Stabilność substancji leczniczych w kontekście trwałości leku – zbieżności definicji i różnice w podejściu analitycznym

Marzena Jamrógiewicz, Karolina Milewska, Klaudia Lewandowska, Karolina Czubak

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, ul. Hallera 107, 80-416 Gdańsk

Adres do korespondencji: Marzena Jamrógiewicz, Katedra i Zakład Chemii Fizycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, ul. Hallera 107, 80-416 Gdańsk, e-mail: majam@gumed.edu.pl

Struktura organizacyjna jednostek nadzorujących procedury zapewniające jakość leku i ich misje

Kontrola jakości leków jest jednym z najistotniejszych elementów badań związanych z rozwojem i wytwarzaniem produktów leczniczych. Podstawowym i krytycznym etapem tej ewaluacji jest procedura monitorowania stabilności danej substancji, poczynając od jej syntezy, aż do wykorzystania w produkcji.

Pierwsze oficjalne definicje i parametry oceny jakości farmaceutycznej ustalone zostały dopiero na początku XX w. Zawiązało się wtedy szereg organizacji, które formalnie usankcjonowały terminologię wobec rosnącej potrzeby ograniczenia działań niepożądanych leków (**rycina 1**). Do dnia dzisiejszego dominującą rolę odgrywa:

- ICH, Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Leków Stosowanych u Ludzi (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), powołana w 1991 r. Dodatkowo jej działalność jest wspierana przez:
- WHO – Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organization*) utworzoną w 1948 r.,
- FDA – amerykańską rządową Agencję Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*) utworzoną w 1906 r. oraz
- EMA – Europejską Agencję Leków (*European Medicines Agency*), która rozpoczęła działalność ponad dwadzieścia lat temu jako EMEA, a od 2009 r. występuje pod skróconym akronimem EMA.

Definitions and analytical procedures concerning pharmaceutical compound stability and the shelf-life of the drug product

Chemical and physical stability of medicinal substances and the finished medicinal product is a key aspect of ensuring high-quality medicine and safety of therapy. Currently, every analytical approach including minimization of the risk of degradation of the medicinal substance and elimination of products with potential genotoxic risk is a priority in the registration and implementation such proceedings. Huge interest in the subject of stability resulting from the need to ensure high-quality medicine has been going on for many decades, and recently has increased significantly not only in the scientific literature, but also in procedures and guidelines. Leading institutions related to health surveillance and pharmacotherapy, such as the FDA, WHO and ICH, are constantly introducing new recommendations to minimize the risk of side effects and undesirable pharmaceutical products for human use. Thanks to technological progress, it is possible to control the quality of medicinal products much more than several dozen years ago. The work concerns the review of the latest analytical trends, as well as discussing existing problems with the current stability test guidelines.

Keywords: stability, shelf-life, pharmaceutical quality control, solid state, guidelines.

© Farm Pol, 2018, 74(2): 95–108

Na obszarze Polski funkcjonuje Narodowy Instytut Leków (NIL) prowadzący badania kontrolne produktów leczniczych i surowców służących do ich wytwarzania zarówno przed lub po wprowadzeniu ich do obrotu. Zagwarantowany ustawowo dostęp do produktów leczniczych dobrej jakości, bezpiecznych i skutecznych terapeutycznie, jest regulowany poprzez kontrolę jakości substancji i produktów leczniczych na poszczególnych etapach istnienia

Rycina 1. Schemat istniejących organizacji nadzorujących zapewnienie jakości oraz badania kontrolne produktów leczniczych i surowców służących do ich wytwarzania, zarówno przed lub po wprowadzeniu ich do obrotu

i określony w Ustawie Prawo Farmaceutyczne z 19 grudnia 2014 r. Każdy produkt leczniczy niepełniający standardów zawartych w specyfikacjach dołączanych do dokumentacji rejestracyjnej, która jest podstawą dopuszczenia produktu leczniczego do obrotu, stanowi realne zagrożenie dla pacjenta, a źródła dopatruje się obecnie głównie w substancjach aktywnych na wszystkich etapach procesu wytwarzania leku, jak również w produktach sfalszowanych [1]. NIL pełni rolę służby państwowej w systemie ochrony zdrowia poprzez realizację polityki zdrowotnej państwa oraz zaleceń Unii Europejskiej. Rolą Instytutu jest zapewnienie społeczeństwu bezpiecznych i skutecznych produktów leczniczych i wyrobów medycznych w imieniu narodowych i europejskich instytucji rządowych. Realizując zalecenia Unii Europejskiej, Narodowy Instytut Leków wykonuje zadania Państwowego Laboratorium Kontroli Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, będącego odpowiednikiem europejskiej instytucji nadzorującej jakość leków – *Official Medicines Control Laboratory* (OMCL). OMCL wspiera organy regulacyjne w kontrolowaniu jakości produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych dostępnych na rynku. Niezależnie od producentów, a zatem bez żadnego konfliktu interesów, OMCL testuje te produkty. Obszar objęty nadzorem to państwa członkowskie Unii Europejskiej i państwa posiadające status obserwatora Konwencji, który wykazuje zaangażowanie w działalność sieci i opracowanie Farmakopei Europejskiej (**rycina 1**).

Działalność OMCL ukierunkowana jest, podobnie jak misja Narodowego Instytutu Leków, na wskazywanie realnego zagrożenia jakości surowców, w tym także substancji leczniczych, jak i zagrożenia jakości produktu końcowego. Niewątpliwym czynnikiem

ryzyka jest między innymi mała stabilność substancji, słaba rozpuszczalność, a także nowo opracowana technologia wytwarzania. W przypadku jakości farmaceutycznych produktów końcowych zwraca się uwagę na ryzyko związane z problemami ze stabilnością poszczególnych komponentów, nowe formułacje, możliwe interakcje, biodostępność i wiele innych [2].

Zgodnie z misją ICH związaną z ustalaniem kryteriów oceny stabilności (*stability*), postępowanie organizacji nadzorujących zapewnienie jakości oraz badania kontrolne produktów leczniczych i surowców koncentruje się na zaproponowaniu metod (sposobów) umożliwiających dostarczenie dowodów na znaczącą zmianę jakości substancji i produktów leczniczych pod wpływem oddziaływania różnych czynników środowiska, to jest: temperatury, wilgotności i światła [3, 4]. Opracowywane procedury i ustalone testy mają prowadzić ostatecznie do uzyskania rzetelnych danych pozwalających na wykorzystanie zdobytej wiedzy w technologii wytwarzania leków, tak by były one trwałe i bezpieczne [5]. Ustalono, że istotne jest potwierdzenie tożsamości badanych substancji, identyfikacja i ilościowe oznaczanie zawartości zanieczyszczeń w próbkach farmaceutycznych oraz ustalenie okresu ważności produktu leczniczego, czyli jego trwałości [6–8]. WHO, analizując bieżące kwestie wyjaśnia i uzupełnia wytyczne ICH opisując zaproponowane rodzaje testów stabilności i ich przykłady, a także porusza kwestię potrzeby monitorowania i oceny stopnia degradacji cząsteczki w trakcie badań [9]. ICH zwraca uwagę na konieczność określania ilości zanieczyszczeń obecnych w testowanych próbkach, które mogą być produktami degradacji. Z kolei FDA zwraca uwagę na konieczność analizowania wyników prowadzonych testów stabilności pod kątem jakości, bezpieczeństwa i skuteczności farmakologicznej, zatem łączy kwestię stabilności z działaniem leku. Zaznacza także, że czynnikami wpływającymi na aktywność substancji mogą być czynniki chemiczne, fizyczne, biologiczne i mikrobiologiczne.

Najważniejszym aspektem zapewnienia wysokiej jakości produktu leczniczego jest zdolność do utrzymania jego pierwotnych właściwości w czasie. Ten priorytet wpisuje się globalnie w misjach wszystkich organizacji nadzorujących zapewnienie jakości oraz badania kontrolne produktów leczniczych i surowców. Do ich określenia niezbędne są dwa elementy wspólnie włączające się w atrybut jakości: trwałość i stabilność. Biorąc pod uwagę cel badań i aspekt użytkowy leków, trwałość rozważana jest w badaniach ich stabilności w pewnym, zdefiniowanym okresie, co umożliwia wyznaczenie terminu ważności leku. Dodatkowo jest nieodłącznym elementem jakości produktu w obrocie [10].

