

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



Robert Roškar

VAJE IZ STABILNOSTI ZDRAVIL

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ime in priimek: _____

Termin vaj: _____

Ljubljana, 2013

VSEBINA

1. ANALIZA FARMACEVTSKE OVOJNINE

- 1.1. Preiskovanje kvalitete stekla
- 1.2. Preiskovanje kvalitete plastike in gume

2. KEMIJSKA STABILNOST UČINKOVIN

- 2.1. Stabilnost učinkovin pri sobni temperaturi
- 2.2. Vpliv temperature na hitrost kemijske razgradnje
- 2.3. Vpliv pH na hitrost kemijske razgradnje
- 2.4. Adsorpcija vlage na pomožno snov

3. MEHANIZEM RAZPADA UČINKOVIN

Spremljanje razpada benzodiazepinov s HPLC metodo

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

615.014.4(075.8)(076.5)(0.034.2)

ROŠKAR, Robert,

Vaje iz stabilnosti zdravil [Elektronski vir] : enoviti magistrski študij farmacije / Robert Roškar. - El. knjiga. - Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2013

Način dostopa (URL): <http://www.ffa.uni-lj.si/si/o-fakulteti/katedre/katedra-za-biofarmacijo-in-farmakokinetiko/pedagoska-dejavnost/stabilnost-zdravil.html> .

ISBN 978-961-6378-55-0 (pdf)
270051328

1. ANALIZA FARMACEVTSKE OVOJNINE

Uporabnost zdravil je mnogokrat odvisna od primerne ovojnine, zaradi česar se njenemu proučevanju posveča vedno večja pozornost. Industrijski način proizvodnje pomeni v splošnem podaljšan čas kontakta zdravila z ovojnino, mednarodno trženje pa z izpostavljanjem zdravila različnim vplivom okolja še dodatno vpliva na zdravilo kot celoto. Spremembe temperature, vlažnosti in drugi stresni vplivi tako ob transportiranju ali shranjevanju povzročajo različne spremembe, ki lahko vodijo do neuporabnosti zdravila.

Zdravila ne moremo distribuirati, niti ne more imeti ustreznega roka uporabnosti, če ni oblikovano v ustrezni ovojnini, kar pa lahko dosežemo le s kakovostno povezavo obeh komponent: ovojnine in zdravila.

Naloge ovojnine:

1. omogoča zaščito pred kemičnimi in fizikalnimi agensi ter mikrobiološkim okuženjem;
2. omogoča priročnost (lažja aplikacija) in vsebnost zdravila (zagotovljena količina učinkovine v zdravilu);
3. posreduje identifikacijo in informacijo o zdravilu (ime proizvajalca; učinkovine, ki so vsebovane v zdravilu; količine sestavin; oblika zdravila; način aplikacije; datum izteka roka uporabnosti; serijska številka...);
4. daje izgled zdravilu (omogoča zaupanje pacienta) in omogoča enostavnost rokovanja;

Z **ekološkega vidika** je tudi pomembno, koliko energije se pri proizvodnji ovojnine porabi in predvsem, ali je ovojnina uničljiva oz. sposobna recikliranja.

Glede na **zahteve kvalitete** ločimo 3 tipe ovojnine:

1. *primarna ovojnina*
je v neposrednem stiku z zdravilom. Zanj so zahteve glede kakovosti najstrožje. Njena naloga je predvsem zaščita zdravila pred kvarnimi vplivi iz okolja.
2. *sekundarna ovojnina*
Zdravilo z njo ni v neposrednem stiku, zato zahteve zanj niso tako stroge. Njena naloga je zaščita med transportom in shranjevanjem ter posredovanje identifikacije in informacije o zdravilu.
3. *terciarna ovojnina*
Uporabimo jo za izdelavo pomagala pri aplikaciji zdravila (žličke, dozirne brizge). Njihova kvaliteta mora ustrezati aplikaciji.

Embalažna materiala, ki ju v farmaciji najpogosteje uporabljamo, sta steklo in plastika. S ciljem zagotavljanja integralne kakovosti zdravila je zato potrebno preverjati tudi kakovost teh dveh materialov, pri čemer so kriteriji kakovosti odvisni od namena uporabe.

1.1. Preiskovanje kvalitete stekla

1. Uvod

Steklo v širšem pomenu besede imenujemo vsako amorfno podhlajeno talino. Takšne taline nastanejo zlasti iz zmesi t.i. "steklotvornih oksidov": SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , P_4O_{10} in alkalijskih ali zemljoalkalijskih oksidov. Splošna kemična formula navadnega stekla je: $6\text{SiO}_2 \cdot \text{Me}_2\text{O} \cdot \text{CaO}$, kjer sta Me: Na in K po enakih delih. Ker je navadno steklo kemično, mehansko in temperaturno manj odporno, mu dodajajo zemljoalkalijske (MgO , CaO , BaO) ali amfoterne okside (B_2O_3 , Al_2O_3).

Alkalijski kationi so v steklu dobro gibljivi in zato pri ohlajanju stekla difundirajo na površino stekla in v raztopino, ki postane alkalna. Sprememba pH raztopine ima lahko za posledico med drugim tudi zmanjšano topnost ali zmanjšano obstojnost prisotnih učinkovin. Oddajanje alkalijskih kationov se po daljši uporabi stekla zmanjša, ker sloj stekla, ki je relativno bogatejši s SiO_2 in CaO ščiti steklo pred nadaljnjim raztapljanjem. Raztapljanje stekla poteka hitreje pri povišani temperaturi in ob dodatku baz.

Pozitivne lastnosti stekla, zaradi katerih se steklo pogosto uporablja v farmaciji so:

- trdnost, prozornost, temperaturna obstojnost, lahko čiščenje, večkratna uporabnost ter nepropustnost za tekočine, pline in mikroorganizme.

Negativne lastnosti stekla, zaradi česar je potrebna pozornost ali zamenjava z drugim embalažnim materialom pa so:

- slaba mehanska odpornost, voluminoznost, velika specifična gostota ter kemična neindiferentnost.

Najstrožje zahteve veljajo za steklene vsebnike, v katere polnimo parenteralne raztopine. Takšno steklo ne sme sproščati alkalij, ne sme reagirati z učinkovino, biti mora temperaturno in mehansko odporno pri pogojih sterilizacije in ne sme vsebovati As in Pb.

Kemična stabilnost steklenih vsebnikov za farmacevtsko uporabo je izražena s *hidrolitično odpornostjo*, to je z odpornostjo proti odpuščanju topnih mineralnih snovi v vodo pod predpisanimi pogoji kontakta med steklom in vodo. Hidrolitična odpornost je ovrednotena s titriranjem sproščenih alkalij.

Z ozirom na hidrolitično odpornost steklenih vsebnikov, ločimo v skladu s Ph Eur 8th tri skupine steklenih vsebnikov:

1. skupina:

vsebniki iz nevtralnega stekla, visoke hidrolitične odpornosti zaradi same kemične sestave stekla. Ti so primerni za shranjevanje vseh pripravkov, ne glede na to ali so namenjeni za parenteralno uporabo ali ne, ter za človeško kri in krvne derivate.

2. skupina:

vsebniki iz natrijevega silikatnega stekla, visoke hidrolitične odpornosti, ki je rezultat primerne obdelave površine. Ti so v splošnem namenjeni za shranjevanje kislih ali nevtralnih vodnih pripravkov za parenteralno uporabo ter za vse pripravke, ki so primerni za shranjevanje v vsebnikih 3 skupine.

3. skupina:

vsebniki iz natrijevega silikatnega stekla z zmerno hidrolitično odpornostjo. Ti so primerni za shranjevanje nevodnih pripravkov za parenteralno uporabo, za praške za parenteralno uporabo in pripravke, ki niso namenjeni parenteralni uporabi.

Vsebniki iz natrijevega silikatnega stekla z nizko hidrolitično odpornostjo niso primerni za farmacevtsko uporabo.

Z namenom, da bi definirali kvaliteto steklenih vsebnikov glede na njihovo uporabo, je potrebno izvajati enega ali več testov. V Ph Eur 8th so navedeni trije testi, s katerimi lahko opredelimo *hidrolitično odpornost*:

1. test hidrolitične odpornosti notranje površine vsebnika,
2. test hidrolitične odpornosti uprašenega stekla,
3. test hidrolitične odpornosti jedkane površine vsebnika.

2. Namen dela

3. Metode

TEST A. HYDROLYTIC RESISTANCE OF THE INNER SURFACES OF GLASS CONTAINERS (SURFACE TEST)

The determination is carried out on unused containers. The volumes of the test liquid necessary for the final determination are indicated in Table 3.2.1-2.

