

Ćwiczenie III rok Farmacji – Chemia Leków

BADANIE TRWAŁOŚCI KWASU ASKORBINOWEGO

Opracowanie: dr n. farm. Agnieszka Sobczak, dr n. farm. Monika Leśniewska-Kowiel

Synonimy: kwas askorbowy, witamina C

1. Wstęp

Trwałość w odniesieniu do substancji aktywnej (ang. *active pharmaceutical ingredient*; API) lub produktu leczniczego dotyczy wszystkich zjawisk: fizycznych, chemicznych i mikrobiologicznych, które zachodzą w czasie, pod wpływem różnych czynników zewnętrznych. Dla produktów leczniczych możemy ją rozpatrywać w aspekcie przemian w fazie farmaceutycznej, ale także interakcji zachodzących w fazie farmakokinetycznej i farmakodynamicznej, czyli po podaniu leku, w organizmie pacjenta.

Badania trwałości przeprowadza się w celu:

- zapewnienia jakości, skuteczności terapeutycznej leku oraz braku zmian w jego biodostępności. Standardowo przyjmuje się, że lek w okresie ważności musi zachować 90% swojej pierwotnej aktywności farmakologicznej lub 90% deklarowanej zawartości API. W przypadkach leków silnie działających lub tworzących toksyczne produkty rozkładu mogą być wyjątkowo zastosowane inne normy;
- określenia terminu ważności, okresu ponownego badania substancji czynnej i warunków przechowywania substancji czynnej oraz postaci leku (w opakowaniu bezpośrednim i handlowym, a także po otwarciu opakowania) z uwzględnieniem stref klimatycznych, w których lek ma być dystrybuowany;
- zagwarantowania bezpieczeństwa poprzez określenie potencjalnych produktów rozkładu (ustalenie dopuszczalnego poziomu tych zanieczyszczeń) i wykluczenie substancji czynnych, które przekształcają się do toksycznych produktów. Innym rozwiązaniem może być dobór odpowiednich substancji pomocniczych czy też zastosowanie opakowań o odpowiednim składzie i właściwościach, skutecznie chroniących lek przed rozkładem;

- ustalenia nadmiaru technologicznego dla bardzo labilnych substancji aktywnych, które w terminie ważności ulegają rozkładowi powyżej 10% początkowej zawartości, przy założeniu, że produkty ich rozkładu nie wykazują toksyczności. Przykładami substancji, dla których stosuje się nadmiar technologiczny są: witaminy: A – retinol, B₂ – ryboflawina, B₆ – chlorowodorek pirydoksyny, B₁₂ – cyjanokobalamina, C – kwas askorbinowy (dopuszczalna zawartość początkowa dla witaminy C wynosi 130% wartości deklarowanej);
- opracowania odpowiedniego procesu technologicznego, doboru właściwej postaci leku dla danego API oraz opakowania, które zapewni pożądaną trwałość substancji leczniczej. Może to być osiągnięte m.in. poprzez dodatek konserwantów, stabilizatorów lub eliminację czynnika destrukcyjnego, np. tlenu z powietrza, światła;
- ustalenia wrażliwości na czynniki zewnętrzne nowo syntetyzowanych związków wykazujących działanie farmakologiczne, co umożliwi modyfikowanie ich struktury na etapie projektowania i syntezę nowych analogów o lepszych parametrach;
- ustalenia warunków metody analitycznej do oznaczania zawartości API (selektywność metody).

Czynniki wpływające na stabilność substancji aktywnych i produktów leczniczych możemy podzielić na dwie główne kategorie:

- środowiskowe: temperatura, światło, obecność tlenu lub innych czynników utleniających, katalizatory (np. metale), mikroorganizmy, ciśnienie atmosferyczne, pH oraz wilgotność powietrza;
- interakcje: pomiędzy substancjami aktywnymi (w preparatach złożonych), substancją czynną a substancjami pomocniczymi lub składnikami opakowania. Szczególnym przypadkiem są interakcje w organizmie, zachodzące po podaniu leku pacjentowi, np. po podaniu doustnym nie może dochodzić do dezaktywacji leku w przewodzie pokarmowym pod wpływem enzymów lub pH.

W badaniach stabilności należy uwzględnić trwałość zarówno substancji aktywnej (w fazie stałej, w roztworach, a czasami także w płynach ustrojowych) oraz trwałość gotowego produktu leczniczego.

Podczas przechowywania substancja czynna lub lek może ulegać różnym przemianom: chemicznym, fizycznym i biologicznym.

