

UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII FARMACEUTYCZNEJ



Katarzyna Regulska

TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU W FAZIE STAŁEJ
NA TLE INNYCH INHIBITORÓW KONWERTAZY ANGIOTENSYNY
ORAZ OCENA WPŁYWU PROCESU JEGO DEGRADACJI NA
INICJACJĘ NOWOTWOROWĄ

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. n. farm. Beata Jadwiga Stanisław, prof. UM

POZNAŃ 2014

PRAGNĘ ZŁOŻYĆ SERDECZNE PODZIĘKOWANIA:

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

za życzliwość, zrozumienie,
kilkuletnie kierowanie moim rozwojem naukowym
oraz wszechstronną pomoc
w przygotowaniu niniejszej pracy

PANI PROF. DR HAB. N. FARM. ANNIE JELIŃSKIEJ

za umożliwienie wykonania badań nad trwałością chlorowodoru imidaprilu

PANU DR HAB. N. FARM. MARKOWI MURIASOWI

za okazaną pomoc w badaniach toksykologicznych

MGR. FARM. MIŁOSZOWI REGULSKIEMU

za bezinteresowny wkład włożony w realizację badań mutagenności

MOJEJ RODZINIE, W SZCZEGÓLNOŚCI MOJEMU TACIE

za motywację, wsparcie i wiarę

WIELKOPOLSKIEMU CENTRUM ONKOLOGII

za współfinansowanie w latach 2012 - 2014

Pracę dedykuje

mojemu kochanemu mężowi Miłoszowi

oraz

synkowi Adasiowi,
który przyszedł na świat w czasie jej pisania.

WYKAZ PUBLIKACJI

Oryginalne prace doświadczalne:

1. *B. Stanisław, **K. Regulska**, K. Kolasa, *UV derivative spectrophotometric and RP-HPLC methods for determination of imidapril hydrochloride in tablets and for its stability assessment in solid state*. Acta Pol. Pharm., 2011, 68, 645-651.
Wskaźnik Impact Factor: 0.663
2. B. Stanisław, **K. Regulska**, T. Ratajczak. *First order derivative spectrophotometric and HPLC methods for determination of moexipril hydrochloride in the pure form, pharmaceutical formulations and evaluation of its stability*. Acta Pol. Pharm., 2012, 69, 389-395.
Wskaźnik Impact Factor: 0.663
3. *B. Stanisław, **K. Regulska**, J. Kania, P. Garbacki, *Effect of pharmaceutical excipients on the stability of angiotensin-converting enzyme inhibitors in their solid dosage formulations*. Drug. Dev. Ind. Pharm., 2013, 39, 51-61.
Wskaźnik Impact Factor: 1.539
4. ***K. Regulska**, B. Stanisław, P. Lisiecki, *Optimization of storage and manufacture conditions for imidapril hydrochloride in solid state as a way to reduce costs of antihypertensive therapy*. AAPS PharmSciTech., 2013, 14, 1199-1208.
Wskaźnik Impact Factor: 1.584
5. ***K. Regulska**, B. Stanisław, *Kinetics and mechanism of solid state imidapril hydrochloride degeneration and its degradation impurities identification*. Centr. Eur. J. Chem. 2013, 11, 754-762.
Wskaźnik Impact Factor: 1.167
6. ***K. Regulska**, M. Murias, B. Stanisław, M. Regulski. *Is there any association between imidapril hydrochloride stability profile under dry air conditions and cancer initiation?* Int. J. Pharm., 2013, 456, 332-339.
Wskaźnik Impact Factor: 3.458
7. *B. Stanisław, **K. Regulska**, *Kinetics of degradation of imidapril hydrochloride in finished dosage formulations*. Acta Pol. Pharm., 2013, 70, 737-742.
Wskaźnik Impact Factor: 0.665
8. ***K. Regulska**, M. Murias, B. Stanisław, M. Regulski. *The mutagenicity analysis of imidapril hydrochloride and its degradant, diketopiperazine derivative, nitrosation mixtures by in vitro Ames test with two strains of Salmonella typhimurium*. Rep. Pract. Oncol. Rad. in press.

Prace poglądowe:

9. B. Stanisław, **K. Regulska**, S. Paszun, K. Grzeszak, *Cellulit - defekt kosmetyczny czy choroba XXI wieku?* Farm. Pol., 2012, 68, 584-594.
10. **K. Regulska**, B. Stanisław, M. Regulski. *Indywidualizacja terapii przeciwnowotworowej; molekularne uwarunkowania mechanizmów działania nowoczesnych leków onkologicznych*. Post. Hig. Med. Dośw., 2012, 66, 855-867.
Wskaźnik Impact Factor: 0.552

11. B. Stanisław, **K. Regulska**. *Jak pielęgnować i leczyć skórę atopową?* Farm. Pol., 2012, 68, 209-215.
12. ***K. Regulska**, B. Stanisław, M. Regulski. *The renin-angiotensin system as a target of novel anticancer therapy*. Curr. Pharm. Des., 2013, 19, 7103 – 7125
Wskaźnik Impact Factor: 3.311
13. *B. Stanisław, **K. Regulska**, M. Regulski. *The angiotensin converting enzyme inhibitors – alternative clinical applications*. Now. Lek., 2014, 83, in press.
14. B. Stanisław, **K. Regulska**, M. Regulski, P. Gieremek. *Molekularne podstawy interakcji międzylekowych w terapii nowotworów jelita grubego*. Post. Hig. Med. Dośw., 2014, 68, 209-218.
Wskaźnik Impact Factor: 0.552
15. B. J. Stanisław, **K. Regulska**, B. Niżnik, M. Regulski, A. Wzgarda. *Kwas hialuronowy substancja lecznicza, czy tylko korektor urody?* Pol. J. Cosmetol., 2014, 17: 14-21.

Streszczenia zjazdowe:

16. M. H. Umbreit, P. Chintea, S. Jankowski, **K. Karolak**. *The structural determination of spirostan saponins using selected methods of chemical instrumental analysis*. "New challenges for pharmaceutical sciences". Poznań, May 15-16, 2009, s. 107.
17. *B. Stanisław, P. Lisiecki, **K. Karolak**. *Kinetyka rozkładu chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej*. "Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych". Poznań, 17-18 06. 2010,: s. 88
18. *B. J. Stanisław, **K. Regulska**. *Ocena trwałości chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej*. „Ocena jakości preparatów farmaceutycznych z uwzględnieniem metod badania w fazie stałej”. Gdańsk, 15-16. 09. 2011. s. 27
19. ***K. Regulska**, B.J. Stanisław. *Ocena trwałości chlorowodoru imidaprilu w tabletkach w fazie stałej*. „Farmacja dziś i jutro”. Lublin 13-14. 06. 2013.s. 62.

Komunikaty ustne:

20. ***K. Regulska**, M. Murias, B. Stanisław, M. Regulski, *Impact of nitrosation on mutagenicity of imidapril hydrochloride and its degradation product*. "Perspectives and challenges in medicine". Poznań, Poland, 13-15. 09. 2013. s. 31-32.

* publikacje dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej

Sumaryczna wartość wskaźnika Impact Factor: 14.154

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	22
2. Układ Renina – Angiotensyna i inhibitory konwertazy angiotensyny	25
2.1. Struktura układu Renina - Angiotensyna	26
2.2. Struktura enzymu konwertującego angiotensynę	29
2.2.1. Domena N oraz domena C somatycznej postaci ACE	30
2.2.2. Budowa centrum aktywnego ACE	31
2.2.3. Struktura angiotensyny I	32
2.3. Inhibitory konwertazy angiotensyny (I-ACE).....	33
2.3.1. Farmakodynamiczne aspekty działania I-ACE	33
2.3.2. Budowa i aktywność I-ACE.....	34
2.3.3. Kompleks ACE-inhibitor w układzie przestrzennym.....	36
2.3.4. Systematyka I-ACE.....	37
2.4. Chlorowodorek imidaprilu	38
3. Trwałość leku w fazie stałej – część teoretyczna	41
3.1. Pojęcie trwałości leku w fazie stałej.....	42
3.2. Reaktywność a trwałość substancji leczniczej w fazie stałej	43
3.2.1. Reakcje rozkładu termicznego dikarboksylowych I-ACE w fazie stałej	44
3.3. Wpływ składników preparatu farmaceutycznego na trwałość substancji leczniczej	46
3.3.1. Substancje pomocnicze w stosowane technologii tabletek chlorowodoru imidaprilu	48
3.3.2. Stearynian magnezu	49
3.4. Trwałość postaci farmaceutycznej typu tabletki do podania doustnego.....	50
3.5. Wpływ opakowania bezpośredniego na trwałość leku w fazie stałej.....	51
3.5.1. Opakowanie bezpośrednie typu blister.....	52
3.6. Kinetyka reakcji rozkładu substancji leczniczej w fazie stałej.....	53
3.6.1. Model reakcji pierwszorzędowej.....	56
3.6.2. Kinetyka <i>Prout-Tompkins'a</i>	56
3.6.3. Wpływ temperatury na szybkość reakcji w fazie stałej.....	57
3.6.4. Wpływ wilgotności względnej powietrza na szybkość reakcji w fazie stałej	58
3.7. Metody oceny trwałości leków.....	59
3.7.1. Kryteria wyboru metody analitycznej do badań kinetycznych	60
3.7.2. Walidacja metody analitycznej	61

3.7.3.	Metody oznaczania chlorowodorku imidaprilu – przegląd piśmiennictwa	62
3.8.	Zastosowanie techniki QSPR w analizie trwałości leku	65
4.	Część doświadczalna, etap I - trwałość chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej	67
4.1.	Cel badań	67
4.2.	Materiały do badań i odczynniki	69
4.2.1	Materiały	69
4.2.2.	Odczynniki	70
4.3.	Aparatura i sprzęt	70
4.3.1.	Aparatura	70
4.3.2.	Sprzęt pomocniczy	70
4.4.	Metody analityczne i kinetyczne	71
4.4.1.	Metoda spektrofotometryczna UV	71
4.4.2.	Metoda RP-HPLC z detekcją UV	71
4.4.3.	Metoda HPLC-MS	72
4.4.4.	Izotermiczna metoda badania kinetyki rozkładu leku	72
4.4.5.	Metoda QSPR	73
4.4.6.	Obliczenia	74
4.5.	Procedury	74
4.5.1.	Dobór i optymalizacja metody analitycznej	74
4.5.2.	Walidacja metody analitycznej	76
4.5.3.	Badanie trwałości chlorowodorku imidaprilu w substancji	77
4.5.4.	Badanie trwałości chlorowodorku imidaprilu w obecności substancji pomocniczych	79
4.5.5.	Badanie trwałości chlorowodorku imidaprilu w postaci farmaceutycznej	80
4.5.6.	Analiza QSPR	81
4.6.	Wyniki	82
4.6.1.	Dobór i optymalizacja metody	82
4.6.2.	Walidacja metody spektrofotometrycznej UV przy użyciu techniki D ¹	83
4.6.3.	Walidacja metody RP-HPLC	84
4.6.4.	Ocena wpływu zmian wilgotności względnej powietrza na trwałość chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji	89
3.6.5.	Ocena wpływu zmian temperatury na trwałość chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza	98
3.6.6.	Analiza kinetyki tworzenia oraz identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu powstających w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza	105

4.6.7.	Ocena wpływu zmian temperatury na trwałość chlorowodoru imidaprilu w postaci czystej substancji w warunkach suchego powietrza	118
4.6.8.	Analiza kinetyki tworzenia oraz identyfikacja produktów rozkładu chlorowodoru imidaprilu, powstających w warunkach podwyższonej temperatury oraz suchego powietrza.....	126
4.6.9.	Analiza trwałości chlorowodoru imidaprilu w obecności substancji pomocniczych	133
4.6.10.	Analiza trwałości chlorowodoru imidaprilu w tabletkach	143
4.6.11.	Metoda QSPR w analizie trwałości I-ACE.....	162
4.7.	Podsumowanie	167
5.	Trwałość chlorowodoru imidaprilu a jego profil bezpieczeństwa onkologicznego – część teoretyczna	168
5.1.	Kancerogeneza.....	170
5.2.	Transdukcja sygnału przez receptor AT ₁	171
5.2.1.	Szlaki sygnalizacyjne sprzężone z AT ₁ zależne od białek G.....	171
5.2.2.	Szlaki sygnalizacyjne sprzężone z AT ₁ zależne od kinaz tyrozynowych	175
5.3.	Ekspresja elementów RAS w komórkach nowotworowych	176
5.4.	Angiotensyna II a proces nowotworowy	177
5.5.	Wpływ I-ACE na przebieg procesu kancerogenezy	179
5.6.	Badania mutagenności leku	180
5.6.1.	Test mutacji powrotnych w systemie <i>Salmonella typhimurium</i>	181
5.7.	Mutagenność związków N-nitrozowych.....	184
5.8.	Ocena podatności leku na N-nitrozowanie	186
6.	Część doświadczalna, etap II - trwałość chlorowodoru imidaprilu a jego profil bezpieczeństwa onkologicznego	187
6.1.	Cel badań	187
6.2.	Materiały do badań i odczynniki.....	187
6.2.1	Materiały.....	187
6.2.2.	Odczynniki.....	187
6.3.	Aparatura i sprzęt.....	188
6.3.1.	Aparatura	188
6.3.2.	Sprzęt pomocniczy.....	188
6.4.	Metody	189
6.4.1.	Ames MPF™ 98/100 test.....	189
6.4.2.	<i>Nitrosation assay procedure</i> - (NAP) test	190
6.4.3.	Obliczenia	190

6.5. Procedury	190
6.6. Wyniki	198
6.6.1. Oznaczenie dawki cytotoksycznej	198
6.6.2. Oznaczenie mutagenności.....	200
7. Omówienie wyników	210
8. Wnioski.....	229
Streszczenie	231
Abstract.....	233
Piśmiennictwo	235
Oświadczenia	244

WYKAZ RYCIN

2.1	Główne szlaki metaboliczne angiotensyny II	26
2.2	Struktura somatycznej postaci enzymu konwertującego angiotensynę	30
2.3	Budowa przestrzenna angiotensyny I	32
2.4	Hipotetyczny, dwuwymiarowy model centrum aktywnego ACE	34
2.5	Reguła pięciu dystansów dla I-ACE.	35
2.6	Schemat wiązania enalaprilu z ACE	36
2.7	Wzór strukturalny chlorowodoru imidaprilu	39
3.1	Mechanizm reakcji hydrolizy	45
3.2	Przebieg wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z utworzeniem pochodnej diketopiperazynowej na przykładnie chinaprilu	46
4.1	Widmo chlorowodoru imidaprilu w metanolu zależności	82
4.2	Widma zależności $D^l = f(\lambda)$ dla zmian stężenia chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej	83
4.3	Diagram korelacyjny, przedstawiający liniowość metody RP-HPLC nr 1	86
4.4	Chromatogramy czystej postaci chlorowodoru imidaprilu, metoda RP-HPLC nr 1	89
4.5	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 25.0 \%$).....	92
4.6	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 50.9 \%$).....	93
4.7	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 60.5 \%$).....	94
4.8	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 66.5 \%$).....	95
4.9	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$).....	96
4.10	Wpływ zmiennej $RH \%$ na trwałość chlorowodoru imidaprilu w substancji	97
4.11	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$).....	99
4.12	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 348 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$).....	100
4.13	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 353 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$).....	101
4.14	Graficzny obraz rozkładu chlorowodoru imidaprilu ($T = 358 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$).....	102
4.15	Zależność <i>Arrhenius</i> 'a dla rozkładu chlorowodoru imidaprilu w substancji; $RH = 76.4\%$...	103
4.16	Trójwymiarowa zależność pomiędzy parametrami rozkładu chlorowodoru imidaprilu	104
4.17	Optymalizacja metody RP-HPLC; chromatogram dla chlorowodoru imidaprilu po 9 dniach ogrzewania; faza ruchoma bufor fosforanowy pH 2 – acetonitryl (40:60 v/v)	106
4.18	Optymalizacja metody RP-HPLC; chromatogram dla chlorowodoru imidaprilu po 9 dniach ogrzewania; faza ruchoma bufor fosforanowy pH 2 – acetonitryl (60:40 v/v)	106
4.19	Optymalizacja metody RP-HPLC; chromatogram dla chlorowodoru imidaprilu po 9 dniach ogrzewania; faza ruchoma bufor fosforanowy pH 2 – acetonitryl (70:30 v/v)	106
4.20	Optymalizacja metody RP-HPLC; chromatogram dla chlorowodoru imidaprilu i chlorowodoru oksymetazoliny; faza ruchoma - bufor fosforanowy pH2 – acetonitryl (70:30 v/v)	107

4.21	Optymalizacja metody RP-HPLC; chromatogram dla chlorowodorku imidaprilu i benzokainy; faza ruchoma - bufor fosforanowy <i>pH</i> 2 – acetonitryl (70:30 v/v)	107
4.22	Powstawanie produktów degradacji chlorowodorku imidaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	112
4.23	Chromatogram HPLC-MS chlorowodorku imidaprilu niepoddanego rozkładowi	113
4.24	Widma spektrometrii mas dla chlorowodorku imidaprilu niepoddanego rozkładowi.....	114
4.25	Chromatogramy HPLC-MS chlorowodorku imidaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$, $t = 48 \text{ h}$)....	115
4.26	Widma masowe chlorowodorku imidaprilu, forma kationowa ($T=363 \text{ K}$, $RH=76.4\%$, $t=48 \text{ h}$)	116
4.27	Widma masowe chlorowodorku imidaprilu, forma anionowa ($T=363 \text{ K}$, $RH=76.4\%$, $t=48 \text{ h}$)	116
4.28	Mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach obecności wilgoci	117
4.29	Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 0.0 \%$).....	120
4.30	Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T = 368 \text{ K}$, $RH = 0.0 \%$).....	121
4.31	Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T = 373 \text{ K}$, $RH = 0.0 \%$).....	122
4.32	Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0.0 \%$).....	123
4.33	Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T = 383 \text{ K}$, $RH = 0.0 \%$).....	124
4.34	Zależność <i>Arrhenius</i> 'a dla rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji; $RH = 0.0 \%$	125
4.35	Chromatogramy czystego chlorowodorku imidaprilu, $RH= 0.0\%$, metoda RP-HPLC nr 1.....	126
4.36	Powstawanie produktu degradacji chlorowodorku imidaprilu ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0.0 \%$)	129
4.37	Chromatogramy HPLC-MS chlorowodorku imidaprilu ($T=378 \text{ K}$, $RH = 0.0 \%$, $t = 15 \text{ dni}$) ..	131
4.38	Widma masowe chlorowodorku imidaprilu ($T = 378 \text{ K}$ i $RH = 0.0 \%$, $t = 15 \text{ dni}$).....	131
4.39	Mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach suchego powietrza	132
4.40	Chromatogramy chlorowodorku imidaprilu i stearynianu magnezu, metoda RP-HPLC nr 3...	133
4.41	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu ($T=318\text{K}$, $RH=50.9\%$)	135
4.42	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu ($T=318\text{K}$, $RH=60.5\%$)	136
4.43	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu ($T=318\text{K}$, $RH=66.9\%$)	137
4.44	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu ($T=318\text{K}$, $RH=76.4 \%$)	138
4.45	Wpływ $RH \%$ na trwałość chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu	139
4.46	Chromatogramy HPLC-MS chlorowodorku imidaprilu ze stearynianem magnezu	140
4.47	Widmo masowe chlorowodorku imidaprilu ze stearynianem magnezu, forma ES^+	140
4.48	Widmo masowe chlorowodorku imidaprilu ze stearynianem magnezu, forma ES^-	141
4.49	Mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu.....	142
4.50	Chromatogramy chlorowodorku imidaprilu w tabletkach, metoda RP-HPLC nr 3	143
4.51	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra, reakcja odwracalna	145
4.52	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w blistrze ($T = 313 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	146
4.53	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra ($T = 313 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	147
4.54	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach rozłamanych ($T = 313 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$)	148
4.55	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w blistrze ($T = 318 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	149

4.56	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra ($T = 318 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	150
4.57	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach rozłamanych ($T = 318 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	151
4.58	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w blistrze ($T = 323 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	152
4.59	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra ($T = 323 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	153
4.60	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach rozłamanych ($T = 323 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	154
4.61	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w blistrze ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	155
4.62	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	156
4.63	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach rozłamanych ($T = 333 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	157
4.64	Zależność <i>Arrhenius</i> 'a dla rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach.....	160
5.1	Pobudzenie G-zależnych ścieżek transdukcji sygnału przez receptor AT_1	172
5.2	Transaktywacja EGFR oraz stymulacja Ras zależne od AT_1	173
5.3	Aktywacja białka Rho i Rac zależna od AT_1	174
5.4	Aktywacja cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych zależna od AT_1	176
5.5	Przebieg nieenzymatycznej reakcji nitrozowania amin drugorzędowych <i>in vivo</i>	184
6.1	Przygotowanie 96-dółkowej mikro płytki do oceny cytotoksyczności	192
6.2	Przygotowanie 24-dółkowej mikro płytki do ekspozycji w oznaczeniu cytotoksyczności.....	192
6.3	Przygotowanie 96-dółkowej mikro płytki do oceny mutagenności	195
6.4	Przygotowanie 24-dółkowej płytki do ekspozycji w oznaczeniu mutagenności.....	196
6.5	Przygotowanie 384-dółkowej mikro płytki do inkubacji 48-godzinnej	197
6.6	Przykładowa płytki do oceny cytotoksyczności pochodnej diketopiperazynowej.....	199
6.7	Przykładowa mikro płytki 384-dółkowa po 48-godzinnej inkubacji	200
6.8	Wyniki oceny mutagenności dla pochodnej diketopiperazynowej.....	207
6.9	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny M_1	208
6.10	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny N_1	209
7.1	Widmo $D^l = f(c)$ substancji oraz tabletek chlorowodorku imidaprilu	213
7.2	Wpływ temperatury i $RH\%$ na czas połowicznego rozkładu chlorowodorku imidaprilu	216
7.3	Czasy połowicznego rozkładu dikarboksyloowych I-ACE ($RH = 76.4\%$, $T = 363 \text{ K}$)	220
7.4	Energie aktywacji rozkładu dikarboksyloowych I-ACE w fazie stałej, $RH = 76.4\%$	220
7.5.	Wrażliwość na zmiany $RH\%$ dikarboksyloowych I-ACE w fazie stałej	220
7.6.	Zależność $E_a = f(pI)$ oraz $E_a = f(p)$ dla I-ACE pochodnych estrów	221
7.7.	Zależność $E_a = f(T_{top})$ dla dikarboksyloowych I-ACE	222
7.8.	Zależność $k = f(SASA)$ i $k = f(TPSA)$ dla dikarboksyloowych I-ACE	223
7.9.	Zależność $k = f(LogP)$ i $k = f(p)$ dla dikarboksyloowych I-ACE	223
7.10.	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w zależności od sposobu przechowywania .	226

WYKAZ TABEL

2.1	Systematyka inhibitorów ACE obecnie stosowanych w leczeniu	37
3.1	Matematyczne modele, opisujące kinetykę reakcji chemicznych w fazie stałej	55
4.1	Ocena trwałości chlorowodoru imidaprilu w czystej substancji – specyfikacja warunków testowych	77
4.2	Ocena trwałości chlorowodoru imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu – specyfikacja warunków testowych	79
4.3	Ocena trwałości chlorowodoru imidaprilu w postaci farmaceutycznej – specyfikacja warunków testowych	80
4.4	Wartości λ_{maks} i λ_{min} widm UV (A, D ¹ , D ² , D ³) chlorowodoru imidaprilu w metanolu	83
4.5	Wynik oceny selektywności opracowanych metod RP-HPLC	84
4.6	Parametry krzywej wzorcowej chlorowodoru imidaprilu, metoda RP-HPLC nr 1	85
4.7	Parametry krzywej wzorcowej chlorowodoru imidaprilu, metoda RP-HPLC nr 2	85
4.8	Parametry krzywej wzorcowej chlorowodoru imidaprilu, metoda RP-HPLC nr 3	86
4.9	Precyzja i dokładność metody RP-HPLC nr 1	87
4.10	Precyzja i dokładność metody RP-HPLC nr 2	87
4.11	Precyzja i dokładność metody RP-HPLC nr 3	87
4.12	Wyznaczanie średniej masy tabletki	88
4.13	Dobór modelu kinetycznego reakcji rozkładu chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	90
4.14	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 25.0 \%$)	92
4.15	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 50.9 \%$)	93
4.16	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 60.5 \%$)	94
4.17	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 66.5 \%$)	95
4.18	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	96
4.19	Wpływ $RH \%$ na trwałość chlorowodoru imidaprilu w substancji	97
4.20	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 343 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	99
4.21	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 348 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	100
4.22	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 353 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	101
4.23	Zmiany stężenia chlorowodoru imidaprilu w substancji ($T = 358 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$)	102
4.24	Zależność $Arrhenius'a$ dla rozkładu chlorowodoru imidaprilu w substancji; $RH=76.4\%$	103
4.25	Ocena przydatności płaszczyzny trwałości chlorowodoru imidaprilu	105

4.26	Skład faz ruchomych do optymalizacji metody RP-HPLC	106
4.27	Wydajność metody RP-HPLC nr 1 oraz metody RP-HPLC nr 2.....	108
4.28	Dobór modelu kinetycznego dla reakcji tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $RH = 76.4\%$	109
4.29	Zmiany stężenia produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu nr 1 ($T=363K$, $RH=76.4\%$) .	110
4.30	Zmiany stężenia produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu nr 2 ($T=363K$, $RH=76.4\%$) .	111
4.31	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu ($T=363K$, $RH=76.4\%$),metoda RP-HPLC nr 2..	112
4.32	Porównanie parametrów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji oraz parametrów tworzenia jego produktów degradacji ($T = 363 K$, $RH = 76.4\%$).....	113
4.33	Identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T = 363 K$, $RH = 76.4\%$)	117
4.34	Dobór modelu kinetycznego dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji ($T = 378 K$, $RH = 0.0\%$,)	119
4.35	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji ($T = 363 K$, $RH = 0.0\%$)	120
4.36	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji ($T = 368 K$, $RH = 0.0\%$)	121
4.37	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji ($T = 373 K$, $RH = 0.0\%$)	122
4.38	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji ($T = 378 K$, $RH = 0.0\%$)	123
4.39	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji ($T = 383 K$, $RH = 0.0\%$)	124
4.40	Zależność <i>Arrhenius</i> 'a dla rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji; $RH = 0.0\%$...	125
4.41	Dobór modelu kinetycznego dla reakcji tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $RH = 0.0\%$	127
4.42	Zmiany stężenia produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T = 378 K$, $RH = 0.0\%$).....	128
4.43	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu ($T = 378 K$, $RH = 0.0\%$)	129
4.44	Porównanie parametrów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji oraz parametrów tworzenia jego produktu degradacji ($T = 378 K$, $RH = 0.0\%$).....	130
4.45	Identyfikacja produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T = 373 K$, $RH = 0.0\%$).....	132
4.46	Dobór modelu kinetycznego dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu	134
4.47	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu ($T = 318 K$, $RH = 50.9\%$)	135
4.48	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu ($T = 318 K$, $RH = 60.5\%$)	136
4.49	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu ($T = 318 K$, $RH = 66.9\%$)	137
4.50	Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu ($T = 318 K$, $RH = 76.4\%$)	138
4.51	Wpływ $RH\%$ na trwałość chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu.....	139
4.52	Identyfikacja produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu ze stearynianem magnezu.....	141

4.53	Wpływ stearynianu magnezu na stałą szybkości rozkładu chlorowodorku imidaprilu.....	142
4.54	Wpływ stearynianu magnezu na wrażliwość chlorowodorku imidaprilu na zmiany $RH\%$	143
4.55	Dobór modelu kinetycznego dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach...	144
4.56	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach z blistrem ($T = 313\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	146
4.57	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra ($T = 313\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	147
4.58	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach rozłamanych ($T = 313\text{ K}$, $RH = 76.4\%$)...	148
4.59	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach z blistrem ($T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	149
4.60	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra ($T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	150
4.61	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach rozłamanych ($T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$)...	151
4.62	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach z blistrem ($T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	152
4.63	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra ($T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	153
4.64	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach rozłamanych ($T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$)....	154
4.65	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach z blistrem ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	155
4.66	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	156
4.67	Rozkład chlorowodorku imidaprilu w tabletkach rozłamanych ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76.4\%$)...	157
4.68	Wpływ sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu na jego trwałość ($T = 313\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	158
4.69	Wpływu sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu na jego trwałość ($T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	158
4.70	Wpływu sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu na jego trwałość ($T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	159
4.71	Wpływu sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu na jego trwałość ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76.4\%$).....	159
4.72	Zależność <i>Arrhenius</i> 'a dla rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach	160
4.73	Wpływ procesu wytwarzania tabletek chlorowodorku imidaprilu na trwałość substancji.....	161
4.74	Parametry stabilnościowe leków z grupy dikarboksylowych I-ACE.....	162
4.75	Deskryptory strukturalne zastosowanie w analizie QSPR dikarboksylowych I-ACE	162
4.76	QSPR dla I-ACE.....	163
4.77	QSPR dla I-ACE degradujących w fazie stałej zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej	164
4.78	Analiza różnych modeli matematycznych dla uzyskanych w QSPR zależności	165
5.1	Genotypy szczepów <i>Salmonella typhimurium</i> wykorzystywanych w teście <i>Ames</i> 'a	182
6.1	Skład badanych mieszanin po reakcji nitrozowania	191
6.2	Kontrole pozytywne	194
6.3	Objętości odczynników użytych do przygotowania mieszaniny frakcji S9	194
6.4	Ocena cytotoksyczności badanych związków	199

6.5	Wyniki oceny mutagenności dla pochodnej diketopiperazynowej IMD (TA 98, S9 -)	201
6.6	Wyniki oceny mutagenności dla pochodnej diketopiperazynowej IMD (TA 98, S9 +)	201
6.7	Wyniki oceny mutagenności dla pochodnej diketopiperazynowej IMD (TA 100, S9 -)	202
6.8	Wyniki oceny mutagenności dla pochodnej diketopiperazynowej IMD (TA 100, S9 +)	202
6.9	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny M ₁ (TA 98, S9 -)	203
6.10	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny M ₁ (TA 98, S9 +)	203
6.11	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny M ₁ (TA 100, S9 -)	204
6.12	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny M ₁ (TA 100, S9 +)	204
6.13	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny N ₁ (TA 98, S9 -)	205
6.14	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny N ₁ (TA 98, S9 +)	205
6.15	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny N ₁ (TA 100, S9 -)	206
6.16	Wyniki oceny mutagenności mieszaniny N ₁ (TA 100, S9 +)	206
7.1	Kinetyka i mechanizmy rozkładu dikarboksylowych I-ACE	218

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
Ac-SDKP	tetrapeptyd n-acetylo-serylo-aspartylo-lisylo-prolina
AGT	angiotensynogen
ANG	angiotensyna
APA	aminopeptydaza A
APB	aminopeptydaza B
APN	aminopeptydaza N
AspAP	aminopeptydaza aspartyłowa
AT₁	endogenny receptor dla angiotensyny II typu 1
AT₂	endogenny receptor dla angiotensyny II typu 2
ATP	kwas adenozynotrifosforowy
AW	ilość akceptorów wiązań wodorowych
B	współczynnik proporcjonalności
b	wyraz wolny prostej
BCL-2	(ang. <i>b-cell lymphoma 2</i>) onkogen kodujący białko antyapoptotyczne
c	stężenie
c_∞	stężenie w czasie nieskończonym
c₀	stężenie punkcie czasowym t_0
c_t	stężenie w punkcie czasowym t
DAG	1,2-diacyloglicerol
DCI	bezpośrednia jonizacja chemiczna
df	stopnie swobody w testach statystycznych
DKP	pochodna diketopiperazynowa
DW	ilość donorów wiązań wodorowych
E_a	energia aktywacji reakcji
EGFR	(ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>) receptor dla czynnika wzrostu śródbłónka
ERK1/2	kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe typu 1 i 2
ESI	jonizacja typu elektrosprej
EVOH	kopolimer etylen-alkohol winylowy
FAK	(ang. <i>focal adhesion kinase</i>) kinaza ogniskowo-adhezyjna

FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	(ang. <i>fibroblast growth factor</i>) czynnik wzrostu fibroblastów
FIB	krotność indukcji w odniesieniu do dawki zerowej
GC	chromatografia gazowa
GIT1	białko regulujące liczne procesy komórkowe
<i>h</i>	stała kwantowa Planck'a
H0	hipoteza zerowa testu statystycznego
H1	hipoteza alternatywna testu statystycznego
HB-EGF	(ang. <i>heparine-binding epidermal growth factor</i>) czynnik wzrostu naskórka wiążący heparynę
HDPE	polietylen o wysokiej gęstości
HIF-1α	(ang. <i>hipoxia-induced factor 1 alpha</i>) czynnika indukowanego hipoksją 1 alfa
HPLC	(ang. <i>high performance liquid chromatography</i>) wysokosprawna chromatografia cieczowa
I-ACE	inhibitor enzymu konwertującego angiotensynę
IL	interleukina
IMD	chlorowodorek imidaprilu
IP3	inozytolo-1,4,5-trifosforan
IPEC	ang. <i>International Pharmaceutical Excipients Council</i>
IS	(ang. <i>internal standard</i>) wzorzec wewnętrzny
JAK	cytoplazmatyczne kinazy Janusowe
JNK	(ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>) podrodzina kinaz MAPK
<i>k</i>	stała szybkości reakcji
<i>k</i>_{293 K}	stała szybkości reakcji w $T = 293$ K
<i>k</i>_B	stała Boltzman'a
K.Poz.	kontrola pozytywna
LC	chromatografia cieczowa
LDPE	polietylen o niskiej gęstości
LH-RH	hormon uwalniający hormon luteinizujący
LOD	(ang. <i>limit of detection</i>) granica wykrywalności
LogD	współczynnik dystrybucji
LogP	współczynnik podziału oktanol/woda
LOQ	(ang. <i>limit of quantitation</i>) granica oznaczalności
LPA	kwask lizofosfatydowy
LWR	liczba wiązań rotowalnych
<i>m</i>	masa odważki
MAPK	(ang. <i>miogen-activated protein kinases</i>) kinazy białkowe aktywowane przez miogeny
MASR	endogenny receptor dla angiotensyny (1-7)
MCP-1	(ang. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>) białko chemotaktyczne dla monocytów
MMP	metaloproteinaza

MS	(ang. <i>mass spectroscopy</i>) spektroskopia mas
mTOR	(ang. <i>mammalian target of rapamycin</i>) ssaczy cel rapamycyny
MV	objętość molowa
MVTR	współczynnik transmisji pary wodnej
<i>n</i>	liczba prób
NADP	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADPH	zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NAP test	ang. <i>nitrosation assay procedure</i>
NEP	endopeptydaza neutralna
OECD	Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju
<i>P</i>	(kinetyka) pole powierzchni pod pikiem na chromatogramie
<i>P</i>	(QSPR) parachora
<i>p</i>	(statystyka) wartość testu t-Studenta
<i>p</i>	(QSPR) moment dipolowy
p38	kinaza białka p38 aktywowana przez mitogen
PA	kwas fosfatydowy
PAI	(ang. <i>plasminogen activator inhibitor</i>) inhibitor aktywacji plazminogenu
pAQ1	plazmid, który odpowiada części operonu histydyny
PCTFE	polichlorotrifluoroetylen
PDGF	(ang. <i>platelet-derived growth factor</i>) płytkopochodny czynnik wzrostu
PDGFR	(ang. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>) receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu
PEP	propyl endopeptydaza
PET	polietylen tereftalanu
PGI2	prostaglandyna typu PGI2
<i>pI</i>	punkt izoelektryczny
PI3K	(ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>) kinaza 3-fosfatydyloinozytolo
PIP2	fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu
<i>pKa</i>	logarytm dziesiętny ze stałej dysocjacji kwasu
PKC	kinaza białkowa C
pKM101	plazmid, który zwiększa wrażliwość szczepów testowych <i>Salmonella</i> na działanie mutagenów
PLA2	fosfolipaza A2
PLC	fosfolipaza C
PLD	fosfolipaza D
PP	polipropylen
Prod	produkt rozkładu
PS	polistyren
PSA	aminopeptydaza wrażliwa na puromycynę
PVC	polichlorek winylu

PVC/PVDC/Al	folia z polichlorku winylu, polichloreku winylidenu i aluminium
PVDC	polichlorek winylidenu
PYK	(ang. <i>proline-rich tyrosine kinase</i>) kinaza tyrozynowa bogata w prolinę
R	uniwersalna stała gazowa
r	współczynnik korelacji
Rac	błonowa GTP-aza stymulująca rozliczne szlaki transmisji sygnałów
RAS	(ang. <i>renin-angiotensin system</i>) układ renina-angiotensyna
Ras	błonowa GTP-aza stymulująca rozliczne szlaki transmisji sygnałów
Rfa	jedna z mutacji w genotypie <i>Salmonella typhimurium</i>
RH	wilgotność względna powietrza
Rho	błonowa GTP-aza stymulująca rozliczne szlaki transmisji sygnałów
RhoGEF	(ang. <i>guanine nucleotide exchange factor</i>) białko aktywujące małe białka G
RM	refrakcja molowa
ROCK	Rho-zależna kinaza
Rozp.	rozpuszczalność
RP	(ang. <i>reversed phase</i>) odwrócone fazy
rpm	(ang. <i>revolutions per minute</i>) obroty na minutę
RSD	względne odchylenie standardowe
S	odchylenie standardowe pojedynczego wyniku
S1P1	(ang. <i>sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>) receptor sfingozyno-1-fosforanu 1
S9	system aktywacji metabolicznej
S_a	odchylenie standardowe współczynnika kierunkowego prostej
S_b	odchylenie standardowe wyrazu wolnego prostej
SASA	powierzchnia dostępności rozpuszczalnika
SHP-1/2	(ang. <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>) białkowa fosfataza tyrozynowa
SRC	rodzina niereceptorowych kinaz tyrozynowych
STAT	(ang. <i>signal transducer and activator of transcription</i>) jeden z czynników transkrypcyjnych
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	temperatura
TGF-β	(ang. <i>transforming growth factor beta</i>) transformujący czynnik wzrostu β
TNF	(ang. <i>tumor necrosis factor</i>) czynnik martwicy nowotworów
TOP	thimet oligopeptydaza
TP53	(ang. <i>tumor protein 53</i>) czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego
TPSA	topologiczna polarna powierzchnia cząsteczki

T_{top}	temperatura topnienia
UV	(ang. <i>ultraviolet</i>) promieniowanie nadfioletowe
uvrB	jedna z mutacji w genotypie <i>Salmonella typhimurium</i>
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) czynnik wzrostu śródbłónka
VEGFR	(ang. <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>) receptor czynnika wzrostu śródbłónka
VIS	promieniowanie elektromagnetyczne leżące w zakresie światła widzialnego
w/v	ilościowy stosunek wagowo-objętościowy
w/w	ilościowy stosunek wagowy
W_0	wartość wyjściowa dla dawki zero
W_z	współczynnik zmienności
WSA	powierzchnia van der Waals'a
x	ułamek substancji rozłożonej
x_a	oznaczona ilość analitu w próbce
\bar{x}	wartość średnia wszystkich pomiarów
x_i	wynik pojedynczego pomiaru
α	polaryzowalność cząsteczkowa
μ	rzeczywista zawartość analitu
λ	długość fali
α_{max}	maksimum absorpcji
ΔG_{des}	energia desolvatacji
ΔH^\ddagger	entalpia aktywacji reakcji
ΔS^\ddagger	entropia aktywacji reakcji

1. WSTĘP

Leki lub też produkty lecznicze należą do podstawowych komponentów ochrony zdrowia i życia ludzkiego, a ich dopuszczenie do powszechnego stosowania zdeterminowane jest przez trzy podstawowe kryteria przydatności terapeutycznej, czyli: *jakość*, *bezpieczeństwo* oraz *skuteczność*, przy czym to pierwsze stanowi niejako fundament dla tych dwóch ostatnich. Z kolei pojęcie *jakość* leku obejmuje szereg dalszych zagadnień, związanych z jego tożsamością, siłą działania, czystością oraz *trwałością* [1], które gwarantują utrzymanie właściwości fizykochemicznych substancji leczniczej w określonym przedziale czasowym na poziomie powyżej jej dolnych granic specyfikacji. Wiadomo jednak, że leki, podobnie jak każda inna substancja chemiczna, ulegają efektowi starzenia, który objawia się stopniową degradacją, a jej postęp jest przyczyną pogorszenia ich *jakości* oraz utraty pierwotnych właściwości farmakologicznych. W związku z powyższym, można stwierdzić, że zapewnienie optymalnej *trwałości* jest podstawową determinantą *bezpieczeństwa* i *skuteczności* terapii, a zachowanie jej na najwyższym poziomie przez maksymalnie długi okres czasu stanowi element jej ekonomizacji.

Trwałość leku, podobnie jak *jakość*, jest pochodną wielu czynników, takich jak: reaktywność składników postaci farmaceutycznej, warunki procesu produkcyjnego, rodzaj opakowania oraz warunki przechowywania, w tym temperaturę, wilgotność względną powietrza oraz światło. Z tego względu analizy *trwałości* leku stanowią dość skomplikowany, wielopłaszczyznowy proces, w którym wpływ każdego z wyżej wymienionych elementów zostaje poddawany indywidualnej ocenie, a wyciągnięte wnioski mają na celu stabilizację produktu leczniczego lub czystej substancji w sposób zapewniający bezpieczne i wygodne stosowanie [2,3].

Co więcej, *trwałość* leku nieodłącznie związana jest z jego *bezpieczeństwem*. Wynika to przede wszystkim z faktu, iż stopniowy, ciągły postęp reakcji rozkładu może niekorzystnie odbić się na profilu toksykologicznym leku, co zdeterminowane jest powstawaniem produktów degradacji, których kierunek działania może w niektórych przypadkach okazać się szkodliwym dla organizmu ludzkiego [2]. W związku z tym, podstawowym celem badań toksykologicznych, przeprowadzanych w zakresie analizy *bezpieczeństwa*, jest wykrycie wszelkich ewentualnych niekorzystnych działań leku, ustalenie ich mechanizmu oraz ocena ilościowa, co w rzeczywistości wiąże się z szeroko pojętą profilaktyką [4]. W tym miejscu warto wspomnieć, iż w kontekście wciąż wzrastającej zapadalności na choroby nowotworowe, szczególnego znaczenia nabierają analizy *działania kancerogennego* składników leku, tym bardziej, że efekty długotrwałej ekspozycji na tego typu związki są widoczne dopiero po pewnym czasie i z tego względu ciężko jest odnaleźć zależność przyczynowo skutkową pomiędzy objawami a działaniem danego kancerogenu w warunkach codziennego stosowania [5].

Z uwagi na ścisły związek pomiędzy *jakością* a *bezpieczeństwem* leku w ramach niniejszej pracy doktorskiej zaadoptowano kolektywne podejście do podjętej tematyki badawczej, łącząc w

jednej rozprawie elementy tych dwóch zagadnień. W ujęciu szczegółowym, przedmiotem analiz był chlorowoderek imidaprilu – lek, występujący w postaci tabletek do podania doustnego, należący do rodziny inhibitorów konwertazy angiotensyny, w Polsce powszechnie stosowany w terapii nadciśnienia samoistnego. Na tle swojej klasy terapeutycznej chlorowoderek imidaprilu wyróżnia się wysoką skutecznością, długotrwałym działaniem oraz korzystnym profilem toksykologicznym, związanym z niską tendencją do wywoływania uciążliwego, suchego kaszlu [6]. Jednakże analiza struktury tego związku wykazała jego dużą podatność na procesy związane z degradacją chemiczną, co uwarunkowane jest obecnością wiązania estrowego, które choć niezbędne dla zapewnienia optymalnej biodostępności leku, może zwiększać wrażliwość na przykład na reakcje hydrolizy *ex vivo* i przyczyniać się w ten sposób do naruszenia jego stabilności [7]. Niestety w dostępnej literaturze brak jest danych odnośnie *trwałości* chlorowodoru imidaprilu i z tego też względu przedstawiona problematyka badawcza stała się podstawą dalej zaprezentowanych analiz, ukierunkowanych na określenie wpływu czynników środowiskowych na profil stabilności chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej. W celu usprawnienia późniejszych analiz trwałości, postanowiono również określić przydatność metod modelowania komputerowego do szacowania parametrów kinetycznych oraz termodynamicznych reakcji rozkładu w grupie inhibitorów konwertazy angiotensyny oraz podjęto próbę wykazania zależności struktura chemiczna – trwałość wewnątrz tej klasy.

Co więcej, zgodnie z postawioną hipotezą badawczą, chlorowoderek imidaprilu, będąc substancją nietrwałą, podlega procesowi degradacji, który prowadzi do utworzenia nieznanymi produktami, stanowiącymi zanieczyszczenie gotowej postaci farmaceutycznej. Pamiętając, zatem o możliwości zmiany charakterystyki toksykologicznej leku w efekcie tego procesu, drugim etapem zaplanowanych badań była ocena ryzyka, związanego z indukcją *kancerogenezy* przez produkty rozkładu chlorowodoru imidaprilu, które obecne są w produkcie leczniczym, eksponowanym na niewłaściwe warunki przechowywania. Dobór metodyki tychże badań uzależniono od wyników identyfikacji wspomnianych zanieczyszczeń oraz od przeglądu piśmiennictwa w zakresie ich właściwości toksykologicznych.

Uzyskane w toku opisanych powyżej badań wyniki zaprezentowano w dwóch oddzielnych rozdziałach: dotyczącym trwałości substancji leczniczej w fazie stałej oraz dotyczącym analizy wpływu jej degradacji na proces inicjacji nowotworowej. Stanowią one swoistego rodzaju studium wiedzy, odnośnie trwałości chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej, obejmujące zagadnienia, związane z wpływem warunków przechowywania na kinetyczny mechanizm reakcji, parametry rozkładu oraz profil produktowy badanej substancji leczniczej w czystej postaci, w mieszaninie modelowej z substancją pomocniczą oraz w gotowym produkcie leczniczym. Uzyskane rezultaty oraz wyciągnięte wnioski wydają się być szczególnie użyteczne w dziedzinie technologii postaci leku oraz w zakresie zapewnienia jakości produktu leczniczego, gdyż ich implementacja umożliwia najbardziej efektywne wykorzystanie substancji w procesie produkcyjnym z minimalną stratą w trakcie przechowywania, co niewątpliwie może korzystnie wpłynąć na zmniejszenie kosztów leczenia.

Co więcej, przeprowadzona analiza toksykologiczna nie tylko potwierdza bezpieczeństwo stosowania chlorowodorku imidaprilu pod względem onkologicznym, ale także wskazuje na nowe kierunki w dziedzinie badań rozwojowych, umożliwiające zmaksymalizowanie profilaktyki przeciwnowotworowej. Godnym podkreślenia jest przy tym fakt, iż w dostępnej literaturze światowej brak jest jakichkolwiek doniesień, odnośnie tego typu badań, co dodatkowo potwierdza nowatorski charakter wykonanych prac.

2. UKŁAD RENINA-ANGIOTENSYNA I INHIBITORY KONWERTAZY ANGIOTENSYNY

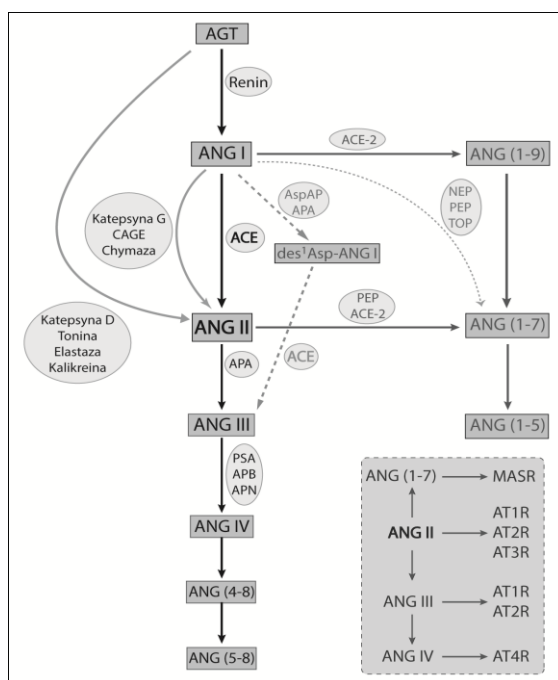
W niniejszej części pracy doktorskiej zaprezentowane zostaną teoretyczne podstawy, dotyczące biologii układu renina-angiotensyna, których analiza jest niezbędna dla zrozumienia mechanizmów działania oraz cech budowy opisanych dalej leków z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny, w tym chlorowodoru imidaprilu, stanowiącego przedmiot zaplanowanych badań eksperymentalnych.

*„Pamiętajmy zresztą, że wiedza teoretyczna
jest podstawą technik eksperymentalnych,
a nie tylko dane eksperymentalne
są podstawą wiedzy teoretycznej.”*

- R. Wójcicki

2.1. Struktura układu Renina-Angiotensyna

Układ renina-angiotensyna (RAS), będąc złożonym, enzymatyczno-hormonalnym mechanizmem regulacji ciśnienia tętniczego oraz kontroli równowagi wodno-elektrolitowej organizmu, w rzeczywistości należy do podstawowych modulatorów endogennej homeostazy. W ujęciu klasycznym, enzymatyczną część tego systemu stanowi renina, oraz enzym konwertujący angiotensynę (ACE), zaś część hormonalną tworzą aktywne metabolicznie substancje o działaniu endokrynnym, tj.: angiotensyna II oraz aldosteron. Schemat działania układu RAS przedstawiono na RYCINIE 2.1.



RYCINA 2.1.

Główne szlaki metaboliczne angiotensyny II; AGT – angiotensynogen, ANG – angiotensyna, ACE – enzym konwertujący angiotensynę, APA – aminopeptydaza A, AspAP - aminopeptydaza aspartylowa, PSA - aminopeptydaza wrażliwa na puromycynę, APB – aminopeptydaza B, APN – aminopeptydaza N, PEP - propyl endopeptydaza, NEP – endopeptydaza neutralna, TOP – thimet oligopeptydaza, ATR – receptor angiotensynowy. Opracowanie własne wg [8].

Renina jest niskocząsteczkową glikoproteiną, posiadającą właściwości proteolityczne. Jej biosynteza odbywa się w komórkach aparatu przykłębuszkowego nerek, a jej prekursorami są preprorenina i prorenina. Dojrzała renina magazynowana jest w ziarnistościach wewnątrzkomórkowych, z których uwalniana jest do krążącej krwi poprzez degranulację w odpowiedzi na: hipowolemię, hiponatremię w okolicach płamki gęstej, hipokaliemię bądź stymulację współczulną [9,10]. Renina należy do wysoce specyficznych enzymów, hydrolizujących wiązanie peptydowe pomiędzy waliną a leucyną. Jej substratem jest produkowana w wątrobie α -2-globulina osocza - angiotensynogen, który w wyniku reakcji katalizowanej przez reninę przekształca się w hemodynamicznie nieaktywny decapeptyd - angiotensynę I [10-12].

Enzym konwertujący angiotensynę (*ang. angiotensin converting enzyme, ACE*) to dwuwartościowa karboksypeptydaza dipeptydylowa, należąca do grupy metalopeptydaz cynkowych [10,11]. Dominująca, tkankowa postać tego enzymu (90%) związana jest z błoną komórkową i występuje w obrębie komórek epitelialnych płuc, nerek i rąbka szczoteczki jelita. Wyróżnia się także postać systemową (10%), która w formie rozpuszczonej obecna jest w krążącej krwi oraz w płynach ustrojowych [10,13]. Jako enzym niespecyficzny, ACE posiada powinowactwo do wielu endogennych peptydów, do których należą: angiotensyna I, bradykinina, substancja P [9], peptyd Ac-SDKP [14], cholecystokininy oraz hormon uwalniający hormon luteinizujący (LH-RH) [15]. Zasadnicza jednak rola ACE polega na konwersji nieaktywnej angiotensyny I do aktywnej angiotensyny II. Proces ten zachodzi głównie w krążeniu płucnym [16].

Angiotensyna II jest endogennym oktapeptydem, wykazującym bardzo silne działanie wazokonstrykcyjne. Jako najważniejszy efektor układu renina-angiotensyna wywołuje skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych, w szczególności tętniczek przedwłośniczkowych i żył zawłośniczkowych, wpływając w ten sposób na wzrost oporu obwodowego i ciśnienia krwi [16,17]. Ponadto, angiotensyna II stymuluje układ współczulny poprzez zwiększenie wydzielania adrenaliny z rdzenia nadnerczy oraz ułatwienie przewodnictwa w zwojach współczulnych, co wynika ze wzrostu syntezy i uwalniania noradrenaliny oraz nasilenia wychwytu zwrotnego katecholamin w obrębie szczeliny synaptycznej. Działanie angiotensyny II bezpośrednio związane jest ze zwiększeniem częstotliwości pracy serca oraz wzrostem jego pojemności wyrzutowej [17,18]. Angiotensyna II pobudza również wydzielanie aldosteronu z kory nadnerczy, warunkując wzrost resorpcji wody i sodu z przesączu pierwotnego oraz zwiększenie wydzielania potasu w kanalikach zbiorczych nerki. Z kolei działanie ośrodkowe angiotensyny II polega na stymulacji wydzielania wazopresyny, pobudzeniu ośrodka pragnienia w podwzgórzu oraz regulacji procesów uczenia się i pamięci. Mediatorem większości wyżej wymienionych efektów jest receptor angiotensynowy typu AT_1 . Z kolei pobudzenie przez angiotensynę II receptora angiotensynowego typu AT_2 daje rezultat częściowo przeciwny, co warunkuje wewnątrzsystemowy dualizm działania na osi renina-angiotensyna II [16,17].

Oprócz opisanego wyżej mechanizmu tworzenia angiotensyny II, zależnego od ACE, istnieje jeszcze kilka alternatywnych szlaków jej biosyntezy. Należą do nich:

- reakcje katalizowane przez: toninę, elastazę, katepsynę G i enzym chymotrypsynopodobny, dla których substratem jest angiotensynogen;
- reakcje katalizowane przez: chymazę, toninę, enzym chymotrypsynopodobny lub katepsynę D i G, dla których substratem jest angiotensyna I [8,9,19].

Angiotensyna II, obecna w krążącej krwi charakteryzuje się dość krótkim okresem biologicznego półtrwania, wynoszącym około 30 sekund [10,20]. Jej cząsteczka ulega szybkiej degradacji w wyniku działania karboksy-, endo- oraz aminopeptydaz, takich jak: aminopeptydaza A (APA), aminopeptydaza N (APN), aminopeptydaza B (APB), do kótkołańcuchowych peptydów

angiotensynowych, w tym: angiotensyny III, angiotensyny (1-7), angiotensyny IV [8], angiotensyny (4-8) oraz angiotensyny (5-8) [21].

Przedstawiona dotąd charakterystyka RAS odpowiada tzw. układowi osoczewemu, którego aktywacja jest odpowiedzią na zaburzenia ogólnoustrojowe a podstawą regulacji jest zależność na osi ujemnego sprzężenia zwrotnego, gdzie wzrost poziomu angiotensyny II hamuje zwrotnie uwalnianie reniny [9]. Jednakże budowa układu renina-angiotensyna wykazuje dużo bardziej złożony charakter. Otóż szczegółowa analiza ekspresji podstawowych elementów tego systemu w różnorodnych tkankach i układach ludzkich dowiodła, iż oprócz systemowego RAS istnieje także wiele lokalnych układów, zdolnych do tworzenia angiotensyny II, pełniących funkcje auto-, para- a nawet intrakryne. Ich obecność potwierdzono między innymi w sercu, w ścianie naczyń krwionośnych, w nerkach i nadnerczach, w jajnikach, jądrach, trzustce, tkance tłuszczowej oraz w ośrodkowym układzie nerwowym [10,19]. Działanie tkankowych RAS jest odmienne w stosunku do układu systemowego i polega na miejscowej regulacji budowy oraz funkcji właściwych struktur, głównie na zasadzie bezpośredniej interakcji z receptorem angiotensynowym, bądź też pośrednio – poprzez wpływ na ekspresję innych hormonów, białek prozapalnych oraz czynników wzrostowych. Do fizjologicznych efektów związanych z pobudzaniem aktywności tkankowych RAS należą: nasilenie proliferacji i różnicowania komórek, hipertrofia, inhibicja sygnałów proapoptotycznych, wzrost migracji, wzmożona angiogeneza, synteza reaktywnych form tlenu, nasilenie stresu oksydacyjnego, agregacja płytek, generacja miejscowego stanu zapalnego, różnicowanie adipocytów oraz regulacja równowagi fibrynolitycznej [19,22,23].

Co istotne, rozdział na osoczkowy oraz lokalne systemy nie jest jedynym aspektem determinującym strukturalną oraz funkcjonalną wielokierunkowość RAS. Godnym uwagi jest, bowiem fakt, iż choć angiotensyna II pełni rolę podstawowego i najważniejszego efektora zarówno systemowego jak i tkankowych układów, jej krótkołańcuchowe pochodne peptydowe, wbrew początkowym przekonaniom, również posiadają własną aktywność biologiczną. Podstawowe znaczenie w tym zakresie przypisuje się angiotensynie (1-7), która powstaje z angiotensyny II w wyniku działania enzymu konwertującego angiotensynę typu 2 (ACE-2), a jej działanie antagonizuje większość fizjologicznych efektów, związanych z pobudzeniem receptora AT₁. I tak, skutkiem działania angiotensyny (1-7) jest: wazodilatacja, diureza, natriureza, hamowanie podziałów komórkowych, redukcja stresu oksydacyjnego, indukcja apoptozy, hamowanie angiogenezy, hamowanie procesów fibrotycznych i działanie przeciwzkrzepowe [19,22].

Przedstawiona powyżej dualistyczna natura układu renina-angiotensyna, skomplikowany mechanizm samoregulacji oraz wielostronność efektów biologicznych sprawia, iż równowaga pomiędzy jego komponentami stanowi podstawową determinantę tkankowej oraz ogólnoustrojowej homeostazy, a wszelkie jej zakłócenia prowadzą do istotnych anomalii oraz długofalowych patologii, w tym do: nadciśnienia tętniczego, przerostu lewej komory serca, dysfunkcji śródbłonna

naczyniowego, arterosklerozy, niewydolności nerek, zwłóknienia nerek i serca, otyłości a nawet do rozwoju nowotworu [10,19,23-27]. Stąd nieprawidłowości, związane z funkcjonowaniem RAS są stanem wymagającym farmakologicznej interwencji a kontrola aktywności tego systemu stanowi niezwykle pożądany cel w farmakoterapii ww. jednostek chorobowych. Najbardziej doniosłą rolę w tym zakresie posiada możliwość regulacji działania ACE i dlatego usystematyzowanie wiedzy, dotyczącej tego enzymu jest podstawą do dalszych rozważań na temat farmakologicznych właściwości związków, wykazujących zdolności do aktywnej jego modulacji.

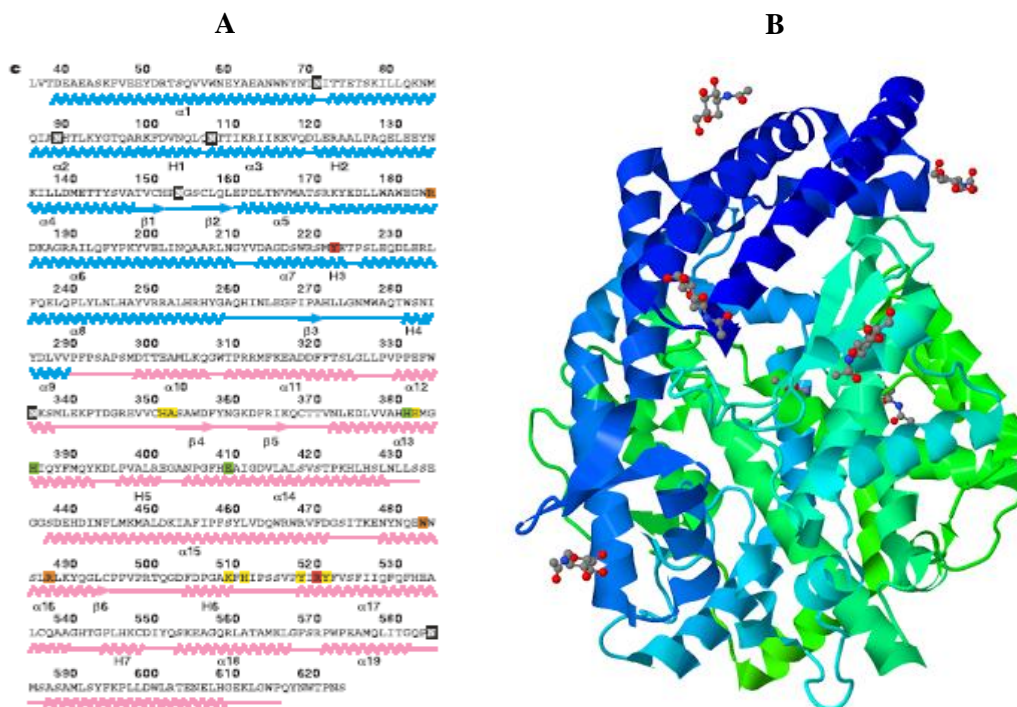
2.2. Struktura enzymu konwertującego angiotensynę

Konwertaza angiotensyny (EC 3.4.15.1), jak już wcześniej wspomniano, jest dwuwartościową karboksypeptydazą dipeptydylową, należącą do grupy metalopeptydaz cynkowych [28]. W ludzkim organizmie zidentyfikowano dwie izoformy tego enzymu, tj.: somatyczną (o masie cząsteczkowej, wynoszącej 180 kDa) oraz jądrową (o masie cząsteczkowej, wynoszącej 110 kDa), które transkrybowane są z tego samego genu, jednak wykazują różnice strukturalne, dotyczące przede wszystkim rozmiarów oraz ilości centrów katalitycznych [29,30].

Somatyczna postać ACE jest monomeryczną glikoproteiną, osadzoną błonowo lub też rozpuszczoną w osoczu. Forma błonowa zbudowana jest z 1306 reszt aminokwasowych, podczas gdy forma osoczowa pozbawiona jest C-końcowej, 72-aminokwasowej sekwencji zakotwiczonej [29]. Analiza pierwszorzędowej struktury ACE pozwoliła wyróżnić w niej następujące regiony:

- peptyd sygnałowy (odcinek pomiędzy Met1 a Ala29),
- domeny katalityczne (odcinek pomiędzy Leu30 a Arg1256),
- część transmembranowa (odcinek pomiędzy Val1257 a Ser1277),
- część cytoplazmatyczna (odcinek pomiędzy Gln1278 a Ser106).

Ustalono również, że cząsteczka ACE posiada aż 15 miejsc N-glikozylacji a odpowiednie typy oligosacharydów wiążą się z łańcuchem białkowym poprzez resztę asparaginy, która zlokalizowana jest w następujących pozycjach: 38, 54, 74, 111, 146, 160, 318, 445, 509, 677, 695, 714, 760, 942, 1191 [31]. Ukształtowany w ten sposób profil glikozylacji determinuje między innymi prawidłowy postęp procesu zwijania i uaktywniania białka oraz nadaje cząsteczce odpowiednich cech trwałości termicznej [28]. Z kolei drugorzędowa struktura ACE charakteryzuje się zdecydowaną przewagą form helikalnych, w tym 61 α helis. Ponadto w cząsteczce enzymu wyróżniono 17 β nici oraz 14 β zakrętów. W trzeciorzędowej strukturze natomiast zidentyfikowano obecność czterech wiązań disiarczkowych, występujących pomiędzy Cys157-Cys165, Cys757-Cys763, Cys957-Cys975, Cys1143-Cys1155, które stabilizują przestrzenną orientację białka [31]. Na RYCINIE 2.2 zaprezentowano strukturę pierwszorzędową i drugorzędową ACE oraz jej projekcję trójwymiarową.



RYCINA 2.2.

Struktura somatycznej postaci enzymu konwertującego angiotensynę; (A) struktura pierwszo- i drugorzędowa [32], (B) drugorzędowa struktura w projekcji trójwymiarowej [PDB 108A].

2.2.1. Domena N oraz domena C somatycznej postaci ACE

Specyficzną cechą somatycznej formy ACE jest obecność dwóch funkcjonalnych domen – domeny C (zlokalizowanej pomiędzy Pro631 a Arg1232) oraz domeny N (zlokalizowanej pomiędzy Leu30 a Pro630), z których każda posiada swoje własne centrum aktywne [30,31]. Obydwie domeny wykazują dość wysoki stopień homologii sekwencyjnej (ok. 60%) oraz posiadają wspólną topologię. W rzeczywistości każda z nich przyjmuje kształt elipsowaty z centralnie położonym kanałem sięgającym 30 Å w głąb cząsteczki. Kanał ten dzieli ich powierzchnie na dwie subdomeny, ograniczone przez cztery α helisy i jedną β nić. Wewnątrz kanału umiejscowiony jest katalityczny atom cynku, który ekranowany jest przez trzy N-terminalne helisy, tworzące strukturę podobną do wieka. Taka konstrukcja ogranicza dostęp do centrum aktywnego substratom o dużych rozmiarach cząsteczkowych. Z drugiej jednak strony brak jednorodności sekwencyjnej jest przyczyną heterogenicznej selektywności obydwu domen, szczególnie w strefie centrum aktywnego, co warunkuje ich zróżnicowaną selektywność w stosunku do swoistych substratów. Ponadto obydwie domeny wykazują odmienne profile glikozylacji a cecha ta determinuje ich niejednorodne zachowanie w obecności czynników denaturujących (N domena jest bardziej trwała). Innym elementem, różnicującym katalitycznie aktywne regiony ACE jest zależność od jednowartościowych jonów chlorkowych, których obecność jest niezbędna do maksymalnej aktywacji domeny C, ale nie domeny N. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w ich strukturalnym przyporządkowaniu do adekwatnych rejonów ACE w taki

sposób, że aż dwa z nich związane są z domeną C za pośrednictwem Arg791, Trp1090, Arg1094 (jon Cl^- nr 1) oraz Tyr829, Arg1127 (jon Cl^- nr 2), a tylko jeden z domeną N za pomocą Tyr231, Arg529. W tym miejscu warto nadmienić, iż budowa jądrowej izoformy ACE jest homologiczna ze strukturą domeny C z wykluczeniem jej C-terminalnej sekwencji o długości 36 reszt aminokwasowych, którą cechuje silna O-glikozylacja [28,31-33].

Różnice strukturalne pomiędzy katalitycznie aktywnymi domenami ACE determinują ich biologiczną heterogenność. I tak, choć obydwie struktury wykazują powinowactwo do angiotensyny I i bradykininy, to jednak elementem wystarczającym i niezbędnym do efektywnej regulacji metabolizmu wymienionych peptydów jest tylko domena C [34]. Z kolei do typowych substratów specyficznych dla domeny N należą: Ac-SDKP (hydrolizowana 50 razy szybciej przez domenę N), angiotensyna (1-7), RH-LH oraz prekursor enkefalin [35]. Aktywność biologiczną obydwu domen można także skutecznie zróżnicować za pomocą specyficznych inhibitorów peptydowych, takich jak: RXP407, który wykazuje 200 razy większe powinowactwo do domeny N oraz RXPA380, który wykazuje 3000 razy większe powinowactwo do domeny C [28,33].

2.2.2. Budowa centrum aktywnego ACE

Najważniejszą częścią każdego enzymu jest jego centrum katalityczne, którego budowa określa systematykę białka. Zgodnie z powyższym, enzym ACE został sklasyfikowany jako przedstawiciel nadrodziny *gluzincis*, klanu MA(E), rodziny M2, której cechą charakterystyczną jest obecność sekwencji konsensusowej His-Glu-X-X-His...Glu-X-X-X-X w obrębie motywu wiążącego cynk, gdzie X jest dowolną resztą aminokwasową. W przypadku ACE motyw ten zbudowany jest z następujących reszt: His-Glu-Met-Gly-His....Glu-Ala-Ile-Gly-Asp i rozdzielony jest 32-aminokwasowym *spacerem*, gdzie His390, His394 i Glu418 należą do ligandów cynku, związanych z domeną N a His988, His992 i Glu1016 zajmują sferę koordynacyjną cynku, odpowiadającą domenie C. Sam katalityczny jon cynku w obrębie obydwu miejsc aktywnych przyjmuje hybrydyzację tetraedryczną, co sugeruje, iż jego czwartym ligandem jest nukleofilowa cząsteczka wody. Pod względem przestrzennym, obydwa motywy His-Glu-Met-Gly-His-*spacer*-Glu-Ala-Ile-Gly-Asp zlokalizowane są na tzw. helisach centrum aktywnego [30], które zgodnie z nomenklaturą, zaadoptowaną przez *Natesh et al.* [32] przyjmują następującą numerację: $\alpha 13$ i $\alpha 14$. W tak zorganizowanej konfiguracji histydyny wiążące cynk rozdzielone są jednym zakrętem helisy $\alpha 13$, co sprawia, że ich łańcuchy boczne ustawiają się względem siebie w sposób równoległy, a ich imidazolowe atomy azotu przyjmują pozycję, umożliwiającą koordynację katalitycznego jonu cynku. Ponadto trzeci ligand cynku – glutamina również przyjmuje orientację równoległą względem ostatniej reszty motywu wiążącego, tj.: kwasu asparaginowego, przy czym konstrukcja ta jest niezbędna dla utrzymania aktywności enzymu [30,32].

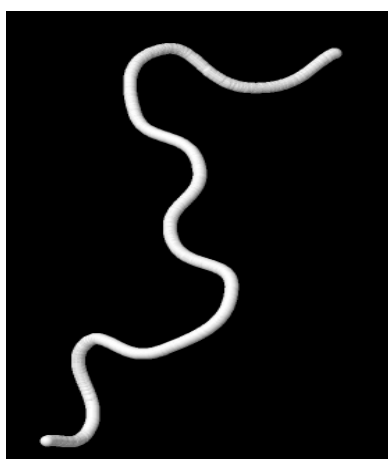
W oparciu o powyższe dane, określono, iż prawdopodobny mechanizm katalityczny dla reakcji zachodzących z udziałem domeny C enzymu ACE obejmuje następującą sekwencję zdarzeń:

- aktywacja jonami chlorkowymi,
- zależna od jonu cynku polaryzacja odchodzącego wiązania amidowego,
- wzrost nukleofilowości związanej z cynkiem cząsteczki wody przy udziale Glu391, która pośredniczy w transferze protonu z cząsteczki wody na odchodzący atom azotu [36].

2.2.3 Struktura angiotensyny I

Najważniejszym endogennym substratem enzymu ACE jest angiotensyna I - decapeptyd o następującej strukturze pierwszorzędowej: $\text{H}_2\text{N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-COOH}$. Jak zaprezentowano RYCINIE 2.3, przestrzenna konfiguracja tego związku przyjmuje kształt litery S z dwoma zakrętami na każdym z końców. Co istotne, cząsteczka angiotensyny I wykazuje nierównomierną dystrybucję elektronową z akumulacją ładunku ujemnego na końcu C oraz ładunku pozytywnego na końcu N. Ta szczególna właściwość nadaje angiotensynie I charakteru dipolowego. Ponadto w środkowej części łańcucha wyróżnić można region hydrofobowy, utworzony przez reszty Tyr4 oraz His6, których pierścienie tworzą kąt 35° i a ich centralne części oddalone są od siebie o 6.1 Å. Dodatkowo odległość pomiędzy N-końcowym atomem azotu a C-końcowym atomem tlenu w cząsteczce angiotensyny I wynosi 21.8 Å [37].

Znajomość budowy naturalnych substratów ACE stanowi postawę do zrozumienia właściwości farmaceutycznych odpowiednich inhibitorów tego enzymu, gdyż ich struktura powinna w idealny sposób imitować najważniejsze cechy endogennych ligandów.



RYCINA 2.3.
Budowa przestrzenna angiotensyny I [PDB 1N9U].

2.3. Inhibitory konwertazy angiotensyny (I-ACE)

Inhibitory konwertazy angiotensyny stanowią grupę leków, popularnie stosowanych w farmakoterapii nadciśnienia tętniczego, chorób układu sercowo-naczyniowego oraz chorób nerek. Ich mechanizm działania polega na konkurencyjnej inhibicji obydwu miejsc aktywnych enzymu ACE [9]. Ponadto przedstawiciele wymienionej klasy leków wykazują działanie hamujące w stosunku do metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) – enzymów, których aktywność katalityczna jest, analogicznie jak w przypadku ACE, zależna jest od obecności jonów cynku [38]. Z farmakologicznego punktu widzenia, stosowanie leków z grupy I-ACE wiąże się z pewnymi ograniczeniami, które wynikają z możliwości wystąpienia tzw. „efektu ucieczki RAS”. Zjawisko to spowodowane jest istnieniem alternatywnych ścieżek biosyntezy angiotensyny II, które są niezależne od działania ACE (RYCINA 2.1) [39,40].

2.3.1. Farmakodynamiczne aspekty działania I-ACE

Typowym efektem wynikającym z zahamowania aktywności ACE jest ogólnoustrojowy spadek stężenia angiotensyny II, któremu towarzyszy wzrost poziomu reniny oraz akumulacja angiotensyny I, będące rezultatem przerwania ujemnego sprzężenia zwrotnego wewnątrz RAS. Wtórnią odpowiedzią, związaną z redukcją syntezy angiotensyny II jest zmniejszenie stężenia aldosteronu, wazopresyny oraz amin katecholowych a także wzrost poziomu bradykininy [41] oraz angiotensyny (1-7) [22,39]. Wielokierunkowość efektów fizjologicznych, związanych z aktywnością angiotensyny II jest wykładnikiem plejotropii działań inhibitorów ACE. Należą do nich:

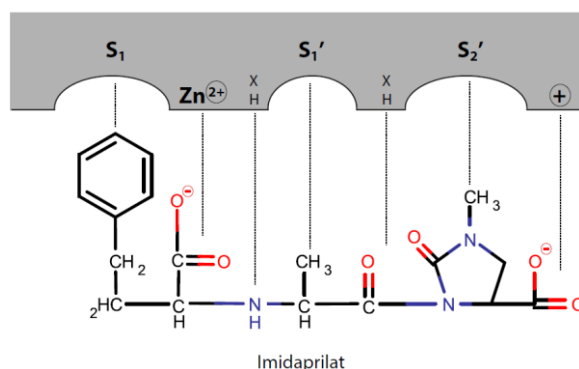
- obniżenie ciśnienia tętniczego krwi jako wynik wazodilatacji, zmniejszonej retencji wody i sodu oraz zależnego od bradykininy uwalniania naczyniowego tlenku azotu (NO) i prostacykliny PGI₂,
- redukcja agregacji płytek i stymulacja fibrynolizy, wynikające ze zwiększenia syntezy NO i PGI₂ a także pobudzenia sekrecji inhibitora aktywacji plazminogenu (PAI-1),
- przywrócenie prawidłowej funkcji śródbłonna i stabilizacja płytki miażdżycowej,
- zahamowanie remodelingu lewej komory serca oraz regresja hipertrofii naczyniowej i komorowej,
- hamowanie proteinurii w przebiegu nefropatii cukrzycowej, wzrost przepływu nerkowego,
- redukcja insulinooporności [6,9,10,39,41-47].

Przedstawione powyżej korzystne następstwa, wynikające z działania inhibitorów ACE determinują ich szerokie zastosowanie terapeutyczne, głównie w leczeniu wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym: nadciśnienia tętniczego, zastoinowej niewydolności serca, dysfunkcji lewokomorowej po zawale mięśnia sercowego, miażdżycy tętnic oraz nefropatii cukrzycowej w przebiegu cukrzycy typu I i II [39].

2.3.2. Budowa i aktywność I-ACE

Wszystkie, aktualnie dostępne I-ACE zostały zaprojektowane bez znajomości przestrzennej struktury enzymu docelowego. Ich rozwój stanowił zatem ogromny sukces wczesnej techniki racjonalnego projektowania leków, gdyż najważniejsze założenia odnośnie struktury wiodącej potencjalnego inhibitora konwertazy angiotensyny zdefiniowano w oparciu o analizę budowy nie samego celu molekularnego a raczej jego znanych substratów oraz białkowych inhibitorów [36]. Ponadto podstawą dla planowanych wówczas badań rozwojowych nad omawianą grupą stał się hipotetyczny, dwuwymiarowy model centrum aktywnego ACE, zaproponowany w 1967 roku przez *Cushman i Ondetti*, koncepcja która bazowała na założeniach o mechanistycznej homologii pomiędzy ACE a lepiej podówczas poznaną - karboksypeptydazą A. W modelu tym wyróżniono:

- trzy kieszenie katalityczne: S_1 , S_1' i S_2' , zdolne do interakcji z łańcuchami bocznymi swoistych substratów,
- jon cynku zlokalizowany pomiędzy kieszenią S_1 i S_1' oraz
- ładunek pozytywny w rejonie końca C (RYCINA 2.4) [48].



RYCINA 2.4

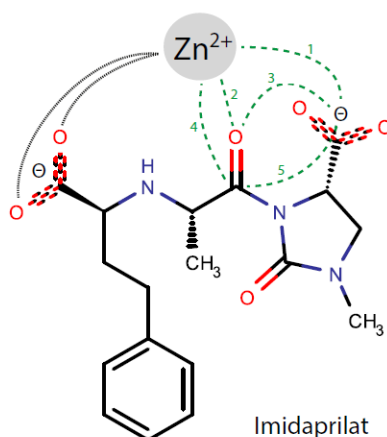
Hipotetyczny model centrum aktywnego ACE zaproponowany przez Cushman i Ondetti w 1967 roku, przedstawiający sposób łączenia enzymu z imidaprilatem. Opracowanie własne wg [48].

I tak, opierając się o wyniki przeprowadzonych rozlicznych testów ze związkami o charakterze białkowym stwierdzono, iż najkorzystniejszą sekwencję, umożliwiającą optymalne wkomponowanie się w kieszenie katalityczne enzymu ACE posiada tripeptyd Tyr-Ala-Pro. Na tej podstawie ustalono minimalne wymagania, jakie powinna spełniać cząsteczka inhibitora aby zrównoważyć ścisłą geometrię centrum aktywnego enzymu, w tym obecność:

- C-terminalnej grupy karboksylowej, kompensującej pozytywny ładunek w miejscu aktywnym,
- grupy karbonylowej, spełniającej rolę akceptora wiązania wodorowego,
- grupy funkcyjnej zdolnej do koordynowania jonów cynku.

Co więcej, późniejsze badania, związane z modelowaniem molekularnym, pozwoliły określić specyficzny farmakofor, który warunkuje wysokie powinowactwo cząsteczki inhibitora do enzymu ACE. W ten sposób przestrzenne relacje pomiędzy elementami wspólnymi dla wszystkich inhibitorów

określone zostały tzw. regułą pięciu dystansów (RYCINA 2.5). Zgodnie z nią karbonylowy atom tlenu związany z ugrupowaniem amidowym musi zajmować pozycję centralną pomiędzy katalitycznym atomem cynku a C-terminalną grupą karboksylową w odległości odpowiednio 4.8-5.0 Å (dystans nr 2) i 4.9-5.2 Å (dystans nr 3). Ponadto odległości pomiędzy karbonylowym atomem węgla a atomem cynku i C-terminalną grupą karboksylową powinny wynosić odpowiednio 4.9-5.2 Å (dystans nr 4) i 4.0 Å (dystans nr 5). Z kolei odległość pomiędzy atomem cynku a końcem C inhibitora określono jako 8.5-8.7 Å z odchyleniem 1.1 Å (dystans nr 1). Dodatkowo wykazano, iż optimum działania leku zapewnia konfiguracja *trans* wokół wiązania amidowego z grupą karbonylową umiejscowioną w kierunku ugrupowania karboksylowego [49,50].



RYCINA 2.5

*Reguła pięciu dystansów, określająca farmakofor dla I-ACE na przykładzie imidaprilatu.
Opracowanie własne wg[50].*

Pierwszym syntetycznym inhibitorem, spełniającym wszystkie, powyżej wymienione reguły oraz wykazującym zadowalającą aktywność po podaniu doustnym był kaptopril, wprowadzony do leczenia w 1981. Kolejnymi przedstawicielami klasy I-ACE były odpowiednie pochodne di- lub tripeptydowe, w tym: enalapril (1984), lisinopril (1987), fosinopril, chinapril, benazepril, ramipril (1991), perindopril (1993), moeksipril (1995), trandolapril (1996) [51] czy imidapril (1999) [52]. Ich analiza strukturalna pozwoliła wskazać dalsze cechy, określone mianem ‘pomocniczych’, ułatwiające wiązanie inhibitora z miejscem aktywnym ACE, w tym:

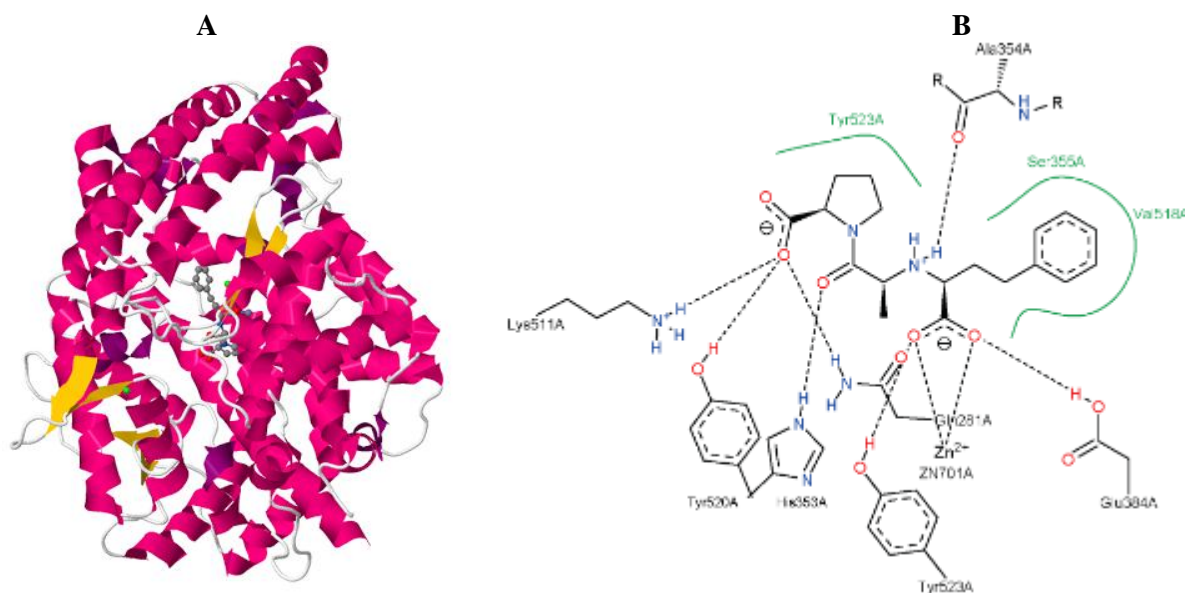
- heterocykliczny pierścień proliny lub pierścień imitujący prolinę, który wpasowuje się w miejscu aktywnym ACE w kieszeni S2' i stanowi zawadę steryczną dla hydrolizy amidowej
- obecność hydrofobowego pierścienia heterocyklicznego w pierścieniu proliny, który wpływa na zwiększenie aktywności leku,
- pierścień benzenu, pozwalający na wpasowanie się inhibitora do hydrofobowej kieszeni S1 za pomocą wiązań *van der Waalsa*,
- grupa iminowa jako dodatkowe miejsce wiążące,
- grupa butylaminowa lisinoprilu, wchodząca w interakcje jonowe z aminokwasami kieszeni S1', zwiększająca biodostępność po podaniu doustnym,

- grupa metylowa bocznego łańcucha alaniny, odpowiedzialna za interakcje hydrofobowe,
- zestryfikowana grupa karboksylowa, zwiększająca lipofilowość, biodostępność oraz wydłużająca działanie leku,
- orientacja zgodna ze strukturą *L*-aminokwasów [9],
- konfiguracja *S* przy wszystkich asymetrycznych atomach węgla [53].