Table 3.2.1-2. – Volume of test liquid and number of titrations

Filling volume (ml)	Volume of test liquid for one titration (ml)	Number of titrations
Up to 3	25.0	1
Above 3 and up to 30	50.0	2
Above 30 and up to 100	100.0	2
Above 100	100.0	3

Cleaning. Remove any debris or dust. Shortly before the test, rinse each container carefully at least twice with *water R* and allow to stand. Immediately before testing empty the containers, rinse once with *water R* then with *water R1* and allow to drain. Complete the cleaning procedure from the first rinsing in not less than 20 min and not more than 25 min.

Heat closed ampoules on a water-bath or in an air-oven at about 50 °C for approximately 2 min before opening; do not rinse before testing.

Filling and heating. The containers are filled with *water R1* up to the filling volume. Containers in the form of cartridges or prefilled syringes are closed in a suitable manner with material that does not interfere with the test. Each container including ampoules shall be loosely capped with an inert material such as a dish of neutral glass or aluminium foil previously rinsed with *water R*. Place the containers on the tray of the autoclave. Place the tray in the autoclave containing a quantity of *water R* such that the tray remains clear of the water. Close the autoclave and carry out the following operations:

- heat the autoclave to 100 °C and allow the steam to issue from the vent cock for 10 min;
- close the ventcock and raise the temperature from 100 °C to 121 °C at a rate of 1 °C per min;
- maintain the temperature at 121 ± 1 °C for 60 ± 1 min;

R...substancia ali raztopina, definirana pod "Reagenti"

Water R = destilirana voda.

- lower the temperature from 121 °C to 100 °C at a rate of 0.5 °C per min, venting to prevent vacuum;
- do not open the autoclave before it has cooled down to 95 °C;
- remove the containers from the autoclave using normal precautions, place them in a water-bath at 80 °C, and run cold tap water, taking care that the water does not contact the loose foil caps to avoid contamination of the extraction solution;
- cooling time does not exceed 30 min.

The extraction solutions are analysed by titration according to the method described below.

Method. Carry out the titration within 1 h of removal of the containers from the autoclave. Combine the liquids obtained from the containers and mix. Introduce the prescribed volume (Table 3.2.1-2) into a conical flask. Place the same volume of *water R1* into a second similar flask as a blank. Add to each flask 0.05 ml of *methyl red solution R* for each 25 ml of liquid. Titrate the blank with 0.01 M *hydrochloric acid*. Titrate the test liquid with the same acid until the colour of the resulting solution is the same as that obtained for the blank. Subtract the value titration for the blank titration from that found for the test liquid and express the results in millilitres of 0.01 M *hydrochloric acid* per 100 ml. Express titration values of less than 1.0 ml to 2 decimal places and titration values of more than or equal to 1.0 ml to 1 decimal place.

Limits. The results, or the average of the results if more than one titration is performed, is not greater than the values stated in Table 3.2.1-3.

Table 3.2.1-3. – Limit values in the test for surface hydrolytic resistance

Filling volume (ml)	Maximum volume of 0.01 M HCl per 100 ml of test liquid (ml)	
	Glass containers	
	Types I and II	Type III
Up to 1	2.0	20.0
Above 1 and up to 2	1.8	17.6
Above 2 and up to 5	1.3	13.2
Above 5 and up to 10	1.0	10.2
Above 10 and up to 20	0.80	8.1
Above 20 and up to 50	0.60	6.1
Above 50 and up to 100	0.50	4.8
Above 100 and up to 200	0.40	3.8
Above 200 and up to 500	0.30	2.9
Above 500	0.20	2.2

4. Rezultati

Volumen preiskovanega vsebnika = _____

Poraba 0,01 M HCl pri slepem poskusu: _____

Poraba 0,01 M HCl pri avtoklavatu: 1. _____ 2. _____ Povprečje: _____

Rezultat: _____ ml 0,01 M HCl na 100 ml preiskovane raztopine.

Glede na hidrolitično odpornost notranje površine spada preiskovan vsebnik v _____ skupino odpornosti.

V tabeli prikažite rezultate preiskovanja hidrolitične odpornosti steklenih vsebnikov znotraj turnusa.

	Opis vsebnika	V vsebnika [mL]	V porabe HCl [mL]	Skupina hidrolitične odpornosti
1. skupina				
2. skupina				
3. skupina				
4. skupina				

5. Razprava in zaključki

1.2. Preiskovanje kvalitete plastike in gume

1. Uvod

Definicija: Plastične mase (umetne mase) so makromolekularne snovi, ki jih pridobivajo bodisi povsem sintetično bodisi s predelavo naravnih visokomolekularnih spojin. Med plastične mase v ožjem smislu ne štejemo elastomerov in umetnih vlaken, vendar pa med letimi in plastičnimi masami ni ostre meje. Mnoga kemijska vlakna so iz istega materiala kot plastične mase, zaradi izrazite urejenosti molekul pa imajo posebne fizikalne lastnosti.

Ime:

Oznaka plastična masa pomeni, da je snov pri oblikovanju polizdelka ali končnega izdelka imela take lastnosti, da jo je bilo moč plastično oblikovati.

Razdelitev:

Glede na obnašanje pri segrevanju delimo plastične mase v **termoplaste** in **duroplaste**.

Pridobivanje povsem umetnih plastičnih mas:

Pridobivanje poteka s postopki polimerizacije, polikondenzacije in poliadicije nizkomolekularnih izhodnih snovi, ki jih pridobivajo iz premoga, nafte ali zemeljskega plina.

Lastnosti:

- majhna gostota,
- zelo nizka električna prevodnost in nizka toplotna prevodnost,
- zmerna mehanska trdnost,
- ob močnejšem segrevanju se razgradijo (deloma se predhodno zmeščajo),
- precej neobčutljive za vlago,
- na splošno odporne proti bazam in kislinam,
- zelo različno odporne proti organskim topilom,
- na splošno fiziološko neaktivne,
- lahko oblikovanje in cenenost.

Lastnosti plastičnih mas se lahko na različne načine spreminjajo glede na namembnost ("plastične mase po meri"). Pri tem uporabljajo različne načine: mešano polimerizacijo, stereospecifično polimerizacijo, kombinacijo plastičnih mas ali kombinacijo s "klasičnimi surovinami" (steklena vlakna, tkanine itd.), dodajanje polnil ali barvil, mehčalcev, različnih stabilizatorjev (proti vplivu toplote, svetlobe ali drugih sevanj), lahko pa tudi zamenjajo nekatere surovine (pri pripravi poliuretanov uporabijo npr. različne polirole ali različne diizocianate).

TERMOPLASTI

Lastnosti:

Termoplasti se pri segrevanju zmeščajo, v toplem stanju jih lahko oblikujemo, pri ohlajanju pa postanejo trdi in ohranijo obliko; postopek lahko ponovimo, kolikorkrat hočemo. V nekaterih topilih termoplasti nabrekajo, nekatera jih topijo.

Zgradba molekul:

Linearne, redko rahlo razvejane makromolekule, ki prostorsko niso povezane z močnimi kemijskimi vezmi.

Mehčala:

Če termoplastom primešajo mehčala, postanejo mehkejši in bolj upogljivi, kar je posebno primerno za folije. Čeprav v manjši meri te snovi vendarle topijo polimer, jih dodajajo le v taki količini, da se vrinejo med molekule plastične mase, pri čemer jih deloma ali povsem obdajo. Tako zmanjšajo trdoto in krhkost polimera.

Pomembni termoplasti:

- polietilen, polivinil klorid, poliamidi, polistiren, polimetil metakrilat, polivinil acetat, celuloid, linearni poliestri, linearni poliuretani, linearni poliamidi.

DUROPLASTI

Lastnosti:

Duroplasti pri segrevanju razpadejo, ne da bi se prej znehčali; so netopni.

Zgradba molekul:

Prostorsko močno zamrežene molekule.

Tehnično oblikovanje vročih duroplastov:

Pri polikondenzaciji nastopi termoplastično stanje, ko so produkti še topni in jih lahko raztalimo. V tem stanju jih vlivamo in (po morebitnem dodajanju polnil in barvil) vroče stiskamo. Po takem oblikovanju poteče prostorsko zamreženje do konca in masa se strdi v duroplast.

Pomembni duroplasti:

- fenoplasti, aminoplasti, zamrežene epoksidne smole, zamreženi poliuretani, zamrežene silikonske smole, zamreženi poliestri.

ELASTOMERI

To so polimerne snovi, v katerih so polimerne molekule močno fleksibilne in neurejene, kar ima za posledico elastične lastnosti materiala. Te snovi so osnova vsem gumijastim izdelkom tako naravnim kot sintetskim ter mnogim adhezivom.

Naravni kavčuk tvorijo polimerne verige cis-izoprena. Surovi gumi izboljšajo lastnosti z različnimi dodatki. Največkrat jo uporabljamo za zamaške in tesnila.

Umetni kavčuki (butilni, nitrilni, kloroprenski) so odpornejši proti visokim temperaturam in manj odporni proti nizkim. Pod vplivom svetlobe in oksidantov se ne spreminjajo.

