



Ивана Митревска



АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ 2

СКРИПТА



Штип, 2026 година



Ивана Митревска
АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ 2
СКРИПТА

Автор:

Доц. д-р Ивана Митревска

Наслов на публикацијата:

АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ 2, СКРИПТА

Рецензенти:

Проф. д-р Марија Дарковска Серафимовска

Проф. д-р Анета Димитровска

Лектор:

Далида Цветанова

Техничко уредување:

Ас. м-р Дино Карпичаров

Издавач:

Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Уредник:

Проф. д-р Лилјана Колева Гудева

Објавено во е-библиотека:

<http://e-lib.ugd.edu.mk/1260>

DOI:

<https://www.doi.org/10.46763/m6082771434m>

CIP - Каталогизација во публикација

Национална и универзитетска библиотека “Св. Климент Охридски”, Скопје

615.07(076)

МИТРЕВСКА, Ивана

Аналитика на лекови 2 [Електронски извор] : скрипта / Ивана Митревска. - Штип : Универзитет “Гоце Делчев” - Штип, Факултет за медицински науки, 2026

Начин на пристапување (URL): <http://e-lib.ugd.edu.mk/1260>. - Текст во PDF формат, содржи XIV, 177 стр., илустр. - Наслов преземен од екранот. - Опис на изворот на ден 06.03.2026. - Биографски податоци: стр. 177. - Библиографија: стр. 173-176

ISBN 978-608-277-143-4

а) Лекови -- Аналитички испитувања -- Практикуми

COBISS.MK-ID 68346885

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ



Автор:
Доц. д-р Ивана Митревска

АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ 2

Штип, 2026

ПРЕДГОВОР

Денес, модерните фармацевтски анализи повлекуваат многу повеќе отколку анализа само на активните фармацевтски супстанции или формулираниот производ. Постојат многу причини за оваа промена, меѓу кои и способноста да се разберат физичко-хемиските својства на фармацевтските соединенија, преку употреба на современи инструментални методи. Понатаму, постои потреба за обезбедување на квалитет на фармацевтските производи во текот на нивниот рок на употреба. Ова бара да ги проучуваме интеракциите на активната супстанција со ексципиенсите во присуство на резидуални растворувачи, како и други потенцијални реакции на деградација што можат да се појават во формулираниот производ во одреден временски период под различни стресни состојби. Фармацевтската индустрија е под зголемена контрола од регулаторните органи и групите од јавен интерес, со фокус кон тоа да доследно се испорачуваат на пазарот безбедни, ефикасни производи, кои ги исполнуваат и задоволуваат критериумите за квалитет. Како дел од раскрсницата да се одржи линијата на цените на лековите на рецепт, индустријата пристапи кон рационализирање на своите операции во однос на откривањето, развојот на лековите и секако, нивното производство. Напорот да се донесат иновативни производи побрзо на пазарот без негативно влијание врз квалитетот или безбедноста е предизвик на секоја компанија да ги модернизира постоечките процеси и да бара начини за зголемување на капацитетот, но за пократок временски период, следејќи ја изреката „направете повеќе со помалку“.

Аналитичката хемија одигра голема улога во промените со кои се соочува фармацевтската индустрија денес. Традиционално се гледало како на услужна дејност, но аналитичкиот оддел станува значаен партнер во процесот на развојот на лековите. Дополнително, важно е да се напомене дека генерирањето и собирањето на аналитичките податоци стана критична активност при изборот на кандидатски молекули за понатамошен развој. Работата под услови кога има ограничување со примероци, а од друга страна, во целосна согласност со тековните добри производствени практики (cGMP), наметнува фармацевтските аналитичари да генерираат точни и прецизни податоци. Науката и технологијата што се користат денес, заедно со новите прописи кои сега се обврзувачки, направија фармацевтските анализи да бидат многу посложени во споредба со она што беше тренд пред десет години.

Содржината на оваа скрипта ја исполнува потребата за учебно помагало што е во однос на филозофијата за аналитиката на лекови, поддршка за развојот на лековите, како и пост-маркетиншка поддршка. Целта е да се претстави улогата и делувањето на аналитичкото истражување и развој како дел од севкупниот процес на развој на нови лекови. Поради оваа причина, поглавјата се организирани повеќе на начин управуван од процеси, а не од чиста функција или техника. Во сите случаи, обезбедени се голем број референци за оние читатели кои сакаат подлабока дискусија за одредена тема. Фармацевтскиот аналитичар игра голема улога во обезбедувањето на идентитет, безбедност, ефикасност, чистота и квалитет на лекот. Студиите за безбедност и ефикасност бараат активната супстанција и готовиот производ да ги исполнуваат утврдените барања за идентитет и чистота, односно за биорасположливост (Поглавје 1). Потребата за изведба на фармацевтските анализи во голема мера е поттикната од регулаторните барања. Ова произлегува од фактот дека регулаторните размислувања се назираат кога се рекламира производот што не го исполнува својот квалитет. Регулаторните барања и прашањата за усогласеноста се детално дискутирани во оваа скрипта. Претставена е значајна дискусија за насоките што ги приложува Меѓународната конференција за хармонизација (ICH), која континуирано се обидува да ги усогласи регулаторните органи во САД, Европа и Јапонија.

Процесите за откривање на нови лекови и оптимизацијата на кандидат-молекула во фармацевтската индустрија интензивно се спроведуваат со примена на комбинаторната хемија во комбинација со *high-throughput* скринингот (HTS) (Поглавје 2). Процесот на селекција вклучува идентификација на онечистувања и производи

поврзани со процесот и проучување на механизмите на деградација уште во раната фаза од развојот на лекот. Ова обезбедува доволно време за подобрување на синтезата на активната супстанција, како и спречување на појавата на вакви онечистувања и производи на деградација во формулацијата (Поглавје 3). Исто така, во последно време сè поголем степен на внимание се посветува на физичките својства на цврстите материји, кои можат да влијаат на перформансите на дозираната форма (Поглавје 4). Доброто разбирање на физичко-хемиското однесување на фармацевтските цврсти материји обезбедува подобар избор на формулација. Студиите на предформулирање, кои се обработени во Поглавје 5, се спроведуваат за да се обезбедат податоци и информации за активната супстанција и технологијата на производство пред почетокот на развој на формулацијата, како и активности при дизајнирање на лекови. Понатаму, се дискутира за процесот на развој на аналитичките методи, што е опфатено во Поглавје 6, со акцент на правилното поставување на критериумите за соодветност на систем. Следствено на тоа, валидацијата на методите е детално разработена во Поглавје 7. Успешен трансфер на аналитичката методологија за нов производ во голема мера зависи од поседувањето вистински процес; ова е нашироко дискутирано во Поглавје 8. Правните барања за стабилност се насочени кон обезбедување дека готовиот производ останува непроменет во рамките на утврдените спецификации за готов производ, со цел да се обезбеди неговиот идентитет, јачина, квалитет и чистота. Затоа, неопходно е да се спроведат студии за стабилност за да се предвиди, процени и осигура безбедноста на готовите производи (Поглавје 9). Тенденција на новите регулаторни директиви е да се наметнат вклучување на математички и статистички методи, како научни пристапи за интерпретација на резултатите од *in vitro* профилите на растворливост на цврстите дозирани форми (Taylor & Cihon, 2004). Од особено значење е академијата, индустријата и регулаторните органи да работат токму во оваа насока, имајќи предвид дека мултиваријантните статистички методи упатуваат кон подобро предвидување на *in vivo* перформансите на испитуваната формулација и воспоставување *in vitro* – *in vivo* (IVIVC) корелација (Поглавје 10).

Вредните информации презентирани во оваа скрипта ќе бидат корисни за оние кои се вклучени во различни аспекти на фармацевтската индустрија при развој на нови лекови, производство, контрола, наставна дејност или регулатива.

СОДРЖИНА

1. СОВРЕМЕНИ ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ.....	1
1.1. Барања за идентитет и чистота	1
1.2. Барања за биорасположливост/растворливост	2
1.3. Регулаторни барања и регулаторна усогласеност.....	3
1.3.1. Меѓународна конференција за хармонизација.....	4
2. КЛУЧНИ СТРАНИ НА СОВРЕМЕНИТЕ ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ.....	5
2.1. Откривање нов хемиски ентитет со <i>high-throughput</i>	5
2.2. Анализа на цврста состојба на активни супстанции	5
2.2.1. Анализа на деградација и онечистувања на API.....	5
2.2.2. Предформулација	6
2.2.3. Цврсти и парентерални дозирани форми.....	6
2.2.4. Развој на нови дозирани форми.....	6
2.2.5. Компендијални тестирања.....	7
2.2.6. Развој на аналитички методи	7
2.2.7. Поставување на спецификации	8
2.2.8. Валидација на аналитички методи.....	8
2.2.9. Студии за стабилност	8
2.2.10. Трансфер на аналитички процедури.....	9
2.2.11. Документација и инспекции	9
2.2.12. Иновативни аналитички платформи.....	10
3. КОМБИНАТОРНИ МЕТОДИ.....	11
3.1. <i>High-throughput</i> скрининг и комбинаторна хемија.....	11
3.2. <i>Solid-state</i> анализи (анализи на цврста состојба).....	12
3.2.1. Својства поврзани со молекуларното ниво	12
3.2.1.1. Ултравioletова/видлива спектроскопија со дифузна рефлексација	13
3.2.1.2. Вибрациона спектроскопија.....	13
3.2.1.3. Нуклеарна магнетна резонанца (NMR) спектроскопија	14
3.2.2. Својства поврзани на ниво на честички	14
3.2.2.1. Микроскопија	14
3.2.2.2. X-зраци, рендгенска дифракција.....	15
3.2.2.3. Термички методи за анализа	16
3.2.3. Својства поврзани на ниво на гранулат.....	17
3.2.3.1. Распределба на големината на честичките	17
3.2.3.2. Микромеритика	19
3.2.3.3. Карактеризација на прашок.....	20
3.2.3.4. Растворливост, ослободување и конзистентност	20
3.2.3.5. Проточност на прашок.....	20
3.2.3.6. Пакување и таблетирање	21
3.2.3.7. Чистота, стабилност и процентуална кристалност	21
4. ОНЕЧИСТУВАЊА НА АКТИВНИ СУПСТАНЦИИ И НА ГОТОВИ ФАРМАЦЕВТСКИ ПРОИЗВОДИ.....	22
4.1. Онечистувања во активни супстанции.....	22
4.1.1. Евалуација на активна супстанција	23
4.1.2. Класификација на онечистувањата на активните супстанции	23
4.1.2.1. Органски онечистувања.....	23
4.1.2.2. Неоргански онечистувања	24
4.1.2.3. Резидуални растворувачи	25
4.1.2.4. Полиморфни форми	26
4.1.2.5. Енантиомери	26
4.1.3. Спецификација за квалитет на активната супстанција	27
4.2. Онечистувања во готов фармацевтски производ	27
4.2.1. Идентификација на онечистувања.....	27
4.2.2. Известување и контрола на онечистувањата.....	28

4.2.3.	Спецификација за квалитет на готов фармацевтски производ	29
4.2.4.	Корекции при квантитативно определување на онечистувањата	29
4.3.	Студии на форсирана деградација	30
4.3.1.	Регулаторни барања за форсирани студии на деградација	31
4.3.2.	Експериментални услови при форсирани студии на деградација	31
4.3.3.	Баланс на маса (<i>Mass balance</i>)	33
4.4.	Нитрозамински онечистувања.....	35
4.4.1.	Главни причини за присуство на <i>N</i> -нитрозамини во медицинските производи и мерки за нивно ублажување.....	35
4.4.1.1.	Основни причини за присуство и формирање на <i>N</i> -нитрозамини во хемиската синтеза на API.....	36
4.4.1.2.	Теоретски можни причини за појава на <i>N</i> -нитрозамини во фармацевтските производи поврзани со водата.....	36
4.4.1.3.	Теоретски можни причини за појава на <i>N</i> -нитрозамини во фармацевтските производи поврзани со растворувачи, реагенси, катализатори 37	
4.4.1.4.	Потврдени основни причини за појава на <i>N</i> -нитрозамини во медицинските производи во однос на ексципиенси и од примарно пакување ...	38
4.4.2.	Аналитички техники за подобрување на чувствителноста при откривање нитрозамински онечистувања	39
4.5.	Елементарни (метални) онечистувања	40
4.5.1.	Оправдување на нивоата на елементарните онечистувања повисоки од воспоставените PDE	41
4.5.2.	Класификација на елементарните онечистувања.....	42
4.5.3.	Потенцијални извори на елементарни онечистувања	43
4.5.4.	Идентификација на потенцијални елементарни онечистувања	43
4.5.5.	Контрола на елементарните онечистувања	45
4.5.6.	Конверзија помеѓу PDEs и дозволеният лимит изразен во концентрација 46	
4.6.	Мигрирачки (<i>Extractables</i> и <i>Leachables</i>) онечистувања.....	46
4.6.1.	Извори и ризици од мигрирачките (<i>Extractables</i> и <i>Leachables</i>) онечистувања	47
4.6.2.	Регулаторен пристап и тековни практики	49
4.6.3.	Дизајнирање на мигрирачка студија	50
4.7.	Стратегии за квалификација на деградационите продукти во нов производ ..	52
4.7.1.	Класификација на онечистувања според мутагениот и карциногениот потенцијал и контролни мерки (ICH M7)	53
4.8.	Инструментални техники за контрола на онечистувања	54
4.8.1.	Високо ефикасна течна хроматографија (HPLC)	54
4.8.2.	Масена спектроскопија (MS).....	54
4.8.3.	Спектроскопија на нуклеарно-магнетна резонанца (NMR)	55
4.8.4.	Атомска емисиона спектроскопија со индуктивно спрегната плазма/масена спектрометрија со индуктивно спрегната плазма (ICP-AES/ICP-MS) 55	
5.	СТУДИИ НА ПРЕДФОРМУЛАЦИЈА.....	56
5.1.	Развој на производ на нов ентитет за лекови	56
5.2.	Студија на предформулирање за поддршка на развој на нов производ	56
5.2.1.	Избор на API за развој на дозирана форма	56
5.2.1.1.	Измени во структурата	57
5.2.1.2.	Чистота	57
5.2.1.3.	Хиралност.....	57
5.2.1.4.	Избор на сол.....	57
5.2.1.5.	Пролекови	58
5.2.1.6.	Метаболити	58
5.2.2.	Заштита на интелектуална сопственост и поднесување патенти.....	58

5.2.3.	Избор на аналитички техники и развој.....	59
5.2.4.	Подготовка и поднесување на апликација за откривање на лекот	59
5.2.5.	Студии за клиничко испитување	59
5.2.6.	Развој и производство на дозирани форми.....	59
5.2.7.	Воспоставување QA/QC систем.....	60
5.2.8.	Подготовка на апликација за нов лек.....	60
5.3.	Значење и улога на студиите на предформулација.....	60
5.4.	Фази на студии за предформулација.....	61
5.4.1.	Физичко-хемиски својства и аналитичко тестирање на активна супстанција 61	
5.4.2.	Податоци кои го поддржуваат развојот на дозираната форма	61
5.4.3.	Поддршка за контрола на квалитетот и производството на готов производ 62	
5.5.	Студија за предформулирање за лекови и производи за здравствена заштита 62	
5.6.	Извештај од спроведени студии на предформулација	62
5.6.1.	Аналитички профили (потребни за развој на аналитички методи.....	62
5.6.1.1.	Идентификација на API.....	62
5.6.1.2.	Чистота, производи на деградација и резидуални растворувачи	63
5.6.1.3.	Апсолутна чистота	63
5.6.2.	Хемиски својства.....	63
5.6.3.	Термодинамички и физичко-хемиски својства	64
5.6.3.1.	Константа на дисоцијација, pK_a	64
5.6.3.2.	Растворливост.....	64
5.6.3.3.	Солубилизација.....	64
5.6.4.	Фармацевтски и механички својства.....	65
5.6.4.1.	Хигроскопност и апсорпција/десорпција на влага.....	65
5.6.4.2.	Карактеристики на гранулат	65
5.6.4.3.	Униформност на мешање.....	65
5.6.5.	Карактеристики на цврста состојба.....	66
5.6.6.	Биофармацевтски својства.....	66
5.6.6.1.	Коефициент на распределба	66
5.6.6.2.	Пропустливост во ГИТ	66
5.6.6.3.	Степен на растворливост	67
5.6.7.	Студии за компатибилност на ексципиенси	67
5.6.8.	Стабилност.....	68
6.	РАЗВОЈ НА АНАЛИТИЧКИ МЕТОД.....	69
6.1.	Преглед на методите за разделување.....	69
6.1.1.	Течна хроматографија со високи перформанси.....	71
6.1.2.	Методи во рана фаза на развој.....	73
6.1.3.	Течна хроматографија/масена спектрометрија и течна хроматографија/ нуклеарна магнетна резонанца	76
6.1.4.	Методи во доцна фаза на развој.....	79
6.1.4.1.	Оптимизација на мобилна фаза врз основа на изократски мод кај реверзно-фазна HPLC.....	80
6.1.4.2.	Оптимизација на мобилна фаза врз основа на изократски мод кај нормално-фазна HPLC.....	81
6.1.4.3.	Хирални сепарации.....	82
6.1.5.	Тенкослојна хроматографија.....	83
6.1.6.	Гасна хроматографија	83
6.1.7.	Суперкритична-течна хроматографија	85
6.1.8.	Капиларна електрофореза	86
7.	ВАЛИДАЦИЈА НА АНАЛИТИЧКИ МЕТОД.....	88
7.1.	Регулаторни аспекти – видови аналитички методи кои треба да бидат валидирани	89

7.1.1.	Некомпендијални методи	91
7.1.2.	Компендијални аналитички процедури	91
7.2.	Валидациони активности при развој на аналитички методи	91
7.2.1.	Животен циклус на развој на методот	91
7.3.	Процес на развој на метод за поддршка на валидационите активности	93
7.3.1.	Робустност на метод.....	93
7.3.2.	Оптимизација на метод	94
7.3.3.	Специфичност на метод	94
7.3.4.	Соодветност на систем (<i>System Suitability Parameters, SST</i>)	94
7.3.5.	Методолошка постапка.....	95
7.3.6.	Прелиминарни експерименти за валидација.....	96
7.4.	Валидациона документација	96
7.5.	Изведба на тестовите за валидација на аналитички метод	97
7.5.1.	Специфичност	97
7.5.1.1.	Начин на изведување на тестот за специфичност.....	97
7.5.1.2.	Критериум на прифатливост на тестот за специфичност.....	98
7.5.1.3.	Форсирани деградациони студии како дел од валидационен параметар – специфичност.....	99
7.5.2.	Опсег.....	100
7.5.2.1.	Опсег на репортирање (<i>Reportable range</i>)	100
7.5.2.2.	Работен опсег (<i>Working range</i>)	100
7.5.2.3.	Одговор (калибрационен модел)	101
7.5.3.	Линеарност.....	101
7.5.3.1.	Начин на изведување на тестот за линеарност	102
7.5.3.2.	Критериум на прифатливост за тестот за линеарност	103
7.5.3.3.	Определување на <i>Relative Response Factor (RRF)</i> преку тестот за линеарност.....	103
7.5.4.	Лимит на детекција	103
7.5.4.1.	Определување на лимит на детекција врз база на визуелна евалуација.....	103
7.5.4.2.	Определување на лимит на детекција врз база на сигнал-шум однос 103	
7.5.4.3.	Определување на лимит на детекција врз база на стандардната девијација на аналитичкиот одговор (σ) и наклонот (<i>S</i>)	104
7.5.4.4.	Начин на изведување на тестот за лимит на детекција.....	104
7.5.4.5.	Критериум на прифатливост на тестот за лимит на детекција	104
7.5.5.	Лимит на квантификација	104
7.5.5.1.	Определување на лимит на квантификација врз база на визуелна евалуација.....	105
7.5.5.2.	Определување на лимит на квантификација врз база на сигнал-шум однос 105	
7.5.5.3.	Определување на лимит на квантификација врз база на стандардната девијација на аналитичкиот одговор (σ) и наклонот (<i>S</i>)	105
7.5.5.4.	Начин на изведување на тестот за лимит на квантификација	105
7.5.5.5.	Критериум на прифатливост на тестот за лимит на квантификација 106	
7.5.6.	Точност	106
7.5.6.1.	Изведување на точност при определување на онечистувања и активна супстанција во готови фармацевтски форми	106
7.5.6.2.	Начин на изведување на тестот за точност.....	106
7.5.6.3.	Критериуми на прифатливост на тестот за точност.....	107
7.5.7.	Прецизност.....	107
7.5.7.1.	Прецизност на системот	108
7.5.7.1.1.	Начин на изведување на тестот за прецизност на системот.....	108

7.5.7.1.2.	Критериуми на прифатливост на тестот за прецизност на системот	108
7.5.7.2.	Повторливост (прецизност на методата).....	108
7.5.7.2.1.	Начин на изведување на тестот за повторливост.....	108
7.5.7.2.2.	Критериум на прифатливост за тестот за повторливост.....	109
7.5.7.3.	Интермедиерна прецизност.....	109
7.5.7.3.1.	Начин на изведување на тестот за интермедиерна прецизност..	109
7.5.7.3.2.	Критериум на прифатливост за тестот за интермедиерна прецизност.....	110
7.5.7.3.3.	Wätzig тест на еквивалентност.....	110
7.5.7.3.4.	Критериум на прифатливост за Wätzig тест на еквивалентност..	112
7.5.7.4.	Репродуцибилност.....	112
7.5.8.	Робустност.....	112
7.5.8.1.	Начин на изведување на тестот за робустност.....	112
7.5.8.2.	Критериум на прифатливост на тестот за робустност.....	114
7.5.8.3.	Алтернативни тестови за проценка на робустност, Wätzig тест на еквивалентност.....	115
7.5.9.	Влијание на филтерот.....	115
7.5.9.1.	Начин на изведување на параметарот влијание на филтер.....	116
7.5.9.2.	Критериум на прифатливост за тестот за влијание на филтер.....	116
7.5.10.	Стабилност на аналитички раствор.....	117
7.5.10.1.	Начин на изведување на параметарот стабилност на аналитички раствор	117
7.5.10.2.	Критериум на прифатливост за тестот за стабилност на аналитички раствор	117
7.6.	Ревалидација.....	117
8.	ТРАНСФЕР НА АНАЛИТИЧКИ МЕТОД.....	119
8.1.	Процес на развој на лекови.....	119
8.2.	Типови трансфери на аналитички методи.....	120
8.2.1.	Компаративно тестирање.....	121
8.2.2.	Ковалидација меѓу две лаборатории.....	121
8.2.3.	Потврдување на методот и/или ревалидација.....	121
8.2.4.	Трансфер преку „waiver“.....	121
8.3.	Барања и елементи за трансфер на аналитичка технологија.....	121
8.3.1.	Однапред одобрен тест план/стандардна оперативна процедура/протокол	122
8.3.2.	Опис на методите/процедурите за тестирање.....	123
8.3.3.	Опис на барањата за тестирање.....	123
8.3.4.	Образложение на барањата за тестирање.....	123
8.3.5.	Критериуми на прифатливост.....	123
8.3.6.	Документирање на резултатите.....	124
8.4.	Временска рамка/проектен план за технички трансфер.....	124
8.5.	Анализа на резултати/статистички пакети.....	125
8.6.	Сертификација и обука на аналитичари.....	126
8.7.	Пренос на техничка сопственост.....	127
8.7.1.	Извештај за развој на метод.....	127
8.7.2.	Извештај за аналитички развој.....	127
8.7.3.	Досие за трансфер.....	128
9.	СТУДИИ НА СТАБИЛНОСТ.....	129
9.1.	Видови стабилност.....	129
9.1.1.	Хемиска стабилност.....	130
9.1.2.	Физичка стабилност.....	131
9.1.3.	Микробиолошка стабилност.....	132
9.1.4.	Терапевтска и токсиколошка стабилност.....	132
9.2.	Типови на стабилност.....	132

9.2.1.	Стабилност на активна супстанција (API).....	133
9.2.2.	Студии на стабилност кои поддржуваат развој на нов производ.....	133
9.2.3.	Студии на стабилност што ги поддржуваат претклиничките и клиничките студии	133
9.2.4.	Студии на стабилност што ја поддржуваат регистрацијата на лекот.....	134
9.2.5.	Студии на стабилност на готов производ што се наоѓа на пазарот	134
9.2.6.	Специјални студии на стабилност	134
9.2.6.1.	Стабилност на неспакуван-bulk производ	134
9.2.6.2.	In-process тестирање	134
9.2.6.3.	In-use тестирање.....	135
9.3.	Преглед на ICH/EMA водичите за стабилност.....	135
9.3.1.	Избор на серии за тестирање при стабилност	135
9.3.2.	Избор на пакување (секундарно и примарно)	135
9.3.3.	Спецификации.....	135
9.3.4.	Фреквенција на тестирање	135
9.3.5.	Услови на чување	136
9.3.6.	Обврски кон програмата за испитување на стабилноста	137
9.3.7.	Евалуација на добиените резултати.....	138
9.3.8.	Тестирање на фотостабилност, Q1B	138
9.3.9.	Тестирање на стабилноста на нови производи, Q1C	138
9.3.10.	Редуциран дизајн на студии на стабилност, Q1D.....	138
9.3.10.1.	Bracketing.....	138
9.3.10.2.	Matrixing.....	139
9.3.11.	Евалуација на податоци добиени од испитување на стабилноста, Q1E	139
9.3.12.	Декларирање на услови на чување.....	140
9.4.	Параметри кои се испитуваат при определување на стабилноста на фармацевтско-дозираната форма.....	141
9.5.	Евалуација на добиени резултати при испитување на стабилноста	142
9.5.1.	Идентификација на ООС резултати.....	142
9.5.2.	Идентификација на ООТ резултати	143
9.5.3.	Статистичка евалуација на ООТ резултати.....	144
9.5.3.1.	Regression control chart метод	144
9.5.3.2.	By-time-point метод	144
9.5.3.3.	Slope control chart метод.....	145
9.5.4.	Преглед на резултати добиени за содржината на онечистувањата	145
9.6.	Пострегистрациски промени, барања и регулатива поврзани со стабилноста	146
9.6.1.	Евалуација на предложените промени.....	146
9.6.2.	Типови промени и глобални барања	146
9.6.2.1.	Тип I варијации.....	146
9.6.2.2.	Тип II варијации.....	148
9.6.2.3.	Промена во спецификации и аналитички метод.....	149
9.6.2.4.	Повеќекратни промени и промени кои афектираат повеќе производи	149
10.	СПОРЕДБА НА <i>IN VITRO</i> ПРОФИЛИ НА РАСТВОРЛИВОСТ	151
10.1.	Теорија и значење на растворливоста како фармацевтско-технолошки параметар	155
10.2.	Развој на дискриминаторен метод за испитување на растворливоста кај фармацевтските производи	156
10.3.	Биофармацевтски систем за класификација на производите (BCS).....	160
10.4.	Растворливост и квалитет базиран на дизајн (<i>Quality by Design, QbD</i>).....	161
10.5.	Примена на конвенционални и мултиваријантни статистички методи за евалуација на <i>in vitro</i> профили на растворливост	164
10.5.1.	Математички модел – независни методи.....	164

10.5.2.	Статистички модел – независен метод, мултиваријантен регион на доверба	166
10.5.2.1.	90% CI-базиран метод на разлики	166
10.5.2.2.	Мултиваријантен статистички метод базиран на растојание	167
10.5.3.	Математички модел – зависни методи.....	168
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....		173

1. СОВРЕМЕНИ ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ

Фармацевтската анализа едноставно значи анализа на фармацевтски препарат(и). Генерално е познато дека фармацевтскиот производ претставува хемиски ентитет од терапевтски интерес (Watson, 2020). Посоодветен термин е активна фармацевтска компонента (API) или активна состојка. Готовиот фармацевтски производ се подготвува со формулација од активна компонента и супстанции со инертни својства (ексципиенси) и истиот е погоден за администрација на пациенти.

Сепак, треба да се нагласи дека постојат ситуации каде што активната супстанција може да се администрира по едноставно растворање во растворувач, како што е водата. Дури и во овие ситуации треба да се спроведе соодветен фармацевтски третман за да се обезбеди достапност и безбедност (Kar, 2021).

Во фармацевтската индустрија добро е познато дека фармацевтските аналитичари во истражување и развој (R&D) играат сеопфатна улога во развојот на нови лекови и во активностите со цел да се осигура дека новиот лек производ ги исполнува воспоставените стандарди, дека е стабилен и продолжува да го исполнува квалитетот во текот на неговиот рок на траење (Pedersen-Bjergaard et al., 2019). Откако еден лек производ се одобри од регулаторните органи, притоа уверувајќи дека сите серии на лек производот се направени по наведените стандарди и методи на производство, станува одговорност на фармацевтските аналитичари во одделот за контрола на квалитет (QC) или за обезбедување на квалитет (QA). Методите генерално се развиваат во аналитички оддел за истражување и развој и се пренесуваат во контрола на квалитет или други оддели, по потреба (Crowther, 1998). Понекогаш тие се префрлаат во странство или на аутсорсинг компании. Очигледно е дека фармацевтските аналитичари играат голема улога во обезбедувањето на идентитетот, безбедноста, ефикасноста и квалитетот на лекот (Watson, 2020).

Студиите за безбедност и ефикасност бараат активната супстанција од лек производот да ги исполнува двете критични барања:

- Идентитет и чистота;
- Биорасположливост.

1.1. Барања за идентитет и чистота

Фармацевтскиот аналитичар се поврзува и комуницира со различни оддели и професионалци од неколку дисциплини за да дадат придонес што гарантира дека новиот хемиски ентитет навистина ја има предложената структура и дефинирана потребна чистота. Ова исто така гарантира дека нема несакани нуспојави од различни онечистувања кои можат да бидат продукти на интеракција или продукти на деградација.

Важно е да се докаже дека развиениот лек производ ги исполнува суштинските барања за квалитет и тој квалитет се одржува додека лекот финално не се администрира на пациентот. Како резултат на тоа мора да се развијат тестови кои се однесуваат на природата на материјалот што се тестира и фазата во неговиот развој. Од структурата на самите суровини, како и нивниот пат на синтеза и начин на подготовка, можат да се добијат релевантни информации како за типот на онечистувањето но и за понатамошниот развој на методологијата за нивно тестирање и правилна идентификација и квантификација. Но како што се развиваат наредни серии, стануваат достапни сè повеќе информации. Не е невообичаено да се промени начинот на подготовка на активната супстанција или готовиот производ со цел подобрување на квалитетот или од економски причини. Оттука, и методологијата треба постојано да се подобрува и/или модифицира за да се приспособи кон овие случувања. Всушност, методите треба да се развијат во согласност со фазата во која се наоѓа лекот. Имаме четири фази на клинички развој на лекот и тоа:

- Фаза I. Безбедност кај здрави субјекти;
- Фаза II. Безбедност и ефикасност кај пациенти;
- Фаза III. Формални студии за клиничка ефикасност;
- Фаза IV. Студии за одобрување на апликација за нови лекови.

Лек супстанцијата може да се формулира во различни лек производи по темелно истражување за саканата доза и целното место. Сепак, маркетинг размислувањата често играат значајна улога во процесот на селекција, кој често покренува некои нови размислувања. Најчесто користените дозирани форми се таблети или капсули кои се администрираат орално, па потоа инјекциите. Сепак, голем број други нови дозирани форми може да бидат пожелни од конвенционалните форми. Новиот финален лек производ може да се поднесе како апликација до локалните регулаторни органи на една земја и, по одобрувањето, истиот ќе биде комерцијализиран.

Фармацевтските анализи многу ретко претставуваат само тестирање на примерок според пишаните насоки, а притоа да нема будни набљудувања. Ова не треба да биде случај дури и во контрола на квалитетот, каде што често се претпоставува дека тестирањето се прави по рецепт. Ако ова е пракса, многу проблеми би поминале незабележани, бидејќи варијациите од серија до серија може да се видат дури и при најдобро контролирано производство. Во аналитиката во истражување и развој, флексибилноста, будноста и креативноста се синоними. Но, секако, акцентот мора да биде ставен на изнаоѓање оптимална методологија што ги следи сите познати и непознати онечистувања. Понатаму, мора да се земат предвид промените кои би можеле да настанат при складирање во различни пакувања. Сите промени во процесот и материјалите треба постојано да се следат за да се осигура квалитетот и безбедноста на лекот. Исто така, многу е важно да се документираат набљудувањата за да се рефлектира нивната важност. Методологиите и спецификациите треба да се документирани и потврдени заради уверување дека истите се точни, прецизни и робусни, така што тие можат да се репродуцираат од ден на ден во рамките на истата лабораторија или во други лаборатории. Исто така, многу е важно да се увери дека производот ја има саканата биорасположливост.

1.2. Барања за биорасположливост/растворливост

Терапевтската доза на лекот треба да биде целосно достапна кога таа се администрира на пациенти. Кристалната форма на активната супстанција и формулацијата може да влијае на биорасположливоста. За да се обезбеди биорасположливост на комерцијално произведени серии на лек производ, важно е да се развијат *in vitro* тестови на растворливост, што се еквивалентни на *in vivo* тестот за биорасположливост (Watson, 2020). Распаѓање, растворање и ослободување се тестови вклучени во фармакопеите. Овие тестови се дизајнирани за рутинска контрола на квалитетот или, во најмала рака, за следење на варијабилности од серија до серија, сè со цел да се обезбеди конзистентност на производството. Овие тестови често се трудоинтензивни и затоа претставуваат најголема можност за модернизација и автоматизација.

Важноста за тоа што претставува тестот за растворливост за фармацевтската индустрија е рефлектирано со фактот дека USP наведува најмалку седум различни лабораториски апарати за определување на *in vitro* ослободувањето на API од нивните фармацевтски дозирани форми. USP апарати 1 (корпи) и 2 (весла) доминираа за цврсти орални дозирани форми, но неодамна е зголемена употребата на апаратот 4 (проток низ ќелија). Иако постојат општи упатства во однос на медиумот за растворање, волуменот, брзината на вртежи и температурата што треба да се користи со секој тип апарати, изборот на условите треба целосно да се заснова на способноста да се детектираат варијации на производот, промени на стабилноста, полиморфни промени и корелација со *in vivo* резултати во ситуации кога се вршат овие студии.

Доброто воспоставување *in vitro* – *in vivo* корелација може да биде значителен потфат за аналитичката, фармацевтската и биофармацевтската област и со тоа може да се обезбеди голема предност на индустријата. Во ситуации кои вклучуваат промени во формулација, процес, опрема и локација на производството, скапите и долготрајни студии за биоеквивалентност може да се заменат со еквивалентни резултати добиени со *in vitro* – *in vivo* корелации.

1.3. Регулаторни барања и регулаторна усогласеност

Во идеален свет потребата за анализа треба да биде поттикната од желбата за уверување дека квалитетот на лекот е задоволувачки. Сепак, во реалниот свет потребата за фармацевтски анализи во голема мера е управувана од регулаторните барања. При развојот на новиот лек производ важно е квалитетот да биде вграден во него. Ова значи дека многу работи треба да се земат предвид од самиот почеток, односно да се увериме во предложената структура на новиот хемиски ентитет, кристална форма (ако сретнеме повеќе од една кристална форма, важно е да се наведе која кристална форма ќе се користи во лекот производ) и стереохемиска структура. Треба да се исполнат високи стандарди за квалитет на производ кој треба да се администрира на луѓето.

Барањата се засновани на насоките дадени според ICH (Меѓународна конференција за хармонизација). Многу од барањата кои сега се специфицирани од регулаторните органи не се ништо друго освен здрав разум и пристап за да се увериме дека тестирањето се врши во соодветни фази, каде промените во процесот може да влијаат на квалитетот. Неопходно е да се развијат методи што треба да се доволно селективни и чувствителни за следење на познатите и непознати онечистувања, мора да бидат репродуцибилни, т.е. повторливи за изведба од страна на други и мора да бидат робусни и ригидни за да можат да се трансферираат во одреден временски период од лабораторија до лабораторија, односно методите треба да бидат потврдени. Овие се барања што потекнуваат и од добрите производни практики (GMP) или добрата лабораториска пракса (GLP). Пред да започне со какви било клинички студии, регулаторните тела, како FDA и EMA, мора да се осигураат во врска со безбедноста и ефикасноста на лекот. Исто така, треба да се поднесе целосно досие и истото треба да се одобри за да може лекот да се комерцијализира. Треба да се дадат информации за хемијата, производството и контролата, како за активната супстанција така и за готовиот производ.

Треба да се напомене дека регулаторниот орган во секоја земја има главен збор за барањата во рамките на нејзината територија.

Добра основа за усогласеност со регулативата во една организација започнува со добро обмислени и воспоставени системи и практики за квалитет и усогласеност (FDA/CDER, 2004).

Тим составен од членови на единицата за истражување и развој, QC и QA, ги развиваат овие системи. Покрај регулаторните и истражувачки документи, потребни се документи за усогласеност за да се покаже интегритетот на податоците. Документите за усогласеност се однесуваат на извештаи што ги бара GMP и/или се користени во текот на инспекцијата од здравствен орган (ICH Q7, 2000; Bunn, 2019). Тоа се документи поврзани со системите за квалитет и специфично за производот, односно контролите и интегритетот на аналитичките податоци. Притоа, општите инспекции на GMP се однесуваат на основните системи за усогласеност и стандардно оперативно работење, процедурите (СОП), оценувајќи ги избраните податоци специфични за производот како репрезентативни на усогласеност со тие системи (Bunn, 2019). Документите за трансфер на технологија се едни од најпознатите, внимателно прегледувани документи за време на инспекција. Одговорности за аналитичката поддршка на новиот лек често се пренесуваат на други локации или на други одделенија. Историјата на развојот и знаењето мора да го придружува преносот на одговорностите. Исклучително е корисно да се има сеопфатен аналитички извештај за развој кој го дава опсегот на секој аналитички метод, хронологија, образложение за промени, како и еквивалентност или супериорност на оптимизираните методи. Обично, аналитичкиот развоен извештај е проследен со извештај за валидација, со што се олеснува процесот на трансфер на технологија. Инспекцискиот тим прави ревизија на следниве документи:

- Лабораториски записи и сертификати за анализа за референтни стандарди, клинички и регистрациски серии итн.;
- Ажурирани извештаи за стабилност;

- Извештаи за валидација на аналитички методи и трансфер на технологија за лек супстанција и лек производ;
- Спецификации и аналитичка методологија (вклучувајќи сировини, компоненти за пакување);
- Достапни аналитички податоци;
- Лабораториски истраги и извештаи од истраги;
- Потврда за чистење.

1.3.1. Меѓународна конференција за хармонизација

Значаен придонес е направен од страна на Меѓународната конференција за хармонизација (ICH), која се обиде да ги усогласи барањата на регулаторните органи во Соединетите Американски Држави, Европа и Јапонија. Во својата 30-годишна историја, Меѓународната конференција за хармонизација на техничките барања за фармацевтски производи за човечка употреба (ICH) опфати широк опсег на теми за да генерира квалитет, безбедност, ефикасност и мултидисциплинарни хармонизирани упатства. Како што науката напредува, издадените водичи се ажурираат и се предлагаат нови насоки во линија на потенцијални идни активности.

На својот почеток ICH разви серија неопходни водичи за технички квалитет, а потоа се прошири и издаде мултидисциплинарни водичи (каков што е заедничкиот технички документ [CTD]). Понатаму напредуваше со издавање револуционерна серија водичи за примена на пристапи за развој засновани на наука и ризик и производство на лекови. Паралелно со тоа, ICH го прошири своето членство и влијание надвор од оригиналниот регулатор и индустриски асоцијации од САД, Јапонија и ЕУ кон 17 нови регулаторни земји и глобални индустриски асоцијации, плус 32 набљудувачи. ICH е формиран во април 1990 година од страна на регулаторните агенции и индустриските асоцијации на Европа, Јапонија и САД. Пред формирањето на ICH, апликациите за нови лекови во Европа, Јапонија и САД биле многу различни, често барале посебни студии и податоци и резултатите биле претставени во различни формати и стилови. Овие разлики резултираа со значително удвојување и многу недоразбирања.

Целта на ICH била, и сè уште е, унапредување на јавното здравје преку меѓународно усогласување кое придонесува за: спречување на непотребно удвојување на клиничките испитувања и постодобрени клинички проценки, развој и производство на нови лекови, регистрација и надзор на нови лекови, намалување на непотребните тестирања на животни без да се загрози безбедноста и ефикасноста.

ICH е уникатна организација: еден од факторите за нејзиниот успех е силната соработка помеѓу индустриските организации и регулаторите, користејќи пристап управуван од консензус. Во својата прва деценија ICH бил сконцентриран на основни регулаторни студии во областите на ефикасност, квалитет и безбедност. Но како што продолжувала активноста на ICH, потребата за проширување на комуникацијата и ширење на информации за водичите за ICH со дополнителни региони станал клучен фокус. Значаен чекор беше направен во 2015 година кога ICH претрпе низа организациски промени и придобивки од усогласувањето надвор од основачките региони.

2. КЛУЧНИ СТРАНИ НА СОВРЕМЕНИТЕ ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ

2.1. Откривање нов хемиски ентитет со *high-throughput*

Процесот на откривање лек е многу сложен и тежок. Идеален потенцијален кандидат за лек треба добро да се апсорбира орално, да е доволно метаболички стабилен за да го поттикне саканиот фармаколошки ефект, нетоксичен; да предизвика минимални или никакви негативни ефекти, селективно да се дистрибуира до целните ткива и да има разумно време/живот на елиминација. Голем број соединенија (околу 80%) не успеваат во претклиничката фаза, а стапката на успех е околу 1% за соединенија кои поминуваат од откривањето на лекот, па сè до нивно одобрување. Како резултат на тоа, трошоците за развој на нов лек се проценуваат на 300 до 500 милиони долари. Комбинаторната хемија овозможува производство на голем број сродни соединенија. Неодамнешните иновации во комбинаторната хемија овозможуваат големи збирки на библиотеки за синтети, кои доведоа до развој на методи способни за скрининг на овие соединенија. Комбинаторната хемија поврзана со *high-throughput* скрининг (HTS) и компјутерските методи се интегрирани во процесот на откривање и оптимизација во фармацевтската индустрија. Овој пристап помага да се идентификуваат сè повеќе и повеќе потенцијални ентитети и се фокусира на олеснување на процесот на апсорпција на лековите, метаболизмот и токсикологијата. Како што компјутеризираниите и експериментални процедури за апсорпција, дистрибуција, метаболизам и екскреција/токсикологија се подобруваат, така и идентификацијата во процесот на откривање на лекот е можен. Односно, моќната комбинација на иновации во хемиската синтеза и дизајнот на библиотеката, заедно со скринингот и биоинформатичката технологија може многу да помогне да се намали времето за развојот на лекови и трошоците.

2.2. Анализа на цврста состојба на активни супстанции

Најчесто користен метод за администрација за поголемиот дел од активните супстанции се вградени во цврсти дозирани форми. До неодамна приоритет на регулаторните тела секогаш беше да се фокусираат на безбедноста и ефикасноста, што доведе до потребниот акцент на аспектите на хемиска чистота. Оваа ситуација драматично се промени изминатата деценија, при што постојано се посветува внимание на физичките својства на цврстите материји кои можат да ја загорзат дозираната форма. Игнорирањето на физичките аспекти на формулацијата може да бидат катастрофални бидејќи различните реакции во цврста состојба може да ја загорзат стабилноста на лекот во неговата таблета/матрица. Честопати, патеката на овие реакции може да биде драматично различна кога се набљудува како се одвива истата реакција во течна или гасовита фазна состојба.

2.2.1. Анализа на деградација и онечистувања на API

Онечистувањата во фармацевтските соединенија потекнуваат главно за време на процесот на синтеза од суровини, растворувачи, меѓупроизводи и нуспроизводи. Суровините генерално се произведуваат со многу пониски барања за чистота отколку активната супстанција. Оттука, лесно е да се разбере зошто би содржеле голем број компоненти кои би можеле да влијаат на чистотата на супстанцијата и на лекот. Слично на тоа, растворувачите што се користат во синтезата содржат голем број на онечистувања кои може да се движат од нивоа во трагови до значителни количини кои можат да реагираат со различни хемикалии и да произведуваат други онечистувања. Прекурсорите, исто така, обично не се одржуваат на нивото на чистота на супстанцијата. Нуспроизводите често се непознати и многу ретко се контролирани. Така и тие се извор на онечистувања. Прекурсорите, од друга страна се погодни, економични и заштедуваат време; сепак, тие предизвикуваат хаос во услови за создавање на онечистувањата бидејќи може да се појават голем број реакции истовремено (Ahuja & Alsante, 2003).

Идентификацијата на онечистувањата и производите поврзани со процесот може да обезбеди разбирање во однос формирање на онечистувањата и овозможува проучување за механизмите на деградација. Доколку процесот на идентификација се

одвива уште во раната фаза на развојот, има соодветно време за подобрувања во производствениот процесот на API и формулацијата а со тоа да се спречи појавата на формирање на деградациони производи. Структурната карактеризација на онечистувањата вклучува голема експертиза од аналитички хемичари (со вклучување масена спектроскопија и експерти за нуклеарна магнетна резонанца), хемичари и/или формулатори (Ahuja & Alsante, 2003).

2.2.2. Предформулација

Примарната цел на студијата е да обезбеди податоци и информации во однос на активната супстанција и технологија на производство пред развојните активности на формулација и дизајн на производот. Предформулационите студии кулминираат со подготовка на извештај заснован на овие студии, кој им помага на формулаторите во нивниот развој. Со вака обезбедените податоци и информации, готовиот производ може да се развива врз основа на здрави принципи и технички практики, со разгледување на аналитичките профили, хемиски/физички својства, модерни производни процедури, стабилност и биофармацевтски својства (Wells, 1988). Како што сè повеќе предформулацијата се вклопува во вкупните развојни активности, содржината на извештаите за предформулација треба да биде посеопфатна. Обезбедени се модели за некои од извештаите за да му се помогне на тимот за развој да осмисли сопствен формат на извештај врз основа на нивните посебни потреби и ресурси. Аналитичките техники, кои се корисни за предформулација и барањата за регулаторна усогласеност на регистрација на производот, сè повеќе се зголемуваат.

2.2.3. Цврсти и парентерални дозирани форми

За време на развојот на производот можат да се употребат многу аналитички техники, обезбедувајќи карактеризација на производот и креирање пат до оптимална формула. Во многу случаи овие техники може да се користат да се проценат ефектите од процесните параметри и да се обезбедат насоки за предвидување на перформансите и стабилноста на финалниот производ. За да се олесни развојот на производи со брзо-, контролирано- и продолжено- ослободување, неинвазивни и недеструктивните *in situ* техники обезбедуваат увид во физичката природа и микрохомогеност на дозираната форма. Станува збор за: светлосна микроскопија, поларизирана светлосна микроскопија, скенирачка електрон микроскопија, трансмисиона микроскопија, FTIR, нуклеарна магнетна резонанца, блиска инфрацрвена (NIR) анализа, Раман спектроскопија, термички техники, течна хроматографија, масена спектрометрија.

Парентералната дозирана форма ги сочинува оние дозирани форми кои се администрираат на пациентите преку инјектирање. Тие можат да содржат прашок кој се раствора во моментот на администрација или раствор или друга соодветна доза за инјектирање која може да обезбеди побрзо дејство од цврстите дозирани форми. Хемиската анализа на парентералните производи се врши претежно преку употреба на течна хроматографија со висок притисок (HPLC). Вообичаени тестови што треба да се направат за парентерални производи се микробиолошките тестови, кои се опфатени со длабинско испитување на тест за стерилитет, тест за бактериски ендотоксин и тест за честички.

2.2.4. Развој на нови дозирани форми

Со цел да се осигура дека лекот е ефикасен и без сериозни несакани ефекти, испораката на лекот претставува еден од главните напори во процесот на развој. Фармацевтските научници треба да го разгледаат најдобриот пат на администрација, целното место на дејство на формулацијата, стабилноста и биорасположливоста на лекот. Најочигледен пат на администрација на лекови е преку усната шуплина или во некои случаи преку ректумот во гастроинтестиналниот тракт. Други начини на администрација со кои пациентите можат да се справат лесно се носот, кожата и окото. Доставување на лекот преку интравенска, интрамускулна, субкутаната и перитонеалната администрација бара обука, надзор, и, можеби, квалификуван персонал.

Создадени се нови, перспективни системи за испорака на лекови во насока да се осигураме дека лековите се доставуваат до соодветните цели на дејство во телото без поголеми компликации. На пример, далечинска (*remote*) испорака на лекови во капсула е интересен концепт. Капсулата го ослободува лекот на целното место, што може да биде желудникот, тенкото црево или дебелото црево. Други интересни пристапи за испорака на лекови е развиен за третман на гастрични улкуси и Кронава болест. Цврстите тумори покажуваат редуктивна средина поради хипоксија и хиперпродукција на биоредуктивни ензими. Дизајниран е систем да се искористат карактеристиките на животната средина обезбедена од цврсти тумори. Аптамерите може да играат важна улога во третманот на пациенти со рак. Тие се олигонуклеотиди кои поседуваат висок афинитет за целите на протеините. Хормоните, протеините и малите пептиди не се погодни за орална администрација без сложени измени во формулацијата.

2.2.5. Компендијални тестирања

За да се обезбеди квалитетот на лекот, објавени се текстови кои вообичаено се нарекуваат компендии, кои ги наведуваат официјалните методи на тестирање, како и спецификациите. Компендијалното тестирање ги вклучува сите аналитички тестови потребни за докажување на идентитетот, ефикасноста и безбедноста на лековите пред да бидат пакувани или дистрибуирани. Три значајни примери за такви компендии се Фармакопеја на Соединетите Американски Држави, Европската фармакопеја и Јапонската фармакопеја. Компендијалните методи треба да се имплементираат како што е напишано, освен кога се научно оправдани можности за промени. Испитувањата за квалитет треба да се направат во согласност со процедурите опишани во фармакопејата која управува со земјата или регионот за кој производот е наменет. Компендијалните тестови се стандардизирани протоколи за многу фармацевтски сировини и готови производи. Тестирањето и усогласеноста со овие стандарди е основен услов за глобално производство, ослободување и дистрибуција на фармацевтски сировини и лекови.

2.2.6. Развој на аналитички методи

Потребни се бројни методи за да се карактеризираат лековите супстанции и лек производите (Pedersen-Bjergaard et al., 2019). Спецификациите може да вклучуваат опис; идентификација; анализа на органски синтетички процесни онечистувања, неоргански онечистувања, производи за деградација, резидуални растворувачи и мигрирачки соединенија; тестови на различни физичко-хемиски својства, хирална чистота, вода содржина, униформност на содржината и антиоксидативен и антимикробен конзерванс содржина; микробиолошки тестови; тестови за растворливост/распаѓање; цврстина/трошност; тестови за големина на честички и полиморфна форма. Некои од овие тестови може да бидат исклучени или може да се додадат дополнителни тестови како што налага хемијата на фармацевтската или дозираната форма. Поради варијабилноста во специфичните тестови тешко е да се обезбеди сеопфатен став/насока за да се опфатат сите аспекти на фармацевтскиот развој. Сепак, потребните тестови може да бидат широко поделени во три главни категории:

- Тестови кои се однесуваат на карактеризација на цврста состојба;
- Компендијални тестови;
- Квантитативни тестови за карактеризирање на составот на супстанцијата и производот.

Квантитативните тестови бараат значително да се земе предвид развојот на методи, како што се тенкослојна хроматографија, гасна хроматографија, HPLC, суперкритична течна хроматографија и капиларна електрофореза, потоа течна хроматографија-масена спектрометрија (LC/MS), течна хроматографија-тандем масена спектрометрија (LC/MS/MS), и течна хроматографија-нуклеарна магнетна резонанца (LC/NMR), што исто така претставуваат тренд за развој во денешницата.

2.2.7. Поставување на спецификации

Поставувањето соодветни спецификации е важен услов за да се осигураме дека за пациентите се достапни безбедни и ефикасни производи. Развојот на конечните спецификации е процес кој се развива заснован на континуирано собирање податоци во текот на истражување и развој, па сè до комерцијализација на производот. Од регулаторна перспектива, ICH создаде силен процес за обезбедување вредни упатства кои ќе му помогнат на производителот да постави конзистентни спецификации кои ќе бидат прифатени од регулаторните агенции во трите главни фармацевтски пазари - САД, Европа и Јапонија. Исто така поставени се и тест процедури и критериуми на прифатливост за биотехнолошки/биолошки производи. Спецификациите мора да се постават по соодветно разгледување на производството, варијабилноста, аналитичката варијабилност и техниките на земање примероци (Pedersen-Bjergaard et al., 2019). Важно е да се запомни дека спецификациите се само еден дел од целокупната филозофија која мора да вклучува соодветен дизајн на производи, развој и контроли и добри производни практики, како и персонал кој е искусен и добро упатен во добри производствени процеси и техники.

2.2.8. Валидација на аналитички методи

Примарната цел на валидацијата на методот е да обезбеди висок степен на уверување дека наведениот метод постојано обезбедува точни резултати од тестот, кои го оценуваат производот според неговите дефинирани спецификации и атрибути за квалитет (Pedersen-Bjergaard et al., 2019). Прописите бараат со достапните податоците за валидација да се утврди дека аналитичките процедури кои се користат при тестирањето ги исполнуваат соодветните стандарди на точност и доверливост (Hokanson, 1994a). Сите аналитички процедури бараат некоја форма на валидација, без разлика дали методот се користи за стабилност, контрола, развој. Повеќето од дискусиите се фокусираат на валидацијата на HPLC методи. Многу аналитички методи за тестирање се очекува на крајот да се користат во единицата за контрола и се бара дополнителен степен на префинетост во споредба со методите во истражување. Мора да се запомни дека процесот на валидација бара квалитетен развој на метод. Со оглед на тоа што валидацијата може да биде процес кој одзема многу време, методите не треба да влезат во фаза на валидација освен ако не се целосно развиени (Hokanson, 1994a). Притоа, треба да внимава на следново:

- Кога методите се правилно развиени, тие можат лесно да се потврдат;
- Валидацијата не го прави методот подобар или поефикасен;
- Потврдениот метод не мора да значи дека ги исполнува сите критериуми на правилно развиен метод;
- Критериумите за прифаќање поставени при валидација треба да се засноваат на искуството од развојот на методот.

Научниците за развој на методи не треба да го започнуваат процесот на валидација освен ако не се сигурни во успехот. Потврда на методот е „холистички“ процес кој бара соодветна инструментација и компетентност во лабораториските техники за да се осигура успех. Иако барањата за валидација се јасно документирани од регулаторните органи, пристапот кон валидација е разновиден и отворен за толкување. Сепак валидацијата е GMP активност и затоа мора да биде соодветно документирана, а се изведува на квалификувани и калибрирани инструменти и опрема (Crowther et al., 2000).

2.2.9. Студии за стабилност

Неопходно е да се спроведат студии за стабилност за да се предвиди, процени и обезбеди безбедноста на производите. Правните барања за стабилност се насочени кон тоа да се обезбеди производот да остане во рамките на утврдените спецификации за да се обезбеди идентитет, јачина, квалитет и чистота. Стабилноста се толкува како должина на време каде производот ќе остане во рамките на предефинираните граници

за сите негови важни карактеристики под различни специфични услови на влијание и складирање. Управувањето со стабилноста е доста динамично и бара повеќе од само познавање и придржување кон различните регулаторни барања. Исто така, бара управување со примероците за стабилност, животната средина, комори и целата придружна документација.

2.2.10. Трансфер на аналитички процедури

Трансферот на аналитичките методи овозможува успешен трансфер на технологија за нов производ за лекови. Важните елементи на аналитички трансфер на технологија се следните:

- Однапред одобрен тест план/СОП/протокол;
- Опис на методи/процедури за тестирање;
- Опис на барањата за тестирање;
- Образложение за барањата за тестирање;
- Критериуми на прифатливост;
- Документација на резултатите.

Преносот на аналитички метод потврдува дека методот или процедурата за тестирање функционира на еквивалентен начин на две или повеќе различни локации во согласност со поставените критериуми на прифатливост. Овој процес е статистички воден и управуван од добиените податоци. Брзите и целосни трансфери се клучни за успехот на експериментите при валидација на процесот (Crowther, 1998).

Фармацевтските аналитичари кои работат во истражување и развој ги развиваат и усовршуваат методите кои на крајот ќе се искористат за тестирање на идентитетот, квалитетот, чистотата и составот на производите на пазарот. Не е невообичаено аналитичките методи да подлежат на повеќекратни повторувања во текот на животниот циклус на развој на фармацевтскиот производ. Промените на методите се резултат на промени на кои било параметри, но не ограничувајќи се на синтеза на API, формулација на составот и производните процеси на дозираната форма. На крајот на развојот, кога методите стануваат „финални“, станува сè почеста појава единицата за квалитет да побара увид за влез и коментар за предложениот пакет методи пред конечната валидација. Со тоа „може да избегнат проблеми со формалниот трансфер што се случува подоцна“. Овој процес ѝ овозможува на единицата за квалитет да даде коментари и предлози до нивните колеги за истражување и развој пред финалната валидација на методот. Во повеќето компании понатамошните трансфери кои се случуваат по одобрување на производот се управувани и администрирани од единицата за квалитет. Така трансферите може да ги вклучат до договорна истражувачка организација или повеќе места за производство и тестирање. Поради временските ограничувања, организација за истражување и развој понекогаш може да се префрли на повеќе локации истовремено.

2.2.11. Документација и инспекции

Фармацевтската аналитичка документација мора да ја исполни клучната мисија на аналитичко истражување и развој: следење и обезбедување на идентитетот, чистотата, стабилноста и конзистентноста на лековите супстанции и дозираните форми кои се користат за време на претклиничката, клиничката и комерцијалната фаза, во согласност со регулаторните насоки и политики. Аналитичките податоци се основата и 'рбетот за фармацевтски развој, што доведува до одобрување и производство на нови лекови на пазарот. Аналитичката документација обезбедува критични врски за време на еволуцијата и животниот циклус на новиот производ – почнувајќи од најраните студии, преку лансирање на производот и промените по одобрувањето. Пред одобрувањето за маркетинг, аналитичкиот персонал за истражување и развој го поддржува развојот и оптимизацијата на производните активности. По одобрувањето, персоналот од единицата за квалитет ги обезбедува податоците за да се увери во

конзистентниот квалитет и стабилност на производот што се продава и за поддршка на неизбежните промени што се случуваат во животниот циклус на секој производ. Барања за аналитичка документација за време на животниот циклус на фармацевтскиот производ – од првичниот скрининг и селекција на кандидатот, преку влез во луѓето/IND, до NDA и постодобрувањето се засноваат на барањата на FDA и ICH упатствата.

2.2.12. Иновативни аналитички платформи

Бројните објавени трудови ја илустрираат улогата на новите аналитички платформи врз основа на комбинации на две или повеќе техники, како што се LC/MS, LC/MS/MS и LC/NMR. Од овие платформи LC/NMR добива сè поголемо значење во модерната фармацевтска индустрија. Овие техники обезбедуваат податоци со помала вклученост на аналитичарот и овозможуваат поголема темелна проценка на квалитетот.

Развојот на минијатуризирани системи добива сè поголемо внимание. Концептот „лабораторија на чип“ ветува дека областа на HTS ќе направи револуција. Минијатуризацијата е многу пожелна во науката за сепарација бидејќи помага да се работи со помали големини на примероци, притоа добивајќи голема брзина и раздвојување со висока пропусност, без да се загрозат резолуцијата и чувствителноста (Ahuja, 2000a). Понатаму, може да помогне да се намали потрошувачката на различни реагенси и органски растворувачи, со тоа што се еколошки ѝ помагаат да се контролираат трошоците. Прикажани се анализи на широк спектар молекули со оваа нова и иновативна технологија. Во фармацевтските анализи постигнат е успех при анализа на протеини, пептиди, ДНК, други мали молекули и хирални сепарации (Ahuja, 2000a). Нанотехнологијата исто е од голема корист во многу области од медицината, односно со употреба на сензори во човечкото тело, нови формулации на лекови и нови системи за испорака на лекови. Најважните потенцијални употреби на нанотехнологијата во медицината вклучуваат рано откривање и третман на болеста.

3. КОМБИНАТОРНИ МЕТОДИ

Комбинаторната хемија се состои од хемиски синтетички методи кои овозможуваат подготовка на голем број (десетици до илјадници, па дури и милиони) соединенија во еден процес (Suto, 1999; Floyd et al., 1999). Овие сложени библиотеки може да се направат како мешавини, множества од поединечни соединенија или хемиски структури, генерирани од компјутерски софтвер. Комбинаторната хемија може да се користи за синтеза на мали молекули и за пептиди.

Стратегиите што овозможуваат идентификација на корисни компоненти на библиотеките се исто така дел од комбинаторната хемија. Методите што се користат во комбинаторната хемија се применуваат и надвор од хемијата. Потеклото на комбинаторната хемија започнува со примена при синтеза на пептиди во 1960-тите, но, со примената на мали молекули како лекови, технологијата почна да станува широко применета во вториот дел од 1990-тите. Комбинаторната хемија е нов метод развиен од академијата и истражувачите за да се намали времето и трошоците за производство и да се откријат ефективни и конкурентни нови лекови (Suto, 1999). Дури и со овие технологии, носењето нов лек на пазарот останува проблем и огромна задача. Само 10% од соединенијата кои влегуваат во развој стигнуваат до аптеките. Многу од неуспесите се должат на лошите фармакокинетски својства, кои се препознаваат само во животниот циклусот на лекот. Оттука, иднината на фармацевтските компании треба да се фокусира на поквалитетни лекови, каде од суштинско значење е подобриот дизајн на комбинаторните библиотеки на HTS.

Употребата на комбинаторната хемија во откривањето лекови вовеле ново поглавје во хемиска синтеза во рамките на фармацевтската лабораторија (Floyd et al., 1999). За првпат мали соединенија може да се направат во голем број со паралелни методи, наместо со класична индивидуализирана сериска синтеза. Библиотеките со мали молекули може да се креираат со различни методи. Тие вклучуваат традиционална хемија на раствори која се изведува паралелно со користење на повеќекратна реакција на садови, така што со индивидуализираната хемија изведена во секој сад, просторно е кодиран и оттука структурата на производот е имплицитна од садот. Алтернативно, хемијата може да се изведе на цврста потпора, обично полистиренски плочи, во поединечни садови или може да се комбинираат во базени каде што секоја плоча се гледа како посебен сад за реакција. Ова овозможува примена на цела палета дизајнерски стратегии. Според неодамнешното истражување на литературата, две третини од пријавените библиотеки се подготвени на цврста потпора и една третина на раствор.

Комбинаторната хемија се состои од хемиски синтетички методи кои овозможуваат подготовка на голем број (десетици до илјадници, па дури и милиони) соединенија во еден процес. Овие сложени библиотеки може да се направат како мешавини, множества од поединечни соединенија или хемиски структури генерирани од компјутерски софтвер. Комбинаторната хемија може да се користи за синтеза на мали молекули и за пептиди. Стратегиите кои овозможуваат идентификација на корисни компоненти на библиотеките се исто така дел од комбинаторната хемија. Методите што се користат во комбинаторната хемија се применуваат и надвор од хемијата.

3.1. *High-throughput* скрининг и комбинаторна хемија

Во текот на изминатите 40 години напредокот во областа на медицинската хемија и биохемијата доведоа до револуционерни промени во нашето разбирање за дејството на лековите. Фармацевтските компании го искористија ова знаење со цел да воспостават нови биоанализи за откривање нови лекови за стари болести. На тој начин беа идентификувани специфични биолошки цели кои покажаа силни врски со болеста. Со тоа *in vitro* би можело ефикасно да се развијат механички-базирани анализи што води кон скрининг на соединенија против различни терапевтски цели. Хемиски добро карактеризирани соединенијата им обезбедија на фармацевтските компании додадена вредност кон скринингот на старите соединенија за нови биолошки активности. Со воведувањето на лабораториската роботика во текот на 1980-тите,

автоматизацијата на биолошки анализи стана можна, што овозможи голем број анализи да работат паралелно. Концептот на HTS еволуираше преку автоматизација на анализите. Блиската работна врска помеѓу биохемијата, молекуларната биологија, инженерството и информатиката се појавија со формирање HTS групи, што резултираше со целосно интегрирани платформи за откривање на лекот. Комбинаторната хемија обезбеди средства да ги пополни празнините во просторот на хемиската разновидност и доведе до проширување на постоечките сложени колекции (Suto, 1999). Како што бројот на соединенија продолжи да се зголемува, се зголеми и побарувачката за поефикасно управување со трошоците, реагенсите и времето поврзано со скринингот на овие соединенија за биолошка активност.

Комбинаторна хемија поврзана со *high-throughput* скрининг и компјутеризирани методи се интегрирани во процесот на откривање и оптимизацијата во фармацевтската индустрија, односно се насочени кон оние библиотеки кои имаат одредена биолошка цел (Suto, 1999).

3.2. Solid-state анализи (анализи на цврста состојба)

Нормалниот начин на администрација за повеќето фармацевтски производи е преку употреба на цврсти дозирани форми и овие единици обично се произведуваат со формулација и преработка на цврсти материји во прав. До неодамна приоритетот на регулаторните тела беше фокусиран кон безбедноста и ефикасноста. Оваа ситуација драстично се промени во текот на изминатата деценија и сè поголемо внимание се посветува на физичките својства на цврстите материји во дозираната форма. Игнорирање на физичките аспекти на формулацијата може да биде катастрофална, бидејќи различни реакции во цврста состојба можат да ја загорзат стабилноста на лекот. Честопати патеките на овие реакции можат да бидат драматично различни во споредба со тоа како истата реакција се одвива во течна или гасовита фаза. Стекнувањето доволно детални информации за физичките својства може да му дозволи на формулаторот да ја надмине способноста да се справи со неочекувани неуспеси. За добро разбран систем теоретски е можно да се дизајнира автоматизирана или полуавтоматизирана производна шема, каде променливите се соодветно контролирани и можноста за сериски неуспех е минимизиран. Материјалите, откако ќе ги поминат спецификациските тестови за физичките параметри, можат да се мешаат, гранулираат, сушат, компресираат и испорачаат во контејнери, без интервенција на операторот. За да се избегнат проблеми за време на развојот на лекот, физичката карактеризација на API, ексципиентите и нивните мешавини треба да станат дел од рутинскиот процес (Gordon & Balasubramanian, 1999). Степенот на физичко тестирање се разликува во зависност од типот на формулација, но треба да ги вклучи сите методи кои се сметаат за соодветни. Ваквиот систематски пристап кон физичката карактеризација на фармацевтските цврсти материјали служи како корисен приод за класификацијата на многу достапни методи за физичка карактеризација. Па оттука, карактеризацијата на физичките својства може да биде на молекуларното ниво, на ниво на честички или на ниво на булк. Една од областите каде што физичката карактеризација на цврстите материји стана исклучително важна е проучувањето на полиморфите и солватоморфите. Кристалната структура на дадено соединение има големо влијание врз својствата на цврстата состојба на тој систем и може да даде значителни разлики во својствата на лекот. Сега е прифатено дека евалуацијата на полиморфизмот на супстанцијата мора да биде темелно испитан уште во раните фази на развој.

Резултатите од овие студии мора да бидат вклучени во производството и контролниот дел при апликацијата на новиот лек, а таквите информации се потребни за да се покаже контрола над процесот на производство.

3.2.1. Својства поврзани со молекуларното ниво

Молекуларните својства може да се дефинираат како карактеристики на материјалот, каде теоретски може да се мерат поединечни молекули. Поради минималните барања за примерок, молекуларните својства често се одредуваат во

најраните фази на развојот на лекот. Повеќето од техниките на молекуларно ниво се спектроскопски по природа, но се од голема корист за формулаторите за да добијат информации и соодветно да дизајнираат експерименти. На пример, скрининг на стреснат материјал може да се изврши на ниво на микрограми, користејќи инфрацрвена микроскопија и резултатите од таквата работа ја помагаат предформулацијата и карактеризацијата на новиот хемиски ентитет.

3.2.1.1. Ултравиолетова/видлива спектроскопија со дифузна рефлексција

Повеќето цврсти материји не се во целост погодни за да се дозволи конвенционална употреба на ултравиолетова/видлива (UV/VIS) спектроскопија. Како резултат на тоа, таквата работа мора да се изврши со користење дифузна рефлексција. Спроведени се студии каде UV/VIS спектроскопијата се користи за проучување на реакционите патишта на различни реакции во цврста состојба. Друго, направени се апликации во областите на идентификација и мерење на боите, области кои можат да бидат од значителна важност кога се применуваат на агенсии за боене кои се во формулациите. Пред некое време беше увидено дека спектроскопијата со дифузна рефлексција е многу корисна алатка за проучување на интеракциите помеѓу различни компоненти на формулацијата, а техниката е успешно искористена во карактеризацијата на многу реакции во цврста состојба. Истражувањата спроведени под соодветно дизајнираните стрес услови се корисни во проучувањето на интеракциите помеѓу API-ексципиенси, патеки на разградување на лекот и промените во биорасположливоста поради хемисорпција на лекот на други компоненти во формулацијата.

3.2.1.2. Вибрациона спектроскопија

Енергиите поврзани со основните вибрациони модови на хемиските соединението се во спектрален регион од $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, што одговара на средно-инфрацрвено електромагнетно зрачење. Транзиции на вибрациона енергија меѓу нивоата може да се набљудуваат директно преку нивната апсорпција во инфрацрвениот регион на спектарот; Фурие-трансформирана инфрацрвена спектроскопија (FTIR) сега е метод на избор. Но, исто така, овие транзиции можат да бидат забележани со користење на Раман спектроскопија. Инфрацрвената (IR) апсорпциона спектроскопија, особено FTIR, е моќна техника за физичката карактеризација на фармацевтските цврсти материји, особено кога структурните карактеристики на цврстото тело го нарушуваат моделот на вибрационо движење за дадена молекула (Manfred et al., 2008). FTIR спектрите често се користат за проценка на типот на полиморфизам и можат да бидат многу корисни за проучување на содржината на водата во облик на хидрати.

Друга техника на вибрациона спектроскопија, која е идеално прилагодена за карактеризација на цврсти материјали, е Раман спектроскопијата. Во оваа методологија примерокот е озрачен со монохроматско ласерско зрачење, додека расејувањето на енергијата се користи за да се добие вибрационен спектар на аналит. Спектарот добиен со Раман спектроскопија генерално наликува на спектарот добиен со користење на FTIR, но разликата е во максималниот интензитет. Општо земено, симетричните вибрации и неполярните групи даваат најинтензивни Раманови расејувачки ленти, додека антисиметричните вибрации и поларни групи даваат најинтензивни ленти на апсорпција на инфрацрвени зраци.

Можен е широк опсег на апликации каде е применета IR спектроскопијата. Спектралните карактеристики се од најголема корист при откривањето и определување на функционални групи кои содржат атоми на водород (Manfred et al., 2008). Определувањето на хидрати во безводна матрица може лесно да се изврши со помош на NIR анализа. Техниката NIR се користи многу успешно за одредување на влага и содржина на цела таблета. Овие методи се лесни за развој и потврда и се многу полесни за извршување отколку традиционалните методи на анализа и имаат точност еквивалентна на таа добиена со употреба на Карл-Фишер титрација. Определувањето

на содржината на цела таблета се изведува многу лесно и разликата е во тоа што не бараат уништување на анализот за да се добие резултат како при HPLC методите.

3.2.1.3. Нуклеарна магнетна резонанца (NMR) спектроскопија

Најмалку осум Нобелови награди по физика и две по хемија се доделени на научници кои имаат работено на полето на NMR спектроскопијата. NMR спектроскопијата се користи во медицинската дијагностика во вид на имиџинг техника за дијагностика на различни заболувања. Меѓутоа, оваа техника пронајде голема примена и во хемијата и овозможи да биде употребена за решавање непознати молекулски конфигурации, изучување на термодинамичките параметри, интра и интермолекулските интеракции и слично (Manfred et al., 2008). Со оглед на големата моќност на NMR спектроскопијата, како и многубројната литература која темелно ја покрива оваа тема, се поставува прашањето: дали употребата на NMR ќе помогне во разрешување на дилемите во врска со идентификацијата на молекулската структура на онечистувањата од деградациони продукти на активните супстанции и готовите фармацевтски производи. За решавање на овие прашања прво треба да се допре до двете најважни цели на NMR спектроскопијата - структурната идентификација и квантификација, како и инструменталните ограничувања на оваа техника од аспект на чувствителноста и потребната чистота на супстанцијата. Нуклеарно магнетната резонантна спектроскопија (NMR) има широк спектар на апликации. Наоѓа голема примена во фармацевтската, медицинската и петрохемиската индустрија. Големата разновидноста на NMR апликациите се должи на нејзината способност за изучување на хемиските и физичките својства, вклучувајќи карактеризација на хемиската структура, како и молекулската динамика. Покрај тоа, таа може да се примени кај течни, цврсти и гасовити примероци. На некој начин, таа е „универзален детектор“, со тоа што ги детектира сите атомски јадра во примерокот, без разлика на нивното потекло. Сите сигнали што се јавуваат од различните компоненти се пропорционални на нивната концентрација. Затоа, NMR е комплементарна на сепаративните техники, како што е хроматографијата, кои обезбедуваат висок степен на селективност на една компонента во смесата. Исто така, NMR е комплементарна техника и на масената спектрометрија, бидејќи може да обезбеди критични структурни информации.

