Analitički i regulatorni aspekt ispitivanja stabilnosti tableta od razvoja do odobrenja za stavljanje lijeka u promet

Jalžabetić, Maja

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:286991

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO- BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Jalžabetić

ANALITIČKI I REGULATORNI ASPEKT ISPITIVANJA STABILNOSTI TABLETA OD RAZVOJA DO ODOBRENJA ZA STAVLJANJE LIJEKA U PROMET

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: Dr.Sc. Renata Jurišić Grubešić, izv. prof.

Specijalistički rad obranjen je dana 20.07.2016. na Farmaceutsko- biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. **Dr.Sc. Biljana Nigović, red. prof.**
   Sveučilište u Zagrebu

   Farmaceutsko- biokemijski fakultet

2. **Dr.Sc. Renata Jurišić Grubešić, izv. prof.**
   Sveučilište u Zagrebu

   Farmaceutsko- biokemijski fakultet

3. **Dr.Sc. Biserka Cetina- Čižmek, znanstv. savj.**
   PLIVA Hrvatska d.o.o.

Rad ima 79 listova.

PREDGOVOR

Ovo istraživanje je provedeno u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko- biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Na odabir teme je utjecao višegodišnji rad u farmaceutskoj industriji te želja za stjecanjem novih znanja iz područja ispitivanja stabilnosti tableta, potrebnih za stručno obavljanje posla na radnom mjestu u odjelu za registraciju lijekova.

Zahvaljujem mentorici dr.Sc. Renati Jurišić Grubešić, izv. prof. na pomoći u oblikovanju ovog rada, savjetima i pristupačnosti.

Zahvaljujem svojim roditeljima na moralnoj podršci i vremenu koje su uložili kako bi mi omogućili izradu ovog rada.

Zahvaljujem suprugu i djeci na ljubavi i strpljenju.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj ovoga rada jest opisati načela i svrhu provođenja ispitivanja stabilnosti lijeka u obliku tableta, kroz analitički i regulatorni aspekt. Pritom je obuhvaćen gotovo cijeli životni ciklus novog proizvoda, čime je postignut uvid u kompleksnost, važnost i potrebu studija stabilnosti tijekom razvoja lijeka pa sve do dobivanja regulatornog odobrenja za stavljanje gotovog farmaceutskog proizvoda na tržište.

Materijali i metode

Istraživanja u okviru specijalističkog rada teorijskog su karaktera. Pretraživanjem odgovarajuće stručne i znanstvene literature skupljeni su podatci o ispitivanju stabilnosti lijekova u obliku tableta. Bibliografske baze podataka (primjerice, Medline/PubMed, ScienceDirect, Scopus, EBSCO i dr.) pretraživane su s ciljem pronalaženja podataka o analitičkom i regulatornom aspektu ispitivanja stabilnosti lijekova. Za analitički dio rada istražene su informacije o čimbenicima koji utječu na stabilnost gotovog farmaceutskog proizvoda u obliku tableta te o analitičkim parametrima koji se prate tijekom ispitivanja stabilnosti. Za regulatorni aspekt studija stabilnosti lijekova, proučene su relevantne međunarodne i nacionalne smjernice koje se odnose na ispitivanje stabilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda: ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), WHO (World Health Organization), FDA (Food and Drug Administration) i EMA (European Medicines Agency).

Rezultati

Rezultati su prikazani kroz analitički i regulatorni aspekt. Analitički dio opisuje studije ispitivanja stabilnosti koje se provode tijekom razvoja proizvoda radi postizanja optimalne formulacije (neformalne studije), potom studije prisilne degradacije (stres ispitivanja), te formalne studije ispitivanja stabilnosti na konačnoj formulaciji koje su potrebne za registraciju novog lijeka. Također se detaljno obrađuju analitički parametri koji se ispituju na tabletama u formalnim studijama stabilnosti, obrazlažu se i stabilitetno-indikativne analitičke metode (SIM), kao i specijalne studije ispitivanja stabilnosti. Regulatorni dio rada daje prikaz temeljnih ICH smjernica za provođenje ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda, koje se prate u svrhu dobivanja regulatornog odobrenja za stavljanje lijeka u promet na području Europske unije, SAD i Japana. ICH smjernice za provođenje ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda uspoređene su sa zahtjevima drugih nacionalnih, regionalnih i međunarodnih tijela s područja regulative lijekova (FDA, EMA, WHO).

Zaključak

Ispitivanje stabilnosti čini niz kompleksnih postupaka prilikom razvoja gotovog farmaceutskog proizvoda koji značajno troše financijske i vremenske resurse. No, provođenjem studija ispitivanja stabilnosti, kvaliteta, djelotvornost i sigurnost se ugrađuju u sâm proizvod. Radi što jednostavnijeg i bržeg dobivanja regulatornog odobrenja za stavljanje gotovog farmaceutskog proizvoda na tržište, ispitivanja stabilnosti provode se u skladu s ICH smjernicama, na kojima se temelje i zahtjevi većine nacionalnih, regionalnih i međunarodnih regulatornih tijela.

SUMMARY

Objectives

Objective of this research is to describe a purpose and principles that guide pharmaceutical industries while performing stability testing of tablet dosage form. This research covers drug life cycle from development to regulatory apporval, with stress on stability studies which are performed for shelf life and storage conditions determination. Subject is covered throuh analytical and regulatory point of view. Analytical parameters tested on tablets and regulatory guidelines for performing stability studies are described herein.

Materials and methods

For this research recent scientific literature has been searched. Analytical aspect of stability testing is described - factors influencing tablet stability, analytical parameters which are tested on finished pharmaceutical dosage form and regulatory aspect - guidelines for performing stability testing are given.

Results

Stability studies performed during development of finished pharmaceutical dosage form involve stability testing of active pharmaceutical ingredient, testing of interactions between active pharmaceutical ingredient and excipients, influence of production processes and packaging materials on stability of dosage form. After final formulation is reached, stability studies that support shelf life and storage conditions of finished dosage form are

performed. Tablets are tested for appearance, hardness, friability, water content, dissolution, assay and impurities.

Conclusion

Stability testing includes a series of procedures during development of finished pharmaceutical product, which significantly consume financial and time resources. However, stability testing provides that quality, efficacy and safety are integrated into the product. For smoother and faster regulatory approval, pharmaceutical industries perform stability studies according to ICH guidelines, which are the basis for the most national agencies requirements.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA ..... **Error! Bookmark not defined.**

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 3

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI 4

3.1. Ispitivanje stabilnosti u razvoju lijekova 4

3.1.1. Vrste studija ispitivanja stabilnosti 5

3.2. Tablete 7

3.2.1. Nestabilnost tableta 11

3.2.1.1. Fizikalna (ne)stabilnost tableta 12

3.2.1.2. Kemijska (ne)stabilnost tableta 15

3.3. Regulatorne organizacije, nacionalne i međunarodne agencije 17

4. RASPRAVA 19

4.1. Analitički dio 19

4.1.1. Ispitivanje stabilnosti tableta tijekom razvoja proizvoda - neformalne studije 19

4.1.1.1. Utjecaj karakteristika djelatnih tvari i interakcija djelatnih i pomoćnih tvari na stabilnost tableta 19

4.1.1.2. Utjecaj proizvodnih procesa na stabilnost tableta 23

4.1.1.3. Utjecaj spremnika na stabilnost tableta 23

4.1.2. Studije prisilne razgradnje (stres ispitivanja) 25

4.1.2.1. Ispitivanje fotostabilnosti 30

4.1.3. Ispitivanje stabilnosti na konačnoj formulaciji - formalne studije 31

4.1.3.1. Stabilitetno-indikativne analitičke metode 31

4.1.3.1. Analitički parametri koji se ispituju na tabletama u studijama stabilnosti 33

4.1.4. Specijalne studije ispitivanja stabilnosti 41

4.2. Regulatorni dio 42

4.2.1. Podjela i pregled ICH smjernica za ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda 43

4.2.1.1. Odabir klimatskih uvjeta 48

4.2.1.2. Dizajn formalnih studija 48

4.2.1.3. Obveza provođenja ispitivanja stabilnosti 53

4.2.2. Usporedba ICH smjernica za ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda sa zahtjevima nacionalnih i međunarodnih agencija 54

5. ZAKLJUČAK 60

6. LITERATURA 63

7. POPIS SKRAĆENICA 68

8. ŽIVOTOPIS 70

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Stabilnost gotovog farmaceutskog proizvoda je ključan čimbenik njegove kvalitete, sigurnosti i djelotvornosti [1]. Američka farmakopeja (USP) definira stabilnost kao mjeru do koje proizvod zadržava karakteristike koje je imao u vrijeme proizvodnje unutar specifikacijskih granica, do isteka roka valjanosti. Stabilnost općenito uključuje kemijske, fizikalne, mikrobiološke, terapijske i toksikološke karakteristike proizvoda [2].

Svrha ispitivanja stabilnosti tijekom razvoja proizvoda jest prikupljanje saznanja o tome kako se kvaliteta gotovog proizvoda mijenja pod utjecajem različitih čimbenika iz okoline, poput temperature, vlage, svjetla, što utječe na proces proizvodnje, skladištenje i odabir spremnika za gotov proizvod [3]. Svrha takve studije jest i određivanje roka valjanosti, vremenskog razdoblja skladištenja u određenim uvjetima u kojima ljekoviti proizvod ostaje u određenim granicama specifikacije [1].

Uspješno provedene studije ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda dovode do određivanja roka valjanosti i prikladnih uvjeta čuvanja, ali također osiguravaju da pacijent dobije kvalitetan, siguran i djelotvoran lijek [3].

Jedan od najčešće primjenjivanih ljekovitih oblika su tablete, kruti oblici koji čine više od 50% svih ljekovitih pripravaka [4]. Nekoliko je razloga neprekidne popularnosti čvrstih oralnih oblika. Naime, oralni način primjene lijeka je najmanje invazivan postupak primjene, pacijent ga razumije i prihvaća te ga može sam provesti. Čvrsti oralni oblici imaju mnoge prednosti i za proizvođača; koriste jeftiniju tehnologiju, općenito su najstabilniji oblici lijekova, kompaktni su i izgled im se može mijenjati u svrhu stvaranja prepoznatljivosti brenda [5]. Prednost tableta u odnosu na ostale oralne pripravke jest u točnosti doziranja, fizičkoj i

mikrobiološkoj stabilnosti čak i nakon duljeg skladištenja, kemijskoj stabilnosti djelatne tvari i prikladnosti aplikacije [4].

Analitički aspekt ispitivanja stabilnosti tableta te regulatorne smjernice za provođenje studija ispitivanja stabilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda predmet su izučavanja ovoga specijalističkog rada.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovoga rada opisati načela i svrhu provođenja ispitivanja stabilnosti lijeka u obliku tableta, kroz analitički i regulatorni aspekt. Pri tome je obuhvaćen gotovo cijeli životni ciklus novog proizvoda, od razvoja do dobivanja regulatornog odobrenja za stavljanje lijeka u promet.

Analitički dio uključuje prikaz fizikalnih i kemijskih razgradnji u tabletama, čimbenika koji ih uzrokuju te opis analitičkih parametara kojima se prati stabilnost tableta tijekom ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda. Radom je obuhvaćen opis studija koje se provode tijekom razvoja proizvoda radi postizanja optimalne formulacije, kao i studija ispitivanja stabilnosti, potrebnih za registraciju novog lijeka.

Regulatornim dijelom se opisuju temeljne ICH smjernice za provođenje ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda, koje se prate u svrhu dobivanja regulatornog odobrenja za stavljanje lijeka u promet na području Europske unije, SAD i Japana (II klimatska zona) te njihova usporedba sa zahtjevima nacionalnih i međunarodnih agencija (FDA- Food and Drug Administration, EMA-European Medicines Agency, WHO-World Health Organization).

3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Istraživanja u okviru ovoga specijalističkog rada su teorijskog karaktera. Pretraživanjem odgovarajuće recentne stručne literature i relevantnih znanstvenih časopisa (Journal of Pharmaceutical Sciences, International Research Journal of Pharmacy, Journal of Applied Pharmaceutical Science i dr.) skupljeni su podatci o ispitivanju stabilnosti lijekova u obliku tableta. Bibliografske baze podataka (primjerice, Medline/PubMed, ScienceDirect, Scopus, EBSCO i dr.) pretraživane su s ciljem pronalaženja podataka o analitičkom i regulatornom aspektu ispitivanja stabilnosti tijekom razvoja proizvoda, uz primjenu ključnih riječi/sintagmi, kao što su: drug stability, stress test, solid oral dosage form stability, new drug application stability, ICH stability itd. Za analitički dio rada istražene su informacije o čimbenicima koji utječu na stabilnost gotovog farmaceutskog proizvoda u obliku tableta, o analitičkim parametrima koji se prate tijekom ispitivanja stabilnosti. Za dio rada koji pokriva regulatorni aspekt studija stabilnosti lijekova, proučene su i međusobno uspoređene relevantne međunarodne i nacionalne smjernice ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), WHO (World Health Organization), FDA (Food and Drug Administration) i EMA (European Medicines Agency), koje se odnose na ispitivanje stabilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda.

3.1. Ispitivanje stabilnosti u razvoju lijekova

Studije ispitivanja stabilnosti lijekova moraju se fokusirati na praćenje promjena tijekom proizvodnje i čuvanja koje mogu utjecati na kvalitetu, djelotvornost i sigurnost gotovog proizvoda [6].

Na stabilnost gotovog farmaceutskog proizvoda utječu mnogi čimbenici, a oni uključuju stabilnost djelatnih tvari, potencijalne interakcije između djelatnih i pomoćnih tvari, proizvodni postupak, dozirni oblik, sustav spremnik/zatvarač, uvjete u okolini tijekom distribucije, skladištenja i rukovanja, te vremenski period od proizvodnje do upotrebe [7].

Nestabilnost gotovog proizvoda može dovesti do razgradnje ili gubitka djelotvornosti lijeka te stvaranja novih spojeva s potencijalnim toksičnim djelovanjem. Zbog toga se prije razvoja formulacije gotovog proizvoda kreće s ispitivanjima stabilnosti djelatne tvari kako bi se odredile njezine karakteristike, što uključuje i određivanje profila čistoće, tj. određivanja onečišćenja. Kao pomoć u određivanju stabilnosti, provode se studije prisilne razgradnje , kako bi se razjasnili potencijalni razgradni produkti, odredila njihova sigurnost i razvili analitički postupci za kvantitativno određivanje takvih kemijskih spojeva. Fizikalni testovi koji bi trebali biti uključeni u program ispitivanja stabilnosti ovise o karakteristikama gotovog proizvoda.

Općenito, nestabilnost može utjecati na primjenu lijeka, njegovu kakvoću, sigurnost i djelotvornost ili pak uzrokovati samo promjene estetske prirode, ali koje mogu u konačnici dovesti do loše prihvatljivosti lijeka kod pacijenata.

3.1.1. Vrste studija ispitivanja stabilnosti

Studije ispitivanja stabilnosti se provode u svim fazama životnog ciklusa gotovog farmaceutskog proizvoda, a prema Markensu (2009) [3] dijele se u 6 kategorija:

(1) stres ispitivanja i ubrzane studije na djelatnim tvarima;

(2) ispitivanje stabilnosti na predformulacijskim serijama;

(3) stres ispitivanja na *scale-up* serijama;

(4) ubrzane i dugoročne studije ispitivanja stabilnosti za registracijske svrhe;

(5) *on-going* ispitivanje stabilnosti i potvrđivanje da će proizvod ostati unutar specifikacija kada se čuva pri deklariranim uvjetima čuvanja [8].

(6) *follow-up* ispitivanje stabilnosti (praćenje stabilnosti tijekom kontinuirane proizvodnje, potvrda već dobivenih podataka o stabilnosti, ispitivanje stabilnosti zbog varijacija i promjena u marketinškom odobrenju, promjene nakon dobivenog odobrenja za stavljanje lijeka u promet [9].

Studije ispitivanja stabilnosti u ranoj fazi razvoja proizvoda određuju uvjete čuvanja djelatnih tvari prije procesiranja s pomoćnim tvarima i retest period za djelatne tvari. Tijekom razvijanja formulacije, djelatnoj tvari se dodaju pomoćne tvari. Pri tome je potrebno odrediti njihovu međusobnu interakciju. Dobiveni podatci se koriste za određivanje formulacije gotovog proizvoda. Formulacija gotovog proizvoda u razvoju se također podvrgava studijama prisilne razgradnje koji ukazuju na puteve razgradnje gotovog proizvoda pri normalnim uvjetima čuvanja. Podatci dobiveni tijekom proučavanja kinetike razgradnje mogu se koristiti za ekstrapolaciju brzine razgradnje, koja se može primijetiti tijekom preporučenih uvjeta čuvanja i može se koristiti za predviđanje dugoročne stabilnosti pri takvim uvjetima čuvanja.

