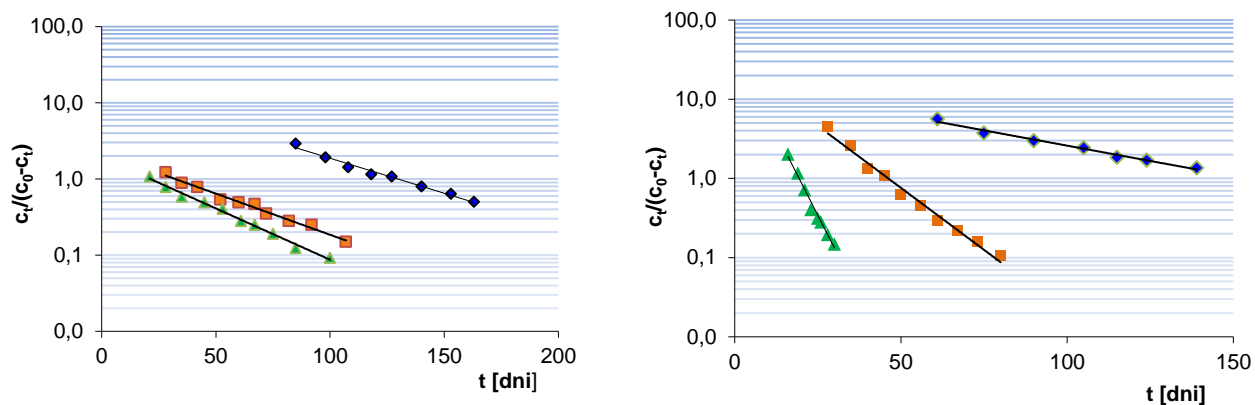
Omówienie wyników

Zaobserwowano, iż w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza PER_t *in pure* i PER_a *in pure* oraz w mieszaninach modelowych z HTH rozkładały się według tych samych mechanizmów, mianowicie reakcji autokatalizy w przypadku PER_t i reakcji I-rzędu w przypadku PER_a . HTH nie ma wpływu na mechanizm rozkładu badanych substancji. Ponadto, HTH nie ma także wpływu na rodzaj powstających w czasie degradacji produktów, gdyż analiza metodą ESI/MS potwierdziła obecność produktów hydrolizy i cyklizacji, które były wcześniej obserwowane po rozkładzie PER_t *in pure* i PER_a *in pure* (Rozdział 4.5). Niemniej jednak, HTH wpływa na szybkość rozkładu obu badanych soli PER. Analizując wpływ wilgoci dla mieszanin soli PER z HTH można zaobserwować, że większą różnicę wartości nachylenia prostej $y = aRH\% + b$ dla PER_t . Z moich przeprowadzonych badań wynika, iż połączenie perindoprylu oraz hydrochlorotiazynu w jednym preparacie farmaceutycznym – tabletki, będzie korzystne nie tylko dla pacjenta w terapii kombinowanej (ponieważ będzie mógł przyjmować jeden preparat), ale wpłynie także pozytywnie na trwałość substancji, zwłaszcza PER_t .

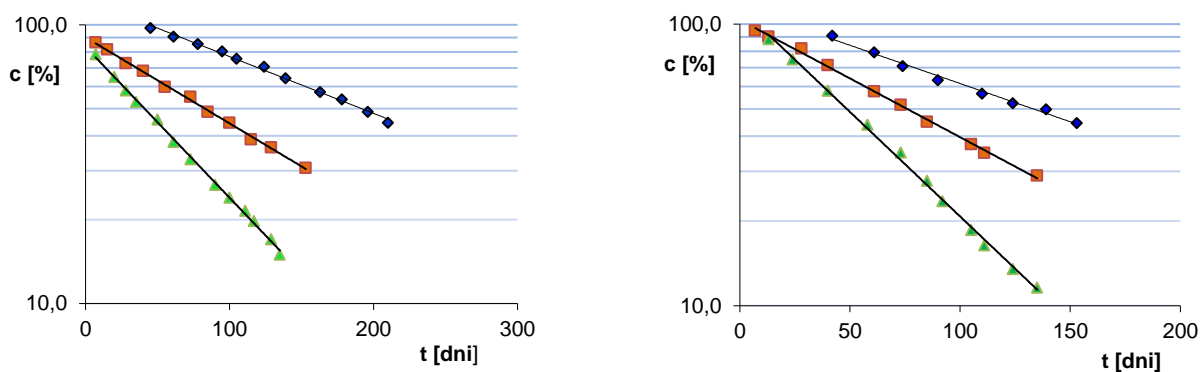
Trwałość peryndoprylu tert-butyloaminy i argininianu peryndoprylu w tabletkach

Należy zwrócić uwagę na fakt, iż pacjenci nie zawsze dostosowują się do zalecanych przez producentów warunków przechowywania preparatów farmaceutycznych (np. wyciąganie tabletek z opakowania handlowego, przepoławianie ich, umieszczanie w kasetkach miesięcznych), a niewłaściwe warunki przechowywania preparatów mogą mieć wpływ na jakość terapii. Postanowiono przeanalizować wpływ temperatury od 303 K do 323 K i RH 76,4% na trwałość preparatów z peryndoprylem poza opakowaniem bezpośrednim / handlowym. Zaplanowane badanie obejmowało analizę trwałości PER_t i PER_a w tabletkach przechowywanych w całości bez blistra oraz w formie przepoławionej. Zaobserwowany rozkład preparatów z PER_t oraz PER_a przedstawiono na **Ryc 6.12** i **6.13**. W wybranych warunkach, w tabletkach bez opakowania handlowego oraz w tabletkach w formie przepoławionej PER_t rozkładał się zgodnie z mechanizmem autokatalitycznym, natomiast PER_a zgodnie z mechanizmem reakcji pierwszego rzędu.

Omówienie wyników



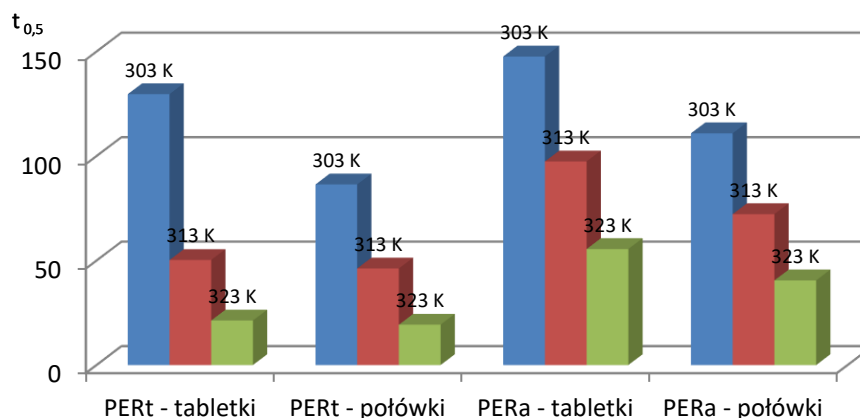
Ryc. 6.12 Wykres zależności $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_t w tabletkach – po prawej- w całości, po lewej - przepołowionych, w RH 76,4 % i temp. (◆) 303 K, (■) 313 K, (▲) 323 K.



Ryc. 6.13 Wykres zależności $\ln c(\%) = f(t)$ reakcji rozkładu PER_a w tabletkach – po prawej- w całości, po lewej - przepołowionych, w RH 76,4 % i temp. (◆)303 K, (■)313 K, (▲) 323 K.

Uzyskane wyniki sugerują, że proces tabletkowania i substancje pomocnicze nie wpływają na zmianę kinetycznego mechanizmu reakcji rozkładu żadnej z soli PER. Jednakże wyznaczone $t_{0,5}$ (**Ryc. 6.14**) wskazują, iż przechowywanie w formie przepołowionej PER_a nie wpływa istotnie na jego trwałość, natomiast w przypadku PER_t proces ten znacząco przyspiesza jego rozkład i nie jest zalecane przechowywanie preparatów z tą solą w formie przepołowionej przez dłuższy czas, czego pacjenci powinni być świadomi.

Omówienie wyników



Ryc. 6.14 Porównanie czasów $t_{0,5}$ dla badanych PER_t i PER_a w całości oraz w formie przepołówionej, temp. od 303 K do 323 K, RH 76,4%.

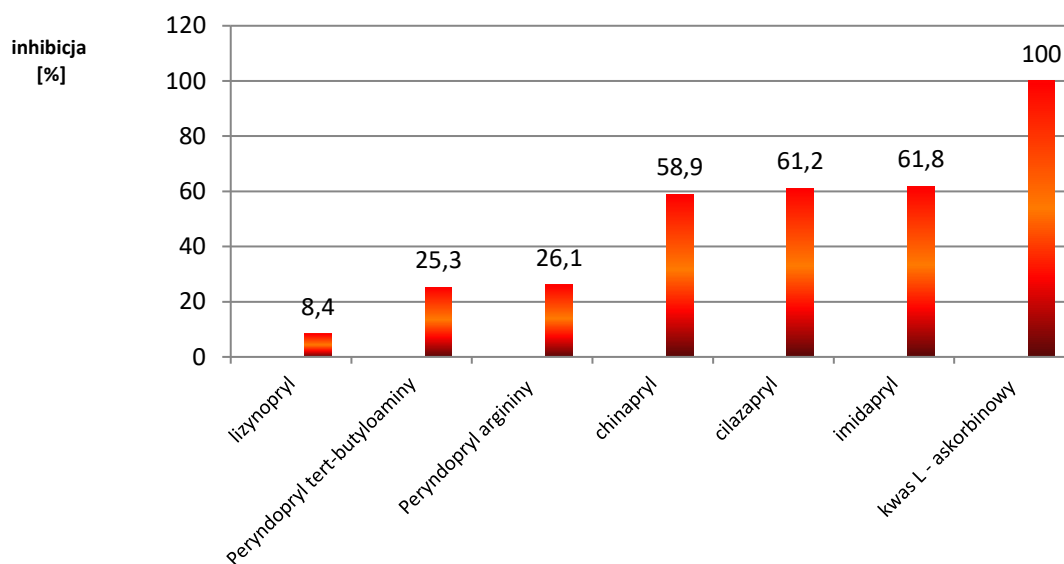
Wyznaczono parametry termodynamiczne dla tabletek z PER_t i PER_a przechowywanych w całości oraz w formie przepołówionej w temp. od 303 K do 323 K, RH 76,4%, które przedstawiono w **Tabeli 6.8**.

Tabela 6.8 Parametry termodynamiczne wyznaczone dla PER_t i PER_a przechowywanych w tabletkach w całości oraz w formie przepołówionej, temp. od 303 K do 323 K, RH 76,4%

tabletki z PER_t przepołówione	tabletki z PER_t w całości	tabletki z PER_a przepołówione	tabletki z PER_a w całości
$E_a = 96,711 \pm 0,361$ [kJ/mol]	$E_a = 15,507 \pm 7,86$ [kJ/mol]	$E_a = 41,45 \pm 17,88$ [kJ/mol]	$E_a = 39,60 \pm 17,65$ [kJ/mol]
$\Delta H^\ddagger = 94,23 \pm 38,59$ [kJ/mol]	$\Delta H^\ddagger = 13,029 \pm 10,34$ [kJ/mol]	$\Delta H^\ddagger = 39,70 \pm 20,36$ [kJ/mol]	$\Delta H^\ddagger = 37,29 \pm 19,96$ [kJ/mol]
$\Delta S^\ddagger = -0,053 \pm 0,129$ [kJ/(K·mol)]	$\Delta S^\ddagger = -0,320 \pm 0,219$ [kJ/(K·mol)]	$\Delta S^\ddagger = -0,247 \pm$ 0,187 [kJ/(K·mol)]	$\Delta S^\ddagger = -0,252 \pm 0,187$ [kJ/(K·mol)]

Potencjał antyoksydacyjny wybranych I-ACE

Ze względu na liczne doniesienia wynikające z obserwacji poprawy stanu u pacjentów z chorobami o podłożu zapalnym, postanowiono przebadać wpływ I-ACE na neutralizację reaktywnych form tlenu. Zastosowana metoda redukcji 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) monitorowana za pomocą detekcji UV potwierdziła właściwości antyoksydacyjne wszystkich przebadanych I-ACE. Wyniki przedstawione na **Ryc. 6.15** dowodzą, iż PER_t i PER_a posiadają potencjał antyutleniający (osiągając ponad 25% siły działania kwasu L-askorbinowego, który uznany jest za związek referencyjny oraz jeden z najsilniejszych przeciwutleniaczy). Badanie to podkreśla zalety stosowania peryndoprylu oraz innych I-ACE w chorobach przewlekłych.

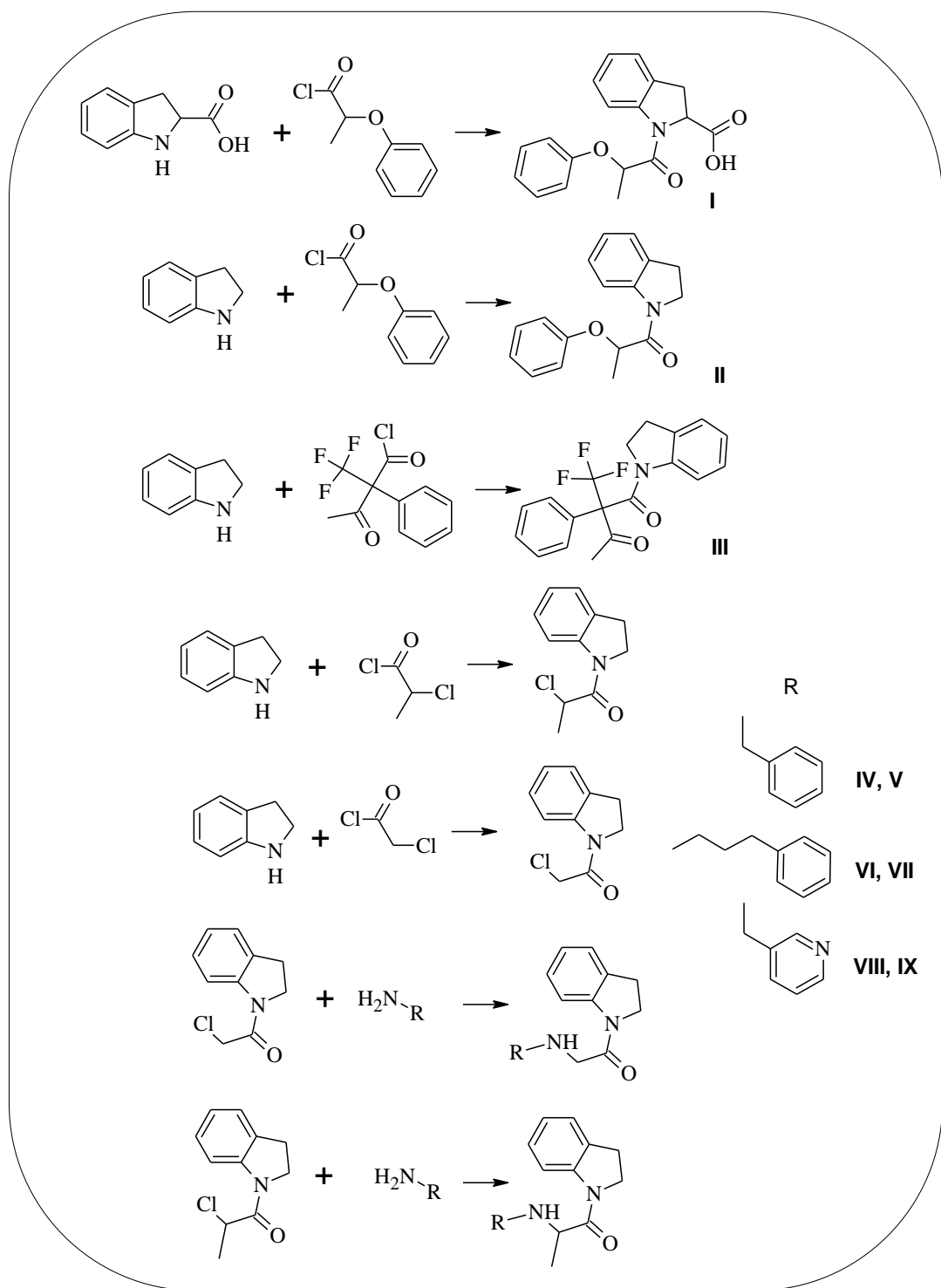


Ryc. 6.15 Obliczona procentowa wartość hamowania wolnych rodników dla badanych substancji z grupy I-ACE, po 30 minutach oddziaływania z DPPH.