Zatem można podsumować, że wspólną misją organizacji i instytucji powołanych w celu ustalenia wytycznych badań i kryteriów jakości farmaceutycznej leków jest zapewnienie bezpieczeństwa pacjenta poprzez ustalenie **okresu trwałości** produktu leczniczego. Niezbędne jest zatem rozróżnienie sformułowania stabilności od trwałości substancji leczniczej, jak i leku.

Trwałość to zdolność substancji do bycia stabilną chemicznie i jest to cecha wytworów, substancji, struktur, oznaczająca ich budowę zapewniającą długi czas istnienia, np. trwałość materiału, trwałość otoczki, trwałość tabletki. Badana próbka lub materiał, który jest trwały (w czasie) i wytrzymały, jest także zdalny do użytku przez dłuższy czas [11, 12]. Trwałość ma zatem wymiar bardziej praktyczny i w farmacji ma uzasadnienie w przypadku badań jakości końcowych produktów.

Synonimy wiążące się z pojęciem trwałość to solidność, równowaga (fizykochemiczna), wytrzymałość (na odczynnik i oraz mechaniczna), stabilność, niezmienność, stałość, odporność.

Stabilność jest z kolei pojęciem węższym, bardziej teoretycznym. Oznacza stałość określonej cechy w danym momencie jako skutek pewnego działania, reakcji, procesu lub testu [10]. Nie jest rozważana w trakcie zdefiniowanego okresu, ale jako skutek działania określonego czynnika na próbkę. W chemii często używa się sformułowania „stabilizator” w przypadku substancji dodawanych w małych ilościach do niestabilnych produktów w celu poprawy ich jakości. Takim przykładem stabilizatora są w emulsiach emulgatory.

WHO wyjaśnia pojęcia związane z badaniami stabilności [8], m.in. takie jak:

- **metody oznaczania stabilności** – są zwalidowanymi procedurami analitycznymi umożliwiającymi wykrycie zmian w czasie, w właściwościach chemicznych, fizycznych oraz mikrobiologicznych zarówno substancji aktywnej, jak i gotowego produktu leczniczego. Są one specyficzne dla zawartej substancji leczniczej, jej produktów degradacji oraz innych czynników wymagających kontroli, które mogą być mierzone bez zakłóceń (w trakcie procesu technologicznego, np. temperatura, wilgotność);
- **badania stabilności** – podzielone na długoterminowe, przyspieszone oraz pośrednie. Prowadzone są dla pierwotnych partii produktu oraz/lub dla partii wyznaczonych zgodnie z protokołem stabilności, aby ustalić bądź potwierdzić trwałość substancji aktywnej lub gotowego produktu leczniczego;
- **testy stresowe (dla substancji leczniczej, API)** – badania, które mają na celu wyjaśnić wewnętrzną stabilność substancji aktywnej. Są one częścią badań rozwojowych i prowadzone

są w trudniejszych warunkach niż badania przyspieszone oraz obejmują hydrolizę kwasową i zasadową oraz testy fotostabilności. Prowadzone są bez narzuconego czasu prowadzenia badań, w dość dowolny sposób;

- **testy stresowe (dla gotowego produktu leczniczego)** – badania analogiczne jak dla substancji leczniczej, które mają umożliwić ocenę właściwości produktu leczniczego pod wpływem czynników środowiskowych trudniejszych niż panujące w trakcie badań przyspieszonych. Obejmują one także testy fotostabilności oraz testy specyficzne dla niektórych produktów (np. inhalatorów z odmierzoną dawką, kremów, emulsji, wodnych roztworów przechowywanych w lodówkach);
- **dodatkowe dane odnośnie do stabilności** – informacje dotyczące między innymi: stabilności w partiach na małą skalę, stabilności związanej z formacją, z przechowywaniem w pojemnikach innych niż oryginalne, naukowych informacji odnośnie do procedur analitycznych, proponowanego czasu na powtórzenie testów, okresów ważności produktów oraz warunków ich przechowywania.

Misją ICH jest także określanie skutków prowadzonych testów stabilności, czyli określanie zanieczyszczeń, ich norm zawartości w substancjach i produktach leczniczych.

Zanieczyszczenia farmaceutyczne są to wszystkie niepożądane związki chemiczne różnego pochodzenia, które występują wspólnie z próbką API [13]. Obecność zanieczyszczeń nawet w małej ilości może istotnie wpływać na skuteczność i bezpieczeństwo stosowania produktów leczniczych, z tego względu bardzo ważna jest ich pełna charakterystyka ilościowa oraz jakościowa [14]. Zanieczyszczenia mogą pochodzić z różnych etapów produkcji, w tym syntezy substancji aktywnej, czasu i sposobu jej przechowywania, ale również na pozostałych etapach wytwarzania produktu leczniczego, takich jak suszenia, granulacji, mieszania i innych. Problem z klasyfikacją zanieczyszczeń podkreśla się w literaturze ze względu na trudności związane z narzuconą przez Farmakopeę koniecznością oznaczeń substancji (wzorców) referencyjnych [15].

Farmakopee dzielą zanieczyszczenia na:

- produkcyjne lub inne wykrywane (niespecyficzne): surowce, rozpuszczalniki;
 - degradacyjne (specyficzne) powstające pod wpływem czynników środowiskowych, nazywane w przemyśle substancjami pokrewnymi.
- Z kolei w wytycznych ICH mówi się o grupach zanieczyszczeń:
- organicznych: substraty z syntezy, produkty pośrednie, produkty degradacji, reagenty, ligandy, katalizatory;

- nieorganicznych: reagenty, ligandy, katalizatory, metale ciężkie, sole nieorganiczne, inne (węgiel);
- pozostałościach rozpuszczalników.

W monografiach farmakopealnych dotyczących substancji leczniczych zawarte są informacje na temat rodzaju zanieczyszczeń API oznaczanych w celu weryfikacji stabilności produktu leczniczego w zakładach farmaceutycznych przy ocenie jakości. Zwykle nie są to wszystkie, o jakich piszą badacze w publikacjach naukowych. Ich umieszczenie w monografii szczegółowej do oznaczeń substancji pokrewnych (zarówno zanieczyszczeń specyficznych i niespecyficznych) wynika z prowadzonych testów stresowych API pod wpływem odczynników chemicznych (**tabela 4**). Ich obecność potwierdza się też w produkcie leczniczym. Monografie farmakopealne w większości przypadków przedstawiają propozycje metody oznaczania zanieczyszczeń farmakopealnych w próbkach API, jak również ich limity zawartości (**tabela 1**). Do 2004 r. dla produktów degradacji występujących powyżej 0,1% w próbce istniał obowiązek oznaczania i identyfikacji, jednak obecnie wytyczne ICH i kryteria WHO zostały znacznie zaostrzone w kierunku oznaczania zanieczyszczeń na najmniejszym racjonalnym poziomie w ramach możliwości analitycznych aparatury, w związku z koniecznością monitorowania zagrożeń genotoksycznych zanieczyszczeń (**rycina 2**) [6, 16].

Terminologia i regulacje związane z badaniami stabilności

Od czasu powstania ICH proces tworzenia wytycznych regulujących przepisy związane z badaniem stabilności stopniowo ewoluował, w wyniku czego obecnie obowiązuje 12 dokumentów dotyczących zasad przeprowadzania badań w kierunku zapewnienia jakości substancji leczniczej oraz produktu leczniczego. Wytyczne oznaczono ogólnym akronimem ICH Q (**Quality**), przyporządkowując liczby od 1 do 12, a dla niektórych grup wytycznych opracowano dodatkowe dokumenty oznaczone literami, np. od A do F.

Dokumenty publikowane przez ICH podzielone są na cztery obszary:

Q (quality)	- jakość
S (safety)	- bezpieczeństwo
E (efficacy)	- skuteczność
M (multidisciplinary)	- wielodyscyplinarny obszar działalności

Pierwsze wytyczne zostały opracowane przez ICH w 1993 r. i dotyczyły ustalenia rodzajów i przebiegu testów stabilności.

- **Q1A(R2)** zawiera opis badań stabilności nowych substancji leczniczych i produktów, metody ich przeprowadzania oraz analizy otrzymanych wyników, które muszą być zawarte w dokumentacji rejestracyjnej nowego produktu leczniczego.
- **Q1B** zawiera informacje na temat sposobu przeprowadzania badań fotostabilności za pomocą odpowiednich procedur, narzędzi i źródeł emitujących promieniowanie z zakresu UV-Vis symulujące światło dzienne.
- **Q1C** dokument wydany w 1996 r., który obejmuje główne procedury dla nowo opracowanych form dozowanych leku, określa również ramy ilościowe uzyskanych wyników z testów stabilności, które mogą zostać zaakceptowane.
- **Q1D** ujednolica, opisuje i podaje podstawowe ramy i zasady projektowania badań stabilności dla nowych substancji leczniczych i produktów.

