

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Sledování stability infúzních roztoků
obsahujících aminokyseliny

(Rigorózní práce)

Hradec Králové 2007

Martin Konečný

Děkuji Doc. RNDr. Miroslavu Poláškov, CSc. a RNDr. Ladislavu Drožovi, Ph.D. za odborné vedení mé rigorózní práce.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Cíle.....	7
3. Teoretická část.....	8
3.1. Infúzní přípravky a jejich použití.....	8
3.1.1. Roztoky elektrolytů.....	9
3.1.1.1. Izoiontové roztoky	10
3.1.1.2. Hypoiontové roztoky.....	10
3.1.1.3. Hyperiontové roztoky.....	10
3.1.1.4. Koncentráty na injekce a intravenózní infúze.....	11
3.1.1.5. Hypertonické a osmoticky účinné infúzní přípravky.....	11
3.1.2. Koloidní infúzní roztoky.....	11
3.1.3. Infúzní přípravky pro parenterální výživu.....	12
3.1.3.1. Roztoky sacharidů.....	12
3.1.3.2. Tukové emulze.....	12
3.1.3.3. Roztoky aminokyselin.....	13
3.2. Stabilita.....	15
3.2.1. Stabilita léčiv a léčivých přípravků.....	17
3.2.2. Extrapolace doby použitelnosti.....	20
3.2.3. Faktory ovlivňující stabilitu.....	23
3.2.3.1. Faktory vnější a vnitřní	23
3.2.3.2. Faktory fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické.....	24
3.2.3.2.1. Fyzikální faktory.....	24
3.2.3.2.2. Chemické faktory	24
3.2.3.2.3. Mikrobiologické faktory.....	30
3.3. Disiřičitan sodný.....	30
3.3.1. Fyzikální vlastnosti.....	30
3.3.2. Stabilita a podmínky skladování.....	31
3.3.3. Využití ve farmacii.....	31
3.3.4. Inkompatibility.....	32

3.3.5. Toxicita siřičitanů.....	32
3.4. Metody stanovení disiřičitanů.....	34
4. Experimentální část.....	35
4.1. Obecné poznámky.....	35
4.2. Příprava odměrných roztoků.....	37
4.3. Provedení zkoušek.....	38
4.3.1. Stanovení hodnoty tlaku vzduchu a obsahu kyslíku nad hladinou roztoků směsí aminokyselin a roztoků samostatných aminokyselin ve skleněných lahvích.....	38
4.3.2. Stanovení siřičitanů v roztocích směsí aminokyselin a roztoků samostatných aminokyselin.	39
4.3.3. Stanovení absorbance.....	40
5. Výsledky a diskuze.....	42
6. Závěr.....	56
7. Použitá literatura.....	58
8. Seznam příloh.....	63

Seznam použitých zkratek

ppm	parts per milion, např. 1mg/kg
Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	asparagin
Asn	kyselina asparagová
Cys	cystin
Gln	glutamin
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
His	histidin
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
Ser	serin
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin
WHO	světová zdravotnická organizace
TPN	úplná parenterální výživa

1. Úvod

Organismus funguje jako termodynamický systém, který získává energii z chemických vazeb látek obsažených v potravě a přeměňuje ji na mechanickou, elektrickou a tepelnou energii.

Výživa má velmi významnou roli ve vývoji lidské společnosti a pro udržení zdravotního stavu organismu. Nesprávná výživa může usnadnit vznik některých onemocnění, a naopak řada zdravotních poruch ovlivňuje stav výživy (např. kareční výživa při nádorových onemocněních, infekcích, gastrointestinálních onemocněních, chorobách jater, ledvin srdce a plic). Jednotlivé druhy parenterálních přípravků mají své specifické funkce, vlastnosti a účinky, jež se navzájem doplňují a vytváří tak vyrovnanou energetickou paletu.

Podávání výživných roztoků aminokyselin představuje základní kámen, na kterém staví parenterální výživa. Přitom složení roztoku aminokyselin musí odpovídat potřebám organismu a respektovat vztahy mezi jednotlivými aminokyselinami¹. Vodné roztoky aminokyselin jsou dlouhodobě nestabilní, a to zejména ve styku se vzdušným kyslíkem. Působení kyslíku lze minimalizovat současným použitím vhodného obalu včetně inertní atmosféry a stabilizátoru. Nezbytnou vlastností stabilizátoru je jeho kompatibilita s rozpuštěnými aminokyselinami. Nejčastějším stabilizátorem, který se používá nejen pro roztoky aminokyselin², je disířičitan sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Tato látka však může způsobit alergickou reakci včetně anafylaktické reakce (nevolnost, zčervenání kůže, svědění, kýchání, kopřivka, kašel, obtížné dýchání) a bronchospasmus (záchvatovité zúžení průdušek), především u pacientů s průduškovým astmatem nebo s alergií.³ Optimalizace množství stabilizátoru je dána požadavkem evropské direktivy pro kvalitu léčiv.⁴ Vhodná metodika pro monitorování změn koncentrace stabilizátoru během výroby, skladování a stabilitního zkoušení je nezbytností pro farmaceutický vývoj v této oblasti. Rigorózní práce se teoreticky i experimentálně zabývá sledováním stability infúzních roztoků obsahujících aminokyseliny, zejména aminokyselinami, které jsou nejvíce odpovědné za jejich nestabilitu.

2. Cíle

Cílem této rigorózní práce bylo:

1. Zjistit příčinu nestability komerčně vyráběných roztoků Neonutrinu 5%, Neonutrinu 10%, Nutraminu N8%.
2. Identifikovat aminokyseliny, které se podílí na nestabilitě infúzních roztoků aminokyselin .
3. Identifikovat faktory, které ovlivňují dobu použitelnosti Neonutrinu 5%, Neonutrinu 10% a Nutraminu N8%.
4. Stanovit vliv výrobcem zavedených stabilizátorů na roztoky volných aminokyselin a jejich směsí.
5. Studium optimalizace provedení sterilizace infúzních roztoků volných aminokyselin a jejich směsí.

3. Teoretická část

Parenterální léky jsou určeny k podání injekcí, infúzí nebo implantací do lidského nebo zvířecího těla. Musí být sterilní a připravovat se metodami, které zajišťují sterilitu a při nichž se zabrání vstupu kontaminace, přítomnosti pyrogenů a růstu mikrobů. Při výrobě parenterálií se mohou použít pomocné látky na izotonaci, nastavení pH, zvýšení rozpustnosti, ochranu léčiva a zachování potřebných antimikrobiálních vlastností.

Nádoby na parenterália (ampulky, injekční lékovky) se mají pokud možno vyrábět z transparentního materiálu, aby byla možná kontrola čistoty, popřípadě zbarvení obsahu.

3.1. Infúzní přípravky a jejich použití

Parenterália jsou rozsáhlou, technologicky náročnou skupinou léků. Jejich použití se rozšířilo zejména po druhé světové válce.⁵ Obsahují léčiva téměř ze všech farmakologických skupin a při některých indikacích jsou nezastupitelná. Infúze se uplatňují jako náhrada krve a krevních derivátů a tělesných tekutin při jejich velkých ztrátách. Slouží k parenterální výživě, jako zdroj sacharidů, aminokyselin, tuků, vitamínů a minerálních látek, používají se v osmotické terapii, k vylučování vody z tkání hypertonickými roztoky cukrů, polyolů nebo močoviny, k peritoneální dialýze při insuficienci ledvin, na omývání a perfúze.^{6,7}

3.1.1. Roztoky elektrolytů

Podle obsahu iontů lze roztoky elektrolytů rozdělit na izoiontové, hypoiontové, hyperiontové.

Tab. č. 1: Roztoky elektrolytů.⁶

Roztok	100 ml obsahuje elektrolyty (mmol)						Glukóza (g)	Osmolarita mOsm.l ⁻¹	Indikace
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	mléč.	HCO ₃ ⁻			
chloridu sodného 0,9% (fyziologický)	154			154				308	Hypotonická dehydratace. Náhrada plazmy izotonickou kapalinou, ztráta extracelulární kapaliny. Krátkodobá náhrada objemu. Nosič kompatibilních léčiv.
Ringerův	147	4	2 3	155,5				308	
Hartmannův, složený roztok mléčnanu sodného	131	5	4	112	28			278	
Darrowův plný	120	36		104	52			312	Ztráta kapalin bohatých na K ⁺
Darrowův poloviční	60	36		104	52			312	Hypertonická dehydratace, ztráta kapalin bohatých na K ⁺
Darrowův poloviční s glukózou 2,5%	60	18		52	20	25		295	
Hydrogenuhlíčitanu sodného 4,2%	500						500	1000	Metabolická acidóza
Hydrogenuhlíčitanu sodného 8,4%	1000						1000	2000	

3.1.1.1 Izoiontové roztoky (plné elektrolytové roztoky, roztoky bez volné vody)

Obsah iontů se blíží obsahu iontů v extracelulární tekutině. Obsahují chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, chlorid hořečnatý, popř. mléčnan, octan nebo jablečnan sodný. Náhrada ostatních iontů obsažených v lidské plazmě je obtížná, neboť vznikají například zákaly a sraženiny. Ty tvoří zejména Ca^{2+} a Mg^{2+} v přítomnosti fosforečnanů a hydrogenuhličitanů. Nejstarším polyiontovým roztokem je Ringerův roztok (1882). Obsahem sodíku, draslíku a vápníku se podobá obsahu těchto iontů v lidské plazmě. Z aniontů obsahuje chloridy a v tom je jeho nevýhoda, protože okyseluje organismus.⁷ Tento okyselující účinek zmírňuje mléčnan sodný, který je součástí Infundibile Ringeri cum natrio lactico. Z něho byl přidáním Mg^{2+} odvozen Hartmannův roztok a dále Foxův roztok, který obsahuje více K^+ . Z něho se vyvinula řada lékopisných infúzních přípravků.⁸ Indikační oblastí těchto roztoků je izotonická dehydratace.

3.1.1.2 Hypoiontové roztoky (zavodňovací, ledvinové startéry)

Obsahují asi polovinu izotonického množství elektrolytů. Na izotonickou koncentraci jsou upravené glukózou, fruktózou nebo sorbitolem. Používají se při hypertonické dehydrataci. Do této skupiny patří také bilanční roztoky. Jsou sestaveny tak, aby při jejich podávání byla kryta denní potřeba vody (2000 až 2500 ml) a zároveň bylo podáno potřebné množství elektrolytů. Obsahují Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , octany nebo mléčnany a většinou též fosforečnany a sacharidy, zejména sorbitol. Např. *Infusio elektrolytica cum sorbitolo*.

Bilanční roztoky mají sloužit k udržování homeostatické rovnováhy.

3.1.1.3 Hyperiontové roztoky

Obsahují soli ve vyšší koncentraci než jaká odpovídá extracelulární tekutině. Do této skupiny patří stále používaný infúzní roztok chloridu sodného. Je nazýván fyziologickým, což je v rozporu s obsahem Na^+ a Cl^- v extracelulární tekutině. Má

okyselující účinek. Aplikuje se při metabolické alkalóze. Na zvládnutí metabolické acidózy jsou určeny roztoky hydrogenuhličitanu sodného, mléčnanu sodného a trometamolu (kyseliny vázané trometamolem jsou rychle vylučovány ledvinami a působí také jako osmotické diuretikum). Elektrolytové roztoky s mléčnanem sodným a chloridem draselným jsou Darrowův a Cookův roztok. Ringerův roztok se používá i neparenterálně na laváže a perfúze.

3.1.1.4 Koncentráty na injekce a intravenózní infúze

Jsou to hypertonické roztoky na přípravu infundibilií v čase potřeby, popřípadě na úpravu standardních infundibilií, tj. na zvýšení obsahu solí podle potřeby konkrétního pacienta. Obsah léčiva bývá $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ nebo 1 mol.l^{-1} . Vyjimečně se mohou použít i na přímou aplikaci.

3.1.1.5 Hypertonické a osmoticky účinné infúzní přípravky

Hypertonické infúzní přípravky se používají při hypotonických stavech a při nedostatku chloridu sodného. Podávají se pomalu a přísně intravenózně. Příkladem je Infusio natrii chlorati concentrata.

Osmoticky účinné infúzní přípravky vyvolávají osmotickou diurézu. Nejčastěji se používají 10% a 20% roztoky manitolu nebo 20% a 40% roztoky sorbitolu. Manitol v organismu není metabolizován a zvyšuje osmotický tlak. Dochází k přesunu vody z mezibuněčných prostorů a z buněk do plazmy. Používá se k eliminaci edémů, např. při edému mozku. Sorbitol se v játrech oxiduje na fruktózu. Po aplikaci 20% až 40% roztoku je přebytek sorbitolu vylučován ledvinami společně s vodou a solemi. Jako osmotické diuretikum se používají též roztoky močoviny.

3.1.2. Koloidní infúzní roztoky

Koloidní objemové náhrady plazmy mají v medicíně významné místo. Cílem jejich použití je udržení nebo obnovení intravazálního objemu při úrazech nebo při chirurgických operacích, zabránění poruchám mikro- a makrocirkulace a zabezpečení

zásobování orgánů kyslíkem. Mezi koloidní plazmatické náhrady patří dextransy, želatinové deriváty a hydroxyethylškrob.

3.1.3. Infúzní přípravky pro parenterální výživu

Podávají se proto, aby pacientovi dodaly nejnnutnější živiny. Ve formě parenterální výživy jsou pacientovi dodávány nejnnutnější živiny, které uhrazují energetickou potřebu a předcházejí ketóze a acidóze z hladu. Podle obsahu živin můžeme tyto infúzní přípravky rozdělit do tří podskupin a to na roztoky sacharidů, roztoky aminokyselin, tukové emulze.¹

3.1.3.1 Roztoky sacharidů

Ze sacharidů se k parenterální výživě používá glukóza, fruktóza, invertní cukr, sorbitol a xylitol. Někdy se pro zvýšení energetické hodnoty přidává k sacharidům menší množství ethanolu.⁸ Pro utilizaci glukózy i ostatních sacharidů je důležité, aby jejich infúzní přípravky byly podávány pomalu. Glukóza je specifickým substrátem buněk, ale metabolismus fruktózy není závislý na inzulínu. Fruktóza má velký význam při stresových situacích, u diabetiků, při akutní alkoholové intoxikaci nebo jaterním onemocnění. Při intravenózním podání dráždí žilní stěnu méně než glukóza. Sorbitol je vhodný pro diabetiky, přeměňuje se především v játrech na fruktózu. Sorbitol má silné antiketogenní účinky a snižuje hladinu neesterifikovaných mastných kyselin a cholesterolu, má také vlastnosti spasmolytické a choleretické.⁸ Pro parenterální výživu se používají infúzní přípravky 5% a 10%, jako osmotické diuretikum se uplatňují přípravky 20% - 40%.