Во споредба со другите техники, NMR е исклучително чувствителна на мали промени во локалните електронски средини, како што се индивидуалните полиморфи во смеса од различни кристали. Покрај квалитативните молекулски информации обезбедени од страна на NMR спектроскопијата, може да се добијат и квантитативни информации. Во зависност од примерокот, NMR спектроскопијата може да ја измери релативната количина на компонентите во смесата. Се разбира, границата за структурна квантификација не зависи само од количината на примерокот туку и од типот на примерокот.

3.2.2. Својства поврзани на ниво на честичи

Овие својства често се проучуваат во текот на раниот развој.

3.2.2.1. Микроскопија

Евалуацијата на морфологијата на фармацевтскиот цврст материјал е од исклучителна важност, бидејќи ова својство има значително влијание врз својствата на булк прашокот. Микроскопијата е исто така корисна како средство за добивање проценки на дистрибуцијата на големината на честичките во примерок и лесно може да се направи определување во однос на кристалноста на материјалот. Непознатите честички често може да се идентификуваат само врз основа на нивните микроскопски карактеристики, иако е корисно да се добие потврдна поддршка за овие заклучоци со помош на микроскопски потпомогнати техники. И оптичките и електронските микроскопи се широко користени за карактеризирање фармацевтски цврсти материји.

Оптичката микроскопија е ограничена на опсегот на зголемување погоден за рутинска работа. Сепак, оваа граница на зголемување не ја исклучува истрагата на

повеќето фармацевтски материјали и се воведува употребата на поларизирачка оптичка моќ во техниката, што не е достапна кај другите методи.

Електрон микроскопијата работи со извонредно големо зголемување (до 90.000× на повеќето единици), а сликите што може да се добијат содржат значителен степен на тридимензионални информации. Кога овие техники се користат заедно, станува возможна суштинската карактеризација на цврст материјал. Електрон микроскопија дава одлични топографски и информации за обликување и е најкорисна во форензички ситуации кои вклучуваат карактеризација на траги и идентификација на докази.

Светлосната микроскопија е најкорисна за добивање информации за внатрешните својства на малите честички, влакна и филм обвивки. Кога поларизирачката оптика се користи заедно со светлосна микроскопија, може да се утврдат и кристалите кои се под истрага. Во тој случај може да се добијат молекуларни информации за анализот. Во проучувањето на цврсти материји најкорисната техника вклучува употреба на поларизирачкиот микроскоп, што во суштина е микроскоп опремен со линеарен поларизатор сместен под кондензаторот и дополнителен поларизатор монтиран на врвот на окуларот. Овој метод може да даде неколку директно измерени параметри, како што е знакот и големината на кое било забележано двојно прекршување, поврзаните индекси на рефракција со секоја кристална насока, аглиите на оската и односите меѓу оптичките оски.

Способноста да се набљудуваат оптичките својства на кристалите за време на загревањето и процесите на ладење се нарекуваат термичка микроскопија, и ова може да биде длабоко корисна техника при проучување на полиморфи и солватоморфи.

Скенирачка електронска микроскопија (SEM) е техника на избор за добивање информации на високи нивоа на зголемување или кога е потребен 3D приказ за површината на честичките. Морфологијата и физичките својства на ексципиентите играат важна улога во формулацијата и нивните својства се анализираат токму со SEM анализата. На пример, кроскарамелозата е полимерна супстанција која најчесто се користи во цврсти дозни форми како дезинтегрант. Кога супстанцијата се произведува како кратки влакна, се добиваат подобри проточни карактеристики и добра способност за мешање без негативно да влијаат на дезинтегративните својства. Во друго досие, SEM анализата е користена да го проучува растот на кристалите на карбамазепин на површината на таблетите кои биле складирани на покачени температури. Откриено е дека овој кристален раст се одвива само кога стеаринската киселина се користела како лубрикант за таблети.

3.2.2.2. X-зраци, рендгенска дифракција

Рендгенската дифракција е исклучително важна за фармацевтската наука бидејќи претставува примарен метод за добивање фундаментални структурни информации за кристалноста на материјалите. Методологијата вклучува определување на кристални структури, евалуација на полиморфизам и водени структури, евалуација на степени на кристалност и проучување на фазни транзиции. Анализата е поделена во три дела. Првата е геометриска анализа, каде што се мери точната просторна распределбата на рефлексииите од рендгенот и се користи за пресметување на големината и формата на единица ќелија. Втората фаза повлекува проучување на интензитетот на различни рефлексии, користејќи ги овие информации за одредување на атомската дистрибуција во рамките на единицата ќелија. Конечно, дијаграмот на x-зраци се испитува за да се добијат квалитативни информации за квалитетот на кристалот или степенот на редослед во кристалната решетка. Овие информации помагаат при предвидувања за растворливоста на кристалната структура.

Несомнено е дека дифракција со x-зраци е моќна техника за проучување на полиморфи и солватоморфи, но исто така е утврдено дека оваа методологија не е добро прилагодена за рутинска евалуација на кристална состојба на цврсти материји во прав. За таа цел се применува рендгенска дифракција за спршени примероци (XRPD). XRPD во контролата на квалитетот на фармацевтските производи првенствено се занимава со идентификување на кристален материјал, важен за регулаторни цели или за време

на развојот, како и за различните полиморфни форми на „отпечатоци од прсти“ на супстанцијата. Може да се користи и за да се направи разлика помеѓу аморфен и кристален материјал или да се измери пропорционална кристалност на примерокот. XRPD може да детектира полиморфни промени кои се случуваат за време на складирањето или производството, каде што температурните и временските варијации може да предизвикаат промени во оригиналната структура на прашкастиот материјал.

Понатаму, фармацевтскиот процес на производство како што е компактирање, мелење итн., може да ја промени морфологијата на активните фармацевтски состојки (API) или ексципиенси. Сите овие варијации претставуваат значителни предизвици за контрола на квалитетот, потенцијално влијаат на ефикасноста, безбедноста или стабилноста на активните состојки или дозираниите форми.

Затоа деталните сознанија за полиморфната форма се многу релевантни за контролата на квалитетот, бидејќи кристалните форми обично се претпочитаат во развојот поради нивната супериорна дефиниција за точка на топење, растворливост и IPC (*in process control parameters*) параметри кои треба да се квантифицираат за да се контролира квалитетот на финалниот производ. Рендгенската дифракција на прашкаст материјал (XRPD) е клучна алатка за карактеризирање на структурниот ред или нарушување на цврстите API или други супстанции, идентификувајќи ги цврстите форми на кој било даден полиморф, солват, ко-кристал или сол со карактеристични комбинации на дифракциони пикови и подредени параметри. Научниците за анализа на честички исто така можат да применат XRPD за да ги набљудуваат кристалографските промени во конечната дозирана форма за да обезбедат внатрешен квалитет на API, ексципиенси и финален производ.

3.2.2.3. Термички методи за анализа

Методите за термичка анализа се дефинирани како оние техники во кои својството на аналитот се определува како функција од надворешната применета температура. Оваа технологија се користи за карактеризирање на чистотата на соединението, полиморфизмот, солвацијата, деградацијата и компатибилноста на ексципиенсите. Методите за термичка анализа вообичаено се користат за следење на ендотермичките процеси (топење, вриење, сублимација, испарување, десолвација, транзиции на фази цврсто-цврста и хемиска деградација) и егзотермни процеси (кристализација и оксидативно распаѓање). Пристапот до оваа методологија е исклучително корисен за време на спроведувањето на студиите на предформулација, бидејќи може да се користат за да се укаже на постоењето можни интеракции на API-ексципиенс. Може да се добие значаен увид во практиката на термичка анализа преку проучување на точката на топење и кривите на фузија.

Диференцијалната термичка анализа (DTA) претставува подобрување на определувањето на точката на топење со тоа што разликата во температурата помеѓу примерокот и референцата се следи во функција на температурата. Сè додека не се случуваат термички транзиции, температурата на примерокот и на референцата ќе биде иста бидејќи топлинските капацитети им се приближно еквивалентни. Разликите во температурата помеѓу примерокот и референцата се манифестираат кога се случуваат промени кои бараат топлинска реакција. Ако транзицијата е позитивна (ендотермичка реакција), температурата на примерокот ќе заостанува зад референтната (бидејќи ќе има повеќе апсорбирана топлина отколку од референцата) и овој настан ќе биде снимен во термограмот како негативен пик. Ако транзицијата е негативна (егзотермична реакција), температурата на примерокот ќе ја надмине онаа на референтната (бидејќи самиот примерок ќе биде извор на дополнителна топлина) и настанот ќе се евидентира во термограмот како позитивен пик.

Калориметрија со диференцијално скенирање (DSC) претставува подобрување на DTA анализата и е еден од најкористените методи на топлинска анализа. Кај DSC за компензација на моќност дава позитивни врвови за ендотермични транзиции и негативни врвови за егзотермни транзиции. Друга методологија е онаа на DSC со топлински флукс, каде негативните пикови се добиваат за ендотермични транзиции и

позитивните се добиваат за егзотермни транзиции. Површината под пикот на DSC кривите е директно пропорционална со апсорбираната топлина. Поради способноста да се олесни толкувањето на квантитативните податоци, употребата на DSC анализа практично ја замени употребата на DTA анализа. DSC анализата може да се користи за да се одреди апсолутната чистота. Знаеме дека околу 90 % од достапните фармацевтски производи се во цврста форма. За да се обезбеди квалитетот на производите треба да се одреди концентрацијата и дистрибуцијата на неговите компоненти (API и помошни супстанции). Промените во кристалноста лесно се откриваат со помош на DSC. Исто така, корисно е и за проучување на филм-облогата на таблетите. Една од најраните апликации на DSC е пронајдена во проучувањето на термодинамичките својства на ензимите. DSC е исто така погоден за учење за термичка стабилност на фотосензитивните протеини. За анализа на инкорпорацијата на лекови во наночестички преку промена на енталпијата, корисна е термичка анализа (DSC).

DSC е исто така корисен во анализата на стабилноста и растворањето на лекот од наноструктурирани липидни носачи (NLC). DSC може да се смета како алатка за брз скрининг за проучување на различни механизми на интеракција на ДНК. DSC помага во проучувањето на *in vitro* интеракциите на антиуморните лекови и интеракциите на многу нестероидни антиинфламаторни лекови.

Кога станува збор за нови пептидни антибиотици, нивниот дизајн, развој и разбирање за молекуларните механизми зависат од концептот на интеракции пептид-липиди. DSC обезбедува дел од квантитативните информации за интеракцијата пептид-липид, а исто така и за пептидниот ефект врз структурата на мембраната. Слично на таблетите, DSC е користен и при подготовката на козметиката за да се развие и контролира квалитетот на суровините и финалниот производ.

Една друга најчесто користена термоаналитичка техника е термогравиметријата (TG), каде што е термички индуцираното губење на тежината на материјалот, мерено во функција на применетата температура. TG анализата е ограничена на студии кои вклучуваат или масовна добивка или загуба (обично загуба) и најчесто се користи за проучување на процесите на десолвација и распаѓање на соединенија. Главна употреба на TG анализата е квантитативно определување на вкупната испарлива содржина на цврстиот материјал. Кога материјалот може да се распадне со помош на неколку дискретни, секвенцијални реакции, големината на секој чекор може да се оценува посебно. TG анализа на распаѓање соединение, исто така, може да се користи за да се споредат слични соединенија. Колку е повисока температурата на распаѓање на дадено соединение, толку понегативна е вредноста на G и, според тоа, толку поголема е стабилноста.

3.2.3. Својства поврзани на ниво на гранулат

Тестирањето на суровините е особено важно, бидејќи се користат само оние кои поминуваат низ предизвиците на процесот на производство. Експципиенсите се вклучени во формулациите со цел да направат некаков физички ефект, како што е подобрување на процесот на натапување на гранулатот, подобрување на растворливоста на дозираната форма, подобрување на проточноста на гранулатот. Речиси очигледно е дека анализите погодни за евалуацијата на функционалните својства на експципиенсите се од суштинско значење за развојот на робусни фармацевтски формулации. Оваа евалуација бара воспоставување сеопфатни програми за физичка карактеризација на експципиенсите, особено во однос на својствата поврзани со употребата и функционалноста. Добивањето релевантни информации за својствата на материјалите критично зависи од земањето мостри и мора да бидат репрезентативни или, во спротивно, аналитичката работа ќе биде апсолутно безвредна.

3.2.3.1. Распределба на големината на честичките

Распределбата на големината на честичките е вреден показател за квалитетот и перформансите на гранулатот, а со тоа директно и на формулацијата. Откако во истражување и развој се конструира нов фармацевтски лек, следниот чекор е во

производството да се идентификува најдобриот начин да се доведе новата активна фармацевтска супстанција (API) во соодветна дозирана форма. Проточноста и леснотијата на ракувањето со API и ексципиенси (полнителите и лубрикантите) се клучни барања за формулацијата на лекот. Стапките на растворање, воедначеноста на дозираните единици и конзистентноста на содржината на API се најважните параметри за ефективноста, квалитетот и биорасположливоста на лекот. Влијанието што го имаат фармацевтските честички врз биорасположливоста се тестира и оценува во неколку различни фази во текот на развојот на лековите. Откако ќе се анализира влијанието во текот на последната развојна фаза, се одредуваат спецификациите за дистрибуција на големината на честички за да се контролира конзистентноста на производството и квалитетот на лекот. Формулациите се многу важен аспект на создавањето лекови, бидејќи тие се од суштинско значење за да се обезбеди дека активниот дел од лекот се доставува до правилниот дел од телото, во вистинска концентрација и со правилна брзина (не премногу брзо или премногу бавно).

Распределбата на големината на честичките е мерење кое го дефинира бројот на присутни честички според нивната големина. Како што можете да видите на сликата, сферичните честички се опишани со користење на дијаметарот на честичката како единечен број, бидејќи сите димензии се идентични. Сепак, не сите честички во примерокот се совршено сферични. Овие не-сферични честички се опишани со користење повеќе мерења на должина и ширина (вертикалните и хоризонталните проекции се прикажани на сликата). Овие описи на несферичните честички обезбедуваат повисоки нивоа на точност, но вклучуваат поголема сложеност во нивното мерење. Затоа повеќето методи ја прават претпоставката дека секоја честичка е сфера. Со цел да се претстави дистрибуцијата на големината на честичките, се прави дијаграм на фреквенција или хистограм. X-оската ја запишува големината на честичките, а y-оската го претставува бројот на честички со таа големина (или фреквенцијата на појавување). Во аналитиката на лекови најголема важност е ширината на кривата на дистрибуција. Клучните мерења што се користат се три вредности: D10, D50 и D90. D50, средната вредност, е дефинирана како големина на честички, каде што половина од популацијата лежи под оваа вредност, 90 проценти од популацијата лежи под точката D90, а 10 проценти од популацијата лежи под D10.

Како различните големини на честички можат да влијаат на фармацевтското производство!?

За време на развојот и производството на фармацевтски лекови, одредувањето на дистрибуцијата на големината на честичките и обезбедувањето дека тие остануваат конзистентни е од витално значење за да се обезбеди степенот на апсорпција на API. Дополнително, големини на честички кои се надвор од спецификациите може да го забават производството или да ги намалат приносите и да влијаат на вкупната профитабилност. На пример, проточноста е многу важна за време на производството на таблети и општо е познато дека колку е помала честичката, толку е полош протокот. На пример, користејќи шеќер како илустрација - шеќерот во прав покажува подобро растворање, но гранулираниот шеќер тече многу полесно. Намалениот или неконзистентен проток при празнење во пресата за таблети може да предизвика проблеми со квалитетот, вклучувајќи и варијации во тежината на таблетата и униформноста на содржината за време на фазите на компресија. Компресибилноста на честичките е исто така многу важна. Кога се користи преса за таблети и се работи со многу фини честички, потребни се дополнителни чекори за одржување на производ со добар квалитет поради недостатокот на способност на помалите честички да се компресираат заедно. Кога работите со многу ситни честички за време на компресија на таблетата, често е потребна преткомпресија – операторот прво користи почетна компресија со полесен притисок, пред главниот чекор на компресија. Ако не се изврши преткомпресија, тоа може да доведе до проблеми при нормалната компресија позната како капирање или ламинирање. Тоа е кога горниот или долниот дел од таблетот се одвојува хоризонтално додека пресата на таблетот ги исфрла таблетите. Ламинацијата е еднослојно или повеќеслојно раздвојување што се случува на кој било друг дел од

таблетот, освен на горниот или долниот дел. Создавањето ситни честички (мали прашински честички) за време на производството ги зголемува тековните трошоци на производствените операции бидејќи се намалува севкупниот принос на производот. Тоа придонесува во неточно ракување со производот, неправилно поставување на процесот на мелење или други техники за намалување на големината на честичките. Освен што го намалуваат приносот, од друга страна, пак, се зголемува потреба за чистење на работната средина и на повисоки нивоа на абење на машините и алатите, што дополнително негативно влијае на профитабилноста.

3.2.3.2. Микромеритика

Микромеритиката ја изучува природата на површините што го сочинуваат цврстиот материјал. Површината, порозноста и густината на материјалот генерално се сметаат за фармацевтски најрелевантни параметри. Површината на цврстиот материјал е важна по тоа што дава информации на расположливите празни места на површините за прашкастиот материјал. Степенот на р-ливост на цврстиот материјал е делумно одреден од површината на честичките. Мерења на површината на цврсто тело се добиваат со апсорпција на инертен гас на цврстата површина на намалена температура и, последователно, апсорпција на овој гас на собна температура. Сорпционите изотерми добиени во оваа техника се толкуваат со користење на равенките развиени од страна на Brunauer, Emmett и Teller и затоа техниката се нарекува метод ВЕТ. За ВЕТ мерењата може да се користи кој било кондензиран, инертен гас, но најпосакувани гасови се азот и криптон.

Од аспект на густината имаме 3 типа густина, што се разликуваат во нивното определување на волуменот окупиран од прашокот.

Балк густина. Еден од начините за одредување на оваа густина е со полнење на градуиран цилиндар со зрнест материјал кој поминал низ сито и инка за да се овозможи нежно акумулирање на честичките со минимално набивање. Разликата помеѓу масата на градуираниот цилиндар по и пред полнењето е масата на примерокот. Волуменот што го читате на градуираниот цилиндар го вклучува волуменот на цврстите гранули, секој празен простор во нив (интрачестичка празнина), како и секој празен простор меѓу нив (меѓучестичка празнина). Масата и волуменот на примерокот се запишуваат; овие вредности се поделени за да се пресмета густината.

Мерењето на **густината по тапкање** обично се добива во истото време, при што волуменот на цврстото тело се мери по подложувањето на системот на голем број контролирани шокови. Честичките во наполнетиот цилиндар се движат и се набиваат колку што е можно повеќе, намалувајќи го празниот простор на меѓучестичките. Оваа постапка се повторува додека не се постигне константен волумен. Густината по тапкање се пресметува со масата на мострата поделена со волуменот по тапкањето. Повторениот механички стрес предизвикува прашокот/гранулатот да се спакува во помал волумен, па следува дека густината по тапкање секогаш ќе биде поголема од балк густина.

Визуелно ги прикажавме разликите помеѓу балк густината и густината по тапкање. Но, што е со остатокот од просторите помеѓу тие честички? Како да го измериме волуменот и густината на прашокот ако сакаме да ги земеме предвид сите тие празнини помеѓу честичките или какви било пукнатини во тие честички? Всушност, тоа е **вистинската густина**. Гасниот пикнометар се користи за поплавување на наполнета чаша за примероци со хелиум или азотен гас. Со оглед на неговата големина и инертната природа, гасот е способен да го пополни најмалиот простор помеѓу честичките, како и сите неправилности, пукнатини и пори на примерокот во чашата. Волуменот на празната чаша е познат; се мери волуменот на гасот што може да се смести во празниот простор; разликата помеѓу овие волумени е волуменот на цврстиот примерок што ја полни чашата. Вообичаено, на примерок се прави серија од 10 определувања на волуменот, а потоа густината се пресметува од влезната маса и просечниот измерен волумен. Промената на вистинската густина може да укаже на присуство на нечистотија во материјалот.

Мерењата на порозноста на честичките се вреден податок и се користат во процесите на директна компресија. Анализата на порозиметрија преку влез на жива (MIP) е еден пристап кој може да обезбеди неколку излези за густина. Со оваа техника апарат со калибриран волумен, наречен пенетрометар, делумно се полни со примерокот. Течната жива се внесува во пенетрометарот при низок притисок, каде што едноставно го обвива примерокот. Разликата помеѓу волуменот на жива потребна за полнење на пенетрометарот со и без примерокот го покажува најголемиот волумен на примерокот; *балк густината* се определува со користење на масата на влезниот примерок и балк волуменот на примерокот. Инструментот потоа врши зголемен притисок врз системот, принудувајќи ја живата да влезе во кој било можен простор во примерокот. Помалата празнина бара повисоки притисоци за да се пополни. За гранулирани примероци празнините меѓу честичките имаат тенденција да се пополнат прво, а дури потоа внатрешните пори. При највисок применет притисок се известува за скелетната или привидната густина. Оваа густина е слична во концептот на вистинската густина, иако може да има некои пори до кои хелиумот може да пристапи, а до кои живата едноставно не може.

3.2.3.3. Карактеризација на прашок

Проточност, растворливост, конзистентност, чистота и стабилност се параметри што треба да се земат предвид кога станува збор за оптимизирање на фармацевтските прашоци. Широк спектар аналитички инструменти фокусирани на карактеризација на фармацевтски прашок можат да помогнат да се подобри ефикасноста на производот.

Продлабочување на разбирањето за својствата на честичките е со цел да се добијат предвидувања за формулациите. Разбирањето за гранулатот/прашоците во секој чекор – од формулација до производство – ги спречува несаканите услови што влијаат на ефикасноста и квалитетот на производот. Потребно е да се добијат сигурни и повторливи резултати за параметри како што се површина, големина и дистрибуција на честички, густина на волумен и тапкање, својства на проток на прав и многу повеќе.

3.2.3.4. Растворливост, ослободување и конзистентност

Оптимизирањето на конзистентноста на формулацијата, степенот на растворливост, биорасположливоста и однесувањето на апсорпција се критични чекори што треба да се земат предвид при процесот на развојот на нов лек. Едно од основните физички својства што директно влијае на секој од овие параметри е големината на честичките на формулацијата. Брзо и прецизно мерење на големината и дистрибуцијата на честичките и како тие се менуваат со текот на времето и под различни услови е често првиот чекор во развојот на нова формулација. Дополнително, површината и порозноста на фармацевтскиот гранулат обезбедуваат голем увид во растворливоста и стапките на ослободување на активната супстанција. Поточно, колку е поголема вкупната површина и колку повеќе пори се присутни во прашокот, толку е подобра растворливоста и стапката на растворање. Прецизното мерење на големината на честичките, како и површината и порозноста на фармацевтските прашоци се критични за оптимизирање на конзистентноста и испораката на лекот на местото на делување и стапката на ослободување на лекот кај пациентот.

3.2.3.5. Проточност на прашок

Обработката, ракувањето и складирањето на прашоци на индустриско ниво предизвикува проблеми кои обично не се гледаат при производството на пилот серии. Многу прашоци покажуваат значителна зависност во однесувањето од условите на животната средина на кои се изложени (на пр., температура и влажност). Овие промени во однесувањето се изразуваат како промени во својствата, како што се проточност, кохезија, тенденција кон агломерација - и многу повеќе. Овие вообичаено несакани ефекти може да бидат проблематични кога, на пример, ексципиенсот и активните фармацевтски состојки се одделуваат или сегрегираат. Оваа промена на својствата на прашокот може да претставува предизвик за време на обработката и полнењето.

Одредувањето на реолошките својства на прашокот под различни влијанија од температура/влага овозможува карактеризација на протокот и механичкото однесување на фармацевтските прашоци. Разбирањето за својствата на протокот играат улога во ефикасноста, транспортот, обработката и мешањето на прашокот.

3.2.3.6. Пакување и таблетирање

Цврстата густина е важна особина на фармацевтските прашоци – лекови или ексципиенси. Балк и густината по тапкање се поврзани со својствата на проточноста на прашокот. Проточноста на прашокот, особено на адитивите или ексципиенсите, е важна во одредувањето како тој додаток ќе влијае на процесот на гранулација или таблетирање. Добрата проточност осигурува дека има соодветно, еднолично полнење на капсулите, а со тоа се постигнува конзистентна тежина и доза. Одредувањето на порозноста на таблетите е од клучно значење за разбирање на многу различни својства, вклучувајќи ја јачината и рокот на траење. Порозноста е исто така важна за спречување на фрактура на ексципиентот за време на компресија на таблетата. Споменавме претходно дека мерења на гасната пикнометрија обезбедуваат податоци за скелетната густина што ни овозможуваат да ги процените информациите за проточноста на прашокот/гранулатот и порозноста на таблетот.

3.2.3.7. Чистота, стабилност и процентуална кристалност

Од клучен интерес е долготрајната стабилност на фармацевтските прашоци и условите за складирање и пакувањето што влијаат на стабилноста на таквите прашоци. Методот, како што е дифракција на рендгенски зраци (XRD), може да се користи за анализа на прашоци за ефекти на стареење кои го менуваат степенот на кристалност (односот помеѓу аморфните делови и кристалните фази) или создаваат други структурни промени. Тие значително ќе се променат со текот на времето и со условите за складирање на прашокот. XRD дава суштински увид во стареењето, стабилноста, соодветното пакување и оптималните услови за складирање. Кристалната структура на која било активна фармацевтска состојка (API) ја одредува стабилноста на производот, растворливоста и, на крајот, биорасположливоста. XRD е стандарден метод за идентификација на кристални фази и спроведување полиморфен скрининг на API за да се разберат формите присутни во прав.

4. ОНЕЧИСТУВАЊА НА АКТИВНИ СУПСТАНЦИИ И НА ГОТОВИ ФАРМАЦЕВТСКИ ПРОИЗВОДИ

Аналитичарите имаат индиректна, но многу важна улога во креирањето ефикасна терапија на новите фармацевтски производи со давање аналитичка поддршка во синтетските, биотехнолошките, фармаколошките, фармацевтско-технолошките, клиничките и други истражувања. Крајната цел на аналитичката активност во фармацевтската индустрија е обезбедување висок квалитет на готовите производи при нивна терапевтска употреба. Целта е да се пронајде најефикасна активна супстанција и нејзина соодветна дозирана форма. Безбедноста на терапијата со готовиот фармацевтски производ се дефинира преку два главни фактора:

- Фармаколошко-токсиколошкиот профил на активната супстанција, т.е. односот на корисни и несакани ефекти од активната супстанција врз човековиот организам;
- Несакани ефекти предизвикани од онечистувања присутни во активната супстанција и готовиот фармацевтски производ.

Како што е дефинирано од страна на ИСН водичите, онечистување претставува „секоја компонента што не е хемиски дефинирана како активна супстанција или ексципиенс во готовиот производ“.

Дефиницијата за профил на онечистувања во основа е иста и дава „опис на идентификувани и неидентификувани онечистувања присутни во готовиот фармацевтски производ“. Под оваа дефиниција генерално се опфатени група аналитички активности чија цел е откривање, идентификување, структурна карактеризација и квантитативно определување на органски и неоргански онечистувања, како и определување на резидуалните растворувачи во активната супстанција и готовиот производ.

Најдобар начин да се опише квалитетот на готовиот производ е да се утврди неговиот профил на онечистувања. Во периодот кога хроматографските техники сè уште не биле достапни, карактеризацијата на онечистувањата се вршела врз основа на определување на содржината на активната супстанција со неспецифични титриметриски и спектрофотометриски методи, поткрепени со определување на физичко-хемиски константи и некои лимит-тестови за познати онечистувања (обоени реакции). Како последица на брзиот развој на аналитичката технологија, посебно на хроматографските техники, во последниве неколку децении се создадени целосно нови можности за потполно определување на профилот на онечистувања на појдовните суровини и готовите производи. Следењето на процесот на производство води до значајни сознанија за карактеризација на присутните онечистувања. Чистотата на крајниот производ зависи и од контролата на појдовните суровини во процесот на производство на готовиот производ: помошни супстанции и активни фармацевтски супстанции. Најголем предизвик, и воедно најтешка задача на фармацевтската индустрија и регулаторните органи, е воспоставувањето граници за дозволено присуство на онечистувањата во активната супстанција и готовиот производ, особено кога станува збор за токсични и потенцијално токсични онечистувања.

4.1. Онечистувања во активни супстанции

Евалуацијата на онечистувањата кај новите активни супстанции се врши од два аспекти:

- *Хемиски аспект*, кој вклучува класификација на онечистувањата, извештај за нивното потекло, набројување/назначување на онечистувањата во спецификациите за квалитет;
- *Безбедносен аспект*, кој вклучува конкретни насоки за квалификација на онечистувањата во сериите на нова активна супстанција што се користат во клиничките студии.

4.1.1. Евалуација на активна супстанција

Потенцијалните онечистувања кои би потекнувале од хемиските реакции вклучени во синтезата, како и деградационите продукти што можат да се појават во текот на чувањето на активната супстанција најчесто се опишани во документацијата (*Drug Master File, DMF*) од производителот на активната супстанција (Housepain, 1996). Во DMF-то посебно внимание треба да се посвети при евалуација на следните поглавја:

3.2.S.2 *Manufacture*;

3.2.S.3 *Characterization*;

3.2.S.4.1 *Control of drug substance – specification*;

3.2.S.4.2 *Control of drug substance – analytical procedures*;

3.2.S.7 *Stability*.

Паралелно со документацијата за активната супстанција од производителот, се евалуира и монографијата за активната супстанција во фармакопеите, доколку е присутна.

Производителите на активните супстанции како предуслов за задоволување на квалитетот треба да поседуваат сертификат на соодветност со Европската фармакопеја (*Certificate of suitability of Monographs of the European Pharmacopoeia, CEP*). Со овој сертификат се потврдува дека квалитетот на избраната активна супстанција одговара на критериумите за квалитет декларирани во монографијата на Европската фармакопеја. Доколку постојат дополнителни тестови кои ги декларира производителот, а се разликуваат од фармакопејските, истите се наведени во CEP-от и мора да се земат предвид при аналитичка евалуација на квалитетот на активната супстанција. ICH на оваа тема посветува големо внимание и декларира соодветни водичи за онечистувања.

4.1.2. Класификација на онечистувањата на активните супстанции

Онечистувањата можат да се класифицираат во следниве категории:

- Органски онечистувања;
- Неоргански онечистувања;
- Резидуални растворувачи.

4.1.2.1. Органски онечистувања

Органските онечистувања можат да бидат:

- Познати онечистувања: се очекува да бидат присутни;
- Потенцијални онечистувања: може да се појават во текот на синтезата, процесот на прочистување или за време на рокот на траење на активната супстанција, и истите можат да бидат непознати по структура.

Важна препорака дава ICH Q3A(R2) водичот, каде се прикажани дозволените прагови на известување, идентификација и квалификација на онечистувањата кај нова активна супстанција (ICH Q3A(R2), 2006). Дозволени прагови за онечистувања во нова активна супстанција се дадени во Табела 1.

Табела 1. Дозволени прагови за онечистувања во нова активна супстанција (ICH Q3A(R2), 2006)

Максимална дневна доза	Праг на известување	Праг на идентификација	Праг на квантификација
≤ 2 g/ден	0,05%	0,10% или 1,0 mg/ден (кое е пониско)	0,15% или 1,0 mg/ден (кое е пониско)
> 2 g/ден	0,03%	0,05%	0,05%

Сите онечистувања на ниво поголемо од прагот на известување (*reporting threshold*) треба да се пријават, да се одредат со приложената аналитичка постапка и

да се пресметаат во вкупните онечистувања. Онечистувањата што се поединечно наведени и лимитирани со специфичен критериум на прифаќање во спецификацијата на активната супстанција се нарекуваат специфицирани онечистувања (*specified impurities*) и можат да бидат:

- Идентификувани (структурно карактеризирани);
- Неидентификувани (дефинирани само со квалитативно аналитичко својство, како, на пример, хроматографско ретенционо време) (European Pharmacopoeia Commission, 2023).

Монографиите на органските супстанции вообичаено содржат тест под наслов „Сродни супстанции“, наменет за контрола на органските онечистувања. Монографијата на органски супстанции содржи транспарентна листа на сите специфицирани онечистувања опфатени со монографијата. Дополнително, може да биде корисно ако се вклучат информации за другите детектибилни онечистувања (онечистувања за кои е познато дека може да бидат детектирани со пропишаните тестови во монографијата, но за кои не се знае дали се појавуваат во тековните произведени серии над прагот на идентификација) (European Pharmacopoeia Commission, 2023).

Транспарентната листа ја дава хемиската номенклатура на секое онечистување. Онечистувањата се означени со големи латински букви (A, B, C, D итн.). Тривијалните имиња дадени во заграда може да бидат вклучени во ретки случаи кога се смета дека се потребни како информација. Ако е дадена и хемиската структура, во тој случај онечистувањата се претставени на сличен начин како активната супстанција, за да биде јасно дека се структурно слични (European Pharmacopoeia Commission, 2023).

4.1.2.2. Неоргански онечистувања

Неорганските онечистувања може да резултираат од процесот на производство и вообичаено се познати и идентификувани. Постојат повеќе извори за неорганските онечистувања во активната супстанција, како што се: реагенси, лиганди и катализатори користени за време на синтеза на активната супстанција и ексципиенсите; тешки метали или други резидуални метали, неоргански соли и останати материјали што се користат во производниот процес, производната опрема и цевките (филтер помагала и филтри, јаглен и друго), балк пакувањето, околината, растворувачите за чистење итн. Вообичаено, неорганските онечистувања се детектираат и квантифицираат со примена на фармакопејски или други соодветни аналитички постапки. Критериумите за прифатливост треба да се базираат на фармакопејски стандарди или други познати податоци за сигурноста.

Фармакопејски лимит-тест за определување на неоргански онечистувања претставува полуквантитативно определување, односно определување на максималното дозволено количество на поедини онечистувања (ppm). Принципот е врз основа на споредување на интензитетот на бојата или заматувањето (настанати како резултат на хемиска реакција) помеѓу испитуваниот раствор и стандарден раствор со точно позната концентрација од онечистувањето. Хемиските реакции што се применуваат при испитување на степенот на чистота треба да бидат специфични и осетливи. Со примена на хемиски реакции при испитување на степенот на чистота може да се утврди присуство на:

- Одредено онечистување;
- Едно онечистување од групата сродни онечистувања (бакар од групата на тешки метали);
- Повеќе сродни онечистувања (тешки метали).

Најновите барања дефинирани во ICH Q3D водичот ги потенцираат ограничувањата на досегашниот метод за определување тешки метали (лимит-тест). Новите барања и методологии даваат проширување на листата на аналити, намалување на максималните дозволени лимити на изложеност, притоа водејќи сметка

за начинот на изложување. Исто така, се воведува употреба на модерни инструментални техники (ICP-OES, ICP-MS), сè со цел да се обезбедат точни определувања на концентрацијата на поединечни аналитички компоненти.

4.1.2.3. Резидуални растворувачи

Резидуалните растворувачи претставуваат органски испарливи хемикалии што се користат или се добиени во процесот на производство на активната супстанција, помошните супстанции или во подготовка на готовиот фармацевтски производ. Изборот на соодветен растворувач претставува критичен параметар во процесот на синтеза на активната супстанција, бидејќи растворувачите може да го зголемат приносот или да влијаат на некои својства на активната супстанција, како што се: кристална форма, чистота и растворливост. Резидуалните растворувачи треба да бидат отстранети до тој степен за да бидат задоволени спецификациите, добрата производна пракса и другите барања за квалитет.

Определувањето на резидуалните растворувачи во активните супстанции, помошните супстанции и готовите фармацевтски производи се врши со гасна хроматографија и со други неспецифични методи, како што се губиток при сушење или термални гравиметриски анализи.

Гасната хроматографија претставува метод од избор за разделување на растворувачите едни од други, како и нивно разделување од другите компоненти во примерокот со што е овозможена нивна идентификација и определување.

Губитокот при сушење вклучува определување на количеството испарливи компоненти што се ослободуваат од примерокот под одредени специфични услови (температура или вакуум).

Термалните гравиметриски анализи вклучуваат мерење на губитокот на испарливи компоненти од примерокот за анализа со примена на температурен градиент.

Предност на неспецифичните методи е во тоа што даваат брза проценка на содржината на испарливи компоненти во примерокот, а, од друга страна, пак, недостаток е тоа што не можат да ги определат испарливите компоненти што се вградени во кристалната структура на соединението. Испитувањето на резидуални растворувачи во активни супстанции, помошни супстанции и готови фармацевтски производи се врши во случаи кога е познато дека процесот на производство или прочистувањето ќе резултира со присуство на вакви растворувачи. Неопходно е испитување само на оние растворувачи што притоа се користени. Кумулативен метод се користи за пресметување на нивото на резидуални растворувачи во готовиот производ од количините на резидуалните растворувачи во компонентите употребени за неговото производство. Кај готовиот фармацевтски производ треба да се испитуваат резидуални растворувачи доколку тие се користат во тек на неговото производство, односно ако резултатите од пресметката се:

- Во дозволените граници или помалку: не е неопходно испитување на резидуални растворувачи;
- Над дозволените граници: неопходно е да се утврди дали со промени во процесот е намалено нивото на растворувачите до прифатливи граници.

Поделба на резидуалните растворувачи:

- **Класа I – Растворувачи што треба да се избегнуваат**

Во оваа група спаѓаат растворувачи што не треба да се употребуваат во производството на активната супстанција, помошните супстанции и готовиот фармацевтски производ поради нивната неприфатлива токсичност, канцерогеност или штетно влијание на човековата околина. Доколку нивната употреба е неизбежна, со цел да се произведе фармацевтски производ со значителна предност во терапевтската активност, тогаш нивното присуство треба да биде во дозволените граници.

Примери: бензен 2 ppm – канцероген; јаглен тетрахлорид 4 ppm; 1,2-дихлороетан 5 ppm; 1,1,1-трихлоретан (штетно влијание на човековата околина 1500 ppm) и др.

– **Класа II – Растворувачи чија употреба треба да биде ограничена**

Тука спаѓаат растворувачи што се негенотоксични канцерогени и можни причинители на иреверзибилна (невротоксичност и тератогеност) и реверзибилна токсичност.

Примери: ацетонитрил 410 ppm; хлороформ 60 ppm; метанол 3000 ppm; пиридин 200 ppm; толуен 890 ppm; циклохексан 3880 ppm; хексан 290 ppm и др.

– **Класа III – Растворувачи со низок токсичен потенцијал**

Растворувачите од оваа група се малку токсични и со мал ризик за човековото здравје доколку се присутни во дозволените граници (≤ 5000 ppm).

Примери: оцетна киселина; ацетон; анизол; 1-бутанол; 2-бутанол; етанол; мравја киселина; етил ацетат и др.

Неспецифични методи може да се користат за испитување на резидуалните растворувачи од Класа III.

– **Растворувачи за кои не постојат соодветни токсиколошки податоци**

Производителите треба да го оправдуваат присуството на остатоци од овие растворувачи во фармацевтските препарати.

Примери: изооктан; изопропилетер; 1,1-диетоксипропан; 1,1-диметоксиметан; 2,2-диметоксипропан.

4.1.2.4. Полиморфни форми

Некои активни супстанции постојат во различни кристални форми што се разликуваат по своите физички својства. Полиморфизмот може да вклучи и продукти на солватација или хидратација (познато како псевдополиморфизам) и аморфни форми.

Соодветната кристална состојба на активната супстанција треба да биде специфицирана во случаи каде што постои разлика во физичките својства на полиморфните форми и овие разлики влијаат на дејството, биорасположливоста или стабилноста на производот. Зависно од тоа дали присуството на полиморфните форми на активната супстанција ќе влијае на својствата на самата активна супстанција или ќе влијае и на квалитетот и дејството на готовиот фармацевтски производ, треба да се воспостават критериуми за следење на полиморфните форми во рокот на употреба на фармацевтскиот производ и да се воспостават дозволените граници за нивно присуство, со што ќе се обезбеди безбедност и ефикасност на препаратот во рокот на употреба.

За определување на присуство на повеќе форми на активната супстанција се користат физичко-хемиски мерења и техники, како што се: определување на температурата на топење, инфрацрвена спектроскопија (IR), рендгенска (X-зраци) дифракција, термални анализи, Раманова спектроскопија, оптичка микроскопија и нуклеарно-магнетна резонанца (NMR).

4.1.2.5. Енантиомери

Голем број активни супстанции се органски молекули што содржат хирални центри. Нивните енантиомери може да се со различен терапевтски ефект.

На пример, L-тироксин (хипотироидизам); D-тироксин (антихолестеремик).

Во случаи кога активната супстанција е еден енантиомер, контролата на другите енантиомери е потребна како и за секое друго онечистување. Тестовите за идентификација треба да овозможат да се направи разлика помеѓу енантиомерите и рацемската смеса. Определувањето на содржината на активната супстанција треба да биде енантиоселективно. Определување на енантиомерните онечистувања може да се врши со методот за определување на содржината на активната компонента или со друг различен метод.

Разделувањето на енантиомерите може да се врши со:

- Директно разделување со примена на хирална стационарна фаза: течна хроматографија;
- Индиректно разделување на енантиомерите со додавање хирален селектор во мобилната фаза и формирање дијастереоизомерни деривати *in situ*: капиларна електрофореза;
- Индиректно разделување на енантиомерите преку дијастереоизомерни деривати, со разделување на нехирален хроматографски систем: гасна хроматографија.

Хроматографијата и електрофорезата претставуваат техники од избор за разделување на енантиомери.

4.1.3. Спецификација за квалитет на активната супстанција

Листа на деградациони продукти што се очекува да се појават за време на производниот процес и под предложените услови на чување. Онечистувањата што се поединечно наведени и лимитирани со специфичен критериум на прифаќање во спецификацијата на активната супстанција се нарекуваат специфицирани онечистувања и можат да бидат:

- Идентификувани (структурно карактеризирани);
- Неидентификувани (дефинирани само со квалитативно аналитичко својство – хроматографско ретенционо време);
- Органски онечистувања:
 - Поединечно специфицирано идентификувано онечистување;
 - Поединечно специфицирано неидентификувано онечистување;
 - Секое неспецифицирано онечистување;
 - Вкупни онечистувања;
- Неоргански онечистувања;
- Резидуални растворувачи.

За предвидување на онечистувањата што ќе се појават во активната супстанција може да послужат студиите за стабилност, студиите за хемиски развој и рутинските анализи на произведените серии (Ahuja, 1998; Görög, 2000). Изборот на онечистувања што ќе бидат вклучени во спецификацијата на активната супстанција треба да се базира на податоците за онечистувањата добиени од испитувањата на сериите произведени со предложениот процес на производство.

4.2. Онечистувања во готов фармaceutски производ

Определувањето на чистотата кај готовите фармaceutски производи е во суштина определување на деградационите продукти на препаратот што можат да се појават во тек на производниот процес или чувањето на готовиот фармaceutски производ (Ahuja, 1998). Деградационен продукт настанува како резултат на хемиска промена на активната супстанција со текот на времето, предизвикана од температура, светлина, рН, вода или од реакција со ексципиенсот и/или контактното пакување и системот за затворање.

4.2.1. Идентификација на онечистувања

Во развојот на нов фармaceutски производ знаењето за деградационите продукти треба да биде засновано на научни сознанија за потенцијалните патишта на деградација и онечистувањата што потекнуваат од интеракција со помошните супстанции и/или контактното пакување (Görög, 2000). Треба да се изработат лабораториски форсирани студии спроведени со цел откривање на начинот на формирање на деградационите продукти во готовиот фармaceutски производ. Квантитативно определување на содржината на онечистувањата се врши преку:

– **Метод на надворешен стандард**

Како надворешен стандард најчесто се користи разредувањето од пробниот раствор/супстанцијата што се испитува, освен ако постои голема разлика во одговорот на детекторот за специфицираното (или по исклучок за неспецифицираното) онечистување во однос на одговорот за испитуваната супстанција. Во тој случај е неопходна употреба на специфичен надворешен стандард, а како таков може да се користи: раствор од онечистувањето (препорачано решение) и раствор на испитуваната супстанција што содржи познато количество онечистување.

– **Постапка на нормализација**

Може да се користи и самата активна супстанција како стандард за да се определи нивото на онечистувања (поединечно или вкупно) преку споредба на аналитичкиот одговор од онечистувањето со одговорот од самата активна супстанција.

При квантитативното определување со постапка на нормализација на површините на пиковите потребно е сите растворени супстанции да бидат елуирани и детектирани, по можност со воедначени фактори на одговор, при што одговорот на детекторот треба да биде линеарен со концентрациите што се користат.

4.2.2. Известување и контрола на онечистувањата

Известувањето и контролата на продуктите на деградација се обезбедува преку детален приказ на сите деградациони продукти што се појавиле како во текот на производниот процес така и за време на студиите на стабилност.

Секој деградационен продукт забележан во студијата на стабилност спроведена на предложените услови на чување треба да се идентификува кога е присутен на ниво поголемо (>) од прагот на идентификација. Деградационите продукти присутни на ниво помало (≤) од прагот на идентификација не треба да бидат идентификувани.

Табела 2. Прагови на известување (ICH Q3B(R2), 2006)

Максимална дневна доза	Праг
≤ 1 g	0,1%
> 1 g	0,05%

Табела 3. Прагови на идентификација (ICH Q3B(R2), 2006)

Максимална дневна доза	Праг
< 1 mg	1,0% или 5 µg TDI, кое е пониско
1 mg – 10 mg	0,5% или 20 µg TDI, кое е пониско
> 10 mg – 2 g	0,2% или 2 mg TDI, кое е пониско
> 2 g	0,10%

TDI: Total daily intake – Вкупна дневна доза

Табела 4. Прагови на квалификација (ICH Q3B(R2), 2006)

Максимална дневна доза	Праг
< 10 mg	1,0% или 50 µg TDI, кое е пониско
10 mg – 100 mg	0,5% или 200 µg TDI, кое е пониско
> 100 mg – 2 g	0,2% или 3 mg TDI, кое е пониско
> 2 g	0,15%

TDI: Total daily intake – Вкупна дневна доза

За подобра контрола на онечистувањата, стратегијата на развојот треба да ги вклучува најновите инструментални методи за оваа намена, односно методите што се развиваат да бидат LC-MS компатибилни. Регистрационото досие треба да содржи документиран доказ дека аналитичките постапки се соодветни за идентификација и квантификација на деградационите продукти. Аналитичката постапка треба да биде валидирана и да ја демонстрира специфичноста кон специфицираните и неспецифицираните продукти на деградација. Сето тоа треба да биде поткрепено со

результати од изведени форсирани студии на деградација што вклучуваат изложување на примерокот на светлина, топлина, влага, хидролиза со киселина/база и оксидација. Секој деградационен продукт и вкупните продукти на деградација присутни во сериите на новиот готов производ на ниво поголемо од прагот на известување ($>$) (*reporting threshold*) треба да бидат евалуирани со соодветна специфична аналитичка постапка.

Приказот на резултатите на онечистувањата, т.е. на децималните места зависи од прагот на известување (*reporting threshold*). Ако прагот на известување изнесува 0,1%, тоа значи дека пријавувањето на онечистувањата ќе биде до прва децимала.

Важни препораки согласно ICH Q3B(R2):

- Лимитот на квантификација на аналитичката постапка не треба да биде поголем од прагот на известување (*reporting threshold*);
- Секој критериум на прифатливост треба да биде воспоставен на ниво не повисоко од прагот на квантификација на дадениот деградационен продукт;
- Индивидуалните критериуми на прифаќање мора да бидат дефинирани за сите онечистувања кои можат да бидат присутни над прагот на идентификација;
- Сите онечистувања со критериум на прифаќање над прагот на идентификација треба да се идентификуваат;
- Сите онечистувања со прифатлив критериум над прагот на квалификација треба да бидат квалификувани (ICH Q3B(R2), 2006).

4.2.3. Спецификација за квалитет на готов фармацевтски производ

Спецификацијата за готов фармацевтски производ треба да содржи листа на деградациони продукти што се очекува да се појават за време на производниот процес и под предложените услови на чување. Поединечните продукти на деградација што со специфичен критериум на прифатливост се вклучени во спецификацијата на готовиот фармацевтски производ се наведени како специфицирани деградациони продукти.

Специфицираните продукти на деградација можат да бидат идентификувани или неидентификувани. Специфицираните идентификувани деградациони продукти треба да бидат вклучени заедно со специфицираните неидентификувани деградациони продукти што се очекува да бидат присутни на ниво поголемо од ($>$) прагот на идентификација.

При поставување на границите на прифатливост за неидентификуваните деградациони продукти сите аналитичките сознанија и податоци од референтната литература се приложуваат и треба да бидат во прилог на оправдувањето на поставените граници на прифатливост. Границата на прифатливост за секој неспецифициран деградационен продукт не треба да го надминува прагот на идентификација.

Во предложената спецификација треба јасно да се воспостават и дефинираат границите на прифатливост за вкупните деградациони продукти. Спецификацијата на новиот готов производ, во однос на онечистувањата, треба да содржи:

- Секој специфициран идентификуван деградационен продукт;
- Секој специфициран неидентификуван деградационен продукт;
- Секој неспецифициран деградационен продукт со прифатлив критериум не повеќе од (\leq) прагот на идентификација;
- Вкупни деградациони продукти.

4.2.4. Корекции при квантитативно определување на онечистувањата

Релативното време на задржување (*Relative Response Factor, RRF*) претставува аналитички параметар кој се користи во хроматографските постапки за контрола на онечистувањата во активната супстанција и готовиот производ. RRF се користи за да се коригира разликата во одговорот од детекторот за онечистувањето со одговорот од детекторот за активната супстанција. RRF се определува преку наклонот добиен од линеарниот опсег на анализираните раствори. Различните фармакопеи даваат различна терминологија за RRF:

- USP: RRF претставува однос на одговорите на еднакви количини на онечистувањето и активната супстанција. Покрај RRF, како терминологија во USP може да се сретне и фактор на корекција (*Correction factor*, CF) или фактор на одговор (*Response factor*, RF);
- Ph. Eur.: RRF е исто што и RF, со што се изразува чувствителноста на детекторот за дадена супстанција во однос на стандардот. Додека, пак, фактор на корекција (*Correction factor*, CF) е реципрочна вредност на факторот на одговор (*Response factor*, RF);
- BP: RF е релативен термин како одговор на еднакви маси на една супстанција во однос на друга под исти хроматографски услови. Според BP, RF е исто што и RRF.

$$RF = \frac{\text{Површина под пик (Peak Area)}}{\text{Концентрација (mg/mL)}} \quad [1]$$

$$RRF = \frac{RF \text{ на онечистувањето}}{RF \text{ на активната супстанција}} \quad [2]$$

$$CF = \frac{1}{RF} \quad [3]$$

4.3. Студии на форсирана деградација

За да се предвиди стабилноста на активната супстанција, а оттаму и стабилноста на готовиот производ, се изведуваат форсирани студии на деградација. Добиените информации од изведените форсирани студии на деградација и проучувањето на кинетиката на деградација даваат насока за очекувањата при поставувањето на готовиот производ на долготрајни, забрзани или интермедиерни услови на чување, како и дизајнирање методи кои ќе укажуваат на стабилноста (*Stability Indicating Method, SIM*) (Ngwa, 2010). Добиените резултати влијаат на процесот на пакување, понатамошниот развој и дефинирање на рокот на употреба и условите на чување.

Цели на форсирани студии на деградација се:

- Да се воспостават патишта на деградација на активната супстанција и на готовиот производ;
- Да се направи разлика помеѓу деградационите производи кои се поврзани со API и оние кои се формираат при процес на некоја интеракција во самата формулација;
- Да се објасни структурата на деградационите производи;
- Да се утврди внатрешната стабилност на API во формулацијата;
- Да се открие механизмот на деградација, како, на пример, дали станува збор за хидролиза, оксидација, термолиза или фотолиза на API или готовиот производ;
- Да се воспостави стабилност на природата на молекулата која се покажува преку добро развиен метод;
- Да се разберат хемиските својства на молекулата на API;
- Да се генерираат постабилни формулации;
- Да се произведе профил на деградација којшто може да биде забележан во формална студија за стабилност;
- Да се решат проблемите поврзани со стабилноста/нестабилноста на молекулата.

Едно од најпоставуваните и дискутираните прашања на секој фармацевтски аналитичар е колкава деградација е потребно да се предизвика? Деградација на активната супстанција помеѓу 5-20% се смета за прифатлива при валидација на хроматографските услови на аналитичката метода (Ngwa, 2010). Други препораки се дека за мали молекули деградација од 10% се смета за оптимална или, од друга страна,

спајкувањето на активната супстанција со мешавина од познати деградациони онечистувања е оправдана при воспоставување и мониторинг на стабилноста на готовиот производ. Не мора да значи дека изведената форсирана деградација би резултирала со формирање деградациони производи во готовиот производ.

Од друга страна, студијата може да се прекине ако нема деградација во активната супстанција или во готовиот производ кој бил изложен на стрес услови наведени во протоколот на забрзаната стабилност. Ова е добар показател за стабилноста на самата молекула. Преголемо стреснување на примероците може да доведе до формирање секундарни деградациони производи кои реално не би се формирале и виделе во текот на стабилноста на производот. Исто така, премало или недоволно стреснување може да не доведе до создавање на деградационите производи. Протоколите по кои би се изведувала форсираната студија на деградација би се разликувале во зависност од различните матрикси, форми и концентрации

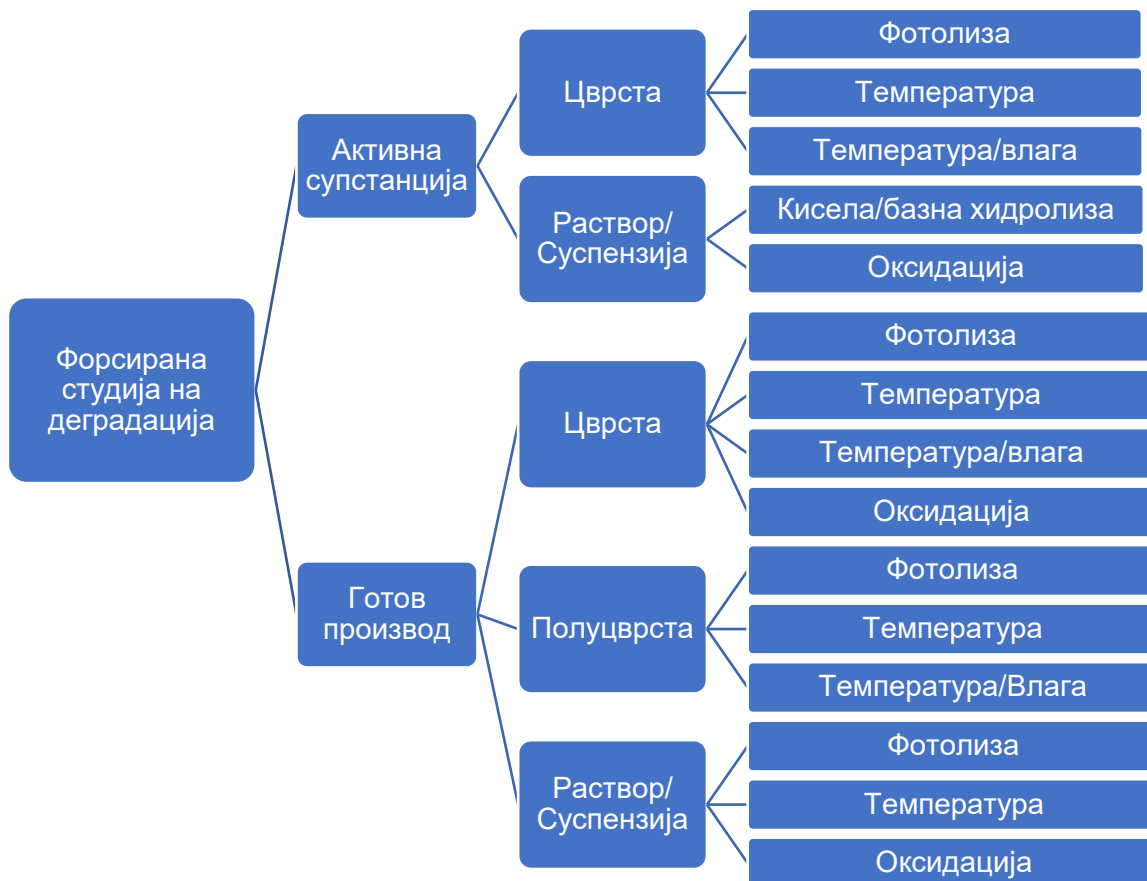
4.3.1. Регулаторни барања за форсирани студии на деградација

Форсираните студии обично се изведуваат на една серија на активната супстанција и готовиот производ. Условите на изведба на форсираните студии се поекстремни во однос на формалните забрзани студии на стабилност, како што се: температура $>50^{\circ}\text{C}$; релативна влажност $\geq 75\%$; поголема употребена светлина од условите дадени во ICH водичот Q1B (ICH Q1B, 1996); висока и ниска pH вредност, оксидација итн. Фотостабилноста треба да биде составен дел при дизајнот на форсираните студии на деградација. Деградационите производи кои не се формираат при формалните забрзани или долготрајни студии на стабилност не мора да се изолираат и структурно карактеризираат. Треба да се даде приказ за пресметка за баланс на маса, како и точните експериментални услови за форсираната студија на деградација, како што се температура, траење и степен на деградација, кои треба да бидат наведени. Експерименталниот дизајн и стратегија е поставен на научна проценка.

Во регулативите не е наведено во која работна концентрација треба да биде примерокот при изведба на форсираната студија на деградација. Препорака е примерокот да биде во концентрација од 1 mg/mL со цел детекција и на помали концентрации на формираните деградациони производи. Исто така, предлог е некои студии на деградација (на пр. студии на бинарни мешавини) да бидат изведени на примероци со концентрација која се очекува да биде презентирана во финалната формулација на готовиот производ (формулациски однос). Студиите на деградација можеби треба да бидат повторени кога доаѓа до промена во аналитичките методи или во формулацијата на готовиот производ по направена стручна проценка.

4.3.2. Експериментални услови при форсирани студии на деградација

Изборот на стрес условите треба да биде во согласност со природата на молекулата на активната компонента, нормалните услови на производство на самиот производ, чувањето и состојбите при транспорт. Предложени стрес услови кои мора да се направат при изведба на форсираните студии на деградација се: хидролиза со киселина и база, термална деградација, фотолиза, оксидација и може да вклучуваат циклуси на замрзнување – одмрзнување. Регуллативите не даваат насоки за кои pH вредности, колкава температура или кои оксидирачки агенси да се употребат. Дизајнот за изведба на фотолизата е во зависност од препораките кои ги предлага ICH Q1B водичот, каде што изворот на светлина треба да има комбинирано видливо и ултравиолетово зрачење (UV 320-400 nm) и времето на изложување треба да биде оправдано (ICH Q1B, 1996).



Слика 1. Стрес услови при форсирани студии на деградација (автор)

Во одредени студии се започнува со поекстремни услови на деградација, како на пример, термална деградација на 80°C, па дури и повисоки, во различни временски интервали (2, 5, 8, 24 часа итн.). Генерално, се започнува со помалку екстремни услови, и тоа на активната супстанција, со цел да се добијат сознанија за нејзината стабилност, па потоа се пристапува кон зголемување на условите на деградација. Услови кои најчесто се користат при почетна изведба на форсирана студија на деградација се дадени во Табела 5.

Табела 5. Услови кои најчесто се користат при почетна изведба на форсирана студија на деградација (автор)

Стрес услов	Експериментални услови	Услови на чување	Временски точки (денови)
Хидролиза	0,01 – 0,1N киселина/база	40°C, 60°C	1, 3, 5
Оксидација	0,3 – 3% H ₂ O ₂	40°C, 60°C	1, 3, 5
Фотолиза	ICH Q1B	/	/
Температура	Комора за температура	60°C, 80°C	1, 3, 5
Температура/Влажа	Комори за температура/влажност	30°C – 80°C и 60 – 90% RH	1, 3, 5

4.3.3. Баланс на маса (*Mass balance*)

Како доказ дека сите деградациони продукти се земени предвид при евалуацијата на податоците од студиите на стабилност, се пресметува баланс на масата (*Mass balance*).

Вообичаено, вредноста за баланс на маса е претставена како збир од процентот добиен за содржината на активната супстанција и збирот од процентот на деградационите производи, со цел да се види колку блиску сме до вредноста од 100% од почетното ниво. Балансот на масата, всушност го покажува опаѓањето на содржината на активна компонента за сметка на зголемување на деградационите продукти. Пресметката за балансот на масата е според следнава формула:

$$\text{Mass balance} = \frac{AS_x + M_{Dx}}{AS_0 + M_{D0}} \times 100\% \quad [4]$$

Каде:

- AS_0 – вредност за содржината на активната супстанција во нулта точка;
- AS_x – вредност за содржината на активната супстанција во единица време;
- M_{D0} – збирна вредност за содржината на онечистувањата во нулта точка;
- M_{Dx} – збирна вредност за содржината на онечистувањата во единица време.

Во зависност од прецизноста на аналитичкиот метод, дозволената варијација за балансот на масата е од 98% до 102%. Во случај ако не е задоволен овој критериум, потребно е да се даде објаснување за непостигнување на балансот на масата.

Табела 6. Најчести причини за непостигнување баланс на масата (автор)

Причина	Сценарио	Решение
<i>Несоодветен или непознат фактор на релативен одговор (RRF)</i>		
RRF помал од активната супстанција	Резултатот е помал од реалниот.	а) Точно да се определи RRF; б) Употреба на алтернативен детектор.
RRF поголем од активната супстанција	Резултатот е поголем од реалниот.	а) Точно да се определи RRF; б) Употреба на алтернативен детектор.
Нема одговор (на пример, уништен хромофор заради деградација)	Онечистувањето не е вклучено во резултатот.	а) Употреба на алтернативен детектор. б) Претпоставка врз основа на претходни познавања на патеката на деградација.
<i>Лошо извлекување (recovery) на онечистувањата или активната супстанција</i>		
Испарливост	Онечистувањето не е детектирано или е добиен нереално понизок резултат.	Примена на гасна хроматографија.
Нерастворливост	а) Активната супстанција не е доволно растворлива во избраниот растворувач; б) Онечистувањето не е доволно растворливо во избраниот растворувач (резултатот е помал од реалниот).	Промени во избор на растворувач – да се подобри растворливоста и начинот на обработка на примерокот.

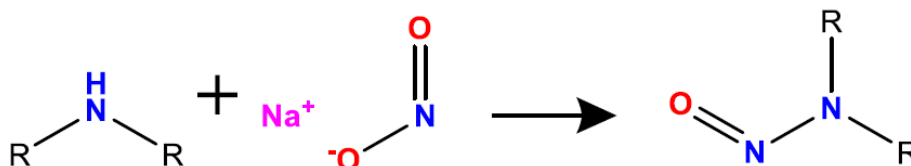
Ковалентно или нековалентно врзување за матриксот	Онечистувањето се врзува не/ковалентно со матриксот и/или не е детектирано или недоволно рапортирано.	Примена на поагресивни техники на обработка на примерокот, хомогенизација или сапонификација.
Нестабилност	а) Деградација во текот на подготовка; б) Апсорпција.	Примерокот се инјектира свеж/веднаш по подготовка или се употребува автосемплер со ладење.
<i>Непознат хемизам</i>		
Непознати онечистувања кои потекнуваат од ексципиенси или дифузна загуба преку примарното пакување	Огромни пикови кои не треба да се сметаат за онечистувања.	Студии за extractable/leachable, анализа на секој ексципиенс.
<i>Хроматографски проблеми</i>		
Премногу мали пикови кои не се интегрирани	Онечистувањата не се разликуваат од базната линија.	Треба да се зголеми концентрацијата на примерокот или примена на колона со помали честички.
Ширење на пикот (peak broadening)	Несоодветна интеграција заради проширување на пикот.	Употреба на „појака“ мобилна фаза.
Онечистувања кои коелуираат со главната компонента или меѓу себе	Несоодветна интеграција.	а) Анализа на чистота на пик (peak purity); б) Подобрување на резолуцијата преку промена на стационарната фаза, растворувач или градиент; в) Примена на ортогонални (различни) методи на сепрација.
Онечистувања кои не се детектирани	Резултатот е помал од реалниот.	а) Примена на PDA-UV (200-400 nm) за да се зголеми универзалноста, следење на одговорот при ниски бранови должини, употреба на UV-транспарентни растворувачи; б) Примена на алтернативни детектори.

Mass balance пристапот е корисна аналитичка алатка и претставува доказ дека методот кој се користи за определување сродни и деградациони продукти е доволно дискриминаторен за раздвојување на активната супстанција од деградационите продукти и доволно осетлив за да се детектираат и квантифицираат сите можни деградациони продукти, доказ дека користените методи се „stability indicating“, а исто така, овозможува лесно откривање на можните интеракции со ексципиенсите, како и полесно разбирање на алтернативните патишта на деградација.

4.4. Нитрозамински онечистувања

4.4.1. Главни причини за присуство на *N*-нитрозамини во медицинските производи и мерки за нивно ублажување

N-нитрозамините се појавуваат и се формираат во околината. Во воздухот тие се формираат главно со процеси на согорување, а во вода со биолошки процеси во трагови. Стратегиите за контрола се според принципите на толку ниско како разумно остварливо (*as low as reasonably achievable*, ALARA) или толку ниско колку што е разумно изводливо (*as low as reasonably practicable*, ALARP). Се смета дека концентрациите се повисоки во областите со помала контрола и каде што има високо загадување на воздухот и водата.



Слика 2. Формирање на *N*-нитрозамини (FDA, 2024)

Во прехранбените производи формирањето на *N*-нитрозамини главно се случува со реакција на нитрити и нитростабилни амини во месото, рибата и другите производи на повисоки температури. Формирањето и појавата покренала голема загриженост во седумдесеттите до деведесеттите години на минатиот век и беа преземени мерки за минимизирање на формирањето со намалување на употребата на нитрати и нитрити во производството на храна. Ова е прегледано од Европската управа за безбедност на храната (*European Food Safety Authority*, EFSA), која се повикува на различни истражувања кои заклучуваат дека изложеноста на испарливи *N*-нитрозамини (NDMA плус NDEA) преку преработеното месо како главен извор на целокупната надворешна изложеност е 0,2 ng/kg/ден кај доенчиња, до 3,5 ng/kg/ден кај мали деца. Необјавените податоци за реалните нивоа на нитрозамини во процесираниот храна ги анализираа *N*-нитрозодиметиламин (NDMA), *N*-нитрозодиетиламин (NDEA), NDIPA, NDPA, но открија само присуство на NDMA (и NPIP) на нивоа од 0,7 – 0,9 ppb или 14 – 17 ng/ден потрошувачка. Прописите за минимизирање на формирањето на *N*-нитрозамини во храната, пијалациите и пивото имаат за цел да ја намалат изложеноста и се засноваат на принципите на EFSA, 2017.

Во Германија контролните граници за NDMA во водата за пиење се 10 ng/L, додека во Калифорнија се 3 ng/L во вода за пиење, а Њу Џерси 0,7 ng/L за NDMA и 5 ng/L за NDPA во подземните води. Агенцијата за заштита на животната средина (EPA) има поставено здравствени референтни нивоа за: NMBA (30 ng/L), NDEA (0,4 ng/L), NDMA (0,6 ng/L), NDPA (7 ng/L), NMEA (3 ng/L) и NPYR (2 ng/L).

Кај производи добиени од технички процеси (на пр. пестициди, гума, пиво, козметика), нивото на *N*-нитрозамини е минимизирано според принципите на ALARA. Според Директивата 2009/48/ЕС за безбедност на играчки, нивоата на *N*-нитрозамини се ограничуваат на ≤ 10 µg/kg и нитрозо соединенија до ≤ 100 µg/kg во играчки направени со еластомери, кои потенцијално може да се внесат во устата. Во козметиката нивото на *N*-нитрозамини не треба да надминува 50 µg/kg. Водичите за проценка и контрола на ДНК реактивните (мутагени) онечистувања во ветеринарно-медицинските производи (EMA/CVMP/SWP/377245/2016) се однесуваат на мутагени со екстремно висока канцерогена моќ, т.е. слични на афлатоксин, *N*-нитрозо- и алкил-азокси структури. Во принцип, овие супстанции не треба да се појавуваат како онечистувања на API или готов производ поради нивната исклучително висока канцерогена моќ.

4.4.1.1. Основни причини за присуство и формирање на *N*-нитрозамини во хемиската синтеза на API

Првично, во јули 2018 година, беше активирана процедура (ЕМЕА/Н/А-31/1471) според член 31 од Директивата 2001/83/ЕЦ за сартани со тетразолен прстен што содржи производи (наречена „*Sartans Referral Procedure*“) за да се процени влијанието на *N*-нитрозаминското онечистување преку принципот бенефит-ризик на медицинскиот производ валсартан (CHMP, 2020). Стана јасно дека откриените нивоа на NDMA, и последователно други откриени *N*-нитрозамини, вклучувајќи NDEA, диизопроил-*N*-нитрозамин (DIPNA), етилизопропил-*N*-нитрозамин (EIPNA) и 4-(метил)нитрозо)амино)бутерна киселина (NMBA) ги надминале дефинираните граници дадени во ICH M7(R1) водичот за супстанции од „*cohort of concern*“, земајќи ја предвид дневната изложеност во текот на животот, наведена како „прифатлив внес“ (*acceptable intake*, AI). Постапката била продолжена во септември 2018 година за да ги опфати сите ЕУ овластени ангиотензин- II-рецептор антагонисти/блокатори, што поседуваат прстен на тетразол, т.е. кандесартан, ирбесартан, лосартан, олмесартан и валсартан (наречени „сартани“). На 31 јануари 2019 година, CHMP на ЕМА го заврши својот преглед на член 31, поставувајќи привремени ограничувања на API кои се применуваат во период на транзиција од две години и дефинирајќи построги долгорочни барања засновани на технички ограничувања (CHMP, 2020). Последователно на член 31, еден производител на API ги информираше властите на ЕУ и Европската дирекција за квалитет на лекови (EDQM) дека открил NDMA во некои серии од пиоглитазон API. Нивоата на NDMA во засегнатите серии на пиоглитазон биле под привремените граници поставени за сартани (врз основа на ICH M7(R1)), но сепак присуството на *N*-нитрозамин во не-сартан API придонесе за нов тек за развој на принципите. Како мерка на претпазливост EDQM направиле преглед на сите сертификати за соодветност на монографиите на апликациите во Европската фармакопеја (CEP) за оваа супстанција и во април 2019 година ЕМА и националните надлежни органи (NCAs) побараа од регистрирани производители за пиоглитазон, кои користеле одредени реагенси во нивните производни процеси, да ги проверуваат нивните процеси за да се исклучи присуството на *N*-нитрозамини. Во јули 2019 година EDQM добиле информации за нов *N*-нитрозамин, *N*-нитрозометилфениламин (NMPA) – во валсартан од друг производител на API. Нивоата откриени за производите во ЕУ/ЕЕА биле под лимитот ICH M7(R1) пресметан за NMPA врз основа на методологиите наведени од член 31. Во септември 2019 година, на барање на Европската комисија бил инициран преглед на член 31 за лекови што содржат ранитидин (ЕМЕА/Н/А-31/1491). По спроведените тестови, покажано е дека некои од овие производи содржат NDMA, како во API, така и во готови производи. Во голем број земји на ЕУ националните власти иницираа отповикување на лекови од ранитидин од аптеките.

