

Problematyka lotnych związków organicznych w farmacji

Volatile organic compounds in pharmacy – the range of the problem

Marzena Jamrógiewicz^(a, b, c), Ewelina Kosek^(b, c), Wiesław Sawicki^(d)

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Kierownik Katedry: prof. dr hab. W. Sawicki

Dziekan Wydziału Farmaceutycznego z OML GUMed: prof. dr hab. W. Sawicki

^(a) koncepcja

^(b) zebranie i przegląd danych literaturowych

^(c) opracowanie tekstu i piśmiennictwa

^(d) sprawdzenie merytoryczne

STRESZCZENIE

Brak stabilności chemicznej substancji leczniczych może skutkować powstawaniem i emisją substancji o charakterze lotnym oraz wpływać nie tylko na stabilność produktu leczniczego, lecz również prowadzić do zmian jego właściwości fizykochemicznych, wywoływać negatywne efekty farmakologiczne, a czasami również toksyczne. Z tego względu istotne jest rutynowe prowadzenie testów stabilności, jak również oznaczanie gazowych produktów degradacji nowoczesnymi metodami, często niekonwencjonalnymi. Wiedza z zakresu chemii medycznej, chemii fizycznej, technologii postaci leku i toksykologii jest potrzebna, by zapewnić stabilną postać leku i optymalny efekt terapeutyczny. Scharakteryzowano wytyczne dotyczące oznaczanych lotnych związków organicznych (LZO) obecnych w próbkach substancji leczniczych, wyszczególniono rodzaje LZO i ich klasyfikację. Dokonano przeglądu bieżącej literatury opisującej wyniki oznaczeń LZO w substancjach i produktach leczniczych oraz omówiono różne możliwości ich detekcji i identyfikacji. Obecnie najczęściej wykorzystuje się metody oparte o chromatografię gazową, GC oraz spektroskopię mobilności jonowej, IMS.

Słowa kluczowe: lotne związki organiczne, emisja, substancje lecznicze, fotodegradacja, toksykologia.

ABSTRACT

The sensitivity and chemical instability of the active pharmaceutical ingredients (API) may result in the formation and emission of volatile substances which affect not only the stability of the medicinal product, but also leads to changes of physicochemical properties, causing negative pharmacologic effects sometimes toxic. For this reason, it is important to conduct routine stability tests, as well as, to determine gaseous degradation products using modern analytical methods, often unconventional. Knowledge of medicinal chemistry, physical chemistry, technology and toxicology is needed to provide a stable form of the drug and its utmost therapeutic effect. Available guidelines on determined volatile organic compounds (VOCs) present in samples of drug substances have been verified, types of VOCs have been specified and classified. Current literature reviewed shows the results of determination of VOCs in active drug compounds and medicinal products, including discussion on various possibilities of their detection and identification. Currently used methods are based on gas chromatography and ion mobility spectrometry IMS.

Key words: volatile organic compounds, emission, medicinal substances, photodegradation, toxicology.

WSTĘP

Lotne substancje chemiczne – definicje

Lotne związki organiczne LZO (ang. *volatile organic compounds*, VOC) stanowią produkty uboczne ogromnej ilości procesów przemysłowych i są poważnym źródłem zanieczyszczenia środowiska. Z tego względu w wielu krajach całego świata (także w Polsce) istnieją normy ograniczające ich emisję do środowiska, poprzez określenie dopuszczalnych wartości maksymalnej zawartości LZO w różnych produktach.

Zawartość LZO określa masę lotnych związków organicznych, wyrażoną w przypadku cieczy w gramach na litr (g/l) produktu gotowego do użytku. Pojęcie lotnych zanieczyszczeń organicznych w farmacji związane jest z pozostałościami lotnych rozpuszczalników stosowanych podczas syntezy substancji leczniczej lub na etapie technologii postaci leku. Rozpuszczalniki te według Międzynarodowej Komisji ds. Harmonizacji i Wymagań Rejestracyjnych Leków, ICH (ang. *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) zaklasyfikowane są do trzech grup w zależności od potencjalnej toksyczności i mają ustalone limity zawartości w substancjach i produktach leczniczych [1]. ICH do organicznych zanieczyszczeń zalicza m.in. substraty używane do syntezy substancji leczniczej, produkty pośrednie tej syntezy, a także produkty degradacji.

Dotychczas nie została opracowana jednoznaczna definicja LZO. Odpowiednie źródła w różny sposób definiują substancje zaliczane do grupy lotnych związków organicznych:

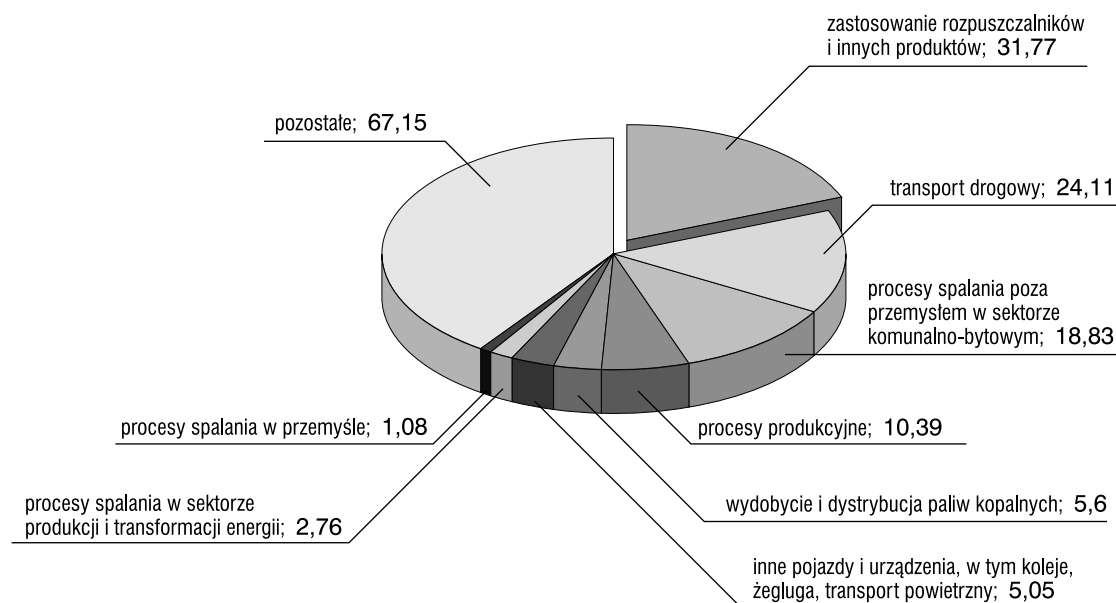
- według dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2004/42/CE są to substancje organiczne o początkowej temperaturze wrzenia równej lub niższej niż 250° C w warunkach standardowego ciśnienia, które w warunkach normalnych są cieczami lub ciałami stałymi [2];
- Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska, EPA (ang. *The Environmental Protection Agency*) przyjmuje jako kryterium zaliczenia do lotnych związków organicznych prężność pary niższą od 0,1013 kPa (0,76 mmHg) i wyklucza z tej grupy tlenek węgla, dwutlenek węgla, kwas węglowy, węgliki lub węglany metali, węglan amonu, dwutlenek siarki, ozon, dwutlenek azotu, tlenek azotu i ołów, które biorą udział w atmosferycznych reakcjach fotochemicznych; natomiast do tej grupy zalicza cząstki związków chemicznych o średnicy aerodynamicznej $\leq 10 \mu\text{m}$ [3];

- lotne związki organiczne, zgodnie z protokołem **Konwencji Genewskiej o Transgranicznym Zanieczyszczeniu Powietrza na Dalekie Odległości**, podpisanym w 1991 roku, to wszystkie związki pochodzenia antropogenicznego, za wyjątkiem metanu, które wykazują zdolność do wytwarzania fotochemicznych utleniaczy poprzez reakcje z tlenkami azotu i pod wpływem promieniowania słonecznego [4];
- terminu lotnych związków **nie można** utożsamiać z pojęciem związków gazowych; jest to grupa związków organicznych charakteryzująca się wysoką prężnością par i niską rozpuszczalnością w wodzie; związki te z łatwością przechodzą w postać pary lub gazu a ich temperatura wrzenia mieści się w granicach 50–250° C (pomiar w warunkach ciśnienia normalnego 101,3 kPa). Mogą również zawierać atomy tlenu, wodoru, fluoru, chloru, siarki, azotu oraz bromu.

Identyfikacja lotnych substancji ma ogromne znaczenie dla przemysłu farmaceutycznego, gdyż nawet niewielkie ich ilości mogą zmieniać fizykochemiczne właściwości substancji leczniczej i mieć wpływ na proces technologiczny postaci leku. Ponadto mogą być przyczyną powstania nieprzyjemnego zapachu, zmiany barwy i wpływać na efekt terapeutyczny, bezpieczeństwo stosowania oraz stabilność gotowego produktu [5].

Oznaczanie związków z grupy LZO niesie ze sobą wiele problemów analitycznych. Zasadniczym źródłem problemów podczas ich identyfikacji jest zarówno ich wysoka lotność, jak i właściwości hydrofobowe, co wiąże się bezpośrednio z trudnością w pobraniu próby do analizy.

Przyczyną emisji LZO są zarówno źródła antropogeniczne jak i naturalne [6]. W krajach Unii Europejskiej ze źródeł naturalnych pochodzi średnio 20% emisji [7]. W Polsce do naturalnych źródeł LZO można zaliczyć m.in. pożary lasów, a także procesy wegetacyjne niektórych organizmów, procesy asymilacyjne, wybuchy wulkanów i gejzerów [8]. Obok naturalnych źródeł powstawania LZO istnieją także źródła antropogeniczne, którymi są głównie procesy prowadzone z zastosowaniem rozpuszczalników [2]. Krajowy Ośrodek Bilansowania i Zarządzania Emisjami w 2010 roku wyodrębnił udział poszczególnych sektorów w emisji LZO pochodzenia antropogenicznego ilościowo (ryc. 1) [9]. Jednym z głównych źródeł emisji LZO jest transport, a szczególnie pojazdy napędzane benzyną. Kolejnym istotnym źródłem jest przemysł, zwłaszcza petrochemiczny, sektor chemii organicznej, przemysł celulozowo-papierniczy.



Ryc. 1. Schemat emisji LZO pochodzenia antropogenicznego – procentowy udział poszczególnych źródeł [9]

Fig. 1. Diagram of anthropogenic VOC emissions – the percentage input of each source [9]

W związku z danymi dotyczącymi emisji LZO nie bez powodu prowadzi się obecnie politykę horyzontalną i zrównoważonego rozwoju w zakresie obejmującym tworzenie i upowszechnianie nowych, przyjaznych dla środowiska technologii. Już w zadaniach Szóstego Programu Działania Unii Europejskiej na rzecz Środowiska (6th European Action Plan – EAP) zagościł tytuł „Środowisko 2010: Nasza przyszłość zależy od naszego wyboru“, gdzie postawiono za cel nadrzędny publikowanie badań naukowych z zakresu ekologii jako formy upowszechniania wiedzy ekologicznej [10].

