

# Stabilnost lijekova i kinetika degradacije farmaceutski aktivnih tvari

---

**Katovčić, Stella**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:926407>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Stella Katovčić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **STABILNOST LIJEKOVA I KINETIKA DEGRADACIJE FARMACEUTSKI AKTIVNIH TVARI**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Josip Požar  
Neposredni voditelj rada: dr. sc. Andrea Usenik

Zagreb, 2024. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

9. srpnja 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Josip Požar

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Utjecaj temperature.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>Utjecaj temperature na brzinu kemijske reakcije.....</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Utjecaj temperature na degradaciju lijekova .....</i>	<i>4</i>
<b>2.2. Utjecaj pH na degradaciju farmaceutski aktivnih tvari.....</b>	<b>7</b>
2.2.1. <i>Hidroliza estera i laktona.....</i>	<i>10</i>
2.2.2. <i>Hidroliza amida i laktama.....</i>	<i>12</i>
2.2.3. <i>Oksidacija.....</i>	<i>13</i>
2.2.4. <i>Fotodegradacija .....</i>	<i>14</i>
2.2.5. <i>Raspad poliprotoskih aktivnih tvari .....</i>	<i>15</i>
2.2.6. <i>Hidroliza aspirina .....</i>	<i>16</i>
<b>2.3. Utjecaj pufera na degradaciju farmaceutski aktivnih tvari.....</b>	<b>17</b>
2.3.1. <i>Fosfatni pufer.....</i>	<i>18</i>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXI</b>



## § Sažetak

Kinetika degradacije farmaceutski aktivnih tvari izuzetno je važna u farmaceutskoj industriji. Praćenje stabilnosti lijekova i kinetike njihove degradacije ključno je za razvoj učinkovitih farmaceutskih proizvoda te poboljšane kvalitete i produljenja roka njihova trajanja. Poznavanje faktora koji utječu na stabilnost lijekova iznimno je važno kako lijekovi ne bi gubili svoju učinkovitost, kako bi bili sigurni za korištenje te imali propisani rok trajanja. Postoje različite vrste stabilnosti lijekova: kemijska, fizikalna, mikrobiološka, terapijska te toksikološka. Faktori koji utječu na stabilnost farmaceutski aktivnih tvari u lijekovima dijele se na kemijske i fizikalne, a to su utjecaj temperature, pH, pufera, svjetlosti, vlage, prisustva kisika i drugih kemijskih spojeva. Nestabilnost lijekova se odražava u smanjenoj učinkovitosti lijeka, nastajanju toksičnih tvari tijekom raspada, smanjenju biološke dostupnosti te u promjeni u fizičkom izgledu. Razne metode poput HPLC-a, spektrofotometrije, spektroskopije NMR, konduktometrije, potenciometrije i kalorimetrije se koriste za praćenje kinetike degradacije. Osnovna načela farmaceutske kinetike mogu se mogu primijeniti za predviđanje roka trajanja i kvantificiranje neželjenih fizikalnih promjena, promjena u sastavu lijeka koje se mogu izbjeći tehnikama stabilizacije te za određivanje načina skladištenja lijekova.



## § 1. UVOD

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. World Health Organization, WHO) stabilnost lijekova definirana je kao sposobnost farmaceutske proizvoda da zadrži svoja kemijska, fizička, mikrobiološka i biofarmaceutička svojstva unutar propisanog roka trajanja.<sup>1</sup> Stabilnost lijekova se prati tijekom proizvodnje i skladištenja, a fizikalne i kemijske promjene lijeka mogu utjecati na kvalitetu, djelotvornost i sigurnost gotovog proizvoda. Stabilni lijekovi će imati duži rok trajanja te se na taj način omogućava veća dostupnost lijekova na tržištu. Faktori koji utječu na stabilnost lijekova su temperatura, pH, korištenje pufera i pomoćnih tvari, prisutnost vlage i svjetlosti. Promjenom jednog od faktora može doći do raspada aktivnih tvari pri čemu im se smanjuje učinkovitost te može doći do negativnih posljedica korištenja i stvaranja toksičnih tvari u organizmu. Pufferi se koriste kako bi se održala optimalna vrijednost pH te oni mogu sudjelovati u razgradnji i formiranju aktivnih tvari. Metode koje se koriste za određivanje koncentracije, mase i udjela aktivne tvari su tekućinska kromatografija visoke razlučivosti (engl. high performance liquid chromatography, HPLC), kvantitativni NMR (engl. quantitative nuclear magnetic resonance, q-NMR), UV-Vis spektrofotometrija te elektrokemijske metode.<sup>2</sup> Degradacija farmaceutski aktivnih tvari je uzrok nestabilnosti gotovog proizvoda. Kinetika degradacije farmaceutski aktivnih tvari opisuje brzine i mehanizme kojima se lijek razgrađuje pod različitim uvjetima. Do degradacije dolazi uslijed različitih reakcija poput solvolize, oksidacije, fotolize, (de)hidratacije, racemizacije, dekarboksilacije te oligomerizacije.<sup>2</sup> Reakcije degradacije se najčešće događaju tijekom dužeg vremenskog perioda (mjeseci i godine) dok je za sintezu aktivnih tvari u pravilu dovoljno samo nekoliko dana. Degradacija najčešće slijedi kinetiku nultog reda gdje brzina degradacije ne ovisi o koncentraciji lijeka te kinetiku prvog reda gdje ovisi o koncentraciji lijeka. Najčešće korištene metode praćenja degradacije su HPLC, NMR te spektrofotometrija koje omogućuju praćenje promjene sastava lijeka tijekom vremena te pomažu u otkrivanju degradacijskih puteva. U ovom radu će biti prikazan pregled istraživanja degradacije farmaceutski aktivnih tvari u ovisnosti o temperaturi, pH te sastavu pufera pomoću gore navedenih metoda. Utjecaj temperature bit će razmotren na temelju Arrheniusove jednadžbe pri čemu se promjenom temperature može predvidjeti stabilnost lijeka pri uvjetima skladištenja. Promjena pH vrijednosti i korištenje pufera će se promatrati ovisno o stupnju protonacije aktivnih tvari koja utječe na kinetiku degradacije.

Opisane će biti kemijske reakcije koje dovode do degradacije aktivnih tvari. Za faktore koji utječu na degradaciju na kraju će biti navedeni primjeri kako bi se pružio uvid u njihovu važnost.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Utjecaj temperature

#### 2.1.1. Utjecaj temperature na brzinu kemijske reakcije

Brzina kemijske reakcije u otopinama se definira kao vremenska derivacija koncentracije reaktanata ili produkata podijeljena s odgovarajućim stehiometrijskim koeficijentom

$$v = \frac{dc_i}{\nu_i dt}. \quad (2.1.1.1.)$$

Brzina kemijske reakcije ovisi o koncentraciji reaktanata/produkata, temperaturi te o prisutstvu katalizatora/inhibitora. Zakon brzine reakcije za npr. reakciju  $aA + bB \rightarrow cC + dD$  opisuje kako brzina reakcije ovisi o koncentracijama reaktanata:

$$v = k c_A^{n_A} c_B^{n_B} \quad (2.1.1.2.)$$

gdje  $k$  označava konstantu brzine reakcije, a eksponent  $n_A$  i  $n_B$  označavaju parcijalni red reakcije s obzirom na svaki od reaktanata. Zbroj svih parcijalnih redova reakcije daje ukupni red reakcije. Ako je neka reakcija  $A \rightarrow B$  prvog reda, prema jednadžbama 2.1.1.1. i 2.1.1.2. zakon brzine te reakcije može se zapisati na sljedeći način:

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k c_A. \quad (2.1.1.3.)$$

Ukoliko je reakcija  $A \rightarrow B$  drugog reda, izraz za zakon brzine reakcije glasi:

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k c_A^2 \quad (2.1.1.4.)$$

odnosno u slučaju da je reakcija nultog reda:  $E_a$

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k \quad (2.1.1.5.)$$

te je u tom slučaju brzina neovisna o koncentraciji reaktanata, odnosno jednaka konstanti brzine reakcije.