Wśród najczęściej zachodzących przemian chemicznych wymienić można reakcje:

- hydrolizy (np. estrów, amidów, laktamów, eterów);
- utlenienia i redukcji (np. aldehydów do kwasów; ugrupowań etylenowych w nienasyconych kwasach tłuszczowych i glicerydach kwasów tłuszczowych; fenotiazyn, które ze względu na obecność siarki dwuwartościowej utleniają się do sulfotlenków a następnie sulfonów);
- hydratacji i dehydratacji;
- dimeryzacji i polimeryzacji;
- dekarboksylacji;
- dehalogenacji;
- przegrupowań przestrzennych (izomeryzacja i epimeryzacja).

W przypadku reakcji chemicznych standardowe badania trwałości będą obejmować określenie właściwej i ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej oraz wpływu temperatury, światła i czynników utleniających.

Substancje i produkty lecznicze mogą też ulegać przemianom fizycznym, które obejmują takie procesy jak: sedymentacja zawiesin, rozdział emulsji, wytrącanie osadów, parowanie, sublimacja, absorbcja wody czy zmiany konsystencji. Z tego względu badania trwałości obejmują też ocenę takich parametrów jak: wygląd, zabarwienie, przezroczystość płynów, rozproszenie cząstek w zawiesinach, odczyn.

Kolejnym rodzajem zmian są zmiany mikrobiologiczne, które wiążą się z utratą jałowości i mogą także prowadzić do zmian chemicznych powstających pod wpływem aktywności mikroorganizmów.

Dobór rodzaju badań wykonywanych w ramach oceny trwałości zależeć będzie od charakteru przemian, jakim może ulegać dany związek lub lek.

Trwałość substancji czynnej może być badana przy pomocy testów stresowych, długoterminowych, pośrednich i przyspieszonych.

Testy stresowe wykonuje się w celu ustalenia wrażliwości API na poszczególne czynniki środowiskowe (zmienne warunki przechowywania), określenia mechanizmu rozkładu wraz z potwierdzeniem struktury chemicznej produktów degradacji, a także przy opracowywaniu i walidacji nowej metody analitycznej. Testy stresowe obejmują reakcje utlenienia (nadtlenkiem wodoru), fotodegradacji oraz hydrolizy w podwyższonej

temperaturze w środowisku kwasowym, obojętnym i zasadowym. Natomiast w przypadku postaci stałych i półstałych bada się wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza.

W zależności od czynnika destrukcyjnego test przeprowadza się według odpowiedniego schematu decyzyjnego. Na podstawie uzyskanych wyników badaną substancję klasyfikuje się do odpowiedniej grupy związków: praktycznie trwałe, bardzo trwałe, trwałe, nietrwałe, bardzo nietrwałe lub wyjątkowo nietrwałe w odniesieniu do działania danego czynnika destrukcyjnego. Jedynie w przypadku reakcji fotodegradacji klasyfikacja związku została ograniczona do dwóch kategorii – fotostabilny i fotolabilny.

Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*; WHO) opisuje procedury przeprowadzania testów **długoterminowych, pośrednich i przyspieszonych** z uwzględnieniem parametrów (temperatury i wilgotności względnej powietrza) zmieniających się w zależności od strefy klimatycznej, w której lek ma być dystrybuowany i przechowywany. W celu standaryzacji warunków badań trwałości świat został podzielony na 4 strefy klimatyczne: I – klimat umiarkowany; II – klimat subtropikalny i śródziemnomorski; III – klimat gorący i suchy; IV – klimat gorący i wilgotny. Badania przeprowadza się zarówno dla API, jak i gotowego produktu leczniczego.

Testy długoterminowe powinny być prowadzone przez minimum jeden rok i kontynuowane przez czas, który pozwoli na ustalenie okresu ponownego badania substancji czynnej lub okresu ważności. Zwykle optymalny okres przechowywania to pięć lat, przy założeniu, że wystarczający rozkład substancji aktywnej nie nastąpi w krótszym okresie czasu.

Ze względu na fakt, że wiele substancji leczniczych ma długi czas rozkładu w warunkach przechowywania, termin ważności często jest ustalany na podstawie testów przyspieszonych, charakteryzujących się bardziej drastycznymi warunkami badań. W sytuacji, kiedy wyniki testów przyspieszonych odbiegają od długoterminowych nie można się na nich opierać i należy wykonać testy pośrednie. W porównaniu do testów długoterminowych pozwalają one zaoszczędzić czas, a w stosunku do przyspieszonych zapewniają dokładniejsze wyniki.

