

ZNAČAJ STUDIJA FORSIRANE DEGRADACIJE U RAZVOJU METODA ZA PRAĆENJE STABILNOSTI LIJEKA

Jelena Kajmaković¹, Jasmina Šljivić²

Apstrakt

Savremeni razvoj validiranih metoda za praćenje stabilnosti aktivnih supstanci i gotovih proizvoda ima veliki značaj u farmaceutskoj analizi. U radu su predstavljene obavezne faze ovog razvoja. Najveći broj metoda za praćenje stabilnosti su metode koje su zasnovane na primjeni tačne hromatografije visokih performansi. Studije forsirane degradacije se sprovode na čistim aktivnim supstancama i farmaceutskim oblicima u čvrstom obliku, rastvorima ili suspenzijama. Ove studije se mogu izvoditi u različitim fazama razvoja lijeka. Njihov cilj je ispitivanje osnovne hemijske stabilnosti aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika, kao i određivanje unutrašnje stabilnosti molekula uspostavljanjem jasnih puteva degradacije, kako bi se identifikovali proizvodi razgradnje i potvrdila stabilnost. Ove studije utvrđuju inherentne karakteristike stabilnosti molekula, kao što su putevi i mehanizam degradacije i dovode do identifikacije degradacionih proizvoda. Detaljna priroda studija zavisi od pojedinačne aktivne supstance i vrste lijeka. Važno je sagledati i regulatorne smjernice koje se odnose na studije forsirane degradacij, kao i eksperimentalne uslove za njihovo izvođenje koje treba da obuhvati ispitivanje osjetljivosti na uticaj hidrolize, oksidacije, termalne degradacije, vlage i svjetlosti.

Ključne riječi: Forsirana degradacija, stres studija, stabilnost, metoda za praćenje stabilnosti

Uvod

Metode za praćenje stabilnosti se prema smjernicama Američke agencije za hranu i lijekove (eng. Food and drug administration, FDA) definišu kao validirane kvantitativne analitičke metode kojima se tokom vremena mogu detektovati promjene u hemijskim, fizičkim ili mikrobiološkim osobinama aktivne supstance i gotovog proizvoda, a koje su specifične tako da se sadržaji aktivnih sastojaka, degradacioni proizvodi i druge komponente od interesa mogu tačno izmjeriti bez interferencija. Titrimetrijske, spektrofotometrijske i hromatografske tehnike se najčešće koriste za ispitivanje stabilnosti. Veliki broj formulacija koje su dostupne

¹Jelena Kajmaković, Univerzitet „Bijeljina“ Bijeljina, Farmaceutski fakultet, Pavlovića put 024, 76300 Bijeljina, Bosna i Hercegovina Tel.: 065 907 422, e-mail: jelenakajmakovic96@gmail.com

²Jasmina Šljivić, Ph.D., Docent, Univerzitet „Bijeljina“ Bijeljina, Farmaceutski fakultet, Pavlovića put 024, 76300 Bijeljina, Bosna i Hercegovina, Tel.: 061 641 232, e-mail: jasminasljivic86@gmail.com

na tržištu su kombinovani dozirani oblici koji sadrže dva ili više aktivna principa. Kompleksnost se povećava proporcionalno povećanju broja tih principa u formulaciji. Stoga, razvoj metode za praćenje stabilnosti za formulacije koje sadrže više od jednog lijeka je veliki izazov. Navedeni lijekovi moraju biti međusobno razdvojeni, ali i svi njihovi degradacioni proizvodi moraju biti razdvojeni. Razvoj selektivne metode za praćenje stabilnosti može biti izuzetno težak ukoliko se očekuje da se na svakoj aktivnoj supstanci u formulaciji provede studija forsirane degradacije pri različitim uslovima i da se provede razdvajanje na koloni tačne hromatografije visokih performansi (eng. high performance liquid chromatography, HPLC) (Bakshi and Singh, 2002).

Razvoj metoda za praćenje stabilnosti lijeka

Gotovo 85-90% metoda koje su opisane u literaturi su HPLC metode (Bakshi and Singh, 2002), pa u cilju postavljanja adekvatne metode za praćenje stabilnosti neophodno je da razvoj i validacija obuhvate različite faze. Prva faza se odnosi na analizu hemijske strukture lijeka u cilju predviđanja najvjerojatnijeg put razgradnje. Prvi korak u postavljanju metoda za praćenje stabilnosti je određivanje hemijske strukture. Na osnovu funkcionalnih grupa i fizičko-hemijskih karakteristika lijeka dolazi se do saznanja koja predviđaju stabilnost i put degradacije. Amidna, estarska, laktamska i laktonska funkcionalna grupa podliježu hidrolitičkoj degradaciji, tioli i tioetri oksidaciji, olefini, jedinjenja sa aromatičnom nitro grupom, aril-halogenidi i N-oksidi podliježu fotodegradaciji.