Xylitol má ochranný vliv na proteiny, podílí se na tvorbě glykogenu. Má silný antiketogenní účinek.

3.1.3.2 Tukové emulze

Oleje mají téměř dvojnásobnou energetickou hodnotu než cukry a aminokyseliny a jsou zdrojem nepostradatelných esenciálních nenasycených kyselin (linolová, linolenová,

arachidonová). Úplná parenterální výživa (TPN) vyžaduje tedy i přívod olejů. Základním předpokladem pro jejich intravenózní podání je vytvoření velmi stabilní emulze olej/voda, jejíž výroba je technologicky náročná. Emulze musí splňovat vysoká kritéria chemické i fyzikální stálosti. Je tvořena olejovou a vodnou fází a emulgátorem. Nejlepší zkušenosti jsou s rostlinnými oleji, které obsahují acylglyceroly vyšších alifatických kyselin, jako jsou sójový, světlicový, kokosový a bavlníkový olej, které obsahují triglyceridy s dlouhým řetězcem nebo středně dlouhým řetězcem. Nejvíce používaným emulgátorem je přírodní lecitin (vaječné fosfolipidy, sójový lecitin, sójový fosfolipid). Ze syntetických jsou hojně využívány poloxamery (deriváty polyoxyetylenu a polyoxypropylenu). Vodnou fází většinou tvoří glycerol nebo roztok vhodného cukru, xylitolu či sorbitolu.⁹

Dříve se uvádělo, že emulze olejů se zásadně nesmí mísit s jinými parenteráliemi, protože se může změnit jejich fyzikální stabilita. Tato zásada však v současnosti neplatí doslovně, protože byly vyrobeny roztoky cukrů (xylitol), aminokyselin a emulze olejů, které jsou mísitelné, takže pacient může dostat z jednoho vaku úplnou parenterální výživu (all in one).¹

3.1.3.3 Roztoky aminokyselin

Proteiny jsou hlavní stavební složkou mnoha orgánů. Všechny bílkoviny v organismu podléhají stálé výstavbě a současně rozpadu. Nemá-li organismus dostatek jiných substrátů, stávají se i bílkoviny zdrojem energie. Hladina aminokyselin, která je u zdravého člověka relativně stálá, je tvořena dynamickou rovnováhou mezi přísunem a odsunem aminokyselin. Přísun aminokyselin je zajišťován příjmem potravy, odbouráváním proteinů, vzájemnou přeměnou aminokyselin a v omezené míře i syntézou některých neesenciálních aminokyselin. Na odsunu se podílí syntéza polypeptidů a bílkovin, přeměna na další biologicky důležité látky a dále i oxidace uhlíkatého skeletu aminokyselin, tj. jeho využití jako energetického zdroje.

První roztoky pro parenterální výživu obsahovaly směsi D- a L-form aminokyselin. Ve všech současných roztocích pro parenterální výživu jsou obsaženy jen L-formy aminokyselin. Pouze tyto mohou plnit svou specifickou funkci. Směsi čistých L-form

aminokyselin organismus využívá beze zbytku, zatímco D-formy jsou využity jen omezeně, protože se málo absorbují v tubulech ledvin.⁸

Infúzní roztoky aminokyselin musí obsahovat všechny esenciální aminokyseliny (valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, methionin, lyzinacetát, treonin, tryptofan), které si lidský organismus neumí sám vytvořit. Esenciální aminokyseliny mají být dodány v určitém vzájemném poměru, případný nedostatek jedné limituje využití ostatních.

Kromě esenciálních aminokyselin obsahují infúzní roztoky též semiesenciální aminokyseliny (arginin, histidin), a takzvané asistující aminokyseliny (glycin, alanin, kyselina glutamová, kyselina asparagová, prolin, serin, cystin, tyrosin). Dalšími součástmi těchto roztoků jsou soli, cukry a alkoholy, jako energetický zdroj potřebný na utilizaci aminokyselin jiné látky, např. ve vodě rozpustné vitamíny.

Roztoky aminokyselin musí být sestaveny tak, aby vznikla rovnováha mezi aminokyselinami, které uvolňují vodíkový iont (např. arginin, lysin, histidin) a těmi, které mají schopnost ho vázat (kyselina glutamová, asparagová), aby roztok neokyseloval organismus pacienta.

Jejich podávání představuje základní kámen, na kterém staví parenterální výživa. Přitom složení roztoku aminokyselin musí odpovídat potřebám organismu, respektovat vztahy mezi jednotlivými aminokyselinami a dále fakt, že předávkování některých aminokyselin může mít za následek vedlejší negativní účinky dané dusíkovou disbalancí.¹

Moderní roztoky aminokyselin jsou odvozeny z optimálního poměru aminokyselin ve stravě.

Roztoky aminokyselin užívané v parenterální výživě lze rozdělit na *roztoky výživné*, ve kterých jsou aminokyseliny využívány k syntéze tělesných proteinů a eventuálně k zajištění energetické potřeby, a *roztoky specializované*, jejichž aminokyseliny kromě výše uvedených funkcí nutričních plní ještě úlohu, která je dána jejich specifickými metabolickými funkcemi. Používají se především u léčby některých chronických nebo akutních metabolických poruch, jako je jaterní nebo ledvinové selhání.

3.2. Stabilita

Stabilita léčiv a léčivých přípravků je definována jako vlastnost zachovávat si po určitou dobu a za stanovených podmínek určité jakostní znaky, kde mírou stability je doba použitelnosti.

Zatímco pro léky připravené v lékárně postačí doba použitelnosti několik hodin (radiofarmaka), dní či týdnů, pro průmyslově vyráběné léčivé přípravky se většinou deklaruje doba použitelnosti 5 let, pro parenterálnía je obvyklá doba použitelnosti 2 roky.^{10, 11}

- Podle WHO je stabilita léčivých přípravků schopnost zachovat si chemické, fyzikální, mikrobiologické a biofarmaceutické vlastnosti v určitých mezích po celou dobu použitelnosti. Doba použitelnosti je pak definována jako časový úsek, v kterém léčivý přípravek, pokud je správně uchováván, vyhovuje požadavkům určených v testech stability, které byly prováděny u více šarží přípravku.¹¹
- V americkém lékopise USP XXIV je stabilita definována jako rozsah, v kterém si léčivý přípravek zachovává v předem stanovených mezích v průběhu skladování stejné vlastnosti a znaky, jaké měl v čase výroby. USP se také zabývá problematikou stability léčivých přípravků připravovaných v lékárnách.¹²

Definování stability je součástí určení kvalitativních parametrů léčivých přípravků a vztahuje se hlavně na fyzikální a chemické vlastnosti jednotlivých složek přípravku. Tyto vlastnosti jsou předmětem zájmu stabilitních studií, které poskytují informace o těchto změnách oproti původnímu stavu v závislosti na čase vlivem vnitřních a vnějších faktorů. Ve farmacii se pojem stabilita vztahuje nejen na léčivý přípravek, ale také na léčivou látku. Proto vždy testování stability účinné látky předchází testování stability daného přípravku.

Kromě stability se při vývoji nového léčivého přípravku sleduje kompatibilita/inkompatibilita jednotlivých složek lékové formy. Ta je definována jako vzájemná snášenlivost jednotlivých složek léčivého přípravku. Týká se nejenom léčiv a

pomocných látek, ale také pomocných látek navzájem a také samotného léčivého přípravku a jeho primárního obalu.

V tzv. předformulační fázi tvorby nového léčivého přípravku probíhají zátěžové testy, jejichž snahou je poznat vlastnosti léčiv a pomocných látek. To se týká jak léčiva nového, tak již používaného. U nových léčiv je nutné zjistit co nejvíce údajů o jejich fyzikálních vlastnostech, stabilitě, odolnosti vůči kyselinám, zásadám a látkám s oxidačními nebo redukčními vlastnosti.

Kromě chemických vlivů se zkoumají ještě další vlivy; vliv světla – fotostabilita, vliv vysokých teplot na léčivo a jeho roztoky. U léčiv již používaných jsou tyto vlastnosti již známy a lze je získat z literárních zdrojů.¹³

V zásadě rozlišujeme inkompatibilitu chemickou a fyzikální. Podle toho, zda ji lze pozorovat našimi smysly, ji můžeme také rozlišit na inkompatibilitu zjevnou neboli manifestovanou, která je běžně rozpoznatelná našimi smysly, příkladem může být změna barvy nebo čírosti roztoku. Druhým typem je skrytá inkompatibilita, kterou lze rozlišit pouze pomocí analytických, chemických nebo fyzikálních metod.

Na základě poznání vlastností všech složek léčivého přípravku můžeme inkompatibilitu odstranit nebo je alespoň snížit na minimum.

K nejčastěji používaným postupům patří úprava pH, která se používá pro dosažení požadované rozpustnosti pro sole slabých kyselin a zásad, změna koncentrace pomocné látky nebo záměna za vhodnější pomocnou látku a v neposlední řadě úprava technologického postupu nebo příprava jiné lékové formy.^{6,13}

Změny při fyzikální inkompatibilitě je možné pozorovat našimi smysly a dochází u ní v poměrně krátké době ke změně fyzikálních vlastností jednotlivých složek do takové míry, že přípravek již nespĺňuje požadavky na jakost. Nejčastěji se sleduje čírost, barva nebo vznik zákalu v roztoku. Tyto jevy závisí především na rozpustnosti jednotlivých složek přípravku nebo na poměru a druhu rozpouštědel. Změnu konzistence lze pozorovat hlavně u pevných lékových forem, kdy určité kombinace dvou nebo i více krystalických látek vytvoří eutektickou směs za současného ztekucení původně krystalických složek. Některé silně hygroskopické látky zase mohou absorbovat vzdušnou vlhkost a po určitém čase dojde k vytvoření roztoku.¹⁴

U lipofilních složek léčivých přípravků může zase docházet k sorpci molekul na stěnu primárního plastového obalu.

Chemické inkompatibility se projevují chemickými reakcemi, které mají vyšší reakční rychlost nebo dochází k rychlému ustanovení chemické rovnováhy. Nejčastěji se jedná o acido-bazické reakce nebo iontové vazby, jejichž důsledkem je vznik sraženiny v tekutých lékových formách nebo reakce mezi obsahovými látkami v léčivém přípravku a látek uvolněných z obalu, například plastů.

Sraženiny vznikají také jako důsledek iontových reakcí a objevují se po překročení koncentrace odpovídající součinu rozpustnosti dané sraženiny.

Příkladem může být uvolnění oxidu barnatého ze skleněných obalů a jeho reakce se síranovými aniony za vzniku sraženiny síranu barnatého.¹⁴

Z polymerů se zase mohou uvolňovat rezidua katalyzátorů, aktivátorů polymeračních reakcí, oxidujících nebo redukujících látek, které mohou přecházet z obalu do léčivého přípravku a reagovat tak s jednotlivými složkami.

Kromě zátěžových testů a zrychlených testů stability začínají v předformulační fázi, v rámci vývoje léků, také dlouhodobé testy stability.

3.2.1. Stabilita léčiv a léčivých přípravků

Stabilita léčiv nebo léčivých přípravků se hodnotí pomocí testů stability, kdy se v určitých časových intervalech sledují změny kvality v důsledku působení různých vlivů. V případě léčivých přípravků se sleduje nejen stabilita samotných léčivých látek, ale také stabilita lékové formy jako celku.

Účelem stabilitních zkoušek je prokázat, jak se mění kvalita látky nebo přípravku s časem vlivem různých faktorů jako je teplota, vlhkost a světlo a následně pak doporučit podmínky uchování a stanovit tak dobu použitelnosti (expirace).

Pojem stabilita je nutné ve farmacii chápat ve smyslu kontrolovaných, dokladovaných a přípustných změn a ne jako stálý nebo neměnný stav, přičemž může jít o různé druhy

změn, jako jsou například chemické, fyzikální, farmaceuticko-technologické, mikrobiologické a biologické, stejně tak i změny biologické dostupnosti.¹¹

Podle povah změn, které mohou nastat je možné rozlišit 5 typů stabilit:

- a) Chemická stabilita, při které si všechny látky v léku zachovávají svou chemickou integritu a obsah v přípustných mezích. To se týká hlavně léčivé látky.
- b) Fyzikální stabilita se týká lékové formy a je to stav, kdy si léčivý přípravek zachovává původní fyzikální vlastnosti (vzhled, chuť, jednotnost, rozpustnost, roztřepatelnost atd.)
- c) Mikrobiologická stabilita je v podstatě zachovaná sterilita (u parenterálií) nebo mikrobiální čistota léčivého přípravku v souladu s danými požadavky, přičemž je zachována účinnost antimikrobiálních látek. Týká se hlavně léčiva i jeho lékové formy.
- d) Terapeutická stabilita, kdy léčivý přípravek má zachovanou terapeutickou účinnost. Týká se hlavně léčivé látky a léčivých forem, u kterých je účinek vázán na způsob zpracování léčivé látky, jako je například cílené nebo řízené uvolňování.
- e) Toxikologická stabilita představuje pouze nevýznamnou přítomnost toxických látek. Týká se všech složek přípravku.

Stabilitní zkoušky můžeme v zásadě rozdělit na zrychlené, kdy jsou stresovými podmínkami urychleny chemické a fyzikální změny léčiva nebo léčivého přípravku, a na dlouhodobé, které jsou realizovány za podmínek uchování předepsaných pro hodnocení léčiv nebo léčivých přípravků.

Dlouhodobé stabilitní zkoušky jsou důležitější než zrychlené, protože upřesňují dobu použitelnosti odhadnutou na základě zrychlených stabilitních zkoušek.

V průběhu stabilitních zkoušek je přípravek uchováván za předem definovaných podmínek, tj. při určité teplotě a relativní vlhkosti vzduchu (RV).^{6,13}

Obvykle používané podmínky uchování pro mírné pásmo jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Podmínky uchovávání přípravků a látek při stabilitních zkouškách.

