Fotolabilność substancji leczniczych – przegląd aktualnych badań i strategie postępowania

Marzena Jamróiewicz, Aneta Karczewska-Kaliszak, Karolina Milewska

ORCID: Marzena Jamróiewicz (ORCID iD: 0000-0002-2637-9886)

Karolina Milewska (ORCID iD: 0000-0002-8701-0396)

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska

Autor do korespondencji: Marzena Jamróiewicz, Katedra i Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Hallera 107, 80-416 Gdańsk, e-mail: marzena.jamrogiewicz@gumed.edu.pl

Badania fotostabilności substancji leczniczych

Niektóre substancje czynne, jak i substancje pomocnicze, są wrażliwe na promieniowanie świetlne, przez co ulegają procesowi fotodegradacji, czyli indukowanej światłem zmianie fizykochemicznej. Proces ten może mieć miejsce na etapie produkcji, jak również transportu, przechowywania oraz klinicznego zastosowania produktu. W wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego, jakim jest światło, z materią, czyli substancją (zarówno w postaci proszku, jak i cieczy), dokonują się zmiany chemiczne w cząsteczce substancji czynnej, powstają nowe związki, dochodzi do dimeryzacji, transformacji czy też utleniania. Reakcje fotochemiczne mogą być w konsekwencji powodem niespełnienia kryteriów jakości gotowego leku oraz naruszać bezpieczeństwo produktu końcowego [1].

Podstawowa procedura przeprowadzania badań trwałości substancji leczniczych i produktów leczniczych opisana jest w wytycznych Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Leków Stosowanych u Ludzi, tzn. ICH (ang. *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) i obowiązuje od stycznia 1998 r. [2]. Wytyczne oznaczone akronimem ICH Q1B zawierają informacje na temat sposobu przeprowadzania badań fotostabilności przy użyciu odpowiednich procedur, aparatury oraz źródeł emisji promieniowania z zakresu nadfioletu i światła widzialnego [3].

Wytyczne ICH Q1B obejmują dwa główne rodzaje testów, mianowicie „wymuszoną degradację” oraz

badania „potwierdzające”. Badania wymuszonego rozpadu są wykorzystywane do wyjaśnienia mechanizmów fotodegradacji oraz do opracowania procedur właściwej produkcji, pakowania, przechowywania, klinicznego zastosowania API (ang. *active pharmaceutical ingredient*) oraz produktu leczniczego. Badania te mają również na celu opracowanie odpowiedniej metody analitycznej zdolnej do wizualizacji potencjalnych zmian zachodzących w produkcie leczniczym bądź wykazania specyficzności już istniejącej metody. Test „potwierdzający”, jak sugeruje nazwa, ma na celu potwierdzenie, czy zalecane warunki przechowywania i opakowanie leku są odpowiednie i wystarczające do ochrony API i produktu leczniczego. Ekspozycja na światło dla badania potwierdzającego odzwierciedla ekspozycję na promieniowanie ultrafioletowe i światło widzialne przez 3 miesiące dla produktu leczniczego bez opakowania ochronnego w aptece, magazynie lub w domu, w warunkach klimatycznych odpowiadającym Stanom Zjednoczonym oraz Europie Północnej. Tym samym, dla lokalizacji geograficznych o większej liczbie godzin oraz większej intensywności okres nasłonecznienia jest znacznie krótszy. Takie wytyczne dotyczące badań są ustalane w zależności od położenia geograficznego (strefy) kraju, w jakim się odbywają.

Badania fotostabilności mogą zostać przeprowadzone na dowolnym etapie wytwarzania i rozwoju produktu leczniczego. Jeżeli istnieje podejrzenie o niestabilności substancji lub produktu, zaleca się potwierdzenie tych informacji na wczesnym etapie, aby móc zastosować odpowiednią strategię produkcji i pakowania.

Light-sensitive medicinal compounds – the latest review of studies and strategies in proceedings

The main procedure for stability testing of Active Pharmaceutical Ingredients (API) and medicinal products is described in the guidelines of the International Council for the Harmonization of Technical Requirements for Human Drugs (ICH). However, these guidelines do not contain specific procedures and methodologies that must be followed in stress testing, especially photostability tests. On the basis of the latest, current research reports which have been published, as well as scientific literature this article provide current information about photolabile medicinal compounds, the structure and properties of their degradation products, as well as various strategies of proceedings.

The ICH Q1B guidelines cover two main types of tests, namely 'forced degradation' and 'confirmatory' tests for medicinal products and medical devices and supplements. Forced degradation studies are used to explain the mechanisms of photodegradation and to develop procedures for the proper production, packaging, storage, clinical / production use of the active pharmaceutical ingredient and the final product. These studies are also aimed at developing an appropriate analytical method capable of visualizing potential changes occurring in the medicinal product or demonstrating the specificity of an already existing method. The "confirm" test, as the name suggests, is intended to confirm that the recommended storage conditions and packaging of the medicine are adequate and sufficient to protect the medicinal product. Light exposure for confirmatory testing roughly reflects exposure to typical ultraviolet and visible light for 3 months in case of a medicinal product without protective packaging in a pharmacy, warehouse or home (in the United States / Northern Europe). Therefore, for geographical locations with a greater number of hours and greater sunlight intensity, this period is much shorter. Such test guidelines are determined depending on the geographical location (zone) of the country in which they take place. People believe that product they use and eat are safety while most of the society are convinced that current guidelines concerning quality evaluation of medicinal products are unified and concentrate on verification of stability through determination by particular tests. The purpose of this review is to discuss with criticism all current recommendations referring to the photostability tests performed for pharmaceutical industry mostly connected with human life as pharmacy. The estimation of all existing and obligatory requirements with their gaps are discussed.

