

Załącznik nr 2



AUTOREFERAT

Omówienie cyklu prac dotyczących osiągnięcia naukowego:

**„Innowacyjna koncepcja badań stabilności chemicznej substancji leczniczych
na przykładzie antagonistów receptora H₂ - konsekwencje aplikacyjne
w przemyśle farmaceutycznym”**

Marzena Jamrógiewicz

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Wiesław Sawicki

Gdańsk, 2015

1. Informacje wstępne o uzyskanych dyplomach i stopniach naukowych

1996 – 2001 r. - studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, na kierunku Biotechnologia

11 kwietnia 2001 r. - tytuł magistra inżyniera chemii na podstawie pracy magisterskiej pt. „Klonowanie, ekspresja i próba oczyszczenia termostabilnego pyrolizyny *Pyrococcus woesei*” wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, promotor pracy - pan prof. dr hab. Józef Kur

2001 – 2005 r. studia doktoranckie w Katedrze Technologii Chemicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej

19 października 2005 r. – stopień doktora nauk chemicznych w specjalności chemia supramolekularna na podstawie pracy doktorskiej pt. „Wpływ cyklodekstryn na reakcje sprzęgania soli diazoniowych z azolami. Chromogeniczne, makrocycliczne pochodne imidazolu”, wykonanej pod kierunkiem pana prof. dr hab. Jana F. Biernata.

Praca uzyskała wyróżnienie za najlepszą pracę doktorską obronioną na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w 2005 r.

2001 - 2002 r. – podyplomowe, dwusemestralne Studia Pedagogiczne, na Wydziale Oceanotechniki i Okrętownictwa Politechniki Gdańskiej ukończone dyplomem w **2002 r.**

2013 r. – certyfikat ukończenia szkolenia: „Naukowiec w biznesie”, 04-06.2013 r.: Rozwój i zarządzanie produktami innowacyjnymi w obszarze nauk medycznych, Badania prekliniczne i kliniczne omówione na przykładzie projektów naukowych, Komercjalizacja produktów biotechnologicznych i medycznych w projekcie naukowym, INVESTIN

2. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

7.11.2005 r. – 28.02.2007 r. - asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Gdańsku.

1.03.2007 r. – obecnie adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

3. Osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

- a) **Tytuł osiągnięcia naukowego:** „Innowacyjna koncepcja badań stabilności chemicznej substancji leczniczych na przykładzie antagonistów receptora H₂ - konsekwencje aplikacyjne w przemyśle farmaceutycznym”.
- b) **Wykaz monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako osiągnięcie postępowania habilitacyjnego.** Informacje o udziale własnym, kopie prac, oświadczenia współautorów o ich udziale w publikacjach wieloautorskich umieszczone są w odpowiednich załącznikach.

W skład osiągnięcia wchodzi cykl 11 publikacji dotyczących badań stabilności chemicznej i fotochemicznej substancji leczniczych z grupy antagonistów receptora H₂, oraz opracowania koncepcji metodyki badania wczesnych zmian w labilnych substancjach leczniczych w fazie stałej w oparciu o nowoczesne narzędzia analityczne. Wyniki badań (5 publikacji), jak i opracowania poglądowe (6 publikacji) dotyczące tematyki prowadzonych prac zostały opisane w postaci monotematycznego cyklu, o łącznym współczynniku oddziaływania IF=12,064 i wartości punktacji MNiSW=171. Przed doktoratem dorobek stanowiły 4 prace o wartości IF=2,641 i 12 punktów KBN/MNiSW. Dorobek po doktoracie, poza cyklem objętym osiągnięciem habilitacyjnym, stanowi 11 publikacji o wartości IF=18,095 i punktacji MNiSW=243, 3 rozdziały w monografiach anglojęzycznych z dziedziny chemii supramolekularnej i udzielony 1 patent. Całkowity dorobek włącznie z pracami opublikowanymi przed doktoratem wynosi IF=32,800 i 414 punktów MNiSW. Indeks-h według bazy Web of Science wynosi 4, natomiast według bazy Scopus wynosi 5.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

H1. Marzena Jamrógiewicz, Jerzy Łukasiak, 2008, *Spektroskopia refleksyjna w podczerwieni (ATR-FTIR) w aspekcie badań trwałości leku*, Farm. Pol., 64 (14), 655-663 (MNiSW=4);

H2. Marzena Jamrógiewicz, 2012, *Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology*, J. Pharm. Biomed. Anal., 66, 1-10 (IF=2,947; MNiSW=30);

- H3. Marzena Jamrógiewicz**, 2006, *Zastosowanie spektrofotometrii w bliskiej podczerwieni NIR w kontroli i technologii produkcji leków*”, Farm. Pol., 62 (11), 487-494 (MNiSW=3);
- H4. Marzena Jamrógiewicz**, Zuzanna Nietupska, Wiesław Sawicki, 2012, *Spektroskopia Ramana narzędziem PAT w technologii farmaceutycznej*, Farm. Pol., 68 (2), 117-123, (MNiSW=3);
- H5. Marzena Jamrógiewicz**, Jerzy Łukasiak, 2009, *Short Term Monitor of Photodegradation Processes in Ranitidine Hydrochloride Observed by FTIR and ATR-FTIR*, J. Food&Drug Analysis, 17(5), 342-347 (IF=0,630; MNiSW=20);
- H6. Marzena Jamrógiewicz**, Jerzy Łukasiak, 2011, *Zastosowanie metody ATR-FTIR oraz FTIR do badania trwałości fotochemicznej chlorowodoru ranitydyny w wybranych produktach leczniczych*, Farm. Pol. 67(6), 353-356 (MNiSW=3);
- H7. Marzena Jamrógiewicz**, Aleksander Ciesielski, 2015, *Application of vibrational spectroscopy, thermal analyses and X-Ray diffraction in the rapid evaluation of the stability in solid-state of ranitidine, famotidine and cimetidine*, J. Pharm. Biomed. Anal. 107, 236-243, (IF=2,829; MNiSW=35).
- H8. Marzena Jamrógiewicz**, Ewelina Kosek, Wiesław Sawicki, 2013, *Problematyka lotnych związków organicznych w farmacji, Volatile organic compounds in pharmacy – the range of the problem*, Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine 16 (3), 59-68 (MNiSW=5);
- H9. Marzena Jamrógiewicz**, Bartosz Wielgomas, 2013, *Detection of some volatile degradation products released during photoexposition of ranitidine in a solid state*, J. Pharm. Biomed. Anal., 76, 177-182 (IF=2,829; MNiSW=30);
- H10. Marzena Jamrógiewicz**, Katarzyna Jasińska, Wiesław Sawicki, 2012, *Problematyka zapewnienia fotostabilności substancji leczniczych*, Farm. Pol., 68, 858-866 (MNiSW=3);
- H11. Marzena Jamrógiewicz**, Bartosz Wielgomas, Michał Strankowski, 2014, *Evaluation of the photoprotective effect of β -cyclodextrin on the emission of volatile degradation products of ranitidine*, J. Pharm. Biomed. Anal., 98, 113-119, (IF=2,829; MNiSW=35).

c) Uzasadnienie oraz omówienie celu badań i uzyskanych wyników

WPROWADZENIE

W oparciu o najnowsze opracowania i osiągnięcia naukowe powstają innowacje, które odgrywają coraz większą rolę w gospodarce europejskiej. „Unia innowacji” jest jedną z siedmiu inicjatyw przewodnich przewidzianych w ramach strategii „Europa 2020” na rzecz stworzenia inteligentnej i zrównoważonej gospodarki. Założeniem wdrażanych innowacji jest głównie projektowanie, opracowywanie, produkcja i wykorzystanie nowych produktów, procesów przemysłowych i usług, które mają być szybsze i wydajniejsze od tych dotychczas prowadzonych. Ich efektem ma być przede wszystkim poprawa jakości życia, a także utrzymanie konkurencyjności Unii Europejskiej na rynku światowym. Polityka innowacyjności stanowi zatem łącznik pomiędzy polityką dotyczącą badań i rozwoju technologicznego, a polityką przemysłową.

Unia Europejska dąży do zagwarantowania społeczeństwu wysokiej jakości informacji na temat bezpieczeństwa i skuteczności wytwarzanych produktów leczniczych. Z kolei rozwój nauk farmaceutycznych w ostatnich dekadach pozwala na uzyskanie w pełni rzetelnych danych dotyczących ich jakości.

Przy opracowywaniu koncepcji składu i postaci gotowego produktu leczniczego, który oprócz skuteczności terapeutycznej musi zapewnić pacjentom bezpieczeństwo ważna jest całościowa ocena jego jakości, przy udziale substancji leczniczej (API, *Active Pharmaceutical Ingredient*). Ocena jakości API jest cyklicznym i punktowym elementem procedury monitorowania stabilności poczynając od jej syntezy, aż do wykorzystania w technologii produktu leczniczego. Kluczowym parametrem jakości jest również tożsamość substancji, czyli stwierdzenie jej rzeczywistej struktury chemicznej i postaci fizycznej. Kontrola jakości stanowi zatem jedno z najistotniejszych zagadnień w dziedzinie nauk farmaceutycznych, a zwłaszcza w przypadku substancji labilnych chemicznie i fizycznie jest dużym wyzwaniem dla badaczy i wynalazców.

W celu oceny parametrów jakości farmaceutycznej API ustalone zostały wytyczne określające procedury ich kontroli oraz obowiązujące normy. Zostały opracowane przez szereg organizacji i agencji, do których należą: ICH - Międzynarodowa Konferencja do spraw Harmonizacji (ang. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) powołana w 1991 r., WHO - Światowa

Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*) utworzona w 1948 r., FDA - amerykańska rządowa Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*) utworzona w 1906 r. oraz EMA - Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*), która rozpoczęła działalność równo dwadzieścia lat temu jako EMEA, a od 2009 roku występuje pod skróconym akronimem EMA.

Wytyczne dotyczące oceny jakości substancji, a co się z tym wiąże również produktów leczniczych, opracowywane przez ICH, WHO, FDA, czy EMA, koncentrują się na weryfikacji stabilności API poprzez ustalanie konkretnych testów i sposobu ich prowadzenia [1], oraz na oznaczaniu ilościowym i jakościowym zanieczyszczeń [2]. Badacze kontrolują różne ścieżki potencjalnej degradacji API, oceniają szybkość zachodzących zmian pod wpływem różnych czynników oraz pracują nad możliwościami wprowadzania stabilizatorów i sposobów zabezpieczania substancji labilnych o potwierdzonej skuteczności terapeutycznej. Kryteria prowadzenia badań stabilności oraz oznaczania i klasyfikowania zanieczyszczeń zostały ustalone na początku lat 90-tych ubiegłego stulecia, jednak pierwsze publikacje poruszające problematykę stabilności farmaceutycznej pochodzą z lat 50-tych.

Na ocenę jakości farmaceutycznej związanej ze stabilnością, składają się różnorodne testy, których rezultaty mają być odpowiedzią na pytanie, czy substancja lecznicza jest stabilna chemicznie oraz fizycznie. Z definicji, stabilność jest stanem, w którym nie dochodzi do degradacji API pod wpływem określonych czynników [3]. Według słownika chemicznego, degradacja jest to stopniowy rozpad cząsteczki poprzez eliminowanie jej poszczególnych fragmentów, co prowadzi do coraz prostszych cząsteczek. Czynniki wywołującymi degradację i zalecanymi przez ICH do testowania stabilności są: wilgotność, temperatura, pH, obecność utleniaczy oraz wpływ światła [1,4]. Najistotniejsze badania stabilności API to tak zwane testy stresowe, które zakładają przesadnie intensywne narażenie na działanie wymienionych wyżej czynników, w sposób indywidualny dla różnych substancji leczniczych. Przy określaniu stabilności chemicznej substancji leczniczych ocenia się efekty reakcji chemicznych API, głównie: hydrolizy (w warunkach zwiększonej wilgotności), utleniania (w warunkach tlenu lub nadtlenu wodoru), izomeryzacji, hydratacji, dimeryzacji, czy dekarboksylacji. Szczególną specyfiką charakteryzują się testy fotostabilności. Są one integralną częścią testów stabilności i zostały włączone przez ICH do badań w 1993 r. Należy podkreślić, że pojęcie fotodegradacji nie dotyczy tylko zmiany struktury API pod wpływem światła, ale też występowania procesów rodnikowych, transferu energii, czy nawet luminescencji, które mogą prowadzić do niespodziewanych i nietypowych rezultatów, zwłaszcza w fazie stałej [5]. Mimo, że wytyczne bardziej szczegółowo dopracowano w 1996 r., to nadal ich cechą jest duża

różnorodność stosowanych źródeł promieniowania oraz dowolność w ustalaniu czasu naświetlań w zależności od stosowanych urządzeń. Brakuje także wytycznych, dotyczących ochrony substancji fotolabilnych [6].

Testowanie substancji leczniczych w środowisku wysokiej wilgotności względnej, podwyższonej temperatury, skrajnie niskiego lub bardzo wysokiego pH, jak również narażenie na promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu UV-Vis o wysokim natężeniu może powodować znaczny ubytek API, ale przede wszystkim inicjuje powstawanie produktów degradacji, które podlegają odrębnym wytycznym dotyczącym zanieczyszczeń. Zaletą testów stresowych jest zatem poznanie reaktywności badanej substancji oraz mechanizmu jej degradacji, co stanowi cenny zbiór informacji wykorzystywany w kolejnych etapach technologii postaci leku, szczególnie w produkcji przemysłowej. Poza tym, dane te mogą posłużyć również w procesie ochrony środowiska w rejonie zakładów farmaceutycznych, np. poprzez wykorzystanie procesu fotodegradacji do ochrony wód gruntowych. Należy nadmienić, że testy stresowe mogą prowadzić do powstawania różnych produktów w zależności od czasu trwania degradacji, podobnie jak w reakcjach rodnikowych, gdzie etapy: inicjacji, propagacji i terminacji, zdecydowanie różnią się od siebie. Stąd ważne jest monitorowanie stanu API i powstających produktów w różnych odstępach czasu. Najczęściej w testach stresowych dąży się do osiągnięcia od 5 do 30% ubytku substancji [6,7].

Odrębnym zagadnieniem wiążącym się z oceną stabilności substancji leczniczej jest stabilność fizyczna. W trakcie badań stabilności może dojść do zmian fizycznych w substancji, takich jak mobilność postaci amorficznej [8], przemiana formy polimorficznej [9] lub innego rodzaju przemiana fazowa [10].

W przypadku niestabilności substancji leczniczej, skutkiem testów stresowych są produkty degradacji, które włącza się do grupy tak zwanych zanieczyszczeń specyficznych API. ICH podaje, że zanieczyszczenie jest to każdy komponent substancji leczniczej, jaki nie jest strukturalnie ani fizycznie zdefiniowany jako substancja lecznicza, i powoduje zakłócenia w jej czystości. Zanieczyszczenia podzielono na trzy rodzaje, czemu poświęca się odrębne wytyczne ICH i farmakopeach [2,11]. Grupę zanieczyszczeń organicznych stanowią substraty z syntezy API, produkty pośrednie, produkty degradacji, reagenty, ligandy, czy katalizatory. Z kolei do zanieczyszczeń nieorganicznych włączono reagenty, ligandy, katalizatory, metale ciężkie, sole nieorganiczne, oraz inne, takie jak węgiel. Osobną grupę zanieczyszczeń stanowią pozostałości rozpuszczalników.