Temperatura je jedan od glavnih faktora koji utječu na brzinu reakcije, a time i na brzinu reakcija raspada lijekova. Konstanta brzine reakcije eksponencijalno raste s temperaturom, a ovisnost brzine kemijske reakcije o temperaturi opisuje se Arrheniusovom jednadžbom:

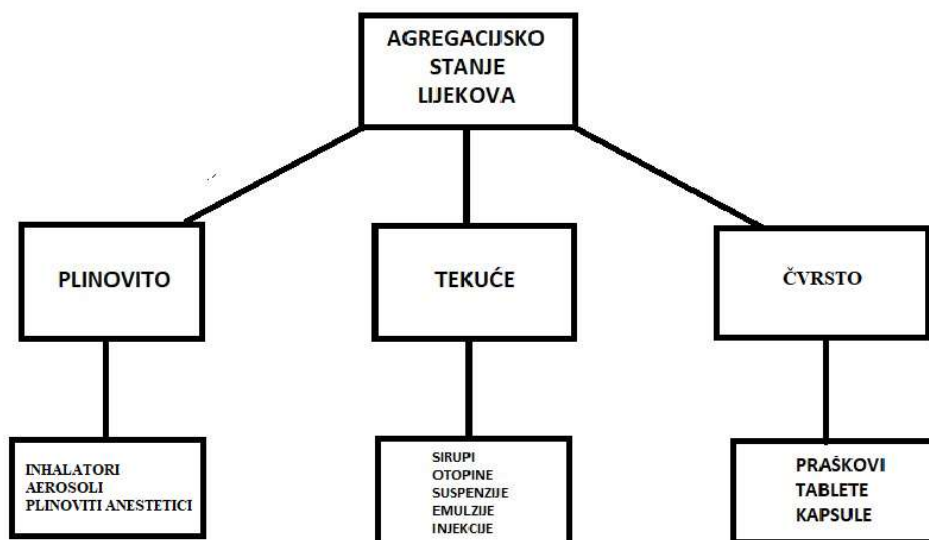
$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (2.1.1.6.)$$

gdje je  $E_a$  energija aktivacije i mjera je ovisnosti konstante brzine o temperaturi.  $A$  predstavlja predeksponencijalni faktor koji je vezan uz frekvenciju sudara reaktanata,  $R$  je opća plinska konstanta, a  $T$  je termodinamička temperatura.

Procjena odgovarajuće brzine degradacije je važna za predviđanje stabilnosti lijekova te se ona mijenja s promjenom temperature i može se predvidjeti stabilnost pri drugim temperaturama klasičnom analizom na temelju poznatih parametara Arrheniusove jednadžbe. Predviđanje odgovarajuće temperature skladištenja lijekova je izrazito bitno, a ono još ovisi i o njegovim fizičkim svojstvima odnosno postoji li lijek kao krutina ili tekućina.

### 2.1.2. Utjecaj temperature na degradaciju lijekova

Poznavanjem promjene brzine degradacije u ovisnosti o temperaturi na kvantitativan način može se predvidjeti stabilnost lijekova na drugim temperaturama. Agregacijska stanja lijekova (čvrsto, tekuće, plinovito) te njihova stabilnost pri različitim temperaturama ključni su za njihovu sigurnost i učinkovitost. S obzirom na agregacijsko stanje (slika 1), lijekovi se ponašaju različito pri različitim temperaturama skladištenja.

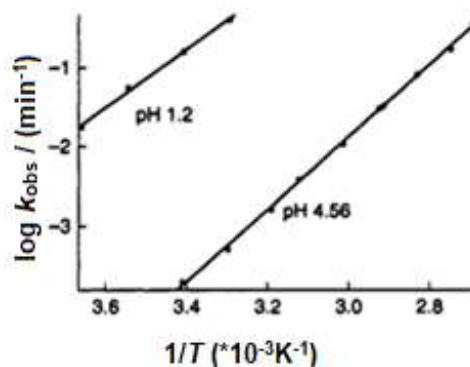


Slika 1. Agregacijska stanja lijekova i njihovi oblici.

Lijekovi u plinovitom stanju su osjetljivi na promjene temperature i tlaka. Pri niskim temperaturama se mogu komprimirati ili čak kondenzirati što utječe na količinu doziranja, dok

pri visokim temperaturama može doći do značajnijeg povećanja tlaka unutar spremnika u kojem se nalaze što utječe na sigurnost korištenja lijeka te može doći i do eksplozije spremnika. U tekućem stanju, lijekovi su u većoj ili manjoj mjeri izloženi vanjskim uvjetima pri čemu može doći do oksidacije, hidrolize i drugih kemijskih promjena.<sup>3</sup> Na niskim temperaturama može doći do kristalizacije ili taloženja aktivnih tvari, povećanja viskoznosti, te do odvajanja faza u emulzijama i suspenzijama, dok se na visokim temperaturama može ubrzati degradacija aktivnih tvari, otapalo može isparavati, viskoznost se može povećati, a time dolazi i do smanjenja stabilnosti lijekova. Budući da su reakcije čvrstom stanju znatno sporije nego u tekućoj i plinovitoj fazi, lijekovi u čvrstoj fazi su najstabilniji, ali promjene temperature mogu dovesti do faznih transformacija lijekova što može utjecati na bioraspoloživost i učinkovitost. Skladištenje pri niskim temperaturama može usporiti kemijske reakcije, a neke formulacije mogu apsorbirati vodenu paru iz zraka pri povratku na sobnu atmosferu što također smanjuje njihovu stabilnost budući da je poznato da se brzina kemijskih reakcija drastično povećava u prisustvu malih količina otapala. Na visokim temperaturama dolazi do raspada aktivnih tvari, ubrzanja kemijskih reakcija, topljenja i sublimacije nekih spojeva.<sup>4</sup>

Jedan od lijekova čija stabilnost uvelike ovisi o temperaturi i agregacijskom stanju je antibiotik penicilin. U čvrstom stanju najčešće je prisutan u obliku soli (npr. penicilin G natrij) ili kao liofilizirani prašak. U tom obliku je najstabilniji te je na sobnoj temperaturi postojeći kao liofilizirani prašak koji se može čuvati nekoliko godina ako su zaštićeni od vlage i svjetlosti.<sup>3</sup> Niske temperature poput onih u hladnjaku mogu produžiti rok trajanja jer usporavaju kemijske reakcije koje bi mogle dovesti do degradacije aktivnih tvari. Kao krutina može podnijeti uvjete skladištenja kao što je čuvanje u tami na sobnoj atmosferi, ali dugotrajno izlaganje visokim temperaturama može uzrokovati postupnu razgradnju aktivnih tvari. Na slici 2 prikazan je graf ovisnosti logaritma konstante brzine degradacije aktivne tvari penicilina G o recipročnoj temperaturi pri pH 1,2 i 4,56. Benzilpenicilin je aktivna tvar u penicilinu G te pripada u skupinu  $\beta$ -laktamskih antibiotika. Pomoću linearnog Arrheniusovog prikaza se mogu odrediti koeficijenti brzine degradacije pri drugim temperaturama, a time i koncentracija farmaceutski aktivnih tvari u vremenu, ali pod uvjetom da su predeksponencijalni faktor  $A$  i energija aktivacije  $E_a$  konstantni u danom temperaturnom rasponu.<sup>3</sup>



Slika 2. Arrheniusovi dijagrami za razgradnju penicilina G pri pH 1,2 i 4,56. Prilagođeno prema ref. 3.