ETAP DRUGI

Synteza nowych pochodnych I-ACE

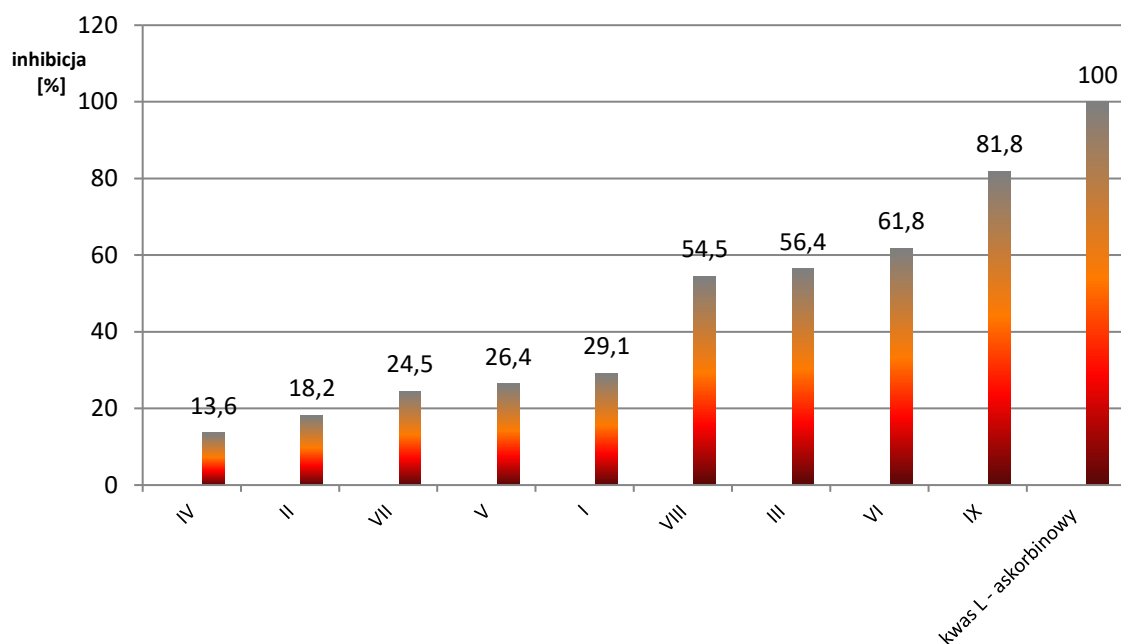
W obecnych czasach dąży się, aby zaprojektowana cząsteczka o potencjalnym działaniu leczniczym cechowała się odpowiednią trwałością, niskim profilem toksyczności oraz wykazywała się wielokierunkową aktywnością farmakologiczną. Kierując się tą ideą, drugi etap pracy doktorskiej stanowiła synteza i badania nowych związków o potencjalnym działaniu inhibującym enzym konwertazy angiotensyny. Znając „słabe punkty” w budowie cząsteczek I-ACE, które warunkują ich nietrwałość, a mianowicie: wiązanie estrowe (reakcja hydrolizy) i bliskość grupy aminowej w stosunku do pierścienia (reakcja cyklizacji), założona synteza nowych pochodnych eliminowała te wiązania w zaprojektowanych strukturach. W wyniku podjętych prac otrzymano dziewięć nowych związków (**I – IX – Ryc. 6.16**), których tożsamość potwierdzono spektroskopią UV, MS ES, ^1H i ^{13}C NMR, a czystość potwierdzono za pomocą temperatury topnienia i metody HPLC. Dodatkowo strukturę związków analizowano przy użyciu dwuwymiarowych widm NMR: $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC. Po ustaleniu struktury nowosyntezowanych pochodnych postanowiłam ocenić: lipofilowość, trwałość, właściwości antyoksydacyjne i biologiczne (hamowanie acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy).



Ryc. 6.16 Ścieżki syntezy nowych związków I – IX.

Właściwości antyoksydacyjne nowych związków

Do analizy potencjału antyoksydacyjnego zastosowano taką samą metodę jak dla badanych wcześniej I-ACE. Analiza wykazała, że interakcje testowanych substancji z DPPH zwiększały się w następującej kolejności: IV < II < VII < V < I < VIII < III < VI < IX, gdzie związek o najlepszych właściwościach (**IX**) neutralizował wolne rodniki jedynie o 19,2% słabiej niż kwas L-askorbinowy, co uważam za bardzo dobry wynik – **Ryc. 6.17**.



Ryc. 6.17 Obliczona procentowa wartość hamowania wolnych rodników dla badanych substancji po 30 minutach oddziaływania z DPPH.

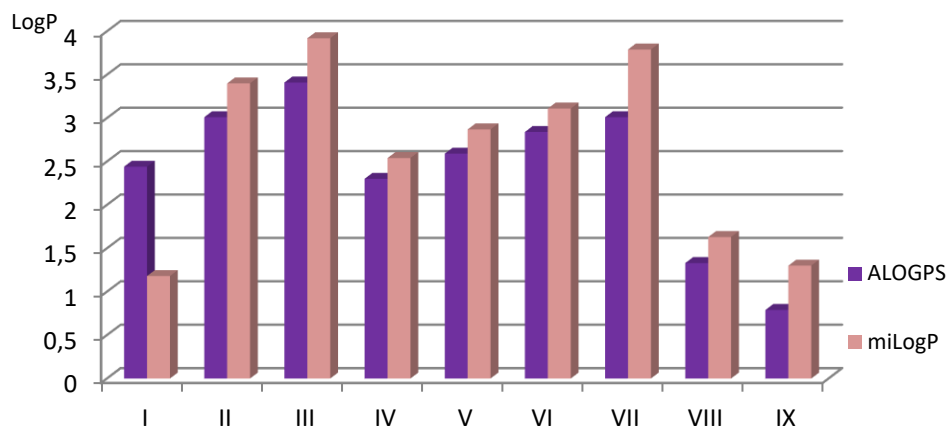
Aktywność biologiczna

Opierając się na licznych doniesieniach o pozytywnym wpływie I-ACE na choroby neurodegeneracyjne oraz pozytywne wyniki potencjału antyoksydacyjnego, postanowiono zbadać wpływ nowych związków na hamowanie acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE), które są głównymi celami dla leków stosowanych w chorobie Alzheimera (AD). Aktywność hamującą związków przeciwko AChE i BuChE mierzono zmodyfikowaną metodą spektrofotometryczną Ellmana. Analiza aktywności biologicznej wykazała, iż nowosyntezowane związki nie wykazują zadowalającego działania hamującego cholinoesteraz, o wartościach IC_{50} powyżej 0,5 mM względem AChE oraz powyżej 0,7 względem BuChE. Najbardziej obiecujące wyniki w hamowaniu aktywności

cholinoesteraz wykazywał związek **III** i **V**. Co ciekawe, związki **V** i **VII** wykazały aktywność wobec BuChE w badanych stężeniach.

Lipofilowość

Aby oszacować rozpuszczalność oraz możliwości przenikania cząsteczek przez błony biologiczne, związki **I** - **IX** poddano analizie wartości *LogP* przez dwa modele matematyczne: *ALOGPS 2.1* oraz *miLogP* (**Ryc. 6.18**). W obu przypadkach wykazano, iż jednym z najbardziej lipofilowych z zsyntezowanych analogów I-ACE okazała się pochodna **III**, a najbardziej hydrofilowym – pochodna **IX**. Obecność ugrupowania karbonylowego w sąsiedztwie kwasowego atomu azotu o hybrydyzacji sp^3 stanowi cechę wspólną ww. układów, jednakże silnie elektroujemny charakter ugrupowania trifluorometylowego związanego z mostkowym atomem węgla, który połączony jest także z grupą metoksyłową, zdaje się przesądzać o bardziej lipofilowych właściwościach związku **III**. Efektu tego nie daje się zaobserwować w przypadku bardziej hydrofilowej pochodnej **IX**, w przypadku której zasadowy charakter drugorzędowego alifatycznego ugrupowania aminowego osłabiony wydaje się być na skutek ekranowania przez szybko rotujący system heterocyklu. W tym miejscu należy podkreślić, iż uzyskane dane w przyszłości planuje się zweryfikować w oparciu o prace eksperymentalne implementujące rozdział HPLC.



Ryc. 6.18 Wyznaczone wartości *LogP* dla związków **I** – **IX**.

Badanie trwałości związków I – IX

Dobór metody analitycznej oraz rewalidacja

Do oceny trwałości związków I – IX wybrano metodę RP-HPLC. Parametry metody były następujące:

- faza stacjonarna : kolumna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm),
- faza ruchoma : acetonitryl - bufor fosforanowy (pH 2,0): 65: 35 v/v,
- szybkość przepływu fazy ruchomej : 1,2 ml/min,
- detekcja spektrofotometryczna: analityczna długość fali λ_{\max} dla związku I - 258 nm, λ_{\max} dla związków II – IX - 256 nm,
- objętość nastrzyku : 20 µl,
- wzorzec wewnętrzny : metanolewy roztwór chlorowodoru bupiwakainy (0,05 mg/ml) – dla związków I i II, metanolewy roztwór chlorowodoru prokainy (0,05 mg/ml) – dla związków III i IX.

Metodę RP-HPLC poddano rewalidacji do każdego ze związków. Analizując poziomy walidacyjne, zauważyłam, iż są one akceptowalne i metoda ta może być zastosowana do badań trwałości związków I – IX.

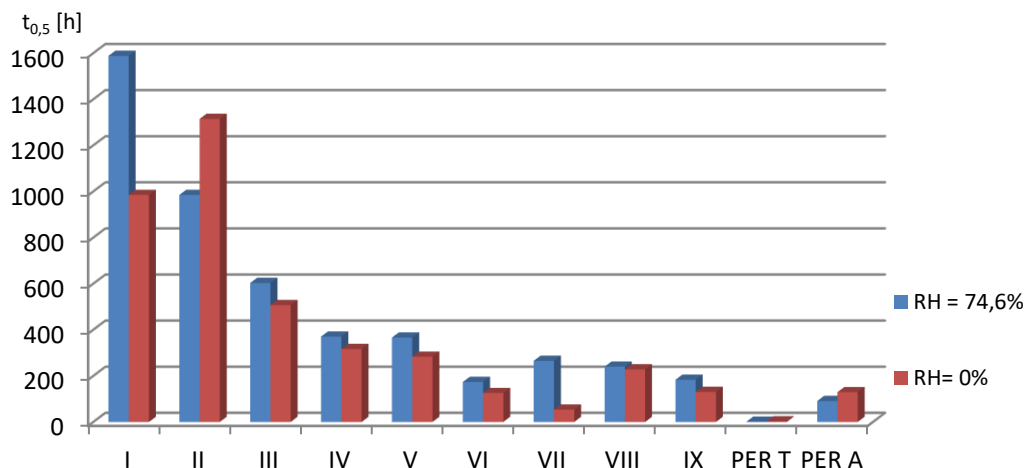
Trwałość związków I - IX

Analizując reakcje rozkładu związków I - IX w fazie stałej, zachodzące w warunkach obniżonej wilgotności względnej powietrza RH = 0% oraz podwyższonej wilgotności względnej powietrza RH = 76,4% i w temperaturze 363 K, uzyskano półlogarytmiczne prostoliniowe zależności stężenia substratu od czasu, co jest charakterystyczne dla reakcji I-rzędu .

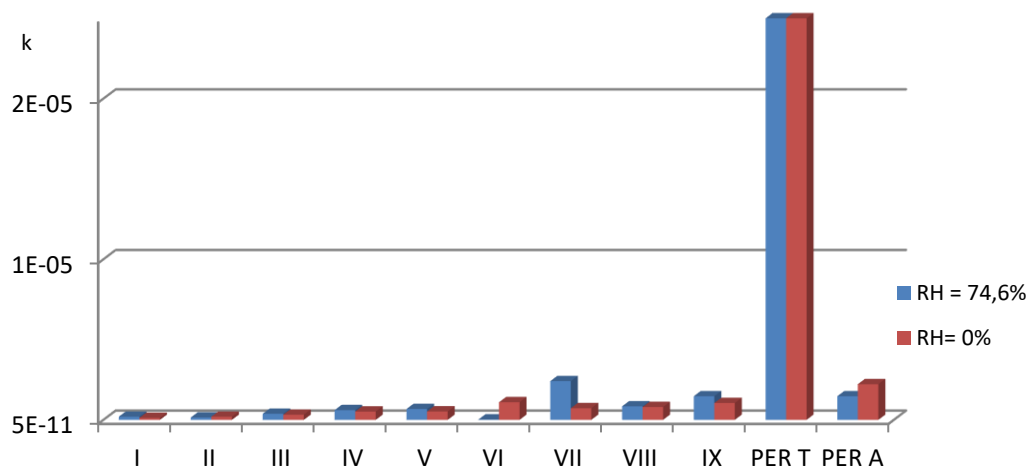
Analiza stałych rozkładu k oraz czasów połowicznego rozkładu $t_{0,5}$ badanych związków wykazała, iż wszystkie nowe cząsteczki są trwalsze od PER_t i PER_a . Największą trwałością odznacza się pochodna kwasowa I. Zaobserwowałam, analizując stałe szybkości rozkładu związków I – IX, że eliminacja w cząsteczce ugrupowania estrowego znacząco podwyższała ich stabilność w porównaniu do PER_t i PER_a . Co więcej, na szybkość rozpadu ma także wpływ obecność grupy aminowej w łańcuchu alifatycznym (związki I, II i III - pozbawione azotu w tym położeniu mają najwyższe czasy $t_{0,5}$). Analizując rozkład związków można zauważyć, że niższą trwałością cechują się związki IV, VI, IX – nieposiadające w łańcuchu

Omówienie wyników

alifatycznym grupy metylowej, której obecność wpływa na ułożenie przestrzenne cząsteczki i prawdopodobnie dodatkowo stabilizuje pierścień. Graficznie trwałość badanych związków, w porównaniu do PER_t i PER_a , przedstawiono na **Ryc 5.19 i 5.20**, porównując ich czasy $t_{0,5}$ oraz stałe k w wybranych warunkach.



Ryc. 6.19 Porównanie czasów $t_{0,5}$ dla związków **I - IX** oraz soli peryndoprylu w warunkach RH 74,6% oraz RH 0% i T 363 K.



Ryc. 6.20 Porównanie stałych rozkładu k dla związków **I - IX** oraz PER_t i PER_a w T 363 K i RH 0% oraz RH 76,4%.

Badania zdolności inhibowania enzymu konwertującego angiotensynę - *in silico*

Wszystkie ligandy **I - IX** były w pierwszej fazie badań minimalizowane celem wytypowania rotameru o najniższej energii spośród grupy rotamerów wygenerowanych

Omówienie wyników

za pomocą dynamiki molekularnej (moduł „Molecular Dynamics Conformational Search” z użyciem oprogramowania *Gabedit 2.4.7*, generowano 1000 rotamerów, używano następujących parametrów: ogrzewanie 0,5 – 1000 ps, 0 – 1000 K, w celu relaksacji naprężeń kątowych użyto pola siłowego Amber [180]), po czym uzyskane w ten sposób geometrie wszystkich rotamerów były preoptymalizowane przy pomocy metodologii półempirycznej PM7 z użyciem oprogramowania *Mopac 2016*. Metodologia dynamiki molekularnej pozwoliła na względnie szybkie przeszukanie przestrzeni konformacyjnej, której bardziej dokładny opis został dokonany z wykorzystaniem relatywnie nowego i szczegółowo sparametryzowanego hamiltonianu PM7. Implementacja formalizmu DFT (*Gaussian G16 A.03*) względem wytypowanych rotamerów badanych azoli [podejście B3LYP/6-31G (d,p) do zaniku częstości urojonych w wygenerowanym widmie IR, osiągając punkty stacjonarne] zaowocowała udokładnieniem, w rozumieniu mechaniki kwantowej, wyników i pozyskaniem zoptymalizowanych struktur ligandów.