Tabela 1. Warunki testów trwałości substancji aktywnych i produktów farmaceutycznych przeznaczonych do przechowywania w temperaturze pokojowej wg wytycznych WHO

Rodzaj testu	Warunki przechowywania	Minimalny czas ekspozycji
Długoterminowy ¹	25°C ± 2°C, 60% RH ± 5% RH lub 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH	12 miesięcy
Pośredni ²	30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH	6 miesięcy
Przyspieszony	40°C ± 2°C, 75% RH ± 5% RH	6 miesięcy

¹Warunki testu długoterminowego, 25°C ± 2°C, 60% RH ± 5% RH lub 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH, są uwarunkowane strefą klimatyczną, w której substancja aktywna ma być przechowywana. Badanie przy wyższej wilgotności względnej powietrza 75% RH ± 5% RH, w temperaturze 30°C ± 2°C, jest również dopuszczalne.

²Jeżeli warunki 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH są warunkami testu długoterminowego, wówczas nie mogą one być warunkami testu pośredniego.

Testy przyspieszonego starzenia służą do ustalenia ilościowej zależności szybkości rozkładu związku m.in. od wartości pH (roztwory), wilgotności względnej powietrza (formy stałe i półstałe), natężenia światła i temperatury oraz pozwalają określić kinetykę tych reakcji. Wyniki testów prowadzonych w podwyższonej temperaturze można ekstrapolować do rzeczywistych warunków przechowywania leku, co zapewnia oszczędność czasu (wpływ wilgotności jest trudniejszy do opisanie). Ponadto wyniki uzyskane na podstawie testów przyspieszonych można wykorzystać do przewidywania trwałości w warunkach ekstremalnych, przekraczających normalne warunki przechowywania zalecone na etykiecie, np. podczas transportu. Nie zawsze natomiast można na ich podstawie ocenić trwałość fizyczną substancji.

Aby istniała możliwość zastosowania testów przyspieszonych musi być spełnionych kilka warunków, m.in.:

- energia aktywacji w stosowanym w teście zakresie temperatur i dla temperatury ekstrapolowanej nie może zależeć od temperatury;
- zależność szybkości reakcji od zmiany warunków musi być liniowa, w przeciwnym razie istnieje możliwość pojawienia się błędów wynikających z ekstrapolacji (dla wielu reakcji złożonych warunek liniowości nie jest spełniony);
- stan skupienia leku nie powinien się zmieniać podczas badań w podwyższonej temperaturze (leki półstałe ulegają zwykle stopieniu podczas ogrzewania);
- rozkład leku w podwyższonej temperaturze musi zachodzić wg takiego samego mechanizmu jak w temperaturze przechowywania;

- niezmiennosc odczynu leku, poniewaz wiele reakcji degradacji zalezy od pH.

Dobór temperatury w testach przyspieszonego starzenia wynika z konieczności zagwarantowania niezmienności mechanizmu reakcji oraz szybkości reakcji degradacji. W miarę możliwości stosuje się temperatury zbliżone do warunków przechowywania, zwykle od 30°C do 60°C. Nie zaleca się przekraczania 90°C. Wyższe temperatury można stosować tylko w przypadkach, w których mamy do czynienia z bardzo powolną degradacją związku w fazie stałej. W celu przewidywania trwałości z zastosowaniem praw kinetyki reakcji chemicznych wymagane jest przeprowadzenie badania przynajmniej w trzech temperaturach. W przypadku ustalania wpływu pH na szybkość reakcji należy stosować bufor o odpowiedniej, dla danego leku, pojemności buforowej oraz unikać buforów będących mieszaniną różnych soli i kwasów.

Opakowanie produktu leczniczego powinno zapewniać stabilność leku i chronić go przed zniszczeniem, a umieszczane na etykiecie zalecenia dotyczące przechowywania leku nie powinny być stosowane jako kompensacja zastosowania niewłaściwego opakowania.

W zależności od postaci farmaceutycznej i właściwości produktu, może wystąpić jednak ryzyko zmian fizycznych w wyniku działania pewnych czynników środowiskowych, np. niskich temperatur (niskie temperatury w niektórych przypadkach mogą mieć również wpływ na trwałość opakowania). Wówczas na etykiecie lub opakowaniu produktu leczniczego zamieszcza się dodatkową informację o warunkach jego przechowywania (Tabela 2).

Tabela 2. Przykłady oznakowań na etykietach produktów leczniczych

Czynnik destrukcyjny	Oznakowanie na etykiecie
Produkty lecznicze nietolerujące chłodzenia	Nie przechowywać w lodówce ani nie zamrażać
Produkty lecznicze nietolerujące zamrażania	Nie zamrażać
Fotolabilne produkty lecznicze	Chronić od światła
Produkty lecznicze nietolerujące wysokich temperatur	Przechowywać i transportować w temperaturze poniżej 30°C

2. Kinetyka chemicznych reakcji degradacji substancji leczniczej w roztworach – rzędowość reakcji

W celu określenia trwałości roztworów substancji aktywnych i produktów leczniczych ważne jest określenie kinetyki zachodzących przemian, czyli ustalenie szybkości reakcji

chemicznej, czynników, które na nią wpływają oraz ustalenie kinetycznego mechanizmu tych reakcji.