Postupci ispitivanja stabilnosti uključuju i specifična ispitivanja, čiji podatci su podrška skladištenju nepakiranih gotovih proizvoda (*bulk*), skladištenju procesnih *(in process*) materijala, postupanju pri temperaturnim odskakanjima izvan određenih uvjeta čuvanja. Nadalje, podatci ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda su potrebni za određivanje uvjeta čuvanja, roka valjanosti gotovog proizvoda te registraciju novog lijeka. Ispitivanja stabilnosti se provode i nakon dobivanja odobrenja za puštanje novog lijeka u promet, kao podrška proizvodima koji se nalaze na tržištu. Nakon što novi lijek dobije odobrenje za puštanje u

promet, za svaku veću promjenu na formulaciji, proizvodnom postupku, pakiranju ili metodi pripreme, potrebno je provesti dodatna ispitivanja stabilnosti [8a] . Ovisno o fazi ispitivanja stabilnosti, vrsti proizvoda i dozirnom obliku, ispitivani uzorci se testiraju u unaprijed određenim intervalima na različite analitičke parametre. Prilikom dizajna studije za ispitivanje stabilnosti, u obzir se mora uzeti ciljano tržište, tj. klimatski uvjeti u kojima će lijek biti stavljen u promet.

3.2. Tablete

Prema Hrvatskoj farmakopeji, tablete su kruti pripravci od kojih svaki sadrži dozu jedne ili više djelatnih tvari sa ili bez dodatka pomoćnih tvari, kao što su sredstva za dopunjavanje, vezivne tvari, sredstva za raspadanje, glidanti, lubrikanti, tvari koje mogu promijeniti ponašanje pripravka u probavnom traktu, boje koje je odobrilo nadležno tijelo i tvari za poboljšanje okusa [10]. Mogu biti proizvedene u velikom broju različitih veličina, oblika i oznaka na površini. Tablete se proizvode iz formulacija koje su procesirane mokrom granulacijom, suhom granulacijom ili direktnim kompaktiranjem. Tablete mogu biti obložene radi zaštite sastojaka od zraka, vlage ili svjetla, radi maskiranja neugodnih okusa ili mirisa, potom za poboljšanje izgleda tablete i smanjivanja rastrošljivosti. Dodatno, oblaganje se može provesti radi zaštite djelatne tvari od kiselih pH vrijednosti želučanih tekućina ili radi kontrole oslobađanja djelatne tvari u gastrointestinalnom traktu [11].

Postoji velik broj različitih vrsta tableta, dizajniranih kako bi ispunile specifičnu terapijsku ulogu.

Podjela tableta prema primjeni [4]:

1) **Peroralne tablete**: apsorpcija djelatne tvari se događa u gastrointestinalnom traktu. Toj skupini pripadaju i efervescentne, višeslojne te prevučene tablete kao izdvojeni pripravci.

2) **Lingvalete** se apsorbiraju u usnoj šupljini putem mukozne sluznice. Primjenjuju se stavljanjem pod jezik (sublingvalno) ili prema obrazu (bukalno).

3) **Oriblete** su namijenjene za lokalno djelovanje na sluznicu usta i grla; najčešće kao aktivnu komponentu sadrže dezinficijense, a primjenjuju se sisanjem.

4) **Solublete** su namijenjene izradi otopina za vanjsku upotrebu.

5) **Implantati** su kruti parenteralni pripravci za subkutanu primjenu.

6) **Hipodermičke tablete** se rabe za pripremu parenteralnih otopina.

7) **Vaginalne tablete** imaju istu namjenu kao i vagitoriji; uglavnom se primjenjuju s ciljem lokalnih učinaka, ali je moguće i sistemsko djelovanje.

8) **Tablete za njegu zuba**, čijom primjenom se odstranjuju ostatci hrane, sprječava stvaranje naslaga na zubima i zaštićuje od karijesa.

Podjela tableta za uporabu kroz usta [10] :

(1) *Neobložene tablete* koje uključuju jednoslojne tablete proizvedene jednostrukom kompresijom granulata i višeslojne tablete sastavljene od koncentričnih ili paralelnih slojeva načinjenih uzastopnom kompresijom granulata različitih sastava.

(2) *Obložene tablete* su obložene s jednim ili više slojeva smjesa različitih tvari, kao što su prirodne ili sintetske smole, gume, želatina, neaktivna i netopljiva punila, šećeri, plastifikatori, polioli, voskovi, boje odobrene od nadležnog tijela, ponekad tvari za

poboljšanje okusa te djelatne tvari. Kada je sredstvo za oblaganje vrlo tanki polimerni sloj, tablete se nazivaju filmom obložene tablete.

(3) *Šumeće tablete* su neobložene tablete, koje općenito sadrže kisele tvari i karbonate ili hidrogenkarbonate koji brzo reagiraju u prisutnosti vode uz oslobađanje ugljičnog dioksida. Namijenjene su za otapanje ili raspršivanje u vodi prije primjene.

(4) *Tablete za oralnu otopinu* su neobložene ili filmom obložene tablete. Prije primjene predviđeno je da se otope u vodi.

(5) *Tablete za oralnu suspenziju* su neobložene ili filmom obložene tablete predviđene da se raspršе u vodi prije primjene uz pripravu homogene disperzije.

(6) *Raspadljive tablete za usta* su neobložene tablete namijenjene da se brzo raspršе u ustima prije nego se progutaju.

(7) *Želučanootporne tablete* su tablete s naknadnim oslobađanjem, otporne na želučani sok, tako da se djelatna tvar oslobađa tek u crijevnom soku.

(8) *Tablete s prilagođenim oslobađanjem* su ili neobložene tablete koje sadrže posebne pomoćne tvari, i/ili su pripravljene posebnim postupcima koji omogućuju prilagodbu brzine, mjesta ili vremena oslobađanja djelatne tvari. Tablete s prilagođenim oslobađanjem uključuju tablete s produljenim oslobađanjem, tablete s naknadnim oslobađanjem i tablete s pulsirajućim oslobađanjem.

(9) *Tablete za uporabu u ustima* su obično neobložene tablete. Oblikovane su tako da se ostvari polagano oslobađanje i lokalni učinak djelatne tvari ili oslobađanje i apsorpcija djelatne tvari u određenom dijelu usta.

(10) *Oralni liofilizati* su kruti pripravci namijenjeni da se stave u usta ili raspršе (ili otope) u vodi prije primjene.

Podjela tableta na temelju karakteristika oslobađanja djelatne tvari [12]:

i) *Tablete s trenutnim oslobađanjem* u kojima se djelatna tvar oslobađa ubrzo nakon primjene ili se tableta otapa i primjenjuje u obliku otopine. To je najčešći oblik tableta, a uključuje dezintegrirajuće tablete, tablete za žvakanje, šumeće tablete, pastile, te sublingvalne i bukalne tablete.

ii) *Tablete s modificiranim oslobađanjem*, koje, za razliku od konvencionalnih tableta ili tableta s trenutnim oslobađanjem, omogućavaju različito oslobađanje djelatne tvari (produljeno, odgođeno ili ponovljeno oslobađanje), što rezultira depozicijom lijeka u različitim dijelovima gastrointestinalnog trakta. Sustavi s modificiranim oslobađanjem djelatne tvari razlikuju se prema brzini ili vremenu oslobađanja djelatne tvari, ali glavni im je cilj kontrola oslobađanja djelatne tvari iz dozirnog oblika.

Stabilnost tableta, tijekom razvoja do stavljanja gotovog proizvoda u promet, prati se provođenjem analiza sadržaja vode, tvrdoće/rastrošljivosti, brzine oslobađanja djelatne tvari (raspadljivosti - ukoliko je opravdano) [2]i [6] te prema WHO (2009) [8b], uz navedeno, i praćenjem izgleda, sadržaja djelatne tvari i onečišćenja.

Nestabilnost kod tableta može uzrokovati smanjenu aktivnost djelatne tvari, povećanje onečišćenja, promjene izgleda, promjene mehaničke snage, promjenu brzine oslobađanja djelatne tvari, te promjene bioraspoloživosti.

Na značajke tableta utječe niz čimbenika koji su uvjetovani osobinama djelatnih i pomoćnih tvari, kao i tehnologijom proizvodnje. Ispitivanje značajki se provodi od početka razvoja oblika do finalnog proizvoda namijenjenog tržištu [4]. Prilikom provođenja studija ispitivanja stabilnosti, proizvođači lijekova moraju u potpunosti pratiti regulativu i smjernice te pratiti dobivene rezultate ispitivanja [3]. Znanstveni podatci dobiveni tijekom tih studija

jamče stabilnost proizvoda u određenom vremenskom periodu, kada se isti skladište pri preporučenim uvjetima, a dio su dosjea za registraciju novog lijeka. Smjernice za provođenje studija ispitivanja stabilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda su usklađene na globalnoj razini. Organizacija ICH (International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) je izdala smjernice za provođenje formalnih studija ispitivanja stabilnosti za dobivanje odobrenja za stavljanje novog lijeka u promet na području EU, SAD i Japana, na kojima se temelje i smjernice većine nacionalnih i međunarodnih regulatornih tijela (primjerice, FDA, EMA, WHO).

3.2.1. Nestabilnost tableta

Nestabilnost tableta se dijeli na fizikalnu i kemijsku [13].

Kada se ispituje fizikalna nestabilnost farmaceutskog sustava, važno je razumjeti njezine uzroke kako bi se mogle poduzeti odgovarajuće mjere. Kemijske razgradnje često u tome imaju važnu ulogu i mogu se dogoditi tijekom različitih faza razvoja proizvoda. Mnoge fizičke promjene, npr. poput organoleptičkih, uzrokovane su kemijskim promjenama djelatne ili pomoćnih tvari u gotovom proizvodu tijekom čuvanja. Primjerice, oksidativna razgradnja – Maillardova reakcija između djelatne tvari i reducirajućih šećera – može dovesti do postupnog obojenja gotovog proizvoda. Tako i kemijske razgradnje mogu biti uzrokovane fizikalnim promjenama, a najčešći primjer je kada kristalna djelatna tvar (neplanirano tijekom proizvodnje) u potpunosti ili djelomično prijeđe u metastabilnu amorfnu formu [14].

3.2.1.1. Fizikalna (ne)stabilnost tableta

Fizikalna nestabilnost se odnosi na promjene karakteristika gotovog proizvoda koje ne uključuju stvaranje ili pucanje kemijskih veza u molekulskoj strukturi, već rezultiraju promjenama u izgledu, oslobađanju djelatne tvari, polimorfnom obliku, okusu, mirisu, čvrstoći ili fenomenima poput kristalizacije u amorfnim sustavima, fizikalnom trošenju (usitnjavanju), segregaciji, adsorpciji. Fizikalna stabilnost može biti pod utjecajem okolišnih čimbenika (npr. vlage, temperature, svjetla i kisika) te pod utjecajem čimbenika vezanih za proizvod (djelatna tvar, sastav formulacije, proces proizvodnje, pakiranje) [6]. Fizikalna stabilnost gotovog proizvoda mora biti postignuta potpunim razumijevanjem fizikalno-kemijskih karakteristika djelatne tvari, pomoćnih tvari, proizvodnog postupka i sustava spremnik/zatvarač te bi kao jedan od atributa kvalitete gotovog farmaceutskog proizvoda trebala biti dizajnirana u formulaciju i proizvodnju putem strategije *kvaliteta kroz dizajn* (*Quality by Design*) kako bi se postigao planirani rok valjanosti i učinkovitost proizvoda [6]. Fizikalna stabilnost često pridonosi i kemijskoj stabilnosti gotovog proizvoda [15].

S obzirom da je fizikalna stabilnost krutih formulacija usko povezana s karakteristikama djelatnih tvari, jedan od glavnih problema tijekom razvoja i proizvodnje krutih oralnih oblika (npr. tableta) je transformacija djelatnih tvari. Promjene faza (transformacije) uključuju polimorfne prijelaze, solvataciju i desolvataciju, amorfizaciju i kristalizaciju, prijelaze soli u izvorni oblik ili prijelaze soli u različite forme [15]. Neplanirana konverzija polimorfa ili prijelaz u amorfan oblik može se dogoditi tijekom različitih procesa proizvodnje (npr. mikronizacije) [6]. Vrlo često fizikalna razgradnja uključuje transformacije polimorfa u kojima nestabilne kristalne strukture ili amorfi prelaze u stabilnije strukture. Stabilnije kristalne strukture (koje imaju višu točku taljenja) u pravilu su slabije topljive u vodi nego odgovarajuće nestabilne strukture (s nižim talištem), što može dovesti do smanjenja

bioraspoloživosti, budući da jedino otopljene komponente mogu proći kroz biološke membrane [13]. Tako zbog fizikalne nestabilnosti u tabletama može doći do promjene topljivosti i brzine oslobađanja djelatne tvari što može biti uzrok promjene bioraspoloživosti lijeka.

Fizikalna razgradnja uključuje reakcije desolvatacije u kojima se kristalna otapala, poput vode, miču iz krutog oblika (npr. pseudopolimorfne transformacije) [13]. Čak i ako je odabrani polimorf termodinamički najstabilniji oblik, solvatacija ili desolvatacija se ipak mogu s vremenom dogoditi. Desolvatacija nastaje kada se iz kristalne strukture izgubi molekula otapala (uključujući vodu iz hidrata), dok solvatacija obično uključuje dodatak vode kristalnoj strukturi. Ekstremni slučaj promjene morfologije nastaje kada takva desolvatacija uzrokuje kompletan gubitak kristalne strukture i nastane amorfna djelatna tvar. Posljedica gubitka kristalnog oblika obično znači povećanje topljivosti (brzine oslobađanja djelatne tvari), ali i smanjenje stabilnosti lijeka. Kod nekih se djelatnih tvari u dozirnom obliku može iskoristiti povećana topljivost amorfne forme (ili drugog oblika više energije) za povećanje bioraspoloživosti. Djelatna tvar u takvim dozirnim oblicima ima potencijal spontane kristalizacije s obzirom na to da je proces egzoterman i često autokatalitičan (primjerice, nakon što nastanu, kristalne jezgre mogu povećati brzinu daljnje kristalizacije). Ipak, sa stabilizatorima, takvi sustavi mogu ograničiti rast kristala kako bi se osigurala pouzdana stabilnost tijekom duljeg vremena. S obzirom da takva promjena s vremenom može uzrokovati smanjenu djelotvornost aktivnih tvari, ovaj čimbenik može ograničiti rok valjanosti gotovog proizvoda [16].

Promjene brzine oslobađanja djelatne tvari i raspadljivosti tableta tijekom proizvodnje i/ili skladištenja mogu nastati zbog niza čimbenika. Kod tableta je većina problema povezana s nakupljanjem vlage iz okoline, što između ostalog može rezultirati promjenom učinkovitosti

sredstava za raspadanje (npr. kukuruzni škrob), koja inače s vodom mogu brzo ekspandirati i razgraditi tabletu u želucu. Kada se tijekom skladištenja vlaga polagano adsorbira na tabletu, dolazi do postupne ekspanzije, što može spriječiti naglu ekspanziju sredstva za raspadanje koja se mora dogoditi u želucu. Kada je tableta u želucu izložena vodi (ili tijekom oslobađanja djelatne tvari u posudi), sredstvo za raspadanje ne apsorbira toliko dodatne vode i zbog toga se ne raspada tako učinkovito kao što bi to bilo da je tableta bila na suhom. Poseban problem za takve sustave je kada je sredstvo za raspadanje izloženo uvjetima u kojima dolazi do kondenzacije vlage. To se događa kada se tableta, izložena visokoj temperaturi i vlazi, ohladi ispod temperature kondenziranja, npr. tijekom distribucije kroz hladnije klimatske zone nego što je zona u kojoj je bila pakirana [16]. U mnogim slučajevima djelatna tvar se u gotovom proizvodu nalazi u termodinamički najstabilnijem obliku te u takvim slučajevima njena fizikalna stabilnost nije upitna, dok u suprotnom vlaga ima ključnu ulogu u brzini konverzije [17].

Vlaga utječe i na mehaničku snagu tableta. Kod tableta pakiranima u *blister*, adsorpcija se povećava s povećanjem vlage i rezultira smanjenom mehaničkom snagom. Promjena mehaničke snage se opisuje kao funkcija osjetljivosti tablete na vlagu, propustljivosti ambalaže za vlagu i uvjeta vlage. Poznavanje ovisnosti navedenih čimbenika omogućava predviđanje promjena karakteristika proizvoda tijekom dugoročnog čuvanja [18]. Prisutnost vode u krutim sustavima ima značajan utjecaj na stabilnost, ne samo jer uzrokuje hidrolizu, već i zbog toga što djeluje kao reakcijski medij te u povećavanju plastičnosti i molekularnog kretanja u sustavu [19].