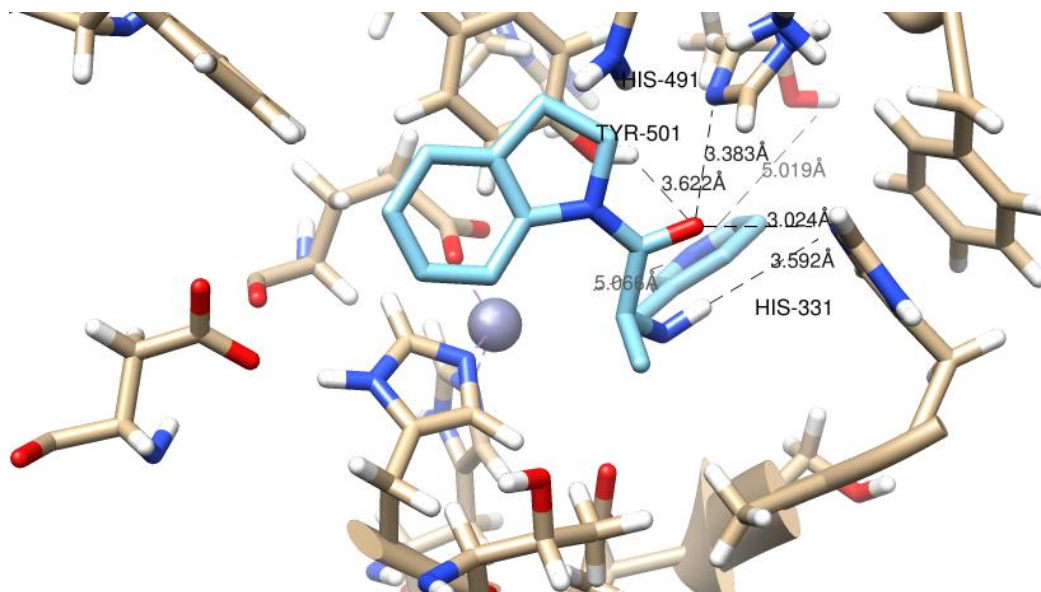
W celu przeprowadzenia procedur dokowania zoptymalizowanych ligandów ich struktury w systemie Linux (*Ubuntu 16.04*) przekształcono do formatu plików z rozszerzeniem **.mol2*, za pomocą programu *Open Babel 2.3.2*. [175] Umożliwiło to przygotowanie z użyciem oprogramowania *AutoDock Tools 1.5.6* pliku startowego (inputu) z rozszerzeniem **.pdbqt* niezbędnym do uruchomienia procedury dokowania. [176] Poza wskazaniem ścieżki dostępu do plików definiujących (min. ładunki czy typy atomów białka) oraz dokowanego ligandu (oba w formacie **.pdbqt*) pozostałe parametry pliku konfiguracyjnego przedstawiały się następująco:

```
center_x = -29,093
center_y = -17,095
center_z = -33,881
size_x = 40
size_y = 40
size_z = 36
energy_range = 4
exhaustiveness = 20
```

Zostały one wypracowane w toku przeprowadzonych uprzednio wielu procedur dokowania (z użyciem oprogramowania *AutoDock Vina* [177]) struktury referencyjnego ligandu (lizynoprylu) po wycięciu go z natywnej struktury enzymu 2c6n.pdb i uzyskaniu satysfakcjonującego wyniku nałożenia się wygenerowanych w wyniku dokowania struktur („poses”). Tak zadokowanego liganda z geometrią oryginalnego, referencyjnego I-ACE

Omówienie wyników

wyekstrahowano z kompleksu natywnego wariantu enzymu 2c6n.pdb. Wizualizację interakcji poszczególnych ligandów z otoczeniem chemicznym zobrazowano za pomocą programu *Chimera 1.13.1*. [181] Analiza wykazała, iż związki **I** – **IX** mogą wiązać się z enzymem konwertującym angiotensynę, a najbardziej obiecujące wyniki otrzymano dla związków **I**, **II**, **III**, **V**, **VIII**, z czego najkorzystniej wypadła ostatnia wymieniona pochodna – **Ryc. 5. 21**.



Ryc. 6.21 Wizualizacja interakcji między pierwszą pozą ligandu **VIII** a kieszenią enzymu 2c6n.pdb w odległości 5 Å od ligandu

7. Wnioski

Etap I - Trwałość soli peryndoprylu w fazie stałej

1. Degradacja peryndoprylu *tert*-butyloaminy w fazie stałej w przypadku w obecności wilgotności względnej powietrza zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej, natomiast w środowisku suchego powietrza zachodzi zgodnie z kinetyką pierwszorzędową. Degradacja argininianu peryndoprylu zarówno w warunkach podwyższonej wilgotności względnej jak również w warunkach suchego powietrza, postępuje zgodnie z mechanizmem reakcji pierwszego rzędu. Badania przeprowadzono opracowaną i walidowaną metodą RP-HPLC z detekcją UV.
2. Obecność hydrochlorotiazydu w mieszaninach modelowych z peryndoprylem *tert*-butyloaminy oraz z argininianem peryndoprylu znacząco wpływa na wzrost stabilności substancji, nie zmieniając przy tym mechanizmu rozkładu.
3. Najmniejszą trwałością cechuje się preparat handlowy z peryndoprylem *tert*-butyloaminy przechowywanym w formie przepołowionej, natomiast dzielenie tabletek z argininianem peryndoprylu nie ma dużego znaczenia.
4. Sole peryndoprylu cechują się właściwościami antyoksydacyjnymi, podobnie jak inne przebadane substancje z grupy I-ACE.

Etap II - Synteza i właściwości nowych pochodnych I - IX

1. Wartość $LogP$ dla badanych związków poza związkami **VIII** i **IX** oscyluje przy wartości $LogP = 3$, co świadczy o ich potencjalnej biodostępności. Związki te są zdolne do inhibowania enzymu angiotensyny na podobnym poziomie co dostępne w lecznictwie I-ACE, a ligandem o najkorzystniejszych właściwościach jest nowosynteżowana pochodna **VIII**.
2. Nowe związki mają właściwości antyoksydacyjne i w stopniu znaczącym neutralizują wolne rodniki, w mniejszym stopniu wykazują aktywność wobec acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy.
3. Nowe pochodne I-ACE wykazują się dużo większą trwałością niż peryndopryl w fazie stałej w postaci soli, w warunkach obniżonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 0\%$) jak i podwyższonej wilgotności względnej ($RH = 76,4\%$) w $T = 363\text{ K}$.

8. Bibliografia

1. Progress Collaborative Group. Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease. *Arch. Intern. Med.* 2003, 163; 1069-1075.
2. Januszewicz A, Prejbisz A. Nadciśnienie tętnicze, problemy współczesnej terapii. *Medycyna Praktyczna*, 2015.
3. Regulska K, Stanisz B, Lisiecki P. Optimization of storage and manufacture conditions for imidapril hydrochloride in solid state as a way to reduce costs of antihypertensive therapy. *AAPS Pharm.Sci.Tech.* 2013, 14; 1199-1208.
4. Regulska K, Regulski M, Paszun S. et al., How to stabilize cilazapril-containing solid dosage forms? The optimization of a final drug formulation. *Arab. J. Chem.* 2017, 10; 378-388.
5. Paszun S, Stanisz B. Cilazapril decomposition kinetics and mechanism in the solid state versus stability of the other ester pro-drug angiotensin converting enzyme inhibitors. *React. Kinet. Mech. Catal.* 2013, 109; 285-300.
6. Stanisz B. Liquid chromatographic studies of the stability of benazepril in pure form and in tablets. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 2004, 27; 3103-3119.
7. Stanisz B. Evaluation of stability of enalapril maleate in solid phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 31; 375-380.
8. Stanisz B. The stability of quinapril hydrochloride – a mixture of amorphous and crystalline forms (QHC-AC) - in solid phase. *Acta Polon. Pharm.* 2003, 60; 443-450.
9. Risha P, Vervaet C, Vergote G, et al. Drug formulations intended for the global market should be tested for stability under tropical climatic conditions. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2003, 59; 135-141.
10. Crichton B. Keep in a cool place: exposure of medicines to high temperatures in general practice during a British heatwave. *J. R. Soc. Med.* 2004, 97; 328–329.
11. Ritz E., Więcek A., Januszkiewicz A. Leki hamujące aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron w chorobach serca, naczyń i nerek. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2010.
12. Więcek A, Nieszporek T. Nadmierne hamowanie aktywności układu renina-angiotensyna-aldosteron nie jest zawsze korzystne. *Postępy Nauk Medycznych* 2009, 10; 782-788.

13. Andrzejczak D. Angiotensyna (1-7) – nowe ogniwo układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA). *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2009, 63; 23-29.
14. Petkow-Dimitrow P. Nowatorskie zastosowania inhibitorów konwertazy angiotensyny i antagonistów receptora angiotensyny II. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2007,117; 164-170.
15. Konieczny G, Posadzy-Mańczyńska A, Tykarski A. Działania niepożądane inhibitorów konwertazy angiotensyny. *Choroby Serca i Naczyń* 2006, 3; 140–148.
16. Danysz A. Buczko W. *Kompedium farmakologii i farmakoterapii dla studentów medycyny.* Urban &Partner, Wrocław 2008.
17. Januskiewicz A, Januskiewicz W, Rużyło W. Inhibitory konwertazy angiotensyny w leczeniu chorób układu sercowo – naczyniowego. *Medycyna Praktyczna*, Kraków, 2005.
18. Wzgarda A, Kleszcz R, Prokop M, et al. Unknown face of known drugs - what else can we expect from angiotensin converting enzyme inhibitors? *Eur. J. Pharmacol.* 2017, 797; 9-19.
19. Stanis. B. Regulska K. Regulski M. Enzyme inhibitors - alternative clinical applications. *J. Med. Sci.* 2014, 1; 83-89.
20. Progress Collaborative Group. Effects of a perindopril-based blood pressure lowering regimen on cardiac outcomes among patients with cerebrovascular disease. *Eur. Heart J.* 2003, 24; 475-484.
21. Progress Collaborative Group. Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease. *Arch. Intern. Med.* 2003, 163; 1069-1075.
22. Assadi, F. The growing epidemic of hypertension among children and adolescents: a challenging road ahead. *Pediatr. Cardiol.* 2012, 33; 1013–1020.
23. Hari P, Sahu J. Effect of enalapril on glomerular filtration rate and proteinuria in children with chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *Indian Pediatr.* 2013, 50; 923-928.
24. Meyers R, Siu A, Shore J. Pharmacotherapy review of chronic pediatric hypertension. *Clin. Ther.* 2011, 33; 1331-1356.
25. Supavekin S, Surapaitoolkorn W, et al. Combined renin angiotensin blockade in childhood steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr. Int.* 2012, 54; 793-797.
26. Zhang Y, Wang F, Ding J, et al. Long-term treatment by ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers in children with Alport syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2016, 31, 67-72.

27. Caletti M, Balestracci A, Missoni M, Vezzani C. Additive antiproteinuric effect of enalapril and losartan in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2013, 28; 745-750.
28. Stern H, Weil J, Genz T, et al. Captopril in children with dilated cardiomyopathy: acute and long-term effects in a prospective study of hemodynamic and hormonal effects. *Pediatr Cardiol.* 1990, 11; 22-28.
29. Stephen P. Did they lower stress in the trial? Or was it just wasted energy? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005, 45; 858-859.
30. Duboc D, Meune C, Lerebours G, et al. Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in duchenne muscular dystrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005, 45; 855-857.
31. Cozzoli A, Nico B, Sblendorio V, et al. Enalapril treatment discloses an early role of angiotensin II in inflammation- and oxidative stress-related muscle damage in dystrophic mdx mice. *Pharmacol. Res.* 2011, 64; 482–492.
32. Armenian S, Gelehrter S, Chow E. Strategies to prevent anthracycline-related congestive heart failure in survivors of childhood cancer. *Cardiol. Res. Pract.* 2012, 2012; 713294-713302.
33. Ghanizadeh A. Captopril as a novel possible treatment for children with ADHD and elevated lead level, a hypothesis. *Environ. Res.* 2011, 111; 1330-1331.
34. Goel R, Bhat S.A, Rajasekar N, et al. Hypertension exacerbates predisposition to neurodegeneration and memory impairment in the presence of a neuroinflammatory stimulus: Protection by angiotensin converting enzyme inhibition. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015, 133; 132–145.
35. Labandeira-Garcia J.L, Rodriguez-Pallares J, Rodríguez-Perez A, et al. Brain angiotensin and dopaminergic degeneration:relevance to Parkinson's disease. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2012, 1; 226-244.
36. Messerli F.H, William, B, Ritz E, Essential hypertension. *Lancet* 2007, 370; 591–603
37. Wright J.W, Harding J.W. Importance of the brain angiotensin system in parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2012, 2012; 860923-860937.
38. Reardon K.A, Mendelsohn F.A, Chai S.Y, Horne M.K. The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of Parkinson's disease. *Aust. N. Z. J. Med.* 2000, 30; 48-53.

39. Muñoz A, Rey P, Guerra M.J, et al. Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology* 2006, 51; 112-120.
40. Sink K.M, Leng X, Williamson J, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cognitive decline in older adults with hypertension: results from the Cardiovascular Health Study. *Arch. Intern. Med.* 2009, 169; 1195-1202.
41. Schölkens B.A, Xiang J, Unger H. Central effects of converting enzyme inhibitors. *Clin. Exp. Hypertens.* 1983, 5; 1301–1317.
42. Zubenko G.S, Nixon R.A. Mood-elevation effect of captopril in depressed patients. *Am. J. Psychiatry* 1984, 141; 110–111.
43. Deicken R.F. Captopril treatment of depression. *Biol. Psychiatr.* 1986, 21; 1425–1428
44. Croog S.H, Levine S, Testa M.A, et al. The effects of antihypertensive therapy on the quality of life. *N. Engl. J. Med.* 1986, 314; 1657–1664.
45. Currie D, Lewis R.V, McDevitt D.G, et al. Central effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, captopril. I. Performance and subjective assessments of mood. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1990, 30; 527–536.
46. Ho B.T, Richards D.W, Chute D.L. Major theories of state dependent learning. *Drug discrimination and state dependent learning.* Academic Press New York, 1978.
47. Jenkins T.A. Effect of angiotensin-related antihypertensives on brain neurotransmitter levels in rats. *Neurosci. Lett.* 2008, 444; 186-189.
48. Jenkins T.A, Chai S.Y. Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on spatial memory and anxiety-like behaviours in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2007, 87; 218-224.
49. Jenkins T.A, Chai S.Y, Howells D, Mendelsohn F.A. Intrastratial angiotensin II induces turning behaviour in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* 1995, 691; 213–216.
50. Jenkins T.A, Chai S.Y, Mendelsohn F.A. Upregulation of angiotensin II AT1 receptors in the mouse nucleus accumbens by chronic haloperidol treatment. *Brain Res.* 1997, 748; 137–142.
51. Mashhoody T, Rastegar K, Zal F. Perindopril may improve the hippocampal reduced glutathione content in rats. *Adv. Pharm. Bull.* 2014, 4; 155-159.
52. Wyss M.J, Kadish I, van Groen T. Age - related decline in spatial learning and memory: attenuation by captopril. *Clin. Exp. Hypertens.* 2003, 25; 455-474.
53. Fricka G, Lader M. Psychotropic effects of repeated doses of enalapril, propranolol and atenolol in normal subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1988, 25; 67–73.

54. Arregui A, Lee C.M, Emson P.C, Iversen L.L. Separation of human brain angiotensin-converting enzyme from enkephalin-degrading activity. *Eur. J. Pharmacol.* 1979, 59; 141–144.
55. Arregui ., Perry E, Rossor M, Tomlinson B.E. Angiotensin converting enzyme in Alzheimer's disease: Increased activity in caudate nucleus and cortical areas. *J. Neurochem.* 1982, 38; 1490–1492.
56. Mendelsohn F.A, Quirion R, Saavedra J.M, et al. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984, 81; 1575–1579.
57. Mondadori C, Etienne P. Nootropic effects of ACE inhibitors in mice. *Psychopharmacology* 1990, 100; 301-307.
58. Ohru T, Tomita N, Sato-Nakagawa T. Effects of brain-penetrating ACE inhibitors on Alzheimer disease progression. *Neurology* 2004, 63; 1324-1325.
59. Dong Y.F, Kataoka K, Tokutomi Y, et al. Perindopril, a centrally active angiotensin-converting enzyme inhibitor, prevents cognitive impairment in mouse models of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2011, 25; 2911-2920.
60. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, et al. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* 2000, 6, 143-150.
61. Nikolova J.G, Getova D.P, Nikolov F.P. Effects of ACE-inhibitors on learning and memory processes in rats. *Folia. Med.* 2000, 42, 47-51.
62. Raghavendra V, Chopra K, Kulkarni S.K. Comparative studies on the memory-enhancing actions of captopril and losartan in mice using inhibitory shock avoidance paradigm. *Neuropeptides* 2001, 35; 65-69.
63. Schrader H, Stovner L.J, Helde G, et al. Prophylactic treatment of migraine with angiotensin converting enzyme inhibitor (lisinopril): randomised, placebo controlled, crossover study. *BMJ* 2001, 322; 19 -27.
64. Bender W.I. ACE inhibitors for prophylaxis of migraine headaches. *Headache* 1995, 35; 470–471.
65. Ratnasabapathy Y, Lawes C, Anderson C. The Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study (PROGRESS): clinical implications for older patients with cerebrovascular disease. *Drugs Aging.* 2003, 20; 241-251.
66. Chapman N, Huxley R, Anderson C, et al. Effects of a perindopril-based blood pressure-lowering regimen on the risk of recurrent stroke according to stroke subtype and medical history: the PROGRESS Trial. *Stroke* 2004, 35; 116-121.