2.3.3. Kompleks ACE-inhibitor w układzie przestrzennym

Jak dotąd krystaliczna struktura kompleksu ACE-inhibitor ustalona została tylko dla kilku leków z grupy I-ACE, w tym dla kaptoprilu, lisinoprilu, enalaprilu, perindoprilu oraz trandolaprilu. Z uwagi na znaczny stopień pokrewieństwa budowy pomiędzy enalaprilem a imidaprilem, związkiem stanowiącym przedmiot badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej, kompleks ACE-enalapril został wybrany do szczegółowej analizy strukturalnej enzymu ACE w postaci związanej.

I tak, badania układu ACE-enalapril, przeprowadzone metodą krystalografii rentgenowskiej, pozwoliły stwierdzić w nim przeważającą ilość form heliakalnych w konformacji analogicznej do natywnej postaci enzymu (RYCINA 2.6 A). W omawianej strukturze inhibitor ulokowany jest wewnątrz centralnie przebiegającego kanału, gdzie znajduje się centrum aktywne. Jego N-terminalna grupa aromatyczna oddziałuje z Phe512 i Val518 za pomocą wiązań *van der Waalsa*. Z kolei grupa karboksylowa tworzy wiązanie koordynacyjne o długości 2.0 Å z jonem cynku a także wiązania wodorowe z Glu384, Tyr523 oraz cząsteczką wody. Co więcej, karbonylowy tlen inhibitora łączy się z azotami reszt His353 i His513 za pomocą wiązań wodorowych zaś C-terminalna grupa karboksylowa powiązana jest z Lys511, Tyr520 i dwiema cząsteczkami wody. Ponadto wiązania wodorowe utworzone są również pomiędzy grupą iminową enalaprilu a resztą Ala354 (RYCINA 2.6 B) [54].



RYCINA 2.6. (A) Kompleks ACE-enalapril [PDB 1UZE] (B) Schemat wiązania enalaprilu z ACE wygenerowany za pomocą programu PoseView (<http://poseview.zbh.uni-hamburg.de/>).

2.3.4. Systematyka I-ACE

Bardzo istotnym elementem budowy I-ACE jest ugrupowanie wiążące cynk, którego rodzaj stanowi podstawę ich klasyfikacji do następujących podgrup:

- pochodnych sulfhydrylowych,
- pochodnych dikarboksylowych oraz
- pochodnych fosfinylowych.

Co istotne, leki, należące do tych dwóch ostatnich mogą występować w postaci prekursora z zestryfikowaną grupą karboksylanową lub fosfinylową, dzięki czemu zachowują optymalną biodostępność popadaniu doustnym. W TABELI 2.1 zestawiono znane inhibitory ACE, określono ich systematykę oraz powinowactwo do odpowiednich frakcji enzymu docelowego a także zdefiniowano ich postać farmakokinetyczną [39,42,53,55,56].

TABELA 2.1.

Systematyka inhibitorów ACE stosowanych obecnie w lecznictwie i charakterystyka ich postaci farmakokinetycznej oraz stopnia powinowactwa do odpowiedniej frakcji enzymu docelowego

Lek	Powinowactwo do tkankowej/osoczowej frakcji ACE	Postać farmakokinetyczna
<i>Pochodne sulfhydrylowe</i>		
kaptopril	osocze	lek aktywny
zofenopril	tkanka	pro-lek
<i>Pochodne dikarboksylowe</i>		
benazepril	tkanka	pro-lek
chinapril	tkanka	pro-lek
cilazapril	tkanka	pro-lek
enalapril	osocze	pro-lek
imidapril	tkanka	pro-lek
lisinopril	osocze	lek aktywny
moeksipril	tkanka	pro-lek
perindopril	tkanka	pro-lek
ramipril	tkanka	pro-lek
trandolapril	tkanka	pro-lek
<i>Pochodne fosfinylowe</i>		
fosinopril	osocze	pro-lek

Zaprezentowany podział, oprócz cechami strukturalnymi, uzasadniony jest również dość istotnymi różnicami w zakresie właściwości farmakokinetycznych, farmakodynamicznych oraz profilu bezpieczeństwa pomiędzy lekami należącymi do odpowiednich klas. Ta niejednorodność najbardziej widoczna jest pomiędzy inhibitorami, zawierającymi grupę –SH a pozostałymi inhibitorami z grupy I-ACE. Zależność ta wynika to z faktu, iż obecność grupy sulfhydrylowej warunkuje specyficzny zespół

cech, takich jak właściwości antyoksydacyjne oraz zdolność do generowania angiostatyny, które nie mogą być przypisane inhibitorom, posiadającym inne ugrupowania wiążące cynk [38,39]. Ponadto obecność podstawnika –SH jest bezpośrednią przyczyną wzrostu częstości działań niepożądanych pochodnych sulfhydrylowych, w tym: utraty smaku, reakcji skórnych czy też białkomoczu [9,56]. Dodatkowo analogi kaptoprilu wykazują tendencję do oksydacji oraz tworzenia dimerów i disulfidów z endogennymi związkami tiolowymi (glutation, cysteina), co może stać się przyczyną skrócenia ich czasu działania [57].

Jak zaprezentowano w TABELI 2.1, z farmakologicznego punktu widzenia dość istotne znaczenie może mieć także inny podział I-ACE, mianowicie na inhibitory osoczowe i tkankowe, a uwarunkowany jest on zdolnością danego leku do penetracji tkankowej. W rzeczywistości, ta szczególna cecha inhibitora podyktowana jest takimi jego własnościami jak: stopień lipofilowości, rozmiary cząsteczkowe, stężenie a także dostępność systemów transportu aktywnego. I tak, tkankowe I-ACE cechują się większym powinowactwem do enzymu, ulegającego lokalnej ekspresji oraz mogą wywierać silniejsze efekty wazodilatacyjne, antymitogenne, przeciwzakrzepowe i przeciwniedokrwienne, co w konsekwencji poszerza ich spektrum działania i jest szczególnie istotne w chorobach, wynikających z zaburzeń lokalnych układów RAS, w tym w dysfunkcji śródbłonna naczyń oraz w chorobach nowotworowych [38,39].

2.4. Chlorowodorek imidaprilu

Synonimy

Imidaprilum, SH-6366, TA-6366

Nazwa handlowa

Tanatril 5 mg, 10 mg, 20 mg, tabletki

Nazwa chemiczna

kwask (S)-3-(N-((S)-1-etoksykarbonylo-3-fenylopropylo)-L-alanylo)-1-metylo-2-oksoimidazolino-4-karboksyłowy

Masa molowa soli chlorkowej

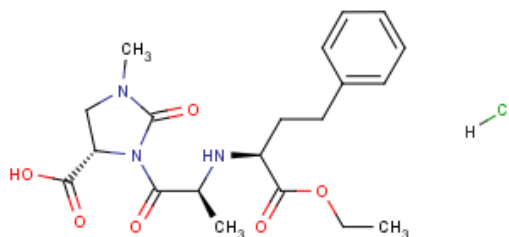
441.91 g/mol

Masa molowa

405.44 g/mol

Wzór chemiczny

$C_{20}H_{27}N_3O_6$ HCl

Wzór strukturalny

RYCINA 2.7

Wzór strukturalny chlorowodorku imidaprilu

Postać

Biały, krystaliczny proszek, łatwo rozpuszczalny w DMSO, metanolu i wodzie, słabo rozpuszczalny w etanolu (99.5%). Temperatura topnienia wynosi około 203°C [58].

Postać farmaceutyczna

Prawie białe, podłużne, dwuwypukłe tabletki o prostych krawędziach, z rowkiem dzielącym po obu stronach [59].

Chlorowodorek imidaprilu należy do silnych, długodziałających, dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny, podawanych doustnie w postaci tabletek [6]. Pod względem budowy chemicznej, wyróżnia się on spośród znanych I-ACE obecnością pierścienia 2-oksoimidazolowego, którego zadaniem jest stabilizacja cząsteczki w formie *trans*, czyli takiej, która posiada największe powinowactwo do endogennej ACE. Zaprojektowana w ten sposób struktura zapobiega rotacjom cząsteczki, dzięki czemu zwiększa się jej siła inhibicyjna [53]. Co więcej, obecność ugrupowania metylowego w pierścieniu heterocyklicznym bardzo istotnie wpływa na wzrost powinowactwa tego inhibitora do enzymu docelowego. Dodatkowo w strukturze imidaprilu zidentyfikowano obecność trzech węgli chiralnych, przy czym wykazano doświadczalnie, że spośród ośmiu izomerów optycznych najwyższą aktywność farmakologiczną posiada enancjomer o konfiguracji *SSS* [60].

W Polsce imidapril stosowany jest wyłącznie w terapii nadciśnienia samoistnego w monoterapii oraz w połączeniu z innymi lekami hipotensyjnymi [61], choć jego skuteczność została także potwierdzona w leczeniu przewlekłej niewydolności serca, nadciśnienia tętniczego mięsżowonerkowego oraz nefropatii cukrzycowej i w tych wskazaniach dostępny jest na terenie Chin, Japonii, Pakistanu oraz Czech [6]. W badaniach przedklinicznych a także w badaniach na grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz po przebytych zawale mięśnia sercowego wykazano istotny wpływ tego leku na poprawę funkcji endotelium [62] oraz na redukcję masy lewej komory serca [63]. Ponadto u pacjentów po przebytych zawale mięśnia sercowego stwierdzono zależną od imidaprilu, istotną redukcję aktywności fibrynolitycznej osocza [64]. Co więcej, imidapril wywierał efekty

renoprotekcyjne u pacjentów z cukrzycą typu I [65] oraz z przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek [66]. Jego przewaga nad innymi I-ACE polega na zmniejszonej tendencji do wywoływania suchego kaszlu oraz na bardzo wysokiej wartości wskaźnika *T/P* (84% dla dawki 10 mg), będącego stosunkiem minimalnego do maksymalnego obniżenia ciśnienia krwi dla kolejnych dawek leku [6].

Standardowa dawka imidaprilu wynosi 5-20 mg na dobę [53]. Po podaniu doustnym szybko wchłania się z przewodu pokarmowego w ok. 70% podanej dawki a maksymalne stężenie w osoczu osiąga w ciągu dwóch godzin. Jego absorpcja jest znacznie ograniczona w obecności pokarmu, szczególnie tłuszczu. Stopień wiązania z białkami imidaprilu wynosi 85% a jego okres biologicznego półtrwania osiąga wartość około 2 godzin. Eliminacja przebiega jednofazowo. Imidapril, podobnie jak większość dikarboksylowych I-ACE, występuje w formie pro-leku, który ulega wątrobowej aktywacji z utworzeniem dikwasowej pochodnej – imidaprilatu, będącego biologicznie czynnym metabolitem [59]. Reakcja ta katalizowana jest przez enzym z grupy α/β -hydrolaz - karboksyesterazy 1 [67]. Imidaprilat wykazuje niemal 500-krotnie większą aktywność farmakologiczną w porównaniu do imidaprilu [68], a swoje maksymalne stężenie w osoczu (c_{max} $15,7 \pm 9,8 \mu\text{g/l}$) osiąga w przeciągu 7 godzin. Jego biodostępność wynosi około 42% a stopień związania białkami – 53% [59,69]. Pozostałe metabolity imidaprilu nie posiadają aktywności farmakologicznej, a są to: kwas ((4*S*)-1-metylo-2-okso-4-imidazolidynokarboksylowy, ester 2-etylo-((2*S*)-N-[(1*S*)-1-karboksy-3-fenylopropylo]alaniny oraz ((2*S*)-N-[(1*S*)-1-karboksylo-3-fenylopropylo]alanina [70]. Eliminacja imidaprilatu przebiega dwufazowo, z początkowym okresem półtrwania 7-9 godzin i z końcowym okresem półtrwania - ponad 24 godziny. Około 40% dawki doustnej wydalane jest z moczem i około 50% z kałem [59,69].

3. TRWAŁOŚĆ LEKU W FAZIE STAŁEJ – CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Jednym z podstawowych wyzwań w dzisiejszej farmacji jest gwarancja najwyższej jakości leków, co w dużej mierze związane jest z zapewnieniem ich zadowalającej trwałości. Fundamentalne znaczenie w tym zakresie ma możliwość nadania substancji aktywnej formy, pozwalającej na jej właściwe dawkowanie, preferencyjnie dawkowanie doustne, w taki sposób, aby utrzymać jej trwałość na jak najwyższym poziomie przez maksymalnie długi okres czasu. Z tego powodu, ocena trwałości leku w fazie stałej oraz jego ewentualna stabilizacja stanowią niezwykle istotny etap w toku badań nad związkami farmakologicznie czynnymi.

W niniejszej części pracy doktorskiej zaprezentowana zostanie szczegółowa analiza trwałości chlorowodoru imidaprilu, leku z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny, za pomocą technik eksperymentalnych. Dokonana zostanie również ocena wpływu budowy I-ACE na ich trwałość za pomocą technik, związanych z modelowaniem komputerowym.

*„Prawem każdego pacjenta,
gwarantowanym przez ustawodawstwo
jest otrzymywanie leków dobrej jakości,
bezpiecznych i skutecznych terapeutycznie.”*

- Z. Fijałek

3.1. Pojęcie trwałości leku w fazie stałej

W ujęciu ogólnym, pojęcie trwałości leku zdefiniowane jest jako zdolność substancji leczniczej bądź produktu leczniczego do utrzymania swych właściwości fizykochemicznych, terapeutycznych, toksykologicznych oraz mikrobiologicznych w okresie użytkowania, określonym terminem przydatności. Zapewnienie optymalnej trwałości jest więc ważnym elementem gwarancji skuteczności i bezpieczeństwa stosowania leku. Wiadomo jednak, że każdy produkt leczniczy, będąc skomplikowanym układem fizykochemicznym, jest obiektem ciągłych przemian na drodze zjawisk chemicznych lub fizycznych, które prowadzą do utraty jego stabilności oraz stopniowej degradacji. Zjawiska te wynikają zarówno z reaktywności substancji, tworzących postać farmaceutyczną, jak również z warunków procesu technologicznego oraz warunków przechowywania [2]. I tak, degradacja substancji leczniczej w wyniku zjawisk fizycznych zachodzi między innymi poprzez:

- przemiany polimorficzne, krystalizację substancji amorficznych, rekrystalizację,
- przemiany fazowe (sublimację, parowanie),
- tworzenie solwatów lub hydratów,
- sorpcję.

Z kolei, degradacja substancji leczniczej na drodze reakcji chemicznych zachodzi w wyniku:

- hydrolizy,
- utleniania i redukcji,
- hydratacji i dehydratacji,
- cyklizacji,
- izomeryzacji/epimeryzacji
- deaminacji,
- polimeryzacji,
- dekarboksylacji.

Jak zatem widać, utrata stabilności chemicznej leku związana jest przede wszystkim ze spadkiem zawartości substancji aktywnej w preparacie oraz ze wzrostem stężenia zanieczyszczeń, powstających w wyniku degradacji. Co więcej, obecność tych ostatnich może indukować toksyczność leku oraz zmniejszać siłę jego działania, bądź też powodować zmiany w biodostępności [3,7], co niesie z sobą poważne konsekwencje terapeutyczne.

Z tego też względu problematyka, związana z trwałością leku stanowi niezwykle ważny aspekt systemu zapewnienia jakości w farmacji, przy czym jej najistotniejszą poddziedziną wydaje się być tematyka, dotycząca trwałości leku w fazie stałej, głównie z uwagi na fakt, iż znaczny odsetek dostępnych preparatów leczniczych występuje pod postacią form stałych. To, z kolei, spowodowane jest zarówno ich korzystniejszym profilem stabilnościowym w zestawieniu z postaciami płynnymi oraz półpłynnymi, jak również prostotą dawkowania. Ponadto, z uwagi na wydajność procesów

oczyszczania, zdecydowana większość substancji czynnych, przeznaczonych do produkcji leków występuje w formie sproszkowanej, co dodatkowo podnosi rangę omawianego zagadnienia [7].

Prowadzenie analiz oraz oceny trwałości leku w fazie stałej jest jednak skomplikowanym postępowaniem analitycznym. Wynika to między innymi z różnorodności jego pierwszorzędowych punktów końcowych, do których należą:

- ustalenie kinetycznego mechanizmu reakcji rozkładu leku,
- określenie szybkości jego degradacji,
- ocena wpływu czynników środowiskowych na parametry kinetyczne reakcji,
- ocena wpływu substancji pomocniczych oraz tworzywa opakowania na szybkość i przebieg reakcji,
- identyfikacja produktów rozkładu leku,
- ewentualna stabilizacja preparatu farmaceutycznego [3].

3.2. Reaktywność a trwałość substancji leczniczej w fazie stałej

Podstawową determinantą postępu procesu degradacji chemicznej leku jest reaktywność substancji, wchodzących w skład gotowej postaci farmaceutycznej. Właściwość ta, z kolei, jest w dużym stopniu uzależniona od ruchliwości elementów struktury substratu, warunkującej szybkość dyfuzji oraz ilość efektywnych zderzeń, które prowadzą do wytworzenia nowych wiązań chemicznych. Jak wiadomo, ciała stałe charakteryzują się zwartym ułożeniem cząsteczek, które dzięki siłom wzajemnego przyciągania posiadają niewielką energię kinetyczną i dlatego wykonują jedynie drgania wokół swych położeń równowagi, tworząc sztywny układ. Stąd ruchliwość elementów sieci przestrzennej w ciałach stałych jest zdecydowanie niższa w porównaniu z ruchliwością cząsteczek w fazie ciekłej bądź gazowej i z tego też względu reakcje chemiczne w fazie stałej rozpoczynają się jedynie na granicy rozdziału pomiędzy reagentami lub w centrach aktywnych, zwanych zarodkami, w przeciwieństwie do cieczy i gazów, gdzie reakcja zachodzi w całej objętości układu. Dodatkowo przebieg reakcji w fazie stałej, oprócz temperatury, ciśnienia i stężenia reagentów (jak w przypadku cieczy), uzależniony jest także od innych parametrów takich jak stopień rozdrobnienia, stopień zdefektowania struktury, szybkość przenoszenia ciepła, higroskopijność, temperatura topnienia, postać krystaliczna oraz rozpuszczalność w zaadsorbowanej warstwie rozpuszczalnika. Wymienione czynniki powodują z kolei, że szybkość reakcji chemicznych w fazie stałej jest znacznie ograniczona, co warunkuje wyższą trwałość stałych postaci leku w porównaniu z postaciami płynnymi.

Jak już wspomniano, początkowe stadia przemian chemicznych z udziałem ciał stałych obejmują akty elementarne, zachodzące na powierzchni kryształu, czyli adsorpcję, rozluźnienie cząstek oraz wbudowywanie się reagenta w warstwy powierzchniowe makrostruktury macierzystej. Dalszy postęp reakcji, natomiast wynika z nadmiaru energii kinetycznej, niezbędnej do rozerwania

wiązań sieci substratu oraz utworzenia nowych wiązań sieci produktu. I tak, elementy posiadające odpowiedni zapas energii kinetycznej stają się zarodkami nowej fazy, które początkowo wydzielają się ze struktury przejściowej, będącej roztworem stałym produktu przemiany w macierzystej sieci krystalicznej. Sam proces zarodkowania w fazie stałej przebiega w sposób niejednorodny, głównie w miejscach zdefektowania struktury kryształu macierzystego oraz na jego krawędziach i narożach. Stąd stopień rozdrobnienia substancji stałej znacząco wpływa na szybkość jej rozkładu, gdyż zwiększa udział bardziej reaktywnych warstw powierzchniowych w stosunku do objętości. Utworzone zarodki nowej fazy wzrastając, formują makrostrukturę produktu i powodują, że strefa reakcyjna zaczyna stopniowo przesuwać się w głąb kryształu macierzystego. Co istotne, wzrost zarodka możliwy jest dzięki następującym procesom elementarnym:

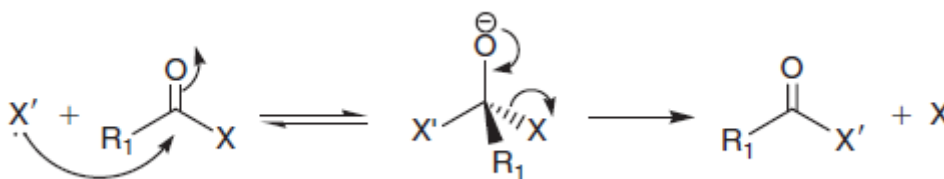
- dyfuzji kolejnych cząstek do powierzchni nowej fazy, wywołanej gradientem potencjału chemicznego,
- migracji powierzchniowej oraz
- wbudowaniu się tych cząstek do tworzącej się struktury.

Ostatnim stadium reakcji w fazie stałej jest oddzielenie produktu od substratu w wyniku różnic objętości właściwych pomiędzy fazami [71].

3.2.1. Reakcje rozkładu termicznego dikarboksylowych I-ACE w fazie stałej

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, iż rozkład inhibitorów konwertazy angiotensyny z grupy pochodnych dikarboksylowych, do których należy chlorowodurek imidaprilu, w fazie stałej zachodzi w wyniku przemian chemicznych i przebiega drogą hydrolizy lub wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji [71-75].

Hydroliza jest najczęściej spotykaną reakcją rozkładu termicznego ciał stałych, przy czym dotyczy ona związków, posiadających w swej budowie ugrupowanie: estrowe, amidowe, imidowe, laktamowe, laktonowe, sulfonowe i sulfonamidowe [7,76]. Stąd obecność wiązania estrowego w cząsteczkach dikarboksylowych I-ACE determinuje ich podatność na rozkład hydrolityczny. Pod względem mechanistycznym, warunkiem hydrolizy, również w przypadku omawianej grupy leków, jest duża elektroujemność atomu tlenu w ugrupowaniu karbonylowym, powodująca polaryzację wiązania $-C=O$ oraz uaktywniająca karbonylowy atom węgla na addycję nukleofilową cząsteczek wody (RYCINA 3.1). Ponadto przebieg reakcji rozkładu na drodze hydrolizy wspomagają następujące czynniki: obecność protonów lub jonów hydroksylowych, podstawniki elektronoakceptorowe (R1), zwiększające elektroujemność grupy karbonylowej oraz dobra zdolność grupy opuszczającej (X). Z kolei podstawniki elektronodonorowe, zawady steryczne i obecność słabych grup odchodzących wpływają na zmniejszenie podatności substancji na uleganie rozkładowi drogą omawianej reakcji.



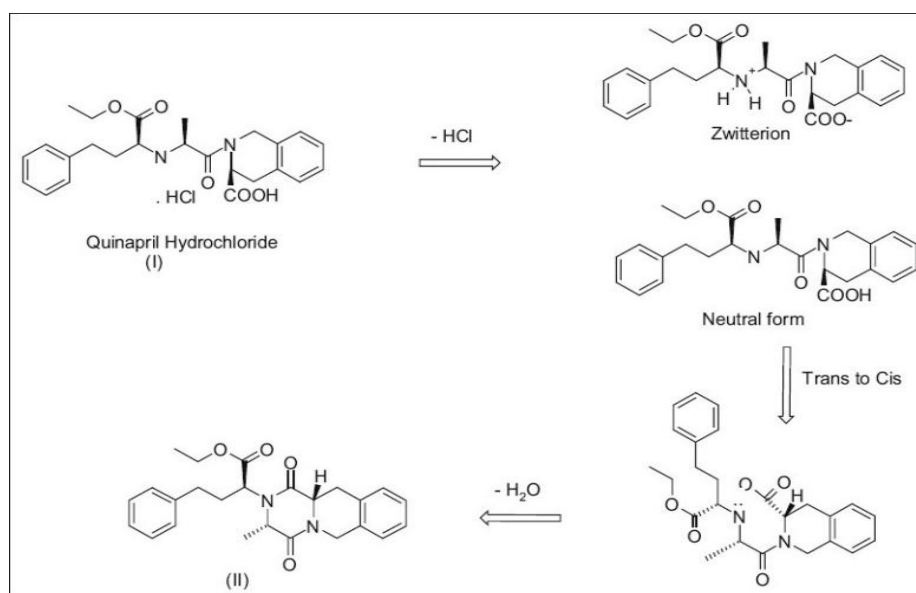
RYCINA 3.1.

Mechanizm reakcji hydrolizy. Opracowanie własne wg [76].

Co więcej, cząsteczki dikarboksylowych I-ACE, oprócz wiązań estrowych, posiadają w swej budowie także wiązania amidowe, które mogą ulegać hydrolizie, jednakże są na nią mniej wrażliwe niż wiązania estrowe. Zależność ta wynika przede wszystkim z mniejszej elektroujemności atomu azotu w porównaniu z atomami tlenu, co z kolei warunkuje mniejszą elektrofilowość karbonylowego atomu węgla oraz słabszą zdolność opuszczającą grupy aminowej w zestawieniu z grupą alkoholową w estrach. Z tego względu inicjacja hydrolizy amidowej wymaga większych energii aktywacji w porównaniu z hydrolizą estrową i dlatego nie stanowi uprzywilejowanej drogi rozkładu w przebiegu degradacji termicznej dikarboksylowych I-ACE w fazie stałej [76]. Warto jednak podkreślić, że reakcja tego typu obserwowana była w przypadku degradacji I-ACE w fazie ciekłej oraz w przebiegu procesów *in vivo* [77-80].

Cyklizacja wewnątrzcząsteczkowa pomiędzy sąsiadującymi resztami aminokwasowymi stanowi drugą, potencjalną ścieżkę rozkładu dikarboksylowych I-ACE w fazie stałej, a wynika ona z ich di- lub tripeptydowej budowy. Reakcja ta, podobnie jak hydroliza, aktywowana jest termicznie, a prowadzi ona do utworzenia pochodnych diketopiperazynowych. Dla I-ACE w formie soli chlorowodorowej przebieg cyklizacji jest kilkusetapowy, zgodnie z RYCINĄ 3.2. Jej inicjacja związana jest z ucieczką chlorowodoru i utworzeniem jonu obojnego. W następnej fazie reakcji natomiast, następuje deprotonacja reszty aminowej oraz utworzenie cząsteczki obojętnej, która ulega izomeryzacji z formy *trans* do formy *cis*, co dalej umożliwia addycję grupy karbonylowej sąsiedniej reszty aminokwasowej. W wyniku tych przemian tworzy się produkt pośredni o strukturze czworościanu, który po odczepieniu cząsteczki wody przekształca się ostatecznie w produkt reakcji [71,81,82].

Co istotne, powstawanie pochodnych diketopiperazynowych w wyniku degradacji w jest poważnym problemem technologicznym, głównie z uwagi na trudność późniejszego oczyszczenia substancji czynnej, nawet na drodze krystalizacji frakcyjnej. Dlatego jedną z metod stabilizacji leków z grupy I-ACE jest tworzenie ich soli kwasowych lub zasadowych, co minimalizuje ich tendencję do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji podczas przechowywania [81].



RYCINA 3.2.

Przebieg procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z utworzeniem pochodnej diketopiperazynowej na przykładzie chinaprilu [81].

3.3. Wpływ składników preparatu farmaceutycznego na trwałość substancji leczniczej

Podatność substancji leczniczej na rozkład, oprócz jej reaktywności, wynika także ze złożonego charakteru układu, jakim jest postać farmaceutyczna, w skład której może wchodzić dość pokaźna ilość składników, a ich bezpośredni kontakt może indukować rozliczne procesy chemiczne, powodujące degradację. Ostateczna postać leku bowiem, oprócz substancji czynnej i jej zanieczyszczeń, dodatkowo zawiera pewną ilość substancji pomocniczych, obecność których może zarówno pozytywnie jak i negatywnie wpłynąć na stabilność substancji aktywnej [83].

Zgodnie z definicją podaną przez IPEC (*International Pharmaceutical Excipients Council*), substancją pomocniczą w technologii postaci leku określa się każdą substancję celowo dodaną do postaci farmaceutycznej, która w zastosowanej ilości pozbawiona jest działania farmakologicznego oraz toksycznego i której zadaniem jest nadanie substancji leczniczej odpowiedniej postaci, ułatwiającej dawkowanie oraz zapewnienie optymalnej trwałości i biodostępności przez cały okres ważności leku [84]. Z uwagi na funkcje, jakie substancje pomocnicze pełnią w procesie technologicznym stałych postaci leku, wyróżnia się:

- środki wypełniające oraz adsorbenty (np.: laktoza, wodorofosforan wapnia), dodawane do masy tabletkowej w przypadku, gdy ilość substancji czynnej jest niewielka lub uniemożliwia granulację lub tabletkowanie,
- środki zwilżające, których rolą jest łączenie ziaren proszku w większe agregaty (np.: woda, kleik ze skrobi kukurydzianej, metyloceluloza, karmeloza sodowa),

- środki utrzymujące wilgoć, zabezpieczające lek przed nadmiernym wysychaniem (np.: skrobia, sorbitol, glicerol),
- środki rozsadzające, które pęcznieją w środowisku wodnym i powodują szybszy rozpad tabletek *in vivo* (np.: skrobia ziemniaczana i kukurydziana, metyloceluloza),
- środki poślizgowe, zmniejszające tarcie pomiędzy ziarnami proszku lub granulatu w czasie tabletkowania oraz zapobiegające przyczepianiu się masy tabletkowej do stempli tabletkarki (np.: stearynian magnezu),
- środki wiążące, zapobiegające zbyt szybkiemu rozpadowi tabletek (np.: karmeloza sodu, sacharoza),
- środki hydrofilizujące, które zwiększają zwilżalność leków hydrofobowych (np.: monostearynian glicerolu, alkohol cetylowy) [85].

W kontekście powyższych rozważań, w ramach zapewnienia jakości każdego leku, bardzo istotną kwestią wydaje się być kwalifikacja substancji pomocniczych do wytworzenia konkretnej postaci farmaceutycznej. I tak, w przemyśle proces ten odbywa się na drodze testów skринingowych, oceniających zgodność danej substancji pomocniczej z substancją aktywną [89, 98] a także jej poziom toksyczności, jakość technologiczną oraz cenę. Znaczenie tego typu analiz podkreśla fakt, iż niewłaściwy dobór substancji pomocniczych może w bardzo niekorzystny sposób wpłynąć zarówno na trwałość leku, jak również na przebieg procesu wytwarzania produktu leczniczego oraz cechy farmakokinetyczne, farmakodynamiczne i profil toksykologiczny substancji czynnej [86]. Wymienione zjawiska wynikają między innymi z proporcjonalnie wyższej zawartości substancji pomocniczych w gotowym produkcie leczniczym w porównaniu z zawartością substancji czynnych, co sugeruje, że to właśnie substancje pomocnicze determinują właściwości fizykochemiczne formulacji oraz jej podatność na procesy technologiczne. Ponadto substancje pomocnicze, pozostając w bezpośrednim kontakcie z substancją czynną, mogą naruszać jej trwałość na drodze różnorodnych mechanizmów, w tym bezpośrednio - jako substraty lub katalizatory reakcji chemicznych, bądź pośrednio poprzez zmianę *pH* środowiska lub adsorpcję wilgoci [7,76].

Możliwość interakcji chemicznych pomiędzy substancjami pomocniczymi a substancją aktywną wynika przede wszystkim z różnic w ich charakterze elektrofilowym, przy czym nukleofilowe substancje czynne (np.: pochodne amin, sulfidów, fenolu) są niezgodne z elektrofilowymi substancjami pomocniczymi (np.: pochodne estrów) i odwrotnie – elektrofilowe substancje czynne (np.: kwasy karboksylowe, estry, amidy) są niezgodne z nukleofilowymi substancjami pomocniczymi (np.: alkohole). Co więcej, oprócz samych substancji pomocniczych, rozkład substancji czynnej mogą powodować również ich zanieczyszczenia (takie jak jony metali, nadtlenki, aldehydy czy krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe) oraz produkty degradacji, co jest szczególnie istotne w przypadku postaci leku o niskim stosunku zawartości substancji czynnej do substancji pomocniczych [87].

Poza zgodnością chemiczną, bardzo ważnym kryterium selekcji substancji pomocniczych do danej formulacji jest zawartość wilgoci oraz zdolność do adsorbowania pary wodnej, ponieważ cecha ta może wpłynąć na zmianę uwodnienia mikrośrodowiska leku a tym samym nasilić rozkład hydrolityczny substancji czynnej. Dodatkowo desorpcja wody z powierzchni substancji pomocniczej może zwiększać plastyczność sieci krystalicznej substancji czynnej oraz nasilać ruchliwość jej cząsteczek, stwarzając w ten sposób dogodne warunki dla innych reakcji chemicznych. Rozwiązaniem tego typu problemów w technologii leków hydrolabilnych jest wprowadzenie do formulacji substancji silnie adsorbujących wodę (np.: krzemionka koloidalna), których zadaniem jest ochrona leku przed degradacją.

Co więcej, trwałość substancji czynnej w postaci farmaceutycznej uzależniona jest także od profilu *pH* zastosowanych substancji pomocniczych, stąd leki rozkładające się w zasadowym środowisku nie powinny być łączone z takimi substancjami pomocniczymi jak stearynian magnezu a leki rozkładające się w środowisku kwasowym nie powinny być łączone z ftalanem hydroksypropylometylocelulozy [7,76].

3.3.1. Substancje pomocnicze w stosowane technologii tabletek chlorowodorku imidaprilu

Zgodnie z informacją zawartą w charakterystyce produktu leczniczego leku Tanatril tabletki (*Imidaprili hydrochloridum*), do wytworzenia jego ostatecznej postaci farmaceutycznej wykorzystywane są następujące substancje pomocnicze: wodorofosforan wapnia bezwodny, skrobia kukurydziana żelowana, laktoza jednowodna, kroskarmeloza sodowa, palmitostearynian glicerolu oraz woda oczyszczona [59].

Wodorofosforan wapnia bezwodny w technologii postaci leku używany jest przede wszystkim jako substancja wypełniająca. Ze względu na dobrą sypkość znalazł zastosowanie w metodzie tabletkowania bezpośredniego. Nie rozpuszcza się w wodzie i etanolu i nie wykazuje właściwości higroskopijnych. Z uwagi na swój ścierny charakter, w formulacji wymaga jednoczesnego zastosowania z substancją poślizgową. W zależności od stopnia rozdrobnienia może być niekompatybilny z substancjami wrażliwymi na *pH* mikrośrodowiska. I tak, rozdrobniony wodorofosforan wapnia cechuje się zasadowym *pH* natomiast wodorofosforan wapnia nierozdrobniony wykazuje *pH* kwasowe, w związku z czym nie powinien być stosowany łącznie z substancjami rozkładającymi się w tych warunkach.

Skrobia kukurydziana żelowana w technologii tabletek stosowana jest jako substancja wypełniająca, rozsadzająca (z uwagi na zdolność pęcznienia w wodzie), wiążąca (ze względu na zdolność adsorpcji wody i zwilżania) oraz utwardzająca. W stężeniu 3.0% – 10.0% w/w działa również jako substancja antyadhezyjna i poślizgowa. Posiada właściwości higroskopijne. W wodnej dyspersji 10% (w/v) jej *pH* wynosi 4.5-7.

Laktoza jednowodna cechuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, słabą rozpuszczalnością w etanolu (95%) oraz brakiem rozpuszczalności w eterze i chloroformie. Posiada około 5.0% zawartości wody krystalizacyjnej. Przy produkcji tabletek i granulatów wykorzystywana jest jako substancja hydrofilizująca lub wypełniająca, przy czym jej dodatek powoduje wzrost twardości i przedłużony czas rozpadu granulatu. Stąd z reguły stosowana jest łącznie z substancjami rozsadzającymi. Laktoza może być niekompatybilna z lisinoprilem i aminokwasami. Ponadto ze związkami posiadającymi pierwszorzędowe grupy aminowe wchodzi w reakcję *Maillarda* z utworzeniem barwnych produktów. U osób z nietolerancją laktozy może powodować zaburzenia dyspeptyczne.

Kroskarmeloza sodowa jest substancją rozsadzającą stosowaną zarówno w procesie tabletkowania bezpośredniego (2.0% w/w) oraz granulacji na mokro (3.0% w/w). Nie rozpuszcza się w wodzie jednak w jej obecności pęcznieje powiększając swoją objętość 4-5 krotnie. Efekt ten mogą zmniejszać substancje higroskopijne, takie jak sorbitol. Jest niezgodna z silnymi kwasami oraz rozpuszczalnymi solami żelaza, cynku i aluminium. Nie wykazuje właściwości toksycznych oraz drażniących. Wartość *pH* 1.0% (w/v) dyspersji wodnej wynosi 5.0 – 7.0.

Palmitostearynian glicerolu w technologii tabletek znalazł zastosowanie jako substancja poślizgowa (w stężeniu 1.0% – 3.0%) oraz nadająca smak (2.0% – 6.0%). Powoduje wzrost czasu rozpadu tabletek oraz zmniejsza ich twardość w stopniu zależnym od czasu mieszania. Nie rozpuszcza się w wodzie i etanolu (95%), jest natomiast rozpuszczalny w chloroformie. Nie wykazuje właściwości toksycznych ani drażniących.

Woda oczyszczona stosowana jest jako substancja zwilżająca [85,88].

3.3.2. Stearynian magnezu

Wzór sumaryczny: $C_{36}H_{70}MgO_4$

Masa molowa: 591.24 g/mol

Synonimy: *Dibasic magnesium stearate; distearynian magnezu; magnesia stearas; oktadekanian magnezu; sól magnezowa kwasu oktadekanowego; sól magnezowa kwasu stearynowego Synpro 90.*

Rozpuszczalność: nierozpuszczalny w etanolu (95%), eterze, wodzie, słabo rozpuszczalny w ogrzonym benzenie i ogrzonym etanolu (95%).

Temperatura topnienia: 117 -150°C.

Stearynian magnezu stanowi mieszaninę soli magnezowych długołańcuchowych kwasów organicznych, głównie stearynianu i palmitynianu magnezu, w różnych proporcjach. Substancja ta występuje w postaci lekkiego, bardzo drobnego, białego proszku o delikatnym zapachu kwasu stearynowego, charakterystycznym smaku i niskiej gęstości nasypowej. Stearynian magnezu jest także

tlusty w dotyku oraz wykazuje przyczepność do skóry. W technologii tabletek wykorzystywany jest głównie jako substancja poślizgowa, antyadhezyjna i smarująca w stężeniu 0.25% - 5.0% w/w. W zwykłe stosowanych ilościach nie posiada działania toksycznego po podaniu doustnym, jednakże w nadmiarze może powodować efekty przeczyszczające oraz podrażnienie błon śluzowych. Nie wykazuje także właściwości kancerogennych [88]. Dodatek stearynianu magnezu powoduje alkalizację środowiska, co może wpływać na przyspieszenie reakcji hydrolizy [76]. Jako składnik postaci farmaceutycznych może być niezgodny z silnymi kwasami, silnymi zasadami oraz jonami żelaza. Co więcej, będąc substancją hydrofobową może przedłużać czas uwalniania substancji czynnej *in vivo* oraz zmniejszać twardość tabletek, zwiększać ich kruchość i przedłużać ich czas rozpadu w stopniu zależnym od czasu mieszania z granulatem. Stearynian magnezu występuje w postaci różnych form krystalicznych (trójwodny, dwuwodny i bezwodny), z których formy uwodnione są trwałe w obecności wilgoci a forma bezwodna adsorbuje wilgoć przy *RH* do 50% natomiast przy wyższych wartościach *RH%* przechodzi w formę trójwodną. Typowym zanieczyszczeniem tej substancji jest tlenek (II) magnezu [85,88].

3.4. Trwałość postaci farmaceutycznej typu tabletki do podania doustnego

Tabletki do podania doustnego należą do stałych, dozowanych postaci leku, otrzymywanych na drodze tabletkowania bezpośredniego z substancjami pomocniczymi lub na drodze tabletkowania po uprzedniej granulacji. Z uwagi na wiele zalet, takich jak: zapewnienie maksymalnej trwałości chemicznej i fizycznej substancji czynnej, ochrona przed szkodliwym wpływem warunków środowiska, możliwość łączenia substancji niezgodnych, niski koszt i wydajność wytwarzania, oraz prostota dawkowania, tabletki należą do najczęściej stosowanych form leku, a ich udział w rynku stanowi ponad 80% wszystkich dostępnych postaci farmaceutycznych [89].

Na stabilność chemiczną tabletek jako postaci farmaceutycznej mają wpływ następujące czynniki:

- profil chemiczny substancji aktywnej,
- właściwy dobór substancji pomocniczych,
- zachowanie odpowiednich warunków procesu przemysłowego, aparatury i sprzętu,
- zapewnienie należytego opakowania oraz
- poprawne zdefiniowanie warunków przechowywania.

Ponadto jednym z najważniejszych elementów systemu zapewnienia jakości tabletek, obok gwarancji tożsamości oraz zgodności składników formulacji, jest kontrola ich produkcji, co wynika z faktu, iż niemal na każdym etapie technologicznym istnieje ryzyko naruszenia równowagi wewnątrz układu, jakim jest masa tabletkowa. Spowodowane jest to między innymi stresem mechanicznym, związanym

z prasowaniem, ugniataniem, mieszaniem, rozdrabnianiem, mikronizacją, granulacją i suszeniem, czyli z konwersją masy tabletkowej do ostatecznej postaci farmaceutycznej, rezultatem której mogą być rozliczne przemiany chemiczne i fizyczne, w tym: przemiany polimorficzne, zmiana właściwości chemicznych (np. wodorofosforan wapnia bezwodny może zmieniać swoje *pH* powierzchniowe), wzrost reaktywności poprzez wzrost powierzchni w stosunku do objętości lub uwalnianie wody związanej, która uczestniczy w tworzeniu roztworów substancji czynnych i stymuluje postęp reakcji rozkładu [7,90] a także może przyczynić się do utraty funkcjonalności i integralności całej postaci farmaceutycznej [76]. Dlatego jednym z podstawowych kryteriów oceny jakości tabletek, przeznaczonych do podania doustnego, obok czasu rozpadu, czasu uwalniania substancji czynnej, twardości oraz kruchości, jest ich stabilność chemiczna, a analizy trwałości gotowego produktu leczniczego stanowią niezwykle istotny etap badań nad jakością leku, podobnie jak badania trwałości substancji aktywnej oraz jej mieszanin z substancjami pomocniczymi [7,90].

3.5. Wpływ opakowania na trwałość leku w fazie stałej

Oprócz zapewnienia właściwych warunków procesu produkcyjnego, niezwykle istotnym aspektem zachowania optymalnej trwałości i wysokiej jakości postaci farmaceutycznej jest dobór właściwego opakowania bezpośredniego oraz zbiorczego, których kryteria przydatności zdeterminowane są przez następujące cechy:

- kompatybilność z substancją czynną oraz substancjami pomocniczymi,
- skuteczna ochrona składników preparatu przed czynnikami powodującymi ich degradację, do których mogą należeć: wilgoć, promieniowanie UV, substancje utleniające, zanieczyszczenia mikrobiologiczne, uszkodzenia mechaniczne,
- bezpieczeństwo stosowania i funkcjonalność,
- niski koszt produkcji.

Zgodnie z powyższym, kompatybilność materiału opakowania z substancją leczniczą lub substancjami pomocniczymi stanowi nadrzędną cechę, determinującą dobór tworzywa, a jej ocena powinna uwzględniać migrację, czyli przenikanie składników opakowania do postaci leku, oraz sorpcję, czyli przenikanie składników postaci leku do materiału opakowania, a więc procesy, sprzyjające występowaniu interakcji pomiędzy lekiem a tworzywem, z którego wykonane jest opakowanie bezpośrednie, a tym samym negatywnie wpływające na jego trwałość. Godnym podkreślenia jest jednak fakt, iż w fazie stałej istnieje jedynie nieznaczne ryzyko tego typu zjawisk, co wynika głównie z relatywnie niewielkiej szybkości reakcji typu ciało stałe - ciało stałe.

Z tego powodu najważniejszym kryterium doboru materiału opakowania dla stałych form leku jest jego zdolność do skutecznej ochrony przed wilgocią, w mniejszym stopniu również przed czynnikami utleniającymi i promieniowaniem UV, przez cały okres ważności leku, w zależności od

indywidualnych wymagań substancji aktywnej. Przenikanie cząsteczek wody lub tlenu przez materiał opakowania oraz ich adsorpcja na powierzchni postaci farmaceutycznej jest bowiem problemem technologicznym, który może w różnym stopniu przyczynić się do nasilonej degradacji substancji leczniczych. Z tego też względu, w technologii opakowań leków wykorzystuje się całą gamę tworzyw, które cechują się różnorodnymi wartościami współczynników transmisji pary wodnej i tlenu, a ich dobór powinien być uzależniony od specyficznych właściwości substancji, dla której opakowanie jest przeznaczone. I tak, najniższą przepuszczalność dla wody wykazuje polichlorotrifluoroetylen (PCTFE) i polichlorek winylidenu (PVDC) a najwyższą polichlorek winylu (PVC), polietylen tereftalanu (PET), polietylen o niskiej gęstości (LDPE) oraz polistyren (PS). Pośrednią wartością tego parametru z kolei charakteryzuje się polietylen o wysokiej gęstości (HDPE) i polipropylen (PP). Ponadto pewnym rozwiązaniem dla tworzyw o niezadowalających parametrach ochrony przed wilgocią jest stosowanie substancji osuszających, które eliminują parę wodną z przestrzeni nadpowierzchniowej opakowania bezpośredniego na drodze reakcji chemicznych lub adsorpcji. W tym celu wykorzystywane są przede wszystkim żel krzemionkowy, glinki oraz sita molekularne. Z drugiej strony, najlepszym tworzywem dla substancji wrażliwych na obecność tlenu są kopolimer etylen-alkohol winylowy (EVOH) i polichlorek winylidenu (PVDC).

Typowymi opakowaniami bezpośrednimi dla stałych postaci leku są plastikowe butelki i pojemniki wielodawkowe wykonane z HDPE, LDPE, PP lub PET, opatrzone nakrętką lub kapsłem a także torebki oraz opakowania jednodawkowe typu blister, wykonane z folii PET, PVC, PVDC lub PCTFE, zgrzewane z folią aluminiową [7].

3.5.1. Opakowanie bezpośrednie typu blister

Blistry w Europie są najpopularniejszym rodzajem opakowania bezpośredniego dla tabletek, drażetek i kapsulek. Zapewniają one ochronę mechaniczną leku a także zabezpieczają go przed szkodliwym działaniem warunków atmosferycznych oraz kontaminacją, w stopniu zależnym od fizykochemicznych właściwości substancji czynnej. W budowie blistra można wyróżnić sztywny spód, nieprzepuszczalny dla wilgoci i gazów utleniających oraz z przezroczystą warstwą wierzchnią, wykonaną tworzywa sztucznego, w której wytłaczane są gniazda. Termoformowanie lub formowanie na zimno opakowania typu blister, napełnianie tabletkami oraz zgrzewanie ze spodnią warstwą odbywa się w linii technologicznej na automatycznych pakowaczkach [85,91,92].

Opakowaniem bezpośrednim dla dostępnych na rynku tabletek z chlorowodorkiem imidaprilu jest blister z folii typu PVC/PVDC/Al [59]. Sztywną warstwą spodnią tego blistra stanowi trójwarstwowa folia aluminiowa twarda ($MVTR \sim 0.001 \text{ g/m}^2/24\text{h}$), która od zewnątrz pokryta jest lakierem podkładowym z farbą drukarską oraz lakierem ochronnym, od wewnątrz natomiast – lakierem termozgrzewalnym przeznaczonym do zgrzewania z folią PVC/PVDC. Warstwa wierzchnia blistra wykonana jest z bezbarwnego laminatu, w którym warstewka PVC pokryta jest emulsją PVDC,

między którymi znajduje się warstwa adhezyjna. Warstwa PVDC oraz warstwa lakieru termozgrzewalnego pozostają w bezpośrednim kontakcie z postacią leku i dlatego powinny one być z nią kompatybilne pod względem chemicznym i fizycznym. Podstawową funkcją tak wykonanego blistra jest ochrona przed parą wodną, co podyktowane jest podatnością chlorowodoru imidaprilu na degradację zależną od wilgoci. Współczynnik transmisji pary wodnej (*MVTR*) dla folii typu PVC/PVDC (o gramaturze 120 g/m²) w warunkach 40°C i *RH* 75% wynosi 0.1 – 0.2 g/m²/24h, co uzasadnia zastosowanie tego tworzywa do produkcji blisterów dla substancji hydrolabilnych [7,93]. Godnym podkreślenia jest również fakt, iż w badaniach doświadczalnych wykazano, iż gramatura lakieru termozgrzewalnego także może wpłynąć na przepuszczalność pary wodnej przez opakowanie bezpośrednie typu blister, jednakże w stopniu, który w przypadku blistra z folii PVC/PVDC/Al można uznać za nieistotny [94]. Co więcej, warstwa PVDC stanowi dobrą ochronę przed gazami utleniającymi z współczynnikiem transmisji tlenu rzędu 0.02-0.04 cm³/m²/24h w 23°C przy *RH* = 0% [95].

3.6. Kinetyka reakcji rozkładu substancji leczniczej w fazie stałej

Kinetyczny opis reakcji w fazie stałej uwarunkowany jest przebiegiem prostych aktów elementarnych, kombinacją których jest każdy proces chemiczny, odbywający się w układzie *ciało stałe – dowolna faza*. Aktami tymi są:

- właściwa reakcja chemiczna,
- dyfuzja,
- zarodkowanie,
- parowanie i kondensacja,
- topnienie,
- krystalizacja.

Co istotne, ostatnie dwa z wymienionych procesów cząstkowych cechują się stosunkowo dużą szybkością w porównaniu z pozostałymi i z tego względu nie determinują czasu postępu procesu sumarycznego. Stąd systematyka reakcji chemicznych w fazie stałej, oparta o charakter reakcji elementarnych według *Ginstling'a* obejmuje następujące klasy:

- reakcje, których szybkość przemian fizycznych jest na tyle duża, iż nie odgrywa istotnej roli a ich kinetyka uwarunkowana jest przebiegiem reakcji chemicznej,
- reakcje, w których na sieci macierzystej tworzy się gruba warstwa produktu stąd ich przebieg uzależniony jest od dyfuzji reagentów przez tą warstwę,
- reakcje, których szybkość zależy od przebiegu procesów fizycznych, parowania lub kondensacji [96].

Przedstawiona klasyfikacja nie uwzględnia, co prawda reakcji, uzależnionych od szybkości zarodkowania nowej fazy oraz od szybkości przesuwania się strefy reakcyjnej w głąb kryształu macierzystego, tym niemniej podział ten stał się podstawą do rozwoju współczesnej koncepcji modeli kinetycznych reakcji w fazie stałej, która umożliwia ocenę trwałości leku w toku odpowiednich testów. I tak, nadrzędnym celem tego typu analiz jest określenie szybkości, z jaką dana reakcja rozkładu zachodzi, przy uwzględnieniu wpływu czynników środowiskowych takich jak: temperatura, względna wilgotność powietrza czy obecność innych reagentów [3]. Podstawowym narzędziem, wykorzystywanym w ramach wspomnianych badań, do ilościowego ujęcia kinetyki degradacji leku w fazie stałej jest modelowanie matematyczne, które pozwala opisać zmiany stopnia przereagowania substratu, zachodzące trakcie poszczególnych aktów elementarnych, za pomocą adekwatnych równań [97]. I tak, na podstawie opisanych powyżej założeń mechanistycznych rozwinięte zostały modele, obrazujące empiryczne zależności zmian stopnia przereagowania substratu jako funkcji czasu, pozwalające na interpretację danych eksperymentalnych oraz umożliwiających wyznaczenie odpowiednich parametrów kinetycznych reakcji, takich jak stała szybkości (k) czy czas połowicznego rozkładu ($t_{0.5}$). Analiza tych wielkości, z kolei, pozwala jednoznacznie ocenić trwałość leku w warunkach, w których dane eksperymentalne zostały pozyskane. Obecnie istnieje wiele modeli matematycznych, opisujących przebieg reakcji w fazie stałej, które wyrażone są za pomocą równań kinetycznych, mogących przyjąć formę różniczkową

$$f(x) = \frac{1}{k} \cdot \frac{dx}{dt}$$

lub scałkowaną

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

gdzie t określa czas, k jest stałą szybkości reakcji a x jest ułamkiem substancji rozłożonej, określającym stopień przereagowania substancji stałej, wyznaczonym z zależności [3,97]:

$$x = 1 - \left(\frac{c}{c_0}\right)$$

Zestawienie modeli matematycznych, wykorzystywanych do opisu reakcji chemicznych w fazie stałej przedstawiono w TABELI 3.1.

TABELA 3.1.

Matematyczne modele opisujące kinetykę reakcji chemicznych w fazie stałej [7]

Symbol/Mechanizm reakcji	Postać różniczkowa $f(x) = \frac{1}{k} \cdot \frac{dx}{dt}$	Postać scałkowana $f(x) = k \cdot t$
<i>Modele reakcji na granicy faz:</i>		
(F0) Reakcje zerowego rzędu	1	x
(F1) Reakcje pierwszego rzędu	(1 - x)	-ln(1 - x)
(F2) Reakcje drugiego rzędu	(1 - x) ²	(1 - x) ⁻¹ - 1
(F3) Reakcje trzeciego rzędu	(1 - x) ³	$\frac{1}{2}((1 - x)^{-2} - 1)$
<i>Modele wzrostu zarodków:</i>		
(P2) Zależność potęgowa	2 x ^{1/2}	x ^{1/2}
(P3) Zależność potęgowa	3 x ^{2/3}	x ^{1/3}
(P4) Zależność potęgowa	4 x ^{3/4}	x ^{1/4}
(P ₂ ³) Zależność potęgowa	$\frac{2}{3} x^{-1/2}$	x ^{3/2}
(A2) Zależność Avrami-Erofeev (wzrost dwuwymiarowy)	$2(1 - x)[-ln(1 - x)]^{1/2}$	$[-ln(1 - x)]^{1/2}$
(A3) Zależność Avrami-Erofeev (wzrost trójwymiarowy)	$3(1 - x)[-ln(1 - x)]^{2/3}$	$[-ln(1 - x)]^{1/3}$
(A4) Zależność Avrami-Erofeev	$4(1 - x)[-ln(1 - x)]^{3/4}$	$[-ln(1 - x)]^{1/4}$
(B1) Zależność Prout-Tompkins'a	x(1 - x)	ln[x/(1 - x)] + c
<i>Modele dyfuzyjne:</i>		
(D1) Dyfuzja jednowymiarowa	$\frac{1}{2x}$	x ²
(D2) Dyfuzja dwuwymiarowa	$[-ln(1 - x)]^{-1}$	$[(1 - x) \cdot ln(1 - x)] + x$
(D3) Dyfuzja trójwymiarowa (zależność Jander'a)	$\frac{3(1 - x)^{1/2}}{2[1 - (1 - x)^{1/3}]}$	$[1 - (1 - x)^{1/3}]^2$
(D4) Dyfuzja trójwymiarowa (zależność Ginstling-Brouhnshtein)	$\frac{3}{2}[(1 - x)^{1/3}]$	$1 - \frac{2x}{3} - (1 - x)^{2/3}$
<i>Modele kontrakcji wymiarów geometrycznych:</i>		
(R1) Kontrakcja liniowa	1	x
(R2) Kontrakcja powierzchniowa	2(1 - x) ^{1/2}	1 - (1 - x) ^{1/2}
(R3) Kontrakcja objętościowa	3(1 - x) ^{2/3}	1 - (1 - x) ^{1/3}

W ujęciu praktycznym, interpretacja danych doświadczalnych, stanowiących obraz przebiegu danej reakcji rozkładu polega na określeniu typu krzywej, charakteryzującej stopień przereagowania substancji stałej jako funkcji czasu. Ustalenie kinetycznego mechanizmu reakcji, z kolei, związane jest z oceną stopnia dopasowania pozyskanych danych eksperymentalnych do założeń teoretycznych każdego z powyższych modeli matematycznych przy zastosowaniu kryteriów statystycznych. Miarą stopnia dopasowania zmierzonych wielkości do danego modelu jest współczynnik korelacji liniowej *r* wyliczony dla zależności $f(x) = k \cdot t$ [7,97].

3.6.1. Model reakcji pierwszorzędowej

Większość reakcji rozkładu leków w fazie stałej zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszorzędowej. W modelu tym zależność stopnia przereagowania substancji stałej od czasu opisuje krzywa kinetyczna o przebiegu wykładniczym, a więc w toku reakcji następuje eksponentjalny zanik substratu w czasie. W związku z powyższym cechą charakterystyczną dla reakcji zachodzących zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu jest liniowe zmniejszanie się wartości logarytmu naturalnego z chwilowego stężenia substratu w czasie reakcji zgodnie z równaniem:

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

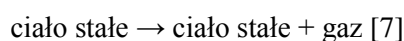
Bardzo częstym zjawiskiem w procesach rozkładu leków jest występowanie dwóch przeciwnie skierowanych procesów pierwszego rzędu, a więc reakcja odwracalna, której stała szybkości K jest sumą stałych szybkości procesów cząstkowych k_1 oraz k_2 . W reakcjach tego typu ustanawia się stan równowagi pomiędzy substratami, kiedy to szybkość reakcji w obu kierunkach jest jednakowa. Scałkowana postać równania kinetycznego, odpowiadająca opisanemu modelowi przyjmuje następującą formę:

$$\ln (c_t - c_e) = \ln (c_0 - c_e) - (k_1 + k_2) \cdot t.$$

gdzie c_e jest stężeniem substratu w stanie równowagi.

3.6.2. Kinetyka *Prout-Tompkins'a*

Model reakcji według *Prout-Tompkins'a* jest charakterystyczny dla procesów zachodzących zgodnie ze schematem:



W modelu tym, zgodnie z teorią powstawania miejsc aktywnych, w początkowym stadium reakcji, określanym mianem indukcji, ilość zarodków nowej fazy jest nieduża i dlatego stopień przereagowania substancji z upływem czasu, podobnie jak przyrost szybkości reakcji w czasie zwiększają się tylko nieznacznie. Jednak w miarę wzrostu zarodków, zaczynają one stykać się i łączyć ze sobą, tworząc nową powierzchnię, będącą zwartym czołem reakcyjnym, które rozprzestrzenia się wewnątrz kryształu macierzystego, powodując intensywny przyrost ilości produktu rozkładu. Produkt ten, z kolei, zaczyna działać katalizująco na przebieg reakcji, warunkując silny wzrost jej szybkości, która w pewnym momencie osiąga swą wartość maksymalną (okres autokatalityczny). W końcowych etapach reakcji natomiast, zmniejszająca się ilość substratów powoduje ponowny spadek jej szybkości. Krzywa kinetyczna zależności stopnia przereagowania substancji stałej jako funkcji czasu,

przedstawiająca przebieg wyżej opisanych procesów ma kształt esowaty (krzywa sigmoidalna) [96] a uzyskanie postaci liniowej umożliwia zastosowanie równania:

$$\log \frac{1-x}{x} = -k \cdot t + \text{const}$$

gdzie x jest ułamkiem substancji rozłożonej, k jest stałą szybkości reakcji a t – czasem [3].

3.6.3. Wpływ temperatury na szybkość reakcji w fazie stałej

Podstawowym czynnikiem, determinującym szybkość reakcji rozkładu w fazie stałej jest temperatura, której wzrost zwiększa energię kinetyczną elementów sieci przestrzennej, warunkując w ten sposób nasiloną ich ruchliwość oraz wzrost szybkości dyfuzji i entropii układu. W związku z powyższym konsekwencją wzrostu temperatury jest zwiększenie ilości efektywnych zderzeń międzycząsteczkowych, prowadzących do utworzenia nowych wiązań chemicznych. Matematycznie, związek pomiędzy stałą szybkości reakcji (k) a temperaturą (T) ujęty jest równaniem *Arrhenius'a*:

$$\ln k = \ln(A) - \frac{E_a}{R \cdot T}$$

gdzie A jest współczynnikiem częstotliwości, opisującym częstość efektywnych zderzeń pomiędzy reagującymi cząsteczkami a E_a jest energią aktywacji reakcji (J/mol), odnoszącą się do wielkości bariery energetycznej pomiędzy substratem a stanem przejściowym. Parametr R , z kolei, określa uniwersalną stałą gazową i wynosi 8.314472 [J/(mol·K)]. Zgodnie z powyższym równaniem, logarymiczna postać funkcji *Arrhenius'a* obrazuje liniową zależność pomiędzy stałą szybkości reakcji a odwrotnością temperatury oraz wyraźnie potwierdza zależny od wzrostu temperatury wzrost szybkości reakcji chemicznych, przy czym związek ten jest tym silniejszy im wyższa jest wartość energii aktywacji. Co istotne, użyteczność zależności *Arrhenius'a* w analizie trwałości leków wynika z faktu, iż przy zachowaniu jej liniowego charakteru, ekstrapolacja wykresu otrzymanego dla danych doświadczalnych pozwala uzyskać informację o szybkości reakcji w dowolnej temperaturze otoczenia. Pamiętać należy jednak, iż zjawiska takie jak: zmiany mechanizmu reakcji, przemiany fazowe, związane ze wzrostem temperatury oraz zmiany wilgotności względnej powietrza mogą powodować utratę liniowości funkcji $\ln k = f\left(\frac{1}{T}\right)$, utrudniając tym samym interpretację danych eksperymentalnych [2,3,7].

Zgodnie z teorią kompleksu przejściowego, wartość energii aktywacji reakcji rozkładu powiązana jest z inną wielkością termodynamiczną, **entalpią aktywacji reakcji** (ΔH^\ddagger) w następujący sposób:

$$E_a = (\Delta H^\ddagger) + R \cdot T$$

Z kolei współczynnik częstotliwości A określa stopień **entropii aktywacji reakcji** (ΔS^\ddagger) zgodnie z zależnością:

$$(\Delta S^\ddagger) = R \cdot (\ln A - \ln \frac{k_B \cdot T}{h})$$

gdzie R jest uniwersalną stałą gazową ($R = 8.3114$ [J/(K·mol)]), T – temperaturą, wyrażoną w K, h - stałą kwantową *Planck'a* ($h = 6.6256 \cdot 10^{-34}$ [J/s]) a k_B - stałą *Boltzman'a* ($1.3805 \cdot 10^{-23}$ [J/K]) [98].

3.6.4. Wpływ wilgotności względnej powietrza na szybkość reakcji w fazie stałej

Kolejnym elementem środowiskowym, wpływającym na postęp procesu degradacji leku w fazie stałej jest woda zawarta w powietrzu atmosferycznym, która determinuje szybkość rozkładu substancji stałej w sposób dwojaki: bezpośrednio jako reagent, powodując hydrolizę, hydratację, izomeryzację i inne reakcje dwucząsteczkowe, lub pośrednio jako substancja zmiękczająca, która adsorbuje na powierzchni kryształu i zwiększa ruchliwości cząsteczek warstw powierzchniowych sieci krystalicznej [76]. W tym drugim przypadku zaadsorbowana woda formuje na powierzchni struktury macierzystej fazę nasyconego roztworu substratu, zapewniając odpowiednie środowisko dla innych reakcji chemicznych. Ponadto pewne cechy strukturalne ciał stałych, takie jak: zdefektowanie sieci krystalicznej oraz obecność regionów o charakterze amorficznym, sprzyjają absorpcji wody do wnętrza kryształu, co indukuje jego degradację o przebiegu charakterystycznym dla reakcji zachodzących w roztworach wodnych [87,96]. Ilościową zależność pomiędzy stałą szybkości reakcji rozkładu a wilgotnością względną powietrza ($RH\%$) opisuje zmodyfikowane równanie *Arrhenius'a*, które przyjmuje następującą postać:

$$\ln k = \ln(A) - \frac{E_a}{R \cdot T} + B \cdot (RH\%)$$

gdzie wyraz B jest współczynnikiem proporcjonalności [99]. Z powyższej zależności wynika, iż szybkość degradacji leku wzrasta wykładniczo wraz ze wzrostem wilgotności względnej powietrza przy stałej temperaturze, a wartość nachylenia powyższej funkcji określa wrażliwość leku na zmiany wilgotności powietrza. Zatem znajomość tego parametru jest istotnym kryterium doboru właściwego opakowania bezpośredniego i może stanowić uzasadnienie dla zastosowania substancji osuszających [7]. Co istotne, liniowość funkcji $\ln k = f(RH\%)$ jest zachowana tylko wówczas, gdy reakcja nie zmienia swego mechanizmu w badanym zakresie wilgotności względnych powietrza oraz nie zachodzą przemiany fazowe [87].

3.7. Metody oceny trwałości leków

Pierwszorzędowym celem analiz trwałości leków jest określenie terminu ich przydatności do użycia oraz wyznaczenie optymalnych warunków przechowywania, przy czym termin przydatności zdefiniowany jest przez czas, w którym następuje 10%-owy spadek zawartości substancji leczniczej w preparacie w stosunku do wartości początkowej. Co istotne, w okresie tym nie powinno również nastąpić obniżenie jakości leku poniżej dolnych granic specyfikacji a jego właściwości organoleptyczne, fizykochemiczne i mikrobiologiczne nie powinny ulec pogorszeniu. Najpopularniejszą metodą, wykorzystywaną do badań kinetyki rozkładu leków jest metoda izotermiczna, w ramach której wyróżnia się następujące kategorie testów przeznaczonych do analiz trwałości:

- badania długoterminowe, w których ocenia się zmiany jakości leku pod wpływem normalnych warunków przechowywania a ich celem jest wyznaczenie okresu przydatności leku do użycia;
- badania przyspieszone, które mają na celu wyznaczenie warunków przechowywania oraz wstępne określenie okresu ważności preparatu;
- badania stresowe, których celem jest identyfikacja produktów rozkładu leku.

W praktyce badania stresowe i badania przyspieszone przeprowadzane są w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza, co istotnie skraca czas analizy. Polegają one na śledzeniu zachodzących w czasie zmian stężenia badanej substancji w analizowanych próbach, które poddawane są działaniu kilku stałych temperatur. Na podstawie zebranych danych doświadczalnych wyznacza się kinetyczny mechanizm reakcji w oparciu o analizę krzywych rozkładu a wybór adekwatnego modelu matematycznego, określającego specyfikę obserwowanych zjawisk umożliwia obliczenie czasu, w którym nastąpi 10%-owy ($t_{0.1}$) lub 50%-owy ($t_{0.5}$) rozkład leku za pomocą odpowiednich przekształceń równania podstawowego [2,99]. W przypadku reakcji autokatalitycznej, którą opisuje zależność *Prout-Tompkins'a* w celu obliczenia $t_{0.1}$ i $t_{0.5}$ stosuje się następujące wzory:

$$t_{0.5} = \frac{b}{k}$$

$$t_{0.1} = \frac{(b - 2.197)}{k}$$

gdzie b stanowi wartość rzędnej dla $t = 0$ z zależności $\ln c_t / (c_0 - c_t) = f(t)$, a k określa stałą szybkości reakcji w danych warunkach analizy.

Natomiast dla reakcji pierwszorzędowej wymienione wyżej parametry oblicza się z następujących zależności:

$$t_{0.5} = \frac{0.693}{k}$$

$$t_{0.1} = \frac{0.1054}{k}$$

gdzie k określa stałą szybkości reakcji w danych warunkach analizy [3].

3.7.1. Kryteria doboru metody analitycznej do badań kinetycznych

Jednym z elementów, zapewniającym właściwe wykonanie analizy trwałości leku jest dobór odpowiedniej i wiarygodnej metody analitycznej, spełniającej wszystkie kryteria przydatności, związane z jej przeznaczeniem. Podstawą w tym zakresie jest zgodność z wytyczną *Food and Drug Administration (FDA)*, według której wybór metody wykorzystywanej do ilościowej oceny stopnia rozkładu leku powinien być dokonany na podstawie właściwości fizykochemicznych, biologicznych oraz cech strukturalnych każdej substancji czynnej, zawartej w produkcie leczniczym a także jej zdolności do dokładnego oznaczenia badanych związków wobec produktów rozkładu i innych składników preparatu oraz wykrycia wszelkich zmian ich właściwości zachodzących zarówno w czasie przechowywania jak i w wyniku stresu, z wykluczeniem wszelkich interferencji [100-102]. Stąd metoda, wykorzystywana do badań kinetycznych, związanych z oceną trwałości leku musi charakteryzować się:

- wysoką selektywnością w stosunku do oznaczanych substancji,
- niskim limitem oznaczalności – do wykrywania zanieczyszczeń i produktów rozkładu, których zawartość w próbce w stosunku do substancji leczniczej może wynosić zaledwie 1 – 4% [3],
- dokładnością i precyzją [76].

Z uwagi na konieczność rozdzielenia substancji leczniczej od jej produktów rozkładu, substancji pomocniczych i zanieczyszczeń, dużą popularność w dziedzinie analizy trwałości leków zyskały sobie metody chromatograficzne, zwłaszcza wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), której dodatkowe zalety to duża dokładność oznaczeń, oznaczalność nawet w stosunku do śladowych ilości substancji, zawartych w próbce oraz możliwość połączenia ze spektrometrem masowym w celu identyfikacji produktów rozkładu [90,100].

3.7.2. Walidacja metody analitycznej

Walidacja jest ostatnim etapem w procesie kwalifikacji opracowanej metody analitycznej do oceny trwałości leku. Polega ona na eksperymentalnym wyznaczeniu parametrów, potwierdzających sprawność i ograniczenia testowanej metody a także na ocenie jej zgodności z wymaganiami, związanymi z wyznaczonym zadaniem analitycznym [103]. Spełnienie przez daną metodę wszystkich kryteriów akceptacji jest warunkiem koniecznym, potwierdzającym wiarygodność wyników uzyskanych w toku badań. Parametrami walidacji charakteryzującymi metodę HPLC są:

- selektywność,
- liniowość,
- precyzja,
- dokładność,
- wykrywalność,
- oznaczalność.

Selektywność jest cechą metody, która gwarantuje możliwość oznaczenia danej substancji wobec innych substancji towarzyszących, obecnych w badanej próbce. Stąd wysoka selektywność jest podstawowym kryterium akceptacji metody do badań kinetycznych, co wynika z dużej złożoności analizowanych próbek (substancja czynna, substancje pomocnicze, zanieczyszczenia) oraz wysokiego stopnia podobieństwa związków w nich zawartych. Dotyczy to przede wszystkim substancji czynnej oraz tworzących się w trakcie jej rozkładu produktów degradacji, które mogą wykazywać jedynie nieznaczne różnice właściwości fizykochemicznych. W przypadku metody HPLC selektywność metody można uzyskać poprzez właściwy dobór kolumny, fazy ruchomej oraz warunków postępowania analitycznego.

Liniowość jest to zdolność do uzyskiwania zależności wprost proporcjonalnej pomiędzy sygnałem analitycznym a stężeniem analitu w próbce, zgodnie z równaniem regresji liniowej $y = ax + b$, którego współczynnik korelacji (r) powinien być bliski jedności a wartość wyrazu b nie powinna istotnie różnić się od zera. Obrazem liniowości metody jest krzywa kalibracyjna $f(c) = Y$, gdzie Y oznacza wartość zmierzonego sygnału.

Precyzja wyraża zgodność wyników pomiarów, uzyskanych po wielokrotnej analizie tej samej próbki (rozrzut wyników) [104]. Miarą precyzji metody jest odchylenie standardowe pojedynczego wyniku S oraz względne odchylenie standardowe RSD lub współczynnik zmienności W_z .

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

$$RDS = \frac{S}{x}; W_z = \frac{S}{x} \cdot 100;$$

gdzie n to liczba oznaczeń, x_i to wynik pojedynczego pomiaru a \bar{x} to wartość średnia wszystkich pomiarów. Dla metody precyzyjnej wartość W_z nie powinna przekraczać 2%.

Dokładność oznacza stopień zgodności pomiędzy wartością rzeczywistą a wartością, stanowiącą wynik oznaczenia, a jej miarą jest wielkość błędu systematycznego. Parametrem, który ilościowo określa poziom dokładności metody jest procent odzysku analitu, który powinien wynosić 95 – 105%.

$$\text{odzysk} = \frac{x_a}{\mu} \cdot 100\%$$

gdzie x_a stanowi oznaczoną ilość analitu w próbce a μ określa rzeczywistą zawartość analitu.

Granica wykrywalności (LOD) jest to najniższe stężenie substancji w próbce, które może być wykryte z zadowalającą dokładnością, z kolei **granica oznaczalności (LOQ)** określa najniższe stężenie analitu, jakie może być ilościowo oznaczone z zadowalającą precyzją i dokładnością.

$$LOD = \frac{3.3 \cdot S_y}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_y}{a}$$

gdzie S_y to odchylenie standardowe ślepej próby a a stanowi nachylenie krzywej kalibracyjnej [105].

3.7.3. Metody oznaczania chlorowodorku imidaprilu – przegląd piśmiennictwa

Z przeglądu piśmiennictwa w zakresie tematyki dotyczącej analizy chemicznej chlorowodorku imidaprilu wynika, iż istnieje wyraźny podział opracowanych technik analitycznych na metody stosowane w celu oceny czystości preparatów farmaceutycznych oraz metody stosowane w badaniach farmakokinetycznych do oznaczenia zawartości tego leku w płynach ustrojowych.

W analizie ilościowej i jakościowej chlorowodorku imidaprilu w preparatach farmaceutycznych oraz w czystej substancji najszerze zastosowanie znalazły metody instrumentalne a wśród nich metody spektrofotometryczne i chromatograficzne. Do dostępnych spektroskopowych metod oznaczania tego leku należy głównie kolorymetria, w której podstawą są reakcje barwne z odpowiednimi odczynnikami. Z kolei z metod chromatograficznych najszerze zastosowanie znalazła technika HPLC. Ponadto, niezwykle istotnym aspektem badań nad wszystkimi lekami z grupy I-ACE, w tym chlorowodorku imidaprilu, jest ich izomeria optyczna, która determinuje aktywność farmakologiczną substancji, przy czym wiadomo, że tylko izomery *S* posiadają aktywność

biologiczną podczas gdy izomery *R* pozostają nieaktywne *in vivo*. Z tego względu w badaniu czystości enancjomerycznej chlorowodorku imidaprilu, wykorzystywane były metody HPLC, cechujące się stereoselektywnością, a zastosowane techniki analityczne obejmowały: HPLC w odwróconych fazach lub derywatyzację z optycznie aktywnym reagentem (bromowodorem L-alanino- β -naftyloamidu) i rozdział na kolumnie z żelu krzemionkowego (HPLC w normalnych fazach). Co więcej, istnieje również metoda bezpośredniego rozdziału enancjomerów chlorowodorku imidaprilu na za pomocą kolumny chiralnej.

Z drugiej strony, z metod wykorzystywanych do ilościowej analizy chlorowodorku imidaprilu w materiale biologicznym w latach 80-tych i na początku lat 90-tych XX wieku najszerszym zastosowaniem cieszyły się metody bioanalityczne. W tym zakresie opracowano między innymi technikę radioimmunologiczną, pozwalającą na oznaczenie imidaprilu obok imidaprilatu zarówno w osoczu jak i w moczu. Pomimo jej bardzo dużej czułości, koszty prowadzenia analiz oraz czasochłonność a także niska specyficzność spowodowały, iż z czasem została ona zastąpiona przez metody chromatograficzne, wśród których zastosowanie znalazła między innymi metoda HPLC z detekcją fluorymetryczną. Aktualnie natomiast, na bardzo szeroką skalę wykorzystywane są hybrydowe metody chromatograficzne a wśród nich LC-MS, GC-MS, które umożliwiają selektywne oznaczenie imidaprilu obok imidaprilatu, przy czym metoda GC-MS, choć dostarcza wiarygodnych wyników w krótkim czasie pojedynczej analizy, to jednak wymaga skomplikowanych procedur obróbki wstępnej, co stanowi jej istotną wadę. Z drugiej strony, w zakresie procesu oznaczenia chlorowodorku imidaprilu w spektrometrze masowym, na uwagę zasługuje możliwość zastosowania zarówno negatywnej jak i pozytywnej jonizacji, co uwarunkowane jest obecnością w strukturze chemicznej tego związku atomów azotu oraz grup karboksylowych, przy czym jonizacja pozytywna zyskała większą popularność w analizie chemicznej omawianego leku. Ponadto, do dostępnych technik jonizacji w spektrometrze masowym należą: jonizacja elektronami, elektrospreji oraz bezpośrednia jonizacja chemiczna [53].

Oznaczenie IMD w preparatach farmaceutycznych i w substancji:

- kinetyczna metoda spektrofotometryczna UV-VIS wykorzystująca reakcję utlenienia chlorowodorku imidaprilu nadmanganianem potasu (VII) w środowisku zasadowym z utworzeniem niebiesko-zielonego produktu [106];
- metoda spektrofotometryczna w zakresie UV-VIS związana z
 - tworzeniem barwnych kompleksów par jonowych z eozyną, kwasem pikrynowym, błękitem metylenowym lub zielenią bromokrezolową,
 - przejściem z przeniesieniem ładunku w obecności 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinonu,
 - reakcją *Hantzsch'a* (z octanem amonowym/acetyloacetone) oraz reakcją z kwasem chromotropowym i chlorowodorkiem 3-metylo-2-benzotiazolo-2-on-hydrazonu, co

uwarunkowane jest uwolnieniem formaldehydu z chlorowodoru imidaprilu w wyniku oksydacji nadjodanem potasu w obecności wodorotlenku sodu;

- oksydacją, wywołaną przez azotan amonu ceru w środowisku kwasowym oraz bromowaniem przy użyciu mieszaniny bromianu i bromku potasu w środowisku kwasowym [107].
- wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych fazach z detekcją spektrofotometryczną w zakresie UV [108],
- wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa sprzężona z densytometrią [109].

Oznaczenie chlorowodoru imidaprilu w preparatach farmaceutycznych i w substancji z rozdzieleniem izomerów optycznych:

- wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych fazach z detekcją UV,
- wysokosprawna chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz z derywatyzacją optycznie czystym, chiralnym reagentem (L-alanylo- β -naftyloamidem),
- wysokosprawna chromatografia cieczowa przy użyciu chiralnych faz stacjonarnych [68].

Oznaczanie chlorowodoru imidaprilu obok innych leków hipotensyjnych (amlodypiny) w preparatach farmaceutycznych:

- wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją PDA [110].

Oznaczanie chlorowodoru imidaprilu obok innych ACE-I:

- wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych fazach z detekcją spektrofotometryczną [109].

Oznaczenie imidaprilu obok imidaprilatu w materiale biologicznym:

- wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fluorometryczną, z zastosowaniem 9-anthryldiazometanu jako czynnika derywatyzującego [111],
- wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas z jonizacją typu elektrosprej (HPLC-ESI-MS/MS) [112],
- metoda radioimmunologiczna [113-116],
- tandemowa spektrometria mas z bezpośrednią jonizacją chemiczną (DCI-MS/MS) z monitorowaniem wybranych reakcji fragmentacji [117],
- chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas z jonizacją elektronami z monitorowaniem wybranych reakcji fragmentacji [70],
- chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrią mas z detekcją typu elektrosprej [118].

Niestety żadna z powyższych metod nie została zaprojektowana w celu prowadzenia badań kinetycznych, ukierunkowanych na ocenę trwałości chlorowodoru imidaprilu.

3.8. Zastosowanie techniki QSPR w analizie trwałości leku

Jak wiadomo, fundamentem dla współczesnego procesu racjonalnego projektowania leków jest analiza zależności struktura-aktywność (*ang. quantitative structure – activity relationship, QSAR*) oraz poszukiwanie korelacji pomiędzy strukturą a właściwościami cząsteczki (*ang. quantitative structure – property relationship, QSPR*). Wymienione metody, wykorzystują techniki modelowania komputerowego, opartego o metody chemioinformatyczne oraz pozwalają przewidzieć właściwości biologiczne i fizykochemiczne cząsteczek na podstawie ich struktury chemicznej. Podstawą teoretyczną tych nowoczesnych technologii jest fakt, iż struktura chemiczna związków organicznych jest swoistego rodzaju kodem, w którym zaszyfrowane są wszystkie ich właściwości biologiczne, chemiczne oraz fizyczne a możliwość odczytania tego kodu pozwoli na szybkie i proste wyznaczenie cech związku tylko na podstawie znajomości samej struktury chemicznej.

Ogromną zaletą technik modelowania komputerowego w kontekście oceny trwałości leków jest sposobność przewidywania w testach przesiewowych parametrów kinetycznych lub termodynamicznych reakcji rozkładu związków z danej grupy pochodnych. Umożliwia to z kolei optymalizację struktury nowych związków już na etapie analiz komputerowych oraz przyspiesza proces badań nad lekiem.