Druga faza se odnosi na sakupljanje informacija o fizičko-hemijskim osobinama supstanci. Izuzetno je važno poznavati fizičko-hemijske osobine ispitivanog lijeka koji se ispituje. Značajno je poznavanje pKa vrijednosti, logP vrijednosti, rastvorljivosti, apsorpcije i talasne dužine maksimuma apsorpcije. Promjene u retencionom ponašanju koje su vezane za pH vrijednost mobilne faze se dešavaju pri pH vrijednostima koje su u okviru $\pm 1,5$ pKa jedinica (Maksić i sar., 2016). Poznavanje rastvorljivosti u vodenim, organskim ili HPLC rastvaračima je od od presudne važnosti za izbor stacionarne i mobilne faze (Šljivić i sar., 2017, Zečević i sar., 2017).

U trećoj fazi se izvodi stres testiranje pri odabranim uslovima. Supstancama koje se nalaze u obliku rastvora ispituje se podložnost procesima hidrolize i oksidacije, dok se kod praškastih supstanci ispituje podložnost fotodegradaciji i termičkoj degradaciji. Rastvor supstance se ispituje tako što se pomiješa rastvor uzorka sa rastvorom stres reagensa, dok se praškasta supstanca u tankom sloju, ostavi tokom predviđenog vremena u sušnicu na povišenu temperaturu ili pod adekvatan izvor zračenja, a nakon toga se priprema rastvor.

Preliminarno ispitivanje razdvajanja stres uzoraka predstavlja četvrtu fazu razvoja metode za praćenje stabilnosti. U ovoj fazi se dobijeni uzorci preliminarno analiziraju kako bi se prikupile informacije o broju i prirodi nastalih proizvoda degradacije. Preporuka je da se počne sa primjenom nepolarnih kolona, dok se za mobilnu fazu preporučuje primjena smješe voda-metanol ili voda-acetonitril. Početni odnos vodenog i organskog dijela može biti 50:50 V/V. Taj

odnos se može mijenjati u cilju postizanja retencionog faktora od 5 do 10. Ukupno vrijeme trajanja analize treba biti 2,5 puta veće od retencionog vremena pika ispitivane supstance, kako bi se otkrili svi eventualni pikovi koji bi mogli koeluirati sa pikom aktivne supstance. Injekciona zapremina i brzina protoka mobilne faze mogu se takođe mijenjati.

Peta faza se odnosi na razvoj i optimizaciju metode. Ne postoji univerzalna strategija za razvoj metode za praćenje stabilnosti. Ona generalno obuhvata odgovarajući uzorak za ispitivanje selektivnosti, koji sadrži sve degradacione proizvode, a koji se dobija izvođenjem studija forsirane degradacije sa stepenom degradacije 10-20%. Cilj je da se svi analiti razdvoje i detektuju, najčešće primjenom HPLC metode u kombinaciji sa različitim tipovima detektora.

Identifikacija i karakterizacija degradacionih proizvoda je šesta faza razvoja metode za praćenje stabilnosti. Prvi korak se odnosi na definisanje svih značajnih degradacionih proizvoda, nečistoća zaostalih iz postupka sinteze, intermedijera i polaznih materijale. Neophodno je primjenom standardnih supstanci izvršiti identifikaciju poznatih proizvoda razgradnje lijeka i poznatih nečistoća iz postupka sinteze. Sljedeći korak je identifikacija pikova nepoznatih degradacionih proizvoda. To se provodi njihovim izolovanjem i identifikacijom primjenom masene spektrometrije, nuklearne magnetne rezonance i infracrvene spektrometrije, kao i primjenom analize elemenata.

Posljednja faza se odnosi na validacija metode za praćenje stabilnosti koja se se sprovodi u dvije faze. Prva faza se sprovodi tokom stres testa, pri čemu se metoda postavlja na osnovu pretpostavljenog ponašanja aktivne supstance pri degradaciji. U drugoj fazi se potvrđuje specifičnost, tačnost i preciznost u prisustvu ekscipijena ili drugih sastojaka formulacije (Zečević i sar., 2017).

Tokom različitih faza razvoja metoda za praćenje stabilnosti primjenjuju se spregnute tehnike, kao što su: gasna hromatografija-masena spektrometrija, tečna hromatografija-masena spektrometrija ili tečna hromatografija-masena spektrometrija-masena spektrometrija, kapilarna elektroforeza-masena spektrometrija, tečna hromatografija-nuklearna magnetna rezonanca i slično.

Njihova primjena je sve veća zbog izuzetno dostupnih instrumenata i brojnih prednosti kao što su svestranost, osjetljivost, mogućnost profiliranja, brzo selektivno kvantitativno određivanje čak i u smjesi. Najveće ograničenje se ogleda u visokoj cijeni instrumenata pa stoga nemaju raširenu upotrebu kao jednostavna gasna hromatografija, HPLC, kapilarna elektroforeza ili nuklearna magnetna rezonanca. Ove sofisticirane tehnike se primjenjuju za praćenje, karakterizaciju i identifikaciju nečistoće, proizvoda razgradnje kao i metabolita. Imaju široku primjenu i u rutinskoj analizi uzoraka stabilnosti. Fourierova transformacija - bliska infracrvena spektroskopija je još jedna tehnika u nastajanju, koja ima veliki potencijal. Instrument radi na principu Kubelka-Munk funkcije pri čemu se određuje fragment svjetlosti reflektiran od uzorka ovisno o raspršenju i apsorpciji svjetlosti. Na ovaj način je moguće izvršiti analizu lijekova direktno u doziranim oblicima, bez potrebe za pripremom uzorka. Ovom nedestruktivnom tehnikom se može analizirati lijek u tabletama, prašcima, čvrstim oblicima, tekućinama ili

pastama. Čak se mogu pouzdano analizirati i nehomogeni uzorci kao što su višeslojne, obložene tablete ili tablete s jezgrom. Samo mala količina uzoraka je potrebna za dobivanje korisnih rezultata ispitivanja. Tehnika je vrlo brza sa velikom reproducibilnošću.