Silikonske gume pridobivajo s polimerizacijo metil-silikonskih olj. Njihove najpomembnejše lastnosti so: izjemna termična odpornost (do 250 °C), neprepustnost za vodo, velika stabilnost in mehanska odpornost. So pa sorazmerno drage.

Preden elastomerni materiali lahko postanejo uporabni gumijasti izdelki, morajo biti podvrženi različnim modifikacijam, od vgradnje različnih dodatkov do tvorbe kopolimerov in premreženja s plastičnimi masami.

Dodatki, onečiščenja z izhodnimi substancami in adsorptivne sposobnosti plastičnih materialov in gum pa povzročajo, da so ti materiali kemično reaktivni in lahko odpuščajo aditive. Ker lahko hkrati prepuščajo tudi tekočine, pline in mikroorganizme, je potrebna kontrola njihove kakovosti za uporabo v farmacevtske namene.

2. Namen dela

3. Metode

PREDPIS ZA KONTROLO FARMACEVTSKE PLASTIKE IN GUME

Vzorci plastike in gume kuhamo 5 minut v prečiščeni vodi, nato vodo odlijemo, vzorce speremo s prečiščeno vodo in razrežemo na koščke. 10 g tega materiala prelijemo z 200 ml prečiščene vode v 300 ml erlenmajerici, ki jo prekrijemo z aluminijevo folijo in avtoklaviramo 15 minut pri 105°C. Vzoredno avtoklaviramo prečiščeno vodo brez vzorcev plastike (slepi vzorec). Ohlajeni avtoklavat, ki ga odlijemo, mora ustrezati naslednjim zahtevam:

1. Organoleptične lastnosti

Avtoklavat mora biti bister, brezbarven, dopustna je le rahla opalescenca, ki ne sme preiti v kosmiče ali oborino. Avtoklavat mora biti brez vonja, pri gumi je dovoljen rahel vonj po žveplu.

2. Sprememba pH

V primerjavi s slepim vzorcem se sme pH avtoklavata spremeniti največ za 1 enoto.

3. Reducenti

20 ml avtoklavata dodamo 20 ml 0,002 M raztopine KMnO_4 in pustimo stati 15 minut pri sobni temperaturi. Dodamo 0,1 g KJ in 2 ml 1 M HCl in retitriramo z 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ob škrobovici kot indikatorju. Delamo 2 paralelki. Od količine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, ki smo ga porabili za titracijo avtoklavata odštejemo količino, ki jo je porabil slepi vzorec. Razlika sme biti največ 1,5 ml.

4. Težke kovine

3 ml avtoklavata dodamo nekaj kapljic ditizonovega reagenta. Avtoklavat se ne sme obarvati v 10 minutah.

5. Kloridi

Kloride določamo z limitnim testom po Ph Eur 8th (2.4.4).

To 15 mL of the prescribed solution add 1 mL of *dilute nitric acid R* and pour the mixture as a single addition into a test-tube containing 1 mL of *silver nitrate solution R2*. Prepare a standard in the same manner using 10 mL of *chloride standard solution (5 ppm Cl)R* and 5 mL of *water R*. Examine the tubes laterally against a black background.

After standing for 5 min protected from light, any opalescence in the test solution is not more intense than that in the standard.

6. Amoniak

10 ml avtoklavata dodamo 3 kaplje Nesslerjevega reagenta. Po 5 minutah se avtoklavat ne sme obarvati v primerjavi s slepim vzorcem.

4. Rezultati

V tabeli prikažite rezultate analize vzorca plastike oz. gume.

Test	Rezultat	Ustreznost
Organoleptične lastnosti		
Sprememba pH		
Reducenti		
Težke kovine		
Kloridi		
Amoniak		

V tabeli prikažite ustreznost analiziranega vzorca plastike (P) oz. gume (G) znotraj turnusa.

Skupina Test	1. P – G	2. P – G	3. P – G	4. P – G
Org. lastnosti				
pH				
Reducenti				
Težke kovine				
Kloridi				
Amoniak				

5. Razprava in zaključki

6. Odgovori na vprašanja

2. KEMIJSKA STABILNOST UČINKOVIN

Stabilnost je sposobnost farmacevtskega izdelka, da skozi čas v razumno predvidljivih pogojih shranjevanja, ohranja svoje lastnosti znotraj predpisanih mej. Pri tem se obravnavajo kemični, fizikalni, mikrobiološki in biofarmacevtski vidiki. To časovno obdobje je definiramo kot rok uporabnosti, rok uporabnosti med uporabo ali kot rok do ponovnega preskušanja.

Zdravilni pripravek je uporaben toliko časa, dokler odgovarja predpisanim specifikacijam. Za pripravke, ki niso zajeti v farmakopeji velja, da so uporabni glede na vsebnost učinkovine, dokler vsebujejo najmanj 90% učinkovin in da pri razgradnji ne nastajajo za organizem škodljive snovi. Industrijsko izdelana zdravila morajo biti uporabna 3-5 let, magistralna 4-6 tednov, ex tempore izdelani pripravki za oralno uporabo 7-14 dni in za parenteralno uporabo 24 ur.

Ločimo nekaj tipov nestabilnosti, ki povzročijo zavrnitev zdravilnega pripravka:

- zmanjšanje koncentracije učinkovine v pripravku, ki je posledica kemijske ali fizikalne nestabilnosti;
- nastanek toksičnih razpadnih produktov;
- zmanjšanje biološke uporabnosti pripravka in s tem manjša terapevtska učinkovitost;
- spremenjene organoleptične lastnosti, fizikalne lastnosti in funkcionalni testi.

Od proizvodnje, transporta pa vse do shranjevanja in uporabe se lahko spreminjajo različne značilnosti farmacevtskega izdelka, ki jih glede na naravo sprememb razvrstimo:

- Kemične; vsaka aktivna sestavina ohranja svojo kemijsko istovetnost in jakost znotraj določenih mej. Posledice kemične nestabilnosti lahko vplivajo tudi na fizikalno in mikrobiološko stabilnost. Primeri nestabilnosti so upad koncentracije učinkovin in ostalih aktivnih spojin (npr. konzervansov).
- Fizikalne; ohranjajo se prvotne fizikalne lastnosti, vključno z izgledom. Nekatere možne posledice nestabilnosti: ločevanje faz, agregacija, sedimentacija, neenakomernost vsebine.
- Mikrobiološke; ohranja se odpornost proti rasti mikroorganizmov v okviru določenih zahtev. Posledice porasta števila mikroorganizmov se izraža zlasti v organoleptičnih spremembah: barva, vonj, motnost, ločitev faz.

Razgradne poti učinkovin delimo na kemijske, kjer nastajajo nove spojine in fizikalne, kjer se spreminjajo samo fizikalne lastnosti zdravila.

Najpomembnejši kemijski reakciji pri spremljanju stabilnosti zdravil sta solvoliza in oksidacija, potekajo pa lahko tudi fotolize, dehidracije, racemizacije, konjugacije in druge reakcije.

Pri solvolizah gre za razgradnjo učinkovine v prisotnosti topila, ki je v večini primerov voda (hidroliza). Najpogosteje potekajo pri karboksilnih derivatih učinkovin (estri, laktani, laktami).

Oksidacije potekajo največkrat pod vplivom atmosferskega kisika. Produkti oksidacije so običajno obarvani, lahko so tudi toksični.

Med fizikalnimi spremembami največkrat srečamo polimorfizem, izparevanje učinkovine, adsorpcijo na površino ovojnine, vezavo ali izhlapevanje vode in sedimentacijo.

Na obstojnost farmacevtskega izdelka lahko kvarno vplivajo nekateri dejavniki. Pomembni so zlasti dejavniki okolja: temperatura, svetloba, relativna vlažnost, kisik in mikroorganizmi. Na kakovost izdelka pa vplivajo tudi notranji dejavniki: narava medija (npr. pH), pomožne snovi in ovojnina. V prvi vrsti ustreza ovojnina, ki primarno varuje izdelek pred zunanjimi vplivi.

2.1. Stabilnost učinkovine pri sobni temperaturi

1. Uvod

Shranjevanje pri sobni temperaturi je osnova t.i. dolgoročnega testiranja stabilnosti učinkovin in zdravilnih pripravkov. Ti rezultati predstavljajo glavni del registracijske dokumentacije, ki se nanaša na stabilnost ter predstavljajo hkrati informacije, na katerih sloni določitev in potrjevanje rokov uporabnosti.

2. Namen dela

3. Metode

Postopek:

1. Natančno natehtamo približno 100 mg ASA v 100 ml bučko. Raztopimo v 2 ml koncentriranega etanola in ko se ASA raztopi, dodamo pufer pH = 7 do oznake.
2. Vsebnost ASA v vzorcih določamo spektrofotometrično (pri 294 nm, referenca je prečiščena voda) ob časih 0, 7 in 14 dni. Pred vsako meritvijo prenesemo 1 ml raztopine ASA v 50 ml bučko in dopolnimo do oznake s prečiščeno vodo.
3. Osnovno raztopino shranjujemo v označeni bučki na sobni temperaturi 14 dni.
4. Na enak način kot raztopino ASA pripravimo tudi ekvimolarno raztopino salicilne kisline. Pri tem upoštevamo dejansko natehto ASA za ustrezen preračun natehte salicilne kisline. Absorbance ekvimolarne količine salicilne kisline določamo spektrofotometrično samo enkrat!
5. Koncentracije ASA v vzorcih in vrednosti konstant reakcijske hitrosti prvega reda za hidrolizo ASA izračunamo po enačbah na osnovi dobljenih absorbanc.

