

Jan Meler, Janusz Pluta

WPLYW SUBSTANCJI POMOCNICZYCH NA ZAWARTOŚĆ TLENU W WODNYCH ROZTWORACH LEKU

Katedra Farmacji Stosowanej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

WSTĘP

Wobec niezwykle szybkiego rozwoju przemysłu farmaceutycznego i wielkiej różnorodności produkowanych specyfików, problem trwałości leku nabiera ogromnego znaczenia. Leki w czasie przechowywania są narażone na działanie tak czynników wewnętrznych (wzajemne oddziaływanie substancji czynnych i substancji pomocniczych wchodzących w skład preparatu), jak i zewnętrznych (wilgoć, tlen, temperatura, światło). Pod ich wpływem mogą one ulegać niekorzystnym zmianom i rozkładowi (WIENIAWSKI i in. 1994). Te niepożądane zmiany mogą mieć charakter zjawisk chemicznych, fizycznych, i biologicznych. Prowadzą one, z reguły, do obniżenia wartości terapeutycznej leku, a niekiedy do zwiększenia jego toksyczności w stosunku do organizmu ludzkiego.

CEL PRACY

Tematem pracy było określenie wpływu tlenu, czasu przechowywania, światła widzialnego i ultrafioletowego na trwałość roztworów wodnych norfloksacyny i określenie optymalnych warunków ich przechowywania. Bada-

nia nad wpływem wyżej wymienionych czynników na wodne układy norfloksacyny pozwalają na stworzenie takich warunków ich przechowywania, które zapewnią choremu skuteczność i bezpieczeństwo stosowania przez maksymalnie długi czas.

MATERIAŁY UŻYTE DO BADAŃ

Substancja badana

Norfloksacyna – wzorzec USP Reference Standard Norfloxacin 200 mg, U.S.P.C., Inc. Rockville, MD, Cat.No. 47150 Lot G. (9510206). Substancja przechowywana była w ciemnym, suchym i chłodnym miejscu, a roztwory do badań przygotowywano na bieżąco.

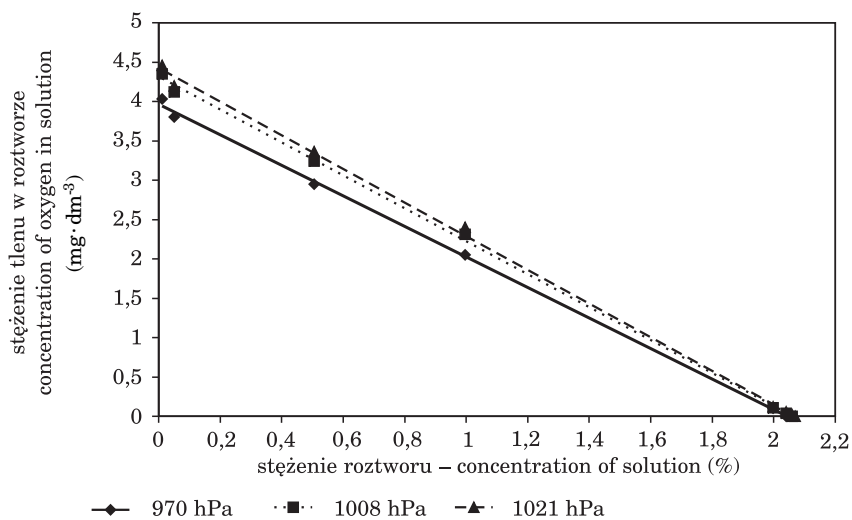
Metodyka badawcza

Badane roztwory norfloksacyny z substancjami chromoforowymi zamknięto w ampułkach ze szkła kwarcowego; próbę porównawczą stanowił roztwór zawierający samą norfloksacynę. Jako substancji zabezpieczających układ przed wpływem promieniowania świetlnego użyto substancji stosowanych w technologii leku: glukozy, kwasu cytrynowego, kwasu winowego, cytrynianu sodowego, glikolu propylenowego –1,2, glicerolu i siarczanu sodowego. Do badanego roztworu norfloksacyny dodawano kolejno ww. substancji zawierających grupy chromoforowe w stężeniach zwykle stosowanych w lekach, od 0,1% do 1,0% (w/v lub v/v gdy substancja była cieczą).