Najbolja strategija za razvoj metoda za praćenje stabilnosti zahtijeva provođenje velikog broja eksperimenata koji su neophodni za postizanje željenih rezultata. Pristup koji obuhvata manipulaciju eksperimentalnim varijablama dok se ne postigne željeno razdvajanje obezbjeđuje dobro razumijevanje interakcija između varijabli. Nažalost, ovaj postupak je spor, dugotrajan i skup. Ova ograničenja su inicirala povećanu upotrebu kompjuterskih ekspertskih sistema koji se mogu primijeniti u cilju automatizacije različitih faza HPLC procesa ili uklapanja retencionih podataka u različite modele s ciljem određivanja najboljih uslova za određeno razdvajanje. Kompjuterskom simulacijom hromatografskog razdvajanja se izbjegava većina eksperimentalnog rada koji se izvodi tokom razvoja i optimizacije, pa se stoga značajno smanjuju troškovi i vrijeme koje je potrebno za proces optimizacije. Kada se započne proces simulacije, on se može završiti bez nadzora. Tokom procesa optimizacije samo je zauzet računar, ali ne i hromatograf koji se može iskoristiti i u druge svrhe (Bakshi and Singh, 2002).

Značaj i cilj studija forsirane degradacije

Studije forsirane degradacije poznate su i kao testiranje na stres ili stres studije. Forsirana degradacija predstavlja proces u kom se dešava degradacija aktivne farmaceutske supstance ili gotovog proizvoda, u uslovima koji su teži od uslova korištenih tokom ubrzanih studija pri čemu se generiše degradacija proizvoda. Internacionalno harmonizirane smjernice, ICH (eng. International conference on Harmonization) navode da stres studije imaju za cilj da identifikuju vjerovatne proizvode razgradnje, što dalje pomaže u određivanju stabilnosti molekula i uspostavljanju puteva degradacije (Scypinski and Johnson, 2001, Zečević i sar., 2017). Ove smjernice za sprovođenje forsirane degradacije su veoma uopštene i ne daju detalje o praktičnom pristupu prema testiranju na stres. FDA i ICH smjernice u uputstvima navode zahtjeve i podatke za ispitivanje stabilnosti, da bi se razumjelo kako se kvalitet ljekovite supstance i lijeka mijenjaju tokom vremena, pod uticajem raznih faktora životne sredine (Solomon i sar., 2011, Zečević i sar., 2017). Znanje o stabilnosti molekula pomaže u odabiru odgovarajuće formulacije i pakovanja, kao i obezbjeđivanju odgovarajućih uslova skladištenja i roka trajanja, što je neophodno za regulatornu dokumentaciju.

Stres studije se mogu izvoditi u različitim fazama razvoja lijeka, a i razlozi za njihovo izvođenje mogu biti različiti. Ove studije se primjenjuju u cilju jasnog preciziranja degradacionih puteva farmaceutske supstance, kao i gotovog proizvoda, identifikacije i potvrde strukture degradacionih proizvoda koji se formiraju tokom proizvodnje, rukovanja i čuvanja farmaceutske supstance, kao i gotovog proizvoda pod normalnim uslovima. Ove studije imaju poseban značaj pri razvoju i validaciji analitičkih metoda za praćenje stabilnosti, kao i potvrdu stabilnosti same farmaceutske supstance, u rastvoru i u čvrstom stanju. Za definisanje termolitičkih, hidrolitičkih, oksidativnih i fotolitičkih degradacionih

mehanizama farmaceutske supstance i gotovog proizvoda i za razlikovanje degradacionih proizvoda u formulaciji koji su potiču od ljekovite supstance u odnosu na degradacione proizvode pomoćnih supstanci takođe se primjenjuju ove studije (Zečević i sar., 2017).

Cilj sprovođenja stres studija je ispitivanje osnovne hemijske stabilnosti aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika. Na osnovu informacija dobijenih tokom stres studija može se formirati degradacioni put, degradacioni profil, mehanizam degradacije aktivne supstance u kratkom vremenskom intervalu, identifikacija i degradacija proizvoda koji se mogu javiti tokom sinteze, proizvodnje, upotrebe ili čuvanja lijeka, kao i potvrditi specifičnosti metode tokom razvoja, optimizacije i validacije analitičkih metoda za praćenje stabilnosti (Klick et al., 2005).