	Podmínky	Intervaly odběru vzorků (měsíce)
Dlouhodobé zkoušky	25 °C ± 2 °C/60 % RV ± 5 %	0, 3, 6, 12, 18, 24 a dále po 24
Zrychlené zkoušky	40 °C ± 2 °C/75 % RV ± 5%	6

Zrychlený test stability při 40 °C/75 % RV je velice náročný a proto se někdy využívá náhrady v podobě zrychleného testu stability s parametry 30 °C/60 % RV, ale v délce trvání jednoho roku.

V určitých případech, zejména jsou-li účinné látky citlivé na teplo, by měly být uchovávány za nižší teploty, která je pak udána jako teplota skladování. Nutný je specifický přístup k takovým přípravkům, které za nižších teplot mohou podléhat fyzikálním nebo chemickým změnám, například suspenze nebo emulze, které mohou krémovatět nebo sedimentovat, dále pak například oleje nebo polotuhé přípravky, které mohou vykazovat vyšší viskozitu. Šestiměsíční zrychlená studie se provádí při teplotě nejméně o 15°C vyšší, než je teplota, při níž se provádí dlouhodobá stabilitní studie.¹⁵

Podmínky uchovávání a délka trvání stabilitních zkoušek pro látku citlivou na teplo jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Podmínky uchovávání látek a přípravků citlivých na teplo při stabilitních studiích.

	Podmínky	Intervaly odběru vzorků (měsíce)
Dlouhodobé zkoušky	5 °C ± 3 °C	0,3,6,12,18,24 a dále po 24
Zrychlené zkoušky	25 °C ± 2 °C/60 % RV ± 5%	6

Pokud dojde k výrazným změnám během 6 měsíců uchování při $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/75\% \text{ RV} \pm 5\%$ (zrychlená stabilitní studie) nebo jestliže jsou tyto podmínky nevhodné z fyzikálních důvodů, je možné za zrychlenou studii pokládat stabilitní studii při $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/60\% \text{ RV} \pm 5\%$ (pro účinnou látku, která má být použita pro výrobu konečného přípravku zkoušeného dlouhodobě při $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/60\% \text{ RV}$)^{6,15}.

Zkoušky kvality přípravků se zpravidla provádějí na počátku studie, každé tři měsíce během prvního roku, každých šest měsíců během druhého roku a dále pak jednou ročně.

Pro všechny typy lékových forem je třeba nejprve uskutečnit organoleptické zkoušky, kdy se sleduje vzhled, barevnost, čírost roztoku a jejich změny. Markantní změny jsou většinou odhaleny již při zkouškách inkompatibilit.

3.2.2. Extrapolace doby použitelnosti

Na základě kladných výsledků při zrychleném testu stability lze odhadnout dobu použitelnosti na 2 roky. K přesnějším údajům lze dospět na základě výpočtu podle Arrheniovy rovnice (rovnice č. 1), která udává změnu koncentrace léčivé látky v čase. Pro výpočet je ale nutné znát aktivační energii nebo stanovit rychlostní konstantu při více teplotách.

Vzorec č. 1: **Arrheniova rovnice**

$$\log c = \log c_0 - \frac{kt}{2,303}$$

Vysvětlivky:

k.....*rychlostní konstanta*

t.....*teplota (°C)*

*c*₀.....*počáteční koncentrace sledované látky*

c.....*koncentrace v čase*

Záměrem stabilitních studií konečného přípravku je stanovit dobu použitelnosti a podmínky uchovávání použitelné pro všechny šarže vyrobené a balené za stejných podmínek.

Za stabilní lze pokládat přípravek, který během dlouhodobých stabilitních zkoušek vyhovuje specifikaci a během zrychlených stabilitních zkoušek u něj nedochází k významným změnám u žádného ze sledovaných parametrů.

Za tzv. významnou změnu u zrychlené studie je považován stav, kdy:

- nastane pětiprocentní pokles účinnosti šarže vzhledem k počáteční hodnotě
- hodnota jakéhokoliv rozkladného produktu nevyhovuje specifikaci
- pokud nevyhovuje hodnota pH
- hodnota disoluce nevyhovuje specifikaci pro 12 tobolek či tablet
- pokud specifikaci nevyhovuje vzhled a fyzikální vlastnosti, jako například barva, čírost nebo rozdělení fází.

Při podávání žádosti o registraci musí být předloženy výsledky zrychlených a dlouhodobých stabilitních zkoušek prováděných se šaržemi stejného složení a lékové formy, ve stejném vnitřním obalu v jakém má být zaregistrován.

Jsou možné dva následující postupy:

1. Pro běžné lékové formy a je-li účinná látka známa jako stabilní, doloží se výsledky stabilitních zkoušek ve dvou šaržích.
2. Pro kritické lékové formy (např. pevné lékové formy s prodlouženým uvolňováním) nebo pokud je látka známa jako nestabilní, doloží se výsledky stabilitních zkoušek nejméně na třech šaržích.

Účinná látka je považována za stabilní, vyhovuje-li výchozí specifikaci po dobu 2 let při 25°C/60%RV a po dobu 6 měsíců při 40 °C/75 % RV.

Stabilitní zkoušky konečného přípravku musí postihnout všechny změny, které by měly za následek snížení jakosti, bezpečnosti a účinnosti léčivého přípravku. Rozsah zkoušek pokrývá nejen chemickou a biologickou stabilitu, ale také ztrátu účinnosti konzervačních látek nebo změnu fyzikálních, eventuelně

i mikrobiologických vlastností, včetně charakteristik lékové formy (např. disoluce pevných perorálních lékových forem).

Obecně je léčivý přípravek považován za stálý, pokud je schopný plnit funkci, pro kterou byl vyroben. Mírou stability je pak čas, po který tento přípravek plní určené kvalitativní požadavky. Podle mezinárodních usnesení se přípravek považuje za stálý, pokud obsahuje nejméně 90 % deklarovaného množství účinné látky a když vzniklé fyzikální, chemické a mikrobiologické změny nijak negativně neovlivní jeho aplikaci, biologickou dostupnost léčiv či nezvyšují toxicitu (tabulka č. 4).¹³

Tabulka č. 4: Obecné požadavky na stabilitu přípravků.

Znaky jakosti	Požadavky na stabilitu
Fyzikální	Původní fyzikální vlastnosti včetně vzhledu zůstávají zachovány ve stanovených mezích
Chemické	Množství léčiv, určených farmaceutických pomocných látek a rozkladných produktů je ve stanovených mezích (často min 90% účinné látky a min 80 % konzervačních přísad)
Biologické	Účinnost se nemění nebo její míra zůstává ve stanovených mezích, nedochází tak ke zvýšení toxicity a jiných negativních jevů
mikrobiologické	Zůstává zachována požadovaná mikrobiologická čistota

Pro jednotlivé lékové formy jsou udány jednotlivé fyzikální zkoušky. Hodnotí se například stejnoměrnost disperze, velikost částic u emulzí, hustota nebo pH. Přehled požadovaných fyzikálních zkoušek prováděných u parenterální je shrnut v Tabulka č. 5.

Tabulka č. 5: Fyzikální zkoušky prováděné u parenterální.

Typ	pH	čirost	barva	částice	vlhkost
Tekuté	+	+	+	+	
Tuhé, určené pro přípravu tekuté formy	+	+	+	+	+

Při chemických zkouškách se sleduje vznik a množství rozkladných produktů a stanovuje se obsah účinné látky, stejně jako příslušných protimikrobních látek nebo stabilizátorů.

Biologické hodnocení má význam u hormonů a antibiotik, řadíme k nim také pyrogenní látky, prováděné u všech infundibilií.

Pro každou lékovou formu platí určité požadavky na mikrobiologickou čistotu, která musí být zachována i na konci doby použitelnosti. Mikrobiologická stabilita se zajišťuje v rámci dlouhodobých testů stability.

3.2.3. Faktory ovlivňující stabilitu

Faktory ovlivňující stabilitu léčiv je možno rozdělit několika způsoby:

3.2.3.1 Faktory vnější a vnitřní

Vnější faktory, kterými jsou nejčastěji teplo, světlo, radiace, vzduch (hlavně jeho dvě složky – kyslík a oxid uhličitý) a vlhkost, dokáží výrazně ovlivnit jednak stabilitu vlastní lékové formy, ale i účinných a pomocných látek. K vnějším faktorům je nutné ještě přiřadit i způsob zpracování do lékové formy, způsob balení a uchovávání.

Vnitřní faktory souvisí s vlastnostmi jednotlivých složek lékové formy, ať už terapeuticky účinných nebo pomocných. Hlavní úlohu hrají chemické vlastnosti a kvalita léčiv, pomocných látek a obalový materiál. Svou roli sehrává i velikost částic, vlastnosti rozpouštědel a přítomnost chemických reziduí nebo kontaminace z výroby.

Všechny vlivy ovlivňují nejen stabilitu, ale také biologickou dostupnost, účinnost léčiv.

3.2.3.2 Faktory fyzikální, chemické, biologické, a mikrobiologické

3.2.3.2.1 Fyzikální faktory

Fyzikální faktory se projevují u tuhých látek nejčastěji změnou krystalické struktury, obsahu vody (vlhkosti), popřípadě sublimací. Pokud je ovšem pevná látka rozpuštěna, může se vysrážet nebo krystalizovat.

Ke změnám disperzity a oddělování fází dochází díky zvětšování velikosti částic. Dalšími fyzikálními faktory, které ovlivňují stabilitu, jsou změny viskozity, agregace, precipitace, denaturace, vypařování těkavých látek nebo sorbce antimikrobních látek na stěnu obalu.¹⁶

3.2.3.2.2 Chemické faktory

K nejčastějším projevům chemické nestability patří hydrolýza, deaminace, oxidační reakce a fotolýza.¹⁷

Hydrolýza

Je jednou z nejčastějších rozkladných reakcí, které podléhají nejčastěji látky s esterovými, amidovými, laktámovými a laktonovými funkčními skupinami.

V některých specializovaných infúzních přípravcích se pro své vlastnosti používají speciální dipeptidy, které se mohou ve vodném prostředí rozkládat na mateřské aminokyseliny. Reakce je ještě urychlena zvýšenou teplotou a přítomností vícemocných kationů těžkých kovů.^{18,19}

Nejvhodnějším způsobem stabilizace snadno hydrolizovatelných léčiv je příprava jiných lékových forem než roztoků.

Pokud se jedná o roztoky, je nejvhodnějším způsobem stabilizace úprava pH na optimální hodnoty nebo nahradit vodu nebo alespoň její část jiným, méně polárním rozpouštědlem.

Deaminace

V prostředí vodného roztoku dochází také k hydrolytickým reakcím, které se projevují jako deaminace koncové $-NH_2$ skupiny a její náhrada $-OH$ skupinou (tj. vznikem karboxylové kyseliny), případně cyklizací za vzniku amidů. Tyto reakce jsou typické

pro Asn a Gln²⁰, ale také pro aminokyseliny vázané v peptidech (Asp-Pro, Asp-Gly) nebo aminokyseliny v sousedství Ser a Thr^{21,22}.

Oxidace

Oxidace patří mezi nejběžnější chemické rozkladné procesy a je spojená se ztrátou elektronů z atomů nebo molekul a provázená přijetím kyslíku nebo odebráním vodíku.

Při radikálových reakcích vznikají po odštěpení vodíku z molekuly volné radikály. Reakce se šíří tvorbou dalších radikálů za vzniku peroxidů a dalších následných produktů podle typu oxidovaných látek. Oxidaci nejčastěji podléhají aldehydy, ketony, dioly, karboxylové a hydroxykarboxylové kyseliny. Vazbou kyslíku na násobné vazby vznikají vysoce reaktivní epoxidy.

Aromatické aminokyseliny, ke kterým patří His, Tyr, Trp a síru obsahující aminokyseliny jako je Met a Cys, podléhají velmi snadno oxidaci, která je ještě urychlena přítomností vícemocných kationů kovů^{22,23}

Methionin tak přechází na sulfoxid nebo při drastičtějších podmínkách na sulfon²⁴.

Cystein zase vytváří intra- nebo inter-molekulární disulfidické můstky, za drastičtějších podmínek vznikají sirmé kyseliny.²⁵ Prolin přechází ve dva hlavní produkty, 2-pyrrolidon a analogy glutamát –semialdehydu. Oxidací aromatických aminokyselin dochází k otevření cyklického řetězce imidazolového (His), fenolového (Tyr, Phe) a idolového (Trp) typu^{26,27}. Vlivem oxidace dochází k výrazným změnám vlastností molekul, především zvýšení hydrofility, poklesu (Trp) nebo zvýšení (Tyr, Phe) fluorescence, změnám v elektrochemických vlastnostech, aj. Některé jevy nejsou dosud zcela objasněny.

Ochrana před oxidací

Látky, které podléhají snadno oxidaci lze stabilizovat jednak vyloučením faktorů oxidaci způsobujících, tzn. minimalizovat jejich styk s kyslíkem. Tyto látky se proto zpracovávají v inertní atmosféře, nejčastěji dusíku (například výroba roztoků aminokyselin), v průběhu celého výrobního procesu.

Zároveň se také používá antioxidačních látek, jejichž úlohou je zabránit vzniku degradačních produktů v průběhu prvních fází oxidačního děje. Antioxidant zasahuje do

procesu pouze tehdy, pokud je rozpuštěný v daném vehikulu, proto se rozlišují antioxidanty rozpustné ve vodě a olejích.⁶

Antioxidanty rozpustné ve vodě

Přehled látek používaných ve vodném prostředí je uveden v tabulce č. 6.

Ve vodných roztocích antioxidantia inhibují oxidaci léčiv. Jsou to sloučeniny, které mají nižší redukční potenciál než léčivo, které mají chránit. Antioxidant tu působí jako donor protonů, tj. jako redukční činidlo. Mezi antioxidanty této skupiny řadíme siřičitan a disiřičitan sodný, siřičitan a disiřičitan draselný, hydrogensiřičitan sodný a draselný, formaldehydsulfoxylan sodný. Siřičitany jsou vhodné pro alkalické, disiřičitany pro kyselé prostředí.

K potlačení oxidace léčiv ve vodných roztocích se používají též dusík a oxid uhličitý. Oxid uhličitý se však rozpouští ve vodě za vzniku kyseliny uhličitě a způsobuje pokles pH. K vytvoření inertní atmosféry je proto dusík vhodnější.

Tabulka č. 6: Antioxidanty pro vodné soustavy.

