

ICH smjernice za testove prisilne razgradnje farmaceutskih supstanci

Vrdoljak, Leonarda

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:290814>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Leonarda Vrdoljak

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Leonarda Vrdoljak

Predala je izrađen završni rad dana: 18. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Kristina Tolić Čop, asistentica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Ivan Brnardić, Sveučilište u Zagrebu Metalurški fakultet u Sisku

dr. sc. Katarina Mužina, viša asistentica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 21. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Leonarda Vrdoljak

**ICH SMJERNICE ZA TESTOVE PRISILNE
RAZGRADNJE FARMACEUTSKIH SUPSTANCI**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Matija Cvetnić

Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Matija Cvetnić

dr. sc. Kristina Tolić Čop

prof. dr. sc. Ivan Brnardić

Zagreb, rujan 2023.

Izražavam svoju zahvalnost doc. dr. sc. Matiji Cvetniću na izvanrednom mentorstvu, susretljivosti, dragocjenim savjetima i razumijevanju tijekom cijelog procesa izrade i oblikovanja ovog rada.

Također, želim izraziti iskrenu zahvalnost svojim roditeljima, članovima obitelji i prijateljima na korisnim savjetima i neprestanoj podršci tijekom cijelog istraživanja i pisanja rada, ali i kroz cijeli preddiplomski studij. Vaša podrška i vjera u mene su mi bili izuzetno važni.

Sažetak

Ispitivanja stabilnosti uobičajena su praksa tijekom razvoja i proizvodnje novih farmaceutskih proizvoda. Provede se kako bi se pratile promjene u aktivnim tvarima i gotovim lijekovima tijekom proizvodnje i skladištenja s ciljem osiguranja da ovi proizvodi ostanu djelotvorni, sigurni i kvalitetni tijekom cijelog njihovog roka trajanja.

Jedna od ključnih metoda za ispitivanje stabilnosti je metoda prisilne razgradnje. Trenutačno, ICH, FDA, WHO i EMA su organizacije koje se bave regulatornim smjernicama o studijama prisilne razgradnje, a ovaj rad se temelji na ICH smjernicama. Ova metoda ne samo da pomaže u procjeni stabilnosti tvari već također omogućava identifikaciju mogućih putanja razgradnje i karakterizaciju produkata razgradnje koji se mogu formirati. Zbog toga je od izuzetne važnosti istražiti formiranje raznih onečišćenja pod utjecajem različitih vanjskih čimbenika kao što su hidrolitički (kiseli ili lužnati), oksidacijski, fotolitički, termički ili vlažni uvjeti.

Do danas su ICH smjernice doprinijele postizanju dosljednosti u mnogim aspektima procjene kvalitete farmaceutskih proizvoda. Kada je riječ o studijama prisilne razgradnje, ICH ističe njihovu ključnu važnost pružajući općenite smjernice i preporuke za njihovo provođenje. Nekoliko ICH smjernica bavi se temom prisilne razgradnje, a to su: ICH Q1A(R2) – Ispitivanje stabilnosti novih farmaceutskih tvari i proizvoda, ICH Q1B – Ispitivanje fotostabilnosti novih farmaceutskih tvari i proizvoda, ICH Q2(R1) – Validacija analitičkih postupaka: Metodologija, ICH Q3A(R2) – Nečistoće u novim farmaceutskim tvarima, ICH Q3B(R2) – Nečistoće u novim farmaceutskim proizvodima, ICH Q5C – Ispitivanje stabilnosti biotehnoloških/bioloških proizvoda i M4Q(R1) – Zajednički tehnički dokument (CTD): Kvaliteta. U ovom radu dan je pregled ovih smjernica i uvjeti provođenja ispitivanja.

Abstract

Stability testing is a common practice in the development and manufacture of new pharmaceutical products. These tests are performed to monitor changes in active ingredients and finished drug products during manufacture and storage to ensure that these products remain effective, safe, and of high quality throughout their shelf life.

One of the most important methods for stability testing is forced degradation. Currently, ICH, EMA, FDA and WHO are organizations involved in regulatory guidelines for forced degradation studies, and this paper is based on the guidelines from ICH. This method not only helps to assess the stability of compounds, but also allows the identification of potential degradation pathways and the characterization of degradation products that may be formed. Therefore, it is of utmost importance to study the formation of different impurities under the influence of various external factors such as hydrolytic (acidic or alkaline), oxidative, photolytic, thermal or humid conditions.

To date, the ICH guidelines have helped achieve consistency in many aspects of pharmaceutical product quality assessment. When it comes to forced degradation studies, ICH emphasizes their critical importance by providing general guidelines and recommendations for their conduct. Several guidelines from ICH address the issue of forced degradation, including ICH Q1A(R2) – Stability Testing of New Drug Substances and Products, ICH Q1B – Photostability Testing of New Drug Substances and Products, ICH Q2(R1) – Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH Q3A(R2) – Impurities in New Drug Substances, ICH Q3B(R2) – Impurities in New Drug Substances, ICH Q5C – Stability Testing of Biotechnological/Biological Products, and M4Q(R1) – The Common Technical Document (CTD): Quality. This paper provides an overview of these guidelines and the conditions for performing the tests.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PRISILNA RAZGRADNJA	2
2.1.1. Povijest prisilne razgradnje.....	3
2.1.2. Svrha prisilne razgradnje	4
2.2. ICH (THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE).....	6
2.2.1. Uvjeti prisilne razgradnje	9
2.2.1.1. Hidroliza	12
2.2.1.2. Oksidacija	14
2.2.1.3. Fotoliza	16
2.2.1.4. Termička razgradnja	19
2.2.1.5. Vlažnost	22
2.2.2. ICH Q1A(R2) – Ispitivanje stabilnosti novih farmaceutskih tvari i proizvoda	23
2.2.3. ICH Q1B – Ispitivanje fotostabilnosti novih farmaceutskih tvari i proizvoda	24
2.2.4. ICH Q2B(R1) – Validacija analitičkih postupaka: Metodologija	25
2.2.5. ICH Q3A(R2) – Nečistoće u novim farmaceutskim tvarima	27
2.2.6. ICH Q3B(R2) – Nečistoće u novim farmaceutskim proizvodima	27
2.2.7. Q5C – Ispitivanje stabilnosti biotehnoških/bioloških proizvoda	27
2.2.8. M4Q(R1) – Zajednički tehnički dokument (CTD): Kvaliteta.....	28
3. ZAKLJUČAK	29
4. LITERATURA.....	30

1. UVOD

Dobra proizvođačka praksa (DPP) predstavlja ključni element u okviru sustava osiguranja kvalitete koji ima za cilj dostići dosljednu i strogo nadziranu proizvodnju farmaceutika u skladu s primjenjivim standardima kvalitete, važećim propisima i u svrhu njihove pravilne uporabe. Svaki proizvođač lijekova namijenjenih za europsko tržište, neovisno o mjestu proizvodnje, dužan je imati potvrdu o primjeni DPP koju izdaje nadležno tijelo države članice Europske unije [1]. S obzirom na različite vrste materijala, metode proizvodnje i kemijski sastav lijekova, jasno je da njihovi rokovi trajanja i procesi razgradnje nisu jednaki. Kao rezultat toga, učinkovitost lijekova razlikuje se tijekom određenog vremenskog razdoblja, a konačno i svaka jedinka zasebno ima različitu reakciju i otpor na do sada primjenjivane metode razgradnje. Rezultati provedenih istraživanja i dosadašnje prakse upućuju na važnost provođenja studija prisilne razgradnje farmaceutskih proizvoda jer se na temelju njih može utvrditi potreba za predviđanjem dugoročne postojanosti ljekovitih tvari. Studije prisilne razgradnje koriste se za razvoj analitičkih metodologija kako bi se bolje pratila stabilnost aktivnih sastojaka i lijekova te radi pružanja informacija o putevima razgradnje proizvoda. Stabilnost farmaceutske supstance kritični je parametar koji može utjecati na snagu, čistoću i sigurnost, a svaka promjena u stabilnosti lijeka može predstavljati rizik za pacijenta. Bitno je naglasiti da istraživanja o prisilnoj razgradnji nisu osmišljena da se utvrde kvalitativna ili kvantitativna ograničenja za promjenu ljekovite tvari ili ljekovitog proizvoda. Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za farmaceutske proizvode za ljudsku uporabu (ICH) usklađuje svoje smjernice koje su implementirane u Europskoj uniji, Japanu i Sjedinjenim Američkim Državama. ICH smjernice za studije prisilne razgradnje farmaceutika naglašavaju da se izloženost ljekovitih tvari ili farmaceutskih proizvoda treba provoditi pod strožim uvjetima od ubrzanih. Za izvođenje prisilne razgradnje potrebni su uvjeti koji u pravilu podrazumijevaju izlaganje farmaceutskih uzoraka raznim ekstremnim uvjetima poput povišene ili snižene temperature, svjetlosti, vlažnosti itd. Tendencija ICH smjernica je proširenje i globalizacija njihove primjene s današnjih potpisnica na ostatak svijeta kako bi na taj način bili uključeni u razvojni proces svakog farmaceutskog proizvoda [2].

2. TEORIJSKI DIO

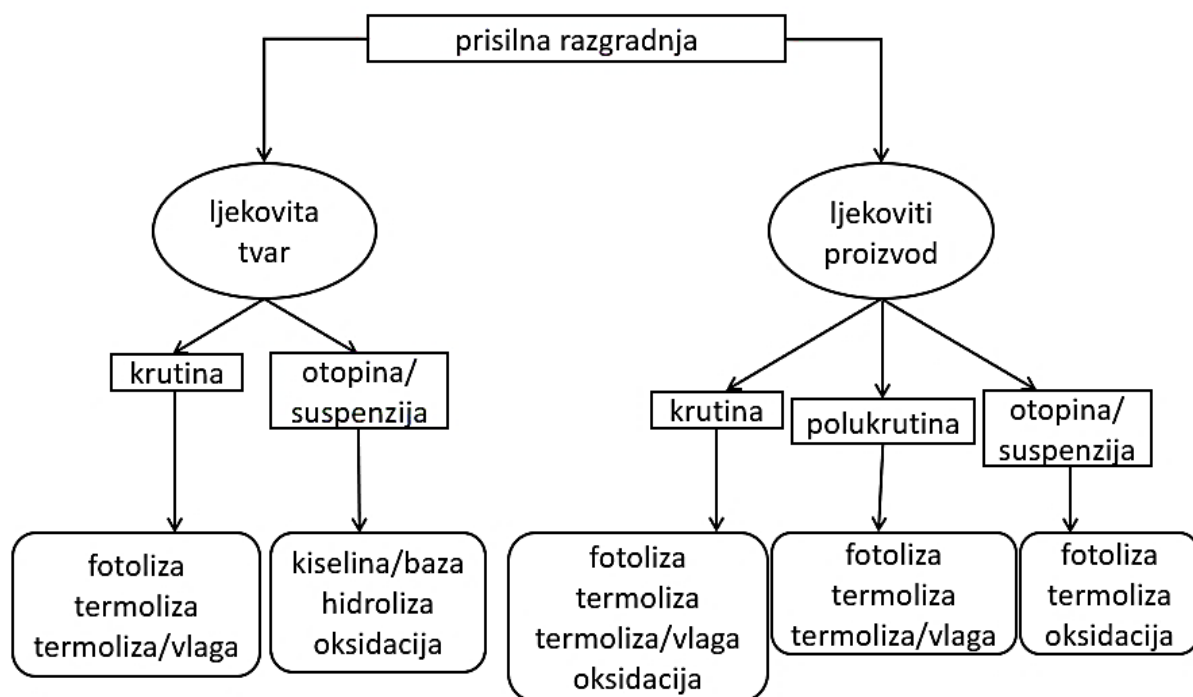
2.1. PRISILNA RAZGRADNJA

Kako bi se razvio učinkovit, siguran i stabilan lijek, potrebno je temeljito ispitati kemijsku i fizikalnu kompatibilnost lijeka. Kemijska stabilnost lijeka odnosi se na moguće kemijske promjene koje mogu utjecati na smanjenje njegove djelotvornosti ili dovesti do nastanka otrovnih produkata. Ona je ključna jer se želi osigurati da lijek zadrži svoju aktivnost i da ne proizvodi štetne tvari tijekom skladištenja i uporabe. Fizikalna stabilnost lijeka također je važna i uključuje promjene poput mirisa, boje, okusa, strukturalne promjene kao što je hidracija, dehidracija, solvatacija ili formiranje novih polimorfni oblika. Svi ti parametri utječu, u većoj ili manjoj mjeri, na samu valjanost i bioraspoloživost lijeka. Te analize su potrebne kako bi se osiguralo da lijek ostane učinkovit, siguran za uporabu te stabilan tijekom cijelog vremena trajanja, a važno je kao jamstvo da pacijenti dobivaju pravilan i djelotvoran lijek te da se minimalizira rizik od nuspojava ili nepoželjnih reakcija [3,4].