Przygotowane w ten sposób roztwory norfloksacyny z substancjami chromoforowymi poddano działaniu promieniowania z zakresu UV i VIS. Jako źródło światła zastosowano lampę HBO 50. Próbki naświetlano przez 60, 120, 180 min. Odległość ampułek od lampy była stała i wynosiła 30 cm. Oznaczenie ilościowe norfloksacyny w próbkach wykonano metodą HPLC (SUNDERLAND i in. 2001). Zastosowano chromatograf ciekłowy firmy Gilson z detektorem fluorometrycznym (analityczna dł. fali wzb.: 294 nm, dł. fali emisji: 475 nm) z kolumną odwróconej fazy (firmy Zorbax ODS Hipersil 5 μm , 250 \times 4,6 mm) oraz pętlą dozującą o poj. 20 μl , stosując elucję izokratyczną. Przez kolumnę przepuszczano fazę ruchomą z szybkością 1,5 ml/min o składzie: 18 mM KH_2PO_4 + 0,13 mM 1-heptanosulfonianu sodu / $\text{MeOH}/\text{H}_3\text{PO}_4$ (700+300+1).

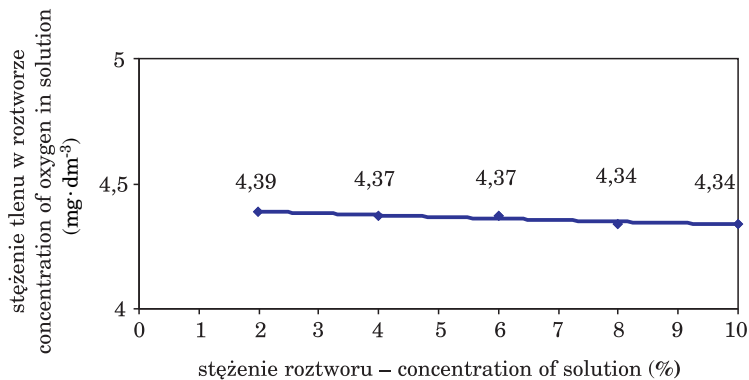
OMÓWIENIE WYNIKÓW

W badaniach zawartości tlenu w wodnych roztworach chromoforów potwierdzono fakt, że w stałej temperaturze rozpuszczalność tlenu w wo-



Rys. 1. Wpływ dodatku kwasu askorbowego na zawartość tlenu w wodzie pod ciśnieniem 970, 1008 i 1021 hPa

Fig. 1. Effect of ascorbic acid as an adjuvant on oxygen concentration at the atmospheric pressure of 970, 1008 i 1021 hPa



Rys. 2. Zależność zawartości tlenu w wodnym roztworze norfloksacyny od stężenia tego roztworu

Fig. 2. Relationship between oxygen concentration in a solution of Norfloxacin and the concentration of the solution

Wpływ promieni słonecznych na trwałość norfloksacyny w roztworze wodnym
Effect of sun radiation on durability of Norfloxacin in an aqueous solution

Czas ekspozycji Exposure time (min)	Promienie słoneczne – Sunrays		
	pole powierzchni pikru peak surface area	stężenie norfloksacyny w próbce ± odchylenie standardowe concentration in a sample standard deviation (mg/100 cm ³)	procent pozostałej po rozkładzie substancji percentage of substance left after decomposition (%)
0	688 612	0.250 ± 0.004	100.0
30	652 240	0.237 ± 0.003	94.8
60	597 340	0.217 ± 0.002	86.8
120	577 180	0.210 ± 0.003	84.0
180	536 480	0.195 ± 0.002	78.0

dzie zależy od ciśnienia atmosferycznego i ilości substancji znajdującej się w roztworze. Wraz ze wzrostem ilości substancji rozpuszczonej, stężenie tlenu w wodzie maleje (PAWELCZYK i in. 1969, BIELSKI i in 1985, ANDERSON i in. 1998). Z kolei wzrost ciśnienia atmosferycznego powoduje wzrost stężenia tlenu w roztworze. W związku z dużą ilością wyników przedstawiono tylko wpływ kwasu askorbowego.