W przebiegu reakcji chemicznej (np. rozkładu) jedna lub kilka cząsteczek wyjściowych (substratów) ulega przekształceniu w jedną lub kilka innych cząsteczek (produktów). Jeżeli reakcja przebiega według równania stechiometrycznego: $aA + bB = cC + dD$ to jej szybkość określa się jako zmianę stężenia substratów (A, B) lub produktów (C, D) w zależności od czasu (a , b , c , d to współczynniki stechiometryczne). Reakcja, której stechiometrię można zapisać w ww. postaci, jest reakcją prostą. Reakcja prosta może być reakcją bezpośredniego przejścia substratów w produkty lub przedstawiać efekt sumaryczny szeregu takich bezpośrednich etapów. Natomiast reakcja złożona składa się z kilku reakcji prostych.

Szybkość reakcji, która opisuje szybkość zmian ilości substratów (A, B) i produktów (C, D), można przedstawić wzorem:

$$-d[A]/dt = -d[B]/dt = d[C]/dt = d[D]/dt = k [A]^{n_1} \cdot [B]^{n_2}$$

w którym n_1 i n_2 to współczynniki liczbowe wskazujące w jakim stopniu stężenie poszczególnych składników A i B wpływa na szybkość reakcji. Świadczą one też o rzędzie reakcji w odniesieniu do tych substratów. Ogólny rząd reakcji jest sumą wykładników potęgowych stężeń poszczególnych substratów: $n = n_1 + n_2$. W przypadku, kiedy jeden z reagentów (np. B) jest w dużym nadmiarze, można założyć, że jego stężenie nie ulega praktycznie zmianie w czasie reakcji i pominąć go w równaniu. W takiej sytuacji ogólny rząd reakcji przyjmuje postać $n = n_1$.

Reakcje chemiczne przebiegają najczęściej według kinetyki zerowego, pierwszego lub drugiego rzędu. Poniżej scharakteryzowano parametry dla reakcji zerowego i pierwszego rzędu.

Reakcje zerowego rzędu

Szybkość reakcji zerowego rzędu można opisać równaniem:

$$-d[A]/dt = k \text{ (postać różniczkowa)}$$

$$\text{lub } [A] = [A]_0 - k \cdot t \text{ (scałkowana postać równania)}$$

Stężenie leku, ulegającego degradacji wg procesu zerowego rzędu jest wprost proporcjonalne do czasu, zatem stałą szybkości reakcji można obliczyć z nachylenia wykresu $[A] = f(t)$. Jednostką stałej szybkości rozkładu zerowego rzędu jest $[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}]$, przy założeniu, że stężenie wyrazi się w $[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$, a czas w sekundach.

Czas połowicznego rozkładu ($t_{0,5}$), w którym następuje rozkład 50% substratu $[A] = [A]_0/2$ oraz czas rozkładu 10% substratu ($t_{0,1}$), gdzie $[A] = \frac{9}{10} [A]_0$ obliczamy z następujących wzorów:

$$t_{0,5} = \frac{[A]_0 - \frac{[A]_0}{2}}{k}, \text{ czyli } t_{0,5} = \frac{[A]_0}{2k}$$
$$t_{0,1} = \frac{[A]_0}{10k}$$

W przypadku związków, których rozkład następuje zgodnie z kinetyką reakcji zerowego rzędu szybkość reakcji rozkładu jest stała, niezależna od chwilowego stężenia reagentów. Zatem w każdej jednostce czasu ubywa taka sama ilość substratu niezależnie od stężenia roztworu, czyli procentowo w stosunku do ilości substratu rozkład jest większy w roztworach rozcieńczonych. Wobec tego wyższe stężenie roztworu gwarantuje większą trwałość preparatu, co wykorzystuje się w aptece do przygotowania roztworów podstawowych leków w wyższych stężeniach.

Reakcje pierwszego rzędu

Szybkość reakcji pierwszego rzędu można opisać równaniem:

$$-d[A]/dt = k [A]^1 \text{ (postać różniczkowa)}$$

$$\text{lub } \ln [A] = \ln [A]_0 - k \cdot t \text{ (scałkowana postać równania)}$$

Logarytm stężenia leku, ulegającego degradacji wg mechanizmu reakcji pierwszego rzędu, jest wprost proporcjonalny do czasu, zatem wykres $\ln[A] = f(t)$ jest prostoliniową zależnością, a wartość k można obliczyć z następującego wzoru:

$$k = \frac{2,303}{t_2 - t_1}$$

Jednostką stałej szybkości rozkładu jest w tym przypadku odwrotność jednostki czasu (np. sekundy [s^{-1}]).