Kategoria dokumentów Q3 ICH dotyczy zanieczyszczeń, w tym:

- **Q3 A(R2)** zawiera opis wytycznych dotyczących oznaczania zanieczyszczeń w nowych substancjach leczniczych,
- **Q3B(R2)** zawiera opis wytycznych dotyczących oznaczania zanieczyszczeń w nowych produktach leczniczych,
- **Q3C(R5)** dotyczy procedur i wytycznych do oznaczeń pozostałości rozpuszczalników,
- **Q3D** omawia wytyczne dla zanieczyszczeń pierwiastkami.

W dokumencie **Q5C** zawarte są informacje na temat przeprowadzania badań stabilności produktów biotechnologicznych.

Najnowszą regulacją i bardzo istotną zmianą w procedurach opublikowanych przez ICH był dokument **M7** z 2014 r. dotyczący sposobu postępowania z zanieczyszczeniami genotoksycznymi [16]. Zawarte są w nim informacje na temat identyfikacji, klasyfikacji, kontroli i oceny ryzyka występowania takich substancji w obrębie zanieczyszczeń API.

Farmakopee definiują stabilność produktu farmaceutycznego w kontekście ilościowym ubytku zawartości substancji leczniczej w testowanym produkcie leczniczym. Zaznacza się, że przez cały okres magazynowania i użytkowania (w okresie ważności) mają pozostawać niezmiennie wszystkie właściwości określone i badane w czasie wszystkich etapów jego procesu wytwarzania [17–19].

Na ocenę jakości farmaceutycznej związanej ze stabilnością składają się różnorodne testy, których rezultaty mają być odpowiedzią na pytanie, czy substancja lecznicza jest stabilna chemicznie oraz fizycznie. **Z definicji, stabilność jest stanem**, w którym nie dochodzi do degradacji API pod wpływem określonych czynników, takich jak: wilgotność, temperatura, pH, obecność utleniaczy oraz wpływ

Tabela 1. Dopuszczalne limity zanieczyszczeń zgodnie z ICH Q3A(R2) [6]

Maksymalna dawka dobową	Wymagana identyfikacja	Wymagane oznaczenie ilościowe
≤2 g/dzień	0,1% lub 1,0 mg/dziennie przyjęcie (jeżeli jest mniejsze)	0,15% lub 1,0 mg/dziennie przyjęcie (jeżeli jest mniejsze)
>2 g/dzień	0,05%	0,05%

światła [3, 4, 9]. Różne źródła piśmiennictwa naukowego wskazują na fakt, że istnieją różnorodne ścieżki potencjalnej degradacji substancji. Zachodzące reakcje różnią się szybkością i przebiegiem. W efekcie najczęściej dochodzi do ubytku zawartości (jej masy lub stężenia) określonej substancji wchodzącej w skład próbki. Czasami dochodzi też do skrajnych przypadków braku stabilności leku, która wiąże się z utratą aktywności czy znaczącą utratą potencjału terapeutycznego [20]. Są to zarówno fizycznie, jak i chemicznie różne pojęcia. Według słownika chemicznego, **degradacja** oznacza stopniowy rozpad cząsteczki poprzez eliminowanie jej poszczególnych fragmentów, co prowadzi do coraz prostszych cząsteczek, najczęściej o mniejszej masie cząsteczkowej [21]. Produkty

degradacji zaburzają bilans masy w próbce i przysparzają wielu trudności analitycznych. Czasami zdarza się, że trudno je wykryć ze względu na granice oznaczalności, specyficzność metody lub niewielkie stężenie w próbce. Produkty degradacji nie muszą mieć tego samego stanu skupienia i nie zawsze są stabilne, zatem mogą ulegać kolejnym przemianom pod wpływem działania czynników niszczących.

Zupełnie innym procesem jest **rozkład** substancji organicznej. Rozkład definiowany jest jako proces przemian kończący się przeważnie zwęglaniem próbki w trakcie ogrzewania i topnienia, poprzedzany mięknieniem, ciemnieniem oraz kurczeniem się substancji, a towarzyszy mu przeważnie wytworzenie produktów gazowych [17]. Monitowanie

Rycina 2. Rodzaje zanieczyszczeń API według ICH

stanów pośrednich nie jest zatem badaniem rozkładu, ale badaniem skutków degradacji. Największą trudność na tym etapie sprawia badaczom nieskończona różnorodność powstających produktów. Ustalenie rodzaju testów stabilności i czasu ich prowadzenia, a także metod, jakimi należy badać skutki degradacji jest zawsze obarczone znacznym stopniem ograniczania się do określonych efektów. Zdarza się też, że w warunkach istnienia produktu na rynku może dojść do narażenia leku na czynniki nieobjęte testami.

W większości procedur omawiających aspekt stabilności substancji leczniczych oceniane są: właściwości chemiczne (struktura, tożsamość, czystość), fizyczne (barwa, postać, zwilżalność, ką nasypu), mikrobiologiczne (biodegradowalność lub zawartość drobnoustrojów) oraz fizyczne substancji leczniczych samodzielnych lub w mieszaninach (w tym w roztworach i w proszkach). Wykonuje się testy fotodegradacji, bada się interakcje z rozpuszczalnikami i innymi substancjami, np. pomocniczymi lub produktami degradacji [21, 22, 23].

Niezbędne jest zatem zwrócenie szczególnej uwagi na mechanizmy zachodzących reakcji, przemiany wpływające bezpośrednio na działanie farmakologiczne leku. W tym aspekcie rozważa się generalnie stabilność chemiczną. W przypadku gdy nie jest rozróżniona badana próbka (lek czy substancja), stabilność kojarzona jest w piśmiennictwie głównie z aspektami chemicznymi, konkretnymi reakcjami substancji i powstającymi produktami degradacji konkretnej, pojedynczej cząsteczki. Zachodzące w niej zmiany mają niewątpliwy wpływ na trwałość, jednak po zbadaniu wszystkich składników mieszaniny, jaką jest preparat farmaceutyczny, a także oddziaływań między nimi w czasie prowadzenia testów.

Tabela 2. Standardowe badania stabilności leków służące do oceny warunków ich przechowywania

Rodzaj badania	Warunki	Minimalny okres przechowywania próbek
Długoterminowe	25 °C ± 2 °C / 60% RH ± 5% RH lub 30 °C ± 2 °C / 65% RH ± 5% RH	12 miesięcy
Pośrednie	30 °C ± 2 °C / 65% RH ± 5% RH	6 miesięcy
Przyspieszone	40 °C ± 2 °C / 75% RH ± 5% RH	6 miesięcy
Stresowe	50 °C, 60 °C lub 70 °C / 75% RH	Do 14 dni

Tabela 3. Podział na strefy klimatyczne wg wytycznych WHO [9]

Strefa klimatyczna	Klimat	Warunki testowania
I	umiarkowany	21 °C ± 2 °C, 45% ± 5% RH
II	śródlądowy, podzwrotnikowy	25 °C ± 2 °C, 60% ± 5% RH
III	gorący suchy	30 °C ± 2 °C, 35% ± 5% RH
IV A	gorący wilgotny	30 °C ± 2 °C, 65% ± 5% RH
IV B	gorący wybitnie wilgotny	30 °C ± 2 °C, 75% ± 5% RH

Przy określaniu stabilności chemicznej substancji leczniczych ocenia się efekty reakcji chemicznych API, głównie: hydrolizy (w warunkach zwiększonej wilgotności), utleniania (w warunkach tlenu lub nadtlenu wodoru), izomeryzacji, hydratacji, dimeryzacji czy dekarboksylacji. Szczególną specyfiką charakteryzują się testy fotostabilności. Są one integralną częścią testów stabilności i zostały włączone przez ICH do badań w 1993 r. Należy podkreślić, że pojęcie fotodegradacji nie dotyczy tylko zmiany struktury API pod wpływem światła, ale też występowania procesów rodnikowych, transferu energii, czy nawet luminescencji, które mogą prowadzić do niespodziewanych i nietypowych rezultatów, zwłaszcza w fazie stałej [24–26]. Mimo że wytyczne bardziej szczegółowo dopracowano w 1996 r., to nadal ich cechą jest duża różnorodność stosowanych źródeł promieniowania oraz dowolność w ustalaniu czasu naświetlań w zależności od stosowanych urządzeń, co przysparza badaczom problemów [27].