Keywords: photostability, photolability, Active Pharmaceutical Ingredient (API).

© Farm Pol, 2019, 75 (10): 575–583

Uleganie procesowi fotodegradacji jest uzależnione od absorpcji promieniowania [4]. Zatem, jeżeli dana cząsteczka nie absorbuje światła o długości fali powyżej 290 nm, a jest to najmniejsza długość fali obecna w świetle słonecznym docierającym do Ziemi, wówczas można uznać cząsteczkę za fotostabilną. Jeżeli związek posiada molowy współczynnik absorpcji na poziomie nie większym niż 1000 dm³/mol/cm przy długości fali z zakresu 290–700 nm, istnieje małe prawdopodobieństwo, że związek ten jest na tyle reaktywny, aby

zainicjować proces fotodegradacji [5]. Ważne jest jednak przeprowadzenie badań stabilności nie tylko dla cząsteczki API, ale finalnej postaci leku, ponieważ znane są w literaturze przypadki występowania fotostabilnego API wykazującego niestabilność w produkcji leczniczym.

Oceniane próbki powinny być ekspozycjonowane na działanie światła, w dawce przekraczającej wymagane w dokumencie ICH Q1B minimum, tj. 200 watogodzin/m² UV-A oraz 1,2 miliona luksogodzin promieniowania widzialnego. Wytyczne ICH przyjmują dwie możliwości ekspozycji na światło. Pierwsza polega na zastosowaniu pojedynczego źródła promieniowania w postaci:

- lampy ksenonowej lub metalowej lampy halogenowej,
- lampy emitującej promieniowanie widzialne i ultrafioletowe,
- sztucznego światła dziennego fluorescencyjnego.

Druga możliwość to ekspozycja na dwa źródła promieniowania jednocześnie przy użyciu:

- zimnej białej lampy fluorescencyjnej określonej przez ISO10977,
- lampy fluorescencyjnej emitującej światło ultrafioletowe w zakresie 320–400 nm.

Obie możliwości mają swoje zalety i wady, niektóre z nich zostały podsumowane w tabeli 1. Wytyczne dotyczące badań fotostabilności spełnia komora do badań starzeniowych Suntest CPS+, która jest rekomendowana przez ICH. Aby w pełni zrozumieć mechanizmy fotodegradacji może okazać się konieczne zastosowanie obu dopuszczalnych przez ICH wyżej wymienionych metod.

Istnieje kilka dodatkowych czynników, które należałoby rozważyć w przypadku wyboru drugiej metody. W momencie korzystania z dwóch różnych źródeł jednocześnie może okazać się, że bardzo istotna jest kolejność ekspozycji próbki na lampy UV i światła widzialnego. Ekspozycja na promieniowanie UV może inicjować proces degradacji, w wyniku którego powstanie barwny produkt, który pochłonie światło widzialne, potencjalnie prowadząc do dalszego postępu degradacji. Istotny również jest czas przeprowadzanego eksperymentu. Przy wyborze metody z dwoma różnymi źródłami promieniowania czas ten jest znacznie dłuższy i wynosi 5 dni narażenia na zimną białą lampę fluorescencyjną oraz 1–2 dni na lampę fluorescencyjną o zakresie ultrafioletowym. Natomiast czas eksperymentu przy użyciu pojedynczego źródła promieniowania mieści się w zakresie 7,5–22 godzin. O tym skąd wiadomo, że zapewniono prawidłową ilość światła podczas badania można dowiedzieć się stosując szereg fizycznych metod określania dawki promieniowania, m.in. aktynometr chemiczny, luksomierz, miernik mocy optycznej czy spektrometr.

Tabela 1. Wady i zalety metod ekspozycji próbki na promieniowanie świetlne.

Table 1. Advantages and disadvantages of sample exposure to light radiation.

Pojedyncze źródło promieniowania, np. Suntest CPS+		Dwa źródła działające jednocześnie
Procesy termiczne	Emitowane światło charakteryzuje się większą intensywnością i powoduje wytwarzanie większej ilości ciepła, zamknięty układ może ograniczyć ucieczkę pochłoniętego ciepła, prowadząc do degradacji termicznej badanego związku. Ta metoda wymaga również obecności urządzenia chłodzącego w trakcie przeprowadzania badania, które może stanowić problem techniczny w postaci zbyt silnego nadmuchu powietrza	Mniejsza ilość wytwarzanego ciepła w trakcie badania niż w przypadku pojedynczego źródła
Czas ekspozycji	Krótszy czas ekspozycji, natomiast metoda ta prowadzi do nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UV	Zazwyczaj przy wykorzystaniu tej metody naświetlanie odbywa się w sposób sekwencyjny, przy niższej intensywności emitowanego światła
Zakres spektralny	Metoda ta obejmuje pojedynczą lampę o szerokim zakresie spektralnym 250-765 nm	Metoda ta obejmuje dwa źródła promieniowania o słabym pokryciu pomiędzy 380-400 nm

Dokument ICH nie zawiera wyczerpujących informacji niezbędnych podczas przeprowadzania testów fotostabilności. Jednym z nich jest pytanie odnośnie zmian zachodzących w cząsteczce API bądź produktu leczniczego pod wpływem światła, mianowicie, jakie zmiany są dopuszczalne, a jakie wymagają działań prewencyjnych. Każda zmiana wpływająca negatywnie na jakość, skuteczność i bezpieczeństwo stosowania leków jest niedopuszczalna, a zmiany te obejmują:

- utratę aktywności i/lub skuteczności,
- wpływ na biodostępność produktu leczniczego,
- tworzenie toksycznych produktów,
- tworzenie stabilnych produktów o aktywności farmakologicznej różniącej się od leku macierzystego,
- dostrzegalne zmiany fizyczne.