4.4.1.2. Теоретски можни причини за појава на *N*-нитрозамини во фармацевтските производи поврзани со водата

Кога *N*-нитрозамините се присутни во суровините, постои ризик тие да се пренесат во готовите производи. Слично на тоа, ако нитритите се присутни во суровините, тие би можеле да реагираат со амини, присутни се во API, нивните прекурсори, реагенси и многу растворувачи за да формираат *N*-нитрозамини кои исто така би можеле да се пренесат во готови производи. NDMA може да се појави во водата за пиење бидејќи е нуспроизвод на неколку индустриски процеси и е загадувач од одредени пестициди. NDMA неодамна беше идентификуван како дезинфекциски нуспроизвод на хлораминирање (со реакција на монохлорамин со диметиламин, како компонента на водите добиени од испуштање на отпадните води) и, до одреден степен, хлорирање. NDMA, исто така, може да се формира како нуспроизвод при третман со анјонска размена на вода. Генерално, се отстранува при третман на вода со UV зрачење. Тековниот водич на СЗО „*Guidelines for drinking-water quality*“ (WHO/HSE/AMR/08.03/8; 4-то издание, кое го вклучува првиот додаток) дефинира граница за NDMA во водата за пиење од 0,1 µg/L, што е еквивалентно на 0,1 µg/kg = 0,1

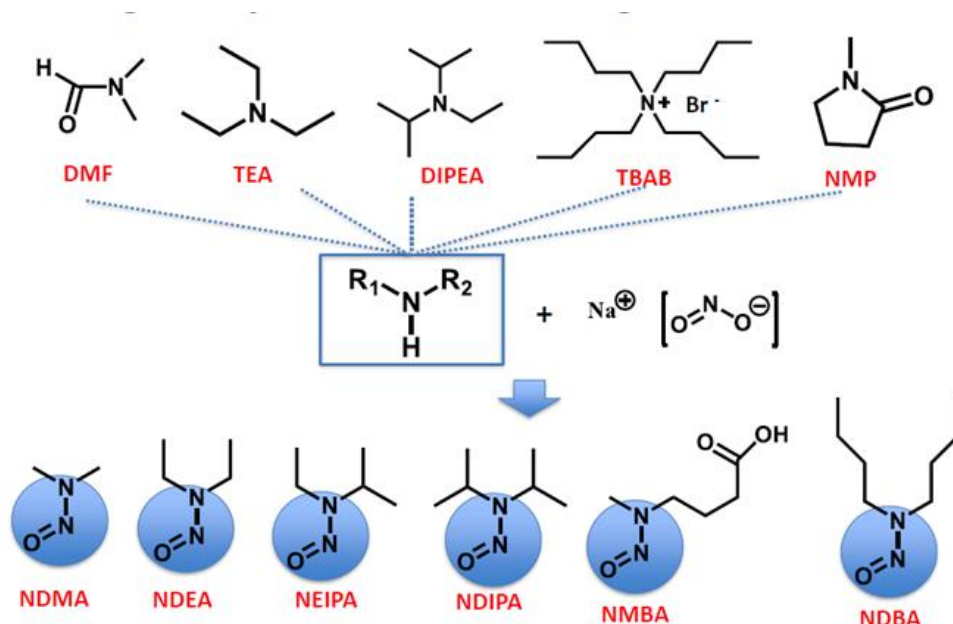
ng/g = 0,1 ppb во случај на $\rho = 1 \text{ kg/L}$, поради различни извори од околината. Максималните нивоа на концентрација на NDMA беа откриени во различни примероци на вода од Австралија и Кина; NDMA 75 ng/L еквивалентно на $< 75 \text{ ng/kg} = 0,075 \text{ ng/g} = 0,075 \text{ ppb}$. Растворливоста на NDMA во вода е висока (290 g/L на 20°C), но со оглед на севкупните ниски нивоа на кои се наоѓа во водата, се заклучува дека NDMA од вода многу веројатно не претставува реален извор за контаминација на NDMA на API. Сепак, процедурите за дезинфекција може да доведат до значително создавање на *N*-нитрозамин како нуспроизвод, во случај да се присутни одредени активни супстанции. Shen и сор. ја истражувале чувствителноста на 20 активни супстанции за формирање *N*-нитрозамин по изложување на вода дезинфицирана со хлорамин. Моларни приноси повисоки од 1% биле забележани за осум фармацевтски супстанции, при што ранитидин покажувал најсилен потенцијал за формирање на NDMA. И покрај понискиот моларен промет, слични резултати биле пријавени за ранитидин кога се третираше со вода дезинфицирана со озонирање. Нитрити се забележани во различни реагенси, често кога се користел натриум нитрит при нивната подготовка (на пример, натриум азид). Ова е уште еден пат по кој нитритите може ненамерно да се најдат во синтетички процес. Бидејќи азидите може да се осиромашат со нитрити, како што е наведено во случајот со сартан, релевантноста на оваа опсервација останува да се разјаснува.

4.4.1.3. Теоретски можни причини за појава на *N*-нитрозамини во фармацевтските производи поврзани со растворувачи, реагенси, катализатори

Во случај на сартани, растворувачите како диметилформаид (DMF), *N*-метилпиролидон (NMP) и триетиламин (TEA) претставуваат извори на амини како што се диметиламин (DMA), метилбутиламин (MBA) и диетиламин (DEA), подложни на *N*-формирање на нитрозамин. Дополнително, растворувачот/реагенсот TEA може да формира NDEA со нитрозативна делкилација. Врз основа на евалуација на достапните литературни информации било проценето (потенцијалното) присуство на секундарни/терциерни амини и NOX во растворувачите наведени во ICH Q3C (R7) водичот. Главниот исход е сумиран, како што следува: слично на DMF, диметилацетамидот се произведува во индустриски размери со реакција на диметиламин со оцетна киселина, оцетен анхидрид или ацетатни естри, што укажува на тоа дека диметиламин е очекувано онечистување. Поради високата структурна и функционална сличност, двата деривати на карбоксилна киселина поседуваат споредливи хемиски својства, на пр. ослободување на диметиламин при хидролиза. Заклучено е дека покрај DMF и NMP, растворувачот диметилацетамид претставува дополнителен извор на секундарни амини подложни на формирање на NDMA во комбинација со нитрозатирачки агенци. Растворувачот TEA често се користи како реагенс или растворувач во органската синтеза и производството на API. Според Spiegelhalder и сор. било откриено дека многу комерцијално достапни секундарни/терциерни амини се контаминирани со соодветните *N*-нитрозамини, покажувајќи дека нивоата се движат помеѓу 0,03 – 53,0 ppm. Највисока концентрација на *N*-нитрозамин е откриена во пиролидин (т.е. 53,0 ppm), додека 0,03 ppm NDEA биле пронајдени во TEA. Споредливи резултати биле пријавени една година подоцна од Bontoyan и сор. Релевантноста на овие резултати, откриени пред 40 години во секундарни и терциерни амини со непознат квалитет, во моментот се смета за непозната.

Катализаторите за пренос на фаза, TEA HCl и тетрабутиламониум бромид (TBAB) биле идентификувани како прекурсори на *N*-нитрозамини, како што се NDEA и *N*-нитрозодибутиламин (NDBA). Во основа, чувствителноста на солите на амониум да формираат *N*-нитрозамини била откриена без разјаснување на механизмот на реакција, како што е прикажано погоре. Имајќи предвид дека солите на квартерниот алкил амониум се добиени од соодветните секундарни и терциерни амини, овие прекурсори претставуваат потенцијални онечистувања, имајќи исто така потенцијал да реагираат со нитрозо реагенси. Врз основа на информациите од литературата, нитроалканите,

како што се 2-нитропропан и нитрометан, се користени за да дејствуваат како извор на азотна киселина во комбинација со одредени оксиданти/катализатори и да формираат *N*-нитрозамин во комбинација со секундарни и терциерни амини. Според S. V. Markovsky, растворувачот нитрометан обично се произведува на индустриско ниво со високотемпературна нитрација на пропан во пареа – пареа – фаза со азотна киселина, проследена со водена обработка и процедури за сушење пред да се одвојат со дестилација во фракциона колона. Следствено, контаминацијата на ниско ниво со азотна киселина и азотни оксиди итн. се чини дека е малку веројатна, но не може сама по себе да се исклучи. За време на синтезата на ранитидин, прекурсорот 1,1-бис(метилтио)-2-нитроетин се произведува со реакција на диметил-*N*-метилкарбонимидодитионат со нитрометан, пред да се вгради во супстанцијата за лековите на ранитидин. Откриено е дека некои серии на ранитидин HCl се значително контаминирани со NDMA.



Слика 3. Создадени потенцијални онечистувања од нитрозамин за време на синтезата на API (FDA, 2024)

4.4.1.4. Потврдени основни причини за појава на *N*-нитрозамини во медицинските производи во однос на ексципиенси и од примарно пакување

Нитрати и нитрити може да се најдат во многу ексципиенси. Натриум скроб гликолат, кроскармелоза натриум, претходно желатинизиран скроб, поливинилпиролидон (PVP), вкрстен поливинилпиролидон (cPVP) и лактоза се ексципиенси кои можат да носат траги на нитрати или нитрити онечистувања. Точните извори на овие онечистувања во трагови не се истражени, но можно е тие да доаѓаат од процесната вода, чекорите на обработка кои бараат титрација со киселина, белење и потенцијално од оксидација во воздухот додека ексципиенсот се загрева во процесот на сушење. Примени се некои извештаи за формирање *N*-нитрозамини во медицинските производи, кои сугерираат поврзаност со интеракцијата на API со нитрити во ексципиенсите, но не и со нитрати. Соодветно на тоа, оваа можност се смета за веројатна основна причина, што укажува на потребата да се иницира истражување, на пр. во соработка со академската заедница.

Во септември 2019 година била идентификувана нова основна причина за контаминација на медицински производи со NDMA/NDEA и истата била пријавена до регулаторните тела. Најверојатно NDMA/NDEA бил формиран за време на печатењето на фолиите за блистерите и формирањето на *N*-нитрозамини е предизвикано од

реакцијата на нитроцелулозата во фолијата со амин што содржи мастило за печатење [диметиламин (DMA) и диетиламин (DEA)] и се префрлува на готовиот производ за време на процесот на термичко запечатување преку испарување и кондензација на готовиот производ. Формирањето на *N*-нитрозамини е поврзано во овој случај со комбинација на критични соединенија (ССС), што се состои од истовремено присуство на секундарни/терциерни амини во мастилото за печатење и нитроцелулоза како средство за нитроза во фолијата на капакот за време на печатењето/пакувањето, што досега се сметало за веродостојно. Оваа основна причина може да се елиминира со замена на фолии за покривање базирани на нитроцелулоза со фолии за покривање без нитроцелулоза. Имајќи предвид дека нитроцелулозата претставува широко користен примарен материјал за пакување готови медицински производи, оваа основна причина треба да се истражи од страна на производителите за нивните медицински производи спакувани во блистери.

4.4.2. Аналитички техники за подобрување на чувствителноста при откривање нитрозамински онечистувања

Како одговор регулаторните власти ги повикуваат сите засегнати страни да извршат строга идентификација, известување за овие онечистувања и препорачуваат API и производителите на лекови да развијат високочувствителни аналитички методи, особено гасни и течни хроматографски методи способни за квантифицирање на нитрозамините со нивоа на долна граница на квантитативска вредност (LOQ). Ова е од суштинско значење за ефикасно откривање и квантификација на нивоата во трагови на овие онечистувања во суровините, посредниците во синтезата на лекови и готовите производи од лекови, на крајот обезбедувајќи ја безбедноста на фармацевтските производи за потрошувачите. Развојот на такви нови и чувствителни методи е предизвикувачка задача којашто бара значителна експертиза и истражувачко искуство. Кога станува збор за помалите молекуларни тежини, сложеноста во структурата и недостатокот на лесно достапни стандарди може да предизвикаат потешкотии во постигнувањето чувствителна детекција. Исто така, бара пристап до инструменти со висока цена, вклучувајќи течна хроматографија-тандем масена спектрометрија (LC-MS/MS) и гасна хроматографија-тандем масена спектрометрија (GC-MS/MS) (Gergov et al., 2003).

LC-MS/MS и GC-MS се широко користени во откривањето нитрозамини бидејќи тие нудат добра чувствителност со откривање на ниво на нанограми на нитрозамини. За откривање на ниво на трага на овие онечистувачи се претпочитаат анализаторите за Orbitrap и quadrupole (Q-TOF). Чувствителен аналитички метод треба да биде способен за квантифицирање на специфичните онечистувачи на нитрозамин во одредени матрици (API или лекови) до 10% од неговата прифатлива граница на внес за тоа конкретно онечистување на нитрозамин. Дополнително, потребна е сеопфатна анализа и проценка на ризикот од нитрозамини и воспоставување на стратегии уште во процесот на предформулација со цел да се ублажи инкорпорирањето на онечистувањатата од нитрозамин во фармацевтските производи.

Мора да се спроведе анализа на основните причини за изворите на инкорпорирање на нитрозамини доколку нитрозамините се пријавени во првичната анализа. Последователно, стратегиите за преформулирање мора да бидат дизајнирани за да се минимизира ризикот од формирање нитрозамини во фармацевтските производи. FDA препорачува вклучување антиоксиданси како аскорбинска киселина и α -токоферол, бидејќи тие покажаа потенцијал да го инхибираат создавањето на нитрозамини во човечкото тело. Дополнително, употребата на ексципиенси како натриум карбонат, кои создаваат базна рН средина *in vivo*, може да биде ефикасна стратегија за ублажување, бидејќи генерирањето на нитрозамини најчесто се јавува во кисела средина. Нитрозамините може да се инкорпорираат во лековите на повеќе начини, за време на процесот на синтеза во повеќе чекори на API, како и при складирање и транспорт на лековите производи. Во контекст на синтезата на API, лековите кои содржат ранливи амини се особено склони кон контаминација со

нитрозамин. Во такви случаи производителите на API треба да прифатат прецизен пристап при изборот на катализатори, реагенси и растворувачи за процесот на синтеза во повеќе чекори. За време на повеќестепената синтеза на API, инкорпорирањето на дополнителни чекори за прочистување може да биде ефективно во елиминирање на формирањето на нитрозамин. Се препорачува да се избегнуваат реагенси кои содржат примарен или секундарен амин и нитрозациони агенци и растворувачи за време на процесот на синтеза. При проценка на ризикот од контаминација со нитрозамин во лековите, треба да се земат предвид различни фактори, како pH, содржината на влага и дистрибуцијата на големината на честичките од формулацијата. Исто така, треба да се земат предвид карактеристиките на материјалот на примарните материјали за пакување на лекот и ексципиенсите што се користат во формулациите. На пример, изборот на материјал за или прајмер во фолијата за покривање, како што е нитроцелулозата, може да биде критичен. Нитроцелулозата може да дејствува како нитрозационен агенс кога е изложена на секундарни амини како диметиламин и диетиламин, кои може да бидат присутни во мастилото за печатење. За време на процесот на формирање на гнездата, кој обично се прави на покачени температури, кој било формиран нитрозамин може да испари и потенцијално да влезе во лекот. Условите на складирање исто така може да влијаат на формирањето на нитрозамини. На пример, нивоата на NDMA во ранитидин API и готовите производи може да се зголемат со зголемувањето на температурите на складирање. За да се ублажи ова, било предложено технологија за пакување за чистење кислород за да се спротивстави на автооксидацијата, можен механизам за формирање на NDMA во ранитидин хидрохлорид. Производителите треба да бидат внимателни при изборот на ексципиенси за нивните формулации, особено земајќи ги предвид нивоата на нитрити во ексципиенсите. Ова е особено важно кога лековитата супстанција и лекот содржат амини во нив. Дополнително, при проценката на ризикот од лековите производи треба да се земат предвид и еластомерните компоненти. Во контекст на складирањето на лекот, температурите на складирање треба внимателно да се проценат.

4.5. Елементарни (метални) онечистувања

Елементарните онечистувања во медицинските производи може да произлезат од неколку извори; тие можат да бидат резидуални катализатори кои биле намерно додадени во синтезата на API или може да бидат присутни како онечистувања (на пример, од интеракции со опремата за обработка или системи/контејнери за затворање или од интеракции со компонентите на лек производот). Бидејќи елементарните онечистувања не даваат никаква терапевтска корист за пациентот, нивните нивоа во лек производот треба да се контролираат во прифатливи граници. Оттука, потребно е евалуација на податоците за токсичност за потенцијални елементарни онечистувања; формирање дозволена дневна изложеност (*Permitted Daily Exposure, PDE*) за секој елемент за кој има наоди за токсиколошка загриженост; контрола на елементарните онечистувања во лек производите со примена на принципите засновани на ризик-пристапот. Од производителите на лек производите не се очекува да ги заострат ограничувањата засновани на способноста на процесот, под услов елементарните онечистувања во лек производите да не го надминуваат PDE. Утврдените PDE во ICH Q3D(R2) водичот се во корист за заштита на јавното здравје за сите популации на пациенти. Во некои случаи пониски нивоа на елементарни онечистувања може да бидат поставени кога се покажало дека нивото под праговите на токсичност има влијание врз другите атрибути на квалитетот на лек производот (на пример, разградување на API катализирано од елемент). Покрај тоа, за елементи со високи PDE-и, можеби ќе треба да се земат предвид други ограничувања од перспектива на фармацевтски квалитет и, друго, треба да се земе предвид и ICH Q3A водичот. ICH Q3D(R2) водичот го претставува процесот за проценка и контрола на елементарните онечистувања во лекот, каде што се користат принципите на управување со ризик, како што е опишано во ICH Q9 водичот (ICH Q9, 2005). Овој процес обезбедува платформа за развивање стратегија за контрола базирана на ризик со цел ограничување на елементарните онечистувања во лекот.

4.5.1. Оправдување на нивоата на елементарните онечистувања повисоки од воспоставените PDE

Нивоата на елементарните онечистувања повисоки од утврдениот PDE може да бидат прифатливи во одредени случаи. Овие случаи ги вклучуваат следниве ситуации:

- Интермитентно дозирање;
- Краткорочно дозирање (т.е. 30 дена или помалку);
- Специфични индикации (на пример, опасни по живот, незадоволени медицински потреби, ретки болести).

Примери за оправдување на зголемено ниво на елементарните онечистувања со помош на потфакторот пристап на модифицирачки фактор се дадени подолу. Може да се користат и други пристапи за да се оправда зголемено ниво. Секое предложено ниво повисоко од воспоставено PDE треба да се оправда од случај до случај.

Пример бр. 1: Елементот X е присутен во орален лек. Од елементот X идентификувано е ниво без забележани несакани ефекти (*No-Observed-Adverse-Effect Level*, NOAEL) од 1,1 mg/kg/ден. Модифицирачки фактори F1-F5 се воспоставени како 5, 10, 5, 1 и 1, соодветно. Користен е стандардниот пристап за модифицирачки фактори и PDE е пресметан на следниов начин:

$$PDE = \frac{1,1 \frac{mg}{kg} \times 50 kg}{(5 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1) \text{ ден}} = 220 \frac{\mu g}{\text{ден}}$$

Модифицирачкиот фактор F2 (стандардно = 10) може да се подели на два потфактори, еден за токсикокинетиката (ТК) и еден за токсикодинамика, секој со опсег од 1 до 3,16. Користејќи го полуживотот во плазмата од 5 дена, Факторот на прилагодување на ТК може да се намали на 1,58 за еднаш неделна администрација (~1 полуживот), и на 1 за администрација еднаш месечно (~5 полуживот). Користејќи го пристапот на потфактор за F2, предложеното ниво за елементот X администриран еднаш неделно може да се пресмета на следниов начин:

$$\text{Предложено ниво} = \frac{1,1 \frac{mg}{kg} \times 50 kg}{[5 \times (1,6 \times 3,16) \times 5 \times 1 \times 1] \text{ ден}} = 440 \frac{\mu g}{\text{ден}}$$

За практични цели, оваа вредност е заокружена на 400 $\mu\text{g}/\text{ден}$.

Пример бр. 2: Пристапот на факторот за прилагодување ТК може да биде соодветен за елементарните онечистувања кои не беа развиени користејќи го пристапот на модифицирачки фактор. За елементот Z, минимално ниво на ризик (*Minimal Risk Level*, MRL) од 0,02 mg/kg/ден се користел за да се добие орален PDE. Од литературни извори, било пријавено дека полуживотот на плазмата е 4 дена. Овој елемент е онечистување во орален лек кој се администрира еднаш на секои 3 недели (~5 полуживот). Користејќи ја кинетиката од прв ред, утврдената PDE од 1000 $\mu\text{g}/\text{ден}$ е модифицирана како:

$$\text{Предложено ниво} = \frac{0,02 \frac{mg}{kg} \times 50 kg}{\frac{1}{(3,16)} \text{ ден}} = 3,16 \frac{mg}{\text{ден}}$$

За практични цели, ова вредност е заокружена на 3000 $\mu\text{g}/\text{ден}$.

4.5.2. Класификација на елементарните онечистувања

Елементарните онечистувања се поделени во три класи врз основа на нивната токсичност (PDE) и веројатноста за појава во лекот. Веројатноста за појава е изведена од неколку фактори, вклучувајќи: веројатност за употреба во фармацевтски процеси, веројатност да биде ко-изолирано онечистување со други елементарни онечистувања во материјалите што се користат во фармацевтските процеси и природниот пренос на елементот од околината. Класите на елементарните онечистувања се:

– Класа 1

As, Cd, Hg и Pb се човечки токсиканти кои имаат ограничена или никаква употреба во производство на фармацевтски производи. Нивното присуство во лековите производи обично најчесто доаѓа од користените материјали. Поради нивната единствена природа, овие четири елементи бараат евалуација за време на проценката на ризикот, низ сите потенцијални извори на елементарните онечистувања, како и правците на администрација. Исходот од проценката на ризикот ќе одреди кои од компонентите можеби ќе бараат дополнителни контроли и во некои случаи може да вклучуваат тестирање за елементи од Класа 1. Не се очекува сите компоненти да подлежат на тестирање за елементарни онечистувања од Класа 1; тестирањето треба да се применува само кога проценката на ризикот го идентификува како соодветна контрола за да се осигура дека PDE ќе биде исполнет.

– Класа 2

Елементите од оваа класа генерално се сметаат за човечки токсиканти, зависни од изворот и патот на администрација. Класа 2 елементите се дополнително поделени во поткласи 2A и 2B врз основа на нивната релативна веројатност за појава во лекот производ.

Елементарните онечистувања од класа 2A имаат релативно голема веројатност да се појават во медицинскиот производ и со тоа бараат проценка на ризикот низ сите потенцијални извори на елементарни онечистувања и патишта на администрација. Елементарните онечистувања од класата 2A се: Co, Ni и V.

Елементарните онечистувања од класа 2B имаат намалена веројатност за појава во лек производот и низок потенцијал да се ко-изолираат од други материјали. Како резултат на тоа, тие можат да бидат исклучени од проценката на ризикот, освен ако не се намерно додадени во текот на производството на активните супстанции, ексципиентите или другите компоненти на лекот. Елементарните онечистувања во класа 2B се: g, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se и Ti.

– Класа 3

Елементарните онечистувања од оваа класа имаат релативно ниска токсичност преку орална администрација (висока PDE, генерално > 500 µg/ден), но може да биде потребно да се земат предвид при проценката на ризикот за вдишување и парентерална администрација. За оралниот начин на администрација, освен ако овие елементи не се намерно додадени, тие не треба да се земат предвид при проценката на ризикот. За парентерални производи и производи за инхалација, потенцијалот за вклучување на овие елементарни онечистувања треба да се процени за време на проценката на ризикот, освен ако PDE за специфичната рута е над 500 µg/ден. Елементарните онечистувања во оваа класа вклучуваат: Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb и Sn.

– Други елементи

Некои елементарни онечистувања за кои PDE не се утврдени поради нивната ниска вродената токсичност и/или разликите во регионалните регулативи не се опфатени со ICH Q3D водичот. Доколку овие елементарни онечистувања се присутни или вклучени во лекови, тие се опфатени со други упатства и/или регионални регулативи и практики кои може да бидат применливи за одредени елементи (на пример, Al за нарушена бубрежна функција; Mn и Zn за пациенти со нарушена хепатална функција). Некои од разгледуваните елементи вклучуваат: Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, W и Zn.

4.5.3. Потенцијални извори на елементарни онечистувања

При разгледувањето на производството на лек производот, постојат широки категории на потенцијални извори на елементарни онечистувања, како што се:

- Резидуални онечистувања што произлегуваат од процесот на синтеза на активната супстанција (на пример, катализатори) или ексципиенси присутни во составот на готовиот производ. Проценката на ризикот на активната супстанција треба да одговори на потенцијалот за вклучување на онечистувања во готовиот производ;
- Елементарни онечистувања што не се намерно додадени, но се потенцијално присутни во активната супстанција, вода или ексципиенси и се користат во подготовката на готовиот производ;
- Елементарни онечистувања што се потенцијално внесени во активната супстанција и/или готовиот производ и истите потекнуваат од опремата за производство;
- Елементарни онечистувања што имаат потенцијал да се пренесат од системот за затворање во активната супстанција и готовиот производ.

Секој од овие извори може да придонесе за присуство на елементарни онечистувања на готовиот производ, било поединечно или во комбинација од потенцијалните извори наведени погоре. При проценка на ризикот треба да се разгледаат потенцијалните придонеси за секој од овие извори и да се утврди севкупниот придонес за појава на елементарните онечистувања во готовиот производ.

4.5.4. Идентификација на потенцијални елементарни онечистувања

- ***Потенцијални елементарни онечистувања добиени од намерно додадени катализатори и неоргански реагенси***

Ако некој елемент наведен во табелата подолу е намерно додаден, тој треба да се земе предвид при проценката на ризикот. За оваа категорија познат е идентитетот на потенцијалните онечистувања и техниките за контролирање на елементарните онечистувања лесно се карактеризираат и дефинираат.

- ***Потенцијални елементарни онечистувања кои можат да бидат присутни во API и/или ексципиенси***

Ненамерно додадени, некои елементарни онечистувања може да бидат присутни во некои API и/или ексципиенси. Можноста за вклучување на овие елементи во лекот треба да се согледа од проценката на ризикот. За орален пат на администрација, проценката на ризикот треба да ја процени можноста за вклучување на класа 1 и класа 2A елементарни онечистувања во лекот. За парентерални и инхалациски патишта на администрација, проценката на ризикот треба да ја процени можноста за вклучување на класа 1, класа 2A и елементарни онечистувања од класа 3.

Табела 7. Проценка на ризик на намерно и ненамерно додадени елементарни онечистувања (ICH Q3D, 2022)

Елемент	Класа	Ако се намерно додадени (сите патишта на администрација)	Ако не се намерно додадени		
			Орално	Парентерално	Инхалационо
Cd	1	Да	Да	Да	Да
Pb	1	Да	Да	Да	Да
As	1	Да	Да	Да	Да
Hg	1	Да	Да	Да	Да
Co	2А	Да	Да	Да	Да
V	2А	Да	Да	Да	Да
Ni	2А	Да	Да	Да	Да
Ti	2Б	Да	Не	Не	Не
Au	2Б	Да	Не	Не	Не
Pb	2Б	Да	Не	Не	Не
Ir	2Б	Да	Не	Не	Не
Os	2Б	Да	Не	Не	Не
Rh	2Б	Да	Не	Не	Не
Ru	2Б	Да	Не	Не	Не
Se	2Б	Да	Не	Не	Не
Ag	2Б	Да	Не	Не	Не
Pt	2Б	Да	Не	Не	Не
Li	3	Да	Не	Да	Да
Sb	3	Да	Не	Да	Да
Ba	3	Да	Не	Не	Да
Mo	3	Да	Не	Не	Да
Cu	3	Да	Не	Да	Да
Sn	3	Да	Не	Не	Да
Cr	3	Да	Не	Не	Да

– **Потенцијални елементарни онечистувања добиени од опремата за производство**

Елементарните онечистувања од овој извор може да бидат ограничени и секако треба да се земат предвид во проценката на ризикот и ќе зависат од опремата што се користи во производството на лек производот. Примената на процесното знаење, изборот на опрема, квалификација на опремата и GMP контролите обезбедуваат низок придонес на елементарните онечистувања од опремата за производство. Специфично елементарно онечистување што создава загриженост треба да се процени врз основа на знаењето за составот на компонентите на опремата за производство што доаѓа во контакт со компонентите на лекот. Проценката за ризик на овој извор на елементарни онечистувања може потенцијално да се искористи за други лек производи кои користат слични процесни фази и процеси. Општо земено, процесите што се користат за подготовка на API се значително поагресивни отколку процесите што се користат при подготовката на готовите лек производи, особено во однос на потенцијалот за истекување или отстранување на елементарни онечистувања од опремата за производство. Па оттука, придонесот на елементарните онечистувања во лекот од опремата за преработка на производи се очекува да биде помала од придонесите забележани во API. Меѓутоа, кога тоа не е случај, врз основа на знаењето или разбирањето на процесот производителот треба да го земе предвид потенцијалот за инкорпорирање на елементарни онечистувања од производствената опрема на лекот во проценката на ризикот (на пр., истиснување со топло топење).

– **Елементарни онечистувања „истечени“ од системите за затворање**

Идентификација на потенцијалот на елементарните онечистувања што можат да се внесат од системите за затворање треба да се заснова на научно разбирање за веројатните интеракции помеѓу одреден тип на лек производ и неговото пакување. Кога прегледот на влезните материјали во системот за затворање не го покажуваат можното присуство на елементарни онечистувања, не треба да се врши дополнителна проценка на ризик. Се препознава дека веројатноста за елементарно истекување во цврсти дозирани форми е минимална и не бара дополнително разгледување при проценката на ризикот. За течни и полуцврсти дозирани форми постои поголема веројатност дека елементарните онечистувања може да се исцедат од системот за затворање за време на рокот на употреба на производот. Треба да бидат спроведени студии за разбирање на потенцијалните истекувања од системот за затворање/пакување (по миење, треба да се изврши стерилизација, зрачење и сл.). Овој извор на елементарни онечистувања обично се осознаваат при евалуација на системот за затворање/пакување на лекот.

Факторите што треба да се земат предвид (за течни и полуцврсти дозирани форми) се:

- Хидрофилност/хидрофобност;
- Јонска содржина;
- рН вредност;
- Температура (ладен синџир наспроти собна температура и услови на обработка);
- Контактна површина;
- Состав на системот за затворање/компонента;
- Терминална стерилизација;
- Процес на пакување;
- Стерилизација на компоненти;
- Времетраење на складирањето.

4.5.5. Контрола на елементарните онечистувања

Контролата на елементарните онечистувања е еден дел од севкупната контролна стратегија за производ што гарантира дека елементарните онечистувања не ги надминуваат PDE. Кога нивото на елементарни онечистувања може да го надмине контролниот лимит, треба да се спроведат дополнителни мерки за да се осигура дека PDE нивото не се надминува. Пристапи што може да ги следи производителот вклучуваат:

- Измена на чекорите во производниот процес што резултираат со намалување на елементарните онечистувања под контролниот праг преку специфични или неспецифични чекори за прочистување;
- Имплементација на контроли во процесот, дизајнирани да ја ограничат концентрацијата на елементарните онечистувања под контролниот лимит за лекот;
- Воспоставување ограничувања во спецификацијата за ексципиенсите или материјалите (на пример, синтетички прекурсори);
- Воспоставување ограничувања во спецификацијата за API;
- Воспоставување ограничувања во спецификацијата за готов производ;
- Избор на соодветни системи за затворање/пакување.

Може да се примени периодичното тестирање за елементарните онечистувања според принципите опишани во ICH Q6A водичот. Информациите за контрола на елементарните онечистувања, што се дадени во регулаторното досие за регистрација, вклучува резиме за проценка на ризикот, соодветни податоци доколку се неопходни и опис на контролите воспоставени за ограничување на елементарните онечистувања.

4.5.6. Конверзија помеѓу PDEs и дозволеният лимит изразен во концентрација

PDE, пријавени во микрограми на ден ($\mu\text{g}/\text{ден}$), го даваат максимумот дозволена количина на секој елемент што може да биде содржана во максималниот дневен внес на лекот. Бидејќи PDE ја рефлектира само вкупната изложеност од лек производот, корисно е PDE да се претвори во концентрација како алатка за евалуација на елементарните очистувања во лек производите или нивните компоненти. Во согласност со ICH Q3D водичот наведени се некои прифатливи пристапи за воспоставување концентрации на елементарните очистувања во лек производите или компоненти што би увериле дека лекот нема да го надмине поставениот лимит за PDE. Може да се избере која било од овие опции сè додека концентрациите гарантираат дека лекот не го надминува поставениот лимит за PDE. Во изборот на одредена опција мора да се има познавање за дневниот внес на лекот. Поставувањата на дозволеният лимит за концентрацијата може да се користат:

- Како алатка во проценката на ризикот за спроведување на набљудуваните или предвидените нивоа со PDE;
- Како алатка во проценката на ризикот за споредување;
- Во дискусиите со добавувачите за да се помогне во воспоставувањето на контролите што ќе уверат дека производот не ја надминува PDE;
- Да се воспостават целни концентрации кога се развиваат контролите во процесот за елементарните очистувања;
- Да се пренесат информации во врска со контролите за елементарни очистувања во регулаторното досие за регистрација.

Опција 1:

$$\text{Концентрација } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{PDE } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ден}} \right)}{\text{Дневен внес на готовиот производ } \left(\frac{\text{g}}{\text{ден}} \right)} \quad [5]$$

Опција 2:

$$\text{PDE } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ден}} \right) \geq \sum_{k=1}^N C_k \times M_k \quad [6]$$

Каде:

- k – индекс за секоја од N компонентите во лекот;
- C_k – дозволена концентрација на елементарното очистување во компонентата k ($\mu\text{g}/\text{g}$);
- M_k – маса на компонентата k во максималниот дневен внес на лекот (g).

Со примена на која било од опциите опишани погоре, елементарните очистувања од системите за затворање и опремата за производство треба да се земат предвид пред да се пресмета максималната дозволена концентрација во преостанатите компоненти (ексципиенси и API). Доколку се утврди во текот на проценката на ризикот дека системите за затворање и опремата за производство не придонесуваат за зголемување на нивото на елементарните очистувања во лекот, тие не треба да се земаат предвид. Онаму каде постојат придонеси од системите за затворање и производната опрема, истите треба да се земат предвид и да се одземат на проценетиот дневен внес од овие од PDE пред да се направи пресметка за дозволената концентрација во ексципиенсите и активната супстанција

4.6. Мигрирачки (*Extractables* и *Leachables*) очистувања

Контаминација на лек производот со *Extractables* и *Leachables* (E&Ls) може да доведат до отповикување на производот од пазар, а со тоа и до значителни комерцијални загуби. На пример, во 2010 година (McNeil Consumer Healthcare, САД) пријавиле миграција на 2,4,6-триброманизол од товарни палети, и загуба на фелодипин на пазарот (Mutual Pharmaceutical, САД) поради истекување на бензофенон од лакот на пакувањето. Во некои случаи, E&Ls може да резултираат со негативни ефекти, како што беше забележано во почетокот 2000-тите и појава на аплазија на

чистите црвени крвни зрнца (PRCA), случаи кои биле поврзани со употребата на инјектиран еритропоетин (ЕПО). Во овој случај, гумените екстракти биле идентификувани како водечка причина за формирање на агрегат што може да предизвика автоимун одговори кај пациентите и резултирал со PRCA. Примерите како овие ја истакнуваат критичната улогата на E&Ls тестирањето во обезбедувањето на безбедноста на лековите, особено за дозирани форми, како што се инјекции. Според FDA овие лекови спаѓаат во категории со најголем ризик, којшто директно се инјектира во парентералниот простор. Понатаму, веројатноста за интеракција помеѓу дозата и пакувањето е висока за лекови во течна состојба.

Extractables се соединенија што во присуство на растворувач можат да се извлечат од системот за затворање/пакување. *Leachables* се соединенија кои се испуштаат во формулацијата на производот од системот за затворање/пакување како резултат на директен контакт со формулацијата под нормални услови.

И двете се предмет на регулаторни тела и мора да се има развојната практика во индустријата и систематски пристап кој идентификува проблематични соединенија за одреден лек производ и го минимизира ризикот со обезбедување на нивна ефективна контрола.



Слика 4. Extractables се соединенија што би можеле да мигрираат во производот; Leachables се соединенија кои мигрираат во производот под репрезентативни услови (<https://www.ondrugdelivery.com/exploring-extractable-and-leachable-testing-strategies-for-parenterals/>)

4.6.1. Извори и ризици од мигрирачките (Extractables и Leachables) онечистувања

Мигрирачките онечистувања се соединенија што може да бидат предизвикани од фармацевтската обработка и системите за затворање/пакување. Овие онечистувања може да доведат до контаминација на високовредни лекови и важно е да се разбере нивната карактеризација, но и разликата помеѓу двете. Примарното пакување е дефинитивен фокус кога станува збор за E&Ls тестирање за парентерали, и со право, бидејќи не е невообичаено за готов лек производ рокот на употреба да е повеќе од 24 месеци.

Extractables се супстанции или соединенија кои може да мигрираат од примарен контејнер, компонентен материјал, систем за испорака или производни површини или при лабораториска манипулација (растворувач или изложеност на топлина), што доведува до контаминација на фармацевтските производи. *Extractables* најчесто се генерираат со интеракција помеѓу лек производот и неговото пакување. Обично, екстрактите се последица на екстремни услови како присуство на силни растворувачи или високи температури. Понатаму, овие онечистувања може да бидат предизвикани од

б-зрачење со деградација на материјалот за пакување/примарниот сад кој главно се состои од полимери.

Leachables се главно резултат на директен контакт со формулацијата. *Leachables* се типично подгрупа на екстракцибилните материји, но за разлика од нив, тие можат да се појават во нормални услови на употреба. Причината за истекување може да бидат адитиви или средства за ослободување, облоги и слични неоргански материјали.

Резултатите од секоја анализа од мигрирачките (E/L) студии треба да бидат прегледани од квалификувани токсиколози. Целта е да се минимизираат грижите за безбедноста на пациентите во однос на изложеноста на потенцијално штетни соединенија што може да мигрираат (Baselt, 2008). Начинот на администрација, дозираната форма (парентерална, локална, инхалација или орална) и дозата на лекот (акутен наспроти хроничен) се клучни фактори што треба да се земат предвид во секоја студија за екстракција или токсиколошки извештај. Понатаму, и природата на процесот и употребата на материјалите за обработка се исто така важни фактори. Со цел да се исклучи какво било онечистување и да се гарантира безбедноста на пациентот, сите медицински помагала и лекови каде е апликативно, на пример, течни форми, полуврсти форми, бараат E/L студии. Онечистувања кои можат да доведат до контаминација на производот предизвикани од мигрирачките материји вклучуваат полимери и разни материјали за пакување, мастила и лепила.

Главниот извор на E&Ls за парентерални лекови е примарното пакување, но секако и други извори, како што се компоненти од опремата за производство и секундарното пакување, можеби ќе треба да се земат предвид. Како што лек производот напредува низ синџирот на производство, стапува во контакт со различни површини и материјали, на пр. од вулканизирани гумени цевки до лубриканти и метални легури. Типично, времињата на контакт се кратки, но не секогаш. Процесите како што е филтрацијата обезбедуваат можности за продолжена интеракција. Секундарно пакувањето, пак, може да биде подолу на листата од веројатни причини за контаминација, но секако може биде плодна област при истрага кога алтернативните извори се елиминирани. Безбедноста на пациентите е примарна грижа во врска со E&Ls бидејќи миграцијата во лекот може да резултира со испорака на токсични онечистувања или, од друга страна, негативно да влијае на неговата стабилност и ефикасност. Како и да е, резултатите од миграционите или симулациски студии се исто така корисни при развојот на лек производот, особено при изборот на материјалот за пакување со цел зачувување на долгорочниот квалитет на лекот и максимизирање на неговата стабилност. Сите парентерални лекови, но особено чувствителните биолошки препарати како моноклонални антители, рекомбинантни пептиди или mRNA вакцини, E&Ls може да предизвикаат агрегација или оксидација, со што се ограничува рокот на употреба, компромитирање на терапевтската ефикасност и, во најлош случај, влијае на безбедноста на пациентот.



Слика 5. Извори на потенцијални *Leachables* вклучуваат производни компоненти во контакт со лекот за време на производството, примарното пакување, системите за затворање и секундарното пакување (<https://www.ondrugdelivery.com/exploring-extractable-and-leachable-testing-strategies-for-parenterals/>)

4.6.2. Регулаторен пристап и тековни практики

При евалуација и проценка на E&Ls кај парентерални производи FDA се залага за пристап базиран на ризик, нагласувајќи ја потребата до истражувачите и развојните научници да ги минимизираат негативните влијанија врз пациентот преку систематско проучување и оценување. Отсуството на прописни протоколи ги истакнуваат придобивките од работењето со експерти од областа, иако има објавено водич од страна на Институтот за истражување на квалитетот на производите (*Product Quality Research Institute, PQRI*). Објавен во 2021 година, најновите насоки дадени во PQRI водичот се особено корисни за јасно дефинирање на прагот на загриженост за безбедноста (*safety concern threshold, SCT*). Дефинирање на SCT „како праг под кој било кое *leachable* соединение би имало толку ниска доза со што се занемаруваат безбедносните грижи од канцерогени и неканцерогени токсични ефекти“ изнесува од 1,5 µg/ден како погоден за поголемиот дел од органските *leachable* соединенија во парентералите производи. Оваа бројка помага да се дефинира чувствителноста со која треба да се погледне на мигрирачките соединенија. Насоките дадени од страна на FDA се исто така корисни, што покажува дека за парентерални производи вообичаена практика е да се пријавуваат *leachable* соединенија на > 1 ppm, да се идентификуваат на 10 ppm и да се квалификуваат на 20 ppm.

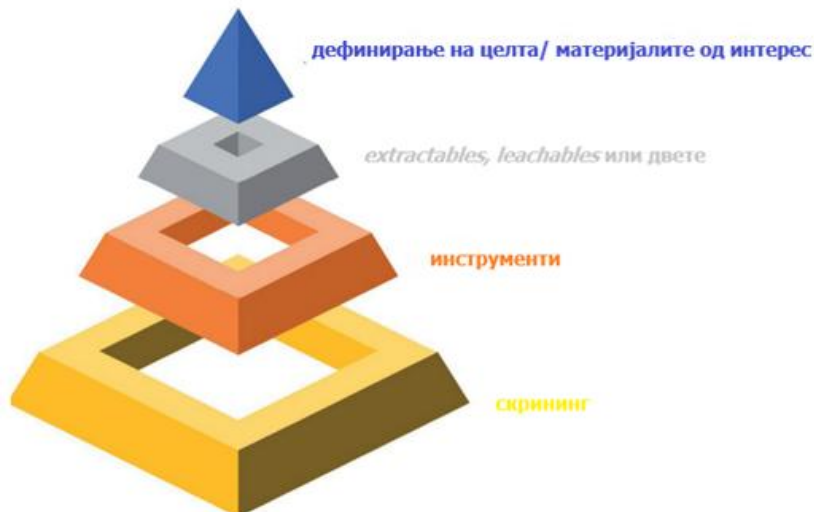
Насоките дадени во Американската фармакопеја (USP) <659> ги покриваат барањата за пакување и складирање, каде што е дадена следнава воведна изјава: „Материјалите за пакување не смеат да имаат каква било физичка или хемиска интеракција со производот за пакување на начин што би ја предизвикувала неговата безбедност, идентитет, ефикасност, квалитет или чистота и да не се усогласат со утврдените барања“. Индивидуални поглавја конкретно се однесуваат на вообичаено користена амбалажа за фармацевтските производи – USP <381> за гумено затворање, USP <660> за стакло и USP <661> за пакување од пластика. За гумено затворање и пластични контејнери *Extractables* се конкретно адресирани во USP <1663> и *Leachables* во USP <1664>, при што и двете го специфицираат тест методот што треба да се имплементира за нивна соодветна евалуација.

Во тек е промена и во ICH водичите, со нов очекуван ICH Q3E водич за *Extractables* и *Leachables* и во моментот се финализира и се очекува да биде усвоен до 2026 година. Водичот ICH M7, кој се однесува конкретно за мутагени соединенија, останува од голема помош во практична смисла, и истиот е имплементиран во PQRI документот.

4.6.3. Дизајнирање на мигрирачка студија

За ефективен дизајн на студијата неопходно е јасно да се разликува E&L тестирањето и да се разбере како двете се поврзани една со друга. Тестирањето за *extractables* има за цел да идентификува профили на соединенија што може да се ослободат од материјал што се користи за пакување или опремата за производство со примена на релативно груби – иако донекаде репрезентативни – услови. Преку „туркање“ на кандидатските материјали, тестирањето за *extractables* ефективно го одредува најлошиот *leachable* материјал. Резултатите помагаат да се квалификуваат алтернативни опции на материјалот за пакување, да воспостават протоколи за контрола на квалитетот на материјалот, прифаќање/употреба и скрининг на токсични материјали што може да се ослободат. Тестирањето за *extractables* често е поле за примена на аналитички техники наменети за тестирање за *leachable* соединенија. Спротивно на тоа, тестирање за *leachable* соединенија одредува кои соединенија мигрираат во специфичната формулација на лекови под тесно репрезентативни услови и, како резултат на тоа, многу повеќе е слично на тестирањето на стабилноста. При дизајнирање на студија првото прашање е дали да се вклучат двете E&L тестирања или дали фокусот да е на едно или друго. Дополнителни прашања што се корисно одговорени на самиот почеток го вклучуваат следново:

- Кои се материјали од интерес вклучени во примарното пакување и компонентите влезени во состав на производната опрема?
- Дали постојат специфични соединенија што предизвикуваат загриженост или е намерата да се изврши широк скрининг? Широк скрининг ќе испорача непристрасна проценка на какви било присутни соединенија, но чувствителноста може да биде петпати поголема за целна студија.
- Кои аналитички техники и инструменти ќе бидат релевантни?
- Какви услови ќе бидат соодветни за тестирањето?

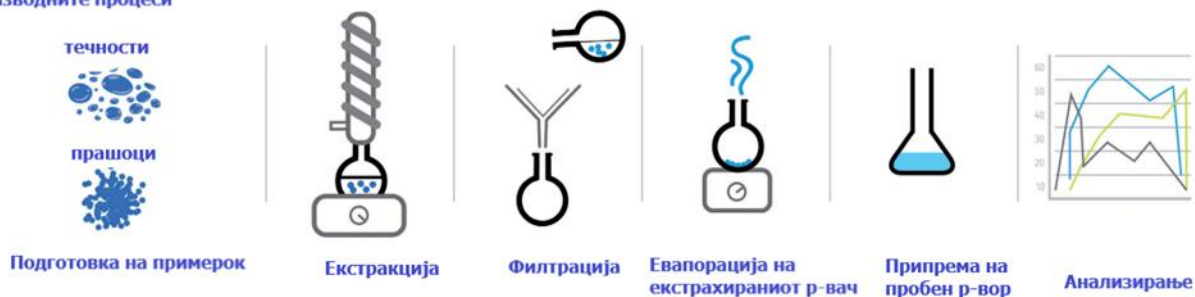


Слика 6. E&L студијата бара внимателно разгледување на неколку фактори (<https://www.ondrugdelivery.com/exploring-extractable-and-leachable-testing-strategies-for-parenterals/>)

Проценката на секој од овие чекори го истакнува широкиот опсег на фактори што треба да се земат предвид при развивање на тест протоколот за тестирањето на *extractables* во насока да се применат доволно груби услови, но да останат во рамките на некои реални граници. Некои критични прашања што треба да се решат се:

- Каква форма треба да биде примерокот за тестирање? Дали обично би имало било каква форма на предтретман, како миенење или зрачење, што треба да се рефлектира во протоколите за тестирање?
- Која техника(и) на екстракција е најмногу соодветна – микробранова печка, рефлукс, *Soxhlet*, сончање или забрзана екстракција со растворувач?
- Кои растворувачи треба да се користат – поларни (на пример, вода, изопропанол) или неполарни (на пример, дихлорометан, хексан), опсег или комбинација? Дали се потребни адитиви, на пример, за да се процени влијанието на рН вредноста и/или сурфактанти?
- Кое е соодветното време за контакт и температурни опсези? Температурата може да биде во опсег од 25°C – 40°C, со тест времиња што се протегаат од неколку часа до 70 дена.
- Дали површината за контакт е погодена? Сооднос површина – волумен од 6:1 cm²/mL е усвоен за рутинска работа.
- Која ќе биде негативната контрола? Со други зборови, инертни материјали – висококвалитетно борсиликатно стакло и политетрафлуороетилен се чести кандидати – се користат за воспоставување на основната линија за компаративни цели.
- Дали постои соодветен внатрешен стандард за да се следи ефикасноста на примерокот – обично молекула на споредлива класа/структура со она што е предмет на испитување?
- Дали примерокот бара чистење за подобрување на квалитетот на аналитичките податоци преку, на пример, филтрација или концентрација?
- Дали е потребна дополнителна концентрација за да се постигне аналитички праг на евалуација на соединението (*analytical evaluation threshold*, АЕТ)? Можни техники на концентрација вклучуваат испарување, течно-течна екстракција, дисперзивна течно-течна микроекстракција, микроекстракција на капки и микроекстракција во цврстата фаза.
- Која аналитичка техника е најмногу соодветна? Течна хроматографија поврзана со масена спектрометрија (LC-UV-MS) е корисна за неиспарливи соединенија, вклучувајќи олигомери и поголеми антиоксиданси; гасна хроматографија – MS (GC-LC) поврзана со течна хроматографија е корисна за полуиспарливи соединенија, како што се резидуални мономери, конзерванси и пластификатори, со GC-MS со хедспејс за анализа на испарливи соединенија како мастила, лепила и процесни растворувачи; индуктивно поврзана плазма MS (ICPMS) – корисна за елементарна анализа на метали.

Систем за затварање/ компоненти од производните процеси



Слика 7. Тек за тестирање на extractable соединенија и развој на соодветна стратегија за тестирање (<https://www.ondrugdelivery.com/exploring-extractable-and-leachable-testing-strategies-for-parenterals/>)

4.7. Стратегии за квалификација на деградационите продукти во нов производ

Квалификација е процес на собирање и проценување податоци со кои се воспоставува контрола на индивидуално онечистување/деградационен продукт или даден профил на онечистувања со специфицирано/и ниво/а, наведени во спецификацијата на новата активна супстанција или готовиот фармацевтски производ. Во случај кога вообичаените граници за нивоата на квалификација се надминати, потребно е да се спроведат повеќе видови студии за да се добијат соодветни и релевантни податоци („*Decision Tree for Identification and Qualification of Degradation Product*“). Поставувањето повисоки квалификациони прагови за онечистувањата/деградационите продукти е можно, но сето тоа треба да биде оправдано со соодветни студии (токсиколошки, клинички).

Доколку онечистувањата/деградационите продукти се причина за појава на несакани реакции кај пациентите, неопходно е поставување на пониски прагови на квалификација.

Во ЕМА водичот „*Guideline on setting specifications for related impurities in antibiotics*“ повисок праг на квалификација за дадено онечистување може да се оправда со компаративни анализи на профилот на онечистување во текот на рокот на траење за онечистувањето во нашиот производ во однос на резултатот добиен во референтниот производ (*qualification by use*).

Според ICH M7 при администрација на производ кој содржи онечистување кое е идентификуван хуман метаболит на активната супстанција, не е потребно спроведување на одделни безбедносни процедури, дури и доколку структурата покажува значајна варијација во однос на структурата на администрираната супстанција. Во ваков случај онечистувањето треба да биде добро контролирано во текот на производствениот процес со цел да се овозможи одржување на дефинирана доза во рамките на дозирана форма за време на целиот рок на траење (ICH M7, 2023).

4.7.1. Класификација на онечистувања според мутагениот и карциногениот потенцијал и контролни мерки (ICH M7)

Табела 8. Класификација на онечистувања според мутагениот и карциногениот потенцијал и контролни мерки (ICH M7, 2023)

Класа	Дефиниција	Предлог мерка за контрола
1	Познати мутагени карциногени	Контрола на ниво или под специфичниот прифатлив лимит за супстанцијата
2	Познати мутагени со непознат карциноген потенцијал (позитивна бактериска мутагеност, без податоци за карциногеност кај глодари)	Контрола на ниво или под прифатливите граници (соодветен ТТС)
3	Предупредувачка структура која не е во врска со структурата на активната супстанција; нема податоци за мутагеност	Контрола на ниво или под прифатливите граници (соодветен ТТС) или спроведување на мутагена анализа на бактерии; Ако е немутагена = класа 5; Ако е мутагена = класа 2
4	Предупредувачка структура, исто предупредување кај активната супстанција или супстанции поврзани со активната супстанција (на пример, меѓупроизводи во тек на процесот), кои биле тестирани и не покажале мутагеност	Се смета за немутагено онечистување
5	Структура која не претставува знак на предупредување или предупредувачка структура со доволно податоци кои покажуваат отсуство на мутагеност или карциногеност	Се смета за немутагено онечистување

TTC – Threshold of Toxicological Concern – праг на токсиколошка загриженост

Компјутерската токсиколошка проценка треба да се изврши со примена на квантитативниот однос структура – активност Q(SAR) методологиите со кои може да се предвиди исходот од тестот за бактериска мутагеност (ICH M7, 2023). Притоа треба да се применат две Q(SAR) предиктивни методологии кои се надополнуваат. Едната методологија треба да биде експертска – заснована на правила, а втората треба да биде статистички базирана.

Отсуството на структурни предупредувања, добиени со примена на две комплементарни Q(SAR) методологии (експертска и статистичка) е доволно за да се извлече заклучок дека онечистувањето не поседува мутагени својства и не е потребно понатамошно тестирање (класа 5 во табела 8).

За да се истражи на релевантен начин едно структурно предупредување (класа 3 во табела 8) или треба да се применат соодветни контролни мерки или е потребно да се изврши тест на мутагеност на бактерии користејќи го само онечистувањето. Соодветно изведен тест на мутагеност на бактерии со негативен резултат ќе ги отфрли сомневањата засновани на структурата и не се бара понатамошна евалуација на генотоксичност. Позитивен тест на мутагеност на бактерии наложува да се направи понатамошна проценка на ризикот и/или да се преземат контролни мерки (класа 2 во табела 8) (ICH M7, 2023). На пример, кога нивоата на онечистувањето не можат да се контролираат на соодветна прифатлива граница, се препорачува онечистувањето да се тестира со примена на *in vivo* генетски тест на мутации со цел да се постигне

релевантност на резултатот добиен од тестот на мутагеност на бактерии во *in vivo* услови. Изборот на анализи на генотоксичност во *in vivo* услови треба да биде научно оправдан и да се заснова на познавање на механизмот на дејство на онечистувањето и експозицијата на целните ткива. *In vivo* студиите треба да бидат така дизајнирани да се земат предвид постоечките ICH водичи за генотоксичност. Резултатите од соодветна *in vivo* анализа можат да бидат потврда за поставените специфични граници за супстанциите кои претставуваат онечистувања.

Онечистување чија структура претставува знак за предупредување, но е слична со активната супстанција или други поврзани супстанции (на пример, исто структурно предупредување во истата положба и хемиската околина), може да се смета како немутагено (класа 4 во табела 8) доколку тестирањето на овие материи со тест на мутагеност на бактерии покажало негативен резултат.

4.8. Инструментални техники за контрола на онечистувања

За анализа на активна супстанција и готов фармацевтски производ, за потребите на фармацевтската индустрија се користат повеќе техники, како ултравioletова спектрофотометрија, инфрацрвена спектроскопија, тенкослојна хроматографија, високоефикасна течна хроматографија со различни детектори, гасна хроматографија итн. Сè почесто хроматографските системи се поврзуваат со масен спектрометар како детектор, така што масената спектрометрија како техника за идентификација и структурна карактеризација навлегува во современите фармацевтски анализи.

4.8.1. Високо ефикасна течна хроматографија (HPLC)

Сè повеќе високо ефикасната течна хроматографија претставува техника на избор која се користи за определување на содржината на онечистувањата, појдовните суровини и готовите производи (Ahuja, 2000b). Високо ефикасната течна хроматографија се карактеризира со релативно лесна подготовка на примероците, со што се минимизира грешката која притоа може да се направи. Исто така, денес се познати широк спектар на врзани стационарни фази што можат да се применат за анализа на различни видови активни супстанции. Градиентното елуирање, температурата и техниките со кои може да се програмира промена на брановата должина во текот на анализата обезбедуваат вредни информации за новите онечистувања во појдовните суровини и готовите производи. Моќноста на DAD детекторите ја надминува вообичаената граница на детекција од 0,1%. Покрај високата осетливост на новите HPLC системи која достигнува до ниво на анализа на трагови, тие исто така се карактеризираат со скоро целосна автоматизација на процесот на анализа, што претставува уште една придобивка за рутинската контрола на квалитет во фармацевтската индустрија.

4.8.2. Масена спектроскопија (MS)

Масената спектрометрија е ефикасна техника која денес широко се користи за идентификација, структурна карактеризација и квантификација на органски соединенија со молекулски маси од неколку десетици до милиони далтони. Таа има големо значење во истражувањата на влезните суровини и готовите производи во фармацевтската индустрија.

Со пронаоѓањето на техниките за јонизација, како што е електроспреј јонизацијата, комбинацијата на течна хроматографија со масена спектрометрија станува сè попопуларна техника за карактеризација на профилот на онечистувања кај фармацевтските препарати (Ermer, 1998). Оваа техника полка навлегува во модерните рутински анализи во контролата на производството. Тоа овозможува голема ефикасност во однос на разделување, идентификација и квантификација на онечистувањата, како и определување на содржината на активни супстанции. Течната хроматографија комбинирана со масена спектрометрија (LC-MS) се смета за една од најважните техники на дваесеттиот век и сè повеќе станува метод на избор за

аналитичка поддршка во многу стадиуми од контролата на квалитетот во фармацевтската индустрија (Ermer, 1998; Gilpin & Pachla, 2001).

4.8.3. Спектроскопија на нуклеарно-магнетна резонанца (NMR)

Оваа техника пронајде голема примена во хемијата и овозможи да биде употребена за решавање непознати молекулски конфигурации, изучување на термодинамичките параметри, интра и интермолекулските интеракции и сл. Со оглед на големата моќност на NMR спектроскопијата, како и многубројната литература која темелно ја покрива оваа тема, се поставува прашањето: дали употребата на NMR ќе помогне во разрешување на дилемите во врска со идентификацијата на молекулската структура на онечистувањата од деградациони продукти на активните супстанции и готовите фармацевтски производи?

За решавање на овие прашања прво треба да се допре до двете најважни цели на NMR спектроскопијата – структурната идентификација и квантификација, како и инструменталните ограничувања на оваа техника од аспект на чувствителноста и потребната чистотата на супстанцијата.

Големата разновидност на NMR апликациите се должи на нејзината способност за изучување на хемиските и физичките својства, вклучувајќи карактеризација на хемиската структура како и молекулската динамика. Покрај тоа, таа може да се примени кај течни, цврсти и гасовити примероци. NMR е комплементарна техника и на масената спектрометрија, и со тоа може да обезбеди критични структурни информации. Во споредба со другите техники, NMR е исклучително чувствителна на мали промени во локалните електронски средини, како што се индивидуалните полиморфи во смеса од различни кристали. Покрај квалитативните молекулски информации обезбедени од страна на NMR спектроскопијата, може да се добијат и квантитативни информации.

4.8.4. Атомска емисиона спектроскопија со индуктивно спрегната плазма/масена спектрометрија со индуктивно спрегната плазма (ICP-AES/ICP-MS)

ICP претставува аналитички метод со кој се определуваат метали во траги. Механизмот се состои во интеракцијата на атомите со електромагнетното зрачење. Овој вид на емисиона спектрометрија користи индуктивно спрегната плазма за да се продуцираат ексцитирани атоми и јони кои емитуваат електромагнетно зрачење на специфични бранови должини карактеристични за секој метал. Интензитетот на оваа емисија е показател за концентрацијата на елементот во примерокот. Високата специфичност, мултиелементноста и добрата детекција овозможуваат употреба на техниката во широк спектар на апликации. Плазмата се користи за дисоцирање на примерокот во неговите составни атоми или јони, ексцитуирајќи ги на повисоко енергетско ниво. Тие се враќаат во нивната основна состојба по емитурање на фотони на карактеристична бранова должина во зависност од присутниот елемент. Интензитетот на електромагнетното зрачење се определува со оптички спектрометар. Во основа се разликуваат два типа инструменти:

- ICP-атомски емисионен спектрометар (ICP-AES) или оптички емисионен спектрометар (ICP-OES): ја дели светлината емитурана од плазмата со брановите должини на самата компонента, притоа користејќи дифракционен хелиум;
- ICP-масен спектрометар (ICP-MS): примероците од јоните се создаваат во плазмата и ги насочува преку масен спектрометар.

5. СТУДИИ НА ПРЕДФОРМУЛАЦИЈА

Во изминатите пет децении развиени се студии познати како предформулациски за поддршка на дизајнот на дозирана форма и за негова контрола на квалитетот. Предформулациските студии добија импулс во 1950-тите и наметнаа научни принципи и образложение за развојот на формулацијата со цел да се минимизираат грешките. Пред појавата на предформулационата студија, развивањето на дозирана форма зависеше од искуството на формулаторот, одредено знаење за употребените ексципиенти и основното, функционално тестирање на производот.

Предформулационата студија е изградена врз познавањето за физичките и хемиските принципи на фармацевтската наука и биофармацијата. Во фармацевтската индустрија предформулирањето генерално не се спроведува само од еден оддел. Оваа активност ги интегрира напорите на добро координирани задачи меѓу многу истражувачки тимови: аналитичко истражување, контрола на квалитет, развој на дозирани форми и други во текот на развојниот циклус. Бидејќи постои блиска врска помеѓу предформулацијата и развојниот циклус, циклусот мора добро да се разбере. Циклусот за развој на современи фармацевтски производи вклучува предформулирање студии заедно со регулаторната усогласеност за да се постигне успех.

5.1. Развој на производ на нов ентитет за лекови

Процес на внесување нов лек на фармацевтскиот пазар еволуираше во добро дефиниран систем во рамките на глобалната фармацевтска индустрија. Општо земено, нова молекула на лекови наменета за одредена терапевтска област е избрана преку процесот на скрининг во фазата на откривање на лекот, исполнувајќи однапред избрани биолошки и терапевтски критериуми со докази за добри перформанси. Во некои случаи молекулата на откриеното ново соединение може да биде изменета хемиски или физичко-хемиски за подобрување на нејзините терапевтски својства. По задоволително исполнување на критериумите, лекот дополнително се оценува и се номинира како добар кандидат за понатамошен развој со цел да се воведат на пазарот. Процесот на селекција е тимски напор, повеќедисциплинарна одлука и тука учествуваат членови од истражување и развој (R&D), производство, медицински маркетинг, обезбедување/контрола на квалитет (QA/QC). Процесите на регулаторните развојни активности за новиот лек може да се следат по процесот на идентификација за развојниот кандидат. Времето потребно за развој до неговото финално одобрување на пазар е од 4 до 12 години, а стапката на успех да се донесе развиено соединение на пазарот се проценува на 10%.

5.2. Студија на предформулирање за поддршка на развој на нов производ

Патувањето и развојот од откривањето нов активен лек до фармацевтски производ е долг. Иако финансиската награда за успешен производ е одлична, стапката на неуспех за носење производ на пазарот е исклучително висока. Исто така, треба да се разгледаат разновидните и непредвидливи инвестиции во времето и трошоците за неуспешен производ. Престанокот на проектот зависи од резултатите од континуираното експериментирање. Така, постојаниот фокус на развојните настани е од суштинско значење за донесување критични одлуки. Тим за управување со проекти мора да го следи напредокот, да обезбеди дистрибуција на ресурси и да донесува брзи менаџерски одлуки за деловен успех. Типичната развојна активност за следење на предформулацијата може да се подели во неколку фази, како што е дискутирано во продолжение.

5.2.1. Избор на API за развој на дозирана форма

Во процесот на биолошкиот скрининг на хемиски соединенија се идентификува хемискиот ентитет што би бил кандидат за развој. Избраното соединение што е тестирано за време на скринингот можеби не е идеално соединение и во текот на развојот може да претрпи одредени промени од аспект на:

- Измени во структурата;
- Чистота;
- Хиралност;
- Избор на сол;
- Пролекови;
- Метаболити.

5.2.1.1. Измени во структурата

Во многу случаи модификација на хемиската структура или на физичките својства може да се покаже дека играат улога во оптимизирање на терапевтските и фармацевтските вредности на кандидатот. Мора да се спроведат низа испитувања пред формулацијата за да осигураме дека промената во молекулата е потребна и оправдана.

5.2.1.2. Чистота

Оптималната чистота на соединението во раната фаза на развој не мора да биде неопходна бидејќи процесот на прочистување продолжува и се подобрува во подоцнежните фази. Нивото на чистотата на супстанциите што се користат во фази на откривање во рана развојна фаза треба да биде практична и зависи од фазата на синтеза. Сепак, мора да се утврди профилот на чистота и мора да биде спроведена конзистентност на квалитетот. Конечниот напредок во синтезата мора да се заснова на посветеноста кон врвен квалитет со највисока чистота.

5.2.1.3. Хиралност

Хиралноста е постоење различни конфигурации на супстанција со идентична хемиска структура. Оваа супстанција може да се разложи во енантиомери. Така, хемиската супстанција што има два изомери е позната како хирално соединение. Хирални супстанции кои имаат 50:50 мешавина од двата енантиомери се познати како рацемски смеси. Често еден од енантиомерите нема активни фармаколошки својства. Во таков случај, со примена на сепаративните техники во формулацијата на лекот, не треба да се вклучува хемискиот дел кој нема терапевтска вредност. Покрај физиолошките активности, стереоспецифичноста влијае и на физичко-хемиските својства на лековите. За развој на нов хемиски ентитет, оптички активното соединение треба да биде достапно во порана фаза од процесот на откривање на студијата за предформулација. Изборот за енантиомер на компонентите или рацемските мешавини мора да се одлучи пред пријавата на патент и поднесување на досието. Може да се изгуби голема инвестиција ако се употребат погрешни хирални соединенија и потоа да треба да се развие друг енантиомер.

5.2.1.4. Избор на сол

Многу синтетички супстанции што треба да се користат во цврста дозирана форма се премногу ограничени со растворливоста за да бидат терапевтски ефективни. Посакуваната растворливост се предлага да биде повеќе од 1 mg/mL (0,1%). За да се зголеми растворливоста на слаб основен лек како што е амин, може да реагира со соодветни минерални киселини и да се формираат соли, односно хидрохлорид (повеќе од 40 % од солта што се продава), сулфат или фосфат. Бидејќи молекулата на сол е поларна, таа треба да биде слободно растворлива во вода, достигнувајќи ниво на терапевтска растворливост. Останатите типови киселини кои вообичаено се користат за формирање сол со слаба база се сулфонските киселини и карбоксилните киселини. За полуцврсти дозирани форми, како што се масти и кремове, органските киселински деривати на база се користат за производство на мрсна супстанција која ги заобикоува формулациските проблеми и ја подобрува распределбата и продорноста на лекот преку кожата. За таа цел се користат органски киселински соли, како што се олеат или октаоат. Да помогне во изборот на соли за финалната активна супстанција, голем број

соли, врз основа на достапните информации, мора да бидат подготвени и тестирани во програмата за предформулација со следниве својства земени предвид:

- Растворливост (според терапевтска цел);
- Хигроскопност;
- Биорасположливост;
- Стабилност.

Пријавена е *in situ* техника на скрининг на сол за основните лекови. Растворливостите добиени со оваа техника се во согласност со оние на автентичните соединенија. Изборот на соодветна сол го подобрува производството, стабилноста и биорасположливоста на дозираните форми.

5.2.1.5. Пролекови

Како што беше дискутирано претходно, дизајнот на цврсти дозирани форми зависи од биорасположливоста, која е контролирана од процесите на растворање и апсорпција. Иако API може брзо да се раствори, во некои случаи апсорпцијата може да биде бавна, намалувајќи ја биорасположливоста. Манипулација со липофилноста на молекулата, како на пример со формирање на естер, може да ја зголеми брзината на неговата апсорпција преку гастроинтестиналниот тракт (ГИ) тракт. Естерифицираната молекула по транспортот низ ГИТ последователно се претвора назад во оригиналната молекула. Естерифицираната молекула, која може лесно да се хидролизира назад до матичната молекула, е позната како пролек. Од друга страна, формирањето пролек, како што е фосфатен естер, може да ја зголеми хидрофилноста, со што се подобрува растворливоста. На пример, растворливоста на *n*-хидроксиметил дериватот на ломефлоксацин е повисок од оние на матичното соединение и може лесно да се конвертира назад во оригиналната молекула. Најчесто користени пролекови се прокаин пеницилин метронидазол фосфат и хлорамфеникол натриум сукцинат.

5.2.1.6. Метаболити

Студијата за метаболизмот на кандидат за лек треба да се спроведе во раната фаза на развој, веднаш по процесот на селекција. Главните метаболити треба да се тестираат фармаколошки и токсиколошки против кандидатот. Доколку се најдат слични профили, треба да се разгледаат, заменувајќи го оригиналниот кандидат за лек со неговиот метаболит.

5.2.2. Заштита на интелектуална сопственост и поднесување патенти

Обезбедување на правата на пазарна ексклузивност за нов лек како заштитена интелектуална сопственост е од голема важност. Интелектуалната сопственост е составена на четири типа:

- Патенти: заштита на корисни пронајдоци, кои можат да бидат процеси, машини, производи или состав на материјата;
- Авторски права: заштита на оригиналната идеја фиксирана во опиплив медиум на изразување;
- Трговски тајни: речиси сè што не е општо познато и тоа му дава на сопственикот конкурентна деловна предност. Сопственикот мора да преземе мерки на претпазливост за да се осигура дека деловната тајна останува тајна;
- Заштитни знаци: идентификување на производот и разликување од другите.

Апликација за патент е последователен тек и може да дојде како последователна мисла откако пронајдокот е веќе реалност. Пронаоѓачот ретко го проучува правото за патент пред да го измисли. Почесто процесот се заснова во насока да се реализира пронајдокот за неговата потреба. Патентна заштита всушност е преговарачки процес за да се постигне подобност по процесот на пронаоѓање. За разлика од повеќето пронаоѓачи, фармацевтските компании исполнуваат низа предуслови пред да пријават

патент и пред процесот на откривање. Барањата при поднесување на апликација се добро дефинирани и познати. Правилата на водење евиденција и правна проверка од страна на пронаѓачот/иноваторот се добро документирани. Широката синтеза на серија аналози за наменето соединение се реализира и се карактеризираат биолошките активности. Други физички својства генерирани од предформулацијата ги проучуваат хиралноста и полиморфизмот и истите се добро документирани за да го покријат евентуалното патентно прекршување.

5.2.3. Избор на аналитички техники и развој

Аналитичките техники се основни за развој на нови лекови. Без нив нема евалуација на квалитетот на материјалите, на прекурсорите, со цел да се направи финален производ. Аналитичките методи мора да бидат развиени рано и пред фазата на развој на производот, односно во фазата на откривање на лекот. Како што студијата напредува, методите може да се подобрат и оптимизираат. Пред истражувачките фази овие методи мора да бидат квалификувани и, во некои случаи, потврдени според регулаторните барања. Изборот на аналитичките техники треба да се засноваат на: специфичноста, точноста, прецизноста, чувствителноста и брзината на тестот и сето тоа мора да биде оправдано.

5.2.4. Подготовка и поднесување на апликација за откривање на лекот

За да се добие регулаторно одобрение за започнување клиничка студија, апликацијата за пронаоѓањето мора да се подготви и достави до регулаторното тело. Целата е да се добие ослободување од статусот што забранува неодобриениот лек да се испорачува со меѓудржавна трговија. Овој чекор е претходникот на процесот при поднесување на апликацијата за регистрирање нов лек и е дел од регулаторниот процес кон одобрување на новиот лек на пазарот. Апликацијата за пронаоѓање бара три главни типа документација

- Токсикологија и фармакологија на животните;
- Клинички протокол и квалификации на истражувачот;
- Хемијата, производството и контролата од каде што некои физичко-хемиски информации за лекот (наведени како студии пред формулација) се бараат.

5.2.5. Студии за клиничко испитување

Клиничките студии мора да се усогласат со Добрата клиничка пракса (GCP) и подготовката на клиничките материјали мора да биде регулирана со тековните добра и Производни практики (cGMP). При подготовката на дозираната форма за клиничко испитување, потребата од количината на откриениот лек е мала бидејќи бројот на пациенти за испитувањето е мал, а достапната API е ограничена. Потоа, како што напредува клиничката студија и истражувањето на производот, се развива оптималната дозирана форма. Затоа, не е потребно да се троши многу време или ресурси за развој на дозирана форма во раните фази на истражување. Ако не се постигне добар маркетиншки успех уште во најраниот стадиум на откривањето на соединението, најмудро решение е да се продолжи со едноставен дизајн за дозирана форма, како што се таблетите. Општо земено, едноставна капсула е доволна за таа цел. Капсулите може да се произведуваат брзо, со минимални истражувачки напори во предформулирањето. За материјалите кои се подложни на клиничката фаза мора да се воспостават спецификации со соодветни критериуми на прифатливост и да се воспостави QA/QC систем, да се приложат резултати од студија за стабилност и треба да се следат GMP/GCP нормите.