67. Bisio A, Rosola R, Abbati C, Sorlini L. Antidepressant activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Curr. Ther. Res.* 1990, 48; 191–197.
68. Margolin A, Avants S.K, Setaro, J.F, et al. Cocaine, HIV, and their cardiovascular effects: is there a role for ACE-inhibitor therapy? *Drug Alcohol Depend.* 2000, 61; 35-45.
69. Kreek M.J. Cocaine, dopamine and endogenous opioid system. *J. Addict. Dis.* 1996, 15; 73–96.
70. Verrico C.D, Haile C.N, De La Garza R, et al. Subjective and cardiovascular effects of intravenous methamphetamine during perindopril maintenance: a randomized, double-blind, placebo-controlled human laboratory study. *Inter. J. Neuropsychopharmacol.* 2016, 19; 1-8.
71. Verrico C.D, Haile C.N, Newton T.F, et al. Pharmacotherapeutics for substance-use disorders: a focus on dopaminergic medications. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2013, 22; 1549–1568.
72. Maul B, Krause W, Pankow K, et al. Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. *FASEB J.* 2005, 19, 1474-1481.
73. Maul B, Siems W.E, Hoehe M.R, et al. Alcohol consumption is controlled by angiotensin II. *FASEB J.* 2001, 15; 1640–1642.
74. Lingham T, Perlanski E, Grupp L.A. Angiotensin converting enzyme inhibitors reduce alcohol consumption: some possible mechanisms and important conditions for its therapeutic use. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1990, 14; 92-99.
75. Verrico C.D, Haile C.N, De La Garza R, et al. Subjective and cardiovascular effects of intravenous methamphetamine during perindopril maintenance: a randomized, double-blind, placebo-controlled human laboratory study. *Inter. J. Neuropsychopharmacol.* 2016, 19; 1-8.
76. Verrico C.D, Haile C.N, Newton T.F, et al. Pharmacotherapeutics for substance-use disorders: a focus on dopaminergic medications. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2013, 22, 1549–1568.
77. Paz M.C, Assis M.A, Cabrera R.J, et al. The AT angiotensin II receptor blockade attenuates the development of amphetamine-induced behavioral sensitization in a two-injection protocol. *Synapse* 2011, 65; 505–512.
78. Visniauskas B, Perry J.C, Oliveira V, et al. Cocaine administration increases angiotensin I-converting enzyme (ACE) expression and activity in the rat striatum and frontal cortex. *Neurosci. Lett.* 2012, 506; 84–88.

79. Zacharieva S, Matrozov P, Stoeva I, Andonova K. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on ACTH response to corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal men. *Horm. Metab. Res.* 1991, 23; 245–246.
80. Aguilera G, Young W.S, Kiss A, Bathia A. Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by angiotensin-II. *Neuroendocrinology* 1995, 61; 437–444.
81. Millar J.A, Sturani A, Rubin P.C, Lawrie C, Reid J.I. Attenuation of the antihypertensive effect of captopril by the opioid receptor antagonist naloxone. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1983, 10; 253–259.
82. Hosseini M, Sharifi M.R, Alaei H, et al. Effects of angiotensin II and captopril on rewarding properties of morphine. *Indian J. Exp. Biol.* 2007, 45; 770-777.
83. Premaratna S.D., Manickam E, Begg D.P, et al. Angiotensin- converting enzyme inhibition reverses diet-induced obesity, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice. *Int. J. Obes.* 2012, 36; 233-243.
84. Segura J, Ruilope L.M. Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. *Public Health Nutr.* 2007, 10; 1151–1155.
85. Santos E.L, de Picoli Souza K, Guimarães P.B, et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. *Int. Immunopharmacol.* 2008, 8; 247–25386.
86. Velkoska E, Warner F.J, Cole T.J, et al. Metabolic effects of low dose angiotensin converting enzyme inhibitor in dietary obesity in the rat. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2010, 20; 49–55.
87. Regulska K, Stanis B, Regulski M. The renin-angiotensin system as a target of novel anticancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2013, 19; 7103-7125.
88. Hii S, Nicol D, Gotley D, et al. Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer.* 1998, 77; 880–883.
89. Haznedaroglu I.C, Beyazit Y. Pathobiological aspects of the local bone marrow renin-angiotensin system: a review. *Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2010, 11; 205–213.
90. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A et al. Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity.* 2013, 38; 296–308.
91. Chen L, Re R.N, Prakash O, Mondal D. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces neuroblastoma cell growth rate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1991, 196; 280–293.

92. Wilop S, von Hobe S, Crysandt M, et al. Impact of angiotensin I converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer undergoing first-line platinum-based chemotherapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009, 135; 1429–1435.
93. Kim S.T, Park K.H, Oh S.C., et al. How does inhibition of the renin-angiotensin system affect the prognosis of advanced gastric cancer patients receiving platinum-based chemotherapy? *Oncology* 2012, 83; 354–360 .
94. Yuge K, Miyajima A, Tanaka N. Prognostic value of reninangiotensin system blockade in non-muscle-invasive bladder cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2012, 19; 3987–3993.
95. Bajaj S. Stability Testing of Pharmaceutical Products, *JAPS.* 2012, 2; 129-138
96. Pawełczyk E. i wsp. Podstawy trwałości leków. PZWL, Warszawa, 1982.
97. Qiu Y. Developing Solid oral dosage forms *Pharmaceutical theory and practice.* Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2009.
98. Niazi S. K. *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations, Vol. 1: Compressed Solid Products,* Informa Healthcare USA, Inc, 2009.
99. Huynh-Ba K. *Handbook of stability testing in pharmaceutical development, regulations, methodologies, and best practices,* Springer, 2009.
100. Byrn i wsp S. R. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2001, 48; 115–136.
101. Yoshioka S. *Stability of drugs and dosage forms.* Kulwer Academic Publishers, 2002
102. Khawam A. Basics and applications of solid-state kinetics: a pharmaceutical perspective. *J. Pharm. Sci.* 2006, 95; 472–498.
103. Al-Omari M. Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. *J. Pharm. Biomed Anal.* 2001, 25; 893–902.
104. Gu L. Drug-excipient incompatibility studies of the dipeptide angiotensin-converting enzyme inhibitor, moexipril hydrochloride: dry powder vs wet granulation. *Pharm. Res.* 1990, 7; 379–383.
105. Rodante F. Kinetic analysis of thermal decomposition for penicillin sodium salts: model-fitting and model-free methods. *J. Pharm. Biomed Anal.* 2002, 29;1031–1043
106. Atkins P.W. *Chemia fizyczna.* PWN, Warszawa, 2001.
107. Zajac M, Jelińska A. Ocena jakości substancji leczniczych i preparatów farmaceutycznych według wymagań farmakopealnych i ICH. *Wydawnictwo Kontekst, Poznan,* 2000.

108. Bakshi M. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *J. Pharm. Biomed Anal.* 2002, 28; 1011–1040.
109. Adamska - Dyniewska H. Leki hamujące enzym przekształcający angiotensynę działanie i zastosowanie kliniczne. Towarzystwo Terapii Monitorowanej, Łódź, 1992
110. Opolski G, Filipiak K. J, Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2000.
111. Paszun S, Stanisław B. Rys historyczny - nadciśnienie tętnicze, układ renina-angiotensyna i synteza pierwszego inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę. *J. Med. Sci.* 2008, 5; 392-398.
112. Hurst M, Jarvis B. Perindopril an updated review of its use in hypertension, *Drugs*, 2001, 61; 867-896 .
113. Devissaguet J.P, Ammoury N, Devissaguet M, Perret L. Pharmacokinetics of perindopril and its metabolites in healthy volunteers. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1990, 4; 175-189.
114. Tykarski A, Narkiewicz K, Gaciong Z, et al. 2015 guidelines for the management of hypertension. Recommendations of the Polish Society of Hypertension – short version. *Kardiol. Po.* 2015, 73; 676-700.
115. Opie L. H. Inhibitory konwertazy angiotensyny: postęp trwa. Via Medica, Gdańsk, 2000 .
116. Kasprzak J. D. Optymalna kontrola ciśnienia tętniczego u pacjentów z wysokim ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych: pozycja perindoprilu. *Choroby Serca i Naczyń* 2011, 8; 53–61.
117. Wildecka K, Preparaty złożone w terapii nadciśnienia, Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2014.
118. Więcek A, Nieszporek T. Nadmierne hamowanie aktywności układu reninaangiotensyna – aldosteron nie jest zawsze korzystne. *Postępy Nauk Medycznych* 2009, 10; 782-788.
119. Farmakopea Polska XI. Warszawa, 2017.
120. Grodzicki T, Nowe możliwości terapii skojarzonej nadciśnienia tętniczego u osób starszych-telmisartan i amlodypina. *Gerontologia Polska* 2011,19; 127–133.
121. Pupek-Musialik D, Musialik K. Leki złożone w terapii nadciśnienia tętniczego — najnowsze standardy terapii Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego, *Forum Zaburzeń Metabolicznych* 2011, 2; 159–168.

122. Brown C. L, Backhouse C. I, Grippat J. C, Santoni J. The effect of perindopril and hydrochlorothiazide alone and in combination on blood pressure and on the renin angiotensin system in hypertensive subjects. *Europ. J. Clin. Pharmacol.* 1990, 39; 327-332.
123. Mohsen A. H, Sally A. H. Modeling of the pharmacokinetic/pharmacodynamic interaction between irbesartan and hydrochlorothiazide in normotensive subjects, *Biopharm. Drug Dispos.* 2015, 36; 216-231.
124. Wykaz produktów leczniczych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej. <http://dziennikmz.mz.gov.pl>.
125. Samer H, Lama J. Analytical methods of perindopril, review. *World J. Pharm. Res.* 2015, 6; 1563-1575.
126. Patel A.I, Oza C.K, Prajapati J.P, et al. RP-HPLC method for the determination of losartan potassium and perindopril erbumine in combined tablet dosage form. *IJPBS* 2011, 2; 709-715.
127. Khomushku G.M, Zhloba A.A, Puchnin V.S, et al. Analysis of the angiotensin-converting enzyme inhibitors perindopril, lisinopril and Quinapril by HPLC. *Pharm. Chem. J.* 2011, 44; 619-623.
128. Prajapati J, Patel A, Patel M.B. Analytical method development and validation of amlodipine besylate and perindopril erbumine in combine dosage form by RP-HPLC. *Int. J. PharmTech Res.* 2011, 3; 801-808.
129. Tiwari R, Jain A, Maliwal D, Toppo E. Multicriteria optimization methodology in development of HPLC method for simultaneous estimation of indapamide and perindopril in bulk drug and its combined dosage form. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2012, 5; 50-53.
130. Chamberlain J. The analysis of drugs in biological fluids. CRC Press, 2000.
131. Medenica M, Ivanović, D, Mašković M, et al. Evaluation of impurities level of perindopril *tert*-butylamine in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 5; 1087-1094.
132. Reddy R.K, Reddy R.M, Reddy D.M. Reversed-phase liquid chromatography analysis of perindopril *tert*-butylamine and its isometric impurity. Hetero Drugs Limited, PCT/IN2003/000276.
133. Dugga H.H, Peraman R, Nayakanti D. Stability-indicating RP-HPLC method for the quantitative analysis of perindopril erbumine in tablet dosage form. *J. Chromatogr. Sci.* 2014, 52; 315-321.

134. Zaazaa H.E, Abbas S.S, Essam H, El-Bardicy M.G. Validated chromatographic methods for determination of perindopril and amlodipine in pharmaceutical formulation in the presence of their degradation products. *J. Chromatogr. Sci.* 2013, 51; 533-543.
135. Rahman N, Anwar N, Kashif M. Optimized and validated initial-rate method for the determination of perindopril erbumine in tablets. *Chem. Pharm. Bull.* 2006, 54; 33-36.
136. Kale S.S, Bakal R.L, Chandewar A.V, Sakhare R.S. Two wavelength method for estimation of indapamide and perindopril erbumine in combined tablet dosage form. *RJPT.* 2011, 4; 545-548.
137. Gizawy S.M, Bebawy L.I, Abdelmageed O.H, M.A. High performance liquid chromatography, TLC-densitometry and first-derivative spectrophotometry for simultaneous determination of amlodipine and perindopril in bulk powder and tablets. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 2013, 36; 1323-1339.
138. Varsha B, Viraj H, Mrinalini C.D. Development and validation of stability-indicating HPTLC method for the estimation of perindopril and indapamide. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci,* 2013, 6; 621-625.
139. Safila N, Hina R, Fatima Q, Syeda Z. Method development of Perindopril using UV spectrophotometer. *Intern. J. Pharm. Qual. Assurance,* 2014; 6; 8-10.
140. Sharma S, Sharma M.C. UV-Spectrophotometric Method for the Perindopril Erbumine in Pharmaceutical Formulations Using Indigo Carmine. *AEJSR.* 2011, 6; 210-216.
141. Nafisur R, Habibur R, Asma K. Development of spectrophotometric method for the determination of perindopril erbumine in pharmaceutical formulations using 2,4 dinitrofluorobenzene. *J. Chil. Chem. Soc.* 2012, 2; 827-831.
142. Nafisur R, Habibur R. Quantitative analysis of perindopril erbumine in pharmaceutical preparations by spectrophotometry via ternary complex formation with Zn(II) and eosin and charge transfer complexation with iodine. *Spectroscopy* 2011, 25; 123–136.
143. Amir A.S, Tamim C, Hanan F. Selective spectrofluorimetric method for the determination of perindopril erbumine in bulk and tablets through derivatization with dansyl chloride. *JAST.* 2015; 6: 12-18.
144. Lin S.J, Wu H.L, Chen S.H, Wen Y.H. Derivatization-GAS Chromatographic Determination of Perindopril. *Anal Latt,* 1996, 29; 1751-1762.
145. Kollamaram G, Faucher A, Croker D.M, et al. Valvejet Technology for the Production of a Personalised Fixed Dose Combination of Ramipril and Glimepiride: an Investigative Study on the Stability of Ramipril. *Pharm. Res.* 2018, 35; 181.