Sloučenina	Rozpustnost	Účinný obsah v %	Použití, poznámky
Kyselina askorbová nebo její sodná sůl	ve vodě ~30% (25 °C), v lihu ~2%, v glycerolu ~1%	0,01 – 0,1 i vyšší	Vhodná na perorální, parenterální i topické roztoky a emulze jako antioxidant, na oleofilní soustavy jako synergista. Působením kyslíku se ve vodných soustavách rozkládá, a to hlavně za přítomnosti těžkých kovů, citlivá na světlo. Její rozkladné produkty jsou barevné.
Organické sloučeniny síry (cystein)		0,05 – 0,15	Pro nepříjemný zápach a chuť je nevhodný v perorálních a topických přípravcích.
Anorganické sloučeniny síry: siřičitan sodný Na₂SO₃, siřičitan draselný K₂SO₃	dobrá ve vodě, v glycerolu, malá v lihu	0,05 – 0,3	Méně vhodné pro perorální přípravky, protože mají nepříjemnou chuť i zápach. Nejsou chemicky ani fyziologicky zcela indiferentní (sulfonace), teplem se rozkládají. pH vodných roztoků siřičitanů je 9, hydrogensířičitanů a disířičitanů 4. Disířičitany se používají v kyselých roztocích v kombinaci s EDTA.
Hydrogensířičitan sodný NaHSO₃ a draselný KHSO₃		0,05 – 0,15	
Disířičitan sodný Na₂S₂O₅ a draselný K₂S₂O₅		0,01 – 0,1	
Formaldehydsulfoxylan sodný (hydroxymetansulfinan sodný) CH₂OH-SO₂Na · 2H₂O	velmi dobrá ve vodě, prakticky žádná v lihu	do 0,5	Vhodný v neutrálním pH, neúčinkuje v kyselém prostředí.

Antioxidanty rozpustné v olejích

Rostlinné oleje a živočišné tuky obsahují velké množství násobných vazeb a proto jsou tak citlivé vůči působení kyslíku. K antioxidantům patří tokoferoly, askorbylpalmitat, galan propylnatý, butylhydroxyazol, butylhydroxytoluen a kyselina nordihydrogvajaretová.

Katalytickým účinkům iontů těžkých kovů je možno předcházet použitím chelatačních činidel (nejčastěji edetanu disodného), kdy vzniká stabilní komplex mezi vícemocnými ionty těžkých kovů a EDTA.

Tabulka č. 7: Antioxidanty pro lipofilní soustavy.

Sloučenina	Rozpustnost	Účinný obsah v %	Použití, poznámky
Tokoferoly α, β, γ, δ	v olejích dobrá, ve vodě prakticky žádná	0,05 – 0,2	α -tokoferol má nejmenší, γ -tokoferol největší antioxidantní účinek, vhodné pro tuky, éterické oleje, přípravky s vitamínem A, synergisté: askorbylpalmitan, kyselina fosforečná a citronová
Askorbylpalmitan	ve vodě 0,2%, v lihu 22%, v olivovém oleji 0,03%	0,1 – 0,2	vhodný pro rostlinné oleje a živočišné tuky, často se kombinuje s tokoferolem
Galan propylnatý	ve vodě 0,3%, v lihu 60%, v propylenglykolu 55%, v olejích 1%	0,001 – 0,02	vhodný pro rostlinné oleje a živočišné tuky a jejich emulze, synergisté: kyselina fosforečná a citronová, ale i BHA a BHT
Butylhydroxyanizol (BHA)	dobrá v etanolu a propylenglykolu	0,001 – 0,02, v éterických olejích 0,1%	
Butylhydroxytoluen (BHT)	v etanolu, v tekutém parafínu, v olejích dobrá; ve vodě, glycerolu a propylenglykolu prakticky žádná		vhodné pro oleje a tuky, často se kombinují s propylgalanem nebo jinými galany, synergisté: kys. citronová a fosforečná
Kyselina nordihydrogvajarová (NDGA)	v olejích asi 0,5%	0,01 – 0,025	nesplňuje úplně kritérium fyziologické indiferentnosti

Fotolýza

Fotolýza neboli fotochemický rozklad je způsoben slunečním popřípadě umělým světlem. Nejvýznamnější je vliv ultrafialové a viditelné části světelného spektra,

keré má největší energii. K příkladům reakcí spuštěných světlem patří například izomerace, někdy nazývaná jako epimerace, při které dochází k přeměně chemické sloučeniny na její jiný optický nebo geometrický izomer. Tato změna může znamenat změnu farmakologických nebo toxikologických vlastností a tedy i účinku. Například pro výrobu infúzních roztoků aminokyselin se používají pouze l-aminokyseliny, které lidský organismus dokáže téměř ze 100% využít. Naopak d-kyseliny téměř vůbec nevyužívá.²³

Racemizace

Chemické změny ve struktuře aminokyselin mohou probíhat také na opticky aktivním uhlíku. Dochází k racemizaci a změně L-aminokyselin na D- formu, která se projeví změnou optické otáčivosti. Na podobném principu probíhá tzv. β -eliminace, při níž vznikají jiné násobné vazby nebo dochází k rozkladu disulfidických můstků (Cys). Tato reakce je opět katalyzována ionty kovů a zvýšenou teplotou. Je typická pro Ser, Thr, Phe, Lys²³.

Dekarboxylace

Při dekarboxylaci dochází k odštěpení oxidu uhličitého z karboxylové skupiny.

Dekarboxylace je závislá na pH, rozpouštědle a katalytickém vlivu vícemocných kationů. Dekarboxylace se objevuje jako reakce následná, doprovázející hlavně hydrolýzu.

Lze ji minimalizovat použitím vhodných chelatačních látek a úpravou pH.

U složitých směsí aminokyselin, které jsou používány v parenterálních, je degradační proces velmi komplikovaný a jeho projevy jsou výsledkem složitých chemických reakcí, které nelze jednoznačně rozlišit a charakterizovat. Těmto nežádoucím reakcím je nutno alespoň částečně zabránit:

1. volbou technologických parametrů výroby
2. prací pod inertní atmosférou

3. formulací lékové formy (nastavení pH, přísada komplexotvorné látky, přísada antioxidační látky).

3.2.3.2.3 Mikrobiologické faktory

Mikrobiologická stabilita se u parenterální zabezpečuje pomocí sterilizace v autoklávu a u ostatních lékových forem přísadou antimikrobních látek. Mikrobiologická kontaminace znamená vždy zásah do kvality léku, který má za následek rozklad léčivých a pomocných látek s následnou změnou chemických a fyzikálních vlastností. Mikrobiologické zkoušky stability jsou vždy součástí dlouhodobých stabilitních testů, a to nejen pro sterilní léky jako zkoušky sterility, ale pro všechny lékové formy v podobě zkoušek na mikrobiologickou čistotou. Stejně tak platí přísné požadavky na mikrobiologickou čistotu všech výchozích látek a obalů.¹⁴

Do vícedávkových léčivých přípravků se přidávají antimikrobní látky, které zabezpečují mikrobiologickou čistotu po celou dobu použití. V této souvislosti je třeba ověřit si i kompatibilitu použitých antimikrobiálních látek s obalem přípravku a to hlavně u polyethylenových obalů. Například u obalů z nízkotlakého polyethylénu se doporučuje pro oční léky použít jako stabilizační agens benzalkonium chlorid nebo octan fenylrtuťnatý.²⁸

3.3. Disiřičitan sodný

3.3.1. Fyzikální vlastnosti³⁰

Disiřičitan sodný je bezbarvý nebo bílý až krémově žlutý krystalický prášek, který tvoří hranolovité krystaly, zapáchá po oxidu siřičitém a má kyselou, slanou chuť. Disiřičitan sodný krystalizuje se sedmi molekulami vody.

Acidita/alkalita: 5% vodný roztok má při 20 °C pH = 3,5-5,0.

Bod tání: disiřičitan sodný taje a rozkládá se zhruba při 150 °C.

Osmolarita: 1,38% vodný roztok je izosmotický s krevním sérem.

Tabulka č. 8: Rozpustnost Na₂S₂O₅ ve vodě v závislosti na teplotě.

teplota (°C)	10	15	20	25	30	40	50	60	70
g Na ₂ S ₂ O ₅ /100g rozt.	38,8	39,2	39,6	40,1	40,5	41,7	42,8	44,1	45,5

Při 20 °C je nepatrně rozpustný v ethanolu (95%) a snadno rozpustný v glycerinu.

3.3.2. Stabilita a podmínky skladování

Disiřičitan sodný vystavený vlhkosti a vzdušnému kyslíku se oxiduje na síran sodný. Působením silných minerálních kyselin dochází uvolňuje plynný oxid siřičitý.

Ve vodě disiřičitan sodný disociuje na sodné (Na⁺) a hydrogensiřičitanové (HSO₃⁻) ionty. Vodné roztoky disiřičitanu sodného jsou z těchto důvodů na vzduchu rozkládají, zvláště při zvýšené teplotě, a proto roztoky, které byly sterilizovány autoklávováním, musí být plněny do nádob, v nichž byl vzduch nahrazen inertním plynem, například dusíkem. Přídavek glukózy k vodnému roztoku disiřičitanu sodného snižuje jeho stabilitu.³¹ Tato reakce je známa jako Maillardova reakce³² Siřičitan by měl být uchováván v dobře uzavřených nádobách, chráněných před světlem a umístěných na chladném, suchém místě.

3.3.3. Využití ve farmacii

Siřičitany jsou používány jako stabilizátory potravin³³ již od počátku 19. století. Vzhledem k dlouhodobým zkušenostem jsou považovány za relativně bezpečné látky.³⁴ Ve farmacii jsou používány jako antioxidační látky v perorálních, topických i parenterálních přípravcích, vykazují také protimikrobní aktivitu.³⁵ Jejich účinek jako protimikrobních látek je závislý na pH. Rovněž antioxidační efekt je podmíněn pH; v kyselém prostředí se používá disiřičitan sodný, v neutrálním hydrogensiřičitan a v alkalickém siřičitan. Mechanismus protimikrobní aktivity spočívá především v inhibici dýchání, konformačních změnách enzymů a destrukci thiamin pyrofosfátu.³⁶

Protimikrobní aktivita siřičitanů je druhově selektivní, obecně jsou bakterie citlivější než kvasinky a plísně.

3.3.4. Inkompatibility

Disiřičitan sodný reaguje se sympatomimetiky a jinými léčivými charakteru derivátů orto a para hydroxybenzyl derivátů za vzniku sulfonových sloučenin bez farmakologické aktivity. Nejdůležitějším léčivem z této oblasti je adrenalin a jeho deriváty.³⁰ V roztocích očních kapek vykazuje inkompatibilitu je tedy s octanem fenylrtnutným, zejména při autoklávování.³⁷

Disiřičitan sodný může reagovat s gumovými uzávěry u vícedávkových nádob.³⁸

3.3.5. Toxicita siřičitanů

Disiřičitan sodný se používá v koncentraci 0,01-1,0%. Jedná se o poměrně stabilní sůl, v pevném stavu obvykle obsahuje malá množství siřičitanu a síranu. Po rozpuštění ve vodě disociuje a tento proces je urychlen při nízkém pH (např. žaludku) a vyšší teplotě. Působením oxidativních enzymů je transformován na síran a vyloučen močí.³⁹ Siřičitanová oxidáza je přítomna ve všech tkáních. Poruchy její aktivity jsou důležité v patogenezi negativních reakcí siřičitanů.

Negativní účinky siřičitanů lze rozdělit na několik skupin. Největší skupinu tvoří údaje o jejich alergizačním efektu, který je uváděn u cca 3-10% astmatické populace.^{36,40} Astmatický záchvat byl popsán jak po vdechnutí, tak po požití siřičitanů. Podstata přecitlivělosti není dosud zcela jasná, je možné, že roli hraje imunoglobulin E,⁴¹ změny v transportu Na⁺ a K⁺ v buňkách bronchů,⁴² stimulace kinin-bradykininového systému,⁴³ nebo jiné. Kožní přecitlivělost je méně častá a vyskytuje se zhruba u 1-3% atopické populace.⁴⁴

Dlouhodobé podávání siřičitanů má vliv na hladiny vitamínů, především thiaminu, kyseliny listové, nikotinamidu a β-karotenu.³³ Siřičitany ireverzibilně štěpí vazbu mezi thiazolovým a pyrimidinovým kruhem thiaminu.

Vysoké dávky siřičitanů mohou vyvolat ztrátu vědomí, poruchy CNS, anafylaktický šok a smrt. Tato situace naštěstí není častá, neboť vysoké dávky vyvolávají zvracení.⁴⁵

Vliv siřičitanů na reprodukční aparát, kancerogenita ani mutagenita nebyla spolehlivě prokázána, neboť metabolismem vzniká řada sloučenin, jejichž sledování in vivo je velmi složité.⁴⁶ Mnoholeté používání však takovým účinkům nenasvědčuje.

O toxicitě siřičitanů při parenterálním podání existuje jen velmi málo informací. Při krátkodobé parenterální výživě u dětí nebyly zaznamenány žádné negativní vlivy,⁴⁷ u kojenců živených systémem all-in-one působily siřičitany příznivě omezením vzniku kyslíkových radikálů.⁴⁸

Přestože jsou celosvětově považovány siřičitany za vcelku bezpečné látky, byla přijata opatření k regulaci jejich používání v potravinách a k omezení denního příjmu. V Evropě je maximální množství stanoveno na 3,5 mg/kg tělesné hmotnosti (vyjádřeno jako SO₂), WHO doporučuje maximální hranici příjmu 7,0 mg/ kg tělesné hmotnosti.³⁰

Proto bylo vyvinuto mnoho metod ke zjištění přítomnosti siřičitanu a stanovení jeho množství v různých druzích potravin a léčivých přípravků.

3.4. Metody stanovení (di)siřičitanů

Z potravin a léčivých přípravků (matrice), které prakticky vždy obsahují různé látky reagující s jódem, je nutné siřičitany nejprve vhodným způsobem izolovat. K tomuto účelu se používá nejčastěji destilace po okyselení, kde do nádoby naplněné vhodným absorpčním roztokem přechází oxid siřičitý.

Destilační metody se liší konkrétním postupem analýzy a použitým činidlem. Druhou možností stanovení siřičitanů je použití kapilární elektroforézy²⁹.