Czasy $t_{0,5}$ oraz $t_{0,1}$ dla substancji ulegających rozkładowi zgodnie z reakcją I-rzędu są niezależne od stężenia i obliczamy je z następujących wzorów:

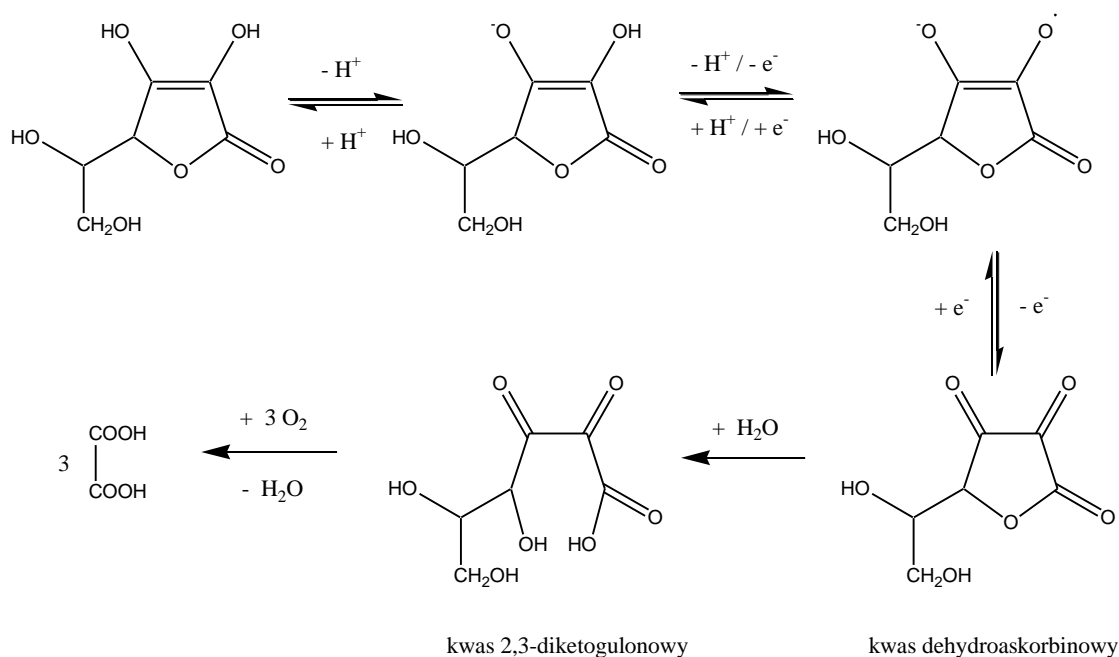
$$t_{0,5} = \frac{0,693}{k}$$
$$t_{0,1} = \frac{0,1054}{k}$$

W takim przypadku zarówno roztwory rozcieńczone, jak i stężone wykazują taką samą trwałość.

3. Mechanizm reakcji rozkładu kwasu askorbinowego

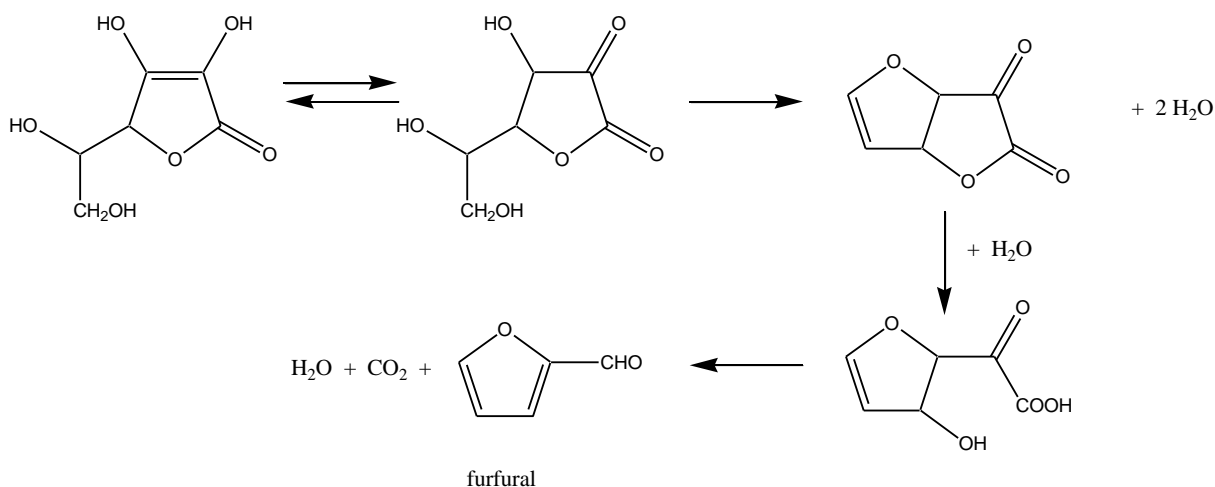
W przypadku niektórych substancji leczniczych, wysoka reaktywność chemiczna warunkuje aktywność farmakologiczną. Przykładami są tutaj m.in. kwas askorbinowy, antybiotyki beta-laktamowe czy kwas acetylosalicylowy. Kwas askorbinowy jest stosunkowo trwały w fazie stałej, zarówno w substancji jak i w stałych preparatach farmaceutycznych (tabletki, kapsułki twarde). Natomiast w roztworach ulega on szybkiemu rozkładowi, co związane jest z obecnością w jego strukturze podatnego na utlenianie ugrupowania endiolowego. Szczególnie dużą podatnością na rozkład odznaczają się wodne roztwory kwasu askorbinowego. Szybka degradacja substancji następuje zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, jej mechanizm jest jednak odmienny.