Kolejnym nie do końca wyjaśnionym aspektem, który rodzi wiele wątpliwości, jest forma, w jakiej należy przygotować próbkę do badań. Stabilność światłoczułej substancji maleje w szeregu: krystaliczne ciało stałe, zawiesina/dyspersja, roztwór. Stałe preparaty, które występują np. w formie liofilizatów, stałych dyspersji czy proszków suszonych rozpyłowo mogą charakteryzować się większą światłoczułością niż krystaliczna postać tego samego związku [6]. Zasadniczo wybór formy próbki do badania powinien być uwarunkowany postacią, w jakiej występuje w gotowym produkcie leczniczym. Stwierdzenie to może prowadzić do dalszych pytań, między innymi, czy istnieje odpowiedni współrozpuszczalnik, jeżeli jest niezbędny do uzyskania roztworu lub, czy istnieje zalecane stężenie badanej próbki. Opinia na temat

rozpuszczalników jest podzielona, gdyż mogą one uczestniczyć w reakcjach fotochemicznych i przyczyniać się do rozpadu substancji czynnej. Bez względu na to, jaki rozpuszczalnik zostanie wykorzystany, ważne jest, aby zastosować go w jak najmniejszej ilości koniecznej do uzyskania wymaganej rozpuszczalności. Alternatywą dla zastosowania współrozpuszczalnika może być zastosowanie bardziej rozcieńczonego roztworu. Jest to jednak ryzykowne rozwiązanie, ponieważ substancja występująca w niższym stężeniu w roztworze wykazuje znacznie mniejszą stabilność niż roztwór stężony. W badaniach fotostabilności najczęściej stosuje się stężenie roztworów 100 µg/ml.

W przypadku substancji leczniczej występującej w postaci proszku lub zawiesiny bardzo ważne jest uwzględnienie wielkości cząstek badanego proszku. Stała szybkości reakcji fotodegradacji substancji sproszkowanej wzrasta wraz ze zmniejszeniem wielkości ziaren proszku [7].

Ważnym praktycznym aspektem dla badań fotostabilności jest również sposób ekspozycji badanej próbki na źródło promieniowania. Substancja lecznicza oraz produkt leczniczy powinny być naświetlane w taki sposób, aby zapewnić maksymalny obszar narażenia próbki na promieniowanie. Substancje występujące w postaci proszków powinny wytworzyć w analizowanej próbce gładką powierzchnię o grubości nie większej niż 3 mm. Wszystkie lampy, stanowiące źródło promieniowania w badaniach fotostabilności, wytwarzają ciepło jako produkt uboczny. Zamknięty układ, w którym występuje badana próbka, może nie pozwolić na utratę pochłoniętego ciepła, potencjalnie

prowadząc do degradacji termicznej i w konsekwencji do zmiany fotochemicznej. Z tego względu wiele komór do badania fotostabilności wyposażonych jest w wentylatory wspomagające chłodzenie. Niestety nawet przy odpowiednio dobrym chłodzeniu zawsze istnieje ryzyko wzrostu temperatury w próbce. W celu wykluczenia wpływu podwyższonej temperatury na badaną próbkę równolegle badaniu poddaje się próbkę kontrolną, tzw. „dark”, to znaczy owinięta folia aluminiową.

Badanie fotostabilności wymaga również uwzględnienia aspektu fototoksyczności. W literaturze pojawia się coraz więcej doniesień na temat korelacji wyników badań fotostabilności i prognozowania fototoksyczności powstających produktów [8,9]. Zjawisko to jest szczególnie często obserwowane wówczas, gdy droga fotodegradacji obejmuje wytwarzanie reaktywnych form tlenu.

Fotodegradacja substancji leczniczych

W celu opracowywania nowych strategii badań fotostabilności i skutecznej ochrony przed fotodegradacją różnych postaci leków, istotna jest znajomość mechanizmów ich rozpadu pod wpływem promieniowania z zakresu nadfioletu i światła widzialnego [10].

Degradacja fotochemiczna substancji czynnej może w konsekwencji prowadzić do utraty jej aktywności bądź powodować poważne w skutkach działania niepożądane [11]. W zależności od budowy chemicznej cząsteczki może dojść do różnych interakcji fotochemicznych. Przykładowo, cząsteczka ketoprofenu, zawierająca fragment benzofenonu i kwasu propionowego, po ekspozycji na światło ulega procesowi fotodekarboksylacji. W wyniku tego procesu tworzy się reaktywny związek pośredni, który ostatecznie transformuje w substancję fotoalergizującą, wywołującą obrzęk i rumień podczas miejscowego stosowania na skórę [12]. Innym typem reakcji fotodegradacji jest fotodehalogenacja, dotycząca większości antybiotyków fluorochinolowych, zawierających w swojej strukturze atom fluoru [13]. Kolejnym przykładem jest ryboflawina, która ulega zróżnicowanym przemianom w wyniku ekspozycji na promieniowanie z zakresu nadfioletu i światła widzialnego, na przykład reakcjom fotodehydrogenacji, fotodealkilacji i/lub fotoaddycji [14].

Polimery, które są grupą związków wielkocząsteczkowych szeroko stosowanych w medycynie i farmacji, pomimo że uchodzą za mało reaktywne związki, także ulegają degradacji pod wpływem promieniowania z zakresu UV-Vis. Takie przemiany wiążą się czasem z utratą skuteczności produktu leczniczego, stąd ich niezależne badanie fotostabilności jest także konieczne i nie może być pomijane.