Najważniejszymi elementami analizy QSPR jest dobór odpowiednich deskryptorów, skompletowanie informacji ilościowych o badanym parametrze oraz analiza korelacji pomiędzy nimi. Deskryptor zdefiniowany jest jako funkcja, pozwalająca przypisać cechom strukturalnym, fizykochemicznym lub innym związków chemicznych wartości liczbowe. Obecnie istnieje ogromna liczba deskryptorów. Niektóre spośród nich opisano poniżej:

-
- *Logarytm dziesiętny ze stałej dysocjacji kwasu (pKa)* jest ilościową miarą jego chemicznej mocy, a więc zdolnością do oddawania protonów.
 - *Ilość donorów/akceptorów wodorowych* określa ilość ugrupowań zdolnych do tworzenia mostków wodorowych w kompleksach.
 - *Współczynnik podziału (LogP)* jest stosunkiem stężeń formy niezjonizowanej substancji pomiędzy dwiema fazami.
 - *Współczynnik dystrybucji (LogD)*, czyli to stosunek sum stężeń wszystkich form związku (zjonizowanej i niezjonizowanej) w każdej z faz, zależny od wartości *pH* fazy wodnej.
 - *Refrakcja molowa* wiąże współczynnik załamania światła z objętością cząsteczki i określa wielkość polaryzacji jednego mola substancji w polu elektromagnetycznym.
 - *Polaryzowalność cząsteczkowa* to wielkość wyrażająca zdolność do zaburzenia rozkładu gęstości elektronowej wokół jąder atomowych oraz zmiany geometrii cząsteczek pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego, czego konsekwencją jest tworzenie dipoli elektrycznych.
-

- *Moment dipolowy* jako wektorowa wielkość fizyczna określa wartość iloczynu ładunku i odległości między biegunami w cząsteczce dwubiegunowej.
 - *Liczba wiązań rotowalnych* odnosi się do giętkości cząsteczki i wyraża ilość wiązań pojedynczych pomiędzy atomami ciężkimi, z pominięciem wiązań amidowych oraz wiązań w pierścieniach aromatycznych.
 - *Topologiczna polarna powierzchnia cząsteczki* zdefiniowana jest jako suma polarnych powierzchni *van der Waalsa* atomów w cząsteczce (zwykle tlenów i azotów wraz z odpowiadającymi im wodorami).
 - *Energia desolvatacji grup hydrofobowych/polarnych* jest to zmiana energii układu zachodząca podczas desolvatacji odpowiednich ugrupowań.
 - *Powierzchnia van der Waalsa* jest teoretyczną powierzchnią sferycznych atomów cząsteczki o promieniu równym promieniowi *van der Waalsa*.
 - *Punkt izoelektryczny* określa wartość *pH* roztworu, w którym stężenie jonu obojnaczego osiąga wartość maksymalną a stężenia form: anionowej i kationowej są sobie równe.
 - *Powierzchnia dostępności rozpuszczalnika* jest zewnętrzną powierzchnią cząsteczki, jaka jest dostępna dla cząsteczek rozpuszczalnika.
 - *Objętość molowa*, czyli objętość, jaką zajmuje jeden mol danej substancji w warunkach normalnych.
 - *Parachora* to wielkość fizyczna łącząca w sobie zależność między gęstością i napięciem powierzchniowym cieczy, a jej wielkość jest zależna od poszczególnych atomów, wiązań i ugrupowań atomów [119].
-

Pomimo ogromnego znaczenia w dostępnym piśmiennictwie odnaleziono tylko kilka doniesień, dotyczących analizy powyższych deskryptorów na parametry kinetyczne oraz termodynamiczne degradacji leków. I tak, liniową korelację pomiędzy stałą szybkości reakcji rozkładu w fazie stałej a stałą hydrofobową oraz liczbą π podstawników a także pomiędzy energią aktywacji reakcji a indeksem *Randic'a* odnaleziono dla penicylin. Również dla leków przeciwdrgawkowych pochodnych triazoliny wykazano liniową zależność pomiędzy stałą szybkości rozkładu w fazie stałej a stałą *Hammett'a* [120].

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

ETAP I - TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU W FAZIE STAŁEJ

4.1. Cel badań

Celem badań niniejszej części pracy doktorskiej była analiza i ocena trwałości chemicznej chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej:

- w postaci czystej substancji,
- w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu oraz
- w preparacie farmaceutycznym.

Jak wiadomo, kompleksowy charakter procesu związanego z badaniem trwałości każdej substancji leczniczej sprawia, iż obejmuje on szereg zagadnień. Stąd szczegółowe cele poszczególnych problemów badawczych dotyczyły:

1. Doboru metody analitycznej do badania trwałości chlorowodorku imidaprilu spośród:
 - a. metody spektrofotometrycznej UV przy różnych technikach pomiaru (A , D^1 , D^2 , D^3),
 - b. wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV.
2. Walidacji wybranej metody analitycznej.
3. Oceny trwałości chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji 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 ($T = 363\text{ K}$) i podwyższonej wilgotności powietrza ($RH = 25.0\% - 76.4\%$).

W zakresie tym uwzględniono następujące kwestie badawcze:

- ustalenie kinetycznego mechanizmu reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu na podstawie krzywych rozkładu metodą *model-fitting*,
- wyznaczenie stałych szybkości reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w wyżej wymienionych warunkach,
- wyznaczenie prostoliniowej zależności, określającej wpływ różnych wilgotności względnych powietrza na trwałość chlorowodorku imidaprilu,

- wyznaczenie zależności *Arrhenius'a* oraz parametrów termodynamicznych reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu, zachodzącej w warunkach stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76.4\%$ i $RH = 0.0\%$) oraz podwyższonej temperatury,
 - wyznaczenie parametrów dla zmodyfikowanego równania *Arrhenius'a*, określającego związek trwałości chlorowodorku imidaprilu z wartością temperatury i wilgotności względnej powietrza,
 - ustalenie miejsca badanej substancji w hierarchii trwałości leków z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny na podstawie danych doświadczalnych,
 - identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu, w reakcji zachodzącej w warunkach stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76.4\%$ oraz $RH = 0.0\%$) i podwyższonej temperatury metodą HPLC-MS,
 - określenie modelowego mechanizmu rozkładu badanego związku w warunkach stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76.4\%$ oraz $RH = 0.0\%$) i podwyższonej temperatury.
4. Określenie wpływu substancji pomocniczych na trwałość chlorowodorku imidaprilu w warunkach stałej, podwyższonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 25.0\% - 76.4\%$) oraz podwyższonej temperatury ($T = 318\text{ K}$).

W zakresie tym uwzględniono następujące kwestie badawcze:

- ustalenie kinetycznego mechanizmu rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej na podstawie krzywych rozkładu metodą *model-fitting*,
- wyznaczenie stałych szybkości reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w wyżej wymienionych warunkach,
- porównanie parametrów reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w obecności wybranej substancji pomocniczej z parametrami, wyznaczonymi dla reakcji rozkładu czystej substancji leczniczej w tych samych warunkach,
- ustalenie wpływu zwiększającej się wilgotności względnej powietrza na rozkład chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu,
- identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu w warunkach stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76.4\%$) i podwyższonej temperatury,
- określenie modelowego mechanizmu rozkładu badanego związku w warunkach stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76.4\%$) i w podwyższonej temperatury w obecności stearynianu magnezu.

5. Ocena trwałości chlorowodorku imidaprilu w postaci farmaceutycznej:
- w tabletkach w opakowaniu handlowym,
 - w tabletkach bez opakowania handlowego,
 - w tabletkach rozdzielonej na połówkę bez opakowania handlowego.

W zakresie tym uwzględniono następujące kwestie badawcze:

- ustalenie kinetycznego mechanizmu rozkładu chlorowodorku imidaprilu w preparacie handlowym na podstawie krzywych rozkładu metodą *model-fiting*,
- określenie stałych szybkości reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach, przechowywanych zgodnie z wyżej wymienionymi wytycznymi w stałej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76.4\%$) oraz podwyższonej temperaturze,
- porównanie uzyskanych wartości stałych szybkości reakcji rozkładu dla różnych metod przechowywania,
- wyznaczenie zależności *Arrhenius'a* oraz parametrów termodynamicznych dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach, przechowywanych według powyższych założeń.

Wykonana w ten sposób analiza pozwoli określić wpływ procesu produkcyjnego na trwałość chlorowodorku imidaprilu, wpływ opakowania bezpośredniego na trwałość postaci farmaceutycznej oraz wpływ sposobu przechowywania na trwałość tabletek chlorowodorku imidaprilu.

6. Porównanie parametrów kinetycznych oraz termodynamicznych reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu z danymi dostępnymi dla innych inhibitorów konwertazy angiotensyny.
7. Określenie za pomocą modelowania komputerowego metodą QSPR zależności struktury i właściwości fizykochemicznych cząsteczek inhibitorów konwertazy angiotensyny od ich trwałości.

Wyznaczone cele badawcze osiągnięto w toku testów kinetycznych, analizy ilościowej, analizy matematycznej oraz analizy statystycznej uzyskanych wyników.

4.2. Materiały do badań i odczynniki

4.2.1 Materiały

- chlorowodorek imidaprilu, Jelfa Pharmaceutical S.A. Jelenia Góra, seria 0710004942,
- tabletki Tanatril 10 mg, Jelfa Pharmaceutical S.A. Jelenia Góra, seria 021107,
- stearnian magnezu, Biofarm Sp. z o.o.,
- chlorowodorek oksymetazoliny, Sigma-Aldrich, Poznań,
- benzokaina, Sigma-Aldrich, Poznań,

4.2.2. Odczynniki

- acetonitryl, jakoś HPLC, Merck, Darmstadt, Niemcy,
- metanol, cz.d.a., POCh S.A. Gliwice,
- diwodorofosforan (V) potasu (KH_2PO_4), POCh S.A., Gliwice,
- kwas orto-fosforowy 95%, POCh S.A., Gliwice,
- woda destylowana,
- jodek sodu, POCh S.A., Gliwice,
- bromek sodu, POCh S.A., Gliwice,
- jodek potasu, POCh S.A., Gliwice,
- azotan sodu, POCh S.A., Gliwice,
- chlorek sodu, POCh S.A., Gliwice,
- bromek potasu, POCh S.A., Gliwice .

4.3. Aparatura i sprzęt

4.3.1. 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,
- wysokosprawny chromatograf cieczowy Waters Alliance wyposażony w detektor z matrycą diodową PDA996 sprzężony ze spektrometrem mas Single Quadruple Mass Detector Waters Micromass ZQ 2000.

4.3.2. Sprzęt pomocniczy

- komory cieplne KBC-125W, WAMED,
- płuczka ultradźwiękowa,
- waga analityczna Satorius Extend ED 124S, Satorius,
- pHmetr Toledo MP225, Mettler,
- sączek szklany ze szkła spiekanego o średnicy porów 0,22 μm , Millipore,
- sączki ilościowe twarde 390, Munktell,
- laboratoryjny sprzęt szklany (kolbki, pipety, naczynka wagowe).

4.4. Metody analityczne i kinetyczne

4.4.1. Metoda spektrofotometryczna UV

Analizę metodą spektrofotometryczną wykonano z zastosowaniem różnych technik (A, D¹, D², D³) przy zachowaniu następujących parametrów pracy spektrofotometru:

- szerokość spektralna wiązki promieniowania wychodzącego z monochromatora: 1.0 nm,
- szybkość wykonywania widma: 240 nm/min,
- przyrost długości fali ($\Delta\lambda$): 1.0 nm.

Widma spektrofotometryczne zależności absorbancji (A), pierwszej (D¹), drugiej (D²) i trzeciej (D³) pochodnej jako funkcji długości fali zarejestrowano w zakresie 200 nm do 280 nm w warstwie 1 cm.

4.4.2. Metoda RP-HPLC z detekcją UV

Analizę kinetyki rozkładu chlorowodorku imidaprilu przeprowadzono metodą RP-HPLC z detekcją UV przy zastosowaniu następujących parametrów rozdziału:

Metoda RP-HPLC nr 1: Analiza trwałości chlorowodorku imidaprilu w substancji

- faza stacjonarna: kolumna chromatograficzna LiChroCART ® 250-4 HPLC-Cradridge, LiChrospher ® 100 RP-18 (5 μ m), o wymiarach 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt)
- faza ruchoma: acetonitryl – metanol – bufor fosforanowy 0.035 mol/l pH 2.0 (60:10:30 v/v/v),
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1.0 ml/min,
- długość fali detektora: 218 nm,
- temperatura badań: niekontrolowana,
- wzorzec wewnętrzny: metanolewy roztwór chlorowodorku oksymetazoliny 0.2 mg/ml
- objętość nastrzyku: 20 μ l.

Metoda RP-HPLC nr 2: Identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w RH = 76.4%

- kolumna chromatograficzna LiChroCART ® 250-4 HPLC-Cradridge, LiChrospher ® 100 RP-18 (5 μ m), o wymiarach 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt),
- faza ruchoma: acetonitryl – bufor fosforanowy 0.035 mol/l o pH 2.0 (30:70 v/v),
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1.2 ml/min,
- długość fali detektora: 218 nm,
- temperatura badań: niekontrolowana,
- wzorzec wewnętrzny: metanolewy roztwór benzokainy o stężeniu 0.2 mg/ml,
- objętość nastrzyku: 20 μ l.

Metoda RP-HPLC nr 3: Analiza trwałości chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu oraz w tabletkach

- faza stacjonarna: kolumna Hypersil MOS (5 μm), Merck Darmstadt o wymiarach 250 mm x 4 mm,
- faza ruchoma: acetonitryl – bufor fosforanowy 0.035 mol/L o pH 2.0 (50:50 v/v),
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1.5 ml/min,
- długość fali detektora: 218 nm,
- temperatura badań: niekontrolowana,
- wzorzec wewnętrzny: metanolowy roztwór chlorowodorku oksymetazoliny 0.2 mg/ml,
- objętość nastrzyku: 20 μl .

4.4.3. Metoda HPLC-MS

Identyfikację produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu przeprowadzono metodą HPLC-MS przy zachowaniu następujących warunków analitycznych:

- kolumna chromatograficzna LiChroCART® 250-4 HPLC-Cradridge, LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm), o wymiarach 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt),
- faza ruchoma: metanol – woda – formaldehyd (49:50:0.5 v/v/v),
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 0.5 ml/min,
- objętość nastrzyku: 100 μl ,
- zakres rejestrowanych mas: od $m/z = 150$ do $m/z = 1000$, lub od $m/z = 150$ do $m/z = 600$,
- metoda jonizacji elektrorozpylania; jonizacja pozytywna i negatywna,
- temperatura badań:
 - 303 K dla próbek eksponowanych na RH 76.4%
 - 298 K dla próbek eksponowanych na RH 0.0 %

Badania zostały wykonane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

4.4.4. Izotermiczna metoda badania kinetyki rozkładu leku

Badanie kinetyki rozkładu chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej wykonano za pomocą metody izotermicznej w podwyższonej ($RH > 0\%$) oraz obniżonej ($RH = 0.0\%$) wilgotności względnej powietrza. W celu uzyskania odpowiednich warunków analizy zaakceptowano następującą metodykę postępowania:

- wymaganą wartość temperatury zapewniono umieszczając badane próbki w komorach cieplnych, które gwarantowały utrzymanie stałych warunków termicznych w czasie testu z dokładnością ± 1 K;

- wymaganą wartość wilgotności względnej powietrza ($RH > 0\%$) zapewniono umieszczając badane próbki w eksykatorach zawierających nasycone roztwory wymienionych poniżej soli nieorganicznych:
 - jodek sodu – $RH = 25.0\%$,
 - bromek sodu – $RH = 50.9\%$,
 - jodek potasu – $RH = 60.5\%$,
 - azotan sodu – $RH = 66.5\%$,
 - chlorek sodu – $RH = 76.4\%$.

Zamknięte eksykatory z próbkami badanymi umieszczano w komorach cieplnych nagranych do określonej temperatury testu.

- Wymaganą wartość obniżonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 0.0\%$) zapewniono umieszczając badane próbki w łaźniach piaskowych, wkładanych bezpośrednio do nagranych do odpowiedniej temperatury komór cieplnych.
- Puste eksykatory, zawierające sole organiczne oraz łaźnie piaskowe umieszczano każdorazowo w nagranych do określonej temperatury komorach cieplnych 24 godziny przed rozpoczęciem testu w celu zapewnienia odpowiednich warunków termicznych podczas badania.

4.4.5. Metoda QSPR

Poszukiwanie korelacji pomiędzy strukturą a właściwościami cząsteczki inhibitora konwertazy angiotensyny przeprowadzono metodą QSPR (*ang. quantitative structure – property relationship*). Za pomocą:

- oprogramowania komputerowego Marvin Sketch firmy ChemAxon Kft, ACD/Labs; ChemSketch firmy Advanced Chemistry Development, Inc; ALOGPS 2.1 firmy Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org/lab/alogps/> oraz
- baz danych: ChemSpider - baza Royal Society of Chemistry, Wielka Brytania, <http://www.chemspider.com/>; ZINC Database - baza University of California San Francisco, USA <http://zinc.docking.org/>

wyznaczono następujące deskrytory strukturalne: rozpuszczalność w wodzie, temperaturę topnienia, wykładnik stałej dysocjacji pKa , ilość donorów wodorowych, ilość akceptorów wodorowych, współczynnik dystrybucji $LogD$ (pH 5.5), $LogD$ (pH 7.4), współczynnik podziału $LogP$, refrakcję molową, polaryzowalność cząsteczkową, moment dipolowy, ilość wiązań rotowalnych, topologiczną polarną powierzchnię cząsteczki, energię desolvatacji grup hydrofobowych, energię desolvatacji grup polarnych, punkt izoelektryczny, powierzchnię *van der Waalsa*, powierzchnię dostępności rozpuszczalnika, objętość molową oraz parachorę.

Przeanalizowano wpływ powyższych cech budowy cząsteczki na parametry stabilnościowe I-ACE, takie jak: stała szybkości reakcji rozkładu w $T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$ oraz energia aktywacji reakcji.

4.4.6. Obliczenia

Kalkulacje matematyczne oraz analiza statystyczna wyników zostały przeprowadzone za pomocą oprogramowania Excel 2000 oraz Statistica. Badanie metodą QSPR przeprowadzono wykorzystując programy komputerowe: Marvin Sketch firmy ChemAxon Kft, ACD/Labs; ChemSketch firmy Advanced Chemistry Development, Inc; ALOGPS 2.1 firmy Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org/lab/alogps> oraz Excel 2000.

4.5. Procedury

4.5.1. Dobór metody analitycznej

Przegląd piśmiennictwa pozwolił stwierdzić, iż w analizie chemicznej chlorowodorku imidaprilu stosowane były dwie metody: spektrofotometryczna UV oraz RP-HPLC. Nie określono jednak przydatności wymienionych metod do oceny trwałości tej substancji leczniczej w kontekście badań kinetycznych. Stąd podstawowym problemem badawczym, związanym z oceną trwałości chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej był dobór i opracowanie odpowiedniej metody pomiarowej.

Metoda spektrofotometryczna UV

Procedura nr 4.1: Przygotowanie roztworu do badań i dobór analitycznej długości fali

Odważano dokładnie na wadze analitycznej (0.0100 g) chlorowodorku imidaprilu, przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o poj. 50 ml, dodano 15 ml metanolu, wytrząsano do rozpuszczenia, uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 50.0 ml (roztwór A). 1.0 ml roztworu A uzupełniono metanolem do 25.0 ml (roztwór A_1).

Wykreślono widma zależności absorbancji (A), pierwszej (D^1), drugiej (D^2) i trzeciej (D^3) pochodnej jako funkcji długości fali. Na podstawie uzyskanych widm dokonano doboru analitycznej długości fali oraz techniki pomiarowej.

Metoda RP-HPLC

Procedura nr 4.2: Przygotowanie fazy ruchomej

a) *Metoda RP-HPLC nr 1*

W celu przygotowania fazy ruchomej do badań kinetycznych chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji zmieszano: acetonitryl, metanol, bufor fosforanowy (0.035 mol/l, $pH = 2.0$) w proporcji 60:10:30 v/v/v.

b) *Metoda RP-HPLC nr 2*

W celu przygotowania fazy ruchomej do badań kinetycznych, dotyczących analizy kinetyki tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu zmieszano: acetonitryl i bufor fosforanowy (0.035 mol/l, $pH 2.0$) w proporcji 70:30 v/v.

c) *Metoda RP-HPLC nr 3*

W celu przygotowania fazy ruchomej do badań kinetycznych chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu oraz w tabletkach zmieszano: acetonitryl i bufor fosforanowy (0.035 mol/l, $pH 2.0$) w proporcji 50:50 v/v.

Otrzymane roztwory sączono przez sączek ze szkła spiekanego o średnicy porów 0.22 μm i odgazowywano w płuczce ultradźwiękowej przez 15 minut.

Procedura nr 4.3: Przygotowanie buforu fosforanowego, $pH = 2.0$ (0.035 mol/l) do fazy ruchomej

Odważono dokładnie 0.0681 g diwodorofosforanu potasu i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o poj. 500 ml, dodano 400 ml wody destylowanej, wytrząsano do rozpuszczenia. Otrzymany roztwór doprowadzono 85% kwasem orto-fosforowym do $pH = 2.0$ i uzupełniono wodą destylowaną do objętości 500 ml.

Procedura nr 4.4: Przygotowanie wzorca wewnętrznego do analizy metodą RP-HPLC nr 1 oraz 3

Odważono dokładnie 0.0200 g chlorowodorku oksymetazoliny do kolbki miarowej o poj. 100 ml, dodano 50 ml metanolu i wytrząsano 15 minut, uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 100.0 ml (roztwór Wz₁).

Procedura nr 4.5: Przygotowanie wzorca wewnętrznego do analizy metodą RP-HPLC nr 2

Odważono dokładnie 0.0200 g benzokainy do kolbki miarowej o poj. 100 ml, dodano 50 ml metanolu i wytrząsano 15 minut, uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 100.0 ml (roztwór Wz₂).

4.5.2. Walidacja metod analitycznych

Metoda spektrofotometryczna UV

Procedura nr 4.6: Selektywność

Selektywność metody spektrofotometrycznej UV oceniono za pomocą pilotażowego badania kinetycznego ($T = 363 \text{ K}$, $RH 76.4 \%$, $t = 70 \text{ h}$, $n = 9$), zgodnie z *Procedurami nr 4.10 – 4.12*.

W celu dokonania pomiaru zawartości chlorowodorku imidaprilu przygotowano roztwór A zgodnie z *Procedurą nr 4.12*, pobrano 0.5 ml i uzupełniono do 10.0 ml metanolem. Zarejestrowano widma UV.

Metoda RP-HPLC

Procedura nr 4.7: Selektywność

Selektywność metody RP-HPLC została oceniona zgodnie z następującymi procedurami:

- *Procedura nr 4.10 - 4.14 dla Metody RP-HPLC nr 1*, wykorzystanej do analizy trwałości chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji;
- *Procedura nr 4.10 - 4.14 dla Metody RP-HPLC nr 2*, wykorzystanej do identyfikacji produktów rozkładu badanego leku;
- *Procedura 4.16 - 4.23 dla Metody RP-HPLC nr 3*, wykorzystanej do analizy trwałości chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu oraz w tabletkach.

Procedura nr 4.8: Liniowość

Odważano dokładnie (0.0200 g) chlorowodorku imidaprilu, przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o poj. 50 ml. Rozpuszczano w 20 ml metanolu i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 50.0 ml (roztwór A). Odmierzono po 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ml roztworu A i uzupełniono metanolem do 10.0 ml (roztwór A₁). Otrzymano metanolewe roztwory chlorowodorku imidaprilu o stężeniach 0.004, 0.008, 0.012, 0.016, 0.020, 0.024, 0.028, 0.032, 0.036 oraz 0.040%. Sporządzono roztwór Wz₁ zgodnie z *Procedurą nr 4.4 dla Metody RP-HPLC nr 1 i 3* oraz roztwór Wz₂ zgodnie z *Procedurą nr 4.5 dla Metody RP-HPLC nr 2*.

Do 1.0 ml roztworów A₁ dodano 0.5 ml roztworu Wz₁ lub Wz₂ i zmieszano (roztwory A₂). Roztwory A₂ nanoszono na kolumnę chromatograficzną w ilości 20 µl i zarejestrowano chromatogramy w trzech powtórzeniach. Wyznaczono krzywe wzorcowe chlorowodorku imidaprilu.

Procedura nr 4.9: Precyzja i dokładność

Precyzję metody RP-HPLC określono na podstawie obliczonej wartości Wz natomiast dokładność oszacowano na podstawie *odzysku* [%]. Odpowiednie parametry walidacji wyznaczone zostały zgodnie z poniższym postępowaniem, stosując wzory zamieszczone w ROZDZIALE 3.7.2. *Walidacja metody analitycznej* (str. 61).

Sporządzono roztwory chlorowodorku imidaprilu w metanolu o różnych stężeniach.

Roztwór o stężeniu 0.040% wykorzystano jako roztwór porównawczy. Dla każdego stężenia przygotowano 6 – 8 prób mieszając 1.0 ml odpowiedniego roztworu chlorowodorku imidaprilu z 0.5 ml odpowiedniego roztworu wzorca wewnętrznego.

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

$$c [\%] = \frac{P_{IMD}/P_{IS}}{P^*_{IMD}/P_{IS}} \cdot c^* [\%] \cdot \frac{V}{100} \cdot \frac{M}{m} \cdot \frac{100}{z}$$

gdzie $P [-]$ to pola powierzchni pod pikami chromatogramu odpowiednio roztworu chlorowodorku imidaprilu badanego (IMD), wzorcowego ($*IMD$) oraz wzorca wewnętrznego (IS), $c^* [\%]$ to stężenie wzorcowe analitu, V stanowi współczynnik rozcieńczeń, m to odważka a z jest wartością rzeczywistą.

4.5.3. Badanie trwałości chlorowodorku imidaprilu w substancji

Procedura nr 4.10: Przygotowanie próbek czystego chlorowodorku imidaprilu do analizy trwałości

Odważono dokładnie 0.0100 g substancji badanej (chlorowodorku imidaprilu) do fiolek szklanych ze szkła oranżowego o pojemności 5 ml.

Procedura nr 4.11: Wykonanie testu kinetycznego dla czystego chlorowodorku imidaprilu

Testy kinetyczne wykonano zgodnie z założeniami *Izotermicznej metody badania kinetyki rozkładu leku* scharakteryzowanej w ROZDZIALE 4.4.4 (str. 72). Dokładną specyfikację warunków testowych przedstawiono w TABELI 4.1.

TABELA 4.1.

Ocena trwałości chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji – specyfikacja warunków testowych

Cel analizy	Temperatura [K]	Wilgotność względna powietrza [%]
<i>Ocena wpływu zmian RH% na trwałość chlorowodorku imidaprilu w podwyższonej temperaturze</i>		25.0
	363	50.9
		60.5
		66.5
		76.4
<i>Ocena wpływu zmian temperatury na trwałość chlorowodorku imidaprilu przy podwyższonej RH%</i>	343	76.4
	348	
	353	
	358	
	363	
<i>Ocena wpływu zmian temperatury na trwałość chlorowodorku imidaprilu w warunkach suchego powietrza</i>	363	0
	368	
	373	
	378	
	383	

Czas ogrzewania kolejnych próbek, przygotowanych zgodnie z *Procedurą nr 4.10* uzależniono od szybkości rozkładu badanej substancji. Próbki po wyjęciu z komory cieplnej chłodzono do temperatury pokojowej.

Procedura nr 4.12: Przygotowanie próbki do analizy ilościowej

Zawartość każdej fiołki, poddanej testom kinetycznym przenoszono ilościowo do kolbki miarowej, używając metanolu jako rozpuszczalnika. Zawartość kolby wytrząsano przez 10 minut, po czym uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 25.0 ml (roztwór A).

Procedura nr 4.13: Przygotowanie roztworu substancji porównawczej do analizy ilościowej

Odważono dokładnie 0.0100 g substancji porównawczej (chlorowodorku imidaprilu) do kolbki miarowej o poj. 25 ml, dodano 20 ml metanolu i wytrząsano przez 15 minut, uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 25.0 ml (roztwór B).

Procedura nr 4.14: Wykonanie analizy ilościowej metodą RP-HPLC nr 1 i 2

Do 1.0 ml roztworu A i B przygotowanych zgodnie z *Procedurami nr 4.12 i 4.13* dodano po 0.5 ml roztworu Wz, przygotowanego zgodnie z *Procedurą nr 4.4* lub *4.5* (roztwory A₁ i B₁).

Roztwory A₁ i B₁ nanoszono na kolumnę chromatograficzną w ilości 20 µl. Zarejestrowano chromatogramy (RYCINA 4.4, 4.21, 4.35). Wartość stężenia oznaczonego obliczono ze wzoru podanego w *Procedurze nr 4.9* (str. 77).

Procedura nr 4.15: Przygotowanie prób do analizy jakościowej HPLC-MS

Odważono dokładnie 0.0100 g substancji porównawczej (chlorowodorku imidaprilu) do kolby miarowej o pojemności 25 ml, dodano 15 ml metanolu i wytrząsano do rozpuszczenia, a następnie uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 25.0 ml (roztwór A).

Do fiołki szklanej o pojemności 5 ml odważono dokładnie 0.0100 g chlorowodorku imidaprilu i ogrzewano w warunkach $T = 363 \text{ K}$, $RH 76.4\%$ oraz w warunkach $T = 378 \text{ K}$, $RH = 0.0\%$. Rozłożoną próbkę wyjęto z komory cieplnej, ochłodzono do temperatury pokojowej i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej stosując metanol jako rozpuszczalnik. Następnie wytrząsano zawartość kolbki przez 15 minut i uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem do 25.0 ml (roztwór B).

Roztwór B zmieszano i poddano analizie HPLC-MS zgodnie z metodą, opisaną w ROZDZIALE 4.4.3. *Metoda HPLC-MS* (str. 72).

4.5.4. Badanie trwałości chlorowodorku imidaprilu w obecności substancji pomocniczej

Procedura nr 4.16: Przygotowanie mieszaniny modelowej chlorowodorku imidaprilu ze stearynianem magnezu

Mieszaninę modelową chlorowodorku imidaprilu i stearynianu magnezu przygotowano w stosunku wagowym 1:1 (w/w). Odważono dokładnie 0.500 g chlorowodorku imidaprilu oraz 0.500 g stearynianu magnezu i przeniesiono ilościowo do moździerza porcelanowego. Uzyskaną masę homogenizowano przez 15 minut za pomocą pistla.

Procedura nr 4.17: Wykonanie testu kinetycznego dla przygotowanej mieszaniny modelowej

Do fiolek szklanych o poj. 5 ml odważono 0.0200 g mieszaniny modelowej przygotowanej zgodnie z *Procedurą nr 4.16*. Testy kinetyczne wykonano zgodnie z założeniami *Izotermicznej metody badania kinetyki rozkładu leku* scharakteryzowanej w ROZDZIALE 4.4.4 (str. 72). Dokładną specyfikację testowych przedstawiono w TABELI 4.2.

TABELA 4.2.

Ocena trwałości chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu 1:1 (w/w) w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza – specyfikacja warunków testowych

Cel analizy	Temperatura [K]	Wilgotność względna powietrza [%]
<i>Ocena wpływu RH% na trwałość chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu</i>	318	50.9
		60.5
		66.5
		76.4

Czas ogrzewania kolejnych próbek uzależniono od szybkości rozkładu badanej substancji. Po wyjęciu z komory cieplnej próbki chłodzono do temperatury pokojowej.

Procedura nr 4.18: Przygotowanie próbki mieszaniny modelowej do analizy ilościowej

Zawartość każdej fiołki poddanej testom kinetycznym zgodnie z *Procedurą nr 4.17* przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o poj. 50 ml i dodano 25.0 ml metanolu, wytrząsano 30 minut, przesączono przez twardy sączek ilościowy 390 (Munktell) (roztwór A).

Roztwór substancji porównawczej przygotowano zgodnie z *Procedurą nr 4.13* (Roztwór B).

Procedura nr 4.19: Wykonanie analizy ilościowej metodą RP-HPLC nr 3 dla mieszanin modelowych

Do 1.0 ml roztworu A i B przygotowanych zgodnie z *Procedurą nr 4.13* i 4.18 dodano po 0.5 ml roztworu W_{z1}, przygotowanego zgodnie z *Procedurą nr 4.4* i wymieszano (Roztwory A₁ i B₁).

Roztwory A₁ i B₁ nanoszono na kolumnę chromatograficzną w ilości 20 µl. Zarejestrowano chromatogramy (RYCINA 4.40). Wartość stężenia oznaczonego obliczono ze wzoru podanego przy *Procedurze nr 4.9* (str. 77).

4.5.5. Badanie trwałości chlorowodorku imidaprilu w postaci farmaceutycznej

Procedura nr 4.20: Przygotowanie próbek tabletek do testów kinetycznych

W szklanych fiolkach ze szkła oranżowego umieszczono odpowiednio:

- wyjętą z blistra tabletkę chlorowodorku imidaprilu (w całości),
- tabletkę chlorowodorku imidaprilu przełamaną na dwie połówki,
- tabletkę chlorowodorku imidaprilu w blistrze (w całości).

Procedura nr 4.21: Wykonanie testu kinetycznego dla tabletek

Testy kinetyczne wykonano zgodnie z założeniami *Izotermicznej metody badania kinetyki rozkładu leku* scharakteryzowanej w ROZDZIALE 4.4.4 (str. 72). Dokładną specyfikację warunków testowych przedstawiono w TABELI 4.3.

TABELA 4.3.

Ocena trwałości chlorowodorku imidaprilu w postaci farmaceutycznej w warunkach podwyższonej temperatury oraz wilgotności względnej powietrza – specyfikacja warunków testowych

Cel analizy	Temperatura [K]	Wilgotność względna powietrza [%]
<i>Ocena wpływ temperatury na trwałość chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przy podwyższonej RH%</i>	313	76.4
	318	
	323	
	333	

Czas ogrzewania kolejnych próbek przygotowanych zgodnie z *Procedurą nr 4.20* uzależniono od szybkości rozkładu badanej substancji. Po wyjęciu z komory cieplnej próbki chłodzono do temperatury pokojowej.

Procedura nr 4.22: Przygotowanie próbek z tabletkami do analizy ilościowej metodą RP-HPLC nr 3

Zawartość każdej fiołki, poddanej testom kinetycznym przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o poj. 50 ml, dodano 3.0 ml wody destylowanej a po rozpadzie tabletki dodano 22.0 ml metanolu, wytrząsano 15 minut, sączono przez twardy sączek ilościowy 390 (Munktell) (roztwór A).

Roztwór substancji porównawczej przygotowano zgodnie z *Procedurą nr 4.13* (Roztwór B).

Procedura nr 4.23: Wykonanie analizy ilościowej dla tabletek metodą RP-HPLC nr 3

Do 1.0 ml roztworu A i B przygotowanych zgodnie z *Procedurą nr 4.13* i 4.22 dodano po 0.5 ml roztworu W_{Z1}, przygotowanego zgodnie z *Procedurą nr 4.4* i wymieszano (Roztwory A₁ i B₁).

Roztwory A₁ i B₁ nanoszono na kolumnę chromatograficzną w ilości 20 µl. Zarejestrowano chromatogramy (RYCINA 4.50). Zawartość chlorowodorku imidaprilu w badanych próbkach obliczono ze wzoru podanego przy *Procedurze nr 4.9* (str. 77).

Procedura nr 4.24: Określenie średniej masy tabletki

Zważono pojedynczo dokładnie 28 tabletek preparatu Tanatril 10 mg i obliczono średnią masę tabletki.

4.5.6. Analiza QSPR

Procedura nr 4.25: Wykonanie analizy QSPR

Zebrano dane literaturowe, odnośnie trwałości następujących I-ACE: chinapril, enalapril, lisinopril, moeksipril, benazepril, cilazapril w warunkach $T = 363$ K, RH 76.4%. Przeanalizowano ich parametry kinetyczne i termodynamiczne reakcji rozkładu, w tym stałą szybkości degradacji oraz energię aktywacji reakcji. Uzyskane dane zestawiono z danymi obliczonymi dla chlorowodorku imidaprilu.

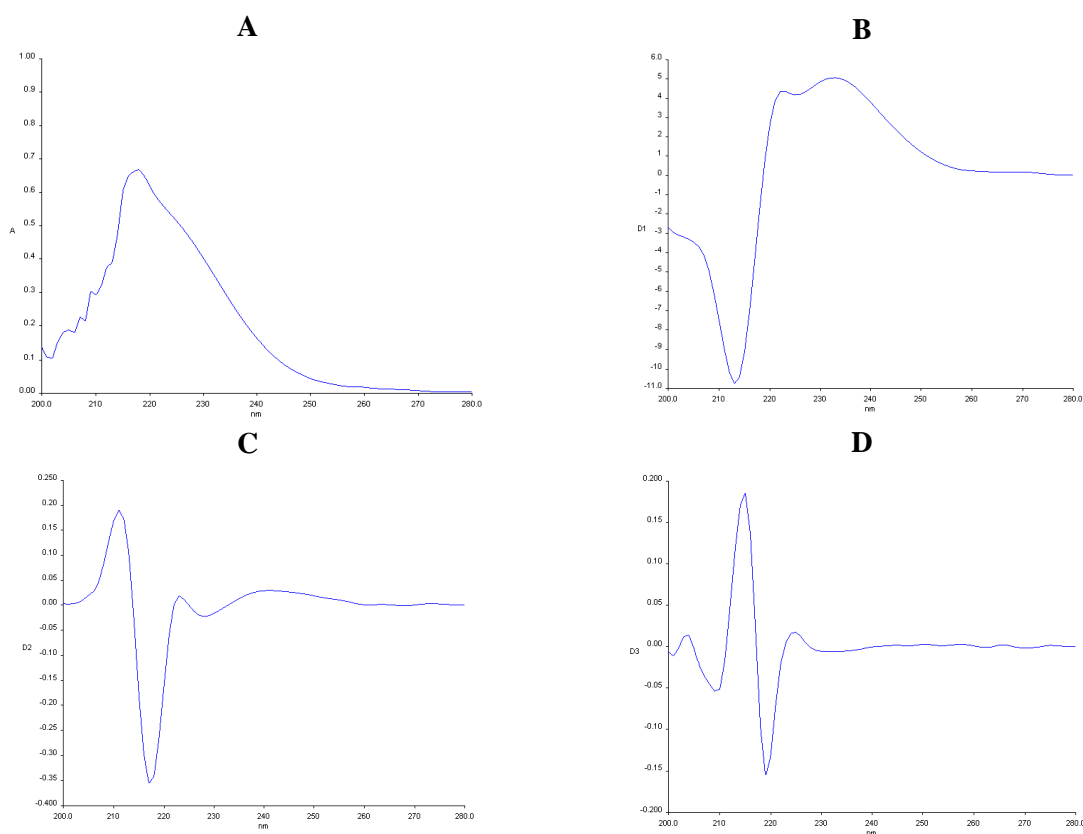
Korzystając z oprogramowania komputerowego podanego w ROZDZIALE 4.4.5. *Metoda QSPR* (str. 73) obliczono następujące parametry strukturalne i fizykochemiczne wymienionych I-ACE, które posłużyły jako deskryptory w analizie QSPR: rozpuszczalność w wodzie, temperaturę topnienia, wykładnik stałej dysocjacji pK_a , ilość donorów wodorowych, ilość akceptorów wodorowych, współczynnik dystrybucji $LogD$ (pH 5.5), $LogD$ (pH 7.4), współczynnik podziału $LogP$, refrakcję molową, polaryzowalność cząsteczkową, moment dipolowy, ilość wiązań rotowalnych, topologiczną polarną powierzchnię cząsteczki, energię desolvatacji grup hydrofobowych, energię desolvatacji grup polarnych, punkt izoelektryczny, powierzchnię *van der Waalsa*, powierzchnię dostępności rozpuszczalnika, objętość molową, oraz parachorę. Obliczono współczynniki korelacji pomiędzy parametrami kinetycznymi lub parametrami termodynamicznymi reakcji rozkładu ww. I-ACE a poszczególnymi deskryptorami celem wykazania zależności trwałości od budowy chemicznej w obrębie badanej grupy.

4.6. Wyniki

4.6.1. Dobór metody analitycznej

Metoda spektrofotometryczna

W celu określenia przydatności metody spektrofotometrycznej UV do analizy trwałości chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej, wykreślono widma zależności absorbancji (A), pierwszej (D^1), drugiej (D^2) i trzeciej (D^3) pochodnej jako funkcji długości fali w zakresie 200 nm do 280 nm w warstwie 1 cm, zgodnie z *Procedurą nr 4.1*. Uzyskane widma przedstawiono na RYCINIE 4.1. Odczytane z otrzymanych widm wartości λ_{maks} i λ_{min} zaprezentowano w TABELI 4.4.



RYCINA 4.1.

Widmo chlorowodorku imidaprilu w metanolu zależności
(A) $A = f(\lambda)$, (B) $D^1 = f(\lambda)$, (C) $D^2 = f(\lambda)$, (D) $D^3 = f(\lambda)$.

TABELA 4.4.
Wartości λ_{maks} i λ_{min} widm UV (A, D¹, D², D³) chlorowodorku imidaprilu w metanolu

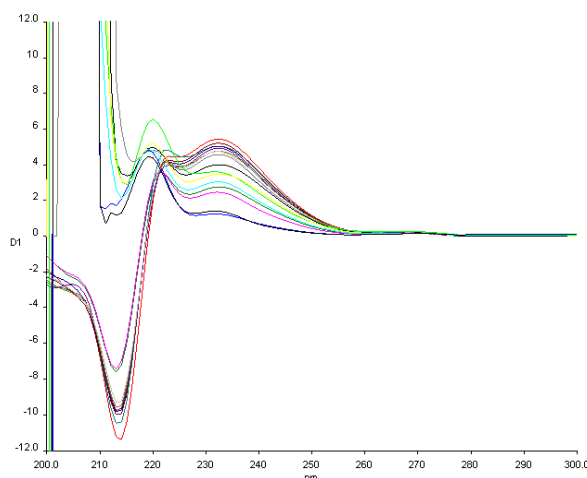
Technika	λ_{maks} [nm]	λ_{min} [nm]	λ_{maks} [nm]
A	218	—	—
D ¹	234	213	222
D ²	211	217	223
D ³	215	219	224

Po przeanalizowaniu uzyskanych widm spektralnych A, D¹, D² i D³ stwierdzono, iż do badania trwałości chlorowodorku imidaprilu w substancji najbardziej odpowiednią jest technika pierwszej pochodnej (D¹), ponieważ charakteryzuje się ona najbardziej selektywną długością fali $\lambda = 234$ i z tego względu została ona poddana dalszej walidacji.

4.6.2. Walidacja metody spektrofotometrycznej UV techniką D¹

Selektywność

Wykonano pilotażowe badanie trwałości zgodnie z *Procedurą nr 4.6*. Wykreślone widma przedstawiono na RYCINIE 4.2.



RYCINA 4.2.
Widma zależności $D^1 = f(\lambda)$ zmian stężenia chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej, $RH = 76.4\%$, $T = 363\text{ K}$.

Zaobserwowano, iż w czasie $t \rightarrow t_0$ absorbancja jest większa od zera, co sugeruje, iż metoda spektrofotometryczna UV techniką D¹ nie jest selektywna w stosunku do chlorowodorku imidaprilu w obecności jego produktów rozkładu. Stąd z uwagi na brak jej zadowalającej selektywności, która wymusza konieczność zastosowania techniki odejmowania, co znacznie komplikuje proces interpretacji danych doświadczalnych, metoda spektrofotometryczna D¹ została odrzucona na tym etapie analiz.

4.6.3. Walidacja metody RP-HPLC

Selektywność

W celu określenia selektywności opracowanych metod RP-HPLC wykonano odpowiednie testy kinetyczne. Badane próby oznaczono zgodnie z procedurami, podanymi w TABELI 4.5.

TABELA 4.5.
Selektywność opracowanych metod RP-HPLC

Metoda RP-HPLC	Numer procedury	Opis otrzymanego chromatogramu	Odnosnik do RYCINY
Metoda nr 1	<i>Procedura nr 4.10- 4.14</i>	IMD: $t_R \sim 5$ minut IS: $t_R \sim 8$ minut Prod 1/2: $t_R \sim 2/3$ minut	RYCINA 4.4 RYCINA 4.35
Metoda nr 2	<i>Procedura nr 4.10- 4.14</i>	IMD: $t_R \sim 12$ minut IS: $t_R \sim 7$ minut Prod 1: $t_R \sim 3$ minuty Prod 2: $t_R \sim 5$ minut	RYCINA 4.21
Metoda nr 3 IMD i stearynian magnezu	<i>Procedura nr 4.16 – 4.19</i>	IMD: $t_R \sim 5$ minut IS: $t_R \sim 8$ minut Prod 1: $t_R \sim 3$ minuty Brak sygnału dla stearynianu magnezu	RYCINA 4.40
Metoda nr 3 tabletki	<i>Procedura nr 4.20 – 4.23</i>	IMD: $t_R \sim 13$ minut IS: $t_R \sim 8$ minut Prod 1: $t_R \sim 3$ minuty Prod 2: $t_R \sim 5$ minut	RYCINA 4.50

* oznaczenia sygnałów na chromatogramach: IMD – chlorowodorek imidaprilu, IS – wzorec wewnętrzny, Prod 1,2 – produkt rozkładu.

Liniowość

Wyznaczono krzywą wzorcową zgodnie z *Procedurą nr 4.8* oraz przeprowadzono analizę statystyczną (RYCINA 4.3). Graficznym obrazem wyznaczonej krzywej jest wykres zależności sygnału chromatograficznego P_{IMD}/P_{IS} od stężenia chlorowodorku imidaprilu w kolejnych próbach. Wartość P_{IMD}/P_{IS} zdefiniowano jako stosunek pola powierzchni sygnału pochodzącego od chlorowodorku imidaprilu do pola powierzchni sygnału pochodzącego od wzorca wewnętrznego. Z otrzymanej krzywej wzorcowej wyznaczono granicę wykrywalności (*LOD*) oraz limit oznaczalności (*LOQ*) metody RP-HPLC korzystając z wzorów podanych w ROZDZIALE 3.7.2. *Walidacja metody analitycznej* (str. 61). Otrzymane wyniki zaprezentowano w TABELACH 4.6 – 4.8.

TABELA 4.6.
Parametry krzywej wzorcowej chlorowodorku imidaprilu wyznaczone metodą RP-HPLC nr 1 oraz ocena statystyczna prostych

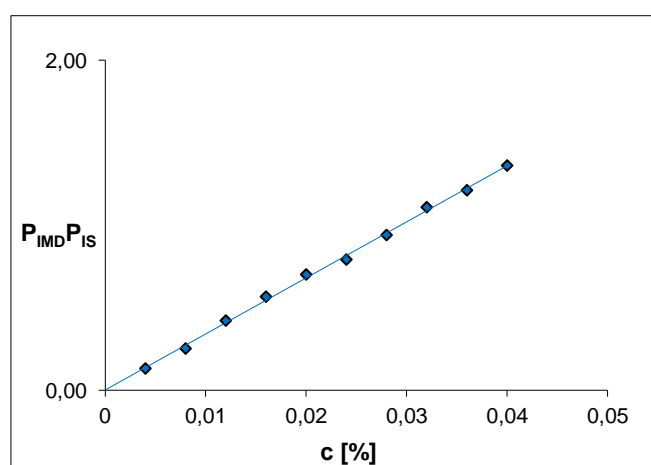
<i>c</i> (%)	P_{IMD}/P_{IS}	Ocena statystyczna $y = ax + b$	Ocena statystyczna $y = ax$	Parametry walidacji
0.004	0.1312	$a \pm \Delta a = 34.0 \pm 1.2$ $S_a = 0.5229$ $b \pm \Delta b = 0.0007 \pm 0.0299$ $S_b = 0.0130$ $r = 0.999$ $S_y = 0.0198$ weryfikacja hipotezy o istotności współczynnika b : $t = b/S_b = 0.054$ $t > t_{\alpha, f}$	$a \pm \Delta a = 34.02 \pm 1.1$ $S_a = 0.4930$ $S_y = 0.0179$ $r = 0.999$ $b = 0, t > t_{\alpha, f}$ współczynnik b nieistotny	$LOD = 0.0017\%$ $LOQ = 0.0053\%$
0.008	0.2521			
0.012	0.4216			
0.016	0.5664			
0.020	0.7012			
0.024	0.7915			
0.028	0.9402			
0.032	1.1090			
0.036	1.2116			
0.040	1.3615			

TABELA 4.7.
Parametry krzywej wzorcowej chlorowodorku imidaprilu wyznaczone metodą RP-HPLC nr 2 oraz ocena statystyczna prostych

<i>c</i> (%)	P_{IMD}/P_{IS}	Ocena statystyczna $y = ax + b$	Ocena statystyczna $y = ax$	Parametry walidacji
0.004	0.2667	$a \pm \Delta a = 51.7 \pm 3.9$ $S_a = 1.7095$ $b \pm \Delta b = 0.057 \pm 0.092$ $S_b = 0.0405$ $r = 0.995$ $S_y = 0.0701$ weryfikacja hipotezy o istotności współczynnika b : $t = b/S_b = 1.42$ $t > t_{\alpha, f}$	$a \pm \Delta a = 53.8 \pm 3.6$ $S_a = 1.6218$ $S_y = 0.0665$ $r = 0.9951$ $b = 0, t > t_{\alpha, f}$ współczynnik b nieistotny	$LOD = 0.0041\%$ $LOQ = 0.0124\%$
0.008	0.5181			
0.012	0.6397			
0.016	0.9263			
0.020	1.0963			
0.024	1.2615			
0.028	1.4416			
0.032	1.5878			
0.036	1.9416			
0.040	2.2566			

TABELA 4.8.
Parametry krzywej wzorcowej chlorowodorku imidaprilu wyznaczone metodą RP-HPLC nr 3 oraz ocena statystyczna prostych

c (%)	P_{IMD}/P_{IS}	Ocena statystyczna $y = ax + b$	Ocena statystyczna $y = ax$	Parametry walidacji
0.004	0.1514			
0.008	0.2521	$a \pm \Delta a = 31.12 \pm 1.78$	$a \pm \Delta a = 32.60 \pm 1.66$	
0.012	0.4562	$S_a = 0.8089$	$S_a = 0.7627$	$LOD = 0.0028\%$
0.016	0.5664	$b \pm \Delta b = 0.041 \pm 0.044$	$S_y = 0.0277$	$LOQ = 0.0085\%$
0.020	0.6550	$S_b = 0.0200$	$r = 0.997$	
0.024	0.7861	$r = 0.997$		
0.028	0.9515	$S_y = 0.0294$		
0.032	1.0111	weryfikacja hipotezy o	$b = 0, t > t_{\alpha, f}$	
0.036	1.1396	istotności współczynnika b :	współczynnik b	
0.040	1.2923	$t = b/S_b = 2.06$	nieistotny	



RYCINA 4.3.
Diagram korelacyjny, przedstawiający liniowość Metody RP-HPLC nr 1 jako zależność $P_{IMD}/P_{IS} = f(c)$ chlorowodorku imidaprilu – krzywa wzorcowa.

We wszystkich analizowanych przypadkach stwierdzono, że wartość $t = b/S_b$ jest mniejsza od wartości krytycznej $t_{\alpha, f} = 2.228$ przy poziomie istotności $\alpha = 0.05$, co wskazuje, że wartość współczynnika b jest statystycznie nieistotna ($b = 0$).

Precyzja i dokładność

Precyzję i dokładność metody RP-HPLC określono na podstawie wyników 6 lub 8 oznaczeń zawartości chlorowodorku imidaprilu w roztworach o trzech różnych stężeniach, przygotowanych zgodnie z *Procedurą nr 4.9*. Jako roztwór porównawczy wykorzystano 0.04% roztwór chlorowodorku imidaprilu, dla którego zmierzona wartość $P/P_{wz} = 1.2194$. Wyniki przedstawiono w TABELACH 4.9 – 4.11.

TABELA 4.9.
Precyzja i stopień odzysku metody RP-HPLC nr 1

Dzień	Stężenie rzeczywiste (%)	Stężenie oznaczone (%)	% odzysk	S	Wz (%)	n
0	0.004	0.00402 ± 0.000021	100.50 ± 0.725	9.50 · 10 ⁻⁶	0.745	6
	0.020	0.02020 ± 0.000014	101.00 ± 0.800	1.98 · 10 ⁻⁵	0.981	6
	0.040	0.04015 ± 0.000026	100.37 ± 0.820	3.71 · 10 ⁻⁵	0.925	6
1	0.004	0.00403 ± 0.000029	100.75 ± 0.770	4.06 · 10 ⁻⁶	1.008	6
	0.020	0.02021 ± 0.000013	101.05 ± 0.695	1.90 · 10 ⁻⁵	0.942	6
	0.040	0.04027 ± 0.000030	100.67 ± 0.710	4.24 · 10 ⁻⁵	1.050	6
2	0.004	0.00404 ± 0.000032	101.00 ± 0.815	4.42 · 10 ⁻⁶	1.095	6
	0.020	0.02022 ± 0.000012	101.10 ± 0.790	1.63 · 10 ⁻⁵	0.807	6
	0.040	0.04026 ± 0.000024	100.65 ± 0.795	3.40 · 10 ⁻⁵	0.844	6

TABELA 4.10.
Precyzja i stopień odzysku metody RP-HPLC nr 2

Dzień	Stężenie rzeczywiste (%)	Stężenie oznaczone (%)	% odzysk	S	Wz (%)	n
0	0.0160	0.0159 ± 0.0000101	99.37 ± 0.660	1.42 · 10 ⁻⁴	0.890	8
	0.020	0.0201 ± 0.0000222	100.5 ± 0.710	3.11 · 10 ⁻⁴	1.550	8
1	0.020	0.0199 ± 0.0000199	99.99 ± 0.522	2.78 · 10 ⁻⁴	1.011	8

TABELA 4.11.
Precyzja i stopień odzysku metody RP-HPLC nr 3

Dzień	Stężenie rzeczywiste (%)	Stężenie oznaczone (%)	% odzysk	S	Wz (%)	n
0	0.004	0.00401 ± 0.000024	100.30 ± 0.675	6.22 · 10 ⁻⁶	1.002	8
	0.020	0.02022 ± 0.000013	101.10 ± 0.780	2.01 · 10 ⁻⁵	0.825	8
	0.040	0.04033 ± 0.000031	100.99 ± 0.840	3.88 · 10 ⁻⁵	0.872	8
1	0.020	0.02010 ± 0.000019	100.95 ± 0.667	1.72 · 10 ⁻⁵	0.930	8

Wyznaczenie średniej masy tabletki

Średnią masę tabletki z chlorowodorkiem imidaprilu wyznaczono zgodnie z *Procedurą nr 4.24*. Uzyskane wyniki przedstawiono w TABELI 4.12.

TABELA 4.12.
Wyznaczanie średniej masy tabletki

Lp.	Masa tabletki (g)	Lp.	Masa tabletki (g)
1.	0.1965	15.	0.2053
2.	0.2006	16.	0.2040
3.	0.2005	17.	0.2013
4.	0.2031	18.	0.2026
5.	0.2039	19.	0.2004
6.	0.2022	20.	0.2049
7.	0.2032	21.	0.2058
8.	0.1993	22.	0.2014
9.	0.2019	23.	0.2007
10.	0.2026	24.	0.2077
11.	0.2003	25.	0.1990
12.	0.2047	26.	0.1980
13.	0.2001	27.	0.2050
14.	0.2031	28.	0.2018

OCENA STATYSTYCZNA

$$\bar{x} \pm \Delta x = 0.2021 \pm 0.00201$$
$$S = 0.000019$$

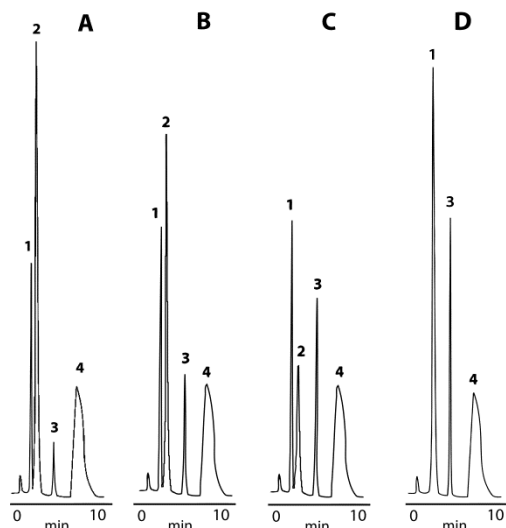
Średnia masa tabletki preparatu Tanatril 10 mg wynosi 0.2021g, przy czym $\bar{x} + x_{min} = 0.1965$, natomiast $\bar{x} + x_{maks} = 0.2077$, co w obu przypadkach stanowi 2.77% odchylenia od średniej masy tabletki. Wyniki powyższe wskazują, że tabletki spełniają wymagania farmakopealne (tabletki o masie 81- 249 mg mogą wykazywać odchylenie $\pm 7.5\%$).

Podsumowanie

Po przeanalizowaniu powyższych danych stwierdzono, iż wszystkie opracowane metody RP-HPLC spełniają najważniejsze kryteria walidacji, a więc: selektywność, liniowość, precyzję, dokładność, co potwierdza wiarygodność uzyskanych za ich pomocą wyników. Z tego względu metoda RP-HPLC z detekcją UV została zaakceptowana do dalszych badań trwałości chlorowodorku imidaprilu.

4.6.4. Ocena wpływu zmian wilgotności względnej powietrza na trwałość chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji

Analizę wpływu zmian wilgotności względnej powietrza na trwałość chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji przeprowadzono zgodnie z *Procedurami nr 4.10 - 4.14* za pomocą *Metody RP-HPLC nr 1*. Selektywność metody względem chlorowodorku imidaprilu potwierdzono analizując jakość wykreślonych chromatogramów (RYCINA 4.4):



RYCINA 4.4.

Chromatogramy dla próbki czystego chlorowodorku imidaprilu, uzyskane po zastosowaniu metody RP-HPLC nr 1 (3 – chlorowodorek imidaprilu $t_R = 5$ min; 1, 2 – produkty degradacji $t_R \sim 3/2$ min, na chromatogramie "D" $t_R = 3$ min; 4 – wzorzec wewnętrzny $t_R = 8$ min) w następujących warunkach kinetycznych: $T = 363$ K, $t = 9$ dni (A) $RH \sim 76.4\%$, (B) $RH \sim 50.9\%$, (C) $RH \sim 25.0\%$, (D) $RH \sim 0\%$.

Na podstawie uzyskanych wyników dokonano doboru kinetycznego modelu opisującego mechanizm rozkładu badanej substancji leczniczej oraz przeprowadzono analizę parametrów kinetycznych obserwowanej reakcji.

Dobór kinetycznego modelu reakcji rozkładu czystej postaci chlorowodorku imidaprilu w różnych wilgotnościach względnych powietrza

Kinetyczny model obserwowanej reakcji rozkładu czystej postaci chlorowodorku imidaprilu w warunkach stałej temperatury i w różnych wilgotnościach względnych powietrza ustalono na podstawie modelowania matematycznego poprzez dobór adekwatnego równania, które w najbardziej wiarygodny sposób opisuje przebieg reakcji oraz umożliwia interpretację uzyskanych danych eksperymentalnych.

W celu określenia modelu kinetycznego powyższej reakcji, uzyskane w toku badań stężenia cząstkowe zostały wyrażone jako ułamek substancji rozłożonej zgodnie ze wzorem:

$$x = 1 - \left(\frac{c}{c_0}\right)$$

a następnie dokonano analizy współczynników korelacji r krzywych teoretycznych, powstałych w wyniku podstawienia uzyskanych wartości x do zależności $f(x) = k \cdot t$ oraz $f(x) = k \cdot (t')$ zgodnie ze

znanymi równaniami kinetycznymi wymienionymi w TABELI 3.1, gdzie k określa stałą szybkości reakcji rozkładu, t jest czasem rozkładu a (t') stanowi skorygowany czas rozkładu, uwzględniający jedynie punkty należące do prostoliniowego odcinka wykresu funkcji $f(c) = t$. Uzyskane wyniki zamieszczono w TABELI 4.13.

TABELA 4.13.
Dobór modelu kinetycznego dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu na podstawie danych doświadczalnych uzyskanych w warunkach RH 76.4%, T = 363 K

Symbol reakcji	Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot t$	Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot (t')$
F0	0.967	0.961
F1	0.944	0.940
F2	0.914	0.913
F3	0.879	0.882
P2	0.957	0.951
P3	0.965	0.991
P4	0.952	0.993
P_2^3	0.922	0.928
A2	0.979	0.977
A3	0.971	0.986
A4	0.961	0.989
<u>B1</u>	<u>0.914</u>	<u>0.995</u>
D1	0.875	0.891
D2	0.861	0.879
D3	0.845	0.864
D4	0.855	0.874
R1	0.967	0.961
R2	0.957	0.951
R3	0.953	0.948

* t jest czasem trwania testu a (t') jest skorygowanym czasem trwania testu, uwzględniającym punkty należące do prostoliniowego odcinka wykresu funkcji $f(c) = t$.

Jak wynika z wartości przedstawionych w TABELI 4.13, najlepszą korelację danych uzyskano dla zależności *Prout-Tompkins'a* (model wzrostu zarodków, symbol B1). Wynik ten jest zgodny z analizą krzywej rozkładu $f(c) = t$, której graficznym obrazem jest krzywa sigmoidalna, charakteryzująca się początkowym, powolnym okresem indukcji, okresem przyspieszenia reakcji oraz okresem terminacji. Opis ten jest typowy dla reakcji autokatalitycznej, obserwowanej w przypadku rozkładu chlorowodorku imidaprilu w wyżej wymienionych warunkach.

Analiza poszczególnych procesów kinetycznych

Przedstawiona poniżej liniowa postać równania *Prout-Tompkins'a* stanowiła podstawę dla dalszej analizy wpływu zmian wilgotności względnej powietrza na kinetykę rozkładu badanej substancji leczniczej,

$$\ln \frac{c}{c_0 - c} = a \cdot t + b$$

gdzie c jest oznaczonym stężeniem procentowym chlorowodorku imidaprilu w próbkach testowych, c_0 jest stężeniem procentowym chlorowodorku imidaprilu w próbkach nierozłożonych (100 %), t to czas przebywania próbki w warunkach kinetycznych, wyrażony w dniach, a stanowi współczynnik nachylenia prostej a b jest wyrazem wolnym. Wartości a i b powyższego równania wyznaczone zostały metodą najmniejszych kwadratów, a błędy standardowe obliczono dla $\alpha = 0,05$ i $df = n - 2$ stopni swobody. Uzyskane dane eksperymentalne zinterpretowano zgodnie z podanym powyżej równaniem. Parametry kinetyczne obserwowanych reakcji zostały wyznaczone na podstawie przeprowadzonej analizy regresji:

- wartość nachylenia prostej a posłużyła do określenia **stałej szybkości reakcji** poszczególnych procesów kinetycznych k [1/s] zgodnie z zależnością:

$$k = \frac{a}{86400}$$

gdzie liczba 86400 stanowi przelicznik jednostek czasu z dni na sekundy.

- wartość **czasu połowicznego rozkładu** chlorowodorku imidaprilu w danych warunkach oraz wartość **czasu 10%-owego rozkładu** wyznaczono z równań podanych w ROZDZIALE 3.7. *Metody oceny trwałości leków* (str. 59),
- **okres indukcji**, wyznaczano graficznie, przyjmując, że trwa on do pierwszego punktu eksperymentalnego, należącego do okresu przyspieszenia.

Uzyskane krzywe rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach testowych oraz odpowiadające im dane doświadczalne przedstawiono na kolejnych RYCINACH 4.5 – 4.9 i w TABELACH 4.14 – 4.18.

$T = 363\text{ K}$, $RH = 25.0\%$

TABELA 4.14.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363\text{ K}$, $RH = 25.0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	1		1.1989	98.78	*
2	5		1.1680	96.23	*
3	7		1.1317	93.25	*
4	10		1.0698	88.14	7.4317
5	16		1.0089	83.12	4.9242
6	20		0.9485	78.14	3.5746
7	26	1.2138	0.8272	68.15	2.1397
8	32		0.7426	61.18	1.5760
9	36		0.6572	54.14	1.1805
10	40		0.5364	44.19	0.7918
11	44		0.4521	37.25	0.5936
12	46		0.4265	35.14	0.5418
13	50		0.3901	32.14	0.4736

* okres indukcji

PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$$a = -0.0715$$

$$\Delta a = 0.00398$$

$$S_a = 0.0017$$

$$b = 2.7020$$

$$\Delta b = 0.1374$$

$$S_b = 0.0596$$

$$S_v = 0.0705$$

$$r = -0.998$$

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$$k [1/s]$$

$$8.2756 \cdot 10^{-7}$$

$$\Delta k [1/s]$$

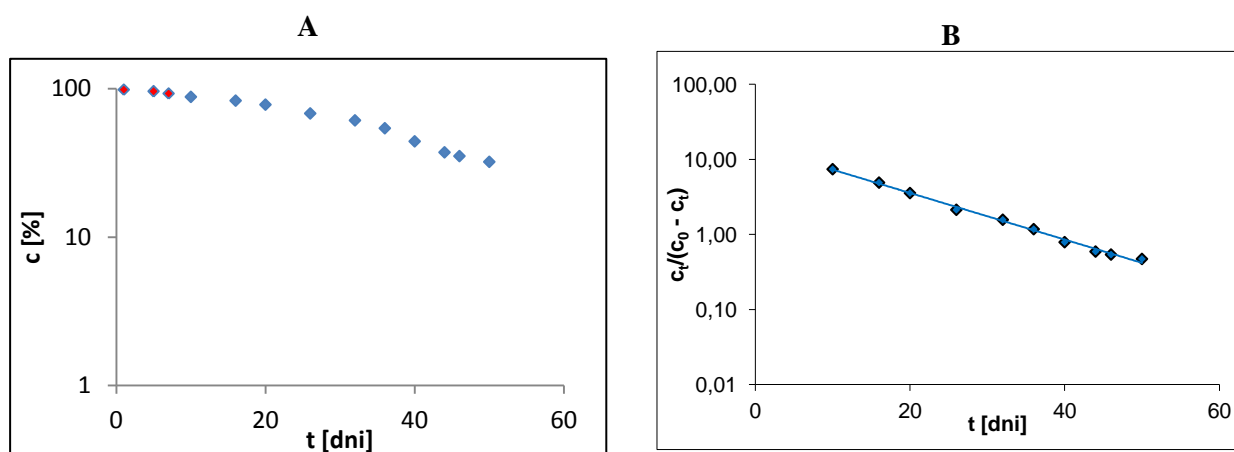
$$0.4610 \cdot 10^{-7}$$

$$t_{0.5} [h]$$

$$37.8$$

$$t_{0.1} [h]$$

$$7.1$$



RYCINA 4.5.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 25.0\%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 363 \text{ K}, RH = 50.9 \%$

TABELA 4.15.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363 \text{ K}, RH = 50.9\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	0.5		1.2313	99.49	*
2	1		1.2218	98.72	*
3	3		1.1944	96.51	*
4	4		1.1577	93.54	*
5	5		1.1032	89.14	8.2081
6	7		1.0552	85.26	5.7843
7	9		0.9424	76.15	3.1929
8	11	1.2376	0.8683	70.16	2.3512
9	12		0.8427	68.09	2.1338
10	14		0.7018	56.71	1.3100
11	16		0.5439	43.95	0.7841
12	18		0.4723	38.16	0.6171
13	20		0.3859	31.18	0.4531
14	23		0.2740	22.14	0.2844

* okres indukcji

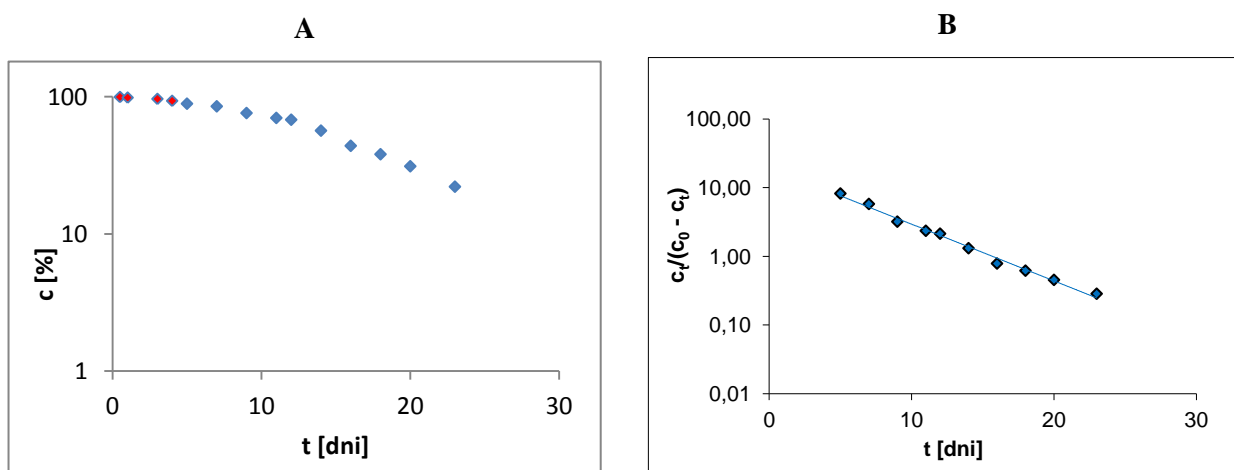
PARAMETRY PROSTEJ

$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$

$a = -0.1902$	$\Delta a = 0.0140$	$S_a = 0.0061$
$b = 2.9807$	$\Delta b = 0.2043$	$S_b = 0.0886$
$S_y = 0.1057$	$r = -0.996$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$2.2015 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$0.1618 \cdot 10^{-6}$
$t_{0.5}$ [h]	15.7
$t_{0.1}$ [h]	4.1



RYCINA 4.6.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 50.9 \%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 363\text{ K}$, $RH = 60.5\%$

TABELA 4.16.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363\text{ K}$, $RH = 60.5\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	0.5		1.2251	99.08	*
2	2		1.2060	97.45	*
3	4		1.1724	94.73	*
4	5		1.1277	91.12	10.2613
5	7		1.0287	83.12	4.9242
6	9		0.9178	74.16	2.8700
7	11	1.2376	0.8433	68.14	2.1387
8	13		0.7571	61.18	1.5760
9	14		0.6453	52.14	1.0894
10	16		0.5090	41.13	0.6987
11	18		0.3728	30.12	0.4310
12	20		0.2246	18.15	0.2217
13	23		0.1171	9.46	0.1045

* okres indukcji

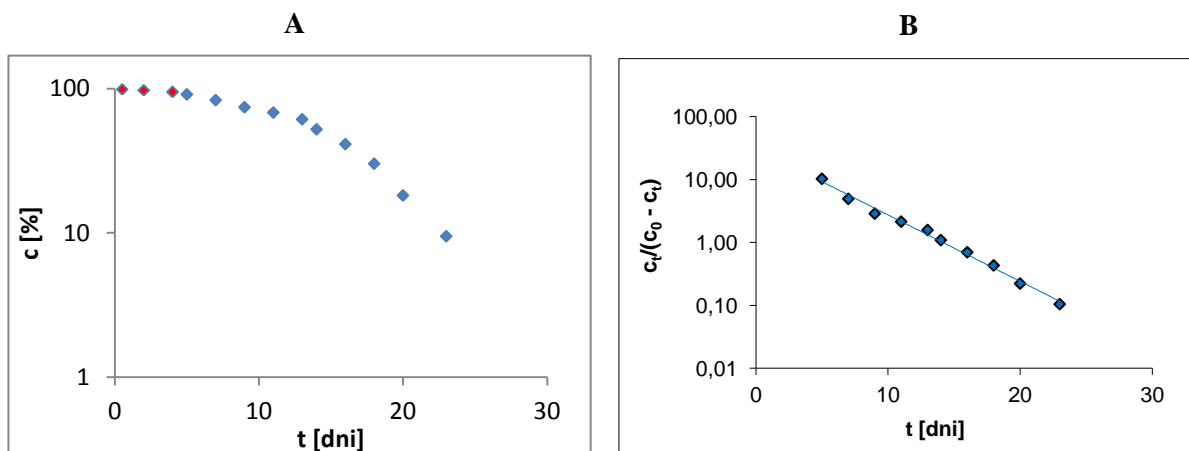
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$a = -0.2432$	$\Delta a = 0.0176$	$S_a = 0.0076$
$b = 3.4382$	$\Delta b = 0.2577$	$S_b = 0.1117$
$S_y = 0.1321$	$r = -0.996$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$2.8144 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$0.2034 \cdot 10^{-6}$
$t_{0.5}$ [h]	14.1
$t_{0.1}$ [h]	5.1



RYCINA 4.7.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 60.5\%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 363 \text{ K}, RH = 66.5 \%$

TABELA 4.17.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363 \text{ K}, RH = 66.5 \%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	0.3		1.2724	99.30	*
2	1		1.2321	96.15	24.9740
3	3		1.1808	92.15	11.7389
4	5		1.1298	88.17	7.4531
5	7		1.0228	79.82	3.9554
6	9	1.2814	0.8380	65.40	1.8902
7	12		0.6739	52.59	1.1093
8	13		0.6217	48.52	0.9425
9	15		0.3606	28.14	0.3916
10	16		0.2840	22.16	0.2847
11	20		0.1427	11.14	0.1254

* okres indukcji

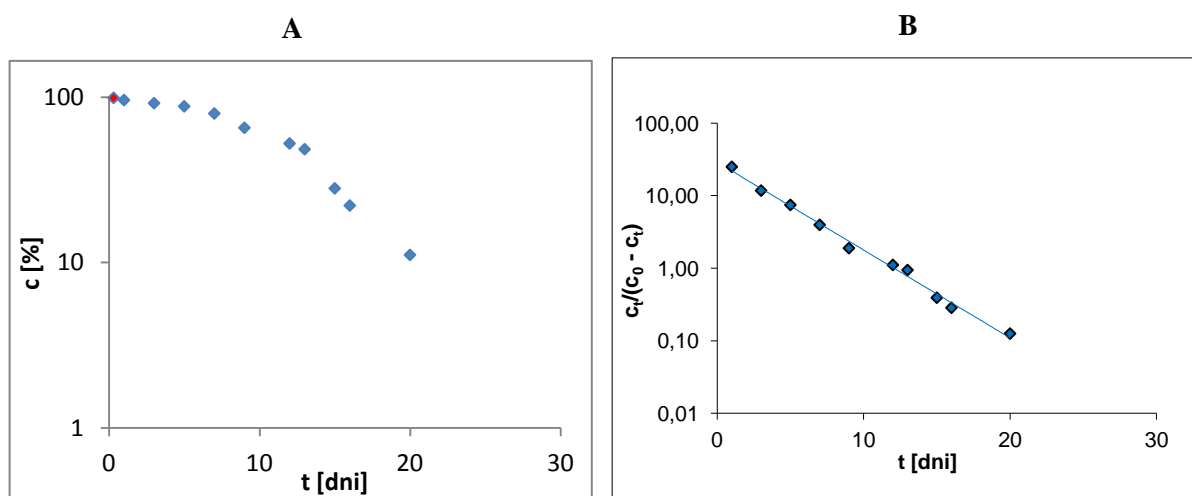
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t / (c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$a = -0.2789$	$\Delta a = 0.0186$	$S_a = 0.0081$
$b = 3.3643$	$\Delta b = 0.2179$	$S_b = 0.0945$
$S_y = 0.1492$	$r = -0.997$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$3.2279 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$0.2163 \cdot 10^{-6}$
$t_{0.5}$ [h]	12.1
$t_{0.1}$ [h]	4.2



RYCINA 4.8.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 66.5 \%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t / (c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 363 \text{ K}, RH = 76.4 \%$

TABELA 4.18.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 363 \text{ K}, RH = 76.4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	0.1	1.2365	1.1999	97.04	*
2	0.5		1.1819	95.59	*
3	1		1.1529	93.24	13.7929
4	2		1.1023	89.15	8.2166
5	3		1.0899	88.15	7.4388
6	4		1.0158	82.15	4.6022
7	5		0.9674	78.24	3.5956
8	6		0.7753	62.70	1.6810
9	7		0.6286	50.84	1.0342
10	8		0.4717	38.15	0.6168
11	10		0.3233	26.15	0.3541
12	12		0.1587	12.84	0.1473

* okres indukcji

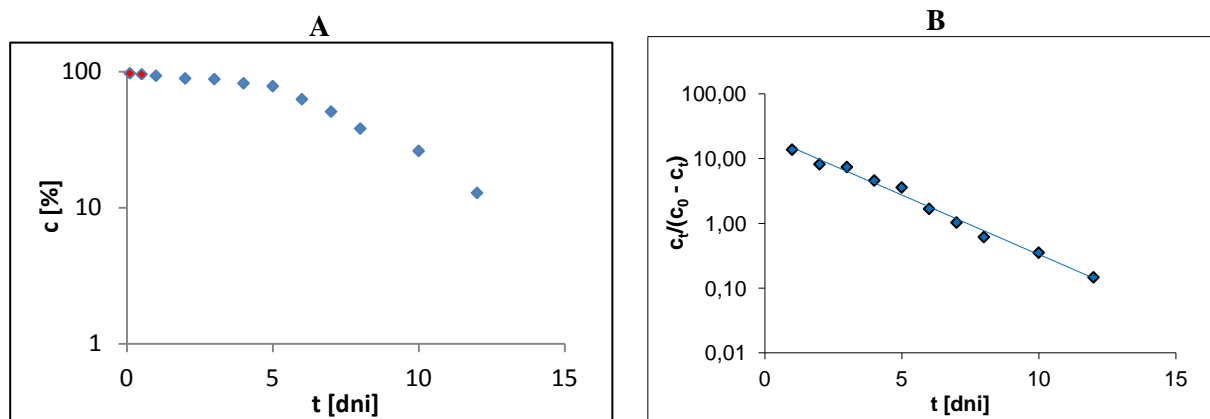
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$a = -0.4224$	$\Delta a = 0.0360$	$S_a = 0.0156$
$b = 3.1161$	$\Delta b = 0.2408$	$S_b = 0.1044$
$S_v = 0.1648$	$r = -0.995$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$4.8892 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$0.4165 \cdot 10^{-6}$
$t_{0.5}$ [h]	7.3
$t_{0.1}$ [h]	2.1



RYCINA 4.9.

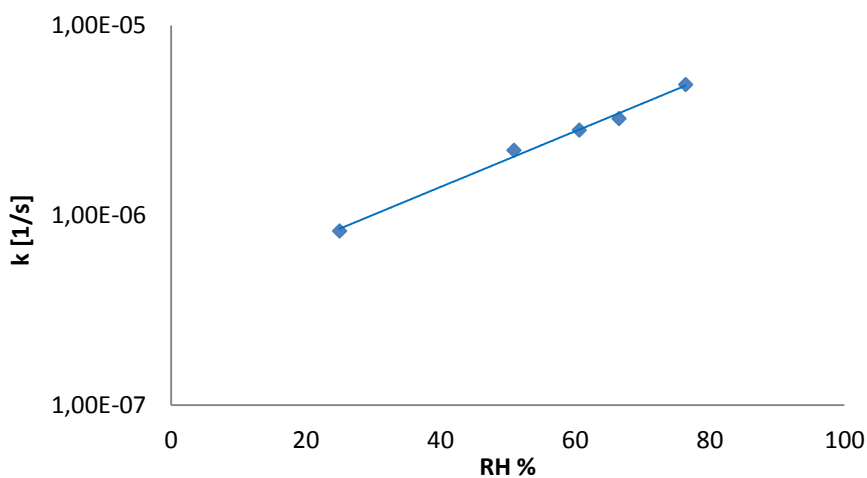
Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 76.4 \%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji ($T = 363 \text{ K}$, $RH 25.0 - 76.4\%$)

Ustalono, iż wyznaczone wartości stałych szybkości rozkładu badanej substancji leczniczej spełniają prostoliniową zależność $\ln k = f(RH\%)$, której parametry regresji przedstawiono w TABELI 4.19, a jej graficznym obrazem jest prosta przedstawiona na RYCINIE 4.10.

TABELA 4.19.
Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość chlorowodorku imidaprilu w substancji – parametry prostej opisanej $\ln k = f(RH\%)$

$RH\%$	$10^{-6} k \pm \Delta k$ [1/s]	$-r$	n	Parametry prostej $\ln k = f(RH\%)$
25.0	0.8276 ± 0.0461	0.997	10	$a \pm \Delta a = 0.0338 \pm 0.0050$
50.9	2.2015 ± 0.1618	0.996	10	$S_a = 0.0016$
60.6	2.8144 ± 0.2034	0.996	10	$b \pm \Delta b = -14.82 \pm 0.29$
66.5	3.2279 ± 0.2163	0.995	10	$S_b = 0.091$
76.4	4.8892 ± 0.4165	0.995	10	$r = 0.997$



RYCINA 4.10.
*Wpływ zmiennej $RH\%$ na trwałość chlorowodorku imidaprilu w substancji - półlogarytmiczny wykres obserwowanej stałej szybkości reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji (k [1/s]) jako funkcji wilgotności względnej powietrza ($RH\%$) w warunkach kinetycznych
 $T = 363 \text{ K}$, $RH = 25.0 - 76.4 \%$.*

Uzyskana prostoliniowa zależność potwierdza, iż wzrost poziomu wilgotności względnej powietrza nie wpływa na zmianę mechanizmu obserwowanej reakcji a jedynie przyczynia się do wzrostu ilości kolizji pomiędzy reagującymi cząstkami, co powoduje wzrost na szybkości reakcji.

4.6.5. Ocena wpływu zmian temperatury na trwałość chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji w podwyższonej wilgotności względnej powietrza

Analizę wpływu zmian temperatury (T 333 – 363 K) w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza ($RH = 76.4\%$) na trwałość chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji przeprowadzono zgodnie z *Procedurami nr 4.10 - 4.14* za pomocą *Metody RP-HPLC nr 1*. Analiza chromatogramu zaprezentowanego na RYCINIE 4.4 potwierdziła selektywność zastosowanej metody w stosunku do chlorowodorku imidaprilu. Stwierdzono, iż rozkład badanego leku w powyższych warunkach zachodzi zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej, opisaney kinetyką *Prout-Tompkins'a*. Na tej podstawie przeprowadzono analizę parametrów kinetycznych obserwowanych reakcji. Ustalono, iż w miarę wzrostu temperatury wartości okresu indukcji reakcji ulegają skróceniu, podczas gdy odpowiadające im stałe szybkości degradacji zwiększają się.