5.2.6. Развој и производство на дозирани форми

Фармацевтските дозирани форми се комбиниран систем од активна супстанција и голем број материјали за олеснување на администрацијата и производството. Општо земено, дозираните форми се цврсти, течни, раствор за инјекции, спреј за нос, крем или маст, кои заеднички се нарекуваат конвенционални дозирани форми. Во прилог на овие

повеќе традиционални форми, сега на пазарот е прифатен понов технолошки напредок, нови начини на администрација на производи и подобри начини за постигнување усогласеност на пациентите. Овие производи вклучуваат нови системи за испорака на лекови, како што се контролирана или одржлива испорака на лекот, трансдермални фластери, назална испорака и таргет специфично место на испорака на биотехнолошки производи. Студиите на предформулација како извор на информации за развојот на дозата на производот се клучен елемент за успехот на производот.

5.2.7. Воспоставување QA/QC систем

Да се воспостави гаранција за квалитет, контрола на дозирани форми, почнувајќи од клиничкото испитување до производството и воведување на производот на пазарот, мора да се наметнат низа операции и тестирање на производот за усогласеност со спецификациите и упатствата за квалитетно работење, со цел да се обезбедат атрибутите на производот. Повремено спецификациите може да се ревидираат поради нови докази откриени во континуираната студија за предформулирање. Првиот чекор во процесот на развој на производот е воспоставување спецификации по истражувањето за да се донесе производот на пазарот. Спецификациите се дефиниција за квалитет на еден производ (дозирани форми или сродни материјали за производство) врз кои се прифаќа пазарна дистрибуција и продажба. Податоците за утврдување спецификации на фармацевтски производи за двете лековити супстанции и дозираните форми се дефинирани според идентитетот, чистотата, јачината и квалитетот добиен од студијата за предформулација.

5.2.8. Подготовка на апликација за нов лек

Апликацијата за регистрација на нов лек во основа е барање на производителот до регулаторните органи. Преку апликацијата/досието за регистрација производителот дава гаранција за посветеноста на фирмата во процесот на производство, квалитет и активности за развој на лековите. Некои информации што се вклучени во досието за регистрација можеби се поднесени порано во апликацијата за откривање на новиот лек, но со дополнителни и ревидирани информации. Вклучени се податоци и информации од производните чекори, контролата, неклиничка фармакологија и токсикологија, фармакокинетика и биорасположливост, микробиологија, клинички и статистички делови, формулари и табели за извештаи за случаи и примероци и етикетирање.

Скратена апликација за нов лек е апликацијата за дуплирање на лек производ кој регулаторниот орган претходно го одобрил. За поднесување потребни се податоци само за контролата и квалитетот на производот. Дел од тие информации може да се извадат од студиите на предформулација, без податоци од скапи клинички испитувања. Но потребно е да се докаже биорасположливоста кај луѓето. Во некои случаи ова барање може и да се замени со студија *in vitro* растворливост.

5.3. Значење и улога на студиите на предформулација

Предформулацијата е проучување на хемиските и физичките својства на компоненти на лекот пред процесот на формулација. Целта на студијата е да се разберат природата и карактеристиките на секоја од компонентите и да се оптимизираат условите за производство на дозирана форма. Пред развојот на формулацијата мора да се генерираат податоци за предформулација, да се дефинираат физичко-хемиските својства на компонентите во насока да се помогне развојот. Треба да бидат вклучени интеракциите помеѓу активната супстанција и употребениот ексципиенс во формулацијата, што резултира со интелегентни избор на ексципиенси. Прелиминарните профили на деградација на активната супстанција се вклучени во студијата со цел дизајнирање на формулацијата на стабилен производ. Исто така, вклучени се аналитичките карактеристики (аналитичките профили) на компонентите. Проучувањето на оваа тема го помага развојот на процесот и мониторингот во текот на развојот на формулацијата. Водачите издадени од регулаторните органи како и Меѓународната конференција за хармонизација (ICH) ги

препорачуваат студиите на предформулација, каде програмата е заснована на научно знаење, индустриско искуство и квалитет, обезбедување информации за оптимален развој на формулацијата, подобрување и проширување на производот. Научните и регулаторните оправдувања за стекнатото знаење од податоците од изведените студии на предформулација вклучуваат следно:

- Воспоставување спецификации за лекови наменети за токсиколошка евалуација и препарати за клиничко испитување;
- Формулирање клинички пилот проби и воспоставување на нивните прелиминарни спецификации;
- Обезбедување научни податоци за поддршка на развојот и евалуацијата на дозираната форма за ефикасноста, квалитетот, стабилноста и биорасположливоста на производот;
- Евалуација на стабилноста на рано развиените дозирани форми;
- Исполнување на регулаторните барања за регистрација на развиените дозирани форми.

5.4. Фази на студии за предформулација

Навремената достапност на податоците од предформулацијата е од клучно и суштинско значење за успешен развој. Може да дојде до одложен напредок доколку податоците не се достапни навреме. На пример, пред ослободување на лекот мора да се утврдат спецификациите за тестирање заради безбедносна евалуација. Физичките својства, како што се точката на топење и ултравиолетовиот спектар за активната супстанција и нејзините онечистувања се од суштинско значење за поставување на прелиминарната спецификација. Првичните податоци може да бидат едноставни, но треба да го поддржуваат распоредот на развојниот циклус. За да се исполни барањето за навремено објавување на податоците од предформулацијата, може последователно да се објавуваат посебни извештаи и да се дистрибуираат повремено (се предлага тие да бидат објавени во три дела во различни фази од развојниот циклус). Тие може периодично да се ревидираат како што напредува развојот. Преформулацијата се изведува во неколку фази со различни развојни циклуси, кои се дискутирани во продолжение.

5.4.1. Физичко-хемиски својства и аналитичко тестирање на активна супстанција

Ова ниво на предформулација е почетокот на развојниот циклус. Податоците се состојат од физичко-хемиските својства и аналитичките својства на активната супстанција што се корисни во развојот на аналитичките методи за евалуација на квалитетот на материјалот и тестирање за прифаќање на развиената формулација. Во раната фаза на развој достапноста на материјалот е ограничен, па поради недостатокот на количини може да влијае на квалитетот на добиените податоци. Како што развојниот циклус оди напред, податоците треба да се ажурираат или докажат со користење на повеќе комплицирани и точни методи. Дел 1 од извештајот за предформулација може да биде објавен пред утврдувањето на спецификациите. Делот од овој извештај кој се состои од аналитички податоци може да биде познат како „аналитички профил“.

5.4.2. Податоци кои го поддржуваат развојот на дозираната форма

Пред развојот на формулацијата мора да се генерираат обемни податоци за да помогнат при производствениот процес. Потребни се податоци за стабилноста, компатибилноста и карактеристиките на цврста состојба на активната супстанција за да се поддржи развојот на производот и понатамошното подобрување. Изборот на соодветни методи за евалуација на дозираната форма исто така се смета како дел од студиите за предформулација. Евалуацијата на дозираната форма се базира на: фармацевтско тестирање (трошливост, цврстина, распаѓање и растворање итн.), микробиолошко тестирање и студии за биорасположливост. Дел 2 од извештајот за предформулација вклучува ревидирани податоци од претходниот извештај.

5.4.3. Поддршка за контрола на квалитетот и производството на готов производ

Во дел 3 од извештајот вклучени се претходно објавените податоци за предформулацијата, со додавање ажурирана докуменатција за примената на напредните техники. Ревидираните фармацевтски податоци се спецификациите и аналитичките методи на развиениот производ. Делот 3 од предформулацискиот извештајот мора да биде објавен пред да се финализира производот на пазар.

5.5. Студија за предформулирање за лекови и производи за здравствена заштита

Насоките и форматите за студија за предформулирање опишани во ова поглавје се општо применливи за различни производи за здравствена заштита, вклучувајќи конвенционални лекови, биотехнолошки производи и додатоци во исхраната. Поради уникатната физичко-хемиска природа и физиолошката активност на производите, понекогаш може да биде потребна модификација на студијата да се добијат значајни податоци за развојот на потенцијалните производи и/или дозирани форми. Во фармацевтската индустрија различни производи се произведуваат врз основа на следните класификации:

- Регулаторна класификација, како што се лекови на рецепт, генерички лек, производи без рецепт (OTC), биотехнолошки производи, додатоци во исхраната;
- Физичка класификација, како што се цврсти материи, орални течности, полуцврсти материи и парентерални производи;
- Класификација на дозирани форми според употреба за луѓе или животни.

5.6. Извештај од спроведени студии на предформулација

Содржината за студиите на предформулација се генерално пошироки од оние што се наоѓаат во објавените статии или конвенционалните учебници. Во извештајот треба да бидат вклучени следните информации за:

- Аналитичките профили (потребни за развој на аналитички методи);
- Хемиските својства;
- Термодинамичките и физичко-хемиските својства;
- Фармацевтските и механички својства;
- Карактеристиките на цврстата состојба;
- Биофармацевтските својства;
- Студиите за компатибилност на ексципиенси;
- Стабилноста.

5.6.1. Аналитички профили (потребни за развој на аналитички методи)

Мора да се развијат аналитички профили на API уште во раните фази на развој на лекот, веднаш по изборот на супстанцијата кандидат (PhRMA, 2000). Податоците се потребни за да создадат аналитички методи за утврдување на чистотата, квалитетот на лекот, ослободувањето и контролата и прелиминарната евалуација на стабилноста. Толкувања за структурата и користените методи можат да бидат вклучени во аналитичките профили (Rosenstock, 1998).

5.6.1.1. Идентификација на API

Идентификација на API е отпечаток од прст на материјал. Ова осигурува дека правилниот материјал се користи за биолошко тестирање, фармацевтска истрага и производство. Инфрацрвената спектроскопија најчесто се користи за оваа намена. UV спектроскопија на испитување на материјалот во воден или алкохолен раствор е пригоден метод за идентификација. Блиска инфрацрвена спектроскопија (NIR) се здоби со популарност за идентификација, и воедно е недеструктивна техника. TLC можеби е најзгоден и најмалку скап метод за такво тестирање за идентификација. Потребна е основна опрема, реагенс и техники и е идеален за лаборатории со ограничени ресурси.

Друго едноставно определување за идентификација на API е точката на топење. Пософистицирана техника е диференцијалната скенирачка калориметрија. Карактеристиката на топење може да се користи за идентификација, а особено е погоден за полиморфен систем. За идентификација на хидрати или солвати се користи термичка гравиметриска анализа (TGA). За идентификација на хирални компоненти се користи оптичка ротациона дисперзија (ORD) или може да се користат техники на кружен дихроизам (CD). HPLC со соодветната колона може да се користи најефективно за идентификација на хирално соединение и за квантификација на сродни и деградациони производи (Gilpin & Pachla, 2001). Истовремено може да се утврди идентификација на компонента на лекот според времињата на задржување во хроматограмот. Може да се добијат слични податоци и со гасна хроматографија.

5.6.1.2. Чистота, производи на деградација и резидуални растворувачи

Најчистиот материјал генерално се смета како референтен стандард и се користи за одредување на чистотата на API со компаративен UV спектроскопски метод. Сепак, прецизноста на UV методот може да не е висока во некои случаи. Титрациите, како што се киселинско-базната или оксидативната, се конвенционални за одредување на јачината, моќта или чистотата на API. Потенциометриски методи со користење автоматски титратори за неводена титрација најчесто се користат во лабораторијата за контрола на квалитетот. Титрацијата применета како метод за мерење на чистота на API е ограничена бидејќи може да титрира само една функционална група како киселина или база. Друг пристап за мерење на чистотата е квантитативно да се одредат онечистувањата со хроматографија. Најдобро може да се открие присуството на онечистувањата со TLC, HPLC или GC. Квалитативно, чистотата може да се открие со топење и ладење. Колку е почиста супстанцијата, толку е потесен опсегот на топење.

5.6.1.3. Апсолутна чистота

Во повеќето случаи чистотата на фармацевтската супстанција се одредува со споредба на референтниот стандард со познатата доделена чистота. Но, од друга страна, кога не е достапен референтен стандарден примерок, чистотата се одредува со апсолутен метод во кој пресметаниот резултат се заснова на теорија, а не со компаративен метод. Чистота утврдена со аналитички методи, како што е анализата на растворливост во фаза или калориметрија со диференцијално скенирање (DSC), е познат како апсолутна чистота.

5.6.2. Хемиски својства

Хемиската структура е воспоставена порано во фазите на откривање, веднаш откако супстанцијата се синтетизира, со цел да се обезбеди интегритет на супстанцијата. При утврдување на својствата се вклучуваат: хемиска структура, молекуларна тежина и емпириска формула. Елементарната анализа (C, H, N, O и Cl) ја потврдува емпириската формула; на тој начин прво се добива молекуларната тежина, по што следи разјаснување на структурата со спектроскопски техники. Методите кои најчесто се користат за структурната карактеризација се нуклеарно-магнетна резонанца (NMR) и масена спектрометрија (MS). Исто така се користат конвенционалните методи како инфрацрвена (IR) спектроскопија и методи за карактеризација на хиралните својства како што се ORD или CD. Податоците за разјаснување на структурата треба да бидат вклучени во предформулациски извештаи, а толкувањето и заклучоците може да бидат пријавени на ист начин како оние објавени во аналитичките профили на супстанцијата на лекови и помошни супстанции.

5.6.3. Термодинамички и физичко-хемиски својства

5.6.3.1. Константа на дисоцијација, pK_a

Во развојот на течни формулации, подобрувањето на растворливоста е клучна задача за формулаторот бидејќи повеќето лековити супстанции не се растворливи во вода. За јонизирани супстанции, како што се киселини или бази, растворливоста при дадена рН вредност може да биде проценета ако е позната pK_a . Од друга страна, растворливоста на нејонизирана супстанција не е под влијание на рН вредноста и зголемувањето на растворливоста ќе зависи од ко-растворувачот или средството за растворање. Константата на дисоцијација се пресметува според Хендерсон-хаселбалховата равенка:

$$pK_a = pH - \log\left(\frac{A^-}{HA}\right) \quad [7]$$

Каде:

- A^- – јонизиран дел;
- HA – протониран дел.

Кога A^- е еднакво на HA , односно $\frac{A^-}{HA} = 1$, последниот член од равенката испаѓа. Така, pK_a на лекот од интерес е рН вредноста од соодносот на јонската концентрација. Вообичаени методи за определување на pK_a врз основа на Хендерсон-хаселбалховата равенка се: UV спектрометриското определување, определување со титрација и одредување на растворливост.

5.6.3.2. Растворливост

Растворливост е концентрација на супстанција во заситен раствор на дадена температура и се однесува на термодинамичките својства на молекулата на лекот. Во концептот на апсорпција на лекови, испораката на молекулата на лекот во системската циркулација бара транспорт преку GI мембраната. Механизмот на дејство е регулиран со растворање и интестинална пропустливост на молекулата на лекот. Движечката сила на растворање е водната растворливост на неговата молекула: колку е поголема растворливоста (поголема хидрофилност), толку е поголема брзината на растворање. Последователно, пенетрацијата на липидната мембрана зависи од липофилноста на лекот молекула, која може да биде во корелација со вредноста на коефициентот на распределба. Ефикасната апсорпција зависи од правилната рамнотежа помеѓу овие две спротивни својства. Студијата за карактеристиките на растворливост генерално се спроведува во рана фаза, бидејќи тоа влијае на дизајнот на дозирање, особено во таблети или капсули. Предложено е дека растворливост помала од 1% (10 mg/mL) во опсег на рН од 1 до 7 на 37°C може да резултира со проблеми со апсорпцијата. Слаба биорасположливост на дизајнот на дозираната форма може да се претпостави со едноставно определување на растворливост. Конверзијата на супстанцијата, како и формирањето сол, може да го избегне проблемот.

5.6.3.3. Солубилизација

Солубилизацијата е зголемување на растворливоста на слабо растворливи во вода супстанции со површински активни агенси. Механизмот вклучува заробување на молекулите во мицели и тенденцијата на сурфактанти за да се формираат колоидни агрегации на критични нивоа на мицелна концентрација. Така, критичната мицелна концентрација е минималната концентрација на сурфактант при што започнува растворливоста на нерастворливата молекула. Зголемување на концентрацијата на мицели доведува до зголемување на растворливоста на лекот. Некои најчесто користени сурфактанти одобрени за употреба за парентерални производи се: полисорбат 20, 40 и 80; натриум деоксихолат; монопалмитат; полиоксиетилирани супстанции на масни киселини, ричиновото масло и сорбитол. За течни дозирани форми на лекови нерастворливи во вода, растворливоста е важна алатка во студиите за предформулација за избор на сурфактанти. При изборот на сурфактанти мора да бидат

вклучени студии за токсичноста, стабилноста, физиолошките ефекти (пропустливост во гастроинтестиналниот тракт) и влијанијата врз другите фармацевтски конзерванси, како што се антиоксидантите и средствата за боење.

Мицеларната растворливост е моќна алтернатива за растворање на хидрофобни лекови во водени средини. Тоа е процес на инкорпорирање на растворот во или на мицели. Растворувањето може да се случи во систем кој се состои од растворувач, асоцијативен колоид (колоид кој формира мицели) и барем уште еден растворувач.

Солубилизацијата се разликува од растворувањето бидејќи добиената течност е колоидна дисперзија која вклучува асоцијативен колоид. Затоа, проучувањето на сурфактантите и нивната улога во фармацијата е од огромно значење, особено во однос на нивната способност да раствораат хидрофобни лекови.

5.6.4. Фармацевтски и механички својства

5.6.4.1. Хигроскопност и апсорпција/десорпција на влага

Хигроскопност е способност на цврстите материји да апсорбираат вода на нивните микроскопски површини. Стапката на апсорпција и рамнотежната количина на апсорбираната вода зависат од релативната влажност на атмосферата. За цврстите материји важно е да се знае дали материјалот што се проучува е хигроскопски. Така, чекорите кон сушење и складирање, како што е контролата на влажноста во производството и средините за пакување ќе треба да се воспостават за да се избегнат тешкотии во производството и проблеми со нестабилноста. Апсорпција/десорпција може да се утврди со мониторинг, така што примероците се складираат во сушачи со различни релативна влажност (заситени раствори на сол кои даваат различни проценти на релативна влажност). Количината на присутна вода се одредува преку губиток при сушењето (LOD), TGA, Карл Фишер титрација, NIR. Во студијата за предформулирање, разбирањето на физичко-хемиските својства во однос на интеракцијата вода-цврста површина е корисна за ракувањето, формулацијата и производство на готовите производи.

5.6.4.2. Карактеристики на гранулат

Цврсти дозирани форми како што се таблети или некои капсули се составени од поединечната маса на активни супстанции и ексципиенси, како што се полнителни, дезинтегратори, лубриканти итн. Физичката интеракција на овие материјали придонесува за изработка на прифатлив процес и добар производ. Разбирањето на карактеристиките на гранулатот ќе биде корисен во развојот на процесот на формулација.

5.6.4.3. Униформност на мешање

Мешањето е критичен процес во производството на дозирани форми, особено во производството на таблети и капсули. Таблетите или капсулите подготвени од мешавина што е лошо измешана со активни состојки и ексципиенсите може да паднат на тестот за контрола на квалитетот при испитување на униформноста на содржината на дозираните форми. Границата на прифаќање според фармакопеите се заснова на пресметката на индивидуална анализа од 10 таблети со еднаква релативна стандардна девијација до или помалку од 6%. Неисполнувањето на критериумите резултира со отфрлање на произведената серија. Како резултат на регулаторна одлука, предложениот тест за униформност на мешавината е барање за контрола во процесот на производството за некои цврсти дозирани форми. Границата на прифаќање на униформноста на мешавината моментално е иста како онаа на униформноста на содржината за готовиот производ. Идејата во текот на процесот да се комбинираат двата теста за униформност ќе даде дополнителна гаранција дека серијата на производот ќе ги исполни тестовите за униформност на содржината ако смесата е хомогена. Тешкотии во студијата на униформност се јавува кога се користат различни типови на уреди за земање примероци. Правилниот избор на техники за земање примероци влијае на пресметковна вредност на релативната стандардна девијација на

гранулатот, односно на индикацијата за хомогеност. Во многу случаи во текот на производството релативната стандардна девијација на униформноста на гранулатот се покажала дека е неприфатлива и во тој случај серијата би требало да биде отфрлена. Но од друга страна, пак, таблетите подготвени со тој гранулат неочекувано го исполниле тестот за униформност на содржината.

5.6.5. Карактеристики на цврста состојба

Поради промената на термодинамичката сила, метастабилната цврста состојба (најенергетската состојба) може да се претвори во стабилна форма (најмалку енергетска состојба). Се верува дека метастабилната цврстина има поголема физиолошка активност бидејќи има поголема тенденција за бегство, што резултира со поголема растворливост. Метастабилната цврстина може да биде материјал на избор врз основа на претпоставка за неговата биорасположливост. Сепак, овој метастабилен материјал е во високоенергетска состојба и на крајот ќе се врати назад во стабилна состојба. Во цврсти дозирани форми - таблети, капсули и прашоци, модификацијата на физичките својства на активната супстанција може многу да влијае на неговите физиолошки перформанси (Carstensen, 1993). Така, термодинамички промени во кристалните структурите на даден лек може да влијаат на физичките својства на цврстиот лек (Gordon & Balasubramanian, 1999). Овој кристално модифициран материјал може да има различна растворливост и физичка стабилност, што резултира со промена во терапевтската вредност.

5.6.6. Биофармацевтски својства

Терапевтските перформанси на фармацевтската дозирана форма, особено орални цврсти дозирани форми, кои вклучуваат поголем дел од лековите производи, во голема мера зависи од биофармацевтските својства на API. Биофармацевтската може да се дефинира како проучување на некои од физичките и хемиските својства на лекот и неговите дозирани форми, заедно со биолошките ефекти забележани по администрацијата на лекот во различни дозирани форми. Овие својства вклучуваат растворање, кристална структура, степен на растворливост, коефициент на распределба и пропустливост. За орална апсорпција на таблета или капсула, кинетиката на апсорпција е контролирана со два механизми: растворање на дозираните форми и пропустливоста на молекулата на лекот низ гастроинтестиналниот тракт. За таблета или капсула која бавно се раствора, стапката на растворање е ограничувачки фактор во апсорпцијата. Кога растворањето е брзо, пропустливоста е ограничувачки фактор во апсорпцијата.

5.6.6.1. Коефициент на распределба

Коефициентот на распределба е мерка за липофилноста на лекот и индикација за неговата способност да ја премине клеточната мембрана. Се дефинира како сооднос помеѓу нејонизираниот лек дистрибуиран помеѓу органските и водените слоеви во рамнотежа. Иако коефициентот на распределба сам по себе не дава информации во однос на апсорпцијата, ја карактеризира липофилно-хидрофилната рамнотежа на лекот и го поддржува скринингот на соединенијата за нивните биолошки својства.

5.6.6.2. Пропустливост во ГИТ

Пропустливоста е способност на молекулата да се транспортира преку GI бариера. Разбирањето на *in vitro* пропустливоста на лекот овозможува предвидување на орална апсорпција и оттука и неговата биорасположливост. Лекот се апсорбира преку дифузија низ низа посебни бариери каде што единствениот слој на епителните клетки е најзначајната бариера за апсорпција. Многу *in vitro* методи се развиени за проучување на овој феномен. Коефициентите на пропустливост во однос на степенот на апсорпција на лекови од страна на човекот се дадени во Табела 9.

Табела 9. Коефициенти на пропустливост во однос на степенот на апсорпција на лекови од страна на човекот (Yoshimura et al., 2018)

Апсорпција на лек	Апсорпционен коефициент
Целосно апсорбиран	$> 1,0 \times 10^{-16}$ cm/s
Апсорбиран повеќе од 1%, но помалку од 100%	$0,1 - 1,0 \times 10^{-16}$ cm/s
Апсорбиран помалку од 1%	$< 1,0 \times 10^{-7}$ cm/s

Овој систем е широко користен во фармацевтската индустрија како ефикасен модел за предвидување на апсорпцијата на лекот. Други предности се:

- Потенцијал за автоматизација, роботска работа, висока исплатливост и скратено време на развој;
- Минимална употреба на животни за експериментирање, во моментов чувствително прашање во општеството;
- Мали количини на API се користат за повеќекратно тестирање;
- Развој на метод за потенцијален скрининг за тестирање на орална дозирана форма.

5.6.6.3. Степен на растворливост

Определувањето на степенот на растворливост е наследник на тестот за дезинтеграција, наменет за контрола на квалитетот на цврсти дозирани форми, како што се таблети и капсули (Carstensen, 1993). Тестовите за дезинтеграција се поедноставени каде дозираните форми мора да се распадат во мали гранули пред апсорпција. Во реалноста, тестот за дезинтеграција е добра алатка за контрола на квалитетот на таблетите со ентерично обложување, што ја тестира способноста на обложената таблета да се спротивстави на распаѓање во симулирана ГИТ средина. Кај тестот за испитување на степенот на ослободување на API, таблетата се става во чаша исполнета со течности за растворање, што може да бидат вода, симулиран гастричен сок (без ензим) или разредена хлороводородна киселина. Течноста за растворање се одржува на константна температура од 37°C за да ги имитира физиолошките состојби. Во студијата за предформулација, знаењето за растворливоста на лековитата супстанција е од суштинско значење за развојот на дозирана форма за да се постигне оптимална биорасположливост и клинички перформанси. Ослободувањето на API од формулацијата може да се нарече внатрешна растворливост. Првичната идеја за одредувањето на *in vitro* степенот на растворливост беше да корелира со *in vivo* степенот на апсорпција. Проучување на полуживотот на степенот на растворливост и степенот на апсорпција кај таблетите на ацетилсалицилна киселина се покажаа како добро корелирани. Бидејќи концептите на кинетиката на апсорпцијата, дистрибуцијата, метаболизмот и елиминацијата (KADME) не беа добро разбрани, како и поради други технички потешкотии во раните фази на фармацевтскиот развој, *in vitro* растворливоста и *in vitro* апсорпцијата не успеаја да се поврзат и имало помал интерес за воспоставување на нивна корелација. Последователно, тестовите за растворливост првенствено се користеа како алатка за контрола на квалитетот на цврстите дозирани форми. Со доаѓањето на фармакокинетиката, пријавени се сè повеќе и повеќе студии за корелација. Покрај примената на тестовите за растворливост во контролата на квалитетот, може да се прошири и биорасположливоста на производот. Така, одредена корелација помеѓу *in vivo* растворливоста и *in vitro* апсорпцијата треба да се утврди во предформулациската фаза за да помогне во логичкиот развој на дозираните форми.

5.6.7. Студии за компатибилност на ексципиенси

Изборот на ексципиенси, како што се разредувачи, врзивни средства, дезинтегранти, лубриканти, лизгачи итн. се одредува порано од студијата за предформулација, врз основа на резултатот од студиите на експериментите за компатибилност. Формулирањето на дозирана форма, особено во цврсти дозирани форми како таблети или капсули, бара познавање на хемиската интеракција на

супстанцијата на лекот со помошните средства. Помошните супстанции може да бидат многубројни во производот, бидејќи тие служат како функционални агенси на производниот процес. Експципиенсите го олеснуваат протокот на гранулатот и операцијата за компресирање на таблетите, но и го обезбедуваат производот со добра биорасположливост и добра прифатливост од пациентот. Експципиенсите присутни во таблетите се средства за зголемување и полнење, дезинтегрирачки средства, средства за подмачкување, средства за боење, средства за маскирање на вкусот и стабилизатори. Тие може да се најдат во количини поголеми од оние на активната супстанција или во помали количини. Студијата за компатибилност се фокусира на бинарна мешавина на супстанција за лекови и некои избрани експципиенси во фиксен сооднос со или без додадена влага. Бинарната мешавина се чува на покачена температура во затворени ампули. Интеракцијата помеѓу API и експципиенсите може да се определи со техники како што се TLC, HPLC и DSC. Поради неговата едноставност и практичност, се користи DSC екстензивно и неселективно како скрининг метод за компатибилност. Сепак, доказите за валидноста на методот DSC во споредба со други аналитички техники за студии за компатибилност на експципиенси мора да бидат добро воспоставени пред прифаќањето на овој метод за скрининг цели. За разлика од вообичаената практика на проучување на интеракцијата помеѓу лек супстанција и експципиенси, како што е опишано погоре, предлог е дека подготовката на првичните формулации за скрининг стабилноста на дозираните форми е позначаен и поекономичен од тестот за компатибилност со експципиенси во мешавини во прав.

5.6.8. Стабилност

Во студијата на предформулација намерата да се започне со евалуација на стабилноста е да се дефинира систем кој ги идентификува потенцијалните деградациони производи и вклучува аналитички методи за нивно квантитативно мерење (Wells, 1988). Последователно, овој систем се користи и за следење на процесот на деградација на API сама по себе или во дозирана форма за одреден временски период. Познавање на деградационите видови и присутната количина е важна за обезбедување на безбедноста на производот. Ако кинетиката на деградација е последователна реакција, деградациониот производ присутен во производот за време на неговиот рок на траење може да не биде идентификуван. Дополнителна предност е создавањето графички приказ за степенот на деградација, која може да биде од клучно значење за формулаторот. За да се утврди профилот на деградација на новиот лек, се изведуваат и форсирани студии на деградација како што се хидролиза, оксидација и фотодеградација и се применуваат на API за да се генерираат производи на деградација кои може да се следат со сепративните техники. Секој производ на деградација во текот на хроматографскиот процес може да се изолира како поединечна компонента и да подложи на карактеризација и разјаснување на структурата. Овие производи на деградација треба да се синтетизираат за други студии, како при определување на токсиколошката способност. Студијата за забрзана стабилност, базирана на проучување на степенот на деградација често се користи за предвидување на деградационите патишта. Се ставаат примероци од лекови на програмата за стабилност и примероците се чуваат под различни стресни услови: температура на 5°C, 25°C (температура на околината), 50°C и 75°C, и 75% релативна влажност или поголема, онаму каде што е соодветно. Примероците се изложени на различни бранови должини на електромагнетното зрачење во UV и видливи опсези (190-780 μm), по можност во отворени контејнери. Времето на складирање на примерокот треба да се определи така што секоја деградација може адекватно да се карактеризира, т.е. со доволна фреквенција за одредување со разумен степен на доверба на кривата на деградација.

6. РАЗВОЈ НА АНАЛИТИЧКИ МЕТОД

Потребни се бројни методи за документирање на идентитетот, јачината, квалитетот, чистотата и моќта на лековите супстанции и лековите производи. Спецификациите може да вклучат:

- Опис;
- Идентификација;
- Анализа на содржината;
- Тестови за органски процесни онечистувања, неоргански онечистувања, производи за деградација, резидуални растворувачи и екстракти од контејнери;
- Тестови за различни физичко-хемиски својства, хирална чистота, содржина на вода, униформност на содржината и антиоксиданси и содржина на антимицробни конзерванси;
- Микробиолошки тестови;
- Тестови за распаѓање/растворливост;
- Тестови за цврстина/трошливост;
- Тестови за големина на честички и полиморфна форма.

Одредени тестови може да се исклучат или да се додадат дополнителни тестови, како што е наложено според хемијата на активната фармацевтска супстанција (API) или дозираната форма. Поради варијабилноста во специфичните тестови, потребни за целосно карактеризирање на фармацевтските производи, тешко е да се обезбеди сеопфатна дискусија за решавање на сите аспекти на фармацевтскиот развој. Сепак, потребните тестови широко се поделени во следните три главни категории:

- Тестови кои се однесуваат на карактеризација на цврстата состојба;
- Дополнителни тестови наведени во регулаторната фармакопеја;
- Квантитативни тестови за карактеризирање на API и составот на готовите производи.

Карактеризацијата на цврста состојба е обработена во претходното поглавје. Компендијалните методи се опишани во меѓународните фармакопеи и за нив подоцна ќе дискутираме. Дополнителните методи треба да се имплементираат, како што е напишано, освен таму каде што се неопходни научно оправдани промени. Иако се направени значителни напори за стандардизирање на компендијалните методи, во моментов постојат разлики помеѓу Фармакопеја на Соединетите Американски Држави (USP) и други фармакопеи. Во овие случаи тестирањето треба да се направи во согласност со процедурите опишани во фармакопејата со која се уредува земјата или регионот за кој производот е наменет. Фокусот ќе биде елаборирање на развојот на методот, како и размислувања за квантитативни тестови за карактеризирање на API и готовиот производ, составот на производот, сè со цел обезбедување на квалитетот на производот.

6.1. Преглед на методите за разделување

Квантитативните тестови се засноваат на мерење одредени компоненти и/или сродни супстанции присутни во примерокот и, како резултат на тоа, потребна е изолација или одвојување на целните аналити. Со оглед на тоа што сè почесто се наметнува потребата од квантификација на поединечните компоненти и нивна изолација, сè почеста е употребата на процедурите за одвојување, заедно со соодветно откривање заради можност од следење на поединечните аналити од интерес. Ова е особено моќен пристап бидејќи примената на квантитативните мерења може да се направи од една анализа на примерокот. Со користење на оптимизирани процедури за разделување може да се следи содржината на API, органски синтетските процесни онечистувања и производите на деградација само со едно определување. Слично на тоа, повеќе резидуални растворувачи може да се квантифицираат во една анализа. Хемиските сепарации се постигнуваат со употреба на хроматографија и, во многу

помала мера, електрофоретски методи. Кај хроматографските методи сепарацијата се заснова на варијација во дистрибуцијата на различни соединенија помеѓу две различни фази - стационарна фаза и мобилна фаза (Nogare & Juvet, 1962). Електрофоретските процедури се засноваат на одвојување според разликите во подвижноста на анализите во спроводлива течност медиум подложен на електрично поле. Растворените материји се одвојуваат врз основа на разлики во нивните хидродинамички соодноси на големина и полнење (Skoog et al., 2022).

Иако TLC одржува одредена применливост, далеку најчести методи на сепарација кои се користат во современата лабораторија за фармацевтска анализа се HPLC методите (Szepesi & Nyiredy, 1996; Snyder et al., 1997). Хроматографски методи кои користат течност како мобилна фаза се нарекуваат методи на течна хроматографија (LC), додека користењето гасови како мобилна фаза се нарекува гасна хроматографија (GC), а методите кои користат суперкритични флуиди како мобилна фаза се нарекуваат суперкритична-течна хроматографија (SFC). Кај HPLC методите раздвојувањето се врши или со користење на колона наполнета со стационарна фаза или со користење на капилара обложена со стационарната фаза на капиларниот ѕид. Во пракса HPLC во капилар форматот покажа ограничена корисност поради побавната дифузија на растворени материји во течности наспроти гасови и суперкритични течности. Примарната цел на хроматографските сепарации е да се одвојат компонентите (од интерес) во примерокот. Условот на раздвојување е постигнат кога резолуцијата (R_S) помеѓу поединечните компоненти е поголема од нумеричката вредност од 1,5 т.е. 2,0.

Сите хроматографски сепарации работат на истиот принцип: распределбата на растворената супстанција помеѓу две различни фази - подвижна фаза и стационарна фаза. Во секоја постапка примерокот се внесува во едниот крај на колоната и мобилната фаза ги транспортира компонентите на примерокот кон другиот крај на колоната. Во отсуство на интеракција со стационарна фаза, сите компоненти ќе излезат од другиот крај на колоната по одредено време, t_0 , врз основа на волуменот на колоната и брзината на проток на мобилната фаза. Ако се случува интеракција во стационарната фаза, времето потребно за растворената супстанција да се елуира од колоната би го зголемило времето што растворената супстанција го троши во асоцијација со стационарната фаза (t'_R). Односот на t'_R/t_0 е директно пропорционален на коефициент на дистрибуција помеѓу стационарната фаза и мобилната фаза и се нарекува фактор на капацитет (или фактор на задржување), k' . Односот на k' 's од две растворени материји што треба да се одвојат, k'_2/k'_1 , соодветно, се нарекува селективност, α . Примарна цел во хроматографијата е да се максимизира α или, наједноставно изразено, да се воспостават услови со кои разликата во коефициентите на дистрибуција на соединенијата што треба да се издвојат е максимизиран. Покрај оптимизирањето на термодинамичките параметри k' и α , исто така е важно е да се минимизира дисперзијата (проширување на лентата) на секоја растворена супстанција како што мигрира низ колоната за да се осигура дека нема да се добијат штетни секундарни интеракции во текот на процесот на миграција. Секундарни интеракции се забележани кога пиковите имаат „опаш“ и вообичаено кај HPLC и SFC се контролираат со додавање хемиски адитиви во мобилната фаза. Феноменот на дисперзија се нарекува ефикасност на сепарација (N) и е мерка за варијансата во ширината на пикот во функција на времето додека растворената супстанција мигрира низ колоната. Ефикасноста на сепарација (N) се нарекува и број на теоретски подови. За спакувана HPLC колона, N се зголемува како што се зголемува должината на колоната или се намалува големината на честичките. Во практични работни услови, N се намалува со зголемување на брзината на проток на мобилната фаза. Сепак (особено за течна хроматографија), постојат ограничувања на апсолутната должина, дијаметарот на честичките и протокот што може да се користи за дадено одвојување поради генерираниот притисок со текот на мобилната фаза низ системот.

Резолуцијата, претходно опишана како степен на одвојување помеѓу компоненти, може да се изрази во однос на k , α и N , како:

$$R_S = \frac{N^{1/2} k' \alpha - 1}{4 k' + 1 \alpha} \quad [8]$$

Од оваа равенка за резолуција може да се забележи дека погодени хроматографски процедури може да се развијат со прилагодување на k , α и N за да се добие резолуција од 2,0. Во примери каде што разликите во коефициентите на распределба на компонентите што треба да се издвојат се толку големи што компонентите не можат да се елуираат под истите услови во разумен временски период, можно е да се промени составот на мобилна фаза, температурата или притисокот. Параметарот што треба да се промени со текот на времето во голема мера зависи од тоа кој параметар најдоминантно го контролира раздвојувањето.

Во HPLC дистрибуцијата на растворената супстанција помеѓу мобилната фаза и стационарната фаза се регулира првенствено според поларитетот на мобилната фаза. Според тоа, можно е да се промени составот на мобилната фаза со текот на времето за да се обезбеди разумен коефициент на дистрибуција за секоја компонента во примерокот. Ова се нарекува градиентно елуирање.

Во GC, примарниот контролен параметар е температурата и тоа е можно со користење на температурно програмирање за да извршите раздвојување во разумна количина на време. При процесот на развој на метод и во насока на широкиот опсег на сепарациони техники, мора да се направи избор кој метод на раздвојување е најпогоден да одговори на задачата.

6.1.1. Течна хроматографија со високи перформанси

ICH водичите за „Онечистувања во нови активни супстанции и нови производи и придружните водичи за валидација на методот“ ја нагласуваат корисноста на HPLC техниката во фармацевтските анализи. Слободно може да се каже дека водичите беа првенствено напишани врз основа на можностите на HPLC техниката. Дополнително сведоштво за широката прифатливост на HPLC е дадено во една неодамнешна анкета за испитување на фармацевтски и козметички квалитет. HPLC моментално претставува 35% од сета употреба на инструментални анализи во фармацевтската и козметичката индустрија и останува најбрзо растечка техника во двете индустрии. HPLC обезбедува сигурна квантитативна прецизност и точност, доволна за да овозможи определување на API и сродните супстанции во ист циклус со користење на различни детектори, а може да се изведува на целосно автоматизирана инструментација. HPLC обезбедува одлична репродукцибилност и се применува на широк спектар на соединенија, но со правилен избор на хемизмот на HPLC колоната. HPLC вклучува реверзно/обратно-фазна и нормална фазна хроматографија за анализа на мали (<2000 Da) органски молекули, јонска хроматографија за анализа на јони, одвојување на полимери и хирална HPLC за определување со енантиомерна чистота. Бројни хемиски колони се достапни во рамките на секоја класификација за понатамошен развој на методот. Во нормална фазна HPLC задржувањето на растворените материи се заснова на дистрибуцијата на растворената супстанција помеѓу поларна стационарна фаза и неполарна мобилна фаза (обично мешавина од хексан и пополарен растворувач каков што е изопропанол). Елуирањето може да се зголеми со зголемување на количината на поларен растворувач во мобилната фаза. Кај реверзно-фазната HPLC задржувањето се заснова на дистрибуција помеѓу неполарна стационарна фаза и поларна мобилна фаза (обично мешавина од вода и ацетонитрил или метанол), а елуирањето се промовира со додавање помалку поларен растворувач во мобилната фаза. Со исклучок на екстремно поларните или јонизирани соединенија, кои не се подложни на HPLC во нормална фаза и екстремно неполарни соединенија, како што се одредени стероиди и природни производи кои не се подложни на HPLC со обратна фаза, двата начина на HPLC се потенцијално применливи за API и сродни супстанции.

Сепак, околу 75% на тековните HPLC анализи се вршат со користење реверзна фаза. Ова не е само поради безбедносните размислувања за користење неполярни растворувачи, туку и поради разлики во процедурите за подготовка на примероци потребни за нормална фаза наспроти HPLC со обратна фаза. Кај HPLC во обратна фаза филтратот од примерокот може да се инјектира директно на колоната. Растворените ексципиенси од дозираната форма генерално се пополярни од компонентите на интерес и не се задржуваат на стационарната фаза, а, следствено, не се мешаат со компонентите од интерес-API. Кај нормално-фазната HPLC се јавуваат проблеми со екстракција. Па така, употребата на нормално-фазната HPLC е применлива за анализа на API, но производот бара дополнителни размислувања за подготовка пред самата апликација на хроматографијата. За одвојување на хиралните молекули во нивните соодветни енантиомери, можни се неколку пристапи со HPLC. Тие вклучуваат дериватизација да се формираат дијастереомери, проследено со употреба на нормално-фазна или обратно-фазна HPLC или додавање реагенс за дериватизација во хроматографската мобилна фаза за да се формираат динамични дијастереомери за време на процес на сепарација. Алтернативно, може да се користат специјални колони подготвени со циклодекстрини или специфични хирални делови како стационарни фази.

Накратко, HPLC, особено реверзно-фазната HPLC, моментално е најсоодветен метод за исполнување на повеќето критериуми за квантитативна анализа во рамките на фармацевтската индустрија. Сепак, некои ограничувања сè уште постојат. Често е тешко да се изберат колони од различни производители кои обезбедуваат исти перформанси и затоа треба да се внимава при спецификацијата на типот на колоната за методот што треба да се извршува меѓулабораторски. Дополнителни разлики постојат помеѓу инструменти од различни производители и разбирањето на овие разлики често се потребни за успешен трансфер на методите. На пример, разликите во комората за мешање растворувачи до волуменот на главата на колоната во различни HPLC пумпи и употребата на мешање под низок наспроти висок притисок дава значајни разлики во градиентното елуирање. Разлики во волуменот на ќелијата на UV лампата и пропусниот опсег може да генерираат различни фактори на одговор на растворени материи и може да резултира со промени во линеарниот опсег и чувствителноста на методот. Наспроти проблемите со трансфер на методот, HPLC нуди помала ефикасност на сепарација отколку други техники на сепарација, како што е капиларна електрофореза (CE), GC и SFC. Всушност, обично е тешко да се издвојат повеќе од 15-20 соединенија во едно тестирање на HPLC кои бараат употреба на две или повеќе работи за сложени примероци. Како резултат на тоа, други техники продолжуваат да имаат значителен интерес. Нереално е да се замисли дека може да се развие единствен метод за определување на API и сродните супстанции и, во исто време, да биде оптимизиран за поддршка на сите фази на развојот во фармацевтската индустрија. Наместо тоа, треба да се развие тест метод, да се спроведе во контекст на критичко испитување на она за што методот ќе се користи за мерење и методот да покаже дека овие критериуми се исполнети. За методите во рана фаза регулаторните водичи се неспецифични, додека, за методите во доцна фаза, регулаторните очекувања обезбедуваат сеопфатен сет цели за изведба што треба да ги постигне методот.

Во раните фази на развојот на лекот клучниот услов за хроматографски метод е да се одвои новиот хемиски ентитет (NCE) од сите онечистувања од процесот на супстанцијата и деградационите продукти на активната супстанција и на производот. Многу е пожелно да се развијат два или повеќе ортогонални методи за да се користат заедно заради обезбедување колку што е можно поверодостојна идентификација на сродните и деградационите продукти. Ортогоналноста може да се постигне со користење методологии кои обезбедуваат различни механизми на раздвојување. На пример, HPLC со обратна фаза може да се користи во комбинација со CE, каде што сепарацијата е врз основа на односот полнеж-маса на растворената супстанција. Алтернативно, може да се развијат два посебни HPLC методи кај кои различна селективност се постигнува со користење различна стационарна/мобилна фаза во комбинација. Методите на рана фаза се погодни за евалуација на профилите на

онечистувањата, идентификување на производи на деградација добиени преку форсирна деградација и прелиминарните студии за стабилност и давање повратни информации на студиите на формулација. Методологиите се оптимизирани за откривање и идентификација на сродни супстанции и идеално треба да резултираат со разбирање на хемијата на активната супстанција за да се овозможи поставување спецификации за онечистувањата, како и за производите на деградација.

Во подоцнежните фази на развојот целта е да се развие *stability indicating* методи со кој се докажува стабилност на API и готовиот производ и истите треба да ги исполнат следните критериуми:

- Методите треба да ги разгледаат активната супстанција и синтетските процесни онечистувања и производите на деградација што може да потекнат од самата активна супстанција;
- Методите треба да ја одвојат активната супстанција, производите на деградација на готовиот производ, ексципиенсите и производите на деградација од ексципиенсите;
- Методите за готовиот производ не се потребни да ги следат производите што не се деградациони;
- Методите во доцна фаза треба да бидат оптимизирани за да бидат што е можно побрзи и поедноставни и да ги исполнуваат наведените регулаторни барања;
- Размислувањата во развојот на методот треба да биде во насока на способноста на методот и подготовката на примерокот целосно да се автоматизира и да се осигура дека методите се доволно робусни и чувствителни за да се овозможи трансфер во други лаборатории.

6.1.2. Методи во рана фаза на развој

Развојот на методот во раната фаза обично започнува со прочистување на активната супстанција од синтезата и потребно е да се генерираат следните информации:

- Физичко-хемиските својства на API (структура, податоци за растворливост, $pK_a(i)$, UV спектри, хиралитет итн.);
- Патот на синтезата;
- Потенцијата;
- Намената на дозираната форма.

Материјалите, како што се ексципиенси, сродни супстанции како и онечистувањата (почетни материјали, меѓупроизводи итн.) што можат да бидат присутни треба да се раздвојат и добијат. Испитувањето на патот на синтезата кој се користи во производството овозможува предвидување на потенцијалните резидуални синтетски онечистувања присутни во активната супстанција. Структурата на API претставува основа за подлабоко испитување на патеките на деградација иницирани со хидролитички, оксидативни, каталитички и други механизми. Овие проценки служат за олеснување при толкувањето на тестови за идентификација. Испитувањето на физичко-хемиските својства го овозможува и рационалното воспоставување на методите за скрининг. На пример, употребата на нормално-фазната HPLC ќе биде елиминирана ако API е сол или покажува ограничена растворливост во неполарни органски растворувачи. Слично на тоа, ако API (или сомнителни сродни супстанции) нема значителен хромофор над 250 nm, употреба на тетраhydroфуран (THF) и други растворувачи како мобилна фаза е сериозно ограничен. За соединенија со јонизирачки групи, варијацијата на pH ќе има значително влијание врз однесувањето при нивната елуција и тоа може да се искористи да се оптимизира селективноста на раздвојувањето со реверзно-фазна HPLC. Пред да се започне со развојот на методот, корисно е да се прегледа литературата за сродни класи на фармацевтски производи, особено за да се утврди дали атрибутите на молекулите спречуваат одредени чекори да се спроведе процесот на развој на методот.

Генерално, реверзно-фазната HPLC обезбедува подобро раздвојување помеѓу соединенијата во согласност со бројот на алкил јаглеродните групи и елуцијата е по редослед на намалување на поларитетот.

Нормално-фазната HPLC обезбедува подобра резолуција на различните соединенија кај поларните супституенти и кај ахиралните изомери и елуцијата е во ред на зголемен поларитет. Бидејќи не може да се направи априори избор на колона, корисно е да се направи проценка на повеќе колони за да се обезбеди потенцијално ортогонална селективност. Варијациите на силициум диоксид-силика колоните вклучуваат големина на честички, тип на силика, големина на пора, чистота, површина и хемија на површината. Тие варираат во однос на хемиската природа и може да бидат C18, C8, фенилни, цијано, мономерна наспроти полимерна врзување итн. Збирно овие разлики доведуваат до разлики во покриеноста на површината и процентуалното јаглеродно оптоварување. За да изберете колони за скрининг експерименти, пожелно е да се изберат три или четири реверзно-фазни колони кои се разликуваат по хемизмот. Може да се постигнат и раздвојувања со нормално-фазна HPLC користејќи цијано или диол колони. Достапни се и други стационарни фази, но генерално обезбедуваат послаба стабилност. За двата режима на одвојување колоните со $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ($5 \mu\text{m}$) нудат најголема ефикасност на раздвојување и се претпочитаат за почетни експерименти. Изборот на мобилни фази што ќе се користат заедно зависи од начинот на хроматографија (реверзна наспроти нормална фаза) и физичко-хемиските својства на активната супстанција. Од огромно значење е почетните хроматографски услови да ги елуираат сите компоненти (т.е. сите соединенија од интерес). Во пракса ова диктира употреба на градиентно елуирање со употреба на 5-90% силен растворувач и времетраење од 60 минути.

Неутрални раствори. Кај реверзно-фазна HPLC водата се користи како слаб растворувач, додека ацетонитрилот, метанолот или THF (каде што е применливо) се користат како силни растворувачи. Во нормално-фазна HPLC хексан се користи како слаб растворувач, а изопропанол се користи како силен растворувач. За промена на селективноста врз основа на силниот растворувач, изопропанол може да се замени со метилен хлорид, метил *t*-бутил етер или етил ацетат. Сепак, треба да се потенцира високото UV cut-off (прекини) на овие растворувачи кога треба да се користи UV детекција.

Киселински раствори. Раздвојувањата со реверзно-фазна HPLC се изведуваат како што е опишано за неутрални материи со исклучок на водената компонента на мобилната фаза, која е модифицирана со киселина/база или пуфер, така што pH е минимум 2 pH единици над или под pK_a на растворената супстанција, а со тоа се овозможува јонизирање на соединенијата што треба да се евалуираат. За основните соединенија, промената на pH може да биде проблематична поради нестабилноста на силика гелот во основните медиуми.

Сепак, изминатите неколку години значителни напори се фокусираа на развој на пакување на колоните и во голема мера го олеснија проблемот. Во моментот модификација на pH идеално треба да се постигне со употреба на испарливи киселини, бази или пуфери, како што се: оцетна киселина, мравја киселина, амониум хидроксид или оцетна киселина/амониум пуфери на ацетат или мравја киселина/формат на амониум за да се овозможи комплементарност со MS спектроскопијата.

За да се добијат што повеќе информации за специфичноста на предложените услови, треба да се спроведат скрининг експерименти на активната супстанција, достапните ексципиенти при услови на зголемена температура, влажност, оксидација и фотолиза и во базни и кисели средини. Поради разликите во инхерентната стабилност на различни ентитети, тешко е да се дадат точни насоки во врска со концентрациите на растворите при стрес услови, како и времето на изложеност и температурите. Сепак, пожелно е да се постигне приближно 20% деградација од секоја состојба на распаѓање за да се генерираат лесно забележливи количини на деградационите производи. Треба да се забележи дека распаѓањето што се случува под форсирани услови може да не биде преку истиот механизам како што би се одвивала реакцијата при нормални услови,

и како такви, студиите со принудно распаѓање обезбедуваат само прелиминарна проценка на соединенијата на разградување кои можат да се добијат. За да се спроведе процесот на скрининг на методот, секоја мобилна фаза се испитува на секоја колона, со исклучок на комбинации кои се некомпатибилни. Ова се спроведува на автоматизиран начин со модерни HPLC системи со помош на префрлување на колони и секвенцијално вклучување на одделните кандидатски мобилни фази. За да се постават дополнителните HPLC променливи, се препорачува колоната да е поставена на 35-40°C за да се намали вискозноста на мобилната фаза и да се подобри ефикасноста на одвојување (N) наспроти условите на околината. За време на првичните дизајнирани експерименти целта е да се идентификуваат условите за одвојување на кандидатите и исклучително е корисно да се користи детекција PDA детектор или комбинација на PDA и MS. Употребата на PDA ќе овозможи да се добијат UV спектри за секој аналит во примерокот. Ова обезбедува пет основни предности во однос на UV детекцијата со една бранова должина, и тоа:

- Онаму каде што UV спектрите на растворената супстанција се различни, следењето на врвот на апсорпциониот максимум се постигнува со користење на спектрите;
- UV максималните за поединечни компоненти лесно се одредуваат;
- Следењето на ниските бранови должини (205-210 nm) ја максимизира веројатноста дека се забележани сите компоненти што се елуираат;
- Иако е со ниска идентификациона вредност во споредба со другите спектроскопски методи, UV спектрите може да се користат за да помогнат во структурно разјаснување на непознати пикови;
- Чистотата на секој пик може да се процени со преклопување на спектрите на предниот дел, врвот и опашката на секој пик или со користење софтвер за сооднос на бранови должини во различни временски точки во текот на пикот.

Иако ова се предности во однос на UV детекцијата со една бранова должина, треба да се нагласи дека мерењата на чистота на пиковите со PDA детекција не е потврден. Подobar метод е да се користи PDA заедно со MS.

MS овозможува посуштинска идентификација на непознати пикови и споредбата на MS спектрите дозволува определување на чистота на пикот за соединенија со слични UV спектри. Сепак, употребата на PDA не е без заслуги. На тој начин, множествата на потенцијални услови може да се исклучат од понатамошно оптимизирање и го минимизира бројот на примероци за кои е потребна MS евалуација. За првичните испитувања, примероците треба да се подготват за инјектирање од волумен од 15-30 μL за да се зголеми квантитативната репродуктивност без да се направи волуменско преоптоварување на колоната. Идеално, масата што се инјектира треба да овозможи идентификација на сродните супстанции кои треба да се набљудуваат на границата на квантификацијата при концентрација на 0,02% или помалку за да се осигура дека се набљудуваат дури и помали соединенија. За примероци кои не се растворливи во препорачаниот систем на растворувачи, помал волумен на инјектирање (5 μL) може да биде неопходен за да се спречат штетните форми на пиковите кои можат да настанат кога примерокот содржи поголем процент на силен растворувач од мобилната фаза.

По изборот на почетните најдобри услови за работа, методот-кандидат може да се подобри во насока на зголемување на резолуцијата помеѓу компонентите со користење сегментирани градиенти наместо линеарни градиенти користени за почетните експерименти. На пример, ако сите компоненти се елуираат на почетокот на хроматограмот, може да биде корисно да се намали стапката на промена на силниот растворувач на почетокот на ранот и да се зголеми стапката на крајот на ранот. Сепак, употребата на широк градиент треба да се максимизира во насока на веројатноста дека сите компоненти се генерирани во следните експерименти и истите може да се следат. Иако нема формална валидација, освен покажување специфичност со користење на PDA (и MS) откривање, во овој момент во развојот корисно е да се реанализираат

подготвените мостри во различни временски интервали за да се утврди дека не се забележуваат нови пикови и дека нема губење на сродните супстанции. По изборот на кандидат-методот, ќе се направат дополнителни студии за стабилноста и за активната супстанција и готовиот производ (или бинарни мешавини на API со секој од ексципиентите, доколку не е достапна дозирана форма). Овие студии треба да се изведат во цврста состојба со изложување на API и готовиот производ на релативна влажност, температура и услови на кислород кои се поблиску до предложените ICH услови за чување. За да се олесни последователната идентификација на производите на деградација и да се добијат примероци за последователен развој на методот, треба да се стави доволно материјал на стабилност. Примероците од стабилноста во цврста состојба треба да се следат со користење и PDA и MS детекција за да осигуриме дека се одржува специфичноста на метод-кандидатот. Исто така, се препорачува анализа на примероци со ортогонален метод за понатамошна проверка на специфичноста. Ако методот, во овој момент, се покаже дека обезбедува раздвојување меѓу API, сите онечистувања од процесот на синтеза и сите производи на деградација, потребно е продлабочување на развој на методот. По утврдувањето на специфичноста, методот(ите) треба да бидат потврдени за да се овозможи нивна употреба при тестирање на формалната стабилност. Таквата валидација вообичаено е во скратена форма за разлика од валидацијата потребна за потврда на конечните методи. Но треба да се покаже: специфичност, линеарност, опсег, точност и повторливост. За сродните супстанции треба да се покаже специфичноста, лимитот на детекција (LOD) и лимитот на квантификација (LOQ).

Дополнително е корисно да се повтори разделувањето на нови колони од различни серии за да се утврди дека сепарацијата е добра и може да се одржува од колона до колона. Кога формулацијата или патот на синтеза ќе се изменет, поддршката со ортогоналните методи, идентификувани при почетниот развој на методот, треба да се примени за да се потврди валидноста (специфичноста) на методот. Кога поддржувачкиот метод покажува дека почетниот метод е несоодветен, методот на поддршка треба да се потврди за да се овозможи негова употреба во дополнување на првичниот метод за тестирање на стабилноста. Истовремено со овие активности значителни синтетски процесни онечистувања и деградациони производи треба да се идентификуваат и изолираат или синтетизираат.

Стрес студиите во цврста состојба, како што беше наведено претходно, треба да се спроведат и за API и за готовиот производ за да се провери дали модификациите не ги менуваат патиштата на деградација. Потоа следи критичко испитување на податоците од деградационите студии и може да се направи проценка за тоа кои онечистувања и деградациони продукти треба да се следат во финалните методи (Ermer, 1998).

6.1.3. Течна хроматографија/масена спектрометрија и течна хроматографија/нуклеарна магнетна резонанца

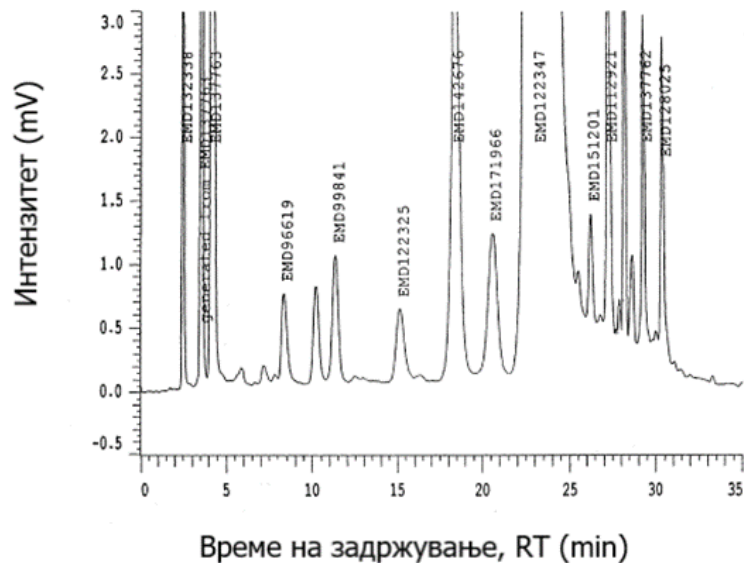
Досега акцентот беше ставен на широката употреба на детекција со MS како примарен метод за проценка на структурата на непознатите генерирани во текот на развојот (Smyth, 2005). Сеопфатното разјаснување на структурата може да бара не само MS, туку исто така MS/MS или MS техники поврзани со NMR (Gergov et al., 2003). NMR нашироко се смета за најмоќна техника за структурно разјаснување, најчесто се користи во комбинација со MS и е особено корисен во идентификацијата на изомерите. Иако HPLC/NMR се развива за да стане рутинска техника, таа бара големи волумени и протоци за детекција на материјали во трагови и деутерирани мобилно-фазни растворувачи. Објавени се бројни трудови за да се илустрира улогата на LC/MS, LC/MS/MS и LC/NMR во раните фази на развојот (Smyth, 2005). Thomasberger и соп., на пример, користеле HPLC/MS, HPLC/MS/MS и HPLC/UV за решавање на профил на онечистувања на антагонист на гликопротеин IIb/IIIa. Целта беше да се разјасни структурата на секое онечистување генерирано за време на активностите за зголемување на нивоата на 0,1% или повеќе во однос на API. Како почетна точка во

развојот на методот, патот на синтезата беше критички испитан, како референтни стандарди беа добиени прекурзори и потенцијални нуспроизводи за олеснување на последователна идентификација. За откривање на MS спроведени се анализи користејќи колона од 125 × 4 mm (5 μm) Lichrospher 60 RP-Select B. Мобилна фаза А – 800 mL вода/200 mL ацетонитрил/3,08 g амониум ацетат прилагоден на pH 6,5 со оцетна киселина. Мобилна фаза Б – 500 mL вода/500 mL ацетонитрил/1,93 g амониум ацетат прилагоден на pH 6,5 со оцетна киселина. Градиентот беше пуштен со 0,5 mL/min на следниов начин: од 0-25,0 min, 100% А; од 25,0-35,0 min, 100% А-100% Б; од 35,0-45,0 min, 100% Б; од 45,1-55,0 min, 100% А. За време на евалуацијата со MS идентификувани се непознати соединенија. Забележаните соединенија вклучуваат контаминент во трага што коелутира со друго онечистување. Може да биде или етилуретанетил естер или метилуретанизопропил естер врз основа на процесот на синтеза.

Време на задржување (RT min)	Име	Формула
2.49	EMD 132 338	
4.25	EMD 137 763	
8.35	EMD 96 619	
11.33	EMD 99 841	
15.23	EMD 122 325	
18.37	EMD 142 676	
20.32	EMD 171 966	
23.05	EMD 122 347	
26.17	EMD 132 338	
27.31	EMD 112 921	
29.25	EMD 137 762	
30.48	EMD 128 025	

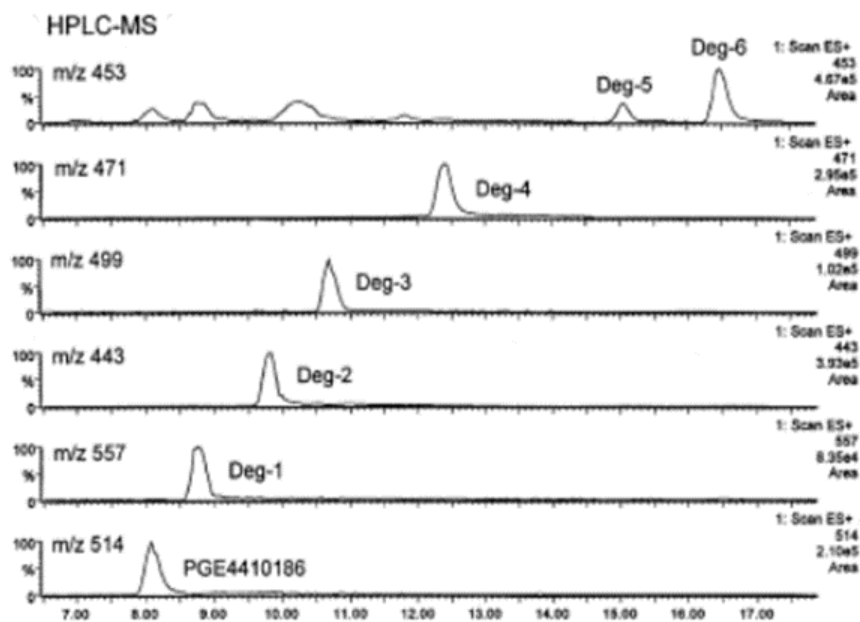
Слика 8. Добиени резултати во студијата на Thomasberger и соработниците (Ahuja & Scypinski, 2001)

Структурното разјаснување преку MS/MS јасно го илустрирало аналогот на изопропил естерот. UV анализите беа спроведени со помош на 250 × 4 mm (5 μm) Lichrospher 60 RP-Select B колона. Мобилна фаза А – 800 mL вода/200 mL ацетонитрил/11,04 g натриум дихидроген фосфат прилагоден на pH 6,5 со NaOH. Мобилна фаза Б – 500 mL вода/500 mL ацетонитрил/6,90 g натриум дихидроген фосфат прилагоден на pH 6,5 со NaOH. Градиентот беше пуштен на 1 mL/min на следниов начин: 0-17,0 min, 100% А; 17,0-25,0 min, 100% А-100% Б; 25,0-35,0 min, 100% Б; 35,1-55,0 min, 100% А.



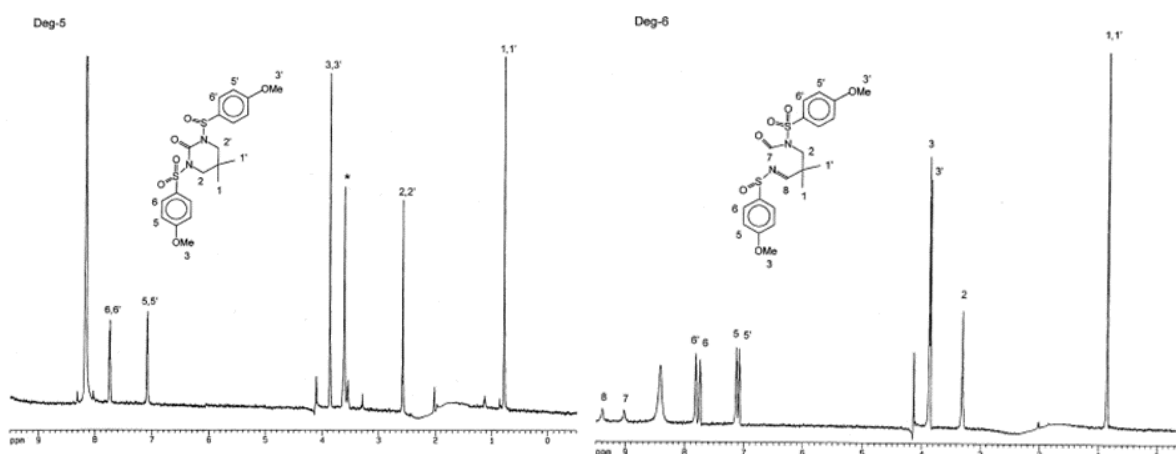
Слика 9. Хроматограм со идентификуваните онечистувања во студијата на Thomasberger и соработниците (Ahuja & Scypinski, 2001)

Peng и сор. користеле HPLC/UV, LC/NMR и LC/MS за идентификација на производите на деградација на инхибиторот на протеаза, *N*-хидрокси-1,3-ди-[4-етоксибензенсулфонил]-5,5-диметил-[1,3]циклохексилдiazин-2-карбоксамид (односно PGE 4410186) во дозирани формулации. HPLC методот е изведен на колона Waters Symmetry C18 (150 x 3,9 mm) со помош на линеарен градиент од 20 минути и мобилна фаза во однос 35:65:0,1 (v/v/v) ацетонитрил/вода/мравја киселина до 80/20/0,1 (v/v/v) ацетонитрил/вода/мравја киселина на 1 mL/min. Беа направени анализи на примерок од концентрација од 10 mg/mL и волумен на инјектирање од 5 μ L.



Слика 10. Хроматограми добиени со помош на HPLC/MS на 240 nm во студијата на Peng и соработниците (Ahuja & Scypinski, 2001)

Податоците за MS врз основа на молекуларната тежина и преку спектрите овозможиле пробна идентификација на неколку од деградационите производи. Сепак, за Deg-4 податоците се покажале конзистентни и можело да се постави „tentative“ структура. Deg-5 и Deg-6 биле со иста молекуларна тежина и дале идентична фрагментација, што укажува дека тие најверојатно биле структурни изомери. Да се потврдат, но и за да се разјаснат структурите на Deg-4, Deg-5 и Deg-6 биле направени HPLC/NMR анализи. Условите биле исти, опишани за HPLC/UV и MS, со исклучок дека ацетонитрил со чистота за NMR и деутерирана вода се користеа како компоненти во мобилната фаза. Волуменот на инјектирање беше дополнително зголемен на 25 mL за да се стават 5-50 µg од секој производ на деградација на колоната. За Deg-4, NMR спектарот не беше во согласност со MS спектарот и укажал на тавтомерски алдехид со отворен прстен како производ на деградација.



Слика 11. NMR спектри на Deg-5 и Deg-6 во студијата на Peng и соработниците (Ahuja & Scypinski, 2001)

Потоа, врз основа на комбинираниите податоци и податоците за NMR, била направена соодветна карактеризација.

6.1.4. Методи во доцна фаза на развој

Во доцниот стадиум на развојот патот на синтезата на API и формулацијата на производот треба да биде финализиран, а развојниот аналитичар треба да развие метод што ќе биде соодветен да ги оддели познатите хемиски ентитети. Во овој момент може да се направи разлика помеѓу методот за испитување на API vs. методот на готовиот производ, бидејќи соединенијата што треба да се одвојат може да бидат различни. Развојниот аналитичар е вооружен со информации за методот од студиите во рана фаза на развојот, за однесувањето на растворената API во киселина/база, UV спектрите на аналитите и податоци за растворливост и компатибилност со растворувачи и има поголема ширина во изборот на составот на мобилната фаза. Сепак, мора да се земат предвид дополнителни критериуми.

За да се оптимизира пропусната моќ, времето на извршување на методот (треба да биде што е можно пократко) и за да се олесни трансферот на методот, се претпочита употребата на изократски услови отколку градиент. Но, кога се неопходни градиенти, се претпочитаат линеарни градиенти. Во доцната фаза на развојот на методите следи систематска оптимизација, иако неколку од чекорите за оптимизација може да се исклучат врз основа на постоечките информации. На пример, се претпоставува дека колоната што треба да се користи е позната. Сепак, експерименталниот дизајн може лесно да се повтори со користење на различни колони за да се утврди дека е избрана оптималната колона. Колона(и) за евалуација треба да се избере во согласност со фактот дека треба да овозможи замена со колона од различен производител и да се добие истото одвојување. Ова размислување е особено важно кога методот треба да

се користи во различни географски региони каде што достапноста на колоните може да се разликува, а и како план за вонредни ситуации во случај добавувачот да престане со производството на колоната. Колоните што се продаваат за да „обезбедат единствена селективност“ треба да бидат избегнувани. Како што беше дискутирано, колоните со реверзна фаза се разликуваат во силика гел пакувањето. Всушност, повеќе од 600 различни материјали на пакување се достапни моментално. Со оглед на тоа што разликите меѓу колоните можат да доведат до проблеми при идентификување на еквивалентна колона, мора да се нагласи дека тие се исто така одговорни за разликите во однесувањето на одвојување; и соодветно на тоа, разликите може да се искористат во развојот на методите.

Имајќи ја предвид варијабилноста од производител до производител, добра почетна точка на студиите за развој на методот во доцна фаза е да се избере 5 μm 250 \times 4,6 mm колона со големина на пора од 80–100 \AA и површина на честичките од 150–350 m^2/g . Идеално, колоната треба да биде достапна во пократки должини (3, 5, 7,5, 10 и 15 cm) и со материјал за пакување од 3 μm со иста големина на порите и површина, така што раздвојувањето може да биде лесно оптимизирано. Во развојот на методот често се користат два популарни пристапи:

- Оптимизација на мобилната фаза врз основа на секвенцијални изократски мод;
- Оптимизација на мобилната фаза врз основа на градиент.

Како што е наведено, примарна цел на развојот на методот во доцна фаза е да се постигнат изократски работни услови.