4. Experimentální část

4.1. Obecné poznámky

Aminokyseliny, které byly použity pro přípravu vodných roztoků, jsou dodávány komerčními dodavateli.

Všechny roztoky aminokyselin byly připravovány za podmínek SLP a to v objemu 5 litrů. Roztoky byly adjustovány do skleněných lahví o objemu 500ml. Byly použity pryžové zátky FM 140. Při samotné přípravě roztoků byl celý objem probubláván dusíkem čistoty 99,997%. Taktéž při jeho adjustaci do skleněných lahví byl použit dusík.

Připravené roztoky byly skladovány ve stabilitní komoře při 30 °C při 60 % relativní vlhkosti.

Sterilizace roztoků proběhla v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut.

Tlak vzduchu nad roztokem byl měřen pomocí ručního tlakoměru opatřeného jehlou s rozsahem (0-100 kPa).

Obsah kyslíku nad roztokem v lahvích byl analyzován pomocí analyzátoru SERVOMEX 572. Před každým měřením byl přístroj kalibrován dle návodu. Kontrola kalibrace a správnosti měření byla provedena pomocí kalibračního plynu (1% O₂ V/V v dusíku).

Disiřičitan sodný byl stanoven pomocí destilační metody jímání vzniklé SO₂ do H₂O₂ a následnou alkalimetrií vzniklé H₂SO₄. Pro alkalimetrii byl použit přístroj Titrino 702 SM+728 Stirrer (Metrohm, KZL 01 306, Donau Trading AG) se skleněnou elektrodou: pH 14/0 sycená 3 mol/l KCl . K zpětné titraci byl použit roztok 0,1 M NaOH. Obsah siřičitanu je přímoúměrný množství vzniklé H₂SO₄.

Pro spektrofotometrická měření byl použit spektrofotometr Unicam UV 4, Vision software verze 3.02 a Spekol 11. Pro HPLC analýzu byl použit Thermo Separation

HPLC system UV/Vis, kolona - silikagel RP - C18 (Watrex), mobilní fáze 0,05 molární roztok octanu triethylamonného ($\text{NEt}_3^+\text{AcO}^-$) při $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Průběh reakcí byl sledován pomocí TLC na silikagelových foliích Silufol UV₂₅₄ (Sklárny Kavalier). Jako vyvíjecí soustava byla použita směs 96% denaturovaného ethanolu a koncentrovaného roztoku amoniaku ve vodě (12:1; v:v). Detekce byla provedena postřikem roztoku ninhydrinu (30 mg ninhydrinu, 100 ml ethanolu, 3ml kyseliny octové) a zahřátím na 150 °C po dobu 30 sekund. Metoda byla použita pro stanovení oxidačních produktů.

Použité chemikálie byly získány od firem Lachema, Merk, Penta, Infusia a.s., Chemotrade.

^1H NMR spektra byla měřena na přístroji firmy Varian GEMINI 300 při 300,1 Hz v roztoku D_2O při 25 °C bez vnitřního standardu. Posuny byly referencovány na signál rozpouštědla (D_2O ; $\delta = 4,75 \text{ ppm}$).

Tabulka č. 9 podává přehled hromadně vyráběných i laboratorně připravených roztoků směsí aminokyselin, které byly použity či cíleně připraveny pro tuto práci.

Tabulka č. 9: přehled roztoků aminokyselin, které byly použity pro analýzu.

Druh aminoroztoku	šarže	Poznámka
NEONUTRIN 5%	173803	
NUTRAMIN N8%	265203	
NEONUTRIN 5%	098301	Bez disiřičitanu
NEONUTRIN Nefro	Lab. příprava	Bez His, bez disiřičitanu
NEONUTRIN 10%	216203	
NEONUTRIN Nefro	217503	Bez disiřičitanu

4.2. Příprava odměrných roztoků

3% H₂O₂

Připraví se zředěním 200 ml peroxidu vodíku R pomocí Aqua pro inj. na 2000 ml v čase potřeby. Maximální trvanlivost je 1 týden.

0,1 M NaOH

Připraví se dle platného předpisu ČL 2002. Faktor se stanoví na roztok kyseliny chlorovodíkové zředěné RS 0,1 M o známém faktoru ($f_{\text{HCl}}=1,01696$).

7% HCl V/V

Připraví se zředěním 200 ml kyseliny chlorovodíkové HCl 35% p.a. na 1000ml.

Příprava slepého vzorku pro titrační stanovení SO₂

Slepý vzorek se připraví tak, že celému procesu destilace se vystaví 250 ml Aqua pro inj. R. Spotřeba 0,1M NaOH slepého vzorku (V_2) je množství, které je nutné k neutralizaci vlastní kyselosti H₂O₂.

Příprava vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

Vyvíjecí soustava se připraví smícháním 6 ml 96% ethanolu s 0,5 ml 25% NH₄OH

Příprava pufru pro HPLC

Připraví se přidáním 3,47 ml triethylaminu a 1,43 ml kyseliny octové do 0,5 litru destilované vody.

Ninhydrin

Ninhydrin se připravuje smísením 0,3 g ninhydrinu, 100 ml ethanolu a 3 ml kyseliny octové.

4.3. Provedení zkoušek

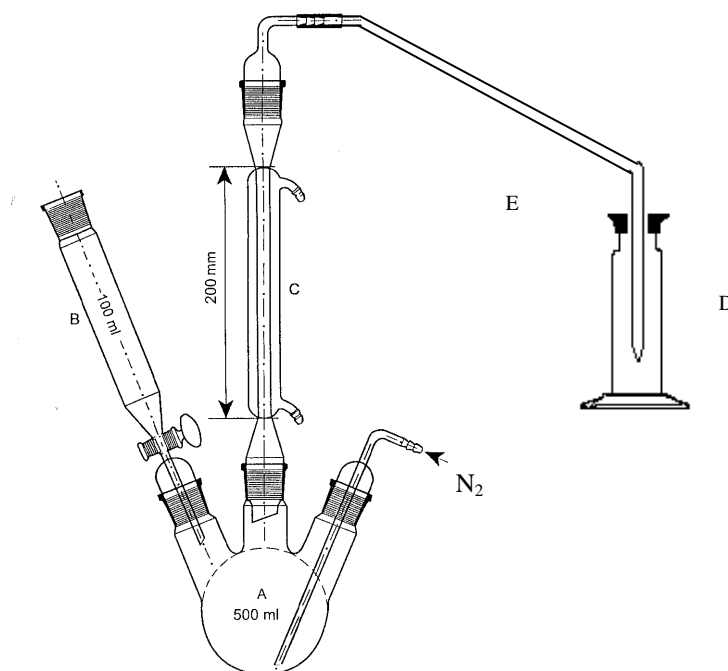
4.3.1. Stanovení hodnoty tlaku vzduchu a obsahu kyslíku nad hladinou roztoků směsí aminokyselin a roztoků samostatných aminokyselin ve skleněných lahvích.

Těsně před začátkem stanovení siřičitanů v roztocích bylo provedeno stanovení tlaku vzduchu nad roztokem. Po ochlazení na teplotu okolí byla opatrně sejmuta hliníková pertle a pak byla gumová zátka propíchnuta jehlou manometru a odečtena hodnota vakua.

Současně se stanovením tlaku vzduchu nad hladinou byl pomocí analyzátoru Servomex stanoven obsah kyslíku nad hladinou roztoku. Gumová zátka byla propíchnuta jehlou vstupního ventilu a odečtena hodnota. Během měření nesmí dojít k jakémukoliv nasátí roztoku, který by poškodil měrnou celu analyzátoru.

4.3.2. Stanovení siřičitanů v roztocích směsí aminokyselin a roztoků samostatných aminokyselin

Pro stanovení siřičitanů byla použita metoda vyvinutá v Infusi Hořátev a.s. v roce 2002/2003. Princip této metody je uveden v diplomové práci pod názvem Stabilizace aminoroztoků v Infusi a.s.²⁹



Nejprve se sestaví aparatura podle obrázku. Do topného hnízda se vloží tříhrdlá baňka s kulatým dnem (A) a do ní se převede 150 ml Aqua pro inj. R. Do přikapávací nálevky se převede 80 ml HCl 7% RS a do jímající nádoby (D) 100 ml 3% peroxidu vodíku RS. Celým systémem se nechá 15 min proudit dusík R průtokovou rychlostí 100ml/min. Proud dusíku R a chladicí kapaliny pláštěm Liebigova chladiče se udržuje konstantní po celou dobu varu.

Po 45 min se odstraní nálevka (B) a do tříhrdlé baňky se přidá 100ml zkoušeného roztoku. Překontroluje se těsnost celé aparatury a pomocí přetlaku vzduchu se nálevkou (B) postupně přidá 80ml HCl 7% RS. Zapne se zahřívání a obsah se nechá vařit 45 minut.

Po 45 minutách se vypne zahřívání a odejme nálevka (B). Tím poklesne přetlak v aparatuře a dojde k nasátí peroxidu do kapiláry . Pak se aparatura opět uzavře a vzniklý peroxid nechá vytlačit dusíkem, tím dojde k vymytí ulpělé kyseliny z kapiláry.

Celý objem peroxidu vodíku z jímající nádoby se ihned titruje roztokem 0,1M NaOH za potenciometrické indikace bodu ekvivalence proti slepému vzorku, který představovala Aqua pro inj. R (Infusi) 250ml.

Obsah siřičitanů (jako $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) v mg/l se vypočítá podle vzorce, kde V_1 představuje spotřebu 0,1M NaOH vzorku, V_2 spotřebu slepého vzorku a f faktor 0,1M roztoku NaOH.

$$x = 47,525 * (V_1 - V_2) * f$$

Obsah disiřičitanu byl poprvé sledován po sterilizaci vzorků a tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulkách jako vstupní data (čas 0). Po sterilizaci dochází k úbytku původního množství disiřičitanů 200mg/l.

4.3.3. Stanovení absorbance roztoků při 420 nm

Po převedení 100ml vzorku do tříhrdlé varné baňky byla pomocí spektrofotometru změřena u zbývajících množství roztoku absorbance při vlnové délce 420nm a tloušťce měrné vrstvy 1cm. Slepým vzorkem byla Aqua pro inj. R (Infusia).

4.3.4. Stanovení disiřičitanu

Ze spotřeby odměrného roztoku NaOH ($V_1 - V_2$) jsem vypočítal obsah disiřičitanu (%) podle následného vzorce:

$$\text{obsah disiřičitanu [\%]} = \frac{\textit{koncentrace} \cdot \textit{faktor} \cdot \textit{ekvivalent} \cdot \textit{spotřeba}}{\textit{navážka}}$$

koncentrace.....titračního činidla (NaOH)

faktor.....faktor titračního činidla

ekvivalent.....ekvivalent disiřičitanu sodného (47,5)

spotřeba.....spotřeba titračního činidla (NaOH)

navážka.....navážka stanovovaného vzorku

5. Výsledky a diskuse

Cílem předkládané práce bylo stanovit příčinu barevné změny infuzních vodných roztoků směsí aminokyselin a dipeptidů, která se projevuje žloutnutím těchto roztoků při jejich skladování. Vzhledem k tomu, že infuzní roztok je směsí 16 až 21 aminokyselin a dipeptidů a pomocných látek, kterými jsou disířičitan sodný, disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Chelaton 3), není jednoduché určit příčinu těchto změn. Z uvedeného je zřejmé, že se jedná o komplexní směsi, jejichž komponenty mohou na sebe navzájem působit a transformovat se. Faktory ovlivňující tento rozklad infuzních roztoků je možné rozdělit do dvou skupin.

- Exogenní faktory

vliv světelného záření

vliv kyslíku nad roztokem

vliv teploty

- Endogenní faktory

reaktivita složek směsi a jejich transformace (COOH, NH₂, OH, SH)

vliv pomocných látek

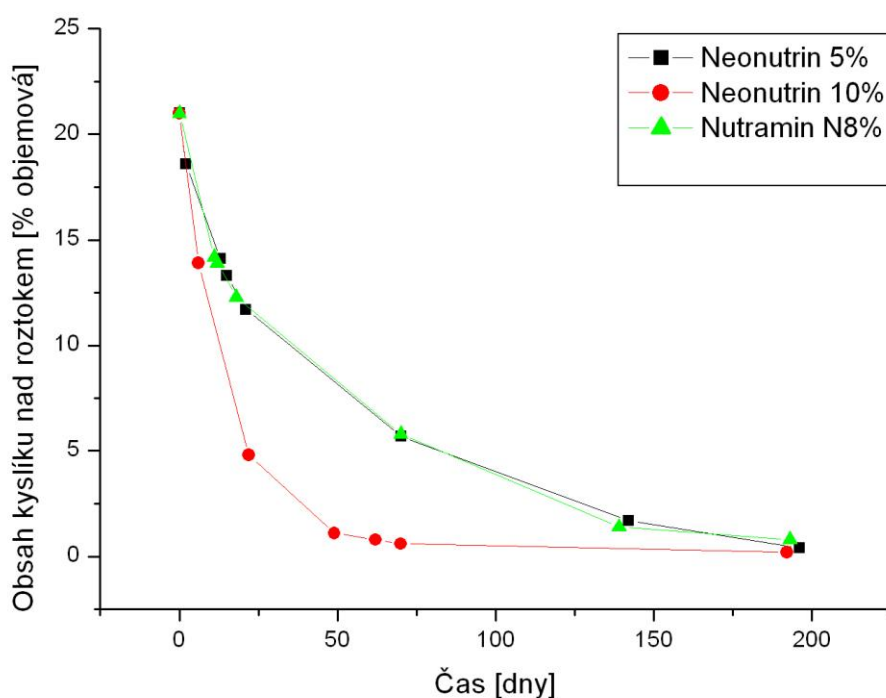
1) Vliv světelného záření

Stupeň rozkladu je přímo úměrný nárůstu absorbance při vlnové délce 420 nm, kdy při absorbanci 0,0133 (optická dráha = 1 cm) je již rozklad pozorovatelný pouhým okem. Spektrofotometrická studie získaná skladováním roztoků za standardních podmínek ve stabilitní komoře a skladováním za přístupu slunečního záření neposkytla zásadní rozdíl v nárůstu absorbance.

2) Vliv kyslíku nad roztokem

Kyslík přítomný nad hladinou infuzního roztoku v lahvi významně ovlivňuje svým oxidačním chováním stabilitu a složení tohoto roztoku. Proto byly provedeny experimenty, kdy byl zkoumán jeho vliv na pomocné látky a vlastní aminokyselinové species. V grafu č. 1 jsou uvedena data, týkající se vlivu kyslíku na samotný komerční Neonutrin 5%, Neonutrin 10%, Nutramin N8%.