Analiza poszczególnych procesów kinetycznych

Dokonano analizy poszczególnych procesów kinetycznych zgodnie z postępowaniem opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 w akapicie dotyczącym *analizy procesów kinetycznych* (str. 91). Uzyskane krzywe rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach testowych oraz odpowiadające im dane doświadczalne przedstawiono na kolejnych RYCINACH 4.11 – 4.14 i TABELACH 4.20 – 4.23. Dane eksperymentalne dla warunków $T = 363$ K, $RH = 76.4\%$ przedstawiono w TABELI 4.18 i na RYCINIE 4.9.

$$T = 343 \text{ K}, RH = 76.4 \%$$

TABELA 4.20.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 343 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_i	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	1		1.5774	99.80	*
2	5		1.5670	99.14	*
3	10		1.5516	98.16	*
4	15		1.4564	92.14	*
5	18		1.3982	88.46	*
6	22		1.2352	78.15	3.5770
7	26		1.0923	69.13	2.2390
8	32	1.5806	0.9348	59.14	1.4470
9	36		0.8870	56.12	1.2790
10	42		0.7609	48.14	0.9280
11	48		0.6190	39.16	0.6440
12	52		0.5551	35.12	0.5413
13	56		0.4449	28.15	0.3918
14	60		0.3028	19.16	0.2370

* okres indukcji

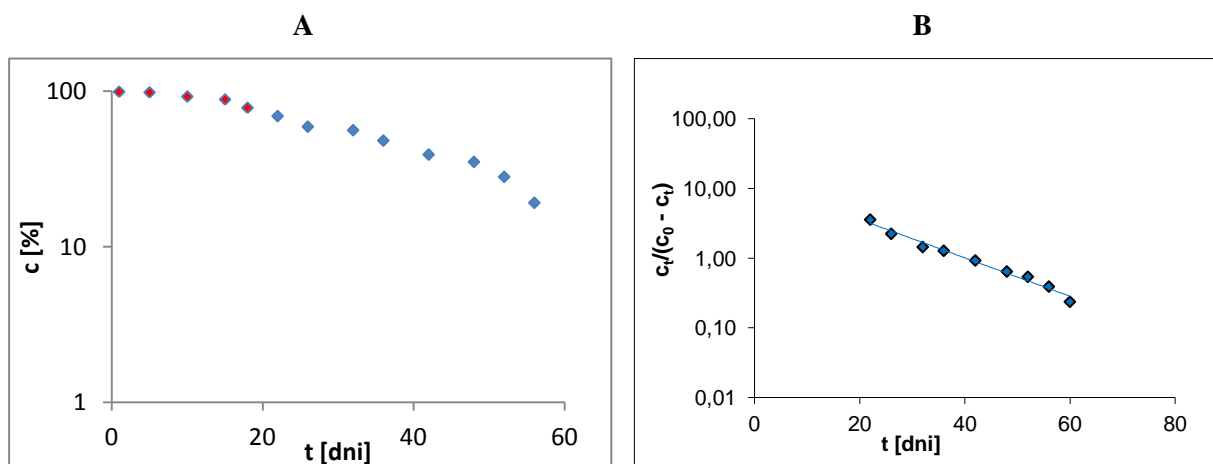
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$a = -0.0634$	$\Delta a = 0.0077$	$S_a = 0.0032$
$b = 2.5458$	$\Delta b = 2.5458$	$S_b = 0.1411$
$S_y = 0.1237$	$r = -0.991$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$7.3414 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.8898 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	40.14
$t_{0.1}$ [dni]	5.50



RYCINA 4.11.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 343 \text{ K}$ i $RH = 76.4 \%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 348 \text{ K}, RH = 76.4 \%$

TABELA 4.21.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 348 \text{ K}, RH = 76.4 \%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	5		1.5814	99.94	*
2	10		1.5361	97.19	*
3	12		1.4455	91.46	*
4	15		1.3614	86.14	*
5	17		1.2510	79.15	3.7960
6	22		1.0613	67.15	2.0440
7	26	1.5805	0.9190	58.14	1.3890
8	28		0.8713	55.13	1.2290
9	35		0.6973	44.12	0.7890
10	37		0.6028	38.14	0.6170
11	40		0.5235	33.12	0.4950
12	41		0.4131	26.14	0.3540
13	45		0.3035	19.20	0.2360

* okres indukcji

PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t / (c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$$a = -0,0916$$

$$\Delta a = 0,0108$$

$$S_a = 0.0046$$

$$b = 2.8177$$

$$\Delta b = 0.3565$$

$$S_b = 0.1544$$

$$S_y = 0.1239$$

$$r = -0.991$$

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$$k \text{ [1/s]}$$

$$1.0608 \cdot 10^{-7}$$

$$\Delta k \text{ [1/s]}$$

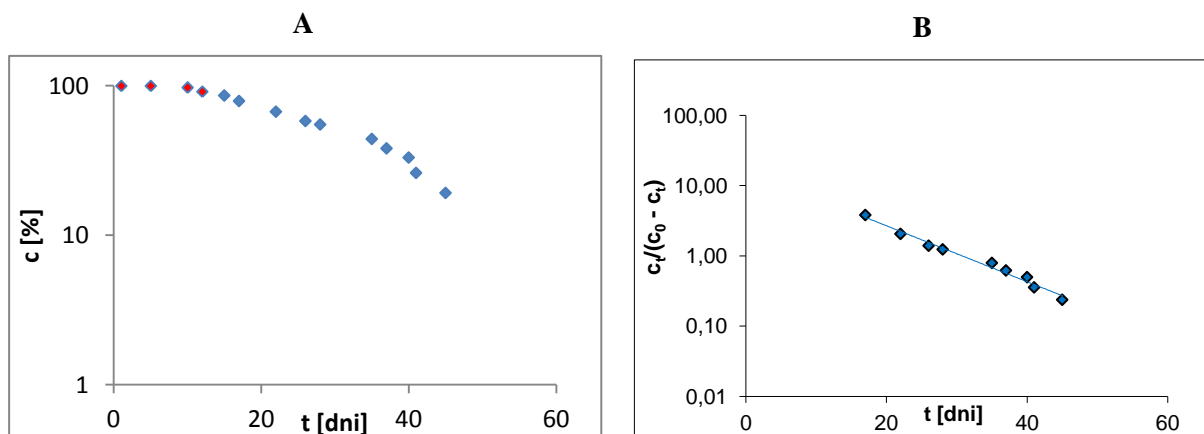
$$0.1260 \cdot 10^{-7}$$

$$t_{0.5} \text{ [dni]}$$

$$30.8$$

$$t_{0.1} \text{ [dni]}$$

$$6.8$$



RYCINA 4.12.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 348 \text{ K}$ i $RH = 76.4 \%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t / (c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 353\text{ K}, RH = 76.4\%$

TABELA 4.22.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 353\text{ K}, RH = 76.4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_d)$
1	1		1.3714	100.02	*
2	2		1.3386	97.63	*
3	3		1.3016	94.93	*
4	5		1.2814	93.45	*
5	6		1.2447	90.78	*
6	12		0.9626	70.21	2.3570
7	14	1.3711	0.8247	60.15	1.5090
8	16		0.8155	59.48	1.4680
9	19		0.6328	46.15	0.8570
10	21		0.5346	38.99	0.6390
11	22		0.4696	34.25	0.5210
12	23		0.3141	22.91	0.2970
13	30		0.0987	7.20	0.7760

* okres indukcji

PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$$a = -0.1923$$

$$\Delta a = 0.0234$$

$$S_a = 0.0099$$

$$b = 3.2436$$

$$\Delta b = 0.6575$$

$$S_b = 0.1909$$

$$S_y = 0.2125$$

$$r = -0.991$$

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$$k \text{ [1/s]}$$

$$2.2260 \cdot 10^{-6}$$

$$\Delta k \text{ [1/s]}$$

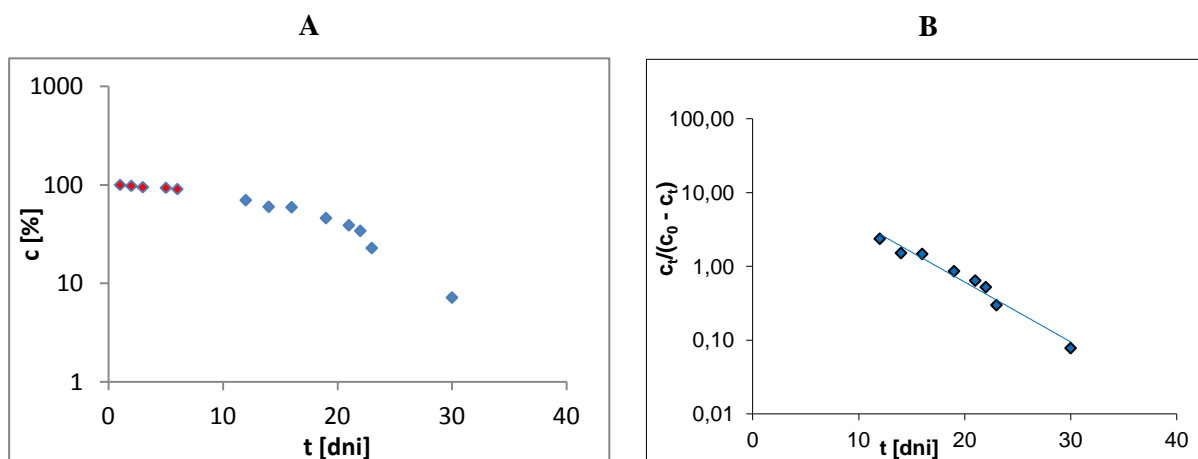
$$0.2710 \cdot 10^{-6}$$

$$t_{0.5} \text{ [dni]}$$

$$17.3$$

$$t_{0.1} \text{ [dni]}$$

$$5.9$$



RYCINA 4.13.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 353\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 358\text{ K}, RH = 76.4\%$

TABELA 4.23.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji w wyniku rozkładu w $T = 358\text{ K}, RH = 76.4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	1	1.3711	1.3033	99.69	*
2	3		1.2313	94.18	*
3	4		1.2356	90.12	*
4	6		1.2357	90.13	*
5	9		1.1214	81.78	*
6	14		0.9614	70.12	2.3470
7	15		0.8635	62.98	1.7010
8	16		0.7834	57.14	1.3330
9	17		0.6277	45.78	0.8440
10	18		0.5501	40.12	0.6700
11	19		0.4407	32.14	0.4730
12	20		0.3860	28.15	0.3920

* okres indukcji

PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$$a = -0.3106$$

$$\Delta a = 0.0404$$

$$S_a = 0.0157$$

$$b = 5.1477$$

$$\Delta b = 0.4575$$

$$S_b = 0.2695$$

$$S_y = 0.0613$$

$$r = -0.994$$

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$$k \text{ [1/s]}$$

$$3.5953 \cdot 10^{-6}$$

$$\Delta k \text{ [1/s]}$$

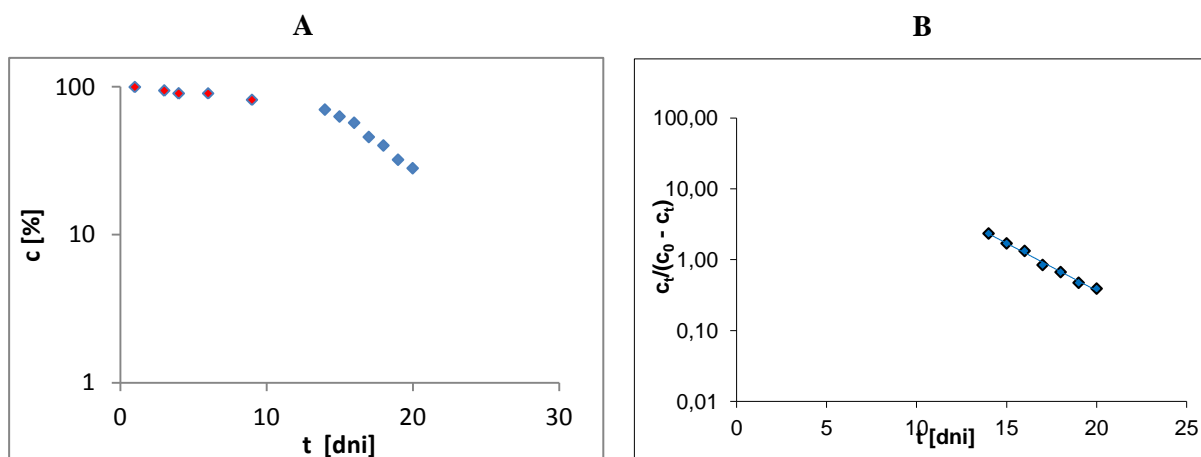
$$0.4686 \cdot 10^{-6}$$

$$t_{0.5} \text{ [dni]}$$

$$16.8$$

$$t_{0.1} \text{ [h]}$$

$$9.7$$



RYCINA 4.14.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 358\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

Zależność Arrhenius'a (T 343 – 363 K, $RH = 76.4\%$)

Ustalono, iż wyznaczone wartości stałych szybkości rozkładu badanej substancji leczniczej spełniają prostoliniową zależność Arrhenius'a $\ln k = f(1/T)$ (RYCINA 4.15), której parametry regresji przedstawiono w TABELI 4.24. Na podstawie wyznaczonego równania obliczono parametry termodynamiczne reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w temperaturze 298 K w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza (RH 76.4%) korzystając ze wzorów podanych w ROZDZIALE 3.6.3 (str. 57-58).

TABELA 4.24.

Parametry prostej stanowiącej obraz zależności Arrhenius'a dla rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji w $T = 343 - 363$ K, $RH = 76.4$ % oraz jej obliczone parametry termodynamiczne

<i>L.p.</i>	<i>T [K]</i>	<i>1/T · 10⁻³</i>	<i>k ± Δk [1/s]</i>
1	363	2.7550	$(4.8892 \pm 0.4164) 10^{-6}$
2	358	2.7932	$(3.5953 \pm 0.4686) 10^{-6}$
3	353	2.8328	$(2.2260 \pm 0.2710) 10^{-6}$
4	348	2.8735	$(1.0608 \pm 0.1260) 10^{-6}$
5	343	2.9154	$(7.3414 \pm 0.8894) 10^{-7}$

PARAMETRY PROSTEJ

$\ln k = f(1/T)$

$a \pm \Delta a = -12550.0809 \pm 2827.3749$

$S_a = 1018.5068$

$b \pm \Delta b = 22.41 \pm 8.11$

$S_b = 2.8859$

$r = -0.9902$

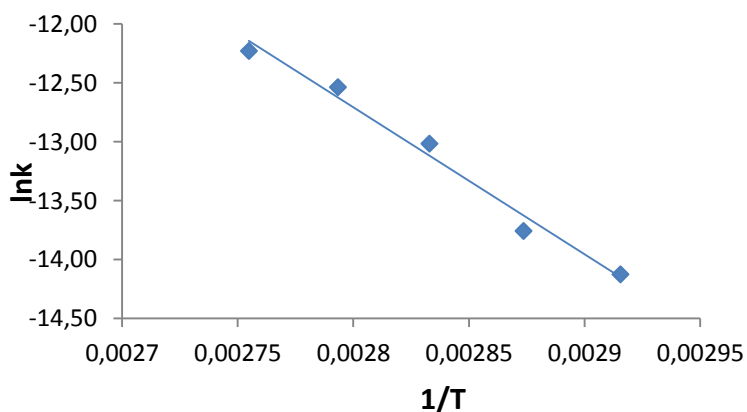
PARAMETRY TERMODYNAMICZNE

w $T = 298$ K

$E_a = 104.3464 \pm 23.5079$ [kJ · mol⁻¹]

$\Delta H^\ddagger = 101.868 \pm 25.9856$ [kJ · mol⁻¹]

$\Delta S^\ddagger = -58.5918 \pm 177.4877$ [J · K⁻¹ · mol⁻¹]



RYCINA 4.15.

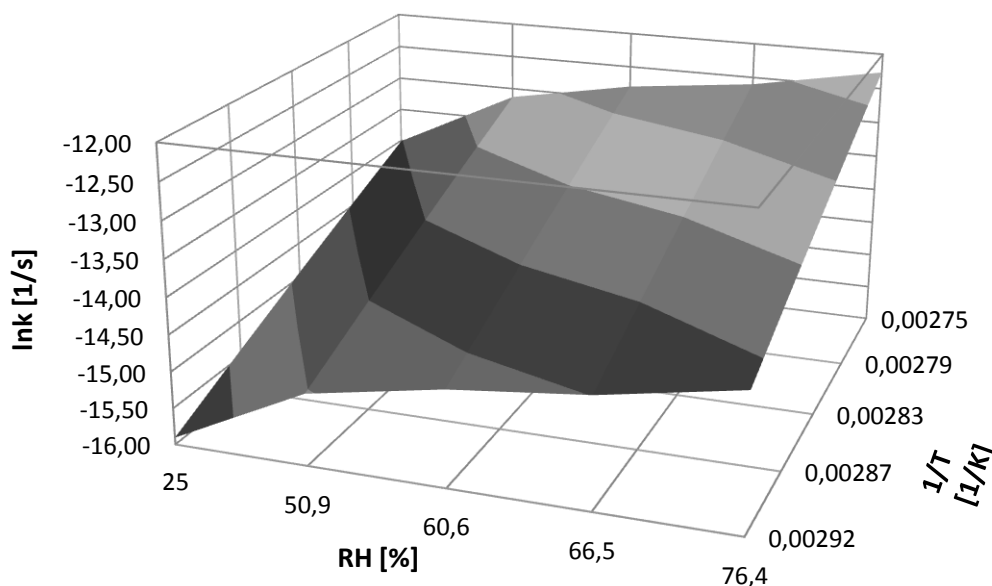
Wykres zależności Arrhenius'a dla rozkładu chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza $RH = 76.4\%$.

Uzyskana prostoliniowa zależność $\ln k = f(1/T)$ potwierdza, iż w zastosowanych warunkach kinetycznych eksperymentu wzrost temperatury nie powoduje zmian mechanizmu obserwowanej reakcji rozkładu a jedynie wpływa na zwiększenie jej szybkości.

Rozszerzona postać zależności Arrhenius'a (T 343 – 363 K, $RH = 76.4\%$) uwzględniająca parametr wilgotności względnej powietrza

Powiązując ze sobą parametry, wywierające wpływ na szybkość rozkładu chlorowodorku imidaprilu uzyskano zależność trójwymiarową w przestrzennym układzie współrzędnych xyz, w której wartość stałej szybkości rozkładu badanego leku jest funkcją dwóch zmiennych, temperatury oraz wilgotności względnej powietrza, a jej obrazem jest płaszczyzna (RYCINA 4.16) opisana równaniem wyznaczonym za pomocą metody regresji wielorakiej:

$$\ln k = 17.6 - 11783.6 \cdot (1/T) + 0.034 RH\%$$



RYCINA 4.16.

Trójwymiarowa zależność pomiędzy parametrami rozkładu chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji: zlogarytmowaną obserwowaną stałą szybkości rozkładu, wilgotnością względną powietrza i odwrotnością temperatury.

Powyższa zależność daje możliwość przewidywania trwałości chlorowodorku imidaprilu w dowolnych warunkach środowiskowych, a jej wiarygodność została potwierdzona statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej (TABELA 4.25).

TABELA 4.25.

Ocena wiarygodności rozszerzonej zależności Arrhenius'a dla chlorowodorku imidaprilu w substancji za pomocą statystycznego testu równości współczynników regresji liniowej z uwzględnieniem zależności $\ln k = f(RH\%)$ i $\ln k = f(1/T)$

TEST I $\ln k = f(RH\%)$	TEST II $\ln k = f(1/T)$
<u>HIPOTEZY</u>	
$H_0: a_1 = a_2$ $H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Parametry doświadczalne</i> $\ln k = 0.0338 (RH\%) - 14.83; (n = 5)$	<i>Parametry doświadczalne</i> $\ln k = -12483.9 (1/T) + 22.25; (n = 5)$
<i>Parametry teoretyczne</i> $\ln k = 0.034 (RH\%) - 14.86; (n = 5)$	<i>Parametry teoretyczne</i> $\ln k = -11783.6 (1/T) + 20.2; (n = 5)$
$t = \frac{a_1 - a_2}{S_{a_1 - a_2}}$	
$S_{a_1 - a_2} = 0.0016$ $ t = 0.063$	$S_{a_1 - a_2} = 951.7332$ $ t = 0.736$
$t (\alpha = 0.05; df = 6) = 2.4469$	
$ t < t (\alpha; df)$	$ t < t (\alpha; df)$
<u>WYNIK</u>	
Brak podstaw do odrzucenia H_0 , a więc współczynniki regresji liniowej a_1 i a_2 nie różnią się istotnie zarówno w teście I jak i w teście II, zatem stałe szybkości reakcji wyznaczone doświadczalnie oraz teoretycznie nie wykazują różnic pod względem statystycznym.	

4.6.6. Analiza kinetyki tworzenia oraz identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu powstających w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza

Optymalizacja metody analitycznej

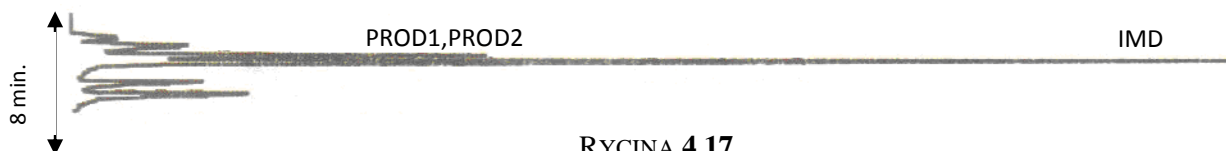
W celu przeprowadzenia analizy kinetyki tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji dokonano optymalizacji opracowanej *Metody RP-HPLC nr 1*, która nie wykazywała zadowalającej selektywności w stosunku do dwóch produktów rozkładu, ponieważ piki odpowiadające im na chromatogramach uzyskanych w wyniku rozdzielania przy zastosowaniu parametrów opisanych w ROZDZIALE 4.4.2 *Metoda RP-HPLC nr 1* (str. 71) nie były odpowiednio rozdzielone (RYCINA 4.4). W związku z powyższym przetestowano inne fazy ruchome, o różnych stężeniach acetonitrylu i buforu fosforanowego (0.035 mol/l, $pH = 2$), których skład przedstawiono w TABELI 4.26, w różnych trybach pracy pompy oraz z zastosowaniem różnych wzorców wewnętrznych.

TABELA 4.26.

Skład badanych faz ruchomych do optymalizacji metody RP-HPLC

Lp.	Stężenie buforu fosforanowego o pH 2.0 [%]	Stężenie acetonitrylu [%]
1	40	60
2	60	40
3	70	30

Dla każdego oznaczenia z wykorzystaniem przygotowanych faz ruchomych przygotowywano próbki analityczne w warunkach $T = 363$ K, RH 76.4%, $t = 9$ dni i nanoszono je na kolumnę chromatograficzną zgodnie z *Procedurami nr 4.10 – 4.16*. Uzyskane chromatogramy zaprezentowano na RYCINACH 4.17 – 4.19.

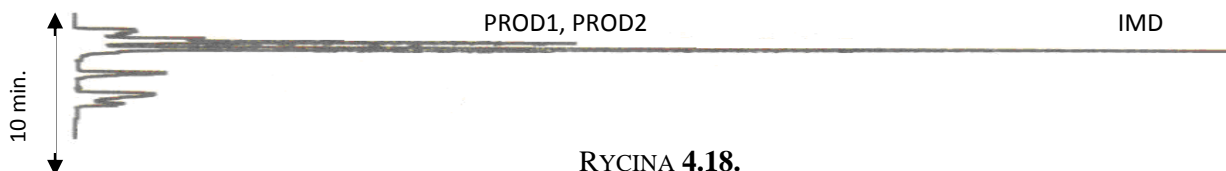


RYCINA 4.17.

Chromatogram roztworu chlorowodorku imidaprilu po 9 dniach przechowywania w $T = 363$ K i $RH = 76.4\%$ z użyciem fazy ruchomej nr 1.

Wniosek:

Brak rozdziału produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu.

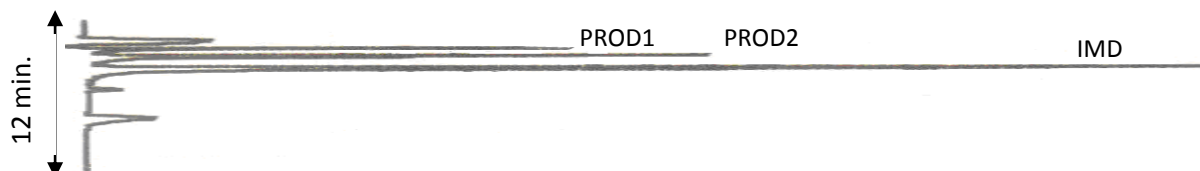


RYCINA 4.18.

Chromatogram roztworu chlorowodorku imidaprilu po 9 dniach przechowywania w $T = 363$ K i $RH = 76.4\%$ z użyciem fazy ruchomej nr 2.

Wniosek:

Brak rozdziału produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu.



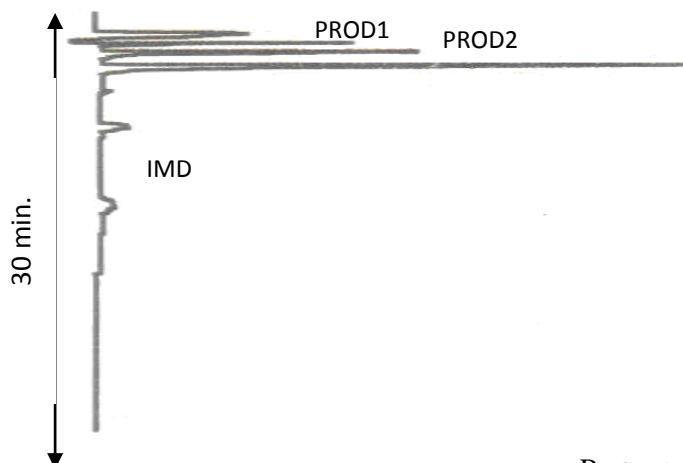
RYCINA 4.19.

Chromatogram roztworu chlorowodorku imidaprilu po 9 dniach przechowywania w $T = 363$ K i $RH = 76.4\%$ z użyciem fazy ruchomej nr 3.

Wniosek:

Zadawalający rozdział produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu.

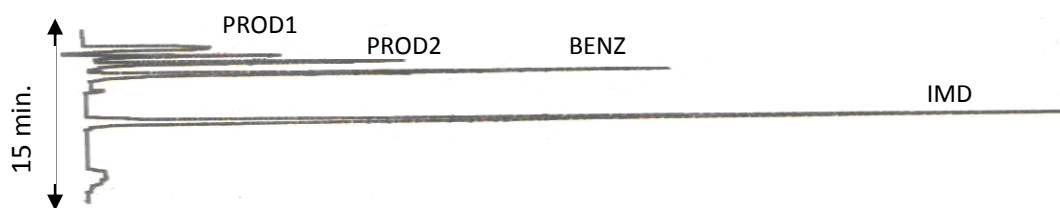
Analiza otrzymanych chromatogramów umożliwiła dobór odpowiedniej fazy ruchomej do dalszych badań, czyli fazy ruchomej o składzie bufor fosforanowy (0.035 mol/l, pH 2) - acetonitryl (70:30 v/v), której zastosowanie dawało dobry rozdział sygnałów produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu. Opracowana faza ruchoma wymagała wyboru nowego wzorca wewnętrznego, gdyż nie zaobserwowano w tych warunkach wymywania chlorowodorku oksymetazoliny (RYCINA 4.20).



RYCINA 4.20.

Chromatogram chlorowodorku imidaprilu po 9 dniach przechowywania w $T = 363K$ i $RH = 76.4\%$ oraz chlorowodorku oksymetazoliny z użyciem fazy ruchomej nr 3.

Z powyższego chromatogramu wynika, że chlorowodorek oksymetazoliny nie może być użyty jako wzorec wewnętrzny w nowodobranych warunkach analitycznych. Konieczny zatem okazał się dobór nowego wzorca wewnętrznego. Na podstawie przeprowadzonych analiz wybrano benzokainę (RYCINA 4.21).



RYCINA 4.21.

Chromatogram roztworu chlorowodorku imidaprilu oraz benzokainy o stężeniu 0.02% po 9 dniach przechowywania w $T = 363K$ i $RH = 76.4\%$ z użyciem fazy ruchomej nr 3.

Wniosek:

Faza ruchoma o składzie: acetonitryl – bufor fosforanowy (pH 2.0) (30:70 v/v) wykazuje selektywność w stosunku do chlorowodorku imidaprilu, wzorca wewnętrznego (metanolowy roztwór benzokainy o stężeniu 0.02%) oraz produktów rozkładu IMD w $T = 363 K$ i $RH = 76.4\%$.

Ponadto przeprowadzono optymalizację szybkości przepływu fazy ruchomej, wykonując rozdział chromatograficzny próbek badanych przy następujących parametrach pracy pompy: 1.0 ml/min, 1.2 ml/min, 1.5 ml/min.

Analiza otrzymanych wyników pozwoliła stwierdzić, iż najwyższej jakości chromatogramy uzyskano dla następujących parametrów rozdziału: faza ruchoma bufor fosforanowy (0.035 mol/l, pH 2) - acetonitryl (70:30 v/v), szybkość przepływu 1.2 ml/min, wzorzec wewnętrzny – benzokaina (RYCINA 4.21), dla których uzyskano wąskie, ostre, symetryczne oraz dobrze rozdzielone piki, odpowiadające związkowi macierystemu ($t_R = 12$ min), produktowi nr 1 ($t_R = 3$ min), produktowi nr 2 ($t_R = 5$ min) oraz wzorcowi wewnętrznemu ($t_R = 7$ min). Ocena wydajności zoptymalizowanej metody *RP-HPLC nr 2* oraz metody *RP-HPLC nr 1* zaprezentowano w TABELI 4.27.

TABELA 4.27.
Wydajność Metody RP-HPLC nr 1 oraz Metody RP-HPLC nr 2 w analizie kinetyki rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji warunkach $T = 363$ K, $RH = 76.4\%$

Faza ruchoma; przepływ 1.2 ml/min	acetonitryl – metanol – bufor fosforanowy pH 2.00 (60:10:30 v/v/v)	acetonitryl – bufor fosforanowy pH 2.00 (30:70 v/v)
<i>Związek</i>	<i>Liczba póltek teoretycznych (n)</i>	
Produkt nr 1	2172	1064
Produkt nr 2	2836	2015
Imidapril	4986	6382
Wzorzec wewn.	11364	4533
Współczynnik rozdzielczości	$R_{I-II} = 0.59$ $R_{I-IMD} = 3.14$ $R_{II-IMD} = 2.36$ $R_{IMD-IS} = 1,48$ $R_{I-IS} = 3.73$ $R_{II-IS} = 3.54$	$R_{I-II} = 1.18$ $R_{I-IMD} = 4.28$ $R_{II-IMD} = 3.30$ $R_{IMD-IS} = 2.12$ $R_{I-IS} = 2.66$ $R_{II-IS} = 1.48$

Dobór kinetycznego modelu dla reakcji tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej postaci w warunkach $RH = 74.6\%$ i $T = 363$ K

Analizę kinetyki tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza ($T = 363$ K, $RH = 76.4\%$) przeprowadzono zgodnie z *Procedurami nr 4.10 - 4.15*. Na podstawie uzyskanych wyników dokonano doboru kinetycznego modelu, opisującego mechanizm tworzenia produktów rozkładu badanej substancji leczniczej, posługując się modelowaniem matematycznym, zgodnie z postępowaniem opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 (str. 89). Uzyskane wyniki zamieszczono w TABELI 4.28.

TABELA 4.28.

Dobór modelu kinetycznego dla reakcji tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu na podstawie danych doświadczalnych uzyskanych w warunkach RH = 76.4%, T = 363 K

Symbol reakcji	Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot t$		Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot (t')$	
	Produkt 1	Produkt 2	Produkt 1	Produkt 2
F0	0.969	0.962	0.985	0.969
F1	0.983	0.977	0.975	0.984
F2	0.917	0.812	0.864	0.844
F3	0.860	0.698	0.765	0.676
P2	0.989	0.988	0.992	0.987
P3	0.935	0.929	0.955	0.942
P4	0.930	0.924	0.950	0.938
$P\frac{3}{2}$	0.982	0.978	0.991	0.982
A2	0.991	0.987	0.991	0.989
A3	0.988	0.976	0.990	0.988
A4	0.985	0.989	0.992	0.985
<u>B1</u>	0.990	0.980	<u>0.993</u>	<u>0.990</u>
D1	0.987	0.988	0.992	0.989
D2	0.986	0.985	0.985	0.989
D3	0.968	0.963	0.951	0.967
D4	0.982	0.989	0.976	0.987
R1	0.969	0.962	0.985	0.969
R2	0.989	0.967	0.991	0.988
R3	0.990	0.979	0.992	0.989

* t jest czasem trwania testu a (t') jest skorygowanym czasem trwania testu uwzględniającym punkty należące do prostoliniowego odcinka wykresu funkcji $f(c) = t$.

Jak wynika z wartości przedstawionych w TABELI 4.28, najlepszą korelację danych zarówno dla produktu nr 1 jak i produktu nr 2 uzyskano dla zależności *Prout-Tompkins'a* (model wzrostu zarodków, symbol B1). Wynik ten jest zgodny z analizą krzywej tworzenia $f(c) = t$, której graficznym obrazem jest krzywa sigmoidalna, co sugeruje, iż w wyżej wymienionych warunkach zachodzi reakcja autokatalityczna.

Analiza procesu kinetycznego

Przedstawiona poniżej liniowa postać równania *Prout-Tompkins'a* stanowiła podstawę dla dalszej analizy kinetyki tworzenia produktów rozkładu badanego leku w postaci czystej substancji,

$$\ln \frac{c_{\infty} - c}{c} = -a \cdot t + b$$

gdzie c jest oznaczonym stężeniem procentowym produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu w próbkach testowych, c_{∞} jest stężeniem procentowym produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu

ROZDZIAŁ 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA
ETAP I - TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU W FAZIE STAŁEJ

w czasie nieskończonym, t to czas przebywania próbki w warunkach kinetycznych wyrażony w dniach, a stanowi współczynnik nachylenia prostej a b jest wyrazem wolnym. Wartości a i b powyższego równania wyznaczone zostały metodą najmniejszych kwadratów a błędy standardowe obliczono dla $\alpha = 0,05$ i $df = n - 2$ stopni swobody.

Ocena procesu kinetycznego przeprowadzona została zgodnie z postępowaniem opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 w akapicie, dotyczącym analizy procesów kinetycznych (str.91). Uzyskane krzywe tworzenia produktu nr 1 oraz produktu nr 2 w warunkach testowych oraz odpowiadające im dane doświadczalne przedstawiono w TABELACH 4.29 – 4.31 oraz na RYCINIE 4.22.

Równolegle, drogą analizy uzyskanych chromatogramów, dokonano oceny procesu degradacji chlorowodorku imidaprilu w ww. warunkach eksperymentalnych za pomocą *Metody RP-HPLC nr 2*. Ten etap badań stanowił element niezbędny do przeprowadzenia analizy statystycznej.

Produkt nr 1; T = 363 K, RH = 76.4 %

TABELA 4.29.

Zmiany stężenia produktu nr 1, powstającego w wyniku rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji (P_i/P_{wz}) w warunkach T = 363 K, RH = 76.4 % wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_∞	$P_t = P_i/P_{wz}$	$(P_\infty - P_t)/P_t$
1	0.5		0.0199	*
2	1		0.0201	*
3	2		0.0213	15.4319
4	3		0.0216	15.2037
5	4		0.0453	6.7263
6	5		0.0613	4.7096
7	6	0.35	0.0931	2.7594
8	7		0.1213	1.8854
9	8		0.1355	1.5830
10	9		0.1630	1.1472
11	10		0.2023	0.7301
12	11		0.2516	0.3911
13	12		0.2813	0.2442
* okres indukcji				
PARAMETRY PROSTEJ				
$\ln (P_\infty - P_t)/P_t = -a \cdot t + b$				
$a = -0.4129$	$\Delta a = 0.0364$	$S_a = 0.0158$		
$b = 3.6622$	$\Delta b = 0.2797$	$S_b = 0.1213$		
$S_y = 0.1656$	$r = -0.993$			
PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI				
k [1/s]		$4.7780 \cdot 10^{-6}$		
Δk [1/s]		$0.4072 \cdot 10^{-6}$		

Produkt nr 2; T = 363 K, RH = 76.4 %

TABELA 4.30.

Zmiany stężenia produktu nr 2, powstającego w wyniku rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji (P_t/P_{wz}) w warunkach $T = 363\text{ K}$, $RH = 76.4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_∞	$P_t = P_t/P_{wz}$	$(P_\infty - P_t)/P_t$
1	0.5		0.0287	*
2	1		0.0299	*
3	2		0.0392	19.429
4	3		0.0751	8.9867
5	4		0.1155	5.4935
6	5		0.1287	4.8275
7	6	0.75	0.1559	3.8108
8	7		0.2077	2.6110
9	8		0.2719	1.7584
10	9		0.3516	1.1331
11	10		0.5016	0.4952
12	11		0.5516	0.3597
13	12		0.6015	0.2469

* okres indukcji

PARAMETRY PROSTEJ
 $\ln (P_\infty - P_t)/P_t = -a \cdot t + b$

$a = -0.4145$	$\Delta a = 0.0437$	$S_a = 0.0196$
$b = 3.6561$	$\Delta b = 0.3472$	$S_b = 0.1506$
$S_y = 0.2056$	$r = -0.990$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$k [1/s]$	$4.7972 \cdot 10^{-6}$
$\Delta k [1/s]$	$0.5055 \cdot 10^{-6}$

Chlorowodorek imidaprilu; $T = 363\text{ K}$, $RH = 76.4\%$

TABELA 4.31.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (P_i/P_{wz}) w czystej substancji w warunkach $T = 363\text{ K}$, $RH = 76.4\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	$P_t = (P_i/P_{wz})$	$P_t/(P_0 - P_t)$
1	1	2.0290	*
2	2	2.0278	*
3	3	2.0160	10.9565
4	4	1.9216	6.9023
5	5	1.9074	6.5188
6	6	1.7266	3.6472
7	7	1.4399	1.8944
8	8	1.3095	1.4705
9	9	1.0475	0.9089
10	10	0.7818	0.5513
11	11	0.6712	0.4390
11	12	0.5561	0.3383
12	13	0.3316	0.1775

* okres indukcji

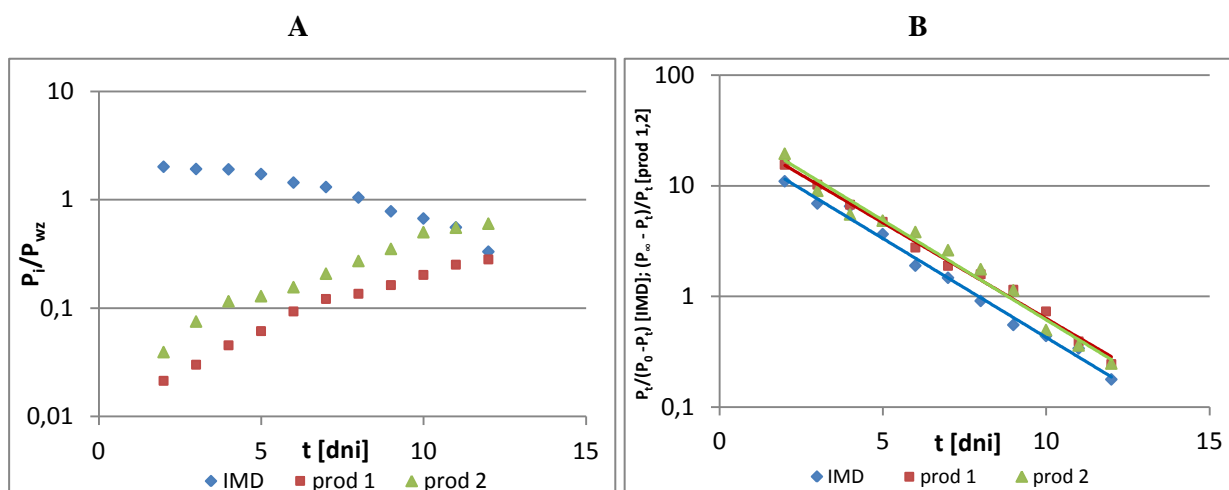
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln P_t/(P_0 - P_t) = a \cdot t + b$$

$a = -0.4117$	$\Delta a = 0.0296$	$S_a = 0.0133$
$b = 3.6744$	$\Delta b = 0.2631$	$S_b = 0.1141$
$S_y = 0.1391$	$r = -0.995$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$4.765 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$0.354 \cdot 10^{-6}$



RYCINA 4.22.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu (IMD) oraz tworzenia jego produktów degradacji (prod 1, 2) w warunkach $T = 363\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$ przedstawiający zmiany stężenia wymienionych związków (P_i/P_{wz}) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) półlogarytmiczna zależność $(P_i/P_{wz}) = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln P_t/(P_0 - P_t) = a \cdot t + b$ (IMD) oraz $\ln(P_\infty - P_t)/P_t = -a \cdot t + b$ (prod 1, 2).

Obliczone wartości stałych tworzenia chlorowodorku imidaprilu, produktu nr 1 oraz produktu nr 2 w zastosowanych warunkach kinetycznych poddano ocenie statystycznej za pomocą testu równości współczynników kierunkowych prostych. Uzyskane wyniki przedstawiono w TABELI 4.32.

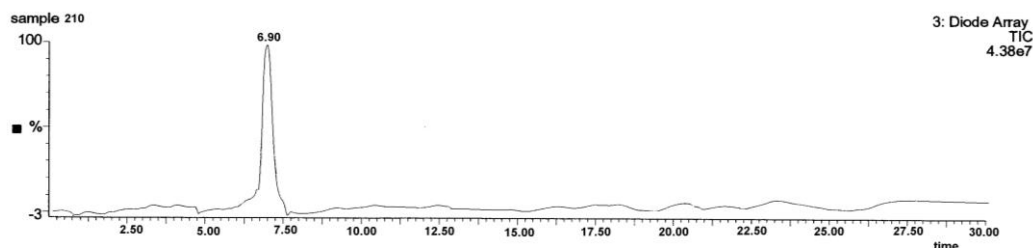
TABELA 4.32.

Porównanie parametrów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji oraz parametrów tworzenia jego produktów degradacji (Produkt nr 1 oraz Produkt nr 2) w warunkach ($T = 363\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST I <i>Chlorowodorek imidaprilu vs produkt nr 1</i>	TEST II <i>Chlorowodorek imidaprilu vs produkt nr 2</i>
HIPOTEZY	
$H_0: a_1 = a_2$	
$H_1: a_1 \neq a_2$	
<p><i>Populacja I (IMD)</i> $\ln P_t / (P_0 - P_t) = -0.4117 \cdot t + 3.6744$; (n = 11)</p> <p><i>Populacja II (Prod nr 1)</i> $\ln(P_\infty - P_t) / P_t = -0.4129 \cdot t + 3.6622$; (n = 11)</p> <p>$S_{a_1 - a_2} = 0.01484$ $t = 0.0644$</p>	<p><i>Populacja I (IMD)</i> $\ln P_t / (P_0 - P_t) = -0.4117 \cdot t + 3.6744$; (n = 11)</p> <p><i>Populacja II (Prod nr 2)</i> $\ln(P_\infty - P_t) / P_t = -0.4145 + 3.6561 \cdot t$; (n = 11)</p> <p>$S_{a_1 - a_2} = 0.02138$ $t = 0.1309$</p>
$t (\alpha = 0.05; df = 18) = 2.101$	
$ t < t(\alpha; df)$	$ t < t(\alpha; df)$
WYNIK	
Brak podstaw do odrzucenia H_0 , a więc współczynniki regresji liniowej a_1 i a_2 nie różnią się istotnie, zatem stałe szybkości tworzenia IMD, produktu nr 1 oraz produktu nr 2 nie wykazują różnic pod względem statystycznym, czyli rozkład IMD w podwyższonej $RH(\%)$ i temperaturze zachodzi zgodnie z równoległą reakcją.	

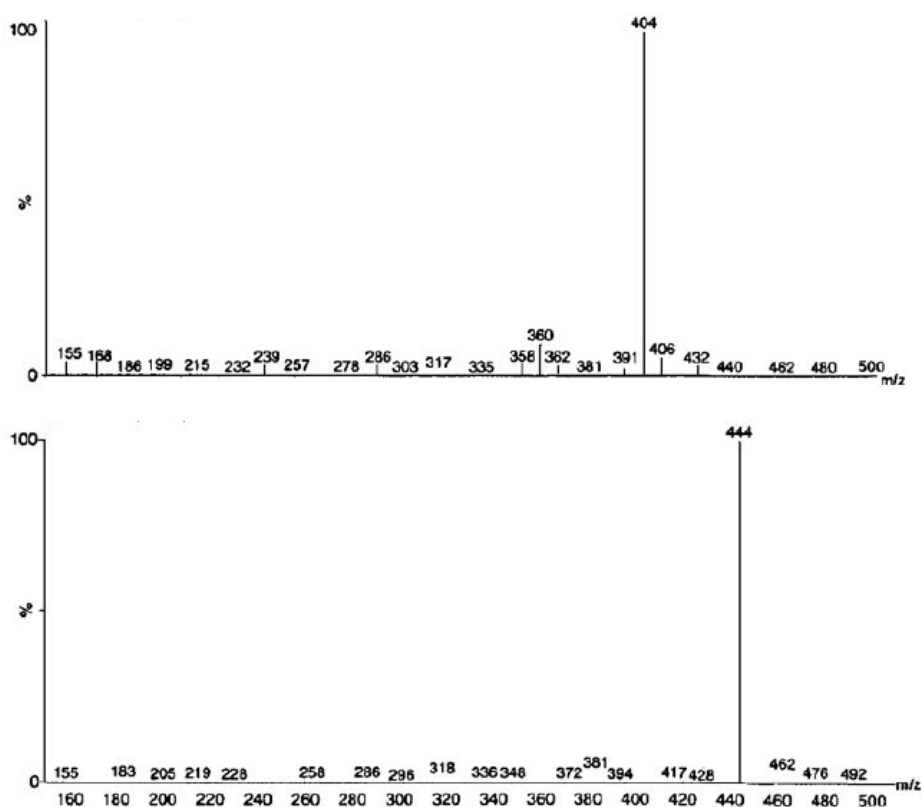
Identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza

Identyfikacja zanieczyszczeń tworzących się w trakcie rozkładu chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji została wykonana drogą analizy jakościowej metodą HPLC-MS, zgodnie z *Procedurą nr 4.15*. Pierwszym etapem realizacji powyższego zadania było potwierdzenie tożsamości chlorowodorku imidaprilu poprzez ocenę jakościową chromatogramu HPLC-MS oraz widma masowego, uzyskanego dla próbki substancji leczniczej niepoddanej rozkładowi (RYCINA 4.23 - 4.24).



RYCINA 4.23.

Chromatogram HPLC-MS dla nierozłożonego chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej, $t_R = 6.90\text{ min}$.



RYCINA 4.24.

Widma spektrometrii mas dla próbki chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji niepoddawanej procesowi rozkładu, forma anionowa ES^- $m/z = 404$ i forma kationowa (potasowa) ES^+ $m/z = 444$.

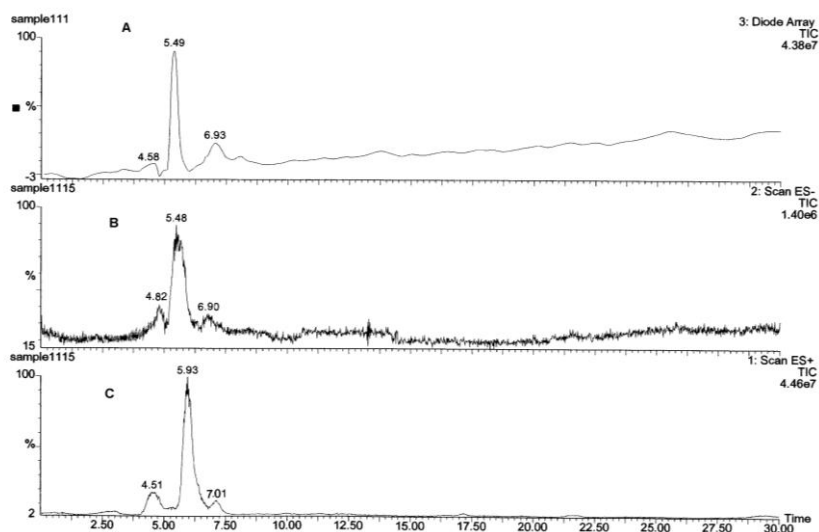
Otrzymany chromatogram HPLC dla próbki chlorowodorku imidaprilu niepoddanego testom kinetycznym zawiera jeden sygnał o czasie retencji (t_R) równym 6.90 min.

Widmo spektroskopii mas w formie anionowej ES^- dla nierozłożonego chlorowodorku imidaprilu zawiera charakterystyczny, wysoki pik o wartości $m/z = 404$, który odpowiada pozornemu jonowi molekularnemu typu $[M - H]^-$. Stwierdzono, iż zaobserwowany sygnał pochodzi od badanej substancji leczniczej, gdyż jego wartość m/z jest liczbowo równa masie cząsteczkowej chlorowodorku imidaprilu pomniejszonej o masę protonu. Z kolei widmo spektroskopii mas w formie anionowej ES^+ dla nierozłożonego chlorowodorku imidaprilu zawiera charakterystyczny, wysoki pik o wartości $m/z = 444$, który odpowiada pozornemu jonowi molekularnemu typu $[M - K]^+$. Stwierdzono, iż zaobserwowany sygnał pochodzi od badanej substancji leczniczej, gdyż jego wartość m/z jest liczbowo równa masie cząsteczkowej chlorowodorku imidaprilu powiększonej o masę potasu.

Wniosek

Otrzymane widma spektroskopii mas potwierdzają tożsamość chlorowodorku imidaprilu i stanowią odniesienie dla identyfikacji produktów jego rozkładu.

Następnie, celem identyfikacji produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji wykonano chromatogram HPLC-MS dla próbki ogrzewanej w $T = 363\text{ K}$, $RH = 76.4\%$ przez okres 48 godzin, na którym stwierdzono obecność trzech pików, pochodzących od badanej substancji leczniczej ($t_R \sim 5.48\text{ min}$ dla formy anionowej ES^- i $t_R \sim 5.93$ dla formy kationowej ES^+), produktu rozkładu nr 1 ($t_R \sim 4.82\text{ min}$ dla formy anionowej ES^- i $t_R \sim 4.51\text{ min}$ dla formy kationowej ES^+) oraz produktu rozkładu nr 2 ($t_R \sim 6.90\text{ min}$ dla formy anionowej ES^- i $t_R \sim 7.01\text{ min}$ dla formy kationowej ES^+) (RYCINA 4.25).

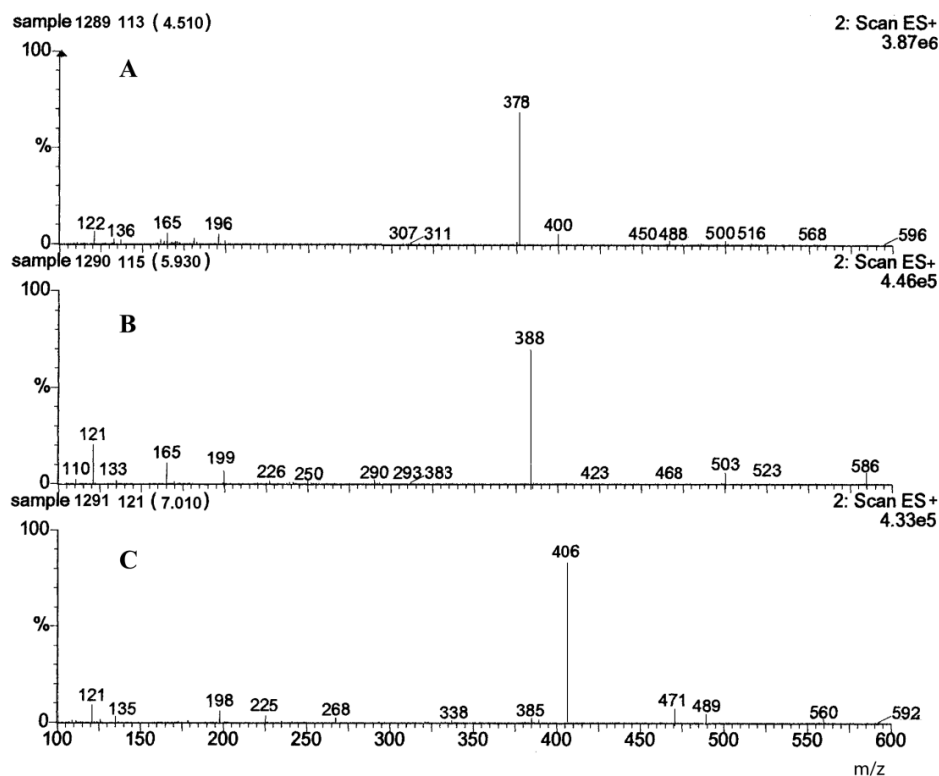


RYCINA 4.25.

Chromatogramy HPLC-MS otrzymane dla próbki chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji po 48 h ogrzewania w $T = 363\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$: (B) chromatogram anionowy ES^- , (C) chromatogram kationowy ES^+

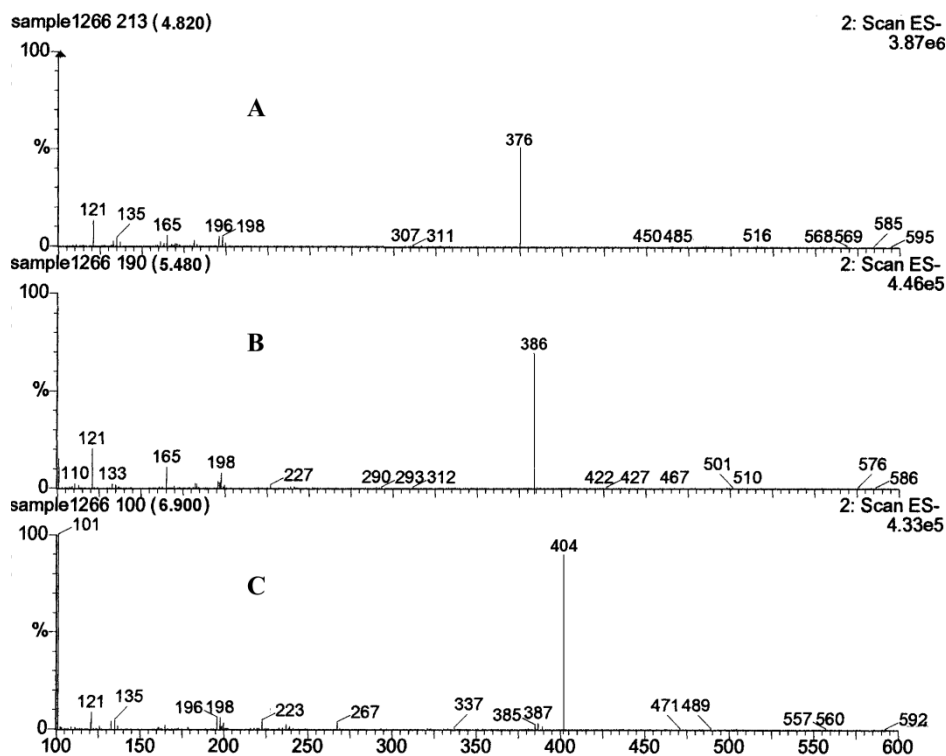
Odpowiadające powyższym chromatogramom widma masowe (ES^+ oraz ES^-) charakteryzowały się obecnością pasm, których wartości m/z wskazują na masy cząsteczkowe jonów, odpowiednio $[M-H]^+$, $[M-H]^-$ imidaprilu oraz jego dwóch produktów rozkładu. Widma masowe zaprezentowano na RYCINIE 4.26 – 4.27. Odczytane wartości m/z oraz obliczone masy cząsteczkowe i wzory sumaryczne odpowiadających im związków zestawiono w TABELI 4.33.

ROZDZIAŁ 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA
ETAP I - TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU W FAZIE STAŁEJ



RYCINA 4.26.

Widma spektrometrii mas, forma kationowa ES+ dla (A) produktu nr 1, (B) produktu nr 2 oraz (C) chlorowodorku imidaprilu.



RYCINA 4.27.

Widma spektrometrii mas, forma anionowa ES- dla (A) produktu nr 1, (B) produktu nr 2 oraz (C) chlorowodorku imidaprilu.

TABELA 4.33.

Identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T=363\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) drogą analizy wartości m/z odczytanych z widm masowych

Związek	Wzór sumaryczny	Obliczona masa cząsteczkowa (u)	Wartość m/z na widmie ES+ jon $[M-H]^+$	Wartość m/z na widmie ES- jon $[M-H]^-$
Imidapril	$C_{20}H_{27}N_3O_6$	405	406	404
Produkt nr I (DKP*)	$C_{20}H_{25}N_3O_5$	387	388	386
Produkt nr II (Imidaprilat)	$C_{18}H_{23}N_3O_6$	377	378	376

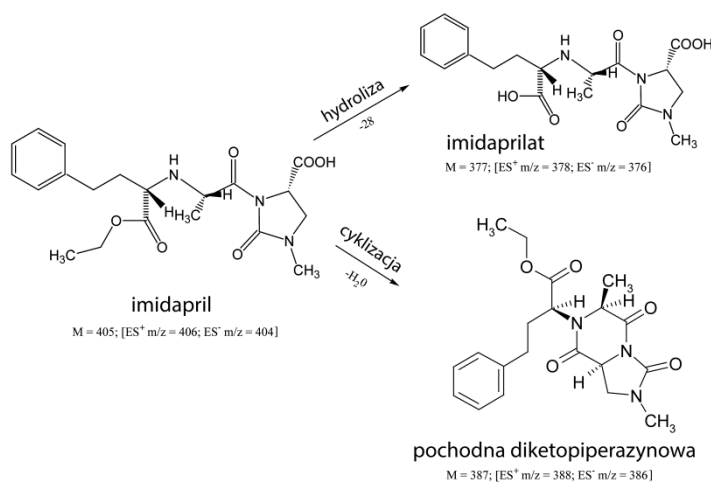
*DKP pochodna diketopiperazynowa chlorowodorku imidaprilu

Stwierdzono, że chlorowodorek imidaprilu w powyższych warunkach kinetycznych ulega degradacji z utworzeniem dwóch produktów rozkładu: pochodnej dikwasowej (imidaprilatu) oraz pochodnej diketopiperazynowej.

Mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach podwyższonej wilgotności powietrza

Na podstawie uzyskanych wyników identyfikacji produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach kinetycznych $T = 363\text{ K}$, $RH = 76.4\%$ ustalono prawdopodobny mechanizm reakcji degradacji badanej substancji leczniczej. Określono, iż w powyższych warunkach chlorowodorek imidaprilu zgodnie z zamieszczonym poniżej schematem (RYCINA 4.28) ulega jednoczesnej:

- deestryfikacji z utworzeniem pochodnej dikwasowej (imidaprilatu) oraz
- wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z utworzeniem pochodnej diketopiperazynowej.



RYCINA 4.28.

Mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach obecności wilgoci w powietrzu.

4.6.7. Ocena wpływu zmian temperatury na trwałość chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji w warunkach suchego powietrza

Badanie wpływu zmian temperatury na trwałość chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji w warunkach suchego powietrza przeprowadzono zgodnie z *Procedurami nr 4.10 - 4.14*. Selektywność zastosowanej *Metody RP-HPLC nr 1* zarówno w stosunku do chlorowodorku imidaprilu jak i jego produktu rozkładu potwierdziła analiza chromatogramu, zaprezentowanego na RYCINIE 4.4.D. Na podstawie uzyskanych wyników dokonano doboru kinetycznego modelu, opisującego mechanizm rozkładu badanej substancji leczniczej oraz przeprowadzono analizę parametrów kinetycznych obserwowanej reakcji.

Dobór kinetycznego modelu dla reakcji rozkładu czystej postaci chlorowodorku imidaprilu w warunkach podwyższonej temperatury i zerowej wilgotności względnej powietrza

Kinetyczny model obserwowanej reakcji rozkładu czystej postaci chlorowodorku imidaprilu w warunkach podwyższonej temperatury i zerowej wilgotności względnej powietrza ustalono na podstawie modelowania matematycznego zgodnie z postępowaniem, opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 (str. 89). Uzyskane wyniki zamieszczono w TABELI 4.34.

TABELA 4.34.

Dobór modelu kinetycznego dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu na podstawie danych doświadczalnych uzyskanych w warunkach RH = 0.0%, T = 378 K

Symbol reakcji	Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot t$	Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot (t')$
F0	0.996	0.995
F1	0.964	0.969
F2	0.831	0.846
F3	0.698	0.718
P2	-0.993	0.995
P3	0.950	0.975
P4	0.934	0.971
P_2^3	0.991	0.995
A2	0.996	0.997
A3	0.991	0.997
A4	0.983	0.997
B1	0.968	0.998
D1	0.978	0.987
D2	0.958	0.971
D3	0.918	0.934
D4	0.946	0.960
R1	0.996	0.995
R2	0.993	0.995
R3	0.987	0.989

* t jest czasem trwania testu a (t') jest skorygowanym czasem trwania testu uwzględniającym punkty należące do prostoliniowego odcinka wykresu funkcji $f(c) = t$.

Jak wynika z TABELI 4.34, najlepszą korelację danych uzyskano dla zależności *Prout-Tompkins'a* (model wzrostu zarodków, symbol B1). Wynik ten jest zgodny z analizą krzywej rozkładu $f(c) = t$, której graficznym obrazem jest krzywa sigmoidalna, co sugeruje, iż w wyżej wymienionych warunkach zachodzi reakcja autokatalityczna.

Analiza poszczególnych procesów kinetycznych

Dokonano analizy poszczególnych procesów kinetycznych zgodnie z postępowaniem opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 w akapicie, dotyczącym analizy procesów kinetycznych (str. 91). Uzyskane krzywe rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach testowych oraz odpowiadające im dane doświadczalne przedstawiono na RYCINACH 4.29 – 4.33 i w TABELACH 4.35 – 4.39.

$T = 363 \text{ K}, RH = 0.0 \%$

TABELA 4.35.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji na skutek rozkładu w $T = 363 \text{ K}, RH = 0.0 \%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	1		1.3723	99.90	*
2	5		1.3613	99.03	*
3	10		1.2628	91.87	*
4	20		1.1978	87.14	6.7760
5	39		1.0879	79.15	3.7962
6	48		0.9776	71.12	2.4626
7	60	1.3746	0.8630	62.78	1.6867
8	76		0.7032	51.16	1.0475
9	95		0.5633	40.98	0.6943
10	101		0.5243	38.14	0.6166
11	105		0.4693	34.14	0.5184
12	126		0.3867	28.13	0.3914
13	141		0.2746	19.98	0.2497

* okres indukcji

PARAMETRY PROSTEJ

$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$

$a = -0.0267$

$\Delta a = 0.0029$

$S_a = 0.0012$

$b = 2.2561$

$\Delta b = 0.2554$

$S_b = 0.1107$

$S_y = 0.1460$

$r = -0.992$

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]

$3.0932 \cdot 10^{-7}$

Δk [1/s]

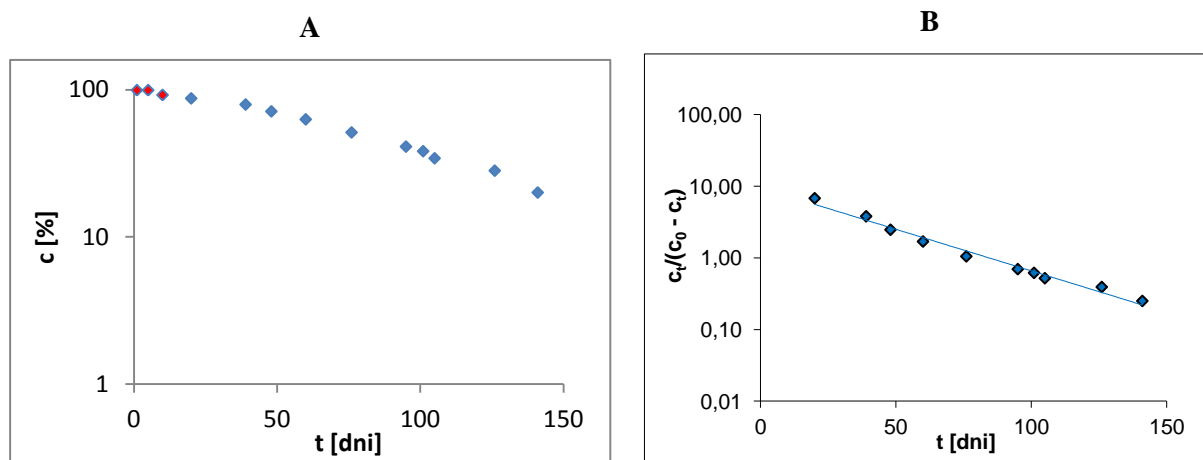
$0.3313 \cdot 10^{-7}$

$t_{0.5}$ [dni]

84.4

$t_{0.1}$ [dni]

2.2



RYCINA 4.29.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 363 \text{ K}$ i $RH = 0.0 \%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 368 \text{ K}, RH = 0.0 \%$

TABELA 4.36.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji na skutek rozkładu w $T = 368 \text{ K}, RH = 0.0 \%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	1	1.3746	1.3704	99.69	*
2	5		1.3494	98.17	*
3	10		1.2548	91.29	*
4	19		1.0330	75.16	3.0258
5	23		0.9896	71.99	2.5702
6	25		0.9042	65.78	1.9223
7	29		0.8278	60.22	1.5138
8	31		0.7991	58.13	1.3883
9	34		0.7622	55.45	1.2447
10	40		0.6430	46.78	0.8790
11	48		0.5300	38.56	0.6276
12	52		0.4039	29.98	0.4282
13	60		0.3050	22.19	0.2852

* okres indukcji

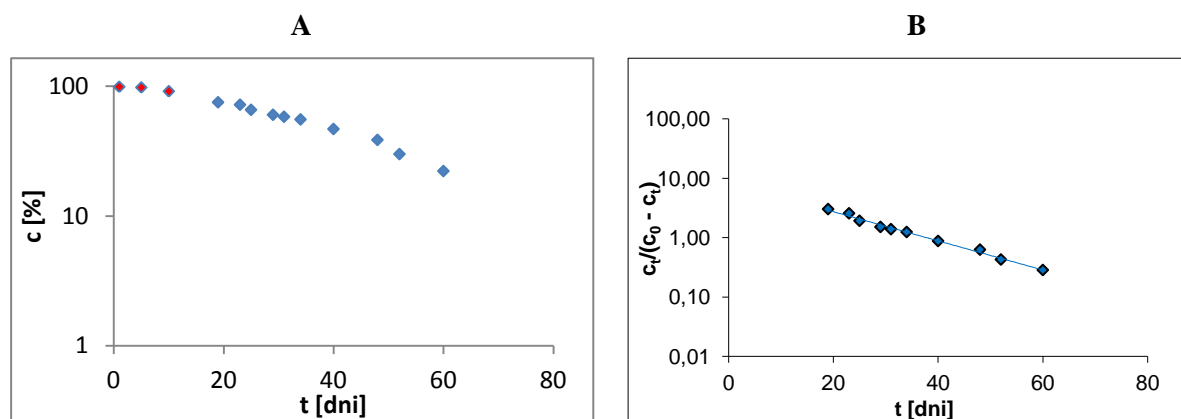
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$a = -0.0565$	$\Delta a = 0.0042$	$S_a = 0.0018$
$b = 2.1362$	$\Delta b = 0.1592$	$S_b = 0.0690$
$S_v = 0.0731$	$r = -0.996$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$6.5384 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.4808 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	37.8
$t_{0.1}$ [dni]	1.1



RYCINA 4.30.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 368 \text{ K}$ i $RH = 0.0 \%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 373\text{ K}, RH = 0.0\%$

TABELA 4.37.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji na skutek rozkładu w $T = 373\text{ K}, RH = 0.0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	1		1.2484	99.00	*
2	5		1.1619	92.14	*
3	10		0.9985	79.18	*
4	12		0.8570	67.96	2.1711
5	14		0.7835	62.13	1.6406
6	16		0.7306	57.94	1.3776
7	18		0.6266	49.69	0.9877
8	21	1.2610	0.5632	44.67	0.8073
9	22		0.5315	42.15	0.7286
10	23		0.5109	40.52	0.6812
11	25		0.4809	38.14	0.6166
12	28		0.4179	33.14	0.4957
13	30		0.3539	28.07	0.3902
14	34		0.2875	22.80	0.2850

* okres indukcji

PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$$a = -0.0887$$

$$\Delta a = 0.0083$$

$$S_a = 0.0036$$

$$b = 1.7120$$

$$\Delta b = 0.1911$$

$$S_b = 0.0829$$

$$S_y = 0.0781$$

$$r = -0.993$$

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$$k [1/s]$$

$$1.0264 \cdot 10^{-6}$$

$$\Delta k [1/s]$$

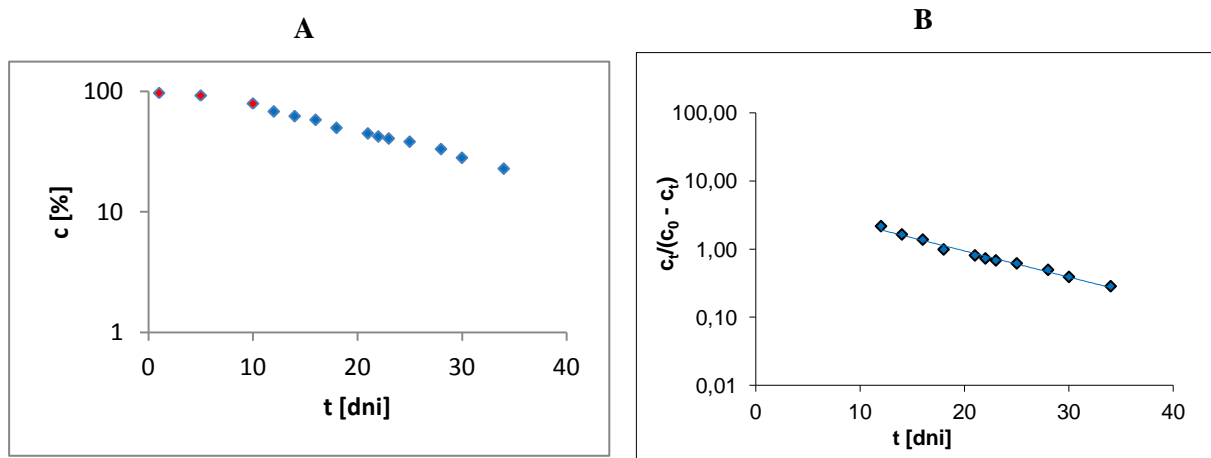
$$0.9602 \cdot 10^{-7}$$

$$t_{0.5} [\text{dni}]$$

$$19.3$$

$$t_{0.1} [\text{dni}]$$

$$5.4$$



RYCINA 4.31.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 373\text{ K}$ i $RH = 0.0\%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 378 \text{ K}, RH = 0.0 \%$

TABELA 4.38.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji na skutek rozkładu w $T = 378 \text{ K}, RH = 0.0 \%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	1		1.2805	99.09	*
2	2		1.2777	98.88	*
3	3		1.1975	92.67	*
4	5		1.1431	88.46	7.6655
5	6		1.0999	85.12	5.7204
6	9		0.9839	76.14	3.1911
7	12		0.8804	68.13	2.1377
8	14	1.2922	0.7092	54.88	1.2163
9	19		0.4983	38.56	0.6276
10	22		0.3896	30.15	0.4316
11	26		0.2142	16.58	0.1988
12	28		0.1313	10.16	0.1131
13	32		0.0759	5.88	0.0625

* okres indukcji

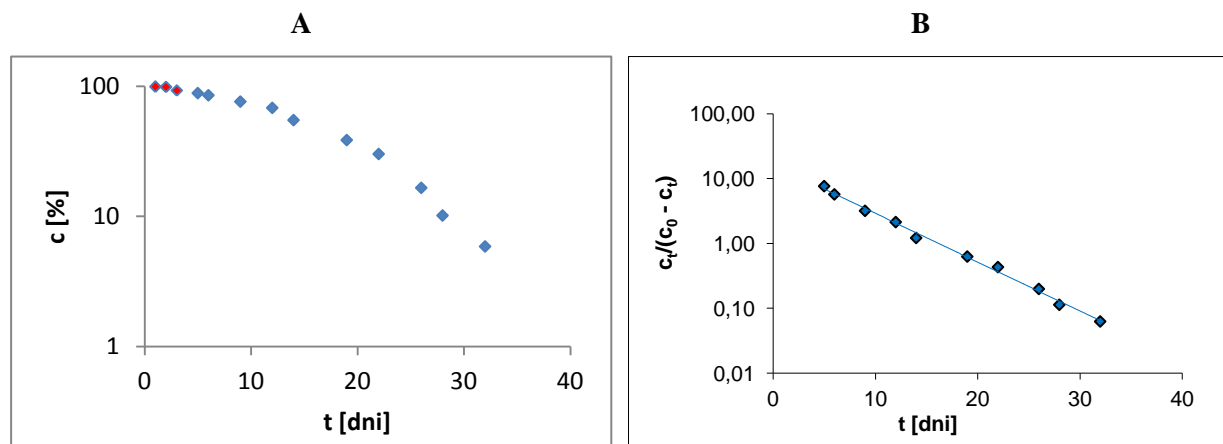
PARAMETRY PROSTEJ

$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$

$a = -0.1735$	$\Delta a = 0.0093$	$S_a = 0.0040$
$b = 2.8039$	$\Delta b = 0.1812$	$S_b = 0.0786$
$S_y = 0.1151$	$r = -0.998$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$2.0082 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$0.1074 \cdot 10^{-6}$
$t_{0.5}$ [dni]	16.2
$t_{0.1}$ [dni]	3.5



RYCINA 4.32.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 378 \text{ K}$ i $RH = 0.0 \%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

$T = 383\text{ K}$, $RH = 0.0\%$

TABELA 4.39.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji na skutek rozkładu w $T = 383\text{ K}$, $RH = 0.0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$c_t/(c_0 - c_t)$
1	0.5	1.2610	1.2572	99.69	*
2	1		1.2373	98.12	*
3	1.5		1.2123	96.14	*
4	2		1.1237	89.11	*
5	3		0.9178	72.78	2.6738
6	4		0.7924	62.84	1.6911
7	5		0.5450	43.22	0.7612
8	6		0.4295	34.06	0.5165
9	7		0.3802	30.15	0.4316
10	7.5		0.3406	27.01	0.3701
11	8		0.2458	19.49	0.2421
12	9		0.1933	15.33	0.1811
13	11		0.1091	8.65	0.0947
14	12		0.0573	4.55	0.0477
15	13		0.0396	3.14	0.0324

* okres indukcji

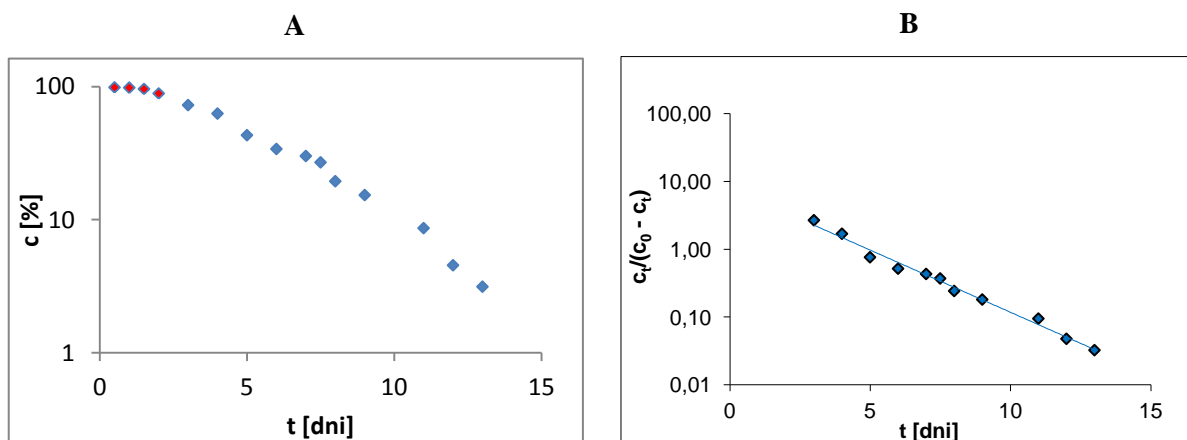
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$$

$a = -0.4224$	$\Delta a = 0.0350$	$S_a = 0.0152$
$b = 2.0821$	$\Delta b = 1.3406$	$S_b = 0.1271$
$S_y = 0.1562$	$r = -0.994$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$4.8894 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$0.4055 \cdot 10^{-6}$
$t_{0.5}$ [dni]	4.9
$t_{0.1}$ [dni]	0.3



RYCINA 4.33.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w $T = 383\text{ K}$ i $RH = 0.0\%$ przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln c_t/(c_0 - c_t) = a \cdot t + b$. Kolorem czerwonym oznaczono okres indukcji.

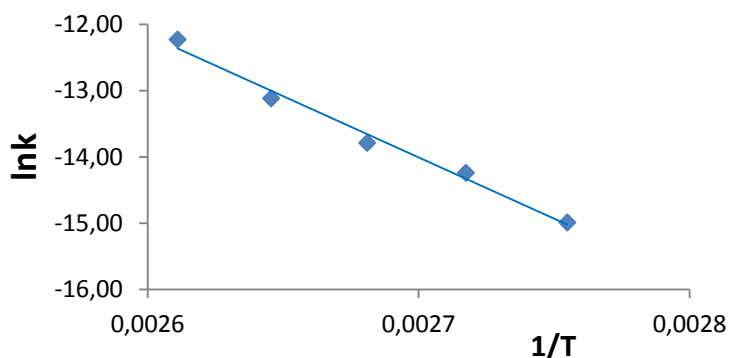
Zależność Arrhenius'a (T 363 – 383 K, $RH = 0.0\%$)

Ustalono, iż wyznaczone wartości stałych szybkości rozkładu badanej substancji w warunkach eksperymentalnych spełniają prostoliniową zależność Arrhenius'a $\ln k = f(1/T)$ (RYCINA 4.34), której parametry regresji przedstawiono w TABELI 4.40. Na podstawie wyznaczonego równania obliczono parametry termodynamiczne reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w temperaturze 298 K w warunkach suchego powietrza (RH 0.0%) korzystając ze wzorów podanych w ROZDZIALE 3.6.3 (str. 57-58).

TABELA 4.40.

Parametry prostej, stanowiącej obraz zależności Arrhenius'a dla rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji w $T = 363 - 383$ K, $RH = 0.0\%$ wraz z obliczonymi parametrami termodynamicznymi

<i>Lp.</i>	<i>T [K]</i>	<i>1/T · 10³</i>	<i>k ± Δk [1/s]</i>
1	363	2.754821	$(3.0932 \pm 0.3313) \cdot 10^{-7}$
2	368	2.717391	$(6.5384 \pm 0.4808) \cdot 10^{-7}$
3	373	2.680965	$(1.0264 \pm 0.0960) \cdot 10^{-6}$
4	378	2.645503	$(2.0082 \pm 0.1074) \cdot 10^{-6}$
5	383	2.610966	$(4.8894 \pm 0.4055) \cdot 10^{-6}$
PARAMETRY PROSTEJ			
<i>lnk = f(1/T)</i>			
$a \pm \Delta a = -18417 \pm 3463$			
$S_a = 1247$			
$b \pm \Delta b = 35 \pm 9$			
$S_b = 3.3$			
$r = -0.993$			
PARAMETRY TERMODYNAMICZNE			
w $T = 298$ K			
$E_a = 153 \pm 28$ [kJ · mol ⁻¹]			
$\Delta H^\ddagger = 150 \pm 31$ [kJ · mol ⁻¹]			
$\Delta S^\ddagger = 51 \pm 167$ [J · K ⁻¹ · mol ⁻¹]			



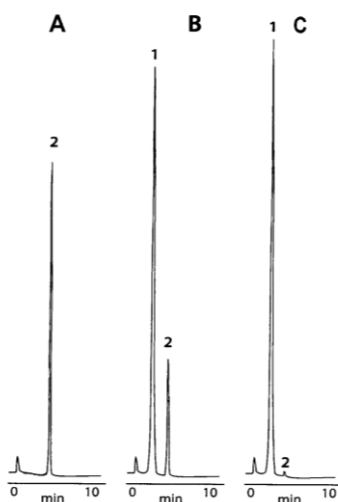
RYCINA 4.34.

Zależność Arrhenius'a dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach RH 0.0%.

Uzyskana prostoliniowa zależność $\ln k = f(1/T)$ potwierdza, iż w zastosowanych warunkach kinetycznych eksperymentu wzrost temperatury nie powoduje zmian mechanizmu obserwowanej reakcji rozkładu a jedynie przyspiesza jej przebieg.

4.6.8. Analiza kinetyki tworzenia oraz identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu powstających w warunkach podwyższonej temperatury oraz suchego powietrza

Analizę kinetyki tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji w warunkach podwyższonej temperatury oraz suchego powietrza ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0.0\%$) przeprowadzono zgodnie z *Procedurami nr 4.10 – 4.15* za pomocą *Metody RP-HPLC nr 1*, która zapewniła zadowalający rozdział związków obecnych w badanej próbce (RYCINA 4.35). Analizując otrzymane chromatogramy RP-HPLC zmian stężenia chlorowodorku imidaprilu w czasie zauważono, że w $T = 378 \text{ K}$, $RH = 0.0\%$ powstaje jeden produkt rozkładu. Na podstawie uzyskanych wyników dokonano doboru kinetycznego modelu, opisującego mechanizm tworzenia produktu rozkładu badanego leku na podstawie modelowania matematycznego, zgodnie z postępowaniem opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 (str. 89). Uzyskane wyniki zamieszczono w TABELI 4.41.



RYCINA 4.35.

Chromatogram RP-HPLC, przedstawiający 1- produkt rozkładu chlorowodorku imidaprilu - $t_R = 3 \text{ min}$, 2- chlorowodorek imidaprilu - $t_R = 5 \text{ min}$ (A) chlorowodorek imidaprilu niepoddany rozkładowi; (B) chlorowodorek imidaprilu poddany rozkładowi ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0.0\%$, $t = 6 \text{ dni}$); (C) chlorowodorek imidaprilu poddany rozkładowi ($T = 378 \text{ K}$, $RH = 0.0\%$, $t = 15 \text{ dni}$).

TABELA 4.41.

Dobór modelu kinetycznego dla reakcji tworzenia produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu na podstawie danych doświadczalnych uzyskanych w warunkach RH = 0.0%, T = 378 K

Symbol reakcji	Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot t$	Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot (t')$
F0	0.934	0.983
F1	0.986	0.994
F2	0.983	0.961
F3	0.946	0.899
P2	0.967	0.994
P3	0.912	0.969
P4	0.909	0.967
P ₂ ³	0.948	0.989
A2	0.974	0.993
A3	0.968	0.994
A4	0.965	0.992
<u>B1</u>	0.976	<u>0.995</u>
D1	0.958	0.993
D2	0.976	0.994
D3	0.988	0.989
D4	0.981	0.993
R1	0.917	0.983
R2	0.950	0.994
R3	0.959	0.993

* t jest czasem trwania testu a (t') jest skorygowanym czasem trwania testu uwzględniającym punkty, należące do prostoliniowego odcinka wykresu funkcji $f(c) = t$.

Jak wynika z TABELI 4.41, najlepszą korelację danych dla produktu nr 1 uzyskano dla zależności Prout-Tompkins'a (model wzrostu zarodków, symbol B1). Wynik ten jest zgodny z analizą krzywej tworzenia $f(c) = t$, której graficznym obrazem jest krzywa sigmoidalna, co sugeruje, iż w wyżej wymienionych warunkach zachodzi reakcja autokatalityczna.

Analiza procesu kinetycznego

Analizę procesu kinetycznego, związanego z tworzeniem produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach $T = 373$ K i $RH = 0.0\%$ przeprowadzono zgodnie z przepisem podanym w ROZDZIALE 4.6.4, w akapicie dotyczącym analizy procesu kinetycznego (str. 91). Uzyskane krzywe rozkładu chlorowodorku imidaprilu i krzywe tworzenia produktu nr 1 w warunkach testowych oraz dopowiadające im dane doświadczalne przedstawiono na RYCINIE 4.36 oraz w TABELI 4.42 – 4.43.

Produkt nr 1; T = 378 K, RH = 0.0 %

TABELA 4.42.