Oznaczanie zanieczyszczeń w substancjach leczniczych jest konsekwencją testowania ich stabilności chemicznej i dotyczy przede wszystkim poznania struktury, właściwości

fizykochemicznych, zawartości oraz toksyczności [12-14]. Pierwsze regulacje ICH dotyczące granicy oznaczalności zanieczyszczeń w substancjach leczniczych [2] bazowały jedynie na przyjmowanej przez pacjenta dawce dziennej API, drogach podawania i czasie trwania terapii i nie przewidywały konieczności identyfikacji zanieczyszczenia, jeżeli występowało w stężeniu poniżej 0,1% [15]. Do oceny ilości zanieczyszczeń wykorzystywano w badaniach przede wszystkim końcowy produkt leczniczy, a nie API. Dopiero w 2004 r. nastąpiła dostrzegalna zmiana podejścia do norm i limitów wykrywalności zanieczyszczeń w związku z opracowaną przez EMEA koncepcją ustalania limitów zanieczyszczeń substancji leczniczych w celu oceny ich działania genotoksycznego [16]. Podjęto też kwestię konieczności prognozowania toksyczności oznaczonych w API zanieczyszczeń. Po pierwsze, wyeksponowano alarmująco niebezpieczne i reaktywne struktury chemiczne oddziałujące z DNA, takie jak *N*-tlenki, pierścienie aromatyczne, aminy aromatyczne, aldehydy, aromatyczne grupy nitrowe, alkilo-*N*-nitrozaminy [17]. Po drugie, zaakceptowano wykorzystanie technik komputerowych do przewidywania genotoksyczności i kancerogenności substancji, w tym narzędzi do prognozowania *in-silico*. Co najważniejsze, ustalono, że w przypadku przewidywania obecności w API substancji genotoksycznej, mają obowiązywać możliwie najniższe granice oznaczalności zanieczyszczeń [18]. W celu zminimalizowania ryzyka, ICH w najnowszych wytycznych opracowanych w 2014 r., przyjęła dodatkowo za wymóg wykorzystanie przynajmniej dwóch narzędzi prognozowania mutagenności *in-silico*, np. QSAR (z ang. *quantitative structure-activity relationships*), pozwalającej na ustalenie związku między budową i właściwościami z niej wynikającymi, a działaniem toksycznym substancji chemicznych lub DEREK (z ang. *deductive estimation of risk from existing knowledge*), prognozujący toksyczność, genotoksyczność, rakotwórczość, działania uczulające na podstawie budowy chemicznej i wiedzy eksperckiej). Nowe kryteria dotyczące zanieczyszczeń są obecnie znacznym wyzwaniem, ponieważ w sposób precyzyjny każą określać szybkość tworzenia produktów rozkładu na poziomach niższych niż 0,1%, które wcześniej obowiązywały (wytyczne Q3A i Q3B) [19].

Zmiany wprowadzone w ostatniej dekadzie do obowiązujących wytycznych wskazują, że należy prowadzić monitoring zmian strukturalnych nie tylko w przypadku nowych API, wprowadzanych dopiero do lecznictwa, ale także ciągłą kontrolą trzeba objąć substancje stosowane od wielu lat. Uzasadnieniem tego podejścia jest to, że szerokie spojrzenie na stabilność i bezpieczeństwo stosowania substancji leczniczych jest szansą na identyfikację nietypowych i groźnych zanieczyszczeń API, jak również opracowanie koncepcji ich eliminacji [6,20]. Należy dodać, że realizacja takiej koncepcji może przyczynić się do nowego spojrzenia na ocenę stabilności i bezpieczeństwa API starszej generacji. Jest to związane z tym, że wiele

badania i testów stresowych zostało już wcześniej wykonanych, a w świetle nowych wytycznych stają się niekompletne. Co więcej, rozwój metod analitycznych poszerza możliwości identyfikacji nowych, dotychczas nieobserwowanych produktów degradacji API. Dlatego też należy ponownie określić problemy związane ze stabilnością oraz ocenić toksyczność oznaczanych zanieczyszczeń. W EMA oraz WHO podkreślono, że w obecnych czasach, istnieje dostęp do narzędzi analitycznych, które umożliwią osiągnięcie postawionej w wytycznych granicy oznaczalności. Metody analityczne o dużej specyficzności i czułości, takie jak chromatografia cieczowa/gazowa - LC/GC [17,20-23] i wykorzystanie detektorów najnowszej generacji, pozwalają oznaczać i identyfikować substancje na bardzo niskim poziomie.

Przy obecnym poziomie rozwoju technologii farmaceutycznej warto rozważać planowanie ochrony cząsteczek przed czynnikami szkodliwymi, które powodują ich degradację. Zebrana na przestrzeni lat wiedza chemików i fizyków pozwala na korzystanie z różnorodnych układów, jakie mogą zapobiegać degradacji substancji leczniczych, a tym samym uniemożliwić powstawanie zanieczyszczeń. Przykładowo, w latach 80-90 ubiegłego stulecia poznano właściwości ochronne cyklodekstryn i innych układów supramolekularnych, z kolei w ostatnich latach wiele prac poświęca się metodom nanotechnologicznym stabilizacji API [24]. Zapewne ze względu na duży stopień zróżnicowania właściwości cząsteczek labilnych, nie opracowano dotąd stosownych wytycznych w tej kwestii, jednakże z prac wielu badaczy wynikają wnioski o wymiernych korzyściach stosowanej ochrony fizycznej i chemicznej API.

W roku 2002 FDA podjęło innowacyjne działania w kierunku kontroli jakości i oceny stabilności farmaceutycznej. Stwierdzono, że determinują je wszystkie etapy technologiczne, na których może dojść do kontaktu API z potencjalnie niszczącym czynnikiem, i w konsekwencji do powstania produktów degradacji. Od tego momentu skoncentrowano się głównie na rzetelnej ocenie jakości poprzez zapewnienie niezawodności monitorowania przebiegu procesów technologicznych, biorąc pod uwagę ich zmienność i wpływ na atrybuty jakości API. Procedury działań zebrano w ogólną inicjatywę Technologii Analizy Procesów (PAT) [25]. Jest to system obejmujący zintegrowane analizy chemiczne, fizyczne, mikrobiologiczne, matematyczne prowadzone w celu projektowania, analizowania i kontrolowania procesów produkcyjnych oparte na pomiarach w czasie rzeczywistym krytycznych cech jakościowych i użytkowych surowców i materiałów w czasie procesów (FP X). Wdrożono specjalistyczne systemy pomiarów kontrolnych stanu API, które w sposób bezpośredni informują o jej stabilności. W kolejnym roku, w oparciu o ustalenia FDA, dokumentację farmakopealną [11] i wytyczne ICH związane z kontrolą procesową API [26-28], EMA zaproponowała wykorzystanie do oceny jakości narzędzi analitycznych, które w szybki, jednoznaczny i nieniszczący sposób

(alternatywny do metod separacyjnych takich jak techniki chromatograficzne) potwierdzą tożsamość, ocenią stabilność i czystość analizowanych próbek zawierających API. Odtąd nie wystarczą już tradycyjne metody analityczne, głównie ze względu na niemożliwość pracy w czasie rzeczywistym procesu. W tym celu PAT zaleca wykorzystanie spektroskopii w zakresie bliskiej podczerwieni (ang. *Near-Infrared Spectroscopy*, NIR) [29] oraz spektroskopii Ramana, które umożliwiają prowadzenie analizy jakościowej i ilościowej zarówno w czasie rzeczywistym procesu produkcji, czyli *on-line*, jak i laboratoryjnym, *at-line* i zdalnym *in-line*. Dodatkowo, wskazano na metody wspomagające PAT, które umożliwią monitorowanie ewentualnych zmian zachodzących w fazie stałej (bez rozpuszczania próbek), na przykład ocenę powierzchni substancji w fazie stałej w trakcie prowadzenia testów stabilności.

Do grupy narzędzi wspomagających PAT zalicza się również metody rentgenograficzne (np. rentgenowska dyfraktometria proszkowa - XRD, ang. *X-Ray Diffraction*), termoanalityczne (np. różnicowa kalorymetria skaningowa - DSC, ang. *Differential Scanning Calorimetry*, analiza termogravimetryczna – TGA, ang. *Termogravimetric Analysis*), mikroskopowe (mikroskopia sił atomowych – AFM, ang. *Atomic Force Microscope*, skaningowy mikroskop elektronowy – SEM, ang. *Scanning Electron Microscope*). W technologii farmaceutycznej postaci leku niezwykle ważne jest potwierdzanie struktury krystalograficznej, czy ustalanie konformacji przestrzennej zastosowanych substancji leczniczych i pomocniczych za pomocą technik rentgenograficznych [30], co dopiero od niedawna stało się powszechne. Na podstawie tzw. historii termicznej analizowanej próbki niezbędnych informacji na temat jakości API dostarczają: różnicowa kalorymetria skaningowa oraz termogravimetria. Są to narzędzia o bardzo dużym potencjale badawczym do oceny jakości i monitorowania stanu substancji leczniczej. Podobnie techniki mikroskopowe, w połączeniu z technikami spektroskopowymi, takimi jak spektroskopia Ramana, spektroskopia fluorescencyjna, wraz z możliwością obrazowania chemicznego, stanowią przydatne narzędzie wspomagające koncepcję PAT.

W niniejszej pracy przedstawiono w sposób wielopłaszczyznowy podejście do zagadnienia badań stabilności substancji leczniczych, uzasadniając sens i kierunek podejmowanych aktualnie działań w tematyce monitorowania jakości API. W efekcie zostało sprecyzowane osiągnięcie naukowe ujęte tytułem: **„Innowacyjna koncepcja badań stabilności chemicznej substancji leczniczych na przykładzie antagonistów receptora H2 - konsekwencje aplikacyjne w przemyśle farmaceutycznym”**.

W świetle przedstawionych faktów, dotyczących konieczności śledzenia aktualizacji wytycznych, opracowanych przez FDA, WHO, ICH, uwzględniających nowe priorytety

w ocenie stabilności chemicznej substancji leczniczych, w celu zapewnienia jakości i bezpieczeństwa leków, zaproponowano innowacyjne podejście do tematu na podstawie następujących przesłanek:

- istnienie nowoczesnych technik analitycznych pozwala uzyskać nowe dane o API;
- zalecanie stosowania metodyki technologii analizy procesu, PAT (która zapewnia dobrze ukierunkowane planowanie postępowania), poprzez podejście do całościowej oceny ryzyka degradacji substancji leczniczej;
- podkreślenie konieczności monitorowania stabilności API na każdym etapie wytwarzania produktu leczniczego ze względu na różny postęp zachodzących reakcji w wyodrębnionych momentach: inicjacji, propagacji i terminacji;
- poświęcenie większej uwagi badaniom stabilności substancji leczniczych starszej generacji, w celu oceny zakresu występujących zmian, które dotąd nie były brane pod uwagę ze względu na ograniczoną specyficzność metod analitycznych, jak również zbyt wysoką granicę oznaczalności analitu;
- uzyskanie nowych informacji na temat API może przyczynić się do opracowania skutecznych sposobów ich ochrony przed czynnikami niszczącymi;
- poszerzony zakres badań stabilności według nowej koncepcji ma umożliwić ciągłe, a nie jak dotąd punktowe monitorowanie stanu API, a oprócz tego ma pozwolić zaangażować prostsze i mniej kłopotliwe metody analityczne;
- przewidywanie genotoksyczności produktów rozkładu (badania *in silico*) pozwoli pozyskać wiedzę o możliwościach bezpiecznego stosowania substancji leczniczej lub ewentualnego podjęcia środków zaradczych.

Istotę podjętej tematyki badań należy podkreślić w kontekście konieczności aktualizacji procedur, a zatem konsekwencji dla przyszłych opracowań analitycznych, mianowicie:

- w literaturze niejednokrotnie podkreślano potrzebę tworzenia koncepcji metodyki o wysokiej specyficzności, która będzie przydatna w identyfikowaniu nowych produktów degradacji i innych zanieczyszczeń;
- podkreśla się obowiązujący wymóg stosowania metod o możliwie niskiej granicy wykrywalności i oznaczalności, dzięki którym sygnał analityczny pochodzący od danej substancji można odróżnić od sygnału szumów, przy jak najniższej zawartości analitu;

- zagadnieniem nieustannie aktualnym jest opracowanie właściwych procedur przygotowania próbek do analizy w taki sposób, by nie pomijać substancji lotnych;
- najbardziej wartościowe koncepcje metodyczne są podejmowane dzięki wysokim kompetencjom eksperckim chemików analityków.

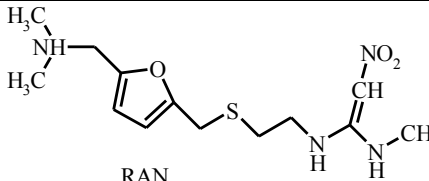
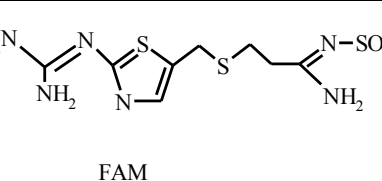
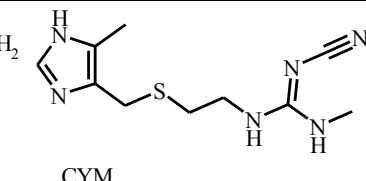
Należy też podkreślić, że nowy warsztat analityczny, w tym zaangażowanie różnych technik i procedur do monitorowania stabilności substancji leczniczych pozwoli w perspektywie sprostać najtrudniejszym celom badawczym i doprowadzi do konsekwencji normatywnych. Pozyskanie informacji o zmianach zachodzących w strukturze API pod wpływem czynników niszczących staje się bowiem bodźcem do ustalenia nowych, dotąd nieobowiązujących norm. Celem ewaluacji zapisów normatywnych jest ukazywanie dopuszczalnych poziomów nowo zidentyfikowanych związków, jak i poszerzania zakresu badań. Najważniejszą konsekwencją normatywną jest jednak możliwość wydania decyzji o wycofaniu produktu leczniczego dotąd stosowanego w lecznictwie, na podstawie uzyskanych nowych, niekorzystnych danych na temat substancji leczniczej.

Podsumowując powyższe rozważania, innowacyjny charakter podejścia do badań stabilności substancji leczniczych uzasadnić można zwracając uwagę na fakt braku wyczerpujących informacji, związanych z poznanymi dotąd zanieczyszczeniami dla znanych substancji leczniczych. Zanieczyszczenia określone terminem farmakopealnych, na których opiera się większość przemysłowych procedur analitycznych związanych z oceną jakości API i produktów leczniczych, w świetle nowych wymagań, są niedostatecznym źródłem informacji. Obecny postęp stwarza możliwości wykrycia i zidentyfikowania dodatkowych, nie zamieszczonych w Farmakopeach zanieczyszczeń. Dotąd poznane zanieczyszczenia farmakopealne nie wyczerpują zatem możliwości istnienia innych. Należy dodać, że konieczność monitorowania zanieczyszczeń z wszystkich grup klasyfikacji ICH, ze szczególnym uwzględnieniem substancji lotnych może dostarczyć cennych informacji o ich toksyczności. A zatem nowe, obligatoryjne procedury monitorowania stabilności substancji leczniczych powinny uwzględniać również pobieranie i przygotowywanie niestandardowych prób do analizy. Przede wszystkim jednak, prowadzenie badań w sposób ciągły, bardziej szczegółowy i na różnych etapach degradacji, jest innowacyjne i dotąd nie praktykowane. Procesy technologiczne wytwarzania produktów leczniczych są istotnymi punktami pomiarowymi, a okazuje się, że tylko wykonując wszechstronne badania można ocenić stabilność chemiczną API.

Ukazanie proponowanego innowacyjnego podejścia do badań stabilności substancji leczniczych i wynikających z niego konsekwencji było możliwe dzięki wykorzystaniu w pracy reprezentatywnej grupy substancji leczniczych. W sposób świadomy wybrany został obiekt badań, bardzo popularny w lecznictwie, jakim są antagoniści receptora H₂, do których należą: chlorowodorek ranitydyny, famotydyna i cymetydyna.

Chlorowodorek ranitydyny (RAN) występuje w Polsce w postaci tabletek powlekanych oraz tabletek musujących w dawkach 75 lub 150 mg i roztworu do infuzji w dawce 0,5 mg/ml oraz roztworu do wstrzykiwań i infuzji w dawce 25 mg/ml. Znane na rynku produkty lecznicze z RAN są to: oryginalny Zantac (GlaxoSmithKline), oraz produkty generyczne, takie jak między innymi: Ranigast (Polpharma SA), Ranimax (Polfarmex Sp. z o.o.), Raniberl Max (Berlin-Chemie AG). Famotydyna (FAM) występuje w postaci tabletek powlekanych lub proszku do sporządzania roztworów w dawce 10, 20 i 40 mg. W sprzedaży są między innymi produkty: Famogast (Polpharma SA), Ulfamid (Krka), a cymetydyna (CYM) w dawce 200 mg obecna dawniej w produktach Altramet (Lek Pharmaceuticals D.D.) i Cimetidine (Jelfa SA), obecnie nie jest produkowana w Polsce. Są to produkty stosowane w celu zmniejszenia wydzielania kwaśnego soku żołądkowego, chorobie refluksowej, w chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy, a także w leczeniu wrzodu stresowego oraz innych stanach, w których występuje nadmierne wydzielanie kwasu solnego, jak układowa mastocytoza i białaczka bazoofilowa z hiperhistaminemią. Wskazania przewidują podawanie leków dorosłym i dzieciom powyżej 16 roku życia, jedynie w przypadku wlewów dożylnych z RAN (trwającym ponad 2 min) są wskazania dla niemowląt/dzieci (w wieku od 6 miesięcy do 11 lat) w dawce 50 mg co 6-8 h. W innych krajach Europy dostępny jest też syrop z RAN w dawce 75 mg/ml i 15 mg/ml dla niemowląt i dzieci.

Wzory strukturalne substancji wybranych do badań (Ryc. 1) wskazują na wyraźną analogię struktury chemicznej, polegającą na obecności pierścienia heterocyklicznego, łańcucha alifatycznego, licznych ugrupowań aminowych oraz centralnie umiejscowionego heteroatomu – siarki.