Všechny uvedené komerční preparáty obsahují jako stabilizační přísadu disiřičitan sodný. Z naměřených dat je patrné, že při hermetickém uzavření lahve s roztokem dochází k úbytku kyslíku nad jeho hladinou. Uvedený fakt dokumentuje graf č. 1.

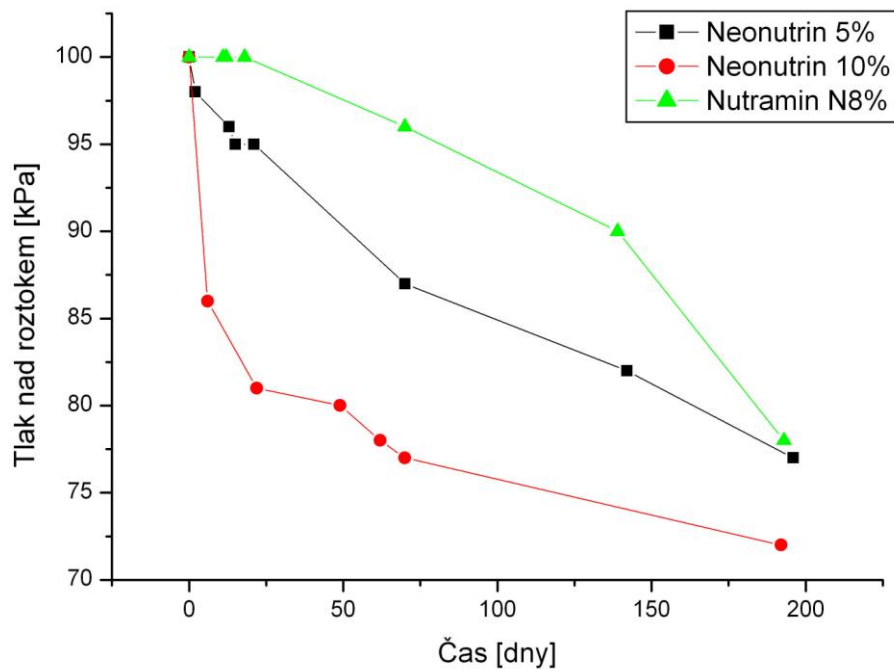


Graf č. 1

Pokles koncentrace kyslíku nad hladinou roztoků Neonutrinu 5%, Neonutrinu 10%, Nutraminu N8.

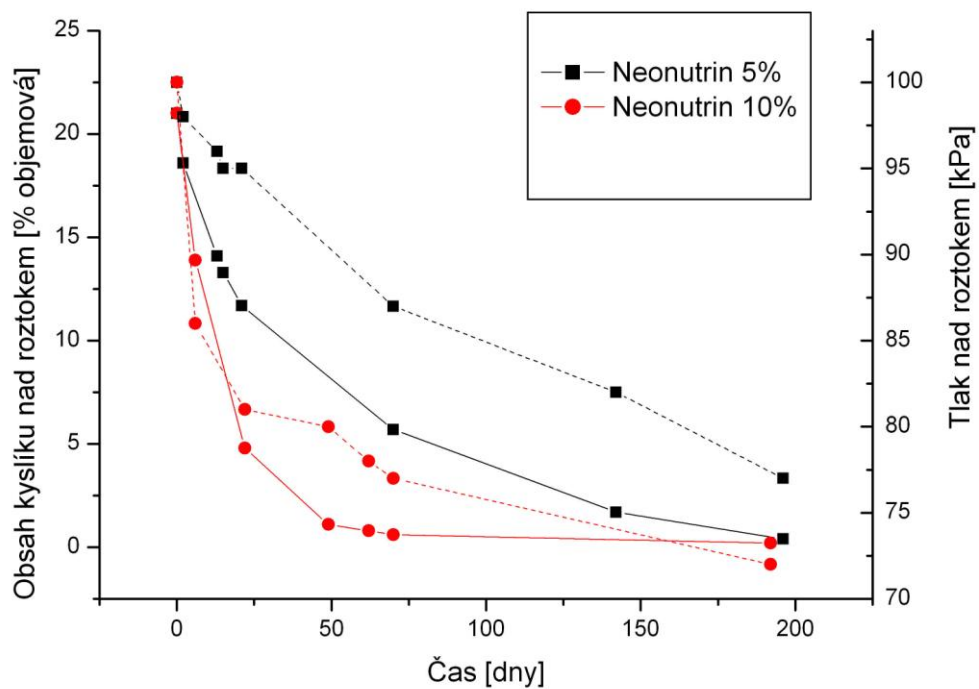
Složení roztoků Neonutrinu 5%, Neonutrinu 10% je stejné, liší se pouze koncentrací rozpuštěných složek roztoku. Koncentrace stabilizační složky disiřičitanu sodného je ve všech případech stejná. Z uvedeného je patrné, že rychlejší úbytek kyslíku v případě Neonutrinu 10% bude zřejmě způsoben vyšší koncentrací rozpuštěných aminokyselin,

kteřé díky své vyšší koncentraci interagují s kyslíkem rychleji. S úbytkem kyslíku je úzce spjata i další měřená veličina pokles tlaku nad roztokem. Měření hodnot poklesu tlaku potvrzuje, že naměřená data uvedená v grafu č. 2 korespondují s hodnotami odpovídajícími poklesu koncentrace volného kyslíku (graf č. 1). Pro lepší názornost situace poklesu koncentrace kyslíku a snížení tlaku nad roztokem pro Neonutrin 5% a 10% je uveden graf č. 3.



Graf č. 2

Pokles tlaku vzduchu nad hladinou roztoků Neonutrinu 5%, Neonutrinu 10%, Nutraminu N8%.

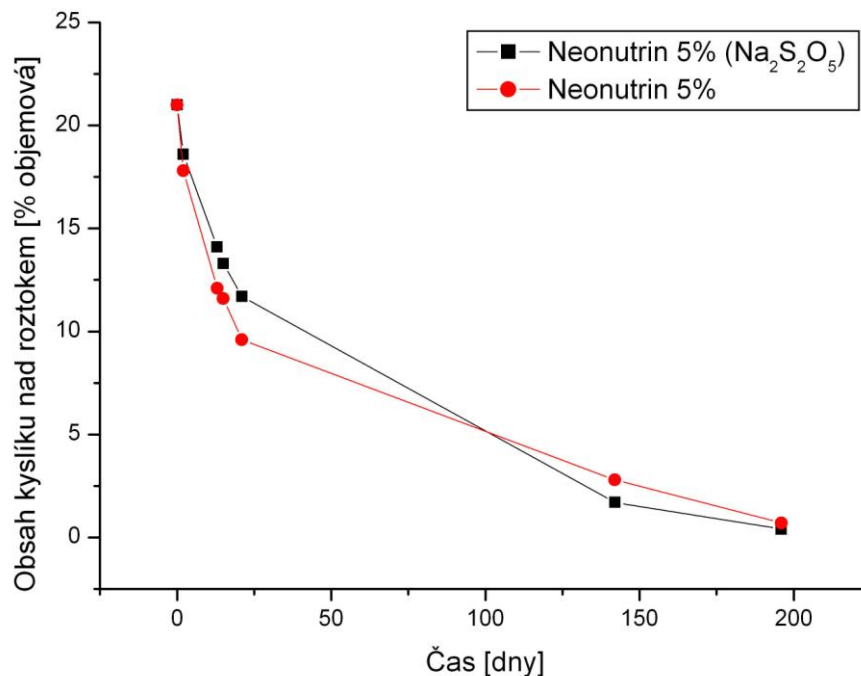


Pozn. Přerušovaná čára zobrazuje tlak nad roztokem, plná čára obsah kyslíku.

Graf č. 3.

Srovnání poklesu tlaku vzduchu nad hladinou a obsahu kyslíku u roztoků Neonutrinu 5% a Neonutrinu 10%.

Z tohoto důvodu bylo zajímavé zjistit, jaký vliv má na konverzi kyslíku nad roztokem aminokyselin přidaný stabilizátor (disiřičitan sodný). Situaci dokumentuje graf č. 4.



Graf č. 4.

Vliv disiřičitanu na pokles obsahu kyslíku nad roztokem Neonutrinu 5%.

Úbytek koncentrace kyslíku je v obou experimentech totožný a konverguje ke stejné hodnotě 0,4 - 0,7 obj. %. Z uvedených dat a z grafu č. 4 jasně plyne, že působení použitého stabilizátoru roztoku nemá významný vliv na snížení koncentrace kyslíku. Toto zjištění vede k závěru, že změna koncentrace kyslíku, resp. jeho úbytku, je vyvolána pravděpodobně interakcí (přímou oxidací) volných aminokyselin s kyslíkem.

Pro další zkoumání byl proveden screening působení kyslíku na vodné roztoky jednotlivých aminokyselin. Výsledky dokumentuje tabulka č. 10.

Porovnáním hodnot bylo zjištěno, že absorbance vodného roztoku tryptofanu dosahuje až stonásobně vyšších hodnot než ostatní roztoky aminokyselin.

3) Vliv teploty

Při přípravě roztoků aminokyselin bylo použito dvou metod navzájem se lišících v teplotě konečné úpravy těchto roztoků. Roztoky byly připravovány ve všech případech pod inertní atmosférou dusíku. Spektrofotometrickou analýzou bylo zjištěno, že roztoky připravené bez závěrečné sterilizace při 120 °C vykazovaly menší hodnotu absorbance při 420 nm. Naproti tomu roztoky, u nichž bylo použito sterilizace, vykazovaly absorbance vyšší. Rozdíl mezi hodnotami absorbance byl řádově stokrát vyšší. Z toho plyne, že teplota výrazně ovlivňuje kolorimetrickou změnu měřených roztoků.

Na základě strukturní odlišnosti aminokyselin byla pro měření vybrána skupina aminokyselin, která by mohla být potenciálně odpovědná za změny, které v roztocích při stání probíhají.

Pro tento screening byly vybrány tyto aminokyseliny: His, Trp, Cys, Met, Arg. Uvedené výsledky v tabulce č. 10.

Aminokyselina	absorbance počáteční stav	absorbance po 7 dnech	absorbance po 75 dnech	pH po 75 dnech
Arg	0,0019	0,0035	0,001	9,86
Cys	0,0008	0,0039	0,004	4,56
Trp	0,0133	0,0179	0,0363	5,6
His	0,0016	0,0008	0,005	7,09
Met^a	0,0016	0,0022	0,003	5,37

^a láhev byla uzavřena při 35 °C

Tabulka č. 10: Absorbance roztoků His, Tyr, Trp, Cys, Met, Pro.

Naměřené hodnoty studovaného souboru aminokyselin překvapivě ukázaly, že zvýšené hodnoty absorbance vykazoval pouze tryptofan. Na základě těchto výsledků pro potvrzení, že pouze tryptofan je odpovědný za vznik nežádoucích barevných změn, byl změřen druhý kompletní soubor méně reaktivních aminokyselin. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 11.

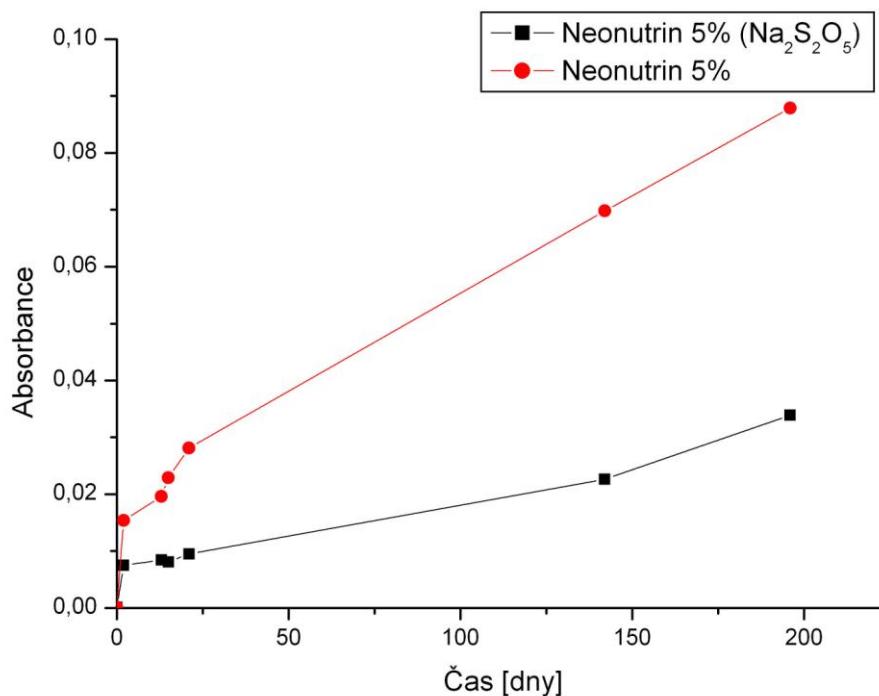
Aminokyselina	absorbance počáteční stav	absorbance po 28 dnech	pH po 28 dnech
Lys	0,0009	0,0016	5,6
Phe	0,0005	0,0011	5,23
Tre	0,0012	0,0026	5,3
Ala	0,0007	0,0018	5,6
Gly	0,0005	0,0008	5,64
Pro	0,0009	0,0013	5,55
Tyr	0,0012	0,0016	6
Ser	0,0008	0,0012	5,6

Tabulka č. 11: Absorbance méně reaktivních aminokyselin.

Hodnoty absorbance u měřeného souboru aminokyselin zdaleka nedosahují hodnot naměřených pro tryptofan. Je tedy možné se domnívat, že barevné změny jsou způsobeny pravděpodobně rozkladem aminokyseliny tryptofanu. Z tohoto důvodu byla pozornost zaměřena právě na tryptofan. Zajímavým výsledkem dalšího zkoumání bylo měření úbytku kyslíku nad roztokem tryptofanu. V tabulce č. 12 jsou uvedeny hodnoty i pro další volné aminokyseliny ze skupiny více reaktivních.

1) Reaktivita složek směsi a jejich transformace (-COOH, -NH₂, -OH, -SH)

Z následujících dat vyplývá, že jednotlivé složky roztoků vzájemně interagují.