3.2.1.2. Kemijska (ne)stabilnost tableta

Kemijska nestabilnost se odnosi na promjene u kemijskoj strukturi molekule u dozirnom obliku. Promjene su povezane s razgradnjom lijeka, što rezultira smanjenom djelotvornošću (smanjenje sadržaja djelatne tvari) i nastajanjem drugih molekula (razgradnih produkata) [19]. Kemijska razgradnja uključuje pucanje i/ili formiranje kovalentnih veza (npr. hidroliza, oksidacija, fotokemijska razgradnja).

- HIDROLIZA

Kemijska razgradnja u čvrstim dozirnim oblicima, poput tableta, često se događa u mikroskopskim otopinama djelatnih tvari u dozirnom obliku, a najčešće su te mikroskopske otopine vodene otopine [13). Općenito, kada u mikroskopskim vodenim domenama dolazi do razgradnje unutar krutog materijala, brzina razgradnje ovisi o:

1) sadržaju vlage u krutom materijalu; sadržaj vlage ovisi o prisutnosti higroskopnih pomoćnih tvari i relativne vlage (RV);

2) topljivosti djelatnih tvari u vodenoj domeni; topljivost, posebice ioniziranih djelatnih tvari u vodenim domenama može biti pod utjecajem pomoćnih tvari;

3) temperaturi; temperatura će utjecati i na topljivost i konstantu brzine reakcije, a oboje će se povećavati s povišenjem temperature.

Veličina vodenih domena (područja) i brzina razgradnje u krutom obliku se povećava s povećanjem relativne vlage, a topljivost djelatnih tvari u vodi i konstanta brzine reakcije će se smanjiti sa sniženjem temperature. Primjer ovakve vrste hidrolize u krutom obliku je acetilsalicilna kiselina. Kemijska razgradnja u krutom obliku se također može događati i u nevodenim tekućim domenama kao i u stvarnim krutim stanjima [13].

- OKSIDACIJA

Oksidacija djelatne tvari unutar gotovog proizvoda se najčešće ispituje kroz ispitivanje kompatibilnosti pomoćnih tvari promjenom uvjeta temperature i vlage. U mnogim slučajevima je čista djelatna tvar prilično stabilna, a dozirni oblik pokazuje značajne znakove oksidacije. Razlika u reaktivnosti se općenito pripisuje sljedećem [20]:

1. amorfan lijek - amorfni dijelovi lijeka imaju veću aktivnost i nedostaje im stabilizacijska energija kristalne strukture, a rezultat je povećana permeabilnost kisika i povećana topljivost;

2. kruta otopina - pomoćne tvari mogu potencijalno otopiti dio djelatnih tvari bilo izravno ili povećavajući razinu vlage. U obliku krute otopine, lijek će biti amorfan i imati reaktivnost kao što je već opisano. Dodatno, otapanje pomoćnih tvari može rezultirati deprotonacijom djelatnih tvari, što ih može učiniti reaktivnijima.

3. reaktivnost pomoćnih tvari - pomoćne tvari mogu biti izvor oksidansa i metala.

- FOTOKEMIJSKA RAZGRADNJA

Osjetljivost gotovog proizvoda na svjetlo također može ograničiti rok valjanosti ili odrediti zahtjeve za spremnik proizvoda. U nekim slučajevima, izloženost svjetlu može potaknuti kemijsku razgradnju u djelatnim tvarima kada se svjetlo apsorbira i pokrene kemijsku reakciju. Fotokemijske reakcije najčešće uključuju oksidaciju i razmještaj slobodnih radikala. Mogući su također indirektni fotokemijski procesi, u kojima svjetlo apsorbira pomoćna tvar što dovodi do reakcije s djelatnim tvarima [16].

3.3. Regulatorne organizacije, nacionalne i međunarodne agencije

Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO) je specijalizirana agencija pri Ujedinjenim Narodima sa 194 zemlje članice, koja nema ulogu regulatorne agencije već surađuje s regulatornim vlastima iz zemalja članica u uspostavljanju odgovarajućih pravilnika i izobrazbe kako bi se osiguralo da su lijekovi sigurni, kvalitetni, djelotvorni te da su distribuirani i primijenjeni kao što je predviđeno [21].

WHO je također izdala smjernice za provođenje ispitivanja stabilnosti novog lijeka (klimatske zone III i IV).

FDA (Food and Drug Administration), EMA (European Medicines Agency) i PMDA (The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency) su nacionalne regulatorne agencije koje osiguravaju da se lijekovi razvijaju i proizvode u skladu sa regulatornim zahtjevima te su odgovorne za davanje odobrenja za stavljanje novih lijekova u promet na području SAD, EU i Japana. Svaka od agencija je propisala smjernice i zahtjeve koje je potrebno ispuniti tijekom razvoja novog lijeka, a temelje se na smjernicama ICH organizacije (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). ICH organizacija je projekt koji objedinjuje regulatorne vlasti SAD, EU i Japana te stručnjake iz područja farmaceutske industrije iz tri regije kako bi razmotrili znanstvene i tehničke aspekte registracije farmaceutskih proizvoda [22].

Svrha ICH je smanjiti ili ukloniti potrebu za udvostručavanjem ispitivanja provedenih tijekom istraživanja i razvoja novih lijekova, predlaganjem smjernica kojima bi se postigla bolja usklađenost u interpretaciji i primjeni tehničkih preporuka i zahtjeva za registraciju proizvoda.

Usklađivanje bi dovelo do ekonomičnijeg iskorištenja ljudskih, životinjskih i materijalnih resursa, kao i eliminacije nepotrebnog zadržavanja globalnog razvoja i dostupnosti novih lijekova, uz zadržavanje očuvanja kvalitete, sigurnosti, djelotvornosti i regulatornih obveza za zaštitu javnog zdravlja [22].

4. RASPRAVA

4.1. Analitički dio

4.1.1. Ispitivanja stabilnosti tableta tijekom razvoja proizvoda - neformalne studije

Stabilnost gotovog proizvoda nije povezana samo s unutarnjom kemijskom stabilnošću molekule, već i s fizikalnim oblikom, proizvodnim procesima, interakcijama unutar formulacije, sustavom spremnik/zatvarač i uvjetima čuvanja [6].

4.1.1.1. Utjecaj karakteristika djelatnih tvari i interakcija djelatnih i pomoćnih tvari na stabilnost tableta

Fizikalna i kemijska stabilnost djelatnih tvari procjenjuju se u predformulacijskoj fazi razvoja. Ispitivanje stabilnosti u predformulacijskoj fazi uključuje ispitivanje stabilnosti djelatne tvari u krutom i tekućem obliku, te ispitivanje u prisustvu pomoćnih tvari. ispitivanja započinju utvrđivanjem kemijske strukture djelatne tvari. Utvrđivanje kemijskih karakteristika uključuju ispitivanje strukturu, formu i reaktivnost. Karakteristike koje utječu na oslobađanje djelatne tvari i bioraspoloživost uključuju fizikalne karakteristike poput veličine čestica, kristalne strukture i topljivosti. [23].

Predformulacijski profil djelatnih tvari bi trebao uključivati i profil pH topljivosti i stabilnosti, određivanje pKa i log P, kao i saznanja o onečišćenjima koja nastaju tijekom studija prisilne razgradnje u obliku otopine pri kiselim, baznim i oksidativnim uvjetima [24].

Uobičajene studije prisilne razgradnje djelatnih tvari uključuju ispitivanja pri različitim uvjetima [25]:

1. pH (kiselo/bazno)
2. oksidacija
3. temperatura i/ili vlaga
4. fotodegradacija

Tablica 1. Primjer parametara, uvjeta i trajanja studija prisilne razgradnje djelatnih tvari [25].

STUDIJA	**UVJETI**	**TRAJANJE**
Kiselo/ otopina	HCl (1,0 N, ST, 70°C)	1- 7 dana
Bazno/otopina	NaOH (1,0 N, ST, 70°C)	1- 7 dana
Oksidacija/otopina	H_2O_2	7 dana
Termalno	70°C/30% RV	6 tjedana
Termalno/vlaga	70°C/75% RV	6 tjedana
Foto (UV svjetlo)	1,000 watt h/m2, ST	5 x ICH
Foto (fluorescentno svijetlo)	6x106 lux h, RT	5 x ICH

ST- sobna temperatura, RV - relativna vlaga

Početna ispitivanja započinju poznavanjem kemijske strukture, što omogućava pripremu za moguće razgradne reakcije [23]. Podvrgavanjem djelatnih tvari stresnim uvjetima u krutom i tekućem stanju, generira se uzorak koji sadrži produkte za koje je najizglednije da će nastati i pri realnijim uvjetima čuvanja, što omogućava razvoj stabilitetno-indikativnih analitičkih metoda (SIM) [25].

Minimalni podatci o djelatnim tvarima koje bi trebalo imati prije ispitivanja interakcija s pomoćnim tvarima uključuju poznavanje termalne stabilnosti i stabilnosti krutog oblika pri promjeni temperature i vlage [24].

Iako su pomoćne tvari farmakološki inertne, mogu reagirati s djelatnim tvarima u dozirnom obliku te tako utjecati na stabilnost gotovog proizvoda. Njihove interakcije mogu dovesti do kemijske i fizikalne nestabilnosti u krutim dozirnim oblicima [19]. Kemijske interakcije mogu dovesti do razgradnje razgradnje djelatne tvari i na taj način smanjiti količinu potrebnu za terapeutsko djelovanje, a reakcijski produkti mogu utjecati na sigurnost i dozvoljenu dozu. Fizikalne interakcije mogu utjecati na brzinu oslobađanja djelatne tvari, ujednačenost doze ili jednostavnost primjene [26]. Djelatna tvar u takvim interakcijama može reagirati direktno s pomoćnim tvarima ili s onečišćenjima iz pomoćnih tvari [19]. Kod interakcija djelatne tvari s onečišćenjima, radi se pretežno o reakcijama s peroksidima, aldehidima i kiselinama, te metalima u dozirnom obliku koji su prisutni kao onečišćenja. U ranoj fazi razvoja proizvoda, takve nestabilnosti dozirnog oblika moraju se identificirati i izbjeći putem studija kao što je ispitivanje kompatibilnosti pomoćnih tvari. Neki od mehanizama kojima pomoćne tvari utječu na stabilnost djelatne tvari u dozirnom obliku su promjena sadržaja vlage, promjena pH mikro uvjeta, djelovanje poput katalizatora kiselina/baza, direktno reagiranje s djelatnom tvari, djelovanje kao izvor onečišćenja koja mogu direktno reagirati s djelatnom tvari ili sudjelovati kao katalizator u razgradnji. U fizikalnim interakcijama, pomoćne tvari ne utječu izravno na kemijsku reakciju, nego mijenjaju fizikalni oblik djelatne tvari tako da se brzina kemijske reakcije povećava. Ostale promjene koje pomoćne tvari mogu uzrokovati, narušavajući pritom fizikalnu i kemijsku stabilnost djelatne tvari u dozirnom obliku, posredovane su mehanizmima poput

kompleksacije, izmjene iona, polimorfnim transformacijama kristalnog ili amorfnog oblika, te nastajanjem eutektičkih ili krutih otopina [19].

Budući da je prikupljanje podataka dugoročnih studija ispitivanja stabilnosti i podataka o kompatibilnosti u ranim fazama razvoja nepraktično, za predviđanje interakcija i brzina razgradnje pri ambijentalnim uvjetima mora se osloniti na stres i ubrzana ispitivanja [24]. Interpretaciji podataka treba pristupiti s oprezom, jer ispitivanje kompatibilnosti je kreirano tako da predstavlja najgori mogući slučaj i kao takve ne moraju nužno reflektirati slučaj za gotov proizvod. Dobar primjer je magnezijev stearat, koji često reagira s djelatnim tvarima kada je prisutan u velikom masenom udjelu. No, takvi rezultati ne isključuju njegovu široku upotrebu kao lubrikanta u tabletama u količinama 0,25–0,5% m/m [27].

Dvije uobičajeno korištene tehnike probira (*screening*) za utvrđivanje kompatibilnosti djelatnih i pomoćnih tvari su izotermalno stres ispitivanje dvokomponentnih smjesa i termalna analiza, DSC ili DTA. U svojem najjednostavnijem obliku, izotermalno stres ispitivanje podrazumijeva izlaganje smjesa povišenim temperaturama i vlazi kako bi se ubrzalo starenje i interakcije. Nakon određenog vremena, uzorci se ispituju vizualno i kromatografski. S druge strane, termalne analize imaju znatne prednosti pred izotermalnim stres ispitivanjem. Nije potrebno dugoročno skladištenje ni kromatografske analize te je potrebno tek nekoliko miligrama uzorka. Dakle, termalna analiza može biti dragocjena tijekom ranih faza predformulacija, kada su dostupne tek male količine djelatne tvari i kromatografske metode još nisu razvijene [28].

Analitičke tehnike za ispitivanje kompatibilnosti uobičajeno uključuju primjenu metoda poput DSC, TGA, DTA, izotermalne mikrokalorimetrije, HSM, XRPD, FTIR, SEM i HPLC [29].

4.1.1.2. Utjecaj proizvodnih procesa na stabilnost tableta

Odabir proizvodnog postupka se mora temeljiti na stabilnosti gotovog proizvoda. U obzir se mora uzeti stabilnost djelatne tvari unutar svakog od procesa. Na primjer, mokrom granulacijom se djelatne tvari izlažu otapalima i visokoj temperaturi, što na djelatne tvari koje su osjetljive na povišene temperature može djelovati štetno [30].

4.1.1.3. Utjecaj spremnika na stabilnost tableta

Zaštitnom funkcijom, spremnik može značajno utjecati na stabilnost proizvoda. Odabir pakiranja za kruti dozirni oblik temelji se na zahtjevima za fizikalnu i kemijsku stabilnost proizvoda, uključujući i ekonomski aspekt [31].

Spremnik ima važnu ulogu u održavanju kvalitete gotovog proizvoda, a to je prvenstveno zaštita dozirnog oblika od vlage i kisika iz atmosfere, svjetla i drugih vrsta utjecaja na kvalitetu proizvoda tijekom dugoročnog skladištenja [18]. Kao što je već spomenuto, na kemijsku i fizikalnu stabilnost tableta može utjecati vlaga. Istraživanja su pokazala da se količina vlage koju tablete u blisterima adsorbiraju povećava s povećanom vlagom u okolini i rezultira smanjenjem mehaničke snage tableta. Također, kada kruti oralni oblik adsorbira vlagu, djelatna tvar prisutna na površini će se otopiti (ukoliko je topljiva) te će biti podložna hidrolitičkoj razgradnji [32].

Važan aspekt iz pacijentove percepcije kvalitete jest boja. Promjena boje povezana je s kemijskim promjenama. Druga mogućnost uzroka promjene boje je migracija materijala u vanjski sloj (*coating*). Budući da na takvo kretanje utječe topljivost i pokretljivost, može se pretpostaviti da će vlaga utjecati na brzinu procesa konverzije [17]. Dakle, jedan od glavnih zaštitnih utjecaja pakiranja na stabilnost tableta je zaštita od vlage. Kemijska zaštita se

odnosi na sprječavanje interakcija između proizvoda i pakiranja. No, interakcija spremnika s tabletama ne predstavlja veliku zabrinutost u odnosu na druge dozirne oblike (Tablica 2).

Tablica 2. Mogućnost interakcije spremnika s dozirnim oblikom.

Stupanj zabrinutosti povezan sa putem primjene lijeka	Vjerojatnost interakcije komponenti iz spremnika s gotovim oblikom		
	Visoka	Srednja	Niska
Najviši	Inhalacijske aerosoli i otopine; injekcije i suspenzije koje se injiciraju	Sterilni prašci i prašci za injekcije, inhalacijski prašci	/
Visok	Oftalmičke otopine i suspenzije, transdermalne masti i flasteri; nazalne aerosoli i sprejevi	/	/
Nizak	Topičke otopine i suspenzije; topičke i lingvalne aerosoli; oralne otopine i suspenzije	Topički i oralni prašci	Oralne tablete i oralne (tvrde i mekane) kapsule

U farmaceutskoj su industriji preferirane opcije za pakiranje krutih oblika bočice (polietilen visoke gustoće, HDPE) i blisteri (polivinilklorid, PVC; polivinilklorid/polivinilidenklorid, PVC/PVDC; ACLAR tj. poliklorotrifluoroetilen film), a najnepropusnija za vlagu je barijera od hladno formirane aluminijske folije [32].

Kruti dozirni oblici imaju najmanji rizik od interakcije s pakiranjem, ali rizik ipak postoji. Primjeri mogućih interakcija su [31]:

- migracija aditiva ili drugih komponenata iz pakiranja u kruti materijal, uzrokujući kontaminaciju;
- razgradnja proizvoda zbog adsorpcije ili ispiranja onečišćenja;

- obezbojenje pakiranja zbog interakcija vezanih sa pakiranjem;

- povećanje lomljivosti / gubitak integriteta komponenata pakiranja, npr. zbog nekompatibilnosti ostatnih otapala s pakiranjem.