Wszystkie kraje Unii Europejskiej wspólnie dążą do dbałości o środowisko, stąd bezpośrednim celem prowadzonych działalności powinno być szerzenie wiedzy promującej jej ochronę, segregowanie śmieci, budowanie oczyszczalni ścieków, lub w efekcie pośredniego oddziaływania, korzystanie z dokumentów elektronicznych zamiast papierowych.

NORMY I WYTYCZNE DOTYCZĄCE LOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH W FARMACJI





Przemysł farmaceutyczny dąży do minimalizowania liczby i ilości rozpuszczalników organicznych (tab. I) stosowanych przy wytwarzaniu produktów leczniczych. Nie mają one terapeutycznej wartości i mogą być toksyczne, a ponadto mogą dodatkowo

przyspieszać rozkład produktu leczniczego. Szczególne wskazówki publikowane w Farmakopeach oraz wytyczne ICH określają maksymalne dopuszczalne ilości lotnych związków organicznych w technologii farmaceutycznej. Jeżeli ilość LZO mieści się poniżej ustalonego limitu, wtedy analizowany produkt może być przeznaczony do obrotu. Przemysł farmaceutyczny potrzebuje ujednoczenia limitów dla rozpuszczalników stosowanych w produkcji. Przez wiele lat tylko USP (Farmakopea Amerykańska) podawała ilości lotnych związków organicznych dopuszczonych do dziennej ekspozycji. W 1990 roku limity dla LZO zostały zaproponowane przez Farmakopeę Europejską. Projekt wytycznych sprzed trzech lat został podany przez ICH [9].

Ustalone dopuszczalne poziomy dla organicznych zanieczyszczeń i rozpuszczalników zależą od wielu czynników, m.in. od toksyczności, kosztu syntezy a także drogi podania, co bezpośrednio przekłada się na produkt leczniczy, czas trwania leczenia i stosowaną dawkę. Według ICH ilość zanieczyszczeń w substancjach leczniczych nie powinna przekraczać 0,1 %, chociaż dla związków silnie toksycznych wartość ta jest jeszcze niższa (np. 1 ppm dla tlenu etylenu). Powyżej określonego poziomu wszystkie nieznanne zanieczyszczenia powinny zostać zidentyfikowane (tab. II) [11, 12]. Dodatkowo, wszystkie wykrywane zanieczyszczenia powinny być poddane odpowiednim badaniom toksykologicznym.

Tab. I. Przykłady rozpuszczalników organicznych stosowanych w technologii farmaceutycznej wraz z dopuszczalną dzienną ekspozycją, PDE (ang. *permissible daily exposure*) [5, 9]

Tab. I. Examples of some organic solvents in the pharmaceutical technology and the permissible daily exposure, PDE [5, 9]

Klasa	Rozpuszczalnik	Zawartość PDE (mg/dzień)	Działanie	Wzór
I	benzen	0,02	Substancje karcynogenne, toksyczne, zagrażające środowisku, substancje drażniące	
	tetrachlorek węgla	0,04		CCl ₄
	1,2-dichloroetan	0,05		CH ₂ ClCH ₂ Cl
	1,1-dichloroetan	0,08		CHCl ₂ CH ₃
	1,1,1-trichloroetan	15,0		CCl ₃ CH ₃
II	chloroform	0,6		CHCl ₃
	toluen	8,9		
	formamid	2,2		HCONH ₂
	metylocykloheksan	11,8		
	metanol	20,0		CH ₃ OH
III	aceton	50,0		(CH ₃) ₂ CO
	octan etylu			CH ₃ COOC ₂ H ₅
	3-metylo-1-butanol			CH ₂ (OH)CH ₂ CH(CH ₃)CH ₃
	2-propanol			CH ₃ CH(OH)CH ₃
	tetrahydrofuran			

Tab. II. Ustalone progi dla identyfikacji i kwalifikacji zanieczyszczeń w produktach leczniczych (całkowite dzienne spożycie, TDI ang. *total daily intake*) [11]

Tab. II. Established thresholds for the identification and qualification of impurities in medicinal products (total daily intake, TDI [11])

Maksymalna dawka dobową produktu leczniczego	Limit zanieczyszczeń
IDENTYFIKACJA	
mniej niż 1 mg	1,0% lub 5 µg TDI
1 mg – 10 mg	0,5% lub 20 µg TDI
10 mg – 2 g	0,2% lub 2 mg TDI
więcej niż 2 g	0,1%
KWALIFIKACJA	
mniej niż 10 mg	1,0% lub 50 µg TDI
10 mg – 100 mg	0,5% lub 200 µg TDI
100 mg – 2 g	0,2 % lub 2 mg TDI
więcej niż 2 g	0,1%

W skład zanieczyszczeń zawartych w produktach leczniczych wchodzi m.in. produkty degradacji składników syntezy, produkty pochodzące z reakcji pomiędzy substancjami leczniczymi i substancjami pomocniczymi, zanieczyszczenia pochodzące od zastosowanego sprzętu oraz zanieczyszczenia i rozpuszczalniki użyte w procesie produkcji. W Farmakopeach sumarycznie są one traktowane jako zanieczyszczenia. W publikacjach naukowych również często mylone są pojęcia stabilności chemicznej i związane z tym produkty degradacji powstające pod wpływem czynnika zewnętrznego takiego jak woda, promieniowanie, czy podwyższona temperatura, z pojęciem zanieczyszczenia. To ostatnie może być związane jedynie z niedoskonałym oczyszczeniem substancji na etapie technologicznym, a nie ze stabilnością. Takiego rozgraniczenia nie można znaleźć również w Farmakopeach.