Provođenje studija stabilnosti uključuje dugoročne i ubrzane studije. Dugoročne studije stabilnosti traju dvanaest, a ubrzane šest mjeseci. Također, u primjeni dugoročne studije stabilnosti, uvjeti su manje strogi nego kod ubrzanih. Studije prisilne razgradnje, za razliku od studija stabilnosti, mogu izvršiti ispitivanja već u nekoliko tjedana. Mnogi znanstvenici pribjegavaju ispitivanjima prisilne razgradnje upravo zbog kraćeg vremenskog trajanja. Takvi uzorci mogu poslužiti u razvoju metoda, ali i za analizu uzoraka dobivenih dugoročnim i ubrzanim studijama stabilnosti [5].

Prisilna razgradnja (eng. *forced degradation*) proces je koji uključuje razgradnju lijekova i lijekovitih tvari u uvjetima težim od uobičajenih ili ubrzanih pri čemu nastaju razgrađeni produkti koji se proučavaju kako bi se utvrdila stabilnost molekule. ICH smjernice navode da se prilikom testiranja otpornosti na ekstremnije uvjete, koji su namijenjeni identificiranju vjerojatnih produkata razgradnje, određuje i objašnjava način razgradnje te se uspostavlja validacija stabilnosti koja ukazuje na korištene uvjete [6]. Takva informacija im uveliko pomaže koncipirati podatke o uvjetima skladištenja, roku trajanja, formulaciji farmaceutika, materijalu i vrsti pakiranja, a po tome se slažu prikladne upute o čuvanju lijeka za korisnike. Analiza stabilnosti značajna je i u regulatornoj dokumentaciji zbog ispunjavanja registracijskog dosjea koji je obavezan za izdavanje svakog lijeka [7,8].

Preporučuje se da studija razgradnje započne tijekom razvojne faze lijeka kako bi se prikupilo što više informacija o stabilnosti molekule i kasnije formulacije. Iznimno je važno istražiti vrste nastalih nečistoća pri različitim promjenama vanjskih uvjeta kao što su svjetlo, vlaga, temperatura, pH vrijednost i drugi. Najčešći eksperimentalni uvjeti pri kojima se provodi prisilna razgradnja su hidrolitički, oksidacijski, fotolitički, termolitički i vlažni. Budući da se uvjeti ispitivanja lijekovitih proizvoda i lijekovite tvari donekle razlikuju, na slici 1 prikazani su preporučeni uvjeti za oba slučaja [9].



Slika 1. Uvjeti prisilne razgradnje [10]

2.1.1. Povijest prisilne razgradnje

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća počeli su se pojavljivati problemi s očuvanjem kvalitete lijekova prilikom skladištenja tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Kako bi se riješio ovaj problem, razvile su se ključne smjernice i regulative. 1975. godine farmakopeja SAD-a (eng. *United States Pharmacopeia*, USP) uvela je smjernice o rokovima trajanja lijekova. 1984. godine Američka Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) objavila je svoje smjernice o praćenju stabilnosti lijekova, a tri godine nakon izdala je posebne zahtjeve za analizu i praćenje stabilnosti ljudskih lijekova u svrhu

određivanja roka trajanja. 1990. Međunarodna konferencija o harmonizaciji (eng. *International Conference of Harmonization*, ICH) izdala je smjernice s ciljem usklađivanja regulatornih zahtjeva na globalnoj razini. Trenutno se odnose na SAD, EU i Japan. Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO) također je objavila smjernice o stabilnosti lijekova 1996. godine. Ove inicijative i smjernice igrale su ključnu ulogu u ostvarivanju sigurnosti i učinkovitosti lijekova tijekom njihova roka trajanja te su pridonijele usklađenosti regulativa u farmaceutskoj industriji [11].

Trenutno je dostupno nekoliko regulatornih smjernica o izvođenju studija prisilne razgradnje, a uključuju EMA (eng. *European Medicines Agency*), ICH, FDA i WHO. Međutim, niti jedna od tih smjernica ne pruža potpuno jasne i detaljne upute za izvođenje ispitivanja, a često se ne specificira precizan opseg, trajanje i najučinkovitija metoda za ispitivanje razgradnje određenog spoja. Uvjeti i vrijeme izloženosti prilično su široki što može izazvati različite rezultate za isti eksperiment. To dovodi do razilaženja u pristupima i izvedbi studije, kao i u interpretaciji i tumačenjima između različitih farmaceutskih tvrtki. Općenito se uvjeti odabiru prema dosadašnjem iskustvu farmaceuta i već provedenim ispitivanjima uz prethodno poznavanje karakteristika molekula koje sudjeluju [9].

2.1.2. Svrha prisilne razgradnje

Svrha istraživanja stabilnosti i razgradnje je prikupljanje dokaza o tome kako se kvaliteta i učinkovitost lijekova i ljekovitih tvari mijenja tijekom vremena pod utjecajem različitih ekstremnih okolišnih uvjeta. Ovo istraživanje ima za cilj odrediti period retestiranja ili utvrditi rok valjanosti farmaceutika, ali i preporučiti uvjete skladištenja. Period retestiranja je vremenski interval nakon kojeg treba provjeriti odgovara li lijek specifikacijama te je li i dalje prikladan za upotrebu. Rok trajanja je razdoblje unutar kojeg aktivna farmaceutska tvar (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) ispunjava specifikacije pod uvjetom da je pohranjena prema propisanim uvjetima. Važno je napomenuti da se studije stabilnosti provode kako na ljekovitoj tvari, tako i na gotovom ljekovitom proizvodu. Informacije o stabilnosti ljekovite tvari mogu uključivati pretpostavke za odabir najpovoljnijih uvjeta za skladištenje i čuvanje ovisno o dosadašnjim rezultatima ispitivanja. Uvjeti ispitivanja stabilnosti odabiru se ovisno o klimatskim uvjetima zbog čega je svijet podijeljen na četiri klimatske zone [12].

Svrha prisilne razgradnje u istraživanju razvoja lijeka može se podijeliti na mnoge aspekte, uključujući naredne stavke:

- Analiza kemijskih svojstava molekule ljekovite tvari: Utvrđivanje osnovnih kemijskih karakteristika molekule ljekovite tvari.
- Istraživanje razgradnog puta ljekovitog oblika i proizvoda: Razumijevanje kako se ljekovita tvar razgrađuje i koje su moguće putanje razgradnje.
- Otkrivanje razgradnih mehanizama: Utvrđivanje procesa razgradnje koji utječu na ljekovitu tvar ili farmaceutik kao što su hidroliza, oksidacija, termoliza ili fotoliza.
- Razlikovanje razgradnih produkata: Mogućnost razlikovanja razgradnih produkata koji potječu iz ljekovite tvari od onih koji se formiraju iz drugih komponenata u formulaciji lijeka.
- Identifikacija struktura razgradnih produkata: Identifikacija i karakterizacija struktura spojeva koji nastaju kao produkti razgradnje.
- Dobivanje razgradnog profila sličnog dugoročnim uvjetima stabilnosti: Simulacija razgradnog profila koji bi se mogao pojaviti tijekom dugotrajnih ispitivanja stabilnosti pod određenim uvjetima.
- Razvoj metoda za praćenje stabilnosti: Razvoj metoda analize koje omogućuju praćenje stabilnosti lijeka tijekom vremena poput stabilitetno-indikativne.
- Razvoj stabilnih ljekovitih proizvoda: Rad na poboljšanju formulacija kako bi se osigurala stabilnost i produžila trajnost ljekovitih proizvoda [9].

2.2. ICH (THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE)

ICH, skraćeno za Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih specifikacija lijekova za primjenu kod ljudi, ima zadaću koordinirati i uskladiti tehničke zahtjeve i smjernice kod lijekova za ljudsku uporabu. Jedina okuplja regulatorna tijela i farmaceutsku industriju raspravljajući o tehničkim i znanstvenim aspektima lijekova, ali i izradi ICH smjernica. Osnovana je 1990. godine i postupno se razvijala kako bi odgovorila na sve globalnija pitanja u farmaceutskom sektoru, a njene smjernice primjenjuje sve veći broj regulatornih tijela. Trenutno uključuje 21 člana i 36 promatrača. Ideja ICH je postići bolju i bržu usklađenost u svijetu kako bi se osiguralo da visokokvalitetni lijekovi budu učinkoviti i sigurni uz ispunjavanje visokih standarda. Njihov slogan je „Harmonizacija za bolje zdravlje!“ [2]. Vijeće okuplja farmaceutska regulatorna tijela u Sjedinjenim Američkim Državama, Japanu i Europi zajedno s farmaceutskim trgovinskim institutima iz tih regija. Cilj je optimizirati usklađenost s tehničkim smjernicama i registracijskim zahtjevima za proizvode kako bi se smanjilo nepotrebno dupliciranje ispitivanja i izvještavanja tijekom istraživanja i razvoja novih lijekova. Kasnije u radu objašnjene su smjernice koje se odnose na testove prisilne razgradnje [13].

Definirani koraci za postizanje navedenih ciljeva podijeljeni su u četiri područja farmaceutskih pravilnika:

Kvaliteta (Q) - proizvodnja, kontrola i stabilnost proizvoda i sastojaka

- 25 smjernica

Učinkovitost (E) - projektiranje, ponašanje, sigurnost i izvješćivanje o kliničkim ispitivanjima

- 22 smjernice

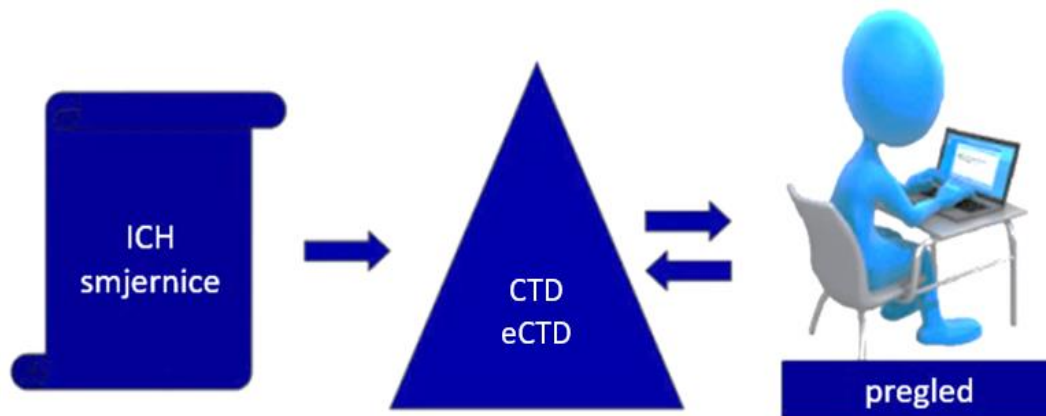
Sigurnost (S) - razvoj strategije za nekliničko ispitivanje

- 16 smjernica

Multidisciplinarni (M) - različite kategorije uključujući CTD/eCTD, Medicinski rječnik i e-standarde za prijenos regulatornih informacija

- 9 smjernica

Pored toga, ICH je razvio širok niz dokumenata koji sadrže pitanja i odgovore, kao i edukativne materijale koji će pomoći u budućem razjašnjavanju terminologije i tumačenja smjernica. Zajednički tehnički dokument (eng. *Common Technical Document*, CTD) objedinjuje sve informacije o kvaliteti, sigurnosti i učinkovitosti u zajedničkom, usklađenom formatu te one koje su prihvaćene regulativama u svim ICH poljima. Također, CTD je pokrenuo revoluciju u regulativama kod industrijske proizvodnje (slika 2) [14].