6.1.4.1. Оптимизација на мобилна фаза врз основа на изократски мод кај реверзно-фазна HPLC

Пристапот за развој на изократски метод прво се заснова на следниве услови: проток од 1 mL/min и температура на колона од 35–40°C и мобилна фаза 100% ацетонитрил за да се утврди дека сите компонентите се елуираат и дека сепарацијата е подложна на реверзно-фазна HPLC. Последователно, процентот на ацетонитрил се намалува за 20%, а се зголемува водената фаза како друга компонента на мобилната фаза. За јонизираниите соединенија водената компонента на мобилната фаза може да се замени со 25 mM калиум фосфат пуфер со pH 2,5–3,0. Ако не може да се добие состојба $0,5 < k < 20$, потребна е промена на колоната и, на пример, да се замени со друг хемизам како цијано колона. Ако овој пристап исто така не успее да обезбеди елуирање на растворени материји во опсег од $0,5 < k < 20$, напорите треба да се префрлат на оптимизација на градиентен метод (Snyder et al., 1997). За примероци каде што критериумот $0,5 < k < 20$ се исполнети, во чекорите на оптимизација се оценува селективноста помеѓу растворувачите, така што процентот на ацетонитрил се заменува со приближно еднакви јачини на метанол/вода и THF/вода. На селективноста, како и на k , може да влијае и процентот на вода во мобилната фаза. Бидејќи генерално е пожелно да се користи ацетонитрил или мобилни фази базирани на метанол, исто така корисно е да се менува процентот на вода во ацетонитрилни и метанолни системи сè додека се одржува потребниот опсег за k . Ако развојот ја исполнува првичната цел за одвојување на соединенијата, примамливо е да се претпостави дека развојот на методот е завршен. Сепак, иако и колоната хемија и мобилната фаза се избрани, понатамошна оптимизација на должината на колоната, големината на честичките и стапката на проток е оправдана. Пристапот може да се повтори со користење дополнителни типови колони (фенилни или цијано колони).

Алтернативно, особено за ахиралните изомери, влијанието на температурата под секој сет услови треба да се евалуира. За киселините и базите може да се забележат и големи промени во селективноста како функција од pH. Притоа, пожелно е да се промени pH вредноста за 0,2 pH единици за да се потврдат какви било услови на кандидат робусност метод пред да се продолжи кон негова валидација. Дополнителен пристап, применлив за базите и мешавината на киселини и бази, е јонско спарување. Користејќи го овој пристап, водениот дел од мобилната фазата е пуферирана за да се

потисне јонизацијата на киселините и да се промовира целосна јонизација на базите. Последователно, се додава реагенс, како што е хексан сулфонат во водениот пуфер, во концентрација од 50-100 mM за да се формира динамично јон-спарување со катјонската база и со тоа да се зголеми задржувањето на базата. Варијацијата во задржувањето на базите е под влијание на количината на органски растворувач (метанолот обично се користи поради причини за растворливост), концентрацијата на реагенс за спарување на јони и, како дополнителна променлива, температурата. Посебен проблем поврзан со одвојувањето на основните соединенија и во режимот на јонско спарување и во други форми на HPLC е формирањето „опашка“ на пикот поради интеракцијата со силика гелот. Таквата интеракција обично се неутрализира со 20-30 mM триетиламин во мобилната фаза.

6.1.4.2. Оптимизација на мобилна фаза врз основа на изократски мод кај нормално-фазна HPLC

Нормалните фазни сепарации може да се развијат со користење на истиот филозофски пристап наведен претходно. Почетните работи треба да се спроведат со користење на 100% силен растворувач (изопропанол за сепарации во нормална фаза) на $250 \times 4,6$ mm (5 μ m) цијано колона за да се утврди дека сите компоненти се елуираат на $0,5 < k < 20$. Процентот на изопропанол треба да се намалува последователно, користејќи хексан како слаб растворувач. Градиент од 100% хексан до 100% изопропанол може алтернативно да се користи за да се процени дали условите за градиент се неопходни или приближно да се доближи потребниот процент на изопропанол. За да се промени селективноста врз основа на силниот растворувач, изопропанолот може да се замени со метилен хлорид, метил *t*-бутил етер или етил ацетат. Сепак, треба да се земе предвид релативно високата UV „cut-off“ на овие растворувачи. Како алтернатива на цијано колони, може да се истражуваат диол колони. Други стационарни фази се исто така достапни, но генерално обезбедуваат послаба стабилност. Триетиламин или оцетна киселина може да се додаде во мобилната фаза за да се добијат посиметрични пикови.

Оптимизацијата на методите е во голема мера олеснета со комерцијално достапниот софтвер, каков што е DryLab. Со овој пристап се овозможува предвидување на добиените хроматограми кои користат различни градиенти и различни мобилни фази. Истиот пристап може да се земе експериментално, но употребата на софтвер во голема мера го намалува бројот на потребните експерименти. Ако не се добие соодветна резолуција по почетната оптимизација на мобилна фаза, двете работи може да се повторат со користење различни температури, различни растворувачи или различни колони и софтверската симулација се повторува да се утврдат оптималните услови. Софтверските пакети вршат математичка трансформација поврзана со промената на колоната должина, дијаметар на честички и брзина на проток и може да ги предвиди хроматограмите, што би резултирало во услови на кандидат-методот. Условите предвидени како оптимални од страна на софтверот треба да се потврдат експериментално, со што грешките при експериментирањето може значително да бидат намалени. За да се развие соодветна техника на филтрирање, треба да се спроведат студии да се покаже дека анализот и сродните супстанции не се задржани на филтерот, за да се обезбеди отсуство на мембрански екстракти и честички од филтратот, да се одреди капацитетот на филтерот и да се одреди потребниот волумен потребен за навлажнување на филтерот. Се споредува концентрацијата на филтрирани vs. нефилтрирани раствори кои ги содржат компонентите од интерес. Ова може да се испита рачно пред да се користи автоматскиот систем бидејќи филтер-блокадата може да доведе до дефект на системот.

Како последен чекор при развојот, генерираните тест решенија треба да се чуваат под амбиентални услови на автоматизираниот систем за да се дефинира прифатливиот период на стабилност. За методите во доцна фаза треба да се спроведе постапката на целосна валидација на хроматографијата (Ahuja & Dong, 2005). Ова треба да вклучува спецификација за соодветноста на параметрите на системот за да се

осигура дека перформансите добиени за време на развојот на методот се одржуваат за време на рутинската употреба. Соодветноста на параметрите на системот вклучуваат: спецификација за прифатлива повторливост на инјектирање, критериуми за резолуција помеѓу критичните парови, максимално дозволени фактори на задржување и потврда за чувствителноста на методот.

6.1.4.3. Хирални сепарации

Хиралните молекули може да се одвојат на нивните соодветни енантиомери, при што се користат реагенси за дериватизација или хирални стационарни фази (CSPs). Примарната цел на хиралното одвојување е типично за да се одреди енантиомерен однос на саканиот енантиомер vs. несаканиот енантиомер. Повеќето хирални HPLC анализи се изведуваат на CSPs. Генерално, CSPs се поделени во четири основни категории (има дополнителни помали користени пристапи): тип донор-акцептор (Pirkle), јаглехидрати базирани на полимер, инклузионен тип на комплексност и базирани на протеини. Работата во нормална фаза покажува дека елуцијата на растворената супстанција се промовира со додавање поларен растворувач, додека при операција во реверзна фаза, елуцијата се промовира со намалување на поларитетот на мобилната фаза. Донор-акцептор CSPs се засноваат на интеракција од три точки помеѓу растворената супстанца и хиралната стационарна фаза од која мора да има барем една интеракција за да бидат стереохемиски специфични. Елуцијата се контролира со менување на процентот на поларен растворувач (т.е. процентот на изопропанол во хексан) или кај реверзно-фазна, елуирањето е со менување на процентот на метанол (или ацетонитрил) кон процентот на пуферот. Иако селективноста може да се разликува помеѓу модификаторите, генерално се препорачува раздвојувањето да е во опсег од $0,5 < k < 20$. Раздвојувањата генерално се подобруваат при субамбиентална температура.

Современите полисахаридни колони се засноваат на обложен силициум диоксид со целулоза или деривати на амилоза. Механизмот на хирална дискриминација сè уште не е целосно разбран. Поради тоа достапни се бројни фази подмножества и ортогоналноста генерално може да се добие од три или четири колони како прв пристап кон развојот на методот. Типичен избор на колони би било да се проба сет од различни амилози (Chiralpak AD и AS) и целулозни (Chiralcel OD или OJ) колони. На наведените колони се извршуваат во режим на нормална фаза и мобилните фази се типично мешавини на хексан со мали количини изопропанол или етанол за контрола на задржувањето. Сепак, селективноста се менува со различни поларни модификатори. Широчината на пикот може да се минимизира со додавање на 10-50 mM трифлуороцетна киселина (TFA) или триетиламин (TEA). Аналоги на наведените колони (AD-R, AS-R, OD-R и OD-J) се достапни за раздвојување во реверзно-фазен режим. Сепарациите засновани на инклузивна комплексност обично се изведуваат на колони базирани на циклодекстрин. Циклодекстрините (CD) се состојат од 6(α), 7(β) или 8(γ) единици на глукопираноза поврзани со α -(1,4)-гликозидни врски. Хиралното препознавање се базира на хидрофобниот дел од молекулата што влегува во циклодекстринската празнина и интеракција (водородна врска) на поларниот дел од молекулата со поларните групи на отворот на шуплината. Изборот на CD зависи во голема мера на големината на неполарниот дел од молекулата.

β -CD покажа најширока применливост за фармацевтските производи. За разновидно хирално препознавање секој тип на CD може да се дериватизира за да содржи различни поларни конституенти на отворот на шуплината. Раздвојувањето може да се изврши и во реверзна и во нормална фаза или во 100% ацетонитрил или метанол (поларен органски режим) и во голема мера зависи од растворливоста на анализот. Во принцип, најдобро се добива раздвојување во реверзно-фазен режим. Сепарациите базирани на протеински стационарни фази, како што се албумини, гликопротеини, пепсини и целулоза, ковалентно врзани за силика или полимери, се изведуваат со употреба на водени пуфери со органски модификатори и тие се корисни за поларни фармацевтски производи.

Треба да се напомене дека стабилноста на различните пакувања е ограничена и е во рамките на прилично тесен опсег на pH и дека процентот на органски растворувачи е типично ограничен од 10-50%, во зависност од типот на колоната. Механизмот на раздвојување е сложен, но се заснова и на хидрофобни и на електростатски интеракции. Според тоа, промените во селективноста може да се постигнат со менување и на типот на органски растворувач (количината на органски растворувач го контролира k , но генерално има помал ефект врз селективноста) и pH на мобилната фаза. Општо земено, развојот на метод може да користи 10 mM фосфатен пуфер со pH 5-7 и доволно изопропанол за да се постигне саканиот k опсег како почетна точка. Последователно, pH вредноста се менува за енантиселективност. Сепак, влијанието на pH донекаде е тешко да се предвиди бидејќи и полнежите на аналитот и стационарната фаза се засегнати.

6.1.5. Тенкослојна хроматографија

Современиот TLC пристап може да се спроведе во нормална и во реверзна фаза и може да се прошири на одвојување на хирални соединенија со модифицирање на стационарната фаза или мобилната фаза со хирални селектори (Szepesi & Nyiredy, 1996). Со користење автоматизирани системи, перформансите што може да се постигнат се еднакви како оние со HPLC. Улогата на TLC во квалитативната или полуквантитативната анализа е голема. TLC е корисна техника за дополнување на HPLC за време на раната фаза на развој на методот (Szepesi & Nyiredy, 1996). Посебна предност на TLC е тоа што може да се користи или во реверзно-фазен или во режим на нормална фаза со кој било систем на растворувач за примероци и дека сите компоненти на примерокот нанесени на плочата може да се визуелизираат. TLC со реверзна фаза е корисна алатка за проценка на балансот на масата (*mass balance*) за време на студиите на форсирана деградација (Szepesi & Nyiredy, 1996). На пример, да потврдите дека загубата на масата не е резултат на неповратна апсорпција на спакуваната колона, примерокот може да се анализира со користење на истите услови на TLC плоча и потеклото критички да се оцени. Примерок подготвен за реверзна фаза HPLC може да се користи со TLC во нормална фаза за да се потврди дека сите сродни супстанции се забележани (Szepesi & Nyiredy, 1996). За да се олесни идентификацијата на одвоените ленти, може да се користи TLC/MS. Овој пристап може да биде едноставен како отстранување на лентата од плочата, екстракција на растворувачот во соодветен растворувач и инјектирање во изворот на јони на MS. Сепак, има и други пристапи, како што е брзото атомско бомбардирање (FAB), а користени се и ласерска десорпција/јонизација со помош на матрица или површина.

6.1.6. Гасна хроматографија

Подобрената кинетика на пренос на маса во гасовите за разлика од течностите ја создава гас хроматографија (GC). Истата е во капиларен формат, побрза, повисока техника на резолуција отколку течната хроматографија. Сепак, гасната хроматографија е ограничена за примена на испарливи, термички стабилни соединенија и мора да се преземат мерки на претпазливост за да се осигура дека примероците се подготвени како што треба за да се спечи испарување на компоненти (Nogare & Juvet, 1962).

За API и готов производ кои не се ограничени со овие критериуми, GC може да се користи како поддршка (ортогонален) метод или за методи за стабилност и ослободување. На пример, Mielcarek и сор. користеле GC/MS за определување на производи настанати од фотодеградација на нилвапин (блокатор на калциумовите канали) и Суг и сор. користеле GC за определување на изомери на доксепин и сродни соединенија. Дополнителна широка област на користење на GC е определувањето резидуални растворувачи (органски испарливи онечистувања). Растворувачите дозволени за употреба во синтезата и производството и нивните соодветни резидуални граници биле адресирани од ICH.

Тестовите за резидуални растворувачи треба да се спроведуваат секогаш кога процесите на производство или прочистување може да резултираат со присуство на

такви растворувачи. Ова наложува резидуалните растворувачи да се определат во API. За готовите производи резидуалните нивоа на растворувачи може да се пресметаат од нивоата на материјалите што се користат за производство на лекот, но пожелно е класа 1 да се избегнуваат или растворувачи од класа 2 да се ограничат во производството на API, ексципиенси или производ. Примарниот предизвик во GC анализата на резидуалните растворувачи е да се обезбеди дека неиспарливите компоненти на примерокот не се внесуваат во GC. Ова обично се постигнува со земање примероци од headspace, но и други техники, како што е микроекстракцијата во цврста фаза (*solid-phase microextraction*, SPME), се испитува за подобна. Типично, анализите се вршат со користење на температурно програмирани капиларни GC со облоги со дебел филм за задржување на испарливите соединенија. Идентификација на поединечни компоненти може да се изведе со користење две различни колони паралелно за детекција на MS. Треба да се внимава да се осигура дека се присутни само очекуваните растворувачи, бидејќи релативно неиспарливите онечистувања од растворувачите може да се концентрираат и да се појават реакции на растворувачи за време на производствениот процес. Ацетонот, на пример, може да формира мезитил оксид и мезитилен, а етанолот може да формира диетил етер. Типично се врши земање примероци од главниот простор за органските испарливи онечистувања (OVIs) со растворање на API во соодветен растворувач наместо API во цврста фаза за да се спречат ефектите на заробување во матрицата. Последователно, специфицираниот волумен на растворот се додава во вијалата за headspace и растворот се загрева одредено време на одредена температура. Примероци од headspace се пренесуваат во GC со притискање на вијалата за проветрување на празниот простор во загреана подлога за примероци. Потоа вијалата се префрла преку вентил за да се донесе примерокот во протокот на носечки гас и во GC. De Smet и сор. објавија генерички метод за OVIs во API базиран на анализа на headspace. Во овој пристап, 100 mg на дрога супстанција се раствора во 2 mL 1,3-диметил-2-имидазолидинон (DMI), кој се покажа дека обезбедува одлични својства на растворање за широк опсег на примероци. Примерокот се внесува во две колони со користење двојна врата за поврзување инјектор-колона. За раздвојување и квантификација се користи колона долга 50 m, со внатрешен дијаметар 0,32 mm, обложена со 5 µm хемиски врзан полидиметилсилоксан. За потврдна идентификација се користи колона долга 50 m, со внатрешен дијаметар 0,32 mm, обложена со 1,2 µm хемиски врзан полиетилен гликол. Методот беше потврден за определување на 23 OVIs во опсег на концентрација од 50-100 до 2500 ppm. Главна предност на наведената процедура е тоа што методот може да се користи за повеќе супстанции на лекови, под услов да се вклучени употребените OVIs во сетот од 23 компоненти. Згора на тоа, единствениот критериум за валидација е да се потврди дека API не ги менува коефициентите на дистрибуција помеѓу растворувачот и headspace. За примероци кои се нерастворливи во DMI, може да се користат други растворувачи, како *N,N*-диметилацетамид или *N,N*-диметилформаид (DMF).

Алтернативно, DMI може да се замени со вода. Употребата на вода може да ја промовира дистрибуцијата на OVIs во headspace, но може да има штетни ефекти врз колоната GC. За тоа како промената во растворувачот ќе влијае на дистрибуцијата на примерокот помеѓу растворувачот и на headspace, потребна е пообемна валидација. GC може да се прошири на испитување на OVIs во производите, под услов критериумот за извлекување на растворувачите од матрицата да биде постигнат. Kumar и Egoville користеле headspace GC за определување на изопропанол и толуен во лепенка на трансдермален естроген и прогестоген. Примероците биле подготвени за анализа во headspace со екстракција во DMF оставени преку ноќ и биле квантифицирани со користење на стандардниот метод на додавање за да се елиминира каква било загаженост поради ефектите на матрицата. Повторливоста била потврдена за различни нивоа на изопропанол и толуен во опсег од 90-106% и %RSD од 2,1–8,6% (за $n = 4$ мерења на секое ниво).

6.1.7. Суперкритична-течна хроматографија

Суперкритичната-течна хроматографија (SFC) била опширно евалуирана во доцните 1980-ти години, во капиларна и во спакувана колона, за различни соединенија, вклучително и фармацевтски производи – првенствено со негативни резултати. Последователната евалуација на SFC покажа дека примарен извор за ова разочарување е дека суперкритичниот јаглерод диоксид е значително помалку поларен од првично предвиденото. Во својата наједноставна форма суперкритичниот јаглерод диоксид може да се смета дека обезбедува приближно ист поларитет како хексан.

Како резултат на тоа, SFC не може да се користи толку лесно како HPLC во реверзно-фазни анализи за поларните соединенија во поларните матрици (како што се многу лекови) и моментално не се применува за овие апликации. Ако поларитетот се смета за еквивалентен на хексан и се додадат поларни модификатори во суперкритичната течност, тогаш одвојувањето може да се смета за слично на нормално-фазна HPLC. Сепак, својствата на вискозност и преносот на маса на суперкритичните течности се поповолни и може да доведат до зголемено раздвојување, ефикасност и намалено време на анализа.

Berger и Wilson покажаа дека сепарациите со 260.000 теоретски подови може да се постигнат со сериско спојување на 10 HPLC колони без да има штетни ефекти од притисокот што би се генерирал со употреба на течна мобилна фаза. За апликации кои не се ограничени со поларни матрици, SFC е остварлива опција. Насоки за системски развој на методи слични на оние достапни за HPLC не се развиени. Условите за одвојување треба да се евалуираат врз основа на поларитетот на растворената супстанција и поларитетот на стационарната фаза.

Поларитетот на стационарната фаза се зголемува по редослед C18 < C8 < фенил < цијано < силициум < амин < диол. За неполарни растворени материи на неполарни стационарни фази, сепарацијата може да биде постигната со употреба на чист јаглерод диоксид. Како се зголемува поларитетот на растворената супстанција или стационарната фаза, потребен е јаглерод диоксид модифициран со метанол (или изопропанол, етанол или ацетонитрил) или јаглерод диоксид модифициран со растворувач и адитив, како на пример, TFA, оцетна киселина, триетиламин или изопропиламин (0,5% или помалку).

Како и кај HPLC методите, така и кај SFC може е да се изврши градиентен мод со цел да се олесни развојот на методот. Вообичаена практика е да се постави излезниот притисок на 150-250 бари и температура на колоната на 30-80°C и потоа постепено да се зголемува процентот на растворувач и (каде што е применливо) количината на адитив за елуирање на соединенијата од интерес. Следствено на ова, може да бидат поставени изократски услови за работа, иако градиентниот мод на SFC има општа предност во однос на градиентниот мод на HPLC во насока на побрзи времиња на повторна рамнотежа. Капиларниот формат на SFC е атрактивен поради потенцијалот на интерфејсот за достапноста на широкиот спектар детектори кога јаглерод диоксид се користи како мобилна фаза. Сепак, капиларните SFC инструменти ги немаат потребните аналитички перформанси за фармацевтски анализи и се наидува на потешкотии поради киселата природа на силициум диоксид и проблемот со мерењето на онечистувањата, а притоа да не се преоптоварува стационарната фаза со главната компонента. Gyllenhaal и Vessman користеле SFC со спакувана колона за анализа на метопролол (агенс за блокирање на β -адрено рецепторот). Лекот бил одвоен од 12 аналогни и сродни соединенија за помалку од 12 минути. Методот користел услови слични на оние што беа дискутирани претходно. Поточно, 125 × 4 mm (5 μ m) диол колона, јаглерод диоксид модифициран со 10% (v/v) метанол кој содржи 0,35 M оцетна киселина и 0,07 M триетиламин и проток од 2 mL/min. Задниот притисок бил поставен на 150 бари, температурата на 40°C, а детекцијата била на UV од 273 nm. Било забележано дека употребата на триметиламинот ја намалува „опашката“, односно *tailing*-от на пиковите на основните соединенија, но од друга страна ја деградира стационарната фаза на база на силика. Додавање киселина во стехиометриски вишок

промовира стабилност на колоната, додека, во исто време, не влијае негативно на основната функција.

Резултатите од студијата покажуваат дека е можно истовремено да се открие API и повеќето сродни супстанции во 0,1% (w/w). Понатаму, методот обезбедува различна селективност од реверзно-фазна HPLC. Како поширок заклучок, ова укажува на ортогоналност на реверзно-фазна HPLC и сугерира на поддршка на развојот на методот во рана фаза. Во поголем степен за раздвојувањето на API и сродните супстанции, SFC со спакувана колона предизвика значителен интерес за употреба во енантиомери сепарации. SFC покажа компатибилност со голема разновидност на хирални стационарни фази, вклучувајќи циклодекстрини (матични и дериватизирани), тип Piracle, и деривати на целулоза и амилоза. Потенцијалната главна предност е подобрена ефикасност на сепарација, што ги зголемува енантиомерите, но исто така ја намалува веројатноста дека онечистувањата ќе се мешаат во анализата. Поради поларитетот на повеќето хирални стационарни фази, за да се изврши раздвојувањето, повеќето сепарации бараат најмалку бинарни мешавини (метанол во јаглерод диоксид) и додаток, како што е опишано претходно. Разделби со користење на различни колони Chiralcel и Chiralpak беа извршени со Berger инструменти. Бројни енантиомери беа одвоени на Chiralcel колони со користење мешавина на јаглерод диоксид со метанол кој содржи 0,5% изопропиламин. Без изопропиламин, пиковите имале опашка. Енантиомерот на пропанолол [(s)-(-)-изомер со β -адренергично-блокирачка активност] можел да се одреди за помалку од 4 минути. Понатаму, студиите за линеарност и репродуктивност укажуваат дека одговорите за R-пропанолол и S-пропанолол се линеарни од 0,25-250 ppm и 2,5-2500 ppm, соодветно, со прифатлива репродуктивност низ целиот опсег. Овој динамички опсег покажува дека набљудувањето на енантиомерните онечистувања треба да се врши на многу пониски нивоа.

За да се реши развојот на хирални сепарации со SFC, Villeneuve и Anderegg имаат развиено SFC систем користејќи автоматски модификатор и вентили за избор на колони. Колони (250 x 4,6 mm идентично, 10 μ m) спакувани со Chiralpak AD, Chiralpak AS дериват на амилоза, Chiralcel OD целулоза карбамат дериват и дериват на естер на целулоза Chiralcel OJ (Chiral Technologies, Exton, PA) беа поврзани со вентил за префрлување на колона. Кандидат-примероци беа работени последователно на секоја колона, користејќи фиксни изократски, изобарични и изотермални услови од 2 mL/min, 205 atm притисок и 40°C со и без 0,1% TEA поларен модификатор (метанол, етанол или изопропанол). Примероците беа растворени во метанол на 1 mg/mL и се инјектираа во делови од 10 μ L. Секоја анализа беше избрана да биде долга 25 минути со 20-минутно време на рамнотежа помеѓу рановите. Имено, по автоматизираното извршување на условите на низата, само мали измени во условите на работа биле неопходни за да се оптимизираат раздвојувањата.

6.1.8. Капиларна електрофореза

Капиларните електрофоретски сепарации се засноваат на разлики во односот полнеж-големина на аналитите. Како што е забележано од Altria, за киселини или бази јонизацијата обично може да биде постигната под една од двете групи услови: во фосфатен пуфер (pH 2,5) за бази или во боратен пуфер (pH 9,3) за киселини. Користење на овие две множества на услови обезбедува генерички пристап кон развојот на методот и се покажа дека е остварлив за широк опсег на типови примероци.

За фармацевтските апликации истовремено определување на API и сродни супстанции обично се постигнува со воведување релативно високи концентрации на примероци (0,2-0,5 mg/mL) и со користење на UV детекција со ниска бранова должина (200 nm). За нејонизирани соединенија или за промена на селективноста на јонизирани соединенија, пуферски адитиви како мицеларен натриум додецил сулфат (SDS) или октанска/бутан-1-ол/SDS микроемулзија, може да се користи. За нејонски соединенија раздвојувањето се заснова на дистрибуција помеѓу тампонот и наполнетиот адитив кој се движи со различна брзина од позадинскиот електролит.

За наелектризираните видови, одвојувањето се заснова и на преградата и на електрофоретската мобилност на компонентите во примерокот. Примероци кои не се растворливи во воден медиум може да се одвојат во органски растворувачи, како што се метанол или ацетонитрил кој содржи проводна сол.

Chen и сор. користеле капиларна електрофореза за развој и валидација на метод за поликатјонски пептид со широк опсег на антимикробни активности. Одвојувањето било постигнато со употреба на 100 mM натриум фосфат pH 2,6, UV детекција на 200 nm, капиларна температура од 25°C, 45 cm (ефективна должина) × 50 μm сплотена капиларна силика (недериватизирана) и 20 kV работен напон. Како внатрешен стандард се користел α-амино глицилфенилаланин амид. Валидацијата на методот покажа дека перформансите ги исполнуваат однапред воспоставените критериуми со почитување на точноста, прецизноста, линеарноста, опсегот, лимит на детекција и квантификација, специфичноста и соодветноста на системот. Врз основа на концентрацијата на API на 0,5 mg/mL, границата на откривање на онечистувањата била 0,1%. Робустноста била демонстрирана со оценување на релативното време на задржување и резолуцијата помеѓу главната компонента и три сродни супстанции со направени промени во јачината на пуферот, pH, сепаративниот напон и капиларната температура.

Farina и сор. користеле и CE и HPLC за определување на цефалоспорински антибиотик и неговите производи за разградување. CE сепарацијата била извршена со помош на мицеларна средина со користење на 64,5 cm (56 cm ефективна должина) × 50 μm споена капиларна силика, пуфер кој се состои од 25 mM натриум борат, pH 9,2 со 150 mM SDS, применет напон од 20 kV и капиларна температура од 25°C. Откривањето беше со UV на 254 nm. И двете методи го одвоија API од сродните супстанции и обезбедија конзистентни квантитативни резултати. Споредувајќи ги CE и HPLC, било забележано дека CE процедурите се побрзи, но дека репродуктивноста на CE често не е толку добра како онаа на HPLC. Важен атрибут за користење на HPLC и CE е зголемената веројатност за откривање непознати онечистувања. Бројни агенсии за хирална дискриминација исто така биле испитани за CE, вклучувајќи природни и дериватизирани циклодекстрини, јаглени хидрати, протеини, антибиотици, природни и синтетски сурфактанти.

Значителен интерес е покажан за употребата на циклодекстрините (CDs). Потенцијално, прво може да се развијат ахирални методи со користење на пуфер/модификатори кои обезбедуваат прифатлива форма на пикот и времето за анализа. Последователно може да се додадат различни видови и концентрации на циклодекстрини за да се развие хирално одвојување. Таквиот пристап е исклучително привлечен бидејќи методите, првично развиени за профилирање на онечистувања, потенцијално може да се прошират на тестирање на хирална чистота со минимален дополнителен развој на методот. Употребата на циклодекстрини како хирални селектори во CE неодамна било разгледано и се дискутирало за влијанието на различни параметри за раздвојување. Раздвојувањето е под влијание на видот и концентрацијата на CDs, pH, пуферскиот состав, капиларната температура и напонот за одвојувањето.

Како што е наведено, пристапот за развој на методот е да се изберат услови кои овозможуваат јонизација на растворените материји, а потоа да се избере типот на CD врз основа на структурата на растворената супстанција. Природните α-, β- и γ-циклодекстрини имаат различни големини и ќе се применливи за различни соединенија. Општо земено, β-CD е најприменлив на фармацевтските производи. Од објавените сепарации, CD-а се типично со концентрација во опсег од 5-50 mM. Ограничувањата во растворливоста може бара додавање органски растворувач на некои за да се постигне овој опсег. Иако горенаведената дискусија покажува дека постојат бројни можности достапни во развојот на CD-базирани CE, тој е исклучително атрактивен да се развие систематски пристап кон развојот на методот, како што беше дискутирано за реверзно-фазната HPLC.

7. ВАЛИДАЦИЈА НА АНАЛИТИЧКИ МЕТОД

Валидација на аналитички метод е процес кој се базира на лабораториски студии со кои се докажува дека карактеристиките на методот ги задоволуваат барањата за наменските аналитички апликации (Johnson & Van Buskirk, 1988). Овој процес претставува дел од животниот циклус на аналитичкиот метод, согласно ИСН водичот „*Analytical Procedure Development Q14*“. Валидацијата на аналитичкиот метод треба да се изврши пред воведување на методот во рутинска употреба.

Ревалидацијата (целосна или делумна) се врши при промена во аналитичкиот метод од различни причини кои влијаат врз евалуација на квалитетот на производот (Johnson & Van Buskirk, 1988). Степенот на ревалидација, односно кои тестови за валидација се изведуваат, ќе зависи од природата и големината на промените во методот. Некои од причините за ревалидација се:

- Промена во методите во официјалните монографии;
- Промени во формулацијата или технологијата на производот;
- Подобрување или забрзување на изведбата на методот;
- Промена во подготовката на примерокот за анализа;
- Вклучување нова аналитичка опрема која може да има влијание врз изведбата на методот.

Следниве набљудувања можат да се постават како врска помеѓу валидацијата и развојот на методот:

- Кога методите се правилно развиени, тие лесно се потврдуваат;
- Валидацијата не е алатка за развој на метод – валидацијата не го прави методот добар или ефикасен;
- Потврдениот метод не мора да значи дека е валидиран – трансфериран метод;
- Критериумите за прифаќање на валидацијата треба да се засноваат на развојот на методот и искуството.

Научникот за развој на методот не треба да влезе во процесот на валидација, освен ако тој или таа не е уверен во успехот. Процесот на валидација е „потврда“ дека методот е погоден за неговата намена; треба да има малку „изненадувања“ во резултатите при валидацијата, бидејќи податоците за евалуација на превалидацијата треба да сугерираат дека методот успешно ќе се потврди. Потврдувањето на методот е исто така „холистички“ процес кој бара соодветна инструментација и компетентност во лабораториските техники за да се обезбеди успех. Иако барањата за валидација се јасно документирани од страна на регулаторните органи, пристапот за валидација е разновиден и отворен за толкување. Бидејќи валидацијата се смета за добра производна практика (GMP), затоа активностите, експериментите за валидација мора да бидат соодветно документирани и изведени на квалификувани и калибрирани и инструментација и опрема. Важно е да се дефинираат термините што се користат во регулаторните водичи кога се дискутира за валидација на метод. Следните дефиниции се цитирани директно од ИСН водичите:

- **Точност:** „Точноста на една аналитичка постапка ја изразува блискоста помеѓу вредноста која е прифатена како конвенционална вистинска вредност или прифатена референтна вредност и пронајдена вредност“. Точноста на аналитичкиот метод е блискост на резултатите добиени со аналитичкиот метод со вистинската вредност;
- **Прецизност:** „Прецизноста на една аналитичка постапка ја изразува блискоста на одговорите помеѓу низа мерења од повеќекратно земање примероци од иста хомогена мостра под пропишани услови. Прецизност може да се разгледува на три нивоа: повторливост, интермедиерна прецизност и репродуктивност“;
 - **Повторливост:** „Повторливоста ја изразува прецизноста под исти работни услови во краток временски интервал“;

- **Интермедиерна прецизност:** „Интермедиераната прецизност ги изразува варијациите на ниво на лабораторија: различни денови, различни аналитичари, различна опрема, итн.“;
 - **Репродуктивност:** „Репродуктивноста ја изразува прецизноста помеѓу лабораториите“;
- **Специфичност:** „Специфичноста е недвосмислена способност да се процени/идентификува аналитот во присуство на компоненти кои се очекуваат да бидат присутни“;
 - **Лимит на детекција:** „Лимитот на детекција на индивидуална аналитичка постапка е најниската количина на аналит во примерокот што може да се открие, но не е нужно квантифицирано како точна вредност“;
 - **Лимит на квантификација:** „Квантификациска граница на индивидуална аналитичка процедурата е најниската количина на аналит во примерокот што може да биде квантитативно определена со соодветна прецизност и точност“;
 - **Линеарност:** „Линеарноста на аналитичката постапка е нејзината способност (во рамките на даден опсег) да се добијат резултати од тестот кои се директно пропорционални на концентрацијата (количината) на аналитот во примерокот“;
 - **Опсег:** „Опсегот на една аналитичка постапка е интервалот помеѓу горната и долната концентрација (количините) на аналитот во мострата, вклучувајќи ги и оние концентрации за кои е покажано дека аналитичката процедурата има соодветно ниво на прецизност, точност и линеарност“;
 - **Робустност:** „Робустноста на аналитичката постапка е мерка за неговиот капацитет да остане незасегнат под влијание на малите, но намерни варијации во параметрите на методот дава индикација за неговата доверливост при нормална употреба“;
 - **Ригидност:** USP ја дефинира ригидноста како „Степен на репродуктивност на резултатите од анализа на истите примероци под различни нормални услови за тестирање, како што се различни лаборатории, различни аналитичари, различни серии на реагенси итн. Всушност, ригидноста е мерка на репродуктивност на резултатите од тестот при нормални, очекувани оперативни услови од лабораторија до лабораторија и од аналитичар до аналитичар“;
 - **Чувствителност:** Чувствителноста на аналитичкиот метод е еднаква на наклонот на калибрационата права во линеарен систем.

7.1. Регулаторни аспекти – видови аналитички методи кои треба да бидат валидирани

Фармакопеите (Ph. Eur., BP, USP) и ICH водичите даваат определени препораки и насоки за валидација на аналитичките методи со предвидените валидациони тестови кои треба да се евалуираат за да методот се смета за валидиран. Дадените препораки не треба да се сметаат за апсолутни и не претставуваат директни упатства како да се спроведе валидацијата на методот. Други пристапи за валидација на аналитичките методи може да бидат применливи и прифатливи доколку се научно оправдани. Согласно ICH водичот „*Validation of Analytical Procedures Q2(R5)*“, аналитичките тестови се поделени во три општи групи:

- Идентификациони тестови;
- Тестови за онечистувања и други квантитативни определувања чиј опсег блиску до лимитот на детекција/лимитот на квантификација;
- Тестови за содржина и други квантитативни определувања чиј опсег е значително поголем од лимитот на детекција/лимитот на квантификација.

Табела 10. Испитувани параметри и валидациони тестови коишто се користат за да се докаже дека се исполнети перформансните карактеристики кои го обезбедуваат квалитетот на измерениот резултат (ICH Q2(R1), 1994)

Параметар	Идентификација	Тестови за онечистувања		Содржина	Растворливост	Распределба по големина на честички
		Квант.	Лимит			
Перформансни карактеристики						
СПЕЦИФИЧНОСТ						
Тест за специфичност	+	+	+	+	+	-
ОПСЕГ						
Одговор (калибрационен модел)	-	+	-	+	+	-
Лимит на детекција	-	-	+	-	-	-
Лимит на квантификација	-	+	-	-	-	-
ТОЧНОСТ						
Тест за точност	-	+	-	+	+	-
ПРЕЦИЗНОСТ						
Тест за прецизност на системот	-	+	-	+	+	-
Тест за повторливост	-	+	-	+	+	+
Тест за интермедиерна прецизност	-	+	-	+	+	+

(-) – означува дека не е задолжително изведувањето на овој тест

(+) – означува дека се изведува овој тест

Регулаторните агенции бараат точни информации и податоци евидентирани и во регулаторните апликации и во секојдневните операции на фармацевтското производство. Од перспектива на фармацевтската лабораторија, аналитичарите треба да обезбедат точност и веродостојност на податоците генерирани со нивните методи на тестирање.

При воведување на методи кои се комплетно преземени од официјалните фармакопејски монографии или методи развивани и валидирани од страна на производителот на влезните материјали, не е потребна изведба на валидација на аналитички метод. Потребно е корисникот да процени дали и до кој степен е потребно да се докаже соодветноста на користење на методот во дадените услови на употреба.

Во зависност од сложеноста на самиот метод може да се процени потреба од изведба на верификација на метод. Параметрите кои се засноваат на едноставни инструментални мерења најчесто не подлежат на верификација (како мерење рН, кондуктивност, сулфатен пепел, губиток при жарење, киселинска вредност и слично).

Верификацијата се врши со изведба на соодветно одбран дел од тестовите за валидација на аналитичкиот метод. Најчесто се изведуваат валидационите тестови за: специфичност, повторливост, лимит на отфрлање или лимит на детекција и лимит на квантификација. Покрај овие тестови, по проценка може да се изведе и робустност на

методот од аспект на компарација на изведба на методот на различни типови инструменти. Кога се работи за готов фармацевтски производ се препорачува верификацијата да вклучи проценка на влијанието на матриксот врз содржината на онечистувањата и активната компонента преку докажување на точноста како перформансна карактеристика.

7.1.1. Некомпендијални методи

Јасно е дека сите квантитативни аналитички методи се користат за поддршка на регулаторните барања (поставување на спецификации итн.), токсиколошки тестирања, клинички тестирања или при ослободување на производот на пазарот, при што методите кои се користат во студиите за стабилност бараат некоја форма на валидација. Барања за валидација на различни аналитички методологии се наведени во ИСН водичите. Агенциите за регистрација на лекови ги имаат прифатено овие упатства. При развивањето на HPLC методологијата, овие барања за валидација пропишуваат методите на онечистувања да бидат дизајнирани и потврдени за:

- Истовремено одвојување, идентификување и квантифицирање на деградационите продукти/онечистувања од активната супстанција;
- Ослободување од интеракциите со помошните материјали.

Од друга страна, униформноста на содржината и методите на р-ливост често нудат предности на едноставност и помала строгост за валидација. Слично на тоа, методите што се користат за идентификација на супстанцијата/производот на лекот е релативно едноставно да се развијат и да се потврдат. Накратко, многу од барањата на процесот за развој на метод се диктирани преку регулатива и меѓународно прифатени водичи, како и познавање на тековната „добра практика“, прифатена во фармацевтската индустрија.

7.1.2. Компендијални аналитички процедури

Методите дадени во официјалните монографии се потврдени од лабораторијата што ја доставува монографијата. Оваа валидација е извршена со материјал произведен или користен од лабораторијата и на опремата содржана во лабораторијата. Тоа е важно за сите компендијални методи – што секоја поединечна лабораторија врши валидација на методот или верификација на соодветноста на методот во неговата лабораторија.

7.2. Валидациони активности при развој на аналитички методи

7.2.1. Животен циклус на развој на методот

„Животниот циклус“ на развојот на методот е паралелно воспоставен пристап со валидација на аналитичкиот метод и компјутерската валидација. Јасно е дека аналитичките методи имаат век на траење и треба периодично да се прегледуваат и потоа ревидираат или изменат, доколку е потребно. Успешната имплементација на процесот на развој на методот бара внимателност, планирање и развој на барањата на методот, извонредност во лабораториската работа, квалификувана инструментација и соодветна документација од почеток до крај. Секој аналитички развоен проект треба да ги вклучи „целите“, да се дизајнира флексибилност и робусност во постапката, разбирање на потребите и лабораторијата каде методот на крајот ќе се трансферира, притоа земајќи ги предвид барањата што треба да се исполнат за валидацијата. Научниците што развиваат методи треба да се стремат да го минимизираат напорот при користење на методот и да се поедностави обработката и толкувањето на податоци. Прегледот на процесот на развој на методот вклучува различни фази кои треба да се земат предвид во текот на развојот; овие активности треба да се извршат согласно тековните ИСН водичи.

Планирање. Планирањето ги опфаќа корисничките барања на методот. Планирањето ги вклучува следните главни ставки:

- Определете ја целта и регулаторните барања на методот;
- Соберете постоечки информации (технички и безбедносни) за API, познати сродни супстанции и составот на формулацијата;
- Разберете ги очекувањата на корисникот (на пример, време на анализа, леснотија за користење, трошоци за анализа, расположлива инструментација итн.);
- Воспоставете временска линија за развој на метод;
- Проценете ги барањата и достапноста на ресурсите (референтни стандарди, инструментација, технички персонал итн.);
- Разбирање на барањата за техничкиот метод (аналитичка опрема, употребени хемикалии, потребна чувствителност, селективност, хиралност итн.);
- Испитајте ги барањата за усогласеност на методот;
- Преку анализа на различни серии и податоци за стабилност, утврдете и идентификувајте ги специфицираните сродни супстанции (0,1%) и неспецифицираните сродни супстанции (обично се јавува на нивоа помеѓу 0,05% и 0,10%).

Цел. Сите сродни супстанции мора хроматографски да се одвојат од активната супстанција; ништо не треба да коелуира со специфицираната сродна супстанција. Неспецифицираните сродни супстанции би можеле да коелуираат едни со други, но не смеат да коелуираат со активната, специфицираната сродна супстанција или ексципиенсот во формулација.

Прегледајте ги податоците, отстапувањата и извештаите за претходните верзии на методот, може да биде потребна само „вкрстена“ студија за корелација на двата методи.

Развој на метод. Откако планот и ресурсите се на место, може да започне лабораторискиот дел од процесот на развој на методот. На пример, во случај на хроматографски метод, откако хроматографските параметри се прилагодени за да се овозможи предложена резолуција на сродните супстанции во разумно време за анализа, методологијата се оценува за следново:

- Дали методот може дополнително да се оптимизира за да биде попрактичен и поефикасен?
- Дали методот ќе се потврди (студии за превалидација)?
- Дали методот е специфичен и дали стабилноста покажува како што е прикажано со студии за стабилност (pH, светлина, топлина, оксидација)?
- Дали имаме корисни и значајни критериуми за соодветност на системот?
- Ако ова е преработка на постоечки метод, дали е направена вкрстена студија изведена за да се споредат двата методи?

Тестирање на робустност. Тестирањето на робустноста го проучува капацитетот на методот да остане незасегнат од малите, но намерни варијации во параметрите на методот. Со помош на ограничен сет експерименти (често се користат експериментални дизајнерски пристапи), критичните параметри кои можат да влијаат на ригидноста на методот може да се идентификуваат, разберат и да се направат подобрувања доколку е неопходно.

Тестирање на евалуација од страна на корисникот. Ова овозможува во лабораториите каде ќе се применува/трансферира методот да се провери дали истиот функционира соодветно за неговата намена. Оваа евалуација треба да се разгледува согласно барањата за усогласеност на аналитички методи за конкретната земја. Оценувањето од страна на клиентите дозволува директни повратни информации од корисникот кон развојната лабораторија пред започнување на студиите за валидација.

Валидација. Валидацијата е процес на собирање документирани докази дека методот работи според неговата намена. Ова се заснова на аналитички експерименти извршени според протоколот за валидација кои се во согласност со меѓународните водичи за валидација на метод. За општи HPLC методи вообичаено се оценуваат следните параметри за валидација: специфичност; линеарност; точност; опсег; прецизност (повторливост, интермедиерна репродуктивност); лимит на детекција/квантификација; стабилност на растворот (препорачано) и соодветност на системот.

Трансфер на метод. Трансферот на методот е процес на собирање документи и докази што овозможуваат приемните лаборатории (клиентите) да се способни за водење на методот. Ова се заснова на аналитички експерименти кои ја покажуваат еквивалентноста на аналитичките резултати добиени во развојот и приемните лаборатории. Овие експерименти се поставени според протоколот за трансфер кои треба да содржат однапред одобрени критериуми на прифатливост.

Евалуација на метод и промена на метод. Ако некој метод треба да се модифицира или промени, процесот треба да се води со користење воспоставен систем за контрола на промени. Поновата методологија треба да биде во корелација со постоечката методологија и се докажува преку вкрстена студија која ги оценува податоците од различните анализирани примероци со двата метода.

7.3. Процес на развој на метод за поддршка на валидационите активности

Пред да се започнете со активностите за валидација, треба да се следат следните испораки како завршен дел од процесот на развој на методот:

- робусност на методот;
- оптимизација на методот;
- специфичност на методот;
- соодветност на системот;
- методолошка процедура;
- прелиминарни експерименти за валидација што ќе се користат за воспоставување критериуми на прифатливост на параметрите што се валидираат.

7.3.1. Робусност на метод

Способноста на методот да функционира ефективно во типична лабораториска средина со прифатливи варијации се оценува при тестирањето на робусноста. Општо земено, ако робусноста е дизајнирана при процесот на развој на методот, методите треба полесно да се трансферираат. Успешната изведба на методот на тестирање може да биде чувствителен при поставување некои оперативни параметри. При тестирањето на робусноста се оценуваат различни параметри за да се одреди степенот до кој тие можат да се менуваат без да влијаат на перформансите на методот. Во експериментите со HPLC, може да се проценат следните репрезентативни параметри (фактори):

- Производител на HPLC систем;
- Варијација на колона од серија до серија;
- Добавувач на колони;
- Стапка на проток;
- Температура на колоната;
- pH на мобилната фаза;
- Јонска јачина;
- Бранова должина на детектор;
- Наклон на градиент;
- Волумен на инјектирање;
- Концентрација на примерокот.

Некои, но не сите од овие фактори можеби ќе треба да се проценат при тестирање на робушноста врз основа на општо знаење или искуство во текот на развојот на методот. Опсегот (нивоата) преку кој се оценуваат различните параметри треба да биде значаен; односно дали методот ќе функционира успешно ако се прилагоди рН вредноста $\pm 0,2$ рН единици од онаа наведена во методот? Од HPLC експерименти преку типичните „одговори“ (т.е. фактор на капацитет, резолуција, симетрија на пикот) се следи дали факторите се приспособени. За да се оптимизира евалуацијата на робушноста, овие фактори може да се проценат истовремено преку пристап на експериментален дизајн. Успехот е постигнат со користење на двофакторскиот статистички пристап, Плакет-Бурман. Во овој пристап може да се оценат 7 фактори преку 12 инјектирања.

7.3.2. Оптимизација на метод

Ако методот не ги исполнува критериумите за време на работа или барањата за робушност, може да бара дополнителна оптимизација. Оптимизацијата е типично продолжение на процесот за развојот на метод, сè додека не се постигнат целите наведени во развојниот план. Експертите за развој на методи често имаат искуство за адекватно оптимизирање на процедурата; а од друга страна, може да се добијат и корисни информации од документираните и организиран развоен пристап за достапните софтверски пакети. Достапни се неколку комерцијални пакети кои комбинираат класична хроматографска теорија со статистички дизајн за предвидување оптимални услови за раздвојување со минимален број експерименти.

7.3.3. Специфичност на метод

Дали методот е специфичен и „*stability indicating*“ како што е прикажано со анализа на примероците испитувани на стрес студии за стабилност (рН, светлина, топлина, оксидација)? Нормално, специфичноста се одредува преку чистота на пиковите со користење DAD HPLC анализи или течна хроматографија (LC)/масена спектрометрија (MS) (Ahuja & Dong, 2005). Во методите за анализа на лековите, плацебо формулациите мора да дадат „празни“ хроматографски линии. Со цел развојот и валидација на методите да ја покажат чистотата на пиковите и условот дека се „*stability indicating*“ се бараат дополнителни студии за да се потврди способноста на методот да ги реши сите можни производи на деградација и синтетички онечистувања од API со прецизно мерење на нивната концентрација во присуство на ексципиенси на производот. Ваквите студии се сметаат како минимален услов за развој и валидација на повеќето методи за покажување дека се „*stability indicating*“.

7.3.4. Соодветност на систем (*System Suitability Parameters, SST*)

Тестирањата за соодветноста на системот осигурува дека вкупниот систем функционира во кое било дадено време. Тестирањата за соодветност на системот, заедно со претходна квалификација на инструментот, периодична калибрација и валидација на методот, обезбедуваат гаранција дека методот за испитување ќе обезбеди точни и прецизни податоци. Правилно избраните критериуми за соодветност на системот не треба да бидат толку строги за да можат рутински да се користат. Тоа е предизвик на секој научник при развојот на методот да креира и постави реални и значајни критериуми за соодветност на системот. Со текот на времето треба да се следи соодветноста на системот за да се потврди дека критериумите остануваат реални и остварливи за соодветно извршување на методот.

Одбран дел од соодветноста на системот треба да се провери и потврди при изведувања на секој валидационен тест. Соодветноста на системот е интегрален дел од секоја анализа, т.е. е предуслов за продолжување на истата. Следниве параметри за соодветноста на системот треба да бидат вклучени во HPLC методи за оценување и следење на перформансите:

- **Резолуција (R_s):** Резолуцијата е мерка за тоа колку добро се одвоени два пика. За сигурна квантификација од суштинско значење се добро одвоени пикови;
- **Релативна стандардна девијација (RSD):** Ова служи како дневна евалуација на повторливоста на системот. Често релативната стандардна девијација од пет или шест инјектирања на референтен стандард се мери на почетокот на секоја анализа;
- **Симетрија на пик (A_s):** Се користи за време на SST во случај кога постои тенденција за развлекување на пикот на активната супстанција или од сродните соединенија. Ова е критичен параметар ако симетријата на пикот се влошува како што старее HPLC колоната;
- **Лимит на квантификација (LOQ):** Способноста на системот да го детектира LOQ треба да биде евалуиран со секој примерок. Инјектирање на LOQ концентрација за време на евалуацијата на SST може да се користи и како груба проверка на линеарноста на системот во опсег од LOQ до 100% од целната активна концентрација;
- **Други параметри за системот:** Освен наведените и други параметри може да се земат предвид при тестирање на соодветноста (на пример, капацитативен фактор, број на теоретски подови итн.);
- **Проверка преку референтен стандард:** Работните политики на некои лаборатории бараат дупликат инјектирање на посебно измерен референтен раствор и треба да се анализира како контрола за да послужи како проверка на точноста на мерењето на стандардот. Очекуваниот резултат за вториот стандард треба да биде од 102,0-98,0%, пресметано во однос на првиот референтен стандард. Лабораториите исто така може да ја оценат промената на одговорот на системот со текот на времето (обично на секои 10-12 инјектирања) преку референтниот стандард. Се очекува дека бројот на површини нема да се промени за повеќе од $\pm 2\%$ во текот на дадената хроматографска анализа.

7.3.5. Методолошка постапка

Постапката на методот или описот треба да ги содржи минимум следните информации пред валидацијата:

- Воведно резиме, вклучувајќи ја целта и принципот на методот;
- Список на реагенси и нивните спецификации (степен на чистота на реагенс); треба да се вклучат и какви било мерки на претпазливост;
- Список на потребни стандарди;
- Список на набавки – стакларија, филтри итн.;
- Список на инструменти и опрема;
- Опис на подготовката на растворот (мобилни фази, стандарди и примероци);
- Опис на условите на методот (проток, бранова должина, профил на градиент, време за еквилибрација);
- Постапка за подготовка на примерок/стандард;
- Критериуми за соодветност на системот и како да се пресметаат;
- Предложена шема за секвенцата на примероци, вклучувајќи ред и број на инјектирања на стандарди, пробни раствори, соодветност на систем, контроли и примероци;
- Целосни пресметки/пример пресметки, вклучувајќи ја и фреквенцијата на калибрација и како се врши калибрацијата;
- Табела на релативно време на задржување на аналитот и фактори на релативниот одговор (RRFs), вклучувајќи ги и пиковите на ексципиенсите;
- Репрезентативен означен хроматограм.

7.3.6. Прелиминарни експерименти за валидација

Откако ќе се утврди дека методот е оптимален, тој се оценува за да се види дали ќе ги исполни барањата за валидација. Во овој сегмент методот е предизвикан во некои од следните области:

- Лимит на квантификација;
- Селективност на методот (плацебо; плацебо третирано под стрес услови, деградирани примероци, познати онечистувања и деграданти, чистота на пик – „Собери“ активно – анализирај на HPLC колона со различна селективност);
- Линеарност на активната компонента (0-150%);
- Линеарност на сродните соединенија (0,05-2,0%).

Успешното завршување на проценката на превалидацијата сугерира дека методот е способен да влезе во многу поригорозна фаза на валидација. Пред да се влезе во валидационите активности, напредокот на развојот на методот треба да биде прегледан од тимот кој првично ги подготвил барањата за методот. Најдобро е методот да се „оцени“ во лаборатории на корисниците за време на процесот „евалуација од страна на корисник“, која треба да овозможи конструктивен дијалог со научник за развој пред да се влезе во процесот на валидација која одзема многу време. Оваа евалуација може исто така да го олесни трансферот на методот.

7.4. Валидациона документација

Документацијата за валидација обично се состои од протокол, податоци за тестирањето и финален извештај. Еден пристап за поедноставување на документацијата за валидација е да се фокусираме на темелен протокол со однапред одобрени критериуми на прифатливост. Овој протокол може да има табели со податоци за внесување на резултатите од тестот, за што е потребно само кратко резиме за да се сумираат резултатите и референца или прилог на суровини податоци. Развојната лабораторија често ги користи овие добро развиени и оптимизирани протоколи за валидација на методот како шаблони за последователни валидации. Често копија од процедурата за методот и, ако е можно, развојниот извештај на методот се приложуваат на протоколот за валидација. Во принцип, *Протоколот за валидација* треба да го содржи следново:

- Принцип/цел на методот;
- Список на одговорности (вклучени лаборатории и нивната улога во валидацијата);
- Категоризација на методи според ICH или EP/USP;
- Список на реагенси и потребни стандарди;
- Тест процедури за да се оцени секој параметар за валидација и предложен критериум на прифатливост;
- План или постапка кога критериумите за прифатливост не се исполнети;
- Краен извештај.

Дополнително, Протоколот за валидација може да содржи и додатоци, односно:

- Извештај за развој на метод;
- Постапка на метод.

Процесот на валидација не може да продолжи додека протоколот и сите вклучени страни ги одобруваат критериумите за прифаќање. Откако ќе завршат опсежните експерименти за валидација, може да се бараат мали промени во описот на методот. Обично тие вклучуваат додавање валидациони податоци (RRFs за сродни супстанции, LOQ, итн.), но исто така може да вклучуваат мали промени во барањата за соодветност на системот поради податоците од повеќе лаборатории. Не треба да има фундаментални промени кои би ги промениле принципите на методологијата или бараат ревалидација, освен ако дел од валидацијата не успеала, што сугерира мало прилагодување и повторна изведба на методот на потребните експерименти за валидација.

7.5. Изведба на тестовите за валидација на аналитички метод

Со цел да се евалуираат перформансите на аналитичкиот метод, генерално се изведуваат следните валидациони тестови, групирани според нивните главни перформансни карактеристики:

- Специфичност (Specificity) – Тест за специфичност;
- Опсег (Range):
 - Одговор (Калибрационен модел);
 - Лимит на детекција (Limit of Detection, LOD);
 - Лимит на квантификација (Limit of Quantification, LOQ);
- Точност (Accuracy) – Тест за точност;
- Прецизност (Precision):
 - Тест за прецизност на системот (System Precision);
 - Тест за повторливост (Repeatability);
 - Тест за интермедиерна прецизност (Intermediate Precision);
 - Тест за репродукцибилност (Reproducibility) (Kar, 2021).

Освен овие валидациони тестови, треба да се земат предвид и други тестови кои се изведуваат при развој на аналитичкиот метод и најчесто влегуваат во валидацијата на методот. Тоа се следните тестови: робустност, влијание на филтерот, форсирани деградациони студии (како дел од специфичноста), стабилност на стандарден и пробен раствор (Kar, 2021). Сите поединечно се објаснети во следните потпоглавја.

7.5.1. Специфичност

Специфичноста се дефинира како способност на аналитичкиот метод да го идентификува и/или измери сигналот (аналитичкиот одговор) на испитуваната супстанца во присуство на други компоненти кои се очекува да бидат присутни во испитуваниот примерок.

Кога се работи за **идентификациони тестирања**, специфичноста се потврдува со добивање позитивни резултати (може да се направи споредба со познат референтен материјал) од примероци кои содржат аналит во однос на негативни резултати добиени од примероци кои не содржат аналит или треба да се види можноста бараната компонента да биде одделена од други компоненти кои би потекнувале од матриксот или од други можни присутни молекули.

Кога се работи за **содржина на активна супстанција и содржина на онечистувања**, за да се демонстрира специфичност кај хроматографските постапки се употребуваат репрезентативни хроматограми во кои индивидуалните компоненти треба да бидат соодветно означени.

Недостатоците на специфичноста на аналитичкиот метод може да бидат компензирани со поддршка од друг метод.

7.5.1.1. Начин на изведување на тестот за специфичност

Кај аналитичките методи за одредување на содржина, растворливост на активна компонента, сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи, специфичноста се изведува со анализа на:

- Растворувачот (дилуентот) кој се користи за подготовка на пробите;
- Плацебото и филмот за обложување ако се работи за филм обложени таблети;
- Стандардни раствори подготвени во работната концентрација според пропишаниот аналитички метод (стандарден раствор за проценка, стандарди за соодветност на системот, стандарди од онечистувањата и слично);
- Пробен раствор подготвен во работната концентрација според пропишаниот аналитички метод;
- Спајкувани проби со достапни специфицирани онечистувања, каде е потребно, по проценка на аналитичарот;
- Примероци од производот со поминат рок или при крај на истек на рокот (*aged samples*), доколку нема достапни онечистувања.

Кај аналитичките методи за идентификација способноста за идентификација на анализираниот од интерес се потврдува со добивање позитивен резултат за пробниот раствор при споредба со референтен стандард, заедно со негативни резултати за пробни раствори кои не го содржат анализираниот од интерес.

Кај аналитичкиот метод за идентификација на активна супстанција во готов производ со инфрацрвена спектроскопија (FTIR), специфичноста се изведува со директна анализа во цврста состојба на високодозажни цврсти форми или со анализа на примерок екстрахиран од готов производ кај нискодозажни цврсти форми или од течни форми. Се снима и инфрацрвен спектар на соодветен стандард и истиот се користи за споредба. Дополнително, може да се анализира примерок кој не го содржи анализираниот (плацебо) и примероци од структурно слични супстанции со цел да се докаже дека не се добива непосакуван позитивен резултат.

Кај методата за NIR идентификација тестот за специфичност се изведува со снимање на спектар од активната супстанција, директно и преку оригиналната амбалажа (доколку има достапни серии во магацин) и споредба на спектарот со спектрите од веќе креираната стандардотека во самиот инструмент. Стандардотеката се состои од неколку комерцијални серии и CRS-и. Истите се снимани директно и преку оригиналната амбалажа.

Кај методата за Raman идентификација тестот за специфичност се изведува со снимање на спектар од активната супстанција и споредба на спектарот со спектрите од заедничката стандардотека за сировини, која се состои од CRS-и или од претходни серии на различни сировини.

За специфичност кај NIR/Raman се снимаат:

- 3 различни серии од една иста сировина, кои се очекува да се совпаднат со стандардот. За некои специфични влезни сировини, за кои нема достапни различни серии, може да се користи и истата серија, но различни пакувања или различни места на снимање на спектарот;
- 1 сировина која нема слична структура и која се очекува да не се совпадне со стандардот;
- 1 сировина со слична структура која се очекува да не се совпадне со стандардот. Се препорачува да се користат сродни сировини или сировини кои имаат исти функционални групи, но се малку поразлични (на пример, кафеин со теофилин).

7.5.1.2. Критериум на прифатливост на тестот за специфичност

Кај **хроматографските методи** не треба да има интерференција на пикот од интерес со пиковите од дилуентот, плацебото, медиумот за растворливост и другите пикови.

За критични сепарации, специфичноста може да се демонстрира преку други индикатори за сепарација на две компоненти кои елуираат блиску една до друга (резулција или *peak-to-valley ratio*).

Кај **UV/Vis спектрофотометриските методи** се анализира спектарот на пробниот раствор кој треба да се поклопува со спектарот на стандардниот раствор, а спектарот од плацебото и дилуентот не треба да се поклопуваат со спектарот на активната компонента која се одредува. Кај спектрофотометриските методи за растворливост дозволена е мала интерференција на медиумот за растворливост и плацебото со апсорбанцата на стандардниот раствор, односно не повеќе од 1% за медиумот за растворливост и не повеќе од 2% за плацебото.

Кај **FTIR спектроскопските методи** се евалуира инфрацрвениот спектар на готовиот производ или на екстрахиран примерок од готовиот производ, во кој карактеристичните ленти треба да се детектираат на слични бранови броеви како и лентите кои се детектираат во инфрацрвениот спектар на стандардот. Бројот на ленти кои ќе бидат користени за споредба зависи од супстанцијата која се анализира.

Кај **методите за NIR идентификација** сличноста со спектарот од стандардот (similarity match) треба да биде поголема од 95 (резултатот е PASS) за испитуваната компонента, а да биде помала од 95 (резултатот е FAIL) за сите останати супстанции.

Кај методите за Raman идентификација сличноста со спектарот од стандардот (match) треба да биде поголема од 93 (резултатот е MATCH) за испитуваната компонента, а да биде помала од 93 (резултатот е NO MATCH) за сите останати супстанции.

Кај титрационите методи, потенциометрискиот скок или промената на боја на индикаторот треба да се должи на присуство на активната супстанца што се одредува, а плацебото, како и реагенсите не треба да даваат потенциометриска промена или промена на боја на индикаторот.

Кај методите за идентификација со реакција на преципитација (таложее) или обојување за позитивна идентификација се смета добивање карактеристичен талог/обојување кај производот кој го содржи анализатот од интерес, како и стандарден раствор кој го содржи анализатот од интерес, а отсуство на карактеристичен талог/обојување кај плацебо/растворувач.

Дополнителен критериуми на прифатливост во зависност од аналитичкиот метод, претставува определувањето на *Peak purity* факторот, кој се одредува со употреба на diode array детектор, при што се врши снимање на спектарот со задавање соодветен праг на чувствителност (*threshold*). Претставува доказ дека пикот добиен од анализатот потекнува само од една компонента. Чистотата (*purity match*) треба да биде поголема од 950 за испитуваната компонента.

7.5.1.3. Форсирани деградациони студии како дел од валидационен параметар – специфичност

Целта на овие студии, како дел од валидацијата на аналитичката метода, е да се демонстрира специфичноста на методот и да се докаже дека методот е соодветен за следење на стабилност. Освен како дел од валидацијата на аналитичкиот метод, овие студии се применуваат во развојот на формулацијата на готовиот фармацевтски производ. Со форсираната деградација може да се предвидат некои патишта на деградација по кои растат или се создаваат нови сродни деградациони продукти (познати или непознати онечистувања). Во зависност од целта на овие студии, тие може да се применат на активната супстанција, на готовиот производ надвор од пакувањето, на готовиот производ во неговото примарно (интермедиерно пакување) и во секундарното пакување. Истовремено се анализира и контролен (нетретирани) примерок и добиените резултати се споредуваат со резултатите добиени од третираниот примерок.

Примероци кои се анализираат кога се изведува студијата на готов производ се: плацебо, филм – ако се работи за филм обложени таблети и препарат изложен/и надвор од контактната амбалажа (на пример, таблети/капсули надвор од блистерот и третирани во кварцни петриеви плочи, течни производи надвор од примарното пакување третирани во кварцни ерленмаерки итн.).

Дизајнот на форсираните деградациони студии, односно условите со кои ќе се изведат стрес студиите, начинот на деградација и времето на експозиција зависи од примерокот (препаратот) кој се анализира и аналитичкиот метод. Примероците може да бидат изложени на релевантни стрес услови со цел да се предизвика најмногу 20 % деградација. Резултатите се пресметуваат со одредување на *Peak purity* параметарот и со споредба на содржината на активната компонента/и и профилите на онечистувањата.

Најчесто кај готовите фармацевтски производи се изведуваат следните стрес тестови:

- **Температура:** Температурата на деградација и времето на експозиција се избира во зависност од термостабилноста на активната супстанција. Анализата на примероците се врши според аналитичкиот метод и во одредени временски интервали;
- **Температура и влага:** Примероците најчесто се ставаат во комори со контролирана температура $T=40^{\circ}\text{C}$ и влага $\text{RH}=75\%$. Анализата на примероците се врши според аналитичкиот метод и во одредени временски интервали;

- **Оксидација:** Се изведува со различни концентрации на раствор на H_2O_2 или со друг оксидационен реагенс. Најчесто се употребува разреден раствор, како 3%, 5%, 10% или 20% H_2O_2 , со кој се третира примерокот со или без загревање и во одредено време, сето тоа во зависност од природата и чувствителноста на примерокот;
- **Фотодеградиција:** Примерокот се изложува во фотокомора под влијание на светлина и зрачење од блиската UV област, согласно Опција 1 опишана во водичот за фотостабилност на готов производ. Деградацијата најчесто се изведува со максимално зрачење на лампата од $765 W/h^2$ и времетраење од 35 часа, но секако може да се примени и друг дизајн на деградација. Заедно со примероците се третира и примерок кој е покриен со алуминиумска фолија или ставен во темно стаклено шише или друг сад што заштитува од светлина и UV зрачење, како *dark control*, со цел да се види дали има влијание температурата која се создава внатре во комората за време на зрачењето. Анализите што се изведуваат на примероците изложени 3 и 7 часа на истите услови се дел од студиите за фотостабилност, согласно ICH Q1B (ICH Q1B, 1996);
- **Кисела хидролиза:** Се изведува со раствори на HCl или со друга киселина со одредена моларност (концентрација), со која се третира примерокот со или без загревање и во одредено време, во зависност од природата и осетливоста на примерокот. По третирање со раствор на киселина, потребно е растворот да се неутрализира со раствор на база со иста моларност (концентрација);
- **Алкална хидролиза:** Се изведува со раствор на NaOH или со друга база со одредена моларност (концентрација), со која се третира примерокот со или без загревање и во одредено време, во зависност од природата и осетливоста на примерокот. По третирање со раствор на база потребно е растворот да се неутрализира со раствор на киселина со иста моларност (концентрација).

7.5.2. Опсег

Опсегот претставува интервал помеѓу најнискиот и највисокиот резултат во кој аналитичкиот метод има соодветно ниво на прецизност, точност и одговор.

7.5.2.1. Опсег на репортирање (Reportable range)

Опсегот на репортирање ги вклучува сите вредности од најнискиот до највисокиот резултат кој се репортира, за кои се постигнува задоволителна прецизност и точност. Вообичаено, опсегот на репортирање е зададен во истите единици како и спецификациските граници.

7.5.2.2. Работен опсег (Working range)

Работниот опсег одговара на најниските и највисоките концентрации или нивоа на чистота на примерокот, анализирани на аналитичкиот инструмент за кој аналитичката постапка обезбедува сигурни резултати. Обично се потребни математички пресметки за да се добијат резултати за репортирање. Опсегот на репортирање и работниот опсег може да бидат идентични.

Табела 11. Потребен минимален опсег на репортирање (автор)

Аналитичка процедура	Долен лимит на опсег на репортирање	Горен лимит на опсег на репортирање
Содржина на активна компонента и конзерванс и други компоненти*	80% од декларираната содржина или 80% од долната спецификациска граница	120% од декларираната содржина или 120% од горната спецификациска граница
Воедначеност на содржина	70% од декларираната содржина	130% од декларираната содржина
Растворливост		
Конвенционално ослободување: – Една точка – Повеќе точки	Q–45% Долна спецификациска граница или лимит на квантификација	130% од декларираната содржина
Модифицирано ослободување	Долна спецификациска граница или лимит на квантификација	
Онечистувања и остатоци од органски растворувачи	Ниво на рапортирање за секое онечистување	120% од shelf life спецификацијата за соодветното онечистување

*Во случај кога содржината на активната компонента и онечистувањата се изведуваат заедно со ист метод и со употреба само на 100% стандард, линеарноста мора да го покрие опсегот од нивото на рапортирање на онечистувањата до 120% од декларираната содржина на активната компонента.

Во ICH водичите Q3A(R2) „Impurities in New Drug Substances“ и Q3B(R2) „Impurities in New Drug Products“, дадени се дозволени лимити за „Reporting threshold“ – ниво на репортирање во зависност од максималната дневна доза.

Табела 12. Ниво на рапортирање во зависност од максималната дневна доза (ICH Q3A(R2), 2006; ICH Q3B(R2), 2006)

Максимална дневна доза	Reporting threshold
<i>Активна супстанција</i>	
≤ 2 g	0,05%
> 2 g	0,03%
<i>Готов фармацевтски производ</i>	
≤ 1 g	0,1%
> 1 g	0,05%

7.5.2.3. Одговор (калибрационен модел)

Одговор претставува способност на аналитичката постапка (во даден опсег) да добие сигнал кој е ефективно поврзан со концентрацијата (количината) или активноста на аналитот во примерокот со некоја позната математичка функција. Иако повеќето аналитички постапки се линеарни, некои аналитички постапки може да покажуваат нелинеарен одговор во однос на концентрацијата. Во такви случаи потребен е модел или функција, кој/а го дефинира односот помеѓу одговорот на аналитичката постапка и концентрацијата. Соодветноста на моделот треба да се процени со помош на нелинеарна регресиона анализа (на пример, со коефициент на корелација).

7.5.3. Линеарност

Линеарноста се однесува на способноста на аналитичкиот метод да се добијат тест резултати кои се директно пропорционални на концентрацијата на аналитот. Линеарноста треба да биде испитана и потврдена во опсегот на репортирање на

методот. Линеарноста се одредува во најмалку 5 различни концентрации. Добиените резултати од линеарноста се евалуираат статистички преку пресметка на регресионата права со метод на најмали квадрати. Регресионата анализа е математичка проценка на степенот на зависноста. Равенката на регресионата права е дадена како:

$$y = a + bx \quad [9]$$

Каде:

- Наклонот на регресионата права (*slope-b*) ја карактеризира линеарноста на одговорот во однос на концентрацијата;
- Отсечокот на *y*-оската (*intercept-a*) е мерка за систематската грешка;
- Коефициентот на корелација (*r*) и коефициентот на детерминација (*r*²) се математички мерки за линеарноста;

Отсечокот на *y*-оската (*y-intercept value*) не треба значително да отстапува од нула. Ова отстапување од *intercept*-от од нула го именуваме како *intercept deviation* и се пресметува со формулата:

$$\text{intercept deviation}(\%) = \left| \frac{y\text{-intercept value} \times 100\%}{\text{response at 100\% level}} \right| \quad [10]$$

Табела 13. Препорачани вредности за *intercept deviation* (автор)

Параметар	Intercept deviation (%)
Содржина на активна компонента	≤ 2,0%
Содржина на конзерванс и други компоненти	≤ 2,0%
Растворливост	≤ 2,0%
Сродни и деградациони продукти (HPLC)	≤ 10,0%
Сродни и деградациони продукти (TLC или друг помалку чувствителен метод)	≤ 20,0%
GC методи за содржина на активна компонента/други компоненти	Headspace: ≤ 15,0% Liquid injection: ≤ 10,0%
GC методи за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи	≤ 15,0%

Дополнително, може да се прикаже и како график со анализа на остатоци (*plot of residuals*), кој визуелно ќе биде евалуиран (грешките треба да бидат независни и да покажуваат нормална дистрибуција).

7.5.3.1. Начин на изведување на тестот за линеарност

Се подготвува стандарден раствор според пропишаниот аналитички метод во работната концентрација. Другите концентрации се подготвуваат, ако е можно, со разредување од еден заеднички основен стандарден раствор или со мерење и подготовка на нови стандарди. Избраните концентрации се во зависност од работната концентрација на стандардот во аналитичкиот метод и според горенаведениот минимален опсег на репортирање. На секое концентрациско ниво се прават по минимум 3 определувања (инјектирања) на стандардниот раствор и се пресметува средната вредност.

Кај GC методите за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи вредноста за најниското концентрациско ниво може да се преземе од првите три инјектирања од лимит на квантификација.