Różnorodne zanieczyszczenia produktów leczniczych są przedmiotem szczególnego zainteresowania współczesnej farmacji. Istnieje obowiązek jednoznacznego identyfikowania wykrytych zanieczyszczeń niezależnie od ich poziomu przed podjęciem decyzji o wprowadzeniu produktu leczniczego do obrotu.

Dopuszczalne limity proponowane przez ICH dla organicznych zanieczyszczeń obecnych w produktach leczniczych są znacznie wyższe niż dla substancji leczniczych. Odzwierciedla to fakt, iż preparaty farmaceutyczne są zwykle mniej trwałe niż czyste substancje lecznicze głównie ze względu na możliwość interakcji. Przedmiotem szczególnego zainteresowania jest badanie i monitorowanie zanieczyszczeń produktów leczniczych podczas ich wytwarzania.

TOKSYCZNOŚĆ LOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH PROBLEMEM FARMACJI?

Lotne związki organiczne stanowią bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia człowieka i środowiska przez oddziaływanie toksyczne jak również poprzez oddziaływanie pośrednie, prowadzące do powstawania wtórnych szkodliwych zanieczyszczeń, np. ozonu [13]. W farmacji problem zawartości LZO jest bezpośrednio monitorowany w zakładach farmaceutycznych oraz chemicznych syntezujących substancje lecznicze i substancje pomocnicze, które używane są do wytwarzania produktów leczniczych. Certyfikaty i specyfikacje stosowanych w farmacji i medycynie związków są gwarancją i świadectwem bezpieczeństwa pacjentów. Źródłem LZO w produktach medycznych i lekach są najczęściej pozos-

tałości rozpuszczalników, ale również produkty rozkładu, interakcji czy innej transformacji substancji leczniczych.

Pierwsza klasa rozpuszczalników organicznych jest najbardziej toksyczna. Znajdują się tu zarówno poznane już karcynogeny, związki o potencjalnym działaniu onkogenym, jak również związki stanowiące zagrożenie dla środowiska i zdrowia ludzkiego, tj. benzen, tetrachlorek węgla, 1,2-dichloroetan, 1,1-dichloroetan oraz 1,1,1-trichloroetan. Wartości graniczne stężeń dla pierwszych czterech rozpuszczalników klasy pierwszej wynoszą pomiędzy 2 a 8 ppm, natomiast limit dla trichloroetanu wynosi 1500 ppm [5].

Stosowanie rozpuszczalników należących do **drugiej klasy** powinno być również ograniczone, ponieważ wykazują działanie neurotoksyczne i teratogenne. Są to takie substancje jak np. chloroform, chlorobenzen, dichlorometan, toluen czy ksylen o zróżnicowanej dawce wywołującej szkodliwość.

Trzecia klasa rozpuszczalników o dość niskim potencjale toksyczności zawiera takie związki chemiczne jak kwas octowy czy octan etylu. Nie działają one teratogenne ani genotoksycznie, jednak szczególnie drażniąco oddziałują na błony śluzowe. Wartości graniczne stężeń dla wszystkich rozpuszczalników tej klasy wynoszą 5000 ppm. Większe ilości mogą być akceptowane, jeśli producent udowodni, że ilości tych rozpuszczalników są realne w stosunku do zdolności produkcyjnych i zgodne z wymogami Dobrej Praktyki Wytwarzania GMP (ang. *Good Manufacturing Practice*) [5].

Możemy także wyróżnić **czwartą klasę rozpuszczalników**, jednak odpowiednie dane toksykologiczne dla tej grupy nie są dostępne.

Rozpuszczalniki z każdej z tych grup niosą ze sobą zagrożenia, zarówno dla zdrowia ludzi jak i dla środowiska naturalnego. Przykładowo formaldehyd lub związki z grupy polichlorowanych bifenyli mogą spowodować częste bóle i zawroty głowy, tetrachloroetylen i chlorek winylu są odpowiedzialne za uczucie permanentnego zmęczenia i senności, natomiast podrażnienie błon śluzowych oczu, gardła i dróg oddechowych powoduje między innymi formaldehyd, akroleina, benzen i aldehyd octowy. Mogą one także powodować obrzęk płuc, astmę, czy zmiany skórne. Niektóre z lotnych związków organicznych mają udowodnione właściwości cancerogenne, teratogenne i genotoksyczne lub są podejrzewane o takie działanie na organizm człowieka w przypadku długotrwałej ekspozycji.

RODZAJE WYKRYWANYCH LOTNYCH SUBSTANCJI W FARMACJI I MEDYCYNIE

Lotne związki organiczne są praktycznie wszechobecne. Źródłem LZO w farmacji mogą być między innymi pozostałości rozpuszczalników, które są zakwalifikowane głównie do II i III klasy związków (tab. I). Ponadto znajdują się one w klejach, farbach, drewnie, w postaci przetworzonej lub naturalnej. Zawartość lotnych związków organicznych jest również wykrywana rutynowo i identyfikowana w substancjach leczniczych i produktach leczniczych.