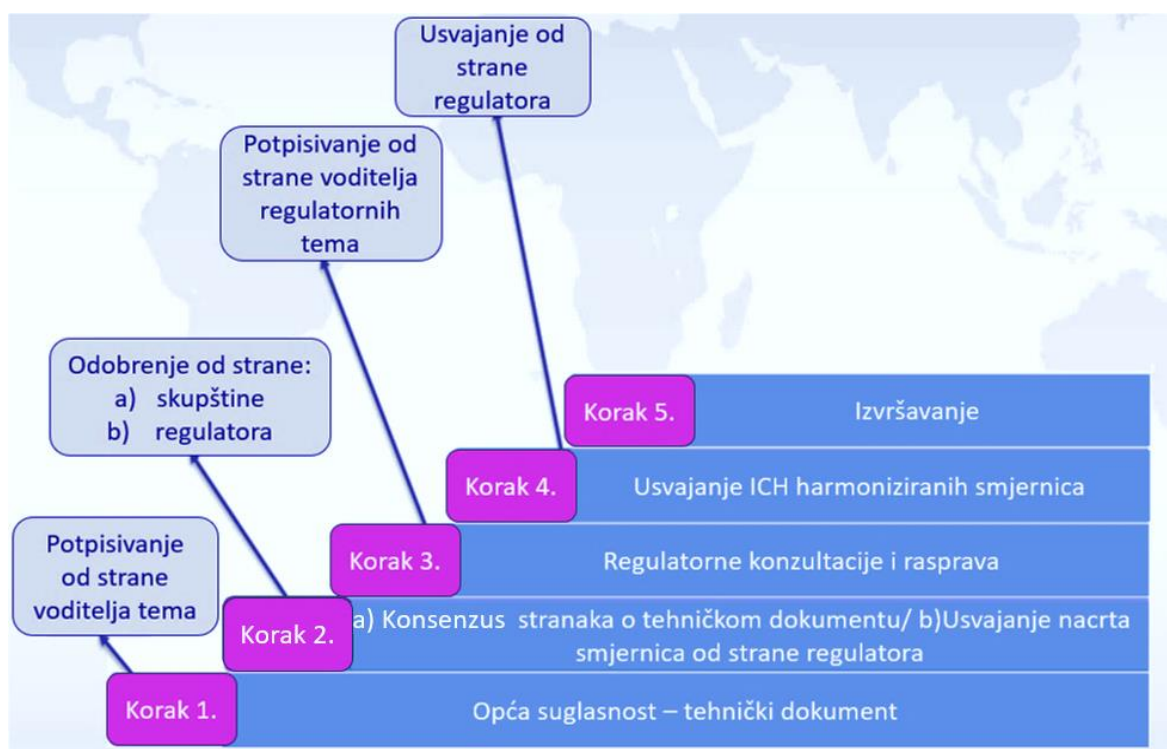
Slika 2. Regulativa industrijske proizvodnje [14]

Svrha ICH je promocija javnog zdravstva putem međunarodnog usklađivanja kojim se doprinosi:

- Smanjenju nepotrebnih testiranja na životinjama te da se isto provodi bez ugrožavanja, uz sigurnost i učinkovitost kroz tehničke smjernice koje provodi regulatorno tijelo vlasti
- Sprječavanju nepotrebnog udvostručavanja kliničkih i tržišnih ispitivanja
- Razvoju i proizvodnji novih lijekova
- Registraciji i nadzoru nad novim lijekovima
- Izvješćivanju o sigurnosti nakon izdavanja odobrenja i farmakovigilancije [15]

Farmakovigilancija obuhvaća niz radnji koje se tiču identifikacije, razumijevanja, vrednovanja, upravljanja i prevencije nuspojava lijekova, a uključuje i nove informacije o rizicima povezanih s njihovom primjenom [16].

Proces razvoja i promjene ICH smjernica prikazan je u pet koraka na slici 3.



Slika 3. Koraci za razvoj i promjenu ICH smjernica [14]

Misija ICH, kao međunarodnog neprofitnog udruženja prema švicarskom zakonu 23. listopada 2015., utjelovljena je u statutu kako slijedi:

- Davanje preporuka za postizanje veće usklađenosti u tumačenju i primjeni tehničkih smjernica i zahtjeva za registraciju i održavanje farmaceutskih proizvoda
- Održavanje foruma za konstruktivan dijalog između regulatornih tijela i farmaceutske industrije o znanstvenim pitanjima i o usklađivanju tehničkih zahtjeva za proizvode
- Međunarodni doprinos zaštiti javnog zdravlja u interesu pacijenata
- Praćenje i ažuriranje usklađenih tehničkih zahtjeva koji dovode do većeg uzajamnog prihvaćanja podataka o istraživanju i razvoju
- Izbjegavanje različitih budućih zahtjeva usklađivanjem odabranih tema koje su potrebne za napredak i razvoj novih tehnologija za proizvodnju lijekova
- Olakšavanje usvajanja novih ili poboljšanih pristupa tehničkom istraživanju i razvoju kojima se ažuriraju ili zamjenjuju trenutačne prakse

- Poticanje primjerene provedbe i integracije zajedničkih standarda širenjem i priopćavanjem informacija te obuku za provedbu i uporabu usklađenih smjernica
- Razvitak pravilnika za ICH pod nazivom Medicinski rječnik za terminologiju regulatornih djelatnosti (eng. *Medical Dictionary for Regulatory Activities Terminology*, MedDRA) kao standardiziranog rječnika koji koristi bogatu i vrlo specifičnu standardiziranu medicinsku terminologiju za olakšavanje međunarodne razmjene regulatornih informacija za medicinske proizvode [17]

2.2.1. Uvjeti prisilne razgradnje

Za odabir uvjeta provedbe formalnih studija stabilnosti gotovih proizvoda s ciljem određivanja roka valjanosti, svijet je podijeljen na četiri klimatske zone (I-IV) na temelju prosječne kinetičke temperature i relativne vlage. Svaka od tih zona ima specifične uvjete za pohranu. ICH smjernice primjenjuju se na područja koja obuhvaćaju klimatske zone I i II, a smjernice za istraživanje stabilnosti u klimatskim zonama III i IV izdaje WHO [18].

Razvoj novih lijekova ili ljekovitih tvari uključuje provođenje stres ispitivanja kako bi se razumjela njihova stabilnost pri različitim uvjetima. Prema FDA, preporučuje se provođenje stres ispitivanja u trećoj fazi razvoja lijeka. Usprkos tim preporukama, mnogi istraživači preferiraju započeti ova ispitivanja već u ranoj pretkliničkoj fazi ili u početnoj fazi kliničkih ispitivanja. To omogućuje dovoljno vremena za identifikaciju potencijalnih razgradnih produkata i optimizaciju uvjeta prisilne razgradnje. Stres ispitivanja obično uključuju testiranje tvari pod ekstremnim uvjetima kao što su različite pH vrijednosti, vlažnost, svjetlo, kisik i povišena temperatura. Nema univerzalnih uputa za odabir određenih uvjeta. Obično se cilja na razgradnju 5-20 % farmaceutski aktivnih tvari ili ljekovitih supstanci. Sva navedena ispitivanja provode se na jednoj seriji uzoraka iako ne moraju nužno rezultirati stvaranjem razgradnih produkata. Ispitivanje se zaustavlja ukoliko nema vidljivih promjena nakon izlaganja tvari stresnim uvjetima propisanim za prisilnu razgradnju, a to sugerira na stabilnost molekule. Važno je napomenuti da prekomjerno izlaganje uzoraka stresnim uvjetima može stvoriti sekundarne razgradne produkte koji se vjerojatno ne bi pojavili u stvarnim uvjetima. S druge strane, nedovoljno jaki uvjeti razgradnje mogu spriječiti formiranje razgradnih produkata. Početna koncentracija za ispitivanje prisilne razgradnje obično je oko 1 mg/mL, ali konkretna koncentracija može varirati ovisno o potrebama istraživanja [5].

Neke tvari imaju lošu sposobnost otapanja u vodi, pa se često moraju koristiti organska otapala za provođenje prisilne razgradnje. ICH smjernice ne zahtijevaju izričito korištenje otopina, već omogućuju uporabu suspenzija. Međutim, kod suspenzija postoji tendencija sporije razgradnje u usporedbi s otopinama. Često je potrebna analiza sadržaja lijeka i suspenzije tijekom cijelog eksperimenta kako bi se smanjila moguća pogreška povezana s uzimanjem uzoraka iz suspenzija. Korištenje organskih otapala može riješiti ove probleme, ali treba biti oprezan jer njihova uporaba može dovesti do nedostatne ili pretjerane razgradnje, reakcija s analitom ili pojavljivanja vrhova otapala u kromatogramu. Acetonitril i dimetilsulfoksid su često korištena otapala u ovim situacijama. Uvjeti prisilne razgradnje ovise o specifičnom ljekovitom sredstvu. Ukoliko postoje prethodne studije stabilnosti, uvjeti se prilagođavaju na temelju poznatih informacija. U ranim fazama razvoja, kada se malo zna o molekuli, koriste se standardni uvjeti. Odabir uvjeta za izloženost uzorka zahtijeva pažljivu selekciju kako bi se izbjegla prekomjerna ili nedovoljna razgradnja. Poželjno je stvoriti željene primarne razgradne produkte jer je vjerojatno da će se upravo oni formirati pod stvarnim uvjetima skladištenja. U slučaju analize uzorka u različitim vremenskim točkama, može se ponovno primijetiti pojava sekundarnih razgradnih produkata. U takvim slučajevima, vrhovi primarnih produkata opadaju dok se pojavljuju novi vrhovi sekundarnih produkata. Dakle, uvjeti moraju biti precizno odabrani da bi došlo do primarnih produkata razgradnje budući da jednako izlaganje API-ja različitim uvjetima neće dati jednake produkte [19].