 <p>RAN</p>	 <p>FAM</p>	 <p>CYM</p>
<p>a)</p> <p>m.cz. = 314,4 logP=0,98 pKa=8,08</p>	<p>b)</p> <p>m.cz. = 337,4 logP= -2 pKa=9,29</p>	<p>c)</p> <p>m.cz. = 252,3 logP=0,60 pKa=6,91</p>

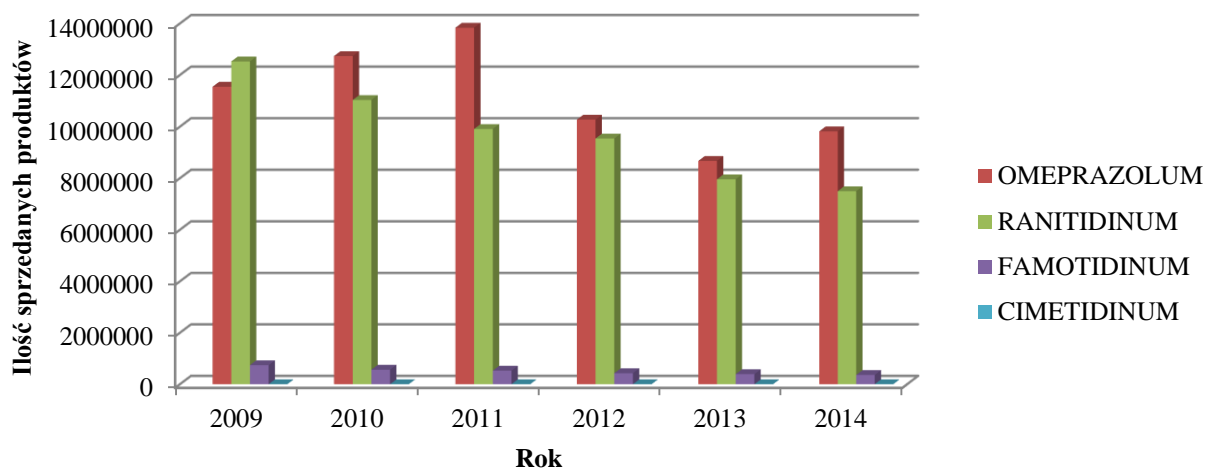
Rycina 1. Wzory strukturalne a) chlorowodoru ranitydyny, b) famotydyny i c) cymetydyny.

Z analogią strukturalną RAN, FAM i CYM łączy się ich podobne działanie terapeutyczne, jednak dane literaturowe wskazują, że więcej jest cech, które je różnicują. Mimo, iż cymetydyna została opracowana jako pierwsza cząsteczka selektywnie blokująca receptor histaminowy H₂ (rok 1964), to jej działanie nie było zbyt silne, a poza tym wykazywała znaczne działania niepożądane. Obecnie testuje się CYM pod kątem jej potencjalnego wykorzystania w leczeniu nowotworów [31,32], stąd niezmiennie poświęca się jej uwagę w wielu ośrodkach badawczych. Do hamowania wydzielania kwasu solnego opracowano niedługo później inną cząsteczkę, ranitydynę, wprowadzoną na rynek 1981 r., której pierścień heterocykliczny zawiera atom tlenu zamiast azotu. Pierścień furanu został dwupodstawiony ugrupowaniem z atomem azotu w taki sposób, że cząsteczka wykazuje większą aktywność, niż cymetydyna, a przy tym wywołuje dużo mniej skutków ubocznych. W kolejności opracowano famotydynę, cząsteczkę, która posiada największą aktywność terapeutyczną spośród wymienionych substancji. Z wyników badań uzyskanych na przestrzeni ponad trzydziestu lat wynika jednoznacznie, że RAN charakteryzuje się największą niestabilnością i przysparza najwięcej kłopotów technologicznych w porównaniu z pozostałymi, a jednak jest bardziej popularna wśród lekarzy i pacjentów niż CYM i FAM.

Należy zaznaczyć, że produkty z RAN i FAM stosowane są zarówno profilaktycznie, jak i leczniczo, a co istotne, dostępne są w sprzedaży pozaaptecznej. Ponadto rutynowo są podawane *ex-tempore* w leczeniu szpitalnym, pacjentom przygotowywanym do zabiegów chirurgicznych w znieczuleniu ogólnym [33].

Ranitydyna jest bardzo popularną substancją leczniczą, co zostało wielokrotnie odnotowane. W 1988 roku produkty lecznicze z RAN na receptę były najlepiej sprzedawanymi na świecie. Wejście na polski rynek farmaceutyczny produktów nowej generacji, będących inhibitorami pompy protonowej, do której należy między innymi omeprazol wydawany z przepisu lekarza, nie zmieniło znacząco popytu na produkty z RAN, co zostało przedstawione na Rycinie 2. Należy dodać, że obecnie uaktywniła się sprzedaż produktów zawierających substancję leczniczą

nowej generacji o nazwie pantoprazol. Jednak ranitydyna jest w dalszym ciągu bardzo istotną substancją stosowaną np. w pediatrii, w warunkach szpitalnych.



Rycina 2. Ranking sprzedaży produktów leczniczych zawierających ranitydynę, famotydynę, cymetydynę i omeprazol (w ilości opakowań), w Polsce (dane udostępnione dzięki życzliwości firmy **PharmaExpert Sp. z o.o.** www.pharmaexpert.com)

Nieustające zainteresowanie pacjentów produktami leczniczymi zawierającymi substancje lecznicze z grupy antagonistów receptora H₂ w sprzedaży pozaaptecznej, z pewnością wynika z obecnego rozwoju cywilizacyjnego i rosnących problemów zdrowotnych związanych ze stresem oraz tempem życia zawodowego i rodzinnego. Nie maleje zatem uwaga skupiona na tych produktach leczniczych, nad ich ciągłym rozwojem, opracowywaniem nowych postaci i rozwiązań poprawiających jakość. Rozwój generycznych produktów leczniczych, m.in. zawierających RAN wynika z przyczyn ekonomicznych, ale również jest efektem prac nad poprawą stabilności API, czy sposobu dozowania. Należy wspomnieć w tym miejscu o syropie Zantac z RAN, opracowanym w 1991 r., który zawiera alkohol etylowy dodawany w celu poprawy stabilności fizycznej (7,5%) [34]. Syrop ten, podawany głównie dzieciom, jest nadal dostępny na rynku europejskim. Zaproponowano też skład roztworu z RAN z hydroksyetylocelulozą do poprawy stabilności fizycznej [35]. Najnowszą postacią farmaceutyczną z RAN na polskim rynku farmaceutycznym są tabletki musujące zarejestrowane w grudniu 2012 r. (Ranigast Fast, Polpharma). Obecnie w Polsce dostępnych jest 12 marek produktów leczniczych z chlorowodorkiem ranitydyny różnych producentów.

Istnieje wiele dowodów na to, że chlorowodorek ranitydyny jest substancją labilną. Fakt ten potwierdzają doniesienia literaturowe, w których podkreśla się, że RAN jest substancją wrażliwą na degradację głównie pod wpływem wilgoci i światła [36-38]. Jednakże większość publikacji dotyczyła badań degradacji RAN w roztworze, ekosystemach i płynnych postaciach leku.

Monografie farmakopealne opisują chlorowodorek ranitydyny jako biało-żółty proszek o lekko gorzkim smaku, który należy „chronić przed światłem”. Warto dodać w tym miejscu, że w czasie przechowywania proszku RAN w warunkach zalecanych przez dostawcę, dostrzegane są zmiany barwy proszku na kremowo-brązowy, a dodatkowym efektem zmian jest ostry, nieprzyjemny, merkaptanowo-aminowy zapach. Narażenie stałej postaci chlorowodoru ranitydyny na wilgotność względną 75% przez kilka dni skutkuje jej przemianą fazową w półstałą, kleistą, brązową maź o ostrym zapachu.

Wiadomo, że ugrupowania aminowe w cząsteczce RAN w sąsiedztwie pierścienia furanu mogą polimeryzować [39]. W cząsteczce famotydyny występuje inny pierścień aromatyczny, tj. tiazol, a w cymetydynie jest imidazol, które nie wykazują takiej reaktywności. Ponadto, w cząsteczce RAN z jednej strony występuje ugrupowanie nitrowe podatne na czynniki redukujące, z drugiej zaś kilka ugrupowań aminowych, które łatwo się utleniają, co jest charakterystyczną cechą wszystkich amin. Inną cechą strukturalną cząsteczki RAN jest obecność dwóch drugorzędowych grup aminowych, które mogą w sprzyjających warunkach utracić proton, przechodząc w *N*-nitrozoaminy o charakterystycznym żółto-brunatnym zabarwieniu i oleistej konsystencji [40,41]. W przypadku FAM obecność kilku ugrupowań aminowych pierwszo- i trzeciorzędowych może zdecydować o reaktywności i nietrwałości cząsteczki, na co wskazuje kilku badaczy [42-45]. Inaczej sytuacja wygląda w przypadku CYM, gdzie mimo obecności dwóch ugrupowań drugorzędowych amin i trzeciorzędowej aminy nie wykazano wrażliwości na podwyższoną wilgotność, a źródła literaturowe nie podają informacji o nietrwałości substancji. Wiadomo też, że wiązanie acetylenowe jest nietrwałe, jednak okazuje się, że nie wpływa na stabilność CYM.

Wyniki badań przeprowadzonych na przestrzeni lat 1980-2013 wskazują na poważny problem niskiej trwałości ranitydyny *in sub.*, jak również niektórych form produktów leczniczych zawierających tę substancję czynną, przy czym nie maleje zainteresowanie zakładów farmaceutycznych produktami z RAN [48-54]. Należy zaznaczyć, że do większości zakładów surowiec do wytwarzania produktów z RAN jest sprowadzany, stąd w czasie transportu i przechowywania może być narażony na niepożądane czynniki środowiskowe, prowadzące między innymi do degradacji. Autorzy publikacji zwracają uwagę na trudności

związane z uzyskaniem stabilnych chemicznie produktów leczniczych [46-50]. Jedną z hipotez mówi, że w trakcie otrzymywania chlorowodoru z RAN (monochlorowodoru) powstaje również di-chlorowodorek, bardzo nietrwały i higroskopijny [51-53]. Usunięcie di-chlorowodoru z mieszaniny soli addycyjnych jest bardzo trudne, a jako kontaminacja jest on źródłem gwałtownej absorpcji wody z otoczenia [51]. Ponadto bardzo wiele trudności pojawia się również w gotowych produktach leczniczych zawierających chlorowodorek ranitydyny. Wobec substancji pomocniczych, np. laktozy, poliwinylpirolidonu, stearynianu magnezu czy Eudragitu-100 (kopolimeru kwasu metakrylowego), może dojść do reakcji Maillarda, prowadzącej do charakterystycznego brązowienia [54]. Istnieją również przesłanki, by przypuszczać, że podobna sytuacja może mieć miejsce w przypadku, gdy zanieczyszczenia lub produkty rozkładu RAN reagują w taki sposób.

Również w przypadku famotydyny wiele problemów nie jest do końca rozstrzygniętych. Jest to substancja, która nadal jest popularna wśród lekarzy i pacjentów, pomimo nieco mniejszego zainteresowania w porównaniu z RAN. W badaniach stabilności chemicznej FAM wykazano degradację substancji, jak również identyfikowano niepożądane produkty powstające w warunkach zróżnicowanego pH, temperatury i obecności światła [42,43,45]. Stwierdzono, że famotydyna testowana w środowisku wodnym i kwaśnym przy pH ok. 2, w warunkach naświetlania, jest niestabilna chemicznie, nawet w obecności substancji pomocniczych [44]. W roztworach *ex-tempore* przygotowywanych z tabletek wykazano w czasie 4 tygodni 15% degradację FAM, mimo przechowywania w lodówce. Dodatkowo jest to substancja, której nieprzyjemny, gorzki smak zniechęca pacjentów do jej przyjmowania, zatem wciąż opracowywane są produkty zawierające substancje maskujące smak [55]. Dla preparatów z famotydyną dobre rezultaty w testach stabilności odnotowano w przypadku nanozawiesin [56,57] oraz mieszanin form polimorficznych FAM [58,59]. Dla form stałych przygotowuje się obecnie nanokryształy substancji do nanozawiesin, by poprawić ich stabilność fizyczną [57]. Cymetydyna jest to substancja stabilna podczas utleniania elektrochemicznego [60] w warunkach podwyższonej wilgotności w tabletkach [61-63].

Przeprowadzone badania wykazały, że kolejna różnica między RAN, FAM i CYM związana jest z wynikami testów genotoksyczności, które wskazały na podwyższone ryzyko i zagrożenia kancerogenezą przy stosowaniu produktów z CYM [64]. Należy dodać w tym miejscu, że chlorowodorek ranitydyny znajduje się na liście substancji, których obecność w wodach gruntowych wielu krajów europejskich jest nieustannie monitorowana ze względu na szkodliwość dla ekosystemu zarówno substancji, jak i jej produktów degradacji [65]. Najnowsze wytyczne ICH dotyczące kontroli jakości substancji i produktów leczniczych zwracają

szczególną uwagę na wyniki badań dotyczących obecności zanieczyszczeń genotoksycznych w API [19]. Skutki kancerogenne mogą być wywoływane przez systematyczne i długoterminowe narażenie, obserwowane w przypadku przyjmowanych substancji leczniczych, w tym również leków z grupy gastroenterologicznych.

Biorąc pod uwagę wyniki wieloletnich prac badawczych, które zostały dotychczas opublikowane na temat stabilności RAN, FAM i CYM, oraz mając na uwadze wytyczne ICH, WHO, FDA i EMA dotyczące kontroli jakości wszystkich substancji leczniczych, które są na rynku zauważono kilka istotnych kwestii, które przyczyniły się do wyodrębnienia celu pracy, mianowicie:

- skuteczność terapeutyczna i popularność antagonistów receptora H₂ w lecnictwie od przeszło trzydziestu lat, jest silnym bodźcem, który skłania do podjęcia specjalistycznych badań związanych z ich stabilnością i zmianami zachodzącymi w stanie stałym;
- nie zajmowano się dotąd oceną wczesnych zmian substancji leczniczych pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak podwyższona temperatura i wilgotność oraz światło;
- wykorzystanie metod analitycznych zakwalifikowanych jako narzędzia PAT, czyli monitorujących jakość substancji leczniczych na każdym etapie procesu wytwarzania produktu leczniczego, umożliwi opisanie nietypowych zmian w substancjach leczniczych w stanie stałym;
- niektóre procesy technologiczne, takie jak granulacja mogą przebiegać w środowisku wodnym, stąd konieczne jest monitorowanie stabilności substancji leczniczych labilnych w takich warunkach w czasie rzeczywistym;
- degradacja substancji leczniczych, która zachodzi w fazie stałej, nawet w wyniku jej przechowywania, może zainicjować proces powstawania produktów lotnych, który trzeba monitorować głównie ze względu na toksyczność substancji;
- istnieją szanse na ochronę labilnych substancji leczniczych.

CEL BADAŃ

Przedmiotem prezentowanego osiągnięcia naukowego było opracowanie koncepcji metodyki badań dla oceny wczesnych zmian zachodzących w labilnych substancjach leczniczych z grupy antagonistów receptora H₂ w fazie stałej pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak podwyższona temperatura, zwiększona wilgotność i światło. Podjęto działania, mające na celu wyjaśnić kwestie przyczyny labilności chlorowodoru ranitydyny (RAN). Zaplanowano monitorowanie nietypowych efektów degradacji substancji leczniczych, takich jak oznaczanie lotnych produktów powstających w trakcie fotodegradacji. Powodem realizacji tego zadania, stał się brak standardowych procedur dotyczących monitorowania stabilności substancji leczniczych w stanie stałym, w celu wdrożenia systemu PAT. Badania wykonane w celu porównawczym dla analogów strukturalnych i terapeutycznych RAN, tj. famotydyny (FAM) i cymetydyny (CYM) przy wykorzystaniu narzędzi PAT, umożliwią po raz pierwszy ciągłą i wczesną ocenę zmian zachodzących pod wpływem podwyższonej temperatury i wilgotności oraz światła.

OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ WŁASNYCH

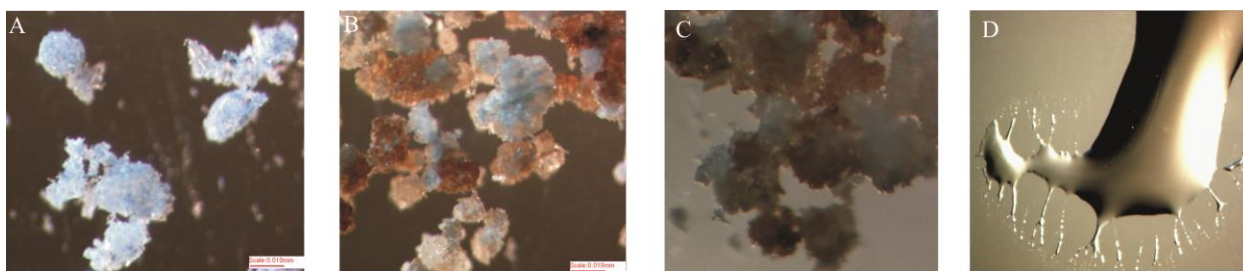
Badaniom poddano chlorowodorek ranitydyny, famotydynę i cymetydynę w fazie stałej testując ich fotostabilność w komorze Suntest CPS+ (500 W/m²) i stabilność chemiczną w komorze klimatycznej w warunkach podwyższonej wilgotności i temperatury (40 °C 75% RH). Analizy wykonano wykorzystując następujące metody:

1. chromatograficzne: HPLC/UV-Vis - walidacja metody; oznaczanie produktów degradacji; GC/MS – oznaczanie i identyfikacja lotnych produktów degradacji;
2. spektroskopowe w zakresie podczerwieni: FTIR techniką transmisyjną, ATR-FTIR techniką refleksyjną;
3. spektroskopową w zakresie bliskiej podczerwieni NIR;
4. spektroskopową Ramana;
5. termoanalityczną przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej, DSC;
6. mikroskopową: pomiar optyczny świetlny i elektronowy SEM;
7. dyfraktometryczną za pomocą rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej XRD.

Pierwsze badania dotyczące monitorowania zmian zachodzących w próbkach chlorowodoru ranitydyny, w kontekście celu pracy, przeprowadzono metodą farmakopealną, czyli przy wykorzystaniu chromatografii HPLC z detektorem UV-Vis. Analizowane były próbki proszku

RAN po naświetlaniu w komorze Suntest CPS+ (500 W/m²) po czasie 48 h i 7 dni oraz po przechowywaniu w komorze klimatycznej w warunkach podwyższonej wilgotności i temperatury (40 °C/75% RH) przez 4 i 7 dni, oraz 1, 2, 4 i 6 miesięcy. Analizy HPLC/UV-Vis dla próbek RAN po tygodniu naświetlania wykazały, że nie spełniają one wymagań testu na obecność substancji pokrewnych (według FP 6.0), ponieważ sumaryczna ilość oznaczonych zanieczyszczeń przekracza 0,7%. Z kolei po 7 dniach przechowywania w komorze klimatycznej ubywa 25% RAN z próbki wyjściowej. Przed akwizycją danych, metodę HPLC/UV-Vis zwalidowano. Uzyskane wyniki wskazywały na obecność innych, poza farmakopealnymi, produktów degradacji. W celu ich identyfikacji wykonane zostały analizy z zastosowaniem chromatografu HPLC z detekcją UV-Vis (DAD) wyposażonego w spektrometr mas z jonizacją poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI) z analizatorami kwadрупolowym i czasu przelotu (Q-ToF) [wyniki są przygotowane do wysłania do redakcji czasopisma].

Interesujący jest jednak fakt, że próbki chlorowodorku ranitydyny zmieniają się wizualnie już po pierwszym dniu przechowywania w komorze klimatycznej, jak i pierwszym dniu naświetlania, co pokazano na rycinie 3. Dotąd badacze nie opisywali takich zmian w RAN pod wpływem światła, czy wilgoci, które zachodzą na bardzo wczesnym etapie testów stabilności produktów, jak również nie były monitorowane w stanie stałym. Najczęściej prowadzono analizy chromatograficzne weryfikujące ilość powstających produktów degradacji lub jedynie optymalizowano metody rozdzielania związków modelowych dla zanieczyszczeń RAN.



Rycina 3. Zdjęcia proszku RAN z mikroskopu optycznego A) przed testowaniem stabilności; B) po naświetlaniu 24 h; C) po przechowywaniu w komorze klimatycznej 1 dzień 40°C/75%RH; D) po przechowywaniu w komorze klimatycznej 4 dni 40°C/75%RH.

Uzyskanie kremowo-brązowego koloru próbek RAN już po pierwszym dniu naświetlania oraz zmiana postaci próbki z proszku do konsystencji półstałej po 4 dniach wiąże się z dodatkowym efektem wydzielania nieprzyjemnego zapachu. Aby zweryfikować kierunek, jak i zakres zmian, jakim ulega cząsteczka ranitydyny, w pierwszej kolejności podjęto się poszukiwania metod

analitycznych, które umożliwią identyfikację powstających produktów degradacji oraz poznanie mechanizmu zachodzących zmian. Sposób i optymalizacja pobierania prób wymagała specjalistycznej wiedzy i wykorzystania do tego celu specjalnie zaprojektowanych naczynek. Wyodrębniono kilka metod analitycznych, za pomocą których zaplanowano oznaczyć i zidentyfikować substancje odpowiadające za wydzielany zapach.

Najpierw przeprowadzono serie ekstrakcji gazowych znad proszku RAN do wybranych deuterowanych rozpuszczalników organicznych (GLE, ang. *gas-liquid extraction*) oraz do kuwety gazowej spektrometru podczerwieni FTIR. Uzyskano potwierdzenie, że w wyniku fotoekspozycji próbek RAN dochodzi do jej degradacji wraz z wydzielaniem gazowych i lotnych substancji, co wstępnie potwierdzono przy użyciu chromatografii gazowej z detektorem FID. Spektroskopia FTIR pozwoliła jedynie uzyskać dowód na emitowanie lotnych związków chemicznych znad powierzchni RAN po testach fotostabilności. Udało się również zidentyfikować powstający w czasie fotodegradacji tlenek węgla (II). Wykonane analizy nie pozwoliły uzyskać jednoznacznego obrazu widma ^1H NMR przydatnego do interpretacji. W związku z najbardziej czytelnym wynikiem analiz chromatograficznych GC, podjęto się dopracowania metodyki pobierania próbek i oznaczania powstających lotnych produktów fotodegradacji RAN techniką „znad przestrzeni wokół próbki” (HS, z ang. *head space*), ich rozdzielenia i identyfikacji [H8,H9]. Metoda HS jest znana ze stosowania przy oznaczaniu substancji lotnych, najczęściej do oznaczania pozostałości rozpuszczalników w przemyśle farmaceutycznym [66]. Duże zainteresowanie w badaniach nad pozostałościami rozpuszczalników wzbudza też połączenie HS z techniką mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME, z ang. *solid phase microextraction*) ze względu na niską granicę wykrywalności lotnych zanieczyszczeń organicznych [67]. Do pobrania próbki znad powierzchni poddanej testom RAN wykorzystano włókno SPME z polidimetylosiloksanu – PDMS.

W dalszym etapie prac, analizy prowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Toksykologii GUMed, gdzie wykonano oznaczenia przy użyciu chromatografii gazowej, sprzężonej z detektorem mas (GC-MS), a próby pobierane były bezpośrednio, w czasie naświetlań lub tuż po naświetlaniu techniką HS-SPME, na włókno z PDMS dedykowane substancjom lotnym [H9]. Ze względu na bezpośrednią analizę produktów degradacji z fazy nadpowierzchniowej bez konieczności rozpuszczania prób, analizy wykaczały poza krąg rutynowych i powszechnie stosowanych metod kontroli jakości i zawartości substancji w próbkach farmaceutycznych. Są zgodne z założeniami inicjatywy PAT. W połączeniu z HS, technika SPME i GC przyniosła oczekiwane efekty, to jest możliwość detekcji i identyfikacji

lotnych produktów fotodegradacji chlorowodorku ranitydyny. Już po 30 minutach naświetlania próbek oznaczono obecność trzech produktów, a po 48h naświetlania ich liczba wzrosła do 16 i były to inne związki niż zanieczyszczenia farmakopealne. Niektóre substancje zostały zidentyfikowane w oparciu o analizę widm masowych oraz porównanie z widmami wzorców. Znaczącym sukcesem w badaniach stabilności RAN była zatem charakterystyka procesu fotodegradacji RAN w stanie stałym. Ostatecznie zidentyfikowano i potwierdzono z wzorcami 5 związków: acetaldoxym, tiazol, dimetyloacetamid (DMAc), dimetyloformamid (DMF) oraz 5-metylofurfural. Należy dodać, że w literaturze już potwierdzono narkotyczne działanie toksyczne acetaldoxymu [68], a hepatotoksyczność wykazano dla DMF i DMAc [69]. Z innych danych literaturowych wynika, że 5-metylofurfural może powodować uszkodzenia DNA i prowadzić do kancerogenezy u ludzi i u zwierząt [70]. Trzy spośród zidentyfikowanych związków - acetaldoxym, tiazol i 5-metylofurfural, mają charakter lotny. W odniesieniu do RAN wynotowano z literatury naukowej około 40 substancji pokrewnych o ciężarze cząsteczkowym poniżej 500 g/mol, pochodzących z degradacji, transformacji wywołanej czynnikiem szkodliwym lub będących pozostałościami z syntezy RAN. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa z lat 1987-2014 opracowano Tabelę 1, zawierającą zestawienie tych substancji z uwzględnieniem oznaczonych i zidentyfikowanych w pracy własnej [H9, nr 3,5,7,8,11]. Ponadto, z danych zamieszczonych w tabeli 1 można zauważyć, że wykorzystane metody analityczne do identyfikacji zanieczyszczeń i produktów degradacji koncentrują się przede wszystkim na metodach chromatograficznych i tylko w nielicznych przypadkach - z wykorzystaniem detektora mas. Farmakopee, na których opierają się analizy we wszystkich zakładach wytwarzających produkty lecznicze, podają jedynie 11 zanieczyszczeń (od A do K [11]) identyfikowanych podczas kontroli jakości produktów leczniczych z RAN. Biorąc pod uwagę najnowsze trendy i wytyczne dotyczące monitorowania toksycznych i genotoksycznych zanieczyszczeń w substancjach leczniczych [19], na podstawie uzyskanych rezultatów badań (identyfikacji lotnych, toksycznych produktów) uzasadniono, że prace dotyczące identyfikacji i ciągłego monitorowania zmian zachodzących w substancjach leczniczych mają dużą wartość oraz istotne jest prowadzenie dalszych badań w tym kierunku.

Tabela 1. Substancje pokrewne chlorowodorku ranitydyny: surowce i półprodukty używane w syntezie produkty, transformacji i rozkładu.

Lp.	Nazwa / oznaczenie Farmakopealne / Piśmiennictwo	Struktura	Pochodzenie*	Sposób/Metoda analityczna użyta w oznaczaniu	MW (g mol ⁻¹)
1	Methylamine [71]	<chem>CH3NH2</chem>	DP	Degradacja/hydroliza pH>9; chromatografia TLC, wzorzec	31,06
2	Dimethylamine [72]	<chem>CN(C)</chem>	S	Substrat użyty w przedostatnim etapie syntezy	45,08
3	Acetaldoxime [H9]	<chem>CC(=O)NO</chem>	DP	Fotodegradacja, HS-SPME-GC/MS	59,07
4	Nitromethane [72,73]	<chem>C[N+](=O)[O-]</chem>	S	Pierwszy substrat w syntezie z CS ₂	61,04
5	Dimethylformamide [72,74,H9]	<chem>CN(C)C=O</chem>	S, DP	Rozpuszczalnik użyty w syntezie i produkt oznaczony przy fotodegradacji: HS-SPME- GC/MS	73,09
6	Carbon disulphide [72,73]	<chem>CS2</chem>	S	Substrat w reakcji syntezy w pierwszym etapie	76,14
7	Thiazole [H9]	<chem>c1cc[nH]s1</chem>	DP	Fotodegradacja, HS-SPME-GC/MS	85,13
8	Dimethylacetamide [72,74,H9]	<chem>CC(=O)N(C)C</chem>	S, DP	Rozpuszczalnik użyty w syntezie i produkt oznaczony przy fotodegradacji: HS-SPME- GC/MS	87,12
9	Diethyl sulphide [75]	<chem>CCSCC</chem>	M	Modelowy związek użyty podczas fotolizy laserowej RAN; NMR, UV-Vis, IR, HPLC	90,19
10	Furfuryl alcohol [76]	<chem>OCC1=CC=CO1</chem>	DP, M	Modelowy związek użyty do optymalizacji układu chromatograficznego degradacji RAN – nie oznaczony w danym układzie	98,10
11	5-methylfurfural [H9]	<chem>CC1=CC(=O)OC=C1</chem>	DP	Fotodegradacja, HS-SPME-GC/MS	110,03
12	Fumaric acid [76]	<chem>OC(=O)/C=C/C(=O)O</chem>	DP	Modelowy związek użyty do optymalizacji układu chromatograficznego degradacji RAN – nie oznaczony w danym układzie	116,07
13	Thioethanolamine [76]	<chem>NCCS</chem>	DP	Modelowy związek użyty do optymalizacji układu chromatograficznego degradacji RAN – nie oznaczony w danym układzie	113,60
14	N-methyl-2-nitroacetamide [71,77] / H	<chem>CN(C)C(=O)N</chem>	H, S	Hydroliza przy pH>9, chromatografia TLC, substrat w syntezie, testy starzenia w 70 °C/28%RH – produkt degradacji, XRPD,	118,09

				HPLC	
15	2-[(methyl thio) methyl]-furan [75]		M	Modelowy związek użyty podczas fotolizy laserowej RAN; NMR, UV-Vis, IR, HPLC	128,19
16	<i>N,N'</i> -dimethyl-2-nitro-1,1-ethene diamine [75,76]		M, DP	Modelowy związek użyty do optymalizacji układu chromatograficznego degradacji RAN	131,13
17	<i>N,N</i> ,5-trimethyl-2-furanmethanamine [75]		M	Modelowy związek użyty podczas fotolizy laserowej RAN; NMR, UV-Vis, IR, HPLC	139,19
18	<i>N</i> -methyl-1-(methylthio)-2-nitroethenamine [76] / K		DP	Modelowy związek użyty do optymalizacji układu chromatograficznego degradacji RAN	148,18
19	1,1-bis(methylthio)-2-nitroethylene [75]		M, DP	Modelowy związek użyty podczas fotolizy laserowej RAN; NMR, UV-Vis, IR, HPLC	165,23
20	2-(2-Amino ethylthio methyl)-5-dimethyl aminomethylfuran [71,76,77,78,79] / B		H, S	Hydroliza przy pH>9, chromatografia TLC, substrat w syntezie, testy starzenia w 70 °C/28%RH – produkt degradacji, XRPD, HPLC, TLC – jedynie do rozdzielania, HPLC po degradacji w 85 °C i 48h	214,33
21	5-[(dimethylamino) methyl]-furfuryl alcohol hydrochloride [71,75,76,79] / F		H, S, M	Degradacja/hydroliza pH<9; chromatografia TLC, wzorzec syntezowany; modelowy związek użyty podczas fotolizy laserowej RAN; NMR, UV-Vis, IR, HPLC po degradacji w 85 °C i 48h	191,66
22	5,6-dihydro-3-methylamino-2H-1,4-thiazine-2-one oxime [71,76,79] / G		H, S	Degradacja/hydroliza pH<9; chromatografia TLC, wyizolowany i zidentyfikowany NMR, X-ray, HPLC po degradacji w 85 °C i 48h	160,05 / 195,67
23	5-[[[2-[[1-(methyl amino)-2-nitroso ethenyl]amino]ethyl]thio]methyl]-2-furancarboxaldehyde [38]		DP	Produkt fotokatalicznego rozkładu na TiO ₂ , rozdzielanie i identyfikacja UPLC/ESI-QqToF-MS	269,32
24	<i>N</i> -[2-[[[5-[(dimethylamino)methyl]-2-furanyl] methyl]thio]ethyl]- <i>N'</i> -methyl-urea [80]		DP	Produkt fotodegradacji roztworu wodnego naświetlanego lampą ksenonową: 150 W, 50h; rozdzielanie TLC, identyfikacja, NMR; produkt toksyczny, genotoksyczny w ekosystemach wodnych (ryby)	271,38