Istnieje wiele czynników, które warunkują proces fotodegradacji, m.in. obecność zanieczyszczeń zawierających w swojej strukturze grupy chromoforowe, czy też występowanie związków organicznych o niskiej masie cząsteczkowej. Istotnymi czynnikami wpływającymi na proces fotodegradacji są również warunki przechowywania substancji, mianowicie różnorodna intensywność narażenia na promieniowanie z zakresu nadfioletu i światła widzialnego, a także obecność tlenu. Połączenie tych dwóch czynników determinuje wyższy procent fotodegradacji, co obserwowano przykładowo dla polistyrenu. Generalnie przyjęło się, że polimery oraz ich pochodne są stabilne fotochemicznie w warunkach narażenia na promieniowanie elektromagnetyczne poniżej wartości długości fali 290 nm [15].

Kolejnym technologicznym wyzwaniem, decydującym o fotostabilności produktów leczniczych, jest podatność białek na uszkodzenia w obecności światła. Problem ten dotyczy przede wszystkim biofarmaceutyków i występuje nie tylko na etapie produkcji, ale również dystrybucji, eliminacji opakowania podstawowego oraz podczas jego stosowania, np. podczas rozcieńczania do podawania pozajelitowego [16].

Wśród substancji leczniczych i gotowych postaci leków wiele wykazuje wrażliwość na światło. Somatotropina, ludzki hormon wzrostu, po ekspozycji na światło w obecności katalizatora w postaci metalu, ulega procesowi fotoutleniania [17]. Wykazano, że proces ten jest warunkowany tworzeniem cysteinowych rodników tiolowych, które następnie reagują z cząsteczkowym tlenem, w konsekwencji tworząc reaktywne grupy α -disulfotlenkowe, tiosulfonianowe i/lub tiosulfonianowe. Z tego względu wprowadzono na rynek preparaty zawierające somatotropinę jako produkty liofilizowane, wypełnione gazem obojętnym. Niestety rozwiązanie takie nie przyniosło w pełni oczekiwanych rezultatów, gdyż liofilizowany produkt również był podatny na fotodegradację w obecności promieniowania UV o długości fali z zakresu 305–410 nm. Jednakże w porównaniu z wynikami badań przeprowadzonych dla roztworu, stopień fotodegradacji był znacznie mniejszy [18].

Leki z grupy pochodnych 1,4-dihydropirydyny (DHP) są obecnie najczęściej stosowane w terapii nadciśnienia. Wszystkie cząsteczki związków chemicznych należących do tej grupy wykazują znaczną wrażliwość na promieniowanie świetlne, co prowadzi do utraty ich aktywności farmakologicznej. W jednej z najnowszych prac przeglądowych zebrano wiele przykładów poprawy stabilności fotochemicznej leków z tej grupy chemicznej, tj. amlodypiny, felodypiny, nikardypiny, nifedypiny, nisoldypiny, m.in. poprzez zastosowanie liposomów

z niejonowymi surfaktantami, utworzenie emulsji O/W z polioksyglicerydowymi emulgatorami i dekstrynami [19]. Procedury analityczne do monitorowania fotodegradacji leków z grupy chemicznych pochodnych DHP zostały przedstawione w wielu publikacjach naukowych, między innymi przy wykorzystaniu spektrofotometrii z zakresu UV-Vis oraz analizy danych wielowymiarowych [20].

Bardzo interesujące wyniki badań uzyskano w czasie testowania światłoczułości kilku substancji leczniczych z chemicznej grupy pochodnych 1,4-dihydropirydyny, którą skorelowano z niektórymi deskryptorami molekularnymi poprzez ilościowy model zależności struktura-właściwość (QSPR). Zastosowanie modelu umożliwia oszacowanie szybkości fotodegradacji cząsteczek [21,22].

Tworzenie kompleksów supramolekularnych substancji leczniczych z cyklodekstrynami jest jednym ze sposobów pozytywnego działania fotoprotekcyjnego na cząsteczki m.in. z grupy DHP [23]. Ostatnio opublikowano wyniki badań

fotostabilności isradypiny poprzez włączenie jej do kompleksu z β -cyklodekstryną. Fotostabilność tak powstałego połączenia monitorowano za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (ang. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) oraz spektroskopii w zakresie podczerwieni FTIR (ang. *Fourier Transfer Infrared Spectroscopy*) [38]. Podobnie butylo-metoksydibenzoilometan, który jest środkiem absorbującym promieniowanie UV i jest stosowany jako filtr w kosmetykach i preparatach przeciwsłonecznych, jest fotostabilny w kompleksie z HP- β -CD (hydroksypropylo- β -cyklodekstryną) [24].

Zapobieganie fotodegradacji

Ze względu na niepożądane w leczeniu skutki uboczne odnotowane dla fotowrażliwych substancji leczniczych opracowano sposoby, dzięki którym możliwe jest znaczne ograniczenie procesów fotodegradacji API (tabela 2). Najpowszechniejszą

Tabela 2. Skutki fotodegradacji w różnych postaciach leku oraz stosowana ochrona [1].

Table 2. The effects of photodegradation in various forms of the drug and examples of the protection.