146. Paszun S, Stanisz B. Cilazapril decomposition kinetics and mechanism in the solid state versus stability of the other ester pro-drug angiotensin converting enzyme inhibitors. *React. Kinet. Mech. Catal.* 2013, 109; 285-300.
147. Stanisz B. Liquid chromatographic studies of the stability of benazepril in pure form and in tablets. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 2004. 27; 3103-3119.
148. Stanisz B. Evaluation of stability of enalapril maleate in solid phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 31, 375-380.
149. Stanisz B. The stability of quinapril hydrochloride - a mixture of amorphous and crystalline forms (QHC-AC) - in solid phase. *Acta Polon. Pharm.* 2003, 60; 443-450.
150. Stanisz B. Kinetics of lisinopril degradation in solid phase. *React. Kinet. Mech. Catal.* 2005, 85; 145-152.
151. Stanisz B. The influence of relative humidity and temperature on stability of moexipril hydrochloride in solid phase. *Acta Polon. Pharm.* 2004, 61; 91-97.
152. Regulski M, Regulska K, Stanisz B, et al. Chemistry and pharmacology of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Curr. Pharm. Design* 2015, 21; 1764-1775.
153. Cushman D, Ondetti M, Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nat. Med.* 1999, 5; 1110-1113.
154. <https://www.rcsb.org/structure/2X94>; logowanie: grudzień 2018.
155. Akif M, Measuyer G, Schwager S, et al. Structural characterization of angiotensin I-converting enzyme in complex with a selenium analogue of captopril *FEBS J.* 2011, 287; 3644-3650.
156. <https://www.rcsb.org/structure/2X94>; logowanie: grudzień 2018.
157. Gomez C., Berteina-Raboin S., De Nanteuil G., Guillaumet G. Perindopril and ramipril phosphonate analogues as a new class of angiotensin converting enzyme inhibitors *Bioorg. Med. Chem.* (2013) 21: 7216–7221.
158. Wzgarda A, Dettlaff K, Rostalska M, et al. Thermo-, Radio- and Photostability of Perindopril *Tert*-butyloamine in The Solid State. Comparison to Other Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. *Iran. J. Pharm. Res.* 2017, 16; 1007-1018.
159. Juszczak A, Szczołko W, Pieszak M, et al. Impact of hydrochlorothiazide on the stability of two perindopril salts. Evaluation of the interaction with HPLC and ESI LC/MS methods. *Acta Pol. Pharm.* 2018, 75; 1117-1125.
160. Juszczak A, Ramos P, Szczolko W, et al. Can angiotensin-converting enzyme inhibitors interfere with the free radicals? Measurement of antioxidant capacity using DPPH

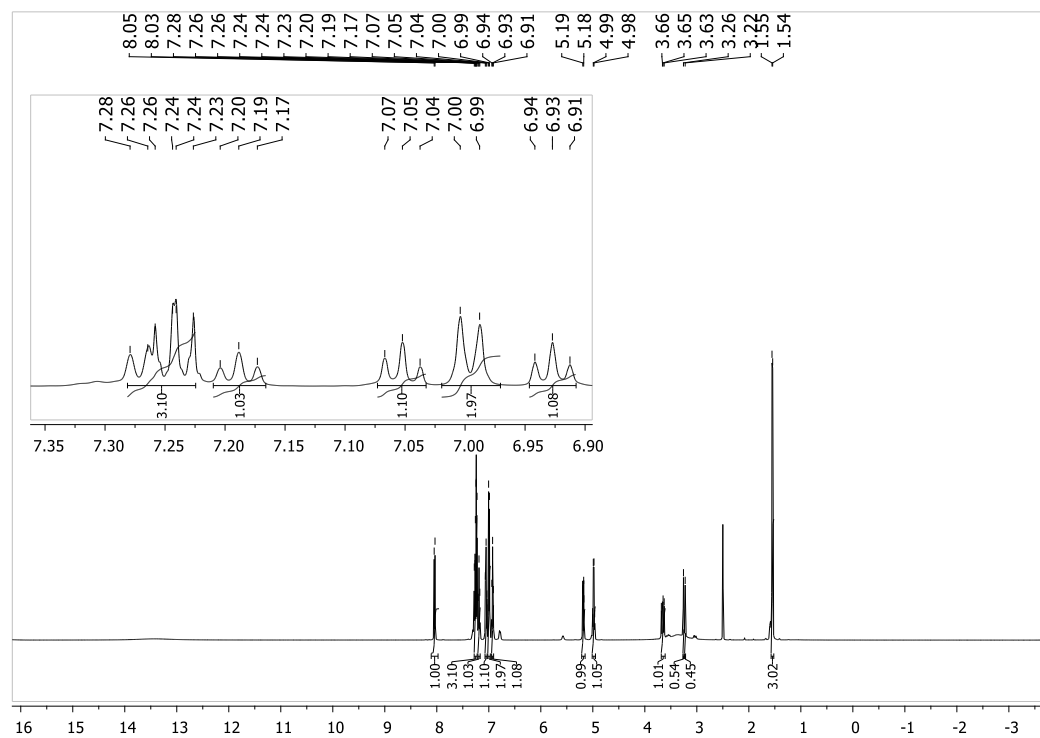
radical reduction examined by UV-VIS method. Przyjęty do druku w Acta Pol. Pharm. - APPDR-00278-2018-02.

161. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using the DPPH Free Radical Method. LWT -Food Sci. Technol. 1997, 30; 609-615.
162. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basics principles and new insights. Acta Biochim. Pol. 2010, 57; 139-142.
163. Momen M, Haghi B, Morsali A, et al. Kinetic study of dpph scavenging in the presence of mixture of zinc and vitamin C as an antioxidant. JCHR 2012, 2; 43-50.
164. Shekar T.C, Anju G. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. A. J. Ethno. 2014, 1; 244.
165. Bartosz G, *Druga twarz tlenu*. PWN, Warsaw, 2012 .
166. Czarnecka K, Chufarova N, Halczuk K, et al. Tetrahydroacridine derivatives with dichloronicotinic acid moiety as attractive, multipotent agents for Alzheimer's disease treatment. Eur. J. Med. Chem. 2018, 145; 760-769.
167. Czarnecka K, Szymanski P, Girek M, et al. Tetrahydroacridine derivatives with fluorobenzoic acid moiety as multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. Bioorg. Chem. 2017, 72; 315–322.
168. Martin Y.C. How medicinal chemists learned about log P. J. Comput. Aided Mol. Des. 2018, 32; 809-819.
169. Kujawski J, Popielarska H, Myka M, et al. The log P parameter as a molecular descriptor in the computer-aided drug design - an overview. Comput. Meth. Sci. Technol. 2012, 18; 81-88.
170. Kujawski J, Bernard M, Janusz A, Kuźma W. Prediction of log P : ALOGPS application in medicinal chemistry education. J. Chem. Educ. 2012, 89; 1, 64-67.
171. <https://www.rcsb.org/structure/2c6n>; data ostatniego logowania: styczeń 2017.
172. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods. VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. J. Mol. Model. 2013, 19; 1-32.
173. <http://openmopac.net/MOPAC2016.html> ; Data logowania: styczeń 2017.
174. <http://gaussian.com/citation>.
175. O'Boyle N.M, Banck M, James C.A, Open Babel: An Open Chemical Toolbox. J. Cheminf. 2011, 3; 1-14.

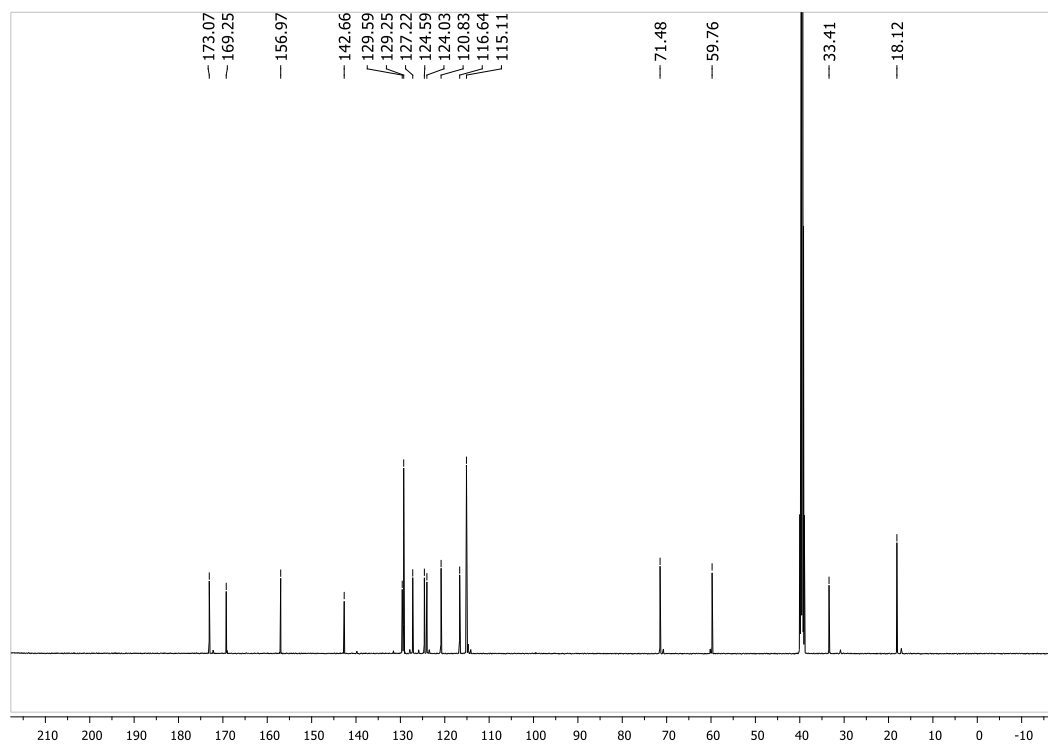
176. Sanner M.F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graphics* 1999, 17; 57-61.
177. Trott O, Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010, 31; 455-461.
178. <https://www.rcsb.org/structure/2c6n>; data ostatniego logowania: styczeń 2017.
179. Corradi H.R, Schwager S, Nchinda A.T, et al. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. *J. Mol. Biol.* 2006, 357; 964-974.
180. Silva A, Vranken W. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE *BMC. Res.Notes.* 2012, 5; 367-375.
181. Pettersen E.F, Goddard T.D, Huang C.C, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004, 25; 1605-12.

9. Załączniki:

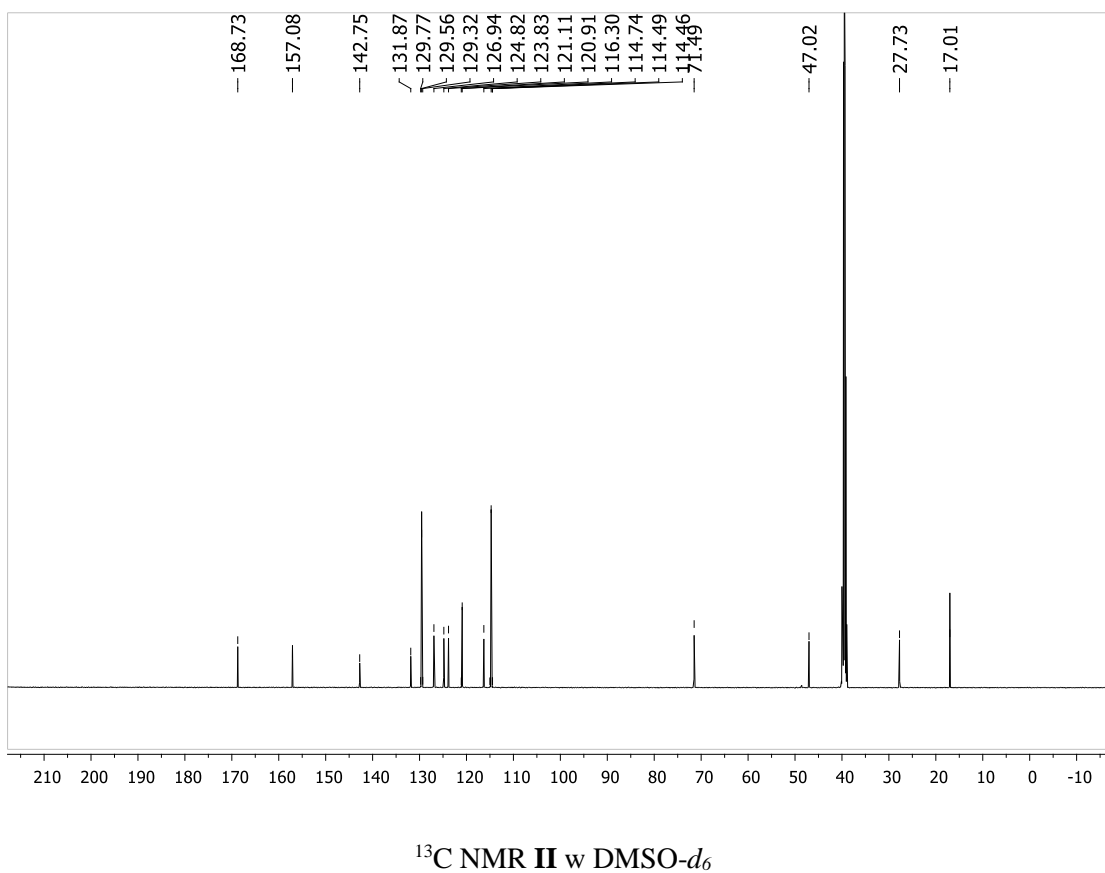
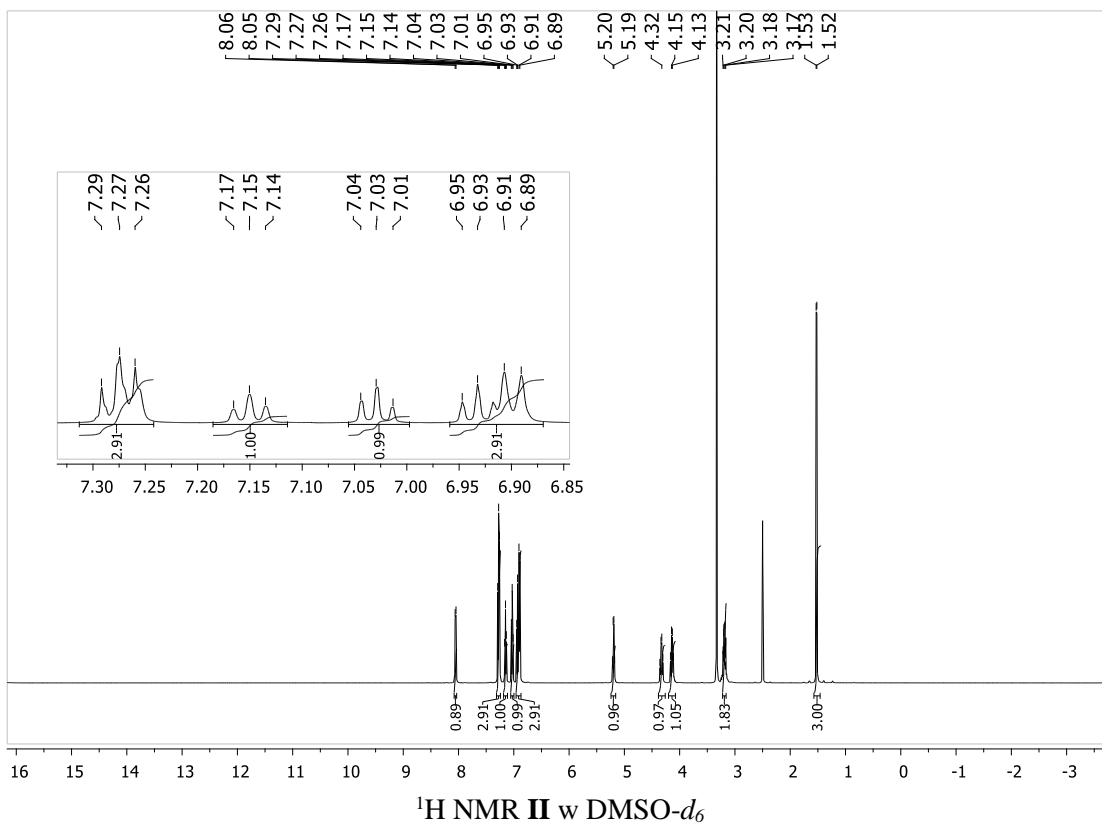
I. Widma NMR związków I-IX