W kategorii LZO poza rozpuszczalnikami może znajdować się wiele różnych substancji. Według

Dyrektywy Komisji Europejskiej 1999/13/CE cechą wspólną tych związków jest zawartość węgla, który jest następnie połączony z tlenem, siarką, wodorem, fosforem lub halogenowcami. Związki te są lotne, więc mogą rozprzestrzeniać się na różne odległości od źródła emisji i mogą mieć pośredni lub bezpośredni wpływ na zdrowie istot żywych. Stąd też tak ważna jest identyfikacja tych związków i ocena ich szkodliwości. Zdarza się, że w trakcie przechowywania substancji leczniczych lub sterylizacji produktów leczniczych, jak również podczas analizy laboratoryjnej, następuje emisja LZO, które są identyfikowane za pomocą różnych metod analitycznych (tab. III).

Tab. III. Przykłady identyfikowanych LZO z wybranych substancji leczniczych, produktów leczniczych oraz podczas diagnostyki laboratoryjnej

Tab. III. Examples of identified VOCs from certain medicinal substances, medicinal products and during medical diagnosis

	Substancje identyfikowane o charakterze lotnym	Wykonane badania	Metoda analityczna	Piśmiennictwo
Substancja lecznicza/produkt handlowy				
Sól sodowa cefotaksymu/ Claforan	Metanol, etanol, izocyjanian metylu, dichlorometan, aceton, kwas octowy, chloroform, tetrahydrofuran, ester etylu, pirydyna, dwutlenek węgla, woda	Radiosterylizacja próbek; warunki analizy: 25 kGy/1g substancji, temp. pok.	Chromatografia gazowa z detektorem mas i podczerwienią GC-MS; GC-IR	[14]
Sól sodowa cefuroksymu/ Zinacef	Etanol, aceton, chloroform, dwutlenek węgla, woda	j.w.	j.w.	[14]
Pięciowodzian ceftazydym/ Glazidim	Aceton, pirydyna, dwutlenek węgla, woda	j.w.	j.w.	[14]
Substancje z grupy 5-członowych heterocyklicznych pochodnych azoli tj.: talazol, miconazol, econazol, azakonazol, klotrimazol, bifonazol	Pozostałości substancji leczniczych i pochodnych związków o charakterze lotnym na linii produkcyjnej i urządzeniach	Kontrola czystości w zakładach farmaceutycznych	Spektrometria mobilności jonowej, IMS	[15]
Ibuprofen	Ilościowe oznaczanie substancji leczniczej w badaniach transdermalnej dyfuzji przy wykorzystaniu celek dyfuzyjnych Franza	Transdermalna dyfuzja przy wykorzystaniu celek dyfuzyjnych Franza	j.w.	[15]
Suplementy i produkty lecznicze zawierające cysteinę oraz rybozę	Pochodne tiolowe; 2-tienylo-metanotiol, 3-tiolo-2-butanon; 1-tiolo-2-propanon; mieszanina disiarczków	Rozkład termiczny/reakcja Maillarda	Wysokorozdzielcza chromatografia gazowa z detektorem mas, HR-GC; statyczna analiza fazy nadpowierzchniowej/olfaktometria, SHO	[16]
Marihuana, kokaina, heroina, metamfetamina	Benzaldehyd, 1-fenylo-2-propanon, kwas octowy, kamfora, piperonal, izosafrol	Stabilność podczas przechowywania, wykrywanie narkotyków, kryminalistyka	Mikroekstrakcja z warstwy nadpowierzchniowej do fazy stacjonarnej, chromatografia gazowa z detektorem wychwytu elektronów HS-SPME-GC-ECD	[17]

Chlorowodorek ranitydyny	Acetaldoxym, tiazol, 5-metylofurfural	Fotodegradacja w stanie stałym	Mikroekstrakcja z warstwy nadpowierzchniowej do fazy stacjonarnej, chromatografia gazowa z detektorem mas, HS-SPME-GC-MS	[18]
Diagnostyka medyczna				
Powietrze wydychane palaczy i niepalaczy	Acetonitryl, benzen	Czynne i bierne palenie	Spektrometria mas z reakcją przeniesienia protonu, PTR-MS	[19]
Procesy metaboliczne związane z przebiegiem chorób cywilizacyjnych	Aceton, benzen, acetonitryl, isoprene, dimetylo siarczek acetaldehyd, formaldehyd, metanol, etanol	Diagnostyka i przebieg cukrzycy, choroba wieńcowa, choroba nowotworowa płuc i nerek	Spektrometria mas z reakcją przeniesienia protonu, PTR-MS	[20]
Przemiany zachodzące w ciele ludzkim po śmierci, patomorfologia, histopatologia	1,5-diaminopentan, 1,4-diaminobutan, p-krezol, indole, dimetylo siarczki, trimetyloamina, kwas propionowy, kwas masłowy, kwasy tłuszczowe	Detektywistyka, poszukiwanie zmarłych, poznanie przyczyn zgonu	Mikroekstrakcja z warstwy nadpowierzchniowej do fazy stacjonarnej, chromatografia gazowa z detektorem mas, HS-SPME-GC-MS [17]	[17]

Jedną z bardziej powszechnych i dobrze znanych metod identyfikacji rozpuszczalników i pozostałości substancji leczniczych jest chromatografia gazowa, najczęściej poprzedzona techniką dozowania znad przestrzeni próbki oraz ekstrakcją do fazy stałej, HS-SPME (tab. III). Mało znane są natomiast takie metody jak spektrometria mobilności jonowej, IMS, czy olfaktometria i spektrometria mas z reakcją przeniesienia protonu PTR-MS.