Zmiany stężenia produktu nr 1, powstającego w wyniku rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji (P_i/P_{wz}) w T = 378 K, RH = 0.0 % wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_∞	$P_t = P_i/P_{wz}$	$(P_\infty - P_t)/P_t$
1	1		0.1109	*
2	3		0.1254	*
3	5		0.1299	*
4	7		0.1526	7.1913
5	9		0.1816	5.8833
6	10		0.2121	4.8934
.7	11	1.25	0.2514	3.9722
8	12		0.2814	3.4421
9	13		0.3315	2.7707
10	14		0.3816	2.2757
11	16		0.4866	1.5688
12	18		0.5433	1.3006
13	20		0.7211	0.7335

*** okres indukcji**

PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln (P_\infty - P_t)/P_t = -a \cdot t + b$$

$a = -0.1758$	$\Delta a = 0.0136$	$S_a = 0.0060$
$b = 3.3043$	$\Delta b = 0.1874$	$S_b = 0.0812$
$S_v = 0.0734$	$r = -0.995$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$k [1/s]$	$2.0344 \cdot 10^{-6}$
$\Delta k [1/s]$	$0.1569 \cdot 10^{-6}$

Chlorowodorek imidaprilu; $T = 378\text{ K}$, $RH = 0.0\%$

TABELA 4.43.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w substancji (P_i/P_{wz}) w $T = 373\text{ K}$, $RH = 0.0\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

<i>Lp.</i>	<i>t</i> [dni]	$P_t = (P_i/P_{wz})$	$P_t/(P_0 - P_t)$
1	1	1.1889	*
2	5	1.1145	*
3	7	1.0294	*
4	9	1.0053	*
5	11	0.9416	2.7026
6	12	0.8816	2.1587
7	13	0.8116	1.6965
8	14	0.8015	1.6407
9	16	0.6712	1.0847
10	18	0.6055	0.8846
11	20	0.5219	0.6795
11	22	0.3514	0.3744
12	25	0.2117	0.1963
13	27	0.1590	0.1406

* okres indukcji

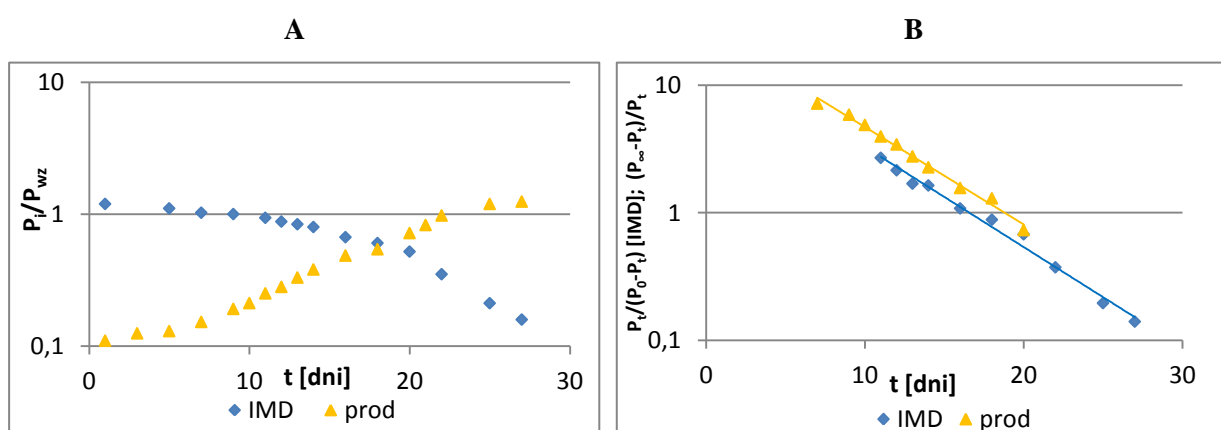
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln P_t/(P_0 - P_t) = a \cdot t + b$$

$a = -0.1808$	$\Delta a = 0.0157$	$S_a = 0.0133$
$b = 2.9975$	$\Delta b = 0.2977$	$S_b = 0.1291$
$S_y = 0.1163$	$r = -0.994$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$2.0929 \cdot 10^{-6}$
Δk [1/s]	$0.1856 \cdot 10^{-6}$
$t_{0.5}$ [h]	16.58
$t_{0.1}$ [h]	4.43



RYCINA 4.36.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu (IMD) oraz tworzenia jego produktów degradacji (prod) w warunkach $T = 378\text{ K}$ i $RH = 0.0\%$ przedstawiający zmiany stężenia wymienionych związków (P_i/P_{wz}) jako funkcji czasu (t [dni]); (A) półlogarytmiczna zależność $c = f(t)$; (B) zależność liniowa $\ln P_t/(P_0 - P_t) = a \cdot t + b$ (IMD) oraz $\ln(P_\infty - P_t)/P_t = -a \cdot t + b$ (prod).

Celem interpretacji uzyskanych danych doświadczalnych przeprowadzono test równości współczynników kierunkowych prostych. Uzyskane wyniki przedstawiono w TABELI 4.44.

TABELA 4.44.

Test równości współczynników kierunkowych prostych opisujących proces tworzenia produktu nr 1 oraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach $T = 378\text{ K}$, $RH = 0.0\%$

HIPOTEZY

$$H_0: a_1 = a_2$$

$$H_1: a_1 \neq a_2$$

Populacja nr I (Prod)

$$\ln(P_\infty - P_t)/P_t = -0.1758 \cdot t + 3.3043; (n = 10)$$

Populacja nr II (IMD)

$$\ln P_t / (P_\infty - P_t) = -0.1808 + 2.9975 \cdot t; (n = 10)$$

$$S_{a_1 - a_2} = 0.0092$$

$$|t| = 0.5449$$

$$t(\alpha = 0.05; df = 16) = 2.120$$

$$|t| < t(\alpha; df)$$

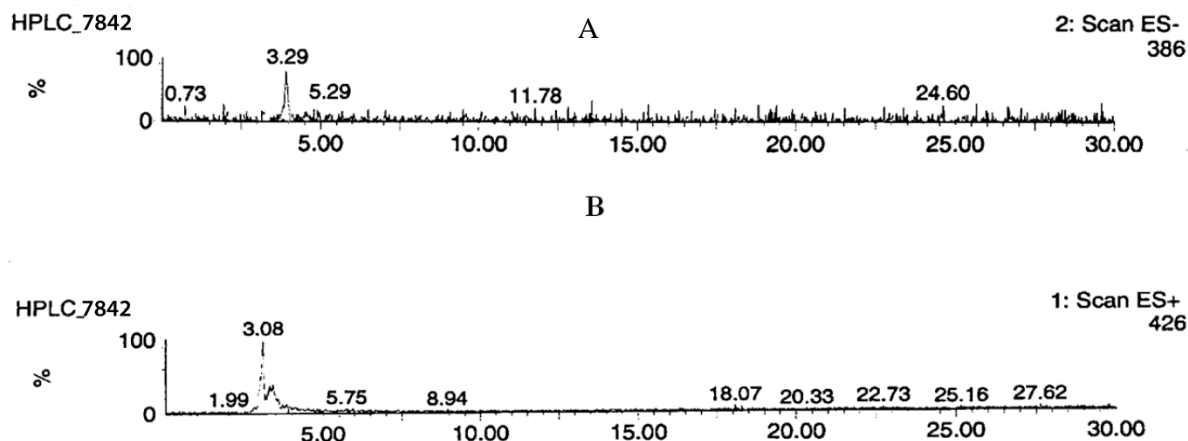
WYNIK

Brak podstaw do odrzucenia H_0 , a więc współczynniki regresji liniowej a_1 i a_2 nie różnią się istotnie, zatem stałe szybkości rozkładu chlorowodorku imidaprilu oraz tworzenia produktu nr 1 nie wykazują różnic pod względem statystycznym, a więc rozkład IMD w tych warunkach prowadzi do tworzenia jednego produktu rozkładu IMD.

Identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji w warunkach suchego powietrza

Tożsamość chlorowodorku imidaprilu potwierdzono analizą HPLC-MS, wykonaną dla próbki tego leku w postaci czystej substancji, której niepoddawano procesowi rozkładu. Odpowiednie chromatogramy oraz widma masowe zaprezentowano na RYCINACH 4.23 – 4.24.

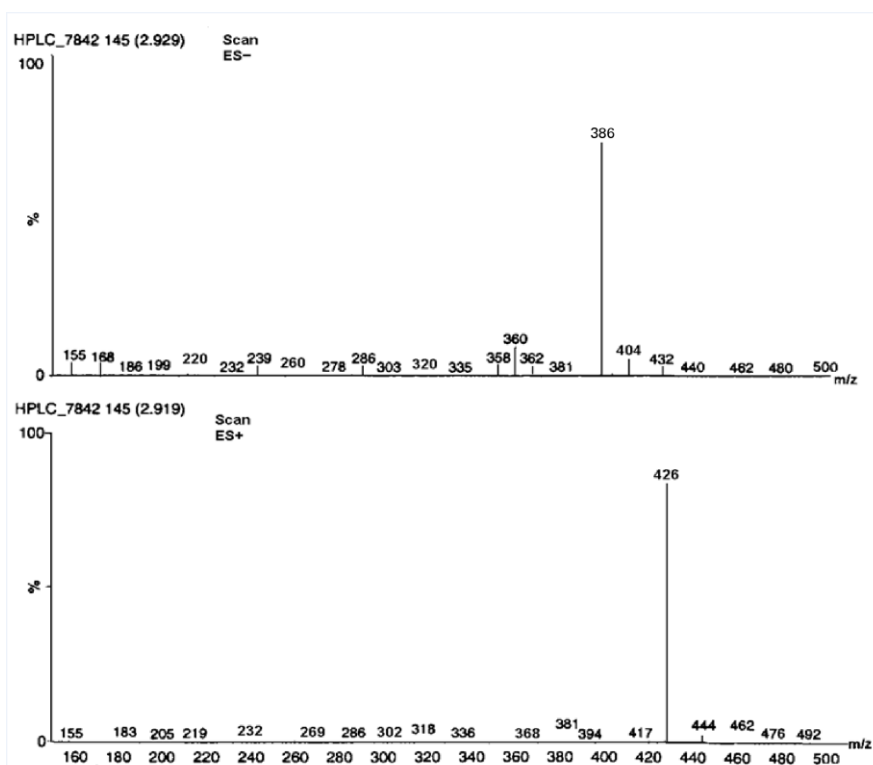
Identyfikacja produktu rozkładu, tworzącego się w trakcie degradacji chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji w warunkach $T = 378\text{ K}$, $RH = 0.0\%$, $t = 15$ dni została wykonana drogą analizy jakościowej metodą HPLC-MS, zgodnie z *Procedurą nr 4.15*. Z uwagi na całkowity rozkład badanej substancji leczniczej, otrzymany chromatogram HPLC-MS charakteryzował się obecnością jednego piku, pochodzącego od badanego produktu rozkładu o wartości $t_R \sim 3.29$ min dla formy anionowej ES^- oraz $t_R \sim 3.08$ min dla formy kationowej ES^+ (RYCINA 4.37).



RYCINA 4.37.

Chromatogramy HPLC-MS otrzymane dla próbki chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji po 15 dniach ogrzewania w $T = 378\text{ K}$ i $RH = 0.0\%$: (A) chromatogram anionowy ES-, (B) chromatogram kationowy ES+.

Widma masowe odpowiadające ww. chromatogramom przedstawiono na RYCINIE 4.38.



RYCINA 4.38.

Widma spektrometrii mas próbki chlorowodorku imidaprilu rozłożonego ($T=378\text{ K}$, $RH=0.0\%$, $t = 15$ dni), zawierającej produkt rozkładu; forma anionowa ES⁻ $m/z = 386$ i forma kationowa (potasowa) ES⁺ $m/z = 426$.

Obserwowane sygnały na widmach spektroskopii mas o wartościach $m/z = 386$ (pozorny jon molekularny typu $[M - H]^-$) oraz $m/z = 426$ (pozorny jon molekularny typu $[M + K]^+$) zostały przypisane prawdopodobnemu produktowi rozkładu, który zidentyfikowano jako pochodna diketopiperazynowa chlorowodorku imidaprilu (DKP). Wartość $m/z = 426$ jest liczbowo równa masie

cząsteczkowej pochodnej diketopiperazynowej IMD powiększonej o masę potasu, podczas gdy wartość $m/z = 386$ jest liczbowo równa masie cząsteczkowej pochodnej diketopiperazynowej IMD pomniejszonej o masę protonu. Oznacza to, że masa cząsteczkowa produktu roykadu IMD wynosi 387 u. (TABELA 4.45).

TABELA 4.45.
Identyfikacja produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu ($T=378\text{ K}$, $RH = 0.0\%$) drogą analizy wartości m/z odczytanych z widm masowych

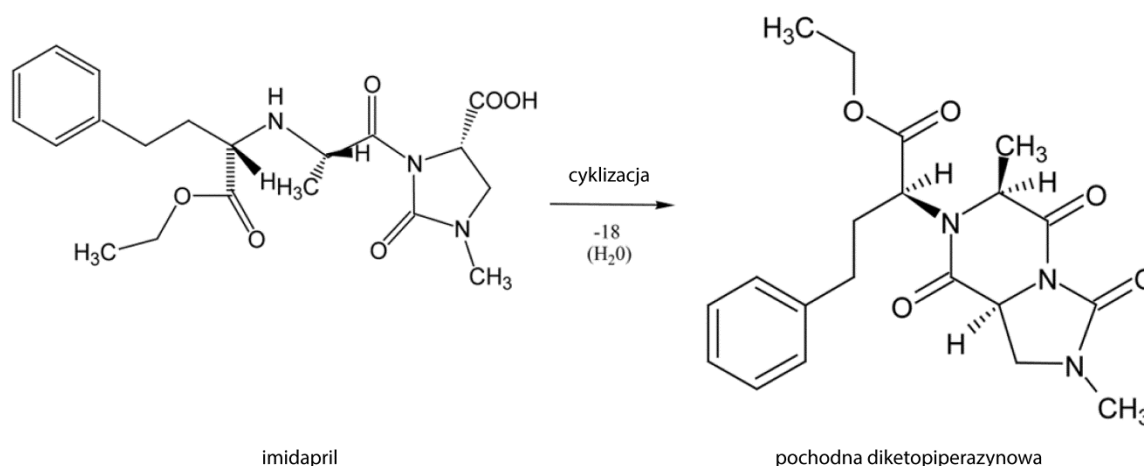
Związek	Wzór sumaryczny	Obliczona masa cząsteczkowa (u)	Wartość m/z na widmie ES+ jon $[M-K]^+$	Wartość m/z na widmie ES- jon $[M-H]^-$
Produkt nr 1 DKP*	$C_{20}H_{25}N_3O_5$	387	426**	386

* DKP pochodna diketopiperazynowa chlorowodorku imidaprilu
** $[M-K]^+$ forma potasowa

Stwierdzono, że chlorowodorek imidaprilu w powyższych warunkach kinetycznych ulega degradacji z utworzeniem jednego produktu rozkładu: pochodnej diketopiperazynowej.

Mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach zerowej wilgotności powietrza

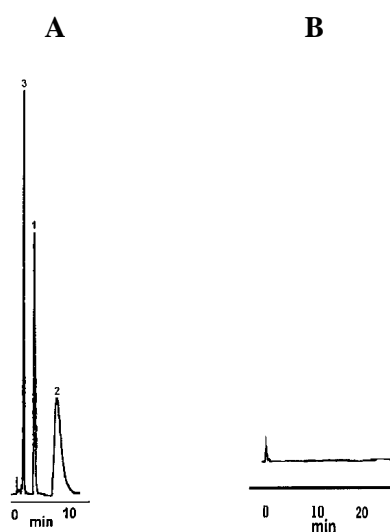
Na podstawie uzyskanych wyników identyfikacji produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach kinetycznych $T = 378\text{ K}$, $RH = 0.0\%$ ustalono prawdopodobny mechanizm reakcji degradacji badanej substancji leczniczej. Określono, iż ww. warunkach chlorowodorek imidaprilu ulega cyklizacji z utworzeniem pochodnej diketopiperazynowej, zgodnie z zamieszczonym poniżej schematem (RYCINA 4.39).



RYCINA 4.39.
Mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji w warunkach suchego powietrza.

4.6.9. Analiza trwałości chlorowodorku imidaprilu w obecności substancji pomocniczych

Do analizy wpływu obecności substancji pomocniczej na trwałość chlorowodorku imidaprilu wybrano stearynian magnezu z uwagi na jego powszechne zastosowanie w technologii trwałych postaci leku jako substancji poślizgowej oraz ze względu na rozliczne doniesienia literaturowe o możliwości wystąpienia interakcji pomiędzy tym związkiem a substancją leczniczą. Badanie wykonano zgodnie z *Procedurami nr 4.16 - 4.19* za pomocą *Metody RP-HPLC nr 3*. Selektywność tej metody potwierdzono drogą analizy jakości otrzymanego chromatogramu zaprezentowanego na RYCINIE 4.40.



RYCINA 4.40.

(A) RP-HPLC chromatogram uzyskany dla mieszaniny modelowej chlorowodorku imidaprilu ze stearynianem magnezu za pomocą Metody RP-HPLC nr 3; (1) chlorowodorek imidaprilu $t_R=5$ min, (2) wzorzec wewnętrzny $t_R=8$ min, (3) produkt rozkładu $t_R=3$ min.
(B) RP-HPLC chromatogram dla metanolowego roztworu stearynianu magnezu (w przedziale czasu od 0 do 20 min nie zaobserwowano żadnych sygnałów).

Dobór kinetycznego modelu reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach podwyższonej temperatury i podwyższonej wilgotności względnej powietrza w obecności stearynianu magnezu

Kinetyczny model obserwowanej reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu warunkach temperatury 318 K i podwyższonej wilgotności względnej powietrza ustalono na podstawie modelowania matematycznego, zgodnie z przepisem podanym w ROZDZIALE 4.6.4 (str. 89). Uzyskane wyniki zamieszczono w TABELI 4.46.

TABELA 4.46.

Dobór modelu kinetycznego dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu na podstawie danych doświadczalnych, uzyskanych w warunkach RH = 76.4%, T = 318 K, gdzie t jest czasem trwania testu

Symbol reakcji	Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot t$
F0	0.926
<u>F1</u>	<u>0.997</u>
F2	0.954
F3	0.871
P2	0.974
P3	0.859
P4	0.849
P_2^3	0.958
A2	0.973
A3	0.956
A4	0.945
B1	0.960
D1	0.978
D2	0.995
D3	0.995
D4	0.996
R1	0.926
R2	0.975
R3	0.985

Najlepszą korelację danych uzyskano dla reakcji pierwszego rzędu (F1). Wynik ten jest zgodny z analizą krzywej rozkładu $f(c) = t$, której graficznym obrazem jest funkcja wykładnicza.

Analiza poszczególnych procesów kinetycznych

Dokonano analizy poszczególnych procesów kinetycznych zgodnie z postępowaniem opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 w akapicie dotyczącym analizy procesów kinetycznych (str. 91). Uzyskane krzywe rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach testowych oraz odpowiadające im dane doświadczalne przedstawiono na RYCINACH 4.41 - 4.44 oraz w TABELACH 4.47 – 4.50.

$T = 318 \text{ K}, RH = 50.9 \%$

TABELA 4.47.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu, zachodzące na skutek rozkładu w $T = 318 \text{ K}, RH = 50.9 \%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	<i>P_{IMD}/P_{IS} dla t_0</i>	<i>P_{IMD}/P_{IS} dla t_h</i>	<i>c_t (%)</i>
1	7	1.1938	1.0999	92.14
2	17		1.0762	90.15
3	25		0.9843	82.45
4	29		0.9414	78.86
5	45		0.8475	70.99
6	55		0.7538	63.14
7	65		0.6585	55.16
8	75		0.6224	52.14
9	98		0.5155	43.18
10	120		0.4606	38.58
11	170		0.3601	30.16
12	200		0.2946	24.68

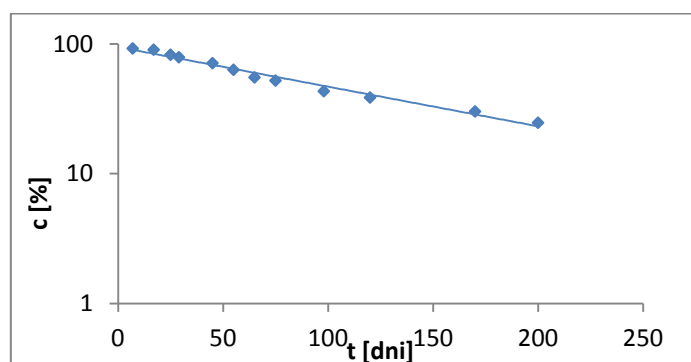
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0070$	$\Delta a = 0.0007$	$S_a = 0.0003$
$b = 4.5483$	$\Delta b = 0.0693$	$S_b = 0.0293$
$S_y = 0.0622$	$r = -0.991$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$8.1412 \cdot 10^{-8}$
Δk [1/s]	$0.7807 \cdot 10^{-8}$
$t_{0.5}$ [dni]	98.5
$t_{0.1}$ [dni]	14.9



RYCINA 4.41.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w $T = 318 \text{ K}$ i $RH = 50.9 \%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

$T = 318\text{ K}, RH = 60.5\%$

TABELA 4.48.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu, zachodzące na skutek rozkładu w $T = 318\text{ K}, RH = 60.5\%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	7	1.1938	1.0763	90.16
2	17		1.0522	88.14
3	25		0.9564	80.11
4	29		0.9127	76.45
5	45		0.8172	68.45
6	55		0.7269	60.89
7	65		0.6302	52.79
8	75		0.5765	48.29
9	98		0.4873	40.82
10	120		0.4416	36.99
11	170		0.2693	22.56
12	200		0.2334	19.55

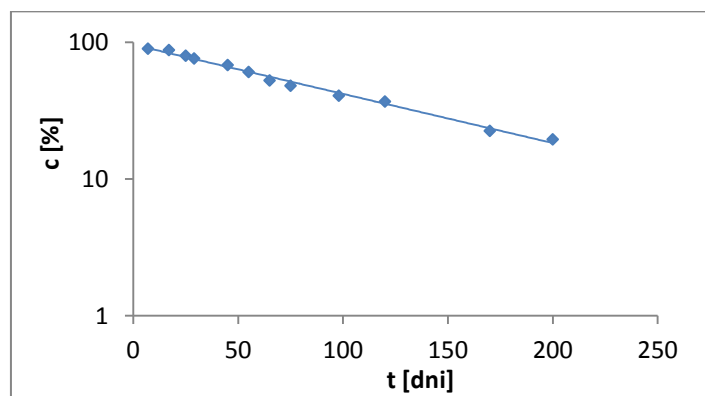
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0083$	$\Delta a = 0.0005$	$S_a = 0.0002$
$b = 4.5662$	$\Delta b = 0.0526$	$S_b = 0.0223$
$S_y = 0.0473$	$r = -0.996$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$9.5886 \cdot 10^{-8}$
Δk [1/s]	$0.5933 \cdot 10^{-8}$
$t_{0.5}$ [dni]	83.6
$t_{0.1}$ [dni]	12.7



RYCINA 4.42.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w $T = 318\text{ K}$ i $RH = 60.5\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

$$T = 318 \text{ K}, RH = 66.9 \%$$

TABELA 4.49.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu zachodzące na skutek rozkładu w $T = 318 \text{ K}$, $RH = 66.9 \%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	7	1.1938	1.0764	90.17
2	17		1.0051	84.19
3	25		0.9179	76.89
4	29		0.8135	68.14
5	45		0.7158	59.96
6	55		0.6139	51.88
7	65		0.5519	46.23
8	75		0.4798	40.19
9	98		0.4319	36.18
10	120		0.3359	28.14
11	170		0.2012	16.85
12	200		0.1367	11.45

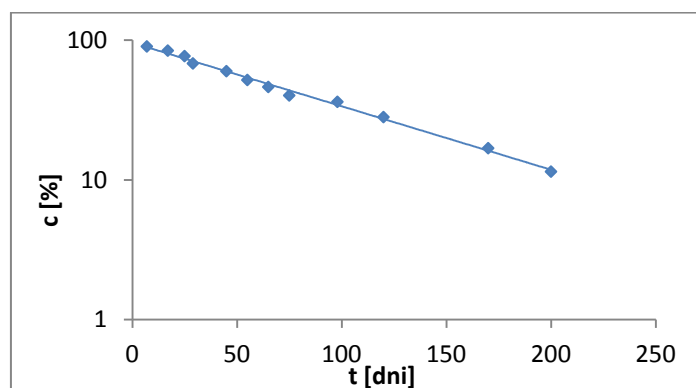
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0105$	$\Delta a = 0.0005$	$S_a = 0.0002$
$b = 4.5633$	$\Delta b = 0.0533$	$S_b = 0.0225$
$S_y = 0.0479$	$r = -0.997$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$1.2132 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.0601 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	66.1
$t_{0.1}$ [dni]	10.1



RYCINA 4.43.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w $T = 318 \text{ K}$ i $RH = 66.9 \%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

$$T = 318 \text{ K}, RH = 76.4 \%$$

TABELA 4.50.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu zachodzące na skutek rozkładu w $T = 318 \text{ K}$, $RH = 76.4 \%$ wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	7	1.1938	1.0165	85.15
2	17		0.8371	70.12
3	25		0.8135	68.14
4	29		0.6702	56.14
5	45		0.5745	48.12
6	55		0.4909	41.12
7	65		0.4553	38.14
8	75		0.3596	30.12
9	98		0.3001	25.14
10	120		0.2409	20.18
11	170		0.1210	10.14
12	200		0.0852	7.14

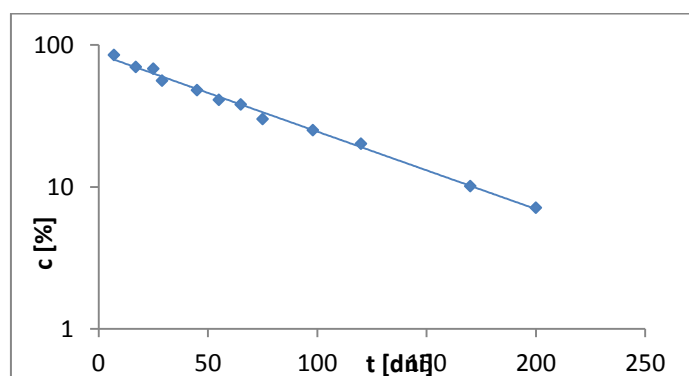
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0126$	$\Delta a = 0.0006$	$S_a = 0.0003$
$b = 4.4567$	$\Delta b = 0.0653$	$S_b = 0.0276$
$S_y = 0.0587$	$r = -0.997$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$1.4548 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.0736 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	55.1
$t_{0.1}$ [dni]	8.4



RYCINA 4.44.

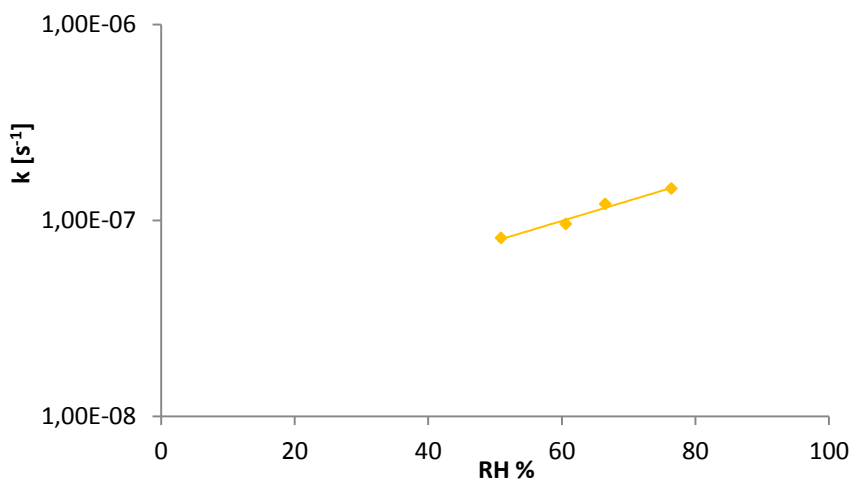
Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w $T = 318 \text{ K}$ i $RH = 76,4 \%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

Ocena wpływu wartości wilgotności względnej powietrza na szybkość rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w $T = 318\text{ K}$, RH (50.9 – 76.4 %)

Ustalono, iż wyznaczone wartości stałych szybkości rozkładu badanej substancji leczniczej w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu spełniają prostoliniową zależność $\ln k = f(RH\%)$ (RYCINA 4.45), której parametry regresji przedstawiono w TABELI 4.51.

TABELA 4.51.
Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu; parametry prostej $\ln k = f(RH\%)$

$RH\%$	$10^{-7} k \pm \Delta k$ [1/s]	$-r$	n	Parametry prostej $\ln k = f(RH\%)$
50.9	0.8141 ± 0.0781	0.990	12	$a \pm \Delta a = (0.0234 \pm 0.006)$ $S_a = 0.0026$
60.6	0.9589 ± 0.0593	0.996	12	$b \pm \Delta b = (-17.53 \pm 0.71)$
66.5	1.2132 ± 0.0601	0.997	12	$S_b = 0.1661$
76.4	1.4548 ± 0.0736	0.997	12	$r = 0.988$

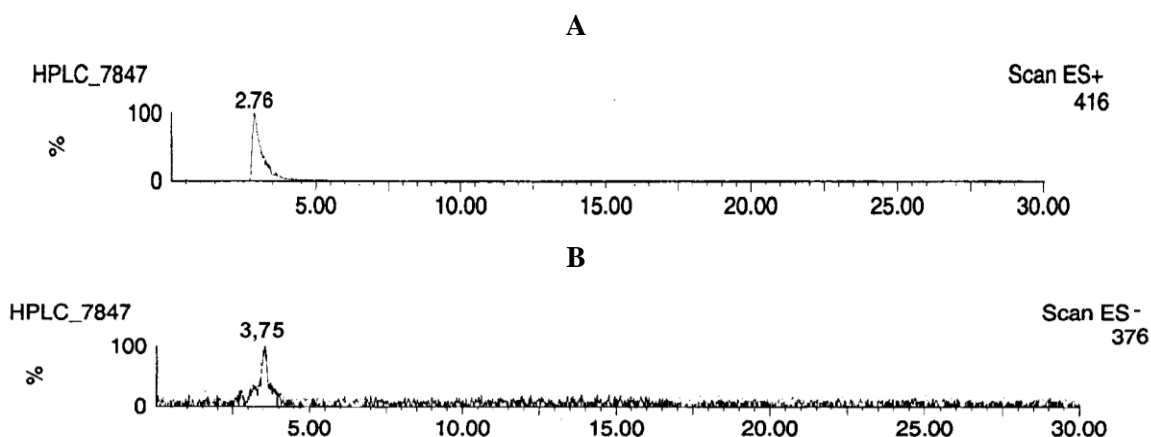


RYCINA 4.45.
Wpływ zmiennej $RH\%$ na trwałość chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu; półlogarytmiczny wykres obserwowanej stałej szybkości reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem (k [1/s]) jako funkcji wilgotności względnej powietrza ($RH\%$) w warunkach kinetycznych ($T = 318\text{ K}$, $RH = 50.9 - 76.4\%$).

Uzyskana prostoliniowa zależność (RYCINA 4.45) potwierdza, iż wzrost poziomu wilgotności względnej powietrza nie wpływa na zmianę mechanizmu obserwowanej reakcji a jedynie przyczynia się do wzrostu ilości kolizji pomiędzy reagującymi cząstkami, co powoduje przyspieszenie jej przebiegu.

Identyfikacja produktów rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w warunkach podwyższonej wilgotności powietrza

Identyfikacja produktu rozkładu, tworzącego się w trakcie degradacji chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w warunkach $T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$, $t = 215$ dni została wykonana drogą analizy jakościowej metodą HPLC-MS, zgodnie z *Procedurą nr 4.15*. Z uwagi na całkowity rozkład badanej substancji leczniczej otrzymany chromatogram HPLC-MS charakteryzował się obecnością jednego piku, pochodzącego od badanego produktu rozkładu o wartości $t_R \sim 3.75$ min dla formy anionowej ES^- oraz $t_R \sim 2.76$ min dla formy kationowej ES^+ (RYCINA 4.46).



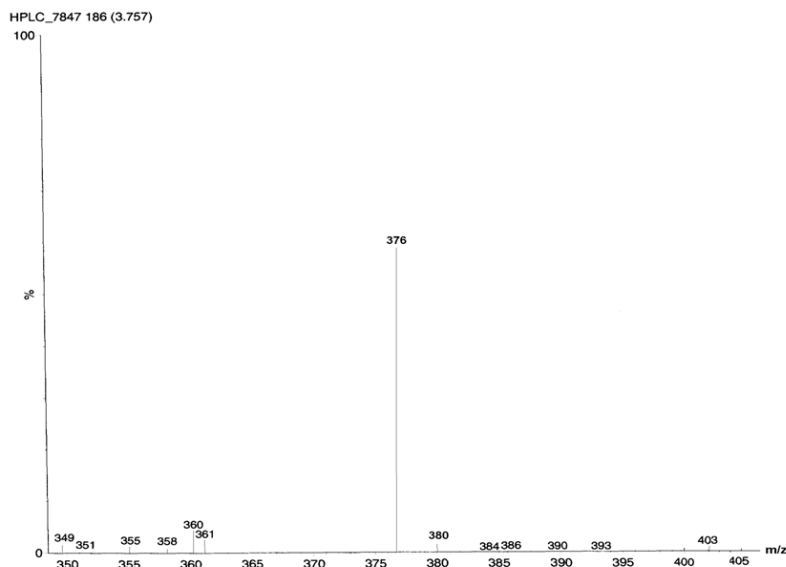
RYCINA 4.46.

Chromatogramy HPLC-MS otrzymane dla próbki chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu po 215 dniach ogrzewania w $T = 318\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$; (A) forma kationowa ES^+ , (B) forma anionowa ES^- .



RYCINA 4.47.

Widmo spektrometrii mas w formie kationowej ES^+ dla próbki chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu po 215 dniach ogrzewania w $T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$, zawierającej produkt rozkładu; $m/z = 416$ (postać potasowa).



RYCINA 4.48.

Widmo spektrometrii mas w formie anionowej ES⁻ dla próbki chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu po 215 dniach ogrzewania w $T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$, zawierającej produkt rozkładu; $m/z = 376$.

Analiza otrzymanych chromatogramów HPLC – MS wykazała obecność pików jednego produktu rozkładu o czasie retencji $t_R = 2.67$ min dla formy kationowej i $t_R = 3.75$ min dla formy anionowej. Obserwowane sygnały na widmach spektroskopii mas o wartościach $m/z = 376$ (pozorny jon molekularny typu $[M - H]^-$) oraz $m/z = 416$ (pozorny jon molekularny typu $[M + K]^+$) zostały przypisane prawdopodobnemu produktowi rozkładu, który zidentyfikowano jako pochodna dikwasowa chlorowodorku imidaprilu (imidaprilat). Wartość $m/z = 416$ jest liczbowo równa masie cząsteczkowej imidaprilatu powiększonej o masę potasu, podczas gdy wartość $m/z = 376$ jest liczbowo równa masie cząsteczkowej imidaprilatu pomniejszonej o masę protonu. Oznacza to, że masa cząsteczkowa zidentyfikowanego produktu wynosi 377 u (wzór sumaryczny $C_{18}H_{23}N_3O_6$) (TABELA 4.52).

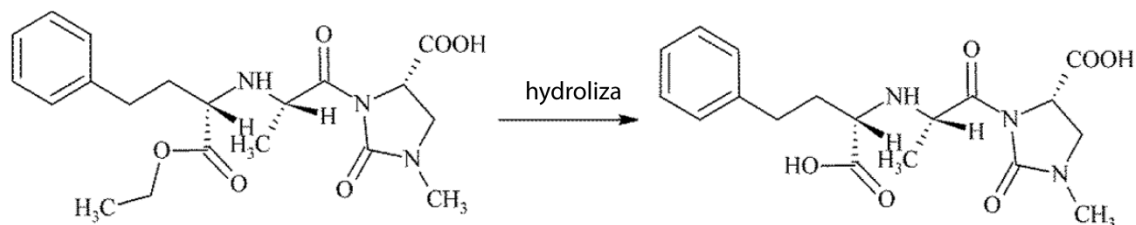
TABELA 4.52.

Identyfikacja produktu rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianu magnezu drogą analizy wartości m/z odczytanych z widm masowych

Związek	Wzór sumaryczny	Obliczona masa cząsteczkowa (u)	Wartość m/z na widmie ES ⁺ jon $[M-K]^+$	Wartość m/z na widmie ES ⁻ jon $[M-H]^-$
Produkt nr 1 imidaprilat	$C_{18}H_{23}N_3O_6$	377	416*	376

* $[M-K]^+$ forma potasowa

Stąd stwierdzono, iż jedynym produktem obserwowanej reakcji jest pochodna dikwasowa utworzona w wyniku hydrolizy badanej substancji leczniczej. W związku z powyższym zaproponowano mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w zastosowanych warunkach eksperymentalnych zgodnie z RYCINĄ 4.49.



RYCINA 4.49.

Mechanizm rozkładu chlorowodorku imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza.

Ocena wpływu stearynianu magnezu na trwałość chlorowodorku imidaprilu

Wykazano, iż stearynian magnezu wpływa na zmianę mechanizmu reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu z reakcji autokatalitycznej na reakcję pierwszego rzędu oraz powoduje zmianę jej profilu produktowego, gdyż w badanej mieszaninie modelowej zidentyfikowano tylko jeden produkt (imidaprilat), podczas gdy czysta postać chlorowodorku imidaprilu rozkłada się z utworzeniem dwóch produktów: imidaprilatu oraz pochodnej diketopiperazynowej. Co więcej, obecność substancji pomocniczej spowalnia szybkość degradacji chlorowodorku imidaprilu, co wykazano analizując stałe szybkości reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji oraz w mieszaninie ze stearynianem magnezu w warunkach $T = 333 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$ (TABELA 4.53).

TABELA 4.53

Porównanie stałych szybkości reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji oraz w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu w warunkach $T = 333 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$

k_{IMD}	$2.3210 \cdot 10^{-7} *$
k_{IMD-ST}	$1.4548 \cdot 10^{-7}$

* wartość obliczona z równania Arrhenius'a : $\ln k = -12550.0809 (1/T) + 22.41$

k_{IMD} – stała szybkości rozkładu czystego chlorowodorku imidaprilu

k_{IMD-ST} – stała szybkości rozkładu chlorowodorku imidaprilu w obecności stearynianu magnezu

Oceniono również wpływ stearynianu magnezu na wrażliwość chlorowodorku imidaprilu na zmiany zawartości wilgoci w powietrzu za pomocą statystycznego testu równości współczynników regresji liniowej (TABELA 4.54).

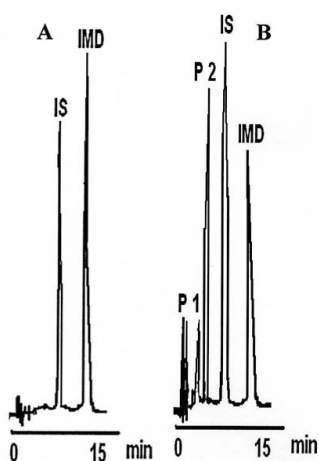
TABELA 4.54.

Ocena wpływu stearynianu magnezu na wrażliwość chlorowodorku imidaprilu na zmiany RH(%) za pomocą statystycznego testu równości współczynników regresji liniowej

<u>HIPOTEZY</u>	
$H0: a_1 = a_2$	
$H1: a_1 \neq a_2$	
Populacja I	Populacja II
Mieszanina modelowa ze stearynianem magnezu lnk = 0.0234 RH% - 17.53 n = 4	Czysta postać chlorowodorku imidaprilu lnk = 0.0338 RH% - 14.82 n = 5
$S_{a_1 - a_2} = 0.00317$ $ t = 3.252$ $t(\alpha = 0.05; df = 5) = 2.571$	
$ t > t(\alpha; df)$	
<u>WYNIK</u>	
Weryfikacja hipotez wykazała, że $ t > t(\alpha; df)$ dlatego odrzucono $H0$ na korzyść $H1$. Współczynniki regresji liniowej a_1 i a_2 różnią się istotnie, zatem wrażliwość chlorowodorku imidaprilu na rozkład w obecności stearynianu magnezu spada w sposób istotny pod względem statystycznym.	

4.6.10. Analiza trwałości chlorowodorku imidaprilu w tabletkach

W celu określenia wpływu sposobu przechowywania preparatu farmaceutycznego chlorowodorku imidaprilu na trwałość badanej substancji leczniczej przeprowadzono badanie zgodnie z *Procedurami nr 4.20 - 4.23* za pomocą *Metody RP-HPLC nr 3*. Selektywność metody potwierdzono drogą analizy wykreślonych chromatogramów (RYCINA 4.50).



RYCINA 4.50.

Chromatogram RP-HPLC dla ekstraktu z tabletek chlorowodorku imidaprilu (A) niepoddawanych warunkom testu kinetycznego, (B) przechowywanych bez opakowania bezpośredniego w $T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$ przez 30 dni; chlorowodorek imidaprilu $t_R \sim 13\text{ min}$; produkt rozkładu nr 1 $t_R \sim 3\text{ min}$; produkt rozkładu nr 2 $t_R \sim 5\text{ min}$; wzorzec wewnętrzny $t_R \sim 8\text{ min}$.

Przeprowadzono ocenę parametrów kinetycznych reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych:

- w opakowaniu handlowym,
- bez opakowania handlowego, tabletki w całości,
- bez opakowania handlowego, tabletki rozłamane na dwie połówki.

Na podstawie uzyskanych wyników dokonano doboru kinetycznego modelu, opisującego mechanizm rozkładu badanej substancji leczniczej w zależności od sposobu przechowywania tabletek oraz przeprowadzono analizę parametrów kinetycznych obserwowanych reakcji rozkładu. Testem statystycznym równości współczynników regresji liniowej dokonano porównania wpływu sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu na trwałość badanej substancji leczniczej.

Dobór kinetycznego modelu reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach

Kinetyczny model obserwowanej reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza ustalono na podstawie modelowania matematycznego zgodnie z postępowaniem opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 (str. 89). Uzyskane wyniki zamieszczono w TABELI 4.55.

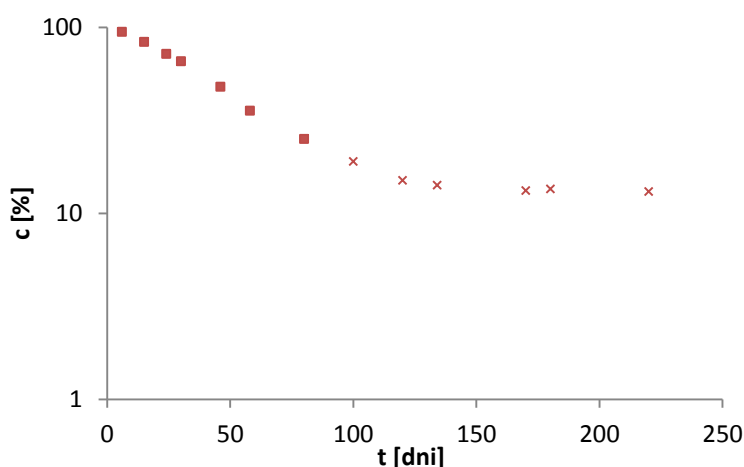
TABELA 4.55.

Dobór modelu kinetycznego dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w preparacie handlowym, na podstawie danych doświadczalnych uzyskanych w warunkach RH = 76.4 %, T = 333 K

Symbol reakcji	Tabletki w blistrze	Tabletki bez blistra	Połówki tabletek bez blistra
<i>Współczynnik korelacji dla $f(x) = k \cdot t$</i>			
F0	0.956	0.987	0.968
F1	0.997	0.998*	0.996
F2	0.891	0.978	0.930
F3	0.749	0.938	0.840
P2	0.989	0.996	0.992
P3	0.896	0.936	0.930
P4	0.884	0.925	0.924
P ₂ ³	0.976	0.995	0.982
A2	0.991	0.987	0.994
A3	0.979	0.973	0.988
A4	0.970	0.963	0.983
B1	0.980	0.953	0.991
D1	0.985	0.990	0.989
D2	0.992	0.985	0.993
D3	0.984	0.974	0.982
D4	0.992	0.982	0.991
R1	0.956	0.987	0.968
R2	0.989	0.996	0.992
R3	0.996	0.997	0.995

* korelacja dla punktów nienależących do etapu reakcji, w którym ustalił się stan równowagi; po zastosowaniu techniki odejmowania

We wszystkich przypadkach najlepszą korelację danych uzyskano dla reakcji pierwszego rzędu (F1). Wynik ten jest zgodny z analizą krzywych rozkładu $f(c) = t$, które dla tabletek w blistrze oraz połówek tabletek bez blistra mają charakter wykładniczy, co jest charakterystyczną cechą reakcji przebiegających zgodnie z tym wybranym modelem. Z kolei, w trakcie degradacji chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez blistra również dochodzi do eksponentyjnego ubytku substancji czynnej w czasie jednakże w końcowym etapie tego procesu ($t \rightarrow t_{\infty}$) ustala się stan równowagi ($c_t \rightarrow \infty$), co wskazuje na reakcję odwracalną (RYCINA 4.51), gdzie występują dwa przeciwnie skierowane procesy pierwszego rzędu. W tym przypadku w celu uzyskania prostoliniowej zależności stężenia od czasu należy zastosować technikę odejmowania $\ln(c_t - c_{\infty}) = f(t)$.



RYCINA 4.51.

Półlogarytmiczny wykres zależności $c = f(t)$ dla tabletek z chlorowodorkiem imidaprilu przechowywanych w $T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$ bez opakowania bezpośredniego, obrazujący przebieg reakcji odwracalnej. Krzyżykiem oznaczono punkty należące do stanu równowagi.

Analiza poszczególnych procesów kinetycznych

Dokonano analizy poszczególnych procesów kinetycznych zgodnie z postępowaniem opisanym w ROZDZIALE 4.6.4 w akapicie dotyczącym analizy procesów kinetycznych (str 91). Uzyskane krzywe rozkładu chlorowodorku imidaprilu w warunkach testowych oraz odpowiadające im dane doświadczalne przedstawiono na RYCINACH 4.52 – 4.63 i w TABELACH 4.56 - 4.67. Ocenę wpływu przechowywania tabletek z chlorowodorkiem imidaprilu na trwałość badanej substancji leczniczej przeprowadzono za pomocą statystycznego testu równości współczynników regresji liniowej, a otrzymane wyniki przedstawiono w TABELACH 4.68 – 4.71.

$T = 313\text{ K}, RH = 76.4\%$

TABELA 4.56.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w opakowaniu bezpośrednim ($T = 313\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej i parametrami kinetycznymi reakcji

TABLETKI W BLISTRZE				
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	10	1.2544	1.2309	98.13
2	25		1.2060	96.14
3	30		1.1524	91.87
4	38		1.1056	88.14
5	50		1.0745	85.66
6	66		1.0258	81.78
7	78		0.9801	78.13
8	120		0.9052	72.16
9	145		0.8546	68.13
10	160		0.7864	62.69
11	180		0.7260	57.88

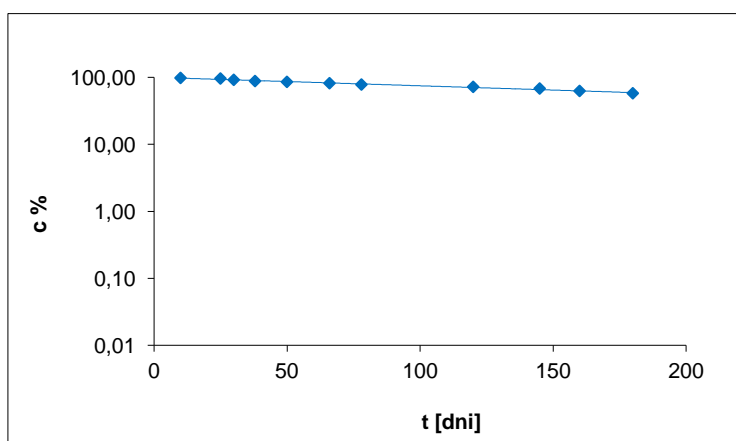
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0029$	$\Delta a = 0.0003$	$S_a = 0.0001$
$b = 4.6089$	$\Delta b = 0.0262$	$S_b = 0.0118$
$S_y = 0.0222$	$r = -0.993$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$3.3781 \cdot 10^{-8}$
Δk [1/s]	$0.3045 \cdot 10^{-8}$
$t_{0.5}$ [dni]	236.7
$t_{0.1}$ [dni]	36.1



RYCINA 4.52.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych w blistrze w $T = 313\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

TABELA 4.57.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez opakowania bezpośredniego ($T = 313\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej i parametrami kinetycznymi reakcji

TABLETKI BEZ BLISTRA					
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} <i>dla t_0</i>	P_{IMD}/P_{IS} <i>dla t_h</i>	c_t (%)	$(c_t - c_\infty)$
1	10	1.2538	1.2492	99.63	59.01
2	25		1.1430	91.16	50.54
3	30		1.1339	90.44	49.82
4	38		1.1053	88.16	47.54
5	50		1.0154	80.99	40.37
6	66		0.8922	71.16	30.54
7	78		0.8385	66.88	26.26
8	120		0.6859	54.71	14.09
9	145		0.5627	44.88	**
10	160		0.5282	42.13	**
11	180		0.5127	40.89	*
12	220		0.5098	40.66	*
13	240		0.5088	40.58	*
14	280		0.5055	40.32	*

* stan stacjonarny ($c_{sr} = 40.62\%$)

** wyniki odrzucone

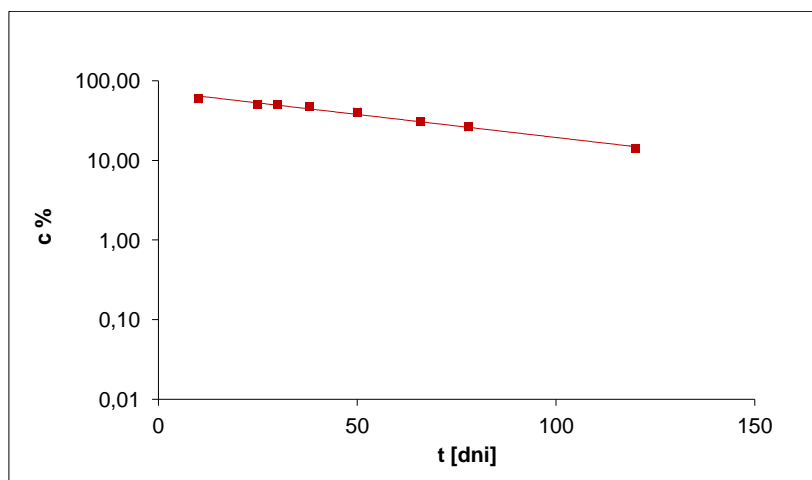
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln(c_t - c_\infty) = \ln(c_0 - c_\infty) - k \cdot t$$

$a = -0.0133$	$\Delta a = 0.0015$	$S_a = 0.0006$
$b = 4.2943$	$\Delta b = 0.0885$	$S_b = 0.0397$
$S_y = 0.0600$	$r = -0.993$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$1.5413 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.1799 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	52.1
$t_{0.1}$ [dni]	7.9



RYCINA 4.53.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych bez blistra w $T = 313\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln(c_t - c_\infty) = \ln(c_0 - c_\infty) - k \cdot t$.

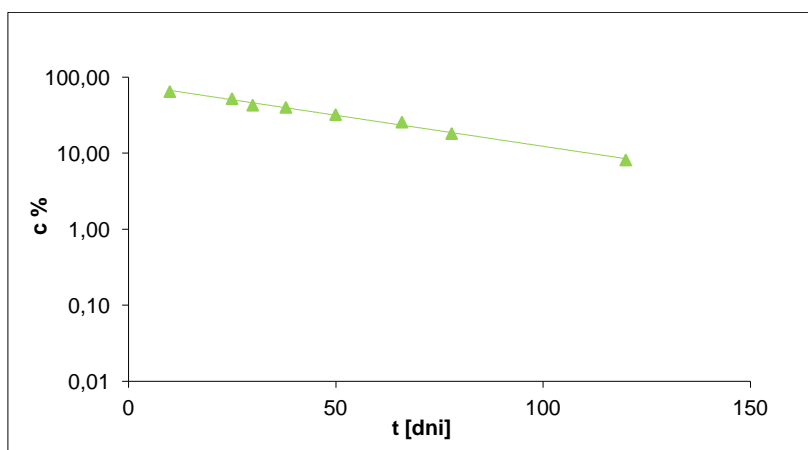
TABELA 4.58.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w postaci tabletek przechowywanych bez opakowania bezpośredniego w formie przepołowionej ($T = 313\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

POŁÓWKI TABLETEK BEZ BLISTRA				
Lp.	t [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	10	1.2544	0.8108	64.64
2	25		0.6540	52.14
3	30		0.5375	42.85
4	38		0.5033	40.12
5	50		0.4034	32.16
6	66		0.3219	25.66
7	78		0.2215	18.14
8	120		0.1022	8.15

PARAMETRY PROSTEJ		
$\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$		
$a = -0.0188$	$\Delta a = 0.0014$	$S_a = 0.0006$
$b = 4.3908$	$\Delta b = 0.0824$	$S_b = 0.0370$
$S_y = 0.0559$	$r = -0.996$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI	
k [1/s]	$2.1767 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.1642 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	36.8
$t_{0.1}$ [dni]	5.6



RYCINA 4.54.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej bez blistra w $T = 313\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

$T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$

TABELA 4.59.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w opakowaniu bezpośrednim ($T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

TABLETKI W BLISTRZE				
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	10	1.2544	1.2309	98.13
2	25		1.1860	94.55
3	30		1.1372	90.66
4	38		1.0620	84.66
5	50		0.9645	76.89
6	66		0.9393	74.88
7	78		0.9017	71.88
8	120		0.7844	62.55
9	145		0.6872	54.78
10	160		0.6508	51.88
11	180		0.6022	48.01

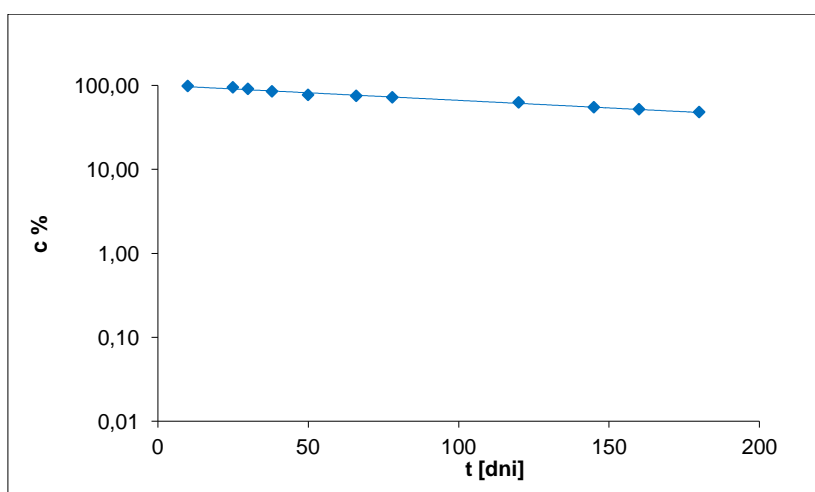
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0042$	$\Delta a = 0.0003$	$S_a = 0.0002$
$b = 4.6113$	$\Delta b = 0.0344$	$S_b = 0.0154$
$S_y = 0.0291$	$r = -0.994$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$4.8131 \cdot 10^{-8}$
Δk [1/s]	$0.3987 \cdot 10^{-8}$
$t_{0.5}$ [dni]	166.7
$t_{0.1}$ [dni]	25.3



RYCINA 4.55.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych w blistrze w $T = 318\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

TABELA 4.60.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez opakowania bezpośredniego ($T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

TABLETKI BEZ BLISTRA					
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	<i>P_{IMD}/P_{IS}</i> <i>dla t₀</i>	<i>P_{IMD}/P_{IS}</i> <i>dla t_h</i>	<i>c_t (%)</i>	<i>(c_t - c_∞)</i>
1	10	1.2538	1.2429	99.13	69.06
2	25		1.1465	91.44	61.37
3	30		1.0889	86.85	56.78
4	38		0.9797	78.14	48.07
5	50		0.9083	72.44	42.37
6	66		0.7821	62.38	32.31
7	78		0.6944	55.38	25.31
8	120		0.5549	44.26	14.19
9	145		0.4285	34.18	**
10	160		0.4028	32.13	**
11	180		0.3844	30.66	*
12	220		0.3763	30.01	*
13	240		0.3769	30.06	*
14	280		0.3706	29.56	*

* stan stacjonarny ($c_{sr} = 30.07\%$)

** wyniki odrzucone

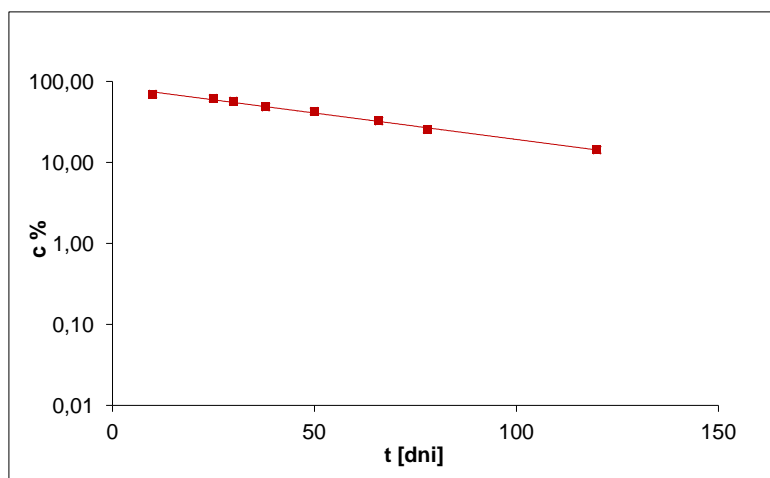
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln(c_t - c_\infty) = \ln(c_0 - c_\infty) - k \cdot t$$

$a = -0.0150$	$\Delta a = 0.0011$	$S_a = 0.0005$
$b = 4.4538$	$\Delta b = 0.0690$	$S_b = 0.0300$
$S_y = 0.0452$	$r = -0.997$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$k [1/s]$	$1.7379 \cdot 10^{-7}$
$\Delta k [1/s]$	$0.1297 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5} [dni]$	46.2
$t_{0.1} [dni]$	7.0



RYCINA 4.56.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych bez blistra w $T = 318\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu ($c [\%]$) jako funkcji czasu ($t [dni]$); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln(c_t - c_\infty) = \ln(c_0 - c_\infty) - k \cdot t$.

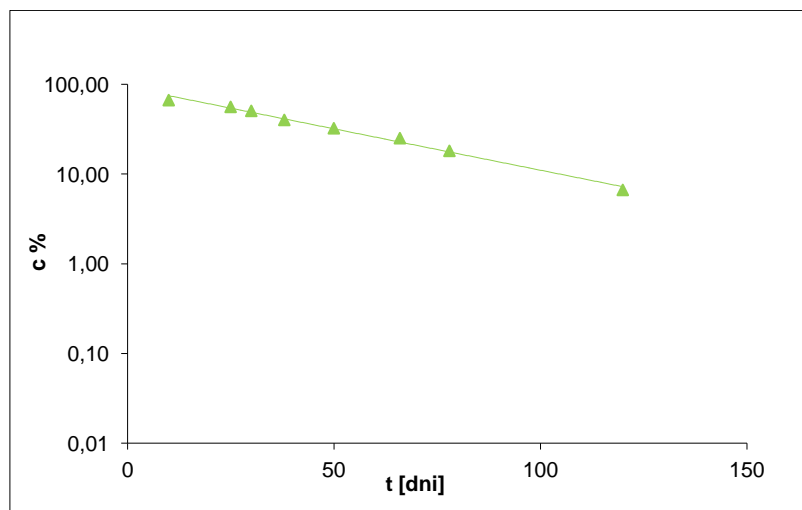
TABELA 4.61.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w postaci tabletek przechowywanych bez opakowania bezpośredniego w formie przepołowionej ($T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

POŁÓWKI TABLETEK BEZ BLISTRA				
<i>Lp.</i>	<i>t</i> [dni]	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	10	1.3711	0.9156	66.78
2	25		0.7697	56.14
3	30		0.6950	50.69
4	38		0.5506	40.16
5	50		0.4449	32.45
6	66		0.3447	25.14
7	78		0.2490	18.16
8	120		0.0193	6.66

PARAMETRY PROSTEJ		
$\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$		
$a = -0.0212$	$\Delta a = 0.0019$	$S_a = 0.0008$
$b = 4.5268$	$\Delta b = 0.1109$	$S_b = 0.0498$
$S_y = 0.0752$	$r = -0.996$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI	
k [1/s]	$2.4597 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.2094 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	32.6
$t_{0.1}$ [dni]	5.0



RYCINA 4.57.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej bez blistra w $T = 318\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

$T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$

TABELA 4.62.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w opakowaniu bezpośrednim ($T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

TABLETKI W BLISTRZE				
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	6		1.2523	98.66
2	15		1.1447	90.18
3	24		1.0238	80.66
4	30		0.9970	78.55
5	46		0.8969	70.66
6	58	1.2693	0.8650	68.15
7	80		0.7779	61.29
8	100		0.6430	50.66
9	120		0.5855	46.13
10	134		0.4971	39.16
11	170		0.3574	28.16

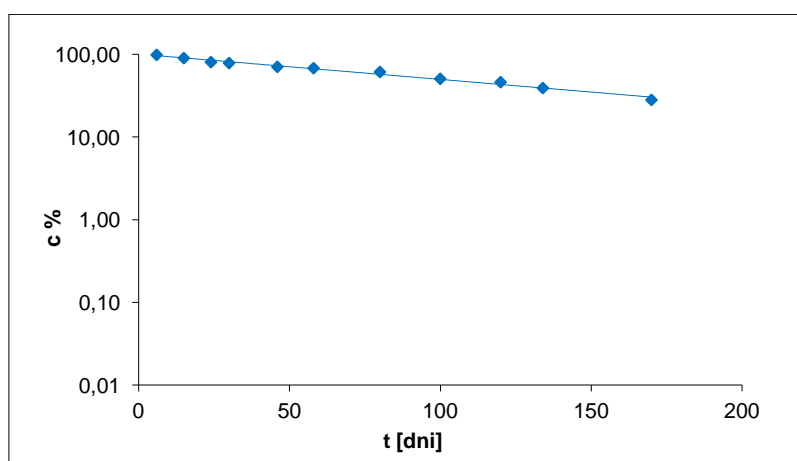
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0070$	$\Delta a = 0.0006$	$S_a = 0.0003$
$b = 4.6109$	$\Delta b = 0.0550$	$S_b = 0.0247$
$S_y = 0.0480$	$r = -0.993$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$8.1525 \cdot 10^{-8}$
Δk [1/s]	$0.7253 \cdot 10^{-8}$
$t_{0.5}$ [dni]	98.4
$t_{0.1}$ [dni]	15.0



RYCINA 4.58.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych w blistrze w $T = 323\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

TABELA 4.63.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez opakowania bezpośredniego ($T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

TABLETKI BEZ BLISTRA					
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	<i>P_{IMD}/P_{IS}</i> <i>dla t₀</i>	<i>P_{IMD}/P_{IS}</i> <i>dla t_h</i>	<i>c_t (%)</i>	<i>(c_t - c_∞)</i>
1	6	1.2538	1.2304	98.13	75.60
2	15		1.1675	93.12	70.59
3	24		1.0817	86.19	63.66
4	30		0.8837	70.48	47.95
5	46		0.8107	64.66	42.13
6	58		0.6942	55.37	32.84
7	80		0.5348	42.66	20.13
8	100		0.4346	34.66	12.13
9	120		0.3884	30.98	8.45
10	134		0.3287	26.22	3.69
11	170		0.2982	23.78	*
12	180		0.2776	22.14	*
13	220		0.2774	22.13	*
14	260		0.2766	22.06	*

* stan stacjonarny ($c_{sr} = 22.53\%$)

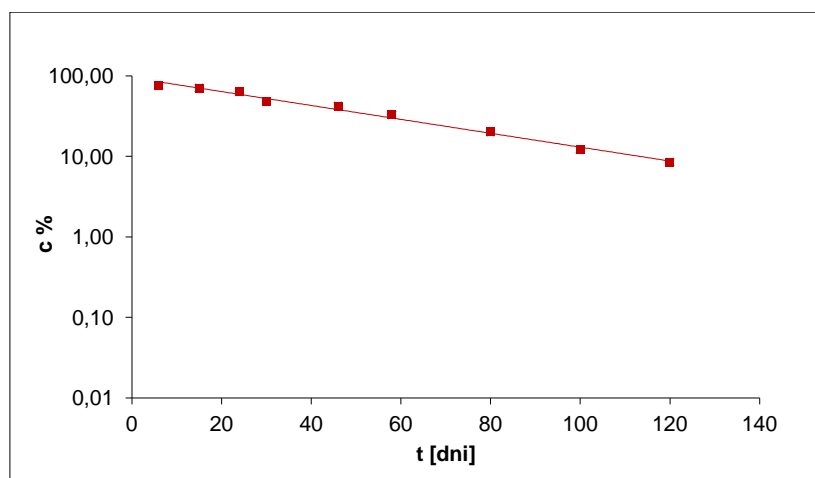
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln(c_t - c_\infty) = \ln(c_0 - c_\infty) - k \cdot t$$

$a = -0.0199$	$\Delta a = 0.0018$	$S_a = 0.0008$
$b = 4.5545$	$\Delta b = 0.1110$	$S_b = 0.0498$
$S_y = 0.0858$	$r = -0.995$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

$k [1/s]$	$2.3003 \cdot 10^{-7}$
$\Delta k [1/s]$	$0.2046 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5} [\text{dni}]$	34.9
$t_{0.1} [\text{dni}]$	5.3



RYCINA 4.59.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych bez blistra w $T = 323\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu ($c [\%]$) jako funkcji czasu ($t [\text{dni}]$); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln(c_t - c_\infty) = \ln(c_0 - c_\infty) - k \cdot t$.

TABELA 4.64.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w postaci tabletek przechowywanych bez opakowania bezpośredniego w formie przepołówionej ($T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

POŁÓWKI TABLETEK BEZ BLISTRA				
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	6	1.3711	1.0168	74.16
2	15		0.8931	65.14
3	24		0.8043	58.66
4	30		0.5501	40.12
5	46		0.5057	36.88
6	58		0.3311	24.15
7	80		0.1996	14.56
8	100		0.1167	8.51
9	120		0.0702	5.12

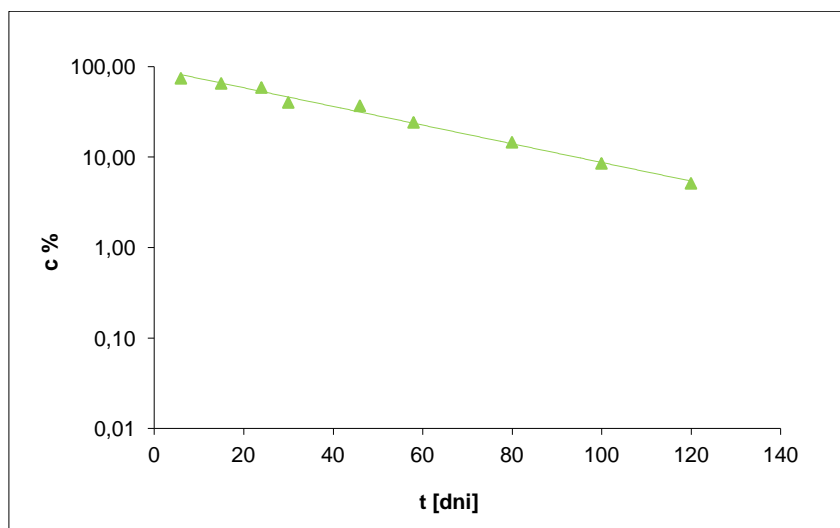
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0238$	$\Delta a = 0.0020$	$S_a = 0.0009$
$b = 4.5415$	$\Delta b = 0.1280$	$S_b = 0.0575$
$S_y = 0.0989$	$r = -0.995$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$2.7504 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.2359 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	29.2
$t_{0.1}$ [dni]	4.4



RYCINA 4.60.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych w formie przepołówionej bez blistra w $T = 323\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

$T = 333\text{ K}, RH = 76.4\%$

TABELA 4.65.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w opakowaniu bezpośrednim ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

TABLETKI W BLISTRZE				
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	6	1.2693	1.1695	92.14
2	15		1.0172	80.14
3	24		0.8903	70.14
4	30		0.7940	62.55
5	46		0.6760	53.26
6	58		0.5100	40.18
7	80		0.3319	26.15
8	100		0.2142	16.88
9	120		0.1252	9.86
10	134		0.09723	7.66
11	170		0.04569	3.60

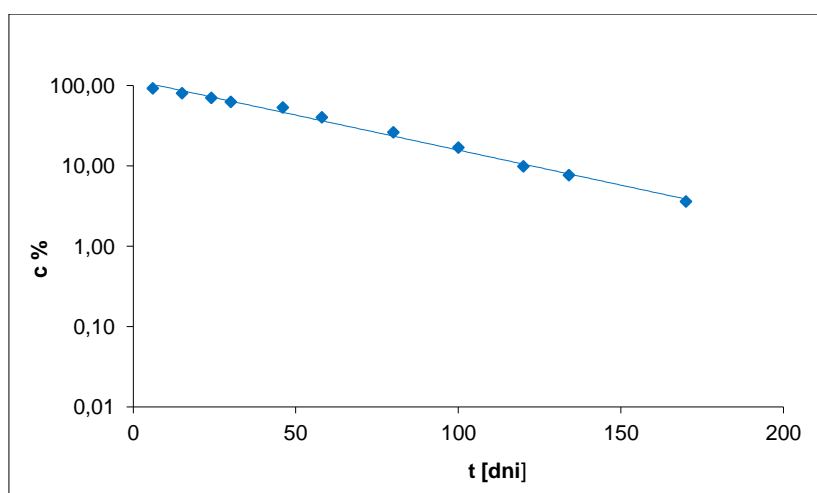
PARAMETRY PROSTEJ

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

$a = -0.0201$	$\Delta a = 0.0012$	$S_a = 0.0005$
$b = 4.7601$	$\Delta b = 0.1054$	$S_b = 0.0473$
$S_y = 0.0919$	$r = -0.997$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$2.3212 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.1388 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	34.6
$t_{0.1}$ [dni]	5.2



RYCINA 4.61.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych w blistrze w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

TABELA 4.66.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w tabletkach bez opakowania bezpośredniego ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

TABLETKI BEZ BLISTRA					
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)	$(c_t - c_\infty)$
1	6	1.2538	1.1889	94.83	81.29
2	15		1.0496	83.71	70.17
3	24		0.9047	72.16	58.62
4	30		0.8260	65.88	52.34
5	46		0.6022	48.03	34.49
6	58		0.4476	35.70	22.16
7	80		0.3154	25.16	11.64
8	100		0.2388	19.05	**
9	120		0.1889	15.07	**
10	134		0.1782	14.21	*
11	170		0.1663	13.26	*
12	180		0.1700	13.56	*
13	220		0.1644	13.11	*

* stan stacjonarny ($c_{sr} = 13.54\%$)
** wyniki odrzucone

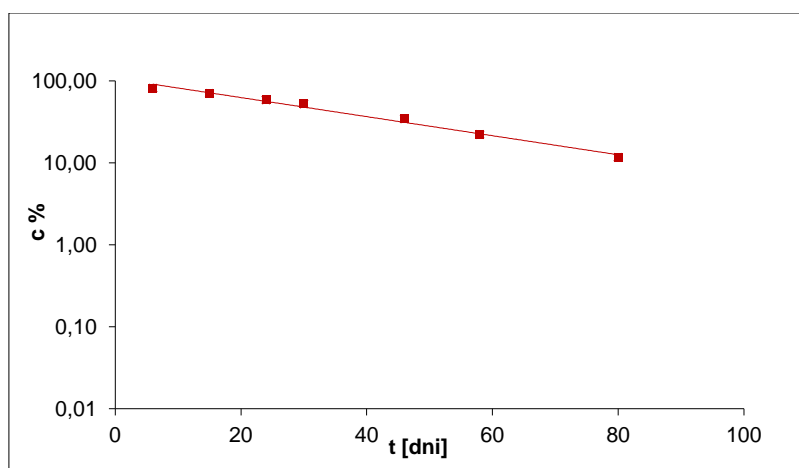
PARAMETRY PROSTEJ

$$\ln(c_t - c_\infty) = \ln(c_0 - c_\infty) - k \cdot t$$

$a = -0.0268$	$\Delta a = 0.0034$	$S_a = 0.0014$
$b = 4.6728$	$\Delta b = 0.1372$	$S_b = 0.0616$
$S_y = 0.0887$	$r = -0.993$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI

k [1/s]	$3.1012 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.3956 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	25.9
$t_{0.1}$ [dni]	3.9



RYCINA 4.62.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych bez blistra w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln(c_t - c_\infty) = \ln(c_0 - c_\infty) - k \cdot t$.

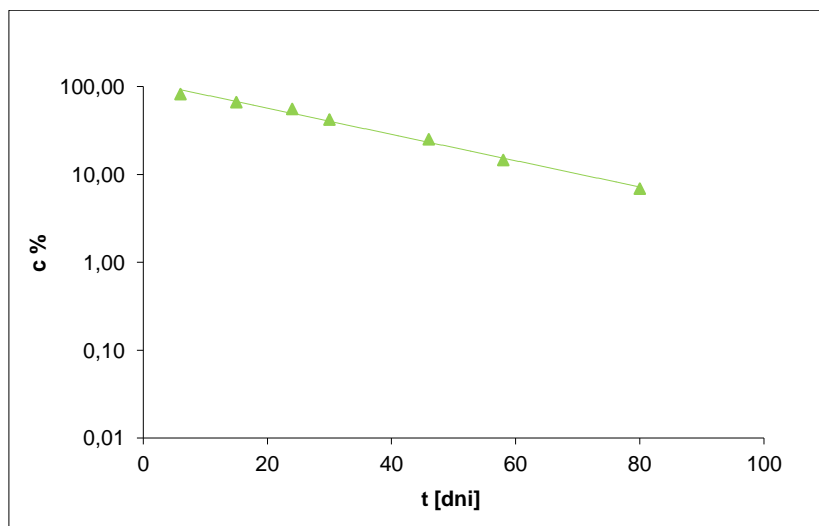
TABELA 4.67.

Zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu w postaci tabletek przechowywanych bez opakowania bezpośredniego w formie przepołowionej ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) wraz z wyznaczonymi parametrami prostej oraz parametrami kinetycznymi reakcji

POŁÓWKI TABLETEK BEZ BLISTRA				
<i>Lp.</i>	<i>t [dni]</i>	P_{IMD}/P_{IS} dla t_0	P_{IMD}/P_{IS} dla t_h	c_t (%)
1	6		1.1262	82.14
2	15		0.9111	66.45
3	24		0.7632	55.66
4	30	1.3711	0.5781	42.16
5	46		0.3447	25.14
6	58		0.2000	14.59
7	80		0.0945	6.89

PARAMETRY PROSTEJ		
$\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$		
$a = -0.0345$	$\Delta a = 0.0034$	$S_a = 0.0014$
$b = 4.7333$	$\Delta b = 0.1318$	$S_b = 0.0620$
$S_y = 0.0892$	$r = -0.996$	

PARAMETRY KINETYCZNE REAKCJI	
k [1/s]	$3.9916 \cdot 10^{-7}$
Δk [1/s]	$0.3978 \cdot 10^{-7}$
$t_{0.5}$ [dni]	20.1
$t_{0.1}$ [dni]	3.1



RYCINA 4.63.

Graficzny obraz rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych w formie przepołowionej bez blistra w $T = 333\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$, przedstawiający zmiany stężenia chlorowodorku imidaprilu (c [%]) jako funkcji czasu (t [dni]); półlogarytmiczna zależność liniowa $\ln c_t = \ln c_0 - k \cdot t$.

ROZDZIAŁ 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA
ETAP I - TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU W FAZIE STAŁEJ

TABELA 4.68.

Ocena wpływu sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu ($T = 313\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) na trwałość substancji leczniczej statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST I <i>Tabletki w blistrze vs tabletki bez blistra</i>	TEST II <i>Tabletki bez blistra vs połówki tabletek bez blistra</i>
<u>HIPOTEZY</u> $H_0: a_1 = a_2$ $H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja I</i> $\ln c_t = -0.0029 \cdot t + 4.6089; (n = 7)$	<i>Populacja I</i> $\ln (c_t - c_\infty) = -0.0133 \cdot t + 4.2943; (n = 7)$
<i>Populacja II</i> $\ln (c_t - c_\infty) = -0.0133 \cdot t + 4.2943; (n = 7)$	<i>Populacja II</i> $\ln c_t = -0.0188 \cdot t + 4.3908; (n = 7)$
$S_{a_1-a_2} = 0.0011$	$S_{a_1-a_2} = 0.0015$
$ t = 9.349$	$ t = 3.790$
$t(\alpha = 0.05; df = 10) = 2.228$	
$ t > t(\alpha; df)$	$ t > t(\alpha; df)$

WYNIK

Weryfikacja hipotez wykazała, że $|t| > t(\alpha; df)$, dlatego odrzucono H_0 na korzyść H_1 .
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie.

TABELA 4.69.

Ocena wpływu sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu ($T = 318\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) na trwałość substancji leczniczej statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST I <i>Tabletki w blistrze vs tabletki bez blistra</i>	TEST II <i>Tabletki bez blistra vs połówki tabletek bez blistra</i>
<u>HIPOTEZY</u> $H_0: a_1 = a_2$ $H_1: a_1 \neq a_2$	
<i>Populacja I</i> $\ln c_t = -0.0042 \cdot t + 4.6113; (n = 7)$	<i>Populacja I</i> $\ln (c_t - c_\infty) = -0.0150 \cdot t + 4.4538; (n = 7)$
<i>Populacja II</i> $\ln (c_t - c_\infty) = -0.0150 \cdot t + 4.4538; (n = 7)$	<i>Populacja II</i> $\ln c_t = -0.0212 \cdot t + 4.5268; (n = 7)$
$S_{a_1-a_2} = 0.0020$	$S_{a_1-a_2} = 0.0023$
$ t = 5.384$	$ t = 2.743$
$t(\alpha = 0.05; df = 10) = 2.228$	
$ t > t(\alpha; df)$	$ t > t(\alpha; df)$

WYNIK

Weryfikacja hipotez wykazała, że $|t| > t(\alpha; df)$, dlatego odrzucono H_0 na korzyść H_1 .
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie.

ROZDZIAŁ 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA
ETAP I - TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU W FAZIE STAŁEJ

TABELA 4.70.

Ocena wpływu sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu ($T = 323\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) na trwałość substancji leczniczej statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST I <i>Tabletki w blistrze vs tabletki bez blistra</i>	TEST II <i>Tabletki w bez blistra vs połówki tabletek bez blistra</i>
<u>HIPOTEZY</u> $H_0: a_1 = a_2$ $H_1: a_1 \neq a_2$	
<p><i>Populacja I</i> $\ln c_t = -0.0070 \cdot t + 4.6109; (n = 7)$</p> <p><i>Populacja II</i> $\ln (c_t - c_\infty) = -0.0199 \cdot t + 4.5545; (n = 7)$</p> <p>$S_{a_1-a_2} = 0.0029$</p> <p>$t = 4.477$</p>	<p><i>Populacja I</i> $\ln (c_t - c_\infty) = -0.0199 \cdot t + 4.5545; (n = 7)$</p> <p><i>Populacja II</i> $\ln c_t = -0.0238 \cdot t + 4.5415; (n = 7)$</p> <p>$S_{a_1-a_2} = 0.0033$</p> <p>$t = 1.173$</p>
$t (\alpha = 0.05; df = 10) = 2.228$	
$ t > t (\alpha; df)$	$ t < t (\alpha; df)$

WYNIK

Weryfikacja hipotez wykazała, że:

- w teście nr 1 $|t| > t (\alpha; df)$, dlatego odrzucono H_0 na korzyść H_1 , a więc współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie,
- w teście nr 2 $|t| < t (\alpha; df)$, dlatego nie ma podstaw do odrzucenia H_0 , a więc współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji nie różnią się statystycznie.

TABELA 4.71.

Ocena wpływu sposobu przechowywania tabletek chlorowodorku imidaprilu ($T = 333\text{ K}$, $RH = 76.4\%$) na trwałość substancji leczniczej statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST I <i>Tabletki w blistrze vs tabletki bez blistra</i>	TEST II <i>Tabletki bez blistra vs połówki tabletek bez blistra</i>
<u>HIPOTEZY</u> $H_0: a_1 = a_2$ $H_1: a_1 \neq a_2$	
<p><i>Populacja I</i> $\ln c_t = -0.0201 \cdot t + 4.7601; (n = 7)$</p> <p><i>Populacja II</i> $\ln (c_t - c_\infty) = -0.0268 \cdot t + 4.6728; (n = 7)$</p> <p>$S_{a_1-a_2} = 0.0022$</p> <p>$t = 3.089$</p>	<p><i>Populacja I</i> $\ln (c_t - c_\infty) = -0.0268 \cdot t + 4.6728; (n = 7)$</p> <p><i>Populacja II</i> $\ln c_t = -0.0345 \cdot t + 4.7333; (n = 7)$</p> <p>$S_{a_1-a_2} = 0.0020$</p> <p>$t = 3.894$</p>
$t (\alpha = 0.05; df = 10) = 2.228$	
$ t > t (\alpha; df)$	$ t > t (\alpha; df)$

WYNIK

Weryfikacja hipotez wykazała, że $|t| > t (\alpha; df)$, dlatego odrzucono H_0 na korzyść H_1 .
Współczynniki regresji a tym samym stałe szybkości reakcji różnią się statystycznie.

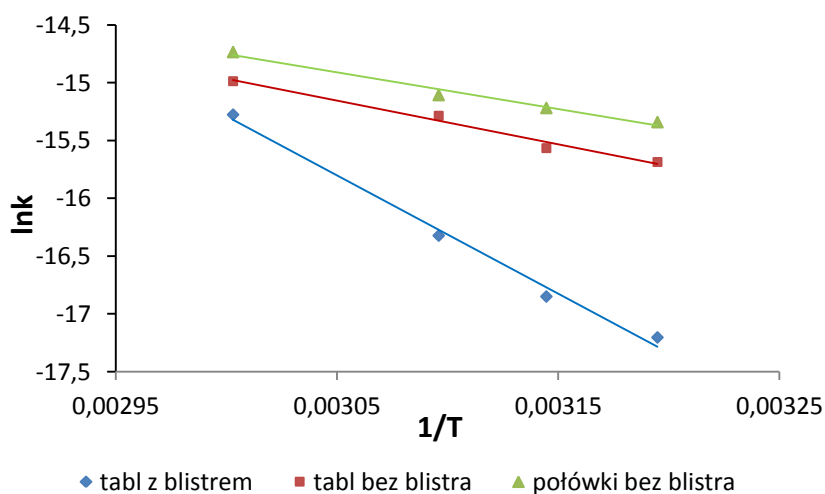
Zależność Arrhenius'a dla tabletek (T 313 – 333 K, $RH = 76.4\%$)

Ustalono, iż wyznaczone wartości stałych szybkości rozkładu chlorowodorku imidaprilu we wszystkich trzech seriach tabletek spełniają prostoliniową zależność Arrhenius'a $\ln k = f(1/T)$, której parametry regresji przedstawiono w TABELI 4.72. Na podstawie wyznaczonego równania obliczono parametry termodynamiczne reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach w zależności od sposobu ich przechowywania w $T = 298$ K w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza (RH 76.4%) korzystając ze wzorów podanych w ROZDZIALE 3.6.3 (str. 57-58).

TABELA 4.72.