7.5.3.2. Критериум на прифатливост за тестот за линеарност

Табела 14. Критериуми на прифатливост за тестот за линеарност (автор)

Параметар	Фактор на корелација (<i>r</i>)
Содржина на активна компонента	> 0,999
Содржина на конзерванс и други компоненти	> 0,999
Растворливост	> 0,999
Сродни и деградациони продукти (HPLC)	> 0,99
Сродни и деградациони продукти (TLC или друг помалку чувствителен метод)	> 0,95
GC методи за содржина на активна компонента/други компоненти	> 0,99
GC методи за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи	> 0,99

7.5.3.3. Определување на Relative Response Factor (RRF) преку тестот за линеарност

При определување на *Relative Response Factor*, или активната компонента се спајкува со онечистувањето/ата или се подготвуваат поединечно стандарди од онечистувањата и стандарди од активната компонента во најмалку три концентрациски нивоа. *Relative Response Factor*-от се пресметува од односот на аналитичкиот одговор на онечистувањето и аналитичкиот одговор на активната компонента на секое концентрациско ниво или преку односот *slope-b* на онечистувањето и *slope-b* на активната компонента, добиени од кривата на линеарност во трите концентрациски нивоа.

За онечистувања за кои се добива *Relative Response Factor* надвор од фармакопејски дозволените граници (0,8-1,2), определениот корекционен фактор (реципрочна вредност од *Relative Response Factor*-от) се користи за квантификација на онечистувањата. Вообичаен критериум за воведување корекционен фактор е тој да биде во граници 0,2-5,0 (BP SC I A/Control of Impurities).

7.5.4. Лимит на детекција

Лимит на детекција претставува најмалата количина на аналит во примерокот која може да биде детектирана, но не мора да биде квантифицивана. Во зависност од тоа дали постапката е инструментална или неинструментална, за определување на лимитот на детекција се можни неколку различни пристапи.

7.5.4.1. Определување на лимит на детекција врз база на визуелна евалуација

Вообичаено, определувањето на лимитот на детекција врз база на визуелна евалуација, се користи за неинструментални методи, но може да се употреби и за инструментални методи. Лимитот на детекција се определува со испитување на примероци со позната концентрација на аналит и утврдување на минималната концентрација при која аналитот може со сигурност да се детектира.

7.5.4.2. Определување на лимит на детекција врз база на сигнал-шум однос

Определувањето на лимитот на детекција врз база на сигнал-шум односот може да се примени на аналитички методи кои покажуваат шум на базната линија. Определувањето се изведува со споредување на измерените сигнали од примероци со ниска и позната концентрација на аналитот со тие од слепата проба и утврдување на минималната концентрација која може со сигурност да се детектира. Односот сигнал-шум од 3:1 генерално се смета за прифатлив при проценка на лимитот на детекција. Во Ph. Eur. е даден начинот на пресметка на овој однос преку равенката:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h} \quad [11]$$

Каде:

- H – висината на пикот на активната компонента измерена со екстраполирање на максимумот на пикот врз базната линија;
- h – висината на шумот добиен од слепата проба (дилуентот), измерен на растојание петпати по ширината на полувисината на пикот од анализот, по можност подеднакво лоциран околу местото каде што се наоѓа пикот од анализот.

7.5.4.3. Определување на лимит на детекција врз база на стандардната девијација на аналитичкиот одговор (σ) и наклонот (S)

За определување на лимитот на детекција врз база на стандардната девијација на аналитичкиот одговор и наклонот, се користи следната равенка:

$$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} \quad [12]$$

Каде:

- σ – стандардна девијација на аналитичкиот одговор;
- S – наклон на кривата.

Наклонот на кривата (S) може да се процени од калибрационата крива на анализот. Вредноста σ може да се процени преку:

- стандардната девијација на слепата проба – мерење на величината на повеќе аналитички одговори на слепата проба и определување на стандардната девијација од нив;
- од калибрационата крива добиена од одговорите на анализот во количина која е многу блиска до лимитот на детекција.

При дефинирањето на лимитот на детекција треба да биде презентирана методата која е употребена за негово утврдување. Доколку LOD е определен врз база на визуелна евалуација или врз база на односот сигнал-шум, пожелно е да бидат презентирани релевантни хроматограми.

7.5.4.4. Начин на изведување на тестот за лимит на детекција

Најчесто се пресметува преку проценка на сигнал-шум односот. Се споредуваат измерените сигнали од анализот подготвен во ниски концентрации со шумот добиен на базната линија. Се подготвуваат според методот раствори од активната супстанца и/или познатото онечистување со разредувања на соодветните стандардни раствори, сè додека не се добие вредност за односот сигнал-шум околу 3. Стандардниот раствор во таа концентрација што го претставува определениот лимит на детекција се инјектира шестпати последователно.

7.5.4.5. Критериум на прифатливост на тестот за лимит на детекција

Односот сигнал-шум треба да е околу 3:1.

7.5.5. Лимит на квантификација

Лимит на квантификација претставува најмалата количина аналит во примерокот која може да биде квантификувана со соодветна прецизност и точност. Кај методи за определување на онечистувања, лимитот на квантификација треба да биде еднаков или помал од нивото на репортирање. Во зависност од тоа дали постапката е неинструментална или инструментална, за определување на лимитот на квантификација се можни неколку различни пристапи.

7.5.5.1. **Определување на лимит на квантификација врз база на визуелна евалуација**

Определувањето на лимитот на квантификација врз база на визуелна евалуација се користи за неинструментални методи, но може да се употреби и за инструменталните методи. Лимитот на квантификација се определува со испитување на примероци со позната концентрација на аналит и утврдување на минималната концентрација при која аналитот може да се квантификува.

7.5.5.2. **Определување на лимит на квантификација врз база на сигнал-шум однос**

Определувањето на лимитот на квантификација врз база на сигнал-шум односот, може да се примени на аналитички методи кои покажуваат шум на базната линија. Определувањето се изведува со споредување на измерените сигнали од примероци со ниска и позната концентрација на аналитот со тие од слепата проба (растворувач) и утврдување на минималната концентрација која може квантитативно да се определи. Односот сигнал-шум од најмалку 10:1 се смета за прифатлив при проценка на лимитот на квантификација.

7.5.5.3. **Определување на лимит на квантификација врз база на стандардната девијација на аналитичкиот одговор (σ) и наклонот (S)**

За определување на лимитот на квантификација врз база на стандардната девијација на аналитичкиот одговор и наклонот, се користи следната равенка:

$$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{S} \quad [13]$$

Каде:

- σ – стандардна девијација на аналитичкиот одговор;
- S – наклон на кривата.

Наклонот на кривата (S) може да се процени од калибрационата крива на аналитот. Вредноста σ може да се процени преку:

- стандардната девијација на слепата проба – мерење на величината на повеќе аналитички одговори на слепата проба и определување на стандардната девијација од нив;
- од калибрационата крива добиена од одговорите на аналитот во количина која е многу блиска до лимитот на квантификација.

При дефинирањето на лимитот на квантификација треба да биде презентирана методата која е употребена за негово утврдување. Доколку LOQ е определен врз база на визуелна евалуација или врз база на односот сигнал-шум, пожелно е да бидат презентирани релевантни хроматограми.

7.5.5.4. **Начин на изведување на тестот за лимит на квантификација**

Најчесто се пресметува преку проценка на сигнал-шум односот. Се споредуваат измерените сигнали од аналитот подготвен во ниски концентрации со шумот добиен од базната линија. Се подготвуваат според методот раствори од активната супстанца и/или познатото онечистување со разредувања на соодветните стандардни раствори, сè додека не се утврди концентрацијата која може да се квантификува (односот сигнал-шум да биде најмалку 10:1) и која претставува лимит на квантификација. Стандардниот раствор во таа концентрација се инјектира шестпати последователно и се пресметува релативна стандардна девијација (RSD (%)) од одговорот.

7.5.5.5. Критериум на прифатливост на тестот за лимит на квантификација

Табела 15. Критериуми на прифатливост на тестот за лимит на квантификација (автор)

Параметар	Однос сигнал-шум	RSD (%)
Сродни и деградациони продукти (HPLC)	$\geq 10:1$	$\leq 10,0\%$
GC методи за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи	$\geq 10:1$	$\leq 30,0\%$

7.5.6. Точност

Точноста на аналитичкиот метод е блискост на резултатите добиени со аналитичкиот метод со вистинската вредност. Потребни се најмалку 9 определувања кои се вршат на 3 концентрации во пропишаниот опсег на репортирање на аналитичкиот метод (на пример, на секое концентрациско ниво по 3 проби подготвени според пропишаниот аналитички метод).

7.5.6.1. Изведување на точност при определување на онечистувања и активна супстанција во готови фармацевтски форми

Примена на аналитичкиот метод на вештачки подготвена смеса која се добива кога на една иста количина на плацебо се додаваат познати и различни количини на активна супстанција кои се над и под тест-концентрацијата, односно спецификациската граница.

Примена на аналитичкиот метод на вештачки подготвена смеса која се добива кога на една иста количина на плацебо се додаваат активната супстанција во работната концентрација, како и познати и различни количини на онечистувања/деградациони продукти кои се над и под тест-концентрацијата, почнувајќи од нивото на репортирање. Во случај кога не се достапни онечистувања, точноста се изведува со спајкување на плацебото со активната супстанца во различни концентрации.

Спајкувањето се врши со додавање различни волумени од претходно подготвени основни раствори (*stock solutions*) од активната супстанција/онечистувањето.

Точноста се изразува како аналитички принос (*Recovery*) изразен во проценти со 95% интервал на доверба (95% *Confidence Interval* – CI). Овој интервал треба да биде во согласност со поставените критериуми на прифатливост (Skoog et al., 2022).

Аналитичкиот принос (%) се пресметува од односот помеѓу добиената и теоретската вредност за додадено количество супстанција, помножен со 100.

7.5.6.2. Начин на изведување на тестот за точност

Се мерат плацебото и филмот за сите концентрациски нивоа во иста количина (како 100 %-но) и се спајкуваат со познати и различни количини на активната супстанција или онечистувања. Се спајкуваат по 3 проби за секоја концентрација. Се подготвува стандарден раствор во работната концентрација пропишана во аналитичкиот метод.

Спајкувањето се изведува со директно додавање цврста супстанција кон плацебото или со додавање соодветна количина на основен стандарден раствор (*stock solution*) подготвен од супстанцијата која се додава кон плацебото.

За параметарот растворливост спајкувањето се изведува со додавање познати количества од активната супстанција во чашите за растворливост, кои содржат 100 %-но количество плацебо и филм, претходно додадени во медиумот за растворливост.

Точноста може да се изведува и на готови подготвени фармацевтски форми, каде што активната компонента е во различни концентрации. Овој начин е најчесто применлив при анализа на точноста кај параметарот растворливост.

За параметарот растворливост оправдана е изведба на параметарот со симулација во волуметриски садови на магнетна мешалка наместо во апарат за

растворливост. Изведувањето на тестот за точност со симулација во волуметриски садови на магнетна мешалка е оправдано кај методи со корпи каде е невозможно спајкуваната проба да се задржи во корпата. Во одредени случаи овој начин е применлив и кај нискодозажни препарати и препарати со продолжено ослободување.

Во случаи каде активната супстанца е нерастворлива во воден раствор, точноста на параметарот растворливост може да се анализира со претходно растворање на активната супстанција во мала количина на органски растворувач, така што крајната концентрација на органскиот растворувач треба да биде не повеќе од 5% во однос на финалниот волумен на водениот медиум за растворливост.

Секоја спајкувана проба се анализира според пропишаниот аналитички метод, од најниското до највисокото тестирано концентрациско ниво. Се пресметува аналитички принос (%) помеѓу добиената и теоретската вредност за додадено количество супстанција, како и средна вредност и RSD (%) од трите проби за секое концентрациско ниво. На крај се пресметува и средна вредност од аналитичкиот принос (%) и RSD (%) од сите тестирани концентрациски нивоа.

7.5.6.3. Критериуми на прифатливост на тестот за точност

Табела 16. Критериуми на прифатливост на тестот за точност (автор)

Параметар	Аналитички принос – Recovery (%) со 95% интервал на доверба	RSD (%) на секое концентрациско ниво
Содржина на активна компонента	98,0-102,0%	≤ 2,0%
Содржина на активна компонента со примена на помалку чувствителни методи	95,0-105,0%	≤ 5,0%
Содржина на конзерванс и други компоненти	95,0-105,0%	≤ 5,0%
Растворливост	95,0-105,0%	≤ 5,0%
Сродни и деградациони продукти (HPLC)	Ниво на рапортирање ≤ 0,1%: 80,0-120,0%	≤ 20,0%
	Ниво на рапортирање > 0,1%: 90,0-110,0%	≤ 10,0%
GC методи за содржина на активна компонента/други компоненти	90,0-110,0%	Headspace: ≤ 15,0% Liquid injection: ≤ 10,0%
GC методи за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи	За ниво на рапортирање: 70,0-130,0%	≤ 15,0%
	Над ниво на рапортирање: 80,0-120,0%	

7.5.7. Прецизност

Прецизноста е степен на блискост меѓу поединечните резултати, кога методата се аплицира последователно на повеќе поединечно земени примероци од ист материјал. Прецизноста се докажува преку следните тестови:

- прецизност на системот;
- повторливост (прецизност на методата);
- интермедиерна прецизност;
- репродуцибилност.

7.5.7.1. Прецизност на системот

Прецизност на системот се однесува на одредување на прецизноста при работа под исти услови за краток временски период на еден ист примерок. Иако овој тест повеќе се однесува на соодветност на системот, сепак влијае на прецизноста како перформансна карактеристика, па затоа се изведува при валидација на прецизноста.

7.5.7.1.1. Начин на изведување на тестот за прецизност на системот

Се подготвува стандарден раствор од активната супстанција и/или онечистувањето во работна концентрација според пропишаниот аналитички метод. Се вршат 6 последователни определувања на еден ист примерок и се пресметува средната вредност и RSD (%).

7.5.7.1.2. Критериуми на прифатливост на тестот за прецизност на системот

Табела 17. Критериуми на прифатливост на тестот за прецизност на системот (автор)

Параметар	RSD (%)
Содржина на активна компонента	≤ 2,0%
Содржина на конзерванс и други компоненти	≤ 2,0%
Растворливост	≤ 2,0%
Сродни и деградациони продукти (HPLC)	≤ 5,0%
Сродни и деградациони продукти (TLC или друг помалку чувствителен метод)	≤ 10,0%
GC методи за содржина на активна компонента/други компоненти	Headspace: ≤ 15,0% Liquid injection: ≤ 5,0%
GC методи за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи	≤ 15,0%

7.5.7.2. Повторливост (прецизност на методата)

Повторливоста се однесува на одредување на прецизноста на методот при работа под исти услови за краток временски период. Овој тест за разлика од прецизноста на системот се изведува на повеќе поединечни примероци од еден ист материјал.

7.5.7.2.1. Начин на изведување на тестот за повторливост

Кај методите за определување на содржина на активна компонента/други компоненти, сродните и деградационите продукти и остатоците од органски растворувачи се подготвуваат по 6 проби според пропишаниот аналитички метод или алтернативно, по 3 проби во 3 или повеќе концентрациски нивоа во опсегот на репортирање. Во случај кога се подготвуваат проби во различни концентрациски нивоа, тестовите за точност и повторливост се изведуваат како еден тест.

Кај методот за растворливост се подготвуваат по 6 проби од една иста чаша за растворливост според пропишаниот аналитички метод.

Кај високо варијабилни производи прецизноста на методот може да се изведе со подготовка на 6 вештачки подготвени проби (матрикс спајкуван со познати количества на аналитот од интерес).

Исто така, кај методи за сродни и деградациони продукти, во случај каде не се детектирани познатите онечистувања, се спајкуваат по 6 проби со стандарди од познатите онечистувања во соодветна концентрација, најчесто на спецификациското ниво (според проценка на аналитичарот и во зависност од чувствителноста на методот).

Доколку поединечните онечистувања не се достапни во позната концентрација, а располагаме со одреден *performance test*, *resolution* или *system suitability* стандард кој ги содржи тие онечистувања, тогаш се спајкува со истиот тој стандард. Се вршат последователни определувања на пробите и се пресметува средната вредност и RSD (%) од одговорот или од пресметаната количина (*amount*), по проценка кои вредности

се посоодветни за споредба. Секој поединечен резултат треба да биде изразен со 95% интервал на доверба и целиот интервал треба да ги исполнува поставените спецификациски граници.

Кај методи за определување на големина на честички со ласерска дифракција се анализираат 6 поединечни примероци од материјалот за анализа. Се пресметува средна вредност и RSD (%) за трите точки на дистрибуција (освен доколку не е пропишано поинаку во аналитичкиот метод): d10, d50 и d90.

7.5.7.2.2. Критериум на прифатливост за тестот за повторливост

Табела 18. Критериуми на прифатливост за тестот за повторливост (автор)

Параметар	Критериум на прифатливост
Содржина на активна компонента	RSD ≤ 2,0%
Содржина на конзерванс и други компоненти	RSD ≤ 5,0%
Воедначеност на содржина	AV ≤ 15,0%
Растворливост	RSD ≤ 2,0%
Сродни и деградациони продукти (HPLC)	Ниво на рапортирање ≤ 0,1%: RSD ≤ 20,0%
	Ниво на рапортирање > 0,1%: RSD ≤ 10,0%
Сродни и деградациони продукти (TLC или друг помалку чувствителен метод)	RSD ≤ 20,0%
GC методи за содржина на активна компонента/други компоненти	Headspace: RSD ≤ 15,0% Liquid injection: RSD ≤ 10,0%
GC методи за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи	RSD ≤ 15,0%
Методи за определување на големина на честички со ласерска дифракција	d50: RSD ≤ 10,0%* d10 и d90: RSD ≤ 15,0%*

*За честички помали од 10 µm, вредностите за RSD (%) се удвојуваат.

7.5.7.3. Интермедиерна прецизност

Интермедиерната прецизност се однесува на одредување на прецизноста во една иста лабораторија, но под различни услови како што се различни денови, различни аналитичари, различни инструменти и др.

7.5.7.3.1. Начин на изведување на тестот за интермедиерна прецизност

Тестот за интермедиерна прецизност се изведува на истиот начин опишан погоре кај тестот за повторливост, со таа разлика што се изведуваат два теста со променети услови (аналитичар, ден, инструмент итн.) и се споредуваат добиените резултати. Многу често, но и вообичаено е да се користат резултатите добиени од тестот за повторливост како резултати од прв аналитичар во тестот за интермедиерната прецизност. Тестот се изведува со промена на најмалку еден услов (аналитичар, инструмент, ден). Може да се примени експериментален дизајн на промена на повеќе услови истовремено. Се пресметува средна вредност, стандардна девијација и релативна стандардна девијација од шесте мерења од секоја поединечна анализа, како и од сите дванаесет мерења. Секој поединечен резултат треба да биде изразен со 95% интервал на доверба и целиот интервал треба да ги исполнува поставените спецификациски граници.

7.5.7.3.2. Критериум на прифатливост за тестот за интермедиерна прецизност

Табела 19. Критериуми на прифатливост за тестот за интермедиерна прецизност (автор)

Параметар	Критериум на прифатливост
Содржина на активна компонента	RSD ≤ 2,0%, Overall RSD ≤ 2,0%
Содржина на конзерванс и други компоненти	RSD ≤ 5,0%, Overall RSD ≤ 5,0%
Воедначеност на содржина	AV ≤ 15,0%
Растворливост	RSD ≤ 2,0%
Сродни и деградациони продукти (HPLC)	Ниво на рапортирање ≤ 0,1%: RSD ≤ 20,0%, 0,05% апсолутна разлика помеѓу средните вредности
	Ниво на рапортирање > 0,1%: RSD ≤ 10,0%, 25% релативна разлика помеѓу средните вредности
Сродни и деградациони продукти (TLC или друг помалку чувствителен метод)	RSD ≤ 20,0%
GC методи за содржина на активна компонента/други компоненти	Headspace: RSD ≤ 15,0%, Overall RSD ≤ 15,0%
	Liquid injection: RSD ≤ 10,0%, Overall RSD ≤ 10,0%
GC методи за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи	RSD ≤ 15,0%
Методи за определување на големина на честички со ласерска дифракција	d50: RSD ≤ 10,0%* d10 и d90: RSD ≤ 15,0%*

*За честички помали од 10 μm, вредностите за RSD (%) се удвојуваат.

7.5.7.3.3. Wätzig тест на еквивалентност

Претставува алтернативен тест за проценка на интермедиерната прецизност кај аналитичките методи за определување на содржина на активна супстанција, содржина на конзерванс и други компоненти и растворливост. Од статистички аспект, проблемот за проценка на еквивалентноста на групи резултати може да се редефинира како проблем на проценка дали разликата помеѓу средните вредности од две групи добиени резултати е значајно различна од 0. На прв поглед ова може да изгледа како практично тривијална задача, која би можела да се реши со примена на конвенционалните „еднодимензионални“ (*univariate*) статистички приоди (такви каде што методите се базирани на анализа на еднодимензионални случајни променливи), како што е на пример, *Student*-овиот *t*-тест. Меѓутоа, поподробната и потемелна анализа на овој проблем, како и темелната ревизија на целта на статистичката анализа на ваков тип податоци, неминовно доведува до заклучокот дека е неопходна примена на поинаков пристап. Од причини кои се дополнително елаборирани подолу, во нашиот случај е имплементирана методологијата базирана на 90%-ен интервал на доверба за разликите помеѓу средните вредности од двете анализи во интермедиерната прецизност $\langle x_A \rangle - \langle x_B \rangle$, кој е спореден со соодветно избран (т.е. однапред дефиниран) интервал на толеранција. Оваа методологија е во голема мера препорачана и популаризирана од групата на проф. Н. Wätzig и е позната под името „тест на еквиваленција“ („*equivalence test*“), како и под различни варијации на овој назив. Методологијата е имплементирана врз база на претпоставката дека измерените вредности на параметарот x претставуваат примероци од популации x_A и x_B , кои се карактеризираат со нормални (Gauss-ови) распределби, за кои вредностите на математичките очекувања (на популациите) се μ_A и μ_B , соодветно. Во исто време, претпоставена е идентичност на дисперзиите ($\sigma_A^2 = \sigma_B^2$), кои во натамошниот текст се означени со σ^2 . Со оглед на тоа што последната величина е непозната, неопходно е да

се направи нејзина проценка преку пресметување на здружената варијанса на примерокот (Meier & Zünd, 1993). Оваа величина е дефинирана како тежински-нормирана средна вредност од варијансите на примероците добиени при првата и втората анализа (при што тежинскиот множител е пропорционален на бројот на соодветните степени на слобода кај двете анализи):

$$s_p^2 = \frac{(n_B-1) \cdot s_B^2 + (n_A-1) \cdot s_A^2}{n_B + n_A - 2} \quad [14]$$

Со оглед на тоа што сме заинтересирани за разликата $\mu_B - \mu_A$, природна проценка на оваа разлика би била разликата $\langle x_B \rangle - \langle x_A \rangle$.

Величината дефинирана со претходната равенка може да се изрази како линеарна комбинација од независни случајни променливи, распределени според Gauss-овиот закон (т.е. според законот за нормална распределба) (Meier & Zünd, 1993). Според тоа, таа е исто така карактеризирана со Gauss-ова распределба, со параметри дефинирани подолу:

$$\langle x_B \rangle - \langle x_A \rangle \sim N[\mu_B - \mu_A, \sigma^2 (\frac{1}{n_B} + \frac{1}{n_A})] \quad [15]$$

Задачата за изнаоѓање на интервалот на доверба би била едноставна доколку дисперзијата σ^2 е позната. Со оглед на фактот што тоа не е случај, понатаму е постапено на следниов начин. Претпоставуваме дека множеството измерени вредности на x_A , т.е. $\{x_{A,1}, x_{A,2}, \dots, x_{A,n}\}$, се состои од идентични и идентично распределени (според законот за нормална распределба) случајни променливи со математичко очекување μ_A и дисперзија σ^2 . Аналогна претпоставка е валидна и за множеството измерени вредности на x_B , односно: $\{x_{B,1}, x_{B,2}, \dots, x_{B,n}\}$.

Во овој случај, меѓутоа, математичкото очекување е μ_B , а дисперзијата е σ^2 . Доколку претходните претпоставки се исполнети, може да се покаже дека статистиката ја следи t -распределбата со $(n_B + n_A - 2)$ степени на слобода:

$$\frac{(\langle x_B \rangle - \langle x_A \rangle) - (\mu_B - \mu_A)}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_B} + \frac{1}{n_A}}} \quad [16]$$

Понатаму, погодно е да се воведат оценката на стандардната девијација (или стандардната грешка) на разликата $\langle x_B \rangle - \langle x_A \rangle$:

$$s_{diff} = s_{\langle x_B \rangle - \langle x_A \rangle} = s_p \sqrt{\frac{1}{n_B} + \frac{1}{n_A}} \quad [17]$$

Под претходно елаборираните услови, $100 \times (1 - \alpha)\%$ -иот интервал на доверба за $\mu_B - \mu_A$, е даден со изразот:

$$(\langle x_B \rangle - \langle x_A \rangle) \pm t_{n_B+n_A-2, \alpha/2} \cdot s_{diff} \quad [18]$$

Доколку долната и горната граница на интервалот на доверба за $\mu_R - \mu_S$ ги означиме со $\delta_{L,CI}$ и $\delta_{H,CI}$, соодветно, овие величини ќе бидат зададени со изразите:

$$\delta_{L,CI} = (\langle x_B \rangle - \langle x_A \rangle) - t_{n_B+n_A-2, \alpha/2} \times s_{diff} \quad [19]$$

$$\delta_{H,CI} = (\langle x_B \rangle - \langle x_A \rangle) + t_{n_B+n_A-2, \alpha/2} \times s_{diff} \quad [20]$$

При $\alpha = 0,1$ (α -error probability), $t_{n_B+n_A-2,\alpha/2}$ претставува табеларно отчитана вредност според $100 \times (1 - \alpha)\%$ -иот интервал на доверба и според бројот на степени на слобода.

На пример, кај методот за содржина или растворливост, за бројот на степени на слобода $10(n_B + n_A - 2)$ и $\alpha = 0,1$, t -вредноста изнесува 1,812.

Воведува, исто така, и интервал на толеранција, чија долна и горна граница ги означуваме соодветно со $\delta_{L,TOL}$ и $\delta_{H,TOL}$. Овие интервали се поставуваат врз основа на параметарот што се одредува и границите на спецификација.

7.5.7.3.4. Критериум на прифатливост за Wätzig тест на еквивалентност

Се поставува нулта хипотеза: нема статистички значајна разлика помеѓу две групи резултати, т.е. еквивалентноста е докажана доколку целосниот интервал на доверба се содржи во интервалот на толеранција (интервал на прифатливост), базирано на $100 \times (1 - \alpha)\%$ -иот интервал на доверба и можност за грешка $\alpha = 0,1$: $(\delta_{L,TOL} \leq \delta_{L,CI}) \wedge (\delta_{H,CI} \leq \delta_{H,TOL})$.

Табела 20. Критериуми на прифатливост за Wätzig тест на еквивалентност при определување на интермедиерната прецизност (автор)

Параметар	Долен лимит на толеранција ($\delta_{L,TOL}$)	Горен лимит на толеранција ($\delta_{H,TOL}$)
Содржина на активна компонента	-2,5	+2,5
Содржина на конзерванс и други компоненти	-5,0	+5,0
Растворливост	-5,0	+5,0
GC метода за содржина на активна компонента/други компоненти	-5,0	+5,0
GC метода за остатоци од органски растворувачи	-5,0	+5,0

7.5.7.4. Репродуцибилност

Репродуцибилноста се однесува на одредување на прецизноста во две различни лаборатории. Овој тест се изведува како дел од ко-валидација при трансфер на аналитичкиот метод помеѓу две лаборатории. Проценка на резултатите се прави со истите статистички тестови како кај интермедиерната прецизност. Резултатите за интермедиерна прецизност можат да бидат преземени од тестот за репродукцибилност.

7.5.8. Робустност

Робустност на аналитичката постапка е мерка за нејзината способност да остане непроменета при мали, но свесно направени варијации на параметрите на методот.

7.5.8.1. Начин на изведување на тестот за робустност

Се подготвува *system suitability* стандардот и стандард во работната концентрација според пропишаниот аналитички метод, кој се анализира последователно. Се следи промената на *system suitability* параметрите (симетрија на пикот, број на теоретски подови, RSD од 6 репликати, резолуција и слично). Робустноста може да се испита и на пробни раствори или пробни раствори спајкувани со соодветни онечистувања во случаи каде што постои можност за критично раздвојување на соседни пикови или има интеракција на пикови од матриксот со пиковите од интерес. Бројот на пробни раствори кои се хроматографираат при робустност не е предефиниран, се одредува од случај до случај. Во случај на растворливост генерално се пуштаат по 6 пробни раствори.

Освен испитување на робушноста која се однесува на методот на испитување, може да се изведе робушност на подготовката на примерокот за анализа (Sample preparation). Се изведува така што се прави промена на времето на третирање на растворите, промена на ултразвучна бања со магнетна мешалка и слично.

Робушноста треба да се испита со промена на минимум еден услов или по принцип на дизајн на експерименти. Примената на дизајн на експерименти во испитување на робушноста овозможува да се испита влијанието на повеќе фактори истовремено, како и влијанието на можната интеракција помеѓу факторите врз одговорот. Во текот на развојот на методот најчесто користен софтверски пакет за испитување на робушноста преку дизајн на експерименти е MODDE®. Доколку е апликативно испитувањето на робушноста во текот на развојот, може да се преземе во валидацијата на аналитичката постапка.

Прв чекор при воспоставувањето на дизајнот на експерименти е проценка и избор на експериментални фактори (проток, температура на колона, рН, концентрација, однос на мобилна фаза, промена на колона и сл.) и утврдување на границите (нивоата) на овие фактори (отстапувања од зададените вредности) како и дефинирање на одговорите (резолюција, симетрија, теоретски подови, релативна стандардна девијација) и дозволените граници. Треба да се изберат експериментални фактори за кои се смета дека имаат најголемо влијание врз одговорот. Вообичаено, избраните фактори се анализираат на две нивоа, ниско (-1) и високо (+1) кои се наоѓаат околу вредноста дефинирана во аналитичката постапка. Следен чекор е избор на соодветен експериментален дизајн. Во зависност од избраните фактори и одговори самиот софтвер дава предлог-дизајни. Најчесто користен дизајн при испитување на робушноста на методот е *Plackett Burman*. По изведувањето на експериментите според избраниот дизајн и внесот на добиените одговори, се дефинира математичкиот модел кој се одбира како опција понудена од самиот софтвер. Следен чекор е евалуација на ефектите од факторите, како и утврдување на меѓуфакторските интеракции, графички прикажано во *Pareto* дијаграм. По евалуација на значајноста на факторите, графички се прикажува областа во која се задоволени предефинираните критериуми како дводимензионален (2 независни фактори), тродимензионален (површина на одговор на два независни фактори) или четиридимензионален приказ.

Табела 21. Услови кои се менуваат при тестот за робушност во зависност од типот на аналитичкиот метод (автор)

Услови кои се менуваат при тестот за робушност	Препорачан опсег на тестирање
HPLC	
Проток на мобилната фаза	± 50%
Однос на компонентите во мобилната фаза (V/V%)	± 5% апсолутни (± 2% апсолутни за компоненти со низок удел)
рН на водената фаза (пуферот) во мобилната фаза	± 0,2 рН единици
Концентрација на соли во водената фаза	± 10%
Температура на колоната	± 5°C
Промена на колона со колона од друга серија, со ист тип на колона од друг производител, еквивалентна колона	/
Промена на инструмент	/
UV-Vis спектрофотометрија	
Бранова должина	± 5 nm
Промена на инструмент	/

NIR/RAMAN	
Дебелина на примарната амбалажа	Едно ниво под и едно ниво над оригиналната примарна амбалажа
Промена на аналитичар	/
Промена на инструмент	/
GC	
Проток на гасот носач	± 50%
Температурен градиент	± 10%
Температура на инјектор	± 10%
Температура на детектор	± 10%
Промена на колона со колона од друга серија, со исти тип на колона од друг производител	/
Промена на колона со колона со слични димензии, но иста стационарна фаза (еквивалентна колона)	Дебелина на филм (стационарна фаза): од -50% до +100%; Должина на колона ± 70%; Внатрешен дијаметар на колона: ± 50%
Титрација	
Количина на индикатор	/
Фактор (титар) на титривал	/
Количина на растворувач	/
TLC	
Однос на компонентите во мобилната фаза (V/V%)	/
Должина на патувањето на мобилната фаза	/
Распределба на големина на честички со ласерска дифракција	
<i>Методи со сува дисперзија</i>	<i>Методи со влажна дисперзија</i>
Притисок на воздух	Број на вртежи
Feed rate	Јачина на ултразвук
Времетраење на мерење	Времетраење на мерење
Висина на инка	Степен на опструкција
	/
Растворливост	
Број на вртежи на веслото или корпата	± 4%
Температура на бањата за растворливост	± 0,5°C
pH вредност на медиумот	± 0,1 pH единица

7.5.8.2. Критериум на прифатливост на тестот за робустност

Прифатливите вредности за *system suitability* параметрите се воспоставуваат во зависност од аналитичкиот метод. Како критериум на прифатливост може да се воведат вредност за резолуција помеѓу критични разделувања, *peak to valley* критериум каде нема можност за разделување до базна линија, симетрија односно *tailing factor*, број на теоретски подови, RSD од 6 инјектирања и слично. Кога при робустност се тестираат пробни раствори, се вршат споредби со тоа што резултатите за пресметаната количина (*amount*) од оригиналниот (непроменетиот) метод се земаат за референтни и во однос на нив се прават сите споредби.

Табела 22. Критериуми за споредба на резултатите од пробните раствори (автор)

Параметар	Критериум на прифатливост
Содржина на активна компонента	Overall RSD \leq 2,0%
Содржина на конзерванс и други компоненти	Overall RSD \leq 5,0%
Растворливост	Overall RSD \leq 5,0%*
Сродни и деградациони продукти	Ниво на рапортирање \leq 0,1%: 0,05% апсолутна разлика помеѓу средните вредности
	Ниво на рапортирање $>$ 0,1%: 25% релативна разлика помеѓу средните вредности
GC методи за содржина на активна компонента/други компоненти	Headspace: RSD \leq 15,0%, Overall RSD \leq 15,0%
	Liquid injection: RSD \leq 10,0%, Overall RSD \leq 10,0%
GC методи за сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворувачи	RSD \leq 15,0%, Overall RSD \leq 15,0%
Методи за определување на распределба на честички по големина со ласерска дифракција	d50: RSD \leq 10,0%** d10 и d90: RSD \leq 15,0%**

*За специфични случаи, за методите за растворливост каде имаме претходно позната варијабилност на резултати предизвикани од природата на молекулата, технолошкиот процес, тип на инструмент и слично, а која варијабилност е докажана во текот на развојот на производот и/или при анализа на поголем број примероци од различни серии (тренд на резултати), дозволен е прифатлив критериум за Overall RSD \leq 10,0%;

**За честички помали од 10 μ m, вредностите за RSD (%) се удвојуваат.

7.5.8.3. Алтернативни тестови за проценка на робустност, Wätzig тест на еквивалентност

Табела 23. Критериуми на прифатливост за Wätzig тест на еквивалентност при определување на робустност (автор)

Параметар	Долен лимит на толеранција ($\delta_{L,TOL}$)	Горен лимит на толеранција ($\delta_{H,TOL}$)
Содржина на активна компонента	-2,5	+2,5
Содржина на конзерванс и други компоненти	-5,0	+5,0
Растворливост	-5,0	+5,0
GC метода за содржина на активна компонента/други компоненти	-5,0	+5,0
GC метода за остатоци од органски растворувачи	-5,0	+5,0

7.5.9. Влијание на филтерот

Овој тест се изведува за да се испита дали филтерот кој се употребува во аналитичкиот метод има влијание, како апсорпција или интерференција со активната супстанца. Уште во развојот на методот се испитува влијанието на повеќе видови филтри кои се користат во аналитичките методи. Овој параметар вообичаено е дел од развој на метод, меѓутоа во некои случаи може да се изведува при валидација. Во зависност од природата на пробниот раствор, на пример, ако е многу вискозен како кај

течни форми – суспензии или полуцврсти форми (масти, кремове, гелови) и слично, како и кај високи концентрации на пробен раствор при определување на сродни и деградациони продукти, сосема е оправдано да не се испитува влијание на филтер на пробен раствор.

7.5.9.1. Начин на изведување на параметарот влијание на филтер

Се врши споредба на стандарден/пробен раствор подготвен во работната концентрација како нефилтриран и филтриран со филтерот кој се употребува за филтрација во аналитичкиот метод или филтерот чиешто влијание се испитува. Во случај кога не е возможно анализирање на нефилтриран пробен раствор поради можност за запушување на инструментот, се подготвува вештачка проба (матрикс спајкуван со анализот од интерес во работната концентрација) која се филтрира и се споредува со нефилтриран стандарден раствор во истата концентрација. Алтернативно, кога веќе е докажана соодветноста на одреден тип филтер, споредбата на различни типови филтри може да се врши во однос на раствор филтриран со веќе докажаниот филтер, наместо во однос на нефилтриран раствор. Се анализира нефилтриран стандарден/пробен раствор во 6 последователни определувања. Потоа се подготвуваат 6 индивидуални примероци на филтриран стандарден/пробен раствор со испуштање на соодветна количина филтрат. Се пресметува секој поединечен резултат на филтрираниот стандарден/пробен раствор во однос на средната вредност добиена од нефилтрираниот стандарден/пробен раствор како аналитички принос (%), средната вредност и RSD (%) од 6-те резултати за аналитички принос.

Аналитичкиот принос (%) се пресметува од одговорот кај стандардните раствори и од пресметаната количина (*amount*) или од одговорот кај пробните раствори, по проценка кои вредности се посоодветни за споредба.

7.5.9.2. Критериум на прифатливост за тестот за влијание на филтер

Табела 24. Критериуми на прифатливост за тестот за влијание на филтер (автор)

Параметар	Аналитички принос (%)	RSD (%)
Содржина на активна компонента	98,0-102,0%	≤ 2,0%
Содржина на конзерванс и други компоненти	98,0-102,0%	≤ 2,0%
Растворливост	98,0-102,0%	≤ 2,0%
Сродни и деградациони продукти (HPLC) – стандардни раствори	Стандардни раствори за квантификација: 95,0-105,0%	≤ 5,0%
	Стандарди кои не се вклучени во квантификација (Resolution solution, Peak to valley standard): 80,0-120,0%*	≤ 20,0%
Сродни и деградациони продукти (HPLC) – пробни раствори	Ниво на рапортирање ≤ 0,1%: 80,0-120,0%	≤ 20,0%
	Ниво на рапортирање > 0,1%: 90,0-110,0%	≤ 10,0%
GC – содржина на активна компонента/сродни и деградациони продукти	95,0-105,0%	Liquid injection: ≤ 10,0%

*За Peak ID стандарден раствор нема потреба од испитување на влијание на филтер.

7.5.10. Стабилност на аналитички раствор

Тестот се изведува со чување на стандардниот и пробниот раствор во услови на чување на собна температура и/или на пониска температура (најчесто 5°C) во волуметриска тиквичка или вијала и со анализирање на растворите во различни временски интервали. Тестот за стабилност на аналитички раствор е дел од развојот на аналитичкиот метод, но може да се изведува и при валидација.

7.5.10.1. Начин на изведување на параметарот стабилност на аналитички раствор

Се подготвува стандарден и пробен раствор во работната концентрација и стабилноста се испитува со споредба на аналитичкиот одговор на активната компонента, конзервансот или онечистувањата во текот на неколку временски интервали со аналитичкиот одговор на истите на почетокот на анализата. Се пресметува промената преку аналитичкиот принос (%) на аналитичкиот одговор на аналитот од интерес во сите временски интервали во однос на одговорот на истите на почетокот.

7.5.10.2. Критериум на прифатливост за тестот за стабилност на аналитички раствор

Табела 25. Критериуми на прифатливост за тестот за стабилност на аналитички раствор (Ahuja & Scypinski, 2001)

Параметар	Аналитички принос (%)
Содржина на активна компонента	Стандарден/пробен раствор: 98,0-102,0%
Содржина на конзерванс и други компоненти	Стандарден раствор: 98,0-102,0% Пробен раствор: 95,0-105,0%
Растворливост	Стандарден раствор: 98,0-102,0% Пробен раствор: 95,0-105,0%
Сродни и деградациони продукти (HPLC) – стандардни раствори	Стандард кој не е вклучен во квантификација System suitability (Resolution, peak to valley): 80,0-120,0%*
Сродни и деградациони продукти (HPLC) – пробни раствори	Ниво на рапортирање ≤ 0,1%: 75,0-125,0%
	Ниво на рапортирање > 0,1%: 90,0-110,0%
GC метода за содржина, сродни и деградациони продукти и остатоци од органски растворовачи	Стандарден/пробен раствор: 90,0-110,0%

*За Peak ID стандарден раствор доволна е позитивна идентификација на пикот од интерес; за S/N стандарден раствор потребно е само да биде задоволен критериумот S/N > 10.

При валидација на параметри кои имаат потесни или пошироки спецификациски граници, оправдано е поставување различни критериуми на прифатливост од дефинираните, со приложување на соодветно оправдување.

7.6. Ревалидација

Според животниот циклус на валидација, методите за тестирање може да бараат дополнителна валидација или ревалидација кога регулаторните агенции издаваат нови барања или кога се прават промени во методологијата (Hokanson, 1994b). Промени во методот и дополнителни активности за валидација може да бидат потребни кога има:

- Промени на инструменти;
- Промени на производот;
- Модификации на методот;
- Промена на аналитичарот;
- Застарена технологија.

Повторната валидација може да биде неопходна по промени во:

- Синтезата на супстанцијата на лекот;
- Составот на лекот на производот;
- Аналитичката постапка.

Степенот на потребната ревалидација зависи од природата на направените промени (Hokanson, 1994b).

8. ТРАНСФЕР НА АНАЛИТИЧКИ МЕТОД

Процесот за трансфер на аналитичката методологија е релативно едноставна операција. Во суштина, трансферот на аналитички метод претставува верификација дека методот или постапката за тестирање функционира на еквивалентен начин на две или повеќе различни локации или лаборатории и ги исполнува сите поставени критериуми на прифатливост (Vial et al., 1998).

Овој процес е воден од усогласеноста и управуван од статистички третман на добиените податоци. Овој аспект на „меѓулабораториски трансфер“ на целокупниот трансфер процес е опфатен од страна на McGonigle, кој нагласил дека успешните трансфери се поврзани со процесот на валидација на методот. Трансфер на метод е дефиниран како „вovedување потврден метод во назначена лабораторија за да може да се користи со истиот капацитет за кој првично е развиен“ (McGonigle, 1996).

Вториот дел од процесот на трансфер се однесува на трансфер на техничката „сопственост“ од една лабораторија во друга. Овој последен тип трансфер обично се поврзува со движењето на проектите за развој на лекови од истражување и развој до одделенијата за спроведување на рутински, секојдневни анализи.

Трансфер на аналитички метод (TAM) претставува комплетно документиран процес според кој приемната лабораторија (*receiving unit*) се квалификува за изведба на аналитички методи коишто потекнуваат од друга лабораторија (*sending/transferring unit*) (Vial et al., 1998). Целата на трансферот е да обезбеди гаранција дека лабораторијата којашто во иднина ќе го контролира квалитетот на лекот е успешно обучена и квалификувана за изведба на соодветниот аналитички метод. Брзи и целосни трансфери се клучни за успехот на експериментите при валидација на процесите за фармацевтските дозирани форми. Неодамна, на годишна работилница одржана од страна на Управниот комитет за аналитичко истражување и развој (*Analytical Research and Development Steering Committee, ARDSC*) на здружението за истражувања и производство на фармацевтски производи (*Pharmaceutical Research and Manufacturers Association, PhRMA*) беше нагласена важноста на аналитичкиот трансфер. На овој состанок претставници од здружението PhRMA компаниите се сретнаа со претставници од фармацевтските компании за да изготват „Прифатлива аналитичка практика“ (*Acceptable Analytical Practice, AAP*) што ќе функционира како соодветен образец за успешен трансфер на методот.

Во USP фармакопејата е објавена финалната верзија на Поглавјето <1224> за трансфер на аналитички процедури во USP 35–NF 30, која стана официјална во мај 2012 година. Претходно USP издаде мотивациско четиво за „Трансфер на аналитички процедури“ и врз основа на добиените коментари ја финализираше постапката и издаде општо поглавје <1224>. Ова поглавје ја опишува постапката за пренос на аналитички процедури од една лабораторија во друга лабораторија или во рамките на самата организацијата или во различни организации. Единствената разлика помеѓу мотивациското четиво и општото поглавје е пристапот заснован на ризик, предложен за видот и проширувањата на активностите при процесот на трансфер.

8.1. Процес на развој на лекови

Сите големи фармацевтски компании развиваат производи со користење слични општи процеси, како што е прикажано на Слика 12. Иако има плејада внатрешни иницијативи насочени кон намалување на временската рамка на развој на лекот и оттука целокупното време за продажба, основниот процес на развој на лекови остана непроменет.



Слика 12. Фази во тек на развој на лекот (<https://www.patheon.com/us/en/insights-resources/blog/drug-development-phases.html>)

Фармацевтските аналитичари кои работат во истражување и развој (R&D) развиваат и усовршуваат методи што на крајот ќе се користат за тестирање на идентитетот, квалитетот, чистотата, јачината и составот на производите што се продаваат. Не е невообичаено аналитичките методи да се подложат на повеќекратни повторувања во текот на животниот циклус на развој на фармацевтските производи. Промените на методите се резултат на промените на кој било параметар/фактор на производот, како што се: промена во синтезата на активната фармацевтска супстанција (API), составот на формулацијата и производствените процеси на дозираната форма. Важно е единиците за квалитет, кои на крајот ќе имаат техничка сопственост, да бидат во тек при промените на методите. На крајот на развојот, кога методите треба да станат „заклучени“, аналитичарите вообичаено се консултираат со единицата за квалитет за внесување коментар за предложениот пакет методи пред конечната валидација. Со ваквиот принцип на комуникација може да се избегнат проблеми при формалниот трансфер што би се одвивал во подоцнежна фаза. Овој процес е наречен „Евалуација на аналитички метод, прстен тест (*Analytical method evaluation ring test*, AMERT)“ од страна на Crowther и соработниците. Накратко, овој процес овозможува единицата за квалитет да дава коментари и предлози до своите колеги од истражување и развој пред започнување на финалната фаза од процесот на валидација на методот. Со претпоставка дека планот за клинички развој се одвива непречено, формалниот трансфер на аналитичките методи се одвива во текот на вториот дел од клиничката фаза III. Во овој момент барањата за аналитички технички трансфер се наведени од аналитичарите од истражување и развој и операциите треба соодветно да се извршуваат од единиците за квалитет. Исто така, сега се разгледуваат и соодветните критериуми на прифатливост, се со цел приемната лабораторија да биде „квалификувана“ и способна да генерира податоци што понатаму статистички ќе бидат обработливи (Taylor & Cihon, 2004). Во повеќето компании, по одобрување на производот, преземањето дополнителни трансфер места се водени и администрирани од единицата за квалитет. Такви трансфери може да бидат со друга договорна истражувачка организација (*Contract research organization*, CRO) или на повеќе производствени и тестирачки локации. Одделот за истражување и развој понекогаш може да трансферира методи на повеќе локации истовремено.

8.2. Типови трансфери на аналитички методи

Трансферот на методот е дефиниран како процес кој ја квалификува лабораторијата да користи тест процедури или аналитички метод. Според оваа дефиниција, која било квалификувана лабораторија би ги исполнила критериумите за трансфер. Најчестите типови на трансфер на методот се: компаративното тестирање, ковалидација помеѓу две лаборатории или локации, целосна или делумна метода валидација или ревалидација и преку „*waiver*“, односно изведба на трансфер на метод преку неklasичен пристап (Vial et al., 1998).

8.2.1. Компаративно тестирање

Компаративното тестирање е најчестата форма на трансфер во фармацевтската индустрија. Овој тип вклучува две или повеќе лаборатории или локации кои извршуваат однапред одобрен протокол кој ги детализира критериумите според кои примател-лабораторијата се смета дека е „квалификувана“ да ги користи методот(ите) што се пренесуваат. Добиените податоци се анализираат статистички и се споредуваат со критериумите за прифатливост. Компаративното тестирање се користи и во други сценарија за време на развојот и по одобрувањето на лекот во промет, помеѓу партнери, CRO-а и други внатрешни развојни групи, на пример, движење на проект помеѓу различни оддели или локации за развој.

8.2.2. Ковалидација меѓу две лаборатории

Алтернатива на компаративното тестирање е да се вклучи приемната лабораторија во валидација на методот(ите). По дефиниција, лабораторија или локација што врши експерименти за валидација е квалификувана да го користи тој метод за неговата намена. За да се изврши таков пренос неопходно е да се идентификува кои валидациони параметри треба да бидат трансферирани или „предизвикани“ од другата единица. Разумен пристап е да се вклучи приемната лабораторија во меѓулабораториската квалификација, со што се генерира матрица од податоци што го сумира ефектот од тестирањето - локација, аналитичар, датум на анализа и инструментација. Со вклучување на овие податоци во извештајот за валидација на методот и целосно опишување на експерименталниот дизајн, можно е овој документ да стои како доказ на аналитичкиот трансфер.

8.2.3. Потврдување на методот и/или ревалидација

Пред да се извршат активностите за трансфер на методи кои вклучуваат протоколи и критериуми на прифатливост, вообичаено е приемната лабораторија да повтори некои или сите експерименти што се одвиваат при процесот на валидација. Изборот на параметар(и) за валидација зависи од типот на методот што се трансферира. На пример, анализите за униформност на содржината при одредување на конзистентноста на производот во голема мера зависат од методот и прецизноста на системот. Како втор пример, определување на онечистувањата во API не може да се репродуцира помеѓу две локации ако нивните инструменти не даваат слични лимити на детекција и на квантификација.

8.2.4. Трансфер преку „waiver“

При одредени ситуации секако може да се гарантира изоставување на конвенционален трансфер. Да се продолжи без некаков начин на споредба помеѓу две лаборатории или локации, од клучно значење е да се документираат причините за донесување таква одлука. На пример, за дозирани форми кои рутински се тестираат во приемната лабораторијата, можеби е можно е откажување од трансфер од следниве причини:

- Приемната лабораторија веќе го тестира производот и е темелно запознаена со постапката(ите);
- Новата дозирана форма поседува споредлив состав и/или концентрацијата на API во однос на постоечкиот производ;
- Аналитичкиот(те) метод(и) се исти или многу слични на оние кои веќе се употребуваат;
- Пакетот за валидација на методот ги опфаќа новите методи.

8.3. Барања и елементи за трансфер на аналитичка технологија

Многу од факторите неопходни за усогласен трансфер се меѓусебно поврзани.

8.3.1. Однапред одобрен тест план/стандардна оперативна процедура/протокол

Пред планирањето на било кој трансфер, потребно е да се има одобрен документ кој ги опишува општиот процес на трансфер, како и потребните специфични критериуми на прифатливост за методот/ите кои се пренесуваат. Во многу компании вообичаено е одделите за истражување и развој и за квалитет да имаат работење што ги следи општите стандардни процедури (СОП) кои го регулираат процесот на трансфер. Во СОП се опишуваат деталите за протоколот, планот и критериумите за прифатливост што треба да бидат исполнети при трансфер на методот кој е специфичен за даден готов производ. Содржината на таков протокол вклучува:

- Јасно дефинирани одговорности на единицата која трансферира, како и на приемната;
- Список на сите методи кои треба да се трансферираат преку компаративно тестирање. Образложението за сите методи кои не се вклучени, т.е. откажување од трансфер, исто така, мора да биде обезбедено;
- Опсегот на трансферот треба да се обезбеди во однос на тоа кои лаборатории и аналитичари се засегнати од трансферот. Во некои случаи директен трансфер од аналитичар на аналитичар може да биде неопходен поради сложеноста на методот или употреба на нова или непозната опрема. Во случај на автоматизирани методи, трансфер од специфични работи или работни станици од истражување и развој ќе треба да се изврши на споредливи системи во рамките на самата операција;
- Изборот на материјали и примероци што ќе се користат при трансферот треба да бидат детално опишани. Во принцип, се избира „ослободен GMP“ материјал за одвивање на активностите при трансферот, во спротивно може да се добие резултат надвор од однапред определените критериуми на прифатливост (ООС) и истиот да биде под истрага. Треба да биде забележан и идентитетот и бројот на употребените серии лек при трансферот. Ако е можно, да се вклучат сертификатите од анализата за сите примероци и да се достават референтни стандарди. Инструментите треба да бидат опишани, вклучувајќи и какви било изјави кои можат да влијаат на исходот на трансферот.

Во случај на градиентна течна хроматографија со високи перформансни (HPLC) методи, градиентот што се формира во пумпата преку мешањето под висок притисок може драстично да влијае на перформансите на колоната, што доведува до промени во времето на задржување, факторот на капацитет и резолуцијата. Се препорачува инструментите да се одржуваат во константна работа и форма за време на трансферот. Се препорачува лабораторијата во истражување и развој да размисли за воведување алтернативен метод што би бил апликативен на инструментите и користен во одделот за квалитет пред изведба на формалниот трансфер.

Најважна улога во изведување успешен трансфер има отворената и доверливата комуникација меѓу лабораториите/единиците. За да се избегнат тешкотии за време на трансферот, потребно е да се воочат потенцијалните пречки уште на почетокот на активностите за изведба на трансфер на метод.

Клучни фактори за успешен трансфер се:

- Документација;
- Информираност и комуникација;
- Проценка на ризик;
- Обезбедување на примероци и нивно чување;
- Дефинирање и подготовка на проби за анализа;
- Обука на лабораториски персонал, искуство на истиот;
- Апаратура за анализа и соодветна квалификација;
- Евалуација на податоци;
- Активности при неочекувани резултати или неуспешен трансфер.

8.3.2. Опис на методите/процедурите за тестирање

Неопходно е да се вклучат копии од сите методи кои се користат при трансферот. Сите достапни податоци за валидација треба да се дадат на приемната лабораторија. Треба да се вклучат какви било идиосинкразии присутни во методот. Развојниот аналитичар мора многу внимателно да ги одреди чекорите што треба да се следат и сите проблеми што би можеле се јават при текот на трансферот. Ова може да биде случај дури и со компендијалните методи, што би требало само формално да се трансферираат. Поради општата природа на описите од компендијалните методи, приемните лаборатории често се соочуваат со тешкотии при нивно извршување. На пример, во монографијата за етинилестрадиол претставена во USP фармакопејата при подготовката на примерокот за анализа на супстанцијата на лекот, се наведува следното: „Префрлете околу 25 mg етинилестрадиол, прецизно измерен, во 25 mL волуметриска колба, додадете мобилна фаза и измешајте“. Општата монографија не наведува дека треба да се внимава при подготовката на стандардите од ваква природа поради ефектот на влага или температура, што може да даде погрешни резултати од анализата. Во сите методолошки процедури чекор-по-чекор треба да бидат дадени „совет и трикови“, безбедносни размислувања и јасни формули и пресметки.

8.3.3. Опис на барањата за тестирање

Како дел од конкретниот трансфер, бројот на серија лек, повторувањата и инјектирањата (во случајот со HPLC метод) треба експресно да се претстават. При трансфер на методот за растворливост, треба да се наведе бројот на поединечни дозирани форми што ќе се тестираат. Потребно е да се наведат такви детали со цел и малите разлики во секојдневието на аналитичарските филозофии да не го нарушат процесот на трансфер. Во случај на нови техники, што можеби не се вообичаени за приемната лабораторија (на пример, капиларна електрофореза или течна хроматографија/масена спектроскопија), може да биде неопходна специфична обука пред извршувањето на протоколот за трансфер.

8.3.4. Образложение на барањата за тестирање

Како и во секој научен документ, мора да се обезбеди образложение за избраните параметри и нивниот ефект врз севкупниот успех на трансферот. Ова вклучува објаснување за параметрите за соодветноста на системот што се воспоставени за методот. Соодветноста на системот може да биде моќна алатка за решавање на проблемите при неусогласеност на методот и покрај тоа што е тест од збир на параметри за покажување на усогласеноста на системот пред започнување со анализата.

8.3.5. Критериуми на прифатливост

Протоколот за трансфер мора да содржи соодветни критериуми на прифатливост, релевантни за тестовите и специфичните дозирани форми. Треба да се напомене дека поставување строги и брзи спецификации за такви критериуми не е можно. Сигурно би имало повеќе исклучоци отколку норми. На неодамнешната PhRMA ARDSC работилница за трансфер на методот, беа претставени одговори кои опфаќаа различни пристапи.

Табела 26 содржи, која содржи некои од одговорите на поставените прашања за критериумите на прифатливост за аналитичките методи, јасно покажува дека дискретните критериуми на прифатливост значително се разликуваат од компанија до компанија. Сепак, се покажува дека има системи за да се предизвикаат перформансите на метод за време на трансферот.

Табела 26. Одговори на некои од поставените прашања за критериумите за прифатливост за аналитичките методи (Ahuja & Scypinski, 2001)

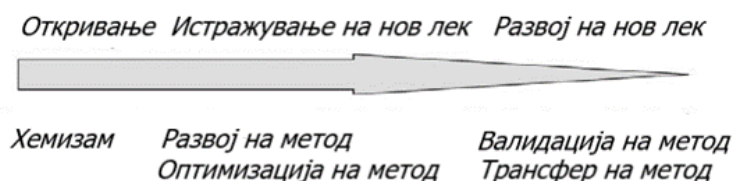
Прашање	Одговор
Дали извршувате линеарност при трансферот?	Да или не
Колку серии од производот тестираате со трансферот?	2, 3 со ковалидација и 1 дополнителна серија; примена на брекетинг пристап (анализи на голема и мала јачина), доколку е применливо
Како може да се повторуваат анализите?	1 до 6 во зависност од RSD (%)
Колку аналитичари се вклучени во приемната единица?	1, 2 (некои со истиот аналитичар, но различна опрема, ден итн.)
Дали ги спајкувате примероците со онечистувањата?	Да или не

8.3.6. Документирање на резултатите

Резултатите од експериментите за споредбеното тестирање треба да се документираат во извештај. Потребно е да биде посветено значително внимание на детали за сите аспекти, набљудувања и резултати од експериментите. Во некои случаи резултатите од приемната лабораторија може да не ги исполнуваат утврдените критериуми на прифатливост. Ваквите ситуации треба да се решаваат со поставена политика која мора да опише како ќе се постапува со таквите податоци. На PhRMA работилницата речиси сите биле едногласни во изјавата дека таквото „неуспешно“ прифаќање на критериумите не ја сочинува потребата за формална ООС истрага. Но, без разлика дали се следи таква политика, истрагата за сите резултати што се надвор од критериумите за прифатливост треба да се сумира и прикаже.

8.4. Временска рамка/проектен план за технички трансфер

Како што беше наведено претходно, временската рамка за формален трансфер најчесто се одвива во процесот на средината до доцната клиничка фаза III. Времето за технички трансфер мора да биде флексибилно, во зависност на конкретниот производ. Мора да се земе предвид потребата од обезбедување на методите во рамките на операциите пред добивање на регулаторното одобрение или лансирањето на производот на пазар. Мора да се знае дека приемната лабораторија ги исполнила сите критериуми за да биде квалификувана за извршување на методите и поврзаните тестирања пред пристигнувањето на вистинските примероци. Ако процесот на карактеризација или производство на сериите за регистрација потребни за изведба на клучните студии на стабилност се одвиваат порано, трансферот мора да се изврши пред фазата III. Сликата подолу дава груба временска рамка за трансфер на методите, вклучувајќи ги главните фази во развојниот циклус. На сличен начин и движењето на методите од првиот момент, па сè до градење на „докази на принципи“ за целосниот развој, исто така, мора да бидат содржани рано во генезата на производот. Ваквите трансфери може да се сметаат за сложени бидејќи раните проекти имаат помалку добро дефинирани аналитички методи и затоа ќе бидат потешко трансферирани според дефинираните критериуми на прифатливост.



Слика 13. Временска линија за трансфер на генерички технички метод (Ahuja & Scypinski, 2001)

Многу големи фармацевтските компании денес користат поголеми тимови за развој на производите за пазар. Во рамките на таквите тимови типично е да се вклучат поединци кои ја претставуваат единицата за квалитет во соодветно време од историјата на проектот. Овие поединци се задолжени за дефинирање на процесот на прифаќање на аналитичката методологија и целокупниот технички процес на трансфер за аналитички методи, вклучувајќи ја и целокупната придружна документација. Се избираат лица од инволвираните лаборатории/единици и од одделот за квалитет коишто ќе ги координираат сите активности потребни за изведба на трансферот.

Обврски и одговорности на **лабораторијата која трансферира**:

- Да обезбеди соодветна обука за изведување на анализата од страна на приемната лабораторија;
- Предлага стратегија за изведба на методите коишто ќе се трансферираат;
- Предлага експериментален дизајн, примероци и критериуми за споредба;
- Обезбедува развојни и валидациони извештаи;
- Обезбедува детални информации за апаратурата којашто се користела во текот на развојот на препаратот;
- Го подготвува и прегледува трансфер протоколот;
- Ги изведува анализите согласно трансфер протоколот;
- Го изработува и прегледува трансфер извештајот.

Обврски и одговорности на **приемната лабораторија**:

- Обезбедува присуство на соодветно обучен персонал;
- Врши преглед на аналитичките методи обезбедени од лабораторијата која трансферира;
- Дава согласност околу критериумите на прифатливост пред извршување на трансфер протоколот;
- Осигурува дека потребната апаратура е достапна и квалификувана;
- Го прегледува трансфер протоколот;
- Ги изведува анализите согласно трансфер протоколот;
- Го дополнува и прегледува трансфер извештајот.

8.5. **Анализа на резултати/статистички пакети**

Компаративниот тип тестирање на технички трансфер генерира резултати кои се потребни да се споредат со користење на една или повеќе статистички алатки. Иако во некои случаи сигурно може да се оценат податоците субјективно, употребата на статистика ќе изгради објективност при анализа на податоците и овозможува непристрасна споредба на множеството податоци. Бидејќи компаративното тестирањето вклучува тестирање на поединечни примероци, моќноста на трансферот вклучува математичко докажување дека множествата на податоци се еквивалентни. Многу трансфери се регулирани со статистиката на стандардниот *Student's t*-тест. Тестот е корисен за одредување на еквивалентноста на слични множества на податоци и е генерално доволен за анализа на резултатите од податоците за компаративното тестирање. Постојат и варијации кои се користат за покомплексни процедури на трансфер. На пример, *Anderson-Hauck* тестот, првично развиен за определување на биеквивалентност во клиничките испитувања, се користи за посложени сетови на податоци (Anderson & Hauck, 1983). Табелата подолу ги наведува аналитичките резултати за анализи на содржина на API и онечистувања за хипотетички производ за истовремен трансфер на четири локации и податоците се анализирани со *Anderson-Hauck* тестот. Како што може да се види, трансферот на методите на повеќе од една локација може да вклучи опсежна статистичка анализа.

Табела 27. Податоци од анализи на содржина на API и онечистувања на лек производ, трансферирано на четири локации истовремено (Ahuja & Scypinski, 2001)

Метод/Критериум	Локација 1	Локација 2	Локација 3	Локација 4	Барања
Метод за определување на содржина на API					
Линеарност	49,4	49,5	49,7	49,6	48,0-52,0%
Прецизност на стандарди	0,8	1,1	1,4	1,1	≤ 2,0%
% (diff.) разлика од 2 стандарди	1,3	0,7	2,0	1,4	≤ 2,0%
Метод за определување на содржина на онечистувања					
Соодветност на систем (онечистување 1)	6,4	2,2	5,9	8,8	≤ 10,0%
Соодветност на систем (онечистување 2)	9,4	9,8	6,2	9,8	≤ 10,0%
Линеарност	49,7	49,7	51,5	48,7	48,0-52,0%
Онечистување 1	Не е детектирано	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%	≤ 1,0%
Онечистување 1	Не е детектирано	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%	≤ 1,0%

8.6. Сертификација и обука на аналитичари

За време на извршувањето на активностите за трансфер на методот, чекорот обука при процесот не смее да се сфати едноставно. Доколку персоналот во приемната лабораторија не го зборува мајчиниот јазик на персоналот во развојната лабораторија, може да бидат потребни процедури за преведување на методите. Исто така, важно е да се обезбеди соодветна обука на аналитичарите кои ќе ги извршуваат процедурите. Во некои аспекти, процесот на компаративно тестирање може да се смета за пристрасен, бидејќи и двете лаборатории ќе посветат големо внимание на процедурите за тестирање. Подобра мерка за робушноста на методот(ите) е да се тестираат методите откако тие би биле во рутинска употреба во рамките на единицата за квалитет; сепак, ова е непрактично за документирање за успехот на трансферот.

Вистинската обука на аналитичарите на приемните единици што учествуваат при трансферот е област која доби значително внимание од регулаторните органи и внатрешните аудитори за обезбедување квалитет. Постојат неколку опции за сертификација на аналитичарите кои би биле обучени и стручни да ги извршат потребните процедури за тестирање. Една од можностите е да се квалификуваат поединечни аналитичари за секој метод специфично, со што се создава матрица на методи и аналитичари. Таквиот пристап може да стане тежок бидејќи се генерира дополнителна документација во однос на евиденцијата за обука за поединечни аналитичари. Одговорноста за усогласеност, исто така, може да резултира ако аналитичар кој не бил „сертифициран“ генерира GMP податоци.

Алтернатива на сертификатот за индивидуален метод е да се квалификува аналитичар по техника, а не метод. Ова е пристапот кој најчесто се користи од поголеми компании. Евиденцијата за обука мора да вклучува документација што докажува дека поединецот е компетентен да врши рутински тестови користејќи специфични трансфери. Во овие случаи аудитор или друг квалификуван аналитичар може да потврди дека поединецот аналитичар е надлежен да ја изврши предметната процедура за тестирање. Компанијата *Johnson & Johnson* овој пристап го има продлабочено и оди чекор понапред со тоа што во рамките на својот институт имаат воспоставено програма

за „Лабораториски аналитичари и за сертификација на обуки“ (*Laboratory Analyst and Training Certification Program, LATCP*), во која сите аналитичари кои развиваат или извршуваат методи за ослободување и/или стабилност на лек производи, присуствуваат на сеопфатен двонеделен курс. На крајот на овој курс студентите мора да положат испит за да се потврди компетентноста. Со зголемениот акцент на регулаторните органи во однос на важноста на обуките и компетентноста на аналитичарот, нема сомнеж дека таквите програми ќе се размножуваат во иднина.

8.7. Пренос на техничка сопственост

Во срцето на процесот на технички трансфер е документацијата. Старата поговорка вели: „Ако не е напишано, не е направено“ секако важи и за аналитичкиот трансфер. Процесот за развој на нови лекови од страна на одделот за истражување и развој (R&D) опфаќа неколку години, и за тоа време базата на знаењата околу соединението постојано се зголемува. На крстосницата помеѓу R&D и другите оддели кои понатаму ќе ги извршуваат операциите, важно е да се обезбеди не само успешност на аналитичките методи користени од единицата за квалитет, туку и дека применливите знаења и податоци се префрлени или се лесно достапни од приемната лабораторијата. Иако единицата за квалитет можеби нема да бара прекумерни детали во врска со сите научни истражувања извршени во периодот на истражување и развој, сепак неопходен е одреден трансфер на информации. Наместо да се преплави единицата за квалитет со голем број долги извештаи, се претпочитаат неколку концизни документи што ги задоволуваат специфичните потреби на операциите во аналитичката средина. Во повеќето компании најважните извештаи се извештаите за развој/валидација на методите и текот на самиот аналитички развој.

8.7.1. Извештај за развој на метод

Извештајот за развој на метод може да биде дел од извештајот за валидација на методот. Овој извештај треба да обезбеди концизен преглед за развојот на клучните аналитички методи што се користат за да се обезбеди идентитетот, квалитетот, чистотата, моќта и составот на предметот за тестирање. За HPLC методите треба да бидат документирани образложението за колоната и избраните услови. За методи на дискриминаторност на тестот за растворливост треба да бидат прикажани изборот на медиум, типот на апарат и детекција. Во сите, исто така, треба да се вклучат опис или табеларна листа на неуспешности. Причината за вклучување на таквите информации е со цел да ѝ помогне на единицата за квалитет доколку е неопходно повторно да се развие или рedefинира метод по одобрување поради промени во процесот, формулацијата или други променливи. Ако и кога тоа би се случило, имајќи ги на располагање овие информации, единицата за квалитет ќе помогне да се избегне „тркалото на повторно развивање“ на аналитичките методи. Дobar извештај за развој/валидација на методот вклучува примероци од хроматограми за пристапи што се испробани.

8.7.2. Извештај за аналитички развој

Извештајот за аналитички развој е документирано резиме и логички тек на сите суштински аналитички информации стекнати за време на фазата на истражување и развој на проектот. Во многу случаи овој извештај служи за различни цели: тој е складиште на сите важни аналитички информации што се однесуваат на проектот и затоа е изворен документ за единицата за квалитет, а се користи и во подготовка при инспекции за локацијата во моментот на одобрување на производот. Табелата подолу содржи резиме на сите информации што треба да бидат содржани во аналитичкиот развоен извештај. Извештајот за аналитички развој е еден од највредните документи напишан од единицата за истражување и развој во текот на процесот на развој. Ако е правилно составен и завршен, може да послужи како моќен документ многу години по одобрување на производот.

Табела 28. Извештај за аналитички развој (Ahuja & Scypinski, 2001)

Секција	Содржина
Преглед на проектот	<ul style="list-style-type: none"> – Изјава за аналитичко тестирање; – Релевантни информации за иднината за тестот (резиме за синтезата на супстанција, состав/процес на производство за дозирана форма).
Резиме	<ul style="list-style-type: none"> – Резиме за хемијата на активната супстанција; – Дискусија за потенцијалните онечистувања и производи на деградација; – Механизми на деградација; – Резиме на податоци од предформулацијата.
Историја на методот	<ul style="list-style-type: none"> – Историја на развојот за клучните методи; – Дискусија за промени, дополнувања, бришења на методот; – Образложение за клучните методи; – Извештаи за развој/валидација на референтен метод.
Спецификации	<ul style="list-style-type: none"> – Образложение за предложените спецификации за производите наменет за пазар; – Историја на поставување на спецификација; – Табели со резултати од анализи на клучните серии што јасно го илустрираат оправдувањето за предложената спецификација.
Стабилност	<ul style="list-style-type: none"> – Резиме за стабилноста, однесувањето, трендовите итн. за супстанцијата и/или производот; – Извештаи за стабилност на референтната супстанција или дозирана форма; – Кратка дискусија за студиите на „прелиминарна стабилност“ при развој на готовиот производ.
„Совети и трикови“	<ul style="list-style-type: none"> – Водичи за лабораториите во единицата за квалитет; – Резиме на клучните чекори за секој метод; – Безбедносни прашања/мерки на претпазливост; – Употреба на компендијални методи.
Референци	<ul style="list-style-type: none"> – Список на важни извештаи/делови; – Извештаи од „добавувачи-партнери“ (хемиски развој, фармацевтски развој итн.).

8.7.3. Досие за трансфер

Многу компании имаат развиено практика на составување на она што се нарекува „досие за трансфер“ како средство за обезбедување дека сите клучни документи и релевантни информации се пренесуваат на другите оддели или на приемната лабораторија. Ова досие претставува збирка на важни извештаи. За аналитичките методи се вклучуваат извештаи за развој и валидација на методот, извештаи за профили на онечистувања, извештаи и табели за стабилност и архива со спецификации. Моќта на таквиот пристап е тоа што осигурува дека се пренесуваат сите информации до приемната лабораторија. Оваа стратегија е корисна за развој за нови јачини или подобрувања во формулацијата, за „поддршка на брендот“, при управување со животниот циклус на производот или при поддршка на клиничките испитувања во фаза IV.