4.1.2. Studije prisilne razgradnje (stres ispitivanja)

Prisilna razgradnja je proces koji podrazumijeva razgradnju djelatne tvari i gotovog proizvoda pri uvjetima koji su ekstremniji nego uvjeti korišteni u ubrzanim studijama ispitivanja stabilnosti. Studije prisilne razgradnje se provode sa sljedećim ciljevima [33]:

- utvrđivanje razgradnih puteva djelatnih tvari i gotovih proizvoda;

- razlikovanje razgradnih produkata vezanih za gotove proizvode od onih koji su generirani iz pomoćnih tvari u formulaciji;

- utvrđivanje strukture razgradnih produkata;

- utvrđivanje unutarnje stabilnosti djelatnih tvari u formulaciji;

- otkrivanje razgradnih mehanizama, poput hidrolize, oksidacije, termolize ili fotolize djelatnih tvari ili gotovog proizvoda;

- utvrđivanje prirode razvijenih analitičkih metoda s obzirom na njihovo određivanje stabilnosti;

- razumijevanje kemijskih karakteristika molekula;

- stvaranje stabilnijih formulacija;

- stvaranje profila razgradnje sličnog onom koji se prati tijekom formalnih studija ispitivanja stabilnosti prema ICH uvjetima;

- rješavanje problema vezanih za stabilnost.

Iako su studije prisilne razgradnje regulatorni zahtjev i znanstvena potreba tijekom razvoja lijeka, nisu dio formalnih studija ispitivanja stabilnosti. U usporedbi s formalnim

studijama ispitivanja stabilnosti, studije prisilne razgradnje pomažu pri stvaranju razgradnih produkata u kraćem vremenu. Generirani uzorci se zatim mogu koristiti za razvoj stabilitetno-indikativnih metoda (SIM), koje se kasnije mogu upotrijebiti za analizu uzoraka iz ubrzanih ili dugoročnih studija. Studije prisilne razgradnje ukazuju na kemijsko ponašanje molekule što zauzvrat pomaže u razvoju formulacije i odabiru pakiranja [33].

U dizajn stres studija djelatne tvari preporuča se uključiti baznu i kiselinsku hidrolizu, fotolizu, oksidaciju te stres uvjete vlage i temperature. Takvi uvjeti mogu biti korišteni kao polazna točka u razvoju SIM. Promjena uvjeta na oštrije ili blaže može se primijeniti kada je uočeno da dolazi do preslabe ili prejake razgradnje [34].

Tablica 3. Primjer uvjeta za provođenje stres studija na djelatnim tvarima, [25] i [34].

KRUTINA			
Stres		**Uvjet**	**Trajanje**
Toplina		60°C	Do 1 mjesec
Vlaga		75%	Do 1 mjesec
Fotostabilnost		3 mm (prašak) Izloženi i neizloženi uzorak (kontrola)	Prema ICH zahtjevima (Q1B)
OTOPINA			
Stres		**Uvjet**	**Trajanje**
Hidroliza	Kiselo	0,1-1 M HCl	Nekoliko tjedana i do 60°C
	Lužnato	0,1-1 M NaOH	Nekoliko tjedana i do 60°C
Oksidacija		H_2O_2 3% (V/V)	Do 24 h
Fotostabilnost		Izloženi i neizloženi uzorak (kontrola)	Prema ICH zahtjevima (Q1B)
Temperatura		60°C	Do 1 mjesec

Tablica 4. Primjer predloženih uvjeta za ispitivanje gotovog proizvoda u krutom obliku [35].

Uvjeti čuvanja	**Vremenski period trajanja ispitivanja***
40°C, 75% RV; otvoreno **	3 mjeseca
50-60 °C, ambijentalna RV; otvoreno	3 mjeseca
Fotostabilnost; prema ICH	prema ICH
* 3 mjeseca ili 5-15% razgradnje, što se dogodi prije ** Za smjese djelatnih tvari ili smjesu djelatne i pomoćne tvari, ili za gotov farmaceutski proizvod bez ambalaže, obično se raširi tanki sloj materijala u Petrijevu posudicu.	

RV-relativna vlaga

Navedeni uvjeti su dovoljni za izlaganje krutog uzorka temperaturnom stresu, oksidacijskom stresu i stresu s vlagom. Više temperature od navedenih mogu biti primijenjene kako bi se brzo razvila metoda ili predformulacijski uzorci. No, takav pristup može dovesti do različitih kinetika razgradnje i nebitnih razgradnih produkata. Kraći vremenski uvjeti bi se trebali izbjegavati kako bi se zadržala realistična termodinamika. Dulje vrijeme izlaganja nije preporučeno zbog toga što su takvi uzorci teško dostupni u ranoj fazi razvoja i treba ih razmatrati jedino ukoliko se ne postigne nikakva razgradnja unutar tri mjeseca [35].

Jačina i trajanje stresnih uvjeta određuju se eksperimentalno kako bi se dobio uzorak s traženom razgradnjom . Istovremeno se istim stresnim uvjetima izlaže i placebo [36].

Prisilna razgradnja krutih dozirnih oblika uobičajeno uključuje izlaganje djelatne tvari toplini, vlazi i svjetlu. Eksperimentalni uzorci koji nastanu zatim se koriste za utvrđivanje je li određena metoda SIM, tj. je li sposobna detektirati gubitak sadržaja djelatne tvari i posljedičan porast onečišćenja [36].

Farmaceutske kompanije provode stres ispitivanja u predformulacijskoj fazi razvoja kao pomoć pri odabiru pomoćnih tvari za daljnji razvoj, pri odabiru soli ili optimizaciji formulacije te radi stvaranja uzoraka za razvoj SIM. Iako su predformulacije dio ranog razvoja lijeka, stres testovi se često ponavljaju nakon što se proizvodni procesi, sastav proizvoda i analitički postupci promijene i kako se približava finalnoj fazi razvoja Iako se u regulatornim smjernicama može pronaći koncept za provođenje stres ispitivanja, nema detaljnih podataka o strategiji. Za stres ispitivanja krutih oblika, primijenjeni uvjeti uključuju povišene temperature i relativnu vlagu. Takvi se uvjeti često koriste na temelju tradicije, a ne znanstvenih načela. Dostupne smjernice ne propisuju do koje mjere treba provesti stres ispitivanja - jačinu stresa, tj. koliku razgradnju postići. Eksperimentalni uvjeti trebaju biti realistični i dovesti do namjeravane razgradnje. To znači da bi eksperimentalni uvjeti trebali biti takvi da se tijekom ispitivanja generiraju reprezentativni uzorci za procjenu stabilnosti djelatnih tvari i gotovog proizvoda, da se dobije informacija o mogućim putevima razgradnje i demonstrira mogućnost određivanja stabilnosti primijenjenim analitičkim postupcima. No, prepoznato je da tijekom stres ispitivanja mogu nastati razgradni produkti koji se neće formirati tijekom dugoročnih ili ubrzanih studija, a takve razgradne produkte niti ne treba dalje ispitivati [35].

Impurity Profiling Group (IPG), grupa stručnjaka sastavljena od zastupnika iz nekoliko farmaceutskih kompanija i sa Sveučilišta u Utrechtu, predstavila je pristup za provođenje stres ispitivanja koje bi dovelo do stvaranja reprezentativnih uzoraka za razvoj SIM za djelatne tvari i gotove proizvode. Inicijalno je pitanje bilo koliko se stresa može smatrati prikladnim za stvaranje takvih uzoraka. IPG grupa se složila da se količina stresa koja će se primijeniti na uzorke treba odabrati s obzirom na to što je sve potrebno da bi se postigla namjeravana razgradnja. Optimalan model razgradnje bi na kraju stres ispitivanja pokazao

samo one razgradne produkte koji će se vidjeti i na kraju roka valjanosti u formalnim studijama ispitivanja stabilnosti, i one koji se mogu pojaviti ukoliko se s djelatnim tvarima ili gotovim proizvodom ne rukuje prikladno ili se ne pakiraju na odgovarajući način. Stres ispitivanje bi trebalo inducirati ne više od 5-15% razgradnje djelatne tvari te bi trebalo biti zaustavljeno kada je taj postotak razgradnje postignut. Nije poželjno generiranje uzoraka opsežne razgradnje zbog njihove ograničene važnosti i formiranja sekundarnih razgradnih produkata koji dovode do kompliciranih modela razgradnje. Jedno od pitanja je i koliko dugo bi se trebalo nastaviti sa stres ispitivanjima ukoliko cilj nije postignut. IPG grupa preporuča period od tri mjeseca za djelatne tvari i gotove proizvode u krutom obliku, što zapravo može biti predugo razdoblje za predformulacijsku fazu tijekom ranog razvoja lijeka. Općenito, da bi se procijenila važnost, rezultate dobivene stres ispitivanjima treba usporediti s onima dobivenim tijekom dugoročnih i ubrzanih ispitivanja čim budu dostupni [35].

Preporuka za planirane razgradnje [35]:

- ispitivanje treba dovesti do razgradnje djelatne tvari, ali ne više od 5-15%*
- ispitivanje treba dovesti do dobre predvidljivosti putova razgradnje (slaba mogućnost za preintenzivne ili lažne razgradnje)
- ispitivanje ne bi trebalo trajati dulje od 3 mjeseca

Identifikacija i karakterizacija razgradnih produkata provodi se u skladu s ICH zahtjevima, a pritom se koriste konvencionalne metode (npr. kolonska kromatografija) ili tehnike poput LC-MS i LC-NMR. Strukturalna karakterizacija razgradnih produkata je nužna za ona onečišćenja koja nastaju i tijekom formalnih studija ispitivanja stabilnosti [38].

* prema nekim autorima, 5-20% [37].

4.1.2.1. Ispitivanje fotostabilnosti

Studije ispitivanja fotostabilnosti provode se s ciljem utvrđivanja dovodi li izlaganje dozirnog oblika određenom svjetlu do neželjenih promjena. Fotorazgradnja može dovesti do promjena u fizikalnom izgledu, kao i kemijskom sastavu dozirnog oblika. Svjetlo može utjecati na djelatnu tvar u formulaciji, gotov proizvod ili pakiranje [39].

Fotokemijsko stres ispitivanje uobičajeno se provodi pri uvjetima koji su ekstremniji nego uvjeti u ubrzanim studijama ispitivanja stabilnosti. Prilikom provođenja ispitivanja fotostabilnosti, preporuča se sistematski pristup prema sljedećem redu: ispitivanje na djelatnoj tvari, ispitivanje na izloženom gotovom proizvodu bez primarnog pakiranja, ispitivanje na gotovom proizvodu u primarnom pakiranju te, ukoliko je potrebno, ispitivanje gotovog proizvoda u marketinškom pakiranju (sekundarnom). Na kraju svakog od izlaganja, na uzorcima se moraju analizirati promjene, poput izgleda, sadržaja i onečišćenja, metodama koje su validirane za produkte koji proizlaze iz fotorazgradnih procesa [40].

Konfirmatornim studijama treba prepoznati mjere predostrožnosti potrebne u proizvodnji ili formulaciji gotovog proizvoda te odabiru pakiranja. Kada se procjenjuju rezultati konfirmatornih studija kako bi se odredilo je li promjena prihvatljiva, važno je uzeti u obzir rezultate formalnih studija ispitivanja stabilnosti kako bi se osiguralo da će lijek biti unutar granica specifikacije u vremenu upotrebe [39].

U krutim se oblicima fotokemijske reakcije događaju na površini proizvoda te u većini slučajeva unutrašnjost preparata neće biti pogođena neovisno o vremenu izlaganja. Brzina razgradnje na površinskom sloju je ovisna o pomoćnim tvarima, ali i o čimbenicima koji utječu na dubinu penetracije, npr. promjena apsorpcije i refleksije na površini (primjerice, veličina čestica, modifikacija kristala, boja, debljina sloja praška i oblaganje pojedinih čestica ili dozirnog oblika) [40].

4.1.3. Ispitivanja stabilnosti na konačnoj formulaciji - formalne studije

Postoje tri tipa formalnih studija ispitivanja stabilnosti koje daju predodžbu o stabilnosti lijekova:

1. Dugoročne studije ispitivanja stabilnosti (real time testing):

- duljina i uvjeti provođenja studije moraju pokrivati skladištenje, transport i upotrebu lijeka. Klimatski uvjeti za provođenje studije (temperatura i vlaga) odabiru se na temelju klimatskih uvjeta tržišta na kojem će novi proizvod biti stavljen u promet.

2. Ubrzane studije ispitivanja stabilnosti:

- kreirane su za ubrzavanje kemijskih razgradnja ili fizikalnih promjena djelatne tvari ili gotovog proizvoda primjenom pretjeranih uvjeta čuvanja kao dio formalnog, konačnog programa čuvanja. Rezultati ubrzanih studija nisu uvijek indikatori fizikalnih promjena. Provode se jer za uvođenje novih proizvoda na tržište ili za promjene u procesima, formulaciji, sustavu spremnik/zatvarač postojećih proizvoda nije moguće čekati generiranje svih podataka o stabilnosti na sobnoj temperaturi [25].

3. Međuuvjeti (pomoćni uvjeti u ispitivanju stabilnosti):

- studije su dizajnirane za umjereno povećavanje brzine kemijske razgradnje ili fizikalnih promjena za djelatnu tvar koja se namjerava skladištiti dugoročno na 25°C [25]. Primjenjuju se kada dolazi do značajnih promjena na ispitivanim uzorcima tijekom ubrzanih studija.

4.1.3.1. Stabilitetno-indikativne analitičke metode

Najčešći analitički parametri koji se prate tijekom formalnih studija ispitivanja stabilnosti tableta su: izgled, brzina oslobađanja i sadržaj djelatne tvari, određivanje vode i

onečišćenja. Pri tome se koriste nekromatografske i kromatografske analitičke tehnike, tj. stabilitetno-indikativne metode (SIM).

S obzirom da je svrha ispitivanja stabilnosti praćenje mogućih promjena na proizvodu tijekom vremena pri različitim uvjetima čuvanja, očekuje se da su sve primijenjene analitičke metode stabilitetno-indikativne. Koristeći ovu široku definiciju, svaka metoda, od XRPD za praćenje promjena na kristalnoj formi, do praćenja brzine oslobađanja djelatne tvari, može se smatrati SIM, ukoliko se može pokazati da pouzdano detektira specifične fizikalno-kemijske promjene na proizvodu/materijalu koji se ispituje. No, kod uobičajenih farmaceutskih proizvoda postalo je normalno koristiti termin SIM za opis metode (općenito kromatografske) koja se koristi za detektiranje kemijske razgradnje djelatne tvari ili gotovog proizvoda [37]. Prema FDA, SIM je validirani kvantitativni analitički postupak koji može detektirati promjene bitnih karakteristika djelatne tvari i gotovog proizvoda koje nastaju s vremenom. Stabilitetno-indikativnom metodom se precizno mjeri djelatna tvar, bez interferencija razgradnih produkata, procesnih onečišćenja ili drugih potencijalnih onečišćenja [25]. Dakle, metodu čini stabilitetno-indikativnom, kao i stabilitetno-specifičnom, njezina diskriminatorna priroda [41].

Bakshi i Singh [42] smatraju da razvoj SIM uključuje 7 koraka:

(1) ispitivanje strukture djelatne tvari kako bi se utvrdio vjerojatni put razgradnje;

(2) prikupljanje podataka o fizikalno-kemijskim karakteristikama djelatne tvari;

(3) provođenje studija prisilne razgradnje (stres studija);

(4) provođenje separacije uzoraka iz stres studija;

(5) konačni razvoj metode i optimizacija;

(6) identifikacija i karakterizacija razgradnih produkata i priprema standarada;

(7) validacija SIM.