Jak wynika z przedstawionych badań, roztwór kwasu askorbowego o stężeniu 0,01 % (ilość substancji 0,1 mg/dm³) zawiera 4,03 mg/cm³ tlenu, a podwyższenie stężenia kwasu askorbowego do uzyskania roztworu o ciśnieniu osmotycznym 109,74 mOsm/dm³ pozwala na utrzymanie zawartości 0,10 mg/cm³ tlenu. Jeżeli ciśnienie atmosferyczne wyniesie 970 hPa, minimalne stężenie kwasu askorbowego, warunkujące 100% wyparcie tlenu z jego roztworu, to 2,04%. Gdy ciśnienie jest wyższe i wynosi 1008 i 1021 hPa, potrzebne jest wyższe stężenie tego roztworu, wynoszące odpowiednio 2,06 i 2,07%. Wartości tlenu rozpuszczonego są dla poszczególnych roztworów chromoforów o tym samym stężeniu różne, jednak w każdym przypadku obowiązuje zasada opisana powyżej. Ponieważ leki w czasie przechowywania narażone są na wpływ zmian ciśnienia atmosferycznego, konieczne jest uwzględnienie tego faktu przy doborze stężenia roztworu substancji chromoforowej, dodawanego do leku w celu zabezpieczenia go przed niekorzystnym wpływem tlenu rozpuszczonego. Stężenie tego roztworu musi zapewnić minimalny poziom tlenu w zakresie możliwych zmian ciśnienia atmosferycznego.

Norfloksacyna wykazuje niewielką zdolność wypierania tlenu z roztworu wodnego. Zdolność ta bardzo nieznacznie rośnie wraz ze wzrostem stężenia leku w roztworze. Jak wynika z badań, 1,98% roztwór norfloksacyny

Tabela 2
Table 2

Wpływ promieniowania UV na stężenie norfloksacyny w roztworze wodnym
Effect of UV radiation on the concentration of Norfloxacin in an aqueous solution

Czas ekspozycji Exposure time (min)	Pole powierzchni pików Peak surface area	Stężenie norfloksacyny w próbce ± odchylenie standardowe Concentration in a sample standard deviation (mg/100 cm ³)	Substancja pozostała po rozkładzie Percentage of substance left after decomposition (%)
0	688 612	0.250 ± 0.0009	100.0
30	642 113	0.233 ± 0.0008	93.2
60	582 422	0.211 ± 0.001	84.4
120	562 164	0.204 ± 0.004	81.6
180	515 426	0.187 ± 0.003	74.8

zawiera tylko o 0,23% mniej tlenu w stosunku do wody destylowanej, a roztwór 10,00% – 1,36 % zawartości tlenu. W związku z tym konieczna jest ochrona norfloksacyny w postaci roztworu wodnego przed niekorzystnym wpływem tlenu rozpuszczonego, m.in. przez dodatek chromoforów o odpowiednim stężeniu.

Zaobserwowano niewielki, stały ubytek norfloksacyny w układzie wodnym, przechowywanej w temperaturze pokojowej (20°C), całkowicie zabezpieczonej przed światłem. Po sześciu miesiącach przechowywania zawartość norfloksacyny w badanej próbce zmniejszyła się jedynie o 1,8% w stosunku do wartości początkowej. Widoczny jest także równoczesny stopniowy wzrost ilości produktów rozpadu, w tym najważniejszego z nich: 3 – dekarboksylowej pochodnej (TIEFENBACHER i in. 1994, THOMA i in 1997)

Obserwacje zmian zachodzących w wodnym roztworze norfloksacyny wskazują na dużą wrażliwość tego związku na promieniowanie elektromagnetyczne o dł. fali 100–200 nm (promienie UV iVIS) – tabela 2.