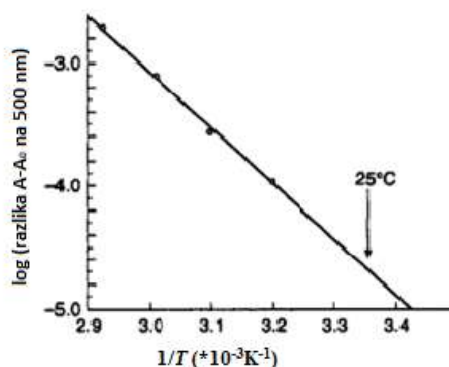
Penicilin je dostupan i kao vodena otopina koja se primjenjuje kao injekcija i tada je njegova stabilnost značajno smanjena uslijed hidrolitičke razgradnje. Hidroliza je ubrzana pri višim temperaturama dok razgradnja penicilina pri 25 °C u otopini može trajati i nekoliko dana.<sup>4</sup> Tekuće formulacije penicilina stoga se čuvaju u hladnjaku kako bi se usporila razgradnja, ali iznad ledišta. Zamrzavanjem se smanjuje učinkovitost jer dolazi do promjena u strukturi molekule penicilina tijekom degradacije aktivnih tvari.<sup>4</sup>

Kao još jedan primjer mogu se uzeti tzv. multisulfa pripravci koji su različite kombinacije sulfonamidnih antibiotika, a poput penicilina primjenjuju se u čvrstom stanju (tablete i praškovi) te kao otopine (suspencije). Stabilni su na sobnoj temperaturi, ali se stabilnost smanjuje ukoliko su izloženi vodenoj pari ili sunčevoj svjetlosti. Na visokim temperaturama se ubrzava degradacija aktivnih tvari dok na niskim temperaturama nije izražena degradacija ukoliko nema prisutnosti vodene pare dok ne dođe do kondenzacije. U otopini stabilnost je smanjena u usporedbi sa čvrstim stanjem jer može doći do hidrolize, oksidacije i mikrobiološke kontaminacije koje uzrokuju razgradnju sulfonamida. Na sobnoj temperaturi otopine mogu biti stabilne, pri višim temperaturama se ubrzava degradacija dok pri niskim temperaturama može doći do kristalizacije aktivnih tvari što otežava doziranje lijeka.<sup>3</sup> Na slici 3 prikazan je Arrheniusov dijagram za promjenu apsorbancije tekućeg multisulfa pripravka. Promjena boje, a time i apsorbancije pri određenoj valnoj duljini često je indikativna za kemijsku razgradnju aktivnih sastojaka, budući da su degradacijski produkti često drugačije boje od aktivnih tvari. Pomoću Beer-Lambertovog zakona opisuje se odnos apsorbancije i koncentracije, a koji vrijedi samo za razrijeđene otopine, glasi:

$$A = \epsilon bc \quad (2.1.2.1.)$$

$A$  označava apsorbanciju,  $\varepsilon$  apsorpcijski koeficijent,  $b$  je duljina puta zrake kroz uzorak dok  $c$  označava koncentraciju. Prema ovom zakonu, apsorbancija je proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće tvari, duljini puta svjetlosti zrake i apsorpcijskom koeficijentu. Ukoliko se vrijednost apsorbancije na određenoj valnoj duljini poveća, to znači da se više svjetlosti apsorbira, a manje prolazi ili reflektira, stoga to utječe na direktnu promjenu boje jer različite valne duljine manje ili više doprinose spektru koja se opaža. Boja koja se tada vidi rezultat je valnih duljina svjetlosti koje nisu apsorbirane. Na primjer, ako tvar apsorbira plavu svjetlost, ona će reflektirati crvenu ili zelenu te tada tvar izgleda žuto.<sup>5</sup>

Povišenje temperature uzorkuje oksidacijske procese pri čemu se boja mijenja iz bijele boje u žutu potom u smeđu, a zatim u crvenu. Pri niskim temperaturama (<15 °C) ne mora doći do promjene boje, ali dolazi do kristalizacije koja se može zamijetiti i golim okom.<sup>3</sup>



Slika 3. Arrheniusov dijagram za promjenu boje tekućeg multisulfa pripravka. Prilagođeno prema ref. 3.

## 2.2. Utjecaj pH na degradaciju farmaceutski aktivnih tvari

Utjecaj pH na degradaciju farmaceutski aktivnih tvari odražava se u različitim stabilnostima kao što su kemijska, fizikalna i biološka te utjecaj konzervansa. Vrijednost pH otopine lijeka najčešće ima značajan utjecaj na njegovu stabilnost budući da pH utječe na konstantu brzine te se npr. za promjenu jedne jedinice pH konstanta brzine može promijeniti čak za gotovo 10 puta pritom utjecaj koncentracije  $\text{H}^+$  na kinetiku raspada lijeka može biti dvojak.<sup>6</sup>

Hidroliza je raspad molekula kovalentnih kemijskih spojeva u reakciji s vodom pri čemu se vodikov atom vode spaja s jednim produktom raspada, a hidroksilna skupina s drugim produktom raspada.<sup>7</sup> Ukoliko se lijek ne (de)protonira u vodi postoje tri hidrolitička puta: specifična kiselina kataliza, hidroliza u pH neutralnim uvjetima te specifična bazna kataliza. Sukladno navedenom zakonu brzine reakcije degradacije lijeka može se zapisati na sljedeći način:

$$-\frac{dc}{dt} = k_1[\text{H}^+]c_A + k_2c_A + k_3[\text{OH}^-]c_A \quad (2.2.1.)$$

gdje  $c$  označava koncentraciju lijeka, a  $k_1 - k_3$  konstante brzine hidrolize u kiselim, neutralnim i lužnatim uvjetima. U uvjetima konstantne vrijednosti pH jednadžba 2.2.1. može se preurediti dijeljenjem s  $c$ :

$$-\frac{dc_A}{c_A dt} = k_{\text{obs}} = k_1[\text{H}^+] + k_2 + k_3[\text{OH}^-] \quad (2.2.2.)$$

gdje je  $k_{\text{obs}}$  opsežna konstanta brzine raspada. Ovisno o pH, jednadžba 2.2.2. može se pojednostaviti uvođenjem odgovarajućih aproksimacija. Pri niskim vrijednostima pH prevladava prvi član u jednadžbi 2.2.2., odnosno vrijede sljedeće relacije:

$$k_1[\text{H}^+] \gg k_2 + k_3[\text{OH}^-], \quad (2.2.3.)$$

$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{H}^+], \quad (2.2.4.)$$

te slijedi:

$$\log(k_{\text{obs}}) = \log(k_1) - \text{pH}. \quad (2.2.5.)$$

Kada je  $[\text{H}^+] \approx [\text{OH}^-]$  vrijedi:

$$k_2 \gg k_1[\text{H}^+] + k_3[\text{OH}^-], \quad (2.2.6.)$$

$$k_{\text{obs}} = k_2 \quad (2.2.7.)$$

te slijedi:

$$\log(k_{\text{obs}}) = \log(k_2). \quad (2.2.8.)$$

Kada je  $[\text{OH}^-] > [\text{H}^+]$  vrijedi:

$$k_3[\text{OH}^-] \gg k_1[\text{H}^+] + k_2, \quad (2.2.9.)$$

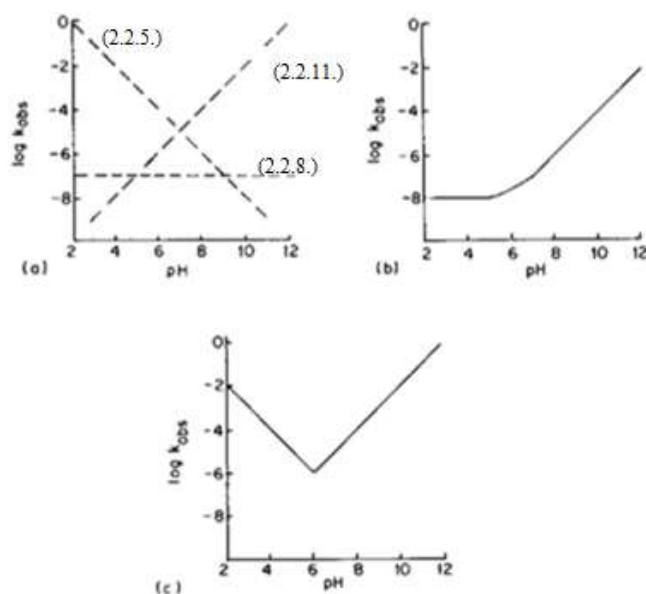
$$k_{\text{obs}} = k_3[\text{OH}^-], \quad (2.2.10.)$$

pri čemu je:

$$\log(k_{\text{obs}}) = \log(k_3) + \text{pH}. \quad (2.2.11.)$$

Ovisnost logaritma opažene konstante brzine raspada ( $k_{\text{obs}}$ ) farmaceutski aktivne tvari o pH (jednadžbe 2.2.4., 2.2.5., 2.2.7., 2.2.8., 2.2.10., 2.2.11.) prikazana je na slici 4. Isprekidane linije pokazuju kako se radi o relativnim položajima linija koje nisu fiksne već ovise o iznosu konstanti brzine.<sup>6</sup>





Slika 4. Kvalitativna ovisnost logaritma konstante brzine reakcije degradacije aktivnih tvari koje ne podliježu (de)protonaciji o pH. Prilagođeno prema ref. 6.

Ukoliko se aktivna tvar (de)protonira u jednom koraku vrijedi:

$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{H}^+]f_{\text{HA}} + k_2f_{\text{HA}} + k_3[\text{OH}^-]f_{\text{HA}} + k_4[\text{H}^+]f_{\text{A}} + k_5f_{\text{A}} + k_6[\text{OH}^-]f_{\text{A}}, \quad (2.2.12.)$$

gdje su  $k_1$ - $k_3$  kinetički parametri koji se odnose na kiselinski, a  $k_4$ - $k_6$  na bazični oblik lijeka, a  $f_{\text{HA}}$  i  $f_{\text{A}}$  faktori koji su definirani na sljedeći način:

$$f_{\text{HA}} = \frac{[\text{HA}]}{[\text{HA}] + [\text{A}]} = \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} \quad (2.2.13.)$$

$$f_{\text{A}} = \frac{[\text{A}]}{[\text{HA}] + [\text{A}]} = \frac{K_a}{[\text{H}^+] + K_a} \quad (2.2.14.)$$

Također, pH može značajno utjecati na kinetiku degradacije aktivnih tvari. Tijekom reakcija koje uzrokuju degradaciju dolazi do promjene kemijske strukture aktivnih sastojaka stoga te reakcije mogu rezultirati manje topljivim razgradnim produktima. Ukoliko se ostvaruju interakcije razgradnog produkta s farmaceutski aktivnim tvarima mogu nastati supramolekulske vrste koje su slabije topljive. Također s farmaceutski aktivnim tvarima može reagirati i razgradni produkt pri čemu nastaje kovalentna veza, a nastali spoj može biti manje topljiv od aktivne tvari. Spojevi poput estera, laktona, amida i laktama, motiva koji su često prisutni u brojnim lijekovima poput antibiotika, mogu se puno brže hidrolizirati pri velikim vrijednostima pH.<sup>3</sup> Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj dolazi do gubitka elektrona pri čemu se mijenja

oksidacijsko stanje atoma, iona ili molekula. Dio je redoks procesa tijekom kojeg se odvijaju reakcije oksidacije i redukcije istovremeno. Najčešće je povezana s reakcijama koje uključuju kisik, a katalizirane su kationima prijelaznih metala. Tijekom oksidacije dolazi do gubitka učinkovitosti lijeka, a ona može biti brža pri određenim pH vrijednostima. Fizikalna stabilnost se odražava na topljivost lijeka te se aktivne tvari mogu taložiti pri određenim pH vrijednostima te može doći do promjene u njihovoj strukturi pri čemu će se smanjiti biološka raspoloživost. Mikrobiološka stabilnost se objašnjava na način da određene pH vrijednosti mogu poticati rast mikroorganizama što utječe na stabilnost, a ujedno i sigurnost lijeka. Vrijednost pH još utječe i na konzervanse koji se nalaze u lijekovima te može smanjiti njihovu učinkovitost, a time i vijek trajanja lijeka.

### 2.2.1. Hidroliza estera i laktona

Mnogi lijekovi sadrže estersku vezu. Esteri su produkti reakcije esterifikacije, odnosno reakcije između alkohola i kiselina. Najčešći su esteri karboksilnih kiselina no mogu biti i esteri sulfonske, karbaminske i sulfaminske kiseline. Primarno se hidroliziraju nukleofilnim napadom hidroksidnog iona ili vode na ester (slika 5).<sup>8</sup>



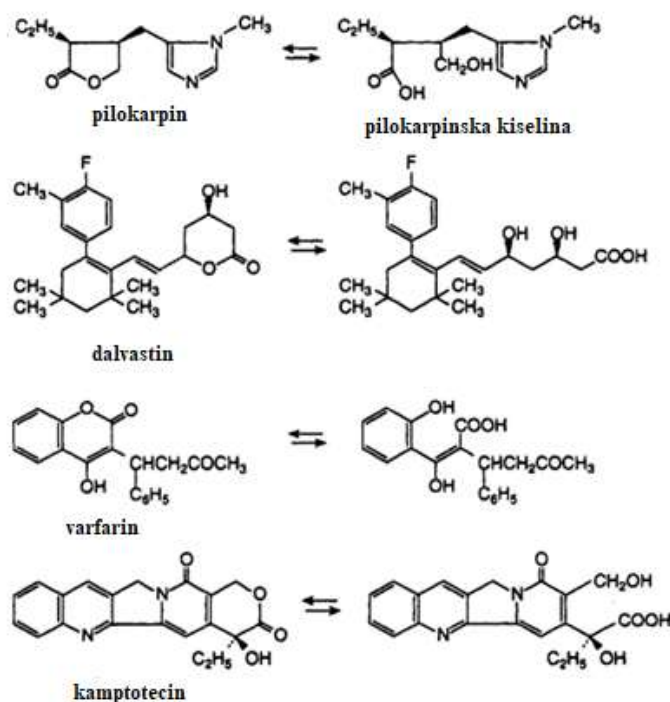
Slika 5. Hidroliza estera karboksilne kiseline. Prilagođeno prema ref. 3.