9. СТУДИИ НА СТАБИЛНОСТ

Стабилноста претставува критично својство кое го отсликува квалитетот на производот. Поради тоа, следењето, т.е. испитувањето на стабилноста игра важна улога во развојниот процес на фармацевтскиот производ. Целта е да се обезбедат докази за промената на квалитетот на FDP и активната супстанција (API) со текот на времето под влијание на различни фактори (температура, влага, светлина, pH, изложеност на кислород и др.), вклучувајќи ја хемиско-физичката стабилност за време на претклиничките фази на формулирање, развојниот процес, пакувањето и пост-регистрацискиот живот на FDP. Евалуација на физичко-хемиската стабилност на даден производ бара разбирање за физичките и хемиски својства на API. Недоволна стабилност на API или на FDP може да влијае на чистотата, јачината и безбедноста на производот. Безбедноста и ефикасноста на FDP се утврдува за време на развојниот процес преку изведба на претклинички студии врз животни и клинички студии спроведени на пациенти – доброволци. Својствата кои го отсликуваат квалитетот, како: идентитетот, концентрацијата и чистотата се дефинираат однапред, во текот на развојот. Доколку за време на студијата на стабилност дојде до промена на едно од наведените својства надвор од поставените критериуми на прифатливост, тогаш воспоставената безбедност и ефикасност на FDP повеќе не е применлива. Промената во стабилноста на FDP (на пример, промена во содржината на API) може да доведе до ризик за безбедност на пациентот, бидејќи применетата доза на пациентот е помала од очекуваната. Нестабилноста исто така може да доведе до формирање токсични деградациони продукти. Ако нестабилноста на FDP доведе до појава на несакани ефекти врз пациентите, производителите се доведуваат во ситуација да трошат дополнителни ресурси поради откривање на причините за нестабилноста и дополнителната примена на методи за нивно минимизирање. Поради тоа, тестирањето на стабилноста овозможува воспоставување производни услови, препорачани услови на чување, избор на пакување, дефинирање на *re-test* период на API и крајна цел - дефинирање на рокот на употреба на FDP. На пример, доколку производот е чувствителен на светлина, потребно е минимизирање на изложувањето на светлина во производниот процес, како и правилен избор на крајното пакување на производот. Материјалите што се чувствителни на кислород ќе бараат ракување под инертна атмосфера, како што е азот, и додавање на апсорбенти на кислород во пакувањето на производот. Дефинирањето на стабилноста на FDP во голема мера е поврзано со разгледување на можната интеракција на API со ексципиенсите и пакувањето. На пример, при долготрајно чување на течни производи можна е појава на контаминација на API со екстрактивни соединенија (*extractables*) што потекнуваат од материјалот за пакување. Материјалот за пакување мора да бидат избран за да ги елиминира или да ги минимизира овие екстракти. Анализирањето на примероците од програмата за следење на стабилност бара големи ресурси, експертиза и голема свесност од страна на аналитичарите за значајноста на овие студии при поддршката за носењето одлуки во текот на развојниот процес.

9.1. Видови стабилност

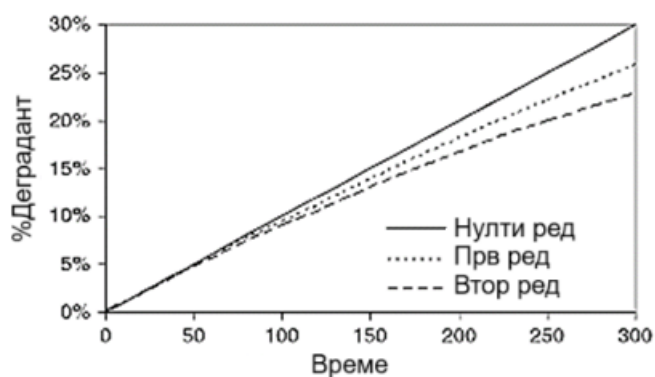
Фармацевтските дозирани форми имаат одреден рок на употреба во кој се смета дека лекот е безбеден и ефективен доколку се чува во пропишаните услови. Многу фактори влијаат врз определувањето на рокот на употреба на една фармацевтска дозирана форма. Еден од највлијателните фактори е хемиската стабилност на активната супстанција што влегува во состав на фармацевтската дозирана форма, поради тоа што хемиската деградација може да доведе до формирање на потенцијално токсични онечистувања кои се штетни по здравјето на пациентот (Huynh-Ba, 2009). Сите други фактори што влијаат на биорасположливоста на активната компонента исто така може да го ограничат рокот на употреба на дозираната форма. Овие фактори вклучуваат и намалување на ефективност на активната компонента како резултат на преципитација или нејзино намалено ослободување во гастроинтестиналниот тракт.

9.1.1. Хемиска стабилност

Активната фармацевтска супстанција, без разлика дали е биолошка (протеин или нуклеинска киселина) или мала молекула, подложна е на органски хемиски деградационен процес. Промената на содржината на деградационите продукти на активната компонента е резултат на деградационите реакции од типот на: хидролиза, оксидација, реакција на радикали, изомеризација, рацемизација, епимеризација итн. За да се одржи безбедноста и ефикасноста на фармацевтскиот производ, регулаторните агенции бараат да се проценат (ограничат) деградационите продукти при одредување на рокот на употреба. Ограничувањата се базираат на максималната дневна доза и се опишани како прагови на известување, идентификација и квалификација. Прагот на известување е дефиниран како ниво на кое онечистувањето мора да биде пријавено. Праг на идентификација е дефиниран како ниво кое бара специфична хемиска идентификација за онечистувањето. Праг на квалификација е ниво кое бара токсиколошка проценка за да се утврди безбедноста на онечистувањето. Дозволените прагови на известување, идентификација и квалификација за онечистувањата кај API и FDP се дадени во ICH водичите Q3A и Q3B, соодветно (ICH Q3A(R2), 2006; ICH Q3B(R2), 2006). Факторите кои се користат за утврдување на дозволеното ниво на дадено онечистување се:

- Ако онечистувањето е метаболит, постои оправдување за повисоко ниво бидејќи ова онечистување е тестирано за неговата безбедност како дел од клиничките испитувања на API;
- Кога производот се администрира во мали дози, можат да бидат дозволени малку повисоки критериуми на прифатливост за онечистувањата, врз основа на вкупната изложеност на пациентот;
- Доколку постои сомнеж дека онечистувањето е канцерогено, тератогено или мутагено, се применува понизок ранг;
- Доколку станува збор за хронична терапија, дозволените нивоа за онечистувањата можат да бидат пониски;
- Кај онечистувањата за кои има малку расположливи податоци во врска со нивната безбедност, генерално критериумот на прифатливост се ограничува помеѓу 0,2% и 0,5% од активната супстанција до крајот на рокот на употреба.

Важна цел во овој процес е целосно одредување на процесот на деградација во производот. Во принцип, рокот на употреба се одредува преку изведените анализи во реално време. Сепак, подолг рок на употреба може да се предложи преку предвидувањето на стабилноста на дозираната форма со екстраполација. Ова овозможува со помош на познати податоци, евалуирани до одреден термин план за одредено критично квантитативно својство, приближно да се пресметаат останатите резултати до крајот на студијата на стабилност и со тоа да се предвиди рокот на употреба. Проценка на рокот на употреба на препаратот може да се направи и врз основа на брзината и механизмот на хемиската реакција на деградација. Брзината на хемиската реакција и факторите кои влијаат на брзината се предмет на проучување на хемиската кинетика. Брзината на хемиската реакција претставува промена на концентрацијата на реактантот или производот со текот на времето. Влијанието на концентрацијата на реактантот/реактантите врз брзината на хемиската реакција е дефинирано со редот на реакцијата.



Слика 14. Разлика помеѓу реакции од нулти, прв и втор ред при ниска конверзија (Huynh-Ba, 2009)

9.1.2. Физичка стабилност

Во некои случаи рокот на употреба може да биде лимитиран и од физичката стабилност на производот. Од особено значење е факторот што може да предизвика промена на биорасположливоста на API. За цврстите дозирани форми ова може да значи промена во карактеристиките на растворливоста на производот. Промени во растворливоста во текот на чувањето на цврстите дозирани форми може да настанат како резултат на влијание од голем број фактори. За таблетите најголемо влијание има влагата во околината. Ова може да резултира во промена на ефикасноста на средството за распаѓање (дезинтегрант-ексципиенс). Имено, дезинтегрантите имаат способност брзо да набабрат во вода и на тој начин ја распаѓаат таблетата во желудникот. Кога влагата ќе се апсорбира постепено во текот на чувањето на производот, може да го спречи набабрувањето на дезинтегрантот што е неопходно за брзо распаѓање во желудникот. Особено проблематично е кога дезинтегрантот е изложен на услови каде има кондензација на вода. Ова се случува кога производот, чуван на повисока температура и влажност, потоа се лади на температура на која се јавува кондензација, на пример при транспорт низ постудени климатски зони од местото каде биле иницијално спакувани. Во однос на желатинските капсули, сами по себе капсулите се субјект на физички промени во текот на долготрајни услови на чување. Во некои случаи желатинот подлегнува на реакција на вкрстено поврзување (*cross-linking*) поради ниските нивоа на онечистувањата во формулацијата или пакувањето. Ова вкрстено поврзување може да доведе до бавно растворање на желатинот во препорачаните медиуми за испитување на растворливоста. Сепак, треба да се напомене дека во многу случаи, *in vivo* ослободувањето на API од формулацијата нема да може вистински да се предвиди поради ензимските процеси. Поради тоа, овој ефект може да се испита со специјални медиуми за растворливост кои содржат соодветни дигестивни ензими. Друга потенцијална физичка промена кај цврстите дозирани форми вклучува промена во самата API. Повеќето фармацевтски дозирани форми содржат кристална форма на активна супстанција со одредена морфологија. Доколку се работи за полиморф со висока енергија, во текот на чувањето постои можност за промена на полиморфната форма. Во ретки случаи ваквата промена на морфологијата може да доведе до промена на биорасположливоста на производот. Ова може да се должи на промена на растворливоста (постабилен полиморф има пониска растворливост). Дури и ако полиморфот е во термодинамичка стабилна форма, со текот на времето може да се јави солватација и десолватација. Десолватација се јавува кога доаѓа до губење на растворената молекула од кристалната решетка. Солватацијата генерално вклучува додавање вода во кристалната решетка. Во екстремни случаи при десолватација може да дојде до промена на морфологијата, односно целосно губење на кристалната решетка, што доведува до зголемување на растворливоста на активната супстанција, но намалување на стабилноста на производот. Некои API имаат потенцијал спонтано да кристализираат. Во такви случаи се користат стабилизатори кои можат да го спречат кристализирањето, со што се обезбедува стабилност во подолг временски период. Оваа

промена со текот на времето може да резултира со намалување на ефикасноста на активната супстанција, поради тоа овој фактор може да биде ограничувачки при поставување на рокот на употреба. За течни дозирани форми промената во биорасположливоста генерално се манифестира преку преципитација на активната супстанција или друга компонента од формулацијата. Преципитацијата може да се јави како резултат на повеќе фактори. Кај малите молекули преципитацијата може да биде предизвикана од промена на рН на растворот (суспензијата). Ваквата промена може да биде поради апсорпцијата на CO₂, хемиска деградација на компонента која генерира киселина или база или губиток на пуферска компонента поради оксидација. Преципитацијата може да настане и поради зголемување на големината на честичките на API. Овој ефект, наречен „Ostwald ripening“, е предизвикан од постепено растворање на малите кристали, проследено со истовремено растење на поголемите поради нивната пониска енергија.

9.1.3. Микробиолошка стабилност

Препаратите за кои е предвидено да бидат стерилни треба да ја зачуваат стерилноста во предвидениот рок на употреба. Препаратите за кои не е предвидено да бидат стерилни треба да одговараат во однос на микробиолошката чистота, што подразбира отсуство на патогени микроорганизми и дозволено присуство на вкупни аеробни микроорганизми или специфични видови микроорганизми, мувли и квасци до пропишаните граници во рокот на употреба.

9.1.4. Терапевтска и токсиколошка стабилност

Терапевтскиот ефект на препаратот треба да остане непроменет во рокот на употреба. Во рокот на употреба препаратот не смее да пројави токсични ефекти врз организмот, што најчесто е резултат на деградација на активната компонента (Baselt, 2008).

9.2. Типови на стабилност

Во секоја фаза од развојниот процес FDP (*finished drug product*) треба да одговара на барањата за квалитет во однос на поставените граници во спецификациите за дадениот период на испитување. Овој период се нарекува рок на употреба (*shelf-life*) на FDP. GMP барањата укажуваат на тоа дека целта за тестирање на стабилноста на финално спакуван производ е да се исполнат поставените критериуми за идентитет, квалитет и чистота за времето на рокот на употреба (ICH Q7, 2000). Како фактори што влијаат на стабилноста на активната супстанција и готовиот производ се сметаат: самата формулација, пакувањето, местото и постапката на производство, големината на серијата, како и варијабилноста од серија до серија.



Слика 15. Развоен пат на фармацевтски производ (Huynh-Ba, 2009)

9.2.1. Стабилност на активна супстанција (API)

Пред да се започне со развој на нов фармацевтски производ, потребно е да се утврди природата на активната супстанција. Од голема важност е испитувањето на чистотата на API преку одредување на профилот на онечистувања кои мора да бидат во воспоставените граници на прифатливост на предложената спецификација. Промена во профилот на онечистувањата мора да се утврди за време на чувањето преку изложување на API на различни забрзани и стрес услови, со цел да се поттикне формирањето на деградационите онечистувања. Со изведба на овие рани студии на стабилност може да се одреди дека API треба да се чува под специфични услови, какви што се ниска температура, ниска влажност, не-оксидирачки и слабо осветлени средини. При испитување на стабилноста, методот мора да биде *stability-indicating* со цел правилна идентификација и квантификација на онечистувањата кои се јавуваат. Ако се идентификуваат онечистувања кои се поврзани со процесот (*process related impurities*), истите не треба да бидат следени за време на долготрајната стабилност. Меѓутоа, доколку се покаже дека некои од онечистувањата се зголемуваат во текот на чувањето, тие се нарекуваат деградациони онечистувања или производи на деградација и истите мора да се следат за време на студиите на стабилност. Студиите на стабилност се спроведуваат сè до утврдување на оптимални услови на чување на API како суровина (*bulk*), исто така обезбедуваат податоци врз основа на кои се утврдува периодот на повторна контрола на API (*re-test*) како суровина што се користи во производството.

9.2.2. Студии на стабилност кои поддржуваат развој на нов производ

Интеракцијата на ексципиенсите еден со друг или со активната супстанција се утврдуваат преку студиите за стабилност, т.н. студии на компатибилност, и се користат за да се одреди соодветна формулација за FDP. Доколку се појават интеракции, производите од овие интеракции (деградационите онечистувања) мора да се евалуираат, идентификуваат и квантифицираат со соодветни аналитички процедури што се *stability-indicating* (SIM). Тестирањето на стабилноста е континуиран процес, како и една од насоките која се предлага пред крајното дефинирање на формулацијата и производството на мали серии FDP во екстремните точки на производствениот процес. Целта на поставување и анализирање на овие серии на програмата на стабилност е да се утврди профилот на стабилност на FDP и подобро разбирање на способностите на производниот процес.

9.2.3. Студии на стабилност што ги поддржуваат претклиничките и клиничките студии

Студиите на стабилност кои ги опфаќаат сериите произведени при развојот на формулацијата (*formulation development*), направени се со цел поддршка на клиничките студии (прелиминарни студии на стабилност). Претклиничката фаза опфаќа тестирање на производот кај животни. Во текот на претклиничките тестирања се изведуваат студии на стабилност со цел да се покаже дека претклиничките серии/мостри/примероци ги задоволуваат критериумите на прифатливост поставени во спецификациите во текот на целиот временски период при испитувањето врз животните. Испитуваната формулација мора да биде стабилна, чиста и да обезбеди сигурност дека сите тестирани животни ја примаат номиналната доза од самиот почеток до крајот на студијата. По успешно завршено тестирање на претклиничката фаза, FDP влегува во клиничка фаза на тестирање. Студиите за стабилност се неопходни за поддршка и проценка на FDP при овој тип студии. Во повеќето случаи се изведуваат само долготрајни студии на стабилност (*long-term stability studies*), меѓутоа, некои компании вклучуваат дополнителни студии на стабилност, како што се забрзаните (*accelerated stability studies*) и стрес студиите, со цел добивање поголем број податоци во однос на стабилноста на примероците.

9.2.4. Студии на стабилност што ја поддржуваат регистрацијата на лекот

Крајниот спакуван производ мора да биде стабилен најмалку до истекот на предложениот рок на употреба, па и подолго (ICH Q1A(R2), 2003). Добиените податоци за стабилност се поднесуваат до регулаторните тела за поддршка при одредување на прелиминарниот рок на употреба. Овие податоци, како и податоците добиени при тестирањата на забрзани услови на чување може да се искористат за да се предвиди крајната стабилност и да се утврди степенот и кинетиката на деградација. При поднесување на досието до агенциите за регистрација, генерално правило е дека сите производи и активни супстанции се следат минимум 24 месеци. Ова претставува предложен (*proposed*) рок на употреба. Во однос на времето на следење на производите на стабилност, корпоративна одлука е дека истите ќе се анализираат на програмата на стабилност до посакуваниот рок на употреба (*target shelf-life*).

9.2.5. Студии на стабилност на готов производ што се наоѓа на пазарот

По добивањето на одобрение за ставање на лекот во промет, студиите за стабилност продолжуваат и понатаму, со цел поддржување на комерцијалната употреба на лекот (*ongoing stability studies*). Со цел следење и мониторирање на стабилноста на производот на програмата за следење на стабилност, еднаш годишно се поставуваат и испитуваат репрезентативни примероци од секој производ претставен во портфолиото на компанијата. Дополнително, можна е изведба на пост-регистрациски студии на стабилност, доколку има какви било промени во процесот на производство на веќе регистрираниот производ.

9.2.6. Специјални студии на стабилност

9.2.6.1. Стабилност на неспакуван-bulk производ

Студии на стабилност што ќе го поддржат периодот помеѓу финално произведен производ и спакуван производ мора да се спроведат и завршат пред периодот на комерцијализација. Обично, овие студии траат помалку од 12 месеци, во зависност од препаратот, и се спроведуваат во простории со контролирана температура и се мониторирани. Производ кој ќе се транспортира до друг капацитет за пакување како *bulk*, во студиите за стабилност се чува во симулирани пакувања, односно пластични буриња, симулирајќи го пакувањето за транспорт. Производот што се пакува во истиот капацитет каде и што се произведува, се чува во инкос буре, при што треба да се испита временскиот период во кој производот е стабилен во вакви услови за да се одреди периодот на стоење на *bulk* производот до неговото финално пакување – *holding time на bulk производ*. Времетраењето и дизајнот на студијата е во зависност од производот. Тестирањето треба да се прави на секои 3 месеци, или пократко, во зависност од производот (Housepain, 1996).

9.2.6.2. In-process тестирање

Студиите мора да се спроведат за да се обезбедат податоци за поддршка на временскиот период на отстојување на меѓупроизводот/полупроизводот, т.е. од моментот на мешање на материјалите (ексципиенси и активна супстанција) до процесот на производство на финално спакуван производ. Генерално е прифатливо дека не е потребна никаква формална студија ако производниот процес е континуиран и нема чување на материјалите. Доколку меѓупроизводот отстојува пролонгиран период (повеќе од 30 дена), истиот треба да биде соодветно оправдан во ризик анализата и за истиот треба да се изведе *hold-time* студија која опфаќа резултати од стабилност на најмалку 2 серии. Во случај кога двете серии се чувани различно време, потврденото време на отстојување треба да биде пократкото време. Студија на *holding time* на материјалот опфаќа испитување на *stability-indicating* параметрите карактеристични за производот пред продолжување со процесот на производство.

9.2.6.3. In-use тестирање

In-use студиите се потребни за мултидозни производи за да се потврди дека може и колку време може да се користат по првото отворање на примарното пакување, како на пример за производи што треба да се реконституираат пред употреба – гелови, кремове за топикална употреба и слично. Ова барање е наведено од страна на cGMP и европската регулатива. Овој вид студии треба да ја симулираат употребата на производот во пракса во однос на начинот на користење од страна на пациентот, како и условите за употреба. Должината на студијата зависи од тоа колку долго треба да се користи производот. Тестирањето вклучува физичко-хемиски и микробиолошки тестови, со цел детекција на промените што би можеле да се случат откако ќе се отвори производот. *In-use* испитувањето треба да се изврши на две различни серии, една серија на почетокот и една серија блиску до крајот на рокот на употреба или на последната временска точка при поднесувањето на досието за регистрација.

9.3. Преглед на ICH/EMA водичите за стабилност

9.3.1. Избор на серии за тестирање при стабилност

При поднесување на производот за регистрација, според Q1A(R2) програмата за следење на стабилност, потребно е да се постават минимум по три серии од секоја јачина на дозираната форма (ICH Q1A(R2), 2003). За API овие серии мора да бидат со големина на *pilot* серии, додека за FDP две од трите серии мора да бидат барем со големина на *pilot* серии и третата може да биде помала (лабораториска проба). Производниот процес на сериите на API и FDP што се поставуваат на програмата за следење на стабилност мора да биде репрезентативен на комерцијалниот процес. Притоа, треба да се имаат предвид промените што можат да се појават за време на зголемувањето на големината на серијата (*scale-up*). Промените имаат потенцијал да го променат профилот на стабилноста на API или FDP, како и профилот на онечистувањата.

9.3.2. Избор на пакување (секундарно и примарно)

За API студиите за следење на стабилност мора да се спроведат на пакувањето што е слично или го симулира пакувањето предложено за складирање и дистрибуција. Вообичаено API се чува во полиетиленски ќеси сместени во пластични или инокс буриња во магацин. Сето ова не е практично за изведба на студиите на стабилност поради недостаток на простор и големата количина на API. Поради тоа, за изведба на студиите вообичаено се користат симулирани мали буриња, но мора да се внимава на дебелината на бурето за да не обезбеди помала или поголема заштита од бурето во магацинот. За FDP студиите на стабилност се изведуваат на предложеното комерцијално пакување.

9.3.3. Спецификации

Спецификациите за API и FDP треба да бидат воспоставени со цел да се утврди квалитетот преку сет аналитички процедури што опфаќаат испитување на физички, хемиски, биолошки и микробиолошки атрибути. Спецификацијата, како стандард за квалитет, е предложена и научно оправдана од страна на производителот, а е потврдена од регулаторните органи. Дополнителни насоки за воспоставување на спецификациите за API и FDP може да се најдат во ICH Q6A и Q6B водичите. Притоа може да се постават построги критериуми при пуштање на лекот во промет (*release specification*) во однос на критериумите во рок на употреба (*shelf-life specification*). Во однос на сродните и деградационите продукти мора да се утврди спецификација за индивидуални и вкупни онечистувања. Во *shelf-life* спецификацијата границите за онечистувањата може да бидат пошироки во однос на *release* спецификацијата.

9.3.4. Фреквенција на тестирање

Водичот дава препорака дека тестирањето треба да се прави на секои 3 месеци во текот на првата година, на секои 6 месеци во текот на втората година, а потоа еднаш

годишно. Во спротивно со тоа, минимум три временски точки (вклучувајќи ги почетните и крајните) се неопходни за забрзани и четири временски точки за интермедиерни услови на тестирање.

Табела 29. Временски точки на испитување за студиите на стабилност (Нунн-Ва, 2009)

Временски точки	Долготрајни услови на чување	Интермедиерни услови на чување	Забрзани услови на чување
Нулта (иницијална)	X	X	X
3 месеци	X	X	X
6 месеци	X	X	X
9 месеци	X	X	
12 месеци	X	X	
18 месеци	X		
24 месеци	X		
36 месеци	X		

9.3.5. Услови на чување

Температурата во колоната мора да се контролира во рамките на $\pm 2^{\circ}\text{C}$, а влажноста да се контролира во рамките на $\pm 5\%$ релативна влажност. За производ што се чува на собна температура, водичот дефинира интермедиерни услови на чување од $30^{\circ}\text{C} / 65\% \text{RH}$. На интермедиерни услови на чување потребно е тестирање само ако се случи значителна промена кај примероците чувани под забрзани услови од $40^{\circ}\text{C} / 75\% \text{RH}$ во текот на 6 месеци. Да се има предвид дека доколку е предвидено производот да се следи и за четврта климатска зона, истиот се поставува на долготрајни студии на $30^{\circ}\text{C} / 75\% \text{RH}$ и притоа нема потреба од дополнително следење на производот на интермедиерни услови во случаи кога има значителна промена на $40^{\circ}\text{C} / 75\% \text{RH}$. Во Табела 30 се наведени се ICH условите на чување, како и потребниот број податоци кои треба да се поднесат при регистрација. Кога е соодветно, податоците од забрзаните и интермедиерните услови може да се користат за проценка на влијанието на краткорочните екскурзии што може да се јават во текот на чувањето, дистрибуцијата и употребата на лекот од страна на пациентите.

Табела 30. ICH услови на чување при испитување на студии на стабилност (ICH Q1A(R2), 2003)

Пропишани услови на чување на пакувањето	Студии на стабилност	Услови на чување	Потребен број податоци при поднесување на досие за регистрација
Собна температура	Долготрајни	$25^{\circ}\text{C} / 60\% \text{RH}$	12 месеци
	Интермедиерни*	$30^{\circ}\text{C} / 65\% \text{RH}$	6 месеци
	Забрзани	$40^{\circ}\text{C} / 75\% \text{RH}$	6 месеци
Фрижидер	Долготрајни	$5^{\circ}\text{C} / \text{амбиентална}$	12 месеци
	Забрзани	$25^{\circ}\text{C} / 60\% \text{RH}$	6 месеци
Замрзнувач	Долготрајни	$-20^{\circ}\text{C} / \text{амбиентална}$	12 месеци

*Доколку настане сигнификантна промена на $40^{\circ}\text{C} / 75\% \text{RH}$.

Сигнификантна (значителна) промена за API претставува кога некоја од анализите на примероците чувани на забрзани услови не ги исполнува критериумите во спецификациите. За FDP, значителни промени се случуваат доколку еден од петте услови дадени во табела 6 е исполнет. Ако податоците од 6 месеци на забрзани услови не ги исполнуваат спецификациите, потребно е да се тестираат примероците чувани на интермедиерни услови до 12 месеци. Соодветно, овие податоците ќе бидат доставени во досието за регистрација.

Табела 31. Дефиниција за сигнификантна промена на примероци чувани на забрзани услови (ICH Q1A(R2), 2003)

API	Значајна промена е дефинирана ако критериумите на прифатливост дадени во спецификацијата не се исполнети.
FDP	Ако содржината е променета за 5% од иницијалната содржина.
	Ако некое специфицирано деградационо онечистување ја надминува границата на прифатливост во спецификацијата.
	Неисполнување на критериумите на прифатливост за изглед и други физички својства (на пример, боја, раздвојување на фази, реконституција, трошност, цврстина).
	Неисполнување на критериумот на прифатливост за pH.
	Неисполнување на критериумот на прифатливост за растворливоста изведена на 12 единици.

За **течни дозирани форми спакувани во полупропустливи контејнери**, ICH условите на чување се наведени во Табела 32. Сепак, водичот дава можност студијата за долготрајните услови на чување да се направи на 25°C / 60% RH, а губитокот на водата да се пресмета еквивалентно на 25°C / 40% RH. Примероците чувани на 30°C / 65% RH може да се користат на место од 30°C / 35% RH како интермедиерни услови.

Табела 32. Услови на чување за полупропустливи контејнери (ICH Q1A(R2), 2003)

Долготрајни	25°C / 40% RH
Интермедиерни	30°C / 35% RH
Забрзани	40°C / 25% RH

9.3.6. Обврски кон програмата за испитување на стабилноста

ICH Q1A(R2) водичот препорачува да се даде обврска за стабилност во досието за регистрација:

- Доколку при поднесувањето на документите студиите на стабилност имаат податоци за најмалку три серии, треба да се направи обврска која ќе вклучува продолжување на следењето на долготрајната студија на стабилност до предложениот рок на траење и следење на забрзаната стабилност до 6 месеца;
- Доколку при поднесувањето на документите студиите на стабилност имаат податоци за помалку од три серии, треба да се направи обврска која ќе вклучи продолжување на следење на стабилноста до крајот на предложениот рок на траење, следење на забрзаната стабилност до 6 месеца и поставување дополнителни серии на долготрајни услови во траење до истек на важноста и забрзани услови во траење од 6 месеца;
- Доколку при поднесувањето документите од студиите на стабилност не вклучуваат ниту една серија, треба да се направи обврска за поставување на првите три (индустриски) серии на долготрајно следење на стабилност до предложениот рок на траење и на забрзани студии на 6 месеца.

Протоколот за следење на студиите на стабилност за сериите од дадената обврска треба да е истиот со оној од примарните серии дадени при регистрација, освен ако не е оправдано поинаку. Ако е неопходно интермедиерно следење на стабилноста, поради значајна промена на забрзаните услови на примарните серии, тестирањето на сериите од обврската може да се изведе или од интермедиерни или од забрзани услови на чување. Сепак, доколку настане значителна промена на забрзани услови на чување на сериите од обврската, тестирањето треба да се направи и на интермедиерните услови на чување.

9.3.7. Евалуација на добиените резултати

Целта на студиите на стабилност во основа е да воспостават рок на употреба и препорачани услови на чување кои ќе се однесуваат на сите идни серии произведени и спакувани под слични околности (ICH Q1A(R2), 2003). Степенот на варијабилност на индивидуалните серии влијае на сигурноста дека идните произведени серии ќе останат во границите на прифатливост до крајот на рокот на употреба. Кога податоците покажуваат ниска деградација и мала варијабилност, со што и при едноставно набљудување на податоците станува јасно дека предвидениот рок на употреба ќе биде остварен, нормално не е неопходна примена на формална статистичка анализа (доколку оправдувањето за немање статистичка анализа е доволно). Секоја евалуација е потребно да ги вклучи не само испитување на содржината, туку и деградационите продукти и други соодветни својства. Доколку е применливо, треба да се посвети внимание на испитување на адекватноста на баланс на маса и различните перформанси на стабилноста и деградацијата.

9.3.8. Тестирање на фотостабилност, Q1B

Q1B водичот ги дефинира условите на испитување на фотостабилноста како интегрален дел на стрес тестовите. Резултатите од оваа студија имаат важна улога при развојот на формулацијата и изборот на пакувањето. Осетливоста на светлина може да го ограничи рокот на употреба или во многу случаи да влијае на барањата за пакување на готовиот производ (ICH Q1B, 1996).

9.3.9. Тестирање на стабилноста на нови производи, Q1C

ICH Q1C водичот го проширува Q1A водичот за стабилност на нови формулации на веќе одобрени производи и ги дефинира околностите под кои намалениот број податоци за стабилноста можат да бидат прифатени. Под нова формулација се подразбира друг начин на примена, нова функционалност и различни дозирани форми за ист начин на примена. Протоколот за студијата на стабилност треба да биде во согласност со условите дадени во Q1A, но во оправдани случаи може да се прифатат и редуцирани податоци за стабилност.

9.3.10. Редуциран дизајн на студии на стабилност, Q1D

Водичот Q1D ги опишува општите принципи за намалено (редуцирано) тестирање на стабилноста и дава примери на дизајнирање на протоколи со редуцирано испитување. Прифаќањето на овој пристап од страна на регулаторните тела овозможува заштеда на време и ресурси на производителите. Од друга страна, намалените податоци значат зголемен ризик за да се поддржи очекуваниот рок на употреба, бидејќи добиените резултати може да не бидат доволни.

9.3.10.1. Bracketing

Bracketing е редуциран пристап при дизајн на студија на стабилност, со што комплетно се анализираат само екстремите во сите временски интервали (на пример, јачина, пакување). На пример, профилот на стабилност на различни јачини за иста дозирана форма мора најпрво да се утврди и на програмата за следење на стабилност, да се стават највисоката и најниската дозирана јачина. *Bracketing* дизајнот е применлив ако јачините се со идентичен или сличен состав (на пример, кај таблети направени со различни сила на компресија од сличен основен гранулат или капсули со различен начин на полнење на капсуларното тело, но од ист основен состав). *Bracketing* може да се искористи за да се намали тестирањето на примероците со различни големини или полнење на пакувањето. Во случаи кога различни ексципиенси се користат помеѓу различните јачини, тогаш *bracketing* пристапот не е применлив. Сепак, овој пристап на дизајн на студии на стабилност има свои предизвици. На пример, екстремните тестирани точки може во иднина да не бидат од интерес, поради што овој пристап претставува ризична стратегија во случаи кога не се сите серии поставени на стабилност, оставајќи ја компанијата да располага со недоволен број податоци. Исто

така, проблем за компанијата е кога една од сериите не ги исполнува очекуваните критериуми на прифатливост.

9.3.10.2. Matrixing

Matrixing е поконзервативен пристап отколку *bracketing* и е пофаворизиран од страна на регулаторните агенции, иако регулаторното искуство продолжува да биде ограничено. Како што е дефинирано во Q1D, *matrixing* претставува статистички дизајн за распоредот на тестирањата во студиите на стабилност. Во одредена временска точка се тестира избрано подмножество од вкупниот број можни примероци за сите комбинации на фактори. Во друга временска точка се тестира друго подмножество примероци за сите комбинации на фактори. Дизајнот претпоставува дека стабилноста од секое подмножество на тестираните примероци ја претставува стабилноста на сите примероци во дадената временска точка. За разлика од *bracketing* пристапот, каде се проценуваат крајностите, *matrixing* дизајнот е применлив во случаи кога се идентификуваат разликите. Разликите во примероците за еден ист производ може да се идентификуваат вклучувајќи, на пример: различни серии, различни јачини, различни големини на пакувањето и, во некои случаи, различни типови на пакувања. При *matrixing* дизајнот, сите комбинации на фактори треба да бидат тестирани на почетната и крајната временска точка. Во средните временски точки, само дел од овие комбинации треба да се тестираат. Исто така, сите избрани комбинации треба да бидат тестирани и на 12-месечен термин план (како точка за поднесување на досие за регистрација) или во последната временска точка пред поднесувањето. Најкритична предност на *matrixing* пристапот е флексибилноста што ја нуди за дизајн на протоколот за следење на студии на стабилност. Секоја состојба на чување на производот може да се третира одделно со нејзин сопствен *matrixing* дизајн, бидејќи степенот на деградација може да биде различен за секој услов на чување. Затоа, реално со *matrixing* дизајнот треба да се пристапува само кон долготрајните услови на чување. Регулаторната бара тестирање при забрзани услови во три временски точки за секоја комбинација. Затоа податоците од забрзаните услови на чување може да немаат доволно точки за да го поддржат *matrixing* дизајнот на овие услови за чување. *Matrixing* дизајнот се базира на знаењето за очекуваната стабилност на API или FDP.

9.3.11. Евалуација на податоци добиени од испитување на стабилноста, Q1E

ICH водичот Q1E дава повеќе детали за евалуација на резултатите. Исто така, водичот потенцира дека нема потреба од формална статистичка анализа ако податоците покажуваат мала деградација или мала варијабилност. Потребно е да се даде оправдување дека податоците се во дозволената варијабилност на методот и не покажуваат посебен тренд со текот на времето. Овој документ го проширува Q1A водичот со објаснување на можни ситуации каде е соодветна екстраполација на податоците во реално време за поставување на *re-test* период/рок на употреба (ICH Q1E, 2003). Статистичката анализа може да биде корисна во поддршка на екстраполацијата на *re-test* периодот/рок на употреба во одредени ситуации, како и може да биде потребна за потврда на предложениот *re-test* период/рок на употреба.

Доколку е апликативно, при поднесување на досието за регистрација потребна е примена на соодветен статистички метод за анализа на податоците добиени од долготрајните студии на стабилност. Целта на оваа анализа е да се одреди *re-test* периодот/рокот на употреба со висок степен на сигурност.

Регресионата анализа се смета за соодветен приод при евалуација на податоци од студиите на стабилност и поставување на *re-test* период/рок на употреба. Природата на врската меѓу својството и времето ќе одреди дали податоците треба да се трансформираат за линеарна регресиона анализа. Врската може да биде претставена со линеарна или нелинеарна функција, како и на аритметичка или логаритамска скала. Во некои случаи, нелинеарната регресија може подобро да ја рефлектира вистинската поврзаност. Статистичкиот метод користен за анализа на податоците потребно е да го

земе предвид дизајнот на студијата за стабилност за да обезбеди валиден статистички заклучок за предвидениот *re-test* период/рок на употреба.

9.3.12. Декларирање на услови на чување

Целта на ЕМА водичот (*Guideline on declaration of storage conditions*) е поставување униформни знаци за условите на чување при означување на медицинските производи и дефинирање кога се применуваат. Резултатите од студиите за стабилност, претставени за време на поднесување на досието за регистрација, треба да се користат како водич и потребно е да се наведе директна врска меѓу знаците на пакувањето и прикажаните карактеристики на стабилноста на готовиот производ. Сепак, назнака за услови на чување не може да се користи како замена за недоволни податоци од стабилноста, на пример, ослободување од студии на стабилност при забрзани и интермедиерни услови на чување. Употребата на термини како „собна температура“ или „амбиентални услови“ не е прифатлива.

Табела 33. Декларирање на условите на чување во зависност од испитаната стабилност на API/FDP при различни услови на тестирање (ЕМА, 2007)

Испитувани услови на коишто производот е стабилен	Потребни декларирани услови на чување на производот	Дополнителни услови на чување на производот* (каде е потребно)
25°C / 60% RH (долготрајни) 40°C / 75% RH (забрзани) или 30°C / 65% RH (долготрајни) 40°C / 75% RH (забрзани)	Нема***	Да не се чува во фрижидер или да не се замрзнува
25°C / 60% RH (долготрајни) 30°C / 60% RH или 65% RH (интермедиерни) или 30°C / 65% RH (долготрајни)	Да не се чува над 30°C или да се чува под 30°C	
25°C / 60% RH (долготрајни)	Да не се чува над 25°C или да се чува под 25°C	
5 ± 3°C (долготрајни)	Да се чува во фрижидер или да се чува и транспортира во фрижидер**** **	Да не се замрзнува
Под 0°C	Да се чува во замрзнувач или да се чува и транспортира замрзнат***** **	/

*Зависно од фармацевтската форма и својствата на производот, може да постои ризик од влошување поради физички промени ако производот е изложен на ниски температури. Понекогаш, ниските температури може да имаат ефект и врз пакувањето. Може да биде потребна додатна изјава за да се земе предвид оваа можност;

**Збирниот извештај за особините на лекот (*Summary of Product Characteristics, SPC*) и Упатството за пакувањето (*Package Leaflet, PL*) треба да содржат референца за температурниот опсег, на пример, 2°C до 8°C;

***Следните изјави во SPC и PL се задолжителни: Овој лек не бара посебни услови за чување;

****Податоците за стабилност добиени на 25°C / 60% RH (забрзани) треба да се земат предвид при одлучувањето дали е неопходен транспорт во фрижидер. Оваа изјава треба да се користи само во исклучителни случаи;

*****Изјавата треба да се користи само кога е критично.

Во принцип, медицинските производи треба да се пакувани во амбалажа која обезбедува стабилност и го штити готовиот производ од распаѓање. Означата за начинот на чување не треба да се користи како надомест за несоодветно или слабо пакување. Сепак, долунаведените изјави може да се користат да се истакне потребата од претпазливост на пациентот.

Табела 34. Дополнителни ознаки зависно од видот на пакување (EMA, 2007)

Осетливост на производот при чување	Дополнителни услови на чување на производот*, во зависност од пакувањето
Осетлив на влага	Чувај го пакувањето*** цврсто затворено
	Чувај го производот во оригиналното пакување
Осетлив на светлина**	Чувај го производот во оригиналното пакување
	Чувај го пакувањето*** во секундарното пакување

*Кога се користи стандардна изјава од ваков тип, потребно е да се даде објаснување со кое се прецизира дали производот е чувствителен на светлина и/или влага;

**Деталите за евалуацијата се вклучени во водичот на Комитетот за медицински производи за хумана употреба и Меѓународната конференција за хармонизација (CPMP/ICH) за тестирање на фотостабилност;

***Треба да се прецизира типот на контејнерот, на пример, шише, блистер и сл.

9.4. Параметри кои се испитуваат при определување на стабилноста на фармацевтско-дозираниот форма

Аналитичарите во контрола на квалитет или лабораториите за стабилност мора да бидат внимателни при тестирањето, со цел да се осигураат дека производот доставен за продажба одговара на поставените граници во спецификацијата за поддршка на рокот на употреба. Сите атипични појави мора да се евидентираат и да се пријават на повисоко ниво за преземање соодветни мерки.

Табела 35. Параметри кои треба да се следат во студиите за стабилност во зависност од дозираната форма (Нунн-Ва, 2009)

Дозирана форма	Параметри кои треба да се испитуваат во студиите за стабилност
Таблети	Изглед, боја, мирис, содржина, деградациони онечистувања, растворливост, присуство на вода, трошност
Цврсти желатински капсули	Изглед, боја, мирис, содржина, деградациони онечистувања, растворливост, присуство на влага, микробиолошки лимити
Меки желатински капсули	Изглед, боја, мирис, содржина, деградациони онечистувања, растворливост, присуство на влага, микробиолошки лимити, рН
Емулзии	Изглед, боја, мирис, содржина, деградациони онечистувања, микробиолошки лимити, рН, вискозност, содржина на конзерванс, дистрибуција на дисперзирани глобули
Орални раствори	Изглед, боја, мирис, содржина, деградациони онечистувања, рН, микробиолошки лимити, содржина на конзерванс
Орални суспензии	Изглед, боја, мирис, содржина, деградациони онечистувања, рН, микробиолошки лимити, содржина на конзерванс, редисперзибилност, дистрибуција на честички
Орални прашоци	Изглед, боја, присуство на вода, време на реконституција
Инхалациони и назални спрејови	Изглед, боја, мирис, содржина, деградациони онечистувања, воедначеност на доза, микроскопска евалуација, присуство на вода, брзина на истекување, микробиолошки лимити
Топикални и офталмолошки кремове, масти, лосиони, гелови	Изглед, боја, мирис, хомогеност, содржина, деградациони онечистувања, рН, вискозност, ресуспендибилност, дистрибуција на честички, микробиолошки лимити, губиток на маса
Маловолуменски парентерални препарати	Изглед, боја, бистрина, содржина, содржина на конзерванс, деградациони онечистувања, стерилност
Големоволуменски парентерални препарати	Изглед, боја, бистрина, содржина, содржина на конзерванс, деградациони онечистувања, стерилност, рН, пирогеност, волумен

9.5. Евалуација на добиени резултати при испитување на стабилноста

Евалуацијата на податоците добиени од анализите при испитување на стабилноста мора да започне со генерирање сурови податоци добиени од лабораторијата. cGMP регулативата бара API и FDP да ги исполнуваат барања кои се поставени во нивните спецификации за идентитет, јачина, квалитет и чистота. Важно е да се забележат и запишат евентуални значајни промени и потребна е истрага во време кога оригиналниот неисправен примерок и реагенсите се сè уште достапни. Евалуацијата на податоците може ефективно да се изврши само доколку аналитичарот има навремени и точни информации од спецификациите, како и од резултатите и хроматограмите од претходните тестирани временски точки од студијата за стабилност. Доколку се добијат ООС (надвор од спецификација), ООТ (надвор од тренд) и ООЕ (надвор од очекуваните) резултати, мора навремено да се направи истрага и резултатите да се испитаат, повторат, коригираат или да се продолжи истрагата, во зависност од проблемот.

9.5.1. Идентификација на ООС резултати

Кој било добиен резултат при тестирање на стабилност што не ги исполнува барањата поставени во спецификациите, се вели дека е ООС. При идентификација на ООС резултати во тек на стабилност, вклучена е лабораториска истрага (Ia, Ib), како и целокупна истрага (II) со наведени одговорности на аналитичарите, одговорните лица во

лабораторијата, како и одделението за обезбедување квалитет. Важно е истрагата да биде навремена, непристрасна, добро документирана и научно базирана и истата да биде затворена во рок од 30 дена од денот на откривање на ООС резултатот. ООС резултат може да се должи на грешки во процесот на мерење или во процесот на производство. Поради тоа неопходно е да се направи истрага за да се утврди основната причина. Доколку истрагата во фаза I не резултира со лабораториска/аналитичка грешка, истрагата продолжува во фаза II. Пред да се започне со какви било дополнителни тестирања, треба да се направи истрага и да се постави хипотеза за истрагата. Тоа го олеснува водењето на понатамошната постапка и ги намалува трошоците што би се направиле за следните фази. Во оваа фаза потребно е да се известат единиците за квалитет за добиениот ООС преку извештај. Кога резултатот од студијата за стабилност покажува значителна промена на забрзани услови, како што е дефинирано во ICH Q1A(R2) за развојни серии кои се вклучени во регистрационата документација, тестирањето на примероци чувани на интермедиерни услови е задолжително (ICH Q1A(R1), 2003). Доколку резултатите од забрзаните студии на стабилност се ООС, може да има промени во условите на чување на производот, како и кретење на рокот на употреба. Од друга страна, пак, добивање на ООС резултатите во стабилноста при долготрајни услови на чување може да предизвика промена во пакувањето на производот, формулацијата, условите на чување, како и рокот на употреба.

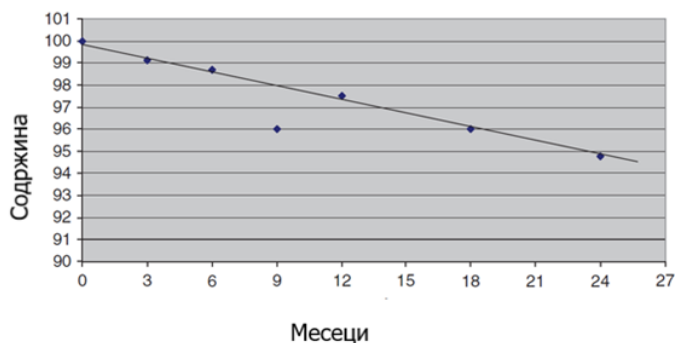
9.5.2. Идентификација на ООТ резултати

Идентификацијата на ООТ резултати вообичаено е покомплицирана од едноставна споредба на резултатите во однос на поставените спецификациски лимити. Идентификација на тренд на податоците е критичен дел од програмата за следење на стабилност и постојат мал број водичи во кои се опишани правила за соодветно евалуирање. Треба да се има предвид дека идентификацијата на ООТ резултатите може да помогне во предвидување на идни ООС резултати. Секое идентификувано отстапување во споредба со раните точки од тестирањето се смета за ООТ инцидент, при што се преземаат соодветни понатамошни мерки. Притоа, гранични (*border*) резултати се третираат на ист начин како ООТ резултати. Постојат неколку емпириски методи за идентификација на ООТ резултати, и тоа:

- Добиениот резултат е $\pm 5\%$ од иницијалната вредност;
- Добиената вредност е $\pm 3\%$ од претходниот резултат;
- Три последователни резултати се надвор од контролниот (тренд) лимит.

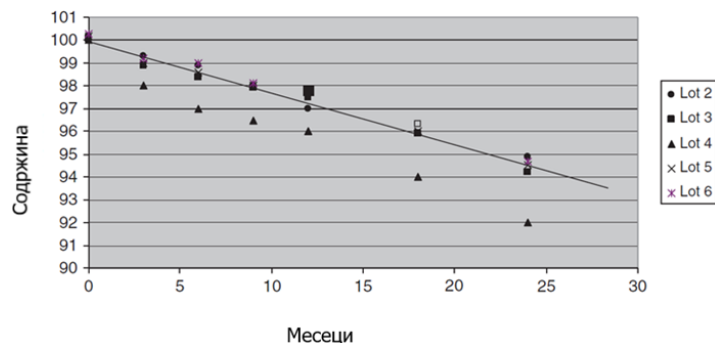
Идентификацијата може да биде квалитативна, со графичко прикажување на податоците од стабилност, или со статистичка обработка на добиените податоци.

Графичкото претставување на податоците може да се примени за идентификација на ООТ резултати во една серија или кај еден производ/тип на пакување. На Слика 15 се прикажани податоци од една серија, каде што точката на 9 месеци се смета дека е ООТ во споредба со резултатите добиени за другите термин планови.



Слика 16. Резултати од стабилност за една серија каде се гледа дека точката на 9 месеци е ООТ (Нунн-Ва, 2009)

Ваква идентификација на ООТ резултат е од големо значење при раниот развој на еден производ, кога е лимитиран бројот на достапни податоци, а графикот дава информации за деградацијата на производот или варијабилноста на аналитичкиот метод. На Слика 16 може да се идентификува ООТ во споредба со другите 4 серии. Овој вид графичко претставување дозволува евалуација на повеќе серии од различни јачини или различни пакувања.



Слика 17. Резултати од стабилност за 5 серии (изразено во месеци), каде јасно се гледа дека серија 4 е ООТ во споредба со останатите 4 серии (Нунн-Ва, 2009)

9.5.3. Статистичка евалуација на ООТ резултати

Статистичкиот приод ја зема предвид варијабилноста на резултатите при поставувањето лимити. Па така, критериумите на прифатливост за идентификација на ООТ може да се постават за различни типови содржини. Три процедури за нормално дистрибуирани податоци се опишани подолу. Притоа, секој од овие пристапи има свои предности и недостатоци.

9.5.3.1. Regression control chart метод

Во овој пристап регресионата права е погодна за идентификација на ООТ во една серија посебно или во повеќе различни серии. Притоа, очекуваниот резултат за секој термин план е даден со следната равенка:

$$\text{Очекуван резултат} = \text{intercept} + (\text{slope} \times \text{време}) \quad [21]$$

Контролните лимити за секоја дадена точка се пресметани со следната равенка:

$$\text{Очекуван резултат} \pm (k \times s) \quad [22]$$

Каде:

- k – множител одбран од табела за нормални квантили со цел да го даде посакуваното ниво на заштита;
- s – квадратен корен од средната квадратна грешка на регресијата.

Изборот на k вредноста дозволува контрола на нивото на доверба, а со тоа и нивото на лажни аларми. Овој приод зависи од нормалната дистрибуција на податоците и е применлив единствено за податоци со вообичаен линеарен наклон (*slope*) за сите серии.

9.5.3.2. By-time-point метод

Во овој приод се применуваат историски податоци за одредување на интервалот на толеранција за секој термин план од стабилноста. Интервалот на толеранција може да се пресмета од самите резултати на тестирањето или од разликата меѓу индивидуалниот резултат и иницијалниот резултат. Интервалот за секоја точка може да се пресмета како:

$$(\text{Средна вредност од резултатите за одреден термин план}) \pm (k \times s) \quad [23]$$

Каде:

- k – множител одбран од табела за нормални квантили;
- s – стандардна девијација од резултатите добиени за термин планот од интерес.

Притоа, секој резултат надвор од интервалот на толеранција се смета за ООТ. Овој метод зависи од нормалната дистрибуција на податоците и не зависи од обликот на деградационата крива.

9.5.3.3. Slope control chart метод

Кај овој приод се конструира регресиона права за наклонот (*slope*) за секој термин план. На секоја точка од стабилноста регресионата права ги вклучува сите претходни точки. Пресметката на наклонот за секоја серија се применува за да се пресмета наклонот за сите други серии. ООТ лимитот за наклонот за секој термин план се добива од интервалот на толеранција, во кој k е одбран за да ја даде посакуваната заштита од лажно позитивни или лажно негативни вредности.

9.5.4. Преглед на резултати добиени за содржината на онечистувањата

Овој специјален случај бара подетална дискусија поради неговото влијание врз поставувањето на границите за прифатливост во спецификациите за API и FDP. Најчесто критериумите на прифатливост за онечистувањата се во согласност со насоките дадени во ICH Q3A(R2) и ICH Q3B водичите (ICH Q3A(R2), 2006; ICH Q3B(R2), 2006). Крајно репортираниот резултат, добиен за одредено онечистување, се заокружува во согласност со воспоставениот лимит во спецификацијата. Со заокружувањето на добиените резултати на една децимала се отежнува користењето на ООТ алатките и притоа може да се добијат лажни резултати. Најчесто онечистувањата под лимитот на квантификација (LOQ) се репортираат како $< LOQ$, согласно ICH Q3B(R2) (ICH Q3B(R2), 2006). Па така, репортираните резултати под LOQ не може да се користат за идентификација на ООТ резултати. Оваа пракса на репортирање на резултатите исто така го намалува бројот на податоци потребни за идентификација на ООТ резултати за онечистувањата и може да биде проблем за онечистувања што имаат вредност блиску до границите за LOQ. Во продолжение следат процедури за евалуирање на ООТ резултати блиску до LOQ:

- Доколку сите добиени вредности се над LOQ, имаат нормална дистрибуција и варијансите се константни, за идентификација на ООТ резултати може да се применат *Regression control chart* и *Slope control chart* методите;
- Доколку сите добиени вредности се под LOQ, секој резултат над LOQ може да се смета дека е ООТ. Меѓутоа, овој начин за идентификација на ООТ резултати може да резултира со лажно позитивни заклучоци, земајќи предвид дека неговата појава над LOQ може да биде резултат на варијабилноста на аналитичкиот метод;
- Доколку само неколку вредности се под LOQ, една од стратегиите е сите резултати кои се $< LOQ$ да се земаат како LOQ вредност или $\frac{1}{2}$ од вредноста, со цел соодветна статистичка евалуација на ООТ резултати.

Идентификацијата на ООТ резултати од онечистувањата може да укаже на потребата од идентификација на непознати онечистувања кои може да растат во текот на стабилноста. Порастот на процентот за непознатото онечистување може да предизвика негова идентификација и квантификација уште пред да го надмине лимитот за прифатливост поставен во спецификацијата за неспецифицирано онечистување според ICH Q3A/B(R2) (ICH Q3A(R2), 2006).

9.6. Пострегистрациски промени, барања и регулатива поврзани со стабилноста

Постојат голем број причини за промена во фармацевтскиот производ по добиеното одобрение за ставање на лекот во промет (подобрување на процес на производство и/или опрема, промена на големина на серија, трансфер на нова производна локација, воведување на втора јачина, промена на пакување, промена на аналитички методи за испитување, промена на спецификации, промена на рок на употреба итн.). Дел од тие промени може да се значителни и притоа да се потребни голем број податоци за поддршка на истите. Дополнително, има и мали промени за кои е потребно само обврзување дека доколку се добијат непосакувани резултати, ќе се пријават соодветно до регулаторните агенции. Притоа, при овие процедури, регулаторната група ја определува стратегијата за поднесувањето на документацијата, земајќи ги предвид техничката проценка и водичите кои се на располагање. Стратегијата е покомплицирана доколку производот е регистриран глобално, на повеќе пазари. Барањата за промени што се поврзани со стабилноста најчесто се водени од мултидисциплинарен тим.

9.6.1. Евалуација на предложените промени

Промените, по добиено одобрение за ставање на лекот во промет, се прават од различни причини. При поднесување на досието се прават лимитиран број промени, како резултат на тоа што различните промени може да го пролонгираат добивањето одобрение за ставање на лекот во промет. Па така, вообичаено брзо по одобрувањето ќе треба да се направат неколку промени со цел да се подобри производството или комерцијалната поддршка. Процесот за контрола на промени е инициран кога е предложена промена за проактивно подобрување на процесите, при што се собира тимот и ги евалуира предложените промени. Во зависност од барањата, се дефинира временска рамка и се прави проценка на трошоците. Некои предложени промени за подобрување на процесот може веднаш да се одбијат од страна на тимот, а од друга страна, пак, промените поврзани со добавувачите се одобруваат директно и секогаш им се дава приоритет. Од аспект на стабилноста, секоја промена треба да се евалуира базирано на потенцијалниот ефект врз стабилноста на API/FDP. Кога има повеќе од една јачина можеби ќе бидат потребни неколку студии во зависност од пакувањето и можноста да се примени редуциран дизајн – *bracketing*. Заедно со достапните податоци од стабилност и другите технички барања, алтернативно, иницијаторот може да ги вклучи соодветните регулаторни барања во контрола на промена врз основа на важечката регулатива. Контролата на промена потоа се дистрибуира за преглед/одобрување до соодветни одговорни лица. Штом се одобри промената, ќе започнат активностите и врз основа на податоците од стабилноста и наведените регулаторни барања, лицата од стабилност изработуваат соодветна документација. Притоа, на стабилност може да се постават пилот серии за поддршка на промените, иако честопати е посоодветно да се постават серии со комерцијална големина бидејќи истите може да се носат на пазар веднаш штом се одобри промената, под претпоставка дека останува доволно време пред истекот на рокот на траење (барем 12-18 месеци). Во документацијата од стабилност се дава предлог за рокот на употреба на променетиот производ врз основа на споредбата на профилот на стабилност со прворегистрираниот производ. Освен тоа, се дава и обврска за изведба на дополнителни студии на стабилност, доколку е потребно. Барањата од стабилност по одобрувањето на промената, исто така, треба да бидат вклучени во документацијата за контрола на промена (CHMP/CVMP, 2014).

9.6.2. Типови промени и глобални барања

9.6.2.1. Тип I варијации

Промените може да се категоризираат како IA (нотификација) или IB (подносителот е известен во рок од 30 дена по валидацијата). Тип IA варијациите се мали промени за кои, всушност, не е потребно одобрување пред нивна имплементација.

Сепак, подносителот на барањето има обврска да ги извести регулаторните агенции за направената промена во рок од 12 месеци по имплементацијата. Тип IB варијациите се мали промени за кои, за разлика од тип IA варијациите, подносителот мора да извести за промената пред имплементација на истата. Во рок од 30 дена се добива известување дали истата е одобрена и дали може да се имплементира. Иако промените може да се комбинираат, препорачливо е да се поднесуваат индивидуално, земајќи предвид дека комбинираниите може да доведат до несакани одложувања. Дел од промените кои спаѓаат во оваа категорија се прикажани во следната табела. Притоа, за секоја пријавена промена од тип I варијациите се плаќаат одредени придонеси (EMA, 2006).

Табела 36. Примери за тип I варијации (Huynh-Va, 2009)

Промена	Потребни податоци од стабилност	Препорачани активности/коментари
Големина на серија на API	Нема потреба од податоци од стабилност	Податоци од 2 серии при нивно ослободување
Промена на ексципиенс со друг споредлив ексципиенс	3 месеци податоци на 2 серии од производот (најмалку со големина на пилот серии)	За цврсти дозирани форми податоци од компаративни дисолуциони профили (стар vs. нов); Потребно е да се покаже дека промената нема влијание врз аналитичките методи
Состав на примарното (контактното) пакување	3 месеци податоци на 2 серии од производот (најмалку со големина на пилот серии)	Компаративни податоци за новото пакување (влага, пермеабилност)
Големина на серија на готов производ	Доколку е со големина <10 пати во однос на претходно одобрената – не е потребна стабилност; Доколку е со големина >10 пати – 3 месеци податоци на 1 серија (најмалку со големина на пилот серии)	Протокол за валидација на процес/извештај
Мала промена во производствениот процес	3 месеци податоци на 1 серија од производот (најмалку со големина на пилот серии)	Принципот на производство е непроменет
Средство за бојење или вкус кое се користи во производот	3 месеци податоци (забрзани и долготрајни) на 2 серии од производот (најмалку со големина на пилот серии)	Доколку е оправдано, потребно е да се изработи студија на фотостабилност; Доколку е нов ексципиенс, нема влијание врз аналитичките методи
Маса на облогата за таблети или маса на капсулната обвивка	3 месеци податоци на 2 серии од производот (најмалку со големина на пилот серии)	Компаративни дисолуции: тип IA – за таблети со конвенционално ослободување; тип IB – за таблети со модифицирано ослободување (обложувањето не е критичен фактор за ослободување)

Форма или големина на пакувањето/ капачето	Нема потреба од податоци од стабилност	Ист состав на шишето; тип IB – за стерилни дозирани форми; тип IA – за сите останати
Форма или големина на пакувањето/ капачето	3 месеци податоци на 2 серии од производот (најмалку со големина на пилот серии)	Исто како погоре наведеното, со таа разлика што има промена во <i>headspace</i> -от или односот на површина/волумен
Број на единици во пакување (шише)	Обврска да се следи стабилноста доколку промената ги афектира критичните параметри	Доколку има резултати надвор од пропишаните граници, потребна е обврска дека би се следеле серии со имплементираната промена

9.6.2.2. Тип II варијации

Тип II варијации се пријавуваат за големи промени и за нив е потребно одобрување од регулаторните тела пред нивна имплементација (CHMP/CVMP, 2014). За одобрување вообичаено се неопходни 60-90 дена за преглед. Тип II варијациите се оние кои не можат да се сметаат како мали промени или екстензии на добиено одобрение за ставање на лекот во промет. Дел од промените од овој тип се прикажани во следната табела. Исто и кај овие варијации производителот плаќа одредени придонеси. Барањата за овој тип варијации може да се разликуваат во зависност од тоа дали активната супстанција е стабилна или нестабилна. Согласно регулативата, стабилна активна супстанција е онаа супстанција која е во дефинираните спецификациски лимити кога е складирана на 25°C / 60% RH или 30°C / 65% RH во период од 2 години и на 40°C / 75% RH во период од 6 месеци (CHMP/CVMP, 2014).

Табела 37. Примери за тип II варијации (Huynh-Va, 2009)

Промена	Потребни податоци од стабилност	Препорачани активности/коментари
Производствен процес на API	<u>Стабилна API</u> : 1 серија / 3 месеци податоци од забрзани и долготрајни услови; <u>Нестабилна API</u> : 3 серии / 6 месеци податоци од забрзани и долготрајни услови; <u>Производ</u> : 2 серии / 3 месеци податоци од забрзани и долготрајни услови	Доколку се променети карактеристиките на API, а со тоа и компромитирана стабилноста, потребни се компаративни податоци од стабилност (пред и по промената на процесот); Доколку се променети карактеристиките на API, а со тоа компромитирана и стабилноста на готовиот производ, потребни се податоци од стабилност.
Состав на производот	<u>Дозирани форми со конвенционално ослободување и стабилна API</u> : 2 серии / 6 месеци податоци од забрзани и долготрајни услови; <u>Критични дозирани форми и нестабилна API</u> : 3 серии / 6 месеци податоци од забрзани и долготрајни услови.	<u>Цврсти форми со брзо ослободување, раствори</u> : Сериите може да се со пилот големина; <u>Дозирани форми со продолжено ослободување</u> : Сериите може да се со пилот големина.

Контактно (примарно) пакување	<u>Полуцврсти дозирани форми:</u> 3 серии / 6 месеци податоци од забрзани и долготрајни услови.	Помалку протективно пакување или ризик од интеракција; Сериите може да се со пилот големина.
-------------------------------	--	--

9.6.2.3. Промена во спецификации и аналитички метод

Аналитичките методи мора да се мониторираат при тестирањето на параметрите содржина, дисолуција, деградациони продукти и други критични тестови во текот на студиите на стабилност. Притоа, доколку има потреба, ќе се направи подобрување. Кога се прават промени во аналитичките методи кои може да имаат влијание врз студиите на стабилност (било да се нови или *ongoing*) треба да се донесе одлука во однос на валидацијата, имплементацијата и известувањето. Напредокот во аналитичката технологија доведува до зголемена селективност и чувствителност, а со тоа и намалени нивоа на детекција/квантификација за сродните и деградационите продукти. Во однос на промени на лимитите во *shelf-life* спецификацијата, примерите вклучуваат додавање граници за новооткриениот деградационен продукт, проширување на границите за специфициран деградационен продукт, промена во еден или повеќе дисолуциски граници за производите со продолжено ослободување и проширување на лимот за pH кога станува збор за течна дозирана форма. Во однос на аналитичките методи, промените ќе бидат потребни како резултат на постигнување на билансот на маса на производот или проблеми поврзани со подготовката на примероците за анализа, подобро запознавање на API или FDP, информации добиени во тек на метод трансферот или други студии на стабилност, како забрзани или стрес студии. Земајќи го предвид долгото искуството стекнато со работа со методот или доколку е овозможена негова автоматизација, промените во методот може да бидат пожелни со цел кратење на времето за анализа. Во случај на промена во аналитичкиот метод, потребно е да се процени влијанието врз студиите на стабилност. Ако промената е значајно подобрување на квалитетот, тогаш имплементацијата треба да биде веднаш штом се комплетираат валидацијата и вкрстената корелацијата на методите. Во секој случај, промената мора да се достави до регулаторните агенции и, во зависност од типот на промената, можеби ќе има период кога ќе треба да се користат и двете методи, сè до одобрувањето на новата.

9.6.2.4. Повеќекратни промени и промени кои афектираат повеќе производи

Честопати вклучени се повеќекратни промени кои може да имаат влијание врз производот и неговата стабилност. На пример, пријавувањето ново производно место може да вклучува промени во процесните параметри надвор од одобрените граници или употреба на опрема со различен принцип на работа. Во однос на пријавувањето на промената, потребата од студии на стабилност треба да ја поддржат најзначајната промена. Во овој случај, промените во процесот или опремата можат потенцијално да влијаат на стабилноста на производот и да бараат дополнителни истражувања и развојни студии на стабилност. Друг пример би бил развој и производство на нова дозирана форма, на пример промена од капсула во таблета или обратно, со цел да се прошири линијата производи. Дополнителната дозирана форма може да се направи на друго производно место, но сепак барањата за стабилност и пријавувањето на промената ќе бидат диктирани од новата дозирана форма, а не од промената на производното место. Промените, исто така, може да влијаат на цела линија на производ или повеќе различни производи. На пример, додавање на нов добавувач на API со различна синтеза, од финансиски причини или заради квалитет, може да има влијание врз сите производи кои ја содржат оваа API. Доколку се земат предвид сите јачини и пакувања од секоја дозирана форма, бројот на студии за стабилност што треба да се направат може да биде значителен. Меѓутоа, доколку има генерирано значителен број податоци од стабилност за целата производна линија и значајни познавања за производот, добро осмислен редуциран план во кој се покриени сите дозирани форми, јачини и пакувања, може да биде прифатен од регулаторните органи. Еден од

пристапите ќе биде да се процени линијата на производи со цел да се утврди најкритичната/ите дозиран/и форма/и, јачина/и и пакување/а од аспект на стабилност (деградациони продукти, дисолуција), при што би се поставиле само овие. На овој начин, со докажувањето дека одбраната најкритична форма на променетиот производ со инкорпорирана нова API има стабилност слична на првиот регистриран производ, може да се квалификува целата производна линија. Промена која може да има влијание врз повеќе производи со иста дозирана форма е кога се прави промена во компонентите на примарното пакување, како на пример, гумен затворач на вијали, пластични шишиња за орални раствори, полимерни компоненти на туба за полуцврсти форми и слично (FDA/CDER, 1997a). Сето ова може да води до промени во повеќе производи, но, како што беше напоменато и претходно, големите познавања за производот, вклучувајќи го профилот на стабилноста, може да олеснат дизајн на соодветни студии на стабилност со кои би се покрила промената. Па така, може да се земат предвид повеќе фактори, како API и нејзината концентрација, pH на формулацијата, јачината и големината на пакувањето, како и да се направи евалуација на сличностите. Притоа би се групирале повеќе слични производи во однос на некој од тие фактори и би се направил соодветен дизајн во кој ќе се дефинира кои репрезентативни примероци од групата би се поставиле на стабилност и би ги покриле сите засегнати производи. Слично на промените на некоја од компонентите од пакувањето, промените во суровината исто така може да влијаат на голем број производи. Достапен е широк спектар промени и притоа мора да се процени нивното влијание врз квалитетот на производот. Вклучени се повеќе промени во суровината, како промени во производното место, спецификацијата, промени во производниот процес, промена во почетниот материјал или компонентите, како и промена во сосема нов производител заради недостаток на материјал од тековниот добавувач или заради финансиски причини. Доколку промената е направена на критичен ексципиенс или на ексципиенс што го контролира ослободувањето на активната компонента, промената ќе бара податоци од стабилност. Ако промената е направена на кој било друг ексципиенс, тогаш треба да се процени потенцијалното влијание врз производот и неговата стабилност. Кај компатибилен ексципиенс, промената во спецификацијата веројатно нема да има никакво влијание врз стабилноста на производот. При промена на производното место, кога ексципиенсот ги исполнува истите барања, ќе треба да се изготви извештај во кој ќе се докаже еквивалентноста на суровината произведена на двете производни места или од страна на добавувачот (доколку промената на производното место потекнува од добавувачот) или од производителот (промената е додавање на алтернативен добавувач). Промена во производниот процес на суровината или на почетниот материјал ќе бара исто така извештај во кој еквивалентноста меѓу променетата и одобрената суровина ќе се докаже преку најважниот фактор. Доколку со овој вид промена се очекува да се променат физичките карактеристики на материјалот или ако ексципиенсот е критичен за производот или перформансите на производството (на пример, растворање, униформност), тогаш ќе треба да се процени влијанието врз производите и нивната стабилност. Треба да се подготви протокол за квалификација и првата серија од производот да се постави на стабилност. Во случај кога станува збор за повеќе производи, сите производи би можеле да бидат квалификувани засновано врз студии на производ или производи врз кои најверојатно би имало влијание од промената. Промени во некоја од компонентите на суровината (на пример, боја за обложување, комбинација од ексципиенси) може да бидат тешки за проценка бидејќи честопати тестирањето на финалниот материјал може да не биде индикативно за индивидуалните компоненти. Притоа ќе биде потребно да се направи евалуација на промената од страна на добавувачот, а проценката од страна на производителот може да вклучува план за поставување на првата серија од репрезентативниот производ на стабилност.

10. СПОРЕДБА НА *IN VITRO* ПРОФИЛИ НА РАСТВОРЛИВОСТ

За време на фармацевтскиот развој на лекот, фармацевтско-технолошкиот параметар растворливост се користи за да се утврдат факторите што влијаат врз развојот на формулацијата и што можат да имаат клучен ефект врз биорасположливоста на лекот (FDA/CDER, 2004). Откако ќе се дефинира конечниот состав и производниот процес на фармацевтскиот производ, тестот за растворливост се користи во контрола на квалитетот на произведените комерцијални серии со цел да се обезбеди конзистентност од серија до серија (FDA/CDER, 1995; FDA/CDER, 1997b).

Со компаративното испитување на *in vitro* профилите на растворливост се дава можност да се демонстрира сличност помеѓу формулациите на генеричкиот и референтниот производ, а со тоа да се обезбеди поголема сигурност кон понатамошна изведба на успешна студија на биоеквивалентност (BE) (FDA/CDER, 1995; FDA/CDER, 1997b). Од друга страна, во случај на настанати промени (состав, производен процес итн.) во текот на животниот циклус на генеричкиот производ, профилите на растворливост може да послужат како *biowaiver* (сурогат) за да не се спроведува *in vivo* студијата помеѓу генеричкиот и референтниот производ (FDA/CDER, 1995; WHO, 2007). За проценка на сличноста на *in vitro* профилите на растворливост најчесто користена алатка е регулаторно одобриениот фактор на сличност f_2 . Но, доколку едно од поставените регулаторни барања не биде исполнето при испитување на сличноста на *in vitro* профилите на растворливост, се пристапува кон употреба на алтернативни математички и статистички тестови.

За време на фармацевтскиот развој на лекот, главна цел на фармацевтските компании е да развијат стабилен производ, започнувајќи со проучување на физичко-хемиските карактеристики на активната супстанција, па сè до производство на посакувана робустна формулација.

Уште во самиот ран развој на формулацијата (избор на кандидат формулација-предформулација) изведбата на тестовите за растворливост може да помогне во изборот на ексципиенсите и во оптимизирање на процесот на производство. Сето тоа овозможува да се произведе генерички производ со *in vivo* карактеристики слични на одбраниот референтен производ. Евалуацијата на *in vivo* карактеристиките на избраната формулација се постигнува преку *in vitro* споредба на профилите на растворливост помеѓу генеричкиот и референтниот производ.

In vitro испитувањата на растворливоста на генеричките производи формулирани како цврсти дозирани форми се регулаторно барање и претставува најсоодветен и неизбежен метод за предвидување на *in vivo* однесувањето на фармацевтскиот производ (особено кога говориме за високопермеабилни активни супстанции) (Sathe et al., 1997).

По утврдувањето на конечниот состав и процесот на производство на фармацевтскиот производ, тестот за растворливост се користи во контрола на квалитетот на произведените комерцијални серии со цел да се обезбеди конзистентност од серија до серија во текот на животниот циклус на лекот. Оттука, *in vitro* студиите на растворливост наоѓаат голема примена при:

- Споредба на *in vitro* профилите на растворливост помеѓу генерички и референтен производ со цел да се забрза развојот на генеричкиот производ, но и да се намалат трошоците, како и да се воспостави *in vivo-in vitro* (IVIVC) корелација (Sathe et al., 1997);
- Воспоставување прифатливи критериуми за испитување на фармацевтско-технолошкиот параметар „растворливост“ во спецификациите за квалитет на готов производ при пуштање во промет и во рокот на употреба;
- Споредба на *in vitro* профилите на растворливост на генеричкиот производ по направена промена во: составот (ексципиенсите), производниот процес и/или опремата во текот на животниот циклус на производот со производот што има добиено решение за ставање во промет, со цел да се избегне дополнителна изведба на *in vivo* студија;
- Споредба на *in vitro* профилите на растворливост помеѓу различните јачини на генеричкиот производ што ќе дадат сигурен доказ за изведба на една *in vivo* студија.