METODY DETEKcji ZWIĄZKÓW LOTNYCH – APARATURA, PROCEDURY

Identyfikacja lotnych związków organicznych (LZO) jest jednym z najważniejszych analitycznych zadań w analizie farmaceutycznej i kontroli jakości. W ostatnich latach nastąpił duży rozwój technik analitycznych umożliwiających oznaczanie i identyfikację lotnych zanieczyszczeń produktów leczniczych w lekach. Wykorzystywane są do tego celu metody oparte o techniki spektroskopowe, jak i podziałowe.

Metody analityczne służące do analizy lotnych związków organicznych mogą być specyficzne lub niespecyficzne. Do specyficznych metod o dużej wydajności należy m.in. chromatografia gazowa GC, chromatografia jonowa IC, chromatografia micelarna elektrokinetyczna MEK oraz spektrometria mas MS [21]. Do niespecyficznych metod zalicza się oznaczanie całkowitej zawartości węgla organicznego TOC, wyznaczanie przewodnictwa, czy pomiar

pH [22]. Metodami specyficznymi w pewnym stopniu są również spektroskopia w zakresie UV-Vis i metoda absorpcji atomowej [23]. Granica detekcji nie pozwala oznaczyć lotnych związków emitowanych w niewielkich ilościach w stosunku do kubatury pomieszczeń, w których są przechowywane. Są bardzo wrażliwe na interferencje, stąd mogą posłużyć jedynie do wstępnego monitoringu.

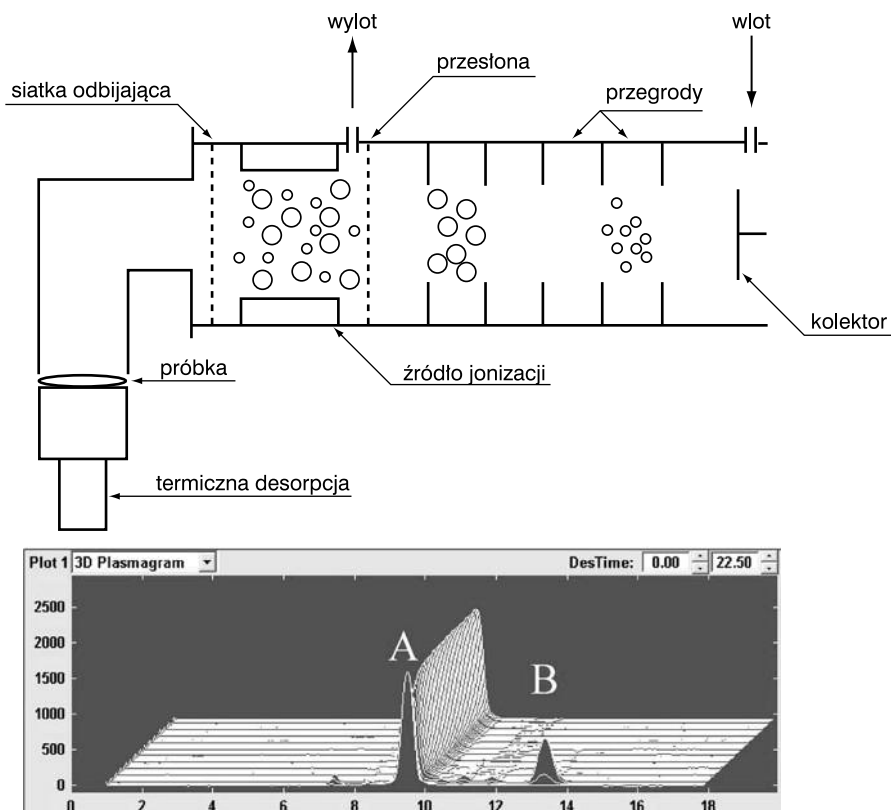
Chromatografia gazowa (GC) jest jedną z najszybszych i najskuteczniejszych metod rozdzielania i identyfikacji mieszanin związków gazowych, a także ciekłych i stałych substancji, które w warunkach prowadzenia procesu chromatograficznego stają się lotne – mają postać gazów lub par, a ich temperatura wrzenia lub sublimacji nie przekracza 400° C. Dlatego metoda ta ma duże znaczenie przy identyfikacji lotnych związków organicznych. Nie zawsze GC udziela jednoznacznych informacji o składzie rozdzielanej mieszaniny. Dlatego w przypadku skomplikowanych analiz i potrzeby identyfikacji poszczególnych składników, metoda GC sprzęgana jest z detektorem mas. Chromatograf gazowy po rozdzieleniu mieszaniny, wprowadza do spektrometru związki o danej lotności i z szybkością dopasowaną do procesów, jakie zachodzą w MS. Spektrometr mas w takim sprzężeniu pełni rolę detektora jakościowego, a ponadto pozwala oznaczać poszczególne składniki ilościowo [24]. Warunkiem prowadzenia analizy jest to, by składniki próbki analizowane metodą chromatografii gazowej były stabilne w temperaturze analizy. Zdarza się, że oznaczane związki mogą być również zawarte w trudno lotnej matrycy.