4.1.3.2. Analitički parametri koji se ispituju na tabletama u studijama stabilnosti

Izgled

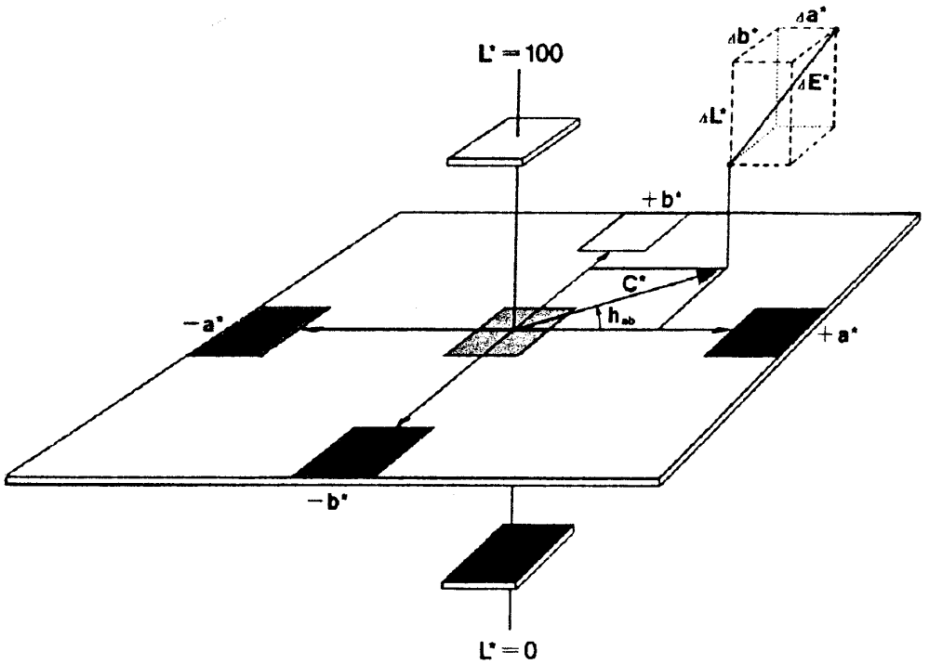
FDA smjernice za ispitivanje stabilnosti krutih farmaceutskih oblika uključuju izgled/boju kao važnu karakteristiku stabilnosti. S obzirom da vizualnom pregledu i subjektivnoj procjeni nedostaje preciznost i objektivnost, kvantifikaciji promjene boje krutih farmaceutskih oblika tijekom ispitivanja stabilnosti se pridaje ograničena pažnja. Instrumetalna tehnika kojom se to može prevladati za krute površine je procjena boje i promjena boje refleksijskom spektroskopijom. CIELAB sustav koordinata boja je opće prihvaćen i uključen je u opće poglavlje USP od 1985. godine. CIELAB sustav boja daje točnu numeričku specifikaciju ljudskog vida. Sustav definira uvjete za opažanje (spoznavanje) boje [43] :

(a) određivanjem relativne spektralne raspodjele energije različitih osvjetljenja, poznatih kao CIELAB Standardna osvjetljenja,

(b) određivanjem da se promjena osvjetljenja nakon interakcije s predmetom mjeri refleksijskim spektrokolorimetrom prema CIELAB preporukama,

(c) kvantificirajući prirodu ljudske percepcije boje u obliku tri funkcija x, y, z, čije se brojčane vrijednosti nalaze u objavljenim tablicama, a poznate su kao CIELAB Standardni promatrač.

Iz određenih *tristimulus* vrijednosti računaju se koordinate boje u trodimenzionalnom prostoru koji se još naziva *vizualno ujednačen prostor boja* Koordinate boje u navedenom prostoru mogu se koristiti za računanje promjena od referentne točke [44] .



Slika 1. CIELAB sustav čine tri prostorne koordinate *a** (os crveno-zeleno), *b** (os žuto- plavo) i *L** (os svjetline) u Kartezijevom koordinatnom sustavu [45].

U literaturi su opisane uočene zavisnosti promjene boje tableta i razgradnje djelatne tvari [43] [46]. Ukoliko je djelatna tvar osjetljiva na vlagu, svjetlo ili kisik, razgradnja djelatne tvari može se manifestirati promjenom boje. S druge strane, promjena boje ne znači nužno da je došlo do razgradnje djelatne tvari. Neki proizvodi pokazuju promjenu boje bez gubitka djelotvornosti, koja može biti rezultat utjecaja pomoćnih tvari te interakcije djelatne tvari ili onečišćenja s pomoćnim tvarima. U posljednje navedenom slučaju, promjeni boje se tijekom farmaceutskog razvoja i opskrbe tržišta ne pridaje puno pozornosti kao gubitku aktivnosti, jer promjena boje ne utječe na djelotvornost ili sigurnost farmaceutskog proizvoda. No, sa stajališta kvalitete, farmaceutski je bitno da bijeli kruti oblik ostane bijele boje i tijekom čuvanja [45]. Instrumentalne varijable mogu utjecati na dobivene rezultate. Iako se među rezultatima koji su mjereni usporedno među sličnim bojama mogu napraviti pouzdane usporedbe, rezultati dobiveni na različitim instrumentima ili pri različitim instrumentalnim

uvjetima moraju se oprezno uspoređivati. Ukoliko je ipak potrebno usporediti takve rezultate, preporuča se uvid u rezultate usporedno analiziranih standardnih materijala. Usporedba rezultata s referentnim materijalima može pomoći u prepoznavanju varijacija uzrokovanih instrumentalnim promjenama [44].

Tvrdoća

Tvrdoća tablete je naznaka otpora vanjskog sloja prema abraziji ili puknuću pri uvjetima skladištenja, transporta i manipulaciji prije upotrebe.

Tableta mora biti dovoljno čvrsta kako bi izdržala proces proizvodnje, pakiranje i transport. No, ne smije biti pretvrda, jer to može utjecati na raspadljivost ili otpuštanje djelatne tvari [47]. Analiza se provodi instrumentalno, tablete se stavljaju između dvije vilice koje gnječe tabletu, a instrument mjeri primjenjenu snagu te detektira kada dolazi do loma.

Rastrošljivost

Rastrošljivost se obično ispituje kod tableta koje su podvrgnute abraziji i mehaničkim šokovima tijekom pakiranja i transporta te proizvodnje, jer takvi stresovi mogu dovesti do okrhnuća, abrazije i loma tableta. Formulacija mora izdržati takve stresove bez promjena u izgledu. Rastrošljivost je uobičajeno parametar koji se ispituje kao dio *release* specifikacija (skup testova i kriterija koji određuju podobnost gotovog farmaceutskog proizvoda u vrijeme stavljanja u promet), međutim, također može biti dio programa ispitivanja stabilnosti neobloženih tableta, pogotovo ukoliko su higroskopne [47]. Analiza se provodi u aparatu koji se sastoji od jedinice koja rotira jedan ili dva plastična bubnja. Rastrošljivost se izražava kao gubitak mase i izražava se u postotku početne mase analiziranih tableta. Maksimalan gubitak od 1% mase tableta se smatra prihvatljivim za većinu proizvoda [48].

Sadržaj vode

Izvori vlage u dozirnom obliku su različiti - uključuju *bulk* proizvode, pomoćne tvari, proizvodne procese i vanjske uvjete. Voda je obično prisutna u malim koncentracijama na krutim fazama farmaceutskih materijala ili unutar njih, manje od 1,5% m/m [49]. Promjena razine vlage u gotovom obliku može ukazivati na djelotvornost sustava spremnik/zatvarač [47].

Sadržaj vode u tabletama utječe na otpuštanje djelatnih tvari, ali i na njihove kemijske, fizikalne i mikrobiološke karakteristike te na rok valjanosti. U skladu sa tim, sadržaj vode u tabletama je od temeljne važnosti te mora biti precizno određen. Ovisno o karakteristikama lijeka, vlaga može ubrzati razgradnju lijeka. Poznati mehanizam razgradne reakcije je hidroliza. Visoke razine vlage mogu utjecati i na oslobađanje djelatne tvari te potencijalno uzrokovati smanjenje bioraspoloživosti. U tom slučaju lijek bi bio u potpunosti potentan, ali se ne bi otopio prema potrebi za apsorpciju i terapijsku učinkovitost [49]. Sadržaj vode se najčešće određuje Karl Fischer titracijama, pri čemu se razlikuje volumetrijski i kulometrijski tip titracije. Karl Fischer titracija se zasniva na kvantitativnoj reakciji vode s jodom i sumpor(IV) oksidom u nevodenoj sredini u prisutnosti odgovarajuće baze dovoljnog puferskog kapaciteta [50].

Karl Fischer volumetrija se koristi za uzorke s većim sadržajem vode, npr. 1-100 mg po uzorku. Reagensi mogu biti jednokomponentni i dvokomponentni. Jednokomponentni reagensi obično sadrže sve reaktante (jod, sumpor(IV) oksid i bazu) otopljene u odgovarajućem alkoholu u istoj otopini, dok dvokomponentni reagensi sadrže sve potrebne reaktante u dvije odijeljene otopine kako bi se ubrzala reakcija i stabilnost reagensa [51].

Budući da su u dvokomponentnom reagensu, za razliku od jednokomponentnog, baza i SO_2 prisutni u suvišku, i budući da je sustav povrh toga puferiran, reakcija je brža. Kako bi se isti učinak postigao u jednokomponentnom reagensu, u nekim slučajevima se dodaje dodatno otapalo [52].

Karl Fischer kulometrija je mikrometoda i posebno je pogodna za uzorke s niskim sadržajem vode, od 10 µg do 10 mg. Jod nastaje elektrokemijski u titracijskoj posudi (anodnom) oksidacijom iz jodida sadržanog u kulometrijskom reagensu. Količina potrošenog električnog naboja se koristi za računanje potrošnje joda te količine vode u uzorku.

Potencijalni problemi vezani za provođenje Karl Fischer titracija tableta odnose se na ograničenu topljivost tableta u radnom mediju koji sadrži alkohol, što znači da priprema uzorka prije određivanja sadržaja vode zahtijeva složenije i dugotrajnije postupke koji mogu dovesti do netočnih rezultata: zbog povećanja površina nakon smanjenja veličine tableta, vlaga iz atmosfere će se apsorbirati puno lakše. Navedeno se može prevladati upotrebom visoko-frekventnog homogenizatora koji služi i kao miješalica tijekom titracije [53].

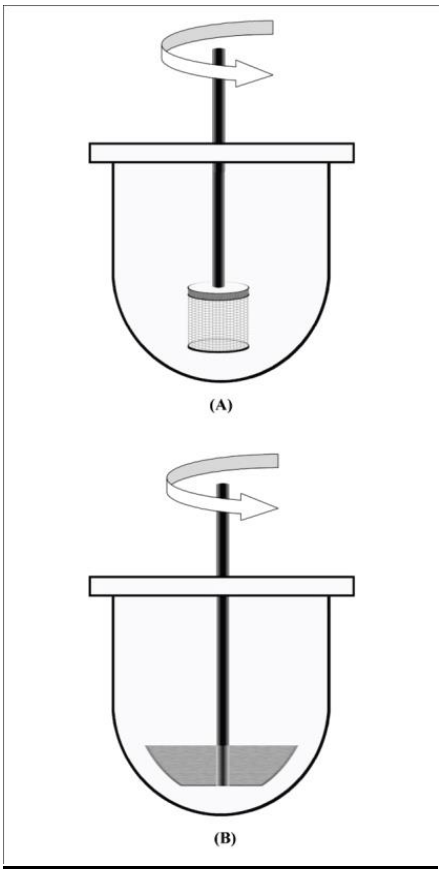
Oslobađanje djelatne tvari

Stabilnost oslobađanja djelatne tvari smatra se kritičnim parametrom, ne samo u pogledu kontrole kvalitete gotovog proizvoda, nego i zbog utjecaja na bioraspoloživost. Tijekom starenja, odsutnost promjena u oslobađanju djelatne tvari donekle daje sigurnost da se bioraspoloživost proizvoda nije promijenila [54].

Metoda analize mora biti diskriminatorne prirode, osjetljiva na čimbenike koji utječu na brzinu oslobađanja djelatne tvari. Takvi čimbenici uključuju karakteristike djelatnih tvari (npr. veličina čestica, kristalni oblik, nasipna gustoća), sastav gotovog oblika (npr. sadržaj djelatne tvari, identitet, tip i količinu pomoćnih tvari), proizvodni proces (npr. sila

komprimiranja) te utjecaje uvjeta skladištenja (npr. temperatura, vlaga) [55]. Utjecaj svakog od čimbenika na promjenu oslobađanja djelatne tvari u tabletama s trenutnim ili modificiranim otpuštanjem ovisi o samom proizvodu te se zato procjenjuje od slučaja do slučaja [56]. Razvoj postupka za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari uključuje izbor medija, tip aparata i hidrodinamike (brzine miješanja) prikladnih za određeni proizvod. Postupak se dalje optimizira za parametre, poput ionske snage i koncentracije surfaktanta, ukoliko je primjenjivo [57].

Prema Europskoj farmakopeji, ispitivanje krutih oralnih oblika se provodi u odgovarajućoj aparaturi s košarom, lopaticom ili protočnom ćelijom. USP razlikuje 7 različitih aparata koji se mogu koristiti za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari, iako se većina tableta ispituje na Aparatima 1 i 2, tj. sa košarom i lopaticom (Slika 2). Oba aparata imaju zajedničke prednosti i nedostatke. Prednosti uključuju: široku prihvaćenost, prvi su odabir za ispitivanje krutih oralnih dozirnih oblika, standardiziranost, jednostavnost korištenja, dobru izdržljivost te veliko iskustvo uporabe. Nedostatci se odnose na: ograničen volumen medija, nemogućnost simulacije gastrointestinalnog prijenosa i nepoznate hidrodinamičke uvjete [55].



Slika 2. Prikaz USP Aparata 1 i USP Aparata 2 za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari [55].

U određenim vremenskim razmacima, uzorkuju se alikvoti filtriranog medija u kojem se analizira sadržaj djelatne tvari tehnikama HPLC ili UV/VIS. Tijekom razvoja se najčešće koristi HPLC, čija je prednost mogućnost odvajanja djelatne tvari od potencijalnih interferencija iz formulacije ili medija te detektiranje razgradnje djelatne tvari [57]. HPLC također ima prednost različitih oblika detekcije (npr. vodljivost, fluorescencija, MS), kako za osjetljivost (molekule nekromofora), tako i za selektivnost. Nadalje, velike varijacije u koncentraciji uzorka mogu biti jednostavno riješene prilagodbom volumena injektiranja. Prilikom razvijanja postupka za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari koji uključuje određivanje sadržaja metodom HPLC, mora se uzeti u obzir kompatibilnost medija i mobilne faze, posebice ukoliko su potrebni veliki volumeni injektiranja (preko 100 µL).

Spektrofotometrijsko određivanje je brže i jednostavnije te zahtijeva manju količinu otapala od HPLC analize. DA (*Diode Array*) UV/VIS spektrofotometri na kojima se može provesti multikomponentna analiza mogu se koristiti i za analizu više djelatnih tvari u jednom uzorku, i u mnogim slučajevima za formulacije s pomoćnim tvarima koje interferiraju [58].

Sadržaj djelatne tvari i onečišćenja

Stabilitetno-indikativna metoda (SIM) za analizu sadržaja precizno mjeri djelatnu tvar bez interferencije s drugim pikovima i dovoljno je osjetljiva za detekciju i kvantifikaciju razgradnih produkata/onečišćenja. U studijama ispitivanja stabilnosti, HPLC je najčešće korištena kromatografska tehnika za određivanje sadržaja, jer nudi brzinu, rezoluciju, točnost, osjetljivost te različite opcije detektora koje druge tehnike ne nude. [59]. Prioritetna SIM metoda za odrađivanje sadržaja tvari niske molarne mase je RP-HPLC, zbog kompatibilnosti s vodenim i organskim otapalima, visoke preciznosti, osjetljivosti i mogućnosti detektiranja polarnih komponenata.

Osnovni kriterij pri razvijanju SIM HPLC metode za određivanje sadržaja je mogućnost razdvajanja djelatne tvari od srodnih tvari.

Najprikladnija separacija može se postići sistematskom optimizacijom svih kromatografskih čimbenika, što uključuje izbor [60] :

(a) kromatografske kolone i načina rada (moda),

(b) prikladne mobilne faze,

(c) odgovarajućih uvjeta detektora,

(d) optimalan odabir temperature kolone i protoka otapala.

Prema Q3B, bilo koji razgradni produkt primijećen u studijama ispitivanja stabilnosti provedenim pri preporučenim uvjetima čuvanja mora biti identificiran ukoliko je prisutan u količini većoj od granice dokazivanja. Razgradni produkti prisutni u količini manjoj ili jednakoj pragu dokazivanja obično ne moraju biti identificirani. No, kvalitativni i kvantitativni analitički postupci moraju biti razvijeni za one razgradne produkte koji imaju značajne farmakološke ili toksične učinke, čak i kada su prisutni u količinama manjim ili jednakim granici dokazivanja.

Registracijska prijava mora uključivati dokumentirani dokaz da su analitički postupci validirani i prikladni za detekciju i kvantifikaciju razgradnih produkata.

4.1.4. Specijalne studije ispitivanja stabilnosti

Posebne studije ispitivanja stabilnosti detaljno opisuju Huynh-Ba i suradnici (2009).

Stabilnost nepakiranih gotovih (bulk) proizvoda

Studije ispitivanja stabilnosti *bulk* proizvoda moraju biti provedene kako bi podržale skladištenje u periodu između proizvodnje i pakiranja. Takav tip studija mora biti završen prije puštanja gotovog proizvoda u promet. Uobičajeno ovakva ispitivanja traju manje od godine dana i provode se pri sobnoj temperaturi. Gotov proizvod se pakira u simuliranu ambalažu, poput dvostruke polietilenske vreće, u mali bubanj ili u plastične spremnike koji oponašaju pakiranje *bulk* proizvoda. Ključne analize treba provesti svaka 3 mjeseca.