Postać leku	Efekty fotodegradacji	Fotoprotekcja
Roztwory doustne	• utrata smaku • wytrącanie osadu rozpuszczonej substancji leczniczej • utrata barwnika, odbarwienie	• zastosowanie substancji pomocniczych • zastosowanie ochronnych opakowań, np. butelka w kolorze bursztynowym
Leki parenteralne	• zabarwienie roztworu (np. preparaty omeprazolu, pantoprazolu)	• zastosowanie przeciwutleniaczy (np. acetylocysteiny lub kwasu askorbinowego) • kolorowe opakowania wykonane z tworzywa sztucznego
Tabletki	• zmiany w wyglądzie • zmiany w profilu uwalniania substancji czynnej	• sporządzenie matrycy tabletek z udziałem cyklodekstryn • kompleksowanie supramolekularne • dodatek substancji pomocniczych
Zawiesiny	• wzrost wielkości i masy kryształów substancji czynnej • generowanie rodników hydroksylowych • utrata jednolitości zawartości leku • zmniejszenie trwałości	• zastosowanie ochronnego opakowania, użycie szkła bursztynowego lub jego modyfikowanych odpowiedników np. za pomocą wapna sodowanego lub borokrzemianu
Emulsje	• krwawienia • trąta jednolitości zawartości • zmiana estetyki wyglądu preparatu • reakcja fotolizy, często prowadząca do polimeryzacji, tworząc duże kompleksowe cząsteczki w postaci leku (np. brązowe przebarwienia roztworu adrenaliny) • wytrącanie substancji czynnej	• dodatek przeciwutleniaczy (np. butylohydroksytoluen) • dodatek reduktorów obniżających potencjał redoks (np. pirosiarczyny sodu, kwas askorbinowy) • środki wzmacniające działanie antyoksydantów (np. kwas cytrynowy, wersenian disodowy)
Kremy	• zmiana barwy • zmiana zapachu • rozdzielenie faz • rozwój mikroorganizmów	• ochronne opakowanie • dodatek stabilizatorów

metodą ochrony światłoczułych substancji jest zastosowanie odpowiedniego opakowania pierwotnego i wtórnego. W tym celu najczęściej stosuje się pojemniki szklane wykonane ze szkła bursztynowego, skuteczne w absorbowaniu promieniowania UV o długości fali 470 nm [12,25]. Innym sposobem pakowania jest wykorzystanie kolorowej folii do opakowań blistrowych lub przezroczystej folii zawierającej absorbenty UV. Do bardziej zaawansowanych metod fotoprotekcyjnych należą nowoczesne rozwiązania technologiczne w postaci systemów lipidowych, liposomów, niosomów, nanocząstek lipidów, gdzie lek zostaje rozpuszczony w wewnętrznej fazie wodnej, natomiast lipidowa otoczka stanowi ochronę światłoczułej substancji [26,27]. Innym stosowanym w praktyce rozwiązaniem są mikrosfery i mikrokapsułki, dla których mechanizm fotoprotekcji opiera się na zatrzymaniu promieniowania przez część polimerową cząsteczki, która działa jednocześnie jako bariera fizyczna i chemiczna zapobiegając procesom fotodegradacji [28].

Nowa strategia badań fotostabilności

Badania fotostabilności posiadają dość wyrafinowaną metodologię, obejmującą wiele czynników odpowiedzialnych za stabilność produktów farmaceutycznych (**rycina 1**). Takim czynnikiem są przede wszystkim właściwości fizykochemiczne substancji czynnych, ale również obecność i rodzaj substancji pomocniczych, sposób wytwarzania substancji czynnej oraz produktu końcowego, sposób

dozowania preparatu, opakowanie końcowe, a także narażenie na czynniki środowiskowe podczas transportu i przechowywania [29].

Niedostateczna fotostabilność powoduje pogorszenie jakości leków, możliwe jest również generowanie toksycznych produktów degradacji, co w znaczny sposób wpływa na bezpieczeństwo stosowania preparatów leczniczych przez pacjentów. Sztandarowym i niezwykle istotnym przykładem takiej sytuacji jest ostatnie (wrzesień 2019 r.) działanie Głównego Inspektoratu Farmaceutycznego (po publikacji EMA [30,31]), wycofujące z rynku produkty zawierające chloroderek ranitydyny z uwagi na możliwość wystąpienia w nich kancerogennych nitrozoamin. Badania nad fotostabilnością tej znanej od lat 80. XX w. substancji są obecnie priorytetami poszukiwań EMA, a przez wiele lat stanowiły obszar badawczy naukowców. Wielokrotnie wskazywali oni na produkty degradacji oznaczane w próbkach ranitydyny, w tym także związki lotne oraz wiele innych, których monografie farmakopealne nie wskazywały jako istotne do oznaczania [32,33]. Praca badawcza chemików i fizyków jest zatem nieodzownym elementem ustalania przepisów farmaceutycznych i wsparciem przy opracowywaniu ograniczania ryzyka wystąpienia podobnych sytuacji narażenia pacjentów na utratę zdrowia. Dlatego tak istotne jest szerzenie wiedzy z zakresu strategii badań fotostabilności oraz krytyczna ocena wyników i udoskonalanie już poznanych metod badawczych służących tej ocenie.

Rycina 1.
Graf obrazujący istotne czynniki wpływające na badania stabilności.

Figure 1.
Graph performing some important factors affecting stability testing.

Monitorowanie i kontrola zanieczyszczeń oraz produktów degradacji jest obecnie obowiązkowym i najważniejszym zagadnieniem dla przemysłu farmaceutycznego [34]. Dawniej oznaczenia czystości lub produktów rozpadu nie były wykonywane dla wszystkich rodzajów substancji leczniczych ze względu na niewystarczającą dostępność odpowiednich technik instrumentalnych [35,36]. Wraz z pojawieniem się nowoczesnych technik produkcji preparatów leczniczych zyskali możliwość identyfikacji ścieżki degradacji substancji czynnej oraz opracowania strategii minimalizacji obecności zanieczyszczeń, czy produktów degradacji w produkcie końcowym [37]. W efekcie zmieniły się również wytyczne.