25	5-[[[2-[[1-(methyl amino)-2-nitro ethenyl] amino] ethyl]thio]methyl]- 2-furancarboxaldehyde [38]		DP	Produkt fotokatalitycznego rozkładu na TiO ₂ , rozdzielanie i identyfikacja UPLC/ESI-QqToF-MS	285,32
26	<i>N</i> -[2-[[[5-hydroxymethyl)-2-furanyl]methyl]thio]ethyl]- <i>N</i> '-methyl nitro-2-ethene diamine-1,1 [74]		S	Komercyjny substrat w syntezie lub produkt pośredni	227,33
27	2 <i>H</i> -1,4-Thiazin-2-one,5,6-dihydro-3-(methylamino)-O-[[5-[(dimethyl amino)methyl]-2-furanyl]methyl]oxime [71,76]		DP	Degradacja/hydroliza pH<9; chromatografia TLC	296,39
28	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> '-[2-[[[5-[(methylamino) methyl]-2-furanyl] methyl]thio]ethyl]-2-nitro-1,1-ethenediamine [38]		DP	Produkt fotokatalitycznego rozkładu na TiO ₂ , rozdzielanie i identyfikacja UPLC/ESI-QqToF-MS	300,38
29	Sodium <i>N</i> -[2-[[[5-[(dimethylamino)methyl]-2-furanyl] methyl]thio]ethyl]-2-nitroacetamide [71,76,77,79] / D		DP, H	Degradacja/hydroliza pH>9; chromatografia TLC, testy starzenia w 70 °C/28%RH – produkt degradacji, XRPD, HPLC	323,35
30	Ranitidine- <i>N</i> -oxide; <i>N</i> -[2-[[[5-[(Dimethyloxidoamino)methyl]furan-2-yl]methyl]sulphanyl]ethyl]- <i>N</i> '-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine [76,77] / E		Ox	Testy starzenia w 70 °C/28%RH – produkt degradacji, XRPD, HPLC	330,41
31	Ranitidine- <i>S</i> -oxide; <i>N</i> -[2-[[[5-[(Dimethylamino)methyl]furan-2-yl]methyl]sulphanyl]ethyl]- <i>N</i> '-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine [76,77,78,80] / C		Ox, DP	Produkt fotodegradacji roztworu wodnego naświetlanego lampą ksenonową: 150 W, 50h; rozdzielanie TLC, identyfikacja, NMR; produkt toksyczny, genotoksyczny w ekosystemach wodnych (ryby); niezależnie TLC – jedynie do rozdzielania	330,41
32	<i>N</i> -[2-[[[5-[(Dimethyl amino)methyl] furan-2-yl]methyl]sulphanyl]ethyl-1-ol]- <i>N</i> '-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine [38]		DP	Produkt fotokatalitycznego rozkładu na TiO ₂ , rozdzielanie i identyfikacja UPLC/ESI-QqToF-MS	33114

33	[(Dimethylamino)methyl]furan-2-yl)methyl ketone] sulphanyl]ethyl-1-ol]-N'-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine [38]		DP	Produkt fotokatalitycznego rozkładu na TiO ₂ , rozdzielanie i identyfikacja UPLC/ESI-QqToF-MS	344,15
34	[(Dimethylamino)methyl]furan-2-yl)methyl ketone] sulphanyl]ethyl-1-ol]-N'-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine [38]		DP	Produkt fotokatalitycznego rozkładu na TiO ₂ , rozdzielanie i identyfikacja UPLC/ESI-QqToF-MS	360,15
35	1,1'-N-[methylene bis(sulphane-diylethylene) bis(N-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine) J		DP	Brak danych	366,46
36	N-{2-[(5-[(dimethyl amino)methyl]furan-2-yl)methyl]sulfanyl ethyl}-2,5-dinitro-1,2,3,6-tetrahydro pyrimidin-4-amine [79]		DP	HPLC po degradacji w 85 °C i 48h	387,13
37	N-{2-[(5-[(di methylamino)methyl]furan-2-yl)methyl] sulfanyl ethyl}-2-nitro-N'-(2-nitropropyl) ethene-1,1-diamine [79]		DP	HPLC po degradacji w 85 °C i 48h	387,13
38	3-[5[(dimethyl amino)methyl]-2-furanyl]-N-[2-[[[5-[(dimethylamino)methyl]-2-furanyl] methyl]thio]ethyl]-N'-methyl-2-nitro-1-propene-1,1-diamine [71,77,75]		DP	HPLC po degradacji w 85 °C i 48h; degradacja/hydroliza pH<9; chromatografia TLC	451,59
39	N,N'-bis[2-[[[5-[(dimethyloamine)methyl]furan-2-yl)methyl]thio]ethyl]-nitroethene-1,1-diamine [76,78] /A		DP	TLC – jedynie do rozdzielania	497,68
40	2,2'-methylene bis[N-2-[[[5-[(dimethyl amino)methyl]furan-2-yl)methyl] sulphanyl]ethyl]-N'-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine [78,79] / I		DP	TLC – jedynie do rozdzielania; HPLC po degradacji w 85 °C i 48h	640,82

*oznaczenia: S – surowiec z syntezy, DP – potencjalny produkt degradacji, H – hydroliza; Ox – utlenianie; M - modelowa lub pokrewna substancja

Z zestawienia zaprezentowanego w Tabeli 1 wynika, że na labilność chlorowodoru ranitydyny w dużym stopniu może wpływać jej mobilność molekularna, zwłaszcza w rozumieniu możliwości transformacji i wewnętrznej reaktywności, w rezultacie czego powstają różnego typu dimery lub pochodne RAN. Z rozpadu cząsteczki RAN powstaje bardzo duża liczba możliwych produktów degradacji, w tym najczęściej dochodzi do reakcji hydrolizy i utleniania. W większości przypadków zanieczyszczenia farmakopealne autorzy publikacji oznaczali właśnie w tych dwóch typach reakcji. Dodatkowa ścieżka degradacji została ukazana w pracach badawczych związanych z fotodegradacją roztworów z RAN, które miały być symulacją jej rozkładu w ekosystemach wodnych pod wpływem promieniowania słonecznego. Fakt mutageniczności i genotoksyczności potwierdzony dla niektórych produktów fotodegradacji wymusza zatem konieczność ciągłego poszukiwania także metod chroniących labilne cząsteczki przed skutkami szkodliwego działania czynników, na jakie mogą być narażone w sposób naturalny.

Po uzyskaniu wyników, które pozwoliły zidentyfikować zmiany zachodzące w warstwie nadpowierzchniowej próbki RAN już po krótkim czasie narażenia na światło, podjęto poszukiwania metod umożliwiających ocenę jakościową i identyfikację obserwowanych zmian zachodzących na powierzchni proszku RAN wynikających z procesu fotodegradacji. Większość metod, które wymagają do analizy rozpuszczenia próbki charakteryzuje się zbyt wysoką granicą oznaczalności lub zbyt małą specyficznością, stąd wczesne i niewielkie zmiany chemiczne RAN nie są możliwe do zarejestrowania.

W dalszym etapie prac zdecydowano się szukać metod, które mogą umożliwić identyfikację zmian chemicznych w sposób bezpośredni w fazie stałej. Przygotowane zostały zestawienia poglądowe [H1-H4] dotyczące możliwości wykorzystania metod spektroskopowych, głównie z zakresu podczerwieni, ale również bliskiej podczerwieni i spektroskopii Ramana, do monitorowania wczesnych zmian zachodzących w proszku RAN pod wpływem światła. Przegląd piśmiennictwa wybrany do wymienionych prac usystematyzowano głównie pod kątem sposobu analizy i interpretacji zmian na powierzchni, które nie są niszczące dla próbek, a przy tym umożliwiają obserwowanie zachodzących specyficznych reakcji chemicznych i fotochemicznych. Ponadto, przytoczone zostały przykłady realizowanych dotąd projektów i kierunki badań związanych ze stabilnością chemiczną i fizyczną substancji i produktów leczniczych, zarówno na etapie rozwoju i badań naukowych, jak i wdrożeń przemysłowych, czy kolejnych etapów wytwarzania produktów leczniczych. Dzięki przygotowanym pracom poglądowym wytypowano możliwe do

wykorzystania metody spektroskopowe do zaplanowanych badań, dotyczących monitorowania jakości produktów leczniczych i ich aplikacji w przemyśle, biorąc pod uwagę drogę API od syntezy, poprzez transport, przechowywanie i wszystkie etapy formulacji, jak również interakcje i stabilność postaci leku. Na podstawie informacji zaczerpniętych z cytowanych publikacji, w pracach przeglądowych szczegółowo został omówiony wpływ parametrów rejestrowania widm na wyniki i możliwości wnioskowania przy użyciu różnych modeli chemometrycznych. Na tej podstawie opracowano metodykę badań monitorowania zmian fotochemicznych zachodzących w RAN interpretując znaczące pasma w podczerwieni oraz bliskiej podczerwieni, które różniły się w porównaniu z próbkami nienaświetlanymi. Badano wpływ czasu ekspozycji, wykorzystanej techniki rejestrowania widm, użytych metod statystycznych i chemometrycznych w oznaczeniach specyficznych zmian chemicznych i fizycznych na uzyskane rezultaty. Zestawienia zaprezentowane w publikacjach poglądowych [H1-H4] stanowiły zatem istotny punkt wyjścia do wyboru odpowiednich narzędzi analitycznych i podjęcia zaplanowanej metodyki.

Monitorowanie zmian na powierzchni proszku RAN rozpoczęto od zastosowania farmakopealnej metody identyfikacji chlorowodoru ranitydyny [FP 6.0], to jest spektroskopii w zakresie podczerwieni, za pomocą której analizowane były próbki naświetlane RAN przy użyciu dwóch technik, tj. techniki odbiciowej ATR-FTIR (na kryształach z ZnSe) oraz transmisyjnej (sporządzając pastylki z KBr). Do porównania wykorzystano próby odniesienia, to jest naświetlane analogicznie i chronione folią aluminiową przed dostępem światła próby i próby nie poddawane naświetlaniu. Z przeglądu literatury wywnioskowano, że technika ATR-FTIR ma znaczną przewagę w stosunku do techniki transmisyjnej FTIR ze względu na możliwość bezpośredniej analizy powierzchni poddanej ekspozycji na promieniowanie. Podjęto prace doświadczalne na różnych podłożach, by z użyciem spektroskopii w zakresie podczerwieni, w powtarzalny sposób móc bezpośrednio ocenić powierzchnię poddaną wcześniej naświetlaniu [H5,H6]. W związku z tym, że degradacja fotochemiczna rozpoczyna się na powierzchni analizowanej substancji, ważne jest użycie techniki rejestrowania zmian na tej samej (nie poddanej żadnej obróbce) powierzchni. Zatem, wykorzystanie techniki ATR-FTIR okazało się bardzo trafne i potwierdziło degradację chemiczną substancji. Widma zarejestrowane dla próbek po fotodegradacji ukazały pasma o większych intensywnościach, jak również zanik niektórych pasm, w porównaniu z widmem zarejestrowanym dla wzorca nie poddanego testom. Najwyraźniej widma były zróżnicowane w zakresie liczb falowych 4000–2000 cm^{-1} oraz zaobserwowano zanik pasm odpowiadających za obecność wiązania N-H ugrupowania aminowego RAN [H5]. Badania prowadzono zarówno dla próbek proszku

RAN, jak i produktów leczniczych (tabletki Zantac oraz produkty generyczne) zawierających chlorowoderek ranitydyny [H6]. Wyniki badań powierzchni próbek eksponowanych na promieniowanie już po 12 h (moc Suntest CPS+ 280 W/m²) wskazały na zachodzące zmiany chemiczne. Obserwowano zmienione przebiegi widm ATR-FTIR, na których pasma charakterystyczne uległy zniekształceniu, przesunięciu i wzmocnieniu intensywności. Z kolei w przypadku widm transmisyjnych FTIR, zmiany w pasmach miały mniejsze intensywności, co wynika przede wszystkim z rozcieńczenia próbki poprzez jej wymieszanie z KBr w celu sporządzenia pastylki. Analogiczne badania porównawcze technik FTIR wykonano dla kilku generycznych produktów leczniczych zawierających chlorowoderek ranitydyny. Opublikowane prace wskazują na fakt, że spektroskopia w zakresie podczerwieni jest metodą przydatną nie tylko do potwierdzania tożsamości API, ale jest również użyteczna w monitorowaniu wczesnych zmian zachodzących w związku z degradacją chemiczną, do jakiej dochodzi w fazie stałej.

Monitorowanie zmian chemicznych zachodzących w proszkach labilnych substancji leczniczych jest niezwykle trudne ze względu na konieczność utrzymania i badania jednorodnej próbki, zwłaszcza przy bezpośrednim analizowaniu powierzchni poddanej testom stabilności. Stąd też, po wykonaniu analiz metodą spektroskopii w zakresie podczerwieni podjęto się opracowania metody wykonania analogicznych oznaczeń dla próbek RAN przy użyciu spektroskopii w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). Wykorzystanie tak powszechnie stosowanego narzędzia PAT w procesach technologicznych jest znane w zakładach farmaceutycznych w Polsce i na świecie już od przeszło dekady. Jednakże, poza jedną opublikowaną pracą, w której autorzy zwrócili uwagę na potencjał zastosowania NIR do oceny stabilności substancji leczniczych [81], nie było dotąd innych prac o takiej tematyce. Zazwyczaj narzędzia PAT wykorzystywane są w przemyśle do potwierdzania tożsamości surowców.

Do badań włączone zostały próbki RAN zarówno po ekspozycji na promieniowanie z zakresu UV-Vis, jak i przechowywane w komorze klimatycznej w warunkach przewidzianych dla testu przyspieszonego starzenia, tj. 40 °C/75% RH. Dodatkowo, weryfikacji podobnych efektów poddałam cymetydynę, powszechnie uznaną za stabilną chemicznie, oraz famotydynę - znaną ze zmienności polimorficznej i niewielkich zachwiania stabilności. Potrzeba oznaczania w sposób bezpośredni wczesnych zmian zachodzących w próbkach testowanych skłaniała również do zaangażowania innych narzędzi PAT, takich

jak spektroskopia Ramana, jak również użytecznych i bardzo specyficznych metod analizy w fazie stałej, tj. różnicowej kalorymetrii skaningowej - DSC i dyfraktometrii rentgenowskiej - XRD.

Z przeglądu literatury wynika, że multi-instrumentalne badania stabilności substancji leczniczych zarówno pod kątem fizycznym, jak i chemicznym są niezwykle cenne zarówno w badaniu tożsamości proszków i surowców farmaceutycznych, jak i polimerów [9,82-85].

Próbki RAN, FAM i CYM objęte badaniami i poddane fotodegradacji i degradacji chemicznej wykazały istotne zmiany destrukcyjne RAN, ale również w przypadku FAM wykazano, że mimo braku różnic świadczących o degradacji substancji dochodzi do subtelnych zmian natury fizycznej [H7].

Dzięki współpracy z Departamentem Kontroli Jakości ZF Polpharma SA (Starogard Gdański) istniała możliwość przeprowadzenia analiz spektroskopowych NIR i Ramana dla próbek RAN, FAM i CYM po testach stabilności. Widma rejestrowane były dla próbek testowanych fotochemicznie i w komorze klimatycznej. Interpretacji zachodzących zmian i zróżnicowania między nimi dokonano porównując uzyskane widma pod kątem intensywności i kształtu pasm charakterystycznych badanych substancji leczniczych. Ze względu na ich duże wzajemne podobieństwo konieczne było wykorzystanie metod statystycznych do interpretacji wyników. Wykorzystano opcję oprogramowania liczącą wariancję z poszczególnych widm porównując przykładowo próbkę testowaną z wzorcem niepoddanym testom (próbą zerową). Wariancja jest podstawową miarą zmienności, w tym przypadku uzyskanych widm i pokazuje jak duże jest ich zróżnicowanie, stąd umożliwia zweryfikowanie niestabilności próbek, nawet jeśli występują niewielkie różnice pomiędzy nimi. Jeśli wynikiem analizy wariancji widm nie jest linia prosta można uznać, że obszary liczby falowej, w jakich zostaje wykreślona krzywa, jest to obszar zróżnicowania widm.