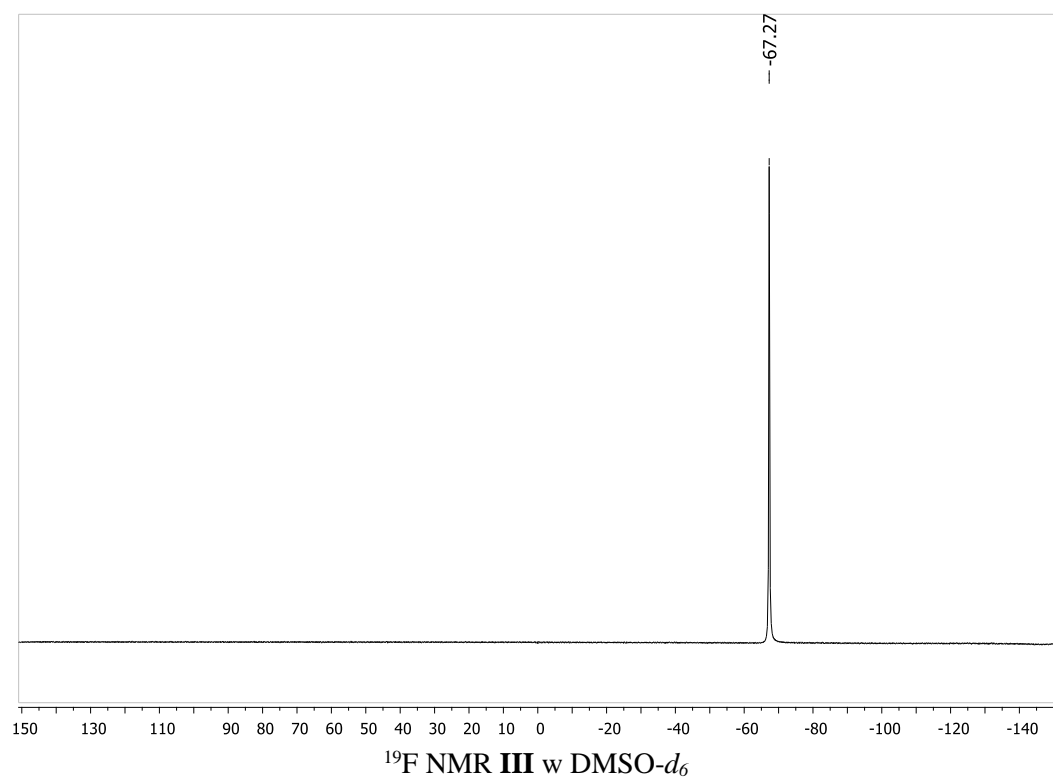


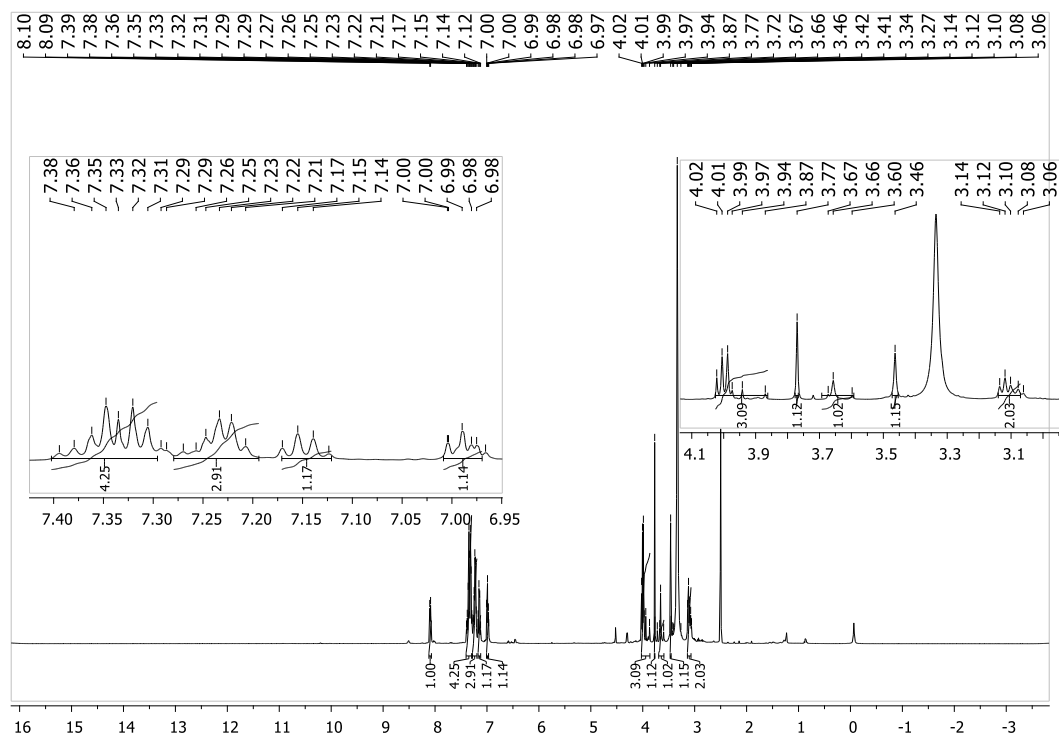
$^1\text{H NMR I w DMSO-}d_6$



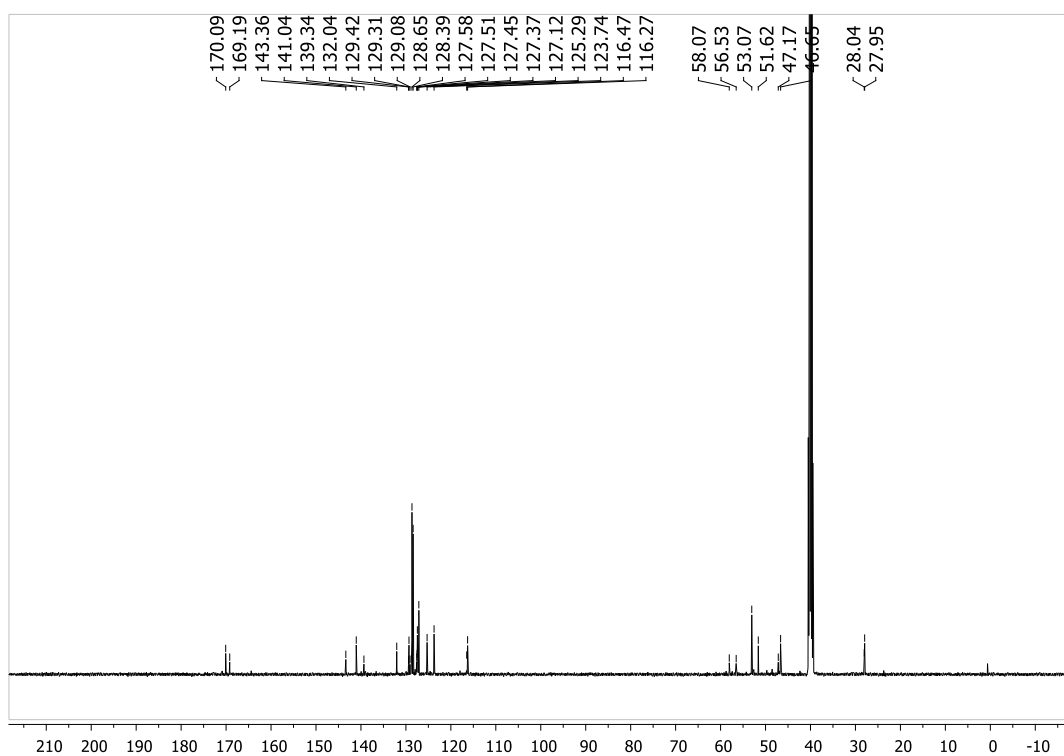
$^{13}\text{C NMR I w DMSO-}d_6$



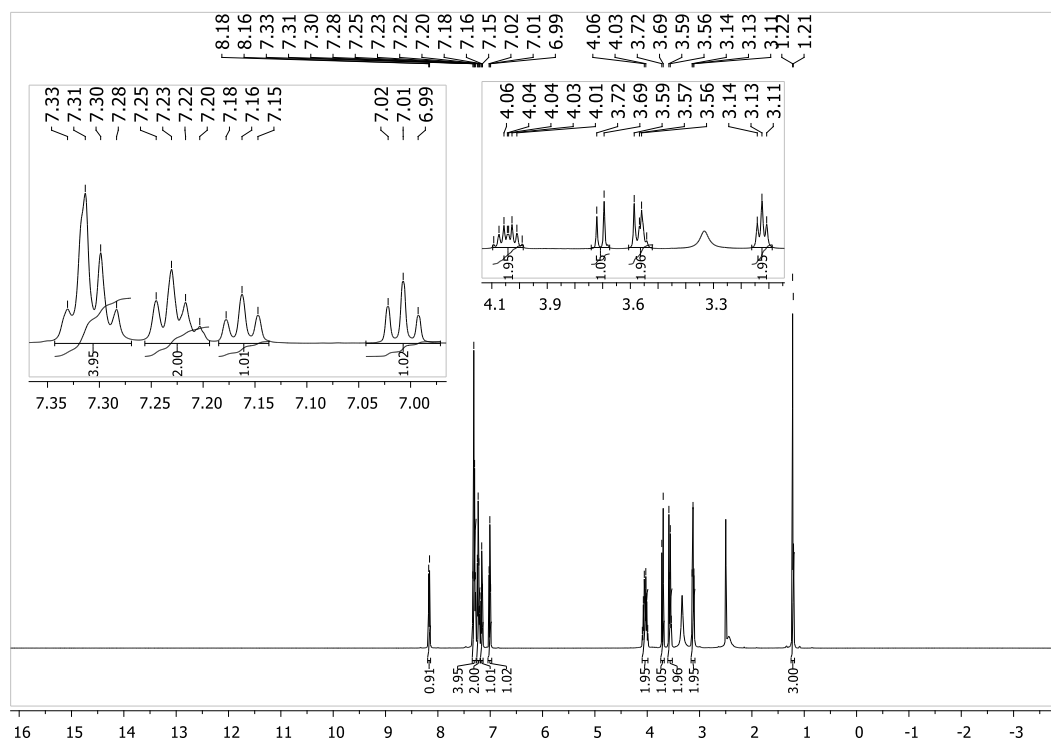




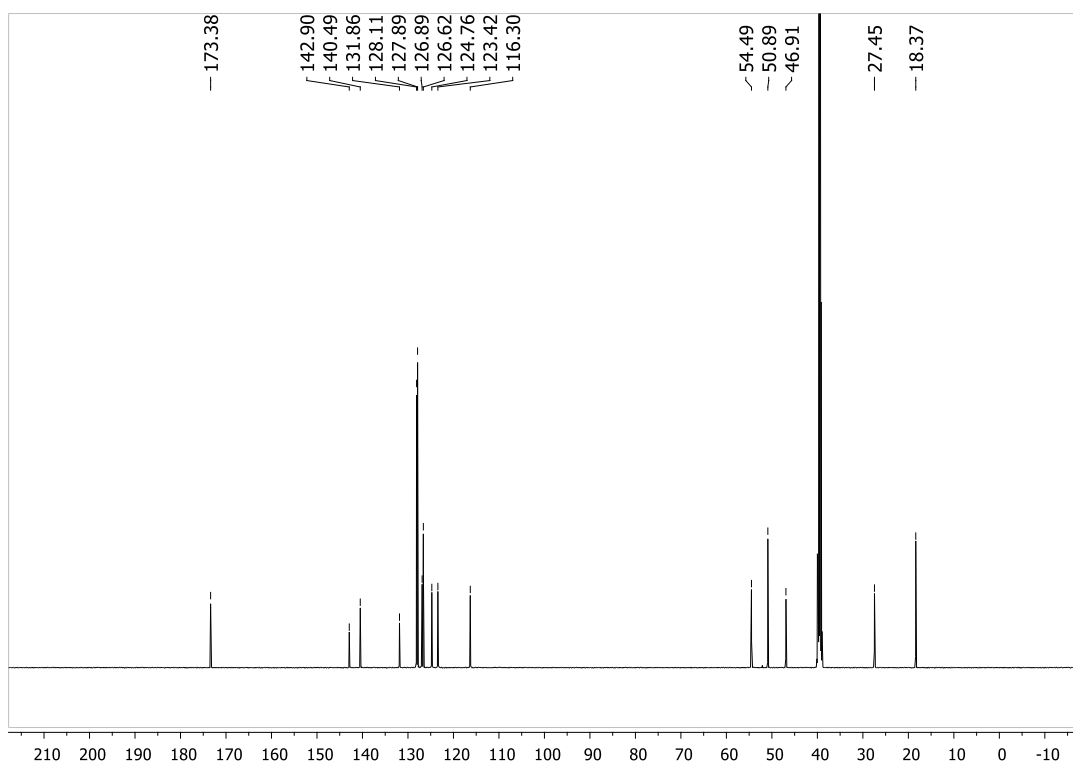
¹H NMR IV w DMSO-d₆



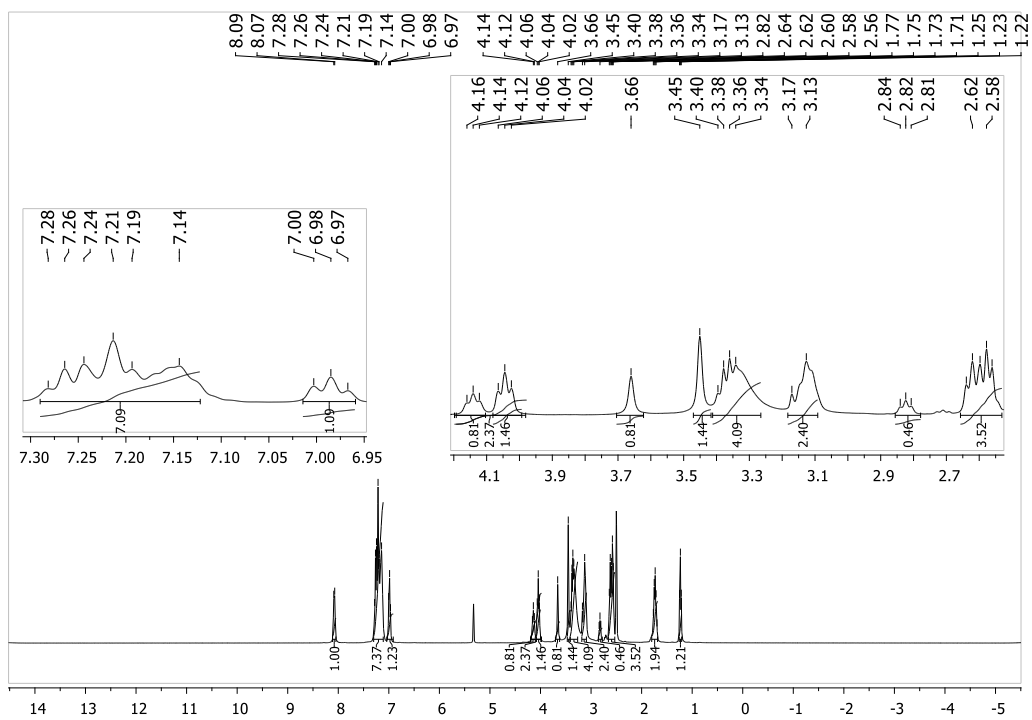
¹³C NMR IV w DMSO-d₆



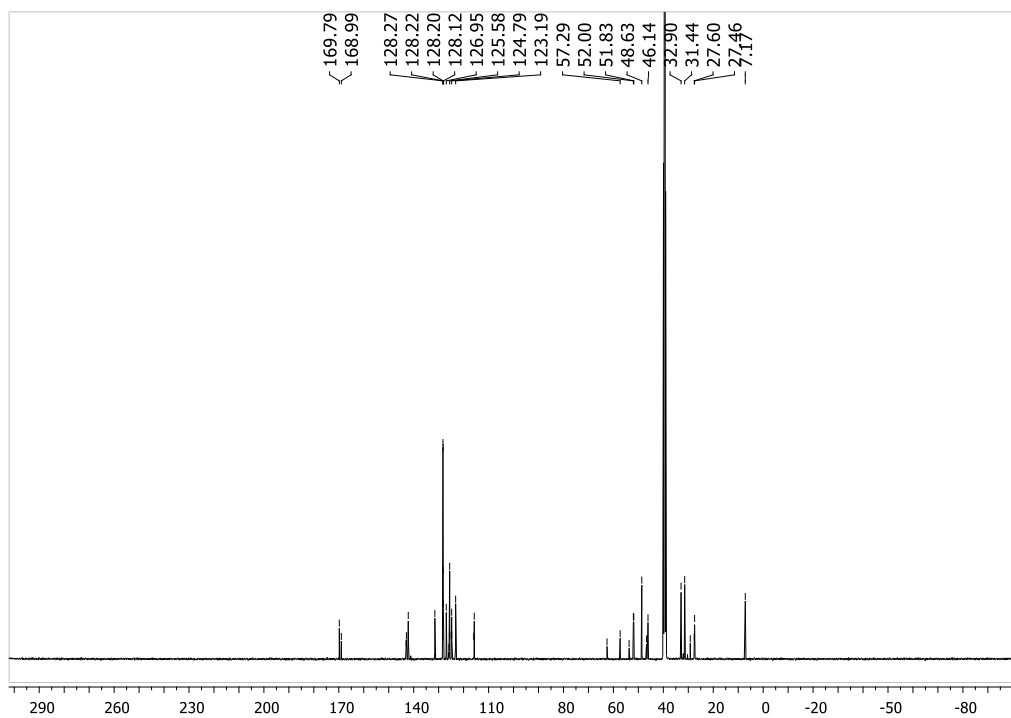
¹H NMR V w DMSO-*d*₆



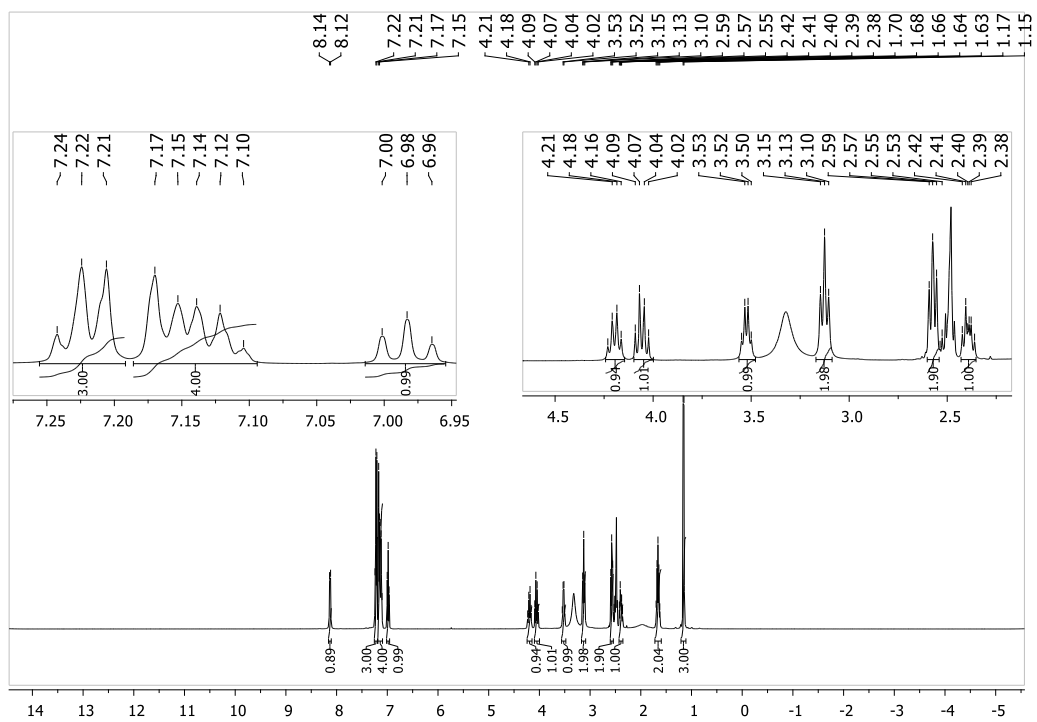
¹³C NMR V w DMSO-*d*₆



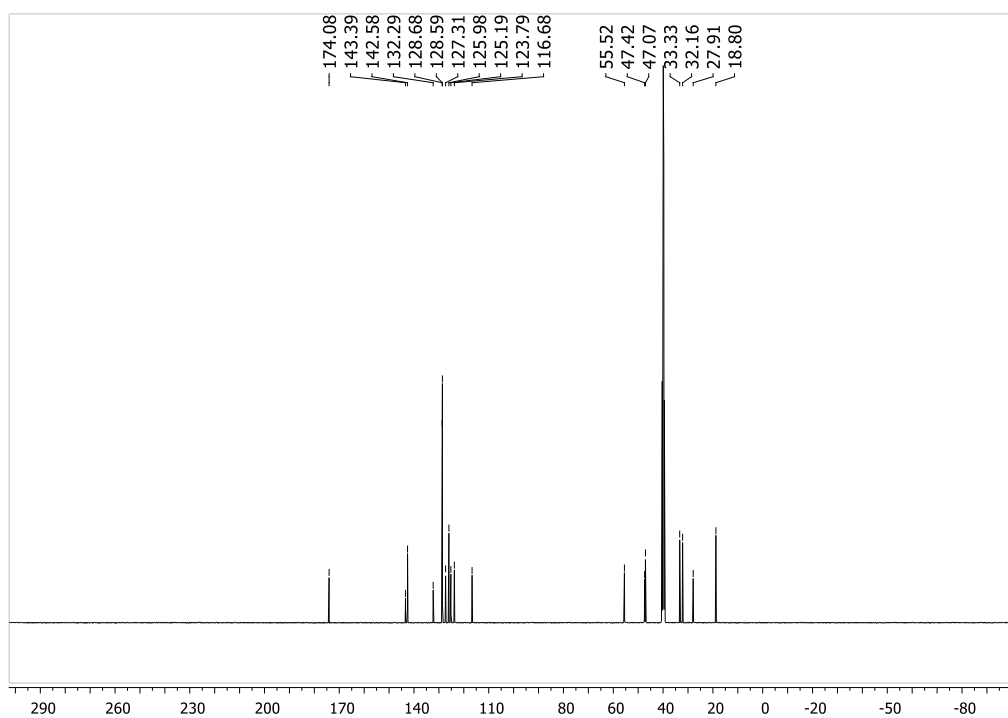
¹H NMR VI w DMSO-d₆



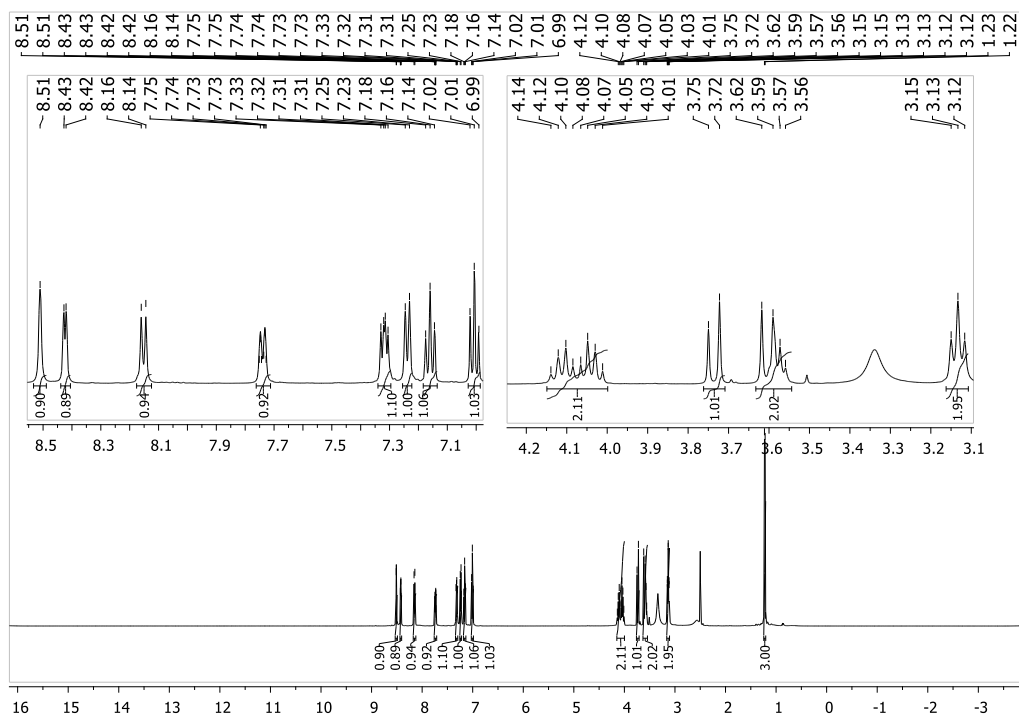
¹³C NMR VI w DMSO-d₆



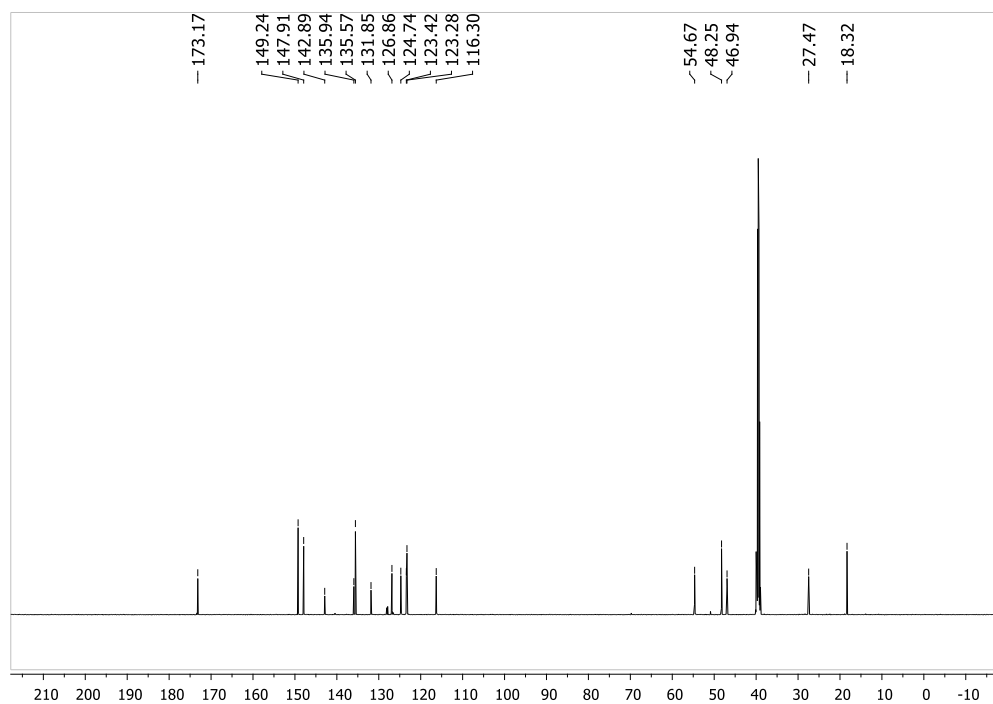
^1H NMR VII w $\text{DMSO}-d_6$



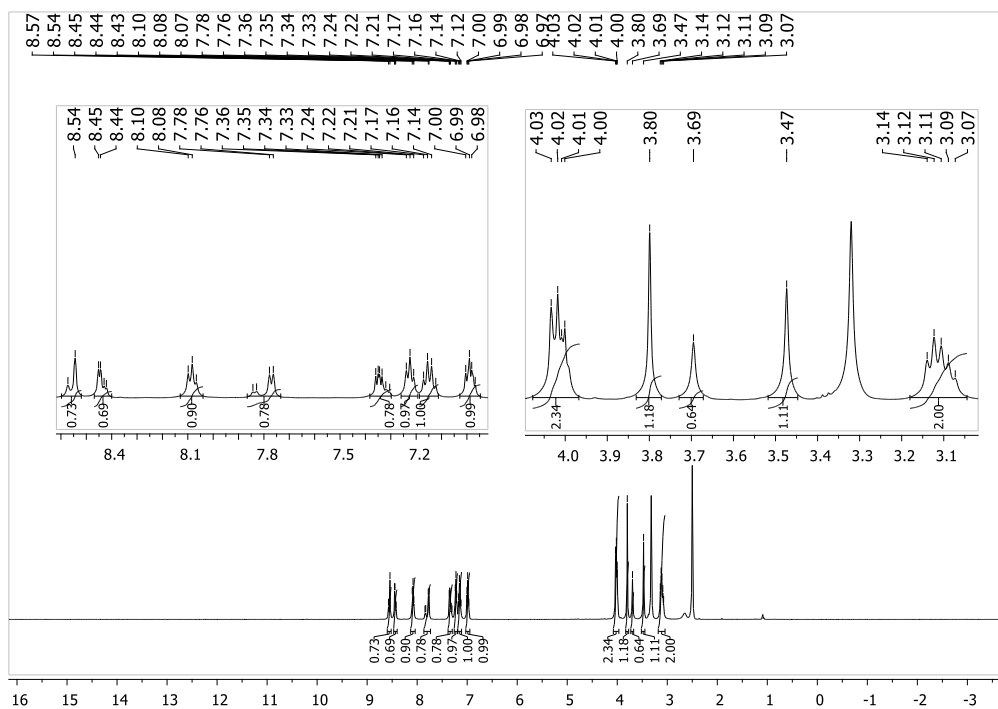
^{13}C NMR VII w $\text{DMSO}-d_6$



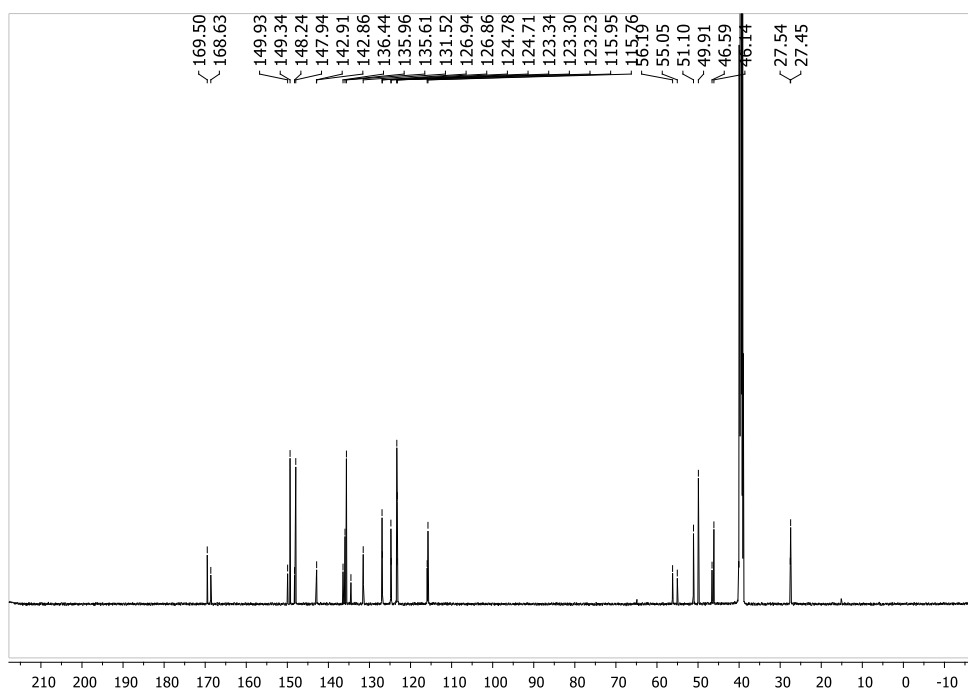
¹H NMR VIII w DMSO-*d*₆



¹³C NMR VIII w DMSO-*d*₆



^1H NMR XI w $\text{DMSO-}d_6$



^{13}C NMR XI w $\text{DMSO-}d_6$

10. Streszczenie

Niniejszą pracę doktorską podzielono na dwa etapy.

Etap I

Celem niniejszego etapu było zbadanie trwałości peryndoprylu *tert*-butyloaminy oraz argininianu peryndoprylu w fazie stałej, uwzględniając wpływ temperatury, podwyższonej i obniżonej wilgotność względnej powietrza, obecności substancji pomocniczych w preparacie farmaceutycznym – tabletki (w całości oraz w formie przepołowionej), a także hydrochlorotiazydu.