Podstawowym urządzeniem służącym do eksperymentów nad fotostabilnością jest komora przystosowana do testów stabilności, np. Suntest CPS+ (tabela 1). Umożliwia ocenę fotostabilności w czasie rzeczywistym, jak i podczas badań przyspieszonych oraz długoterminowych.

Wnętrze komory zapewnia wszystkim badanym próbkom identyczne warunki narażenia na czynnik stresowy, jakim jest promieniowanie z zakresu UV-Vis. Komora powinna być niezawodna i wytrzymała przez długi okres trwania badań. Nowoczesne komory, w zależności od zapotrzebowania, są wyposażone w dokładny system rejestracji danych, środki bezpieczeństwa oraz alarmy.

Identyfikację oraz charakterystykę produktów fotodegradacji przeprowadza się w zależności od istniejących danych dotyczących substancji badanej. Podstawowe aspekty praktyczne, istotne podczas przeprowadzania badań nad fotostabilnością, obejmują rodzaj substancji leczniczej, jej stężenie, cel badania, zastosowane urządzenia oraz procedurę przygotowania próbki do celów analitycznych (rycina 2).

Procedura analityczna stosowana do kwantyfikacji zanieczyszczeń lub produktów degradacji jest specyficzna dla danego produktu. Metody oznaczania stabilności opracowuje się za pomocą odpowiednich przyrządów analitycznych. Zarówno od

zastosowanych urządzeń, jak i metod wymaga się wysokiej czułości oraz niskiej granicy oznaczalności, aby móc wykryć ewentualne zanieczyszczenia bądź produkty degradacji w najniższych stężeniach, a zakres liniowości powinien obejmować pożądany pik/sygnał analitu. Oczekuje się, że przyjęta metodologia analityczna umożliwi wykrycie wszystkich produktów degradacji fotochemicznej.

Badanie powinno być zaprojektowane w taki sposób, aby obejmowało co najmniej trzy próbki, w tym próbkę zerową (nieekspozowaną na czynnik stresowy), ślepą próbę (poddaną stresowi, w identycznych warunkach jak badany lek, jednak zabezpieczoną folią aluminiową przed dostępem światła, tzw. „dark”) i próbkę stresu rzeczywistego narażoną na działanie światła. Po zakończeniu narażenia na stres próbki powinny zostać przetworzone tak, aby były kompatybilne z instrumentem analitycznym. Skoncentrowane próbki można rozcieńczyć i uzyskać stężenie w pożądanym zakresie analitycznym. Próbki stałe, w zależności od metody, zazwyczaj muszą zostać rozpuszczone w odpowiednim rozpuszczalniku.

Metody chromatograficzne wykazują przewagę nad innymi metodami rozdzielania wszystkich związków w jednym cyklu, z zachowaniem dobrej selektywności, czułości, dokładności oraz precyzji. Z tego względu, techniki chromatograficzne są obecnie szeroko stosowane w celu opracowywania metod badania fotostabilności większości analitów, w tym związków nielotnych, wysoce polarnych bądź wrażliwych na ciepło [38].

Połączenie dwóch technik, takich jak chromatografia cieczowa – spektrometria mas (LC-MS) oraz chromatografia cieczowa – spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego (LC-NMR) są technikami obecnie często stosowanymi w celu identyfikacji produktów rozpadu substancji leczniczych. Co istotne, pozwalają one wyjaśnić strukturę produktów degradacji, a to z kolei pomaga podjąć niezbędne środki ostrożności, aby zahamować proces ich powstawania, a także utrzymać poziom

Rycina 2. Techniczne aspekty konieczne do uwzględnienia podczas badania fotostabilności.
Figure 2. Technical aspects necessary to consider during photostability testing.

zanieczyszczeń poniżej dopuszczalnych limitów i ograniczyć tworzenie się innych niepożądanych związków [39].

Obecnie najnowsze wytyczne wskazują, że wszelkie nieznanne zanieczyszczenia, zaobserwowane na każdym etapie rozwoju procesu produkcji, w trakcie wykonywania testów wymuszonej degradacji lub przy regularnych badaniach stabilności, są izolowane i analizowane za pomocą różnych technik chromatograficznych, mianowicie wysoko-sprawnej chromatografii ciekowej (HPLC), chromatografii cienkowarstwowej (TLC), chromatografii gazowej (GC), elektroforezy kapilarnej (CE), chromatografii kationowymiennej (CEC), chromatografii z eluentem w stanie nadkrytycznym (SFC). W przypadku pojawienia się trudności z izolacją produktów degradacji w czystej postaci, są stosowane takie techniki jak HPLC-DAD, LC-MS, LC-NMR oraz chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) [40–43].

Problem leków fotowrażliwych jest tematem zainteresowania chemików, fizyków i farmaceutów od wielu lat. W środowisku naukowym wciąż pojawiają się nowe doniesienia o światłoczułych lekach, których degradacja może prowadzić do utraty ich aktywności terapeutycznej lub tworzenia się toksycznych produktów degradacji. Obecnie duży nacisk kładzie się głównie na poznanie mechanizmów ochronnych, zabezpieczanie cząsteczek przed degradacją i transformacją, a także badanie, identyfikowanie i niwelowanie skutków powstawania substancji toksycznych dla zdrowia [32,44].