Regulatorne smjernice koje se odnose na studije forsirane degradacije

Neke organizacije, poput FDA, ICH, Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), Evropske agencije za lijekove (EMA), Japanske farmakopeje (JP) i Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) dale su smjernice za testiranje stabilnosti za novu komponentu lijeka i ispitivanje stabilnosti lijeka (Somase and Rishipathak, 2022). ICH smjernice koje se odnose na studije forsirane degradacije su navedene u tabeli 1.

Tabela 1. ICH smjernice koje se odnose na studije forsirane degradacije

Standard	Naziv
ICH Q1A (R2)	<i>Stability Testing of New Drug Substances and Products</i>
ICH Q1B	<i>Photostability Testing of New Drug Substances and Products</i>
ICH Q2B	<i>Validation of Analytical Procedures: Methodology</i>
ICH Q3A (R)	<i>Impurities in New Drug Substances</i>
ICH Q3B	<i>Impurities in New Drug Products</i>
FDA vodič	<i>Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics</i>
FDA vodič	<i>Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation</i>
FDA upute recenzenta	<i>Validation of Chromatographic Methods</i>
FDA vodič	<i>Stability testing of Drug Substances and Drug Products</i>
FDA vodič	<i>Analytical Procedures and Methods Validation</i>
FDA vodič	<i>Investigational new drug applications for Phase 2 and Phase 3 Studies, Chemistry, Manufacturing and Controls Information</i>

Izvor: Klick et al., 2005

ICH Q1A (R2): Testiranje stabilnosti novih farmaceutskih supstanci

Poglavlje ICH Q1A smjernica bavi se ispitivanjima forsirane degradacije ljekovite supstance s ciljem identifikacije proizvoda razgradnje i razgradnih puteva, kao i unutrašnje stabilnosti ljekovitih supstanci, ali i razvoja i validacije odgovarajuće analitičke procedure. Priroda stres testiranja ovisi o pojedinačnoj ljekovitoj supstanci i tipu proizvoda.

Stres studije treba da budu sprovedene na jednoj seriji ljekovite supstance, pri čemu ovo ispitivanje treba da uključi ispitivanje efekta temperature povećavajući je za po 10°C iznad temperature koja se koristi za ubrzane studije stabilnosti, tj. 50°C, 60°C, ispitivanje uticaja relativne vlage kada se primjenjuje 75% i više, kao i procjenu osjetljivosti farmaceutske supstance na oksidaciju i na hidrolizu preko širokog opsega pH vrijednosti u rastvoru ili suspenziji. Studije fotostabilnosti treba da budu sastavni dio stres testova.

Dizajn formalnih studija stabilnosti za lijek treba da se zasniva na ponašanju i svojstvu ljekovite supstance, rezultatima studija stabilnosti ljekovite supstance i podacima dobijenim iz kliničkih studija formulacije. Neophodno je navesti vjerovatne promjene uslova skladištenja, kao i obrazloženje za odabir atributa koji će se ispitivati u formalnim studijama stabilnosti. Ispitivanje fotostabilnosti se provodi na najmanje jednoj primarnoj seriji lijeka.

Tokom ovih ispitivanja koriste se znatno rigorozniji eksperimentalni uslovi u poređenju s onima primijenjenima kod ubrzanih ispitivanja. Ovakva ispitivanja igraju ključnu ulogu u procesu validacije analitičkih procedura koje su razvijene za farmaceutski proizvod. Rezultati ovih studija će biti sastavni dio informacija koje se dostavljaju regulatornim tijelima.

ICH Q1B: Ispitivanje stabilnosti: Testiranje fotostabilnosti novih supstanci i proizvoda

Testiranje fotostabilnosti treba da se sastoji od dva dijela i to forsirane degradacije i potvrdnog testiranje. Svrha provođenja forsirane degradacije je da se procijeni fotoosjetljivost supstance u svrhu razvoja metoda i/ili puta razgradnje. Ovo ispitivanje može uključivati ljekovitu supstancu i/ili supstancu u jednostavnom obliku rastvora i suspenzije za validaciju analitičkih procedura. Uzorci bi trebalo da budu u hemijski inertnim i prozirnim kontejnerima. Tokom izvođenja forsirane degradacije primjenjuju se različiti uslovi ovisno o fotosenzitivnosti aktivne supstance i intenzitetu izvora svjetlosti. Za potrebe razvoja i validacije, potrebno je ograničiti ekspoziciju i okončati ispitivanje ako dođe do ekstenzivne razgradnje. Za fotostabilne materijale, studije se mogu prekinuti nakon što je korišten odgovarajući nivo ekspozicije. Pri forsiranim uslovima mogu se uočiti produkti razgradnje za koje je malo vjerovatno da će se formirati pod uslovima koji se koriste za potvrdne studije. Ove informacije mogu biti korisne u razvoju i validacija odgovarajućih analitičkih metoda. Ako se u praksi pokazalo da nisu formirani u potvrdnim studijama, ovi proizvodi razgradnje ne moraju se dalje ispitivati.