Uogólnienia, ekstrapolacje i pozorne ujednolicanie reguł testowania jakości leków są kłopotliwe i coraz częściej w piśmiennictwie zwraca się uwagę na konieczność opracowywania koncepcji indywidualnego spojrzenia na każdą cząsteczkę potencjalnego lub istniejącego zanieczyszczenia (produktu degradacji) [21, 28, 29]. Prowadzenie badań długoterminowych, a także badania stresowe są uzasadnione i prowadzą do ustalenia struktur związków niebezpiecznych dla ludzi. Poza tym wykonuje się badania przyspieszone, a także badania prognozujące.

W tabeli 2 zebrano rodzaje obowiązkowych testów stabilności leków, jakie obligatoryjnie prowadzi się w przemyśle farmaceutycznym.

Wraz z regulacjami wprowadzanymi przez ICH, WHO wyodrębniło 5 stref klimatycznych w obrębie których na całym świecie są prowadzone badania stabilności. Dla każdej ze stref zostały dobrane optymalne warunki testowania produktów leczniczych. W tabeli 3 przedstawiono obowiązujący podział oraz warunki testowania długoterminowego (okres 12 miesięcy) leków. Polska została włączona do II strefy klimatycznej. W przypadku gdy wytwórca produkuje środki lecznicze na eksport do krajów znajdujących się w innej strefie niż kraj wytwarzania, istnieje obowiązek prowadzenia badań i zapewnienia stabilności produktów dla każdej strefy, do której ma zostać skierowany produkt.

W przemyśle badania stabilności wykonuje się dla gotowego produktu leczniczego, ale także dla substancji leczniczej. Wszystkie półprodukty wykorzystywane do wytwarzania leków także podlegają badaniom. W celu określenia ich trwałości prowadzi się dodatkowe testy, takie jak:

- badanie typu **holding time**, które ma na celu wyznaczenie czasu przechowywania danego półproduktu przeznaczonego do kolejnego etapu procesu produkcyjnego, a także maksymalnego czasu, w którym gotowy produkt może oczekiwać na pakowanie. Warunki prowadzenia badania są zbliżone do tych, w których przechowywany jest dany półprodukt;
- badanie typu **post holding time**, które ma na celu potwierdzenie jakości produktu, wcześniej przechowywanego bez opakowania. Jego wynik daje odpowiedź na pytanie, czy takie przechowywanie produktu ma wpływ na jego stabilność. Wykonuje się je po wcześniejszym wykonaniu badania typu *holding time*,
- badanie typu **thermal cycling**, które wykonywane jest w celu oceny stabilności produktu w czasie jego transportu. Oceniane są maksymalne różnice parametrów określanych dla otoczenia podczas transportu gotowego produktu w opakowaniach do tego przeznaczonych. Badany produkt poddawany jest testom, mającym na celu zbadanie wpływu skrajnych warunków otoczenia na produkt przez krótki okres. Pierwszy z przeprowadzonych testów polega na zmianie temperatury z niskiej na wysoką, drugi na zamrażaniu i rozmrażaniu produktu. Otrzymane wyniki muszą mieścić się w zakresie kryteriów przyjętych w specyfikacji zwolnienia produktu do obrotu.

Najistotniejsze badania stabilności API to tzw. **testy stresowe**, które zakładają przesadnie intensywne narażenie na działanie wymienionych wyżej czynników, w sposób indywidualny dla różnych substancji leczniczych. W bieżącym piśmiennictwie z ostatnich kilku lat znaczną część rozważań prowadzi się na temat tych testów [3, 24, 30, 31]. Głównym problemem związanym z pozostawieniem swobody ich prowadzenia jest ustalenie czasu ich trwania. Warunki ich prowadzenia zebrano w **tabeli 4**. W testach stresowych używa się drastycznych czynników i reaktywnych odczynników, czas trwania testów określono szacunkowo, najczęściej

uzyskując ubytek API od 5–20%, jednak w przypadku braku reaktywności substancji nie dłużej niż 2–3 tygodnie [32].

Wiodące firmy badawcze w dziedzinie biofarmaceutyków rekomendują, aby testy stresowe dla produktu w stanie stałym trwały równo lub dłużej jak odpowiednik kinetyczny testu prowadzonego przez 6 miesięcy w temp. 40°C i względnej wilgotności na poziomie 75%. W takim przypadku energia cieplna wprowadzona do próbki podczas badania stresowego będzie równoważna bądź wyższa od tej wprowadzanej podczas testów przyspieszonych, które polegają na przechowywaniu produktu przez 6 miesięcy w warunkach 40°C/75% wilgotności. Zatem, aby dobrze zaplanować czas trwania badania, ważna jest wiedza na temat entalpii produktu lub jej ocena. Gdy założymy zachowawczo, że entalpia jest równa 17 kcal/mol, wyliczymy, że energia termiczna równoważna badaniom przyspieszonym odpowiada warunkom przechowywania próbki przez 2 lata w temperaturze 25°C i wilgotności 75%. Zakładając mniej zachowawczo 25,8 kcal/mol, czas badania w tych samych warunkach wydłuży się do 4 lat. Z doświadczeń wynika, że temperatura powyżej 70°C, przy wysokiej wilgotności (powyżej 75%) oraz przy relatywnie niskiej wilgotności względnej (poniżej 20%) powinna prowadzić do szybkiej i rozsądnej oceny degradacji substancji w fazie stałej oraz oceny stabilności większości leków. Zakładając, że czas trwania testu stresowego ma być dostosowany tak, aby zrównoważyć energię dostarczaną podczas testu przyspieszonego, przy przyjęciu entalpii 17 kcal/mol, w temperaturze 70°C badanie będzie trwało 17 dni [33].

Zagadnieniem wiążącym się z badaniem trwałości produktów leczniczych i oceną stabilności substancji leczniczej jest stabilność fizyczna. W trakcie badań stabilności może dojść do zmian fizycznych w substancji, takich jak: mobilność postaci amorficznej, przemiana formy polimorficznej lub innego rodzaju przemiana fazowa [34–36]. Zwraca się także uwagę na możliwość absorpcji wody w warunkach testów prowadzonych w podwyższonej wilgotności

Tabela 4. Warunki prowadzenia testów stresowych API i produktów leczniczych

Czynnik stresowy	Warunki	Czas trwania testu	Informacje dodatkowe
Temperatura	50–70 °C	2–3 tygodnie	certyfikowane komory starzeniowe
Wilgotność	75% RH lub więcej	2–3 tygodnie	certyfikowane komory starzeniowe
Środowisko kwasowe	HCl lub H ₂ SO ₄ , 0,1–1 mol/L	Do osiągnięcia 5–20% degradacji lub maksymalnie do 14 dni	uwzględniono obecność dodatkowych substancji do roztworów, takich jak: (acetonitryl, metanol) czy bufony
Środowisko zasadowe	NaOH, KOH lub LiOH, 0,1–1,0 mol/L	Do osiągnięcia 5–20% degradacji lub maksymalnie do 7 dni	–
Utleniacze	H ₂ O ₂ , formaldehyd, kwas mrówkowy 0,02–3,00%	Do osiągnięcia 5–20% degradacji lub maksymalnie do 7 dni	–
Fotoliza	Światło widzialne Promieniowanie w zakresie UV–vis	≥1,2 milionów luxogodzin ≥200 Wh/m ²	certyfikowane komory do badania fotostabilności

oraz na konieczność oznaczania stopnia uwodnienia substancji [20, 23].

Po wykonaniu testów stabilności lub testów stresowych w dalszym etapie badań konieczna jest identyfikacja powstających produktów degradacji, tzw. zanieczyszczeń. ICH opracowała dokumenty poświęcone charakterystyce zanieczyszczeń specyficznych i niespecyficznych, ich granic oznaczalności oraz metodyki oznaczania.

Najnowszą metodą oceny stabilności jest ASAP (*Accelerated Stability Assessment Program*), przyspieszony program do oceny stabilności. Metoda ta prognozuje o okresie trwałości badanego produktu w sposób prosty, szybki i wiarygodny. Program ten określa, w jaki sposób można wiarygodnie prognozować okres ważności produktu na podstawie krótkich, punktowych testów i ekstrapolacji wyników. ASAP koncentruje się na zrozumieniu wszystkich procesów i zmian zachodzących w fazie stałej (matrycy leku), bazując na oznaczaniu zanieczyszczeń farmakopealnych [37]. Cała koncepcja ma na celu zmniejszenie niepewności oceny ryzyka degradacji produktu [38]. Ma przy tym duży potencjał wprowadzenia zmian w sposobie wytwarzania produktu leczniczego, jego kontroli oraz procedurze rejestracyjnej produktów leczniczych w przemyśle farmaceutycznym.