W obecności tlenu zachodzi reakcja samoutlenienia do kwasu dehydroaskorbinowego. W wyniku utraty przez cząsteczkę kwasu jednego protonu powstaje anion askorbinowy, który oddaje następnie jeden elektron i kolejny proton przekształcając się w stabilizowany mezomerycznie, rodnik askorbylowy (rodnik kwasu monodehydroaskorbinowego). Utrata kolejnego elektronu prowadzi do powstania kwasu dehydroaskorbinowego. Powyższe reakcje mają charakter odwracalny. Możliwa jest również samorzutna reakcja dysproporcjonowania rodnika monodehydroaskorbinowego do kwasu askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego. Kwas dehydroaskorbinowy ulega następnie hydrolizie do kwasu 2,3-diketogulonowego, którego utlenienie prowadzi do powstania kwasu szczawiowego.



Szybkość reakcji samoutlenienia zależna jest od środowiska, w jakim reakcja zachodzi. Rozkład najwolniej przebiega w środowisku kwasowym około pH 2, następnie wraz ze wzrostem pH przyspiesza aż do maksimum przy pH 4,5. Dalszy wzrost pH skutkuje spadkiem szybkości reakcji rozkładu i osiągnięciem kolejnego minimum w zakresie pH 6 – 7, a następnie przyspieszeniem wraz ze zmianą środowiska na alkaliczne. Wyraźny efekt katalizujący na reakcję samoutlenienia wykazują jony metali ciężkich, zwłaszcza Cu^{2+} . Wpływ ten najwyraźniej widoczny jest w środowisku o pH około 6,5. W przypadku nieobecności jonów metali ciężkich wyraźny przebieg reakcji widoczny jest dopiero dla $\text{pH} > 9$. Na tej podstawie stwierdzono, że katalitycznej reakcji samoutlenienia ulega głównie anion jednowartościowy kwasu askorbinowego. Natomiast anion dwuwartościowy ulega utlenieniu przede wszystkim w reakcji, w której nie uczestniczą jony metali ciężkich.

Rozkład kwasu askorbinowego w warunkach beztlenowych prowadzi do powstania furfuralu. Następuje w wyniku zmiany równowagi keto-enolowej i zachodzących następnie reakcji dehydratacji, hydrolizy i dekarboksylacji. Rozkład jest katalizowany przez jony wodorowe, w związku z czym najszybciej przebiega w środowisku silnie kwasowym ($\text{pH} < 2$). Wzrost pH skutkuje spadkiem szybkości reakcji rozkładu aż do osiągnięcia minimum przy pH 2,5. Dalszy wzrost pH powoduje przyspieszenie reakcji przy pH około 4,0, a następnie prowadzi do osiągnięcia kolejnego minimum w zakresie pH 6 – 8. W warunkach beztlenowych, podobnie jak w obecności tlenu, obserwuje się katalizujący wpływ jonów metali ciężkich na reakcję rozkładu kwasu askorbinowego. Najbardziej wyraźny efekt wywierają tu jednak jony Pb^{2+} i Zn^{2+} .



Trwałość roztworów kwasu askorbinowego uwarunkowana jest stężeniem początkowym leku oraz rodzajem (polarnością) rozpuszczalnika. Roztwory o większym stężeniu odznaczają się większą trwałością. Rozkład kwasu askorbinowego zachodzi więc zgodnie z kinetyką zerowego rzędu. Niektóre publikacje wskazują jednak na rozkład witaminy C przebiegający zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu względem stężenia substratu (fotoliza i utlenianie kwasu askorbinowego w postaci kremu, rozkład witaminy C w świeżych i liofilizowanych warzywach, rozkład wodnych roztworów w temperaturze 80°C i 90°C w obecności jonów Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} oraz Se^{4+}).