Hidroliza estera se može odvijati u kiselim i bazičnim uvjetima. Hidroliza pri niskim vrijednostima pH ravnotežna je kemijska reakcija, koja se naziva esterifikacija, katalizirana najčešće nekom jakim kiselinom, poput klorovodične (HCl) ili sumporne (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), koja dovodi do nastanka kovalentne veze između kiseline i alkohola. Pri visokim vrijednostima pH, hidroliza estera se još naziva i saponifikacija, a reakcija ne dovodi do uspostave kemijske ravnoteže. Ester reagira s bazom te nastaju karboksilatna sol i alkohol.

Brzina razgradnje ovisi o supstituentima na kiselinskom (R<sub>1</sub>) i alkoholnom (R<sub>2</sub>) dijelu molekule (slika 5) pri čemu elektron-akceptorske skupine ubrzavaju hidrolizu, dok je elektron-donorske skupine inhibiraju. Na primjer, supstituirani benzoati koji imaju elektron akceptorske skupine kao što je nitro skupina brže se razgrađuju od nesupstituiranog benzoata. Brzina hidrolize će se tako smanjivati povećanjem alkilne skupine u alkoholnom dijelu estera (R<sub>2</sub>).

Brzina se može promatrati u ovisnosti o izlaznom alkoholu tijekom reakcije eliminacije pri čemu je izlazna skupina  $R_2-OH$  te tada brzina hidrolize ovisi o sposobnosti izlaznog alkohola da na atomu kisika zadrži elektrone. Kod alkohola manjih  $pK_a$  vrijednosti hidroliza će biti mnogo brža, na primjer hidroliza fenil-benzoata je mnogo brža od hidrolize etil-benzoata jer  $pK_a$  vrijednost etanola iznosi 18, a fenola 10.<sup>3</sup> Ukoliko su  $R_1$  i  $R_2$  velike skupine smanjuje se brzina hidrolize. Primjerice, ukoliko je izopropilna skupina supstituirana hidroliza je značajno sporija.

Laktoni (ciklički esteri) također se mogu hidrolizirati. Kao što je prikazano na slici 6, kod pilokarpina, dalvastatina, valfarina i kamptotecina dolazi do otvaranja prstena tijekom hidrolize. Laktoni su, za razliku od ravnolančanih estera, često u ravnoteži sa svojim oblicima karboksilne kiseline odnosno karboksilata.



Slika 6. Reprezentativni laktoni bitni u farmaceutskoj industriji koji su osjetljivi na hidrolizu. Prilagođeno prema ref. 3.

U tablici 1 prikazane su različite prividne konstante brzine ( $k_{obs}$ ) hidrolize različitih estera karboksilne kiseline za usporedbu njihove reaktivnosti. Prividna konstanta brzine se koristi kada se složene reakcije pojednostavljuju zbog određenih uvjeta. To je konstanta brzine reakcije koja se koristi za opisivanje brzine reakcije, ali nije prava konstanta brzine jer uključuje varijacije u koncentraciji određenih reaktanata ili katalizatora koji se smatraju konstantnim ili su prisutni u velikom suvišku. Primjenjuje se ukoliko je reakcija pseudo-prvog reda, kada se

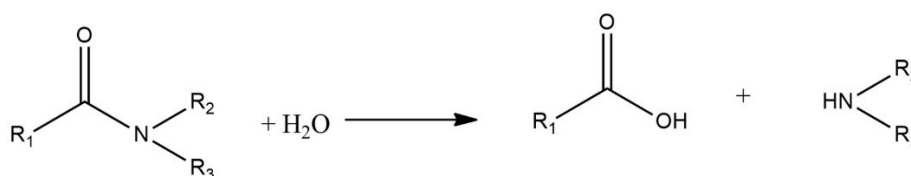
koristi katalizator (brzina reakcije je ovisna samo o koncentraciji supstrata dok je koncentracija katalizatora konstantna) te u složenijim reakcijskim mehanizmima (jedan korak je vrlo spor I određuje ukupnu brzinu kemijske reakcije). Vrijednosti su dobivene pri različitim uvjetima pH, ionske jakosti i vrstama pufera, stoga služe samo za grubu usporedbu.<sup>3</sup>

Tablica 1. Prividne konstante brzina ( $k$ ) za hidrolizu različitih estera karboksilnih kiselina pri 25 °C. Prilagođeno prema ref. 3.

ESTER KARBOKSILNE KISELINE	$k / (s^{-1})$	pH
kamptotecin	$6,0 \cdot 10^{-5}$	7,13
aspirin	$3,7 \cdot 10^{-6}$	6,90
benzokain	$5,7 \cdot 10^{-8}$	9,2
etilparaben	$4,2 \cdot 10^{-8}$	9,16

### 2.2.2. Hidroliza amida i laktama

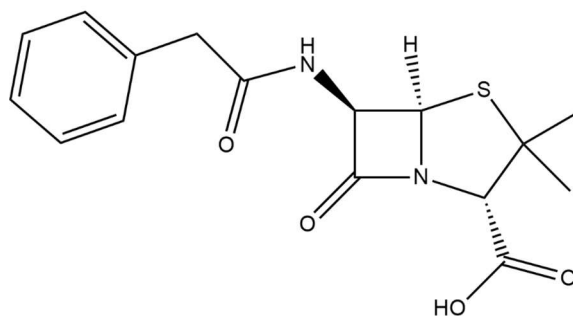
U lijekovima se često nalaze amidne veze. Amidne veze su, za razliku od esterskih veza, manje osjetljive na hidrolizu jer je karbonilni ugljik manje elektrofilan, a izlazna skupina (amin) je lošija izlazna skupina od alkohola. Na slici 2 prikazana je shema hidrolize amida pri kojoj dolazi do reakcije amida i vode pri čemu nastaju karboksilna kiselina i amonijak ili amonijeva sol.<sup>7</sup>



Slika 7. Hidroliza amida. Prilagođeno prema ref. 1.

Reakcija hidrolize amida može biti katalizirana kiselinama, bazama ili enzimima. Neki lijekovi su dizajnirani kao pro-lijekovi gdje amidna veza nužno treba biti hidrolizirana kako bi se oslobodile aktivne tvari u lijeku. Hidroliza amida može služiti kao put za deaktivaciju lijekova omogućujući njihovu pretvorbu u neaktivne ili manje toksične oblike. Produkti razgradnje se zatim lakše izlučuju iz organizma putem urina ili žuči. Hidroliza amida još može utjecati na stabilnost lijekova tijekom skladištenja gotovog proizvoda ili tijekom konzumacije u organizmu. Lijekovi koji sadrže amidne veze mogu biti podložni razgradnji ako su izloženi vodenoj pari u atmosferi ili se nalaze u otopinama različitih vrijednosti pH.