Ispitivanja stabilnosti materijala tijekom proizvodnje

Ispitivanja moraju biti provedena kako bi se osigurali podatci za podršku perioda čuvanja *bulk in process* materijala (poluproizvoda) ili intermedijera. Za stabilan proizvod, općenito, nije potrebno provoditi formalnu studiju ukoliko će se *bulk* materijal čuvati manje

od 30 dana. Za nestabilne proizvode ili materijale koji će se morati čuvati dulje od 30 dana, potrebno je provesti ispitivanje stabilnosti kako bi se potvrdilo da vrijeme čuvanja ne utječu na kvalitetu *in process* materijala.

Ispitivanja za podršku temperaturnim odstupanjima

Ispitivanja se provode na zapakiranim i nepakiranim gotovim proizvodima. Gotovi proizvod se uzastopno izloži različitim termalnim ciklusima (npr. tri ciklusa, od kojih svaki uključuje čuvanje na 40°C tijekom 4 dana i zatim čuvanje na 25°C tijekom 3 dana). Analize se provode nakon završetka svih ciklusa, kako bi se procijenile fizikalne i kemijske promjene koje se mogu dogoditi u gotovom proizvodu. Podatci mogu biti korisni i nakon što se proizvod nađe na tržištu, kao podrška reklamacijama.

4.2. Regulatorni dio

ICH smjernice opisuju minimum zahtjeva potrebnih za registraciju novih lijekova na području SAD, EU i Japana, na način da su u navedena tri područja podatci o stabilnosti međusobno prihvatljivi. Međunarodno prihvaćeni oblik pripreme podataka u aplikacijskom dosjeu novog lijeka koji se podnosi regulatornim agencijama naziva se Zajednički tehnički dokument (*Common Technical Document*, CTD). CTD se sastoji od 5 Modula, a informacije o stabilnosti gotovog proizvoda se prilažu u Modulu 3 koji se odnosi na kakvoću djelatne tvari i gotovog lijeka. Dogovor da se podatci o kvaliteti, sigurnosti i djelotvornosti saberu u standardni, uobičajeni oblik (CTD) promijenio je procese regulatornih pregleda, doveo do usklađenih elektroničkih prijava koje su omogućile implementaciju dobre pregledavateljske prakse. Ono što je važno za industriju, eliminirana je potreba preoblikovanja informacija za

prijave za dobivanje regulatornog odobrenja za stavljanje lijeka na tržište, koje se apliciraju različitim ICH regulatornim tijelima [60].

4.2.1. Podjela i pregled ICH smjernica za ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda [61].

Pregled i objašnjenja ICH smjernica koje se odnose na ispitivanja stabilnosti prikazuje Tablica 5.

Tablica 5. ICH smjernice koje se odnose na ispitivanje stabilnosti.

Šifra	**Naziv dokumenta**
Q1A(R2)	Ispitivanje stabilnosti novih djelatnih tvari i gotovih proizvoda
Q1B	Ispitivanje stabilnosti: ispitivanje fotostabilnosti novih djelatnih tvari i proizvoda
Q1C	Ispitivanje stabilnosti novih dozirnih oblika
Q1D	*Bracketing* i *matrixing* dizajn ispitivanja stabilnosti novih djelatnih tvari i proizvoda
Q1E	Evaluacija podataka o stabilnosti
Q5C	Ispitivanja stabilnosti biotehnoloških /bioloških proizvoda

ICH smjernica *Stability testing of New Drug Substances and Products Q1A* definira podatke o stabilnosti za nove aktivne supstancije i nove gotove proizvode, koji su potrebni za registraciju lijekova na području EU, Japana i SAD. No, u slučajevima kada je to znanstveno opravdano, smjernice dozvoljavaju i alternativne pristupe u provođenju studija ispitivanja stabilnosti.

Dizajn studije za ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda se mora temeljiti na poznavanju karakteristika djelatne tvari, zatim na stabilitetnim studijama provedenim na djelatnoj tvari i na iskustvu dobivenom iz kliničkih formulacijskih studija.

Podatci stabilitetnih studija moraju obuhvaćati minimalno 3 primarne serije gotovog proizvoda. Primarne serije moraju biti iste formulacije i u istom pakiranju kao što je predloženo za tržište. Proizvodni postupak mora simulirati postupak koji će se primijeniti za proizvodne serije i mora rezultirati proizvodom jednake kvalitete i odgovarati zahtjevima specifikacije kojima će odgovarati i proizvod koji će se staviti na tržište. Dvije od tri serije moraju biti serije veličine najmanje pilotne skale, a treća smije biti manja, ukoliko se može opravdati. Kada je to moguće, serije gotovog proizvoda bi trebale biti proizvedene od različitih serija djelatnih tvari. Ispitivanje stabilnosti treba provesti na dozi zapakiranoj u sustav spremnik/zatvarač kakav je predložen za tržište (uključujući prema potrebi i sekundarno pakiranje te etiketu). Bilo koja studija provedena na proizvodu izvan njegovog spremnika sa kojim je u direktnom kontaktu ili u drugačijoj vrsti pakirnog materijala može biti koristan dio stres studije ili poslužiti kao dodatna informacija. Ispitivanje stabilnosti je potrebno provesti na svakoj dozi i veličini spremnika, ukoliko se ne primjenjuje reducirani dizajn (*bracketing* ili *matrixing*).

Tablica 6. Opći pristup za odabir uvjeta koji se primjenjuju u formalnim studijama ispitivanja stabilnosti za vremenski period koji mora biti obuhvaćen vremenom regulatorne prijave gotovog farmaceutskog proizvoda.

Studija	**Uvjeti čuvanja**	**Minimalni period koji mora biti obuhvaćen u vrijeme regulatorne prijave**
Dugoročna*	25°C±2°C/60% RV±5%RV Ili 30°C±2°C/65% RV±5%RV	12 mjeseci
Međuuvjet**	30°C±2°C/65% RV±5%RV	6 mjeseci
Ubrzana	40°C±2°C/75% RV±5%RV	6 mjeseci

* Podnositelj aplikacije može odlučiti hoće li dugoročne studije biti provedene na 25±2°C/60% RV ± 5% RV ili 30°C ± 2°C/65% RV ± 5% RV.

** Ako je 30°C ± 2°C/65% RV ± 5% RV uvjet za dugoročnu studiju, tada nema međuuvjeta.
RV - relativna vlaga

Ukoliko je dugoročna studija provedena na 25°C±2°C/60% RV±5%RV, a tijekom ubrzane studije u trajanju od 6 mjeseci dođe do značajnih promjena, provodi se dodatno testiranje na međuuvjetima i procjenjuje na osnovu kriterija za značajne promjene. Inicijalna regulatorna prijava treba uključivati najmanje 6 mjeseci podataka međuuvjeta od ukupno 12 mjeseci.

Značajna promjena za gotovi proizvod kod procjene rezultata znači:

1.) Promjena od 5% u sadržaju u odnosu na početnu vrijednost;

2.) Ukoliko bilo koji razgradni produkt prelazi kriterij prihvatljivosti;

3.) Ne odgovaranje zahtjevima specifikacije parametara: izgled, fizikalne karakteristike, funkcionalni testovi (npr. boja, tvrdoća).

Značajna promjena kod procjene rezultata ovisno o dozirnom obliku znači i:

4.) Ne odgovaranje zahtjevima za parametar pH vrijednost;

5.) Ne odgovaranje zahtjevima za parametar brzina oslobađanja djelatne tvari na 12 dozirnih jedinica.

Učestalost analitičkog testiranja

Kod **dugoročnih studija** ispitivanja stabilnosti, učestalost testiranja mora biti takva da se može utvrditi profil stabilnosti gotovog proizvoda. Za proizvode s predloženim rokom valjanosti od najmanje 12 mjeseci, učestalost testiranja tijekom dugoročnog ispitivanja bi trebalo biti svaka 3 mjeseca tijekom prve godine, svakih 6 mjeseci tijekom druge godine i nakon toga na godišnjoj bazi do kraja roka valjanosti.

Kod **ubrzanih studija** ispitivanja stabilnosti u trajanju od 6 mjeseci, preporuča se testiranje u minimalno tri vremenske točke, uključujući početnu i završnu (npr. 0, 3 i 6 mjeseci). Kada postoji očekivanje, na temelju iskustva, da će kod rezultata ubrzanih studija doći do značajnih promjena, analize bi trebalo provesti učestalije i to dodavanjem uzoraka na krajnjoj vremenskoj točki ili uključujući četvrtu točku testiranja u dizajn studije.

Kada se provodi testiranje na **međuuvjetima** u trajanju od 12 mjeseci (zbog značajnih promjena u ubrzanoj studiji), preporuča se testiranje u najmanje četiri točke, uključujući početnu i završnu (npr. 0, 6, 9, 12 mjeseci).

U pravilu, gotov proizvod bi trebao biti pod uvjetima koji testiraju njegovu termalnu stabilnost i, ukoliko je primjenjivo, osjetljivost na vlagu ili gubitak otapala. Uvjeti čuvanja i duljina trajanja studije moraju podržavati uvjete čuvanja, distribucije i upotrebe. Rezultati dugoročne studije bi u vrijeme regulatorne prijave gotovog proizvoda trebali obuhvatiti najmanje 12 mjeseci i najmanje tri primarne serije, te bi trebala biti nastavljena dovoljno dugo da obuhvati i predloženi rok valjanosti.

Podatci dobiveni u ubrzanim studijama i međuuvjetima mogu se upotrijebiti za procjenu kratkotrajnih odstupanja od preporučenih uvjeta čuvanja koji se mogu dogoditi tijekom distribucije.

Stres ispitivanja

ICH Q1A opisuje preporučene uvjete za provođenje studija prisilne razgradnje na djelatnim tvarima i gotovim proizvodima. Preporuka je ispitivanje utjecaja temperature (iznad one primijenjene u ubrzanim ispitivanjima, npr. >50°C), vlage (75% RV), oksidacije i fotolize. Uzorci se zatim koriste za razvoj SIM. Q1A i Q1B smjernice bilježe da neki od

razgradnih produkata koji nastaju tijekom studija prisilne razgradnje zapravo ne nastaju tijekom formalnih studija ispitivanja stabilnosti, te u takvom slučaju ne trebaju biti dalje proučavani.

Regulatorne agencije podržavaju početak stres ispitivanja u ranoj fazi razvoja novog proizvoda, u pretkliničkoj ili kliničkoj fazi, kako bi se dobilo dovoljno vremena za identifikaciju razgradnih produkata i utvrđivanje strukture, kao i za optimiziranje stres uvjeta. Stres studija u ranoj fazi razvoja također daje na vremenu za postizanje poboljšanja u procesu proizvodnje i odabiru SIM postupaka [38].

Ispitivanje fotostabilnosti

Ispitivanje fotostabilnosti gotovog proizvoda čini dio stres ispitivanja, a mora biti provedeno kako bi se utvrdilo uzrokuje li izlaganje svjetlu neprihvatljive promjene na gotovom proizvodu. Ispitivanje se tijekom razvoja provodi na jednoj seriji proizvoda, ukoliko ne dođe do promjene, npr. formulacije ili pakiranja, a zatim se karakteristike fotostabilnosti potvrđuju na još jednoj seriji.

Za provođenje ispitivanja fotostabilnosti gotovih proizvoda, ICH predlaže drvo odluke, prema kojem ispitivanje počinje izlaganjem proizvoda bez pakiranja te se prema potrebi izlaganje osvjetljenju nastavlja u primarnoj ili sekundarnoj ambalaži. Na kraju izlaganja, uzorci se analiziraju validiranim metodama kako bi se utvrdilo je li došlo do promjena u fizikalnim karakteristikama, sadržaju ili razgradnim produktima. Fotostabilnost tableta se mora ispitati na dovoljno velikom uzorku od, npr. 20 tableta.

Uzorci koji se ispituju moraju biti izloženi svjetlu koje stvara osvijetljenost od ne manje od 1,2 milijuna lx h i integriranu blisku UV energiju od ne manje od 200 W h/m^2.

4.2.1.1. Odabir klimatskih uvjeta

Za odabir uvjeta provođenja formalnih studija ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda s ciljem određivanja roka valjanosti, svijet se dijeli u 4 klimatske zone (I-IV) temeljem srednje kinetičke temperature i relativne vlage. Svaku zonu karakteriziraju određeni uvjeti čuvanja. Klimatski uvjeti definirani u ICH smjernicama odnose se na područja koja čine klimatske zone I i II. Smjernice za provođenje ispitivanja u klimatskim zonama III i IV su izdane od strane WHO.

4.2.1.2. Dizajn formalnih studija

Novi lijekovi, posebice oni u obliku tableta, na tržište najčešće dolaze u nekoliko doza te u pakiranjima različitih veličina. Provođenje ispitivanja stabilnosti na svakoj od doza/proizvoda rezultirao bi velikim brojem nepotrebnih analiza. Zbog toga je ICH u primjenu uveo dva tipa dizajna formalnih studija - studije potpunog i reduciranog dizajna.

Studije potpunog dizajna, za razliku od studija reduciranog dizajna, uključuju testiranje svih uzoraka postavljenih za praćenje stabilnosti, za svaku kombinaciju čimbenika, u svim unaprijed određenim vremenskim točkama. Prema ICH Q1D, oba tipa dizajna moraju imati mogućnost odgovarajućeg predviđanja roka valjanosti i svaka primjena reduciranog dizajna mora biti obrazložena. Rezultati dobiveni u studijama reduciranog dizajna se pri evaluaciji moraju tretirati na isti način kao i podaci iz studija potpunog dizajna, iako zbog smanjene količine podataka postoji rizik da se studijom reduciranog dizajna odredi kraći rok valjanosti nego što bi proizašao iz studije potpunog dizajna. Tijekom trajanja studija reduciranog dizajna, uz obrazloženje se može prijeći na studiju potpunog dizajna.

Dva su koncepta studija reduciranog dizajna koji se temelje na različitim principima: *bracketing* i *matrixing*.

Bracketing je dizajn rasporeda testiranja u studiji ispitivanja stabilnosti u kojemu se u svakoj unaprijed određenoj vremenskoj točki analiziraju samo uzorci koji čine ekstrem određenih čimbenika (npr. doze, veličine spremnika i/ili punjenja). Takav dizajn podrazumijeva da stabilnost uzoraka koji čine ekstrem predstavlja i stabilnost svih međuuzoraka [61].

Prije primjene *bracketing* dizajna potrebno je odrediti utjecaj takve studije na određivanje roka valjanosti. Ukoliko se pokaže da se stabilnost uzoraka koji predstavljaju ekstrem razlikuje, međuuzorci se ne mogu smatrati stabilnijima od najmanje stabilnog ekstrema. Ukoliko se, nakon što započne studija, za neki od uzoraka koji predstavlja ekstrem više ne očekuje puštanje u promet, već kreirani dizajn se može zadržati kao podrška međuuzorcima uz obvezu provođenja ispitivanja stabilnosti nakon dobivanja regulatornog odobrenja za puštanje lijeka u promet na uzorcima koji predstavljaju ekstrem uzoraka koji se nalaze na tržištu (ICH Q1D).

Bracketing dizajn se može primijeniti kod ispitivanja stabilnosti proizvoda koji se nalazi u različitim dozama pakiranima u isti sustav spremnik/zatvarač od istog materijala i iste veličine, te ukoliko je formulacija u dozama jednaka ili vrlo slična s obzirom na sastav (npr. tablete iz iste smjese/*blenda*, ali komprimirane različitim silama ili tablete različitih doza proizvedene komprimiranjem različitih količina iz iste granulacije). Vrlo slična formulacija u rasponu doza podrazumijeva sličan, ali ne isti osnovni sastav, u kojem je omjer djelatne i pomoćnih tvari konstantan, dozvoljavajući dodavanje ili izuzimanje, npr. bojila ili aroma [62].

Uz obrazloženje, *bracketing* se može primijeniti i u studijama u kojima se ispituju različite doze proizvoda, a u kojima su relativne količine djelatnih i pomoćnih tvari izmijenjene. U takvom slučaju, obrazloženje mora uključivati prikaz usporedivih profila stabilnosti između različitih doza na kliničkim ili razvojnim serijama ICH Q1D.

Prema ICH Q1D, *bracketing* se općenito ne bi trebao koristiti kada se u različitim dozama proizvoda koriste različite pomoćne tvari.

Tablica 7. Primjer *bracketing* dizajna za tablete od tri doze i tri veličine pakiranja (ICH Q1D).

Doza		**50 mg**			**75 mg**			**100 mg**		
Serija		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Veličina spremnika	15 mL	T	T	T				T	T	T
	100 mL									
	500 mL	T	T	T				T	T	T

T-uzorak se analizira

Matrixing je statistički dizajn ispitivanja stabilnosti koji zahtijeva eksperimentalne podatke za svaki oblik gotovog proizvoda, ali omogućava da se u određenim vremenskim točkama prema dizajnu uzorkovanja, analizira samo frakcija (podskup) od ukupnog broja uzoraka za svaku kombinaciju čimbenika [18b]). Dizajn podrazumijeva da stabilnost uzoraka u svakom od podskupova predstavlja stabilnost svih uzoraka u toj vremenskoj točki.