Razni parametri koji potiču razgradnju ljekovitih tvari su:

- pH: pH znatno utječe na razgradnju lijeka hidrolizom. Da bi se to savladalo, farmaceutske formulacije provode se s pH stabilnim puferskim otopinama.
- Temperatura: Promjene temperature mogu negativno utjecati na stabilnost lijeka. Kako temperatura raste, tako se stopa hidrolize lijekova značajno povećava.
- Kisik: Oksidacija određenih lijekova pojačava se kada je prisutan kisik. Pročišćavanje dušika ili ugljičnog dioksida iz spremnika stabilizira lijekove koji se brže razgrađuju u prisutnosti kisika.
- Svjetlo: Neki farmaceutici osjetljivi su na svjetlost zbog mogućeg raspada. Osjetljivost na fotolitičku razgradnju može se odrediti usporedbom stabilnosti tvari u prisutnosti svjetla sa stabilnosti tvari koja se čuva u mraku. Spremnici od jantarnog stakla i skladištenje na tamnom mjestu nužni su za očuvanje fotoosjetljivog spoja.
- Vlaga: Tvari topljive u vodi mogu se otopiti samo ako je prisutna vlaga što dovodi do kemijskih i fizikalnih promjena unutar molekule.

- Pomoćna tvar: Uočeno je da neke pomoćne tvari mogu sadržavati visok sadržaj vode. Ta vlaga može dovesti do povećanja razine vode u formulaciji koja kasnije utječe na samu stabilnost lijeka. Međudjelovanje između pomoćne tvari i materijala lijeka često rezultira smanjenom stabilnošću [20].

Uvjeti pri kojima je poželjno započeti i provoditi prisilnu razgradnju prikazani su u tablici 1 i tablici 2.

Tablica 1. Okvirni uvjeti pri kojima je dobro započeti prisilnu razgradnju [21]

Vrsta razgradnje	Uzorak	Koncentracija uzorka	Koncentracija stresora	Temperatura	Vrijeme izlaganja
kiselna	otopina	0,1-1 mg mL ⁻¹	0,1-1 M HCl	25 °C	5-20 % razgradnje ili do 7 dana
lužnata			0,1-1 M NaOH	25 °C	
oksidativna			3-30 % H ₂ O ₂	25 °C	
svjetlosna	otopina/ krutina	0,1-1 mg mL ⁻¹ / tanki film	/	prema ICH	
termalna		0,1-1 mg mL ⁻¹ / tanki film	/	60-80 °C (25 °C kontrola)	

Tablica 2. Uvjeti provedbe prisilne razgradnje [22]

Tip razgradnje	Eksperimentalni uvjeti	Uvjeti skladištenja	Vrijeme uzorkovanja (dan)
hidroliza	API (bez kiseline i baze)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	0,1 M HCl	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	0,1 M NaOH	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	kiselina (bez API)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	baza (bez API)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	pH: 2, 4, 6, 8		1, 3, 5
oksidacija	3 % H ₂ O ₂	25 °C, 60 °C	1, 3, 5
	peroksid	25 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Azobisisobutironitril (AIBN)	25 °C, 60 °C	1, 3, 5
	AIBN	25 °C, 60 °C	1, 3, 5
		25 °C, 60 °C	1, 3, 5
	fotoliza	svjetlost 1xICH	NA

Tip razgradnje	Eksperimentalni uvjeti	Uvjeti skladištenja	Vrijeme uzorkovanja (dan)
	svjetlost 3xICH	NA	1, 3, 5
	svjetlost 3xICH	NA	1, 3, 5
toplina	toplinska komora	60 °C	1, 3, 5
	toplinska komora	60 °C /75 % RH	1, 3, 5
	toplinska komora	60 °C	1, 3, 5
	toplinska komora	60 °C /75 % RH	1, 3, 5

2.2.1.1. Hidroliza

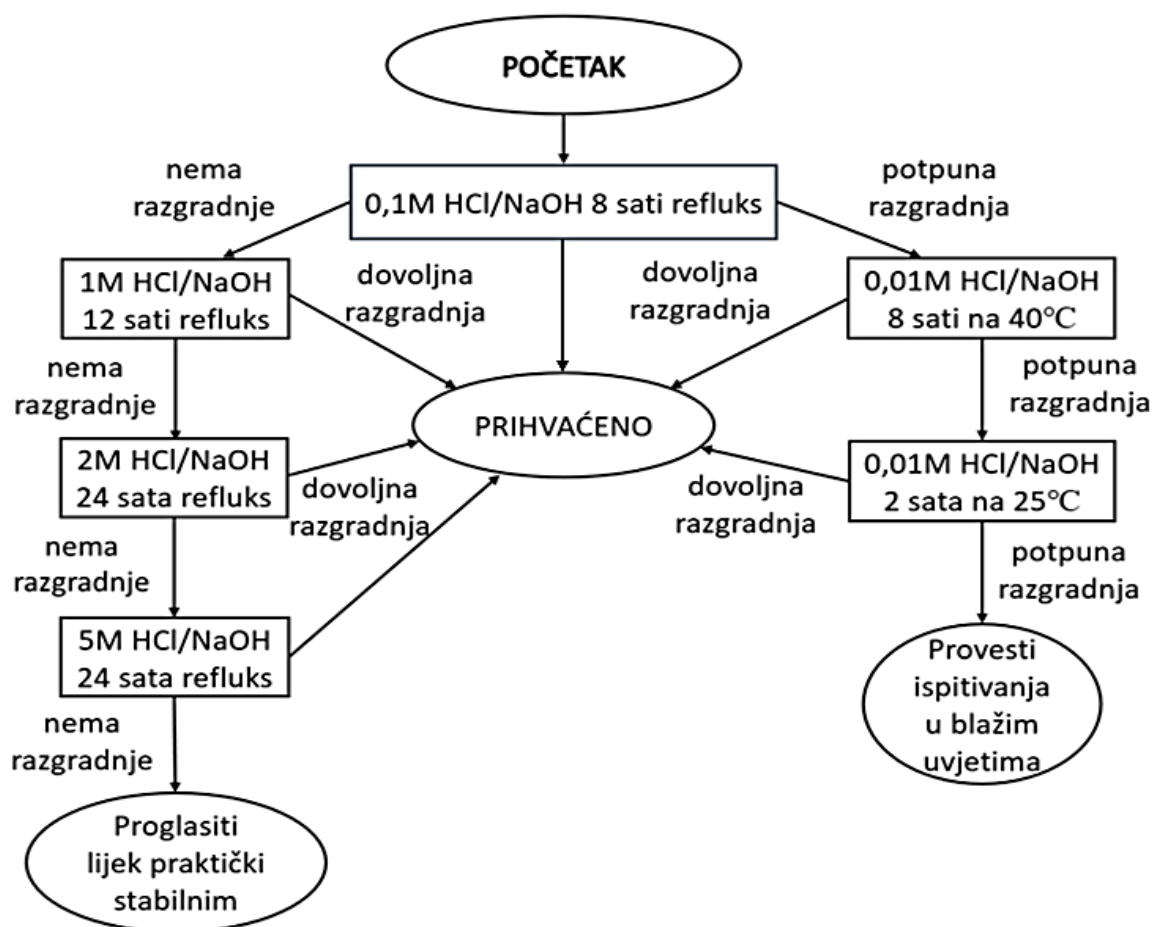
Hidroliza je učestala kemijska reakcija razgradnje koja se događa pri različitim pH vrijednostima. Proces je u kojem lijek reagira s vodom što rezultira stvaranjem različitih kemijskih produkata razgradnje. U hidrolizi je ljekovita tvar izložena kiselim ili lužnatim uvjetima. Voda, kao otapalo ili kao vlaga u zraku, dolazi u kontakt s farmaceutskim oblikom i odgovorna je za razgradnju većine lijekova. Na primjer, lijek aspirin se spaja s vodom i hidrolizira na salicilnu i octenu kiselinu. Još uključuje katalizu ionizacijske funkcionalne skupine prisutne u molekuli. U tablici 3 prikazani su spojevi koji se hidrolitički razgrađuju [23].

Tablica 3. Skupine podložne hidrolitičkoj razgradnji i pripadajuće reakcije razgradnje [9]

Funkcionalna skupina	Reakcija razgradnje
Esteri	Razgradnja estera na alkohol i kiselinu
Amidi	Razgradnja amida na kiselinu i amin
Laktami	Razgradnja laktamskog prstena na alkohol i kiselinu
Laktoni	Razgradnja laktonskog prstena na alkohol i kiselinu
Imidi	Razgradnja imidnog prstena
Alkil kloridi	Prelazak u alkohol
Azometini	Pucanje veze

U kiselim uvjetima koriste se visoke koncentracije kiseline poput koncentrirane klorovodične kiseline (HCl) ili sumporne kiseline (H₂SO₄) u rasponu koncentracija od 0,1 M do 1 M. Za lužnate uvjete koriste se natrijev hidroksid (NaOH) ili kalijev hidroksid (KOH) u

koncentracijama od 0,1 M do 1 M [24]. Ako se uoči razumna razgradnja, testiranje se može prekinuti u ovoj točki. Međutim, u slučaju ako se razgradnja ne primjećuje u tim uvjetima, lijek treba reflusirati u kiselini/lužini veće jačine i duljeg trajanja. Alternativno, ako se nakon podvrgavanja uoči potpuna razgradnja lijekova u početnom stanju, jačina kiseline/lužine može se smanjiti padom reakcijske temperature. Općenito, temperatura i pH glavne su odrednice stabilnosti lijekova sklonih hidrolitičkoj razgradnji, a dijagram izvođenja prikazan je na slici 4 [25].



Slika 3. Dijagram toka za izvođenje hidrolitičke razgradnje [25]

Ako je spoj slabo topljiv u vodi, tada se korišteno suotapalo otopi u HCl ili NaOH. Odabir suotapala ovisi o strukturi ljekovite tvari, a najkorištenija su prikazana u tablici 4. Primjenjuje se ispitivanje prisilne razgradnje na sobnoj temperaturi i povećava se po potrebi razgradnje (50 °C–70 °C). Trajanje ovakvih uvjeta ne bi smjelo biti duže od 7 dana. Nakon toga se razgrađeni uzorak neutralizira upotrebom odgovarajuće kiseline, baze ili pufera kako bi se izbjegla sekundarna razgradnja [24].

Tablica 4. Najčešće korištena suotapala za hidrolitičku razgradnju [9]