Wymienione badania przeprowadzono metodą RP-HPLC, uprzednio zrewalidowaną. Analiza udowodniła, iż kinetyczne mechanizmy reakcji rozkładu nie różnią się dla soli argininianowej, w warunkach obniżonej i podwyższonej wilgotności względnej powietrza rozkład następuje zgodnie z mechanizmem kinetyki I-rzędu. Kinetyczny mechanizm rozkładu peryndoprylu *tert*-butyloaminy zależy od obecności wilgoci, i tak – przy obniżonej wilgotności względnej powietrza obserwuje się reakcję I-rzędu, przy podwyższonej wilgotności względnej – reakcję autokatalityczną. Identyfikacja produktów rozkładu metodą ESI/MS potwierdza, iż sole peryndoprylu ulegają rozkładowi do peryndoprylatu i do pochodnej diketopiperazynowej. Obecność hydrochlorotiazydu nie zmienia mechanizmu rozkładu leku, co więcej, działa ochronnie na strukturę cząsteczki peryndoprylu, wydłużając jej czas połowicznego rozkładu.

Badanie trwałości wykazało, że leki te należy przechowywać w zamkniętych pojemnikach bez dostępu wilgoci oraz wysokich temperatur, na które szczególnie wrażliwa jest sól *tert*-butyloaminowa. Pacjenci powinni unikać także dzielenia tabletek z peryndoprylem *tert*-butyloaminy na półowki, gdyż drastycznie obniża to trwałość substancji czynnej.

Ze względu na fakt, iż w literaturze można znaleźć wiele doniesień na temat pozytywnego działania leków z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny, także poza układem krążenia, a wszystkie te badania dotyczą chorób o podłożu zapalnym, postanowiono ocenić potencjał antyoksydacyjny wybranych leków z tej grupy. Założone doświadczenie udowodniło, iż sole peryndoprylu wykazują działanie neutralizujące wolne rodniki, podobnie jak inne leki z grupy I-ACE, spośród których najlepszy wynik został odnotowany dla imidaprilu i cilazaprilu.