W przypadku próbek naświetlanych i próbek odniesienia, wariancja z widm ramanowskich, która ukazuje charakterystyczne pasma, umożliwia identyfikację mobilnych ugrupowań w cząsteczkach próbek poddanych narażeniu na czynniki szkodliwe. Dla RAN zmiany dotyczyły pasma przy liczbie falowej 1556 cm^{-1} odpowiadającego za asymetryczne rozciągające drgania wiązania N=O oraz 1250 i 1183 cm^{-1} antysymetrycznego drgania deformacyjnego wiązania C-H. Stwierdzono, że te fragmenty struktury RAN są najbardziej podatne na wzbudzenia i fotodegradację. W analogicznej analizie przeprowadzonej dla FAM zmiany wariancji widm Ramana wskazały na zmiany pasm przy liczbie falowej 1552 cm^{-1} (C-N), 1335 cm^{-1} (C=C), 1147 cm^{-1} (N-H) i 737 cm^{-1} (C-S), co potwierdziło fotowrażliwość

tych wiązań. W przypadku CYM zmiany dotyczyły pasm przy 2167 cm^{-1} (C-N), 1597 cm^{-1} (N=O), 1283 cm^{-1} (CH_3) i 662 cm^{-1} (C-S). Wykorzystanie spektroskopii Ramana pozwoliło zatem na zaobserwowanie wczesnych zmian na powierzchni badanych próbek, nawet w przypadku CYM, dla której nie wykazano dotychczas wrażliwości na światło. Metoda FTIR dowiodła, że w RAN poddanej fotodegradacji dochodzi do zmian chemicznych, co wykazano również w poprzednich pracach [H5,H6], natomiast dla FAM i CYM nie zaobserwowano żadnych zmian na widmach próbek poddanych naświetlaniu. W próbkach poddanych testom stabilności pod wpływem podwyższonej temperatury i wilgotności okazało się, że widma FTIR dla RAN są znacznie zmienione, co świadczy zdecydowanie o dużej ilości produktów degradacji, a dla FAM zaobserwowano jedynie subtelne zmiany intensywności niektórych pasm. Analogiczne zmiany udało się zarejestrować metodą NIR. Obserwowano zróżnicowanie wariacji z widm próbek naświetlanych i odniesienia w zakresie liczb falowych $6800\text{--}6300\text{ cm}^{-1}$ i $5200\text{--}4700\text{ cm}^{-1}$. Po zinterpretowaniu zakresów tych pasm, oceniono udział drgań wiązania S-C przy 5050 cm^{-1} jak również pierwszych nadtonów pierwszorzędowych i drugorzędowych amin przy 6000 cm^{-1} dla RAN i 7000 cm^{-1} dla RAN, FAM i CYM. Opracowano model chemometryczny, Simca [85,86], który pozwolił stwierdzić, że widma NIR próbek naświetlanych i nienaświetlanych RAN różnią się od widm NIR wykonanych dla próbek RAN chronionych przed promieniowaniem (odniesienia) [H7].

Różnicowa kalorymetria skaningowa posłużyła do monitorowania zmian w próbkach RAN, FAM i CYM pod wpływem podwyższonej temperatury, zwiększonej wilgotności oraz dostępu światła, wykazując zmiany fizyczne próbek. Pomiary temperatury topnienia próbek wskazały zmianę z pierwotnej T_m $151\text{ }^{\circ}\text{C}$, która obniżała się w próbkach po 1, 2 i 4 miesiącach osiągając wartość T_m $134\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 6 miesiącach testowania próbek RAN. Również testowane fotochemicznie próbki RAN wykazywały zmiany przebiegu krzywych DSC dla próbek naświetlanych dłużej niż 48 h. Dla FAM zanotowano jeden ostry pik endotermiczny przy temperaturze $167,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, znacząco wyższej niż temperatura topnienia wzorcowej, nietestowanej substancji i jej formy polimorficznej B, tj. $158,6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po wnikliwej analizie dostępnej literatury naukowej stwierdzono, że doszło do zmian fizycznych próbek FAM przechowywanych w komorze klimatycznej i komorze Suntest CPS+. Podobny efekt zauważyli badacze testując odporność próbek FAM na wysokie ciśnienia przy kompresji [87]. Dochodzi do swoistego rodzaju wzbudzenia formy polimorficznej B cząsteczki FAM, co skutkuje mechaniczno-chemiczną aktywacją podobną do amorfizacji. Zmiana wartości temperatury topnienia FAM po testach stabilności, jak również obserwowane subtelne

przesunięcia pasm na widmach FTIR w próbkach FAM sugerują jej zmianę fizyczną, aczkolwiek ze względu na brak punktu temperatury zeszklenia (T_g), charakterystycznego dla postaci amorficznej uznano, że postać ta może występować, ale w niewielkiej ilości, jako zanieczyszczenie postaci krystalicznej.

Niezwykle dużą trudność w testowaniu próbek RAN w komorze klimatycznej sprawiał fakt przemiany jej stałej, pierwotnie krystalicznej postaci w postać płynną i kleistą. Przy wykorzystaniu metody dyfraktometrii rentgenowskiej – XRD, na dyfraktogramach obserwowano wczesne zmiany zachodzące w krystalicznej postaci RAN w czasie przechowywania w warunkach testu przyspieszonego starzenia, to jest już po 4 dniach, a dla próbek poddanych fotoekspozycji po 48 h. Refleksy XRD, charakterystyczne dla krystalicznej RAN (forma polimorficzna 2) przy $17,5^\circ$ i $20,2^\circ$ (2θ), są zakłócane pod względem kształtu i intensywności. Dla FAM również zauważono subtelne zmiany w wyglądzie próbek przechowywanych w komorze klimatycznej, co na dyfraktogramach było widoczne dla refleksów przy $19,0^\circ$, $19,6^\circ$ i $29,8^\circ$ (2θ) i prawdopodobnie wiązało się jedynie ze zmianą wielkości cząstek. Nie nastąpiła jednak zmiany formy polimorficznej próbek.

Biorąc pod uwagę przeprowadzoną ocenę wczesnych zmian zachodzących w próbkach RAN za pomocą spektroskopii ATR-FTIR, NIR, Ramana oraz metod takich jak DSC i XRD, jak również dokonaną identyfikacją problemu związanego z powstawaniem lotnych produktów fotodegradacji [H5-H9], podjęto się kolejnego etapu prac związanego z poszukiwaniem skutecznej metody ochrony RAN przed szkodliwymi czynnikami. Założeniem zaplanowanych prac było zahamowanie jej fotodegradacji.

Ochrona labilnych substancji przed szkodliwymi czynnikami jest aktualnym tematem badań w farmacji, ze względu na możliwość ograniczenia ilości powstających substancji potencjalnie toksycznych, czy rodnikowych [H10]. Wykorzystanie do tego celu właściwości cyklodekstryn, które mają zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych (IC) jest naturalną konsekwencją, ponieważ od wielu lat są z powodzeniem wykorzystywane w farmacji i chemii w przypadku innych, labilnych substancji [88-92]. W piśmiennictwie odnotowano tylko jeden przykład wykorzystania cyklodekstryn w technologii ranitydyny. Kompleks RAN z β -cyklodekstryną został opatentowany w 1997 roku jedynie w celu stabilizacji fizycznej chlorowodorku ranitydyny i zapobiegania przemianie polimorficznej z Formy 2 do Formy 1 [92]. W patencie dodatkowo podkreślono, że uzyskany kompleks RAN-CD jest stabilny fizycznie nawet przez długi okres czasu i ponad dwukrotnie mniej higroskopijny

w porównaniu z polimorficzną, wolną od kompleksu Formą 2 RAN. CD nie absorbują promieniowania, jednak z ich udziałem zmienia się przebieg i mechanizm niektórych reakcji chemicznych. Celem prowadzonych badań własnych z udziałem β -CD było ograniczenie ilości powstających produktów fotodegradacji RAN [H9-H10]. Jednocześnie należy podkreślić, iż wcześniej nie prowadzono badań w sposób zaproponowany w niniejszym osiągnięciu. Postawiony cel fotoprotekcji RAN polegał na otrzymaniu konkretnych kompleksów inkluzyjnych z CD, których wdrożenie mogło skutecznie wpłynąć na poprawę jej trwałości [H10]. W celu obserwowania efektów ochrony utworzone zostały kompleksy inkluzyjne RAN z β -CD (IC) w dwóch stosunkach stechiometrycznych 1:1 i 1:2 metodą odparowywania z roztworu oraz analogiczne mieszaniny fizyczne (PM). Próbki ekspozowano na światło w sposób opisany szczegółowo w publikacji [H9]. Próbki do analizy pobierane były metodą HS-SPME oraz analizowane za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS). Z uzyskanych rezultatów wynika jednoznacznie zmniejszenie ilości powstających nowych substancji w wyniku ekspozycji IC i PM na światło w porównaniu z próbką odniesienia, to znaczy naświetlanym proszkiem chlorowodoru ranitydyny owiniętym folią aluminiową. Uzyskane wyniki są podstawą do uznania ochronnych właściwości cyklodekstryn w odniesieniu do fotolabilnej RAN. Należy podkreślić, że w większości próbek zawierających RAN, zarówno IC, PM jak i wzorcowej RAN zidentyfikowano jako produkt degradacji RAN - acetaldotsym. Mimo, iż dotąd nie udało się ustalić źródła jego obecności, jednak prace w tym kierunku powinny być kontynuowane. Zaplanowano również prowadzenie dalszych badań w kierunku oceny toksyczności i genotoksyczności powstających produktów *in silico*, a następnie za pomocą ludzkich linii komórkowych.

PODSUMOWANIE

Prowadzone badania miały na celu wykazanie konieczności szerszego spojrzenia na problem stabilności substancji leczniczych, w porównaniu do obecnych wymogów, zawartych w farmakopei. Uzasadniono innowacyjne podejście, zwłaszcza w przypadku API starszej generacji, dlatego do badań wybrano między innymi powszechnie stosowany w lecznictwie chlorowodorek ranitydyny. Przy wykorzystaniu wielu nowoczesnych metod analitycznych opracowano koncepcję monitorowania zmian substancji leczniczej w fazie stałej na wczesnym etapie narażenia jej na czynniki niszczące. Nowe informacje, jakie uzyskano

w oparciu o identyfikację lotnych produktów degradacji RAN pozwolą zaplanować kolejne badania, w tym między innymi *in silico*. Uzyskanie pozytywnych wyników związanych z eliminacją produktów degradacji, dzięki zastosowanej ochronie i obecności cyklodekstryn jest w konsekwencji powodem do nowego podejścia analitycznego. Istnieje również konieczności wprowadzania zmian normatywnych w kwestii identyfikacji szeroko rozumianych zanieczyszczeń API.

Podsumowując,

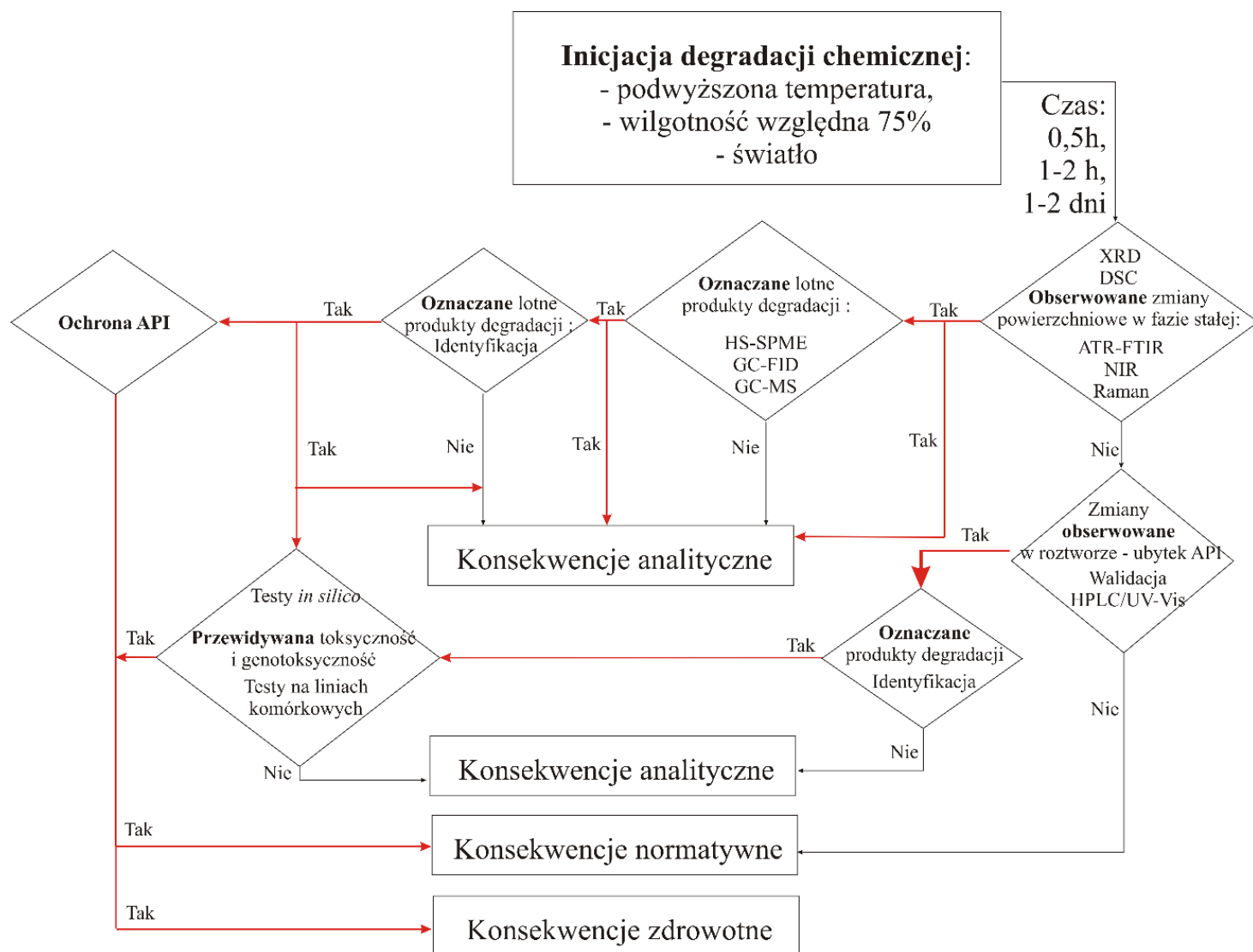
1. Zaproponowano warsztat analityczny, który dostarcza oczekiwanych informacji związanych ze stabilnością substancji leczniczej na wczesnym etapie narażenia na czynnik powodujący degradację. Wykazano, że w przypadku chlorowodorku ranitydyny, podejście ograniczone jedynie do analizy ilościowej zanieczyszczeń uznanych przez farmakopeę w testach stabilności jest niewystarczające. Zdobywanie cennych informacji o stanie chemicznym badanych labilnych substancji leczniczych po kilku minutach lub godzinach od zainicjowania reakcji degradacji poprzez działanie światła lub wilgoci, może być z powodzeniem prowadzone przy użyciu techniki odbiciowej spektroskopii w zakresie podczerwieni, ATR-FTIR. Do takiej obserwacji zmian API w stanie stałym przydatne są też inne metody, które wykorzystano w pracy, takie jak spektroskopia NIR, spektroskopia Ramana, ale również XRD i DSC.
2. Identyfikacja zanieczyszczeń metodą farmakopealną przy użyciu chromatografii HPLC z detektorem UV-Vis, nawet z użyciem zwalidowanej metody, jest niewystarczające do całościowego poznania stabilności API. Istnieje konieczność korzystania ze specyficznych metod analitycznych, które pozwolą na możliwie najniższym poziomie oznaczalności zarejestrować zmiany związane z utratą stabilności substancji leczniczej. Jedynie włączenie do rutynowych testów odrębnego postępowania uzupełniającego analizy o etap badań w fazie stałej, jak również oznaczanie lotnych i gazowych produktów degradacji API, pozwoli traktować proces jako kompleksowy. Ze względu na złożony proces fotodegradacji i konieczność analiz prowadzonych na wczesnym etapie zmian istotny jest właściwy dobór techniki pobierania próbek. Wykazano, że wykorzystanie techniki HS-SPME jest przydatne do bezpośredniej analizy procesów bez ingerencji w próbkę.
3. Oznaczenia zanieczyszczeń lotnych, które mogą pojawić się w próbkach API w wyniku degradacji (poza monitorowaniem pozostałości rozpuszczalników), nie są włączone do rutynowych oznaczeń w badaniach stabilności API zalecanych przez farmakopeę. Przy

użyciu chromatografu gazowego wyposażonego w specyficzny detektor mas (GC/MS) oraz chromatografu cieczowego HPLC z detekcją UV-VIS (DAD) wyposażonego w spektrometr mas z jonizacją poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI) z analizatorami kwadruipolowym i czasu przelotu (Q-ToF), zidentyfikowano inne, poza farmakopealnymi zanieczyszczenia niespecyficzne w próbkach chlorowodoru ranitydyny.