ASAP umożliwia zaobserwowanie konsekwencji procesów fizykochemicznych zachodzących w próbkach farmaceutycznych po krótkim czasie ich przechowywania w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności. W ten sposób efektywnie minimalizuje się ryzyko degradacji w zaplanowanym okresie trwałości, co umożliwia szybszą rejestrację leku lub sprawniejsze podejmowanie kluczowych decyzji dotyczących rozwoju produktu, takich jak: zmiany w procesie formułacyjnym, zmiany opakowania, zmiana skali wytwarzania produktu, szybsze wdrażanie zmian w produkcie już zarejestrowanym, np. nowa dawka leku, zmiana formy leku (np. dodanie kreski dzielącej), zmiana dostawcy API [39].

W tabeli 5 przedstawiono przykładowe zestawienie warunków ustalonych dla badań przewidywania

trwałości próbek przy użyciu metody ASAP. Od kilku do 21 dni próbki przechowywane są w warunkach podwyższonej temperatury (np. od 25 do 80°C) i różnej wilgotności (od bardzo niskiej, 10–11% do wysokiej, nawet 80%). Przykładowo, dla leków generycznych przygotowuje się dane dotyczące stabilności na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz uwzględniając wyniki przeprowadzonych badań na etapie preformulacji oraz testów stabilności. Określa się temperaturowe i wilgotnościowe punkty skrajne, a także uwzględnia się warunki pośrednie. Ilość badań jest z góry ustalona i dobiera się ją indywidualnie dla każdego preparatu. Można także dokonywać modyfikacji zaplanowanych ilości i rodzajów badań w przypadku potrzeby uzyskania dodatkowych informacji na temat próbki.

Projektowanie przyspieszonego testu stabilności według procedury ASAP przedstawia rycina 3. Badanie rozpoczyna się od wyboru API, które zostanie poddane testowaniu. Może być to substancja czynna, jak również gotowy produkt leczniczy. Kolejnym etapem jest zebranie danych literaturowych dotyczących zarówno właściwości, jak i stabilności wybranej substancji. Pod uwagę bierze się głównie temperaturę topnienia i wrzenia, rozpuszczalność, higroskopijność, zdolność tworzenia hydratów, występowanie różnych form krystalicznych (polimorfizm). Na tej podstawie ustala się eksperymentalne warunki starzenia i indywidualne limity degradacji (w%) dla każdej badanej próbki. Ważne jest też, by znać produkty degradacji i ich ilość po określonym czasie prowadzenia badań w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności. Następnie prowadzi się testy stabilności próbki testowej w dobranych warunkach.

W określonych punktach czasowych badania pobiera się materiał testowy, który następnie trafia do analizy. Badania analityczne wykonuje się przede wszystkim przy wykorzystaniu metod chromatograficznych, takich jak HPLC lub UPLC. Uzyskuje się wyniki zawartości substancji aktywnej oraz substancji pokrewnych (produktów degradacji API). Do dedykowanego oprogramowania przyspieszonego programu badań stabilności ASAPprime® wprowadzamy warunki, w jakich produkt był testowany, punkty czasowe i wyniki analizy. Po wprowadzeniu danych program wybiera model oraz rząd reakcji kinetycznej, a następnie generowany jest raport. W zależności od ustalonych limitów specyfikacji, na podstawie raportu zweryfikowana zostaje teza postawiona przed badaniem. Można uzyskać ocenę wpływu wprowadzonej zmiany w formułacji leku, zmiany w opakowaniu czy innej zmiany dokonanej w produkcie, która potencjalnie może mieć wpływ na trwałość. Na podstawie wprowadzonych informacji program generuje krzywą, która odzwierciedla prawdopodobieństwo uzyskania wybranego

Tabela 5. Przykładowe zestawienie warunków zaplanowanych badań przewidywania stabilności przy użyciu metody ASAP

T [°C]	RH [%]	Czas [dni]
50	50	7, 14, 21
60	30	7, 14, 21
70	11	7, 14, 21
70	75	10 (3–5 powtórzeń)
80	30	3, 7, 14
80	50	3, 7, 14 (3–5 powtórzeń)
5	–	21 (3–5 powtórzeń)

Rycina 3.
Etapy projektowania badania przyspieszonego testu stabilności z wykorzystaniem metody ASAP

zanieczyszczenia na danym poziomie w badanych warunkach temperatury oraz wilgotności w funkcji czasu. Bardzo wygodna i przydatna jest w ASAPie możliwość sporządzenia krzywej przewidywania na każdym etapie prowadzenia testu [37, 38].

ASAP wpływa także bezpośrednio na oszczędność czasu oraz kosztów związanych z funkcjonowaniem zakładów przemysłowych. Istotny jest także wpływ ASAP na planowanie i przebieg badań klinicznych, a w ostateczności na rejestrację produktu. Niektóre jednostki używają ASAP do podejmowania decyzji związanych ze stabilnością preparatu, jednak na ten moment ICH dopuszcza jedynie wykorzystanie oprogramowania dedykowanego do ASAP na etapie badań potwierdzających lub wspierających [40–42]. Obecnie w przemyśle farmaceutycznym badania uzyskane metodą ASAP mają charakter uzupełniający oraz wspierający badania tradycyjne.

Nowe podejście do badań stabilności

Hasłem przewodnim nowego podejścia do jakości farmaceutycznej we wszystkich obowiązujących wytycznych jest budowanie jakości poprzez projektowanie wszystkich etapów wytwarzania, a nie ocena gotowego produktu (*Quality cannot be tested into product, it has to be built in by design*) [43]. W piśmiennictwie ostatniej dekady zwraca się uwagę na fakt, że najważniejsza w badaniach jakości jest substancja lecznicza, jej profil zanieczyszczeń, właściwości oznaczanych zanieczyszczeń i weryfikacja bezpieczeństwa pod kątem genotoksyczności [16].

W obecnie obowiązujących wytycznych dotyczących badań stabilności można wyodrębnić zagadnienia wymagające interwencji regulacyjnej i zmian. Takie propozycje przedstawiono na **rycynie 4**. Wynikają one z szybkiego rozwoju nowoczesnych technik analitycznych, pojawiających się wciąż bardziej zaawansowanych możliwości technologicznych, a także interdyscyplinarnego łączenia dziedzin. Analizując je, wyłonić można także swoiste perspektywy stworzenia jednolitych schematów działań i korzystania ze wspólnej platformy na płaszczyźnie badań naukowych, rozwojowych i wdrożeniowych zapewnienia jakości farmaceutycznej. Obecnie trendy umożliwiające rozwój nauk farmaceutycznych koncentrują się na badaniach i wdrażaniu nowych i skutecznych leków. Istnieje wiele firm inwestujących ogromny kapitał finansowy i ludzki w drodze poszukiwania nowej, unikatowej cząsteczki o celowanym działaniu. Jednak należy pamiętać, że wciąż istnieje wiele przykładów substancji leczniczych starszej generacji stosowanych w praktyce medycznej. Są to leki znane, stosowane, udoskonalane technologicznie, ale co najważniejsze, wymagające wnikliwego spojrzenia w wyniki ich badań stabilności odpowiadające nowym wytycznym. Zmiany wprowadzone w ostatniej dekadzie do obowiązujących wytycznych wskazują, że należy prowadzić monitoring zmian strukturalnych nie tylko w przypadku nowych API, wprowadzanych dopiero do lecznictwa, ale także ciągłą kontrolą trzeba objąć substancje stosowane od wielu lat. Uzasadnieniem tego podejścia jest to, że szerokie spojrzenie na stabilność i bezpieczeństwo stosowania substancji leczniczych

Rycina 4.
Nowe podejście
do badań
stabilności

Obniżenie limitów wykrywalności
zanieczyszczeń **poniżej 0,1%**.
Identyfikacja wszystkich
oznaczanych, nawet w bardzo
małym stężeniu.
Oznaczenia genotoksyczności.

Farmakopee **nie wyczerpują**
wiedzy o możliwościach degradacji
substancji leczniczych.
Potrzebna jest wspólna platforma
wiedzy na temat właściwości
chemicznych, fizycznych
oraz ryzyku niestabilności
substancji leczniczych.