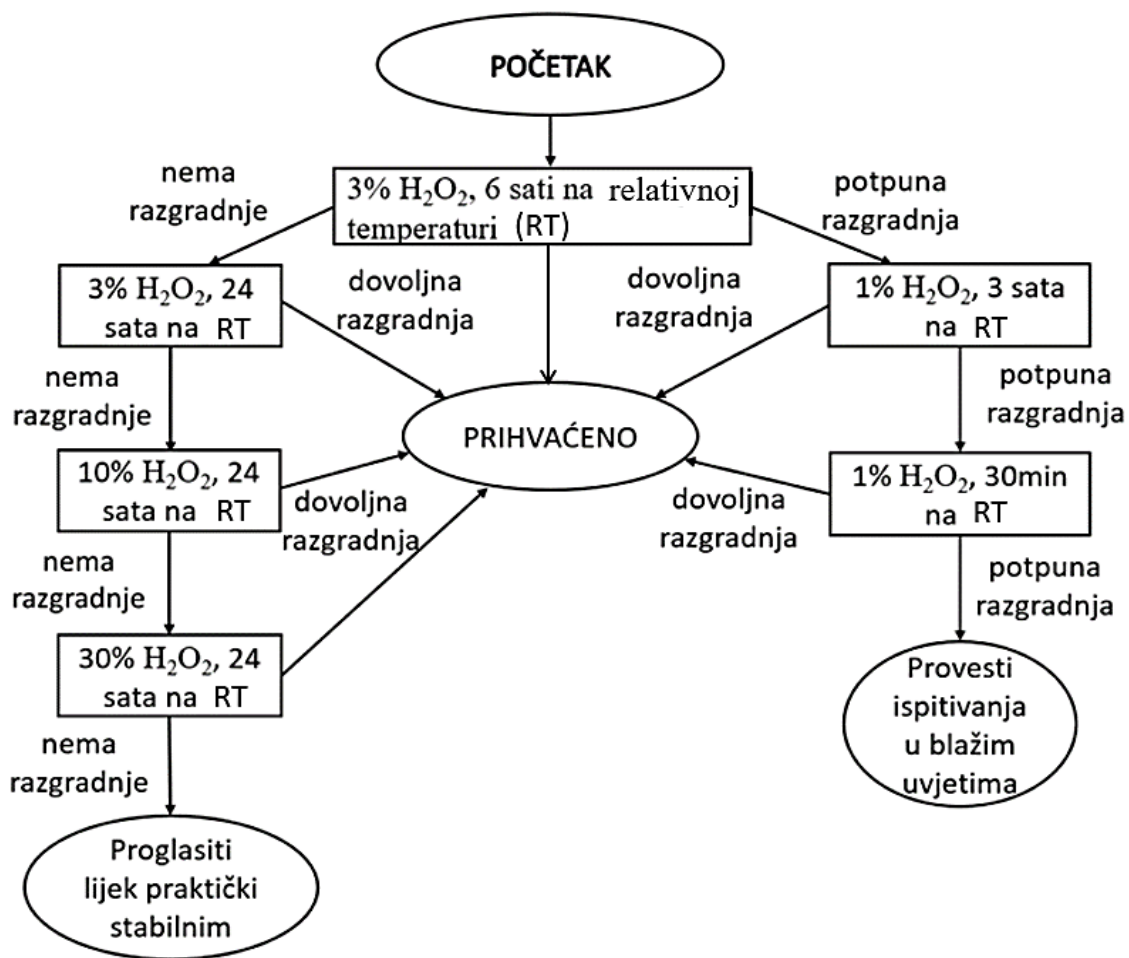
Kiseli pH	Neutralni pH	Lužnati pH
Acetonitril (ACN)	Acetonitril (ACN)	Acetonitril (ACN)
Dimetilsulfoksid (DMSO)	N-metilpirolidinon (primarno za oksidaciju)	Dimetilsulfoksid (DMSO)
Octena kiselina	Metanol	1,2-dimetoksietan
Propionska kiselina		1-metoksi-2-(2-metoksietoksi)etan
Tetrahidrofuran (THF)		p-dioksan
		Metanol

2.2.1.2. Oksidacija

Razgradnja lijekovite tvari često se odvija putem oksidacije, jednog od dva najčešća mehanizma razgradnje uz hidrolizu. Postoje tri ključna oksidacijska puta koja dovode do razgradnje:

- Autooksidacija odnosno oksidacija koja je potaknuta slobodnim radikalima
- Oksidacija koja je pokrenuta prisutnošću peroksida
- Oksidacija koja se događa tijekom prijenosa elektrona [27]

Odabir oksidirajućih sredstava ovisi o koncentraciji lijekovite supstance koju podvrgavamo ovim uvjetima. Obično se koristi vodikov peroksid kao oksidacijski agens za razgradnju lijekovitih tvari u studijama stres ispitivanja. Međutim, postoje i druge opcije za oksidaciju kao što su kisik, hidroksilni radikali, ozon, metalni ioni i inicijatori radikala poput azobisisobutironitrila (AIBN). Vodikov peroksid se primjenjuje tijekom sedam dana kao otopina s koncentracijom od 0,1 do 3 % pri neutralnom pH i pri sobnoj temperaturi. Ovi uvjeti uključuju mehanizme prijenosa elektrona za stvaranje reaktivnih aniona i kationa. Prijenosom elektrona mogu oksidirati amin, sulfid i fenoli te dati N-oksid, hidroksilamin, sulfonsku kiselinu i sulfoksid [24]. Vodikov peroksid se još može koristiti u rasponu koncentracija od 3 do 30 % na temperaturama ne višim od 40 °C 2-8 dana. Vrijeme se također može povećati na 24 sata pri 30 %-tnoj koncentraciji ili smanjiti na 30 min sa 1 % H₂O₂. To je detaljnije prikazano na slici 5 [25]. U tablici 5 prikazani su spojevi koji podliježu oksidaciji te njihovi produkti [9].



Slika 4. Dijagram toka za izvođenje oksidativne razgradnje [25]

Tablica 5. Utjecaj oksidacijske razgradnje na različite funkcionalne skupine i njihovi produkti [9]

Funkcionalna skupina	Produkti reakcije razgradnje
Tioli	S-oksid i disulfid
Tioeteri	S-oksidi
Biciklički i triciklički fenoli	Dimeri
Polihidroksibenzeni	Kinoni
Tiazini	S-oksidi
Nezasićene skupine	Hidroperoksidi
Derivati N-izopropiletanolamina	N-izopropiletanolaminska skupina (oksidacija)
Derivati indola	N-H skupina (oksidacija)

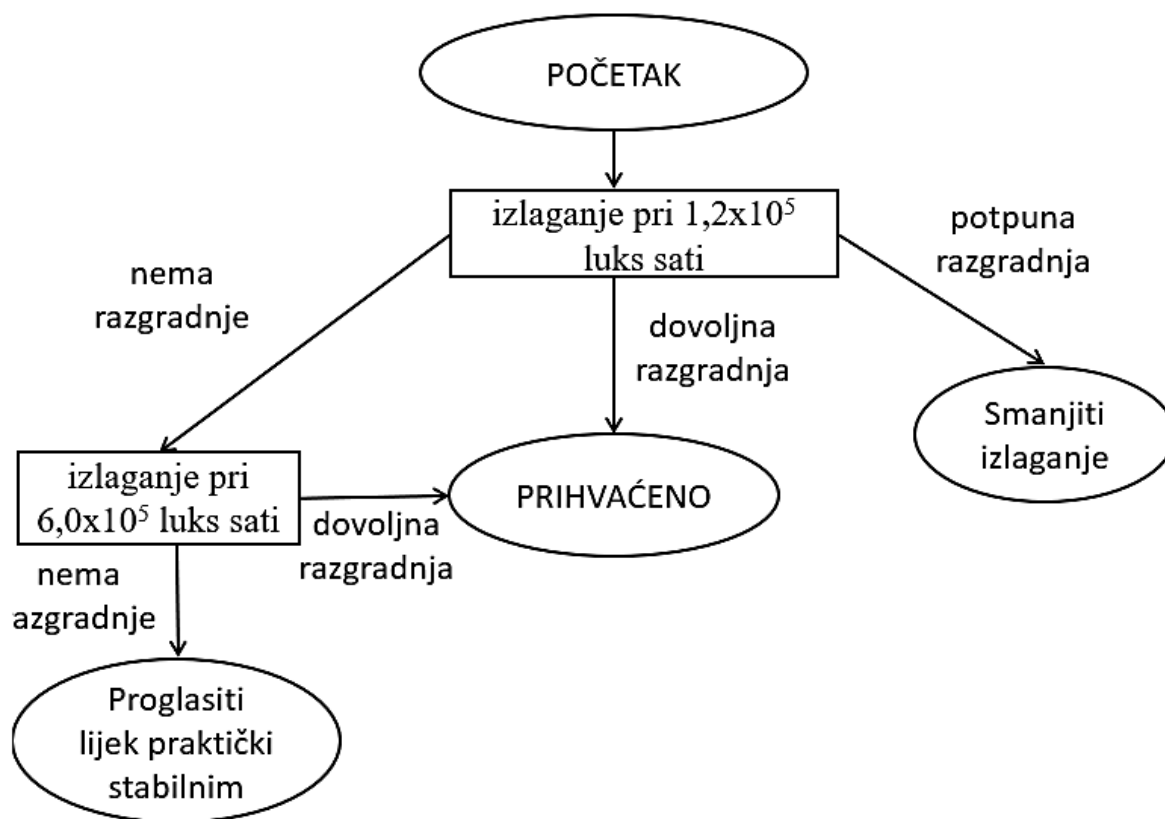
2.2.1.3. Fotoliza

Fotolitička razgradnja nastaje kada se lijek izloži ultraljubičastom (UV) ili vidljivom (Vis) svjetlu u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. Izlaganje svjetlu s valnim duljinama ispod 300 nm obično nije relevantno jer se lijekovi rijetko izlažu takvim uvjetima tijekom svog životnog ciklusa. Vanjsko dnevno svjetlo, koje dolazi od Sunca, obuhvaća dvije glavne komponente:

- Ultraljubičastu svjetlost (UV-A: 320 nm-400 nm i UV-B: 280 nm-320 nm)
- Vidljivu svjetlost (400 nm-800 nm)

Osim izloženosti vanjskom sunčevom svjetlu, ispitivani uzorak može biti izložen i svjetlu u zatvorenom prostoru. To uključuje sunčevu svjetlost koja prolazi kroz staklene prozore i svjetlo koje potječe od umjetnih izvora kao što su bijela fluorescentna svjetla te svjetlo s bliskim UV spektralnim valnim duljinama [26].

Brzina fotolitičke razgradnje ovisi o intenzitetu upadne svjetlosti i količini svjetlosti koju apsorbira molekula lijeka što je detaljnije prikazano na slici 6. Razgradnja se može dogoditi oksidativno ili bez oksidacije. Neoksidativne fotolitičke reakcije uključuju mnoge preraspodjele, izomerizaciju, dimerizaciju, ciklizaciju, dekarboksilaciju, također i heterolitičko cijepanje X-C veza, N-alkilne veze (dealkilacija i deaminacija), SO₂-C veze itd. Nasuprot tome, oksidativna fotolitička razgradnja odvija se koristeći bilo koji singletni kisik (¹O₂) ili tripletni kisik (³O₂). Singletni kisik reagira s nezasićenim vezama, npr. s alkenima, dienima i polinuklearnim aromatskim ugljikovodicima i tako tvore produkte fotooksidativne razgradnje, a tripletni kisik reagira sa slobodnim radikalom molekule lijeka, a on zatim reagira s tripletnom molekulom kisika stvarajući peroksid. Također je važno napomenuti da svjetlost može djelovati kao katalizator u oksidacijskim reakcijama. Na primjer, fotodegradacija barnidipina uključuje vjerojatno stvaranje singletnog kisika koji može modificirati ili uništiti tkiva te tako prouzrokovati značajna oštećenja i gubitak terapijske aktivnosti. Dakle, karakterizacija procesa fotolitičke razgradnje uključuje proučavanje prijelazne vrste i interakciju između prekursora i uzorka, a to je ključan način za razumijevanje potencijalne toksičnosti lijeka i njegovo određivanje [23,25].



Slika 5. Dijagram toka za izvođenje fotolitičke razgradnje [25]

Ljekovitim tvarima se ispituje fotostabilnost uglavnom kako bi se pokazalo da izlaganje svjetlu ne dovodi do neprihvatljive promjene. Skupine kao što su kloridi, slabi C-H i O-H, sulfidi i polieni vjerojatno uvode fotoosjetljivost lijeka. Preporučene uvjete za testiranje fotostabilnosti detaljnije opisuju ICH smjernice. Uzorak API-ja i kruti/tekući ljekoviti proizvod treba izložiti minimalno 1,2 milijuna luks sati (1xh) (srodno 200 Wh/m² UV svjetla). Maksimalno preporučeno obasjavanje je 6 milijuna luks sati [28].