Analiza danych z tabeli 1 i 2 nasuwa wniosek, że nawet krótkotrwałe naświetlanie leku prowadzi do jego znacznej degradacji. Zaobserwowano, że szybszy rozkład związku następuje pod wpływem promieniowania UV, 30-minutowa ekspozycja leku na to promieniowanie powoduje 6,8% spadek zawartości norfloksacyny w badanym roztworze, natomiast taki sam czas ekspozycji na promienie słoneczne wywołuje obniżenie stężenia leku o 5,2%. Po 2 h ekspozycji straty wynoszą już odpowiednio 18,4% i 16% początkowej zawartości norfloksacyny.

Norfloksacyna jest fotosensybilizatorem, który absorbując kwant światła (UV, VIS), przechodzi w stan wzbudzony, stając się bardziej reaktywna.

Tabela 3
Table 3

Wyniki badań efektu stabilizującego wodnych roztworów norfloksacyny na światło z zakresu UV i VIS w zależności od rodzaju stabilizatora
Results of tests on the stabilization effect of Norfloxacin aqueous solutions on UV and visible light depending on the kind of stabilizing substance

Substancja stabilizująca Stabilizing substance	Stężenie substancji stabilizującej Concentration of stabilizing substance (%)	Zawartość norfloksacyny po 3 h naświetlania P Percentage of Norfloxacin amount after 3 h radiation P (%)	Współczynnik stabilizacji Stabilization index $W_s=P/P_0$
Bez stabilizatora Without stabilizing substance	0.0	74.85	1.00
Kwas askorbowy Ascorbic acid	0.5	96.34	1.29
Glukoza Glucose	1.0	71.43	0.95
Glikol propylenowy 1,2 1,2 propylene glycol	0.1	69.14	0.92
Glicerol Glycerol	0.1	64.57	0.86
Kwas cytrynowy Citric acid	0.1	54.28	0.72
Siarczan sodu Natrium sulfate	0.1	34.86	0.46
Cytrynian sodu Natrium citricum	0.5	22.28	0.29
Kwas winowy Acidum tartaricum	0.5	14.86	0.20

Ponieważ w wodzie (nawet podwójnie destylowanej) zawarte są śladowe ilości jonów metali ciężkich (głównie Fe^{2+} i Cu^+) o właściwościach redukujących, dochodzi do katalizowanej światłem fotoredukcji norfloksacyny, która powraca wtedy do stanu podstawowego (HALLIWELL i in. 1989, 1999, FLINT i in. 1993). W kolejnym etapie wchodzi ona spontanicznie w reakcję z tlenem cząsteczkowym zawartym w wodnym roztworze tego leku i oddaje mu elektron, sama ulegając utlenieniu (LACHMAN i in. 1959, MARCINIEC 1975, BIELSKI i in. 1985,). Dochodzi do wytworzenia toksycznego anionorodnika ponadtlenkowego. Norfloksacyna może ponownie zaabsorbować kwant światła, ulec redukcji i spontanicznemu utlenieniu (JONES i in. 2004).

Reakcje te przebiegają w sposób cykliczny, co jest przyczyną tak silnie destrukcyjnego wpływu światła na wodne roztwory norfloksacyny. Wobec tego, niezwykle ważne staje się odpowiednie przechowywanie tej postaci

leku, tj. w szczelnie zamkniętych i ciemnych opakowaniach. Spełnienie tych warunków pozwoli na jego dłuższe przechowywanie, gdyż będzie on w dostateczny sposób zabezpieczony przed wpływem czynników zewnętrznych, a przede wszystkim światła. Najlepszymi stabilizatorami wodnego układu norfloksacyny okazały się glukoza i kwas askorbowy (tab. 3). Wraz ze wzrostem stężenia wymienionych substancji w badanym roztworze, obserwuje się znaczne zwiększenie ilości pozostałego po naświetlaniu leku. Już 0,50% stężenie kwasu askorbowego pozwala na ochronę norfloksacyny, której ilość zmniejsza się tylko o 3,66%, zaś stężenie witaminy C, warunkujące całkowite wyparcie tlenu z badanego roztworu (2,07%), chroni aż 99,84% leku przed rozkładem w wyniku 3 h ekspozycji na promienie UV.