W jednym z najnowszych wydań prestiżowego czasopisma naukowego z branży farmaceutycznej naukowcy opisali opracowaną metodę HPLC do selektywnego rozdzielenia afatynibu i jego produktów degradacji powstających w warunkach hydrolytycznych, utleniających, termicznych i fotolitycznych [45]. Stwierdzono, że lek ulega degradacji we wszystkich wymienionych warunkach i generuje jedenaście produktów degradacji. Wszystkie degradanty zostały zidentyfikowane oraz scharakteryzowane. W innych pracach opisano opracowaną metodę chromatograficzną z mechanizmem separacji jonów w analizatorze mas czasu przelotu, która została rozszerzona o tandemową spektrometrię mas (LC-Q-TOF/MS/MS) w celu scharakteryzowania produktów rozpadu. Dwa główne produkty degradacji wyizolowano przy użyciu preparatywnej HPLC, a ich struktury zostały potwierdzone metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). W ciągu ostatniej dekady chromatografia ciekowa – tandemowa spektrometria mas (LC-MS/MS), w połączeniu z spektrometrią NMR, została szeroko wykorzystana do identyfikacji i charakterystyki produktów wymuszonej degradacji [46,47].

Problem fotostabilności substancji farmaceutycznych występuje nie tylko w preparatach leczniczych ale również może dotyczyć materiału biologicznego, w jakim znajdują się substancje światłoczułe. W badaniach ekspozycji na światło słoneczne i/lub sztuczne światło włosów pacjentów, u których wykryto przed badaniem amfetaminę i/lub ketaminę, wykazano, że dochodzi do fotodegradacji cząsteczki na drodze międzycząsteczkowego transferu energii [48]. Po naświetlaniu próbek włosów nie udało się oznaczyć tych substancji o działaniu narkotycznym stosując nawet tak zaawansowane analityczne metody jak wysokorozdzielcza spektrometria mas (ang. *High-Resolution Mass Spectrometry*, HRMS). O fotolabilności substancji leczniczych należy zatem pamiętać badając wszelkie matryce.

Finansowanie

Publikacja została dofinansowana z projektu unijnego „Interdyscyplinarny program studiów doktoranckich jako narzędzie kształcenia kadr dla nauki i gospodarki w obszarze profilaktyki i terapii chorób cywilizacyjnych” POWR.03.02.00-00-1035/16-00.

Otrzymano: 2019.10.21 · Zaakceptowano: 2019.10.25

Piśmiennictwo

1. Janga KY, King T, Ji N, Sarabu S, Shadambikar G, Sawant S, Murthy SN. Photostability Issues in Pharmaceutical Dosage Forms and Photostabilization. *PharmSciTech*. 2018; 19(1): 48–59.
2. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline: Stability Testing Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Q1B. 1996.
3. Jamrógiewicz M, Milewska K, Lewandowska K, Czuba K. Stabilność substancji leczniczych w kontekście trwałości leku – zbieżności definicji i różnice w podejściu analitycznym. *Farm Pol*. 2018; 74(2): 95–108.
4. Clapham D, Templeton AC, Klein LJ, Kleinman MH. Practical aspects of conducting photostability stress testing. *Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation*. Inf Healthc. 2011; 218–232.
5. Clapham D. Photostability Testing of New Drug Substances and Products. John Wiley & Sons, Inc. 2018; 45–68.
6. Grooff D, Francis F, De Villiers MM, Ferg E. Photostability of crystalline versus amorphous nifedipine and nimodipine. *J Pharm Sci*. 2013; 102(6): 1883–1894.
7. Jamrógiewicz M, Jasińska K, Sawicki W. Problematyka dotycząca zapewnienia fotostabilności substancji leczniczych w postaci leku. *Farm Pol*. 2012; 68(12): 858–866.
8. Ferguson J, DeLeo VA. Drug and chemical photosensitivity: exogenous. *Basic Clin Dermatol*. 2011; 38: 199–217.
9. Cosa G. Photo-degradation and photosensitization in pharmaceutical products: assessing drug phototoxicity. *Pure Appl Chem*. 2014;76: 263–275.
10. Tonnesen HH. Photostability of drugs and drug formulations. CRC Press. 2004.
11. Tonnesen HH. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *Int J Pharm*. 2001; 225(1): 1–14.
12. Ahmad I, Ahmed S, Anwar Z, Sheraz MA, Sikorski M. Photostability and photostabilization of drugs and drug products. *Int J Photoenergy*. 2016; 1–19.
13. Fasani E, Profumo A, Albini A. Structure and mediumdependent photodecomposition of fluoroquinolone antibiotics. *Photochem Photobiol*. 1998; 68(5): 74–666.
14. Insińska-Rak M, Sikorski M. Riboflavin interactions with oxygen – a survey from the photochemical perspective. *Chem Eur J*. 2014; 20(47): 15280–15291.