ICH Q2B: Validacija analitičkih procedura: metodologija

Ako standardi nečistoća ili degradacionih proizvoda nisu dostupni, specifičnost se može pokazati poređenjem rezultata ispitivanja uzoraka koji sadrže nečistoće ili degradacione proizvode sa drugim dobro karakterizovanim postupkom (farmakopejskom metodom ili drugim validiranim analitičkim postupkom).

ICH Q3A(R): Nečistoće u novim ljekovitim supstancama

Podnosilac zahtjeva za registraciju lijeka treba da sumira stvarne i potencijalne nečistoće koje mogu nastati tokom sinteze, prečišćavanja i skladištenja nove ljekovite supstance. Ovaj sažetak bi trebalo da bude zasnovan na dobroj naučnoj procjeni hemijskih reakcija uključenih u sintezu, nečistoćama povezanim sa sirovinama koje bi mogle doprinijeti profilu nečistoća nove ljekovite supstance i mogućeg proizvoda razgradnje. Osim toga, podnosilac zahtjeva treba da sumira laboratorijske studije koje su sprovedene radi otkrivanja nečistoće u novoj ljekovitoj supstanci. Profil nečistoće serije ljekovite supstance namijenjene za tržište treba da se uporedi sa onim koji se koriste u razvoju i da se razmotre sve razlike.

ICH Q3B(R): Nečistoće u novim farmaceutskim proizvodima

Analitičke procedure treba da budu validirane kako bi se pokazala specifičnost za specificirane i nespecificirane degradacione proizvode. Validacija treba da obuhvati uzorke koji se čuvaju pri relevantnim stres uslovima: svjetlost, toplota, vlažnost, kiselo/bazna hidroliza i oksidacija (Klick et al., 2005).

Izvođenje studija forsirane degradacije

Studije forsirane degradacije mogu da se sprovode na čistim farmaceutski aktivnim supstancama i farmaceutskim oblicima u čvrstom obliku, rastvorima ili suspenzijama (jer postoji mogućnost stupanja u interakciju sa nekim od ekscipijenasa) (Scypinski and Johnson, 2001). Tako se može utvrditi porijeklo eventualnog degradacionog proizvoda. Takođe se može utvrditi da li je nastala nečistoća posljedica nestabilnosti farmaceutski aktivne supstance ili interakcije sa ekscipijensima.

Izvođe se na jednoj seriji proizvoda, a eksperimentalni uslovi treba da budu ekstremniji nego u ubrzanim studijama stabilnosti. Uslovi izvođenja studija forsirane degradacije se postavljaju na osnovu fizičkih i hemijskih karakteristika lijeka (Somase and Rishipathak, 2022). Na početku se analizira hemijska struktura ispitivane supstance, tačnije funkcionalne grupe unutar nje. Estri, amidi ili laktoni podliježu hidrolizi. Funkcionalne grupe koje sadrže heteroatom (azot, sumpor), aldehidi i ketoni osjetljivi su na oksidaciju. Alkeni, aromatični i heterociklični derivati su fotosenzitivni (Klick et al., 2005).

Sa aspekta stabilnosti, vlaga je faktor koji se takođe smatra kritičnim. Može učestvovati direktno u reakciji, a može izgraditi sloj čestica u kom je moguća reakcija rastvorenih komponenata. Najviše je ispitivan uticaj vlage na stabilnost čvrstih farmaceutskih oblika (Zečević i sar., 2017).

Postavljeni eksperimentalni uslovi moraju biti takvi da se ostvari degradacija farmaceutski aktivne supstance od 5 % do 20 %, što se smatra značajnom i

reperzentativnom degradacijom (Maksić i sar., 2016). Degradacija preko 20% ne dovodi do pouzdanog definisanja degradacionog profila, a ukoliko je nastala degradacija u koncentraciji ispod 5%, onda se ona ne uzima u razmatranje. Razlog je taj što se smatra da te količine degradacionih proizvoda ne bi nastale pod uslovima koji su preporučeni za čuvanja aktivne supstance ili gotovog proizvoda (Bakshi and Singh, 2002). Smatra se da je ispitivana supstanca stabilna prema određenom agensu ukoliko ne dođe do razgradnje supstance nakon perioda predviđenog za stres studije.

Eksperimentalni uslovi za izvođenje studije forsirane degradacije treba da obuhvate ispitivanje osjetljivosti lijeka na hidrolizu, oksidaciju, termalnu degradaciju, vlagu i svjetlost. Ipak, pomenute smjernice ne obezbjeđuju dovoljnu količinu informacija o opsegu pH vrijednosti, temperaturni opseg, niti oksidaciona sredstva (Somase and Rishipathak, 2022).