Prema zakonima fotokemije, fotolitička razgradnja zahtijeva apsorpciju zračenja od strane molekule bilo da je to molekula ljekovite tvari ili neka druga komponenta u farmaceutskom pripravku. Ovo naglašava da je fotolitička razgradnja uvjetovana količinom zračenja kojom je molekula izložena i onim koje je molekula apsorbirala. Važno je napomenuti da čak i ako molekula ljekovite tvari sama po sebi ne apsorbira UV ili vidljivo svjetlo, fotolitička razgradnja može se dogoditi ako u formulaciji postoji dodatni sastojak (na primjer, pomoćna tvar ili neka vrsta onečišćenja) koji omogućuje apsorpciju svjetla i pokreće fotokemijske reakcije [27]. Spojevi koji se pod svjetlom razgrađuju prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Spojevi osjetljivi na razgradnju pod utjecajem svjetla i njihove reakcije [9]

Funkcionalna skupina	Reakcija razgradnje
Olefini	Izomerna konverzija sa ili bez fotociklizacije uz nastajanje epoksida, hidroperoksida i dimerizacija
Ariloctena kiselina	Dekarboksilacija
Aromatska nitro-skupina	Redukcija u nitrozo-skupinu i oksidacija prstena
Arilhalo-derivati	Dehalogenacija
N-alkil-derivati	N-dealkilacija
Benzofenoni	Nastajanje radikala
N-oksidi	Nastajanje oksaziridina

Ispitivanje stabilnosti pod utjecajem svjetla može se provoditi prema dvije opcije. Odabir između opcije 1 i opcije 2 ovisi o specifičnim potrebama i karakteristikama lijeka ili farmaceutskog pripravka te se odabire u skladu s ICH smjernicama. [29]. Opcija 1 simulira uvjete sunčevog svjetla pomoću posebne lampe koja kombinira ultraljubičasti i vidljivi dio elektromagnetskog spektra. Ove lampe mogu biti od metalnih halida ili ksenonove lampe. Tijekom eksperimenta uzorci se izlažu istodobno UV-A i UV-B zračenju kao i vidljivom svjetlu u rasponu od 420 do 800 nm. Opcija 2 simulira osvjetljenje koje se nalazi unutar zatvorenog prostora. Umjetno osvjetljenje uključuje hladne bijele fluorescentne svjetiljke koje emitiraju zračenje blisko ultraljubičastom svjetlu. Tu se najčešće koristi ksenonova lampa. Produkti koji se formiraju tijekom fotolitičke razgradnje, u okviru prisilnih razgradnji, nisu uvijek uočljivi tijekom ispitivanja. Razlog su razni fizikalni i kemijski faktori koji utječu na ovaj proces uključujući oblik ljekovite tvari (amorfni, kristalni, polimorfni), ukoliko se radi o samoj tvari, ili koncentraciju djelatne tvari i otapala, ako se radi o otopini. Razlike u rezultatima između potvrdnih studija i studija prisilne razgradnje mogu proizaći iz različitih izvora zračenja, varijacija u količini zračenja, različitih temperatura ili vremena izloženosti. Zbog tih različitih čimbenika važno je da obje studije koriste isti izvor zračenja i minimalno različitih uvjeta. Budući da minimalna preporučena izloženost zračenju prema ICH smjernicama ne vrijedi za studije prisilne razgradnje, obično je izloženost najmanje 2 puta veća od preporučene vrijednosti (tablica 7). Često se koriste faktori 2-5 puta veći što je dovoljno za postizanje razgradnje od 10 do 20 %, a to je obično prihvatljivo jer veće razgradnje nisu potrebne ili poželjne [27].

Tablica 7. Preporučeni uvjeti za provođenje fotolitičke razgradnje [9]

Izlaganje vidljivom svjetlu	Minimalno 2 puta veća od preporučene ICH smjernicama (1,2 mil luks h)
Izlaganje UV svjetlu	Minimalno 2 puta veća od ICH preporučene (200 Wh/m ²)
Ljekovita tvar u otopini	Preporuča se za tekuće oblike (injekcije, suspenzije...) Ponekad za čvrste farmaceutske oblike
Ljekovita tvar u čvrstom stanju	Tanki sloj < 1mm
Farmaceutski oblik u čvrstom stanju	Tablete trebaju biti posložene u jedan sloj
Izvor svjetla	ICH opcija 1 ili opcija 2 (koristiti isti izvor svjetla za prisilnu razgradnju i potvrđnu studiju)
Kontrola svjetlosti	Pokrivanje spremnika s prekrivačem nepropusnim za svjetlo (npr. aluminijska folija)
Spremnik	Kvarcno ili borsilikatno staklo
Vrijeme izlaganja	Ovisi o intenzitetu svjetlosti

Ako uzorak izložen svjetlu ne pokazuje promjene u izgledu, boji, bistrini i ne primjećuje se stvaranje razgradnih produkata, možemo zaključiti da je molekula stabilna pod utjecajem svjetla ili da je fotostabilna. Također, pakiranje u tom slučaju dobro štiti farmaceutik od svjetla [9].

2.2.1.4. Termička razgradnja

Toplinska razgradnja (suha toplina i mokra toplina) trebala bi se provoditi u različitim uvjetima kratkog ispitivanja koji su teži od onih preporučenih ICH Q1A smjernicama. Uzorak čvrstog lijeka i ljekovite tvari treba izložiti i suhoj i mokroj toplini, a tekući ljekoviti proizvod treba izložiti samo suhoj toplini. Ispitivanja se mogu provoditi u kraćem vremenu na višoj temperaturi. Učinak temperature na toplinsku razgradnju tvari proučava se koristeći Arrheniusov zakon:

$$K = A \cdot e^{-Ea/RT}$$

K - konstanta brzine reakcije

A - konstanta za određenu kemijsku reakciju, eksponencijalni faktor koji se odnosi na učestalost sudara čestica

E_a - aktivacijska energija reakcije (J/mol)

R - univerzalna konstanta plina (8,314 J/kgK)

T - apsolutna temperatura (K) [30]

Ispitivanje termičke razgradnje obično se provodi u rasponu temperatura od 40 °C do 80 °C. Ovisno o energiji aktivacije tvari, računa se koliko vremena je potrebno izlagati uzorak na povišenoj temperaturi kako bi se postigla ista razgradnja kao kroz dvije godine pri temperaturi od 25 °C, što je predviđeni rok trajanja proizvoda. To se može proučiti pomoću tablice 8 [26].

Tablica 8. *Vrijeme potrebno da se tvari različitih energija aktivacije razgrade na povišenoj temperaturi tako da razgradnja traje isto kao i pri temperaturi od 25°C tijekom 24 mjeseca [26]*

Temperatura (°C)	Energija aktivacije E_a (kcal/mol)				
	12	17	19,8	25,8	29,8
40	280,8	182,5	146,0	90,1	65,2
50	152,1	79,3	54,9	25,0	14,8
60	86,9	35,8	21,7	7,5	3,7
70	51,0	16,9	9,1	2,4	1,0

Ako je energija aktivacije (E_a) molekule 17 kcal/mol, tada će razgradnja uzorka koji je bio pohranjen šest mjeseci na temperaturi od 40 °C biti ekvivalentna razgradnji uzorka koji je bio pohranjen 24 mjeseca na temperaturi od 25 °C. Međutim, ako je E_a za tu molekulu 25,8 kcal/mol, tada će razgradnja postignuta čuvanjem uzorka šest mjeseci na 40 °C biti ekvivalentna razgradnji koja će se dogoditi tijekom četiri godine na temperaturi od 25 °C. Važno je napomenuti da Arrheniusova jednadžba bolje funkcionira kada se istražuje stabilnost suhih farmaceutika i pretpostavlja se mala ukupna razgradnja, obično između 5 % i 10 %. Kod većih razgradnji može doći do sekundarne razgradnje, što znači da u takvim slučajevima model možda neće davati točne rezultate [9].

Budući da su lijekovi osjetljivi na razgradnju pri višoj temperaturi, povećanjem temperature raste brzina reakcije. Mnogi API-evi su osjetljivi na velike vrućine i tropske temperature (npr. vitamini i peptidi). Najviša temperatura koja se može prihvatiti je 70 °C sa visokim i niskim vlažnostima u vremenu od 1 do 2 mjeseca. Temperatura veća od 80 °C možda neće ići predvidljivim putem razgradnje. Ova pretpostavka neće vrijediti za sve molekule lijeka, stoga treba biti jako oprezan kod korištenja ekstremnih temperatura koje su lako dostupne u eksperimentima sa zatvorenim mikrovalnim posudama [25].

Razgradnja malih molekula ljekovitih tvari obično prati slične razgradne mehanizme na različitim temperaturama. Zato se istraživanja razgradnje različitih ljekovitih tvari često provode na temperaturama između 50 °C i 85 °C. Međutim, zagrijavanje tvari na temperaturama od 70 °C do 85 °C i više može povećati rizik od pojave različitih razgradnih mehanizama i stvaranja razgradnih produkata koji se ne bi očekivali u stvarnim uvjetima skladištenja farmaceutskih proizvoda [26]. Preporuke za provedbu termičke razgradnje vidljive su u tablici 9.

Tablica 9. Nekoliko preporuka za uvjete termičke razgradnje pod utjecajem vlage [9]

Spremnik	Otvoren
Uzorak	Ljekovita tvar odnosi se na materijal koji predstavlja aktivni sastojak lijeka i obično je proizveden putem reprezentativnog sintetskog procesa uzimajući u obzir i njegovu fizikalnu formu. Farmaceutski oblik, s druge strane, obuhvaća kako visoke doze tako i niske doze konačnog farmaceutskog proizvoda. To znači da se farmaceutski oblik može manifestirati u različitim oblicima uključujući tablete, kapsule, sirupe, kreme, gelove, injekcije i druge oblike doziranja ovisno o specifičnim potrebama i namjeni lijeka.
Temperatura	50-70 °C
Relativna vlaga	Visoka vlaga je ona od 75 % ili više, a niska od 20 % i niže.
Maksimalno vrijeme izloženosti	Ostvarivanje kinetičkih uvjeta koji odgovaraju duljini od 6 mjeseci pri temperaturi od 40 °C i relativnoj vlažnosti od 75 % ili veće.

2.2.1.5. Vlažnost

Primijećeno je da određene pomoćne tvari mogu sadržavati značajne količine vlage. Prisutnost vlage može rezultirati povećanjem udjela vode u formulaciji što dalje može utjecati na stabilnost samog lijeka. Biotehnološki/biološki proizvodi općenito se distribuiraju u spremnicima koji ih dobro štite od vlage. Tamo gdje se može dokazati da predloženi spremnici i uvjeti skladištenja pružaju dovoljnu zaštitu od visoke i niske vlažnosti, ispitivanja stabilnosti pri različitim relativnim vlažnostima obično se mogu izostaviti. Potrebno je osigurati odgovarajuće podatke o stabilnosti za farmaceutike koji nemaju ambalažu koja ih štiti protiv vlage [31].

2.2.2. ICH Q1A(R2) – Ispitivanje stabilnosti novih farmaceutskih tvari i proizvoda

Poglavlje ICH Q1A smjernica bavi se ispitivanjima prisilne razgradnje ljekovite tvari s ciljem identifikacije razgradnih produkata i razgradnih puteva kao i unutarnje stabilnosti ljekovitih molekula [32]. Tijekom ovih ispitivanja koriste se znatno rigorozniji eksperimentalni uvjeti u usporedbi s onima primijenjenima kod ubrzanih ispitivanja. Ovakva ispitivanja igraju ključnu ulogu u procesu validacije analitičkih procedura koje su razvijene za farmaceutski proizvod [9].