4. Zwalidowana metoda ilościowa HPLC jest przydatna do oceny ubytku substancji leczniczej, a co istotne, w przypadku chlorowodoru ranitydyny, również zmian zachodzących w fazie stałej w komorze klimatycznej. Zdarza się, tak jak w przypadku RAN, że największe zmiany chemiczne zachodzą w dwóch pierwszych dobach kontaktu z czynnikiem degradacyjnym. Etap propagacji procesu degradacji ma już inny charakter i skutkuje powstaniem innych produktów degradacji, niż początkowy i końcowy etap reakcji, stąd każdy jest ważny i powinien być monitorowany.
5. Istnieje wiele substancji leczniczych o dużym potencjale terapeutycznym, w tym również starszej generacji, które są niestabilne w obecności takich czynników jak podwyższona temperatura, wilgotność, czy światło. Pomimo tego nie są eliminowane z lecznictwa. Opracowując metody ochrony zewnętrznej, jak i wewnętrznej labilnych substancji leczniczych można zapobiec ich degradacji, co udało mi się wykazać na przykładzie chlorowodoru ranitydyny i β -cyklodekstryn w postaci kompleksów inkluzyjnych i mieszanin fizycznych.
6. Opracowano autorską koncepcję metodyki badań dla oceny wczesnych zmian zachodzących w fazie stałej w labilnych substancjach leczniczych, co przedstawiono schematycznie na rycinie 4. Podjęto działania, które pozwoliły monitorować stabilność API w fazie stałej za pomocą nowoczesnego warsztatu analitycznego, technik statystycznych i chemometrycznych w sposób niekonwencjonalny, w fazie stałej. Toksyczność każdego zidentyfikowanego nawet w najmniejszej ilości zanieczyszczenia API powinna być oceniona według współczesnych wytycznych metodami *in silico*, a następnie za pomocą specjalistycznych testów na liniach komórkowych. Powodem takiego działania i planowania warsztatu analitycznego było to, by w procesie oceny jakości substancji leczniczej w przemyśle farmaceutycznym, z wykorzystaniem między innymi narzędzi PAT dla procesu, zostały zaproponowane gotowe rozwiązania problemów.

7. Przeprowadzone badania wpisują się w obszar polityki jakości prowadzonej w firmach farmaceutycznych począwszy od badań i rozwoju poprzez proces produkcyjny i monitorowanie produktu na rynku. Opracowana koncepcja jest nowa i konkurencyjna,

a zatem również innowacyjna, stąd może mieć praktyczne zastosowanie w analizie farmaceutycznej.



Rycina 4. Schemat opracowanej autorskiej koncepcji nowego podejścia do badań stabilności chemicznej API.

Prowadzone prace naukowo-badawcze, stanowiące jednotematyczny cykl publikacji, były częściowo finansowane w ramach działalności projektów własnych (BW i MN) i pracy statutowej Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) oraz częściowo z dotacji finansowych nowych projektów badawczych KNOW (Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego dla Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego na lata 2012-2017). Ponadto wielokrotnie ubiegałam się o finansowanie badań z NCN oraz FNP uzyskując bardzo dobre oceny projektów, jednak ostatecznie nie uzyskując dofinansowania.

4. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Od początku studiów doktoranckich w Katedrze Technologii Chemicznej Politechniki Gdańskiej moje zainteresowania naukowe, oprócz realizowanego tematu pracy doktorskiej, związane były z farmacją. Prowadzone w latach 2001-2005 prace o charakterze badawczo-rozwojowym dotyczyły identyfikacji organicznych zanieczyszczeń w preparatach farmaceutycznych, syntezy wzorców zanieczyszczeń, lub też polegały na rozwiązaniu różnorodnych problemów związanych z produktami farmaceutycznymi. Wiele badań wykonywanych było na zlecenie Zakładów Farmaceutycznych POLPHARMA SA w Starogardzie Gdańskim. Efektem prowadzonych prac jest również publikacja, która ukazała się po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora: *Determination of the chemical structure of potential organic impurities occurring in drug substance opipramol*” E. Luboch, E. Wagner-Wysiecka, **M. Jamróiewicz**, J. Szczygelska-Tao, S. Magielka, J.F. Biernat, *Pharmazie*, 65, (2010) 239-244.

Poza tym przed uzyskaniem stopnia doktora pracując w zespole pana prof. Jana Biernata zajmowałam się cyklodekstrynami (CD). Badałam wpływ jaki odgrywają one jako dodatki w reakcjach sprzęgania soli benzenodiazoniowych z pirolem i imidazolem. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że tworząc bardzo specyficzne mikrośrodowisko reakcyjne (podobne do surfaktantów) zwiększają one wydajność uzyskiwanych w syntezach niecyklicznych oraz makrocyklicznych azozwiązków o strukturze eterów koronowych, z kilku nawet do kilkudziesięciu procent. Niewątpliwym zyskiem uzyskanych wyników było skrócenie czasu potrzebnego do syntezy odpowiedniej ilości produktów, które przewidziane były do kolejnych badań. Poza tym, przebieg reakcji prowadzonych w obecności CD, zmienia się, co pozwala uzyskać mniej produktów, ale też o innej strukturze w porównaniu z analogicznie prowadzonymi reakcjami bez dodatku CD. Przed uzyskaniem stopnia doktora zajmowałam się zatem głównie syntezą, a następnie badaniem właściwości elektrochemicznych i fizykochemicznych zsyntezowanych, zidentyfikowanych i oczyszczonych makrocyklicznych eterów koronowych. Badałam zdolność kompleksowania jonów metali ciężkich i przejściowych przez zsyntezowane związki, przy wykorzystaniu metody spektrofotometrycznej i potencjometrycznej. Makrocykliczne pochodne pirolu i imidazolu, które wykazywały duże wartości stałych kompleksowania, były następnie testowane jako materiał do budowy medycznych czujników optycznych.

Dodatkowo i niezależnie, w trakcie studiów doktoranckich brałam udział w projekcie skoncentrowanym na syntezie i badaniu właściwości nowych chromojonoforów i chromoflorojonoforów. Charakterystycznym elementem struktury tych związków jest obecność dwóch grup azowych, które stanowią fragment makropierścienia, oraz grupy zdolnej do oddysocjowania protonu (np. -OH), skierowanej do wnętrza makrocyklu. W ramach projektu syntezowano makrocykliczne związki, które obok łańcucha difenoksypolioksyetylenowego i dwóch grup azowych zawierały pochodne *p*-alkilofenoli, rezorcynolu lub związków heterocyklicznych. Uzyskane związki będące pochodnymi rezorcynolu i 1,3-dihydroksynaftalenu, w zależności od wielkości pierścienia wykazywały selektywność w stosunku do jonów litu lub sodu. Tematyka projektu obejmowała syntezę związków zdolnych do selektywnego rozpoznawania jonów oraz badanie natury i mechanizmu rozpoznania molekularnego. Celem pracy było otrzymanie związków, które w swojej strukturze, oprócz fragmentu jonoforowego, odpowiedzialnego za rozpoznanie jonu, posiadałyby dodatkowo reszty chromoforowe i/lub fluoroforowe, po to, by informacje o rozpoznaniu analitu mogły przetworzyć na sygnał optyczny. Ponadto wyselekcjonowane związki, o odpowiedniej lipofilowości, były testowane jako jonofory w membranowych elektrodach jonoselektywnych pod kątem budowy czujników optycznych. Efektem badań nad układami supramolekularnymi, w których uczestniczyły jony było testowanie zsyntezowanych związków makrocyklicznych do aplikacji w wielu dziedzinach np. chemii analitycznej, medycynie, ochronie środowiska czy technice.

4.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora rozpoczęłam pracę w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej w ówczesnej Akademii Medycznej. Prowadzona działalność skoncentrowana była wokół kilku aspektów.

Po pierwsze moje zainteresowania dotyczyły wykorzystania możliwości analitycznych metod spektroskopowych, głównie z zakresu podczerwieni, w aspekcie badań trwałości substancji leczniczych. Monitorowanie degradacji rozpoczęłam od badania kwasu acetylosalicylowego, jednak w cząsteczce o dosyć prostej strukturze i przewidywalnej stabilności nie znalazłam inspiracji do badań i krąg substancji poszerzyłam o inne, spośród których najbardziej interesujący i godny zaangażowania okazał się być chlorowodorek ranitydyny. W obrębie badań własnych dotyczących stabilności substancji leczniczych,

podjęłam współpracę z Katedrą i Zakładem Toksykologii GUMed w ramach prowadzonych analiz chromatograficznych GC-MS, w wyniku czego powstały dwie publikacje oraz prezentacje na konferencje naukowe.

Od 2009 roku prowadzę współpracę z Departamentem Kontroli Jakości ZF Polpharma SA w Starogardzie Gdańskim. Zostałam zaproszona do realizacji projektu, którego celem było opracowanie metody bazującej na wykorzystaniu spektroskopii w zakresie bliskiej podczerwieni, która miała pozwolić na weryfikację uzyskanej jednolitości masy tabletkowej w procesie mieszania w trakcie wytwarzania stałych postaci leku. W ramach opieki nad studentką realizującą pracę magisterską, której promotorem był pan prof. Jerzy Łukasiak, w tym temacie utworzona została wstępna metoda dla określenia zawartości API w mieszaninie granulatu. Badania obejmowały sztuczne przygotowanie prób o pięciu poziomach procentowych API, wymieszanie ich, a następnie zarejestrowanie widm i poddanie próbek analizie referencyjnej. Z uzyskanych wyników stworzono metodę za pomocą programu TQ Analyst 8.0.1.36. Wyniki badań zostały opublikowane i prezentowane na konferencjach naukowych. Dalszym etapem prac w porozumieniu z ZF Polpharma było wykorzystanie spektroskopii NIR oraz spektroskopii Ramana do identyfikacji i oznaczenia ilościowego kwasu acetylosalicylowego w masie tabletkowej Polopiryny S, w skali przemysłowej. Część uzyskanych wyników prac zostało wdrożonych w Zakładzie do rutynowych działań produkcyjnych. Na jednym z etapów prac dotyczących technologii farmaceutycznej miałam możliwość konsultowania ich przebiegu z panem dr hab. Krzysztofem Calem z Katedry i Zakładu Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego GUMed. W wyniku prowadzonych prac powstała publikacja (M. Jamrógiewicz, K. Cał, M. Gruszecka, A. Ciesielski, 2013, *Determination of API content in a pilot-scale blending by near-infrared spectroscopy as a first step method to process line implementation*”, Acta Pol. Pharm. Drug Res. 70(3), 419-429).

W trakcie badań, opracowywania metodyki i zdobywaniu doświadczenia z nowymi narzędziami PAT, z czym wiązało się śledzenie literatury naukowej, podjęłam się przygotowania publikacji przeglądowej dotyczącej wykorzystania spektroskopii NIR w technologii farmaceutycznej. Praca okazała się niezwykle cenna, ponieważ od 2012 roku była już cytowana przeszło 50 razy (Google Scholar) przez innych naukowców. Praca zaowocowała również zaproszeniem przez edytora z wydawnictwa Studium Press LLC, U.S.A. do udziału w przygotowaniu rozdziału do 12 tomowej serii wydawniczej „Biotechnology, Vol. 12, Bioprocess Engineering”, która została opublikowana w 2014 r.

„*Application of NIR and Raman Spectroscopy in Biotechnology*” (red. S. Sinha, J.N. Govil – Executive Editor), 539-560.

Niezależnie od wyżej wymienionych prac, w 2007 roku rozpoczęłam współpracę z Katedrą i Zakładem Farmacji Stosowanej kierowaną przez panią prof. Małgorzatę Sznitowską w ramach projektu „Silikonowe preparaty z suchym wyciągiem z cebuli i heparyną niskocząsteczkową na blizny hipertroficzne i keloidy”, 2007-2011 r., MNiSzW, N 405008 32/0528. Moje działania skoncentrowane były na poszukiwaniu elastomerów silikonowych, które mogłyby zostać wykorzystane do sporządzenia adhezyjnych plastrów na skórę. Zajmowałam się wstępnym badaniem uwalniania substancji z matryc silikonowych, ustalaniem technologii otrzymywania gotowego plastra z dodatkiem niskocząsteczkowej heparyny i suchego wyciągu z cebuli oraz badaniem właściwości uzyskanych plastrów. W zespole badawczym (M. Żebrowska, **M. Jamrógiewicz**, M. Sznitowska, K. Mojsiewicz-Pieńkowska, M. Ruzikowski) oceniono właściwości fizykochemiczne kauczków silikonowych, zbadano ich sieciowanie oraz właściwości użytkowe gotowego plastra silikonowego nie zawierającego substancji czynnych. Były to takie cechy jak adhezja, przenikanie tlenu, hydratacja i okluzja. Z uzyskanych rezultatów opublikowano dwie prace doświadczalne (1. K. Mojsiewicz-Pieńkowska, **M. Jamrógiewicz**, M. Żebrowska, M. Sznitowska, K. Centkowska, 2011, *Technology of an adhesive silicone film as drug carrier in transdermal therapy I. Analytical methods used for characterization and design of the universal elastomer layers*, J. Pharm. Biomed. Anal., 56, 131-138; 2 - K. Mojsiewicz-Pieńkowska, **M. Jamrógiewicz**, M. Żebrowska, B. Mikolaszek, M. Sznitowska, 2015, *Double layer adhesive silicone dressing as a potential dermal drug delivery film in scar treatment*, Int. J. Pharm. 481, 18-26), jedną przeglądową (**M. Jamrógiewicz**, M. Żebrowska, J. Łukasiak, M. Sznitowska, 2010, *Silikonowe preparaty do leczenia powierzchniowego blizn*, Farm. Pol., 66 (6), 437-442). Do ważnego osiągnięcia należała wydana decyzja o udzieleniu patentu przez Urząd Patentowy RP w 2015 r. Obecnie przygotowywana jest kolejna publikacja prezentująca rezultaty badań właściwości mechanicznych i morfologii uzyskanych plastrów silikonowych (**M. Jamrógiewicz**, B. Mikolaszek, K. Mojsiewicz-Pieńkowska, M. Żebrowska, M. Sznitowska, J. Strankowska, *Physical and mechanical characterization of double layer adhesive silicone dressing, intended for scars and keloids treatment* – do wysłania do Int. J. Pharm.).

Od 2014 r. jestem głównym wykonawcą w grantie pani dr hab. Krystyny Mojsiewicz-Pieńkowskiej, z Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej, GUMed pt. „Badanie zdolności

penetracji i przenikania niskocząsteczkowych polisiloksanów (silikonów) przez skórę ludzką”, NCN, UMO-2013/11/B/N27/02076 na lata 2014-2016 r. Współpraca w grantcie dotyczy optymalizacji metodyki rejestracji widm metodą spektroskopii w bliskiej podczerwieni NIR, analizy danych uzyskanych techniką spektroskopii NIR dla ekstraktów warstw skóry i płynu akceptorowego, opracowywania modelu interpretacji widm ATR FTIR dla poszczególnych warstw skóry z uwzględnieniem także wykorzystania pierwszej i drugiej pochodnej widm oraz dyskusji wyników badań. Przygotowywany jest obecnie manuskrypt do publikacji, zawierający uzyskane dotychczas wyniki.

W obrębie prac prowadzonych w jednostce jestem ponadto zaangażowana w badania dotyczące stabilności chemicznej i fotochemicznej iwabradyny. Moja rola w tych badaniach koncentruje się wokół interpretacji analiz chromatograficznych LC/MS/MS i identyfikacji powstających produktów degradacji. Wstępne wyniki były prezentowane na konferencji w Lizbonie w 2014 r. oraz przygotowywana jest publikacja P. Pikul, **M. Jamrógiewicz**, W. Hewelt-Belka, K. Ciura, J. Nowakowska, „*Identification and characterization of stressed degradation products of ivabradine using LC-MS/MS and in silico methods*” do J. Pharm. Biomed. Anal.

W ramach pracy własnej i prac prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej biorę czynny udział w przygotowywaniu wniosków aparaturowych. W zespole pana prof. Wiesława Sawickiego przygotowywałam również materiały do utworzenia sieci naukowej z Wydziałem Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego, na temat wykorzystania szerokozakresowego spektrometru IR/NIR do ilościowej oceny zawartości formy amorficznej lub krystalicznej w badanych substancjach leczniczych, do badania *ex-vivo* dyfuzji substancji leczniczych do warstw skóry ludzkiej z różnych formułacji i nośników, do udoskonalenia i optymalizacji procesów technologicznych wytwarzania produktów leczniczych, np. mieszania, granulacji (kompaktorowania), suszenia, liofilizacji, mielenia, zamykania ich w kapsułki żelatynowe wpływających na punkt końcowy procesu. Czynnie brałam też udział w ubieganiu się o zakup spektroskopu NIR, dyfraktometru rentgenowskiego i innych urządzeń niezbędnych do pracy w jednostce.

Od 2013 r. prowadzę również rozwój naukowy w ramach seminariów grupy Farm-Fiz-Chem dotyczącego tematów z dziedziny nauk farmaceutycznych, chemicznych i fizycznych. Organizatorami seminariów są: pani prof. Małgorzata Sznitowska - Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Wydział Farmaceutyczny z OML, GUMed; pani dr hab. Krystyna Pieńkowska –

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej GUMed, pan dr hab. Jerzy Kwela, prof. UG, pani dr Justyna Strankowska – Zakład Fizyki Stosowanej, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, UG, pan dr inż. Michał Strankowski – Katedra Technologii Polimerów, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska i dr inż. Marzena Jamróiewicz.