Etap II

Sugerując się niską trwałością leków z grupy I-ACE oraz motywując się brakiem widocznego postępu we wprowadzaniu nowych związków hipotensyjnych, w pracy postanowiono zsyntezować nowe pochodne o potencjalnym działaniu inhibującym enzym konwertazy angiotensyny. Otrzymano dziewięć nowych związków, które scharakteryzowano metodami: spektroskopią UV, ES/MS, ^1H i ^{13}C NMR, a czystość potwierdzono za pomocą temperatury topnienia i metody RP-HPLC. Związki poddano ocenie trwałości oraz badaniom biologicznym, analizie potencjału antyoksydacyjnego, a także oszacowaniu powinowactwa nowych związków do enzymu konwertującego angiotensynę i lipofilowości (*in silico*).

Przeprowadzone eksperymenty utwierdziły w przekonaniu do słuszności zaproponowanej drogi syntezy, gdyż podjęte próby dowiodły, że wszystkie nowe związki okazały się mieć wyższy czas połowicznego rozkładu niż przebadane sole peryndoprylu. Dowodzi to słuszności tezy, iż wiązanie estrowe powinno zostać wyeliminowane ze struktury, unikając ryzyka hydrolizy w warunkach przechowywania, a grupa karboksylowa pierścienia indolinowego powinna być odseparowana od grupy aminowej łańcucha bocznego, gdyż uniemożliwia to tworzenie się pochodnych diketopiperazynowych. Istotny jest też fakt, iż badania *in silico* udowodniły, że nowe związki mogą wiązać się z enzymem konwertującym angiotensynę oraz wykazują optymalną wartość *LogP*, aby przenikać przez błony biologiczne. Nowosyntezowane związki posiadają także duży potencjał antyoksydacyjny, neutralizując wolne rodniki w przedziale 13,6% - 81,8%, w porównaniu do kwasu L-askorbinowego oraz wykazują się niezadowalającą aktywnością biologiczną wobec AChE i BuChE (niski potencjał wobec neurodegeneracyjnych).

Summary in english

This doctoral thesis has been divided into two stages.

Stage I

The aim of this stage was to examine the stability of perindopril *tert*-butylamine and perindopril arginine in the solid phase, in the conditions of increased temperature, reduced and increased relative air humidity, also in a pharmaceutical preparation - tablets (whole tablets and in halved form) and in model mixtures with hydrochlorothiazide.

These tests were carried out using the revalidated RP-HPLC method. The analysis proved that the arginine salt decomposed according to the mechanism of the first order kinetics. The kinetic mechanism of degradation of perindopril *tert*-butylamine depends on the presence of moisture, in reduced relative humidity, the first-order reaction is observed, in increased relative humidity - the autocatalytic reaction. Identification of degradation products confirms that perindopril salts are decomposing to perindoprilat and to the diketopiperazine derivative. The presence of hydrochlorothiazide in model mixtures does not change the mechanism of drug degradation, moreover, it protects the structure of the perindopril molecule, extending its half-life.

The stability test showed that these medicines should be stored in closed containers avoiding humidity and high temperatures to which the *tert*-butylamine salt is very sensitive. Patients should also avoid dividing the tablets with perindopril *tert*-butylamine into halves, as it drastically reduces the stability of the active substance.

Due to the fact that in the literature there are many reports on the positive influence of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, not only on the cardiovascular system, and most of these studies were investigating inflammatory diseases, it was decided to evaluate the antioxidant potential of selected drugs from this group. The study has proved that the perindopril has a neutralizing effect on free radicals, as well as other drugs from the I-ACE group, of which the best results were obtained for imidapril and cilazapril.

Stage II

Suggesting a low stability of I-ACE drugs and motivated by the lack of visible progress in the introduction of new antihypertensive compounds, I decided to synthesize new derivatives with a potential inhibitory effect of the angiotensin-converting enzyme. Nine new compounds were obtained, which were characterized by: UV, ES/MS, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, and purity was confirmed by melting point and RP-HPLC method. The compounds were examined by stability and biological tests, antioxidant capacity analysis were obtained, as well as the analysis of the affinity of new compounds for angiotensin converting enzyme and lipophilicity (*in silico*).

The conducted experiments confirmed the validity of the proposed synthesis route, because it was proved that all the new compounds have a higher half-life time than the tested salts of perindopril. It was confirmed, that the ester link should be eliminated from the structure, to avoid the risk of hydrolysis under storage conditions, and the carboxyl group of the indoline ring should be separated from the side of chain amino group, as this prevents the formation of diketopiperazine derivatives.

The *in silico* studies have proven that new compounds can bind to an angiotensin converting enzyme and have an optimal *LogP* value to penetrate biological membranes. Newly synthesized compounds have also a high antioxidant potential, neutralizing free radicals in the range of 13.6% - 81.8% (in comparison to L-ascorbic acid) and show unsatisfactory biological activity towards AChE and BuChE (low potential for neurodegeneration).

Wykaz publikacji (Sumaryczny IF = 14,431)

Oryginalne prace eksperymentalne:

1. Katarzyna Regulska, Miłosz Regulski, **Anna Wzgarda**, Aleksandra Kotowska, Aleksandra Ignasiak, Barbara Ćwiertnia, Beata Stanisiz: *Does polyvinylpyrrolidone improve the chemical stability of cilazapril in solid state?*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2019, 18; 579-595
(IF = 1,37)
2. ***Anna Juszcak**, Paweł Ramos, Wojciech Szczołko, Barbara Pilawa, Beata Stanisiz: *Can angiotensin-converting enzyme inhibitors interfere with the free radicals? Measurement of antioxidant capacity using DPPH radical reduction examined by UV-VIS method*. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2019, 76; 233-239
(IF = 0,531)
3. ***Anna Juszcak**, Wojciech Szczołko, Martyna Pieszak, Judyta Cielecka- Piątek, Beata Stanisiz: *Impact of hydrochlorothiazide on the stability of two perindopril salts. Evaluation of the interaction with HPLC and ESI LC/MS methods*. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2018, 75; 1117-1125
(IF = 0,531)
4. ***Anna Wzgarda**, Katarzyna Dettlaff, Martyna Rostalska, Ewa Pabian, Katarzyna Regulska, Beata Stanisiz: *Thermo-, radio- and photostability of perindopril in the solid state. Comparison to other angiotensin converting enzyme inhibitors*; Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2017, 16; 1007-1018
(IF = 1,37)
5. Katarzyna Regulska, Miłosz Regulski, Sylwia Paszun, **Anna Wzgarda**, Beata Niemier, Bartłomiej Niżnik, Beata Stanisiz: *How to stabilize cilazapril-containing solid dosage forms? The optimization of a final drug formulation*, Arabian Journal of Chemistry; 2017, 10; 378-388
(IF = 2,96)
6. Wojciech Szczołko, **Anna Wzgarda**, Tomasz Koczorowski, Barbara Wicher, Łukasz Sobotta, Zofia Gdaniec, Maria Gdaniec, Jadwiga Mielcarek, Ewa Tykarska, Tomasz Gośliński. *The Suzuki cross-coupling reaction for the synthesis of porphyrazine possessing bulky 2,5-(biphenyl-4-yl)pyrrol-1-yl substituents in the periphery*. Polyhedron 2015, 102; 462-468
(IF = 2,108)

Prace poglądowe:

7. **Anna Wzgarda**, Robert Kleszcz, Monika Prokop, Katarzyna Regulska, Miłosz Regulski, Jarosław Paluszczak, Beata J. Stanisiz: *Unknown face of known drugs - what else can we expect from angiotensin converting enzyme inhibitors?* European Journal of Pharmacology 2017, 797; 9-19
(IF = 3,04)
8. Bartłomiej Niżnik, **Anna Wzgarda**, Beata Stanisiz: Kosmetyki stosowane przez kobiety w ciąży - pomoc czy zagrożenie? Polish Journal of Cosmetology 2017, 20; 92-100
9. Miłosz Regulski, Katarzyna Regulska, Beata J. Stanisiz, Marek Murias, Paulina Gieremek, **Anna Wzgarda**, Bartłomiej Niżnik: „*Chemistry and pharmacology of angiotensin-converting enzyme inhibitors*”; Current Pharmaceutical Design 2015: 21, 1764-1775
(IF = 3,052)
10. Beata Stanisiz, Katarzyna Regulska, Bartłomiej Niżnik, Miłosz Regulski, **Anna Wzgarda**: *Kwas hialuronowy, substancja lecznicza czy tylko korektor urody*. Polish Journal of Cosmetology 2014, 17; 14-21
11. Mateusz Ściepura, **Anna Wzgarda**, Wojciech Szczęłko, Marcin Wierzchowski, Mariusz Duda, Stanisław Sobiak, Jadwiga Mielcarek, Tomasz Gośliński: *Perspektywy zastosowania pochodnych hiperycyny w terapii fotodynamicznej ukierunkowanej przeciw chorobom nowotworowym i mikroorganizmom. Cz. 1*. Czasopismo Aptekarskie 2013, 2; 32-36
12. Mateusz Ściepura, **Anna Wzgarda**, Wojciech Szczęłko, Marcin Wierzchowski, Mariusz Duda, Stanisław Sobiak, Jadwiga Mielcarek, Tomasz Gośliński: *Perspektywy zastosowania pochodnych hiperycyny w terapii fotodynamicznej ukierunkowanej przeciw chorobom nowotworowym i mikroorganizmom. Cz. 2 - dokończenie*. Czasopismo Aptekarskie 2013, 20; 31-38
13. **Anna Wzgarda**, Tomasz Koczorowski, Michał Nowak, Sebastian Lijewski, Beata Czarczyńska-Goślińska, Wojciech Szczęłko, Tomasz Gośliński: *Terapia fotodynamiczna z udziałem fotouczulaczy porfirynoidowych jako narzędzie współczesnej medycyny i wyzwanie dla farmacji*. Czasopismo Aptekarskie 2012, 19; 37-49

Streszczenia zjazdowe

a) wystąpienia ustne:

- **Anna Wzgarda**, Beata Stanisz, Martyna Rostalska, Ewa Pabian: *Walidacja metody HPLC do oceny trwałości peryndoprylu (PER) w fazie stałej*. III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów i Młodych Naukowców "Per scientiam ad salutem aegroti". Bydgoszcz, 9-10 V 2014 r. Książka streszczeń, 68-69

b) Postery

- **Anna Juszcak**, Paweł Ramos, Barbara Pilawa, Beata Stanisz: *Angiotensin converting enzyme inhibitors - free radicals interactions examined by EPR spectroscopy*. II Konferencja Naukowo-Szkoleniowa "Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia". Poznań, 19-20 X 2017
- Wojciech Szczołko, Zuzanna Brzozowska, Mateusz Grajewski, Tomasz Koczorowski, **Anna Juszcak**, Anna Taubert, Ewa Tykarska, Tomasz Gośliński: *Synteza i charakterystyka nowych magnezowych porfirazyn posiadających rozbudowane grupy peryferyjne*. III Sympozjum "Szkoła chemii medycznej". Wrocław, 6-8 IX 2017
- **Anna Juszcak**, Wojciech Szczołko, Beata Stanisz: *Perspektywa nowej formułacji w terapii kombinowanej nadciśnienia. Wpływ hydrochlorotiazydu na trwałość i mechanizm rozkładu peryndoprylu*. III Sympozjum "Szkoła chemii medycznej". Wrocław, 6-8 IX 2017
- **Anna Wzgarda**, Beata Stanisz: *Kinetics of degradation of perindopril tertbutyloamine in finished dosage formulations*. 23rd Young Research Fellow Meeting. Lille, France, 15-17 II 2016
- **Anna Wzgarda**, Wojciech Szczołko, Tomasz Koczorowski, Ewa Tykarska, Barbara Wicher, Anna Teubert, Tomasz Gośliński: *Synthesis of porphyrazine with 2,5-di(4'-chlorophenylpyrrolyl) groups - potential synthon for cross-coupling reactions*. 26th Bilateral Symposium Poznan-Halle "From Molecular Medicine to Public Health - Translational Research in Cardiovascular Medicine and Oncology". Halle, Germany, 23-25 X 2015
- **Anna Wzgarda**, Martyna Pieszak, Beata Stanisz: *Perindopril and hydrochlorothiazide - study of stability*. 8th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Science "Retrospects, insights and prospects". Kiel, Germany, 29-30 May 2015

- **Anna Wzgarda**, Katarzyna Dettlaff, Ewa Pabian, Beata Jadwiga Stanisiz: *Perindopril tert-butyloamine: Study of Stability*. Ist International Congress „From drug discovery to drug delivery”, Athens, Greece, 13-15 November 2014
- **Anna Wzgarda**, Wojciech Szczołko, Beata Stanisiz: *Wpływ różnych wilgotności względnych powietrza w stałej temperaturze na trwałość peryndoprylu* Oxygenalia 2014. II Międzynarodowa Konferencja Naukowa "Woda cząsteczką życia". XI Międzynarodowy Kongres Młodych Naukowców w Poznaniu, 7-8 XI 2014
- Mateusz Ściepura, Michał Nowak, **Anna Wzgarda**, Sebastian Lijewski, Jarosław Piskorz, Łukasz Lijewski, Jadwiga Mielcarek, Tomasz Gośliński: *Porphyrazines possessing peripheral benzylthiol substituents with potential applications in photodynamic therapy*. 12th International Congress of Young Medical Scientists. Poznań, 11-12 V 2012
- Wojciech Szczołko, **Anna Wzgarda**, Łukasz Sobotta, Paulina Skupin, Ewa Tykarska, Maria Gdaniec, Jadwiga Mielcarek, Tomasz Gośliński: *Synthesis and physical-chemical properties of porphyrazines possessing bulky peripheral 2,5-diarylpyrrol-1-yl substituents*. Vth Conversatory on Medicinal Chemistry. Lublin, 13-15 IX 2012
- Wojciech Szczołko, Łukasz Sobotta, Magdalena Nowak, **Anna Wzgarda**, Stanisław Sobiak, Jadwiga Mielcarek, Maria Gdaniec, Ewa Tykarska, Tomasz Gośliński. *Synthesis and physicalchemical properties of porphyrazines possessing bulky peripheral substituents*. IV Konwersatorium Chemii Medycznej. Lublin, 08-10 IX 2011
- Mateusz Ściepura, Michał Nowak, **Anna Wzgarda**, Łukasz Lijewski, Dominik Langer, Michał Kryjewski, Ewa Tykarska, Maria Gdaniec, Jadwiga Mielcarek, Tomasz Gośliński. *Synthesis, physical and chemical properties of porphyrazines possessing peripheral benzylsulfanyl substituents*. Vth Conversatory on Medicinal Chemistry. Lublin, 13-15 IX 2012

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej pt.:

„Trwałość peryndoprylu w fazie stałej oraz synteza nowych pochodnych inhibitorów konwertazy angiotensyny”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych

Imię i nazwisko
podpis.....

Data, podpis.....

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że jestem autorem rozprawy doktorskiej pt

„Trwałość peryndoprylu w fazie stałej oraz synteza nowych pochodnych inhibitorów konwertazy angiotensyny”

Informuję, że udzielam/nie udzielam¹ nieodpłatnie Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu (UMP) licencji niewyłącznej do korzystania z ww. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji²

- przechowywanie i archiwizowanie pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania, udostępniania i obrotu w formie elektronicznej
- udostępnienie pracy w Czytelnii Naukowej Biblioteki Głównej UMP

Jednocześnie informuję, że³

- wyrażam zgodę na nieodpłatne opublikowanie całości manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (WBC)
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej, ponieważ zobowiązuję się
 - w terminie nie dłuższym niż 6 miesięcy od daty podpisania niniejszego oświadczenia do przygotowania publikacji opartej na wynikach pracy doktorskiej i wysłania do wydawnictwa,
 - opublikowania ww. wyników w okresie kolejnych 18 miesięcy,
 - afiliowania ww. pracy na rzecz Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej z uwagi na zawarty w niej niejawni charakter informacji

Przyjąłem do wiadomości fakt obowiązku niezwłocznego poinformowania Dziekanatu Wydziału Farmaceutycznego UMP o wysłaniu manuskryptu do wydawnictwa oraz przyjęciu publikacji do druku⁴. W przypadku niepoinformowania Dziekanatu w terminie o ww. faktach zezwalam Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu na opublikowanie całości mojej pracy doktorskiej w WBC⁵.

.....
Data i podpis

¹ niepotrzebne skreślić

² właściwe pola zaznaczyć

³ należy wybrać jedną z trzech podanych niżej możliwości

⁴ dotyczy wyłącznie sytuacji, w której autor rozprawy doktorskiej prosi o odroczenie publikacji manuskryptu w WBC z uwagi na zamiar opublikowania zawartych w niej wyników w czasopiśmie/czasopismach naukowych

⁵ Art. 14, ust. 1, Ustawa o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dz.U. 1994 Nr 24 poz. 83)