Parametry prostej, stanowiącej obraz zależności Arrhenius'a dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach ($T = 313 - 333$ K, $RH = 76,4\%$) oraz jej obliczone parametry termodynamiczne

Lp.	T [K]	1/T · 10 ⁻³	k ± Δk [1/s]		
			Tabletki z blistrem	Tabletki bez blistra	Półwki tabletek bez blistra
1	313	3.195	(3.3781 ± 0.3045) · 10 ⁻⁸	(1.5413 ± 0.1799) · 10 ⁻⁷	(2.1767 ± 0.1642) · 10 ⁻⁷
2	318	3.145	(4.8131 ± 0.3987) · 10 ⁻⁸	(1.7379 ± 0.1297) · 10 ⁻⁷	(2.4597 ± 0.2094) · 10 ⁻⁷
3	323	3.096	(8.1525 ± 0.7253) · 10 ⁻⁸	(2.3003 ± 0.2046) · 10 ⁻⁷	(2.7504 ± 0.2359) · 10 ⁻⁷
4	333	3.003	(2.3212 ± 0.1388) · 10 ⁻⁷	(3.1012 ± 0.3956) · 10 ⁻⁷	(3.9916 ± 0.3978) · 10 ⁻⁷
PARAMETRY PROSTEJ <i>lnk = f(1/T)</i>			$a \pm \Delta a = -11175 \pm 282$ $S_a = 88.8$ $b \pm \Delta b = 18.3 \pm 0.9$ $S_b = 0.3$ $r = -0.999$	$a \pm \Delta a = -4110 \pm 1191$ $S_a = 374.4$ $b \pm \Delta b = -2.6 \pm 3.7$ $S_b = 1.2$ $r = -0.992$	$a \pm \Delta a = -3458 \pm 774$ $S_a = 243.4$ $b \pm \Delta b = -4.4 \pm 2.4$ $S_b = 0.8$ $r = -0.995$
PARAMETRY TERMODYNOMICZNE <i>w T = 298 K</i>			$E_a = 93 \pm 2$ [kJ · mol ⁻¹] $\Delta H^\ddagger = 90 \pm 5$ [kJ · mol ⁻¹] $\Delta S^\ddagger = -93 \pm 238$ [J · K ⁻¹ · mol ⁻¹]	$E_a = 34 \pm 10$ [kJ · mol ⁻¹] $\Delta H^\ddagger = 32 \pm 12$ [kJ · mol ⁻¹] $\Delta S^\ddagger = -267 \pm 212$ [J · K ⁻¹ · mol ⁻¹]	$E_a = 29 \pm 6$ [kJ · mol ⁻¹] $\Delta H^\ddagger = 26 \pm 9$ [kJ · mol ⁻¹] $\Delta S^\ddagger = -281 \pm 224$ [J · K ⁻¹ · mol ⁻¹]



RYCINA 4.64.

Wykres zależności Arrhenius'a dla reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach przechowywanych: h w blistrze; bez blistra; w formie przepołowionej bez blistra; przy $RH = 76.4\%$.

Uzyskane prostoliniowe zależności $\ln k = f(1/T)$ (RYCINA 4.64) oraz wyznaczone parametry termodynamiczne potwierdzają, iż w zastosowanych warunkach kinetycznych eksperymentu wzrost temperatury nie powoduje zmian mechanizmu obserwowanych reakcji rozkładu, a jedynie przyspiesza jej przebieg.

Wpływ procesu produkcji tabletek na trwałość chlorowodorku imidaprilu

Dokonano oceny wpływu procesu wytwarzania tabletek chlorowodorku imidaprilu na trwałość badanej substancji czynnej stosując statystyczny test równości współczynników regresji liniowej względem zależności *Arrhenius'a* dla chlorowodorku imidaprilu w substancji oraz w tabletkach. Uzyskane wyniki przedstawiono w TABELI 4.73.

TABELA 4.73.
Ocena wpływu procesu wytwarzania tabletek chlorowodorku imidaprilu na trwałość substancji czynnej przeprowadzona statystycznym testem równości współczynników regresji liniowej

TEST I <i>Tabletki w blistrze vs czysta substancja</i>	TEST II <i>Tabletki bez blistra vs czysta substancja</i>
<u>HIPOTEZY</u>	
<i>H0: $a_1 = a_2$</i>	
<i>H1: $a_1 \neq a_2$</i>	
<p><i>Populacja I</i> $\ln k = -11175 \cdot 1/T + 18.3; (n = 4)$</p> <p><i>Populacja II</i> $\ln k = -12550 \cdot 1/T + 22.41 (n = 5)$</p> <p>$S_{a_1-a_2} = 0.03$ $t = 39334$</p>	<p><i>Populacja I</i> $\ln k = -4110 \cdot 1/T - 2.6 (n = 4)$</p> <p><i>Populacja II</i> $\ln k = -12550 \cdot 1/T + 22.41 (n = 5)$</p> <p>$S_{a_1-a_2} = 0.03$ $t = 304585$</p>
$t (\alpha = 0.05; df = 5) = 2.571$	
$ t > t (\alpha; df)$	$ t > t (\alpha; df)$
<u>WYNIK</u>	
<p>Weryfikacja hipotez wykazała, że $t > t (\alpha; df)$, dlatego odrzucono <i>H0</i> na korzyść <i>H1</i>. Współczynniki regresji a tym samym energie aktywacji reakcji różnią się statystycznie.</p>	

Stwierdzono, iż energia aktywacji reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji jest wyższa od energii aktywacji reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu w tabletkach, a różnica ta jest istotna statystycznie. Oznacza to, iż proces tabletkowania wpływa na obniżenie bariery energetycznej pomiędzy substratem a stanem przejściowym oraz ułatwia inicjację procesu degradacji badanej substancji leczniczej.

4.6.11. Metoda QSPR w analizie trwałości I-ACE

Dane dotyczące parametrów stabilnościowych analogów chlorowodorku imidaprilu z grupy dikarboksyłowych inhibitorów konwertazy angiotensyny zestawiono w TABELI 4.74 [72-75, 121-122]. Przedstawione wartości zostały wykorzystane w analizie QSPR do określenia zależności trwałości od struktury chemicznej w analizowanej grupie leków.

TABELA 4.74
Parametry stabilnościowe leków z grupy dikarboksyłowych I-ACE zebrane w toku analizy piśmiennictwa

I-ACE	k [363K / 76.4% RH] [1/s]	E_a [kJ/mol]
Imidapril	$4.89 \cdot 10^{-6}$	104.35
Enalapril	$3.35 \cdot 10^{-5}$	149.11
Lisinopril	$1.10 \cdot 10^{-6}$	166.19
Moeksipril	$3.31 \cdot 10^{-5}$	116.96
Benazepril	$7.27 \cdot 10^{-7}$	221.16
Cilazapril	$1.94 \cdot 10^{-5}$	166.50
Chinapril	$6.97 \cdot 10^{-5}$	133.62

Odpowiednie deskryptory molekularne, wyznaczone za pomocą oprogramowania komputerowego podanego w ROZDZIALE 4.4.5. *Metoda QSPR* (str. 73) dla poszczególnych I-ACE zawarto w TABELI 4.75.

TABELA 4.75.
Deskryptory strukturalne i fizykochemiczne zastosowanie w analizie QSPR dla dikarboksyłowych I-ACE

I-ACE	pKa	$LogD$ (pH 5.5)	$LogD$ (pH 7.4)	$LogP$	RM [cm ³ /mol]	MV [cm ³ /mol]	α [Å ³]	$TPSA$ [Å ²]	Rozp. w wodzie [g/l]	T_{top} [°C]
Imidapril	3.49	-0.56	-1.81	-0.23	103.20	320.10	40.69	116.25	0.45000	196
Enalapril	3.67	0.30	-1.06	0.59	99.57	312.60	39.42	95.94	0.21000	144
Lisinopril	3.17	-3.11	-3.18	-3.10	107.37	323.90	42.54	132.96	0.22000	147
Moeksipril	3.46	1.16	-0.08	1.50	132.88	408.10	52.21	114.40	0.00585	151
Benazepril	3.53	1.30	0.07	1.54	115.23	335.80	45.30	95.94	0.01045	148
Cilazapril	3.17	-2.56	-4.29	-0.01	110.58	330.30	43.81	99.18	1.06000	96
Chinapril	3.70	1.68	0.31	1.96	119.96	360.10	47.15	95.94	0.00850	125

Legenda: RM – refrakcja molowa, MV – objętość molowa, α – polaryzowalność cząsteczkowa, $TPSA$ – topologiczna polarna powierzchnia cząsteczki, $Rozp.$ – rozpuszczalność, T_{top} – temperatura topnienia

ROZDZIAŁ 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA
ETAP I - TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU W FAZIE STAŁEJ

c.d.

I-ACE	AW	DW	ΔG_{des} grup hydrofobowych [kcal/mol]	ΔG_{des} grup polarnych [kcal/mol]	pI	p [D]	SASA [\AA^2]	WSA [\AA^2]	P [cm^3]	LWR
Imidapril	9	2	8.83	-53.20	4.35	4.94	619.21	609.21	867.90	10
Enalapril	7	2	9.61	-88.05	4.43	6.58	603.46	592.39	836.40	10
Lisinopril	8	5	9.20	-106.06	6.40	3.07	651.22	631.68	902.90	13
Moeksipril	9	2	12.34	-69.87	4.33	5.26	788.48	766.14	1085.60	12
Benazepril	7	2	12.39	-54.80	4.58	6.79	654.85	639.05	930.40	10
Cilazapril	8	2	10.78	-50.60	4.52	7.10	590.76	646.77	913.40	9
Chinapril	7	2	13.13	-73.29	4.45	5.79	664.52	668.48	968.40	10

Legenda: AW – ilość akceptorów wiązań wodorowych, DW – ilość donorów wiązań wodorowych, ΔG_{des} – energia desolwatacji, pI – punkt izoelektryczny, p – moment dipolowy, SASA - powierzchnia dostępności rozpuszczalnika, WSA – powierzchnia van der Waals'a, P – parachora, LWR – liczba wiązań rotowalnych.

Wyznaczono współczynniki korelacji r metodą najmniejszych kwadratów pomiędzy parametrami stabilnościowymi a deskryptorami molekularnymi w celu wykazania zależności budowa chemiczna – trwałość w analizowanej grupie farmakologicznej. Wyniki przedstawiono w TABELI 4.76.

TABELA 4.76.
Współczynniki korelacji liniowej w analizie QSPR w grupie dikarboksylowych I-ACE

Współczynnik korelacji	k [T 363K / 76.4% RH] [1/s]	E_a [kJ/mol]
Rozp. w wodzie [g/l]	-0.2600	-0.0167
T_{top} [°C]	-0.3873	-0.3924
LWR	-0.2050	-0.1184
AW	-0.3186	-0.6275
DW	-0.3921	0.1712
pKa	0.5854	-0.1995
LogD (pH 5.5)	0.5324	-0.0866
LogD (pH 7.4)	0.4598	-0.0606
LogP	0.5674	-0.0837
RM [cm^3/mol]	0.3833	-0.1073
MV [cm^3/mol]	0.4418	-0.3094
α [\AA^3]	0.3801	-0.1050
TPSA [\AA^2]	-0.4753	-0.2906
ΔG_{des} grup hydrofobowych [kcal/mol]	0.5671	0.2177
ΔG_{des} grup polarnych [kcal/mol]	-0.0864	0.0258
Punkt izoelektryczny pI	-0.4128	0.2790
p [D]	0.2467	0.3258
WSA [\AA^2]	0.3338	-0.2546
SASA [\AA^2]	0.2259	-0.2615
P [cm^3]	0.3434	-0.1873

Nie stwierdzono silnej korelacji liniowej z żadnym z analizowanych powyżej przypadków. W związku z tym przeprowadzono analizę różnych modeli matematycznych w poszukiwaniu zależności pomiędzy badanymi wartościami. Ustalono istnienie następujących powiązań:

$k = 0.0004 \cdot pK_a^2 - 0.0025 \cdot pK_a + 0.0042$	$r = 0.7725$
--	--------------

$k = -6 \cdot 10^{-8} \cdot (\Delta G_{des\ polar})^2 - 9 \cdot 10^{-6} \cdot (\Delta G_{des\ polar}) - 0.0003$	$r = -0.8139$
---	---------------

$E_a = -27.036 \cdot AW^2 + 403.92 \cdot AW - 1334.7$	$r = -0.7127$
---	---------------

$E_a = 15.705 \cdot p^2 - 151.83 \cdot p + 481.66$	$r = 0.7965$
--	--------------

Ponadto w grupie I-ACE pochodnych estrów (bez lisinoprilu) stwierdzono istnienie zależności $E_a = f(pI)$ oraz $E_a = f(p)$:

$E_a = 1445.6 \cdot pI^2 - 12461 \cdot pI + 26967$	$r = 0.9694$
--	--------------

$E_a = 8.1685 \cdot p^{1.5985}$	$r = 0.8786$
---------------------------------	--------------

W celu określenia dalszych zależności pomiędzy właściwościami strukturalnymi oraz fizykochemicznymi a trwałością badanych I-ACE, spośród wymienionych w TABELI 4.75 przedstawicieli klasy wyselekcjonowano jednorodną grupę analogów chlorowodorku imidaprilu, których degradacja następuje zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej w warunkach $T = 363$ K, $RH = 76.4\%$, a więc: imidapril, enalapril, cilazapril i lisinopril. Ponowiono analizę zebranych danych tylko w obrębie tej grupy a wyniki zestawiono w TABELI 4.77. Otrzymane zależności, przeanalizowano pod względem najlepszego dopasowania do różnych modeli matematycznych: wykładniczego, logarytmicznego, wielomianowego oraz potęgowego celem odszukania najlepszej korelacji danych. Wyniki zestawiono w TABELI 4.78.

TABELA 4.77.
Współczynniki korelacji liniowej w analizie QSPR dla grupy dikarboksylowych I-ACE rozkładających się zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej

Współczynnik korelacji	k [T 363K / RH 76.4%] [1/s]	E_a [kJ/mol]
Rozp. w wodzie [g/l]	0.0828	0.2009
T_{top} [°C]	-0.4280	-0.8622
LWR	-0.5920	0.2563
AW	-0.7896	-0.6242
DW	-0.6135	0.4475
pKa	0.5678	-0.5611
LogD (pH 5.5)	0.5792	-0.6187
LogD (pH 7.4)	0.3323	-0.5907
LogP	0.6940	-0.5477
RM [cm ³ /mol]	-0.4244	0.5209
MV [cm ³ /mol]	-0.4419	0.3987
α [Å ³]	-0.3997	0.5584
TPSA [Å ²]	-0.9078	-0.0430
ΔG_{des} grup hydrofobowych [kcal/mol]	0.4984	0.6491
ΔG_{des} grup polarnych [kcal/mol]	0.0642	-0.4522
Punkt izoelektryczny pI	-0.5855	0.5069
p [D]	0.8219	0.0663
WSA [Å ²]	-0.4190	0.5441
SASA [Å ²]	-0.7459	0.0090
P [cm ³]	-0.5502	0.4921

TABELA 4.78.
Analiza różnych modeli matematycznych dla zależności uzyskanych w badaniu QSPR w grupie dikarboksylowych I-ACE rozkładających się zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej

Zależność QSPR	funkcja liniowa $y = ax + b$	funkcja wykładnicza $y = a \cdot e^{bx}$	funkcja logarytmiczna $y = a \cdot \ln x + b$	funkcja wielomianowa $y = ax^2 + bx + c$	funkcja potęgowa $y = a \cdot x^b$
$k = f(\text{LogP})$	0.7601	0.9267	brak korelacji	0.9703*	brak korelacji
$k = f(\text{MV})$	-0.4418	0.2651	-0.4500	0.9980	0.2731
$k = f(\text{SASA})$	-0.7459	0.9333	-0.7454	-0.7461	0.9318
$k = f(\text{TPSA})$	-0.9078	-0.9976	-0.9215	-0.9724	-0.9975
$k = f(p)$	0.8219	0.9652	0.8042	0.8255	0.9663
$E_a = f(T_{top})$	-0.8622	-0.8602	-0.8000	-0.9644	-0.8000
$E_a = f(pK_a)$	-0.5611	0.5226	-0.5741	1.0000	0.5361
$E_a = f(\text{SASA})$	0.0089	0.0071	-0.0045	0.9296	0.0173
$E_a = f(\text{AW})$	-0.6242	0.6592	-0.5890	1.0000	0.6254
$E_a = f(P)$	0.4920	0.4520	0.4834	0.9106	0.4431

* korelacja odrzucona, ponieważ uzyskany wykres funkcji przecinał oś OX sugerując ujemne wartości k

Wykazano istnienie:

- korelacji wykładniczej pomiędzy k reakcji autokatalitycznej a $\text{Log}P$, topologiczną polarną powierzchnią cząsteczki oraz powierzchnią dostępności rozpuszczalnika,
- korelacji potęgowej pomiędzy k reakcji autokatalitycznej a momentem dipolowym,
- korelacji wielomianowej pomiędzy k reakcji autokatalitycznej a objętością molową
- korelacji wielomianowej pomiędzy energią aktywacji reakcji autokatalitycznej (E_a) a pK_a , liczbą akceptorów wiązań wodorowych, temperaturą topnienia, momentem dipolowym, powierzchnią dostępności rozpuszczalnika oraz parachorą.

Obliczone metodą najmniejszych kwadratów równania matematyczne obrazujące powyższe zależności przyjmują następującą postać:

$k = 1 \cdot 10^{-5} \cdot e^{0.8611 \cdot \text{Log}P}$	$r = 0.9267$
$k = 0.1553 \cdot e^{-0.089 \cdot \text{TPSA}}$	$r = -0.9976$
$k = 3 \cdot 10^9 \cdot e^{-0.055 \cdot \text{SASA}}$	$r = 0.9333$
$k = 1 \cdot 10^{-8} \cdot p^{3.8911}$	$r = 0.9663$
$k = 3 \cdot 10^{-7} \cdot MV^2 - 0.0002 \cdot MV + 0.0322$	$r = 0.9980$
$E_a = -0.01 \cdot (T_{\text{top}})^2 + 1.95 \cdot T_{\text{top}} + 60.12$	$r = -0.9644$
$E_a = -39.615 \cdot AW^2 + 611.46 \cdot AW - 2190$	$r = -1.0000$
$E_a = 884.8 \cdot pK_a^2 - 6086.5 \cdot pK_a + 10569$	$r = 1.0000$
$E_a = 0.0604 \cdot \text{SASA}^2 - 75.097 \cdot \text{SASA} + 23473$	$r = -0.9296$
$E_a = 0.0328 \cdot P^2 - 56.955 \cdot P + 24855$	$r = 0.9106$

4.7. Podsumowanie

Kompleksowa analiza trwałości chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej została przeprowadzona metodą RP-HPLC z detekcją UV. W celu osiągnięcia maksymalnej selektywności, dla każdego z zaplanowanych etapów badań opracowano odpowiedni system chromatograficzny, którego walidacja potwierdziła zadowalającą selektywność, liniowość, precyzję, dokładność oraz czułość, gwarantując wiarygodność i miarodajność uzyskanych wyników.

Wykonane badania udowodniły, iż chlorowodorek imidaprilu w postaci czystej substancji jest nietrwały pod względem chemicznym. Do czynników przyspieszających jego rozkład należą wzrost temperatury oraz wzrost wilgotności względnej powietrza. Ponadto, z uwagi na autokatalityczny charakter reakcji, obecność produktów rozkładu również przyczynia się do nasilenia procesu degradacji badanej substancji leczniczej. Rozkład chlorowodorku imidaprilu w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza następuje drogą deestryfikacji z utworzeniem imidaprilatu oraz drogą wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, prowadzącej do powstania pochodnej diketopiperazynowej. Obecność imidaprilatu wpływa na obniżenie biodostępności leku z uwagi na jego niski stopień absorpcji jelitowej. Z kolei wpływ pochodnej diketopiperazynowej na bezpieczeństwo i skuteczność chlorowodorku imidaprilu pozostaje nieznanym. Ponadto w warunkach suchego powietrza rozkład chlorowodorku imidaprilu następuje jedynie drogą cyklizacji.

Substancje pomocnicze stosowane w technologii postaci leku wywierają wpływ na trwałość chlorowodorku imidaprilu. Obecność stearynianu magnezu powoduje zmianę mechanizmu reakcji jego rozkładu z autokatalitycznej na reakcję pierwszorzędową, której jedynym produktem rozkładu jest imidaprilat. Ponadto obecność stearynianu magnezu spowalnia reakcję rozkładu badanej substancji leczniczej oraz zmniejsza jej wrażliwość na zmiany wilgotności względnej powietrza.

Analiza trwałości preparatu handlowego, zawierającego chlorowodorek imidaprilu wykazała, iż jego rozkład w tabletkach zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszorzędowej. Ponadto stwierdzono, iż proces produkcji tabletek wpływa na obniżenie energii aktywacji reakcji rozkładu badanej substancji leczniczej. Wykazano również, że opakowanie bezpośrednie preparatu handlowego wywiera efekt ochronny na tabletki chlorowodorku imidaprilu, dlatego tylko przechowywanie w opakowaniu bezpośrednim zapewnia najwyższą trwałość stosowanego leku.

Analiza QSPR wykazała istnienie korelacji pomiędzy k reakcji autokatalitycznej a LogP , TPSA , SASA , momentem dipolowym i objętością molową. Ponadto E_a reakcji autokatalitycznej koreluje z pK_a , liczbą akceptorów wiązań wodorowych, temperaturą topnienia, SASA oraz parachorą. Ponadto w grupie I-ACE pochodnych estrów (bez lisinoprilu) stwierdzono istnienie zależności $E_a = f(pI)$ oraz $E_a = f(p)$.

5. TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU A JEGO PROFIL BEZPIECZEŃSTWA ONKOLOGICZNEGO – CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Zaprezentowana w ROZDZIALE 4 analiza trwałości chlorowodorku imidaprilu stała się punktem wyjścia dla dalszych rozważań, dotyczących bezpieczeństwa jego stosowania. Jak wykazano, wzrost temperatury, wzrost wilgotności względnej powietrza oraz przechowywanie bez opakowania bezpośredniego są przyczyną pogorszenia trwałości chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej, co w konsekwencji prowadzi do nadmiernej jego degradacji oraz nasilonego tworzenia zanieczyszczeń, obniżających jakość gotowej postaci farmaceutycznej. I tak, istotne naruszenie stabilności leku oraz akumulacja jego produktów rozkładu, jako skutek niewłaściwego przechowywania, stały się podstawą do podjęcia badań w kierunku określenia profilu toksykologicznego próbki chlorowodorku imidaprilu, poddanej działaniu czynników przyspieszających rozkład w celu ustalenia ryzyka wystąpienia niepożądanych efektów, związanych z zażywaniem leku narażonego na niewłaściwe warunki środowiskowe.

Kolejną przesłanką, uzasadniającą podjęcie niniejszej problematyki badawczej jest powszechna wśród chorych tendencja do niestosowania się do zaleceń, odnośnie metod właściwego przechowywania preparatów leczniczych, co potwierdzają wyniki badań szacujące, że około 68% leków znajdujących się w domowych apteczkach, przechowywanych jest w sposób nieoptymalny [123]. Wiąże się to oczywiście ze zwiększoną ekspozycją pacjentów na związki chemiczne, będące produktami rozkładu substancji czynnych, a przedstawiony problem nabiera szczególnego znaczenia w przypadku leków przeznaczonych do terapii chorób przewlekłych, do których należy chlorowodorek imidaprilu. W obliczu wyżej przedstawionych uwarunkowań sądzić bowiem można, iż istnieje ryzyko przewlekłego narażenia na małe dawki produktów degradacji chlorowodorku imidaprilu, przy czym brak danych odnośnie bezpieczeństwa takiego postępowania uzasadnia konieczność przeprowadzenia stosownych analiz.

Warto w tym miejscu podkreślić, że chlorowodorek imidaprilu oraz jego dikwasowa pochodna (imidaprilat), tworząca się w wyniku degradacji, jako aktywne leki przeciwnadciśnieniowe, nie wydają się stanowić ryzyka toksykologicznego. Jednakże pochodna diketopiperazynowa chlorowodorku imidaprilu, będąca jego drugim produktem degradacji, należy do grupy związków, co do bezpieczeństwa których istnieje wiele kontrowersji, związanych z ich potencjalnym wpływem na stymulację kancerogenezy w sposób bezpośredni [124] lub też po uprzednim N-nitrozowaniu w środowisku soku żołądkowego [125].

W związku z powyższym, w niniejszej części rozprawy doktorskiej została przeprowadzona ocena bezpieczeństwa chlorowodorku imidaprilu w kontekście potencjalnego wpływu jego pochodnej

diketopiperazynowej, jako produktu rozkładu, oraz produktów jej N-nitrozowania na proces inicjacji oraz promocji nowotworowej. W tym celu dokonano analizy działania mutagennego ww. związków za pomocą technik *in vitro*. W poprzedzającym część badawczą wstępie teoretycznym przedstawiono przegląd literatury związanej z tematyką dotyczącą wpływu układu renina-angiotensyna na proces kancerogenezy.

*„Rak zaczyna powstawać wówczas,
gdy komórka wylamuje się spod kontroli
mechanizmów decydujących o jej
podziałach i lokalizacji.”*

- A. Weinberg.

*„Według epidemiologów zmiana niekorzystnych
przyzwyczajień społeczeństwa (...) może w znaczny
sposób zmniejszyć ryzyko zachorowań na raka.”*

- J. Limon

5.1. Kancerogeneza

Nowotwory złośliwe są jedną z podstawowych przyczyn zgonów na świecie. W Polsce stanowią drugą co do częstości, zaraz po chorobach układu krążeniowego, przyczynę umieralności, zarówno wśród mężczyzn (26.4%) jak i wśród kobiet (22.8%). W ogólnym ujęciu nowotwór jest chorobą uwarunkowaną genetycznie. Jego charakterystyczną cechą jest niekontrolowany podział komórek, związany z kumulacją trwałych nieprawidłowości sekwencji nukleotydów w obrębie różnych rejonów DNA somatycznej komórki prekursorowej. Sam proces nowotworzenia (*kancerogeneza*) przebiega wielofazowo, zazwyczaj w perspektywie wieloletniej. Kolejnymi etapami *kancerogenezy* są: inicjacja, promocja oraz progresja [5].

Rozwój nowotworu rozpoczyna się w momencie powstania pojedynczej mutacji w genie należącym do grupy tzw. onkogenów lub genów związanych z apoptozą (np. genów *TP53* lub *BCL-2*), którego produkt białkowy uczestniczy w regulacji fundamentalnych funkcji komórkowych, takich jak: replikacja i naprawa DNA, różnicowanie, transmisja sygnałów czy śmierć. Źródłem takiej mutacji są różnorodne czynniki zewnętrzne (*mutageny*), zaś jej utrwaleniu sprzyjają wszelkie uszkodzenia w systemach naprawy DNA. Wraz z zaistnieniem zaburzenia pierwotnego dochodzi do stymulacji kolejnych zdarzeń związanych z transformacją nowotworową, w tym do dalszej destabilizacji materiału genetycznego na drodze toru mutacyjnego. Jest to tzw. okres inicjacji *kancerogenezy*, w czasie którego komórka pod wpływem nagromadzonych zmian przekształca swój fenotyp z prawidłowego w nowotworowy. Cechą charakterystyczną takiej komórki jest jej wysoka aktywność mitotyczna oraz wyłamanie się spod rygoru podziałowego, co daje jej możliwość tworzenia kolejnych subklonów komórek potomnych o coraz mniejszym stopniu zróżnicowania. Dalszemu rozwojowi nowotworu sprzyja ciągła presja selekcyjna ze strony środowiska. Prowadzi ona bowiem do eliminacji populacji komórek o mniejszej zdolności do przetrwania oraz faworyzuje te, które wykazują predyspozycje do naciekania i rozsiewu. Rozpoczyna się wówczas kolejny okres *kancerogenezy*, w którym na drodze selekcji klonalnej komórki nowotworowe nabywają zdolności do migracji. Nosi on nazwę promocji. W następnych etapach coraz szybszy rozrost tkanki nowotworowej stwarza potrzebę jej silniejszego odżywienia, czyli wytworzenia sieci naczyń krwionośnych, które umożliwią dalszy rozwój i ukształtowanie guza. Powstawanie odrębnego unaczynienia w procesie angiogenezy odbywa się przy udziale makrofagów, które infiltrując tkankę nowotworową, identyfikują w jej wnętrzu ogniska wzmożonej eliminacji komórek, obecność których wynika z hipoksji oraz ze zbyt niskiej podaży substancji odżywczych w stosunku do zapotrzebowania. Makrofagi rozpoznają te obszary jako miejsca uszkodzenia tkanki i indukują w nich proces gojenia, który polega na doprowadzeniu łożyska naczyniowego, wytworzeniu tkanki łącznej podporowej oraz na stymulacji procesu regeneracji. Dzięki temu stale powiększający się guz wywołuje coraz więcej uszkodzeń otaczających go struktur a także upośledza czynności sąsiadujących organów oraz powoduje zaburzenia ogólnoustrojowe. Na tym etapie choroby, zwanym progresją, zaczynają pojawiać się

komórki inwazyjne, które mają możliwość przemieszczania się w inne rejony organizmu siecią wytworzonych naczyń krwionośnych. Cechują się one przede wszystkim utratą zdolności do adhezji (obniżenie poziomu kadheryny E) oraz ekspresją enzymów proteolitycznych, odpowiedzialnych za degradację błony komórkowej oraz macierzy międzykomórkowej (metaloproteaz). Zasiedlenie komórki pochodzącej z pierwotnego guza w nowym miejscu prowadzi do utworzenia przerzutu [126].

Komórki nowotworowe nie są metabolicznie obojętne wobec organizmu, w którym żyją. W rzeczywistości ich obecność związana jest z nadmierną ekspresją endogennych cytokin, takich jak transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), czynnik martwicy nowotworów (TNF) czy interleukina 6 (IL-6), które nasilają katabolizm białek i upośledzają pracę układu immunologicznego. Prowadzi to do przewlekłego stanu zapalnego oraz kacheksji nowotworowej, objawiającej się postępującym wyniszczeniem organizmu i w konsekwencji śmiercią [5,126].

Jednym z wielu czynników, warunkujących postęp opisanych powyżej procesów są zaburzenia w funkcjonowaniu układu renina-angiotensyna, co wynika przede wszystkim z udziału głównego efektora tego systemu, angiotensyny II, w regulacji takich procesów jak: cykl komórkowy, ekspresja genów, migracja, apoptoza, indukcja stresu oksydacyjnego oraz angiogeneza. Co więcej, w rozlicznych typach nowotworów obserwowano zmiany poziomów poszczególnych komponentów RAS a także wskazywano na korelację pomiędzy stopniem ich ekspresji a stadium zaawansowania choroby [19]. Szczegółowa charakterystyka mechanizmów, odpowiedzialnych za udział układu renina-angiotensyna w procesie kancerogenezy została w dalszych ROZDZIAŁACH niniejszej pracy.

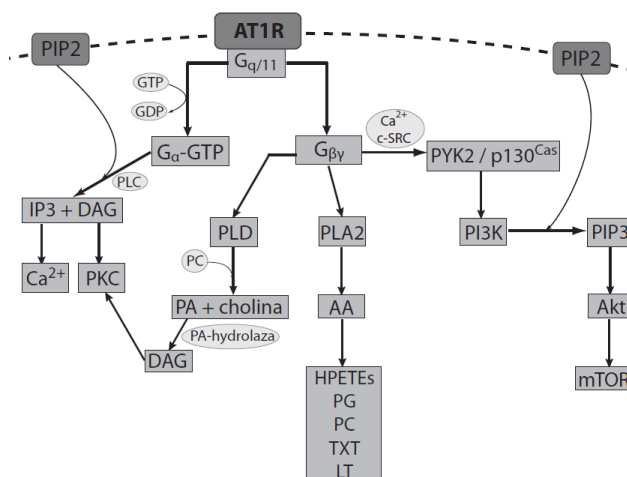
5.2. Transdukcja sygnału przez receptor AT₁

Podstawą dla zrozumienia roli układu renina-angiotensyna w procesie inicjacji, promocji, progresji oraz metastazy nowotworowej jest analiza komórkowych szlaków przekazu informacji, uruchamianych w wyniku obecności angiotensyny II. Jak wiadomo, najważniejszym mediatorem większości biologicznych efektów wymienionego hormonu jest AT₁, który należy do nadrodziny siedmiotransbłonowych receptorów sprzężonych z białkami G, a jego aktywacja wywołuje szereg odpowiedzi komórkowych, zarówno tych związanych z białkami G (odpowieź wczesna), jak i tych niezależnych od białek G (odpowieź późna) [127].

5.2.1. Szlaki sygnalizacyjne sprzężone z AT₁ zależne od białek G

Białka G tworzą dużą nadrodzinę protein błonowych, wiążących nukleotydy guaninowe. Zbudowane są one z trzech podjednostek: G _{α} , G _{β} i G _{γ} , przy czym podjednostka G _{α} posiada aktywność GTP-azy i w wyniku aktywacji receptora łatwo oddysocjowuje od dimeru G _{$\beta\gamma$} . Receptor AT₁ może łączyć się kilkoma podtypami heterotrimerycznych białek G, w tym: G_{q/11} i G_{12/13}, z których każde rozpoznaje właściwą sobie cząsteczkę sygnalizacyjną. I tak: G_{aq/11} pobudza fosfolipazę C (PLC),

$G_{\alpha 12/13}$ uczestniczy w transdukcji sygnału, związanej z aktywacją białek Rho, natomiast dimer $G_{\beta\gamma}$ stymuluje fosfolipazę D (PLD), fosfolipazę A2 (PLA2) oraz kinazę 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) [16]. Poniżej zamieszczono charakterystykę poszczególnych przekaźników niższego rzędu, stymulowanych przez wymienione podjednostki białek G a kolejność zdarzeń, związanych z pobudzeniem G-zależnych ścieżek transdukcji sygnału przez receptor AT_1 przedstawiono schematycznie na RYCINIE 5.1.



RYCINA 5.1.

Kolejność zdarzeń, związanych z pobudzeniem G-zależnych ścieżek transdukcji sygnału przez receptor AT_1 (opracowanie własne wg [16,18]).

Fosfolipaza C katalizuje hydrolizę fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP2) z wytworzeniem 1,2-diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP3) jako wtórnych przekaźników. DAG jest odpowiedzialny za pobudzenie kinazy białkowej C (PKC), zaś IP3 uczestniczy w uwalnianiu jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów, które wywołują skurcz mięśni gładkich. Ufosforylowana PKC, z kolei zaangażowana jest w aktywację wielu ścieżek transdukcji sygnału, w tym: szlaków kinaz białkowych aktywowanych przez miogeny (MAP) oraz szlaku PI3K/Akt/mTOR a także pośredniczy w stymulacji cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych takich jak kinazy SRC, kinaza ogniskowo-adhezyjna (FAK) i kinaza tyrozynowa bogata w prolinę (PYK). PKC wpływa zatem na regulację rozlicznych procesów biologicznych, związanych z proliferacją, różnicowaniem, ekspresją genów, promocją nowotworów, migracją komórek i komunikacją międzykomórkową przez złącza szczelinowe [16,128].

Fosfolipaza A2 przy udziale jonów wapnia i ATP katalizuje uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidu błonowego - fosfatydyloinozytolu, który pod wpływem działania cyklooksygenaz tworzy eikozanoidy. Te ostatnie pełnią z kolei wiele istotnych metabolicznie funkcji a poprzez stymulację kaskady kinaz MAP są zaangażowane między innymi w procesy wzrostowe [16].

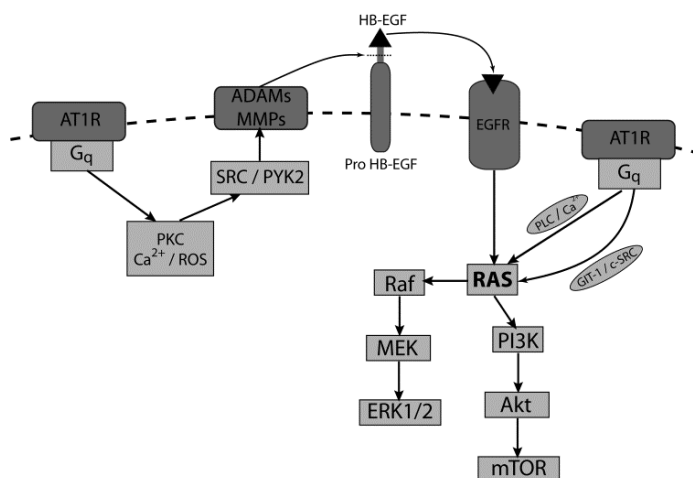
Fosfolipaza D hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe fosfatydylocholinę z wytworzeniem kwasu fosfatydowego (PA) i choliny. PA ma bardzo krótki okres biologicznego półtrwania i jest

szybko przekształcany przez fosfohydrolazę do DAG bądź przez PLA2 do kwasu lizofosfatydowego (LPA). Najlepiej poznane efekty działania LPA to proliferacja komórek naskórka, różnicowanie keratynocytów i agregacja płytek krwi [16,129].

Kinaza 3-fosfatidyloinozytolu ulega aktywacji w wyniku interakcji kompleksu $G_{\beta\gamma}$ /PYK2 z białkiem adaptorowym p130^{Cas}. Wymieniony enzym katalizuje z kolei fosforylację PIP2 do PIP3 i w ten sposób uruchamia szlak PI3K/Akt/mTOR, który jest regulatorem licznych procesów komórkowych, takich jak: wzrost, proliferacja, apoptoza, różnicowanie czy migracja [16,130,131].

Inną rodziną białek G, aktywowanych przez receptor AT_1 są monomeryczne białka G (w tym Ras, Rho i Rac), które posiadają zdolność wiązania GTP i pośredniczą w transmisji sygnałów, wywołujących odpowiedzi późne, związane z procesami rozwojowymi i homeostatycznymi komórki [132]. Poniżej przedstawiono charakterystykę najważniejszych małych białek G, sprzężonych z receptorem AT_1 a kolejność zdarzeń, następujących po pobudzeniu AT_1 -zależnych ścieżek transdukcji sygnału za ich pośrednictwem przedstawiono na RYCINIE 5.2 - 5.3.

Ras jest cząsteczką odpowiedzialną za kontrolę procesów troficznych i mitogennych, co związane jest z jej udziałem w szlaku serynowo-treoninowych kinaz, zwanym Ras/Raf/MEK/ERK. W rzeczywistości, ostatnie ogniwo wymienionej kaskady - kinaza ERK jest typowym efektem, odpowiadającym na stymulację komórki przez czynniki wzrostu, gdyż na poziomie molekularnym funkcjonuje ona jako aktywator jądrowych czynników transkrypcyjnych, takich jak: *c-fos*, *c-myc* czy *c-jun*, uczestniczących w procesach apoptozy, różnicowania i proliferacji. Z tego też względu nadekspresja Ras jest częstym zjawiskiem w przebiegu rozlicznych nowotworów [133]. Pod względem mechanistycznym, w procesie zależnej od AT_1 aktywacji Ras ważną rolę odgrywają kinazy SRC, stymulowane przez GIT1 oraz jony Ca^{2+} , których poziom regulowany jest przez PLC [132].

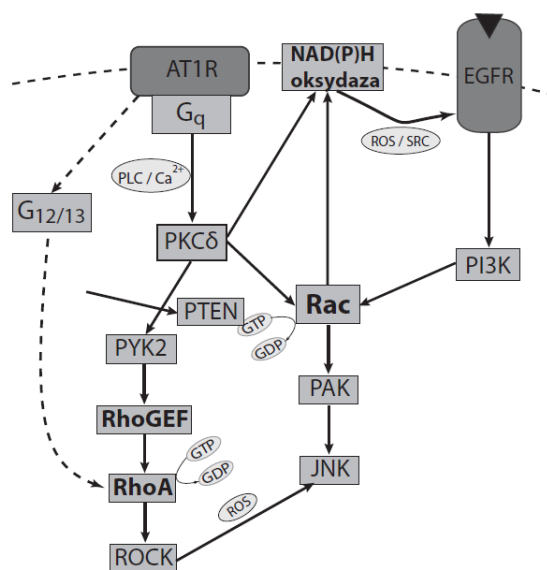


RYCINA 5.2.

Transaktywacja EGFR oraz stymulacja Ras przez AT_1 (opracowanie własne wg [16,18,19]).

RhoA jest białkiem, odpowiedzialnym za dynamiczną reorganizację cytoszkieletu aktomiozynowego w procesie migracji komórek. Jego aktywność wpływa na kształt komórki, zdolność do adhezji międzykomórkowej oraz na kontakt pomiędzy komórką a macierzą zewnątrzkomórkową. Ponadto RhoA reguluje postęp cyklu komórkowego oraz stymuluje proliferację. Nadekspresja tego białka przyczynia się do wzrostu potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych oraz wpływa na ich zdolność do metastazy [134,135]. Bezpośrednim efektem RhoA jest Rho-zależna kinaza (ROCK), która aktywuje przekaźniki niższego rzędu takie jak JNK. Białko RhoA odbiera sygnały od powierzchniowego receptora AT_1 za pośrednictwem białka $G_{12/13}$, którego podjednostka G_α aktywuje białko regulatorowe RhoGEF (*guanine nucleotide exchange factor*). Alternatywnie, RhoA zostaje pobudzone w wyniku stymulacji sprzężonej z AT_1 cząsteczki G_q , na drodze kaskady kinaz PKC δ /PYK2/RhoGEF [132].

Rac, podobnie jak RhoA, jest zaangażowane w proces kontroli organizacji cytoszkieletu aktynowego oraz wpływa na kurczliwość systemu aktomiozynowego. Białko to, zlokalizowane w krawędzi wiodącej migrującej komórki, umożliwia jej polaryzację a także reguluje powstawanie lamelipodiów oraz miejsc adhezji [134,135]. Jego konstytutywna aktywacja przyczynia się do generacji złośliwego fenotypu komórek nowotworowych [136]. Rac ponadto jest ważnym ogniwem szlaku, wiodącego do poburzenia syntazy NAD(P)H, której aktywacja przyczynia się do wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu oraz generacji stresu oksydacyjnego, będącego czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworów. Pobudzenie Rac przez angiotensynę II związane jest ze stymulacją białka G_q oraz jego efektora – PKC, bądź też alternatywnie z transaktywacją receptora EGFR w mechanizmie angażującym PKC, oksydazę NAD(P)H oraz kinazę SRC [132] (RYCINA 5.3).



RYCINA 5.3.

Aktywacja białka Rho i Rac zależna od AT_1 (opracowanie własne wg[132]).

5.2.2. Szlaki sygnalizacyjne sprzężone z AT₁ zależne od kinaz tyrozynowych

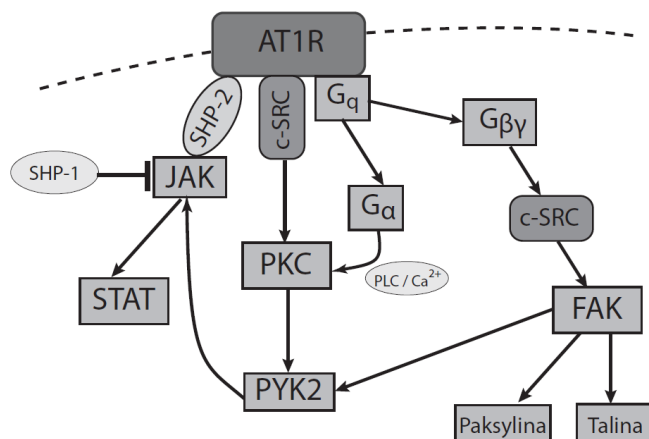
Kinazy tyrozynowe są enzymami, które katalizując reakcje fosforylacji reszt tyrozynowych odpowiednich białek przekaźnikowych, uczestniczą w różnorodnych mechanizmach komunikacji między- i wewnątrzkomórkowej. Do wymienionej rodziny kinaz zaliczane są kinazy tyrozynowe receptorowe (błonowe) oraz kinazy tyrozynowe cytoplazmatyczne.

Stymulacja błonowych kinaz tyrozynowych przez angiotensynę II odbywa się na zasadzie wymiany sygnałów pomiędzy AT₁ a innym receptorem należącym do odrębnego układu białkowego w procesie transaktywacji (*cross-talk*). Dla postępu kancerogenezy najważniejsze znaczenie w tym zakresie ma zależna od angiotensyny II transaktywacja receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) [16,19]. I tak, połączenie angiotensyny II z receptorem AT₁ powoduje aktywację białka G_q oraz zależą od PKC, Ca²⁺ oraz reaktywnych form tlenu stymulację cytoplazmatycznych kinaz SRC oraz PYK2. Zdarzenie to jest z kolei sygnałem dla jednej z metaloproteinaz błonowych do uwolnienia czynnika wzrostu naskórka wiążącego heparynę (HB-EGF), który pobudza EGFR na drodze auto- i parakrynej (RYCINA 5.2) [127]. W konsekwencji aktywowany EGFR stymuluje dalej omawiane już wcześniej szlaki Ras/Raf/MEK/ERK oraz PI3K/AKT/mTOR, uczestniczące w transdukcji sygnału mitogenowego i odpowiadające za nabycie przez komórkę cech złośliwości [16,19].

Z drugiej strony, do grupy cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych, pobudzanych przez receptor AT₁ należą SRC, JAK, FAK i PYK2. Co ciekawe, aktywacja kinazy JAK przez AT₁ może następować w wyniku dwóch mechanizmów: bezpośredniego bądź też pośredniego, uzależnionego od wtórnych mediatorów (RYCINA 5.4). I tak, w mechanizmie bezpośrednim fundamentalne znaczenie odgrywa zdolność wymienionej kinazy do fizycznego kontaktu z częścią cytoplazmatyczną receptora AT₁ w obecności białek adaptorowych z grupy SHP-2 a inhibitorem tego procesu jest fosfataza SHP-1. Z kolei aktywacja pośrednia odbywa się dwiema ścieżkami tj.: przy udziale białek G_q i PLC lub też za pośrednictwem kinaz SRC, PKC i PYK2. Niezależnie od mechanizmu pobudzenia, fosforylacja białek JAK wywołana przez AT₁ powoduje translokację do jądra komórkowego białek typu STAT, które pełnią rolę czynników transkrypcyjnych [16].

Drugą grupą kinaz cytoplazmatycznych, aktywowanych przez angiotensynę II są białka odpowiedzialne za strukturę cytoszkieletu, czyli FAK i PYK2. Kinaza FAK zlokalizowana jest w komórkach, wytwarzających ogniska adhezji z macierzą zewnątrzkomórkową lub z innymi komórkami i jest ona zaangażowana w wiele procesów homeostatycznych m.in. w regulację cyklu komórkowego, adhezję, migrację, inwazję, metastazę, fosforylację białek cytoszkieletu oraz apoptozę, zaś zaburzenia jej przekaźnictwa są ważnym elementem progresji nowotworowej. W istocie, nadekspresja FAK koreluje ze wzmożoną zdolnością komórek nowotworowych do migracji i przerzutowania, co jest bezpośrednio związane z zależną od niej aktywacją JNK, która stymuluje syntezę metaloproteinaz 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9), czyli enzymów degradujących podścielisko łącznotkankowe i umożliwiających wzrost guza pierwotnego, migrację komórek, angiogenezę

i tworzenie ognisk przerzutowych. Ponadto nadekspresja FAK hamuje programową śmierć komórki poprzez aktywację białek antyapoptotycznych oraz indukcję adhezji do macierzy zewnątrzkomórkowej a także nasila proliferację związaną z nadmierną stymulacją ERK1/2 oraz PI3K [137,138].



RYCINA 5.4.

Aktywacja cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych przez od AT₁ (opracowanie własne wg [16,137,138].).

5.3. Ekspresja elementów RAS w komórkach nowotworowych

Zdolność nowotworu do przeżycia i rozwoju uwarunkowana jest zarówno fenotypem komórek tworzących jego masę, jak również elementami środowiska, w którym one egzystują, przy czym tkanka nowotworowa posiada zdolność regulacji tych drugich drogą sekrecji czynników hormonalnych, za pomocą których dostosowuje ona warunki swego otoczenia do własnych potrzeb. Proces ten przebiega głównie dzięki mechanizmom parakrynnym, poprzez indukcję istotnych zmian w funkcjonowaniu różnorodnych układów gospodarza, które w wyniku przeprogramowania zaczynają promować patologiczny rozrost i rozprzestrzenianie guza. I tak, liczne doniesienia naukowe z badań *in vitro* i *in vivo* dowodzą, iż w wielu typach nowotworów ludzkich dochodzi do zmian ekspresji poszczególnych komponentów układu RAS, co koreluje z gorszym rokowaniem dla pacjenta. W rzeczywistości, obecność ACE, AT₁, AT₂ czy angiotensyny II została potwierdzona w następujących guzach litych: rak piersi, jajnika, gruczołu krokowego, trzustki, płuca, mózgu, wątroby oraz jelita grubego. Co ciekawe, nowotwory, w których odnotowano występowanie wyżej wymienionych elementów RAS wywodzą się z tkanek, zdolnych do ich lokalnej ekspresji. Sugeruje to, zatem, iż udział RAS w procesie kancerogenezy wynika z zaburzeń w jego sygnalizacji a nie z ectopowej ekspresji jego komponentów. Nie jest jednak wiadomym, czy obserwowana dysregulacja RAS jest efektem sprawczym, czy też może konsekwencją postępującego procesu nowotworowego [19]. Niezależnie od tego, w przebiegu rozlicznych nowotworów potwierdzono dalej opisane aberracje ekspresji elementów tego systemu.

Wzrost gęstości receptora AT₁ występuje w: raku kolczystokomórkowym skóry, raku trzustki, hormonoopornym raku prostaty oraz raku krtani. Ponadto w raku żołądka, jajnika oraz raku szyjki macicy nadekspresja tego receptora koreluje ze zwiększoną inwazyjnością guza, podczas gdy w raku piersi wraz z progresją choroby ilość receptora AT₁ w komórkach nowotworowych spada [139-140]. Co więcej, polimorfizm genu kodującego receptor AT₁ jest czynnikiem, wpływającym na częstość występowania niektórych chorób nowotworowych. I tak, w przypadku polimorfizmu typu A1166C obecność allelu A predysponuje do rozwoju łagodnego przerostu gruczołu krokowego [142]. Z kolei, w przypadku polimorfizmu typu A168G, C535T, T825A genotyp AA, CC, TT jest związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka piersi [143].

Nadekspresja ACE potwierdzona została w łagodnym przerście gruczołu krokowego, hormonoopornym raku prostaty [19], raku żołądka, raku jelita grubego oraz w nowotworowych naczyniach krwionośnych [141,144]. Ponadto, podobnie jak w przypadku receptora AT₁, w badaniach klinicznych obserwowano zależność pomiędzy zdeterminowanym genetycznie, osobniczym poziomem ACE a częstością zachorowań na niektóre choroby nowotworowe. W ujęciu szczegółowym, zmienność aktywności ACE w osoczu i w tkankach wynika z polimorfizmu inercyjno-delecyjnego I/D w obrębie genu dla ACE, przy czym forma homozygotyczna delecyjna (DD) wiąże się z wyższą aktywnością ACE w porównaniu do formy heterozygotycznej (ID) czy formy homozygotycznej inercyjnej (II). Genotyp DD jest przy tym związany z wyższym ryzykiem rozwoju raka prostaty oraz raka piersi [142,143] a także z większą inwazyjnością komórek raka żołądka [145]. Z kolei genotyp II predysponuje do rozwoju raka endometrium [146].

Obniżone stężenie peptydaz tkankowych takich jak Asp-AP, APB, APN obserwowano w raku nerkowokomórkowym. W raku płaskonabłonkowym głowy i szyi [147] oraz w raku płaskonabłonkowym płuc natomiast **poziom wymienionych peptydaz był podwyższony** [148,149].

5.4. Angiotensyna II a proces nowotworowy

Jak już wcześniej wspomniano, tkankowe układy RAS wpływają na proliferację różnicowanie, dojrzewanie i apoptozę komórek oraz są zaangażowane w promocję angiogenezy i stanu zapalnego. Efekty te stanowią natomiast ważne determinanty postępu kancerogenezy. Z tego względu zdolność guza do nadmiernej stymulacji RAS wydaje się stanowić istotną ewolucyjnie cechę, ułatwiającą jego rozwój i progresję [19,149]. Szczegółowe mechanizmy, związane z indukcją procesu nowotworzenia przez angiotensynę II zaprezentowano poniżej.

Proliferacja i apoptoza. Angiotensyna II za pośrednictwem receptora AT₁ może wywierać dwojaki wpływ na przebieg cyklu komórkowego, skutkujący albo nasileniem podziałów (efekt proproliferacyjny) albo odwrotnie, zatrzymaniem go w fazie G₁ (zjawisko hipertrofii) [151]. Molekularne mechanizmy proproliferacyjnego działania angiotensyny II związane są przede

wszystkim z transaktywacją receptorowych kinaz tyrozynowych, w tym EGFR i receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR) oraz z aktywacją kinaz cytoplazmatycznych, takich jak: PLC γ , JAK, FAK, SRC czy PI3K. W praktyce transaktywacja EGFR przez AT₁ ma miejsce w komórkach raka piersi i raka gruczołu krokowego, przy czym zjawisko to pozytywnie koreluje ze wzrostem guza. Działanie antyapoptotyczne angiotensyny II, natomiast wywołane jest nadmierną stymulacją kinazy PI3K, a efekt ten obserwowano między innymi w komórkach raka jelita grubego oraz w komórkach nabłonika kosmówkowego złośliwego [141].

Migracja, inwazja i metastaza. Nadmierna ekspresja angiotensyny II oraz innych elementów RAS, takich jak AT₁ i ACE jest związana ze wzrostem potencjału metastatycznego niektórych nowotworów, w tym: raka żołądka, jajnika, jelita grubego, płuca czy raka kosmówkowego [19], w którym wzrost migracji komórek wywołany jest zależną od angiotensyny II stymulacją kinazy PI3K [152]. Ponadto akumulacja regulowanego przez angiotensynę II białka RhoA także przyczynia się do nasilenia inwazji nowotworowej, głównie w raku jajnika, pęcherza moczowego, żołądka, przełyku oraz jądra [136].

Angiogeneza i stan zapalny. Proangiogeny wpływ angiotensyny II związany jest przede wszystkim z zależną od receptora AT₁ indukcją aktywności czynników wzrostu, takich jak: czynnik wzrostu naczyń (VEGF), PDGF oraz transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β), które na drodze auto- oraz parakrynej nasilają proliferację oraz migrację komórek endotelialnych a także stymulują formowanie macierzy zewnątrzkomórkowej [150,141]. I tak, pozytywny związek pomiędzy ekspresją AT₁ a stężeniem VEGF obserwowano w komórkach raka żołądka [153], raka jajnika [154] oraz raka endometrium [155], w których wysoki poziom obu tych białek determinował zwiększenie gęstości sieci mikronaczyń wewnątrz guza. W tym miejscu na uwagę zasługuje również fakt, iż wzmożonej ekspresji genu VEGF w obecności angiotensyny II towarzyszy także zależny od oksydazy NAD(P)H, wzrost syntezy reaktywnych form tlenu (H₂O₂ i O₂⁻) oraz wydzielanie czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1 α), co sugeruje, że angiogeneza zależna od angiotensyny II jest ściśle powiązana ze stresem oksydacyjnym, powodującym stan zapalny. Utrzymaniu tego stanu, natomiast sprzyja stymulacja przez angiotensynę II receptorów AT₁ na powierzchni monocytów i neutrofilów, przez co nasila się ich migracja na drodze szlaków sygnalizacyjnych, zależnych od ERK1/2, PYK2, c-SRC i p38 oraz pobudzona zostaje sekrecja substancji o charakterze proangiogenym i prozapalnym, w tym: IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α , które promują progresję nowotworową [19,141,150].

Kacheksja nowotworowa. Angiotensyna II posiada także zdolność indukcji procesu degradacji białek w mechanizmie zależnym od systemu ubikwityna-proteasom, a jej interakcja z receptorem AT₂ skutkuje nasileniem apoptozy, co stanowi jeden z czynników sprawczych postępu kacheksji nowotworowej. Dodatkowo indukowana angiotensyną II generacja reaktywnych form tlenu w wyniku stymulacji NAD(P)H oksydazy również sprzyja wyniszczeniu organizmu na drodze podtrzymywania stresu oksydacyjnego oraz uszkodzenia struktur białkowych [156].

5.5. Wpływ I-ACE na przebieg procesu kancerogenezy

Wpływ angiotensyny II na postęp kancerogenezy wskazuje na możliwość zastosowania w farmakoterapii onkologicznej leków modulujących jej aktywność, w tym I-ACE. I tak potencjalne działanie przeciwnowotworowe przedstawicieli tej klasy obserwowano w następujących przypadkach:

- **działanie antyproliferacyjne i proapoptotyczne**, skutkujące zmniejszeniem masy guza, potwierdzone w badaniach *in vitro* dla kaptoprilu (w raku kolczystokomórkowym skóry, włókniakomięsaku, nerwiaku niedojrzałym, raku płuc, raku nerkowokomórkowym, raku wątrobowokomórkowym i raku sutka), perindoprilu (w gruczolakoraku trzustki) oraz enalaprilu (w nerwiaku niedojrzałym i raku żołądka) [38,157-159];
- **hamowanie migracji komórek**, powodujące zmniejszoną zdolność guza do metastazy, wykazane dla kaptoprilu (na endotelialnych liniach komórkowych, komórkach raka płuc i komórkach glejaka) oraz perindoprilu i enalaprilu (na endotelialnych liniach komórkowych); efekt ten prawdopodobnie związany jest z zależną od I-ACE supresją aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz z zahamowaniem degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, skutkującym ograniczeniem ruchliwości komórek [38];
- **działanie antyangiogenne**, stwierdzone w badaniach *in vitro* dla perindoprilu (w raku wątrobowokomórkowym i w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi), wynikające ze zmniejszonej ekspresji VEGF [38,160], oraz dla kaptoprilu (w raku jelita grubego [161] i w czerniaku [162]), wynikające z redukcji aktywności MMP lub pobudzenia generacji angiostatyny, która jest silną substancją antyangiogenną;
- **działanie protekcyjne na tkankę mięśniową** w przebiegu kacheksji nowotworowej, obserwowane dla imidaprilu w badaniach na zwierzętach oraz w badaniu klinicznym III fazy na grupie pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc i rakiem trzustki a także dla perindoprilu w przedklinicznych badaniach *in vivo* [163-165];
- **działanie immunomodulujące**, wynikające z:
 - przywracania właściwego poziomu Ac-SDKP, który jest naturalnym inhibitorem proliferacji pluripotentnych macierzystych komórek hematopoezy,
 - przywracania fizjologicznej ekspresji receptora S1P1 na powierzchni komórek macierzystych hematopoezy, co normalizuje ich migrację oraz ogranicza akumulację w śledzionie, dzięki czemu zatrzymana zostaje produkcja monocytów a tym samym dopływ makrofagów stanu zapalnego do tkanki nowotworowej. Działanie modulujące w stosunku do receptora S1P1 wykazano dla enalaprilu w badaniu na zwierzętach z przeszczepionymi komórkami gruczolakoraka płuc, w których podaż tego leku skutkowała hamowaniem wzrostu guza i poprawą przeżycia wśród zwierząt eksperymentalnych [166,167].

Przedstawione powyżej korzystne efekty działania I-ACE pozostają jednak w sprzeczności z licznymi danymi przedklinicznymi, które przypisują im właściwości **proangiogenne** oraz **immunosupresyjne**, a tym samym - sprzyjające rozwojowi guza. I tak, indukcja procesu neowaskularyzacji wykazana została w badaniach na modelach zwierzęcych dla następujących przedstawicieli klasy: ramipril, chinapril, imidapril, cilazapril i perindopril, czyli związków, które charakteryzują się dużą lipofilowością oraz wysokim stopniem penetracji tkankowej. Co więcej, w badaniach *in vitro* wykazano, że formowanie nowych naczyń krwionośnych w obecności perindoprylu wynika ze zwiększonego poziomu bradykininy oraz z uaktywnienia receptora bradykininowego B₂, który powoduje zwiększenie stężenia NO i wzrost ekspresji czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-2) oraz VEGF [168-170]. Działanie immunosupresyjne, natomiast obserwowane było w badaniach na modelach zwierzęcych dla kaptoprilu, który indukował upośledzenie funkcji limfocytów T oraz przyczyniał się do nasilenia wzrostu guzów immunogennych [171].

Oprócz tego niejednoznacznych informacji odnośnie wpływu I-ACE na proces nowotworowy dostarczają wyniki retrospektywnych badań epidemiologicznych, które w zależności od populacji, jednostki chorobowej, metodyki zbierania danych oraz substancji czynnej wykazują efekt neutralny, negatywny bądź pozytywny w kontekście ryzyka onkologicznego, związanego z terapią przeciwnadciśnieniową z wykorzystaniem omawianej grupy leków [38].

W związku z powyższym, uzasadnionym wydają się być hipotezy o potencjalnym wpływie I-ACE na inicjację oraz promocję kancerogenezy. Z uwagi jednak na brak danych, wskazujących jednoznacznie na ewentualny mechanizm, związany z takim działaniem, w ramach niniejszej pracy doktorskiej postanowiono przeanalizować jeden z podstawowych procesów prowadzących do indukcji procesu nowotworzenia, a więc mutagenezę w kontekście cech związanych z trwałością oraz mechanizmem degradacji chlorowodorku imidaprilu.

5.6. Badania mutagenności leku

W ramach profilaktyki przeciwnowotworowej szczególne znaczenie przypisywane jest badaniom działania rakotwórczego substancji leczniczych, które obejmują ocenę ich stopnia genotoksyczności oraz mutagenności. W rzeczywistości związek pomiędzy mutagennością a rakotwórczością substancji jest bardzo silny, ponieważ aż 90% związków rakotwórczych wykazuje działanie mutagenne [4], głównie w mechanizmie, polegającym na alkilacji DNA, prowadzącej do jego uszkodzenia, co jak wiadomo jest czynnikiem wyzwalającym transformację nowotworową [5].

Najbardziej wiarygodną metodą oceny stopnia rakotwórczości substancji są badania epidemiologiczne, jednakże wysoki koszt oraz czasochłonność znacznie ograniczają ich zastosowanie. Z tego względu podstawowym elementem analiz toksykologicznych w tym zakresie stały się przedkliniczne badania na modelach zwierzęcych oraz biologiczne testy *in vitro*, zdolne do wykrycia

działania genotoksycznego oraz mutagennego ksenobiotyku, co w świetle powyższych informacji stanowi wystarczające kryterium klasyfikacji substancji jako kancerogenu. W tym miejscu na uwagę zasługuje fakt, iż testy *in vitro* najczęściej wykorzystywane są w badaniach skriningowych do wstępnej oceny potencjalnych kancerogenów, a od ich wyniku uzależnione jest dalsze postępowanie badawcze. Zgodnie z wytycznymi *Organisation for Economic Co-operation and Development* należą do nich:

Badania mutacji genomowych

- test mutacji powrotnych wg *Ames'a* w systemie *Salmonella typhimurium*,
- test mutacji powrotnych wg *Ames'a* w systemie *Escherichia coli*,
- test mutacji genowych na komórkach ssaków:
 - test mutacji genu kinazy tymidynowej na komórkach chłoniaka myszy,
 - test mutacji genu fosforybozylotransferazy ksantynowo-guaninowej,
 - test mutacji genu fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej na liniach komórek świnki morskiej lub ludzkich komórkach limfoblastycznych,

Badania aberracji chromosomowych

- test aberracji chromosomowych *in vitro* na komórkach ssaków,
- test mikrojądrowy *in vitro*,
- test dominujących mutacji letalnych *in vitro*,

Badania uszkodzeń DNA

- test wymiany chromatyd siostrzanych *in vitro*,
- transformacja komórek ssaków *in vitro* [4].

5.6.1. Test mutacji powrotnych w systemie *Salmonella typhimurium*

Najszerzej stosowanym, szybkim, prostym i czułym testem bakteryjnym, wykorzystywanym do wstępnej selekcji potencjalnych mutagenów i związków rakotwórczych jest test *Salmonella*, opracowany przez *Ames'a* i współpracowników [172,173]. Jego podstawą oznaczenia jest możliwość specjalnie skonstruowanych, histydyno-zależnych, auktotroficznych mutantów bakterii z rodzaju *Salmonella typhimurium* do rewersji do formy prototroficznej w wyniku ekspozycji na działanie czynnika mutagennego. I tak, macierzyste szczepy testowe są wyjściowo niezdolne do wzrostu na podłożu minimalnym, pozbawionym histydyny, co wynika z mutacji punktowych wprowadzonych do ich operonu biosyntezy histydyny, które powodują utratę ekspresji enzymów odpowiedzialnych za wytwarzanie tego aminokwasu. Jednakże w obecności mutagenu dochodzi do substytucji par zasad lub do zmiany fazy odczytu w pobliżu miejsca mutacji pierwotnej, co powoduje jej rewersję, dającą

w konsekwencji przywrócenie funkcjonalności genu wyciszonego w szczepie macierzystym. Bakterie zaczynają wówczas biosyntezywać histydynę, dzięki czemu obserwowany jest wzrost kolonii rewertantów również w warunkach braku tego aminokwasu w podłożu hodowlanym [172-174].

W ramach testu *Ames'a* wykorzystywanych jest kilka szczepów bakterii z rodzaju *Salmonella typhimurium*, w tym: TA 1538, TA 1537, TA 1535, TA 104, TA 102, TA 100, TA 98, TA 97, których mutacje podstawowe zlokalizowane są w różnych genach operonu histydyny, dzięki czemu każdy z nich może posłużyć do identyfikacji mutagenów o odmiennych mechanizmach działania. I tak, szczepy TA 1535 i TA 100 stosowane są do wykrycia mutagenów, powodujących substytucję par zasad. Szczepy TA 1538 i TA 98 z kolei rozpoznają mutageny, wywołujące przesunięcie ramki odczytu typu insercja jednego nukleotydu ze zmianą wszystkich kodonów za miejscem mutacji. Szczep TA 1537 natomiast pozwala na identyfikację mutagenów, generujących zmianę ramki odczytu typu delecja jednego kodonu. Oprócz tego, w genomie wymienionych szczepów testowych obecne są także dodatkowe mutacje, które zwiększają wrażliwość komórek bakteryjnych na rewersję mutacji w wyniku mutagennego działania badanych substancji, co ma na celu poprawienie czułości metody. Genotypy ww. szczepów testowych zaprezentowano w TABELI 5.1 [174]:

TABELA 5.1.
Genotypy szczepów Salmonella typhimurium wykorzystywanych w teście Ames'a

Szczep	Mutacja podstawowa	Mutacje dodatkowe		
	Mutacja w operonie histydyny	<i>uvrB</i>	Defekt ściany komórkowej	Plazmid
	<u>Substytucja par zasad</u>			
TA 1535	<i>hisG46</i>	Delecja	<i>rfa</i>	brak
TA 100	<i>hisG46</i>	Delecja	<i>rfa</i>	pKM101
	<u>Zmiana ramki odczytu</u>			
TA 1538	<i>hisD3052</i>	Delecja	<i>rfa</i>	brak
TA 98	<i>hisD3052</i>	Delecja	<i>rfa</i>	pKM101
TA 1537	<i>hisC3076</i>	Delecja	<i>rfa</i>	brak
TA 97	<i>hisD6610, hisO1242</i>	Delecja	<i>rfa</i>	pKM101
	<u>Tranzycja</u>			
TA 102	<i>hisG428</i>	Typ dziki	<i>rfa</i>	pKM101, pAQ1
TA 104	<i>hisG428</i>	Delecja	<i>rfa</i>	brak

Mutacja dodatkowa, polegająca na delecji *uvrB* powoduje utratę genu dla enzymów wycinających dimery pirymidynowe, co eliminuje mechanizm dokładnej reperacji DNA przez wycinanie nukleotydów oraz sprawia, że więcej anomalii naprawianych jest przez system błędnej naprawy DNA, a powstałe podczas kontaktu z mutagenem mutacje punktowe są widoczne fenotypowo. Mutacja *rfa* natomiast warunkuje obecność defektów w budowie lipopolisacharydu

w obrębie ściany komórkowej komórki bakteryjnej, przez co zwiększa się jej przepuszczalność dla dużych cząsteczek mutagenu. Ponadto wprowadzony na drodze inżynierii genetycznej plazmid pKM101, który zawiera gen *mucAB*, zwiększa wrażliwość szczepów testowych na działanie mutagenów zależnych od systemu rekombinacyjnej, błędnej naprawy DNA oraz warunkuje ich oporność na ampicylinę. Z drugiej strony plazmid pAQ1 odpowiada części operonu histydyny, a jego insercja zwiększa ilość celów molekularnych dla związku mutagennego [174].

Jednym z ograniczeń testu mutacji powrotnych wg *Ames'a* są różnice ewolucyjne pomiędzy komórkami systemu badawczego, który należy do królestwa *Procaryota*, a komórkami ssaczymi, głównie w zakresie mechanizmów metabolizmu ksenobiotyków (m.in. brak ekspresji cytochromu P450), budowy chromosomów oraz procesów naprawy DNA. Niejednorodność ta sprawia bowiem, iż bakterie *Salmonella typhimurium* nie mogą być bezpośrednio stosowane do oceny właściwości mutagennych ksenobiotyków u ludzi, gdyż są nieefektywne w analizie mutagennych metabolitów substancji badanych. Praktycznym rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie w teście *Ames'a* egzogennych źródeł aktywacji metabolicznej, których zadaniem jest upodobnienie warunków analizy do warunków panujących w organizmie człowieka [173]. I tak, powszechnie stosowanym systemem aktywacji metabolicznej jest wzbogacona o NADP oraz kofaktory dla oksydacji zależnej od NADPH postmitochondrialna frakcja homogenatu (S9), pozyskanego z wątroby gryzoni poddanych uprzednio działaniu czynników indukujących enzymy, np. Aroclor 1254 lub mieszanina fenobarbitalu i β -naftoflawonu. Frakcja ta zawiera zależne od cytochromu P450 oksygenazy, które katalizują większość reakcji I fazy metabolizmu ksenobiotyków a zastosowanie jej daje możliwość poszerzenia spektrum wiarygodnie testowanych związków [174]. Pamiętać jednak należy, iż istnieje grupa ksenobiotyków, których działanie mutagenne nie może zostać wykryte za pomocą testów bakteryjnych a należą do nich: związki bakteriobójcze i bakteriostatyczne, antybiotyki oraz związki takie jak analogi nukleozydów oraz inhibitory topoizomerazy, ponieważ działanie ich opiera się o mechanizmy nieulegające ekspresji w komórkach prokariotycznych [173,174].

Pod względem metodologicznym opracowano kilka technik wykonania testu *Ames'a*, w tym:

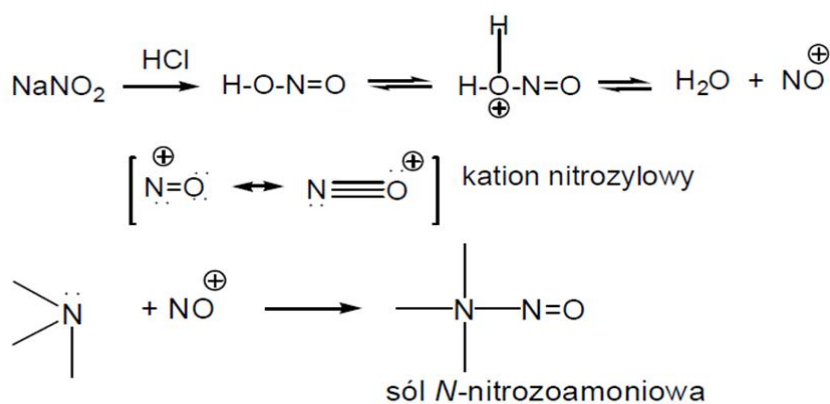
- metodę punktową (*ang. spot test*),
- metodę płytkową (*ang. plate incorporation technique*),
- metodę fluktuacyjną (*ang. fluctuation method*) [174].

Z wymienionych powyżej, metoda fluktuacyjna charakteryzuje się największą czułością i dokładnością, co umożliwia jej zastosowanie do wykrywania mutagenów, występujących w środowisku w niskich stężeniach. Ponadto cechuje się ona niskim zużyciem substancji badanej, prostotą wykonania oraz niewielką czasochłonnością [175,176] i z tych właśnie względów została ona wybrana jako metoda badawcza do oceny mutagenności produktu degradacji chlorowodorku imidaprilu w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

5.7. Mutagenność związków N-nitrozowych

N-nitrozozwiązki stanowią grupę toksycznych substancji chemicznych, które wykazują właściwości genotoksyczne, mutagenne, teratogenne i kancerogenne wynikające z alkilacji oraz fragmentacji DNA [177,178] a także z ich udziału w reakcjach oksydo-redukcyjnych, prowadzących do wytworzenia wolnych rodników [178]. Istotnie, silna korelacja pomiędzy narażeniem na związki N-nitrozowe lub ich prekursorów a rozwojem rozlicznych nowotworów, w tym nowotworów jamy ustnej, żołądka, przełyku, jelita grubego, mózgu, wątroby, płuc, nerek, pęcherza moczowego, języka oraz trzustki potwierdzona została wynikami wielu badań epidemiologicznych [179-181]. Dodatkowo, w przypadku długotrwałej ekspozycji na N-nitrozozwiązki stwierdzono istnienie liniowej zależności efektu rakotwórczego od dawki ekspozycyjnej, również w zakresie bardzo niskich stężeń, co sugeruje brak poziomu granicznego, poniżej którego nie zostanie odnotowany ich szkodliwy efekt [182].

Godnym uwagi jest fakt, iż stopień narażenia człowieka na działanie N-nitrozozwiązków jest pochodną dwóch czynników, a więc ekspozycji środowiskowej oraz wewnątrzustrojowej. I tak, jako kancerogeny egzogenne N-nitrozozwiązki obecne są w rozlicznych elementach środowiska, w tym w żywności, wodzie pitnej, powietrzu, produktach farmaceutycznych oraz kosmetykach. Jednakże to nie szerokie rozpowszechnienie a raczej ich endogenna produkcja z N-nitrozowalnych prekursorów, do których należy również wiele leków, jest głównym źródłem szkodliwego działania tej grupy ksenobiotyków. Co istotne, substancjami leczniczymi, które w odpowiednich warunkach mogą stać substratami w reakcji wewnątrzustrojowego N-nitrozowania są cząsteczki, zawierające następujące motywy strukturalne: dialkylową, alkiloarylową, diarylową lub cykliczną aminę drugorzędową, aminę trzeciorzędową [178,183-185], cyjanamid, guanidynę, amidynę, hydroksylaminę, hydrazyd, hydrazon, hydrazynę [178], diketopiperazynę [185,186] oraz piperazynę [178,187,188]. Przedstawiona poniżej RYCINA 5.5 obrazuje przebieg nieenzymatycznego procesu N-nitrozowania *in vivo* dla amin drugorzędowych.



RYCINA 5.5.

Przebieg nieenzymatycznej reakcji nitrozowania amin drugorzędowych in vivo, zależnej od obecności jonów azotanowych (III) oraz jonów wodorowych. Opracowanie własne wg [178].

Jak zatem wynika z powyższego schematu, dla postępu reakcji endogennego tworzenia N-nitrozozwiązków niezbędna jest obecność czynnika nitrozującego, a więc jonów azotanowych (III) oraz jonów wodorowych, przy czym źródłem tych pierwszych w organizmie człowieka mogą być zarówno konserwowane produkty spożywcze, głównie produkty mięsne, jak również woda pitna oraz rośliny jadalne, które pobierają związki azotowe z gleby w postaci rozpuszczalnych soli. Warto przy tym podkreślić, iż drogą tą dostaje się do organizmu ludzkiego około 20% ogólnej puli azotanów, jaka przenika do żołądka w ciągu doby, co w krajach europejskich stanowi około 1 – 4 mmoli/dzień w przeliczeniu na 1 osobę [189]. Znacznie większa ilość endogennych jonów azotanowych (III) (bo aż 80%) powstaje jednak z jonów azotanowych (V) w toku reakcji enzymatycznych, zachodzących w jamie ustnej, które katalizowane są przez bakteryjną reduktazę azotanową. Co więcej, źródłem azotanów oraz czynników nitrozujących *in vivo* mogą być także reakcje enzymatyczne katalizowane przez aktywowane makrofagi, generujące tlenek azotu (NO[•]), który może ulec dalszej konwersji do tlenku azotu (III) N₂O₃. Niezależnie od źródła pochodzenia, obecne w żołądku czynniki nitrozujące biorą bezpośredni udział we właściwej reakcji N-nitrozowania innych ksenobiotyków, czemu sprzyja silnie kwasowe *pH* środowiska [178]. Alternatywnie, równoległy mechanizm endogennej syntezy N-nitrozozwiązków może przebiegać z udziałem bakterii jelitowych [190], głównie z rodzajów: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella* i *Neisseria* [191], które wykazują ekspresję enzymów nitrozujących, takich jak reduktaza azotanowa lub cytochrom cd₁ [192,163].

Jak już wcześniej zaznaczono, prekursorami związków N-nitrozowych, generowanych endogennie mogą być środki lecznicze, do których przykładowo należą: allopurinol, ampicylina, atenolol, chloramfenikol, enalapril, diazepam, diklofenak, furosemid, propranolol, ranitydyna, werapamil i wiele innych, a możliwość powstawania ich N-nitrozowych metabolitów potwierdzona została w rozlicznych badaniach *in vitro*. Ponadto produkty reakcji N-nitrozowania wielu leków wykazywały właściwości genotoksyczne i kancerogenne w przebiegu badań eksperymentalnych, w tym w teście *Ames'a* w systemie *Salmonella typhimurium* z wykorzystaniem następujących szczepów testowych: TA 1535, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1537 [178]. Z uwagi jednak na bardzo znikomą wiedzę w zakresie podatności leków z grupy I-ACE na endogenne N-nitrozowanie, któremu może towarzyszyć powstawanie mutagennych produktów, w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonano toksykologiczną analizę chlorowodorku imidaprilu oraz jego pochodnej diketopiperazynowej jako produktu degradacji, oceniającą zdolność badanych substancji, po ich uprzednim nitrozowaniu, do wywołania mutacji powrotnych w auktotroficznych szczepach *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

5.8. Ocena podatności leku na N-nitrozowanie

Znanym testem, wykorzystywanym do oceny podatności leku na N-nitrozowanie w warunkach *in vitro* jest, rekomendowany przez WHO, tzw. NAP test (*ang. nitrosation assay procedure*), w ramach którego ustanowione zostały standardowe warunki przeprowadzenia reakcji N-nitrozowania. I tak, zaakceptowane wytyczne dokładnie określają stężenie substancji nitrozowanej (10 mM), stężenie jonów azotanowych (III) (40 mM), temperaturę (37°C), *pH* (3-4) oraz czas reakcji (1 h), zapewniając tym samym optymalne środowisko oraz odpowiedni nadmiar środka nitrozującego, celem maksymalizacji wydajności procesu oraz poprawienia czułości metod analitycznych, służących do późniejszej analizy ilościowej utworzonego produktu [178,194,195]. Podstawową wadą tej metody jest jednak brak możliwości oceny faktycznych stężeń związków N-nitrozowych, powstających *in vivo* na drodze N-nitrozowania leków, a wynika to przede wszystkim z faktu, iż ostateczna efektywność reakcji endogennego nitrozowania jest pochodną wielu subiektywnych czynników, takich jak: obecność katalizatorów i inhibitorów, dostępność substratu, faktyczne *pH* żołądka czy zawartość treści żołądkowej. W związku z powyższym jedyną wiarygodną metodą oceny stężenia produktów powstałych w wyniku N-nitrozowania leków wydaje się być analiza ilościowa próbek soku żołądkowego, pobranych od pacjentów przyjmujących standardowo dany lek w dawkach terapeutycznych. Proces ten jest jednak niezwykle skomplikowany, gdyż wymaga zastosowania metod inwazyjnych a dodatkowym utrudnieniem jest fakt, iż poziom oczekiwanych produktów badanej reakcji jest z reguły bardzo niski i nie przekracza 1.1 μM [196]. To z kolei stwarza konieczność zastosowania niezwykle czułych metod analitycznych, gdyż w przeciwnym przypadku istnieje ryzyko uzyskania wyników fałszywie negatywnych [178].

6. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

ETAP II - TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU A JEGO PROFIL BEZPIECZEŃSTWA ONKOLOGICZNEGO

6.1. Cel badań

Celem badań niniejszej części pracy doktorskiej była analiza mutagenności pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu oraz produktu nitrozowania chlorowodorku imidaprilu i jego pochodnej diketopiperazynowej, za pomocą ilościowej oceny bakteryjnych mutacji powrotnych, przy użyciu histydynozależnych szczepów *Salmonella typhimurium* w obecności oraz bez systemu aktywacji metabolicznej.

Poszczególne problemy badawcze dotyczyły:

1. Oceny cytotoksyczności badanych związków celem określenia zakresu stężeń do analizy mutagenności.
2. Oceny właściwości mutagennych produktu nitrozowania chlorowodorku imidaprilu.
3. Oceny właściwości mutagennych produktu degradacji chlorowodorku imidaprilu – pochodnej diketopiperazynowej.
4. Oceny właściwości mutagennych produktu nitrozowania pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu.

Wyznaczone cele badawcze osiągnięto w toku testów *in vitro*, analizy matematycznej oraz analizy statystycznej uzyskanych wyników.

6.2. Materiały do badań i odczynniki

6.2.1. Materiały

- chlorowodorek imidaprilu (Jelfa Pharmaceutical S.A. Jelenia Góra, seria 0710004942),
- pochodna diketopiperazynowa chlorowodorku imidaprilu (uzyskana w toku testów kinetycznych w warunkach $RH = 0.0\%$, $T = 378\text{ K}$, $t = 15\text{ dni}$).

6.2.2. Odczynniki

- Ames MPF™ 98/100, test do oceny mutagenności w formie mikropłytki, Xenometrix, wyposażony w:
 - szczepy *S. typhimurium* (TA 98, TA 100),
 - sterylną ampicylinę (50 mg/ml),

- mikrosomalną frakcję S9 z wątroby szczura indukowaną fenobarbitem/ β -naftoflawonem,
- roztwór Booster solution S9 100/1537,
- podłoże wzrostowe,
- podłoże do ekspozycji dla *Salmonella*,
- podłoże wskaźnikowe dla *Salmonella*,
- 2-nitrofluoren, 20 μ g,
- 2-aminoantracen, 100 μ g,
- N-tlenek 4-nitrochinoliny, 50 μ g,
- zestaw kofaktorów do przygotowania mieszaniny frakcji S9, Xenometrix:
 - bufor fosforanowy plus sole (KCl i $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), 20 ml,
 - glukozo-6-fosforan, 0.9 ml,
 - uwodniony fosforan dinukleotydu β -nikotynoamido-adeninowego, 3.5 ml,
- sterylny dimetylosulfonotlenek (DMSO), Sigma-Aldrich, Poznań,
- kwas chlorowodorowy 1.0 mol/L (HCl), Sigma-Aldrich, Poznań,
- azotan (III) sodu (NaNO_2), Sigma-Aldrich, Poznań,
- sulfaminian amonu ($\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$), Sigma-Aldrich, Poznań,
- acetonitryl, czystość HPLC, Merck, Darmstadt, Niemcy
- metanol: cz.d.a., POCh S.A., Gliwice,
- diwodorofosforan (V) potasu (KH_2PO_4), POCh S.A., Gliwice,
- kwas orto-fosforowy 95%, POCh S.A., Gliwice,
- woda destylowana.