Razgradnja hemijskog jedinjenja reakcijom sa vodom naziva se hidroliza. U širokom rasponu pH degradacija se najčešće dešava hidrolizom. U kiseloj i baznoj hidrolizi dolazi do katalize jonizujućih funkcionalnih grupa prisutnih u molekulu. Forsirana degradacija ljekovite supstance nastaje kada lijek stupi u interakciju s kiselinom i bazom i pri tome nastaju primarni proizvode degradacije u željenom opsegu. Zavisno od stabilnosti ljekovite supstance odlučuje se o klasi i koncentraciji kiseline ili baze. Za kiselu hidrolizu primjenjuje se hlorovodonična ili sumporna kiselina (0,1-1 M), dok se za baznu hidrolizu najčešće predlažu natrijum hidroksid ili kalijum hidroksid (0,1-1 M). Korastvarači se mogu koristiti ukoliko su jedinjenja slabo rastvorljiva u vodi. Korastvarač se bira na osnovu strukture ispitivanog jedinjenja. Forsirana degradacija bi trebalo da se počne na sobnoj temperaturi i dalje da se postepeno povećava ako nema degradacije (Asheesh et al., 2018, Somase and Rishipathak, 2022).

Ispitivanja uticaja pH na stabilnost farmaceutskih proizvoda su vršena tako što su korištene hlorovodonična kiselina i natrijum-hidroksid različitih koncentracija, na povišenim temperaturama i u različitim vremenskim intervalima, zavisno od osobina ispitivanih supstanci (Scypinski and Johnson, 2001).

Vodonik peroksid se često koristi za ispitivanje oksidacije aktivnih supstanci u studijama forsirane degradacije, ali se mogu koristiti i drugi oksidacijski agensi kao što su joni metala, kiseonik i radikalni inicijatori. Odabir oksidacijskog sredstva, njegove koncentracije i uslova zavisi od same prirode aktivne supstance. Studija sa vodonik peroksidom se ne bi trebala izvoditi uz kombinovane stres studije, na primjer uz povišenu temperaturu. Veze između kiseonika u molekuli vodonik peroksida nisu stabilne, pa bi ih stoga povišena temperatura još brže narušila ove veze koje prije dovode do hidrolize nego do oksidacije. Predlaže se neutralizacija degradacionih uzoraka nastalih nakon oksidacije i to primjenom metabisulfitnog rastvora iste koncentracije. Izlaganje rastvora supstance uticaju 0,1-3% vodonikovog peroksida na neutralnom pH i sobnoj temperaturi tokom sedam dana ili do maksimalne razgradnje od 20% može potencijalno stvoriti relevantne produkte razgradnje. Oksidativna degradacija aktivne supstance obuhvata mehanizam prenosa elektrona za stvaranje reaktivnih anjona i katjona. Amini, sulfidi i fenoli su osjetljivi na oksidaciju prenosa elektrona dajući N-

okside, hidroksilamin, sulfone i sulfoksid. Funkcionalna grupa sa nestabilnim vodonikom poput benzilnog ugljenika, alilnog ugljenika i tercijalnog ugljenika ili α -položaja u odnosu na hetero atom je podložna oksidaciji i može da formira hidroperokside, hidroksid ili keton (Asheesh et al., 2018, Somase and Rishipathak, 2022).

Integralni dio stres testiranja su studije fotostabilnosti. Rezultati studija fotostabilnosti predstavljaju dio registracione dokumentacije. One su detaljno opisane u ICH Q1B smjernici (Kasagić-Vujanović i sar., 2014). Testiranje fotostabilnosti farmaceutskih supstanci ima za cilj da potvrdi da li izlaganje svjetlu dovodi do promjene koja nije prihvatljiva. Studije fotostabilnosti se izvode u cilju stvaranja primarnih degradacionih proizvoda aktivne supstance izlaganjem ultraljubičastoj svjetlosti ili fluorescentnim uslovima. U okviru ispitivanja uticaja svjetla na stabilnost proizvoda danas se koriste različiti izvori svjetla, od živinih lampi koje emituju svjetlost kratkih talasa (UV oblast) do fluorescentnih, halogenih i ksenonskih lampi koje proizvode „vještačku dnevnu svjetlost” (Asheesh et al., 2018, Scypinski and Johnson, 2001).

Neki preporučeni uslovi za testiranje fotostabilnosti opisani su u ICH smjernicama. Uzorci aktivne supstance i čvrstog/tečnog lijeka treba da budu izloženi minimalno 1,2 miliona lx/h i 200 Wh/m² svjetlosti. Najčešće prihvaćena talasna dužina svetlosti koja može da izazove fotolitičku degradaciju je u opsegu od 300-800 nm. Maksimalno preporučeno osvjetljenje je 6 miliona lx/h. Uslovi slabog stresa mogu izazvati fotooksidaciju mehanizmom slobodnih radikala. Funkcionalne grupe kao što su karbonili, nitroaromatični, N-oksidi, alkeni, aril hlorigi, slabe C-H i O-H veze, sulfidi i polieni mogu dovesti do fotosenzitivnosti. Moguće je iskoristiti i prirodnu svjetlost ukoliko nije dostupan specifični instrument, iako se ne preporučuje (Asheesh et al., 2018, Somase and Rishipathak, 2022).