Koncentracija ASA v vzorcih:

$$c_{SAv} = c_{SA} \frac{A_{SAv}}{A_{SA}}$$

$$c_{ASA} = c_{SA} - c_{SAv}$$

c_{ASA} ... koncentracija ASA v času t

c_{SA} ... koncentracija ekvimolarne raztopine SA

c_{SAv} ... koncentracija SA v času t

Konstanta reakcijske hitrosti prvega reda:

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln\left(\frac{C_0}{C}\right)$$

k_1 konstanta reakcijske hitrosti prvega reda (min^{-1})

t čas

C_0 začetna koncentracija učinkovine (mmol/l)

C koncentracija učinkovine (mmol/l) v času t

Konstanto reakcijske hitrosti hidrolize ASA lahko izračunamo tudi direktno iz izmerjenih absorbanč po naslednji enačbi:

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln\left(\frac{A_{SA} - A_{SAv}^0}{A_{SA} - A_{SAv}^t}\right)$$

A_{SA} ... absorbanca ekvimolarne raztopine SA

A_{SAv} ... absorbanca SA v raztopini ASA ob času 0 (A_{SAv}^0) in času t (A_{SAv}^t)

4. Rezultati

Natehta ASA:

Natehta ekvimolarne SA:

Absorbanca ekvimolarne raztopine SA:

Koncentracija ekvimolarne raztopine SA (c_{SA}):

Absorbance SA v preiskovanih vzorcih (A_{SAv}) ter izračunane koncentracije SA (c_{SAv}) in ASA (c_{ASA}) v teh vzorcih.

čas (d)	A_{SAv}	c_{SAv} (mmol/l)	c_{ASA} (mmol/l)
0			
7			
14			

Konstanta reakcijske hitrosti za ASA.

čas (d)	k_1 (d ⁻¹)
7	
14	

Povprečna konstanta reakcijske hitrosti prvega reda je _____ d⁻¹ = _____ min⁻¹.

5. Razprava in zaključki

2.2. Vpliv temperature na hitrost kemijske razgradnje

1. Uvod

Temperatura ima bistven vpliv na hitrost procesov. Višja temperatura v splošnem pospeši reakcije kar se izraža tudi v hitrejšem dosegu in večjem obsegu kemičnih in fizikalnih sprememb in posledično vodi v manjšo obstojnost. Razlogi za proučevanje vpliva temperature so različni. Vključuje tako formalne teste stabilnosti končnega izdelka v skladu s predpisi ali priporočili smernic kakor tudi pospešene in stresne teste stabilnosti. V času razvoja pripravka pa tudi proučevanje vpliva sprememb temperature na stabilnost pri izbranih pogojih, npr. ciklizacija temperature, zamrzovanje, zelo visoke temperature.

Pri proučevanju stabilnosti ločimo tri tipe testov:

- dolgoročna testiranja;
- pospešeni test stabilnosti;
- stresni testi stabilnosti.

a) Pri *dolgoročnem testiranju* gre za dolgoročna testiranja stabilnosti skozi daljša časovna obdobja pri normalnih pogojih shranjevanja. Uporabljajo se eksperimentalni pogoji, kot jih srečujemo pri shranjevanju izdelkov. Vzorčimo v daljših časovnih intervalih. Čas testiranja traja do predvidenega roka uporabnosti (v letih). So zelo zahtevni, tako časovno kot tudi finančno.

b) Pri *pospešenih testih* je potrebno v kratkem času napovedati obstojnost izdelka. Osnovani so na pospešitvi razpadnega procesa in na ekstrapolaciji rezultatov na normalne pogoje shranjevanja. Pospešeni testi lahko bistveno zmanjšajo obseg in ceno dolgoročnega testiranja.

c) *Stresni testi* se izvajajo pri ostrejših pogojih kot pospešeni testi. Poleg povišane temperature se preverja tudi vpliv drugih dejavnikov (npr. svetloba). Ciklizacija temperature, kjer je pripravek ciklično izpostavljen nizki in visoki temperaturi je dober pokazatelj fizikalne stabilnosti grobo disperznih sistemov (npr. emulzij).

Uporabnost pospešenih testov

Ti testi so uporabni za termično pogojene reakcije, pri katerih je energija aktivacije (E_a) med 40 in 150 kJ/mol. Tak tip reakcij so solvolize.

Neuporabnost pospešenih testov

Termično pospešeni test ne bo dal ustreznih rezultatov, če je razpad posledica:

- spremembe agregatnih stanj,
- kontaminacije z mikroorganizmi,
- pretiranega stresanja med transportiranjem,
- prisotnosti katalizatorjev,
- kadar prihaja v sistemu do spremembe fizikalnega stanja pripravka (npr. mazila in svečke se pri visokih temperaturah talijo, kar pomeni, da procesi potekajo drugače kot pri normalnih pripravkih),
- kadar se pripravki pri visokih temperaturah denaturirajo,
- kadar so učinkovine občutljive na svetlobo (fotokemične reakcije) in
- kadar prihaja do spremembe mehanizma reakcije.

ARRHENIUSOVA enačba podaja odnos med temperaturo in hitrostjo kemične reakcije:

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

- Ea aktivacijska energija (J/mol)
 k konstanta reakcijske hitrosti (h⁻¹) pri izbrani temperaturi
 R splošna plinska konstanta (8,314 J/molK)
 T absolutna temperatura (K)
 A frekvenčni faktor (h⁻¹)

S pomočjo ekstrapolacije Arrheniusove premice lahko kinetične eksperimente pri povišani temperaturi prenesemo na nižje temperature, kar uporabljamo pri metodi umetnega staranja oziroma pospešenega testa stabilnosti. Ta metoda se veliko uporablja, saj skrajša čas ugotavljanja stabilnosti pripravka.

Konstanto reakcijske hitrosti pri nižji temperaturi lahko določimo:

- Po Arrheniusovi metodi grafično z nanašanjem $\ln k$ v odvisnosti od $1/T$. Naklon dobljene premice je enak vrednosti $-Ea/R$, odsek na ordinati pa $\ln A$. Premico ekstrapoliramo do želene temperature in določimo $\ln k$ oz k .
- Po Arrheniusovi metodi računsko s pomočjo enačb:

$$Ea = \ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right)\left(\frac{RT_2T_1}{T_2 - T_1}\right) \quad k = Ae^{\frac{-Ea}{RT}}$$

- Po van't Hoffovi metodi s pomočjo temperaturnega koeficienta Q .

To je razmerje med konstanto reakcijske hitrosti pri $T + 10^\circ\text{C}$ in pri T .

- Temperaturni koeficient lahko določimo grafično, tako da nanašamo vsebnost učinkovine v odvisnosti od časa za obe temperaturi, pri določenem procentu učinkovine odčitamo čas razpada in iz enačbe izračunamo temperaturni koeficient:

$$Q = \frac{t_T}{t_{T+10}}$$

- Na računski način tako, da določimo konstanti reakcijske hitrosti pri dveh za 10°C različnih temperaturah in izračunamo van't Hoffov koeficient iz razmerja konstant:

$$Q = \frac{k_{T+10}}{k_T}$$

Če je razlika temperatur večja kot 10°C pa ga izračunamo po enačbi:

$$Q_{\frac{T_2-T_1}{10}} = \frac{k_{T_2}}{k_{T_1}}$$

2. Namen dela

3. Metode

Postopek:

1. Natančno natehtamo približno 100 mg ASA v 100 ml bučko. Raztopimo v 2 ml koncentriranega etanola in ko se ASA raztopi, dodamo pufer pH = 7 do oznake (ista raztopina ASA kot pri vaji 2.1.).
2. Odpipetiramo šestkrat po 10 ml raztopine ASA v označene epruvete (z zamaški), od katerih tri postavimo v termostat pri 40 °C in tri v termostat pri 80 °C.
3. Vsebnost ASA v vzorcih določamo spektrofotometrično (pri 294 nm, referenca je prečiščena voda) ob časih 0, 20, 40 in 60 minut. Pred vsako meritvijo vzorce najprej ohladimo na sobno temperaturo in nato 50-krat redčimo s prečiščeno vodo.
4. Na enak način kot raztopino ASA pripravimo tudi ekvimolarno raztopino salicilne kisline. Pri tem upoštevamo dejansko natehto ASA za ustrezen preračun natehte salicilne kisline. Absorbanco ekvimolarne količine salicilne kisline določamo spektrofotometrično samo enkrat!
5. Koncentracije ASA v vzorcih in vrednosti konstant reakcijske hitrosti prvega reda za hidrolizo ASA izračunamo po enačbah na osnovi dobljenih absorbanc.