Natomiast glukoza w stężeniu 1% nie chroni substancji leczniczej, a zastosowana w stężeniu 2,12% (stężenie wypierające tlen) chroni przed rozkładem tylko 91,55% leku. Ochrona taka jest jednak wystarczająca, gdyż w ciągu 180 min naświetlania rozkładowi ulega mniej niż 10% substancji leczniczej, co warunkuje utrzymanie wartości farmakologicznej leku.

WNIOSKI

1. Opracowana metoda rozdziału chromatograficznego pozwala na śledzenie zmian ilościowych i jakościowych zachodzących w wodnym roztworze norfloksacyny pod wpływem tlenu cząsteczkowego, promieniowania UV i innych czynników fizykochemicznych.

2. Roztwór wodny norfloksacyny jest wrażliwy na działanie promieni słonecznych i ultrafioletowych. Wprowadzenie do układu substancji chromoforowych, a także zmniejszających poziom tlenu w roztworze umożliwia zmniejszenie wpływu światła na rozkład leku.

3. Zawartość tlenu w roztworach wodnych w stałej temperaturze rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia atmosferycznego, a maleje wraz ze wzrostem stężenia substancji pomocniczej w roztworze.

4. Nawet prawidłowe warunki przechowywania wodnego roztworu norfloksacyny nie chronią leku przed degradacją.

5. Najlepszym stabilizatorem wodnego roztworu norfloksacyny okazał się kwas askorbowy. W stopniu zadowalającym roztwór ten chroniła także glukoza. Pozostałe substancje pomocnicze i chromofory wywierają mniejszy wpływ na stabilizację norfloksacyny w roztworze, a cytrynian sodu i kwas winowy są nawet katalizatorami reakcji rozkładu w zastosowanych stężeniach.

KONKLUZJA

Badania zawartości tlenu w wodnych roztworach chromoforów potwierdziły fakt, że w stałej temperaturze rozpuszczalność tlenu w wodzie zależy od ciśnienia atmosferycznego i ilości substancji znajdującej się w roztworze. Wraz ze wzrostem ilości substancji rozpuszczonej, stężenie tlenu w wodzie maleje. Z kolei wzrost ciśnienia atmosferycznego powoduje wzrost stężenia tlenu w roztworze. Ponieważ leki w czasie przechowywania narażone są na wpływ zmian ciśnienia atmosferycznego, konieczne jest uwzględnienie tego faktu przy doborze stężenia roztworu substancji chromoforowej, dodawanego do leku w celu zabezpieczenia go przed niekorzystnym wpływem tlenu rozpuszczonego. Stężenie tego roztworu musi zapewnić minimalny poziom tlenu w zakresie możliwych zmian ciśnienia atmosferycznego.