Stwierdzono ponadto, że stabilizujący wpływ na trwałość wywiera zastosowanie jako rozpuszczalnika glikolu propylenowego lub *Sirupus simplex*. W przypadku roztworów wodnych na trwałość wywierają wpływ stężenie jonów wodorowych oraz ładunek substratu. Zaobserwowano również wzrost trwałości roztworów witaminy C w obecności jonów Se^{4+} oraz Mg^{2+} .

Właściwości witaminowe posiada zarówno kwas askorbinowy, jak i kwas dehydroaskorbinowy. Układ oksydo-redukcyjny kwas askorbinowy – kwas dehydroaskorbinowy pełni ważną rolę w układach biologicznych. Stanowi donor wodoru i przenośnik elektronu w komórkach. Wraz z glutationem, cytochromami *a* i *c*, nukleotydami pirymidynowymi i flawinowymi tworzy układ redoks. Powyższe właściwości warunkują udział kwasu askorbinowego w wielu procesach biologicznych, takich jak:

- reakcje cyklu oddechowego w mitochondriach i mikrosomach,
- reakcje hydroksylacji katalizowane przez oksydazy w mikrosomach,
- utrzymanie właściwego potencjału oksydacyjnego w komórkach,
- reakcje antyoksydacyjne,
- utrzymanie w organizmie aktywnych form miedzi Cu(II) i żelaza Fe(II),
- biosynteza kwasu foliowego.

Aktywność antyoksydacyjna kwasu askorbinowego uwarunkowana jest potencjałem oksydo-redukcyjnym układu kwas askorbinowy – kwas dehydroaskorbinowy, wynoszącym $E'_0 = +0,100$ V. Układ ten zdolny jest do redukcji reaktywnych form tlenu, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy ($\cdot O_2^-$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), czy tlen singletowy (1O_2). Dzięki temu działa on skutecznie zarówno w I, II jak i III linii obrony. Kwas askorbinowy wpływa na aktywność wielu enzymów. Należą do nich liczne oksydazy np. hydroksylaza lizynowa, hydroksylaza prolinowa, β -hydroksylaza dopaminy, także metaloproteiny:

dioksygenaza 4-hydroksyfenylopirogronianowa (zawierająca jony Cu(II)) i homogentyzynianowa (zawierająca jony Fe(II)).

Trwałość kwasu askorbinowego w postaci tabletek i kapsułek jest wystarczająca i nie stanowi problemu farmaceutycznego. Stałe postacie leku zawierające kwas askorbinowy w odpowiednich warunkach (temperatura pokojowa, zamknięte szklane lub polietylenowe opakowania) mogą być przechowywane nawet ponad 5 lat. Przy dłuższym przechowywaniu wykrywa się obecność kwasu dehydroaskorbinowego (0,2 – 0,4%), który również wykazuje aktywność witaminową, oraz kwasu 2,3-diketogulonowego (0,5 – 2,0%) i kwasu szczawiowego (0,2 – 1,0%), które jednak w tych stężeniach nie są szkodliwe dla organizmu ludzkiego. Problem stanowi natomiast podatność na rozkład roztworów kwasu askorbinowego. Celem zwiększenia trwałości roztwory doprowadza się do pH 6 – 7, w którym witamina C jest stosunkowo stabilna. Korzystny efekt daje również rozlewanie roztworów do ampulek lub butelek w atmosferze gazu obojętnego.

Bibliografia:

1. Zając M.: *Podstawy badania trwałości leków*, Ocena jakości substancji leczniczych i preparatów farmaceutycznych według wymagań farmakopealnych i ICH, Poznań, Wydawnictwo Kontekst, 2000, 147-179.
2. Pawełczyk E., Hermann T.: *Podstawy trwałości leków*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1982.
3. Zając M., Jelińska A., Cielecka-Piontek J.: *Testy badania trwałości substancji i produktów leczniczych. Trwałość antybiotyków β -laktamowych*, Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych, pod red. Grześkowiaka E., Jelińskiej A., Zając M., Poznań, Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, 2010, 455-462.
4. Molski A.: *Wprowadzenie do kinetyki chemicznej*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2001, 13-51.
5. WHO Technical Report Series, No. 953, WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, *Annex 2: Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products*, Geneva, 2009, 87-130
6. WHO Technical Report Series, No. 953, *Appendix 3: Recommended labeling statements*, WHO Expert Committee
7. Ahmad I., Sheraz M.A., Ahmed S., Shaikh R.H., Vaid F., Khattak S., Ansari S.A.: *Photostability and Interaction of Ascorbic Acid in Cream Formulations*, AAPS Pharm Sci Tech, 12 (2011), 917-923.
8. Rahman M.S., Al-Rizeigi M.H., Guizani N., Al-Ruzaigi M.S., Al-Aaamri A.H., Zainab S.: *Stability of vitamin C in fresh and freeze-dried capsicum stored at different temperatures*, J Food Sci Technol, 52 (2015), 1691-1697.
9. Dolińska B., Ostróżka-Cieślik A., Caban A., Rimantas K., Leszczyńska L., Ryszka F.: *Influence of Trace Elements on Stabilization of Aqueous Solutions of Ascorbic Acid*, Biol Trace Elem Res, 150 (2012), 509-512.