4. Rezultati

Natehta ASA:

Natehta ekvimolarne SA:

Absorbanca ekvimolarne raztopine SA:

Koncentracija ekvimolarne raztopine SA (c_{SA}):

1. Izračunajte konstanti reakcijske hitrosti prvega reda za obe temperaturi po enačbi:

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln\left(\frac{C_0}{C}\right)$$

T = 40 °C

Rezultati meritev absorbanc SA v preiskovanih vzorcih ob določenih časih (A_{SAV}), izračunane vsebnosti SA (c_{SAV}) in ASA (c_{ASA}) ter konstante reakcijske hitrosti (k_1).

čas (min)	A_{SAV}	c_{SAV} (mmol/l)	c_{ASA} (mmol/l)	k_1 (min ⁻¹)
0				/
20				
40				
60				

T = 80 °C

Rezultati meritev absorbanc SA v preiskovanih vzorcih ob določenih časih (A_{SAV}), izračunane vsebnosti SA (c_{SAV}) in ASA (c_{ASA}) ter konstante reakcijske hitrosti (k_1).

čas (min)	A_{SAV}	c_{SAV} (mmol/l)	c_{ASA} (mmol/l)	k_1 (min ⁻¹)
0				/
20				
40				
60				

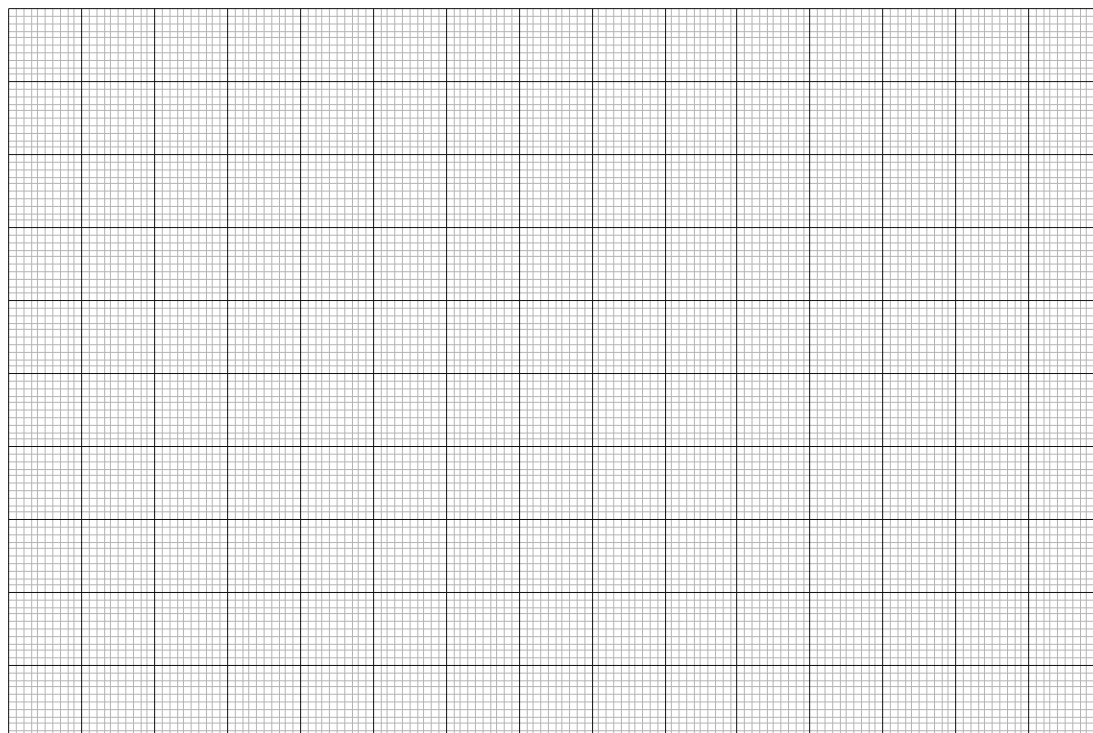
Povprečna konstanta reakcijske hitrosti:

- pri 40°C: $k_1 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ min}^{-1}$
- pri 80°C: $k_2 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ min}^{-1}$

2. Narišite Arrheniusovo premico $\ln k$ v odvisnosti od $1/T$.

T(°C)	1/T (1/K)	k (min ⁻¹)	ln k
80			
40			
20*			

* iz podatkov pri sobni temperaturi



Enačba premica: _____ R²: _____

$\ln k$: _____ k: _____ min⁻¹

3. S pomočjo Arrheniusove enačbe izračunajte aktivacijsko energijo E_a , frekvenčni faktor A in konstanto reakcijske hitrosti pri 20°C.

$$E_a = \ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) \left(\frac{RT_2 T_1}{T_2 - T_1}\right)$$

$$A = k e^{\frac{E_a}{RT}}$$

$$k_{20^\circ C} = A e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

4. Določite van't Hoffov temperaturni koeficient Q in konstanto reakcijske hitrosti pri 20°C:

$$Q = \left(\frac{k^{80^\circ C}}{k^{40^\circ C}} \right)^{1/4}$$

$$k^{20^\circ C} = \frac{k^{40^\circ C}}{Q^2}$$

5. Izračunajte uporabnost učinkovine pri 20°C po Arrheniusovi in van't Hoffovi metodi:

a) Arrheniusova metoda (grafično): $t_{9/10}^{20^\circ C} = \frac{0,105}{k^{20^\circ C}}$

b) Arrheniusova metoda (računsko): $t_{9/10}^{20^\circ C} = \frac{0,105}{k^{20^\circ C}}$

c) van't Hoffova metoda: $t_{9/10}^{20^\circ C} = \frac{0,105}{k^{20^\circ C}}$

d) Dolgoročno testiranje pri 20°C: $t_{9/10}^{20^\circ C} = \frac{0,105}{k^{20^\circ C}}$

6. Rezultati - uporabnost ASA ($t_{9/10}$) pri 20°C:

- a) po Arrheniusovi metodi (grafično):
- b) po Arrheniusovi metodi (računsko):
- c) po van't Hoffovi metodi:
- d) iz dolgoročnega testiranja (vaja 2.1.):

5. Razprava in zaključki

6. Odgovori na vprašanja

2.3. Vpliv pH na hitrost kemijske razgradnje

1. Uvod

Kadar zdravila oblikujemo v raztopini, je nujno, da sestavimo *diagram hitrosti reakcije v odvisnosti od pH* in ugotovimo optimalni pH za stabilnost preparata. Pri izbiri končne pH vrednosti raztopine pa je ob stabilnosti pripravka potrebno upoštevati še topnost in fiziološko kompatibilnost.

Diagrame pH profila razložimo, če proučujemo reakcijo vsake molekularne oblike z H^+ , H_2O in OH^- kot funkcijo pH. Pri tem moramo ločiti dva primera: spojine, ki ne ionizirajo in spojine, ki ionizirajo.

1. Kadar učinkovina *ne ionizira*, lahko v vodi hidrolizira pod vplivom specifične kislinske katalize, solvolize in specifične bazne katalize. Opazovana hitrostna konstanta (kop) je sestavljena:

$$kop = k_1 [H^+] + k_2 + k_3 [OH^-]$$

Diagram odvisnosti hitrosti reakcije od pH narišemo s predpostavko, da eden od kinetičnih izrazov prevladuje:

- $k_1 [H^+] \gg k_2 + k_3 [OH^-]$
 $kop = k_1 [H^+]$
 $\log kop = \log k_1 - pH$
- $k_2 \gg k_1 [H^+] + k_3 [OH^-]$
 $kop = k_2$
 $\log kop = \log k_2$
- $k_3 [OH^-] \gg k_2 + k_1 [H^+]$
 $kop = k_3 [OH^-]$
 $\log kop = \log k_3 + pH - 14$