6.3. Aparatura i sprzęt

6.3.1. Aparatura

- spektrofotometr UV-VIS, Lambda 20, Perkin Elmer,
- komora laminarna Bio-Ban 48, Dow Chem. Comp., Włochy.

6.3.2. Sprzęt pomocniczy

- komory cieplne KBC-125W, WAMED,
- waga analityczna Satorius Extend ED 124S, Satorius,
- wyrząsarka do mikroplątek z inkubatorem DTS-4,
- pipety regulowane 8-kanałowe o pojemności 0.5 - 10 μ l oraz 15 – 300 μ l, Multi-Channel Eppendorf Explorer, Eppendorf,

- pipety regulowane o pojemności o pojemności 1 - 100 μl , 15- 300 μl i 50 - 1000 μl i sterylne końcówki, Single-Channel Eppendorf Explorer, Eppendorf,
- laboratoryjny sprzęt plastikowy, sterylny.

6.4. Metody

6.4.1. Ames MPF™ 98/100 test

Zastosowano następujące warunki testu:

- równoległa analiza serii sześciu stężeń, z użyciem oraz bez użycia systemu aktywacji metabolicznej dla dwóch szczepów *S. typhimurium* TA 98 oraz TA 100,
- ilość bakterii ekspozycyjnych na badany związek: około 10^7 ,
- kontrola negatywna:
 - rozpuszczalnik DMSO dla próbek nienitrozowanych,
 - mieszanina nitrozująca dla próbek nitrozowanych,
- kontrola pozytywna:
 - 2-nitrofluoren dla szczepu *S. typhimurium* TA 98 bez frakcji S9,
 - N-tlenek 4-nitrochinoliny dla szczepu *S. typhimurium* TA 100 bez frakcji S9,
 - 2-aminoantracen dla szczepów TA 100 oraz TA 98 z frakcją S9,
- czas ekspozycji w medium z histydyną: 90 min,
- czas inkubacji płytek do wyboru kolonii z rewersją w medium ze wskaźnikiem *pH*, bez histydyny: 48 godzin,
- oznaczenie – manualne.

Bakterie poddane zostały ekspozycji na 6 stężeń badanego związku, w podłożu zawierającym wystarczającą ilość histydyny, przez czas umożliwiającą średnio dwa podziały komórkowe. Następnie hodowle zostały rozcieńczone w podłożu zawierającym wskaźnik *pH*, a nie zawierającym histydyny i podzielone w równych ilościach między 48 dołków na płytce 384-dołkowej. W ciągu dwóch dni komórki, w których nastąpiło przywrócenie funkcjonalnego genu dla produkcji histydyny wzrosły i uformowały kolonie. Metabolizm kolonii bakteryjnych, obniżając *pH* podłoża, spowodował zmianę koloru w odpowiednim dołku z fioletowego na żółty. Liczba dołków zawierających kolonie z rewersją mutacji została zliczona dla każdej dawki i porównana z kontrolą dla dawki zero (rozpuszczalnikową). Każda dawka była testowana w potrójnym powtórzeniu, aby umożliwić analizę statystyczną danych. Potencjał mutagenny substancji został oceniony bezpośrednio lub w obecności frakcji wątrobowej szczurów S9 wobec kontroli pozytywnych oraz negatywnych.

6.4.2. Nitrosation assay procedure - (NAP test)

Reakcję nitrozowania przeprowadzono dla chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji oraz dla jego pochodnej diketopiperazynowej, zachowując następujące warunki reakcji:

- stosunek molowy substancji nitrozowanej do czynnika nitrozującego 10:40,
- temperatura reakcji 37°C (310 K),
- *pH* 3,
- czas reakcji 1 godzina,
- brak dostępu światła,
- stosunek molowy czynnika nitrozującego i czynnika stopującego reakcję 40:40.

6.4.3. Obliczenia

Kalkulacje matematyczne oraz analiza statystyczna wyników zostały przeprowadzone za pomocą oprogramowania Excel 2000.

6.5. Procedury

Procedura nr 6.1 Przygotowanie próbki pochodnej diketopiperazynowej do testu rewersji mutacji

Dokładnie odważono 0.200 g czystej substancji chlorowodorku imidaprilu (próbka A) oraz 0.010 g czystej substancji chlorowodorku imidaprilu jako kontrola (próbka B) i przeniesiono do fiolek ze szkła oranżowego, które umieszczono w łaźni piaskowej i ogrzewano w $T = 378$ K, $RH = 0.0\%$ przez 15 dni. Po upływie tego czasu zawartość fiołki z próbką B ostudzono do temperatury pokojowej a następnie rozpuszczono w 25.0 ml metanolu, przesączono i naniesiono na kolumnę chromatograficzną w ilości 20 μ l zgodnie z *metodą RP-HPLC nr 1* w celu potwierdzenia obecności w niej pochodnej diketopiperazynowej. Otrzymany chromatogram porównano ze wzorcem, zaprezentowanym na RYCINIE 4.35C. Z zawartości próbki A odważono dokładnie 0.125 g i rozpuszczono w 1.0 ml sterylnego DMSO (Roztwór A₁, który jest 25-krotnie bardziej stężony niż najwyższe stężenie stosowane w oznaczeniu mutagenności).

Procedura nr 6.2 Przeprowadzenie reakcji nitrozowania

- A. Przygotowano roztwór chlorowodorku imidaprilu w DMSO o stężeniu 154.8 mg/ml i doprowadzono go do *pH* 3 za pomocą kwasu chlorowodorowego (1.0 mol/l) (roztwór A). Odważono dokładnie 87.0 mg azotanu (III) sodu i rozpuszczono w 0.1 ml wody destylowanej (roztwór B). 0.4 ml roztworu A zmieszano z 0.05 ml roztworu B i ponownie dostosowano jego *pH* do 3 za pomocą kwasu chlorowodorowego (1.0 mol/l) (mieszanina M). Równoległe przygotowano kontrolę negatywną poprzez zmieszanie 0.4 ml sterylnego DMSO i 0.05 ml roztworu B oraz dostosowanie wartości otrzymanego roztworu do *pH* do 3. Otrzymane próbki

inkubowano w temperaturze 37°C (310 K) przez 1 godzinę w ciemności, ciągle mieszając. Następnie dokładnie odważono 175.6 mg sulfaminianu amonowego i rozpuszczono w 0.1 ml wody destylowanej (roztwór C). 0.05 ml roztworu C zmieszano z mieszaniną M (mieszanina M₁) oraz z kontrolą negatywną (roztwór KN_M) w celu zastopowania reakcji nitrozowania. Otrzymano ostateczne stężenie związku macierzystego $c = 112.6$ mg/ml. Mieszanina M₁ jest 25-krotnie bardziej stężona niż najwyższe stężenie stosowane w oznaczeniu mutagenności.

- B. Przygotowano roztwór pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu o stężeniu 154.8 mg/ml poprzez rozpuszczenie 123.8 mg tego związku w 0.8 ml sterylnego DMSO i doprowadzono go do pH 3 za pomocą kwasu chlorowodorowego (1.0 mol/l) (roztwór A). Odważono dokładnie 99.4 mg azotanu (III) sodu i rozpuszczono w 0.1 ml wody destylowanej (roztwór B). 0.4 ml roztworu A zmieszano z 0.05 ml roztworu B (mieszanina N) i ponownie dostosowano jego pH do 3 za pomocą kwasu chlorowodorowego (1.0 mol/l). Równoległe przygotowano kontrolę negatywną poprzez zmieszanie 0.4 ml sterylnego DMSO i 0.05 ml roztworu B oraz dostosowanie wartości otrzymanego roztworu pH do 3. Otrzymane próbki inkubowano w temperaturze 37°C (310 K) przez 1 godzinę w ciemności ciągle mieszając. Następnie dokładnie odważono 200.6 mg sulfaminianu amonowego i rozpuszczono w 0.1 ml wody destylowanej (roztwór C). 0.05 ml roztworu C zmieszano z mieszaniną N (mieszanina N₁) oraz kontrolą negatywną (roztwór KN_N) w celu zastopowania reakcji nitrozowania. Otrzymano ostateczne stężenie związku macierzystego $c = 112.6$ mg/ml. Mieszanina N₁ jest 25-krotnie bardziej stężona niż najwyższe stężenie stosowane w oznaczeniu mutagenności.

Skład jakościowy oraz ilościowy otrzymanych mieszanin po nitrozowaniu przedstawiono w TABELI 6.1.

TABELA 6.1.

Skład badanych mieszanin do reakcji nitrozowania; zachowano stosunek molowy substancji badanej do czynnika nitrozującego oraz czynnika stopującego reakcję 1:4:4 zgodnie z wytycznymi testu NAP

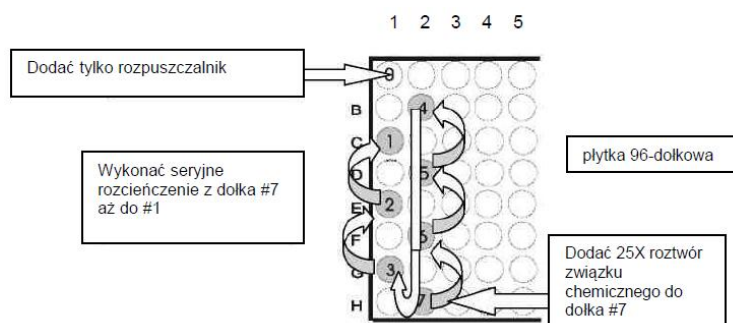
	Mieszanina M ₁ [mmol/ml]	Mieszanina N ₁ [mmol/ml]
Związek badany	0.350	0.400
NaNO ₂	1.400	1.600
NH ₄ SO ₃ NH ₂	1.400	1.600

Procedura nr 6.3 Przygotowanie hodowli całonocnych

Zgodnie z zaleceniami producenta, zamrożone szczepy TA 98 oraz TA 100 rozmrożono w temperaturze pokojowej a następnie zawieszono w 200 µl podłoża wzrostowego. 25 µl tak przygotowanej półpłynnej kolonii przeniesiono do 10 ml podłoża wzrostowego z dodatkiem 10 µl roztworu ampicyliny (50 mg/ml). Równoległe przygotowano kontrolę negatywną, którą stanowiła objętość 5 ml podłoża wzrostowego. Hodowle całonocne wytrząsano z szybkością 250 rpm, z dostępem powietrza, w temperaturze 37°C (310 K). Inkubację zakończono w momencie przekroczenia wartości OD wynoszącej 2.0. Gęstość optyczną mierzono przy 600 nm.

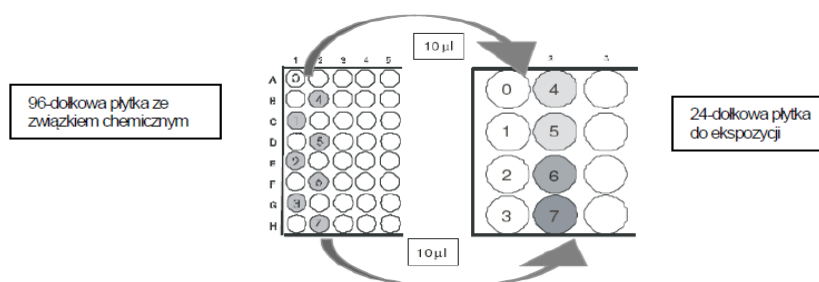
Procedura nr 6.4 Określenie zakresu dawki przed badaniem przesiewowym; oznaczenie cytotoksyczności

- Przygotowano roztwór wyjściowy A₁ zgodnie z *Procedurą nr 6.1* oraz mieszaniny wyjściowe M₁ oraz N₁ zgodnie z *Procedurami nr 6.2A* oraz *6.2B*. Objętość równą 44 μl roztworu oraz mieszanin wyjściowych przeniesiono do dołka nr 7 mikro płytki 96-dołkowej.
- Odmierzono 30 μl sterylnego DMSO i taką objętość przeniesiono do każdego z dołków ww. płytki oznaczonych numerami od 0 do 6.
- Wykonano seryjne rozcieńczenie ½ log badanego związku z dołka nr 7 do dołka nr 1 zgodnie z RYCINĄ 6.1, każdorazowo przenosząc po 14 μl roztworu bardziej stężonego do kolejnego dołka. Zawartość wszystkich dołków dokładnie mieszano przez pipetowanie. Otrzymano 6 rozcieńczeń podstawowego związku chemicznego:
 - dla próbki pochodnej diketopiperazyny: 125.0, 39.8, 12.7, 4.0, 1.3, 0.4 mg/ml,
 - dla próbki pochodnej diketopiperazyny i chlorowodorku imidaprilu po nitrozowaniu: 112.6, 35.8, 11.3, 3.6, 1.2, 0.4 mg/ml.

**RYCINA 6.1.**

Procedura przygotowania 96-dołkowej mikroplinky do rozcieńczenia związku podstawowego w oznaczeniu dawki cytotoksycznej.

- Stężenie mieszaniny po nitrozowaniu wyrażono jako stężenie związku macierzystego sprzed reakcji.
- Przy pomocy regulowanej pipety 8-kanalowej przeniesiono objętość 10 μl każdego stężenia do odpowiednich dołków 24-dołkowej mikroplinky do ekspozycji zgodnie z RYCINĄ 6.2.

**RYCINA 6.2.**

Procedura przygotowania 24-dołkowej mikroplinky do ekspozycji w oznaczeniu dawki cytotoksycznej związku podstawowego.

- 2.7 ml podłoża do ekspozycji zmieszano z 0.3 ml całonocnej hodowli szczepu TA 98 i przy pomocy pipety 8-kanalowej zmieszano objętość 240 μ l otrzymanej mieszaniny z każdym ze stężeń do ekspozycji na mikroplątce 24-dółkowej.
- Otrzymano następujące stężenia testowe:
 - dla próbki pochodnej diketopiperazyny: 5.0, 1.6, 0.5, 0.16, 0.05, 0.016 mg/ml,
 - dla próbki pochodnej diketopiperazyny i chlorowodorku imidaprilu po nitrozowaniu: 4.5, 1.4, 0.45, 0.14, 0.05, 0.016 mg/ml.
- Mikroplątki do ekspozycji inkubowano przez 90 minut w temperaturze 37°C (310 K) przy 250 rpm, po czym wizualnie porównano stopień zmętnienia każdego dołka z kontrolą negatywną. Widoczne zmętnienie, porównywalne ze zmętnieniem dołka dla dawki zerowej wskazuje na brak efektu cytotoksycznego, zaś brak zmętnienia, spowodowany lizą bakterii wskazuje na dawki cytotoksyczne.
- Najniższe stężenie, dla którego stwierdzono cytotoksyczność zostało wybrane jako najwyższe stężenie do badania mutagenności.

Procedura nr 6.5 Przygotowanie kontroli negatywnych

- A. Dla próbki badanej pochodnej diketopiperazynowej kontrolę odczynnikową stanowił 100% DMSO, który został użyty jako rozpuszczalnik dla przygotowanych prób.
- B. Dla próbki badanej mieszaniny M₁ kontrolę negatywną stanowiła mieszanina nitrozująca przygotowana zgodnie z *Procedurą nr 6.2A* (roztwór KN_M).
- C. Dla próbki badanej mieszaniny N₁ kontrolę negatywną stanowiła mieszanina nitrozująca przygotowana zgodnie z *Procedurą nr 6.2B* (roztwór KN_N).

Każde powtórzenie sześciu rozcieńczeń mieszanin badanych było testowane równoległe z jedną kontrolą odczynnikową.

Procedura nr 6.6 Przygotowanie kontroli pozytywnych

Kontrolę pozytywną zastosowano w celu potwierdzenia funkcjonalności przeprowadzonego testu rewersji mutacji w wykrywaniu związków mutagennych. Każde powtórzenie sześciu rozcieńczeń mieszanin badanych było testowane równoległe z jednym rozcieńczeniem kontroli pozytywnej. W zależności od użytych szczepów bakteryjnych, za kontrolę posłużyły roztwory różnych związków mutagennych zgodnie z TABELĄ 6.2.

TABELA 6.2.

Kontrole pozytywne zastosowane w celu oznaczenia mutagenności związków badanych za pomocą testu rewersji mutacji

Szczep testowy <i>S. typhimurium</i>	Substancja stanowiąca kontrolę pozytywną	Roztwór 25-krtonie stężony	Stężenie w hodowli
<i>Test bez użycia aktywacji metabolicznej frakcją S9</i>			
TA 98	2-nitrofluoren	50.0 µg/ml	2.0 µg/ml
TA 100	N-tlenek 4-nitrochinoliny	2.5 µg/ml	0.1 µg/ml
<i>Test z użyciem aktywacji metabolicznej frakcją S9 indukowaną fenobarbitem/β-naphtoflawonem</i>			
TA 98	2-aminoantracen	12.5 µg/ml	0.5 µg/ml
TA 100	2-aminoantracen	31.25 µg/ml	1.25 µg/ml

A. Kontrole pozytywne dla testu bez użycia frakcji S9:

- Przygotowano roztwór podstawowy 100 µg/ml 2-nitrofluorenu w sterylnym DMSO (Roztwór A).
- Przygotowano roztwór podstawowy 5 µg/ml N-tlenku 4-nitrochinoliny w sterylnym DMSO (Roztwór B).
- Połączono 40 µl roztworów A i B bezpośrednio w dołku dla kontroli pozytywnej na 96-dołkowej płytce do rozcieńczeń związku chemicznego.

B. Kontrole pozytywne dla testu z użyciem frakcji S9:

- Przygotowano roztwór podstawowy 31,25 µg/ml 2-aminoantracenu w sterylnym DMSO (Roztwór A).
- Dla szczepu *S. typhimurium* TA 100 przeniesiono 10 µl roztworu A do dołków z kontrolą pozytywną na odpowiednich 24-dołkowych płytkach do ekspozycji.
- Dla szczepu *S. typhimurium* TA 98 rozcieńczono roztwór A za pomocą sterylnego DMSO do stężenia 12.5 µg/ml (Roztwór A₁) i przeniesiono 10 µl otrzymanego roztworu A₁ do dołków z kontrolą pozytywną na odpowiednich 24-dołkowych płytkach do ekspozycji.

Procedura nr 6.7 Przygotowanie 30% mieszaniny frakcji S9 przy użyciu zestawu kofaktorów

Frakcja S9 została przed użyciem wzbogacona o kofaktory wg przepisu, podanego w TABELI 6.3.

TABELA 6.3.

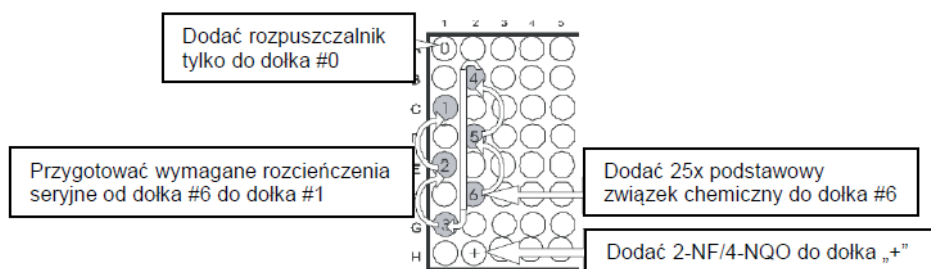
Objętości odczynników użytych do przygotowania mieszaniny frakcji S9

Roztwór	Objętość [ml]
bufor fosforanowy plus sole (KCl i MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	1.323
glukoza-6-fosforan	0.058
uwodniony fosforan dinukleotydu β-nikotynoamido-adeninowego	0.230
Frakcja S9	0.670

Wyżej wymienione odczynniki zmieszano w podanych ilościach w sterylnej probówce.

Procedura nr 6.8 Przygotowanie i rozcieńczenie podstawowego związku chemicznego do testu rewersji mutacji

- Odmierzono 280 µl roztworów związku podstawowego (roztwór A₁, mieszanina M₁, mieszanina N₁), przygotowanych zgodnie z *Procedurą nr 6.1, 6.2A* oraz *6.2B* i przeniesiono do dołka nr 6 96-dółkowej mikro płytki do rozcieńczania związku podstawowego.
- Do pozostałych dołków nr 0 – 5 dodano po 140 µl sterylnego DMSO.
- Wykonano seryjne rozcieńczenie z dołka nr 6 do dołka nr 1 zgodnie z RYCINĄ 6.3, każdorazowo przenosząc po 140 µl roztworu bardziej stężonego do kolejnego dołka. Zawartość wszystkich dołków dokładnie mieszano przez pipetowanie. Otrzymano 6 rozcieńczeń podstawowego związku chemicznego:
 - pochodnej diketopiperazyny: 125.0, 62.5, 31.25, 14.75, 7.75, 4.0 mg/ml,
 - produktów nitrozowania: 112.5, 56.25, 28.125, 14.0, 7.0, 3.5 mg/ml.

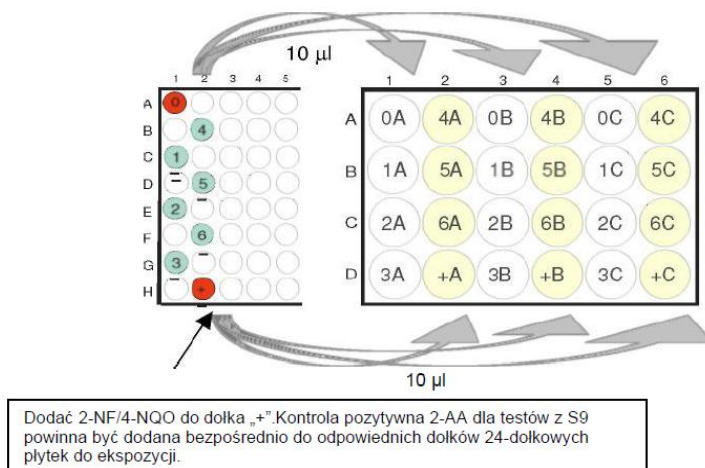
**RYCINA 6.3.**

Procedura przygotowania 96-dółkowej mikro płytki do rozcieńczenia związku podstawowego w oznaczeniu mutagenności.

- Stężenie mieszaniny po nitrozowaniu wyrażono jako stężenie związku macierzystego sprzed reakcji.
- Dodano 80 µl związków kontroli pozytywnych 2-nitrofluoren/N-tlenek 4-nitrochinoliny przygotowanych zgodnie z *Procedurą nr 6.6A* do dołków oznaczonych „+” na płytkach, przeznaczonych do analizy mutagenności bez użycia frakcji S9.

Procedura nr 6.9 Przygotowanie mikro płytek do ekspozycji

- Dla każdego szczepu przygotowano po dwie mikro płytki 24-dółkowe (tj. po jednej dla testu z frakcją S9 i bez frakcji S9).
- Objętość 10 µl każdego rozcieńczenia, przygotowanego zgodnie z *Procedurą nr 6.8* przeniesiono w trzech powtórzeniach do odpowiednich dołków na każdej mikro płytkce 24-dółkowej zgodnie z RYCINĄ 6.4.



RYCINA 6.4.

Procedura przygotowania 24-dółkowej płytki do ekspozycji w oznaczeniu mutagenności związku podstawowego.

- Dodano 10 µl związku kontroli pozytywnej 2-aminoantracenu, przygotowanego zgodnie z *Procedurą 6.6B* bezpośrednio do dołków +A, +B i +C na 24-dółkowej płytce z S9.

Procedura nr 6.10 Przygotowanie hodowli do ekspozycji

A. Szczep *S. typhimurium* TA 98 bez frakcji S9

Zmieszano 6.3 ml podłoża do ekspozycji z 0.7 ml hodowli całonocnej szczepu TA 98, przygotowanej zgodnie z *Procedurą nr 6.3*.

B. Szczep *S. typhimurium* TA 98 z frakcją S9

Zmieszano 5.25 ml podłoża do ekspozycji dla Salmonella/Booster Solution z 0.7 ml hodowli całonocnej szczepu TA 98, przygotowanej zgodnie z *Procedurą nr 6.3*. Przeniesiono 1.05 ml 30% mieszaniny S9 do zbiorniczka, zawierającego mieszaninę całonocnej hodowli i podłoża do ekspozycji. Ostateczne stężenie S9 w kulturze wynosiło 4.5%.

C. Szczep *S. typhimurium* TA 100 bez frakcji S9

Zmieszano 6.65 ml podłoża do ekspozycji z 0.35 ml hodowli całonocnej szczepu TA 100, przygotowanej zgodnie z *Procedurą nr 6.3*.

D. Szczep *S. typhimurium* TA 100 z frakcją S9

Zmieszano 5.6 ml podłoża do ekspozycji dla Salmonella/Booster Solution z 0.35 ml hodowli całonocnej szczepu TA 100, przygotowanej zgodnie z *Procedurą nr 6.3*. Przeniesiono 1.05 ml 30% mieszaniny S9 do zbiorniczka, zawierającego mieszaninę całonocnej hodowli i podłoża do ekspozycji. Ostateczne stężenie S9 w kulturze wynosiło 4.5%.

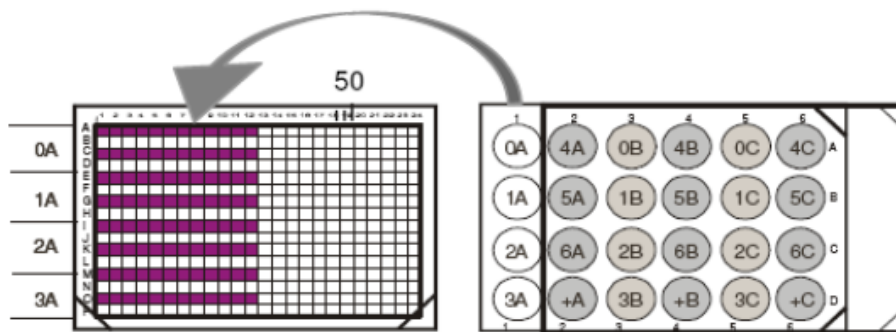
Natychmiast przeniesiono po 240 µl uzyskanych mieszanin do wszystkich dołków odpowiedniej 24-dołkowej płytki do ekspozycji, przygotowanej zgodnie z *Procedurą nr 6.9* za pomocą pipety 8-kanalowej. Ostateczne stężenia ekspozycyjne wynosiły:

- pochodnej diketopiperazyny: 5.0, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 mg/ml,
- produktów nitrozowania: 4.5, 2.25, 1.125, 0.56, 0.28, 0.14 mg/ml.

Przeprowadzono inkubację w temperaturze 37°C przy 250 rpm przez okres 90 minut a po upływie tego czasu zawartość każdego dołka wymieszano z 2.6 ml podłoża wskaźnikowego.

Procedura nr 6.11 Przygotowanie mikroplitek do inkubacji 48-godzinnej

Zawartość każdego dołka 24-dołkowej mikroplityki po ekspozycji, wypełnionego podłożem wskaźnikowym zgodnie z *Procedurą nr 6.10*, rozporcjowano do 48 dołków na mikroplityce 384-dołkowej w ilości 50 µl na dołek za pomocą pipety 8-kanalowej zgodnie z RYCINĄ 6.5. Trzy powtórzenia ekspozycji rozmieszczono na trzech mikroplitykach 384-dołkowych, które następnie poddano 48 godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C (310 K).



RYCINA 6.5.

Procedura przygotowania 384-dołkowej mikroplityki do inkubacji 48-godzinnej w oznaczeniu mutagenności związku podstawowego.

Procedura nr 6.12. Zliczanie kolonii rewertantów

Jedna mikroplityka 384-dołkowa odpowiada jednemu związkowi badanemu, testowanemu z jednym szczepem *Salmonella* w sześciu stężeniach, z albo bez frakcji S9 wraz z kontrolą pozytywną i negatywną. Trzy identyczne mikroplityki stanowią powtórzenia jednego doświadczenia. Poszczególne obszary 4×12 dołków na mikroplityce (łącznie 48 dołków) są przeznaczone do zliczenia dołków pozytywnych powstałych po ekspozycji na jedno ze stężeń badanych lub kontrolę.

Po czasie hodowli w medium wskaźnikowym płytki zostały przeanalizowane przez zliczenie dołków pozytywnych, czyli tych, ze zmienioną barwą.

6.6. Wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono następujące wartości:

- **Średnia liczba dołków pozytywnych dla stężenia** jako średnia arytmetyczna z ilości zliczonych dołków pozytywnych, znajdujących się na trzech powtórzeniach jednej analizowanej dawki lub kontroli.
- **Odchylenie standardowe dołków pozytywnych dla stężenia (S)** jako odchylenie standardowe z ilości zliczonych dołków pozytywnych, znajdujących się na trzech powtórzeniach jednej analizowanej dawki lub kontroli.
- **Wartość p** testu t -Studenta (jednostronny, nie dla par) w celu określenia istotności przy poziomie $\alpha = 0,05$.
- **Wartość wyjściowa dla dawki zero (W_0)** otrzymana poprzez dodanie jednego odchylenia standardowego do średniej liczby pozytywnych dołków dla kontroli z dawką zero.

$$W_0 = \text{Średnia liczba dołków pozytywnych dla kontroli negatywnej} + 1 S$$

- **Krotność indukcji w odniesieniu do dawki zerowej (FIB)** jako odsetek średniej liczby pozytywnych dołków dla danego stężenia podzielony przez wartość wyjściową dla dawki zero.

$$FIB = \frac{\text{Średnia liczba dołków pozytywnych dla stężenia}}{W_0}$$

Związek, w przypadku którego stwierdzono powtarzalny wzrost wynoszący $FIB > 2.0$ lub wyraźną odpowiedź zależną od dawki dla co najmniej trzech stężeń noszących istotność statystyczną (wartość $p \leq 0.05$) określono mianem mutagenu.

6.6.1. Oznaczenie dawki cytotoksycznej

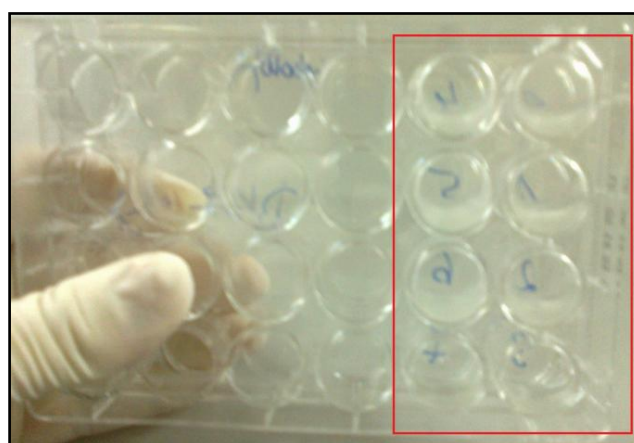
Cytotoksyczność badanych próbek określono manualnie, analizując stopień zmętnienia, wywołanego przez dane stężenie ekspozycyjne po 90 minutowej inkubacji z hodowlą bakteryjną *S. typhimurium* TA 98 i porównując go ze stopniem zmętnienia kontroli negatywnej. Zmętnienie oznacza wzrost bakterii w obecności danego stężenia oraz sugeruje brak jego właściwości cytotoksycznych. Wynik przedstawiono w TABELI 6.4 oraz na RYCINIE 6.6.

TABELA 6.4.

Analiza stopnia zmętnienia wywołanego przez stężenia ekspozycyjne w porównaniu z kontrolą negatywną;

Stężenie [mg/ml]	Próba I	Próba II
Pochodna diketopiperazynowa		
0.016	W,P	W,P
0.05	W,P	W,P
0.16	W,P	W,P
0.5	W,P	W,P
1.6	W,P	W,P
5.0	W,P	W,P
Mieszanina M ₁		
0.016	W,P	W,P
0.05	W,P	W,P
0.14	W,P	W,P
0.45	W,P	W,P
1.4	W,P	W,P
4.5	W,P	W,P
Mieszanina N ₁		
0.016	W,P	W,P
0.05	W,P	W,P
0.14	W,P	W,P
0.45	W,P	W,P
1.4	W,P	W,P
4.5	W,P	W,P

* W – zmętnienie widoczne; P – porównywalne z kontrolą negatywną

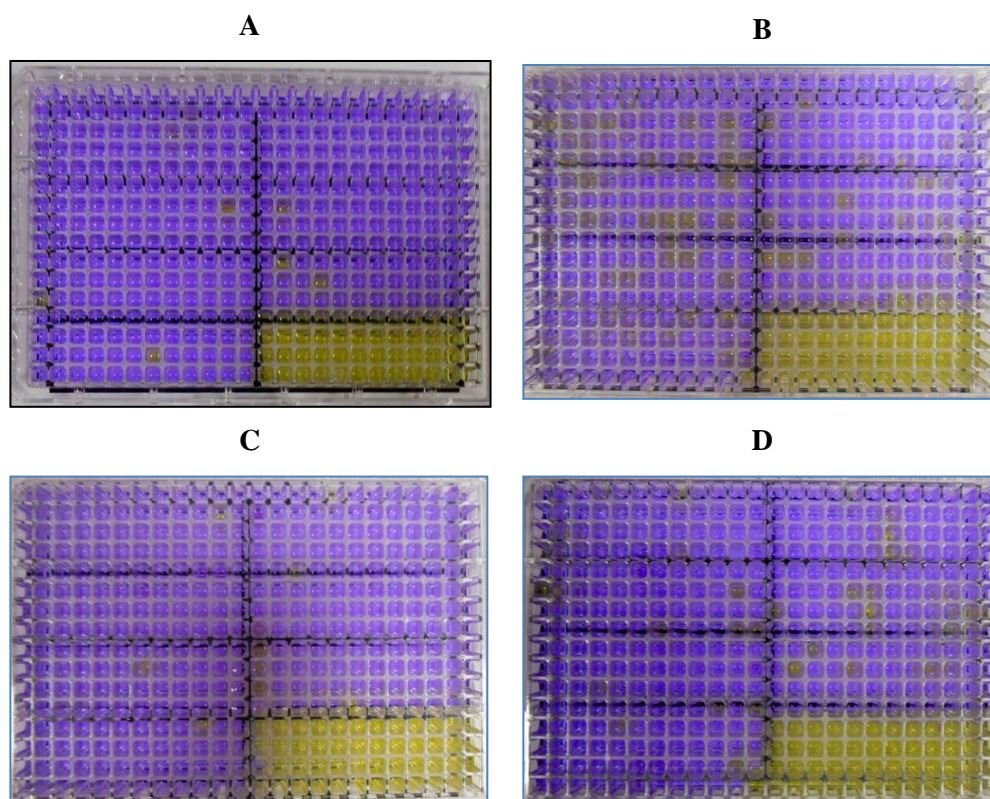


RYCINA 6.6.

Przykładowa płytka do oceny cytotoksyczności pochodnej diketopiperazynowej po inkubacji 90-minutowej. We wszystkich dołkach wewnątrz czerwonej ramki widoczne jest zmętnienie, sugerujące wzrost bakterii.

6.6.2. Oznaczenie mutagenności

Do oznaczenia mutagenności przeznaczono sześć dawek badanych związków zgodnie z zakresem wybranym po oznaczeniu dawki cytotoksycznej. Dla wszystkich sześciu testowanych dawek nie stwierdzono efektu mutagennego. Wyniki ujęto w formie TABEL 6.5 – 6.16. Na RYCINIE 6.7 zamieszczono zdjęcie uzyskanych płytek po 48-godzinnej inkubacji.



RYCINA 6.7.

Przykładowa mikropłytką 384-dolkowa po 48-godzinnej inkubacji dla pochodnej diketopiperazynowej, (A) szczep TA 98, S9-, (B) szczep TA 100, S9-, (C) szczep TA 98, S9+, (D) szczep TA 100, S9+.

TABELA 6.5.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu, testowanej za pomocą szczepu *S. typhimurium* TA 98 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Pochodna diketopiperazynowa; szczep <i>S. typhimurium</i> TA 98 S9-								
Stężenie (mg/ml)	Płytko nr 1	Płytko nr 2	Płytko nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W_0	FIB	p
0.16	2	1	2	1.67	0.58	2.24	0.74	0.5000
0.31	1	5	1	2.33	2.31		1.04	0.3265
0.63	0	1	1	0.67	0.58		0.30	0.0506
1.25	5	5	1	3.67	2.31		1.63	0.1097
2.5	1	2	1	1.33	0.58		0.59	0.2593
5.0	1	2	2	1.67	0.58		0.74	0.5000
K. Poz.	47	48	48	47.67	0.58			
Spontaniczne	1	2	2	1.67	0.58			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W_0 stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

TABELA 6.6.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu, testowanej za pomocą szczepu *S. typhimurium* TA 98 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników.

Pochodna diketopiperazynowa; szczep <i>S. typhimurium</i> TA 98 S9+								
Stężenie (mg/ml)	Płytko nr 1	Płytko nr 2	Płytko nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W_0	FIB	p
0.16	1	0	1	0.67	0.58	3.00	0.22	0.0581
0.31	0	2	2	1.33	1.15		0.44	0.2459
0.63	1	1	2	1.33	0.58		0.44	0.1870
1.25	2	1	1	1.33	0.58		0.44	0.1870
2.5	1	2	1	1.33	0.58		0.44	0.1870
5.0	1	4	1	2.00	1.73		0.67	0.5000
K. Poz.	48	47	48	47.67	0.58			
Spontaniczne	2	1	3	2.00	1.00			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W_0 stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

TABELA 6.7.

*Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu, testowanej za pomocą szczepu *S. typhimurium* T 100 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników.*

Pochodna diketopiperazynowa; szczep <i>S. typhimurium</i> TA 100 S9-								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	<i>S</i>	<i>W</i> ₀	<i>FIB</i>	<i>p</i>
0.16	8	16	12	12.00	4.00	12.18	0.98	0.2203
0.31	7	8	10	8.33	1.53		0.68	0.2383
0.63	7	9	16	10.67	4.73		0.88	0.3813
1.25	14	5	6	8.33	4.93		0.68	0.3490
2.5	7	8	6	7.00	1.00		0.57	0.0816
5.0	7	9	7	7.67	1.15		0.63	0.1395
K. Poz.	48	48	46	47.33	1.15			
Spontaniczne	7	10	12	9.67	2.52			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a *W*₀ stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej

TABELA 6.8.

*Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu, testowanej za pomocą szczepu *S. typhimurium* TA 100 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników*

Pochodna diketopiperazynowa; szczep <i>S. typhimurium</i> TA 100 S9+								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	<i>S</i>	<i>W</i> ₀	<i>FIB</i>	<i>p</i>
0.16	6	5	5	5.33	0.58	7.00	0.76	0.3976
0.31	2	4	2	2.67	1.15		0.38	0.0775
0.63	5	3	5	4.33	1.15		0.62	0.3217
1.25	3	5	2	3.33	1.53		0.48	0.1576
2.5	8	7	7	7.33	0.58		1.05	0.0621
5.0	5	5	4	4.67	0.58		0.67	0.3976
K. Poz.	48	48	48	48.00	0.00			
Spontaniczne	3	5	7	5.00	2.00			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a *W*₀ stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej

TABELA 6.9.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny M_1 (mieszanina po reakcji nitrozowania chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu *S. typhimurium* TA 98 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej (S_9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Mieszanina M_1 ; szczep <i>S. typhimurium</i> TA 98 S_9^-								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W_0	FIB	p
0.14	1	0	1	0.67	0.58	2.82	0.24	0.1254
0.28	1	1	0	0.67	0.58		0.24	0.1254
0.56	1	1	1	1.00	0.00		0.35	0.1870
1.125	2	2	2	2.00	0.00		0.71	0.3217
2.25	2	2	2	2.00	0.00		0.71	0.3217
4.5	1	2	2	1.67	0.58		0.59	0.5000
K. Poz.	47	48	48	47.67	0.58			
Spontaniczne	1	3	1	1.67	1.15			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W_0 stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

TABELA 6.10.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny M_1 (mieszanina po reakcji nitrozowania chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu *S. typhimurium* TA 98 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej (S_9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Mieszanina M_1 ; szczep <i>S. typhimurium</i> TA 98 S_9^+								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W_0	FIB	p
0.14	1	2	2	1.67	0.58	4.65	0.36	0.4208
0.28	2	2	1	1.67	0.58		0.36	0.4208
0.56	1	4	1	2.00	1.73		0.43	0.5000
1.125	2	0	2	1.33	1.15		0.29	0.3548
2.25	0	1	3	1.33	1.53		0.29	0.3623
4.5	1	2	1	1.33	0.58		0.29	0.3459
K. Poz.	48	47	48	47.67	0.58			
Spontaniczne	5	1	0	2.00	2.65			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W_0 stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

TABELA 6.11.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny M_1 (mieszanina po reakcji nitrozowania chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu *S. typhimurium* TA 100 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Mieszanina M_1 ; szczep <i>S. typhimurium</i> TA 100 S9-								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W_0	FIB	p
0.14	9	15	12	12.00	3.00	10.98	1.09	0.1010
0.28	10	5	7	7.33	2.52		0.67	0.2680
0.56	13	6	9	9.33	3.51		0.85	0.3986
1.125	7	6	10	7.67	2.08		0.70	0.3036
2.25	12	11	9	10.67	1.53		0.97	0.1395
4.5	8	5	6	6.33	1.53		0.58	0.1091
K. Poz.	48	48	46	47.33	1.15			
Spontaniczne	6	10	10	8.67	2.31			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W_0 stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

TABELA 6.12.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny M_1 (mieszanina po reakcji nitrozowania chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu *S. typhimurium* TA 100 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Mieszanina M_1 ; szczep <i>S. typhimurium</i> TA 100 S9+								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W_0	FIB	p
0.14	2	1	4	2.33	1.53	5.73	0.41	0.1397
0.28	2	2	3	2.33	0.58		0.41	0.0945
0.56	3	1	1	1.67	1.15		0.29	0.0621
1.125	1	3	1	1.67	1.15		0.29	0.0621
2.25	2	4	2	2.67	1.15		0.47	0.1647
4.5	1	3	1	1.67	1.15		0.29	0.0621
K. Poz.	48	48	48	48.00	0.00			
Spontaniczne	6	3	3	4.00	1.73			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W_0 stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

TABELA 6.13.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny N₁ (mieszanina po reakcji nitrozowania pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu S. typhimurium TA 98 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Mieszanina N₁; szczep S. typhimurium TA 98 S9-								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W ₀	FIB	p
0.14	2	1	1	1.33	0.58	2.82	0.47	0.3389
0.28	2	1	1	1.33	0.58		0.47	0.3389
0.56	0	1	0	0.33	0.58		0.12	0.0741
1.125	3	1	2	2.00	1.00		0.71	0.3623
2.25	2	1	4	2.33	1.53		0.83	0.2895
4.5	2	7	0	3.00	3.61		1.06	0.2874
K. Poz.	47	48	48	47.67	0.58			
Spontaniczne	1	3	1	1.67	1.15			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W₀ stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

TABELA 6.14.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny N₁ (mieszanina po reakcji nitrozowania pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu S. typhimurium TA 98 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Mieszanina N₁; szczep S. typhimurium TA 98 S9+								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W ₀	FIB	p
0.14	2	1	1	1.33	0.58	4.65	0.29	0.3459
0.28	2	0	4	2.00	2.00		0.43	0.5000
0.56	2	1	3	2.00	1.00		0.43	0.5000
1.125	1	4	2	2.33	1.53		0.50	0.4297
2.25	1	1	1	1.00	0.00		0.22	0.2742
4.5	1	0	0	0.33	0.58		0.07	0.1732
K. Poz.	48	47	48	47.67	0.58			
Spontaniczne	5	1	0	2.00	2.65			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W₀ stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

TABELA 6.15.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny N₁ (mieszanina po reakcji nitrozowania pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu S. typhimurium TA 100 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Mieszanina N₁; szczep S. typhimurium TA 100 S9-								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W ₀	FIB	p
0.14	14	13	7	11.33	3.79	10.98	1.03	0.1782
0.28	8	15	12	11.67	3.51		1.06	0.1420
0.56	14	13	13	13.33	0.58		1.21	0.0137
1.125	9	21	11	13.67	6.43		1.25	0.1368
2.25	15	18	16	16.33	1.53		1.49	0.0043
4.5	18	20	23	20.33	2.52		1.85	0.0020
K. Poz.	48	48	46	47.33	1.15			
Spontaniczne	6	10	10	8.67	2.31			

* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W₀ stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

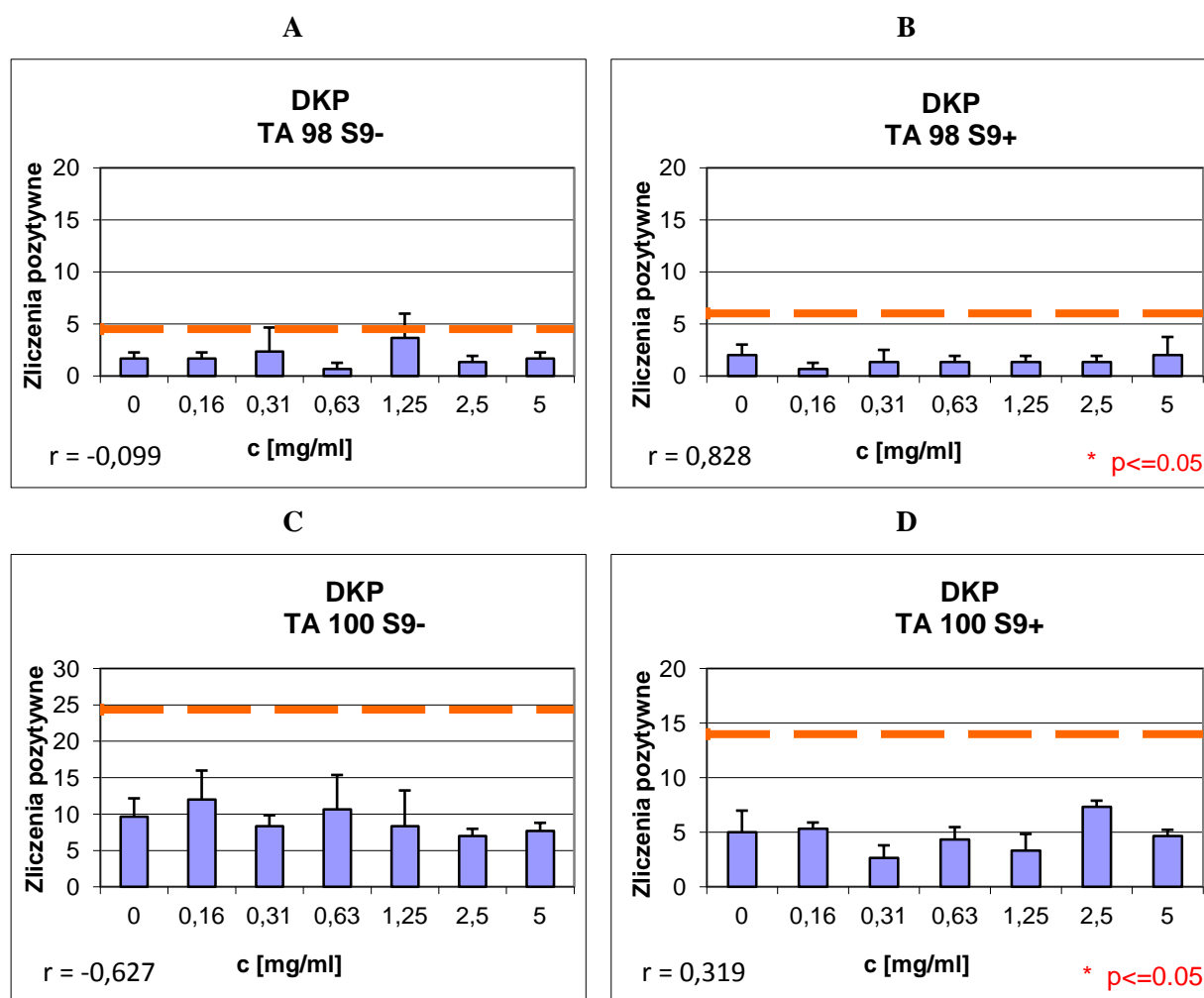
TABELA 6.16.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny N₁ (mieszanina po reakcji nitrozowania pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu S. typhimurium TA 100 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej (S9) wraz z obliczonymi parametrami oceny wyników

Mieszanina N₁; szczep S. typhimurium TA 100 S9+								
Stężenie (mg/ml)	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Płytki nr 3	Średnia liczba pozytywnych dołków	S	W ₀	FIB	p
0.14	6	8	9	7.67	1.53	5.73	1.34	0.0257
0.28	7	5	3	5.00	2.00		0.87	0.2742
0.56	8	6	2	5.33	3.06		0.93	0.2734
1.125	9	6	1	5.33	4.04		0.93	0.3136
2.25	12	4	4	6.67	4.62		1.16	0.2011
4.5	9	2	6	5.67	3.51		0.99	0.2509
K. Poz.	48	48	48	4.00	0.00			
Spontaniczne	6	3	3	4.00	1.73			

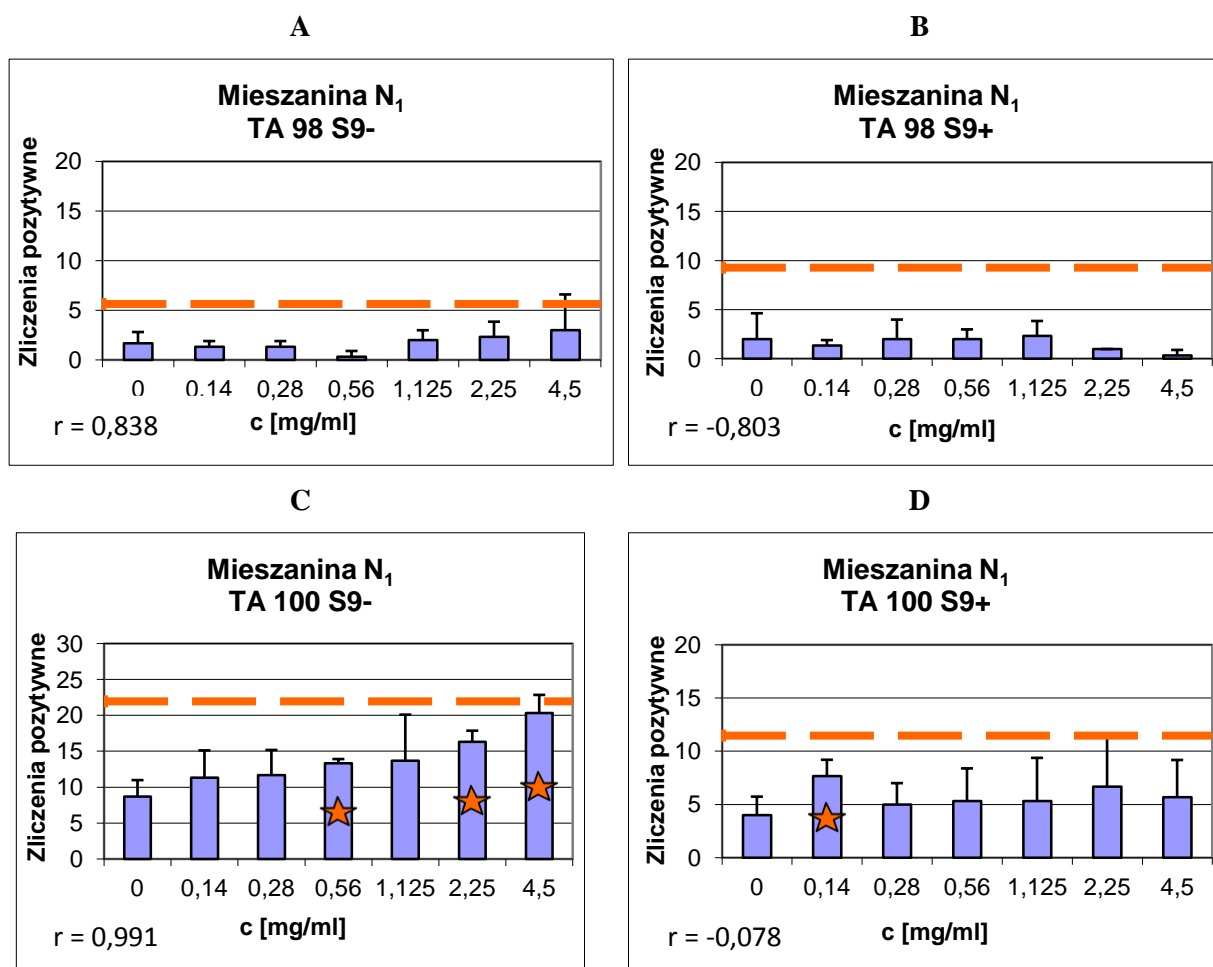
* K. Poz. oznacza ilość zliczeń uzyskanych dla kontroli pozytywnej a W₀ stanowi wartość wyjściową dla dawki zero, spontaniczne to ilość zliczeń dla kontroli negatywnej.

Dane tabelaryczne przedstawiono również na wykresach (RYCINA 6.8 - 6.10), zawierających informacje o średniej liczbie dołków pozytywnych dla stężenia oraz wartość odchylenia standardowego średniej liczby dołków pozytywnych dla stężenia jako słupki błędów. Pomarańczowa linia przerywana znajduje się na wysokości określonej jako 2.0-krotność indukcji rewersji powyżej wartości bazowej. Gwiazdką oznaczone są słupki danych, dla których wartość zliczeń pozytywnych przekracza 2.0-krotność indukcji rewersji powyżej wartości bazowej oraz parametr p w teście t -Studenta nieprzekraczający wartości 0.05.



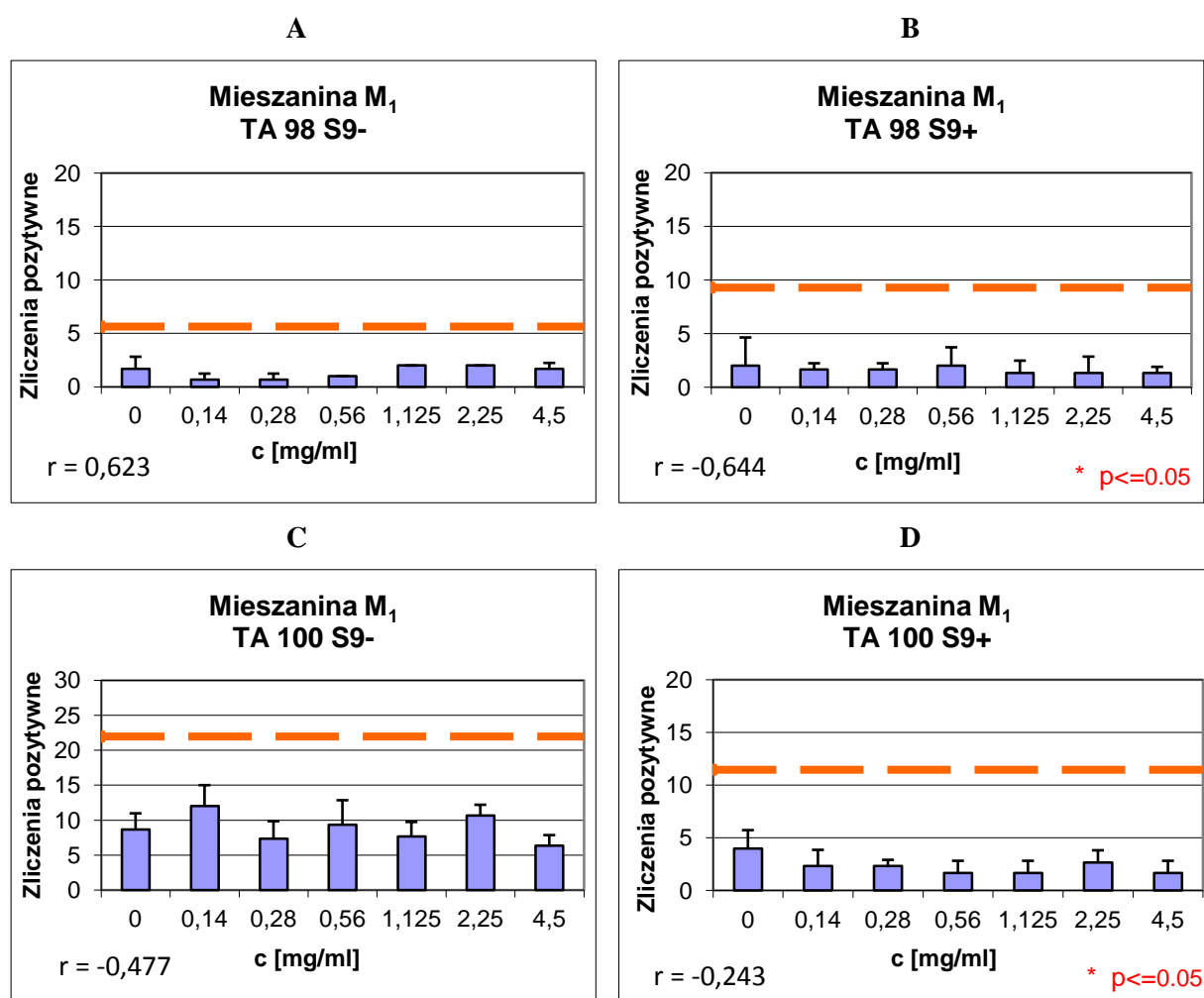
RYCINA 6.8.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu, testowanej za pomocą szczepu (A) *S. typhimurium* TA 98 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej S9; (B) *S. typhimurium* TA 98 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej S9; (C) *S. typhimurium* TA 100 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej S9; (D) *S. typhimurium* TA 100 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej S9.



RYCINA 6.9.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny N₁ (mieszanina po reakcji nitrozowania pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu (A) *S. typhimurium* TA 98 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej S9; (B) *S. typhimurium* TA 98 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej S9; (C) *S. typhimurium* TA 100 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej S9; (D) *S. typhimurium* TA 100 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej S9.



RYCINA 6.10.

Wartości zliczeń dołków pozytywnych dla mieszaniny M₁ (mieszanina po reakcji nitrozowania chlorowodorku imidaprilu), testowanej za pomocą szczepu (A) *S. typhimurium* TA 98 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej S9; (B) *S. typhimurium* TA 98 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej S9; (C) *S. typhimurium* TA 100 bez użycia systemu aktywacji metabolicznej S9; (D) *S. typhimurium* TA 100 z użyciem systemu aktywacji metabolicznej S9.

Dwukrotny wzrost liczby kolonii z rewersją mutacji po ekspozycji na badany związek chemiczny, w porównaniu z kontrolami dla dawki zero, oznacza, że ten związek wykazuje działanie mutagenne w teście Ames MPF™ 98/100.

7. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Chlorowoderek imidaprilu należy do grupy dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny, podawanych doustnie w postaci tabletek w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego, w Polsce – w terapii nadciśnienia samoistnego [59]. Pod względem farmakokinetycznym wymieniona substancja lecznicza występuje w formie pro-leku z zestyfikowaną grupą karboksylową, która w warunkach *in vivo* ulega hydrolizie prowadzącej do utworzenia aktywnego farmakologicznie metabolitu [6]. Obecność wiązania estrowego w strukturze chlorowodorku imidaprilu jest niezbędna do utrzymania jego optymalnej biodostępności, jednakże wiąże się ona również z poważnymi konsekwencjami natury chemicznej, ponieważ warunkuje wrażliwość tego inhibitora na reakcje rozkładu, takie jak hydroliza, oraz wpływa na jego względnie niską trwałość. Ponadto, z uwagi na tripeptydową budowę chlorowodorku imidaprilu, można przypuszczać, iż ulega on także wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, która podobnie jak hydroliza przyczynia się do naruszenia trwałości omawianego związku. W obliczu powyższych uwarunkowań uzasadnione wydają się zatem badania określające wpływ warunków środowiskowych na parametry stabilnościowe chlorowodorku imidaprilu, które są niezwykle istotne w kontekście skuteczności, bezpieczeństwa oraz ekonomizacji terapii z wykorzystaniem tego leku.

Mając do czynienia z substancją leczniczą niestabilną chemicznie, należy liczyć się z faktem, iż jej niska trwałość w danych warunkach wiąże się z nadmiernym powstawaniem produktów degradacji, czyli procesem obarczonym dużym ryzykiem toksykologicznym, wynikającym z możliwości poszerzenia spektrum jej niepożądanych działań. Analizując przy tym nawyki chorych odnośnie metod przechowywania leków, wielokrotnie można stwierdzić wyraźne odstępstwa od zalecanego optimum, co związane jest ze wzrostem narażenia takich pacjentów na działanie zanieczyszczeń degradacyjnych [123]. Problem ten nabiera szczególnego znaczenia w terapii chorób przewlekłych, takich jak nadciśnienie tętnicze, ponieważ w tym przypadku opisane powyżej zachowania niosą w sobie ryzyko długotrwałej, nadmiernej ekspozycji na działanie różnorodnych produktów rozkładu substancji leczniczych, niekiedy również tych o potencjale kancerogennym, a więc mających możliwość inicjacji oraz promocji rozwoju chorób o podłożu nowotworowym. W tym miejscu interesującym wydają się doniesienia naukowe o możliwym udziale leków z grupy I-ACE w stymulacji procesu nowotworowego, przy jednoczesnym braku informacji, odnośnie mechanizmu takiego działania [19,150].

Szczegółowy przegląd piśmiennictwa potwierdził, iż problematyka trwałości chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej oraz zagadnienie dotyczące wpływu produktów jego degradacji na indukcję oraz promocję kancerogenezy nie były wcześniej podejmowane w żadnym zakresie. Stąd w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono odpowiednie testy stabilnościowe i toksykologiczne z zamiarem uzupełnienia tego niedostatku.

Ustalono cele badawcze osiągnięto w dwóch etapach. Pierwszy z nich dotyczył szczegółowej analizy trwałości chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej, z uwzględnieniem następujących zagadnień: (1) doboru i walidacji metody analitycznej, (2) badania trwałości czystej substancji, (3) badania trwałości chlorowodoru imidaprilu w obecności stearynianu magnezu oraz w tabletkach przechowywanych na różne sposoby (tj. w blistrze, bez blistra oraz w postaci tabletek rozdzielonych na połówki), (4) identyfikacji produktów degradacji i (5) ustalenia mechanizmu rozkładu badanej substancji leczniczej w różnych warunkach środowiskowych. Dalej, celem zgłębienia wiedzy odnośnie wpływu indywidualnych cech strukturalnych chlorowodoru imidaprilu na jego parametry trwałości, uzyskane w toku przeprowadzonych eksperymentów wyniki zestawiono z dostępnymi w piśmiennictwie danymi dla innych I-ACE oraz za pomocą metod *in silico* podjęto próbę wykazania zależności budowy cząsteczki inhibitora konwertazy angiotensyny od jej trwałości. Ta część badań pozwoliła również na ustalenie miejsca chlorowodoru imidaprilu w hierarchii stabilnościowej omawianej klasy terapeutycznej.

Drugi etap zaplanowanych prac badawczych obejmował analizę toksykologiczną chlorowodoru imidaprilu, w ramach której dokonano oceny właściwości mutagennych jednego z jego produktów rozkładu - pochodnej diketopiperazynowej, a także produktów reakcji nitrozowania chlorowodoru imidaprilu oraz jego pochodnej diketopiperazynowej. Podstawą dla tak ukształtowanej koncepcji prac są opublikowane wcześniej dane, dotyczące możliwości tworzenia w silnie kwasowym środowisku soku żołądkowego kancerogennych N-nitrozozwiązków z N-nitrozowalnych prekursorów, do których należą właśnie pochodne diketopiperazyny oraz enalapril, a więc inhibitor ACE o bardzo zbliżonej budowie chemicznej do chlorowodoru imidaprilu [178,179]. W części doświadczalnej przeprowadzono zatem reakcję nitrozowania wymienionych związków w celu uzyskania materiału badawczego, a następnie dokonano analizy cytotoksyczności otrzymanych próbek oraz oceniono ich właściwości mutagenne metodami *in vitro*, którymi zamknięto badania w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Opracowanie i walidacja metody analitycznej do badania trwałości

Podstawowym problemem w trakcie realizacji każdego zadania analitycznego jest dobór właściwej metody pomiarowej, gwarantującej wiarygodność uzyskanych wyników. W przypadku testów kinetycznych reakcji chemicznej najważniejszym parametrem, determinującym przydatność danej metody jest jej wysoka selektywność, co związane jest z częstą koniecznością oznaczenia obok siebie substancji cechujących się wysoką analogią strukturalną oraz fizykochemiczną, a więc związku macierzystego i jego produktów degradacji. Znaczenie selektywności wynika także ze złożonego charakteru analizowanych próbek, jakimi są postacie farmaceutyczne, w skład których poza substancją czynną wchodzi także substancje pomocnicze oraz zanieczyszczenia. Ponadto bardzo ważną cechą

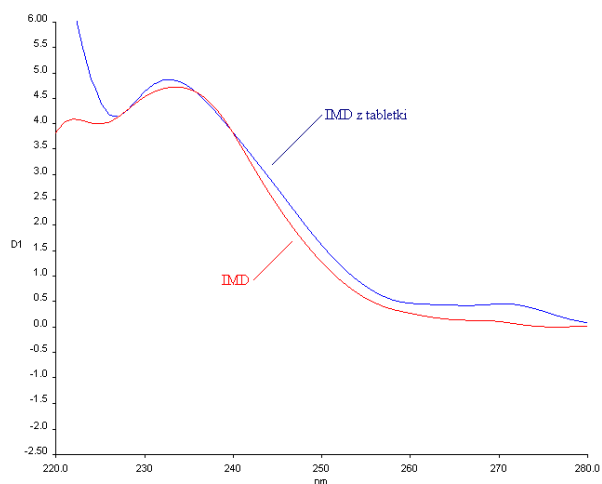
metody przeznaczanej do badań kinetycznych, oprócz precyzji, dokładności i liniowości, jest także prostota, krótki czas procesu analitycznego oraz niski koszt, co wynika z natury opracowanych w tym zakresie testów, gdzie analizie poddawana jest bardzo duża ilość próbek.

Opierając się na przeglądzie piśmiennictwa, na tym etapie prac postanowiono przystosować metodę spektrofotometryczną klasyczną i pochodnych widm oraz metodę RP-HPLC z detekcją UV do realizacji wyznaczonego zadania. Zasadą oznaczenia w obydwu metodach jest pomiar absorpcji promieniowania nadfioletowego przez badaną substancję [104]. Chlorowodurek imidaprilu natomiast, posiadając mało charakterystyczny chromofor benzenowy, absorbuje promieniowanie UV o krótkiej długości fali, a więc spełnia warunek podstawowy stosowalności wymienionych technik instrumentalnych.

Metoda spektrofotometryczna UV

Niezaprzeczalną zaletą metody spektrofotometrycznej UV jest prostota przeprowadzenia analizy w bardzo krótkim czasie, gdyż proces przygotowania próbki oraz wykonania pomiaru obejmuje jedynie rozpuszczenie substancji badanej oraz jej rozcieńczenie do pożądanych stężeń i odczytanie wartości absorbancji przy analitycznej długości fali (λ_{\max}). Dużą wagę przy doborze tejże metody analitycznej przywiązano także do takich jej cech jak możliwość dokonania oznaczenia bez konieczności posiadania substancji porównawczej, dzięki znajomości wartości absorpcji właściwej lub molowego współczynnika absorpcji. Ponadto zastosowanie techniki pochodnych widm pozwoliło rozdzielić nakładające się pasma widma klasycznego oraz precyzyjnie wyznaczyć λ_{\max} dla próbki chlorowodoru imidaprilu. I tak, analiza widm spektralnych A, D¹, D², D³ wykazała, iż do oznaczania chlorowodoru imidaprilu w tabletkach najbardziej optymalną jest technika spektrofotometryczna pochodnej D¹, ponieważ charakteryzuje się ona największą czułością oraz najbardziej selektywną długością fali ($\lambda = 234$ nm). I choć metoda spektrofotometrii klasycznej była także wystarczająco czuła, to jednak stwierdzono, że prowadzenie oznaczenia przy długości fali $\lambda = 218$ nm nie jest optymalne (TABELA 4.4).

Walidując opracowaną metodę spektrofotometryczną UV pierwszej pochodnej, wyznaczono krzywą wzorcową, potwierdzono jej precyzję oraz dokładność, a ponadto nie zaobserwowano różnic pomiędzy widmem chlorowodoru imidaprilu w metanolu a widmem chlorowodoru imidaprilu w metanolewym ekstrakcie z tabletek (RYCINA 7.1).



RYCINA 7.1.

Widmo zależności $D^l = f(c)$ chlorowodoru imidaprilu w metanolu (IMD) oraz chlorowodoru imidaprilu w metanolem ekstrakcie z tabletki (IMD z tabletki).

Powyższe obserwacje świadczą o tym, iż metoda spektrofotometryczna UV może być z powodzeniem stosowana do rutynowej oceny zawartości chlorowodoru imidaprilu w tabletkach np. w trakcie badań jakościowych serii leku. Jednakże przeprowadzone badanie kinetyczne reakcji rozkładu chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej wykazało brak selektywności tej metody dla chlorowodoru imidaprilu w obecności jego produktów rozkładu, co wiąże się z koniecznością zastosowania techniki odejmowania w celu interpretacji danych doświadczalnych. To z kolei znacznie komplikuje proces obliczeniowy, ponieważ zbyt złożony model matematyczny stwarza ryzyko indukcji błędów rachunkowych i z tego też względu postanowiono metodę spektrofotometryczną odrzucić na tym etapie prac.

Metoda RP-HPLC

Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej należy do technik separacyjnych i jest metodą z wyboru w analizie próbek złożonych. Umożliwia ona selektywny rozdział poszczególnych składników próbki, dzięki różnicom w szybkości ich migracji w układzie chromatograficznym. Ogromną zaletą tej metody jest także jej elastyczność, gdyż właściwy dobór warunków separacji umożliwia maksymalizację jej selektywności [104].

W ramach zaplanowanych badań trwałości chlorowodoru imidaprilu, dobierając parametry rozdziału chromatograficznego kierowano się przeglądem piśmiennictwa w zakresie analizy trwałości analogów testowanej substancji leczniczej z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny [72-75,121-122]. Stwierdzono, iż zadowalający rozdział chromatograficzny dla czystej substancji uzyskano przy zastosowaniu warunków, które były poprzednio używane do oceny trwałości cilazaprilu [73]. Otrzymane tym sposobem chromatogramy dla chlorowodoru imidaprilu w substancji cechowały się wysoką jakością oraz wąskimi, symetrycznymi pikami. Jednakże z uwagi na złożony charakter

podjętego zadania analitycznego, na każdym następnym etapie badań modyfikowano warunki rozdziału chromatograficznego, kierując się selektywnością, dokładnością, precyzją, liniowością oraz kosztem analiz. I tak, opracowano trzy metody RP-HPLC, które poddano walidacji.

Potwierdzono selektywność opracowanych metod RP-HPLC analizując uzyskane chromatogramy pod względem jakości sygnałów oraz czasów retencji. Zaobserwowano, że przy ustawionej długości fali detektora $\lambda = 218$ nm nie zachodzą interferencje pomiędzy chlorowodorkiem imidaprilu a innymi składnikami próbki. Ponadto metoda RP-HPLC nr 1 okazała się wystarczająca do analizy kinetyki reakcji rozkładu chlorowodorku imidaprilu na poziomie $RH > 0.0\%$ oraz $RH = 0.0\%$, ponieważ gwarantowała całkowity rozdział sygnału związku macierzystego od produktów rozkładu. Wykorzystanie jej było również możliwe do określenia profilu produktowego reakcji w środowisku suchego powietrza, ponieważ tworzący się w tych warunkach jeden produkt degradacji był także w sposób zadowalający rozdzielony i dawał wyraźny pojedynczy sygnał (RYCINA 4.4D). Jednakże z uwagi na niepełne rozdzielenie pików dwóch zanieczyszczeń degradacyjnych, powstających w warunkach obecności wilgoci w powietrzu (RYCINA 4.4A-C), w celu określenia parametrów kinetycznych reakcji ich tworzenia oraz późniejszej identyfikacji konieczna była optymalizacja metody, obejmująca zmianę fazy ruchomej, zmianę szybkości jej przepływu oraz zmianę wzorca wewnętrznego. I tak, w opracowanym systemie chromatograficznym RP-HPLC nr 2 wyraźny rozdział sygnałów, pochodzących od związku macierzystego oraz produktów rozkładu (RYCINA 4.21) pozwolił na realizację tego zadania. Z kolei do analizy próbek złożonych wykorzystano metodę RP-HPLC nr 3, która umożliwiła otrzymanie chromatogramów (RYCINA 4.40 i 4.50) bez sygnałów od substancji pomocniczych, co jest szczególnie istotne w analizie mieszanin modelowych oraz gotowych postaci farmaceutycznych. W podsumowaniu można stwierdzić, iż opracowane metody zapewniały zadowalającą selektywność oznaczenia w kontekście przewidzianych dlań zadań badawczych a piki widoczne na chromatogramach były ostre, symetryczne oraz wąskie.

Opracowane systemy chromatograficzne charakteryzowały się ponadto liniowością, co potwierdzono analizą regresji wyznaczonych krzywych wzorcowych, która wykazała istnienie wysokiej korelacji liniowej pomiędzy sygnałem (P_{MD}/P_{IS} - pole powierzchni pod pikiem chlorowodorku imidaprilu mierzonym względem pola powierzchni pod pikiem wzorca wewnętrznego) a stężeniem analitu, czego wyrazem były obliczone metodą najmniejszych kwadratów równania prostej oraz współczynnik korelacji r bliski jedności (TABELA 4.6 – 4.8).

Wyznaczono również precyzję opracowanych metod, która wiąże się z błędami przypadkowymi i określa rozrzut wyników wokół wartości średniej. W procesie walidacji każdej z opracowanych metod wielkość błędów przypadkowych określono za pomocą współczynnika zmienności W_z , którego wartość we wszystkich przypadkach spełniała kryteria akceptacji $W_z < 2\%$ (TABELA 4.9 – 4.11).

Dokładność metody, natomiast jest stopniem zbliżenia wyników oznaczenia uzyskanych za jej pomocą do wartości rzeczywistej. Wiąże się ona zatem z błędami systematycznymi wykonanych

pomiarów i określa, w jaki sposób wartość oznaczona różni się od wartości prawdziwej. W niniejszej pracy dokładność opracowanych metod wyrażona została stopniem odzysku analitu z mieszanin modelowych o znanej zawartości chlorowodoru imidaprilu. Oznaczona wartość tego parametru, we wszystkich przypadkach mieściła się w przedziale 95% - 105% (TABELA 4.9 – 4.11).

Spełnienie wszystkich kryteriów akceptacji przez opracowane metody RP-HPLC umożliwiło wykorzystanie ich do zaplanowanych zadań badawczych, ponieważ zapewniały one uzyskanie wiarygodnych wyników.

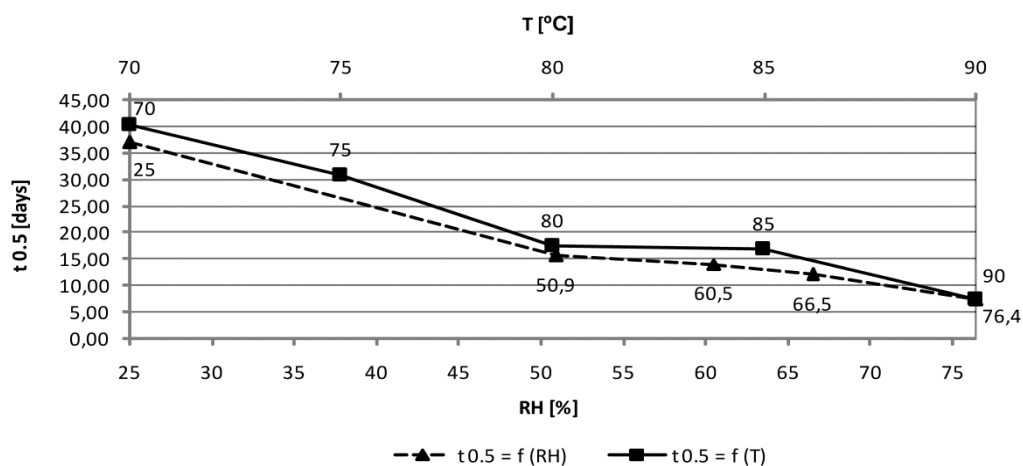
Ocena trwałości chlorowodoru imidaprilu w postaci czystej substancji

Przeprowadzona analiza trwałości chlorowodoru imidaprilu w substancji za pomocą testu izotermicznego umożliwiła wyznaczenie parametrów kinetycznych i termodynamicznych reakcji rozkładu badanego związku oraz reakcji tworzenia jego produktów degradacji w warunkach obecności lub braku wilgoci w powietrzu przy podwyższonej temperaturze otoczenia. Zastosowanie różnych warunków testowych w poszczególnych eksperymentach pozwoliło na określenie wpływu czynników zewnętrznych na przebieg procesu rozkładu chlorowodoru imidaprilu, co jest niezmiernie istotne dla ustalenia wytycznych odnośnie jego właściwego przechowywania. Szczególną uwagę poświęcono przy tym ocenie wpływu wilgoci na trwałość badanej substancji leczniczej, ponieważ jak wiadomo, jest ona stale obecna w otaczającym środowisku a jej dostęp stwarza korzystne warunki dla postępu różnorodnych reakcji chemicznych, prowadząc do ich przyspieszenia bądź indukcji (np. reakcje hydrolizy). Drugim czynnikiem, którego wpływ na rozkład chlorowodoru imidaprilu w postaci czystej substancji poddano szczegółowej analizie była temperatura, gdyż jej wzrost powoduje zwiększenie ilości efektywnych zderzeń pomiędzy reagującymi cząstkami, prowadząc do przyspieszenia reakcji.

I tak, obliczone wartości stężenia procentowego odpowiednio, substancji macierzystej lub produktu reakcji w kolejnych próbach, eksponowanych na działanie wymienionych czynników w różnych przedziałach czasowych potwierdziły stopniowy ubytek chlorowodoru imidaprilu oraz przyrost zawartości jego zanieczyszczeń degradacyjnych w czasie. Otrzymane tym sposobem krzywe rozkładu $c = f(t)$ stanowiły podstawę do określenia modelu kinetycznego obserwowanej reakcji a analiza ich kształtu potwierdziła, że we wszystkich przypadkach przyjmują one postać sigmoidalną z charakterystycznym, wyraźnie zaznaczonym, powolnym okresem indukcji, szybkim okresem przyspieszenia oraz okresem terminacji reakcji (RYCINA 4.9). W celu doboru właściwego modelu matematycznego, opisującego przebieg obserwowanych procesów zastosowano technikę *model-fitting*, dzięki której dowiedziono, że najlepszą korelację danych eksperymentalnych zarówno w warunkach $RH > 0\%$ jak i $RH = 0.0\%$ dla chlorowodoru imidaprilu oraz jego produktów rozkładu uzyskano w modelu wzrostu zarodków wg *Prout-Tomkins'a*, co oznacza, że chlorowodorek imidaprilu

rozkłada się zgodnie z mechanizmem reakcji autokatalitycznej (TABELA 4.13 i 4.34). Godnym uwagi jest fakt, iż warunkiem uzyskania wysokiej korelacji pomiędzy danymi doświadczalnymi w tym modelu była analiza punktów należących wyłącznie do okresu przyspieszenia reakcji, z pominięciem fazy początkowej oraz końcowej. Ponieważ we wszystkich testach z chlorowodorkiem imidaprilu w postaci czystej substancji obserwowano reakcję autokatalityczną, niezależnie od warunków środowiskowych, stwierdzono, że zmiany wilgotności względnej powietrza, włącznie z całkowitym brakiem dostępu wilgoci oraz zmiany temperatury nie mają wpływu na kinetyczny mechanizm rozkładu badanej substancji a także reakcji tworzenia jej produktów degradacyjnych.

Parametrami, które wykorzystywane są do liczbowej interpretacji danych w modelu reakcji autokatalitycznej są długość okresu indukcji oraz stała szybkości reakcji. Pierwszy z nich został wyznaczony graficznie, przy czym wraz ze wzrostem temperatury a także wraz ze wzrostem wilgotności względnej powietrza zaobserwowano stopniowe jego skracanie. Świadczy to o tym, że wymienione czynniki zewnętrzne przyspieszają reakcję rozkładu chlorowodorku imidaprilu w postaci czystej substancji. Ponadto wyznaczone z równania *Prout-Tompkins'a* stałe szybkości reakcji, odwrotnie jak w przypadku długości okresu indukcji, wraz ze wzrostem temperatury oraz wilgotności względnej powietrza – rosną a obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wnioskami, wyciągniętymi na podstawie analizy pierwszego parametru. Co więcej, badając zależność czasu połowicznego rozkładu ($t_{0.5}$) chlorowodorku imidaprilu od zmian temperatury oraz wilgotności względnej powietrza stwierdzono, że obydwa te parametry wpływają porównywalnie na trwałość badanej substancji leczniczej (RYCINA 7.2).



RYCINA 7.2.

Porównanie wpływu temperatury i wilgotności względnej powietrza na czas połowicznego rozkładu chlorowodorku imidaprilu w substancji.

Matematycznie, wpływ temperatury na trwałość chlorowodorku imidaprilu w czystej substancji ujęto równaniem *Arrhenius'a*. Spełniona prostoliniowa zależność $\ln k = f\left(\frac{1}{T}\right)$ zarówno w warunkach $RH = 76.4\%$ jak i $RH = 0.0\%$ potwierdza, iż zmiany temperatury nie powodują zmiany

mechanizmu reakcji a jedynie zwiększają jej szybkość, ponieważ wzrasta częstość kolizji pomiędzy reagującymi cząstkami (RYCINA 4.15 i 4.34).

Wyznaczone zależności Arrhenius'a dla chlorowodoru imidaprilu w postaci czystej substancji przyjmują następującą postać:

$$RH = 76.4\% \quad \ln k = (-12550 \pm 2827) \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + (22 \pm 8)$$

$$RH = 0.0\% \quad \ln k = (-18417 \pm 3463) \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + (35 \pm 9)$$

Powyższe równania stały się podstawą do wyznaczenia parametrów termodynamicznych obserwowanych reakcji w warunkach obecności lub braku wilgoci w powietrzu. Odpowiednie wartości energii aktywacji (E_a), entalpii aktywacji (ΔH^\ddagger) oraz entropii aktywacji (ΔS^\ddagger) podano w TABELACH 4.24 oraz 4.40. Energia aktywacji reakcji określa energię potrzebną do rozerwania wiązań chemicznych w celu utworzenia kompleksu aktywnego. Zatem im wyższa energia aktywacji tym reakcja zachodzi trudniej a substancja jest tym trwalsza. Na podstawie uzyskanych danych doświadczalnych stwierdzono, że w warunkach $RH = 76.4\%$ wartość tego parametru wynosi 104 ± 24 kJ/mol, podczas gdy w warunkach $RH = 0.0\%$, $E_a = 153 \pm 28$ kJ/mol, co potwierdza, że dostęp wilgoci ułatwia inicjację rozkładu chlorowodoru imidaprilu w czystej substancji. Ponadto, pozytywna wartość entalpii aktywacji w obydwu przypadkach sugeruje endotermiczny charakter obserwowanych procesów, a więc ich postęp zależny jest od stałego napływu energii do układu a wzrastające warunki termiczne przyspieszają je. Z kolei negatywna wartość entropii aktywacji dla $RH = 76.4\%$ jest niekorzystna z termodynamicznego punktu widzenia i może świadczyć o tym, że w wyniku utworzenia kompleksu aktywnego układ zyskuje wyższy stopień uporządkowania, co sugeruje dwucząsteczkowy charakter tej reakcji, przy czym jednym z reagentów jest sam chlorowodorek imidaprilu a drugim prawdopodobnie cząsteczką wody. Z drugiej strony, w warunkach suchego powietrza uzyskano dodatnią wartość entropii aktywacji, sugerującą, że kompleks aktywny cechuje się mniejszym stopniem uporządkowania, a więc reakcja zachodzi w trybie jednocząsteczkowym, najprawdopodobniej bez udziału wody. Na podstawie zebranych informacji, na tym etapie badań postawiono hipotezę, iż powyższe różnice parametrów termodynamicznych spowodowane są odmiennym przebiegiem reakcji na poziomie $RH = 0.0\%$ i $RH = 76.4\%$, prowadzącym do otrzymania innych produktów degradacji, co pozostaje w zgodzie z analizą chromatogramów (RYCINA 4.4, 4.21 i 4.35), gdzie w warunkach $RH = 76.4\%$ obserwowano dwa sygnały od produktów rozkładu a w warunkach $RH = 0.0\%$ - tylko jeden.