Stosuje się wówczas technikę dozowania z nad przestrzeni próbki, HS (ang. *head space*). Metoda HS-GC polega na analizie gazu (pary), który pozostaje w równowadze termodynamicznej nad trudno lotną cieczą lub ciałem stałym w układzie zamkniętym. Jest to metoda analityczna stosowana przy oznaczaniu lotnych zanieczyszczeń w produktach leczniczych oraz przy oznaczaniu LZO, szczególnie przydatna do oznaczania niskich stężeń [18, 25].

Duże zainteresowanie w badaniach nad pozostałościami rozpuszczalników w próbkach farmaceutycznych wzbudza technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej SPME (ang. *solid phase microextraction*). Połączenie HS z techniką SPME-GC przyniosło oczekiwane efekty detekcji i identyfikacji lotnych produktów fotodegradacji chlorowodorku ranitydyny (tab. III) [18].

Wśród niewielu specyficznych i dostępnych metod coraz większe zainteresowanie zdobywa metoda **spektrometrii mobilności jonowej, IMS**. Pierwsze wyprodukowane aparaty do IMS były wykorzystywane głównie do wykrywania narkotyków, materiałów wybuchowych i chemicznych środ-

ków biobójczych przez służby kontrolujące porty, lotniska oraz wojsko. Aktualnie, w związku z tym, że przemysł chemiczny i farmaceutyczny potrzebują szybkich, wydajnych i opłacalnych metod analitycznych, technika ta używana jest w badaniach próbek biologicznych, w rozwoju badań biofarmaceutycznych i w medycynie. Ryzyko zanieczyszczenia substancji leczniczych i produktów leczniczych wprowadzanych na linię po poprzednich analitach jest likwidowane dzięki zastosowaniu metody IMS. Okazało się, że IMS jest przydatny do monitorowania bezpieczeństwa, kontroli jakości procesów oraz sterowania procesem w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym. Typowym przykładem wykorzystania tej techniki jest weryfikacja czyszczenia aparatury produkcyjnej i linii produkcyjnej produktów leczniczych [26]. Urządzenie IMS ma prostą budowę (ryc. 2), a wynik analizy przypomina obrazy chromatogramów. Próbka wprowadzana jest do urządzenia dzięki termicznej desorpcji, jest szybko ogrzana, a następnie odparowana na podłożu teflonowym i selektywnie jonizowana przez wewnętrzne źródło promieniowania jonizującego (^{63}Ni).



Ryc. 2. Schemat przedstawiający budowę aparatu IMS oraz wynik przykładowej analizy pozostałości substancji leczniczej na linii produkcyjnej – plasmagram: A – wzorec wewnętrzny, B – analizowana substancja lecznicza

Fig. 2. Diagram presenting construction of an IMS and the result of the residue sample analysis of drug substance in the production line – plasmagram: A – an internal standard, B – analyzed drug substance

W polu elektrycznym jony wędrują przez rurę przepływu, gdzie występują zderzenia pomiędzy jonami i neutralnymi cząsteczkami gazu buforowego (ryc. 2). Charakterystyczna szybkość, z jaką porusza się jon pod wpływem pola elektrycznego określana jest mianem mobilności jonowej [15, 27, 28]. Jest to ważna cecha, umożliwiająca różnicowanie związków na podstawie rozmiaru, kształtu i ładunku.

Wyniki analizy są przedstawiane jako widmo mobilności jonowej lub plazmagram, który jest wykresem intensywności szczytowej w funkcji czasu przepływu przez komorę detektora. W przypadku analizy niektórych substancji IMS może być techniką wysoce specyficzną i selektywną. Jej główną zaletą jest to, że wyniki analizy są otrzymywane w ciągu 1 minuty.

Metoda rzadko spotykana w analityce, jaką jest spektrometria mas z reakcją przeniesienia protonu PTR-MS opiera się na teorii chemicznej jonizacji stosowanej do identyfikacji i oznaczania ilościowego mieszanin związków chemicznych [18]. W metodzie PTR-MS stosowana jest jonizacja chemiczna, która opiera się na reakcji przeniesienia protonu, w której podstawowym substratem jest jon hydroniowy, H_3O^+ . Przekazanie protonu następuje z protonowanych cząsteczek wody na lotne związki organiczne, które następnie rozdzielają się według proporcji masa/ładunek, co zazwyczaj odpowiada ich masom cząsteczkowym. Jony hydroniowe nie reagują z żadnym z naturalnych składników powietrza, ponieważ ich powinowactwo protonowe jest niższe niż cząsteczek wody. Ponadto większość lotnych związków organicznych ma większe powinowactwo protonowe niż H_2O , dlatego podczas przeniesienia protonu dochodzi do zderzeń między cząsteczkami. Istotną zaletą metody jest brak konieczności separacji analizowanych związków chemicznych.

Przyrządy PTR-MS charakteryzują się dużą czułością (poniżej pptv, ang. *part per trillion volume*) i dużą częstotliwością wykonywania pomiarów. Z tych powodów metoda PTR-MS stała się alternatywą dla wielokrotnych badań on-line. Jednym z ważniejszych ograniczeń jest jedynie brak możliwości ich identyfikacji, przez co konieczne jest zastosowanie dodatkowych metod referencyjnych.