Ovo poglavlje pruža sljedeće smjernice za provođenje studije prisilne razgradnje:

- Ispitivanja se provode na jednom kontrolnom broju ljekovite tvari
- Testiranje treba obuhvatiti utjecaj temperature u intervalima od 10 °C (npr. 10 °C, 20 °C, 30 °C itd.), utjecaj vlage (npr. 75 % relativne vlage ili više) te, gdje je moguće, oksidaciju i fotolizu
- Testovi trebaju ispitati osjetljivost ljekovite tvari na hidrolizu kroz širok raspon pH vrijednosti u otopini ili suspenziji
- Ispitivanje fotostabilnosti trebalo bi biti obavezni dio testova, a uvjeti za takva ispitivanja detaljno su opisani u poglavlju ICH Q1B

Budući da je u ovom dijelu smjernica naglasak na stresnim ispitivanjima koja se primjenjuju na ljekovitu tvar, kada se radi o farmaceutskom obliku napominje se da ispitivanja stabilnosti trebaju biti utemeljena na karakteristikama ljekovite tvari te na iskustvu i znanju dobivenom iz prethodnih kliničkih ispitivanja formulacije [32]. Intrinzična stabilnost lijeka određuje se pomoću Q1A smjernica opisanih u odjeljku 2.1.2 (testiranje stabilnost za nove molekule lijekova i njihove proizvode) [10]. Međutim, možda neće biti potrebno posebno ispitivati određene proizvode razgradnje ukoliko je dokazano da ne nastaju u uvjetima prisilne razgradnje. Rezultati ovih studija bit će sastavni dio informacija koje se dostavljaju regulatornim tijelima [32].

2.2.3. ICH Q1B – Ispitivanje fotostabilnosti novih farmaceutskih tvari i proizvoda

Prema ICH Q1B smjernicama prisilna razgradnja se provodi kako bi se ispitivala fotostabilnost farmaceutskih proizvoda. Ovaj postupak sastoji se od dva ključna koraka: prisilne razgradnje i potvrdnog ispitivanja (tablica 10). Ispitivanje fotostabilnosti može se provesti na krutim ljekovitim tvarima ili API-ima u otopini/suspenciji. Ti uzorci se potom koriste za izradu tehnike za određivanje ispitivanja stabilnosti. Ispitivani uzorci trebaju se nalaziti u prozirnoj i kemijski inertnoj ambalaži. Količina izloženosti svjetlu u eksperimentima prisilne razgradnje nije poznata. Različiti uvjeti mogu biti primijenjeni ovisno o osjetljivosti ispitivane farmaceutske tvari i jačini izvora svjetla koji se koristi. Ukoliko je došlo do stvaranja razgradnih produkata, koji se vjerojatno neće pojaviti tijekom potvrdnog ispitivanja, potrebno je reducirati uvjete ili prekinuti ispitivanje. Kod fotostabilnih uzoraka eksperiment se prekida nakon određenog vremena izloženosti. Sami dizajn i pojedini detalji prepušteni su proizvođačima lijekova, ali moraju biti objašnjeni i opravdani [9,33].

Tablica 10. Definicija prisilne razgradnje i potvrdne studije [34]

Studije prisilne razgradnje	Potvrdne studije
Ove studije namjerno razgrađuju uzorak. Mogu se provoditi u fazi razvoja ljekovitih supstanci, a koriste se za procjenu ukupne fotoosjetljivosti materijala u svrhu razvoja metode i/ili razjašnjenje puta degradacije.	Ove studije su poduzete kako bi se utvrdila fotostabilnost u standardiziranim uvjetima. Koriste se za utvrđivanje mjera opreza potrebnih u proizvodnji i za utvrđivanje je li pakiranje otporno na svjetlost te zahtijeva li posebnu oznaku za reduciranje izloženosti svjetlu.

Uvjeti prisilne razgradnje ljekovite tvari opisani su smjernicama u odjeljku 2, a za lijekove u odjeljku 3. Izloženost svjetlu može biti veća od one navedene za potvrdno ispitivanje. Nadalje, kada se ocjenjuju rezultati ovih studija, važno je prepoznati da oni čine dio testiranja otpornosti na stres i samim time nisu osmišljeni za utvrđivanje kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja za promjene. Ove informacije mogu biti korisne u razvoju i validaciji odgovarajućih analitičkih metoda [34].

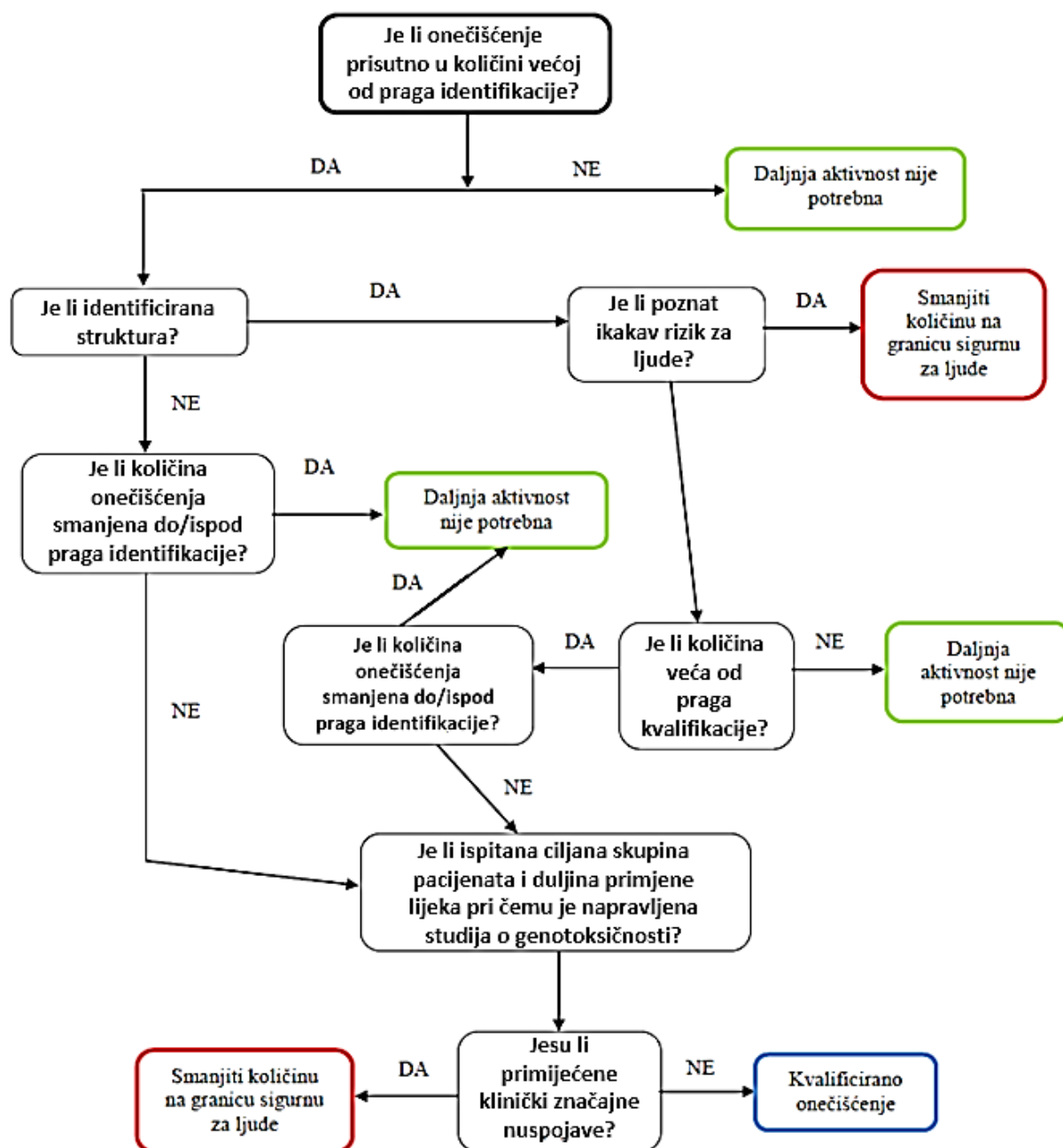
2.2.4. ICH Q2B(R1) – Validacija analitičkih postupaka: Metodologija

ICH Q2B smjernice detaljno opisuju postupke koje treba primijeniti za validaciju različitih analitičkih metoda. U odjeljku B 1.2.2 (nečistoće nisu dostupne) predlaže se korištenje uzoraka iz eksperimenata prisilne razgradnje kako bi se pokazala specifičnost. Dodaje se da uzorke treba podvrgnuti različitim ubrzanim okolnostima, kao što su vlaga i toplina, prije nego što se koriste za određivanje specifičnosti u slučaju nedostupnosti standarda za nečistoće ili standarda proizvoda razgradnje. U studijama prisilne razgradnje, ICH smjernice ne daju preporuke o tome koliko je dugo potrebno provoditi ispitivanje. Neki putevi razgradnje možda se neće vidjeti primjenom preslabog stresnog uvjeta. Kada se primijeni prejak uvjet, mogu se pojaviti proizvodi nerealne razgradnje, a pristup analizi koja se koristi za njihovu identifikaciju može biti neprikladan za realne proizvode razgradnje koji nastaju tijekom ispitivanja stabilnosti. Ova načela su korisna za kvantitativnu analizu određivanja nastalih produkata razgradnje [33]. Nadalje, pod validacijskim parametrom „specifičnost”, ICH Q2B smjernice primjenjuju se kako bi se ocijenila sposobnost jasnog određivanja analita u prisutnosti očekivanih komponenti. Obično mogu uključivati nečistoće, degradante, matricu itd. [35]. Odlučujući čimbenik je utvrđivanje može li analitička metoda identificirati stabilnost ili nespecifičnost [36].

ICH Q3A i Q3B

ICH Q3A Smjernice „Nečistoće u novim farmaceutskim tvarima” i ICH Q3B „Nečistoće u novim farmaceutskim proizvodima” zahtijevaju identifikaciju svake nečistoće i aspekte kemijske sigurnosti. Obje smjernice savjetuju da, u slučaju kada identifikacija nečistoće nije izvediva, sažetak laboratorijskih studija koje pokazuju neuspješan pokušaj treba uključiti u zahtjev [34]. U farmaceutskoj industriji onečišćenja predstavljaju neželjene spojeve prisutne u ljekovitoj tvari. Ovi spojevi mogu ostati prisutni nakon proizvodnog procesa ili se pojaviti tijekom skladištenja farmaceutskog proizvoda. Čak i male količine mogu značajno utjecati na učinkovitost i sigurnost lijeka. Važno je napomenuti da se onečišćenja mogu pojaviti i kao inherentni dijelovi same ljekovite tvari [37]. Prema ICH smjernicama, onečišćenje se definira kao bilo koja tvar u lijeku koja nije identificirana kao aktivna ljekovita. Ova nečistoća može biti klasificirana u tri glavne kategorije: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala [38].

Prvi dio ICH smjernica (Q3A) obuhvaća identifikaciju nečistoće, izradu izvještaja, definiranje zahtjeva. Drugi dio smjernica (Q3B) odnosi se na biološku sigurnost i obuhvaća upute za onečišćenja koja se nalaze u većim količinama od onih koje su propisane za ispitivanje sigurnosti primjene lijeka. Ako su granice za nečistoće u aktivnoj tvari i gotovom lijeku veće od smjernica koje je postavio ICH, tada se primjenjuje dijagram odluke za identifikaciju onečišćenja prikazan na slici 7 [9].