Prema ICH Q1D, *matrixing* je primjenjiv ukoliko prateći stabilitetni podaci ukazuju na predvidljivu stabilnost proizvoda, tj. kada pokazuju slabu varijabilnost. Kada se primjenjuje takav tip dizajna, a neka od doza ili veličine spremnika i/ili punjenja više nije namijenjena za tržište, ispitivanje stabilnosti dotične doze ili spremnika i/ili punjenja se može nastaviti

prema već kreiranom dizajnu, kao podrška ostalim uzorcima u studiji. Dizajn mora biti uravnotežen tako da se svaka kombinacija čimbenika testira u istoj mjeri tijekom planiranog trajanja studije i u završnoj točki prije regulatorne prijave gotovog proizvoda.

Stupanj redukcije potpunog dizajna ovisi o broju kombinacija čimbenika koji se evaluiraju. Što je više čimbenika povezano s proizvodom, i što je više razina vezano za svaki čimbenik, može se razmotriti primjena većeg stupnja redukcije. Čimbenici koji mogu biti reducirani uključuju serije, doze jednakih formulacija, veličine spremnika, količine punjenja i vremenske međutočke. Čimbenici koji ne bi trebali biti reducirani su početna i krajnja točka, parametri analize, dozirni oblici, doze s različitim formulacijama i uvjeti čuvanja [62]. U dizajnu u kojem su vremenske točke reducirane, uzorci za sve odabrane kombinacije čimbenika moraju se testirati u početnim i završnim točkama, dok se samo određene frakcije testiraju u svakoj međutočki (ICHQ1D).

Matrixing se može primijeniti kod proizvoda s različitim dozama, ali identičnom ili vrlo sličnom formulacijom, npr. za tablete koje su proizvedene komprimiranjem različitih odvaga, ali slične osnovne granulacije, zatim serije proizvedene istim postupkom na istoj opremi, iste veličine spremnika i/ili punjenja u isti sustav spremnik/zatvarač. Uz obrazloženje, *matrixing* se može primijeniti na različitim dozama u kojima su relativne količine djelatne i pomoćnih tvari promjenjive, ili gdje se koriste različite pomoćne tvari, ili različiti sustavi spremnik/zatvarač.

Ukoliko podatci iz dugoročnih studija ispitivanja stabilnosti za preporučeni rok valjanosti nisu potpuni, odnosno dostupni za pregled prije dobivanja odobrenja za puštanje lijeka u promet, sve odabrane kombinacije serija, doze, veličine spremnika i punjenja bi se trebale također testirati na 12 mjeseci ili najmanje u zadnjoj točki prije podnošenja zahtjeva

za stavljanje lijeka u promet. Dodatno, podaci iz minimalno tri točke, uključujući početnu, trebali bi biti dostupni za svaku odabranu kombinaciju kroz prvih 12 mjeseci studije. Kod primjene *matrixing*a u ubrzanim studijama ili međuuvjetima, testiranje se provodi u minimalno tri vremenske točke, uključujući početnu i završnu, za svaku odabranu kombinaciju čimbenika.

Primjer primjene *matrixinga* na vremenskim točkama i čimbenicima prikazan je Tablicom 8.

Tablica 8. Primjer primjene *matrixinga* za proizvod s tri doze i tri veličine pakiranja (ICH Q1D).

Doza	**S1**			**S2**			**S3**		
Veličina spremnika	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Serija 1	T1	T2		T2		T1		T1	T2
Serija 2		T3	T1	T3	T1		T1		T3
Serija 3	T3		T2		T2	T3	T2	T3	

Vremenske točke (mjeseci)	0	3	6	9	12	18	24	36
T1	T		T	T	T	T	T	T
T2	T	T		T	T		T	T
T3	T	T	T		T	T		T

T-uzorak se analizira

Ispitivanje stabilnosti se provodi prema unaprijed napisanom protokolu koji sadrži podatke o čimbenicima koji utječu na dizajn studije, poput veličina pakiranja, vremenskih točaka uzorkovanja, doza, podataka o *bracketingu* ili *matrixingu*. U protokolu moraju biti navedeni uvjeti za provođenje ubrzanih i dugoročnih studija pakiranih proizvoda i studija

nepakiranih *bulk* proizvoda. Također mora uključivati validirane stabilitetno indikativne analitičke metode i stabilitetne specifikacije [62].

4.2.1.3. Obveza provođenja ispitivanja stabilnosti

Ukoliko podaci dugoročne studije na tri primarne serije ne obuhvaćaju preporučeni rok valjanosti za gotovi proizvod u vrijeme dobivanja regulatornog odobrenja za puštanje lijeka u promet, studije ispitivanja stabilnosti potrebno je nastaviti i nakon dobivanja odobrenja, kako bi se rok valjanosti čvrsto dokazao. Obveze uključuju sljedeće:

1. Ukoliko prijava sadrži podatke ispitivanja stabilnosti na najmanje 3 proizvodne serije, potrebno je obvezati se da će se dugoročne studije nastaviti kroz predloženi rok valjanosti i ubrzane studije tijekom 6 mjeseci.

2. Ukoliko prijava sadrži podatke ispitivanja stabilnosti na manje od tri proizvodne serije, potrebno je obvezati se da će se dugoročne studije nastaviti kroz predloženi rok valjanosti i ubrzane studije tijekom 6 mjeseci te da će se dodatne proizvodne serije (tako da ih ukupno bude 3) pratiti na dugoročnoj studiji kroz predloženi rok valjanosti i kroz ubrzanu studiju tijekom 6 mjeseci.

3. Ukoliko prijava ne sadrži podatke ispitivanja stabilnosti na proizvodnim serijama, potrebno je obvezati se da će se prve tri proizvodne serije pratiti dugoročnom studijom kroz predloženi rok valjanosti i kroz ubrzanu studiju tijekom 6 mjeseci.

Protokol za ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda za koji se obvezuje mora biti jednak protokolu za primarne serije (serije koje su korištene u formalnim studijama i čiji su podatci korišteni za određivanje roka valjanosti), ukoliko se drugačije ne može znanstveno opravdati.

4.2.2. Usporedba ICH smjernica za ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda sa zahtjevima nacionalnih i međunarodnih agencija

Iako nacionalne agencije propisuju svoje zahtjeve za ispitivanje stabilnosti gotovih proizvoda (Tablica 9) koji se temelje na ICH smjernicama (Tablica 5), u nekim dijelovima ipak postoje razlike.

Tablica 9. FDA, EMA i WHO smjernice za ispitivanje stabilnosti gotovih proizvoda do dobivanja regulatornog odobrenja za stavljanje lijeka u promet.

EMA	Stability Testing of New Drug Substances and Drug Products (ICH Q1A (R2)) CPMP/ICH/2736/99
	Stability Testing of Existing Active Ingredients and Related Finished Products. CPMP/QWP/122/02 Rev. 1 Corr.
	Annex: Declaration of Storage Conditions for Medicinal Products Particulars and Active Substances CPMP/QWP/609/96 Rev. 2
	Evaluation of Stability Data (ICH Q1E) CPMP/ICH/420/02
	Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products (ICH Q1D) CPMP/ICH/4104/00
	Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products (ICH Q1B) CPMP/ICH/279/95
	Stability Testing: Requirements for New Dosage Forms (ICH Q1C) CPMP/ICH/280/95
FDA	ANDAs: Stability Testing of Drug Substances and Products
	ANDAs: Stability Testing of Drug Substances and Products,Questions and Answers
	Stability Testing of Drug Substances and Drug Products-Draft Guidance
WHO	Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products

Pregledom navedenih dokumenata zaključeno je da smjernice razlikuju novi ljekoviti proizvod s novom djelatnom tvari, novi lijekoviti proizvod s već prijavljenom djelatnom tvari i novi dozirni oblik (ljekoviti oblik).

Prema krovnom dokumentu za ispitivanje stabilnosti (ICH Q1A), ICH smjernice se odnose na podatke koje je potrebno priložiti u registracijskoj dokumentaciji za nove djelatne tvari (*new molecular entities*) i pripadajuće gotove proizvode te nove dozirne oblike, a ne odnose se na podatke potrebne za prijavu gotovih proizvoda koji sadrže već prijavljene djelatne tvari, varijacije, aplikacije za klinička istraživanja itd.

Detaljne razlike između ICH, FDA, EMA i WHO smjernica, koje se odnose na provođenje ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda radi određivanja roka valjanosti i uvjeta čuvanja odnosno dobivanje regulatornog odobrenja, dane su u Tablici 10.

Tablica 10. Usporedba ICH, WHO, FDA i EMA smjernica za ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda.

Parametar	**ICH**	**WHO**	**FDA**	**EMA****
Proizvod na koji se smjernice odnose	Gotov proizvod sa novom djelatnom tvari	Gotov proizvod sa novom ili već registriranom djelatnom tvari	Gotov proizvod sa već registriranom djelatnom tvari	Gotov proizvod sa već registriranom djelatnom tvari
Uvjeti dugoročne studije	25°C ± 2°C/60% RV ± 5% RV ili 30°C ± 2°C/65% RV ± 5% RV	25 °C ± 2 °C/60% RV ± 5% RV* ili 30 °C ± 2 °C/65% RV ± 5% RV* ili 30 °C ± 2 °C/75% RV ± 5% RV*	/	/
Minimalni period dugoročnih studija obuhvaćen u vrijeme registracijske prijave	12 mjeseci	12 mjeseci ili 6 mjeseci	6 mjeseci	6 mjeseci ili 12 mjeseci
Broj serija gotovog proizvoda čiji podaci su potrebni za registracijsku prijavu	3 primarne serije (2 serije pilotne veličine i jedna manja serija)	/	/	3 primarne serije (2 serije pilotne veličine i jedna manja serija) Ili 2 serije pilotne veličine

*Odabir između predloženih uvjeta temperature i relativne vlage ovisi o klimatskoj zoni u kojoj će gotov proizvod biti stavljen na tržište.

**EMA je izdala i zasebne smjernice za nove djelatne tvari i pripadajuće gotove proizvode.

RV - relativna vlaga

WHO

U poglavlju *Područje primjene* dokumenta "Annex 2- Ispitivanje stabilnosti aktivnih farmaceutskih sastojaka i gotovih farmaceutskih proizvoda", izdanog od WHO, navedeno je kako se smjernice odnose na nove, ali i postojeće djelatne tvari i pripadajuće gotove farmaceutske proizvode. U odnosu na ICH smjernice, dokument sadrži i dodatak s preporučenim parametrima analize tijekom ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda, podijeljen prema vrsti dozirnog oblika. Općenito, tijekom ispitivanja stabilnosti gotovog proizvoda trebali bi biti procijenjeni parametri: izgled, sadržaj i razgradni produkti (onečišćenja), a kao preporuku za tablete propisano je ispitivanje sljedećih analitičkih parametara: oslobađanje djelatne tvari (ili raspadljivost, ukoliko je opravdano), sadržaj vode te tvrdoća/rastrošljivost.

Za registracijsku prijavu su potrebni podatci o ispitivanju stabilnosti gotovog proizvoda provedeni tijekom minimalno 6 ili 12 mjeseci i moraju se nastaviti dovoljno dugo da obuhvate rok valjanosti. Ukoliko gotov farmaceutski proizvod sadrži djelatnu tvar koja je dokazano stabilna i ako tijekom prvih 6 mjeseci ubrzanih ili dugoročnih studija nije došlo do značajnih promjena na gotovom proizvodu, u prijavu se mogu priložiti podatci koji obuhvaćaju samo 6 mjeseci ispitivanja stabilnosti (u vrijeme regulatorne prijave).

FDA

CDER (Center for Drug Evaluation and Research) je izdao preporuke za provođenje ispitivanja stabilnosti generičkih proizvoda, u kojem navodi da se za ANDA (Abbreviated New drug Application) prijave također prate ICH smjernice, bez obzira što se one izvorno odnose na nove djelatne tvari i proizvode. Pri tome je potrebno:

1. Predočiti podatke od tri serije pilotne veličine ili dvije pilotne veličine i jednu seriju manje veličine. Ukoliko veličina pilotne serije ne prati ICH smjernice, potrebno je obrazloženje.

2. U vrijeme prijave, priložiti podatke koji obuhvaćaju 6 mjeseci ispitivanja stabilnosti koji uključuju ubrzane i dugoročne uvjete. FDA preporuča praćenje ICH smjernica u pogledu korištenja međuuvjeta, kao podrška roku valjanosti.

3. Ukoliko je moguće, koristiti više serija djelatne tvari.

4. Proizvodnja i pakiranje gotovog proizvoda moraju pratiti načela komercijalnih procesa.

5. Dostaviti potpuno opremljenu primarnu seriju.

6. Kod primjene *bracketinga* i *matrixinga*, koristiti proizvod od sve tri primarne serije.

7. Dostaviti statističku analizu podataka, ukoliko je prikladno, u skladu s ICH Q1E (dodatak A) [63].

Prema navedenom, preporuka FDA za generičke proizvode, u odnosu na ICH smjernice za nove proizvode, razlikuje se samo u opsegu podataka iz dugoročnih studija koje je potrebno dostaviti u registracijskoj prijavi. Za generički proizvod taj period iznosi 6 mjeseci, dok je prema ICH smjernicama 12 mjeseci.

EMA

Europska agencija za lijekova (EMA) je za ispitivanje stabilnosti gotovih proizvoda izdala zaseban dokument za nove djelatne tvari i pripadajuće proizvode od dokumenta za ispitivanje stabilnosti postojećih djelatnih tvari i pripadajućih gotovih proizvoda. Smjernice za nove djelatne tvari i pripadajuće gotove proizvode su preuzete od ICH. U smjernicama za gotove proizvode s postojećim djelatnim tvarima, EMA za odabir serija propisuje dvije moguće opcije. Za konvencionalne dozirne oblike te kada je djelatna tvar stabilna, u prijavi je prihvatljivo predočiti podatke ispitivanja stabilnosti na najmanje dvije serije pilotne veličine. Za kritične dozirne oblike, ili kada je poznato da djelatna tvar nije stabilna, potrebno je predočiti podatke ispitivanja stabilnosti na tri primarne serije. U prvom slučaju, u vrijeme prijave dovoljno je predočiti podatke dugoročne studije provedene tijekom 6 mjeseci, dok je u drugom slučaju u vrijeme prijave potrebno predočiti podatke studije provedene tijekom 12 mjeseci, a studije se trebaju nastaviti kako bi obuhvatile predloženi rok valjanosti.

5. ZAKLJUČAK

Stabilnost se definira se kao sposobnost djelatne tvari ili gotovog proizvoda da do kraja roka valjanosti ostane unutar utvrđenih specifikacijskih granica, čime zadržava identitet, jakost, kvalitetu i čistoću [1]. Ispitivanje stabilnosti omogućava razumijevanje utjecaja okolišnih uvjeta na gotov proizvod i njihov dugoročni efekt. Dobiveni podatci se koriste za razvoj formulacije, pri odabiru proizvodnih postupaka, pakiranja, određivanju uvjeta čuvanja i roka valjanosti.

Ispitivanje stabilnosti se provodi u svim fazama razvoja farmaceutskog proizvoda - tijekom ranog razvoja formulacije tableta ispituje se stabilnost djelatne tvari i interakcije djelatne tvari s pomoćnim tvarima; zatim i utjecaj proizvodnih procesa i pakiranja na stabilnost konačne formulacije. Podatci dobiveni tijekom razvojnih faza usmjeravaju proces donošenja odluka i tijek razvojnog projekta prilikom razvoja novog farmaceutskog proizvoda.

Formalnim se studijama, na temelju čijih podataka se potvrđuju uvjeti čuvanja i rok valjanosti, ispituje utjecaj različitih okolišnih čimbenika na gotov proizvod, poput topline, vlage i svjetla. Odabir uvjeta za provođenje dugoročnih studija ispitivanja stabilnosti ovisi o klimatskoj zoni u kojoj se gotov proizvod planira staviti na tržište. S obzirom na to, svijet je podijeljen u 4 klimatske zone (I, II, III, IV). Područje EU, SAD i Japana pripadaju u I II klimatsku zonu. Studije ispitivanja stabilnosti se provode prije predavanja registracijske prijave koja mora uključivati podatke dugoročnih studija (12 mjeseci) i ubrzanih studija (6 mjeseci). Ispitivanja na međuuvjetima (pomoćni test stabilnosti) provode se pri uvjetima koji su blaži od onih primijenjenih u ubrzanim ispitivanjima (6 mjeseci).