Objęcie obostrzeniami
wszystkich substancji
i produktów leczniczych,
zarówno nowych API
dopiero wprowadzanych
na rynek farmaceutyczny,
jak i **tych, które
funkcjonują na rynku
od wielu lat**

ICH - M7 2014 r.
Wymóg wykorzystania
przynajmniej dwóch
narzędzi prognozowania
mutagenności in-silico,
np. DEREK, QSAR.

PAT

Wyjście z ram standardowych metodyk, poszukiwanie wiedzy
o ryzyku degradacji API w niekonwencjonalny sposób,
interdyscyplinarne łączenie problematyki niestabilności

jest szansą na identyfikację nietypowych i groźnych zanieczyszczeń API, jak również opracowanie koncepcji ich eliminacji [27, 41]. Należy dodać, że realizacja takiej koncepcji może przyczynić się do nowego spojrzenia na ocenę stabilności i bezpieczeństwa API starszej generacji. Jest to związane z tym, że wiele badań i testów stresowych zostało już wcześniej wykonanych, a w świetle nowych wytycznych stają się niekompletne. Co więcej, rozwój metod analitycznych poszerza możliwości identyfikacji nowych, dotychczas nieobserwowanych produktów degradacji API. Dlatego też zauważa się konieczność wykazywania i poszukiwania problemów związanych ze stabilnością substancji leczniczych oraz potrzebę oceny toksyczności oznaczanych zanieczyszczeń.

Dodatkową kwestią do rozważań na temat istniejących wytycznych badań stabilności są monografie farmakopealne, zgodnie z którymi zanieczyszczenia farmakopealne i ich wzorce stanowią zestaw obowiązkowych substancji, których poszukuje się w próbkach farmaceutycznych, surowcach i produkcie. Komisja Farmakopei uaktualnia listę zanieczyszczeń każdego dnia, zatem biorąc pod uwagę liczbę wykonywanych analiz w przemyśle,

a także liczbę wdrażanych na rynek produktów, kształtuje się obraz niedoskonałości procedur. Podobnie w sferze badań naukowych, każdego dnia publikowanych jest tak wiele wyników, nowych zanieczyszczeń i ścieżek degradacji, że Komisje i organizacje tworzące wytyczne, a także Farmakopee, nie nadążają. Liczba generowanych danych w publikacjach naukowych dotyczących stabilności, czyli produktów degradacji, zanieczyszczeń genotoksycznych i innych istotnych kwestii dotyczących stabilności leków nie ma oddźwięku w wytycznych od razu, a często dopiero po kilku latach włącza się je na listę niebezpiecznych, toksycznych czy genotoksycznych substancji weryfikujących bezpieczeństwo stosowania leku.

Dlatego dostrzega się kształtowanie nowego podejścia do badań stabilności (**rycina 4**). Cele badań naukowych nad stabilnością zmierzają ku indywidualnej analizie każdej substancji i jej właściwości pod kątem czystości i identyfikacji zanieczyszczeń. Punktem zbieżności w rozpatrywaniu wszystkich możliwości powstania ryzyka degradacji substancji jest wspólna perspektywa i cel badań określający konieczność ciągłego poszukiwania nowej wiedzy o substancjach znanych, jak i nowych. W zależności

od wyzwań związanych z przygotowaniem próbek, celami analitycznymi i aktualnymi wytycznymi dla przemysłu taka platforma badawcza musi zostać sformalizowana, a badania merytorycznie oceniane oraz wykorzystywane w przemyśle.

Aby współczesne procedury analityczne i wymagania dotyczące zapewnienia jakości farmaceutycznej były ze sobą zbieżne nie tylko w zadaniach dotyczących bezpieczeństwa produktów leczniczych, co jest oczywiste, powinny także wymuszać poszukiwanie indywidualnych problemów stabilności, zarówno nowych, jak i związków starszej generacji. Niestety strategie w farmacji są różne, podczas gdy platformy publikacyjne często ograniczają się do nowych związków lub nowych metod analitycznych, bez wskazania głębszego celu i wytycznych dla kierunku poszukiwań naukowych.

Problem jednorodności testowanych próbek stałych

Najnowsze trendy badawcze wykorzystują metody oraz modele matematyczne pozwalające na określenie stabilności chemicznej API i produktów leczniczych zarówno w roztworze, jak i w stanie stałym. Obecnie znaczną uwagę skupia się na rodzaju i ilości substancji powstających w wyniku degradacji API. Nowe podejście do badań stabilności wykorzystuje wyniki oceny zawartości oraz czystości substancji i przy zastosowaniu nowatorskich metod statystycznych umożliwia opracowanie modelu oraz przewidywanie trwałości produktu. Często analizuje się także potencjał toksyczności, a nawet genotoksyczności API.

Oznaczanie niewielkich ilości produktów degradacji (zanieczyszczeń) jest wyzwaniem analitycznym i wymaga zaangażowania nowoczesnych metod do ich identyfikacji. Ponadto wymagania są ukierunkowane na poprawę jakości i zapewnienie bezpieczeństwa stosowania leków, a zatem istotne jest poznanie ryzyka degradacji.

Bardzo istotne jest oznaczanie i identyfikacja substancji, która „powstaje” jako odrębny produkt degradacji. Ważne jest też monitorowanie ubytku zawartości API. W większości przypadków tworzenie się produktów degradacji jest procesem złożonym i skomplikowanym, a często nawet łańcuchowym (np. w polimerach lub substancjach polimeryzujących) [44]. Z tego powodu wciąż poszukuje się prostych schematów postępowania, które pozwolą szybko i zero-jedynkowo odpowiedzieć na pytania związane ze stabilnością API i trwałością produktu leczniczego [25].

W klasycznych przemianach chemicznych zachodzące procesy można opisać na drodze reakcji, które determinuje i określa szybkość procesu degradacji. W badaniach stabilności często jednak dochodzi do reakcji złożonych, na które ma wpływ

wiele czynników. Najważniejszym wyznacznikiem wyboru metody badania jest stan skupienia próbki. W farmacji bada się zarówno stałe formułacje, w tym tabletki, proszki, peletki i granulaty, jak również ciekłe postaci, takie jak: roztwory, krople, syropy. Stan stały jest układem bardziej skomplikowanym niż ciecz, dlatego odrębnie analizuje się degradację w fazie stałej i największą liczbę opublikowanych badań na temat stabilności można znaleźć dla API w tym stanie skupienia [45, 46]. Problem polega jednak na tym, że niejednorodnie degradująca próbka stała może nie wykazywać zmian w wybranej analizie po rozpuszczeniu [26]. Tak najczęściej dzieje się w przypadku próbek narażonych na działanie światła. Ekspozycja badanej próbki na światło polega na umieszczeniu próbki o grubości nieprzekraczającej 2 mm w przezroczystym kwarcowym naczyniu, które w sposób bezpośredni naraża produkt na działanie promieniowania UV lub światła widzialnego. Gdy ocenia się fotostabilność produktu leczniczego, przeprowadzane jest badanie ekspozycji na światło w opakowaniu bezpośrednim, takim jak blister lub folia. Jeżeli opakowanie bezpośrednie nie chroni produktu przed działaniem światła, przeprowadzane jest badanie ekspozycji na światło produktu zapakowanego w opakowanie bezpośrednie oraz marketingowe, takie jak np. pudełko. Wykonywana jest także kontrola, tzw. ekspozycja ciemna. W tym badaniu produkt leczniczy w opakowaniu bezpośrednim zabezpieczonym materiałem nieprzepuszczalnym dla światła poddawany jest ekspozycji [47]. Zatem dostępność czynnika niszczącego jest zróżnicowana w różnych miejscach próbki. Dodatkowo, po pewnym czasie może się też okazać, że zainicjowane reakcje fotochemiczne dalej zachodzą, jako skutek działania rodników o dłuższym czasie życia. Zauważa się zatem potrzebę zastosowania i opracowania niestandardowych metod pobierania prób i analizowania skutków działania czynników zewnętrznych na próbkę.