Na primjer na penicilin<sup>3</sup>, koji je  $\beta$ -laktamski antibiotik, promjene pH značajno utječu na njegovu učinkovitost. Penicilin G (benzilpenicilin, slika 8) je prvi otkriven prirodni penicilin koji se sastoji od  $\beta$ -laktamskog i tiazolidinskog prstena te se najčešće koristi u lijekovima.

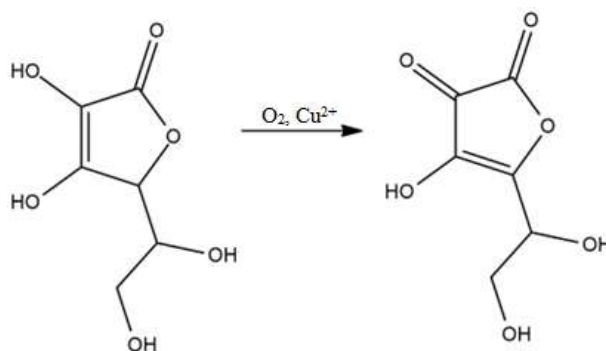


Slika 8. Kemijska struktura benzilpenicilina.

Tijekom hidrolize dolazi do brzog otvaranja prstena. Pri  $\text{pH} < 4$ , penicilin je relativno nestabilan jer dolazi do brze hidrolize što rezultira smanjenjem aktivnosti. Tijekom hidrolize može prijeći u inaktivne metabolite što dovodi do smanjenja učinkovitosti lijeka. U tom slučaju se često koriste puferi kako bi se smanjila razgradnja u navedenim uvjetima. U slučaju kada je  $\text{pH} 4 - 7$ , tada je relativno stabilan. Stabilnost tada varira ovisno o prisutnosti drugih kemijskih sastojaka. Iako je stabilniji u neutralnim uvjetima, i dalje može biti podložan sporij hidrolizi. U uvjetima  $\text{pH} > 7$ , penicilin je izrazito nestabilan. Značajno se ubrzava hidroliza, a  $\beta$ -laktamski prsten se otvara što dovodi do gubitka aktivnosti antibiotika, stoga se koriste puferne otopine kako bi se osigurala učinkovitost antibiotika i minimalizirala hidroliza.<sup>9</sup>

### 2.2.3. Oksidacija

Oksidacija je jedan od načina razgradnje farmaceutskih proizvoda. Odvija se izloženošću farmaceutskih proizvoda kisiku kojeg ima puno u okolišu tijekom proizvodnje ili dugotrajnog skladištenja. Mehanizmi oksidacije lijekova ovise o kemijskoj strukturi lijeka i prisutnosti reaktivnih kisikovih spojeva ili drugih oksidansa. Kao primjer može se navesti oksidacija askorbinske kiseline koja se oksidacijom pretvara u dehidroskorbinsku kiselinu.<sup>3</sup> Proces je važan u biološkim sustavima jer je askorbinska kiselina snažan antioksidans, a njena sposobnost da se oksidira omogućava neutralizaciju slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva (slika 8).

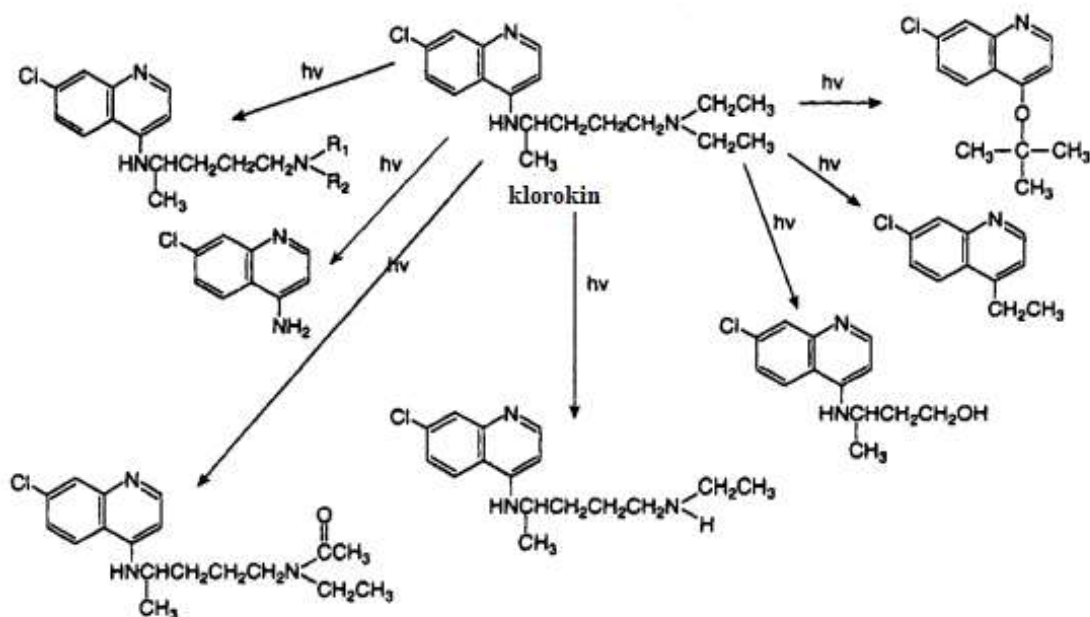


Slika 9. Oksidacija askorbinske kiseline.

Askorbinska kiselina je snažan redukcijski agens i lako se oksidira pretvarajući se u dehidroaskorbinsku kiselinu. Oksidacija askorbinske kiseline može se postići kationima prijelaznih metala (npr. askorbinska kiselina reducira Cu<sup>2+</sup> u Cu<sup>+</sup>, a ona se sama oksidira u dehidroaskorbinsku kiselinu), uz pomoć molekuskog kisika (potrebni su katalizatori poput metalnih iona te se askorbinska kiselina polako pretvara u dehidroaskorbinsku kiselinu, a kisik se reducira u vodikov peroksid), pomoću enzima askorbat oksidaza (specifični katalizator) te korištenjem kemijskih oksidansa (kalijev permanganat (KMnO<sub>4</sub>), jod (I<sub>2</sub>) ili vodikov peroksid(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)). U prvoj fazi molekula aspirina gubi dva protona i dva elektrona pretvarajući se u askorbatni radikal. To je ravnotežan proces što omogućava regeneraciju askorbinske kiseline u određenim uvjetima. U sljedećem koraku askorbatni radikal gubi dodatni elektron i nastaje dehidroaskorbinska kiselina te je taj proces ravnotežan u fiziološkim uvjetima.<sup>3</sup>