Termička degradacija treba da se sprovodi u zahtjevnijim uslovima od preporučenih uslova ubrzanog ispitivanja. Uzorci lijekova u čvrstom stanju i farmaceutski proizvodi treba da budu izloženi suvoj i vlažnoj toploti, dok tečni farmaceutski proizvodi treba da budu izloženi suvoj toplini. Studije se mogu sprovoditi na višim temperaturama u kraćem periodu. Uticaj temperature na degradaciju supstance objašnjava se Arrheniusovom jednačinom:

$$K = A e^{-E_a/RT}$$

gdje je k specifična brzina reakcije, A je faktor frekvencije, E_a je energija aktivacije, R je plinska konstanta (1,987 cal/deg mol) i T je apsolutna temperatura. Studija termičke degradacije se sprovodi na 40-80 °C (Asheesh et al., 2018, Somase and Rishipathak, 2022).

Vlažnost je jedan od efikasnih faktora u utvrđivanju potencijalnih degradacionih proizvoda u gotovom proizvodu i aktivnoj farmaceutskoj supstanci. Obično se preporučuje vlažnost od 90% u trajanju od jedne sedmice za utvrđivanje uzoraka forsirane degradacije (Asheesh et al., 2018, Somase and Rishipathak, 2022).

Istraživanja treba izvoditi pri koncentracijama od 1 mg mL^{-1} , iz razloga što je tada moguće dobiti najmanju količinu degradacionih proizvoda koja se može detektovati. Ukoliko je rastvorljivost limitirajući faktor, određena količina metanola se može koristiti kako bi se dobio bistar rastvor. Ipak, testiranje može biti izvedeno i na suspenziji. Za detaljno ispitivanje svakog pojedinačnog stres uslova neophodno je izvršiti kontrolu najmanje četiri uzorka. Izvještaj se pravi na osnovu rezultata svakog od njih. Dobijeni rezultati se porede i na takav način se osigurava ispravna procjena nastalih promjena. Prvi rastvor se odnosi na rastvor supstance u koji nije dodat stres agens. Drugi je *zero time* uzorak koji se odnosi na uzorak koji sadrži rastvor supstance u koji je dodat stres agens i koji se analizira odmah nakon pripreme. Treći uzorak je slijepa proba. Ona sadrži samo stres agens koji je bio izložen na isti način kao i odgovarajući ispitivani uzorak koji sadrži supstancu. Četvrti uzorak je rastvor supstance koji je izložen uslovima forsirane degradacije. Preporuka je da se analiziranje uzoraka vrši u različitim vremenskim intervalima za svaki pojedinačni uslov reakcije. Ovakav pristup osigurava jasan uvid u stabilnost, kao i u broj nastalih degradacionih proizvoda (Zечевић i sar., 2017).

Faktori koji utiču na degradaciju aktivne supstance ili gotovog proizvoda

Neophodno je sagledati uticaj spoljašnjih faktora na degradaciju, od koji najveći značaj imaju vlaga, ekscipijensi, temperatura, pH vrijednost, kiseonik i svjetlost. Supstance koje su rastvorljive u vodi se mogu rastvoriti kada je prisutna vlaga, koja će dovesti do fizičko-hemijskih promjena unutar molekula.

Nekoliko ekscipijenasa može sadržavati visok sadržaj vode ili vlage, što može povećati nivo vode u formulaciji koja u kasnijoj fazi može da ometa stabilnost komponenti lijeka. Ponekad se uočava smanjena stabilnost zbog hemijske interakcije između ekscipijensa i komponente lijeka ili farmaceutskih proizvoda. Temperatura ima važnu ulogu u stabilnosti komponenti lijeka. Brzina hidrolize lijeka se najčešće povećava sa porastom temperature. pH vrijednost takođe ima važnu ulogu u stabilnosti komponenti lijeka. Da bi se smanjio hidrolitički stepen razgradnje lijekova koji je izazvan pod uticajme pH, koriste se puferski rastvori sa maksimalnom stabilnošću. Kiseonik dovodi do oksidacije određenih ljekovitih supstanci što povećava stepen razgradnje komponente lijeka. Kontrolise se pročišćavanjem azota ili ugljen-dioksida u posudi u kojoj se lijek skladišti. Neke ljekovite supstance su po prirodi osjetljive na svjetlost i razlažu se prilikom izlaganja svjetlosti. Osetljivost na raspadanje pod uticajem svjetlosti može biti otkriveno poređenjem stabilnosti komponente lijeka ili ljekovite supstance kada su izloženi svjetlu, kao i kada su u mraku. Preporučuje se da se komponenta lijeka osjetljiva na svjetlost ili proizvod lijeka čuva u posudama boje čilibara, ili na tamnim mjestima (Somase and Rishipathak, 2022).

Zaključak

U cilju adekvatnog praćenja stabilnosti aktivne farmaceutske supstance neophodno je razviti metodu koja će omogućiti pouzdano i selektivno razdvajanje,

nedvosmisleni identifikaciju i kvantifikaciju aktivne supstance i degradacionih proizvoda. Metode za praćenje stabilnosti su uglavnom zasnovane na primjeni HPLC tehnike. Razvoj ovih metoda se najčešće prikazuje kroz faze koje obuhvataju analizu hemijske strukture lijeka, prikupljanje informacija o fizičko-hemijskim osobinama lijeka, provođenje stres studija, skrining degradacionih proizvoda, razvoj i optimizaciju metoda, identifikaciju degradacionih proizvoda i validaciju metode za praćenje stabilnosti.