4. Wykonanie ćwiczenia

Ćwiczenie III rok Farmacji – Chemia Leków BADANIE TRWAŁOŚCI KWASU ASKORBINOWEGO

Sprzęt laboratoryjny:

Kolba miarowa poj. 50,0 ml	1 szt.
Cylindry (poj. 100 ml) z korkami	4 szt.
Pipety 100,0 ml	3 szt.
Pipety 1,0 ml	1 szt.
Pipety 10,0 ml	4 szt.
Probówki poj. min. 10 ml	17 szt.

Wykonanie ćwiczenia

Roztwór witaminy C

Odważyć dokładnie około 50,0 mg kwasu askorbinowego (M. m. 176,1 g/mol), przenieść ilościowo do kolby miarowej o poj. 50,0 ml, rozpuścić w wodzie demineralizowanej i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem (roztwór A).

Bufor o pH 2,0 i pH 4,5

Odważyć dokładnie 1,7418 g K_2HPO_4 , rozpuścić w zlewce w około 400 ml wody demineralizowanej i doprowadzić do odpowiedniego pH przy użyciu kwasu ortofosforowego (85%). Następnie przenieść ilościowo do kolby miarowej 500,0 ml i uzupełnić wodą demineralizowaną.

Roztwory badane

Do cylindrów zamykanych korkiem o pojemności 100 ml odmierzyć pipetą 100,0 ml odpowiednich rozpuszczalników:

1. Woda demineralizowana
2. Woda demineralizowana
3. Bufor pH 2,0
4. Bufor pH 4,5

Cylinder 1 zamknąć korkiem i pozostawić w temperaturze pokojowej. Cylindry 2 – 4 wraz z rozpuszczalnikami zamknąć korkami, umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 50°C i termostatować przez 30 minut. Następnie do każdego cylindra dodać 1,0 ml roztworu A, zamknąć korkiem i wymieszać.

Pobieranie próbek

Bezpośrednio po przygotowaniu (t_0) oraz w określonych odstępach czasu pobierać z cylindrów do wysokich probówek 10,0 ml badanych roztworów i chłodzić (próby 2 – 4) natychmiast w wodzie z lodem.

Czasy pobierania roztworów z cylindrów:

1. 0 min, 30 min, 120 min
2. 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min
3. 0 min, 15 min, 30 min, 120 min
4. 0 min, 15 min, 30 min

Dla każdego pobranego roztworu wykreślić widmo UV w zakresie 220 – 300 nm jako odniesienie stosując wodę demineralizowaną. Ustalić analityczną długość fali dla analizowanych warunków i odczytać absorbancję przy $\lambda_{maks.}$.

Wpływ temperatury na trwałość kwasu askorbinowego

Analityczna długość fali $\lambda_{maks.}$ roztworów wodnych:

	0 min		30 min		120 min	
	A	c [%]	A	c [%]	A	c [%]
H ₂ O 50°C		100				
H ₂ O temp. pokojowa		100				

Wpływ pH środowiska na trwałość kwasu askorbinowego (temp. 50°C)

Analityczna długość fali $\lambda_{maks.}$ dla buforu pH 2,0:

Analityczna długość fali $\lambda_{maks.}$ dla buforu pH 4,5:

	0 min		15 min		30 min		120 min	
	A	c [%]	A	c [%]	A	c [%]	A	c [%]
H ₂ O 50°C		100						
Bufor pH 2,0		100						
Bufor pH 4,5		100					–	–

Kinetyka rozkładu kwasu askorbinowego w środowisku wodnym w temperaturze 50°C

1. Wykonać pomiary.
2. Ustalić rzędowość reakcji.
3. Wyznaczyć stałą szybkości reakcji.
4. Obliczyć $t_{0,1}$ i $t_{0,5}$.

Czas [min]	Absorbancja	c [%]	c [mM]	Parametry kinetyczne
0		100		r = k = n = $t_{0,1}$ = $t_{0,5}$ =
15				
30				
45				
60				
90				
120				