PIŚMIENNICTWO

- ANDERSSON U., LEIGHTON B., YOUNG M.E., BLOMSTRAND E., NEWSHOLME E.A. 1998. *Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 249: 512-516.
- BIELSKI B.H.J., CABELLI D.E., ARUDI R.L., ROSS A.B. 1985. *Reactivity of HO_2/O_2^- radicals in aqueous solution*. J. Phys. Chem. Ref. Data, 14:1041 - 1100.
- FERGUSON J., JOHNSON B.E. 1990. *Ciprofloxacin-induced photosensitivity: in vitro and in vivo studies*. Brit. J. Dermatol., 123: 9-20.
- FLINT D.H., TUMINELLO J. F., EMTAGE M.H. 1993. *The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide*. J. Biol. Chem., 268: 22369-22376.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M. 1984. *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. Biochem J., 219: 1-14.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- JONES L., ATKINS P. 2004. *Chemia ogólna – cząsteczki, materia, reakcje*. PWN, Warszawa.
- LACHMAN L., COOPER J. 1959. *A Comprehensive Pharmaceutical Stability Testing Laboratory I*. J. Amer. Pharm., Ass., Sci. Ed., 48: 226
- MARCINIEC B. 1975. *Kinetyka rozkładu leków. XXXV. Stabilizacja chlorowodoru tiordazy (TP · HCl) w roztworach wodnych*. Farm. Pol., 26: 583-587.
- PAWELCZYK E., HERMANN T. 1969. *Kinetics of drug decomposition*. Dissert. Pharm. Pharmacol., 21: 268.
- PAWELCZYK E., HERMANN T., ŻAK G. 1977. *Kinetyka rozkładu leków*. Acta Polon. Pharm., 34: 69.
- PHILLIPS G., JOHNSON B.E., FERGUSON J. 1990. *The loss of antibiotic activity of ciprofloxacin by photodegradation*. J. Antimicrobial Chem., 26: 783-789.
- SUNDERLAND J., TOBIN C.M., HEDGES A.J., MACGOWAN A.P., WHITE L.O. 2001. *Antimicrobial activity of fluoroquinolone photodegradation products determined by parallel-line bioassay and high performance liquid chromatography*. J. Antimicrobial Chem., 47: 271-275.
- THOMA K., KÜBLER N. 1997. *Untersuchungen zu Fotostabilität von Gyrasehemmen*. Pharmazie, 52: 519.
- TIEFENBACHER E.M., HAEN E., PRZYBILLA B., KURZ H. 1994. *Photodegradation of some quinolones used as antimicrobial therapeuticus*. J. Pharm. Sci., 83: 463-467.
- WIENIAWSKI W., KU·MIERKIEWICZ W., JANIEC W. 1994. *Międzynarodowa harmonizacja wymagań dla leków*. Farm. Pol., 6: 229.

Jan Meler, Janusz Pluta

**WPLYW SUBSTANCJI POMOCNICZYCH NA ZAWARTOŚĆ TLENU
W WODNYCH ROZTWORACH LEKU**

Key words: chromofory, tlen, norfloksacyna, trwałość postaci leku.

Abstrakt

Wobec niezwykle szybkiego rozwoju przemysłu farmaceutycznego i wielkiej różnorodności produkowanych specyfików, problem trwałości leku nabiera ogromnego znaczenia. Tematem pracy było określenie wpływu tlenu, czasu przechowywania, światła widzialnego i ultrafioletowego na trwałość roztworów wodnych norfloksacyny i określenie optymalnych warunków ich przechowywania. Badania zawartości tlenu w wodnych roztworach chromoforów potwierdziły, że w stałej temperaturze rozpuszczalność tlenu w wodzie zależy od ciśnienia atmosferycznego i ilości substancji znajdującej się w roztworze. Wraz ze wzrostem ilości substancji rozpuszczonej, stężenie tlenu w wodzie maleje. Ponieważ leki w czasie przechowywania narażone są na wpływ zmian ciśnienia atmosferycznego, konieczne jest uwzględnienie tego faktu przy doborze stężenia roztworu substancji chromoforowej dodawane do leku w celu zabezpieczenia go przed niekorzystnym wpływem tlenu rozpuszczonego.

**EFFECT OF ADJUVANT SUBSTANCES ON THE AMOUNT OF OXYGEN
IN AQUEOUS SOLUTIONS OF A PHARMACEUTICAL**

Key words: chromophores, oxygen, Norfloxacin, durability of forms of a pharmaceutical.

Abstract

With the extremely rapid growth of the pharmaceutical industry and a wide variety of pharmaceuticals available on the market, the issue of the durability of medicinal preparations is of utmost importance. The subject of the present paper has been to determine the effect of oxygen, storage conditions, visible and ultraviolet light on the durability of aqueous solutions of Norfloxacin, and to establish optimum conditions under which such solutions should be stored. The examination of oxygen concentration in aqueous solutions of chromophores confirmed that at constant temperature solubility of oxygen in water depended on the atmospheric pressure as well as the amount of the substance present in a given solution. As the amount of the substance dissolved increased, the concentration of oxygen in water decreased. Because pharmaceutical while being stored are subjected to possible changes in the atmospheric pressure, it is necessary to account for this fact while selecting the concentration of the solution of a chromophore substance, which is added to a pharmaceutical in order to protect it against the adverse effect of dissolved oxygen.