Piśmiennictwo

1. ICH Q1A (R) Stability testing of new drug substances and products (1993), *International Conference on Harmonisation*, Szwajcaria, Genewa
2. ICH Q3A. Impurities in New Drug Substances (1994), Tripartite International Conference on Harmonization Guideline Q3A, Genewa
3. Waterman K. C., Adami R. C. (2005), Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.*, 293, 101-125
4. ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and products (2003), *International Conference on Harmonisation*, Szwajcaria, Genewa
5. Glass B. D., Novák C., Brown M. E. (2004), The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. *J. Thermal Anal. Cal.*, 77, 1013-1036
6. Alsante K. M., Huynh-Ba K. C., Baertschi S. W., Reed R. A., Landis M. S., Furness S., Olsen B., Mowery M., Russo K., Iser R., Stephenson G.A., Jansen P. (2014), Recent trends in product development and regulatory issues on impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 2: Safety considerations of impurities in pharmaceutical products and surveying the impurity landscape. *AAPS PharmSciTech*, 15, 237-251
7. Reynolds D. W., Facchine K. L., Mullaney J. F., Alsante K. M., Hatajik T. D., Motto M. G. (2002), Conducting forced degradation studies. *Pharm. Technol.* 48-56
8. Yoshioka S., Aso, Y. (2007). Correlations between molecular mobility and chemical stability during storage of amorphous pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.*, 96, 960-981
9. Chieng N., Rades T., Aaltonen J. (2011), An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 618-644
10. Brittain H.G., Bogdanowich S.J., Bugay D.E., DeVincentis J., Lewen G., Newman A.W. (1991), Physical characterization of pharmaceutical solids, *Pharm. Res.* 8, 963-973
11. European Pharmacopoeia 8.0 (2015), 5.4
12. Huynh-Ba K. (Ed.). (2008). *Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies, and best practices*. Springer Science & Business Media
13. Carstensen J. T. (1999), Drug Stability: Principles and Practices, Revised and Expanded. *Drugs Pharm Sci.*, 92, 68-68
14. Olsen B.A., Larew L.A. (2005), Comparative Stress Stability Studies for Rapid Evaluation of Manufacturing Changes or Materials from Multiple Sources, in: Baertschi, S.W., *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. CRC Press
15. ICH Q3B (R). Draft revised guidance on impurities in new drug products, Federal Register. 65 (2000) 44791-44797
16. EMEA, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), (2004), Guideline on the limits of genotoxic impurities, CPMP/SWP/5199/02, London, UK
17. McGovern T., Jacobson-Kram D. (2006). Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. *TrAC Trends in Anal. Chem.*, 25, 790-795
18. Dow L. K., Hansen M. M., Pack B. W., Page T. J., Baertschi S. W. (2013). The assessment of impurities for genotoxic potential and subsequent control in drug substance and drug product. *J. Pharm. Sci.*, 102, 1404-1418
19. ICH, ICH M7 (2014)– assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk
20. Görög S. (2015), Identification in drug quality control and drug research. *TrAC Trends in Anal. Chem.*, 69, 114-122
21. EMA, CHMP, (2012), Guideline on Stability Testing for Applications for Variations to a Marketing Authorization, London, UK
22. WHO (2012), Guidelines on submission of documentation for a multisource (generic) finished pharmaceutical product for the WHO Prequalification of Medicines Programme: quality par, Anex 4
23. Giordani A., Kobel W., Gally H. U. (2011), Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 43, 1-15
24. Baek I. H., Kim J. S., Ha E. S., Choo G. H., Cho W., Hwang S. J., Kim M. S. (2014), Dissolution and oral absorption of pranlukast nanosuspensions stabilized by hydroxypropylmethyl cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.*, 67, 53-57
25. FDA (2003) "PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance (Draft Guideline)". <http://www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm>
26. ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2009) Topic Q8 (R2): Pharmaceutical Development, ICH, Genewa

27. ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005) Topic Q9: Quality Risk Management, ICH, Genewa
28. ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2008), Topic Q10: Pharmaceutical Quality System, ICH, Genewa
29. EMEA (2009), Note for guidance on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, EMEA/CVMP/961/01, w http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003331.pdf
30. Paradowska K., Wawer I. (2014), Solid-state NMR in the analysis of drugs and naturally occurring materials. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 93, 27-42
31. Kubecova M., Kolostova K., Pinterova D., Kacprzak G., Bobek V. (2011), Cimetidine: an anticancer drug?. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 42, 439-444
32. Sprowl J. A., van Doorn L., Hu S., van Gerven L., de Bruijn P., Li L., Sparreboom A. (2013), Conjunctive therapy of cisplatin with the OCT2 inhibitor cimetidine: influence on antitumor efficacy and systemic clearance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(5), 585-592.
33. Kostowski W., Herman Z S.: Farmakologia. Podstawy farmakoterapii: podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy, PZWL, Warszawa 2008
34. Aqueous ranitidine composition stabilized with ethanol, Glaxo, UP 5068249, 1991
35. Patent, WO 2008039792 A1, Stable pharmaceutical compositions of preserved formulation of ranitidine, process for making the same, and methods of their use, 2006
36. Teraoka R, Otsuka M, Matsuda Y. (1993), Effects of temperature and relative humidity on the solid-state chemical stability of ranitidine hydrochloride, *J. Pharm. Sci.*, 82, 601-604
37. Islam M. A., Hossain Md. A., Kabir A. N. M. H., Kabir S., Hossain Md. K. (2008), Study of moisture absorption by ranitidine hydrochloride: effect of %RH, excipients, dosage forms and packing materials, *J. Pharm. Sci.*, 7, 59-64
38. Radjenović J., C. Sirtori, M. Petrović, D. Barcelo, S. Malato, (2010), Characterization of intermediate products of solar photocatalytic degradation of ranitidine at pilotscale, *Chemosphere* 79, 368–376
39. Mulvaney J. E., Marvel C. S. (1961). Synthesis of polymers containing recurring thiazole rings. *The J. Org. Chem.*, 26, 95-97
40. Masuda M., Mower H. F., Pignatelli B., Celan I., Friesen M. D., Nishino H., Ohshima H. (2000), Formation of N-nitrosamines and N-nitramines by the reaction of secondary amines with peroxyxynitrite and other reactive nitrogen species: comparison with nitrotyrosine formation, *Chem. Res. Tox.*, 13, 301-308
41. Padhye, L., Wang, P., Karanfil, T., & Huang, C. H. (2010), Unexpected role of activated carbon in promoting transformation of secondary amines to N-nitrosamines. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 4161-4168
42. Kamath B.V., Shivram, K., Newalkar, B.L., Shah, A.C. (1993), Liquid chromatographic analysis and degradation kinetics of famotidine, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, 16, 1007-1014
43. Helali N., Darghouth F., Monser L. (2004), RP-HPLC determination of famotidine and its potential impurities in pharmaceuticals. *Chromatographia*, 60, 455-460
44. Wu Y., Fassihi R. (2005), Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination, *Int. J. Pharm.*, 290, 1-13
45. Singh S., Kumar S., Sharda N., Chakraborti A.K. (2002), New findings on degradation of famotidine under basic conditions: Identification of a hitherto unknown degradation product and the condition for obtaining the propionamide intermediate in pure form, *J. Pharm. Sci.*, 91, 253-257
46. Amin A. S., Ahmed I. S., Dessouki H. A., Gouda E. A. (2003), Utility of oxidation–reduction reaction for the determination of ranitidine hydrochloride in pure form, in dosage forms and in the presence of its oxidative degradates, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectr.*, 59, 695-703
47. Addamo M., Augugliaro V., Di Paola A., Garcia-Lopez E., Loddo V., Marci G., Palmisano L. (2005), Removal of drugs in aqueous systems by photoassisted degradation, *J. Appl. Electrochem.* 35, 765-774
48. Tonnesen H.H. (2001), Formulation and stability testing of photolabile drugs, *Int. J. Pharm.*, 225, 1-14
49. Williams M.F, Hak L.J, Dukes G. (1990), In vitro evaluation of the stability of ranitidine hydrochloride in total parenteral nutrient mixtures. *Am. J. Hosp. Pharm.* 47, 1574-1579
50. Allwood M. C., Martin H. (1995), Factors influencing the stability of ranitidine in TPN mixtures. *Clinical Nutrition*, 14, 171-176
51. Mirmehrabi M., Rohani S., Murthy K. S., Radatus B. (2004), Improving the filterability and solid density of ranitidine hydrochloride form 1. *J. Pharm. Sci.*, 93, 1692-1700
52. Cholerton T. J. , J. H. Hunt, G. Klinkert, M. Martin-Smith (1984), Spectroscopic studies on ranitidine—its structure and the influence of temperature and pH. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1761-1766
53. Yoo S. H. (1997), Amine acid salt compounds and process for the production thereof, U.S. Patent No. 5 686 588. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office

54. Bharate S. S., Bharate S. B., Bajaj A. N. (2010), Incompatibilities of Pharmaceutical Excipients with Active Pharmaceutical Ingredients: A Comprehensive Review. *J. Excip. Food Chem.*, 1, 3-26.
55. Noritaka II., MURAKAMI, T. (1999). *WIPO Patent No. 1999016470*. Genewa, World Intellectual Property Organization
56. Patel D. J., Patel J. K., Pandya V. M. (2010), Improvement in the dissolution of poorly water soluble drug using media milling technique. *Thai J. Pharm. Sci*, 34, 155-164
57. Patel D. J., Patel J. K. (2013), Design and evaluation of famotidine mucoadhesive nanoparticles for aspirin induced ulcer treatment." *Braz. Archiv. Biol. Technol.* 56, 223-236
58. Ballester-Rodes M., Palomo-Nicolau F. E., Palomo-Coli A. L., *U.S. Patent No. 5,021,582*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 1991
59. Sriraman M. C., Vyas J. H., Talia Y. H., Sanyal J. P., Shah M. N., *European Patent No. EP 1361221*. Munich, Germany: European Patent Office, 2003
60. Brauckmann C., Faber H., Lanvers-Kaminsky C., Sperling M., Karst U. (2013), Influence of cimetidine and its metabolites on Cisplatin—Investigation of adduct formation by means of electrochemistry/liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1279, 49-57
61. Nep E. I., Conway B. R. (2010), Polysaccharide gum matrix tablets for oral controlled delivery of Cimetidine. *J. Pharm. Sci. Res.*, 2, 708-716
62. Rosenberg H. A., Dougherty J. T., Mayron D., Baldinus J. G. (1980), Cimetidine hydrochloride compatibility. I: Chemical aspects and room temperature stability in intravenous infusion fluids. *Am. J. Health-Sys. Pharm.*, 37, 390-392
63. Yuhas E. M., Lofton F. T., Mayron D., Baldinus J. G. (1981), Cimetidine hydrochloride compatibility. II: Room temperature stability in intravenous infusion fluids. *Am. J. Health-Sys. Pharm.*, 38, 879-881
64. Brambilla G., Francesca M. Antonietta M. (2010), Genotoxic and carcinogenic effects of gastrointestinal drugs, *Mutagenesis* 25, 315-326
65. Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli, R. (2005), Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment, *J. Hazardous Mat.*, 122, 205-209
66. Doelker E., Witschi C. (1997), Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43, 215-242
67. Lord, H., & Pawliszyn, J. (2000). Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 17-63.
68. Seward J. R., Sinks G. D., Schultz, T. W. (2001), Reproducibility of toxicity across mode of toxic action in the Tetrahymena population growth impairment assay. *Aquatic toxicology*, 53, 33-47
69. Tolando R., Zanovello A., Ferrara R., Iley J. N., Manno M. (2001), Inactivation of rat liver cytochrome P450 (P450) by N, N-dimethylformamide and N, N-dimethylacetamide. *Toxicol. Let.* 124, 101-111
70. Chatterjee N., Eom H. J., Jung S. H., Kim J. S., Choi J. (2014) Toxic potentiality of bio-oils, from biomass pyrolysis, in cultured cells and *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol.* 29, 1409-1419
71. Haywood P. A., Martin-Smith M, Cholerton T. J. (1987), Isolation and Identification of the Hydrolytic Degradation Products of Ranitidine Hydrochloride, *J. Chem. Soc. Perkin Trans* 951-954
72. Lipnicka U., Jasztold-Howorko R., Witkiewicz K., Machon Z. (2002), A new method for the synthesis of ranitidine. *Acta Pol. Pharm.*, 59, 121-126
73. Navarro J. J., Almeida J. F., Anaya J., Moran J. R., Grande M., Caballero M. C., San Roman L. (1995), Synthesis and pharmacology of two new histamine receptor antagonists related to ranitidine. *Die Pharmazie*, 50, 12-15
74. Patent, Process for the preparation of ranitidine or acid addition salts thereof, and intermediates for this preparation, EP 0219225 B1, 1985
75. Latch D., Stender B., Packer J., Arnold W., McNeill K. (2003), Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: cimetidine and ranitidine, *Environ. Sci. Technol.* 37, 3342-3350
76. Beaulieu N., Lacroix P. M., Sears R. W., Lovering E. G. (1988), High-performance liquid chromatographic methods for the determination of ranitidine and related substances in raw materials and tablets. *J. Pharm. Sci.*, 77, 889-892
77. Guerrieri P., Salameh A. K., Taylor, L. S. (2007), Effect of small levels of impurities on the water vapor sorption behavior of ranitidine HCl. *Pharm. Res.*, 24, 147-156
78. El-Bayoumi A. E. A., El-Shanawany A., El-Sadek M. E., El-Sattar A. A. (1999), Stability indicating spectrophotometric determination of ranitidine hydrochloride using linear and non-linear regression. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21, 867-873
79. Jones M. D., Plumb R. S. (2006), The application of sub-2- μ m particle liquid chromatography-operated high mobile linear velocities coupled to orthogonal accelerated time-of-flight mass spectrometry for the analysis of ranitidine and its impurities. *J. Separ. Sci.*, 29, 2409-2420

80. Isidori M., Parrella A., Pistillo P., Temussi F. (2009), Effects of ranitidine and its photoderivatives in the aquatic environment, *Environ. Int.* 35, 821–825
81. Yang Y., A. Gupta, A.S. Carlin, P.J. Faustino, R.C. Lyon, Ch. D. Ellison, B. Rothman, M.A. Khan, (2010), Comparative stability of repacked metoprolol tartrate tablet, *Int. J. Pharm.* 385, 92–97
82. Bugay D.E. (2001), Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 48, 43–65
83. Sarraguça M.C., A.V. Cruz, S.O. Soares, H.R. Amaral, P.C. Costa, J.A. Lopes, (2010), Determination of flow properties of pharmaceutical powders by near infrared spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52, 484–492
84. Shah R. B., M. A. Tawakkul, M. A. Khan, (2007), Process Analytical Technology: Chemometric analysis of Raman and near infrared spectroscopic data for predicting physical properties of extended release matrix tablets, *J. Pharm. Sci.* 96, 1356–1365
85. Custers D., Canfyn D. M., Courselle. P., De Beer J.O., Apers S., Deconinck E. (2014), Headspace–gas chromatographic fingerprints to discriminate and classify counterfeit medicines, *Talanta* 123, 78–88
86. Custers D., T. Cauwenbergh, J.L. Bothy, P. Courselle, J.O. De Beer, S. Apers, E. Deconinck (2014), ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics: an interesting tool to discriminate and characterize counterfeit medicines, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 112, 181–189
87. Németh Z., B. Hegedűs, C. Szántay Jr, J. Sztatisz, G. Pokol, (2005), Pressurization effects on the polymorphic forms of famotidine, *Thermochim. Acta*, 430, 35–41
88. Luboch E., Poleska-Muchlado Z., Jamrógiewicz M., Biernat J.F., Artykuł w książce: Cyclodextrin combinations with azocompounds" in *Macrocyclic Chemistry. Current Trends and Future Perspectives*" (red. K. Gloe), 203–218, Springer 2005
89. Jamrógiewicz M., Biernat J.F., Influence of β -Cyclodextrin on Coupling Reactions of o-Nitrobenzenediazonium Salt with Pyrrole, *Pol. J. Chem.* 80, 2006, 753–757
90. Jamrógiewicz M., Sadowska K., Biernat J. F., (2006), Effect of Cyclodextrins on Coupling of o-Ethoxybenzene-Diazonium Salt with Pyrrole and Imidazole, *J. Incl. Phenom.* 56, 355–362
91. Sadowska K., Jamrógiewicz M., Biernat J. (2008), Stimulated by cyclodextrins high yield synthesis of azocrown analogues comprising pyrrole or imidazole residues, *Supramol. Chem.* 20, 717–722
92. Fischer, Wilfried, and Karin Klokke. Crystalline cyclodextrin complexes of ranitidine hydrochloride, process for their preparation and pharmaceutical compositions containing the same. U.S. Patent No. 5,665,767. 9 Sep. 1997

Marzena Jamrógiewicz