Graf č. 5

Vliv disiričitanu na absorbanci Neonutrinu 5%.

Ačkoliv přítomnost disiričitanu jako stabilizátoru neměla vliv na snížení koncentrace kyslíku nad roztokem, ukázalo se, že v případě měření absorbance, kdy nebyl disiričitan v roztoku přítomen byly hodnoty absorbance ~ 2,6 krát vyšší. Z uvedeného výsledku plyne, že přítomnost disiričitanu jako stabilizátoru je nutná pro snížení vzniku nežádoucího rozkladu roztoku aminokyselin v Neonutrinu 5% a zřejmě i koncentrovanějších preparátů Neonutrinu 10% a Nutraminu N8%.

2) Vliv pomocných látek

Vzhledem k tomu, že jednotlivé složky aminokyselinové směsi se navzájem od sebe strukturně liší, bylo také nutné zjistit, jak se jednotlivé volné aminokyseliny chovají ve vodném roztoku. Byly připraveny roztoky volných aminokyselin v koncentraci, která odpovídá koncentraci ve směsi Neonutrinu 5% pod inertní atmosférou dusíku. Lahve s roztoky byly sterilizovány při 120 °C po dobu 6 minut.

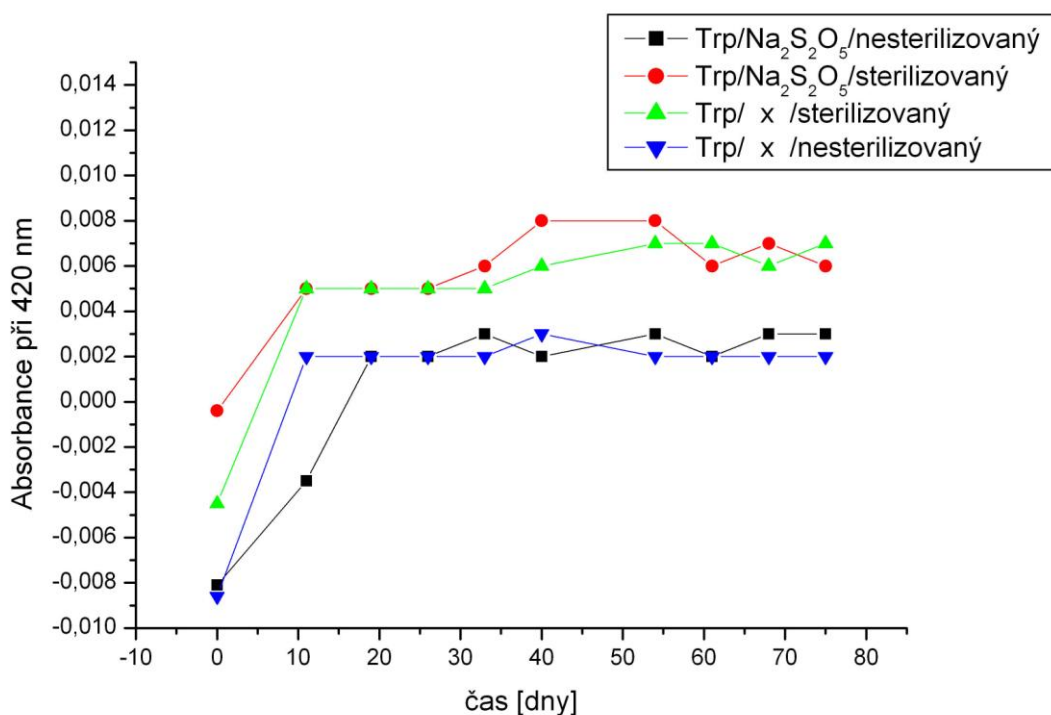
Aminokyselina	tlak nad roztokem ^a [kPa]	obsah kyslíku v prostoru nad roztokem ^a [%]
Arg	95	18,4
Cys	95	17,8
Trp	92	17,6
His	96	18,2
Met^b	88	17,1
Lys	97	19,4
Phe	98	19,3
Tre	95	19,4
Ala	97	19,1
Gly	96	19,3
Pro	98	19,4
Tyr	85	17,1
Ser	97	19,4

^a 4 dny od počátku měření

^b láhev byla uzavřena při 35 °C

Tabulka č. 12: Úbytek kyslíku nad roztokem volných aminokyselin.

Jednoznačně z tabulky (grafu) plyne, že obsah kyslíku nad roztokem tryptofanu je ze skupin sledovaných aminokyselin nejnižší. Pokles obsahu kyslíku v případě tryptofanu dosahuje ~ 20 % obsahu kyslíku nad roztokem ostatních měřených aminokyselin. Naměřená hodnota obsahu kyslíku nad sterilizovaným roztokem volného tryptofanu po sedmi dnech stání koreluje s hodnotou obsahu kyslíku nad Neonutrinem 5 % po 15 dnech stání. I když množství rozpuštěného tryptofanu v obou roztocích je stejné, pokles obsahu kyslíku u Neonutrinu 5 % je pozvolnější. Proto bylo nutné provést měření samotného roztoku tryptofanu a roztoku tryptofanu s přidavkem stabilizátoru disiričitanu. Výsledky těchto měření jsou uvedeny v grafu č. 6.



x značí absenci Na₂S₂O₃ v roztoku

Graf č. 6

Závislost sterilizace a přítomnosti disiričitanu na roztok tryptofanu.

Z grafu č. 6 je možné odečíst hodnoty absolutního rozdílu absorbancí na začátku a konci měření, které jsou v tabulce č. 13.

Experiment č.	Roztok tryptofanu		Δ Absorbance ^a při 420 nm
	Na ₂ S ₂ O ₅	sterilizace	
1	+	-	0,0111
2	+	+	0,0064
3	-	+	0,0115
4	-	-	0,0106

^a Δ Absorbance odečtené během 75 dnů

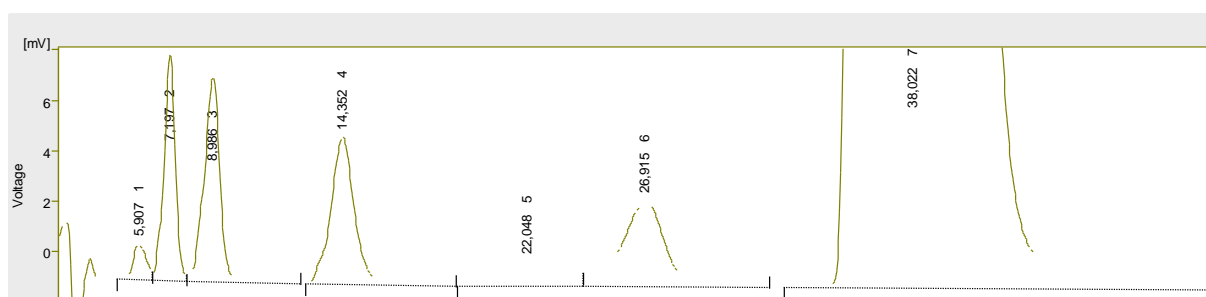
Tabulka č. 13:

Hodnoty absolutního rozdílu absorbancí po 75 dnech měřených za různých podmínek.

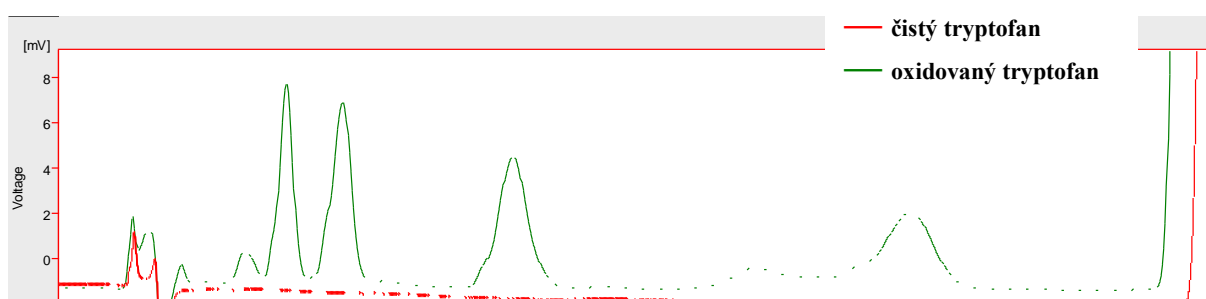
V případě experimentu č. 2, kdy byl roztok tryptofanu připraven za použití sterilizace a stabilizátoru disiřičitanu, dosáhla hodnota absorpance přibližně poloviční hodnoty než hodnoty absorbancí v ostatních experimentech (1, 3, 4). V jejich případě bylo použito pouze jednoho stabilizačního faktoru (disiřičitanu nebo sterilizace). U experimentu č. 4 nebylo použito žádného stabilizačního faktoru. Na základě těchto výsledků je možné tvrdit, že vzájemné působení disiřičitanu a sterilizace má synergický efekt na stabilitu roztoku tryptofanu, který je výraznější než každý ze stabilizačních faktorů působících samostatně.

Vzhledem k tomu, že byl tryptofan identifikován jako nejméně stabilní komponenta aminokyselinových vodných roztoků, byla také zkoumána pomocí chromatografických metod míra jeho rozkladu. K tomuto účelu byl připraven roztok tryptofanu, který byl vystaven působení vzdušného kyslíku. První metoda, tenkovrstvá chromatografie, se ukázala být nevhodná z důvodu nízké citlivosti pro získání relevantních dat, kterými by bylo možné prozkoumat rozkladné procesy probíhající na tryptofanu.

Naproti tomu HPLC analýza na reverzní fázi jasně odhalila rozkladné produkty. Na chromatogramu uvedeném na obrázku č. 1 je možné pozorovat minimálně 8 různých rozkladných produktů s retenčními časy mezi 5-26 minutami, které vznikly pravděpodobně oxidací čistého tryptofanu ve vodném roztoku. Vzhledem k tomu, že retenční časy těchto nečistot jsou nižší než retenční čas samotného tryptofanu, je možné se domnívat, že se jedná o molekuly polárnější. Situaci dokumentuje obrázek č. 2, kde jsou proloženy chromatogramy čistého tryptofanu a rozloženého tryptofanu. HPLC získaná data korespondují i s literárně uvedeným sdělením, které se týká nestability tryptofanu⁴⁹.



Obr. č. 1 HPLC chromatogram oxidovaného tryptofanu. R_t tryptofanu = 38 min, $\lambda=254$ nm.

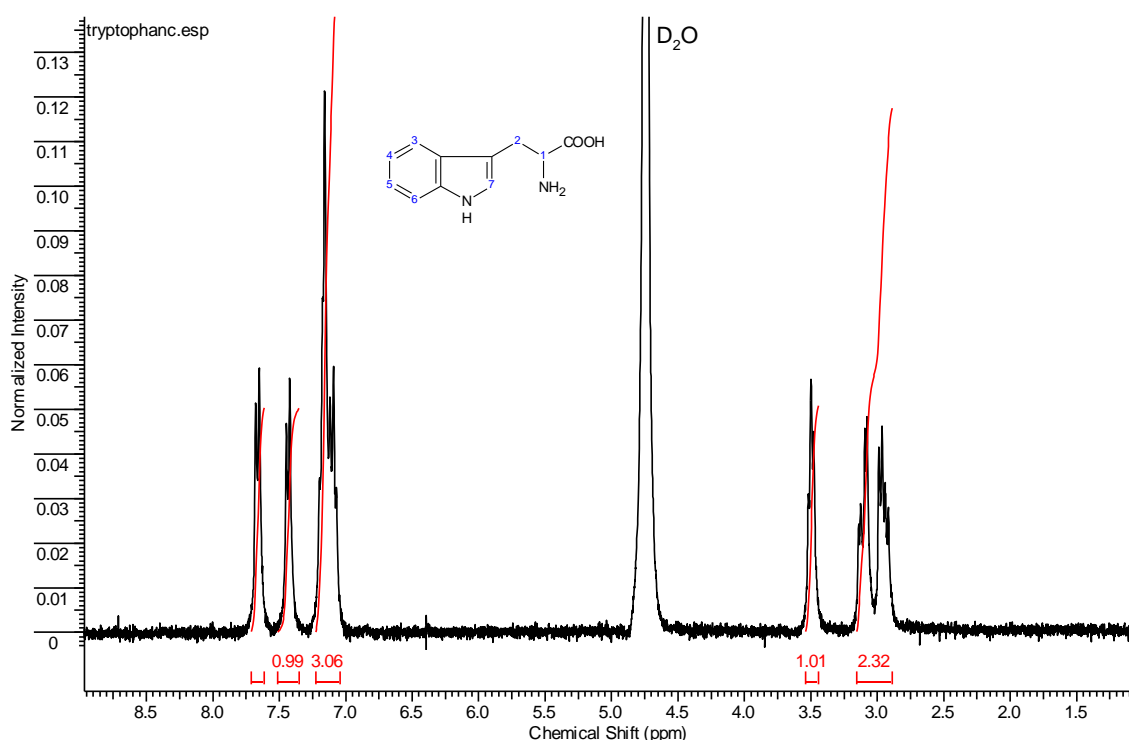


Obr. č. 2 Proložení HPLC chromatogramů čistého a rozloženého tryptofanu v čase 0 – 35 min, $\lambda=254$ nm.