2. Kadar učinkovina *ionizira*, je enačba podobna, le da upoštevamo ionizirano in neionizirano obliko učinkovine:

$$kop = k_1 [H^+] f_{HA} + k_2 f_{HA} + k_3 [OH^-] f_{HA} + k_4 [H^+] f_A + k_5 f_A + k_6 [OH^-] f_A$$

$$f_{HA} = \frac{H^+}{H^+ + Ka}$$

$$f_A = \frac{Ka}{Ka + H^+}$$

f_{HA} frakcija protonirane oblike

f_A frakcija neprotonirane oblike

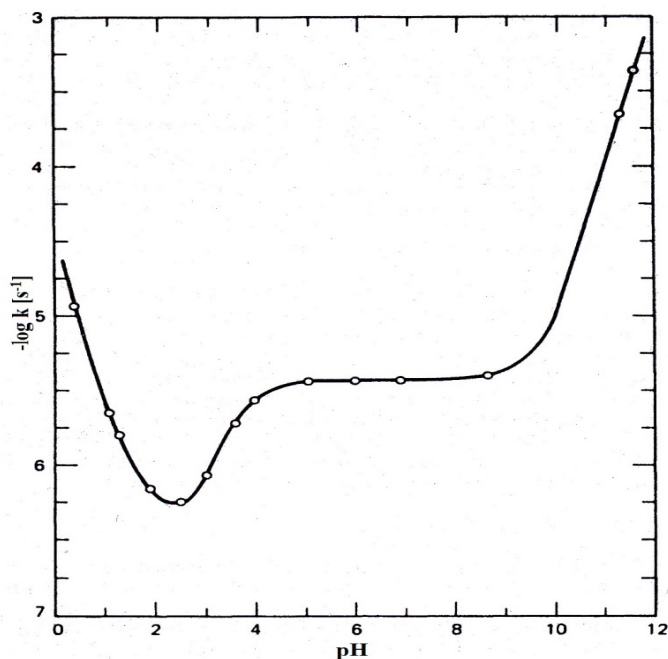
H^+ koncentracija vodikovih ionov

Ka konstanta ionizacije učinkovine

Ker sta 2. in 4. ter 3. in 5. izraz kinetično ekvivalentna in ju ne moremo razlikovati, se enačba zmanjša na maksimalno štiri člene. Za ASA prikažemo konstanto reakcijske hitrosti na naslednji način:

$$k_{\text{op}} = k_1 [\text{H}^+] f_{\text{HA}} + k_4 [\text{H}^+] f_{\text{A}} + k_5 f_{\text{A}} + k_6 [\text{OH}^-] f_{\text{A}}$$

Literaturni pH-profil za ASA:



2. Namen dela

3. Metode

Postopek:

1. Natančno natehtamo približno 50 mg ASA v 50 ml bučko. Raztopimo v 1 ml koncentriranega etanola in ko se ASA raztopi, dodamo prečiščeno vodo do oznake.
2. V dve 50 ml bučki odpipetiramo po 10 ml vodne raztopine ASA in razredčimo do oznake z dvema pufroma (pH 1, 3, 5, 8, 10 ali 12).
3. Vsako pufrno raztopino ASA odpipetiramo trikrat po 10 ml v označene epruvete (z zamaški) in jih postavimo v termostat pri 40 °C.
4. Vsebnost ASA v vzorcih določamo spektrofotometrično (pri 294 nm, referenca je prečiščena voda) ob časih 0, 25, 50 in 75 minut. Pred vsako meritvijo vzorce najprej ohladimo na sobno temperaturo in nato 10-krat redčimo s prečiščeno vodo.
5. Na enak način kot raztopino ASA pripravimo tudi ekvimolarno raztopino salicilne kisline. Pri tem upoštevamo dejansko natehto ASA za ustrezen preračun natehte salicilne kisline. Absorbanco ekvimolarne količine salicilne kisline določamo spektrofotometrično samo enkrat!
6. Koncentracije ASA v vzorcih in vrednosti konstant reakcijske hitrosti prvega reda za hidrolizo ASA izračunamo po enačbah na osnovi dobljenih absorbanc.

4. Rezultati

Natehta ASA:

Natehta ekvimolarne SA:

Absorbanca ekvimolarne raztopine SA:

Koncentracija ekvimolarne raztopine SA (c_{SA}):

1. Izračunajte konstante reakcijske hitrosti prvega reda pri izbranih pH vrednostih raztopin.

Rezultati meritev absorbanc salicilne kisline v preiskovanih vzorcih ob določenih časih (A_{SAV}), izračunane vsebnosti ASA (c_{ASA}) in konstante reakcijskih hitrosti (k).

čas (min)	pH =			pH =		
	A_{SAV}	c_{ASA} (mmol/l)	k (min ⁻¹)	A_{SAV}	c_{ASA} (mmol/l)	k (min ⁻¹)
0			/			/
25						
50						
75						

Povprečna konstanta reakcijske hitrosti:

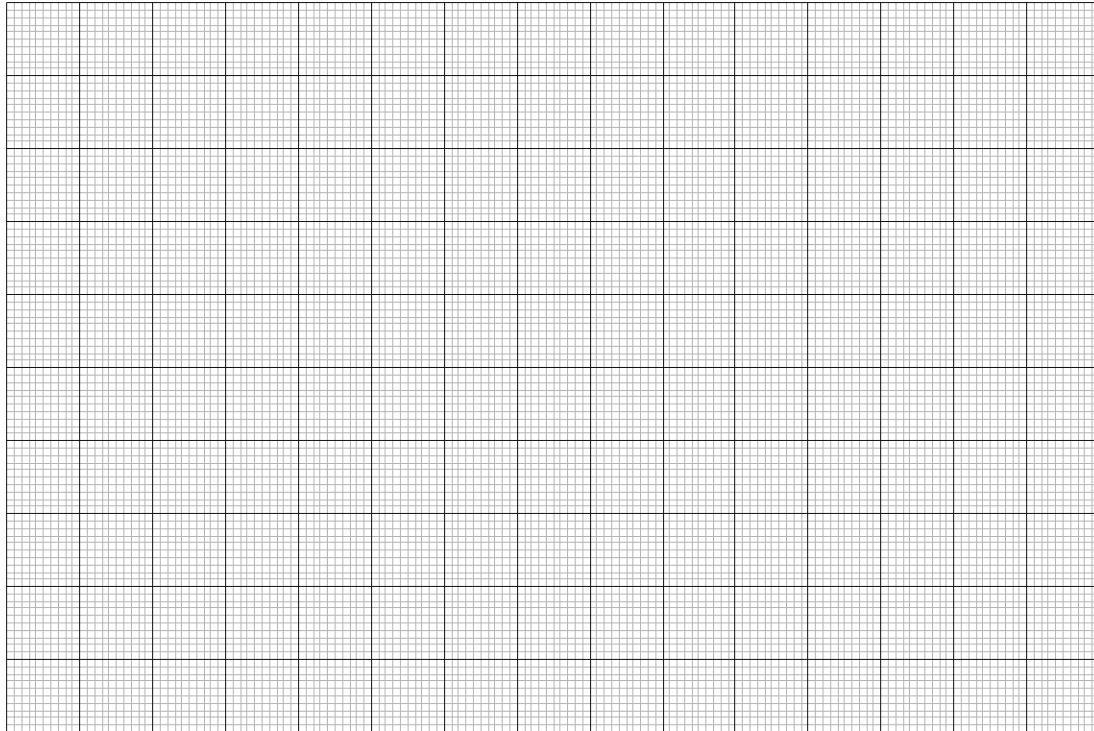
- pri pH = ____ : $k =$ _____ min⁻¹
- pri pH = ____ : $k =$ _____ min⁻¹

Povprečne konstante reakcijskih hitrosti pri različnih pH znotraj turnusa.

pH	1	3	5	8	10	12
k (min ⁻¹)						
povp. k						

2. Narišite diagram $\log k$ v odvisnosti od pH.

pH	1	3	5	8	10	12
k						
$\log k$						



3. Izračunajte frakcije ionizirane in neionizirane oblike učinkovine pri obravnavanih pH.
 pK_a (ASA) = 3,60

4. Izračunajte katalizni konstanti k_1 in k_4 upoštevajoč celokupni konstanti za pH 1 in 3 ter katalizni konstanti k_5 in k_6 upoštevajoč celokupni konstanti za pH 10 in 12.

5. Razprava in zaključki

2.4. Adsorpcija vlage na pomožno snov

1 Uvod

Vlaga je zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na stabilnost zdravilnih učinkovin oziroma pripravkov. Povzroča fizikalne in kemijske spremembe. Med fizikalne spremembe uvrščamo spremembo barve, kristalne strukture, agregatnega stanja, stopnje hidratacije, reoloških lastnosti, topnosti in razpadnosti, kar povzroča spremembo videza in terapevtskega delovanja zdravila. Vlaga omogoči tudi vrsto kemijskih reakcij, kot so kemijske ali encimske hidrolize, oksidacije, racemizacije optično aktivnih spojin, reakcije med sestavinami zdravila in drugo.

Za vrednotenje higroskopnosti trdnega zdravilnega pripravka se določa vsebnost vezane vlage v stanju ravnotežja in hitrost vezanja vlage.

Proces adsorpcije lahko torej obravnavamo s termodinamskega in kinetičnega stališča, pri čemer spremljanje termodinamskih sprememb omogoča določitev spontanosti procesa adsorpcije plina na površino trdne snovi. Merilo obsega adsorpcije so spremembe Gibbsove proste energije, entalpije in entropije v sistemu plin-površina trdne snovi.

Izdelanih je več teorij za adsorpcijo plinov, vendar nobena ni splošno veljavna.