#### 2.2.4. Fotodegradacija

Fotodegradacija je čest proces razgradnje ljekovitih tvari pri kojem dolazi do razgradnje pod utjecajem svjetlosti, posebice UV zračenja i često je popraćena oksidacijom.<sup>3</sup> Tijekom fotodegradacije dolazi do smanjenja množine ili koncentracije aktivnih tvari te dolazi do njihove transformacije u produkte koji su manje aktivni te se na taj način smanjuje učinkovitost lijeka i nastaju toksični nusprodukti. Na fotodegradaciju utječu valna duljina svjetlosti, prisutnost kisika i kemijska struktura. Spojevi s dvostrukim vezama, aromatskim prstenovima i karbonilnim grupama su češće osjetljiviji od zasićenih ugljikovodika i alifatskih kemijskih spojeva. Mehanizmi su vrlo složeni kao što je prikazano na primjeru klorokina (slika 9).<sup>3</sup>

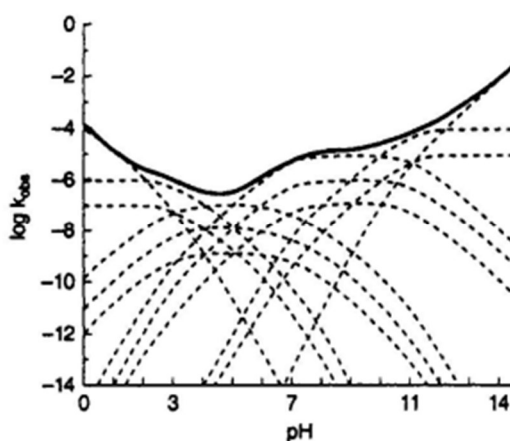


Slika 10. Fotodegradacija klorokina. Prilagođeno prema ref. 3.

Kada je klorokin izložen UV zračenju, dolazi do apsorpcije kvanta elektromagnetskog zračenja (fotona). Pri tome dolazi do pucanja kemijskih veza i stvaranja reaktivnih radikala što dovodi do razgradnje molekule pri čemu nastaju različiti derivati ishodnog spoja odnosno aktivne tvari. Mehanizam i produkti fotodegradacije će biti različiti ukoliko se klorokin nalazi u otopini ili čvrstom obliku ovisno o prisutnosti svjetla. Klorokin na taj način gubi svoju terapijsku učinkovitost čime postaje neefikasan za liječenje malarije, autoimunih bolesti i ostalih bolesti. Produkti mogu biti izrazito toksični te mogu izazvati opasne nuspojave kod pacijenta. Iz navedenog se razloga lijekovi poput klorokina najčešće pakiraju u tamne bočice ili blister pakiranja koja štite od izloženosti svjetlu te se čuvaju udaljeni od sunčeve svjetlosti.<sup>9</sup>

### 2.2.5. Raspad poliprotoskih aktivnih tvari

Vrijednost pH (koja ovisi o koncentraciji vodikovih i hidroksidnih iona) može imati vrlo složen utjecaj na kinetiku raspada u slučaju kada spoj ima više skupina koje se mogu (de)protonirati. Kako je vidljivo na slici 11, koeficijent brzine reakcije degradacije povećava se s porastom vrijednosti pH otopine. Isprekidane krivulje prikazuju doprinose svih reakcija koje se događaju, dok puna krivulja predstavlja prividnu konstantu brzine ( $k_{obs}$ ) u ovisnosti o pH za razgradnju slabe baze s tri ionizirajuće grupe (slika 11).<sup>3</sup>

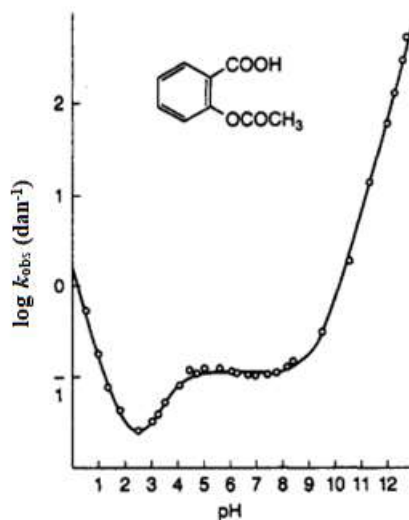


Slika 11. Ovisnost logaritma prividne konstante brzine degradacije baze s tri protonirajuće grupe. Preuzeto iz ref. 3.

### 2.2.6. Hidroliza aspirina

Primjer koji opisuje ovisnost konstante brzine o pH objasniti će se na hidrolizi aspirina. Aspirin, koji sadrži acetilsalicilnu kiselinu kao aktivnu tvar, može se hidrolizirati, a brzina hidrolize ovisi o vrijednosti pH otopine. U uvjetima niske pH vrijednosti poput onih u želucu, aspirin je relativno stabilan, ali u uvjetima niske pH vrijednosti ( $\text{pH} < 3$ ) može doći do spore hidrolize aspirina do salicilne i octene kiseline. Kod  $\text{pH} 4 - 7$  hidroliza aspirina se odvija sporije, ali je i dalje moguća. Kada je vrijednost pH medija viša od  $\text{pH} = 7$  poput onih u tankom crijevu aspirin se može brže hidrolizirati. Hidrolizom aspirina nastaju salicilna i octena kiselina, koje se mogu dalje metabolizirati. Octena kiselina je nusprodukt hidrolize acetilne skupine. Ukoliko se metabolizira ulazi u Krebsov ciklus i potom sudjeluje u sintezi ATP-a ili se može neutralizirati do acetatnih iona koji su manje reaktivni i mogu cirkulirati u krvotoku prije izlučivanja ili metaboličke uporabe. Hidroliza aspirina je značajno ubrzana u prisutnosti vodene pare, kiselina ili baza (slika 7).<sup>3</sup>





Slika 12. Ovisnost prividne konstante brzine ( $k_{\text{obs}}$ ) hidrolize aspirina o pH pri 17 °C. Prilagođeno prema ref. 3.

### 2.3. Utjecaj pufera na degradaciju farmaceutski aktivnih tvari

Kod velike većine otopina lijekova, odnosno kod onih gdje dolazi do uspostavljanja kiselinско-bazne ravnoteže, potrebno je koristiti puferе kako bi se osigurala stalna (i optimalna) pH vrijednost otopine lijeka. Budući da distribucija protonacijskih formi lijeka ovisi o pH otopine lijeka, a njihova je stabilnost nerijetko različita, stabilnost otopine lijekova uglavnom izrazito ovisi o vrijednosti pH formulacije.<sup>6</sup> Optimalna vrijednost pH bi u kontekstu stabilnosti nekog lijeka bila vrijednost pri kojoj je rok trajanja lijeka najveći. Nadalje, održavanjem vrijednosti pH izravno utječe na brzinu hidrolitičkih, oksidacijskih i drugih degradacijskih procesa, budući da brzina tih reakcija vrlo često ovisi o koncentraciji vodikovih (ili hidroksidnih) iona. Također, prisustvo pufera može utjecati i na procese poput reakcija slobodnih radikala, gdje puferske komponente utječu na ravnotežu nastajanja slobodnih radikala koji sudjeluju u lančanim reakcijama. Jednadžba koja opisuje konstantu brzine razgradnje uz pretpostavku da monoanion ili dianion fosforne kiseline sudjeluje u razgradnji aktivnih tvari glasi:

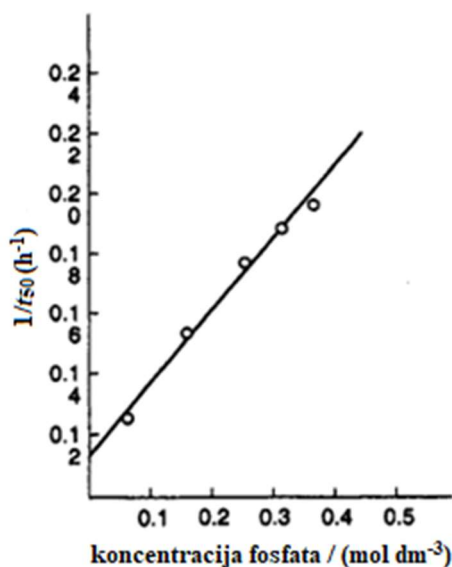
$$k_{\text{obs}} = k_{\text{H}^+}a_{\text{H}^+} + k_{\text{H}_2\text{O}} + k_{\text{OH}^-}a_{\text{OH}^-} + k_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}a_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} + k_{\text{HPO}_4^{2-}}a_{\text{HPO}_4^{2-}} \quad (2.3.1.)$$

Puferi sudjeluju u formiranju i razgradnji aktivnih tvari te određuju brzinu reakcije. Utječu na kinetiku degradacije tako što mogu promijeniti red reakcije (može se mijenjati red reakcije ovisno o utjecaju koncentracije vodikovih iona na brzinu reakcije) te prividnu konstantu brzine. Ukoliko lijek podliježe kiseloj ili baznoj katalizi, pH se značajno mijenja te s njim i konstanta brzine reakcije koja ovisi o koncentraciji vodikovih i hidroksidnih iona. Utječu na kiselinско-

bazne katalizirane reakcije jer kontroliraju koncentraciju vodikovih i hidroksidnih iona koje utječu na brzinu razgradnje aktivnih tvari. Pufferi mogu djelovati i kao katalizatori reakcija na način da anioni ili kationi koji čine puffer mogu direktno utjecati na brzinu reakcije sudjelujući u mehanizmu razgradnje. Pufferi još imaju mogućnost smanjenja interakcija između aktivnih farmaceutskih tvari i pomoćnih tvari pri čemu se održava stabilnost i homogenost lijeka, mogu povećati topljivost lijeka koja dovodi do potrebne količine doziranja lijeka u organizmu te spriječiti njegovu kristalizaciju kako bi se osigurala biološka raspoloživost.

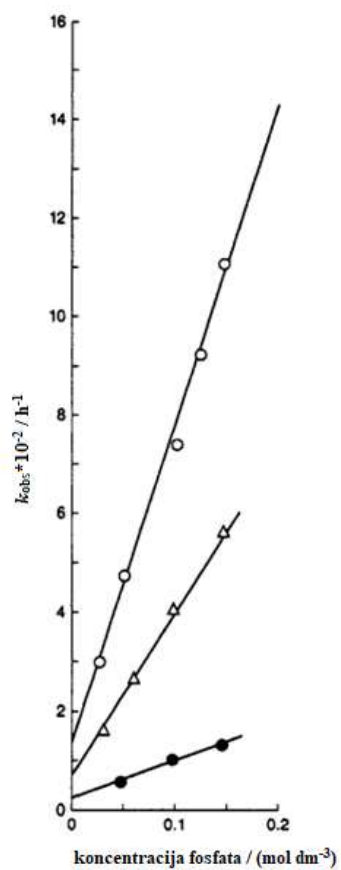
### 2.3.1. Fosfatni puffer

Fosfatni puffer koristi se kada je potrebno održavati formulacije pH u području 5,8 – 8,0. Sastoji se od monofosfatnog i difosfatnog aniona. Često se koristi u biološkim preparatima, injekcijama te u oftamološkim proizvodima (kapi za oči). Fosfatni puffer se često koristi u kloramfenikolu, antibiotiku koji je učinkovit za široki spektar bakterija. Održavanje optimalnog pH ključno je za njegovu učinkovitost i sigurnost. Kloramfenikol je osjetljiv na izrazito niske i visoke vrijednosti pH, a stabilan je u blago kiselom pH te pri  $\text{pH} = 7$ , stoga se koristi fosfatni puffer za održavanje odgovarajuće pH vrijednosti. Održavanje pH 6,0 – 7,5 smanjuje mogućnost hidrolize i osigurava sigurnost korištenja lijeka za vrijeme roka valjanosti. Korištenjem fosfatnog pufera zadržava se antimikrobna učinkovitost te se istovremeno smanjuje iritacija kod primjene. Na slici 13 prikazan je utjecaj koncentracije fosfata na brzinu hidrolize kloramfenikola ( $1/t_{50}$ ) gdje se vidi da se brzina hidrolize smanjuje što je prisutna veća koncentracija fosfatnog pufera.<sup>3</sup>



Slika 13. Utjecaj koncentracije fosfata na brzinu hidrolize (prikazano pomoću recipročne vrijednosti poluživota u satima) kloramfenikola pri pH 7,00 i 97,3 °C. Prilagođeno prema ref. 1.

Najčešće korišteni fosfatni pufer sadrži natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ), natrijev fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) i kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) te održava pH oko 7,4 i često se koristi u biološkim eksperimentima. Postoji i fosfatni pufer s različitim pH jer se sastoji od različitog omjera mononatrijeva fosfata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) i dinatrijevog fosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) budući da je mononatrijev fosfat kiselina, a dinatrijev fosfat baza. Također postoje puferi koji se koriste za specifične primjene s dodatkom kalcija, magnezija ili drugih iona koji se koriste u specifičnim biološkim procesima. Različite vrste fosfata (npr. kalijev fosfat) pospješuju razgradnju različitih ljekovitih tvari kao što su benzil-penicilin, cefadroksilm i karbenicilin (slika 14). Različite prethodno navedene vrste fosfatnog pufera mogu djelovati i kao Lewisova kiselina ili baza kroz nukleofilne ili elektrofilne mehanizme.



Slika 14. Utjecaj koncentracije fosfata na brzinu hidrolize reprezentativnih aktivnih tvari za koje se promatra kataliza fosfatnog pufera. (○ – benzilpenicilin pri 60 °C i pH = 7,05; Δ - cefadoksil pri 35 °C i pH = 7,20; ● – karbenicilin pri 35 °C i pH = 7,48). Prilagodeno prema ref. 3.

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. (datum pristupa 18.07.2024.)  
[https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2008/6\\_Annex\\_5\\_report\\_34.pdf](https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2008/6_Annex_5_report_34.pdf)
2. Predavanja iz kolegija Fizikalno-kemijske metode istraživanja lijekova, 2023.godina, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
3. Sumie Yoshioka, Valentino J. Stella, *Stability of Drugs and Dosage Forms*, Kluwer Academic Publisher, New York, 2022. (str. 5. – 12., 18., 24. – 29., 61. – 99.)
4. "Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics" (Leon Shargel, Andrew B.C. Yu)
5. Predavanja iz kolegija Analitička kemija 2, 2024.godina, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
6. J. Keith Guillory, Rolland I. Poust, *Moder Pharmaceutics*, New York, 2002. (poglavlje 6.)
7. L. G. Wade, ml., *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2017.
8. Muhammad Sajid Hamid Akash, Kanwal Rehman, *Drug stability and Chemical Kinetics*, Springer, Singapore, 2021.
9. A. Albin, E. Fasani, *Drugs Photochemistry and Photostability*, The Royal Society of Chemistry, 1998. (str. 92. – 96.)