WNIOSKI

Biorąc pod uwagę, że substancje lecznicze oraz produkty lecznicze stanowią kluczowy czynnik w poprawie zdrowotności społeczeństwa, udział emisji gazowych i lotnych substancji pochodzących m.in.

z ich rozkładu jest również znaczący ze względu na istotne miejsce jakie zajmuje dziedzina farmacji w gospodarce. Farmaceutyki w trafiają do środowiska w formie niezmienionej lub jako metabolity. Dalej mogą być całkowicie usuwane w oczyszczalniach ścieków lub przechodzić biotyczne i abiotyczne transformacje modyfikujące je pod kątem struktury i właściwości. Są to wszystko drogi emisji lotnych związków organicznych. Niezwykle ważne jest zatem ciągłe monitorowanie ich obecności oraz zagrożenia toksykologicznego.

PIŚMIENNICTWO

1. International Conference on Harmonisation. Guidance on Impurities. Residual Solvents; Federal Register 62, 1997: 67377-67388.
2. Dyrektywa 2004/42/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 21 kwietnia 2004 r., Dz.U. Unii Eur. L 143/87.
3. Wegman L.N.: Definition of Regulated Air Pollutant for Purposes of Title V – memorandum. Environmental Protection Agency, 1993.
4. Konwencja w sprawie transgranicznego zanieczyszczenia powietrza na dalekie odległości, sporządzona w Genewie dnia 13 listopada 1979 r. (Dz.U. z 1985 r. Nr 60, poz. 311).
5. Hymer C.B.: Residual solvent testing: a review of gas-chromatographic and alternative techniques. Pharm Res 2003; 20: 337-344.
6. Chilmonec Z., Ulman M.: Volatile organic compounds-components, sources, determination. Anal Chem 2007; 52: 173-179.
7. Guidebook (2006). EMEP/CORINAIR Emission Inventory Guidebook, version 4 (2006 edition), European Environmental Agency. Technical report No 11/2006 <http://reports.eea.europa.eu/EMEP/CORINAIR4/en/page002.html>. Generally chapter B216.
8. Ochrona Środowiska 2007, GUS, Warszawa 2007: 215-230.
9. Grodowska K., Parczewski A.: Organic solvents in the pharmaceutical industry. Acta Pol Pharm-Drug Res 2010; 67: 3-12.
10. Environment 2010: Our future, our choice, The Six14 EU Environment Action Programme 2001-10, Commission communication – full text, Office of Official Publications of the European Communities, Luxembourg 2001.
11. Krstulovic A.M., Lee C.R.: Defining drug purity through chromatographic and related methods: current status and perspectives. J Chromatogr B 1997; 689: 137-153.
12. Ahuja S.: Assuring quality of drugs by monitoring impurities. Adv Drug Del Rev 2007; 59: 3-11.
13. Brancaloni E., Ciccio P., Frattoni M., i wsp.: Novel family of multi-layer cartridges filled with a new carbon adsorbent for the quantitative determination of volatile organic compounds in the atmosphere. J Chromatogr A 1999; 845: 317-328.
14. Barbarin N., Crucq A.S., Tilquin B.: Study of volatile compounds from the radiosterilization of solid cephalosporins. Radiat Phys Chem 1996; 48: 787-794.
15. Beart B., Vansteelandt S., Spiegeleer B.D.: Ion mobility spectrometry as a high-throughput technique for in vitro transdermal Franz diffusion cell experiments of ibuprofen. J Pharm Biomed Anal 2011; 55: 472-478.

16. Hofmann T., Schieberle P.: Evaluation of the key odorants in a thermally treated solution of ribose and cysteine by aroma extract dilution techniques. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 2187-2194.
17. Lorenzo N., Wan T., Harper R., i wsp.: Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives and humans. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 1212-1224.
18. Jamrógiewicz M., Wielgomas B.: Detection of some volatile degradation products released during photoexposure of ranitidine in a solid state. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 76: 177-182.
19. Lindinger W., Hansel A., Jordan A.: On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) medical applications, food control and environmental research. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1998; 173: 191-241.
20. Hansel, A., Jordan, A., Holzinger, R. i wsp.: Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1995; 149: 609-619.
21. Boca M.B., Pretorius E., Kgaje C. i wsp.: Assessment of MECK suitability for residual drug monitoring on pharmaceutical manufacturing equipment. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 46: 631-638.
22. Qin C., Granger A., Papov V. i wsp.: Quantitative determination of residual active pharmaceutical ingredients and intermediates on equipment surfaces by ion mobility spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 51: 107-113.
23. Shifflet M.J., Shapiro M.: Development of analytical methods to accurately and precisely determine residual active pharmaceutical ingredients and cleaning agents on pharmaceutical surfaces. *Am Pharm Rev* 2002; 5: 35-40.
24. Westmorland D.G., Rhodes G.R.: Analytical techniques for trace organic compounds II: Detectors for gas chromatography. *Pure Appl Chem* 1989; 61: 1148-1160.
25. Doelker E., Witschi C.: Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. *Eur J Pharm Biopharm* 1997; 43: 215-242.
26. Baert B., Boonen J., Thierens C. i wsp.: Ion mobility spectrometry of talarozole, a new azole drug, in cleaning quality control. *Int J Ion Mobil Spec* 2011; 14:109-116.
27. Zamora D., Alcalá M., Blanco M.: Determination of trace impurities in cosmetics intermediates by ion mobility spectrometry. *Anal Chim Acta* 2011; 70: 69-74.
28. Laphorn C., Pullen F., Chowdhry B.Z.: Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions. *Mass Spectr Rev* 2012; 1-29.

Adres do korespondencji:

*dr inż. Marzena Jamrógiewicz
tel. 058-349-16-56, fax. 058-349-16-52
majam@gumed.edu.pl*