FREUNDLICH-ova adsorpcijska izoterma podaja odvisnost adsorpcije od tlaka pri konstantni temperaturi.

$$y = \frac{x}{m} = kP^n$$

x.....adsorbirana voda (mg)

m....masa adsorbenta (mg) = začetna masa vzorca

k,n...Freundlich-ovi konstanti

P.....tlak vodne pare (Pa); P = RV(%) • 23,21 (Pa)

Z logaritmiranjem Freundlichove empirične enačbe dobimo premico, katere naklon podaja konstanto 1/n in presečišče z ordinato log k:

$$\log\left(\frac{x}{m}\right) = \log k + \frac{1}{n} \log P$$

Freundlichova adsorpcijska izoterma velja pri zmernih parnih tlakih in jo zato uporabljamo kot enačbo v omejenem območju.

Proces adsorpcije lahko opišemo tudi s kinetičnimi modeli:

KUVSHINNIK-ov model

$$W = W_{\infty} (1 - e^{-kt})$$

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{W_{\infty}}{W_{\infty} - W_t}$$

W.....vsebnost vlage v času t (mg)

W_{∞} ..vsebnost vlage v stanju ravnotežja (mg)

k.....konstanta hitrosti adsorpcije (h^{-1})

t.....čas (h)

2. Namen dela

3. Metode

Postopek:

1. V tri označene in starirane petrijevke (s pokrovčki) natančno natehtamo približno 2 g predhodno sušene pomožne snovi (škrob ali celuloza).
2. Petrijevke prekrijemo s pokrovčki in postavimo v tri prostore, kjer so različne relativne vlažnosti. V prostorih petrijevke odpremo.
3. Petrijevke stehamo po 1 in 2 urah ter po 7 dneh. Med fazo tehtanja so petrijevke pokrite s pokrovčkom. Ko jih vrnemo nazaj v prostore, jih ponovno odpremo.
4. Relativno vlažnost zraka v prostorih kontroliramo pred vsakim tehtanjem preiskovanega vzorca.
5. Na osnovi prirastka mase vrednotimo higroskopnost pomožnih snovi.

4. Rezultati

Modelna spojina: _____

1. Prikažite rezultate eksperimenta.

Natehte vzorcev skupaj s petrijevkami (mg).

m	prazna petrijevka	z vzorcem t = 0	z vzorcem t = 1h	z vzorcem t = 2h	z vzorcem t = 7 dni
1. prostor					
2. prostor					
3. prostor					

Rezultate mase vzorcev v mg ter porast mase glede na začetno natehto v %.

m	čas	0		1 h		2 h		7 d	
		mg		mg	%	mg	%	mg	%
1. prostor									
2. prostor									
3. prostor									

Relativne vlažnosti (RV) zraka v različnih prostorih.

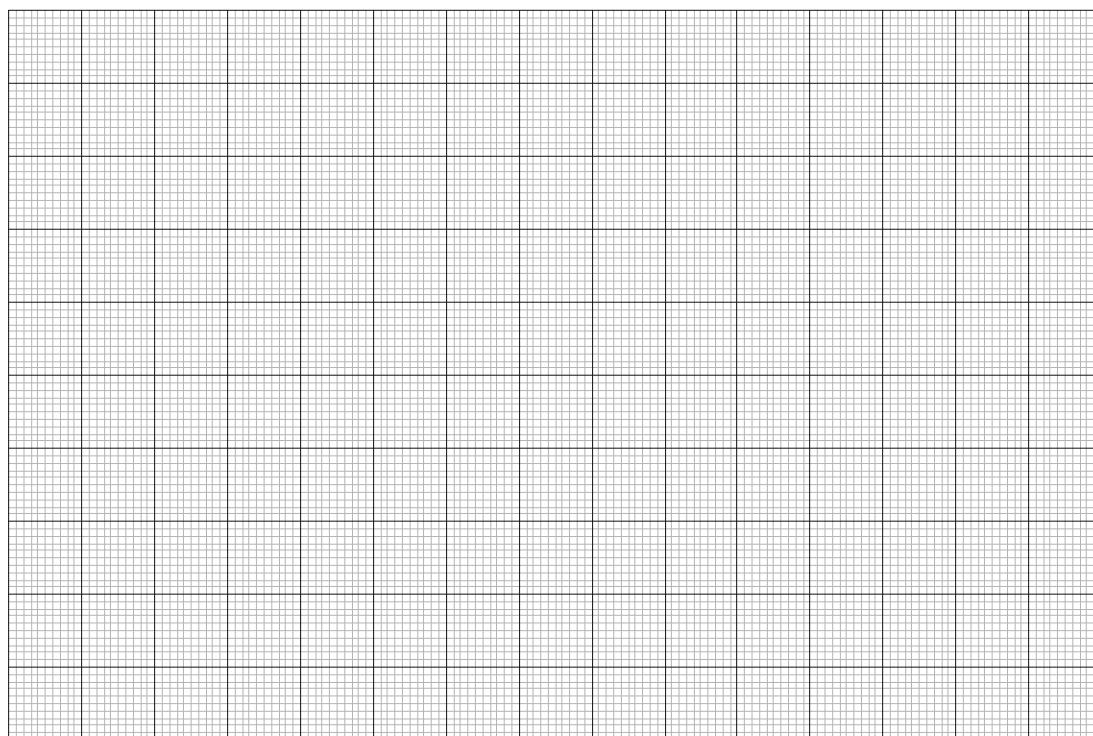
RV (%)	čas	0	1 h	2 h	7 d
1. prostor					
2. prostor					
3. prostor					

2. Izračunajte povprečno vrednost konstante hitrosti adsorpcije vlage za vsako proučevano vlažnost zraka po Kuvshinnikovi enačbi $k = \frac{1}{t} \ln \frac{W_{\infty}}{W_{\infty} - W}$.

Konstanta	čas (h)	1. prostor	2. prostor	3. prostor
k_1	1			
k_2	2			
$k_{\text{povp}} (\text{h}^{-1})$				

3. Narišite diagram: vsebnost vlage (%) v stanju ravnotežja v odvisnosti od RV zraka (%).

RV (%)			
vsebnost vlage (%)			



4. Narišite diagram $\log\left(\frac{x}{m}\right)$ v odvisnosti od $\log P$ s pomočjo linearne regresije z upoštevanjem podatkov v stanju ravnotežja (7 dni).

Enačba premice: _____ R^2 : _____

5. Na osnovi regresijske premice določite Freundlichovi konstanti adsorpcije k in n . Določitev je osnovana na enačbi:

$$\log\left(\frac{x}{m}\right) = \log k + \frac{1}{n} \log P$$

$y = a + bx$

$\log k$odsek na ordinati

$\frac{1}{n}$ naklon premice

$k =$ _____

$n =$ _____

5. Razprava in zaključki

3. MEHANIZEM RAZPADA UČINKOVIN

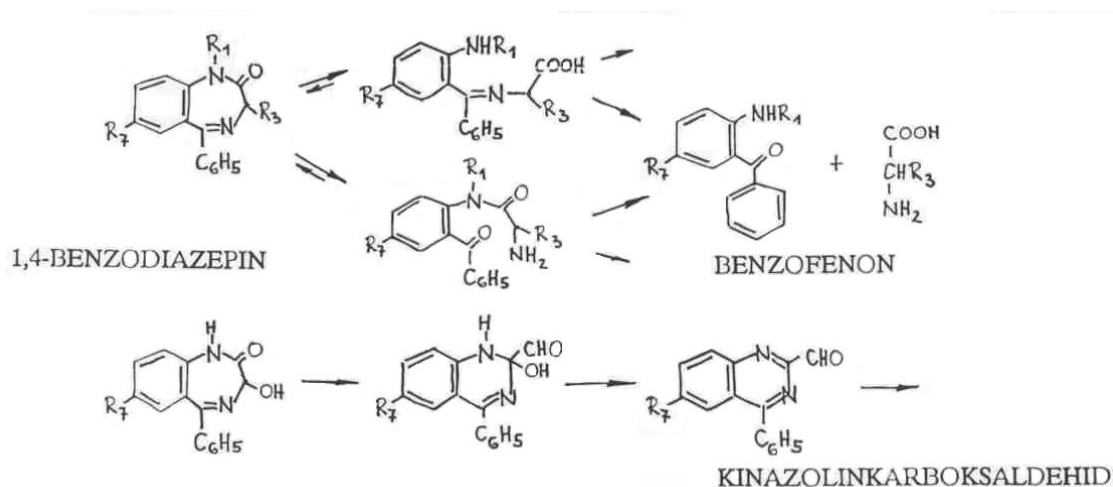
Spremljanje razpada benzodiazepinov s HPLC metodo

1. Uvod

Raziskave stabilnosti se pričnejo že v najzgodnejših fazah razvoja zdravila in nato sledijo temu razvoju in proizvodnji vse do tržnega proizvoda. Primarnega pomena v preformulacijski fazi je proučevanje reaktivnosti same učinkovine pri različnih pogojih in ob prisotnosti potencialnih pomožnih snovi. Razjasnitve mehanizmov in kinetike glavnih poti razpada predstavljajo zato osnovo razvoja ustreznih analitskih metod in smiselne oblikovanja zdravila.