Granice oznaczalności, limity zanieczyszczeń oraz badania *in-silico*

Regulacje ICH dotyczące testowania stabilności skupiają się głównie na czystości oraz oznaczaniu ilościowym i jakościowym zanieczyszczeń w substancjach leczniczych [6]. Do niedawna bazowały one na dawce substancji leczniczej przyjmowanej przez pacjenta, drogach podawania oraz czasie trwania terapii i nie przewidywały konieczności identyfikacji zanieczyszczenia, jeżeli występowało w stężeniu poniżej 0,1% [6]. Do oceny ilości zanieczyszczeń wykorzystywano w badaniach przede wszystkim końcowy produkt leczniczy, a nie API. Dopiero w 2004 r. nastąpiła dostrzegalna zmiana podejścia do norm i limitów wykrywalności zanieczyszczeń w związku z opracowaną przez EMA

koncepcją ustalania limitów zanieczyszczeń substancji leczniczych w celu oceny ich działania genotoksycznego [48]. Podjęto też kwestię konieczności prognozowania toksyczności oznaczonych w API zanieczyszczeń. Po pierwsze, wyeksponowano alarmująco niebezpieczne i reaktywne struktury chemiczne oddziałujące z DNA, takie jak *N*-tlenki, pierścienie aromatyczne, aminy aromatyczne, aldehydy, aromatyczne grupy nitrowe, alkilo-*N*-nitrozaminy [49]. Po drugie, zaakceptowano wykorzystanie technik komputerowych do przewidywania genotoksyczności i kancerogenności substancji, w tym narzędzi do prognozowania *in-silico*. Co najważniejsze, ustalono, że w przypadku przewidywania obecności w API substancji genotoksycznej, mają obowiązywać możliwie najniższe granice oznaczalności zanieczyszczeń [50]. W celu zminimalizowania ryzyka ICH w najnowszych wytycznych, opracowanych w 2014 r., przyjęła dodatkowo za wymóg wykorzystanie przynajmniej dwóch narzędzi prognozowania mutagenności *in-silico*, np. QSAR (*quantitative structure-activity relationships*), pozwalającej na ustalenie związku między budową i właściwościami z niej wynikającymi a działaniem toksycznym substancji chemicznych lub DEREK (*deductive estimation of risk from existing knowledge*), prognozujący toksyczność, genotoksyczność, rakotwórczość, działania uczulające na podstawie budowy chemicznej i wiedzy eksperckiej. Nowe kryteria dotyczące zanieczyszczeń są obecnie znacznym wyzwaniem, ponieważ nakazują określać szybkość tworzenia produktów rozkładu na poziomach niższych niż 0,1%, które wcześniej obowiązywały (wytyczne Q3A i Q3B) [16].

Rycina 5. Składowe PAT w zapewnieniu jakości farmaceutycznej

Wybór warsztatu analitycznego

EMA oraz WHO podkreślają, że w obecnych czasach istnieje dostęp do narzędzi analitycznych, które umożliwią osiągnięcie postawionej w wytycznych granicy oznaczalności. Metody analityczne o dużej specyficzności i czułości, takie jak chromatografia cieczowa/gazowa – LC/GC i wykorzystanie detektorów najnowszej generacji, pozwalają oznaczać i identyfikować substancje na bardzo niskim poziomie [42, 49, 51–54].

W 2002 r. FDA podjęło innowacyjne działania w kierunku kontroli jakości i oceny stabilności farmaceutycznej. Stwierdzono, że determinują je wszystkie etapy technologiczne, na których może dojść do kontaktu API z potencjalnie niszczącym czynnikiem, i w konsekwencji do powstania produktów degradacji. Od tego momentu skoncentrowano się głównie na rzetelnej ocenie jakości poprzez zapewnienie niezawodności monitorowania przebiegu procesów technologicznych, biorąc pod uwagę ich zmienność i wpływ na atrybuty jakości API. Procedury działań zebrano w ogólną inicjatywę Technologii Analizy Procesów (PAT) [55]. Jest to system obejmujący zintegrowane analizy chemiczne, fizyczne, mikrobiologiczne, matematyczne, prowadzone w celu projektowania, analizowania i kontrolowania procesów produkcyjnych. System oparty jest na pomiarach w czasie rzeczywistym krytycznych cech jakościowych i użytkowych surowców i materiałów w czasie procesów. Wdrożono specjalistyczne systemy pomiarów kontrolnych stanu API, które w sposób bezpośredni informują o jej stabilności, konieczności analizy ryzyka degradacji. PAT całościowo obejmuje takie zagadnienia związane z zapewnieniem jakości farmaceutycznej, jak:

- kontrola przebiegu **wszystkich** etapów procesowych wytwarzania produktów leczniczych – analiza ryzyka;
- koncentracja na niezawodności monitorowania przebiegu procesów technologicznych – uwzględnienie zmienności procesu **on-line**;
- zaangażowanie nowoczesnych metod analitycznych: spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR), spektroskopia Ramana, wspomagająco: metody termoanalityczne, dyfraktometryczne.

W kolejnym roku, w oparciu o ustalenia FDA, dokumentację farmakopealną i wytyczne ICH związane z kontrolą procesową API EMEA, która od 2009 r. występuje pod skróconym akronimem EMA, zaproponowała wykorzystanie do oceny jakości narzędzi analitycznych, które w szybki, jednoznaczny i nie niszczący sposób (alternatywny do metod separacyjnych, takich jak techniki chromatograficzne) potwierdzą tożsamość, ocenią stabilność i czystość analizowanych próbek zawierających API (**rycina 5**) [56–59]. Odtąd nie wystarczą już tradycyjne

metody analityczne, głównie ze względu na niemożliwość pracy w czasie rzeczywistym procesu. W tym celu PAT zaleca wykorzystanie spektroskopii w zakresie bliskiej podczerwieni (*Near-Infrared Spectroscopy*, NIR) oraz spektroskopii Ramana, które umożliwiają prowadzenie analizy jakościowej i ilościowej zarówno w czasie rzeczywistym procesu produkcji, czyli *on-line*, jak i laboratoryjnym, *at-line* i zdalnym *in-line* [60]. Dodatkowo wskazano na metody wspomagające PAT, które umożliwią monitorowanie ewentualnych zmian zachodzących w fazie stałej (bez rozpuszczania próbek), na przykład ocenę powierzchni substancji w fazie stałej w trakcie prowadzenia testów stabilności.

Do grupy narzędzi wspomagających PAT zalicza się również metody rentgenograficzne (np. rentgenowska dyfrakcja proszkowa – XRD, *X-Ray Diffraction*), termooanalityczne (np. różnicowa kalorymetria skaningowa – DSC, *Differential Scanning Calorimetry*, analiza termogravimetryczna – TGA, *Termogravimetric Analysis*), mikroskopowe (mikroskopia sił atomowych – AFM, *Atomic Force Microscope*, skaningowy mikroskop elektronowy – SEM, *Scanning Electron Microscope*). W technologii farmaceutycznej postaci leku niezwykle ważne jest potwierdzanie struktury krystalograficznej czy ustalanie konformacji przestrzennej zastosowanych substancji leczniczych i pomocniczych za pomocą technik rentgenograficznych, co dopiero od niedawna stało się powszechne [61]. Na podstawie tzw. historii termicznej analizowanej próbki niezbędnych informacji na temat jakości API dostarczają: różnicowa kalorymetria skaningowa oraz termogravimetria. Są to narzędzia o bardzo dużym potencjale badawczym do oceny jakości i monitorowania stanu substancji leczniczej. Podobnie techniki mikroskopowe, w połączeniu z technikami spektroskopowymi, takimi jak spektroskopia Ramana, spektroskopia fluorescencyjna, wraz z możliwością obrazowania chemicznego, stanowią przydatne narzędzie wspomagające koncepcję PAT.

Najnowsze metody oceny stabilności pozwalają w szybszy sposób ocenić trwałość produktu leczniczego, a tym samym usprawniają proces przygotowania dokumentacji rejestracyjnej oraz produkcji leku generycznego lub po wprowadzeniu zmian w formulacji leku już zarejestrowanego.

Podsumowanie

W pracy wykazano konieczność ustalenia strategii badań stabilności substancji leczniczych w kontekście aktualnych wymagań zawartych w farmakopeach. Zaznaczono potrzebę badań stresowych, omówiono problemy związane z istniejącymi wytycznymi, a także wskazano perspektywy dalszych zmian w wytycznych, wynikające z łączenia

dziedzin z dziedziną nauk farmaceutycznych. Zaważono, że pomaga w tym liczba nowych narzędzi, jakie są dostępne w badaniach, a także możliwości wyjścia badań naukowych poza ramy procedur przemysłowych. Wykazano, że budowanie wspólnej strategii zapewnienia jakości farmaceutycznej musi się zatem opierać na relacjach nauka–przemysł–lek.