Ispitivanje stabilnosti čini skup kompleksnih postupaka koji podrazumijevaju značajan trošak, vrijeme i znanstvene ekspertize kako bi se kvaliteta, djelotvornost i sigurnost ugradili u proizvod. Mnoge serije proizvoda je potrebno iskoristiti za ispitivanje stabilnosti, a

ponekad to uključuje isti proizvod u sličnim pakiranjima ili različitim dozama. Količina testiranih uzoraka može se smanjiti primjenom statističkih studija reduciranog dizajna - *bracketinga* i *matrixinga*. Prisilna razgradnja je postupak razgradnje gotovih proizvoda i djelatnih tvari izlaganjem istim uvjetima koji su mnogo grublji od onih koji se primjenjuju u ubrzanim studijama. Pri tome se stvaraju razgradni produkti koji se mogu proučavati radi određivanja stabilnosti molekule. Za razliku od studija ispitivanja stabilnosti, studije prisilne razgradnje pomažu u stvaranju razgradnih produkata u puno kraćem vremenu, najčešće u nekoliko tjedana. Uzorci koji nastanu mogu se koristiti za razvoj stabilitetno-indikativnih analitičkih metoda (SIM) koje se mogu koristiti kasnije za analizu uzoraka iz ubrzanih ili dugoročnih studija ispitivanja stabilnosti. SIM su kvantitativne analitičke metode koje se temelje na karakterističnim strukturnim, kemijskim i biološkim karakteristikama djelatne tvari ili gotovog proizvoda, a cilj im je razlikovati djelatnu tvar od njezinih razgradnih produkata kako bi djelatna tvar mogla biti precizno izmjerena.

Studije ispitivanja stabilnosti na gotovom proizvodu bi trebale uključivati ispitivanje onih analitičkih parametara koji su skloni promjenama tijekom skladištenja te mogu utjecati na njegovu kvalitetu, sigurnost i/ili djelotvornost. Promjene u tabletama mogu biti posljedica kemijske nestabilnosti, odnosno oksidacije, hidrolize ili fotokemijske razgradnje te mogu uzrokovati razgradnju djelatne tvari i nastajanje razgradnih produkata. Fizikalne nestabilnosti često dovode do polimorfnih prijelaza djelatne tvari, a promjene brzine oslobađanja djelatne tvari u tabletama najčešće su uzrokovane promjenom vlage. Nestabilnost tableta najčešće dovodi do promjena u izgledu, tvrdoći, rastrošljivosti, sadržaju vode, brzini oslobađanja djelatne tvari, sadržaju djelatne tvari i razgradnih produkata. Najčešće analitičke tehnike i metode koje se koriste za praćenje nastalih promjena su redom:

refleksijska spektroskopija, mjerenje tvrdoće i rastrošljivosti tableta, Karl Fischer titracije, ispitivanje oslobađanja djelatne tvari (*dissolution*) i HPLC.

Temeljne smjernice za provođenje studija ispitivanja stabilnosti gotovih proizvoda, za područje klimatskih zona I i II, izdala je ICH organizacija. Na ICH smjernicama se temelje i zahtjevi većine regulatornih agencija (EMA, FDA, WHO). Regulatorni zahtjevi za provođenje studija ispitivanja stabilnosti su s vremenom postali prilično jasni i strogo definirani kako bi se postigao cilj - osigurati sigurnost i djelotvornost gotovog proizvoda kroz definiranje uvjeta čuvanja i roka valjanosti. Zbog toga je ispitivanje stabilnosti potrebno provesti u skladu sa znanstvenim načelima i razumijevanjem regulatornih zahtjeva.

Dakle, zaključno se može ustvrditi da se ispitivanje stabilnosti lijekova provodi prvenstveno radi dobrobiti pacijenata, potom za zaštitu ugleda proizvođača, kao zahtjev regulatornih agencija pri registraciji lijeka te radi prikupljanja podataka koji mogu biti korisni pri oblikovanju novih farmaceutskih proizvoda.

6. LITERATURA

[1] Gokani RH, Desai KN. Stability study:Regulatory requirement. Int J of Adv in Phar Ana. 2012;2:73-78.

[2] Velagaleti R. Stability and Shelf Life of Pharmaceutical Products. U: Gad SC. ur. Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulations and Quality. John Wiley & Sons, Inc.; 2010, str. 2.

[3] Markens U. Conducting Stability Studies: Recent Changes to Climate Zone IV. *Life Science* 2009;13:1-4.

[4] Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Školska knjiga; 2003, str. 147.

[5] Davies P, Oral Solid Dosage Forms. U: Gibson M. ur. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. Informa Healthcare USA, Inc.; 2009, str. 367-430.

[6] Guo Y, Impact of Solid-State Characteristics to the Physical Stability of Drug Substance and Drug Product. U: Huynh-Ba K. ur. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. Springer; 2009, str. 241-262.

[7] Kommanaboyina B, Rhodes, CT. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug development and industrial pharmacy* 1999; *25*(7):857-868.

[8] WHO Expert Commitee on Specifications for Pharmaceutical Preparations,

a) Annex 2 Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Pharmaceutical Products, World Health Organ Tech Rep Ser. 2014;(986):87-116.

b) Appendix 2 Examples of Testing Parameters, World Health Organ Tech Rep Ser. 2009;(986):124-127.)

[9] Grimm W, A Rational Approach to Stability Testing and Analytical Development for NCE, Drug Substance, and Drug Products: Marketed Product Stability Testing. U: Carstensen J T, Rhodes C T, ur. Drug Stability, Principles and Practises. Marcel Dekker, Inc.; 2000, str. 416-483

[10] Zakon o lijekovima i medicinskim proizvodima, Hrvatska farmakopeja. Narodne novine 2007. *Available at:*

http://zakon.poslovna.hr/public/hrvatska-farmakopeja/413466/zakoni.aspx. Accessed June9, 2016.

[11] USP (1151): Pharmaceutical Dosage Forms. *Available at:*

http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/pharmaceuticalDosageForms.pdf.

Accessed June9, 2016.

[12] Dutt K, Sharma SK. Immediate Drug Release Tablets: a Review. Advance Research in Pharmaceuticals and Biologics 2014;

[13] Loftsson T. Drug Stability for Pharmaceutical Scientists. Elsevier; 2014, str. 115-120.

[14] Guo Y, An Overview of Physical Stability of Pharmaceuticals. U: Huynh-Ba K. ur. Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets. Springer; 2010, str. 145-152.

[15] Zhou D. Understanding Physicochemical Properties for Pharmaceutical Product Development and Manufacturing II: Physical and Chemical Stability and Excipient Compatibility. Journal of Validation Technology 2009;15(3):36-47.

[16] Waterman KC, Understanding and Predicting Pharmaceutical Product Shelf-Life. U: Huynh-Ba K. ur. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. Springer; 2009, str. 115-138.

[17] Waterman KC, MacDonald BC. Package Selection for Moisture Protection for Solid, Oral Drug Products. J Pharm Sci 2010;99:4437–4452.

[18] Yoshioka S, Stella VJ, Stability of Drugs and Dosage Forms. Kluwer Academic Publishers; 2002,
a) Stability of Dosage Forms, str. 159.
b) Regulations, str. 225.

[19] Narang AS, Desai D, Badawy S. Impact of Excipient Interactions on Solid Dosage Form Stability. Pharm Res 2012;29:2660-2683.

[20] Waterman KC, Adami RC, Alsante KM i sur. Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. Pharm Dev Technol. 2002;7:1-32.

[21] Rick NG. Drugs: From Discovery to Approval. John Wiley & Sons,inc.; 2015, str. 231-252.

[22] ICH. About ICH. Vision.
Available at: www.ich.org/about/vision. Accessed June9, 2016.

[23] Allen LV Jr, Dosage Form Design and Development. Clin Ther. 2008;30(11):2102-2111.

[24] Antipas AS, Landis MS, Solid state Excipient Compatibility Testing. U: Swarbrick J. ur. Pharmaceutical Stress Testing. Taylor & Francis Group; 2005, str. 419-458.

[25] Shete S, Dhale C, Joshi S, Hole R. Force Degradation Study to Stability Indicating Method. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2014;3(8):863-873.

[26] Crowley P, Martini lG. Drug-Excipient Interactons. Pharm. Technol. 2001;13:26-34.

[27] Gaisford S, Saunders M. Essentials of Pharmaceutical Preformulation. Wiley-Blackwell; 2013, str. 181-209.

[28] Durig T, Fassihi A R. Identification of Stabilizing and Destabilizing Effects of Excipient-Drug Interactions in Solid Dosage Form Design. Int. J. Pharm. 1993;97:161-170.

[29] Chadha R, Bhandari S. Accepted Manuscript Drug-excipient compatibility screening–role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. J. Pharm. Biomed. Anal. 2013.
Available at: http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jpba.2013.06.016. *Accessed June9, 2016.*

[30] Buehler G, Huynh-Ba K, Regulatory Perspectives on Product Stability. U: Huynh-Ba K. ur. Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets. Springer; 2010, str. 9-14.

[31] Argentine MD, Jansen PJ, Packaging-Induced Interactions and Degradation K. U: Huynh-Ba K. ur. Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets. Springer; 2010, str. 135-144.

[32] Allinson JG, Dansereau RJ, Sakr A. The effects of packaging on the stability of a moisture sensitive compound. Int. J. Pharm. 2001;221:49-56.

[33] Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs - A Review. Journal of Pharmaceutical Analysis 2014;4(3):159–165.

[34] Cione AP, Tonhi E, Silva P. Stability Indicating Methods. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, Prof. Yukihiro Shoyama (Ed.), InTech 2011, DOI: 10.5772/19940.

Available at: http://www.intechopen.com/books/quality-control-of-herbal-medicines-and-related-areas/stability-indicating-methods. Accessed June9, 2016.

[35] Klick S, Muijselaar PG, Waterval J, Eichinger T i sur. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. Pharm.Technol. 2005;29:48-66.

[36] Hotha K, Reddy S, Raju VK, Ravindranath LK. Forced Degradation Studies: Practical Approach-Overview of Regulatory Guidanceand Literature for Drug Products and Drug Substances. International research Journal of Pharmacy 2013;4(5):78-85.

[37] Aubry A, Tattersall P, Ruan J, Development of Stability Indicating Methods. U:Huynh-Ba K.ur. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development-Regulations, Methodologies, and Best Practices. Springer; 2009, str. 139-162.

[38] Charde MS, Kumar J, Welankiwar AS, Chakole RD. Review: Development of forced degradation studies of drugs. International Journal of Advances in Pharmaceutics 2013; 2(3):34-39.

[39] Welankiwar A, Saudagar S, Kumar J, Barabde A. Photostability Testing of Pharmaceutical Products. Int. Res. J. Pharm. 2013;4(9):11-15.

[40] Tonnesen HH. Review - Formulation and stability testing of photolabile drugs. Int. J. Pharm. 2001;225:1–14.

[41] Sehrawat R, Maithani M, Singh R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. Chromatographia 2010;72:1-6.

[42] Bakshi M, Singh S, Development of Validated Stability-indicating Assay Methods Critical Review. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002;28:1011–1040.

[43] Rheea Y, Park C, Shin Y, Kamb S, Lee K, Park E. Application of Instrumental Evaluation of Color for the Pre-formulation and Formulation of Rabeprazole. Int. J. Pharm. 2008;350:122-129.

[44] USP, *General Information (*1061) Color—Instrumental Measurement.

Available at: https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1061.pdf. Accessed June9, 2016.

[45] Berberich J, Dee KH, Hayauchi Y, Portner C. A New Method to Determine Discoloration Kinetics of Uncoated White Tablets Occurring During Stability Testing—an Application of Instrumental Color Measurement in the Development Pharmaceutics. Intern. J. Pharm. 2002;234:55-66.

[46] Stark G, Fawcett JP, Tucket IG, Weatherall IL. Instrumental Evaluation of Color of Solid Dosage Forms During Stability Testing. Int. J. Pharm. 1996;143:93-100.

[47] Rhines T, Non-chromatographic Methods to Support Stability Program. U: Huynh-Ba K. ur. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. Springer; 2009,str. 201-221.

[48] European Pharmacopeia 2.9.7. Friability of Uncoated Tablets 01/2005:20907.
Available at:
http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/02_methods_of_analysis/2.9.__pharmaceutical_technical_procedures/2.9.7.%20Friability%20of%20uncoated%20tablets.pdf. Accessed June9, 2016.

[49] Gerhardt AH. Moisture Effects on Solid Dosage Forms - Formulation, Processing, and Stability. Journal of GXP Compliance 2009;13:58-67.

[50] Ph. Eur. 8.5.; 07/2015:20512; 2.5.12. Water: Semi-micro Determination
Available at:
http://online6.edqm.eu/ep808/NetisUtils/srvrutil_getdoc.aspx/1L34oEJ0mE39SCZ0rCJ95BcXqRG00/20512E.pdf. Accessed June9, 2016.

[51] Schott Application Manual, KF Titration
Available at: http://www.si-analytics.com/fileadmin/upload/Gebrauchsanleitungen/Titration/TitroLine/INT/TL-KF_Application-Manual_520-KB_English-PDF.pdf. Accessed June9, 2016.

[52] Mettler Toledo. Good Titration Practice in Karl Fischer Titration. GTP Brochure.

[53] Schlink R, Risse H. Determination of the water content in tablets by automated Karl Fischer titration. Metrohm AG. *Available at:*
http://www.metrohm.com/en/applications/%7B25892D02-6172-48DB-86D1-9FD92AB1F908%7D

[54] Vidal NLG, Brevedan IV, Varillas MA, Simionato LD, Pizzorno M. Effect of Accelerated-Aging Conditions on the Dissolution Stability of Ciprofloxacin Tablets. Dissolution Technologies 2010;23-29.

[55] Uddina R, Saffoonb N, Sutradhara KB. Dissolution and Dissolution Apparatus: A Review. Int J Cur Biomed Phar Res. 2011;1:201-207.

[56] Murthy KS, Ghebre - Seliassie I. Current Perspectives on the Dissolution Stability of Solid Oral Dosage Forms. J. Pharm. Sci. 1993;82:113-126.

[57] Technical Brief: In Vitro Dissolution Testing for Solid Oral Dosage Forms. Particle Sciences 2010;5.

[58] Babu BR. Method development and validation for dissolution testings. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 2011;2:561-575.

[59] Wong AW, Datla A. Assay and Stability Testing. U: Ahuja S, Dong M. ur. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Elsevier; 2005, str. 335-358.

[60] Maggio RM, Vignaduzzo SE, Kaufman TS. Practical and Regulatory Considerations for Stability-indicating Methods for the Assay of Bulk Drugs and Drug Formulations. Accepted Manuscript. Trends in Analytical Chemistry 2013;49:57-70.

[60] ICH. Work Products. CTD.

Available at: http://www.ich.org/products/ctd.html. Accessed June9, 2016.

[61] ICH Quality Guidelines, *Q1A- Q1D*

Available at: http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html.

Accessed June9, 2016.

[62] Bhattacharyya PK, Drug Stability. U: Shargel L, Kanfer I. ur. Generic Drug Product Development, Solid Oral Dosage Forms. CRC Press; 2014, str. 139-170.

[63] Center for Drug Evaluation and Research, FDA 2013: Guidance for Industry. ANDAs: Stability Testing of Drug Substances and Products. *Available at:*

http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm320590.pdf. Accessed June9, 2016.

7. POPIS SKRAĆENICA

ANDA	Abbreviated New Drug Application	Skraćena prijava za novi lijek
CDER	Center for Drug Evaluation and Research	Centar za evaluaciju lijekova i istraživanje
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage	Internacionalna komisija za osvjetljenje
CTD	Common Technical Document	Zajednički tehnički dokument
DSC	Differential Scanning Calorimetry	Diferencijalna pretražna kalorimetrija
DTA	Differential Thermal Analysis	Diferencijalna termalna analiza
EMA	European Medicines Agency	Europska agencija za lijekove
FDA	Food and Drug Administration	Američka agencija za hranu i lijekove
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
HDPE	High Density Polyethylene	Polietilen visoke gustoće
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HSM	Hot Stage Microscopy	Termalna mikroskopija *(hot stage)*
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničke dokumentacije za lijekove
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	Spregnuta tehnika tekućinska kromatografija-masena spektrometrija
LC-NMR	Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Spregnuta tehnika tekućinska kromatografija-nuklearna magnetska rezonancija
NCE	New Chemical Entity	Novi kemijski entitet
PMDA	The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency	Agencija za lijekove i medicinske proizvode
PVC	Polyvinyil chloride	Polivinil klorid
PVC/PVDC	Polyvinyil chloride/	Polivinil klorid/

	Polyvinylidene chloride	poliviniliden klorid
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza
RV	/	Relativna vlaga
SEM	Scanning Electron Microscopy	Pretražna elektronska mikroskopija
SIM	Stability-Indicating Method	Stabilitetno-indikativna metoda
TGA	Thermogravimetric Analysis	Termogravimetrijska analiza
USP	United States Pharmacopeia	Američka farmakopeja
UV/VIS	Ultraviolet/Visible Spectrophotometry	Spektrofotometrija u ultraljubičastom i vidljivom području
WHO	World Health Organization	Svjetska zdravstvena organizacija
XRPD	X-ray Powder Diffraction Analysis	Rendgenska difrakcijska analiza