Osnovni mehanizem razpada 1,4-benzodiazepinov v vodnih raztopinah obsega hidrolizo 1,2-amidne in 4,5 azometinske vezi, kar vodi preko dveh intermediatov do ustreznih derivatov benzofenona in glicina. Prva stopnja v tem procesu je reverzibilna, pri čemer sta obseg reverzibilnosti in preferenčna pot odvisni od pH raztopine. Razpad lahko iz intermediatov poteče tudi v smeri drugih razpadnih produktov. Pri 3-OH derivatih obstaja še pomembna razpadna pot do kinazolin-karboksaldehida in naprej v druge razpadne produkte.

Mehanizmi razpada 1,4-benzodiazepinov:



Struktura benzodiazepinov:

učinkovina	R_1	R_3	R_7
diazepam	CH_3	H	Cl
nordiazepam	H	H	Cl
nitrazepam	H	H	NO_2
nimetazepam	CH_3	H	NO_2
oksazepam	H	OH	Cl

Tabela substituentnih konstant:

substituenta	σ_p	σ^*
Cl	0,23	-
NO ₂	0,78	-
H	-	0,49
CH ₃	-	0,00

2. Namen dela

3. Metode

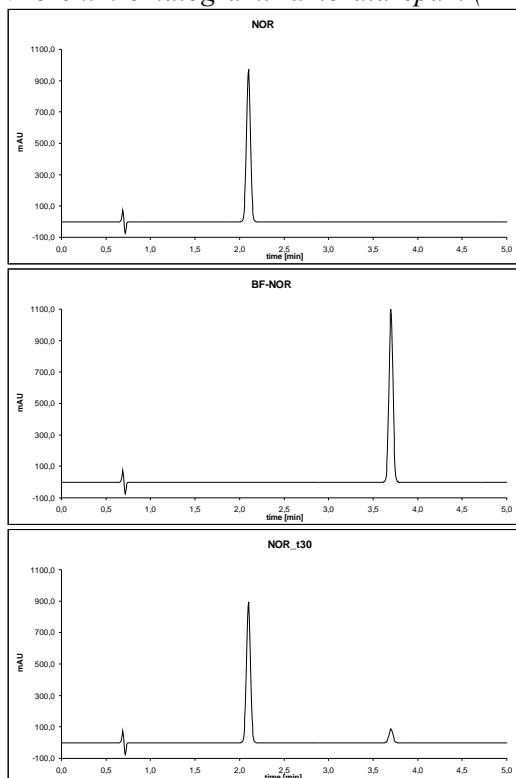
Postopek:

1. 5 ml osnovne raztopine diazepama (nordiazepama, nitrazepama, oksazepama) z znano koncentracijo odpipetiramo v 25 ml bučko in dopolnimo do oznake s topilom (0,01 M HCl ali H₂O ali 0,01 M NaOH). (*Raztopina_BD*)
2. 1 ml *Raztopine_BD* odpipetiramo v vialo, dodamo 1 ml pufru pH 7,0 ter vzorec (BD₀) analiziramo s HPLC.
3. Po 5 ml *Raztopine_BD* odpipetiramo tudi v 2 označeni epruveti z zamaškom (BD₃₀ in BD₆₀), označimo meniskus in postavimo v vodno kopel ter segrevamo na povišani temperaturi.
4. Po 30 oz 60 min vzamemo vzorec BD₃₀ oz BD₆₀ iz termostata, po potrebi dopolnimo s topilom do oznake in redčimo s pufrom pH 7,0 v razmerju 1:1 ter ju analiziramo s HPLC.
5. Na enak način kot *Raztopino_BD* pripravimo tudi raztopino ustreznega benzofenona. 5 ml osnovne raztopine benzofenona z znano koncentracijo odpipetiramo v 25 ml bučko in dopolnimo do oznake s topilom. (*Raztopina_BF*)
6. 1 ml *Raztopine_BF* odpipetiramo v vialo, dodamo 1 ml pufru pH 7,0 ter vzorec (BF) analiziramo s HPLC.
7. Na osnovi površin kromatografskih vrhov izračunamo koncentracije BD in BF v vzorcih ob predpostavki, da je površina direktno sorazmerna koncentraciji.
8. Vrednost konstante reakcijske hitrosti hidrolize BD izračunamo po kinetiki prvega reda.

Kromatografski pogoji:

- tekočinski kromatograf z UV detektorjem
- kolona: 50 x 4,6 mm, polnjena s stacionarno fazo C18, 5 μ m
- mobilna faza: voda : acetonitril = 70:30
- hitrost pretoka mobilne faze: 1,2 ml/min
- volumen injiciranja: 20 μ l
- valovna dolžina detekcije: 254 nm

Vzorčni kromatogrami za nordiazepam (BD_0 , BD_{30} in BF):



Masna bilanca:

$$MB(\%) = \left(\frac{m_{BD}^t + m_{BF}^t + m_G^t - m_V^t}{m_{BD}^0} \right) * 100$$

m_{BD}^0 , m_{BD}^t masa benzodiazepina ob času $t=0$ in t

m_{BF}^t , m_G^t , m_V^t masa benzofenona, glicina in vode ob času t

4. Rezultati

1. V tabeli prikažite koncentracije benzodiazepina in njegovega razgradnega produkta, konstante reakcijske hitrosti razpada in masne bilance.

čas (min)	c (mmol/l)	c_{bf} (mmol/l)	masna bilanca (%)	k (min^{-1})
0				/

2. V tabeli prikažite rezultate izračunanih konstant razgradnje učinkovin znotraj turnusa.

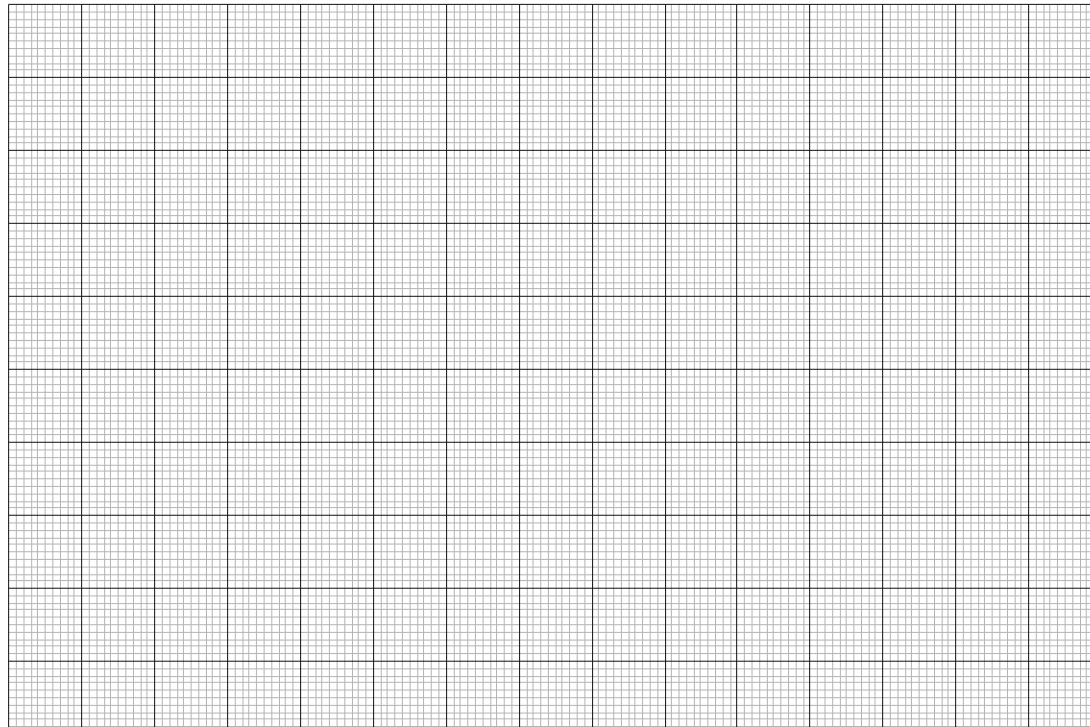
učinkovina	topilo	k (min ⁻¹)	Σσ	MB(%)
diazepam				
nordiazepam				
nitrazepam				
oksazepam				

3. Ocenite razgradno pot proučevane učinkovine in vpliv substituent v molekuli na njeno stabilnost pri uporabljenih eksperimentalnih pogojih.

4. a) Grafično predstavite vpliv substituent na hitrost razpada benzodiazepinov v obliki:

$$\ln k = \ln k_0 + \rho \cdot \Sigma\sigma$$

b) Na osnovi grafa ocenite konstanto reakcijske hitrosti razpada nimetazepama pri obravnavanih eksperimentalnih pogojih.



Enačba premice: _____ R²: _____

Konstanta reakcijske hitrosti nimetazepama:

5. Razprava in zaključek

6. Odgovori na vprašanja