Veliki značaj ima provođenje studija forsirane degradacije čiji rezultati mogu predvidjeti rok upotrebe lijeka. One omogućavaju ispitivanje unutrašnje stabilnosti molekula aktivne supstance, kao i definisanje profila nečistoća. Studije forsirane degradacije daju informacije o mogućim putevima degradacije i proizvodima degradacije aktivnih sastojaka i pomažu u razjašnjavanju strukture nastalih degradacionih proizvoda. One se sprovode na čistim aktivnim supstancama i farmaceutskim oblicima u čvrstom obliku, rastvorima ili suspenzijama. Izvode se na jednoj seriji proizvoda, pri čemu eksperimentalni uslovi trebaju biti ekstremniji od onih u ubrzanim studijama stabilnosti, a oni se postavljaju na osnovu fizičkih i hemijskih karakteristika analizirane supstance. Postavljenim eksperimentalnim uslovima treba da se ostvari reprezentativna degradacija farmaceutski aktivne supstance od 5 % do 20 %. Eksperimentalni uslovi obuhvataju ispitivanje osjetljivosti lijeka na hidrolizu, oksidaciju, termalnu degradaciju, vlagu i svjetlost.

Literatura

1. Asheesh, S., Parul, S., Dilip, S. (2018). Technical considerations of forced degradation studies of new drug substances and product: regulatory perspectives. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 8(2),163-168.
2. Bakshi, M., Singh, S. (2002). Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 1011–1040.
3. Kasagić-Vujanović, I., Jančić-Stojanović, B., Ivanović, D. (2014). Studije forsirane degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata primjenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija. *Arh.farm.*, 64, 230– 246.
4. Klick, S., Muijselaar, G. P., Waterval, J., Eichinger, T., Korn, C., Gerding, K. T., Debets, J. A., Sängner-van de Griend, C., Van den Beld, C., Somsen, W. G., De JongStress, J. G. (2005). Testing of Drug Substances and Drug Products. *Pharmaceutical Technology*.
5. Maksić, J., Tumpa, A., Popović, I., Jančić-Stojanović, B. (2016). Ispitivanje olopatadin-hidrohlorida pod stres uslovima metodom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija. *Hem. ind.*, 70 (3), 339–346.
6. Scypinski, S., R.W. J. (2001). Handbook of modern pharmaceutical analysis. Edited by Satinder Ahuja, Ahuja Consulting Calabash, North Carolina Pharmaceutical Research Institute Raritan, New Jersey.

7. Solomun, Lj., Ibrić, S., Pejanović, V. (2011). Stabilnost lekova-industrijski aspekt. *Arh.farm*, 61, pp.449 – 463.
8. Somase, K., Rishipathak, D. (2022). A review on forced degradation studies, stability indicating method and stability profile of few antiviral drugs. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 13.
9. Šljivić, J. Protić, A., Otašević, B., Golubović, J., Zečević, M. and Krmar, J. (2017). Multicriteria Optimization Methodology in Stability-Indicating Method Development of Cilazapril and Hydrochlorothiazide. *Journal of Chromatographic Science*, 55(6), pp.625–637.
10. Zečević, M., Malenović, A., Stojanović, B. (2017). Odabrana poglavlja Farmaceutske regulative u kontroli lekova. Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet.

THE IMPORTANCE OF FORCED DEGRADATION STUDIES IN THE DEVELOPMENT OF STABILITY INDICATING METHODS FOR DRUG

Jelena Kajmaković¹, Jasmina Šljivić²

Abstract

The modern development of validated stability indicating methods for active substances and drug products is of great importance in pharmaceutical analysis. The paper presents the mandatory stages of this development. The largest number of stability indicating methods are methods that are based on the application of high-performance liquid chromatography. Forced degradation studies are carried out on pure active substances and pharmaceutical forms in solid form, solutions or suspensions. These studies can be performed at different stages of drug development. Their goal is to examine the basic chemical stability of the active pharmaceutical substance and pharmaceutical dosage form, as well as to determine the internal stability of molecules by establishing clear degradation pathways, in order to identify degradation products and confirm stability. These studies determine the inherent stability characteristics of molecules, such as degradation pathways and mechanisms, and lead to the identification of degradation products. The detailed nature of the study depends on the individual active substance and type of drug. It is important to consider regulatory guidelines related to forced degradation studies, as well as experimental conditions for their performance, which should include testing for sensitivity to the effects of hydrolysis, oxidation, thermal degradation, moisture and light.

Key words: *Forced degradation, stress study, stability, stability indicating method.*

¹Jelena Kajmaković, Bijeljina University, Faculty of Pharmacy, Pavlovića put 024, 76300 Bijeljina, Bosnia and Herzegovina, Phone: 065 907 422, e-mail: jelenakajmakovic96@gmail.com

²Jasmina Šljivić, Ph.D., Assistant professor, Bijeljina University, Faculty of pharmacy, Pavlovića put 024, 76300 Bijeljina, Bosnia and Herzegovina, Phone: 061 641 232, e-mail: jasminasljivic86@gmail.com