Slika 6. Dijagram odluke za prepoznavanje i procjenu nečistoća prema ICH smjernicama [9]

2.2.5. ICH Q3A(R2) – Nečistoće u novim farmaceutskim tvarima

ICH Q3A(R2) smjernice pružaju informacije o određivanju nečistoća prisutnih u novim ljekovitim tvarima. Ovi odjeljci daju uvid u različite aspekte kao što su identifikacija i specifikacija onečišćenja, analitički protokoli i izvješća. U novoj seriji ljekovitih molekula najvažnije je napomenuti da će biti dobra valjanost kromatografskih testova ako nečistoće budu potpuno odsutne ili su prisutne u tragovima. U slučaju nečistoća u tragovima, granica stabilnosti trebala bi biti veća od 90 % što znači da je dozvoljeno oko 10 % razgradnje [39]. Ovo poglavlje ističe da proizvođač lijeka koji podnosi prijavu mora uključiti sve informacije o onečišćenjima u svom konačnom izvještaju. Ti podatci moraju uključivati rezultate koji su dobiveni eksperimentima prisilne razgradnje kroz cijelu razvojnu fazu lijeka i tako će se moći identificirati sva moguća onečišćenja [9]. Potrebna je identifikacija svake nečistoće s obzirom na kemijske i sigurnosne izgledе. Kemijski izgledi uključuju klasifikaciju, specifikaciju i identifikaciju nečistoća, izradu izvješća i sažetu raspravu o analitičkim metodama. Sigurnosni izgledi uključuju posebne smjernice za kvalifikaciju onih nečistoća koje uopće nisu bile prisutne ili koje su bile prisutne u značajno malim količinama u seriji novih ljekovitih tvari [22].

2.2.6. ICH Q3B(R2) – Nečistoće u novim farmaceutskim proizvodima

U odjeljku 3 (analitički postupci) ICH Q3B, daju se neke preporuke o uvjetima provedbe razgradnje. Između ostalog, analitički postupci trebaju biti validirani kako bi se pokazala specifičnost za navedene i nespecificirane razgradne proizvode. Prema potrebi, ova validacija bi trebala uključivati uzorke pohranjene u relevantnim uvjetima stresa: kiselinska/bazna hidroliza, oksidacija, svjetlo, toplina i vlaga [39].

2.2.7. Q5C – Ispitivanje stabilnosti biotehnoških/bioloških proizvoda

Q5C poglavlje ukazuje na to da ispitivanje prisilne razgradnje može biti korisno za provjeru je li slučajna izloženost određenim uvjetima mogla imati negativan utjecaj na proizvod. To se odnosi na sve slučajne uvjete osim onih propisanih, npr. različiti slučajni uvjeti tijekom transporta [32]. To će poslužiti u određivanju specifičnih parametara za utvrđivanje

stabilnosti lijeka. Uvjeti koji su propisani u prethodnim ICH smjernicama nisu striktno primjenjivi kada je riječ o biotehnološkim ili biološkim proizvodima. Napominje se da se tada uvjeti pažljivo biraju ovisno o kakvom uzorku je riječ [40].

2.2.8. M4Q(R1) – Zajednički tehnički dokument (CTD): Kvaliteta

Dokument objašnjava da trebaju biti obuhvaćena i sumirana sva provedena ispitivanja prisilne razgradnje, korišteni analitički propisi i svi dobiveni rezultati. U to spada analiza uvjeta i vremena provedbe eksperimenata zajedno s relevantnim informacijama o procesu validacije. Ove smjernice dane su u M4Q(R1) „Zajednički tehnički dosje za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu: Modul 3. Kvaliteta” pod odjeljkom 3.2.S.7.1 (sažetak stabilnosti i zaključci): „Vrste provedenih studija, korišteni protokoli i rezultati studija trebaju biti sažeti”. Odjeljak 3.2.S.7.3 (podatci o stabilnosti) navodi da rezultate studija stabilnosti (npr., studije prisilne razgradnje i uvjet stresa) treba predstaviti u odgovarajućem formatu kao što su tablični, grafički ili pismeni [41]. Ovaj dokument sa smjernicama također pruža znanje o roku trajanja farmaceutika i vremenu za ponovnu provedbu [24].

3. ZAKLJUČAK

S regulatorne perspektive postoji mnogo preporuka, ali nedostaju detaljne smjernice o tome kako provesti prisilnu razgradnju. ICH smjernice se smatraju osnovnim smjericama za provođenje ovih studija, iako ne pružaju detaljne upute za njihovu provedbu. Stoga, pristup izvođenju studija prisilne razgradnje uglavnom se temelji na iskustvu farmaceutskih istraživača, dostupnoj znanstvenoj literaturi i karakteristikama same ljevovite tvari i/ili farmaceutskog oblika. Važno je napomenuti da uvjeti provođenja ovih studija i njihova izvedba mogu varirati ovisno o vrsti tvari koja se ispituje što rezultira nedostatkom jasno definiranih smjernica za ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica. Na ICH smjericama zasnivaju se različite regulatorne agencije poput EMA, WHO i FDA. Sustavne studije prisilne razgradnje igraju ključnu ulogu u razvoju sigurnih i visokokvalitetnih farmaceutskih proizvoda te u razvoju pouzdanih analitičkih metoda za njihovu kontrolu. Prednosti provođenja ovih studija su mnogobrojne. Informacije dobivene iz podataka koriste se u svrhu razvoja formulacije, odabira proizvodnih postupaka, pakiranja, određivanja uvjeta čuvanja i određivanja roka valjanosti. U današnjem vremenu, prisilna razgradnja je postala ključni alat za predviđanje dugoročne stabilnosti lijekova, stoga studije prisilne razgradnje trebaju biti neizostavan dio procesa razvoja svakog farmaceutskog proizvoda. Možemo zaključiti da se ispitivanje stabilnosti lijekova provodi s primarnim ciljem osiguranja sigurnosti i dobrobiti pacijenata. Nadalje, ono služi za zaštitu ugleda proizvođača, ispunjavanje zahtjeva regulatornih agencija tijekom procesa registracije lijeka i za prikupljanje podataka koji mogu biti od koristi pri razvoju novih farmaceutskih proizvoda.

4. LITERATURA

- [1] <https://www.halmed.hr/Promet-proizvodnja-i-inspekcija/Nadzor-proizvodnja-i-uvoz/Dobra-proizvodacka-praksa/> (pristup 17. srpnja 2023.)
- [2] <https://www.ich.org/> (pristup 23. srpnja 2023.)
- [3] I. V. Rounds, What you should know about drug compatibility, *Nursing*, 38 (3) (2008) 15
- [4] S. G. Begum, Y. D. Reddy, B. S. Divya, P. K. Komali, K. Sushmitha, S. Ruksar, Pharmaceutical Incompatibilities: A review, *Asian Journal of Pharmaceutical research and Development*, 6 (6) (2018) 56–61
- [5] M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4 (3) (2014) 159-165
- [6] <https://www.linkedin.com/pulse/forced-degradation-studies-pharmaceutical-industry-shouvik-mondal> (pristup 17. srpnja 2023.)
- [7] <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf> (pristup 18. srpnja 2023.)
- [8] <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> (pristup 18. srpnja 2023.)
- [9] M. Zelen, Priselna razgradnja ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika, Završni specijalistički rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019.
- [10] V. Von, J. Helene, S. Aus, Forced degradation studies – comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution, Znanstveni rad, Sveučilište Rheinische Friedrich-Wilhelms u Bonnu Prirodoslovno-matematički fakultet, 2016.
- [11] M. R. Maggio, E. S. Vignaduzzo, S. T. Kaufman, Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 49 (2013) 57-70
- [12] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf (pristup 20. srpnja 2023.)
- [13] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128243152011064> (pristup 17. srpnja 2023.)
- [14] https://admin.ich.org/sites/default/files/2023-07/OverviewOfICH_2023_0619_0.pdf (pristup 19. srpnja 2023.)
- [15] https://admin.ich.org/sites/default/files/2022-01/ICH_leaflet_2021_1221.pdf (pristup 19. srpnja 2023.)
- [16] V. Ivetić Tkalčević, G. Letinić Klier, P. Lazarić Bošnjak, K. Marijanović Barać, Farmakovigilancija – uvijek budni čuvari sigurnosti pacijenata, *Medicus*, 26 (1) (2017) 53-58
- [17] <https://www.ich.org/page/mission> (pristup 19. srpnja 2023.)
- [18] M. Jalžabetić, Analitički i regulatorni aspekt ispitivanja stabilnosti tableta od razvoja do odobrenja za stavljanje lijeka u promet, Specijalistički rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2016.

- [19] <http://www.pharmoutsourcing.com/Featured-Articles/37640-Forced-Degradation-to-Develop-Stability-indicating-Methods/> (pristup 25. srpnja 2023.)
- [20] <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:188977976> (pristup 25. srpnja 2023.)
- [21] M. L. Jeličić, Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti lijekova primjenom analitičkih tehnika: pregled istraživanja razvoja fiksne kombinacije 5-aminosalicilata i folne kiseline, *Kem. Ind.*, 71 (11-12) (2022) 729–742
- [22] F. Iram, H. Iram, A. Iqbal, A. Husain, Forced degradation studies, *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 3 (6) (2016) 00073
- [23] T. Rawat, I. P. Pandey, Forced degradation studies for drug substances and drug products-scientific and regulatory considerations, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7 (5) (2015) 238-241
- [24] R. Bhaskar, M. Ola, A. Vinit, A. Chavan, H. Girase, Current Trend in Performance of Forced Degradation Studies for Drug Substance and Drug Product's, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 10 (2-s) (2020) 149-155
- [25] S. Ranjit, Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development, *J Pharm Educ Res*, 3 (1) (2012)
- [26] S. W. Baertschi, K. M. Alsante, R. A. Reed, Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation, *Informa healthcare UK*, 210 (2011)
- [27] <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:54644738> (pristup 25. srpnja 2023.)
- [28] <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1B%20Guideline.pdf> (pristup 1. kolovoza 2023.)
- [29] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-b-photostability-testing-new-active-substances-medicinal-products-step-5_en.pdf (pristup 1. kolovoza 2023.)
- [30] <https://www.ikev.org/haber/stabilite/kitap/29%201.1%20Stability%20Workshop%20ICH%20Q1AR2%20C.pdf> (pristup 2. kolovoza 2023.)
- [31] https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-topic-q-5-c-quality-biotechnological-products-stability-testing-biotechnological/biological-products_en.pdf (pristup 22. srpnja 2023.)
- [32] https://www.columbiapharma.com/reg_updates/international/ich/q1a.pdf (pristup 2. kolovoza 2023.)
- [33] B. M. Rajanigandha, V P. Sachinkumar, P. P. Pranali, S S. Sarika, ICH guidelines: stress degradation study, *International Journal of Creative Research Thoughts – IJCRT*, 9 (7) (2021)
- [34] H. Janzen, Forced degradation studies comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution RDC 53/2015, Germany, 2016.
- [35] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf (pristup 3. kolovoza 2023.)
- [36] <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf> (pristup 3. kolovoza 2023.)
- [37] S. V. Saibaba, M. Sathish Kumar, B. Ramu, Pharmaceutical impurities and their characterization: A review, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3 (5) (2016) 190-196

- [38] <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf> (pristup 3. kolovoza 2023.)
- [39] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5_en.pdf (pristup 3. kolovoza 2023.)
- [40] <https://database.ich.org/sites/default/files/Q5C%20Guideline.pdf> (pristup 4. kolovoza 2023.)
- [41] https://database.ich.org/sites/default/files/M4Q_R1_Guideline.pdf (pristup 4. kolovoza 2023.)

ŽIVOTOPIS

Leonarda Vrdoljak [REDACTED] U Pločama je završila Osnovnu školu Vladimira Nazora u razdoblju od 2006. do 2014. godine. Opću gimnaziju u Srednjoj školi fra Andrije Kačića Miošića Ploče pohađala je od 2014. do 2018. godine. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Kemijsko inženjerstvo, upisala je 2019. godine. Stručnu praksu odradila je u tvrtki PLIVA d.o.o. u periodu 16. 3. 2023. – 9. 6. 2023. (prilaz baruna Filipovića 25, 10 000 Zagreb).