Otrzymano: 2017.12.15 · Zaakceptowano: 2018.01.10

Piśmiennictwo

1. Ustawa Prawo Farmaceutyczne z dnia 6 września 2011 r.
2. OMCL Network of the Council of Europe, General dokument, PA/PH/OMCL (06) 3 9R, February 2016.
3. Waterman K. C., Adami R. C.: Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 2005, 293: 101–125.
4. ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and products, International Conference on Harmonisation, Szwajcaria, Genewa, 2003.
5. ICH Q1A (R) Stability testing of new drug substances and products, International Conference on Harmonisation, Szwajcaria, Genewa 1993.
6. ICH Q3A. Impurities in New Drug Substances, Tripartite International Conference on Harmonization Guideline Q3A, Szwajcaria, Genewa, 1994.
7. ICH, Q1E, Evaluation for stability data Q1E Current Step 4 version dated 6 February, Szwajcaria, Genewa, 2003.
8. ICH Q1 F Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV, Szwajcaria, Genewa, 2006.
9. World Health Organization, Annex 2 Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, WHO Technical Report Series, No. 953, Szwajcaria, Genewa, 2009.
10. Sznitowska M.: Farmacja stosowana. Technologia postaci leku. PZWL, 2017: 793.
11. Słownik językowy Glosbe on-line: <https://pl.glosbe.com/pl/pl/trwa-%C5%82o%C5%9B%C4%87>.
12. Słownik PWN on-line: <https://sjp.pwn.pl/slovníki/trwa-%C5%82o%C5%9B%C4%87.html>.
13. Smith R. J., Webb M. L., Ng, L., Lunn, G., Faustino P.: Analysis of drug impurities, John Wiley & Sons 2008, 13.
14. Roy J., Pharmaceutical impurities – a mini review. *AAPS PharmSci-Tech*, 2002, 3: 1–8.
15. Singh D. K., Sahu A., Kumar S., Singh S.: Critical review on establishment and availability of impurity and degradation product reference standards, challenges faced by the users, recent developments, and trends, *Trends Anal. Chem.*, doi: 10.1016/j.trac.2017.10.021, 2017.
16. ICH, ICH M7 – assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, Genewa, Szwajcaria, 2014.
17. The United States Pharmacopeia, 24th Revision, Asian Edition, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, 2000.
18. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/04/WC500164972.pdf.
19. Ali J., Khar R.K., Ahuja A.: Dosage form and design. 3rd ed. Delhi. Birla Publications Pvt. Ltd, 2008.
20. Yoshioka S., Valentino J. S.: Stability of drugs and dosage forms. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.
21. Mały słownik chemiczny, Wiedza powszechna, Warszawa 1974 r.
22. Carstensen, J. T.: Pharmaceutical principles of solid dosage forms. CRC Press. 1993.
23. Huynh-Ba K.: Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies, and best practices. Springer Science & Business Media, 2008.
24. Glass B. D., Novák C., Brown M. E.: The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. *J. Thermal Anal. Cal.* 2004, 77: 1013–1036.
25. Jamrógiewicz M., Ciesielski A.: Application of vibrational spectroscopy, thermal analyses and X-ray diffraction in the rapid evaluation of the stability in solid-state of ranitidine, famotidine and cimetidine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 107: 236–243.
26. Jamrógiewicz M.: Consequences of New Approach to Chemical Stability Tests to Active Pharmaceutical Ingredients, *Front. Pharmacol.* 2016, 7.
27. Alsante K. M., Huynh-Ba K. C., Baertschi S. W., Reed R. A., Landis M. S., Furness S., Olsen B., I wsp.: Recent trends in product development and regulatory issues on impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 2: Safety considerations

- of impurities in pharmaceutical products and surveying the impurity landscape. *AAPS PharmSciTech* 2014, 15: 237–251.
28. Singh M. Junwal G. Modhe H. Tiwari M. Kurmi N. Parashar P. Sidduri: Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *Trends Anal. Chem.* 2013, 49: 71–88.
 29. McGovern T., Jacobson-Kram D.: Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. *Trends Anal. Chem.*, 2006, 25: 790–795.
 30. Waterman, K. C., Carella, A. J., Gumkowski, M. J., Lukulay, P., MacDonald, B. C., Roy, M. C., Shamblyn, S. L.: Improved protocol and data analysis for accelerated shelf-life estimation of solid dosage forms. *Pharm. Res.*, 2007, 24(4): 780–790.
 31. Waterman, K. C.: Understanding and predicting pharmaceutical product shelf-life. *Handbook of stability testing in pharmaceutical development*, 2009: 115–135.
 32. Alsante K. M., Ando, A., Brown, R., Ensing, J., Hatajik, T. D., Kong, W., Tsuda, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv. Drug Del. Rev.*, 2007, 59: 29–37.
 33. Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*. Second Edition, 2016: 20.
 34. Yoshioka S., Aso, Y. Correlations between molecular mobility and chemical stability during storage of amorphous pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* 2007, 96: 960–981.
 35. Chiang N., Rades T., Aaltonen J.: An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 55: 618–644.
 36. Brittain H.G., Bogdanowich S.J., Bugay D.E., DeVincentis J., Lewen G., Newman A.W.: Physical characterization of pharmaceutical solids, *Pharm. Res.* 1991, 8: 963–973.
 37. Waterman K. C., Carella A. J., Gumkowski M. J., Lukulay P., MacDonald B. C., Roy M. C., Shamblyn S. L.: Improved protocol and data analysis for accelerated shelf-life estimation of solid dosage forms. *Pharm. Res.* 2007, 24(4): 780–790.
 38. Li H., Nadig D., Kuzmission A., Riley C. M.: Prediction of the changes in drug dissolution from an immediate-release tablet containing two active pharmaceutical ingredients using an accelerated stability assessment program (ASAPprime®). *AAPS Open* 2016, 2(1): 7.
 39. Bardel A.: *Życie produktu leczniczego*. LAB Laboratoria, Aparatura, Badania, 2015: 20.
 40. Guideline I.H.T.: Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1D. Finalized guideline: February 2002.
 41. Görög S.: Identification in drug quality control and drug research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 69: 114–122.
 42. EMA, CHMP, Guideline on Stability Testing for Applications for Variations to a Marketing Authorization, 2012, London, UK.
 43. Juran, J. M., on quality by design: the new steps for planning quality into goods and services. New York: The Free Press 1992.
 44. Waterman, K. C., Swanson, J. T., & Lippold, B. L., A scientific and statistical analysis of accelerated aging for pharmaceuticals. Part 1: accuracy of fitting methods. *J Pharm Sci.* 2014, 103(10): 3000–3006.
 45. Jens, T., Cartensen. *Drug Stability-Principles and Practices*. Marcel Dekker Inc., New York 1994, 2: 1–18.
 46. Waterman, K. C., The application of the accelerated stability assessment program (ASAP) to quality by design (QbD) for drug product stability. *AAPS PharmSciTech* 2011, 12(3): 932.
 47. ICH Q1B Guideline, I. H. T., Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products., 1996, Current Step, 4.
 48. EMEA, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Guideline on the limits of genotoxic impurities, CPMP/SWP/5199/02, 2004, London, UK.
 49. McGovern T., Jacobson-Kram D. Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. *TrAC Trends in Anal. Chem.* 2006, 25: 790–795.
 50. Dow L. K., Hansen M. M., Pack B. W., Page T. J., Baertschi S. W., The assessment of impurities for genotoxic potential and subsequent control in drug substance and drug product. *J. Pharm. Sci.* 2013, 102: 1404–1418.
 51. WHO, Guidelines on submission of documentation for a multisource (generic) finished pharmaceutical product for the WHO Prequalification of Medicines Programme: quality par, Annex 4, 2012.
 52. Giordani A., Kobel W., Gally H. U., Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011, 43: 1–15.
 53. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2) Current Step 4 version dated August 2009.
 54. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation, July 2000.
 55. FDA (2003) “PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance (Draft Guideline)”. <http://www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm>
 56. European Pharmacopoeia 8.0, 2015, 5.4.
 57. ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Topic Q8 (R2): Pharmaceutical Development, ICH, 2009, Geneva.
 58. ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Topic Q9: Quality Risk Management, ICH, 2005, Geneva.
 59. ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Topic Q10: Pharmaceutical Quality System, ICH, 2008, Geneva.
 60. EMEA, Note for guidance on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, EMEA/CVMP/961/01,2009, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003331.pdf
 61. Paradowska K., Wawer I., Solid-state NMR in the analysis of drugs and naturally occurring materials. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, 93: 27–42.