Co więcej, analizując bardziej szczegółowo wpływ wilgoci na trwałość chlorowodoru imidaprilu w czystej substancji zauważono, iż wraz ze wzrostem poziomu $RH\%$ następuje eksponentalny wzrost stałych szybkości reakcji zgodnie z zależnością $\ln k = f(RH\%)$, której wartość nachylenia określa wrażliwość badanego leku na zmiany wilgoci. Wysoka korelacja danych powyższej funkcji potwierdza, że mechanizm reakcji rozkładu imidaprilu w zakresie analizowanych $RH\%$ pozostaje ten sam a zmienia się jedynie szybkość tego procesu (RYCINA 4.10).

Wyznaczona zależność $\ln k = f(RH\%)$ dla chlorowodoru imidaprilu w postaci czystej substancji przyjmuje następującą postać:

$$\ln k = (0.0337 \pm 0.0050) RH\% - (14.82 \pm 0.29).$$

Dalej, powiązując ze sobą zlogarytmowaną stałą szybkości reakcji rozkładu imidaprilu, odwrotność temperatury oraz wartość wilgotności względnej powietrza otrzymano trójwymiarowy wykres (RYCINA 4.16), opisany równaniem:

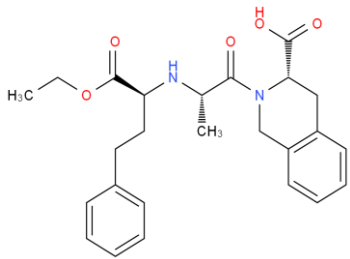
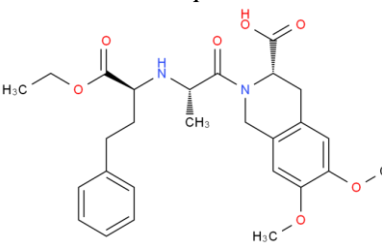
$$\ln k = 17.6 - 11783.6 \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + 0.034 \cdot RH\%,$$

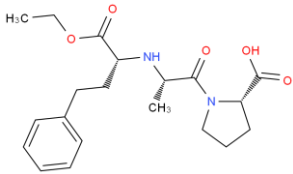
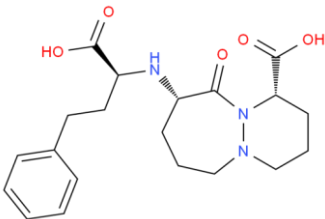
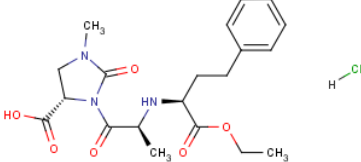
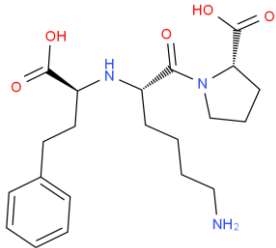
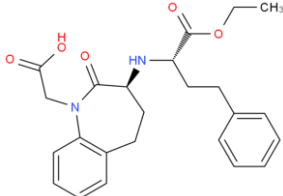
który daje możliwość przewidywania szybkości przebiegu reakcji rozkładu chlorowodoru imidaprilu w postaci czystej substancji w dowolnych warunkach przechowywania.

W celu określenia miejsca badanej substancji leczniczej w hierarchii trwałości dikarboksyłowych pochodnych inhibitorów konwertazy angiotensyny, zebrano odpowiednie dane literaturowe i przedstawiono je w TABELI 7.1 oraz na RYCINACH 7.3 - 7.5 [72-75,121,122].

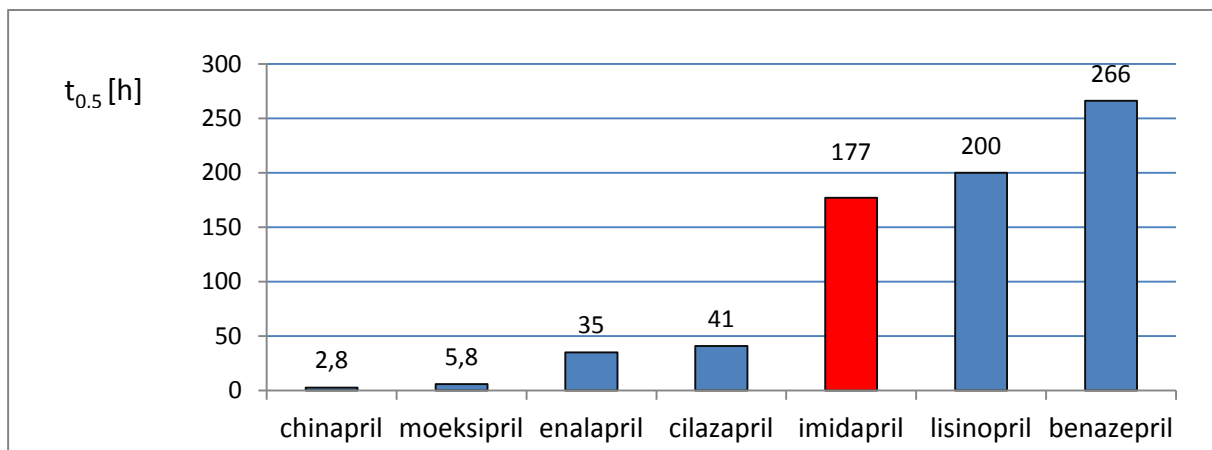
TABELA 7.1.

Porównanie kinetyki i mechanizmów rozkładu dikarboksyłowych inhibitorów konwertazy angiotensyny

Struktura/Nazwa	Parametry kinetyczne $RH = 76.4\%/T = 363\text{ K}$ wrażliwość na zmiany $RH(\%)$	Parametry termodynamiczne [kJ/mol]	Mechanizm rozkładu
<p><i>Chinapril</i></p> 	$k = 6.966 \pm 0.37 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $t_{0.5} = 2.8 \text{ h}$ $\alpha(RH\%) = 0.06$	$E_a(RH76.4\%) = 133.62$ $E_a(RH0.0\%) = 139.86$	Reakcja pierwszego rzędu, hydroliza i cyklizacja
<p><i>Moeksipril</i></p> 	$k = 3.309 \pm 0.31 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $t_{0.5} = 5.8 \text{ h}$ $\alpha(RH\%) = 0.07$	$E_a(RH76.4\%) = 116.96$ $E_a(RH0.0\%) = 145.30$	Reakcja pierwszego rzędu, hydroliza i cyklizacja

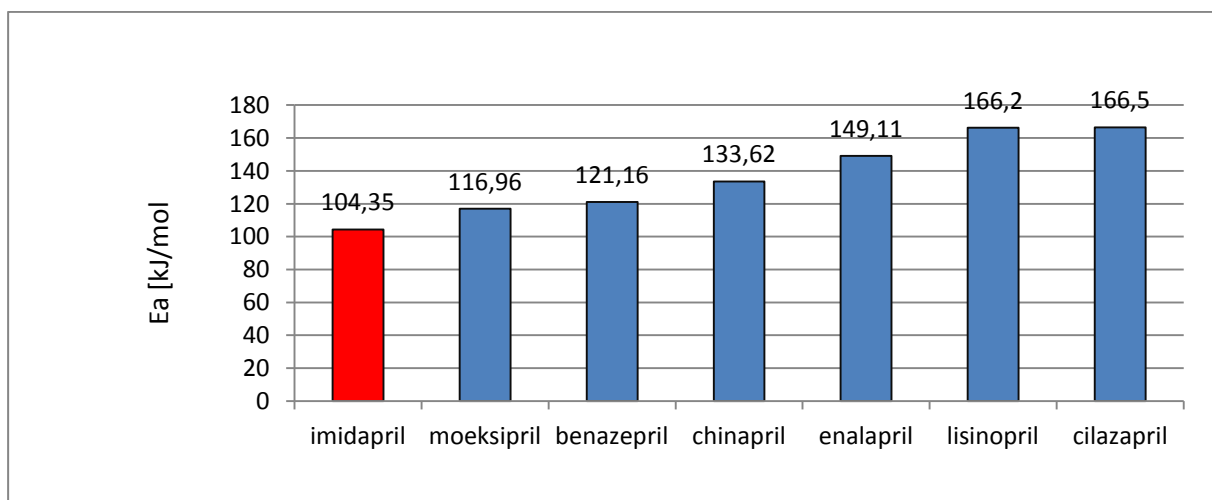
<p><i>Enalapril</i></p> 	$k = 3.354 \pm 0.24 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $t_{0.5} = 35 \text{ h}$ $a(RH\%) = 0.02$	$E_{a(RH76.4\%)} = 149.11$ $E_{a(RH0.0\%)} = 168.50$	Reakcja autokatalityczna, hydroliza i cyklizacja
<p><i>Cilazapril</i></p> 	$k = 1.940 \pm 0.11 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $t_{0.5} = 41 \text{ h}$ $a(RH\%) = 0.04$	$E_{a(RH76.4\%)} = 166.50$ $E_{a(RH0.0\%)} = 110.64$	Reakcja autokatalityczna, hydroliza
<p><i>Imidapril</i></p> 	$k = 4.889 \pm 0.41 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $t_{0.5} = 177 \text{ h}$ $a(RH\%) = 0.03$	$E_{a(RH76.4\%)} = 104.35$ $E_{a(RH0.0\%)} = 153.0$	Reakcja autokatalityczna, hydroliza i cyklizacja
<p><i>Lisinopril</i></p> 	$k = 1.100 \pm 0.19 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $t_{0.5} = 200 \text{ h}$ $a(RH\%) = 0.016$	$E_{a(RH76.4\%)} = 166.19$	Reakcja autokatalityczna, cyklizacja
<p><i>Benazepril</i></p> 	$k = 7.273 \pm 0.22 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ $t_{0.5} = 266 \text{ h}$ $a(RH\%) = 0.02$	$E_{a(RH76.4\%)} = 121.16$ $E_{a(RH0.0\%)} = 85.00$	Reakcja pierwszego rzędu, hydroliza

Legenda: $a(RH\%)$ stanowi wartość nachylenia funkcji $\ln k = f(RH\%)$.



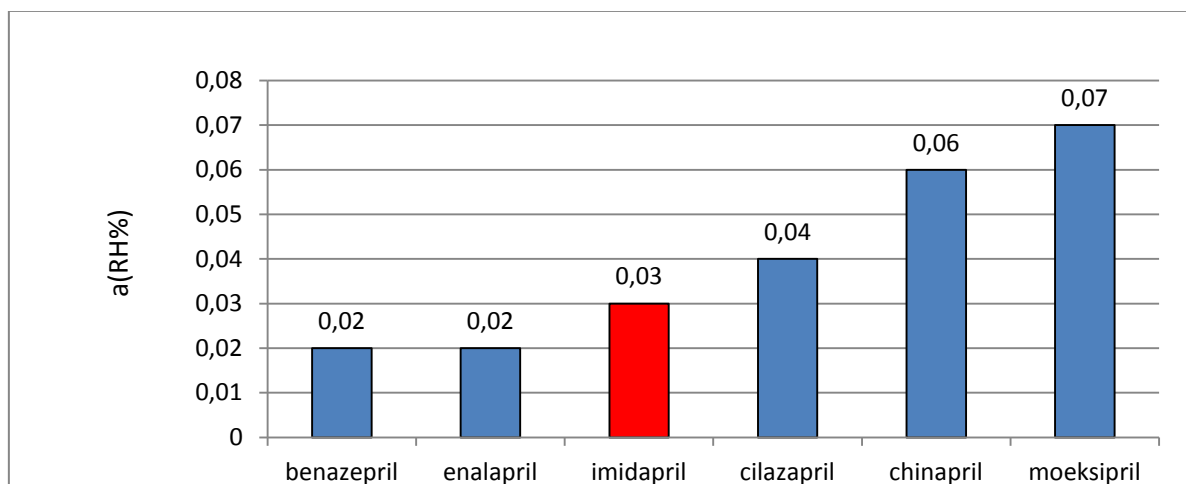
RYCINA 7.3.

Porównanie czasów połowicznego rozkładu w fazie stałej dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny w $RH = 76.4\%$ i $T = 363\text{ K}$.



RYCINA 7.4.

Porównanie energii aktywacji reakcji rozkładu w dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny w fazie stałej dla $RH = 76.4\%$.



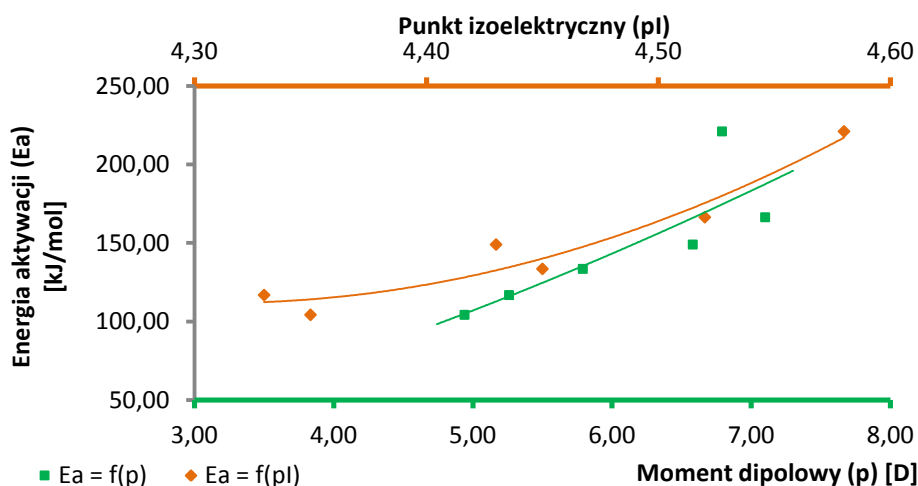
RYCINA 7.5.

Porównanie wrażliwości na zmiany $RH\%$ dikarboksylowych inhibitorów konwertazy angiotensyny w fazie stałej dla $T = 363\text{ K}$.

Jak wynika z powyższych zestawień chlorowoderek imidaprilu należy do grupy bardziej trwałych I-ACE, o czym świadczy jego względnie długi czas połowicznego rozkładu. Co ciekawe, w porównaniu z enalaprilem, który ma podobną budowę chemiczną, wykazuje on ponad 5-krotnie lepszą stabilność w fazie stałej, co przypisuje się obecności podstawnika 1-metylo-2-oksoimidazolowego. Enalapril natomiast, będąc pochodną piroliny należy do grupy mniej trwałych I-ACE. Powolny rozkład chlorowodorku imidaprilu pozostaje jednak w sprzeczności z jego podatnością na reakcje rozkładu, gdyż jak wynika z RYCINY 7.5 jest on najbardziej wrażliwy na zmiany temperatury otoczenia ze wszystkich analizowanych I-ACE. Sądzić zatem można, że ugrupowanie 1-metylo-2-oksoimidazolowe stanowi zawadę steryczną w reakcji rozkładu i chociaż rozpoczyna się ona już w niższych temperaturach, to jednak przebiega wolniej, co kompensuje z nadwyżką nietrwałość struktury. Natomiast w kontekście wrażliwości dikarboksylowych I-ACE na zmiany wilgotności względnej powietrza, wyrażonej wartością nachylenia wykresu $\ln k = f(RH\%)$, wykazano, iż chlorowodorek imidaprilu charakteryzuje się jedną z niższych wartości tego parametru, czyli jest mniej wrażliwy na zmiany poziomu wilgoci w otoczeniu niż większość przedstawicieli analizowanej klasy leków.

Zależność budowy od trwałości dikarboksylowych I-ACE

Na podstawie danych literaturowych i eksperymentalnych podjęto próbę określenia zależności struktury I-ACE od ich trwałości w fazie stałej poprzez skonstruowanie odpowiedniego modelu matematycznego. W tym celu zastosowano technikę modelowania komputerowego QSPR. Dokonano zestawienia danych stabilnościowych wyżej wymienionych dikarboksylowych I-ACE (takich jak k , E_a) z ich wybranymi deskryptorami strukturalnymi i fizykochemicznymi w poszukiwaniu korelacji pomiędzy nimi. W heterogennej grupie badanych związków nie odnaleziono silnych korelacji pomiędzy analizowanymi danymi (TABELA 4.76). Natomiast w grupie I-ACE pochodnych estrów (bez lisinoprilu) określono zależność $E_a = f(pI)$ oraz $E_a = f(p)$ (RYCINA 7.6).

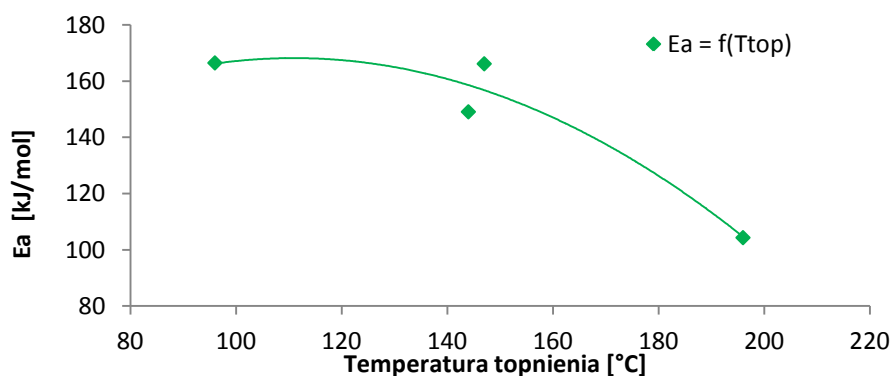


RYCINA 7.6

Zależność pomiędzy E_a rozkładu a punktem izoelektrycznym i momentem dipolowym dla I-ACE pochodnych estrów.

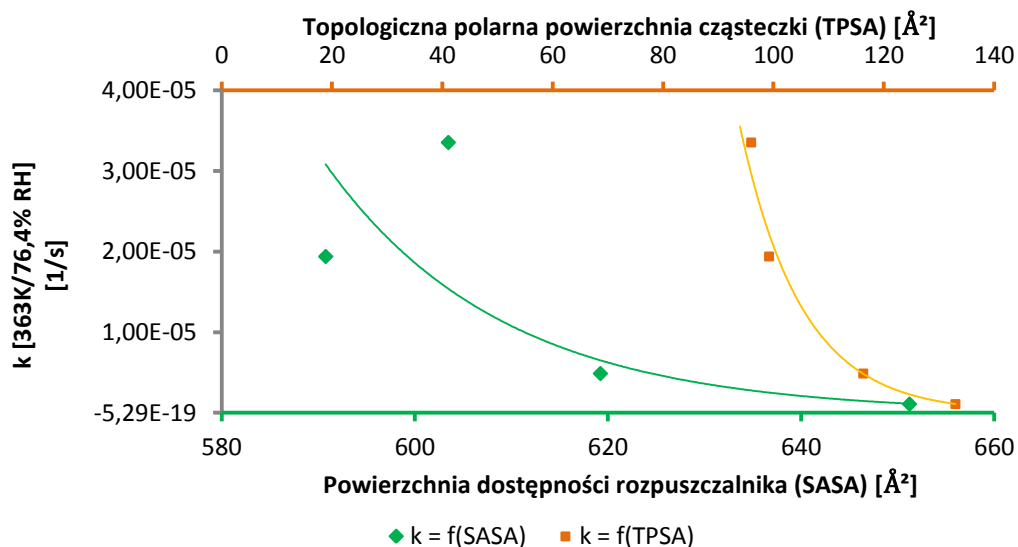
Na podstawie wykresu (RYCINA 7.6) stwierdzono, iż w badanej grupie I-ACE pochodnych estrów dla wyższych wartości punktu izoelektrycznego oraz momentu dipolowego odnotowywano wyższe energie aktywacji rozkładu, a więc mniejszą wrażliwość na zmiany temperatury otoczenia.

W poszukiwaniu dalszych zależności struktury I-ACE od ich trwałości, spośród dostępnych dikarboksyłowych analogów chlorowodorku imidaprilu wyselekcjonowano jednorodny zestaw związków, charakteryzujący się autokatalitycznym przebiegiem reakcji rozkładu w warunkach $T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$, do którego należą: imidapril, enalapril, cilazapril i lisinopril (TABELA 7.1). Ponowna analiza parametrów stabilnościowych i obliczonych deskryptorów tylko dla tych przedstawicieli klasy wykazała istnienie korelacji pomiędzy stałą szybkości reakcji autokatalitycznej a współczynnikiem podziału okatnol/woda, topologiczną polarną powierzchnią cząsteczki, powierzchnią dostępności rozpuszczalnika, momentem dipolowym oraz objętością molową. Ponadto energia aktywacji reakcji autokatalitycznej w badanej grupie koreluje z temperaturą topnienia, ilością akceptorów wiązań wodorowych, wykładnikiem stałej dysocjacji kwasowej, powierzchnią dostępności rozpuszczalnika oraz parachorą (TABELA 4.78). Wyznaczone na tej podstawie równania matematyczne są obrazem związku struktury chemicznej badanych dikarboksyłowych I-ACE degradujących w fazie stałej zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej z ich trwałością. I tak, zgodnie z określonymi zależnościami $k = f(\text{Log}P)$ oraz $k = f(p)$ można stwierdzić, iż w analizowanej grupie leków cząsteczki bardziej lipofilowe oraz wykazujące wyższe wartości momentu dipolowego są mniej trwałe, ponieważ odpowiednie stałe szybkości reakcji osiągają wówczas wyższe wartości. Ponadto, cząsteczki o mniejszej zewnętrznej powierzchni, jaka jest dostępna dla rozpuszczalnika a także o mniejszej sumie polarnych powierzchni *van der Waalsa* atomów także cechują się niższą trwałością, co obrazują zależności, odpowiednio $k = f(\text{SASA})$ oraz $k = f(\text{TPSA})$. Z kolei analiza zależności $E_a = f(T_{\text{top}})$ wykazała, iż cząsteczki o niższych wartościach temperatury topnienia osiągają wyższe energie aktywacji rozkładu, przez co są mniej wrażliwe na zmiany temperatury otoczenia (RYCINY 7.7-7.9). Funkcja wielomianowa $k = f(MV)$ natomiast, ukazująca zależność stałej szybkości reakcji autokatalitycznej od objętości molowej oraz funkcje odpowiadające pozostałym zależnościom $E_a = f(x)$ mają kształt paraboli z jednym ekstremum, wyznaczającym dwa przedziały monotoniczności.



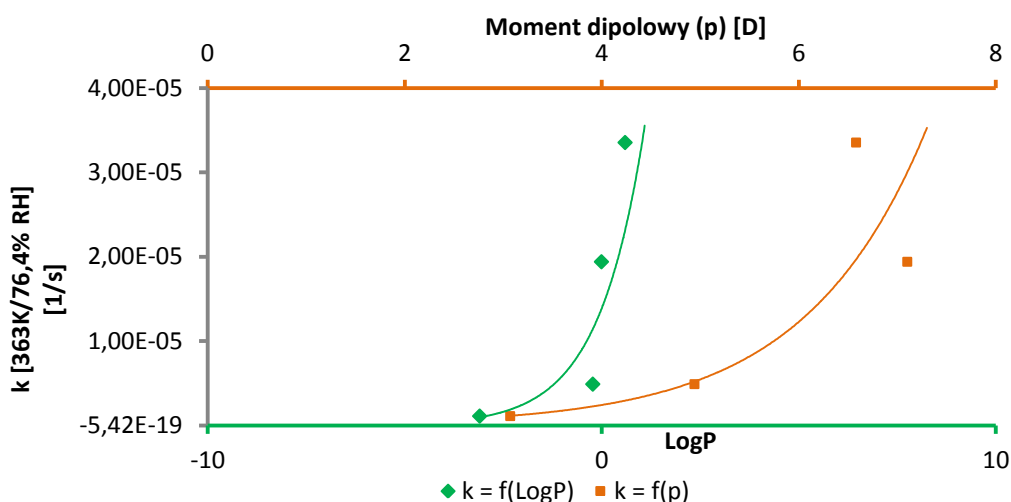
RYCINA 7.7.

Zależność pomiędzy E_a autokatalitycznej reakcji rozkładu a temperaturą topnienia dla dikarboksyłowych I-ACE.



RYCINA 7.8.

Zależność pomiędzy stałą szybkości autokatalitycznej reakcji rozkładu a zewnętrzną powierzchnią dostępną dla rozpuszczalnika oraz sumą polarnych powierzchni van der Waalsa atomów w cząsteczkach dikarboksyłowych I-ACE.



RYCINA 7.9.

Zależność pomiędzy stałą szybkości autokatalitycznej reakcji rozkładu a momentem dipolowym oraz współczynnikiem podziału okatnol/woda dla cząsteczek dikarboksyłowych I-ACE.

Wpływ stearynianu magnezu na trwałość chlorowodoru imidaprilu

Analiza trwałości substancji czynnej w obecności substancji pomocniczych należy do podstawowych komponentów badań rozwojowych nad postacią farmaceutyczną. Konieczność tego typu eksperymentów wynika z faktu, iż choć z definicji neutralne pod względem biologicznym, to jednak jak każda substancja chemiczna, substancje pomocnicze wykazują większą lub mniejszą reaktywność a ich bezpośredni kontakt z substancją czynną jest czynnikiem mogącym wyzwać lub przyspieszać reakcje chemiczne naruszające trwałość leku.

Do analizy trwałości chlorowodoru imidaprilu w obecności substancji pomocniczych wytypowano stearynian magnezu jako najczęściej stosowany środek poślizgowy, o którym z danych literaturowych wiadomo, że jest przyczyną rozlicznych interakcji w gotowej postaci farmaceutycznej [76]. Zaplanowane badania przeprowadzono w mieszaninach modelowych, sporządzonych w wagowym stosunku ilościowym 1:1, celem zmaksymalizowania prawdopodobieństwa zaobserwowania potencjalnej interakcji.

Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdzają, iż obecność stearynianu magnezu zmienia mechanizm reakcji rozkładu chlorowodoru imidaprilu z reakcji autokatalitycznej na reakcję pierwszorzędową, której charakterystyczną cechą jest krzywa kinetyczna o przebiegu wykładniczym, sugerująca eksponentalny zanik substratu w czasie (RYCINA 4.41). Ponadto, porównując stałe szybkości reakcji rozkładu (k) w warunkach $T = 318$ K, $RH = 76.4\%$ oraz wartości nachylenia wykresów $\ln k = f(RH\%)$ chlorowodoru imidaprilu w czystej postaci oraz w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu (TABELA 4.53 – 4.54) stwierdzono, iż w obecności badanej substancji pomocniczej, szybkość degradacji chlorowodoru imidaprilu oraz jego wrażliwość na zmiany wilgotności względnej powietrza spada.

Nie stwierdzono zatem negatywnych interakcji pomiędzy stearynianem magnezu a chlorowodorkiem imidaprilu. Co więcej, zaobserwowana zmiana mechanizmu rozkładu badanej substancji leczniczej w obecności wybranej substancji pomocniczej wydaje się korzystna pod względem bezpieczeństwa terapii. Degradacja leku drogą reakcji autokatalitycznej jest, bowiem mniej pożądanym zjawiskiem z punktu widzenia pacjenta, gdyż nagły, znaczący przyrost szybkości rozkładu substancji czynnej po zakończeniu okresu indukcji, który w przypadku niewłaściwego przechowywania leku ulega skróceniu, może spowodować wielokrotną ekspozycję chorego na nadmiernie wytworzone produkty degradacji oraz znacznie upośledzać skuteczność terapii z powodu bardzo szybkiego ubytku zawartości aktywnych składników leku. Z drugiej strony, w modelu pierwszorzędowym reakcja rozkładu zachodzi stopniowo przez cały jej okres, co zmniejsza, choć nie niweluje ryzyka niekorzystnego wpływu warunków środowiskowych na jakość terapii.

Ocena trwałości chlorowodoru imidaprilu w tabletkach

Z uwagi na znaczenie sposobu przechowywania preparatów leczniczych w domowych apteczkach dla jakości terapii, postanowiono przeanalizować wpływ długotrwałego przebywania tabletek z chlorowodorkiem imidaprilu poza opakowaniem bezpośrednim na trwałość badanej substancji czynnej. Z doświadczenia wiadomo bowiem, że często stosowaną praktyką wśród chorych jest rozdzielanie tabletek na połówki oraz porcjowanie ich np. w popularnych organizerach, kasetkach lub kieliszkach dozujących w systemie dziennym, tygodniowym a nawet miesięcznym, co może niekorzystnie rzutować na trwałość leku. I tak, zaakceptowana metodyka badań obejmowała analizę trwałości chlorowodoru imidaprilu w tabletkach, przechowywanych w blistrze, bez blistra oraz w formie przelamanej na dwie połówki. Co istotne, eksperyment ten, oprócz oceny wpływu

przechowywania, pozwolił także określić wpływ procesu produkcyjnego oraz opakowania bezpośredniego na trwałość badanej substancji czynnej.

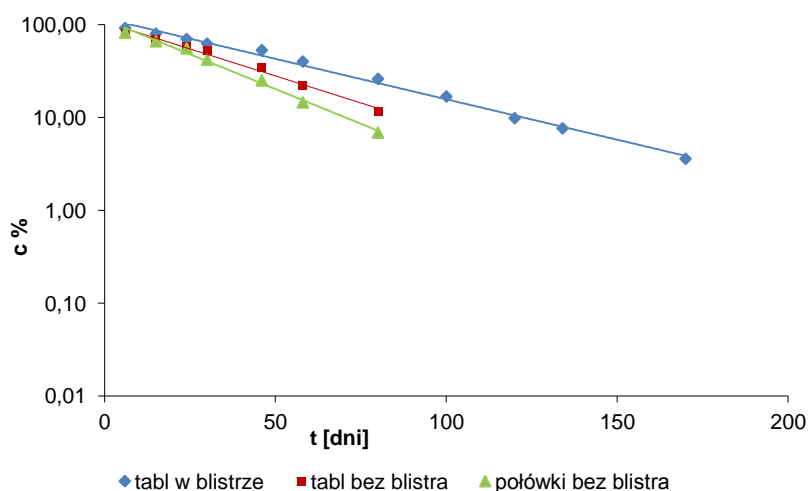
Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły, że proces tabletkowania lub substancje pomocnicze wpływają na zmianę mechanizmu reakcji rozkładu chlorowodoru imidaprilu z reakcji autokatalitycznej na reakcję pierwszorzędową (w przypadku całych tabletek bez blistra – reakcję odwracalną-pierwszorzędową), co jest korzystnym zjawiskiem pod względem bezpieczeństwa terapii. Jednakże wyznaczone z odpowiednich równań *Arrhenius'a* (TABELA 4.24 oraz 4.72) stałe szybkości reakcji rozkładu chlorowodoru imidaprilu w czystej substancji oraz w tabletkach z blistrem w warunkach $RH = 76.4\%$, $T = 293\text{ K}$, wynoszące odpowiednio:

- | | |
|----------------------------|---|
| • dla czystej substancji: | $k_{293\text{ K}} = (1.36 \pm 0.16) \cdot 10^{-9}\text{ 1/s}$ |
| • dla tabletek w blistrze: | $k_{293\text{ K}} = (5.89 \pm 0.45) \cdot 10^{-8}\text{ 1/s}$ |

wskazują, iż rozkład badanej substancji leczniczej zachodzi szybciej w postaci farmaceutycznej. Dodatkowo istotna statystycznie różnica energii aktywacji obydwu procesów (TABELA 4.73) potwierdza, iż w preparacie leczniczym chlorowodorek imidaprilu jest bardziej wrażliwy na zmiany temperatury otoczenia a jego rozkład rozpoczyna się przy niższych wartościach tego parametru w porównaniu z czystą substancją.

Ponadto wykazano, iż przechowywanie tabletek z chlorowodorkiem imidaprilu bez opakowania bezpośredniego lub w postaci przełamanej na dwie połówki narusza trwałość substancji czynnej w sposób istotny pod względem statystycznym (TABELA 4.68 - 4.71). Najgorszą metodą przechowywania tabletek jest forma rozłamana bez opakowania bezpośredniego, gdyż w tym przypadku odnotowano najwyższe wartości stałych szybkości reakcji rozkładu we wszystkich temperaturach (RYCINA 7.10). Oprócz tego jest to forma najbardziej wrażliwa na zmiany temperatury, z energią aktywacji rozkładu rzędu $E_a = 29 \pm 6\text{ [kJ mol}^{-1}\text{]}$. Ostatecznie, obliczone z równania *Arrhenius'a* wartości czasu $t_{0.1}$, warunkach $RH = 76.4\%$, $T = 293\text{ K}$, który jest jednoznaczny z terminem przydatności do użycia danego preparatu, pozwalają bardziej obrazowo przedstawić istotę tego zjawiska:

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| • dla tabletek w blistrze | $t_{0.1} = 513\text{ dni}$ |
| • dla tabletek bez blistra | $t_{0.1} = 21\text{ dni}$ |
| • dla połówek tabletek | $t_{0.1} = 12\text{ dni}$ |



RYCINA 7.10.

Porównanie szybkości rozkładu chlorowodoru imidaprilu w tabletkach w zależności od sposobu przechowywania, w warunkach $T = 333\text{ K}$ i $RH = 76.4\%$.

Reasumując, w przypadku tabletek z chlorowodorkiem imidaprilu należy unikać dozowania długoterminowego za pomocą organizatorów na leki. Jednocześnie w celu zapewnienia maksymalnej skuteczności i bezpieczeństwa terapii, tabletki te należy przechowywać w opakowaniu handlowym, które zapewnia ochronę przed wilgocią oraz minimalizuje podatność leku na zjawisko rozkładu.

Identyfikacja produktów rozkładu chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej

Identyfikacja produktów rozkładu chlorowodoru imidaprilu w fazie stałej jest cennym źródłem informacji, odnośnie ścieżek jego degradacji oraz może posłużyć jako element oceny bezpieczeństwa. Dla chlorowodoru imidaprilu w postaci czystej substancji wykryto dwa produkty rozkładu w warunkach $RH = 76.4\%$ oraz jeden produkt w warunkach $RH = 0.0\%$ (TABELA 4.33 i 4.45). Ponadto w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu rozkład badanego I-ACE również prowadził do utworzenia jednego produktu w warunkach $RH = 76.4\%$ (TABELA 4.52). Przeprowadzone w spektrometrze masowym sprzężonym z wysokosprawnym chromatografem cieczowym rozdział i identyfikacja składników próbek, poddanych działaniu odpowiednich warunków środowiskowych potwierdziły obecność w nich następujących zanieczyszczeń degradacyjnych:

- chlorowodorek imidaprilu, $RH = 76.4\%$ – pochodna diketopiperazynowa oraz imidaprilat,
- chlorowodorek imidaprilu, $RH = 0.0\%$ – pochodna diketopiperazynowa,
- mieszanina chlorowodoru imidaprilu i stearynianu magnezu, $RH = 76.4\%$ – imidaprilat.

W związku z powyższym ostatecznie stwierdzono, że rozkład chlorowodoru imidaprilu w czystej substancji w obecności wilgoci zachodzi drogą dwóch równoległych reakcji: hydrolizy oraz wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. Podobny mechanizm obserwowano w przypadku enalaprilu,

chinaprilu i moeksiprilu, przy czym w tych dwóch ostatnich rozkład był wynikiem procesu pierwszorzędowego (TABELA 7.1). Hydroliza jest reakcją typową dla związków, posiadających wiązanie estrowe. W przypadku dikarboksylowych I-ACE prowadzi ona do utworzenia pochodnej dikwasowej, która jest aktywnym metabolitem i choć to właśnie ten produkt odpowiada za efekt farmakologiczny podanej dawki, to jednak jego przedwczesne powstawanie *ex vivo* jest niekorzystne pod względem farmakokinetycznym, z uwagi na niską absorpcję jelitową, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia biodostępności leku. Z drugiej strony wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja I-ACE prowadzi do zniszczenia struktury cząsteczki macierzystej oraz do utworzenia pochodnych diketopiperazynowych.

Warto podkreślić, że zmianę profilu produktowego reakcji rozkładu chlorowodoru imidaprilu przy $RH = 0.0\%$ postulowano już podczas omawiania parametrów termodynamicznych tego zjawiska. Zasugerowano wówczas jednocząsteczkowy charakter obserwowanego procesu, a więc rozerwanie wiązań chemicznych oraz utworzenie nowych odbywa się tutaj bez udziału drugiego reagenta. Istotnie, brak dostępu wilgoci w warunkach suchego powietrza sprawia, iż hydroliza chlorowodoru imidaprilu nie zachodzi a rozkład następuje tylko drogą wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. Stąd wniosek, iż w cząsteczce chlorowodoru imidaprilu prawdopodobnie brak zaadsorbowanej wody, która mogłaby ewentualnie uczestniczyć w zjawiskach związanych z rozkładem hydrolitycznym.

Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku obecności stearynianu magnezu w warunkach dostępu wilgoci, gdyż wówczas rozkład chlorowodoru imidaprilu zachodzi tylko na drodze hydrolizy z utworzeniem imidaprilatu, natomiast cyklizacji nie obserwowano. Taki przebieg reakcji wytłumaczyć można zależną od stearynianu magnezu alkalizacją środowiska, która przyspiesza rozkład hydrolityczny. Ponadto woda zawarta w powietrzu może w warunkach testu dodatkowo indukować efekty związane ze zmianą pH na powierzchni stykających się ze sobą ciał stałych oraz faworyzować przebieg hydrolizy z jednoczesnym zanikiem długiej ścieżki degradacji imidaprilu.

Uzyskane wyniki identyfikacji zanieczyszczeń degradacyjnych badanej substancji leczniczej oraz ocena wpływu warunków przechowywania tabletek z chlorowodorkiem imidaprilu na jego trwałość stały się podstawą do dalszych analiz, mających na celu określenie ryzyka związanego z inicjacją nowotworową, jako skutkiem ekspozycji na zidentyfikowane produkty rozkładu.

Analiza mutagenności produktów rozkładu oraz produktów nitrozowania chlorowodorku imidaprilu

W przeprowadzonej za pomocą testu *Ames'a* analizie mutagenności pochodnej diketopiperazynowej chlorowodorku imidaprilu oraz jej produktu nitrozowania, jak również produktu nitrozowania chlorowodorku imidaprilu uzyskano rezultat negatywny we wszystkich wykonanych eksperymentach. Badane substancje nie wykazywały w żadnym z analizowanych stężeń dwukrotnego wzrostu w średniej liczbie dołków pozytywnych powyżej linii bazową, wyznaczoną przez odpowiednią kontrolę odczynnikową, a więc nie były mutagenne w stosunku do obydwu testowanych szczepów *S. typhimurium* TA 98 oraz TA 100 zarówno w obecności jak i bez systemu aktywacji metabolicznej (RYCINA 6.8 – 6.10). Na RYCINIE 6.9C co prawda odnotowano zależny od dawki wzrost w średniej liczbie dołków pozytywnych ($r = 0.991$), jednakże zgodnie z pierwotnymi założeniami oceny danych, wynik interpretowano jako pozytywny dopiero wówczas, gdy dla trzech kolejnych stężeń wykazano istotność statystyczną w postaci wartości p poniżej 0.05. Kryterium trzech stężeń przyjęto jako minimum, poniżej którego obserwowaną zależność dawka-odpowiedź klasyfikowano jako przypadkową. Ponadto, zgodnie z wytyczną OECD 471 istotność biologiczna stanowi pierwszorzędowy wyznacznik mutagenności, podczas gdy wskaźniki statystyczne odgrywają jedynie rolę pomocniczą i nie powinny samodzielnie stanowić o ostatecznym wyniku testu. W konsekwencji obserwowane rezultaty oznaczają, że badane związki nie indukują mutacji punktowych przez podstawienie zasad lub wystąpienie mutacji ramki odczytu. Co więcej, badane próbki w zaakceptowanym zakresie stężeń nie wykazywały efektu cytotoksycznego. Jednakże należy zwrócić uwagę na fakt, iż według wytycznych OECD 471 wyniki negatywne, uzyskane w toku testu *Ames'a* powinny zostać dodatkowo potwierdzone w toku odrębnych, niezależnych eksperymentów w celu ostatecznego stwierdzenia braku mutagenności.

8. WNIOSKI

1. Trwałość chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej

- a. Opracowane i zwalidowane metody RP-HPLC z detekcją UV cechują się selektywnością, liniowością, dokładnością oraz precyzją i mogą być stosowane do oceny trwałości chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej.
- b. Degradacja chlorowodorku imidaprilu w fazie stałej zarówno w przypadku kontaktu z wilgocią, jak również w warunkach suchego powietrza postępuje zgodnie z mechanizmem reakcji autokatalitycznej.
- c. W warunkach kontaktu z wilgocią chlorowodorek imidaprilu w postaci czystej substancji rozkłada się z utworzeniem dwóch produktów, tj. pochodnej dikwasowej, zwanej imidaprilatem oraz pochodnej diketopiperazynowej; w warunkach suchego powietrza jedynym produktem rozkładu badanej substancji leczniczej jest pochodna diketopiperazynowa.
- d. Obecność stearynianu magnezu nie wpływa negatywnie na trwałość chlorowodorku imidaprilu.
- e. Tabletkowanie lub kontakt z substancjami pomocniczymi obecnymi w preparacie handlowym powoduje wzrost stałej szybkości rozkładu chlorowodorku imidaprilu.
- f. Najlepszą trwałością cechuje się preparat handlowy z chlorowodorkiem imidaprilu przechowywany w opakowaniu handlowym; w tabletkach rozłamanych na połówki oraz w tabletkach bez opakowania bezpośredniego badana substancja lecznicza jest mniej trwała.

2. Analiza QSPR w grupie dikarboksyłowych I-ACE

- a. W badanej grupie I-ACE pochodnych estrów cząsteczki o wyższych wartościach momentu dipolowego i punktu izoelektrycznego cechują się także wyższymi energiami aktywacji rozkładu.
- b. Badane dikarboksyłowe I-ACE rozkładające się zgodnie z mechanizmem reakcji autokatalitycznej są bardziej trwałe, im mniejsza jest ich lipofilowość oraz moment dipolowy.
- c. Badane dikarboksyłowe I-ACE rozkładające się zgodnie z mechanizmem reakcji autokatalitycznej są tym bardziej trwałe im większa jest ich topologiczna polarna

powierzchna cząsteczki oraz zewnętrzna powierzchnia, jaka jest dostępna dla rozpuszczalnika.

- d. Dla badanych dikarboksylowych I-ACE rozkładających się zgodnie z mechanizmem reakcji autokatalitycznej wraz ze wzrostem temperatury topnienia spada wartość energii aktywacji rozkładu.

3. Ocena mutagenności chlorowodorku imidaprilu i jego pochodnej DKP

- a. Pochodna diketopiperazynowa chlorowodorku imidaprilu oraz jej produkt N-nitrozowania, jak również produkt N-nitrozowania chlorowodorku imidaprilu nie wykazują działania cytotoksycznego ani mutagennego w teście Ames MPF™ 98/100.
- b. Należy przeprowadzić niezależną ocenę mutagenności pochodnej diketopiperazynowej oraz jej produktu nitrozowania a także produktu nitrozowania chlorowodorku imidaprilu z zastosowaniem innej metody *in vitro* lub *in vivo* w celu ostatecznego potwierdzenia braku ich właściwości mutagennych.

STRESZCZENIE

Analiza struktury chlorowodoru imidaprilu dowodzi, iż jest on reaktywny i nietrwały pod względem chemicznym. Dlatego w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono szczegółowe badania trwałości wymienionej substancji leczniczej w fazie stałej, uwzględniając ocenę wpływu temperatury oraz wilgotności względnej powietrza, jak również substancji pomocniczych, tworzywa opakowania bezpośredniego oraz procesu produkcyjnego na parametry kinetyczne oraz termodynamiczne reakcji jej degradacji. Co więcej, zidentyfikowano produkty rozkładu badanego związku a następnie poddano je analizie bezpieczeństwa onkologicznego za pomocą testu mutacji powrotnych *in vitro*.

Zaplanowane badania trwałości chlorowodoru imidaprilu przeprowadzono zgodnie z założeniami testu izotermicznego, przy użyciu opracowanej i zwalidowanej techniki RP-HPLC z detekcją UV jako metody analitycznej. Eksperymenty kinetyczne przeprowadzono dla chlorowodoru imidaprilu w postaci czystej substancji, chlorowodoru imidaprilu w mieszaninie modelowej ze stearynianem magnezu oraz chlorowodoru imidaprilu w formie tabletkowanej w różnych warunkach temperatury oraz wilgotności względnej powietrza. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono modele kinetyczne obserwowanych reakcji za pomocą kryteriów statystycznych a następnie obliczono parametry kinetyczne rozkładu, takie jak stała szybkości, czas połowicznego rozkładu oraz długość okresu indukcji dla reakcji autokatalitycznej. Ponadto, posługując się równaniem *Arrhenius'a* określono wartości energii aktywacji, entalpii aktywacji oraz entropii aktywacji badanych procesów. Dodatkowo, celem analizy wrażliwości chlorowodoru imidaprilu na zmiany wilgotności względnej powietrza wyznaczono zależność $\ln k = f(RH\%)$, której współczynnik kierunkowy jest liczbowym obrazem tej cechy.

W toku badań wykazano, iż chlorowodorek imidaprilu w substancji rozkłada się zgodnie modelem reakcji autokatalitycznej zarówno w $RH = 0.0\%$ jak i w $RH > 0.0\%$ a jego krzywa kinetyczna przyjmuje kształt sigmoidalny. Ponadto analiza wpływu wilgotności względnej powietrza oraz temperatury na postęp degradacji chlorowodoru imidaprilu wykazała, iż wzrost wartości obydwu tych parametrów przyspiesza ją w sposób porównywalny. Co więcej, obserwowane niższe wartości stałych szybkości rozkładu na poziomie $RH = 0.0\%$ wskazują, iż w tych warunkach badany związek jest bardziej trwały a wyższa wartość energii aktywacji sugeruje, że brak dostępu wilgoci zmniejsza jego wrażliwość na zmiany temperatury. W związku z powyższym chlorowodorek imidaprilu należy przechowywać w szczelnie zamkniętych pojemnikach, unikając wysokich temperatur.

Podjęto próbę skonstruowania modelu matematycznego, obrazującego zależność trwałości I-ACE w fazie stałej od ich budowy chemicznej za pomocą techniki QSPR. W grupie analogów chlorowodoru imidaprilu wykazano istnienie korelacji pomiędzy energią aktywacji reakcji rozkładu

a temperaturą topnienia a także pomiędzy stałą szybkości reakcji autokatalitycznej w fazie stałej w warunkach $T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$ a topologiczną polarną powierzchnią cząsteczki, powierzchnią cząsteczki dostępną dla rozpuszczalnika, momentem dipolowym oraz współczynnikiem podziału oktanol/woda. Co więcej, w grupie I-ACE pochodnych estrów stwierdzono zależność pomiędzy energią aktywacji reakcji rozkładu a punktem izoelektrycznym i momentem dipolowym.

Stearynian magnezu jako substancja poślizgowa wpływa na zmianę mechanizmu reakcji rozkładu chlorowodoru imidaprilu z autokatalitycznej na pierwszorzędową. Jest to zjawisko korzystne, które może wpływać na poprawę bezpieczeństwa badanej substancji aktywnej.

Eksperymenty z chlorowodorkiem imidaprilu w postaci farmaceutycznej przeprowadzono dla trzech różnych serii próbek, czyli: tabletek w opakowaniu typu blister, tabletek bez opakowania oraz tabletek przełamanych na połówki bez opakowania, w celu analizy wpływu sposobu przechowywania gotowego produktu leczniczego w domowych apteczkach na trwałość badanej substancji leczniczej. Wykazano, że we wszystkich trzech przypadkach imidapril rozkłada się zgodnie z modelem reakcji pierwszorzędowej, przy czym dla całych tabletek bez opakowania obserwowano reakcję odwracalną. Oceniono, że rozkład chlorowodoru imidaprilu w tabletkach zachodzi szybciej niż w czystej postaci. Ponadto stwierdzono, że najgorszym profilem stabilnościowym cechują się tabletki rozłamane na połówki a najlepszym tabletki w blistrze, co oznacza, że ten ostatni sposób przechowywania jest najbardziej optymalny z punktu widzenia trwałości.

Zidentyfikowanie produktów rozkładu chlorowodoru imidaprilu metodą HPLC-MS pozwoliło na ustalenie ścieżek jego degradacji na dwóch poziomach $RH\%$. Czysta substancja w obecności wilgoci rozkłada się drogą hydrolizy z utworzeniem imidaprilatu oraz drogą wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z utworzeniem pochodnej diketopiperazynowej. Natomiast w warunkach suchego powietrza rozkład chlorowodoru imidaprilu następuje wyłącznie drogą wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji a jego produktem jest pochodna diketopiperazynowa. Ponadto, w obecności stearynianu magnezu w warunkach dostępu wilgoci badana substancja lecznicza ulega tylko hydrolizie z utworzeniem imidaprilatu.

Z uwagi na brak danych odnośnie bezpieczeństwa związanego z długotrwałym narażeniem na produkty rozkładu chlorowodoru imidaprilu, w niniejszej pracy przeprowadzono ocenę mutagenności pochodnej diketopiperazynowej badanego I-ACE oraz jej produktu nitrozowania a także produktu nitrozowania chlorowodoru imidaprilu za pomocą testu *Ames'a* w systemie *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 w obecności oraz bez systemu aktywacji metabolicznej. Analiza uzyskanych wyników wykazała brak efektu cytotoksycznego oraz mutagennego we wszystkich wykonanych eksperymentach, a więc badane substancje nie były mutagenne w teście Ames MPF™ 98/100.

ABSTRACT

STABILITY OF IMIDAPRIL HYDROCHLORIDE IN SOLID STATE IN COMPARISON WITH OTHER ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS AND IMPACT OF ITS DEGRADATION ON NEOPLASTIC INITIATION

Structural analysis of imidapril hydrochloride indicates its chemical liability. For this reason within the scopes of the present dissertation the solid state stability of this drug was investigated with the inclusion of the detailed evaluation of temperature, relative air humidity, excipients, immediate packaging material and the manufacturing process impact on the kinetic and thermodynamic parameters of its decay. What is more, its degradation impurities were identified and further subjected to safety analysis aimed at the estimation of their oncogenic potential using the *in vitro* reverse mutation assay.

The adopted analytical plan was realized using validated RP-HPLC technique with the UV detection under the conditions of isothermal method by the accelerated stability assay procedure. The experiments were performed for pure imidapril hydrochloride, imidapril hydrochloride and magnesium stearate model mixture and imidapril hydrochloride tablets stored under variety of thermal and moisture conditions. The obtained results provided the basis for the estimation of reaction kinetic models by statistical criteria, which further enabled the calculation of the kinetic parameters of imidapril hydrochloride degradation, including degradation rate constant, half-life and the length of induction period (only for autocatalytic reaction). Additionally, by the use of *Arrhenius* equation the energy of activation, enthalpy of activation and entropy of activation were assessed. Finally, in order to determine the imidapril hydrochloride sensitivity to moisture changes, the $\ln k = f(RH\%)$ plots were constructed, the slope of which express the value of this feature.

The collected experimental data indicate that pure imidapril hydrochloride degrades according to autocatalytic reaction kinetics, irrespective of moisture conditions ($RH = 0.0\%$ and $RH > 0.0\%$) since its $c = f(t)$ plots adopt a sigmoid shape. What is more, it was observed that increase of both, temperature and relative air humidity accelerate the drug's degradation similarly. However, the lower degradation rate constants at the level $RH = 0.0\%$ evidence that the complete lack of water access stabilizes the investigated substance while the lower energy of activation under these conditions confirms its lower sensitivity to temperature changes. Summarizing, imidapril hydrochloride should be stored in tightly closed containers protected from moisture and high temperatures.

Furthermore the attempt to construct the mathematical model describing the relation between stability and structure of the ACE-I family was undertaken using QSPR technique. In fact, within the group of imidapril hydrochloride analogs, the degradation of which accords with autocatalytic model, the several relationships were found, including correlation between autocatalytic degradation rate

constant in solid state under the conditions $T = 363 \text{ K}$, $RH = 76.4\%$ and topological polar surface area, solvent accessible surface area, octanol/water partition coefficient and dipole moment, correlation between energy of activation and melting point. Furthermore the relationship between energy of activation and isoelectric point and dipole moment was established in the group of ACE-I ester derivatives.

Magnesium stearate as a lubricant causes the change in the kinetic mechanism of imidapril hydrochloride degradation from autocatalysis to first-order reaction since its appropriate kinetic curve is characterized by its exponential shape. This effect seems favorable for the safety's sake.

The experiments with imidapril hydrochloride tablets were performed for three tablet series: whole tablets in blister, whole unpacked tablets without blister and halved tablets without blister, which enabled the investigation of the in-home drug storage impact on its quality. In all cases drug decayed according to first order kinetics, and for whole unpacked tablets the reversible first-order reaction occurred. Moreover it was found that imidapril in the form of tablets is degraded more rapidly when compared to pure substance. As for storage habits, the halved tablets without blister exhibited the poorest stability profile as opposed to whole blistered tablets, evidencing that the latter one is the only proper mode of drug handling.

The identified imidapril hydrochloride degradation products by HPLC-MS method facilitated the determination of its decay pathways under various external conditions. In fact it was found that pure imidapril hydrochloride in the presence of moisture undergoes simultaneous hydrolysis with the formation of imidaprilat and intramolecular cyclization producing a diketopiperazine derivative. The lack of moisture access, in turn, causes the modification in imidapril degradation product yield since under these conditions only diketopiperazine derivative is formed. Contrary, in the presence of magnesium stearate under $RH = 76.4\%$ the only degradation product detected was imidaprilat.

Considering the deficiency of safety data regarding the long-term human exposure to diketopiperazine derivative present in imidapril hydrochloride pharmaceutical product, the appropriate mutagenicity assay was performed using Ames bacterial reverse mutation assay with *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 tester strains in the presence and absence of metabolic activation system. The subject of this analysis was diketopiperazine derivative and its product of nitrosation, as well as imidapril hydrochloride nitrosation mixture. The obtained results clearly demonstrate no cytotoxic or mutagenic effect of the above substances indicating that they are not mutagenic in Ames MPF™ 98/100 test.

PIŚMIENNICTWO

1. Z. Fijałek. Rola Narodowego Instytutu Leków w zapewnieniu jakości i bezpieczeństwa produktów leczniczych i wyrobów medycznych, *Prz. Med. Uniw. Rzesz. Inst. Leków*, 8: 259-270, 2010.
2. S. Bajaj i wsp. Stability Testing of Pharmaceutical Products, *JAPS*, 2: 129-138, 2012.
3. E. Pawełczyk i wsp. *Podstawy trwałości leków*. PZWL, Warszawa, 1982.
4. W. Seńczuk. *Toksykologia współczesna*, PZWL, 2012.
5. R. Kordek. *Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy*. Via Medica, Gdańsk, 2007.
6. D.M. Robinson i wsp. Imidapril: a review of its use in essential hypertension, Type 1 diabetic nephropathy and chronic heart failure. *Drugs*, 67: 1359-1378, 2007.
7. Y. Qiu i wsp. *Developing Solid oral dosage forms Pharmaceutical theory and practice*. Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2009.
8. E.I. Ager i wsp. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*, 29: 1675-84, 2008.
9. M. Zajac i wsp. *Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów*. Wydawnictwo Naukowe UM Poznań, Poznań 2006.
10. R.M. Carey i wsp. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 24: 261-71, 2003.
11. W.S. Ryu i wsp. Overview of the Renin-Angiotensin System. *Korean Circulation J*, 37 :91-96, 2007.
12. M.B. Vallotton. The renin-angiotensin system, *TIPS*, 8: 69 – 74, 1987.
13. M. Wojewódzka-Żeleznikowicz i wsp. Wpływ tkankowych i osoczowych inhibitorów konwertazy angiotensyny na hemostazę w świetle badań eksperymentalnych i klinicznych. *Kardiologia Pol*, 63 (Supl. 2): 420-427, 2005.
14. M. Azizi i wsp. Angiotensin I-converting enzyme and metabolism of the haematological peptide N-acetyl-serylaspartyl-lysyl-proline. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28: 1066-1069, 2001.
15. R.A. Skidgel i wsp. The broad substrate specificity of human angiotensin I converting enzyme. *Clin Exp Hypertens A*, 9: 243-59, 1987.
16. C. Berry i wsp. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281: H2337-23365, 2001.
17. W. Janiec i wsp. *Farmakodynamika. Podręcznik dla studentów farmacji*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa, 2005.
18. B.G. Zimmerman i wsp. Interaction Between Sympathetic and Renin-angiotensin System. *J Hypertens*, 2: 581-587, 1984.
19. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 745-59.

20. S. A. Al-Merani i wsp. The half-lives of angiotensin II, angiotensin II-amide, angiotensin III, Sar1-Ala8-angiotensin II and renin in the circulatory system of the rat. *J Physiol*, 278: 471–490, 1978.
21. D. Chansel i wsp. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol*, 275: F535-542, 1998.
22. C.M. Ferrario i wsp. Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci*, 61:2720-2727, 2004.
23. S Engel ii wsp. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*, 35: 1270-1277, 2000.
24. H. Kobori i wsp. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*, 59: 251-287, 2007.
25. N. Sakai i wsp. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J Hypertens*, 26: 780-790, 2008.
26. C.I. Johnston i wsp. Intrarenal renin-angiotensin system in renal physiology and pathophysiology. *N Kidney Int Suppl*, 42: S59-63, 1993.
27. R. Tabibiazar i wsp. Formulating clinical strategies for angiotensin antagonism: a review of preclinical and clinical studies. *Am J Med*, 110:471-480, 2001.
28. H.R. Corradi i wsp. 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*, 357:964-974, 2006.
29. B. Fabris i wsp. Inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) in plasma and tissue. *J Cardiovasc Pharmacol*, 15 (Suppl. 2): S6-S13, 1990.
30. G.A. Spyroulias i wsp. Structural features of angiotensin-I converting enzyme catalytic sites: conformational studies in solution, homology models and comparison with other zinc metallopeptidases. *Curr Top Med Chem*, 4:403-429, 2004.
31. (2014) Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 42, D191-D198, <http://www.uniprot.org/uniprot/P12821>.
32. R. Natesh i wsp. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 421:551-554, 2003.
33. C.S. Anthony i wsp. The N domain of human angiotensin-I-converting enzyme: the role of N-glycosylation and the crystal structure in complex with an N domain-specific phosphinic inhibitor, RXP407. *J Biol Chem*, 285: 35685-35693, 2010.
34. D. Georgiadis i wsp. Roles of the two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin: insights from selective inhibitors. *Circ Res*, 93: 148-154, 2003.
35. Georgiadis D i wsp. Roles of the two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin: insights from selective inhibitors. *Circ Res* 93: 148-154, 2003.
36. A. Patchett i wsp. Angiotensin converting enzyme inhibitors. *Adv Protein Chem*, 56: 13-75, 2001.

37. G.A. Spyroulias Comparison of the solution structures of angiotensin I & II. Implication for structure-function relationship. *Eur J Biochem.* 270: 2163-2173, 2003.
38. H. Lindberg i wsp. Angiotensin converting enzyme inhibitors for cancer treatment? *Acta Oncol*, 43: 142-52, 2004.
39. N. J. Brown i wsp. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation*, 97: 1411-1420, 1998.
40. P. Petkow-Dimitrow. Nowatorskie zastosowania inhibitorów konwertazy angiotensyny i antagonistów receptora angiotensyny II. *Pol Arch Med Wewn*, 117 (4) 2007.
41. M. Holecki i wsp. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors beyond lowering blood pressure – are they important for doctors? *Pharmacol Rep*, 63: 740–751, 2011.
42. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. *Eur Heart Journal*, 25: 1454-1470, 2004.
43. G.S. Thind. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors: Comparative structure, pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Cardiovasc Drug Ther*, 4: 199-206, 1990.
44. R. Tabibiazar. Formulating clinical strategies for angiotensin antagonism: a review of preclinical and clinical studies. *Am J Med*, 110: 471-480, 2001.
45. R. Donnelly. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes and heart failure. *J Cardiovascular Pharmacology*, 20 (Suppl II) S38-S44, 1992.
46. R. Chen i wsp. Important role of nitric oxide in the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor imidapril on vascular injury. *Hypertension*. 42: 542-547, 2003.
47. C. Tschöpe i wsp. Antihypertensive and cardioprotective effects after angiotensin-converting enzyme inhibition: role of kinins. *J Card Fail*, 3: 133-148, 1997.
48. D.W. Cushman i wsp. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature Medicine*, 5: 1110-1112, 1999.
49. D. Mayer i wsp. A unique geometry of the active site of angiotensin-converting enzyme consistent with structure-activity studies. *J Comput Aided Mol Des*, 1: 3-16, 1987.
50. D.J. Kuster i wsp. Validated ligand mapping of ACE active site. *J Comput Aided Mol Des*, 19:609-615, 2005.
51. D.A. Sica, The evolution of renin-angiotensin blockade: Angiotensin converting enzyme inhibitors as the starting point, *Curr Hypertens Rep*, 12: 67-73, 2010.
52. F. Thoulon i wsp. Long-term tolerance of imidapril in the cat. *J Vet Cardiol*, 5: 29-34, 2003.
53. P.J. Rudzki i wsp. An overview of chromatographic methods coupled with mass spectrometric detection for determination of angiotensin-converting enzyme inhibitors in biological material. *J Pharm Biomed Anal*, 44: 356-367, 2007.
54. R. Natesh i wsp. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry*. 43: 8718-8724, 2004.
55. V.J. Dzau i wsp. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther*, 16: 149-60, 2002.
56. J. L. Reid. From kinetics to dynamics: are there differences between ACE inhibitors? *Eur Heart J*, 18 (Suppl E): E14-E18, 1997.

57. M.A. Ondetti. Structural relationships of angiotensin converting-enzyme inhibitors to pharmacologic activity. *Circulation*, 77: 174-78, 1988.
58. Farmakopea Japońska, Edycja 16, 2011
<http://www.pmda.go.jp/english/pharmacopoeia/pdf/jpdata/JP16eng.pdf>
59. Tanatril, tabletki, Charakterystyka Produktu Leczniczego.
60. K. Hayashi i wsp. Studies on angiotensin converting enzyme inhibitors. 4. Synthesis and angiotensin converting enzyme inhibitory activities of 3-acyl-1-alkyl-2-oxoimidazolidine-4-carboxylic acid derivatives. *J Med Chem*, 32: 289-297, 1989.
61. J.K. Podlewski i wsp. *Leki współczesnej terapii, wydanie specjalne*. Medical Tribune Polska, Warszawa, 2009.
62. Y Hirata i wsp. Nitric oxide release from kidneys of hypertensive rats treated with imidapril. *Hypertension*, 27: 672-678, 1996.
63. N.K. Sabharwal i wsp. Effect of imidapril and nifedipine on left ventricular hypertrophy in untreated hypertension. *Clin Drug Investig*, 25: 367-375, 2005.
64. H. Soejima i wsp. Effects of imidapril therapy on endogenous fibrinolysis in patients with recent myocardial infarction. *Clin Cardiol*, 20: 441-445, 1997.
65. S. Katayama i wsp. Effect of captopril or imidapril on the progression of diabetic nephropathy in Japanese with type 1 diabetes mellitus: a randomized controlled study (JAPAN-IDDM). *Diabetes Res Clin Pract*, 55: 113-121, 2002.
66. H. Satonaka i wsp. Long-term effect of imidapril hydrochloride compared with dilazep hydrochloride administration on blood pressure and renal function in patients with chronic glomerulonephritis. *Int Heart J*, 46: 701-710, 2005.
67. S. Takahashi i wsp. Different inhibitory effects in rat and human carboxylesterases. *Drug Metab Dispos*, 37: 956-961, 2009.
68. H. Nishi i wsp. Optical resolution of imidapril hydrochloride by high-performance liquid chromatography and application to the optical purity testing of drugs. *J Chromatogr A*, 672: 125-133, 1994.
69. S. Hardes i wsp. Single dose and steady state pharmacokinetics and pharmacodynamics of the ACE-inhibitor imidapril in hypertensive patients. *Br J Clin Pharmacol*, 45: 377-380, 1998.
70. M. Matsuoka i wsp. Determination of three metabolites of a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, imidapril, in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry using multiple ion detection. *J Chromatogr*, 581: 65-73, 1992.
71. S. R. Byrn i wsp. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. *Adv Drug Deliver Rev* 48: 115-136, 2001.
72. B. Stanisławski, Liquid chromatographic studies of the stability of benazepril in pure form and in tablets. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 27: 3103-3119, 2004.
73. S. K. Paszun i wsp. Cilazapril decomposition kinetics and mechanism in the solid state versus stability of the other ester pro-drug angiotensin converting enzyme inhibitors. *Reac Kinet Mech Catal*, 109: 285-300, 2013.
74. B. Stanisławski. Evaluation of stability of enalapril maleate in solid phase. *J Pharm Biomed Anal*, 31: 375-380, 2003.

75. B. Stanisz. The influence of relative humidity and temperature on stability of moexipril hydrochloride in solid phase. *Acta Pol Pharm* 61: 91-97, 2004.
76. S. Yoshioka i wsp. *Stability of drugs and dosage forms*. Kulwer Academic Publishers, 2002.78.
77. L. Gu i wsp. Preformulation stability studies of the new dipeptide angiotensin-converting enzyme inhibitor RS-10029. *Pharm Res*, 5: 765-771, 1988.
- 78.M. Magureanu i wsp. The mechanism of plasma destruction of enalapril and related metabolites in water. *Plasma Process Polym*, 10: 459-468, 2013.
79. S.P. Bhardwaj i wsp. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. *J Pharm Biomed Anal*, 46: 113-120, 2008.
80. M. Matsuoka. Determination of three metabolites of a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, imidapril, in plasma and urine by gas chromatography—mass spectrometry using multiple ion detection. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 581: 65–73, 1992.
81. B. N. Roy i wsp. Stabilization of quinapril by incorporating hydrogen bonding interactions. *Indian J Pharm Sci*, 71: 395–405, 2009.
82. J. Li i wsp. Effects of a citrate buffer system on the solid-state chemical stability of lyophilized quinapril preparations. *Pharm Res*, 19: 20-26, 2002.
83. F. Nishath i wsp. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. *JAPS*, 01: 66-71, 2011.
84. IPEC. The IPEC excipient composition guide, 2009.
85. S. Janicki i wsp. *Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
86. A. Katdare i wsp. *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery systems*, CRC Press, Informa healthcare, Nowy Jork, 2006.
87. K. C. Waterman i wsp. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 293: 101-125, 2005.
88. R.C. Rowe i wsp. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Sixth edition Pharmaceutical Press, 2009.
89. S. K. Niazi. *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations, Vol. 1: Compressed Solid Products*, Informa Healthcare USA, Inc, 2009.
90. K. Huynh-Ba. *Handbook of stability testing in pharmaceutical development, regulations, methodologies, and best practices*, Springer, 2009.
91. R. Pilchik. Pharmaceutical blister packaging. *Pharm Technol*, 24: 68–78, 2000.
92. K. C. Waterman i wsp. Package selection for moisture protection for solid, oral drug products. *J Pharm Sci*, 99: 4437–4451, 2010.
93. K. Paisley. PVDC-new development New opportunities, develop solid dosage forms. *PLACE Conference*, St Louis MO, September 16-20, 2007.
94. L. Muhlfeld i wsp. Influences of heat lacquer thickness on the quality of blister packages. *Eur J Pharm Sci*, 45:150–157, 2012.

95. T.E. Rolando. Flexible Packaging - Adhesives, Coatings and Processes. Rapra Technology Ltd, Vol 11, Report 122, 2000.
96. J. Dereń i wsp. *Chemia ciała stałego*. PWN, Warszawa 1975.
97. A. Khawam i wsp. Solid-state kinetic models: basics and mathematical fundamentals. *J Phys Chem B*, 110: 17315–17328, 2006.
98. M. Zajac i wsp. *Ocena jakości substancji leczniczych i preparatów farmaceutycznych według wymagań farmakopealnych i ICH*. Wydawnictwo Kontekst, Poznan, 2000.
99. G. Scrivens. Mean kinetic relative humidity: a new concept for assessing the impact of variable relative humidity on pharmaceuticals. *Pharm techn*, 36: 52-57, 2012.
100. M. Bakshi i wsp. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *J Pharm Biomed Anal*, 28: 1011–1040, 2002.
101. FDA, Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics. Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1987.
102. FDA, Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products (Draft guidance), Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1998.
103. ICH Expert Working Group. Validation of analytical procedures: text and methodology. *ICH*, 2005.
104. W. Szczepaniak. *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2011.
105. J. Pawlaczyk i wsp. *Walidacja metod analizy chemicznej*. Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznan, 2005.
106. A. Fawzy i wsp. Kinetic spectrophotometric determination of betaxolol, clopidogrel and imidapril in pharmaceutical preparations. *Curr Anal Chem*, 6: 228-236, 2010.
107. A. Fawzy i wsp. Sensitive spectrophotometric methods for estimation of betaxolol and imidapril hydrochloride in bulk powder and in their single dosage forms. *IJAC*, 4: 119-141, 2008. <http://www.ripublication.com/Volume/ijacv4n2.htm>
108. W. Abu Dayyih i wsp. Development and validation of a reverse phase HPLC method for simultaneous estimation of some prills in drug forms. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5:203, 2013.
109. E. Wyszomirska i wsp. Identification and determination of antihypertensives from the group of angiotensin-convertase inhibitors by densitometric method in comparison with HPLC method. *Acta Pol Pharm*, 6:137-43, 2010.
110. M.S. Tahir. RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of imidapril HCl and amlodipine besylate in bulk and tablet. *J Chem Soc Pak*, 35: 49-51, 2013.
111. K. Tagawa i wsp. Highly sensitive determination of imidapril, a new angiotensin I-converting enzyme inhibitor, and its active metabolite in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography with fluorescent labelling reagent. *J Chromatogr*, 617:95-103, 1993.
112. M. Mabuchi i wsp. Determination of imidapril and imidaprilat in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 734: 145-153, 1999.
113. S. Harder i wsp. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction trial after repeated oral doses of imidapril and digoxin in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 43: 475-480, 1997.

114. J.F. Hoogkamer i wsp. Pharmacokinetics of imidapril and its active metabolite imidaprilat following single dose and during steady state in patients with impaired liver function. *Eur J Clin Pharmacol*, 51: 489-491, 1997.
115. S. Harder i wsp. Single dose and steady state pharmacokinetics and pharmacodynamics of the ACE-inhibitor imidapril in hypertensive patients. *Br J Clin Pharmacol*, 45: 377-380, 1998.
116. K. Yamanaka i wsp. Radioimmunoassay for imidapril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, and imidaprilat, its active metabolite, in human plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal*, 14: 281-287, 1996.
117. S. Horimoto i wsp. Rapid determination of a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, imidapril, and its active metabolite in human plasma by negative-ion desorption chemical ionization-tandem mass spectrometry (MS/MS). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 41: 699-702, 1993.
118. J.H. Yun i wsp. LC-MS determination and bioavailability study of imidapril hydrochloride after the oral administration of imidapril tablets in human volunteers. *Arch Pharm Res*, 28: 463-468, 2005.
119. M. Grover i wsp. Quantitative structure-property relationships in pharmaceutical research - Part 1. *Pharm Sci Technolo Today*, 3: 28-35, 2000.
120. M. Grover i wsp. Quantitative structure-property relationships in pharmaceutical research - Part 2. *Pharm Sci Technolo Today*, 3: 50-57, 2000.
121. B. Stanis. The stability of quinapril hydrochloride - a mixture of amorphous and crystalline forms (QHC-AC) - in solid phase. *Acta Pol Pharm*, 60: 443-450, 2003.
122. B. Stanis. Kinetics of lisinopril degradation in solid phase. *React Kinet Catal Lett*, 85: 145-152, 2005.
123. A-M. Jassim. In-home Drug Storage and Self-medication with Antimicrobial Drugs in Basrah, Iraq. *Oman Med J*. 25: 79-87.2010.
124. D.T. Witiak i wsp. Study of trans-cyclopropylbis (diketopiperazine) and chelating agents related to ICRF 159. Cytotoxicity, mutagenicity, and effects on scheduled and unscheduled DNA synthesis. *J Med Chem*, 20: 630-635, 2004.
125. S.E. Shephard i wsp. Mutagenic activity of peptides and the artificial sweetener aspartame after nitrosation. *Food Chem Toxicol*, 31: 323-329, 1993.
126. J. Limon i wsp. *Choroby nowotworowe. Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. red. Jerzy Bal. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013.
127. L. Hunyady i wsp. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*, 20: 953-70, 2006.
128. C.M. Vine. Phospholipase C. *Adv Exp Med Biol*, 740: 235-54, 2012.
129. M. Szumiło i wsp. Fosfolipaza D w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna. *Postepy Hig Med Dosw*, 60: 421-430, 2006.
130. P. Rocic i wsp. A role for PYK2 in regulation of ERK1/2 MAP kinases and PI 3-kinase by ANG II in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C90-99, 2001.
131. B. Markman i wsp. PI3K pathway inhibitors: better not left alone. *Curr Pharm Des*, 19: 895-906, 2013.

132. H. Ohtsu i wsp. Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 48: 534-40, 2006.
133. R.M. Touyz i wsp. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*, 35: 1001-1015, 2002.
134. J. M. Nowak i wsp. Rodzina białek Rho i ich rola w cytoszkielecie komórki. *Postepy Hig Med Dosw*, 62: 110-117, 2008.
135. A. Klimaszewska i wsp. Białka Rho – kluczowe regulatory cytoszkieletu w przebiegu mitozy i cytokinezy. *Postepy Hig Med Dosw*, 65: 704-713, 2011.
136. M. Parri i wsp. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal*, 8: 23-36, 2010.
137. E. Totoń i wsp. Charakterystyka białka FAK i jego rola w procesie nowotworzeni. *Postepy Hig Med Dosw*, 61: 303-309, 2007.
138. P. Rocic i wsp. A role for PYK2 in regulation of ERK1/2 MAP kinases and PI 3-kinase by ANG II in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C90-99, 2001.
139. K. Ino i wsp. Manipulating the angiotensin system - new approaches to the treatment of solid tumours. *Expert Opin Biol Ther*, 6: 243-55, 2006.
140. F. Deshayes i wsp. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab*, 16: 293-299, 2005.
141. K. Dominska i wsp. Zaangażowanie układu renina-angiotensyna (RAS) w proces kancerogenezy. *Postępy Biochemii* 54: 3, 2008.
142. E. Sierra Díaz i wsp. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion and angiotensin type 1 receptor A1166C polymorphisms as genetic risk factors in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *JRAAS*, 10: 241-246, 2009.
143. J.K. Loh. Gene polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system and breast carcinogenesis: is there a connection? *TSMJ*, 9: 48-51, 2008.
144. J.H. Neo i wsp. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer*, 10: 134-144, 2010.
145. C. Röcken i wsp. The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/ deletion polymorphism. *Clin Cancer Res*, 11: 2526-2530, 2005.
146. M. Freitas-Silva i wsp. Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endometrial human cancer in normotensive and hypertensive women. *Cancer Genet Cytogenet* 155: 42-46, 2004.
147. A. Varona A i wsp. Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma. *Am J Physiol-Renal Physiol*, 292: 780-788, 2007.
148. I. Pérez I i wsp. Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 31: 1335-1340, 2009.
149. H. Murakami i wsp. Circulating aminopeptidase N/CD13 is an independent prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 8674-8679, 2003.

150. E.I. Ager i wsp. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*, 29: 1675-84, 2008.
151. G. Wolf G i wsp. Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension* 43: 693-698, 2004.
152. S. Ishimatsu i wsp. Angiotensin II augmented migration and invasion of choriocarcinoma cells involves PI3K activation through the AT1 receptor. *Placenta*, 27: 587-91, 2006.
153. J. Folkman. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med*, 82: 96-100, 1975.
154. T. Suganuma i wsp. Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clin Cancer Res*, 11: 2686-2694, 2005.
155. Y. Watanabe i wsp. Adipocyte-derived leucine aminopeptidase suppresses angiogenesis in human endometrial carcinoma via renin-angiotensin system. *Clin Cancer Res*, 9: 6497-6503, 2003.
156. S. Sukhanov i wsp. Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting. *Am J Med Sci*, 342: 143-147, 2011.
157. W.F. Ward i wsp. The effect of captopril on benign and malignant reactions in irradiated rat skin. *Br J Radiol*, 63: 349-54, 1990.
158. O.V. Volpert i wsp. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J Clin Invest*, 98: 671-679, 1996.
159. S. Carl-McGrath i wsp. Expression of the local angiotensin II system in gastric cancer may facilitate lymphatic invasion and nodal spread. *Cancer Biol Ther*, 6: 1218-1226, 2007.
160. R. Yasumatsu i wsp. Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130: 567-573, 2004.
161. J.H. Neo i wsp. Effect of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in a mouse model of colorectal cancer liver metastases. *J Gastroenterol Hepatol*, 22: 577-584, 2007.
162. R.R. de Groot-Besseling i wsp. Anti-tumor activity of a combination of plasminogen activator and captopril in a human melanoma xenograft model. *Int J Cancer*, 112: 329-34, 2004.
163. S.T. Russell i wsp. Angiotensin II directly inhibits protein synthesis in murine myotubes. *Cancer Lett*, 231: 290-294, 2006.
164. K.T. Murphy i wsp. Inhibition of the renin-angiotensin system improves physiological outcomes in mice with mild or severe cancer cachexia. *Int J Cancer*, 113: 1234-1246, 2013.
165. N. Schanze i wsp. Evidence for an effect of ACE inhibitors on cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 3: 139, 2012.
166. V. Cortez-Retamozo i wsp. Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity*, 38: 296-308, 2013.
167. V. Cortez-Retamozo i wsp. Remote control of macrophage production by cancer. *Oncoimmunology* 2: e24183, 2013.
168. 77. M.R. Goldstein. Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo: a potential downside. *Circulation*, 102: E39, 2000.

169. M. Schachter. ACE inhibitors, angiotensin receptor antagonists and bradykinin. *JRAAS*, 1: 27-29, 2000.
170. J.S. Silvestre i wsp. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res*, 89: 678-683, 2001.
171. P.J. Wysocki i wsp. Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes growth of immunogenic tumors in mice. *Clin Cancer Res*, 12: 4095-4102, 2006.
172. P.A. Escobar i wsp. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. *Mutat Res*, 752: 99-118, 2013.
173. OECD Guideline For Testing Of Chemicals, Bacterial Reverse Mutation Test, 471, 1997.
174. K. Mortelmans i wsp. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, 455: 29-60, 2000.
175. G. de Aragao Umbuzeiro i wsp. Comparison of the salmonella/microsome microsuspension assay with the new microplate fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples. *Environ Mol Mutagen*, 51: 31-38, 2010.
176. S. Flückiger-Isler i wsp. Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames pre-incubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds. *Mutat Res*, 747: 36-45, 2012.
177. S.D. Gangolli i wsp. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur. J. Pharmacol*, 292: 1-38, 1994.
178. G. Brambilla i wsp. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. *Mutat Res*, 635: 17-52, 2007.
179. H. Bartsch i wsp. Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis* 5: 1381-1393, 1984.
180. C.A.M. Krul i wsp. Intra-gastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic in vitro gastrointestinal model under human physiological conditions. *Food Chem Toxicol*, 42: 51-63, 2004.
181. W. Lijinsky W. N-nitroso compounds in the diet. *Mutat Res*, 443: 129-138, 1999.
182. R. Preussmann. Dose-response studies and 'no-effect-levels' of N-nitroso compounds: some general aspects. *Oncology*, 37: 243-250, 1980.
183. S.S. Mirvish. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol*, 31: 325-351, 1975.
184. P. A. S. Smith i wsp. Nitrosative cleavage of tertiary amines. *J Am Chem Soc*, 89: 1147-1157, 1967.
185. W. Lijinsky i wsp. Nitration of tertiary amines and some biological implications. *J Natl Cancer Inst*, 49: 1239-1249, 1972.
186. J.W. Olney i wsp. Increasing brain tumor rates: Is there a link to aspartame? *J Neuropathol Exp Neurol*, 55: 1115-1123, 1996.
187. K. R. Tandel. Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *J Pharmacol Pharmacother*, 2: 236-243, 2011.

188. P.N. Gillatt i wsp. Susceptibilities of drugs to nitrosation under standardized chemical conditions *Food Chem Toxicol*, 22: 269-274, 1984.
189. S.S. Mirvish i wsp. Nitrate and nitrite concentrations in human saliva for men and women at different ages and times of the day and their consistency over time. *Eur J Cancer Prev*, 9: 335-342, 2000.
190. S.A. Leach i wsp. Bacterially catalysed N-nitrosation reactions and their relative importance in the human stomach. *Carcinogenesis*, 8: 1907-1912, 1987.
191. R. Hughes i wsp. Metabolic activities of the gut microflora in relation to cancer. *Microb Ecol Health Dis*, 12: 179-185, 2000.
192. S. Calmels i wsp. Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *J Gen Microbiol*, 134: 221-226, 1988.
193. D. Ziebarth i wsp. N-nitrosation of medicinal drugs catalysed by bacteria from human saliva and gastro-intestinal tract, including *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis*, 18: 383-389, 1997.
194. International Agency for Research on Cancer (IARC), Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals on Humans vol. 24, Some Pharmaceutical Drugs, General Considerations on N-nitrosable Drugs, IARC, Lyon, Francja: 297-314, 1980.
195. WHO, Informal consultation on the potential carcinogenicity of nitrosable drugs, in: Proceedings of the Report of a WHO Meeting, Geneva, Czerwiec 12-16, 1978.
196. P.I. Reed i wsp. Gastric juice N-nitrosamines in health and gastroduodenal disease. *Lancet*, 2: 550-552, 1981.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy.....**doktorskiej**..... p.t.:

„TRWAŁOŚĆ CHLOROWODORKU IMIDAPRILU W FAZIE STAŁEJ NA TLE INNYCH INHIBITORÓW
KONWERTAZY ANGIOTENSYNY ORAZ OCENA WPLYWU PROCESU JEGO DEGRADACJI NA INICJACJĘ
NOWOTWOROWĄ”.

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia ...**naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**..., a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

17.03.2014, Katarzyna Regulska

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

17.03.2014, Katarzyna Regulska