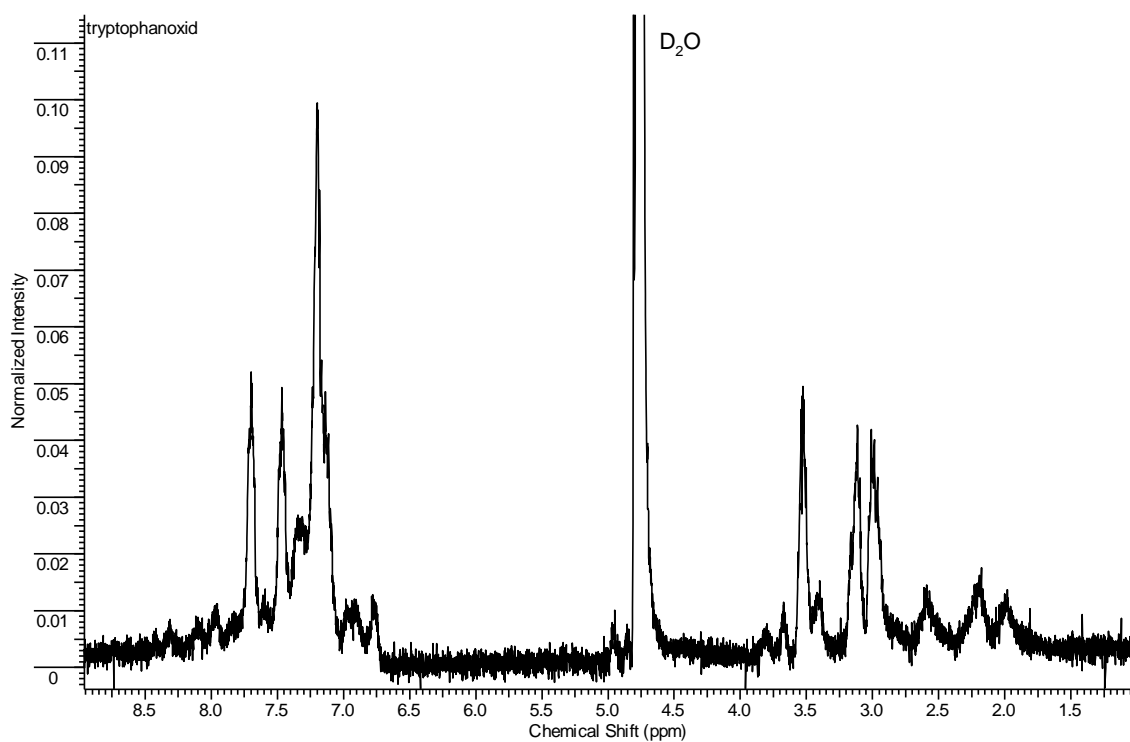
Pro přesnější charakteristiku by bylo vhodnější použít metodu, která by umožnila určit chemickou strukturu vzniklých nečistot (strukturní parametry, chemické složení).

Vhodnými metodami jsou HPLC – MS nebo HPLC – HRMS. Bohužel nebyly tyto přístroje k dispozici a tak tato měření nemohla být provedena.

Srovnávací ^1H NMR experimenty uvedené na obrázku č. 3 potvrzují výsledky HPLC analýzy. Stárnutí roztoku tryptofanu se v ^1H NMR spektru projevuje přítomností dalších vodíkových signálů. Z jejich chemického posunu je možné se domnívat, že dochází při degradaci tryptofanového skeletu k určitým chemickým změnám. Dochází pravděpodobně k strukturním změnám v části indolového skeletu tryptofanu $\delta = 6,7 - 7,0$ ppm (týká se atomů 4 a 5). Nové signály vodíkových jader se objevují v oblasti $\delta = 1,9 - 2,8$ ppm, která je charakteristická pro alifatické vodíkové atomy. V oblasti α -chirálního vodíku alifatického řetězce tryptofanu se objevují nové zborčené multiplety $\delta = 3,4 - 3,9$ ppm.



Obr. č. 3 ^1H NMR spektrum čistého tryptofanu (300,1 Hz, D₂O).



Obr. č. 4 Srovnávací ^1H NMR spektrum rozloženého tryptofanu (300,1 Hz, D_2O).

6. Závěr

Předkládaná práce si kladla za cíl určit příčinu nestability komerčně vyráběných roztoků aminokyselin pro parenterální, která se projevuje vznikem nežádoucího zbarvení při skladování výrobku.

Pro nalezení faktorů, které ovlivňují stabilitu roztoků aminokyselin, byly zkoumány jak vlivy exogenní (světelné záření, vliv kyslíku nad roztokem, vliv teploty) tak vlivy endogenní (reaktivita složek směsi a jejich transformace, vliv pomocných látek).

Z experimentálních dat vyplynulo, že nelze jednoznačně určit příčinu nestability. Faktory se navzájem kombinují.

Použité analytické instrumentální a separační techniky HPLC, NMR, SPF jednoznačně určily majoritní podíl tryptofanu na nestabilitě roztoku aminokyselin. Například HPLC analýza na reverzní fázi zcela jednoznačně odhalila minimálně 8 rozkladných produktů.

Také srovnávací ^1H a NMR experimenty ukázaly, že dochází pravděpodobně ke strukturálním změnám idolového skeletu tryptofanu.

Spektrofotometrická studie neposkytla výsledky, které by vedly k zjištění zásadního vlivu světelného záření na skladované roztoky aminokyselin. Naměřené hodnoty ukázaly, že úbytek kyslíku nad roztokem je v exponenciálním vztahu ke koncentraci aminokyselin v roztoku a v přímé úměře s poklesem tlaku nad roztokem. Významným exogenním faktorem je teplota (sterilizace). Z výsledků plyne, že největší změny vykazuje aminokyselina tryptofan, která se projevuje již makroskopicky pozorovatelným žlutým zbarvením roztoku. Je tedy důvodné se domnívat, že barevné změny ve vodných roztocích směsí aminokyselin, jsou způsobené rozkladem aminokyseliny tryptofanu.

Použitý stabilizátor disiřičitan sodný nemá významný vliv na snížení koncentrace kyslíku v roztoku jak by se dalo předpokládat. Na základě tohoto zjištění je úbytek kyslíku vyvoláván interakcí volných aminokyselin s kyslíkem. Přesto, že přítomnost stabilizátoru neměla vliv na snížení koncentrace kyslíku nad roztokem, ukázalo se, že

jeho přítomnost má výrazný vliv na hodnoty absorbance. Z těchto měření plyne, že přítomnost disiřičitanu je nutná pro snížení nežádoucího rozkladu roztoku aminokyselin v Neonutrinu 5%, Neonutrinu 10% a Nutraminu N8%.

Obsah kyslíku nad roztokem samotného tryptofanu byl ze skupiny měřených aminokyselin jeden z nejnižších. Výsledky měření vedou k závěru, že vzájemné působení disiřičitanu a sterilizace má synergický efekt na stabilitu roztoku tryptofanu. Vlastní sterilizace vede ve zvýšené míře k rozkladu tryptofanu. Z tohoto důvodu by bylo vhodné provádět závěrečnou sterilizaci jiným vhodným způsobem než je parní sterilizace.

7. Použitá literatura

1. Brodanová, M., Anděl, M.: Infúzní terapie, parenterální a enterální výživa, str. 296 Grada Publishing, Praha 1994.
2. AISLP, Automatizovaný informační systém léčivých přípravků, RNDr. Bohuslav Škop, CSc, K Jasánkám 12/1192, 155 00 Praha 5
3. Reg-57: Požadavky na informace uváděné na obalech hromadně vyráběných léčivých přípravků. Věstník SÚKL, 2001.
4. Evropská direktiva pro registraci léčiv: Module 3 – Quality - Chemical-pharmaceutical and biological information for chemical active substances and biological medicinal products NTA, Volume 2B, str. 35 CTD-Module 3, July 2001.
5. Avis, K. E.: The parenteral dosage form and its historical development. In: Avis, K.E., Lieberman, H. A., Lachman, L. (Eds): Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications Vol 1, str. 1 Marcel Dekker, New York 1992.
6. Chalabala, M. et al: Technologie léků, str. 274 Galén, Praha 1997.
7. Schück, O.: Poruchy metabolismu vody a elektrolytů v klinické praxi, str. 224 Grada Publishing, Praha 2000.
8. Grimm, W., Gothier, D.: Stabilität. In: Herzfeld, C. D., Kreuter, J. (Eds): Grundlagen der Arzneiformenlehre. Galenik 2, str. 535 Springer-Verlag, Berlin 1999.
9. Motola, S., Agharkar, S. N.: Formulation research of parenteral medications. In: Avis, K.E., Lieberman, H.A., Lachman, L. (Eds): Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications Vol 1., strana 115 Marcel Dekker, New York 1992.
10. ICH Guidelines-CPMP/QWP/2934/99: Use stability trstiny-směrnice pro léky, strana 33.
11. Matthews, B.R.: Regulatory aspects of stability trstiny in Europe. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 831.
12. Stability considerations in dispensing praktice: USP 24., str. 2128 24th Ed., The US Pharmacop. Convention, Inc., Rockville USA, 1999

13. Beňo, P., Truplová, E., Ostrovská, V., Stankovičová, M.: Stabilita liečiv a liekov, 238 Veda, Bratislava 2003.
14. Bauer, K. H., Frömming, K. H., Früherer, C. (Eds.): Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie, str. 486 Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2002.
15. Grimm, W.: General concept for stability testing. In: Grimm, W., Krümmen, K. (Eds.): Stability testing in EC, Japan and the USA, scientific and regulatory requirements, str. 191 Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1993.
16. Gu, L.C. et al.: Stability of interleukin 1 β (IL-1 β) in aqueous solution: Analytical methods, kinetics, products and solution formulation implications. *Pharm. Res.* 8 (1991) 485.
17. Wang, Y. C. J.: Parenteral products of peptides and proteins. In: Avis, K. E., Lieberman, H. A., Lachman, L. (Eds.): Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications. 2nd Ed., Vol 1. str. 283, Marcel Dekker, New York 1992.
18. Khosravi, M., Borchardt, R. T.: Chemical pathways of peptide degradation: IX. Metal-catalyzed oxidation of histidine in model peptides. *Pharm Res.* 15 (1998) 1096.
19. Bhatt, N. P., Patel, K., Borchardt, R.T.: Chemical pathways of peptide degradation. I. Deamidation of adrenocorticotrophic hormone. *Pharm. Res.* 7 (1990) 593.
20. Patel, K., Borchardt, R.T.: Chemical pathways of peptide degradation. III. Effect of primary sequence on pathways of deamidation of asparaginyl residue in hexapeptides. *Pharm. Res.* 7 (1990) 787.
21. Patel, K., Borchardt, R.T.: Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.* 7 (1990) 703.
22. Manning, M. C., Kamlesh, P., Borchardt, R. T.: Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.* 6 (1989) 903.
23. Reubsæet, J. L. E., Beijnen, J. H., Bult, A., Maanen, R. J., Marchal, J. A. D., Underberg, W. M. J.: Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: Chemical instability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 955.

24. Li, S., Schöneich, C., Borchardt, R. T.: Chemical pathways of peptide degradation. VIII. Oxidation of methionine in small model peptides by prooxidant/transition metal ion système: Influence of selective scavengers for reactive oxygen intermediates. *Pharm. Res.* 12 (1995) 348.
25. Stadtman, E. R.: Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalysed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 797.
26. Schöneich, C.: Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxohistidine in peptides and proteins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1093.
27. Jankovič, I. A., Josimovič, L. R.: Autooxidation of tryptophan in aqueous solutions. *J. Serb. Chem. Soc.* 66 (2001) 571.
28. Barnes, A. R.: Compatibility of commercially available low-density polyethylene eye-drop container with antimicrobial preservatives and potassium ascorbate. *J. Clin. Pharm. Ther.* 20 (1995) 341.
29. Konečný, M.: Stabilizace aminoroztoků Infusia a.s., Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha 2002.
30. Kibbe, A. H. (ed.): Handbook of pharmaceutical excipients. American Pharm. Assoc., Washington, (2000) 490.
31. Schumacher, G. E., Hull, R. L.: Some factors influencing the degradation of sodium bisulfite in dextrose solutions. *Am. J. Hosp. Pharm.* 23 (1966) 245.
32. Maillard, C. L.: Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *Compte-rendu Acad. Sci.* 154 (1912) 66.
33. Branen, L.A., Davidson, P. M., Salminen, S.: Food additives, str. 736, Marcel Dekker, New York 1990.
34. Lester, M. R.: Sulphite sensitivity: significance in human health. *J. Am. Coll. Nutr.* 14 (1995) 229.
35. Tan, M., Parkin, J. E.: Route of decomposition of thiomersal (thiomerosal), *Int. J. Pharm.* 208 (2000) 24.

36. Davidson, P. M., Branen, A.L.: Antimicrobials in foods. str. 137, Marcel Dekker, New York 1993.
37. Richards, R. M. E., Reary, J. M. E.: Changes in antibacterial activity of thiomersal and PMN on autoclaving with certain adjuvants. *J. Pharm. Pharmacol.* 24 (1972) 840 Supplement.
38. Schroeter, L. C.: Sulfurous acid salts as pharmaceutical antioxidants. *J. Pharm. Sci.* 50 (1961) 891.
39. Brusin, M.D.: Comprehensive review in toxicology for emergency clinicians, str. 697 Taylor & Francis, Washington 1997.
40. Gunnison, A. F., Jacobsen, D. W.: Sulphite hypersensitivity. A critical review. *Crit. Rev. Toxicol.* 17 (1987) 185.
41. Sokol, W. N., Hydock, I. B.: Nasal congestion, urticaria, and angioedema caused by an IgE mediated reaction to sodium metabisulphite. *Ann Allergy* 65 (1990) 233.
42. Sakamoto, T., Elwood, W., Barnes, P. J., Chung, K. F.: Pharmacological modulation of inhaled sodium metabisulphite induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction in the guinea pig. *Br. J. Pharmacol.* 107 (1992) 481.
43. Mansour, E., Ahmed, A., Cortes, A., Caplan, J., Burch, R. M., Abraham, W. M.: Mechanisms of metabisulphite induced bronchoconstriction: evidence for bradykinin B2 receptor stimulation. *J. Appl. Physiol.* 72 (1992) 1831.
44. Vena, G. A., Foti, C., Angelini, G.: Sulphite contact allergy. *Contact Dermatitis* 31 (1994) 172.
45. Maga, J. A., Tu, A. T.: Food additive toxicology, str. 542 Marcel Dekker, New York 1995.
46. Togawa, T., Tanabe, S., Kato, M., Koshiishi, I., Toida, T., Imanri, T.: Metabolic pathways of sodium metabisulphite injected intravenously in rabbits. *J. Pharmacobiodyn.* 13 (1990) 83.

47. Lachance, C., Chessex, P., Pineault, M., Brisson, G., Madsen, D.: Clinical and nutritional impacts of removing bisulphite from neonatal parenteral nutrition. *Nutrition* 9 (1993) 519.
48. Lavoie, J. C., Lachance, C., Chessex, P.: Antiperoxide activity of sodium metabisulphite. A doubled edged sword. *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 871.
49. Simat, T. J., Steinhart, H.: Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides and proteins. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 490.

8. Seznam příloh

8.1. Stanovení obsahu disiřičitanu sodného – validace analytické metody

8.2. Specifikace hotového výrobku NEONUTRIN[®] 5%, NEONUTRIN[®] 10%, NEONUTRIN[®] 15%.