15. Yousif E, Haddad R. Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review. *SpringerPlus*. 2013; 2(1): 1.
16. Budai M, Szabó Z, Zimmer A, Szögyi M, Gróf P. Studies on molecular interactions between nalidixic acid and liposomes. *Int J Pharm*. 2004; 279(1): 67–79.
17. Chang SH, Teshima GM, Milby T, Gillece-Castro B, Canova- Davis E. Metal-catalyzed photooxidation of histidine in human growth hormone. *Anal Biochem*. 1997; 244: 221–227.
18. Hageman MJ, Bauer JM, Possert PL, Darrington RT. Preformulation studies oriented towards sustained delivery of recombinant somatotropins. *J Agric Food Chem*. 1992; 40: 348–355.
19. De Luca M, Ioele G, Ragno G. Review: 1,4-Dihydropyridine Antihypertensive Drugs: Recent Advances in Photostabilization Strategies. *Pharm*. 2019; 11–85.
20. Ioele G, Gündüz MG, De Luca M, Simsek R, Safak C, Muzzalupo R, Ragno G. Photodegradation studies of 1,4-dihydropyridine compounds by MCR analysis on UV spectral data. *Future Med Chem*. 2016; 8: 107–115.
21. Ioele G, De Luca M, Oliverio F, Ragno G. Prediction of photosensitivity of 1,4-dihydropyridine antihypertensives by quantitative structure-property relationship. *Talanta*. 2009; 79: 1418–1424.
22. De Luca M, Tauler R, Ioele G, Ragno G. Study of photodegradation kinetics of melatonin by multivariate curve resolution (MCR) with estimation of feasible band boundaries. *Drug Test Anal*. 2013; 5: 96–102.
23. Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physico-chemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm*. 2018; 535: 272–284.
24. Scalia S, Villiani S, Scatturin A, Vandelli MA, Forni F. ?????? brakuje tytułu) *Int J Pharm*. 1998; 175: 205–213.
25. Ahmad I, Ahmed S, Sheraz MA., Aminuddin M, Vaid FHM. Effect of caffeine complexation on the photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *Chem Pharm Bull*. 2009; 57(12): 1363–1370.
26. Bhalekar MR, Harinarayana D, Madgulkar AR, Pandya SJ, Jain DK. Improvement of photostability in formulation: a review. *Asian J Chem*. 2008; 20(7): 5095–5108.
27. Manconi M, Valenti D, Sinico C, Lai F, Loy G, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin: II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. *Int J Pharm*. 2003; 260(2): 261–272.
28. Ragno G, Cione E, Garofalo A, Genchi G, Ioele G, Risoli A. Design and monitoring of photostability systems for amlodipine dosage forms. *Int J Pharm*. 2003; 265(1): 125–132.
29. Sengupta P, Chatterjee B, Tekade RK. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products. *Int J Pharm*. 2018; 328–344.
30. EMA to provide guidance on avoiding nitrosamines in human medicines, 13 September 2019 EMA/500009/2019, https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/ema-provide-guidance-avoiding-nitrosamines-human-medicines_en.pdf. Dostęp 25.09.2019.
31. EMA to review ranitidine medicines following detection of NDMA, 13 September 2019, EMA/503622/2019, https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/ema-review-ranitidine-medicines-following-detection-ndma_en.pdf. Dostęp 25.09.2019.
32. Jamróiewicz M, Pieńkowska K. Recent breakthroughs in the stability testing of pharmaceutical compounds. *Trends Anal. Chem*. 2019; 111: 118–127.
33. Jamróiewicz M, Wielgomas B. Detection of some volatile degradation products released during photoexposure of ranitidine in a solid state. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2013; 76: 177–182.
34. Ustawa Prawo farmaceutyczne Dz.U. 2001 nr 126, poz. 1381 z dnia 6 września 2001 r. <http://prawo.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20011261381/U/D20011381Lj.pdf>. Dostęp 23.09.2019.
35. Drygas A. Aptekarstwo gdańskie: 1399–1939, Gdańskie Towarzystwo Naukowe. Ossolineum, Wrocław 1983.
36. Jamróiewicz M, Merchel M. A history of the physical and chemical stability of pharmaceuticals – a review. *Acta Pol Pharm*. 2018; 75: 297–304.
37. Jamróiewicz M. Consequences of New Approach to Chemical Stability Tests to Active Pharmaceutical Ingredients. *Front. Pharmacol*. 2016; 7.
38. Trawiński J, Skibiński R. Studies on photodegradation process of psychotropic drugs: a review. *Environ Sci Pollut Res*. 2017; 24: 1152–1199.
39. Bansal R, Saini B, Bansal Y, Bansal MSn G. LC-MS-TOF and LC-PDA studies for identification of new degradation impurities of bupropion. *Biomed. Chromatogr*. 2013; 27: 1387–1397.
40. Skibiński R. A study of photodegradation of quetiapine by the use of LC-MS/MS method. *Open Chem*. 2012; 10: 232–240.
41. Skibiński R, Komsta Ł, Inglot T. Characterization of paliperidone photodegradation products by LC-Q-TOF multistage mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr*. 2016; 30: 894–901.
42. Skibiński R. Photostability study and identification of photodegradation products of ziprasidone by UHPLC-DAD/ESI-Q-TOF. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2012; 35: 2097–2112.
43. Talluri N, Kandimalla R, Bandu R, Chundi D, Marupaka R, Srinivas R. Selective separation, detection of zotepine and mass spectral characterization of degradants by LC-MS/MS/QTOF. *J Pharm Anal*. 2014; 4: 107–116.
44. Singh S, Handa T, Narayanam M, Sahu A, Junwal M, Shah RP. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. *J Pharm Biomed Anal*. 2012; 148–173.
45. Chavan BB, Vitthal S, Borkar RM, Srinivas R, Talluri MVNK. Isolation and structural characterization of degradation products of afatinib dimaleate by LC-Q-TOF/MS/MS and NMR: cytotoxicity evaluation of afatinib and isolated degradation products. *J Pharm Biomed Anal*. 2019; 166: 139–146.
46. Chavan BB, Kalariya PD, Srinivas R, Talluri MVNK. Alcaftadine: selective separation and characterization of degradation products by LC-QTOF-MS/MS. *Chromatogr*. 2018; 81: 631–638.
47. Kalariya PD, Talluri MVNK, Patel PN, Srinivas R. Identification of hydrolytic and isomeric N-oxide degradants of vilazodone by on line LC-ESI-MS/MS and APCI-MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2015; 102: 353–365.
48. Janga KY, King T, Ji N, Sarabu S, Shadambikar G, Sawant S, Xu P, Repka M. A, Murthy SN. Photostability issues in pharmaceutical dosage forms and photostabilization. *Pharm Sci Tech*. 2018; 19: 48–59.