Слика 18. Значење и улога на *in vitro* студиите на растворливост во текот на животниот циклус на лекот (Scheubel, 2010)

Проценката на биеквивалентност во однос на референтен производ претставува широко прифатена и официјална постапка за потврдување на ефикасноста на новите генерички формулации (García-Arieta & Gordon, 2012; Davit et al., 2013). *In vivo* студиите спроведени на доброволци за докажување на терапевтската ефикасност на генеричкиот лек се многу скапи, одземаат многу време, а во некои случаи се и етички дискутабилни. Поради тоа фармацевтската индустрија постојано бара ефективни алтернативи за нивна претходна проценка и предвидување (CHMP, 2010). Американската агенција за лекови и храна (FDA) ги охрабрува фармацевтските компании да ја истражат врската помеѓу *in vivo* биорасположливоста и *in vitro* растворливоста на лекот. Во ноември 1995 година FDA издаде водич за цврсти дозирани форми со брзо ослободување на активна супстанција под наслов „*Immediate Release Solid Oral Dosage Forms; Scale-up and Post-approval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Dissolution Testing; In Vivo Bioequivalence Documentation (SUPAC-IR)*“ (Federal Register, Vol. 60, No. 230, Notices, PP. 61638-61643). Водичот дава насоки и чекори што треба да се преземат при настанати промени во формулацијата на фармацевтскиот производ и процесот на производство итн., ја дефинира потребата од изведба на *in vitro* компаративни студии на растворливост, како и потребната документација што треба да се приложи до регулаторните агенции за пријавената промена (Sathe et al., 1997). Доколку се докаже сличност на *in vitro* профилите на растворливост помеѓу формулациите пред и по промените, може да се избегне изведба на *in vivo* студија (CHMP, 2010). Релевантноста на *in vitro* студиите на растворливост за фармацевтските производи сè повеќе се зголемува со текот на времето, па оттука Водичот на FDA, поврзан со „Биофармацевтскиот систем за класификација на производите“ (BCS), дава насоки кога *in vitro* студиите на растворливост би можеле да се искористат како сурогат (*biowaiver*) за *in vivo* студиите

(Lipinski et al., 1997). Предуслов за докажување на сличноста на *in vitro* профилите на растворливост помеѓу испитуваните формулации е тоа што мора да имаат иста фармацевтска дозирана форма и ист квалитативен и квантитативен состав на активната супстанција. Предвидувања за *in vivo* студијата може да се дадат преку резултатите од спроведените *in vitro* студии на растворливост во случај кога ексципиенсите од формулацијата не влијаат врз апсорпцијата на активната супстанција; кога активната супстанција не е во форма на пролек; нема тесен терапевтски индекс и не е наменета да се апсорбира преку усната шуплина. Исто така, ова е применливо за фармацевтски производи со брзо ослободување во следните случаи:

- Доказано е дека активната супстанција има висока растворливост и комплетна апсорпција (BCS – класа 1);
- Доказано е дека активната супстанција има висока растворливост и ограничена апсорпција (BCS – класа 3);
- *In vitro* растворливоста на генеричкиот и референтниот производ е многу брза (> 85% за 15 минути) или средно брза (85% за 30 минути);
- Ексципиенсите што може да влијаат врз биорасположливоста се квалитативно и квантитативно исти. Генерално, се преферира употреба на исти ексципиенси во слични количини.

Еден фармацевтски производ се смета за брзо растворлив (*immediate release, IR*) ако процентот на ослободена активна супстанција изнесува најмалку 85% за време од 30 минути. Од 1995 година научните пристапи за „Биофармацевтскиот систем за класификација на производите“ се вклучени во законските рамки на различни регулаторни тела што се одговорни за ставање на лекот во промет. Со тоа е постигнат добар степен на консензус во однос на можноста да се обезбеди регулаторно олеснување при регистрација на фармацевтски производи со брзо ослободување што припаѓаат на BCS класа 1 и 3, односно производи каде што степенот на растворливост на активната супстанција не ја ограничува апсорпцијата. Во согласност со насоките дадени во EMA и FDA водичите (*EMA Guideline on the investigation of bioequivalence, 2010; US Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Dissolution Testing for Immediate Release Solid Oral Dosage Form, 1997*), споредбата на *in vitro* профилите на растворливост помеѓу испитуваните производи треба да се процени во најмалку три медиуми, по можност: pH 1,2, pH 4,5 и pH 6,8 (дополнително може да се вклучи и медиумот наведен во спецификација за квалитет, ако е различен од регулаторно предложените).

За дозирани форми со брзо ослободување на активната супстанција, споредбата во 15-тата минута е од суштинско значење при споредба на *in vitro* профилите на растворливост, бидејќи е поврзана со физиолошкото време на празнење на желудникот. Водичите препорачуваат во случаи кога повеќе од 85% од активната супстанција се раствора во време од 15 минути, *in vitro* профилите на растворливост да се сметаат за слични без дополнителни математички проценки. Во случаи кога ова барање не е исполнето (т.е. повеќе од 85% се раствора во период од 30 минути), потребни се најмалку три временски точки: една точка пред 15-тата минута, втора точка на 15-тата минута и третата временска точка кога ослободувањето на активната супстанција е блиску до 85%.

Почнувајќи од 90-тите години на минатиот век, во научната литература сè почесто се објавувале предлози за употреба на различни методи при споредувањето на *in vitro* профилите на растворливост. Новите методи се појавуваат откако регулаторните агенции како најпосакуван метод за споредба на профилот на растворливост го препорачувале факторот на сличност (f_2) развиен од страна на Moore и Flanner. Најчесто и најлесно користен пристап за споредување на *in vitro* профилите на растворливост е преку определување на факторот на сличност f_2 . Овој пристап во својата природа нема цврста статистичка основа. Терминот „сличност“ е воведен за да се опише разликата помеѓу две испитувани формулации. Отфрлање на „сличноста“ за два фармацевтски производи преку определување на факторот на сличност (f_2) може

да се смета за неоправдано во однос на биофармацевтски карактеристики на производот, бидејќи поставената граница ($f_2 \geq 50$) е емпириска и фиксна. Новите публикации ги дискутираат негативните последици од примената на f_2 факторот, бидејќи тој може да класифицира две формулации што не се *in vivo* биеквивалентни како слични, додека од друга страна може да биде предискриминаторен. Дополнително, дискутирано е за статистичкото и концептуалното ограничување на f_2 факторот, вклучувајќи го и нивото на доверба, ниската статистичка моќ, недостатокот на флексибилност за изведување различни сценарија и лошата статистичка конзистентност. Поради тоа, за споредба на *in vitro* профилите на растворливост сè повеќе се охрабрува примената на алтернативните мултиваријантни статистички методи, со цел да се разбере и инкорпорира варијабилноста што е присутна во испитуваните серии во однос на процентот на ослободување на активната супстанција од формулацијата. Со сето тоа се овозможува прецизна проценка како на квалитетот така и на *in vitro* сличноста помеѓу испитуваните производи, но дава и сигурни предвидувања за успешноста на *in vivo* студиите што треба да бидат изведени. Според насоките дадени во регулативата, *in vivo* студијата, главно, треба да се спроведе со најголемата јачина на лекот. Па поради тоа и докажувањето на сличноста на *in vitro* профилите на растворливост помеѓу испитуваните производи треба да биде изведена на најголемата јачина на лекот. За производи со линеарна фармакокинетика, каде активната супстанција е во групата на високо растворливи, прифатливо е *in vivo* студијата да биде изведена на помалата јачина ако најголемата јачина не може да се употреби на здрави доброволци заради безбедносни причини. Понатаму, избраната доза може да биде поголема од најголемата терапевтска доза под услов оваа единечна доза да биде добро толерирана кај здрави доброволци и да нема ограничувања при апсорпцијата или растворливоста. За лекови со нелинеарна фармакокинетика потребно е да се изведат две *in vivo* студии, односно на најголемата и најмалата јачина. Но, ако со цврсти статистички и математички методи се докаже сличноста на *in vitro* профилите на растворливост помеѓу различните јачини, изведбата на една *in vivo* судија треба да ја потврди соодветноста од откажување на дополнителни *in vivo* испитувања (EMA, *Guideline on the investigation of bioequivalence*, 2010).

Процесот на развојот на методот за растворливост бара значителна и исцрпна евалуација на профилите на растворливост во повеќе апарати и медиуми. Овој напор е редок при развојот и често не е целосно направен во раната развојна фаза поради временскиот притисок и малата достапност на *in vivo* податоци, што води до потенцијален недостаток за разбирање на ефектот на компонентата на формулацијата (API, ексципиенси), како и својствата на производните процеси подоцна, по зголемувањето на големината на серијата. Предвидувањата за *in vivo* однесувањето бара употреба на методи за *in vitro* на растворливост што ги рефлектираат *in vivo* ГИТ условите. Поради тоа предложени се средства/медиуми за тестирање на растворливоста базирани на физиолошки услови, како што се FaSSIF (*Fasted State Simulated Intestinal Fluid*) и FeSSIF (*Fed State Simulated Intestinal Fluid*), но нивната точност за предвидување во многу случаи сè уште е недоволно докажана. Една од главните причини е сложеноста на физиологијата на гастроинтестиналниот тракт (на пример, хидродинамика) и неразбирањето за процесот на варење. Покрај тоа, фармацевтската индустријата не сака да ги искористи овие покомплексни и поскапи медиуми за растворливост во рутинска работа. Понатаму, квалитетот и целта на податоците за ослободување на API од дозираната форма може да варираат во зависност од нивната намена при фазата на развој на лековите и овие податоци понекогаш тешко се корелираат меѓу себе. Но, и покрај нивната широка употреба во фармацевтскиот развој и процесот на регистрација, сè уште постои недостаток на темелно разбирање за тоа што растворливоста како тест може/треба да измери (API, готов производ). Дури понекогаш индустријата и регулаторните очекувањата во однос на тестирањето за растворливост не се слични. Новата регулатива за „Квалитет базиран на дизајн“ (*Quality by Design*, QbD) го поттикнува фармацевтскиот развој за длабинско разбирање на „причините и последиците“, и сега води кон поиновативно и

понаучно заснован пристап со цел да се подобри методот на растворливост, да се намали варијабилноста и да се обезбеди постојано висок квалитет на готовиот производ (ICH Q9, 2005; ICH Q10, 2008; ICH Q8(R2), 2009).

Идеално, тестот за растворливост што ќе се применува во лабораториите на единицата за квалитет треба да ја следи конзистентноста на производот од серија до серија и, секогаш кога е можно, следење на клучните биофармацевтски параметри или критичните атрибути за квалитет (*Critical Quality Attribute*, CQA) на формулација. Сепак, оваа цел често не е остварлива и останува значаен предизвик за фармацевтската формулација и аналитичкиот научник.

10.1. Теорија и значење на растворливоста како фармацевтско-технолошки параметар

Растворливоста е дефинирана како динамичен процес, со што одредена супстанција се пренесува од цврста во растворена состојба за единица време. Растворливоста на фармацевтскиот производ може да се опише во два чекори. Првенствено, молекулите на активната супстанција се ослободуваат од површината на формулацијата и патуваат до околниот медиум за растворливост. Се формира заситен слој, непосредно во близина на цврстата површина. Потоа, по пат на дифузија, активната супстанција се шири во најголемиот дел од медиумот од регион со висока кониска концентрација. Теоретскиот израз за објаснување на растворливоста е опишан со *Noyes-Whitney*, равенка 1 (Noyes и Whitney, 1897), што подоцна била адаптирана од повеќе автори: Nernst, Brunner, Underwood, но сè уште важи дека:

$$\frac{dw}{dt} = k(C_s - C) \quad [24]$$

Каде:

- w – масата на активна супстанција во растворот;
- C – концентрација на активна супстанција во растворот за време t ;
- C_s – концентрација на заситен раствор на солта (активна супстанција) при рамнотежна состојба.

Вредноста на константата на брзината на растворување k ($\text{cm} \times \text{sec}^{-1}$) се пресметува преку равенката:

$$k = D \times \frac{S}{h} \quad [25]$$

Каде:

- D – коефициент на дифузија на солта (обично изнесува $4^{-8} \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ (Seki, 2003));
- S – површина на растворена активна супстанција;
- h – дебелина на дифузниот слој.

Во зависност од големината на честичките, h може да варира. При sink услови, каде што $C < C_s$, равенката [24] се менува во:

$$\frac{dw}{dt} = kC_s \quad [26]$$

За да може фармацевтскиот производ да го даде потребното терапевтско дејство, активната супстанција мора да се ослободи од дозираната форма, да се апсорбира/стигне во системската циркулација и со неа да се транспортира до местото на делување. Целокупната ефикасност на овој процес е определен со биорасположливоста на активната супстанција и опфаќа два чекора: растворување и апсорпција или пермеабилност на активната супстанца. Растворувањето на активната

супстанција од цврста дозирана форма (на пример, таблета или капсула) е составено од најмалку два последователни чекори, и тоа: ослободување на солта/активната супстанција од формулацијата (на пример, по распаѓање на таблетата) и растворување на активната супстанција во течниот медиум (според равенка [26]). Па така, за да се постигне растворување на активната супстанција од дозираната форма, клучна улога имаат: кохезивните својства на формулацијата, физичко-хемиските својствата на активната супстанција, како и физиолошките состојби во гастроинтестиналниот тракт (ГИТ) што варираат во зависност од внесот на храна.

Табела 38. Физичко-хемиски својства и физиолошки состојби што можат да влијаат на растворливоста на активната супстанција во ГИТ (Scheubel, 2010)

Фактор	Физичко-хемиски својства	Физиолошки состојби
S – површина на производот	Големина на честички	Сурфактанти желудочен сок и жолчка
D – коефициент на дифузија	Молекулска тежина	Вискозност на мукозата во тенко црево
h – дебелина на дифузен слој		Подвижност и проток
C_s – растворливост	Хидрофилност, кристална структура	pH, пуферски капацитет, состав на храна, жолчка
Количина на растворена активна супстанција		Пермеабилност
Волумен на достапен растворувач		Секреција, истовремено употребени течности

Оттука, целта на испитувањето на растворливоста на фармацевтската дозирана форма е да се детектираат променливите што влијаат врз брзината на ослободување на активната супстанција и да се предвидат перформансите на фармацевтскиот производ (Lipinski et al., 1997). Променливи што може да влијаат врз брзината на растворување се:

- Карактеристиките на активната супстанција (на пример, големината на честички, кристална форма);
- Составот на фармацевтскиот производ (на пример, тип, удел и функционалност на ексципиентите);
- Производниот процес (на пример, сили за компресија, опрема);
- Надворешни фактори (на пример, температура, влага и светлина).

Накратко, разбирањето и контролата на механизмот на ослободување на активната супстанција од дозираната форма е клучен фактор во текот на развојот на фармацевтскиот производ. Кај конвенционалните формулации со брзо ослободување на активна супстанција, растворливоста зависи од својствата на самата активна супстанција, за разлика од производите со модифицирано ослободување на активна супстанција, каде растворливоста на активната супстанција главно зависи од формулацијата.

10.2. Развој на дискриминаторен метод за испитување на растворливоста кај фармацевтските производи

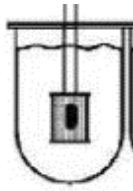
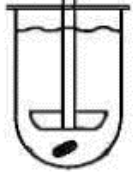
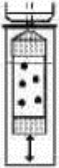
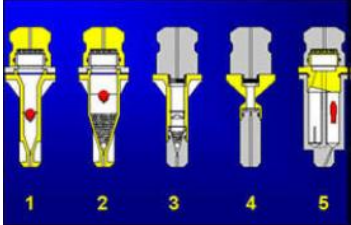
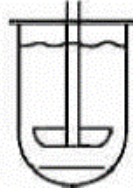
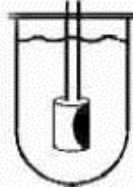
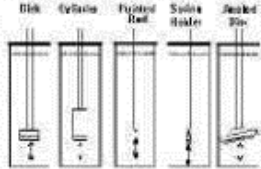
Дискриминаторната моќ на методот за испитување на растворливост зависи од можноста истиот да ги открие настанатите промени во фармацевтскиот производ. Идеално, треба да се развие тест за растворливост што ќе ги идентификува промените што можат да влијаат врз биофармацевтските перформанси на фармацевтскиот производ. Дискриминаторната способност на тестот за растворливост може да се покаже преку испитување на различни формулации каде е направена промена во

карактеристиките на активната супстанција (големина на честички, кристална форма), состав во формулацијата (тип/функционалност на ексципиенсите), промена во производниот процес и изложување на производот на надворешни фактори (температура/влага). Ако спроведените анализи покажат мерлива разлика за клучните променливи, тогаш методот може да се смета како дискриминаторен и способен да даде слика за квалитетот на фармацевтскиот производ. Откако ќе се развие дискриминаторен метод за растворливост, истиот треба да се користи за ослободување на сериите на производот на пазарот. Во фармакопеите достапни се повеќето од тестовите за испитување на растворливоста на фармацевтските производи со дефинирани карактеристики и услови, како што се: апарат, медиум, број на вртежи итн., но сепак е потребна нивна оптимизација и потврда за дискриминаторната моќ на тестот на растворливост за развиената конечна формулација на генеричкиот производ. Најчесто користени методи за испитување на растворливоста на цврсти дозирани форми со конвенционално ослободување на активна супстанција се методот со примена на корпа (апарат 1) и методот со примена на весло (апарат 2) на 50 до 100 вртежи во минута (USP <711>, PE 2.9). И методот со примена на корпа (апарат 1) и методот со примена на весло (апарат 2) можат да примат медиумски волумени кои се движат од 500 mL до 1000 mL со користење стандарден сад (Gray et al., 2009). Лекови со висока моќност, мала доза, примена на сад од 100 mL до 250 mL може да биде истражени, но истите не се компендијални.

USP апарат 3 (*reciprocating cylinder*, цилиндар со клип) и апарат 4 (*flow-through cell*, проток низ ќелија) се користат повеќе во процесот на развој на лекови и помалку во рутински анализи за тестирање. USP апарат 3 може да се користи за да се процени профилот на ослободување на лекот во гастроинтестиналниот тракт со користење низа различни медиуми во сатовите. USP апарат 4 нуди предности за надминување на состојба без постигнување на *sink conditions* во случај на соединенија со ниска растворливост и овозможува поставување ист метод за сите фази од производниот процес (API, мешање на ексципиенсите, па сè до финална форма на готовиот производ), што е од голема помош при развојот за робустен дизајн простор за работа (Dressman & Weitschies, 2012).

Тестовите за испитување на внатрешната растворливост, т.е. на чиста активна супстанција со дефинирана површина, традиционално се изведени со држач за ротирачки диск (USP <1087>), сличен на оној предложен од страна на Wood и соработниците. Сепак, USP апарат 4 се претпоставува дека има хидродинамички модел на проток што ги имитира оние што се наоѓаат *in vivo* подобро од методот на ротирачки диск и истиот може да биде од голема предност при барање на воспоставување на *In vitro In vivo* корелација. Растворливоста на чиста API со користење на USP апарат 4 се нарекува привидна растворливост (Ph. Eur. 2.9).

Табела 39. Типови апарати за изведба на тестот за растворливост (Scheibel, 2010)

<p>USP апарат 1 (корпа)</p>	
<p>USP апарат 2 (весло)</p>	
<p>USP апарат 3 (ротирачки цилиндар) – мека желатинска капсула и повеќекомпонентни единици кои не се распаѓаат</p>	
<p>USP апарат 4 (проток низ ќелија) – се препорачува за нерастворливи во вода или ретко растворливи во вода Ќелија за таблети и капсули (1-2) Ќелија за прашоци и гранули (3) Ќелија за импланти (4) Ќелија за супозитории и меки желатински капсули (5) (3, 4, 5 не се USP)</p>	
<p>USP апарат 5 (весло преку диск) – трансдермални фластери</p>	
<p>USP апарат 6 (ротирачки цилиндар) – трансдермални фластери</p>	
<p>USP апарат 7 (клипен држач) – трансдермални фластери</p>	

Методот на растворливост треба да даде значителна и исцрпна проценка за *in vitro* профилите на ослободување на активната супстанција од дозираната форма. Исто така, развојот на методот за испитување на растворливоста треба да биде во насока на добивање конзистентни и следливи резултати, бидејќи варијабилни резултати не може да дадат јасна слика за промените во формулацијата (*EMA Guideline on the Investigation of Bioequivalence*, 2010). Главни причини за добивање на варијабилни резултати се:

- Самата формулација (на пример, природата на активната супстанција, ексципиенсите или производниот процес);
- Тестот за растворливост (на пример, формирање на купа, лепење на таблетите за веслото или корпата).

При развојот на методот за растворливост една од целите е да се постигнат *sink* услови, што подразбира волумен на медиумот што е најмалку трипати поголем од потребниот волумен за добивање заситен раствор на активната супстанција. Кога *sink* условите се исполнети, поголема е веројатноста дека резултатите ќе ги рефлектираат карактеристиките на дозираната форма (cPh. Eur., Method 2.9.3). За определување на *sink* условите потребно е познавање за растворливоста на активната супстанција во зависност од pH вредноста. Основно е дека *sink* условите треба да бидат задоволени во медиум со pH вредност каде се очекува *in vivo* растворање и/или апсорпција на активната супстанција или, поинаку кажано, во специфицираниот медиум за испитување на растворливоста. Ако податоците од растворливоста на активната супстанција индицираат незадоволителни *sink* услови, се пристапува кон испитување на фармацевтскиот производ или на предлог-формулацијата. Доколку се констатира дека фармацевтскиот производ или предлог-формулацијата не ги задоволува *sink* условите, се прибегнува кон редизајн на тестот за растворливост. Најчесто фармакопејски пропишани волумени на медиум се од 500 mL до 1000 mL (900 mL е најчесто употребуваниот волумен). Обично волуменот на медиумот што се употребува за тестот на растворливост треба да ги одржи *sink* условите. Во некои случаи, со соодветно оправдување, волуменот може да се зголеми од 2 L до 4 L, во зависност од концентрацијата и *sink* условите на активната супстанција. За одредени дозирани форми може да е потребен мал волумен на медиум (на пример, од 100 mL до 200 mL). Во вакви случаи би можело да се користат нефармакопејски апарати (апарати со мали волумени), поткрепено со добро оправдување. Супстанцијата се смета за високо растворлива доколку највисоката поединечна доза администрирана како формулација со брзо ослободување комплетно се раствора во 250 mL пуфер во опсег од pH 1,0 до 6,8 на $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (British National Formulary, 2007). За таа цел, потребно е испитување во најмалку три пуфери од дадениот опсег (препорачливо 1,2; 4,5 и 6,8) и дополнително испитување во пуфер со $\text{pH} = \text{pK}_a$, доколку е во специфицираниот pH опсег. За да се постигне недвосмислена класификација на растворливоста, потребни се по неколку определувања на секоја pH вредност. Критериумите на прифатливост се наведени како препораки и може да се разликуваат за одредени производи (cPh. Eur., Method 5.17.1; USP <1092>).

Валидацијата треба да опфати два чекора, и тоа: валидирање на тестот за растворливост и валидирање на аналитичкиот метод за определување на количината на ослободената активна супстанција за време на тестот на растворливост. Валидацијата на аналитичкиот метод треба да опфати испитување на линеарност и опсег, специфичност, прецизност, точност, робусност и стабилност на стандарден и пробен раствор, со употреба на стандарден раствор или спајкувано плацебо (ICH Q2(R1), 1994). Валидација на тестот за растворливост треба да ги опфати прецизноста и робустноста на подготовката на пробниот раствор.

Спектрофотометриската анализа (UV/Vis) и течната хроматографија (HPLC) претставуваат аналитички методи од избор за определување на количината на ослободената активна супстанција за време на тестот за растворливост. Спектрофотометриската анализа дава побрзи резултати, анализата е поедноставна и потрошувачката на реагенси е помала, но специфичноста може да биде критична и мора да биде потврдена. HPLC анализата се преферира заради поголемата осетливост и селективност при евентуална интерференција на активната супстанција со ексципиенсите.

10.3. Биофармацевтски систем за класификација на производите (BCS)

За да биде ефикасна, активната супстанција на лекот мора да се ослободи од готовиот производ и да се апсорбира во системската циркулација за да може да се транспортира до местото на делување. Целокупната ефикасност на овој процес придонесува за биорасположливоста на супстанцијата на лекот и вклучува два чекори, растворање и апсорпција или пропустливост, како што е дефинирано во водичот на FDA во рамките на „Биофармацевтскиот систем за класификација на производите“ (BCS). BCS првпат бил опишан во 1995 година од Amidon, и неговите принципи се користени во неколку водичи на FDA. BCS е научна рамка за класификација на активните супстанции врз основа на нивната растворливост во вода и интестинална пропустливост. BCS зема предвид два главни фактори кои ја регулираат стапката и обемот на апсорпција на активната супстанција од цврстите орални дозирани форми со брзо ослободување: растворливоста и цревната пропустливост.

Соединенијата со ниска растворливост, врз основа на BCS класификацијата, се дефинираат како соединенија чија највисока терапевтската доза не е растворлива во 250 mL воден медиум од pH 1,2 до 7,5 на 37°C. Највисоката дозирана форма поделена со најниската растворливост во pH опсегот од 1,2 до 7,5 треба да биде помала од 250. Важно е да се забележи дека растворливоста е главно својство на API и неговата солена форма. Кинетичката растворливост обично се одредува со мерење на концентрацијата на заситен раствор по рамнотежа на 37°C, вообичаено од 1 час до 24 часа. Времето на рамнотежа зависи од времетраењето на тестот, како и од физичко-хемиската стабилност (на пример, *in vitro* конверзија на сол во слободна база) на лекот. Високата пропустливост се дефинира како човечка апсорпција на 90% или повеќе од администрираната доза. Брза растворливост се дефинира ако не е помалку од 85% ослободување (%) на API од дозираната форма во време од 30 минути на USP апарат 1 на 100 вртежи во минута или USP апарат 2 на 50 вртежи во минута во pH 1,2 (0,1 N HCl или симулирана гастрична течност без ензим), pH 4,5 пуфер и pH 6,8 пуфер (или симулирана интестинална течност). На страна од растворливоста на API, степенот на ослободување е во директна функција со распаѓањето на производот (порозноста, течењето на гранулите, карактеристиките на гранулите итн.). Сето ова дава една важна работа дека класичниот BCS концепт не го интегрира степенот на ослободување во својата филозофија.

Соединенијата со ниска растворливост и висока пропустливост се класифицирани како соединенија од класа II. Овие соединенија имаат зголемен потенцијал да покажат внатрешна апсорпција ограничена со растворливоста (степенот на растворливост на лекот е многу помала од степенот на апсорпција на лекот), но, секако, воспоставување на *In Vitro In Vivo* (IVIVC) корелацијата може да биде остварена. Соединенијата со ниска растворливост и ниска пропустливост се класифицирани како соединенија од класа IV и може да имаат ограничена апсорпција на растворливоста и пропустливоста. Соединенија со висока растворливост и висока пропустливост се класифицирани како соединенија од класа I, а соединенија со висока растворливост и ниска пропустливост се класифицирани како соединенија од класа III.

Класа 1	висока р-ливост	висока пропустливост	
Класа 2	ниска р-ливост	висока пропустливост	
Класа 3	висока р-ливост	ниска пропустливост	
Класа 4	ниска р-ливост	ниска пропустливост	

Слика 19. Биофармацевтски систем за класификација на производите (BCS) (Scheubel, 2010)

Карактеристиките на BCS системот (растворливост и пропустливост), заедно со ослободувањето на API од дозираната форма се главните фактори што ја регулираат брзината и степенот на апсорпција на лекот од дозираните форми.

10.4. Растворливост и квалитет базиран на дизајн (*Quality by Design, QbD*)

Традиционално, производните процеси се поставуваат рано во развојот со намера материјалот произведен од „фиксни“ процеси да биде еквивалентен по квалитет и тој квалитет се мери со тестирање на крајниот производ со исполнување на критериумите дадени во спецификацијата за готов производ. Испитувањата за растворливост потоа се користат за да се покаже дека новите серии имаат слични перформанси со референтните клучни клинички серии.

Целта на QbD е поефикасна употреба на најновата фармацевтска наука и принципите и знаењата на инженерството применети во текот на животниот циклус на производот. Ова има потенцијал да дозволи пофлексибилни регулаторни пристапи каде што, на пример, при одредени промени по одобрувањето на производот, без претходно сериско испитување на крајниот производ, тој може да се ослободи на пазар во реално време. Преку ова разбирање процесот и производот може да бидат дизајнирани да обезбедат квалитет и, на крај, испитувањата на производот да се сведат на минимум.

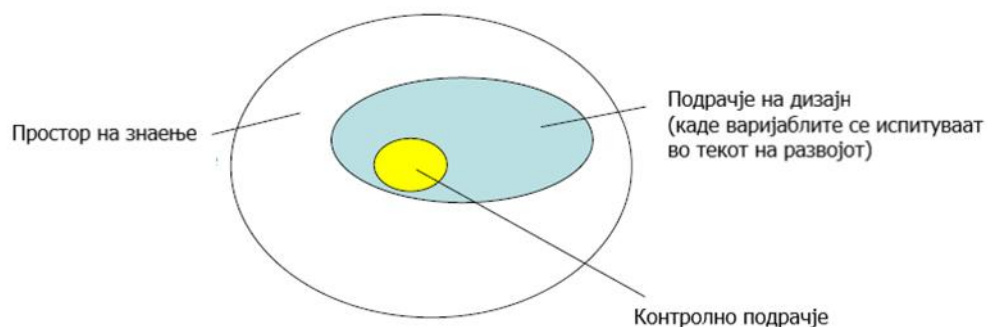
За време на фаза 3 од процесот на развој на лекот, QbD пристапите може да се користат за оптимизирање и финализирање на лек формулација и производствените процеси. Во споредба со конвенционалниот развоен приод, QbD првенствено е посветен на зголемување на механистичкото разбирање на формулацијата и неговите производни процеси, врската помеѓу атрибутите за квалитет на производот и, на крај, нивното влијание врз безбедноста и ефикасноста на производот. Кога е избран QbD пристапот, треба да биде дизајнирано робусно формулирање на производот и процесите на производство за да го постигнат посакуваниот перформанс на производот и, исто така, се однесуваат на посакуваните клинички перформанси. Кога перформансите на производот можат да бидат соодветно карактеризирани со *in vitro* тестот за растворливост (или сурогат), истиот може да биде моќна алатка. Тестот за растворливост тогаш помага во идентификацијата на критичните атрибути за квалитет и критичните параметри на процесот. Затоа употребата на QbD и IVIVC се додадена вредност и ќе придонесат за исполнување на спецификациите кои имаат значење при *in vivo* испитувањата.

FDA и EMA ги охрабруваат индустриите да користат QbD пристап во развојот на нивните лекови. Принципот е наведен во упатствата за ICH Q8 (*Pharmaceutical Development*), Q9 (*Quality Risk Management*) и Q10 (*Quality System*). Процесот е добро разбран кога сите критични (директно влијание) или клучни (индиректно влијание) извори на варијабилност се идентификувани и објаснети (т.н. „контролиран простор“). Варијабилноста е управувана од страна на дизајнирањето и следењето на процесот

(Rodríguez-Pérez, 2021). Атрибутите за квалитет на производот се прецизно и веродостојно предвидени со тестирање на екстремните комбинации (точки) на сите работни параметри за процес, опрема и капацитети (т.н. дизајн простор). Пред QbD пристапот, релевантното знаење за карактеристиките на API, помошните супстанции и процесните операции беа собрани во таканаречениот простор на знаење. Во пракса, QbD се состои од следниве елементи:

- Дефинирање на целен квалитетен профил на производот (*Quality target product profile*, QTPP);
- Дизајнирање и развој на производни процеси за да се задоволи целниот квалитетен профил на производниот профил (*Design space*, дизајн простор);
- Идентификување и контролирање на критичните атрибути за квалитет на сировините, параметрите на процесот и изворите на варијабилност (CQA);
- Следење и приспособување на процесите за да генерираат постојан квалитет на производот во текот на животниот циклус (*Control strategy*, стратегија за контрола) (ICH Q8(R2), 2009).

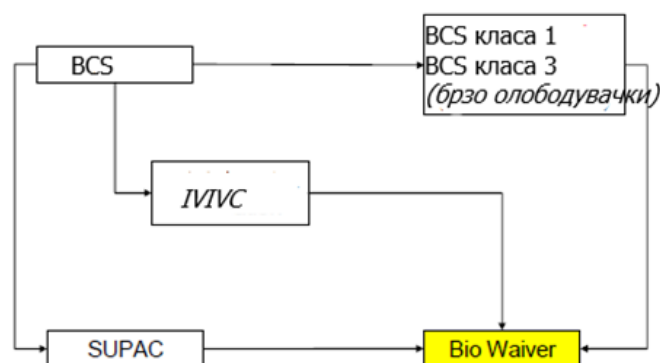
Според QbD системот, фармацевтскиот квалитет се обезбедува со разбирање и контролирање на варијаблите што влегуваат во формулацијата и производството, додека тестирањето на крајниот производ, вклучително и *in vitro* растворливоста, го потврдува квалитетот на производот. Во контекст на растворливоста, QbD подразбира воспоставување односи меѓу својствата на сировината (како што е големината на честичките), променливите на формулацијата (удел на ексципиенсите, стареење), параметри на процесот (како што се силата на компресија и времето на мешање). Овој напор ќе овозможи дефинирање на простор за изведба на дизајнот на експериментите. Ефикасното спроведување на QbD бара испитување на биорелевантен тест на растворливост за време на развојот на производот. Во QbD системот, атрибутите на производот, како што се големината на честичките или полиморфните форми се следат преку тест за растворливост и се контролираат преку проектирање и контрола на производниот процес (*control space*, контролен простор). Иако QbD не мора директно да се поврзува со клиничката стратегија, темелното разбирање на својствата на производот преку QbD овозможува да се избере тест за растворливост што може да обезбеди *in vivo-in vitro* врска за ослободувањето на лекот.



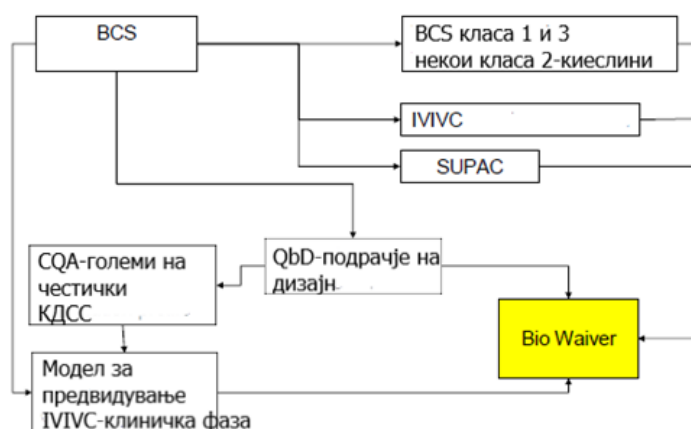
Слика 20. QbD меѓузависности (Scheubel, 2010)

Така, под QbD развојот за тестот на растворливост треба главно да се има фокус на неговата клиничка важност. QbD е систематски пристап за развој на производи и контрола на процесот што започнува со однапред дефинирани цели, го нагласува разбирањето на производот и процесот и поставува контрола на процесот врз основа на здрава наука и управување со квалитетот базиран на ризик. QbD се заснова на примената на мултиваријантни статистички методи и статистички дизајн на експерименти (*Design of Experiments*, DoE) за определување на подрачјето за дизајн на процесот и развој на производот, како и на двете, аналитичките методи и фармацевтските формулации. Соодветните контроли на процесите во фармацевтската

индустрија и производството бараат да се задоволат тековните барања на FDA, како што е PAT (*Process Analytical Technology*). PAT се состои од дизајнирање, анализа и контрола на процесите од мерење на критичните процесни параметри и атрибути за квалитет. Сепак, PAT иницијативата е само една тема во рамките на пошироката иницијатива на FDA за „Фармацевтска cGMPs на 21 век – Пристап базиран на ризик“. Ако перформансите на производот се во рамките на дизајнираниот простор, испитувањето на растворливоста можеби нема да биде потребно како рутински тест за спецификација на готов производ или може да се замени со други сурогат тестирања (на пример, NIR). Дополнителна цел на процесот на разбирање е спроведувањето на *biowaiver*. Со комбинирање на информациите споменати во претходните поглавја, QbD пристапот, поврзан со BCS и IVIVC, овозможува еден нов проактивен и перспективен приод за спроведувањето на *biowaiver*.



Слика 21. Тековната стратегија за *biowaiver* базирана на BCS и IVIVC (Scheubel, 2010)



Слика 22. Потенцијал за *biowaiver* врз основа на QbD, IVIVC, BCS и SUPAC (Scheubel, 2010)

И покрај многуте потенцијални придобивки, индустријата не брза да го прифати QbD пристапот. Уште не е јасно колкава флексибилност ќе понудат регулаторните тела, особено затоа што тие јасно ни ја претставија патеката и научната дискусија за поднесувањето на досието за регистрација, во кое на високо ниво треба да бидат содржани елементите опишани во Q8, Q9 и Q10 водичите (ICH Q9, 2005; ICH Q10, 2008; ICH Q8(R2), 2009). Покрај тоа, поднесување на досието за регистрација, базирано на QbD пристапот, бара значително ниво на споделување податоци (иако, во реалноста, податоците мора да бидат достапни за преглед, дури и за традиционално поднесување). Конечно, QbD пристапот бара значителна инвестиција од аспект на време и напор за координирање на информациите во почетокот на фазата на развојот. QbD е процес кој се развива. QbD бара да размислуваме на поинаков начин од парадигмата валидација на 3 серии, и, од раниот стадиум на развој на тестот за

растворливост, па сè до лансирање на производот на пазар, останува главен метод во овој пристап (FDA/CDER, 2004).

10.5. Примена на конвенционални и мултиваријантни статистички методи за евалуација на *in vitro* профили на растворливост

Постојат повеќе причини за споредба на *in vitro* профилите на растворливост, како на пример: да се направи проценка на растворливост на кандидат-формулацијата за време на развој на фармацевтскиот производ или предформулацијата; да се процени влијанието на промените што може да се јават во текот на животниот циклус на производот и да се покаже сличност на биофармацевтските *in vitro* перформанси помеѓу испитуваните производи. Во литературата предложени се различни статистички методи за споредба на профилите на растворливост од Chow и Ki (1997), Sathe, Tsong и Shah (1996), Tsong, Hammerstrom, Sathe и Shah (1996, 1997), Polli, Rekhi, Augsburg и Shah (1997) и O'Hara, Dunne, Kinahan, Cunningham, Stark и Devane (1996). Методите што се користат за споредување на податоците од *in vitro* профилите на растворливост може да се категоризираат како:

- Методи за анализа на податоците – графички и табеларно;
- Математички методи – што обично користат еден број за да се опише разликата/сличноста помеѓу профилите на растворливост;
- Статистички методи – при споредба на профилите на растворливост, за пресметка ја земаат предвид варијабилноста помеѓу податоците, како и нивната корелација (Yuksel et al., 2000).

10.5.1. Математички модел – независни методи

Факторот на различност f_1 (равенка [27]) е мерка за релативната грешка помеѓу двете криви на растворливост, додека факторот на сличност f_2 (равенка [28]) е мерка за сличноста помеѓу две криви на растворливост, т.е. процент на ослободена активна супстанција од две различни формулации, каде што R_t и T_t се процентите на ослободена активна супстанција од референтниот и испитуваниот производ, соодветно во временската точка t и n е бројот на земените мостри за анализа.

$$f_1 = \left[\frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right] \times 100 \quad [27]$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad [28]$$

Ако профилите на растворливост се сметаат за „слични“, f_1 треба да биде блиску до 0, а f_2 треба да биде блиску до 100. Водичите сугерираат дека два профила можат да се сметаат за слични ако f_1 е помал од 15 (0-15) и f_2 е поголем од 50 (50-100), што е еквивалентно на просечна разлика од 10% во сите временски точки на земање мостри. Кога се користи f_1 методот за да се процени разликата помеѓу формулациите, при промена на испитуваниот и референтниот производ ќе се промени f_1 факторот, но сепак разликите помеѓу двата профили остануваат исти. За да се избегне овој проблем, предложена е изменета формула на следниов начин:

$$f_1' = \left[\frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\frac{\sum_{t=1}^n (R_t + T_t)}{2}} \right] \times 100 \quad [29]$$

Во равенката [29], именителот претставува збир на средните вредности добиени за ослободената активна супстанција од двата производа во секоја временска точка, наместо само на референтниот производ. Бидејќи f_1 претставува мерка за целокупната релативна грешка, а не на индивидуалната релативна грешка во секој временски момент, просекот на индивидуалните релативни грешки, f_3 , е предложен како друго

алтернативно мерење за проценка на разликата помеѓу двата профила на растворливост:

$$f_3 = \left(\frac{1}{n}\right) \left[\sum_{t=1}^n \frac{|R_t - T_t|}{R_t}\right] \times 100 \quad [30]$$

Сепак, факторот f_3 сè уште бара понатамошно проучување пред негово општо прифаќање како мерка за сличност.

Факторот на сличност f_2 е чувствителен на бројот на временските точки, особено откако ќе се постигне плато на кривата на ослободување на активна супстанција (> 85%) (Shah et al., 1998), односно ако се изберат поголем број временски точки за земање примерок за анализа, тогаш вкупната просечна разлика ќе биде мала, а f_2 ќе има тенденција да биде поголема од 50, што ќе резултира во утврдување на сличност, иако двата профила би можеле да бидат многу различни. Факторот f_2 е предложен за проценка на степенот на сличност помеѓу две криви на растворливост, но не е соодветен кога просечната разлика во која било временска точка е поголема од 15% помеѓу две серии. Исто така, кога варијацијата во рамките на една серија е повеќе од 15%, тогаш сличноста може да се пресмета со употреба на модел-зависни методи или алтернативни модел-независни методи, како на пример, преку статистичка мултиваријантна споредба на параметрите што го карактеризираат обликот на кривата на растворливост. За пресметка на f_1 и f_2 факторите, FDA регулативата дава јасна насока да се користи средната добиена вредности на процентите на ослободена активна супстанција од испитуваниот производ vs. референтниот производ, но сепак може да се проценат и преку индивидуалните вредности за растворливост во единица време од испитуваниот производ vs. референтниот производ. Пријавено е дека добиените вредностите за f_1 и f_2 не биле статистички различни кога се пресметувале преку средните или индивидуалните податоци за растворливост. Но, други истражувања покажале дека разликата помеѓу две формулации била помала кога за пресметка се користеле средните наместо индивидуалните податоци за растворливост во секоја временска точка. Со цел да се пресметаат односите на добиениот процент на растворливост (PD), површините под кривите (AUC), како и средните времиња на растворливост (MDT) во секоја временска точка помеѓу испитуваниот и референтниот производ се користи *Ratio* методологијата како модел-независен метод:

$$R(PD)_{T/R,t} = \frac{\langle F_T \rangle_t}{\langle F_R \rangle_t} \quad [31]$$

Воедно, методот е проследен со дополнителна проценка на неговата стандардна грешка (SE), како и пресметка на 90% интервал на доверливост (CI):

$$SE_{R(PD)} = \frac{\langle F_T \rangle_t}{\langle F_R \rangle_t} \times \sqrt{\left(\frac{SE_{T,t}}{\langle F_T \rangle_t}\right)^2 + \left(\frac{SE_{R,t}}{\langle F_R \rangle_t}\right)^2} \quad [32]$$

$$CI = \frac{\langle F_T \rangle_t}{\langle F_R \rangle_t} \pm t_{(0,1,n_R+n_T-2)} \times SE_{R(PD)} \quad [33]$$

Каде:

- $SE_{T,t}$ и $SE_{R,t}$ – стандардни грешки на испитуваниот и референтниот производ, соодветно, во временска точка t ;
- n_T и n_R – го означуваат бројот на податоци за испитуваниот и референтниот производ, соодветно;
- $t_{(0,1,n_R+n_T-2)}$ – вредност на t -променливата со $(n_R + n_T)^{-2}$ степени на слобода и 90% CI.

Тестовите на сооднос (*Ratio*) се особено значајни и често користени во случаи кога најголемиот дел од активната супстанција се ослободува за релативно краток

временски период. Споредбата на *in vitro* профилите на растворливост со пресметка на AUC и MDT *Ratio* тестовите како прв чекор бараат пресметка на површините под кривите и средните времиња на растворливост во секоја временска точка. Од друга страна, употребата на PD *Ratio* тестот се претпочита во однос на претходните два *Ratio* теста, поради неговата едноставност во толкувањето на добиениот резултат од соодносот на процентите на растворливост. Добиената вредност од приближно 1,0 за соодносот на процентите на растворливост пресметан при 90% CI може да укаже на „сличност“ на профилите на растворливост.

10.5.2. Статистички модел – независен метод, мултиваријантен регион на доверба

За споредба на профилите на растворливост во случаи кога варијацијата во рамките на една серија е поголема од 15%, регулативата дава насоки да се употреби методот на мултиваријантниот регион на доверба, што во својата природа претставува модел-независен метод (CHMP, 2010). Според овој пристап, два профили на растворливост се сметаат за слични кога разликата помеѓу профилите на испитуваниот и референтниот производ е помала или еднаква на максималната очекувана разлика (D_{M_max}) помеѓу кои било две серии од одобриениот производ. Максималната очекувана разлика уште е наречена „граница на сличност“ или „граница на толеранција“. Границите на сличност наместо на емпириска основа (каде просечната разлика изнесува 10% или 15%), може да се постават и врз основа на природата на самиот производ. Бидејќи постапката е конструирана за да се утврди дали разликата помеѓу два производа е поголема од границата на толеранција, може да се смета како модификација и генерализација на тестот што се користи при изведба на студијата за BE (García-Arieta & Gordon, 2012). Мултиваријантниот регион на доверба се класифицира како:

- 90% CI-базиран метод на разлики – за пресметка на разликата на добиените вредности за растворливост во една временска точка;
- Мултиваријантен статистички метод базиран на растојание – за пресметка на сличност на профилите на растворливост во повеќе временски точки.

10.5.2.1. 90% CI-базиран метод на разлики

За фармацевтски производи со брзо ослободување на активната супстанција од формулацијата доволно е да се одбере една временска точка при проценка на карактеристиките на производот во однос на растворливоста. Затоа, со помош на едноставен *t*-тест лесно може да се определи дали разликата од средните вредности на растворливост помеѓу испитуваниот и референтниот производ е значително различна од нула. Меѓутоа, кога целта е да се види дали разликата помеѓу двата производи е поголема од границата на толеранција (на пример, 10%), неопходно е да се определи интервалот на доверба на вистинската разлика и да се спореди горната граница на интервалот на доверба со максималната толеранција. Добиената средна вредност на растворливост за секој производ претставува независна променлива, додека разликата помеѓу двете независни променливи претставува единечна проценка. Оттука, 90% CI може да се пресмета како:

$$90\%CI = Diff_{T-R} \pm t_{(0,1,n_R+n_T-2)} \times SE_{Diff} \quad [34]$$

$$Diff_{T-R} = \bar{X}_T - \bar{X}_R \quad [35]$$

$$SE_{Diff} = \sqrt{\frac{SD_T^2 \times (n_T - 1) + SD_R^2 \times (n_R - 1)}{n_T + n_R - 2}} \times \sqrt{\frac{1}{n_T} + \frac{1}{n_R}} \quad [36]$$

Каде:

- n_T и n_R – број на примероци за испитуваниот и референтниот производ, соодветно;

- $t_{(0,1,n_R+n_T-2)}$ – t -вредност со $(n_R + n_T)^{-2}$ степени на слобода и 90% CI;
- SE_{Diff} – стандардна грешка за разликата;
- SD_T и SD_R – стандардни девијации за испитуваниот и референтниот производ, соодветно;
- \bar{X}_T и \bar{X}_R – средни вредности на растворливост (%) за испитуваниот и референтниот производ, соодветно.

Споредуваните профили можат да се сметаат за слични ако горната граница на 90% CI е помала од одредената максимална толеранција.

10.5.2.2. Мултиваријантен статистички метод базиран на растојание

Кога во рамките на една серија варијацијата е поголема од 15%, водичите препорачуваат употреба на мултиваријантен метод за да се процени сличноста помеѓу двата производа. Ова може да се направи со употреба на следните чекори:

- Воспоставување граница на прифатливост за определување на „сличноста“ во однос на мултиваријантна статистичка оддалеченост (MSD), заснована на разликите во растворливоста од различни серии на референтниот производ;
- Пресметка на MSD помеѓу средните вредности на растворливост на испитуваниот и референтниот производ;
- Проценка на 90% CI од вистинскиот определен MSD, како што е утврдено во претходниот чекор;
- Споредба на горната граница на 90% CI со граница на прифатливост за „сличноста“ утврдена во првиот чекор. Испитуваниот производ е сличен со референтниот ако горната граница на 90% CI е помала или еднаква на границата на прифатливост за „сличноста“.

Определувањето на MSD не е експлицитно наведено во водичите, поради што покомлексно е да се користи овој метод отколку f_2 методот. Сепак, во пракса, постапката предложена од страна на Tsong и соработниците може да се смета за добро прифатен метод. Според овој метод, мултиваријантното статистичко растојание, наречено *Mehanobis* растојание, што се користи за мерење на разликата помеѓу две мултиваријантни средини, се пресметува како:

$$D_M = \sqrt{(X_T - X_R)' S_{pooled}^{-1} (X_T - X_R)} \quad [37]$$

Каде:

- $S_{pooled} = \frac{S_T + S_R}{2}$ – претставува збирна матрица од варијанца-коваријанца на анализираните примероци од двата производа;
- X_T и X_R – претставуваат вектори на средните вредности од анализираните примероци на профилот на растворливост на испитуваниот и референтниот производ, соодветно;
- S_T и S_R – претставуваат матрици од варијанца-коваријанца од профилот на растворливост на испитуваниот и референтниот производ, соодветно.

Со цел да се воспостави граница на прифатливост за одредување на „сличноста“ во однос на MSD, се предлага да се користи следнава равенка:

$$D_{M_max} = \sqrt{[D_g]' S_{pooled}^{-1} [D_g]} \quad [38]$$

Каде:

- $[D_g]$ – претставува $1 \times p$ вектор што има емпириски дефинирана граница на прифатливост од 15% за максимална дозволена разлика во секоја временска точка;

- p – вкупен број точки на земање на примероците.

Со претпоставка дека податоците имаат нормална дистрибуција, 90%-ниот регион на доверба (CR) за вистинската разлика помеѓу средните вредности на векторите $\mu_T - \mu_R$ може да се пресмета преку резултантниот вектор за да ја задоволи следната состојба:

$$CR = \{K \times [\mu - (X_T - X_R)]' S_{pooled}^{-1} [\mu - (X_T - X_R)] \leq F_{(p, n_T + n_R - p - 1, 0.9)}\} \quad [39]$$

Каде:

- K – фактор на скалирање ($K = \frac{n_T \times n_R}{n_T + n_R} \times \frac{n_T + n_R - p - 1}{(n_T + n_R - 2) \times p}$);
- $F_{(p, n_T + n_R - p - 1, 0.9)}$ – 90% од F -дистрибуцијата со p степени на слобода и $n_T + n_R - p - 1$.

Очигледно е дека $n_T + n_R$ мора да биде поголемо од $p + 1$. Оттука, 90% CR на D_M , (D_M^L , D_M^U) може лесно да се пресмета. Сличност може да се констатира ако D_M^U е помал или еднаков од лимитот за D_{M_max} .

Предноста на мултиваријантниот метод предложен од Tsong и соработниците е во тоа што се зема предвид варијабилноста и структурната корелација на податоците при определување на разликата помеѓу средните вредности од двата сета податоци за растворливост. Исто така, може да се смета како модификација и аналог на концептот што се поставува при споредба на податоците добиени од изведената студија на БЕ на доброволци. Како и да е, треба да се внимава на проблемите при користење на горенаведениот мултиваријантен метод:

- Спроведувањето може да биде релативно тешко, бидејќи при проценка на растојанието *Mahalanobis* неопходно е да се пресмета матрицата варијанца-коваријанца, како и нејзината инверзна форма;
- Постои можност методот да не даде доволно информации бидејќи растојанието *Mahalanobis* не ја зема предвид природата на разликата помеѓу двете криви на растворливост. Со други зборови, доколку средните вредности на профилите на растворливост имаат големи разлики во раните временски точки и мали разлики во подоцнежните временски интервали, може да дадат исто *Mahalanobis* растојание, како и при споредба на профилите кои во раните временски точки имаат мали разлики, но големи разлики во подоцнежните временски точки. Овој недостаток е идентичен на еден од недостатоците на f_2 методот. Овие два метода не се чувствителни на формата на кривите на растворливост и не можат да ги земат предвид нееднаквите растојанија помеѓу последователните временски точки на земање на примероците;
- Пресметката на 90% CI на MSD е под претпоставка дека податоците за растворливост се нормално распределени и дека двата сета податоци имаат иста структура за варијанца-коваријанца матрицата. Но, кога податоците не се нормално распоредени, еден од начините за негова пресметка е да се користат логаритамски (*log*)-нормално трансформирани податоци за растворливоста. Меѓутоа, ако податоците не се ниту нормални, ниту *log*-нормално распоредени, за пресметка на 90% CI на MSD треба да се употребат непараметарски методи со претходно докажана робустност.

10.5.3. Математички модел – зависни методи

Квантитативната анализа на податоците добиени од тестовите за растворливост имаат подлабока суштина кога се користат математички равенки што ги објаснуваат добиените резултати од ослободената активна супстанција како функција од некои карактеристики на фармацевтскиот производ. Во некои случаи овие математички модели се изведени од теоретски анализи на процесот, како, на пример, процеси што

следат кинетика од нулти ред. Меѓутоа, теоретскиот концепт повеќе не постои бидејќи користењето на емпириските равенки се покажа како несоодветно. Полиморфната форма, големината на честичките и растворливоста на активната супстанција може да влијаат на кинетиката на ослободување на активната супстанција. Податоците добиени од тестот на брзина на растворување, најчесто (но не секогаш) се опишуваат со следните математички модели:

– **Кинетика од нулти ред**

$$Q_t = Q_o + K_o t \quad [40]$$

Каде:

- Q_t – претставува ослободена количина за единица време t ;
- Q_o – претставува почетната количина на активната супстанција во растворот (вообичаено, $Q_o = 0$);
- K_o – претставува константа на брзината на ослободување од нулти ред.

Според овој модел, лекот се елиминира од организмот во константна количина во единица време (ослободената фракција на активната супстанција од дозираната форма наспроти времето е линеарно). Равенката [39] може да се користи за да се опише ослободувањето на активната супстанција од фармацевтската дозирана форма со модифицирано ослободување, трансдермални системи, како и за матрикс таблети со ниска растворливост на активната супстанција.

– **Кинетика од прв ред**

$$\ln Q_t = \ln Q_o + K_1 t \quad [41]$$

Каде:

- Q_t – претставува ослободена количина за единица време t ;
- Q_o – претставува почетната количина на активната супстанција во растворот;
- K_1 – претставува константа на ослободување од прв ред.

Модел-зависниот пристап, покрај тоа што се користи за да го опише профилот на растворливост, се применува и со цел да се процени сличноста помеѓу профилите на растворливост на параметарски начин. Во литературата се предложени неколку математички модели за да се споредат профилите на растворливост. Методот што е развиен од Sathe и соработниците и прифатен од FDA, предлага неколку постапки што треба да се спроведат при проценка на сличноста помеѓу два производа:

- I. Определување модел што најсоодветно ќе го опише профилот на растворливост на референтниот фармацевтски производ;
- II. Постапување податоци за растворливост на сите поединечни примероци од референтниот производ;
- III. Дефинирање на „граница на сличност“ преку определување на MSD базирана на варијацијата на параметрите од моделот што ја опишува растворливоста на одобрени референтни серии;
- IV. Спарување на добиените поединечни податоци за растворливоста од испитуваниот и референтниот производ со најсоодветно избраниот модел утврден во чекор (I) и проценка на параметрите што го карактеризираат моделот;
- V. Пресметка на MSD помеѓу испитуваниот и референтниот производ со користење на параметрите од моделот;
- VI. Проценка на 90% CI на вистинскиот MSD, како што е утврдено во чекор (V);
- VII. Споредбата на горната граница на добиеното 90% CI со „границата на сличност“ што е утврдена во чекор (III). Хипотезата за сличност помеѓу два производи може да се прифати доколку горната граница на 90% CI помала или еднаква на утврдената „граница на сличност“.

Од горенаведените чекори може да се види дека концептот на модел-зависниот пристап е делумно сличен со мултиваријантниот метод опишан во претходниот дел. Тоа

е заради тоа што и двата метода ја мерат разликата помеѓу две групи податоци во однос на MSD. Разликата е во тоа што мултиваријантниот пристап го пресметува MSD врз основа на оригинално добиените податоци за растворливоста на производот, а, од друга страна, модел-зависниот пристап ја пресметува MSD врз основа на добиените параметри на употребениот модел. За разлика од математичките модел-независни методи каде што се бара употреба на ист сет временски точки при земање на примероците за анализа за двата производи, математичките модел-зависни методи можат да содржат неидентични временски точки за земање мостри за анализа. Ова може да се смета како мала предност при примена на математичките модел-зависни методи. Опишувајќи ги профилите на растворливост како функција од неколку параметри на избраниот модел, модел-зависниот пристап може да ја поедностави анализата и толкувањето на податоците преку споредба на спарените параметри од методот за двата производи. Сепак, некои прашања остануваат нејасни, како на пример:

- I. Како да се избере најсоодветен модел? Ова претставува главен проблем и ја ограничува примената на овој пристап. Во литературата не е јасно опишано како да се избере модел за спарување на добиените податоци за растворливост. Во практична смисла најчесто користени се: емпириските модели (на пример, *Logistic*, *Probit* и *Weibull* моделите) и механичките модели (на пример, *Higuchi*, *Korsmeyer-Peppas* и *Hixson-Crowell* моделите). Иако се изработени неколку статистички показатели за проценка на степенот на доверба на избраниот модел, сепак не постои јасен критериум за избор на соодветен модел. Најчесто користени критериуми за избор на модел се: прилагодениот коефициент на детерминација ($R^2_{adjusted}$), критериумот за информации-*Akaike* (AIC) или критериумот за избор на модел (MSC).

$$R^2_{adjusted} = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)}(1 - R^2) \quad [42]$$

Каде:

- n – број на податоци од профилот на растворливост ($\frac{M}{t}$);
- p – број на параметри што се споредуваат во избраниот модел;
- R^2 – коефициент на детерминација.

Најдобар избран модел ќе биде оној со најголема вредност за $R^2_{adjusted}$.

$$AIC = 1 \times \ln(WSSR) + 2 \times p \quad [43]$$

Каде:

- n – број на податоци од профилот на растворливост ($\frac{M}{t}$);
- p – број на параметри што се споредуваат во избраниот модел;
- $WSSR$ – збир од квадратите на резидуите.

Најдобар избран модел ќе биде оној со најмала вредност за AIC .

- II. Бидејќи профилите на растворливост за двата производи никогаш не се идентични, избраниот модел може да биде погоден за референтниот производ, но не одговара добро на податоците од испитуваниот производ. Иако ниту еден модел не може емпириски да биде соодветен за сите типови профили на растворливост, сепак *Weibull* моделот се смета за подобар од другите модели во опишувањето на кривата на растворливост.

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad [44]$$

- III. Споредбата на спарените параметри што ја опишува избраниот модел е клучен чекор во проценката на сличноста. Сепак, во FDA водичите не е експлицитно наведено како да се споредат параметрите на моделот; се предлага само

пресметување на MSD на параметрите на моделот помеѓу сериите на испитуваниот производ и референтниот производ. Меѓутоа, во пракса исто така се користат неколку други методи за споредба на профилите на растворливост, како што е едноставна описна споредба со *t*-тест, ANOVA и *Ratio* тестот.

- IV. Еден мал недостаток на модел-зависниот пристап е тоа што е невозможно да се визуелизира регионот на доверба кога во равенката на моделот има повеќе од три параметри. Кога се користи еден, два или три-параметарски модел, регионот на доверба може соодветно да се визуелизира, како линеарен сегмент, елиптичен регион или како елипсовиден простор.

Табела 40. Модели, критериум за избор на модел и методи кои се користат како алтернатива на параметарските модели (Zhang, Y. et al, 2010)

Модел	Критериум за избор на модел	Методи како алтернатива на параметарските модели
Probit, Logistic, Weibull, Quadratic, Exponential	RMS*, AIC	Мултиваријантен регион на доверба базиран на <i>Mahalanobis</i> растојание
Модел со најмногу три параметри (на пример, Linear, Quadratic, Logistic, Probit, Weibull)	Нема прецизирано	Мултиваријантен регион на доверба
Zero-order, First-order, Hixson-Crowell, Higuchi, Quadratic, Weibull, Gompertz, Logistic	MSC	Ratio тест
Exponential, Probit, Gompertz, Logistic, Weibull	RMS	Мултиваријантен регион на доверба
Weibull, Logistic, Gompertz	Нема прецизирано	95% CI интервал на доверливост
First-order, Hixson-Crowell, Higuchi, Weibull, Logistic	$R^2_{adjusted}$, RMS	<i>t</i> -тест
Zero-order, First-order, Hixson-Crowell, Weibull, Higuchi, Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas	$R^2_{adjusted}$	Дескриптивна споредба
Zero-order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, First-order, Hixson-Crowell, Weibull, Logistic	AIC	<i>t</i> -тест
Zero-order, First-order, Hixson-Crowell, Weibull	$R^2_{adjusted}$, RMS	ANOVA
Zero-order, First-order, Higuchi, Weibull	$R^2_{adjusted}$	Дескриптивна споредба
Zero-order, First-order, Hixson-Crowell, Weibull, Logistic	$R^2_{adjusted}$, RMS	Мултиваријантен регион на доверба
First-order, Gompertz, Logistic, Second-order, Weibull	$R^2_{adjusted}$, MSC	Мултиваријантен регион на доверба базиран на Hotelling's T^2

*RMS – residual mean square

Воспоставените комбинирани и мултиваријантни статистички методи се брзи, достапни и со јасни критериуми на прифатливост при испитување на сличноста на *in*

vitro профилите на растворливост на генеричките во однос на референтните производи и во нашите случаи придонесоа за намалување на трошоците и времето за добивање одобрение за ставање на лекот во промет (Taylor & Cihon, 2004; Saranadasa & Krishnamoorthy, 2005). Ваквиот пристап овозможува да се избегнат предизвиците при оценките за сличноста на *in vitro* профилите на растворливост во случаи кога со примена на конвенционалните *f* фактори може да се утврди дека два производи *in vitro* не се слични, а всушност истите да бидат *in vivo* биоеквивалентни.

Иако поставената цел е постигната, како што се покажа низ овие истражувања, потребни се понатамошни напори и продлабочување на знаењето за правилен избор и толкување на резултатите добиени од мултиваријантните статистички анализи за споредба на *in vitro* профилите на растворливост (Taylor & Cihon, 2004; Saranadasa & Krishnamoorthy, 2005). Тенденција на новите регулаторни директиви е да наметнат вклучување на математички и статистички методи, како научен пристап за толкување на резултатите од *in vitro* профилите на растворливост на цврстите дозирани форми. Ќе биде од голема вредност ако академијата, индустријата и регулаторните органи работат во оваа насока, имајќи предвид дека мултиваријантните статистички методи упатуваат кон подобро предвидување на *in vivo* перформансите на испитуваната формулација и воспоставување *in vitro-in vivo* (IVIVC) корелација.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Ahuja, S. (1998). *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*. New York: Marcel Dekker.
- Ahuja, S. (2000). *Chromatography and separation science*. New York: Oxford University Press.
- Ahuja, S. (2000). *Handbook of Bioseparations*. New York: Academic Press.
- Ahuja, S., & Alsante, K. M. (2003). *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals* (1st ed., Vol. 5). Academic Press.
- Ahuja, S., & Dong, M. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* (1st ed., Vol. 6). Elsevier.
- Anderson, S., & Hauck, W. W. (1983). A new procedure for testing equivalence in comparative bioavailability and other clinical trials. *Communications in Statistics - Theory and Methods*, 12(23), 2663-2692.
- Baselt, R. (2008). *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man* (8th ed.). Foster City: Biomedical Publications.
- British National Formulary; Royal Pharmaceutical Society's (RPS) knowledge business. (2007). *British National Formulary* (Vol. 54). London: BMJ Publishing Group Ltd.; RPS Publishing.
- Bunn, G. P. (2019). *Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals* (7th ed.). CRC Press.
- Carstensen, J. T. (1993). *Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms*. Lancaster: Technomic.
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2010, January 20). *EMA Guideline on the Investigation of Bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98)*. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2020, June 25). *EMA Assessment Report for Nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products (EMA/H/A-5(3)/1490)*. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/opinion-any-scientific-matter/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)/Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). (2014, March 21). *EMA Guideline on stability testing for applications for variations to a marketing authorisation (EMA/CHMP/CVMP/QWP/441071/2011)*. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-stability-testing-applications-variations-marketing-authorisation-revision-2_en.pdf
- Crowther, J. B. (1998). International method transfers. *Eastern Analytical Symposium and Exposition*.
- Crowther, J. B., Jimidar, M. I., Niemeijer, N., & Salomons, P. (2000). Qualification of laboratory instrumentation, validation, and transfer of analytical methods. In *Analytical Chemistry in a GMP Environment: A Practical Guide* (pp. 453-456). New York: Wiley.
- Davit, B., Braddy, A. C., Conner, D. P., & Yu, L. X. (2013). International guidelines for bioequivalence of systemically available orally administered generic drug products: a survey of similarities and differences. *AAPS J.*, 15(4), 974-990.
- Dressman, J., & Weitschies, W. (2012). Foreword for the Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics special issue: Recent innovations in dissolution testing. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 64, 909-910.
- Ermer, J. (1998). The use of hyphenated LC-MS technique for characterisation of impurity profiles during drug development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(4-5), 707-714.
- European Medicines Agency (EMA). (2006, July 7). *Guideline on dossier requirements for Type IA and IB notifications*. Retrieved from http://www.it-asso.com/gxp/eudralex_v27/contents/vol-2/c/var_type_1a1b_guideline_06-2006.pdf

- European Pharmacopoeia Commission. (2023). 5.10: Control of Impurities in Substances for Pharmaceutical Use. In *European Pharmacopoeia* (11th ed.). Strasbourg: Council of Europe.
- Floyd, C. D., Leblanc, C., & Whittaker, M. (1999). Combinatorial chemistry as a tool for drug discovery. *Prog. Med. Chem.*, 36, 91-168.
- García-Arieta, A., & Gordon, J. (2012). Bioequivalence requirements in the European Union: critical discussion. *AAPS J.*, 14(4), 738-748.
- Gergov, M., Ojanperä, I., & Vuori, E. (2003). Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 795(1), 41-53.
- Gilpin, R. K., & Pachla, L. A. (2001). Pharmaceuticals and related drugs. *Anal. Chem.*, 73, 2805-2816.
- Gordon, K., & Balasubramanian, S. (1999). Recent advances in solid-phase chemical methodologies. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 2(4), 342-349.
- Görög, S. (Ed.). (2000). *Identification and Determination of Impurities in Drugs* (1st ed., Vol. 4). Amsterdam: Elsevier.
- Gray, V., Kelly, G., Xia, M., Butler, C., Thomas, S., & Mayock, S. (2009). The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. *Pharm. Res.*, 26(6), 1289-1302.
- Hokanson, G. C. (1994). A life cycle approach to validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part I: The initial validation process. *Pharm. Technol.*, 18, 118-130.
- Hokanson, G. C. (1994). A life cycle approach to validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part II: Changes and the need for additional validation. *Pharm. Technol.*, 18, 92-100.
- Housepain, P. K. (1996). Bulk Drug Substances and Finished Products. In *Development and Validation of Analytical Methods* (1st ed.). New York: Elsevier.
- Huynh-Ba, K. (Ed.). (2009). *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices*. Springer Science & Business Media, LLC.
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (1994, October 27). *Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (1996, November 6). *Q1B: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products*. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1B%20Guideline.pdf>
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2000, November 10). *Q7: Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients*. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q7%20Guideline.pdf>
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2003, February 6). *Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products*. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf>
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2003, February 6). *Q1E: Evaluation for Stability Data*. Retrieved from https://database.ich.org/sites/default/files/Q1E_Guideline.pdf
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2005, November 9). *Q9: Quality Risk Management*. Retrieved from https://database.ich.org/sites/default/files/Q9_Guideline.pdf
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2006, October 26). *Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances*. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf>
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2006, June 2). *Q3B(R2): Impurities in New Drug Products*. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf>

- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2009, August). Q8(R2): *Pharmaceutical Development*. Retrieved from https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2023, April 3). *M7: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk*. Retrieved from https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf
- ICH of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2008). *Q10: Pharmaceutical Quality System*. Geneva: ICH. Retrieved from <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- Johnson, J. D., & Van Buskirk, G. E. (1988). Analytical method validation. *J. Validation Technol.*, 2, 88-105.
- Kar, A. (2021). *Pharmaceutical Drug Analysis*. New Age International.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1-3), 3-25.
- Manfred, H., Herbert, M., & Bernd, Z. (2008). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry* (2nd ed.). Thieme Chemistry.
- McGonigle, E. (1996). Assay Validation and Inter-Laboratory Transfer. In *Development and Validation of Analytical Methods* (1st ed.). New York: Elsevier.
- Meier, P. C., & Zünd, R. E. (1993). *Statistical Methods in Analytical Chemistry* (1st ed.). New York: Wiley-Interscience.
- Ngwa, G. (2010). Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. *Drug Delivery Technology*, 10(5).
- Nogare, S. D., & Juvet, R. S. (1962). *Gas-Liquid Chromatography: Theory and Practice*. New York: Wiley-Interscience.
- Pedersen-Bjergaard, S., Gammelgaard, B., & Halvorsen, T. G. (2019). *Introduction to Pharmaceutical Analytical Chemistry* (2nd ed.). Wiley.
- Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA). (2000, September 20). Analytical Research and Development Workshop.
- Rodríguez-Pérez, J. (2021). *Quality Culture in the Pharmaceutical Industry: Implementing a Behavior-based Quality and Compliance Culture*. Business Excellence Consulting.
- Rosenstock, J. (1998). *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* (Vol. 25). New York: Academic Press.
- Saranadasa, H., & Krishnamoorthy, K. (2005). A multivariate test for similarity of two dissolution profiles. *J. Biopharm. Stat.*, 15(2), 265-278.
- Sathe, P., Tsong, Y., & Shah, V. (1997). In vitro dissolution profile comparison and IVIVR. In *In vitro-In vivo Correlations* (Vol. 423, pp. 31-42). New York: Plenum Press.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J., & Crouch, S. R. (2022). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (10th ed.). Cengage Learning.
- Smyth, W. F. (2005). Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 824(1-2), 1-20.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development* (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Suto, M. J. (1999). Developments in solution-phase combinatorial chemistry. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 2(4), 377-384.
- Szepesi, G., & Nyiredy, S. (1996). *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. New York: Marcel Dekker.
- Taylor, J. K., & Cihon, C. (2004). *Statistical Techniques for Data Analysis* (2nd ed.). New York: Chapman & Hall/CRC.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA)/Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (1995, November). *SUPAC-IR: Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-*

- Up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation*. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/supac-ir-immediate-release-solid-oral-dosage-forms-scale-and-post-approval-changes-chemistry>
- U.S. Food and Drug Administration (FDA)/Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (1997, October). *SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Dissolution Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation*. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/supac-mr-modified-release-solid-oral-dosage-forms-scale-and-postapproval-changes-chemistry>
- U.S. Food and Drug Administration (FDA)/Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (1997, May). *SUPAC-SS: Nonsterile Semisolid Dosage Forms; Scale-Up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation*. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/supac-ss-nonsterile-semisolid-dosage-forms-scale-and-post-approval-changes-chemistry-manufacturing>
- U.S. Food and Drug Administration (FDA)/Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (2004, October). *PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/pat-framework-innovative-pharmaceutical-development-manufacturing-and-quality-assurance>
- Vial, J., Jardy, A., Anger, P., Brun, A., & Menet, J.-M. (1998). Methodology for transfer of liquid chromatography methods based on statistical considerations. *Journal of Chromatography A*, 815(2), 173-182.
- Watson, D. G. (2020). *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists* (5th ed.). Elsevier.
- Wells, J. I. (1988). Pharmaceutical Preformulation. In *Physicochemical Properties of Drug Substances* (pp. 209-214). Chinchester: Ellis Horwood Limited.
- World Health Organization (WHO). (2007, February). *Annex 6: WHO Guidance on variations to a prequalified product dossier*.
- Yuksel, N., Kanik, A. E., & Baykara, T. (2000). Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independents methods. *Int. J. Pharm.*, 209(1-2), 57-67.

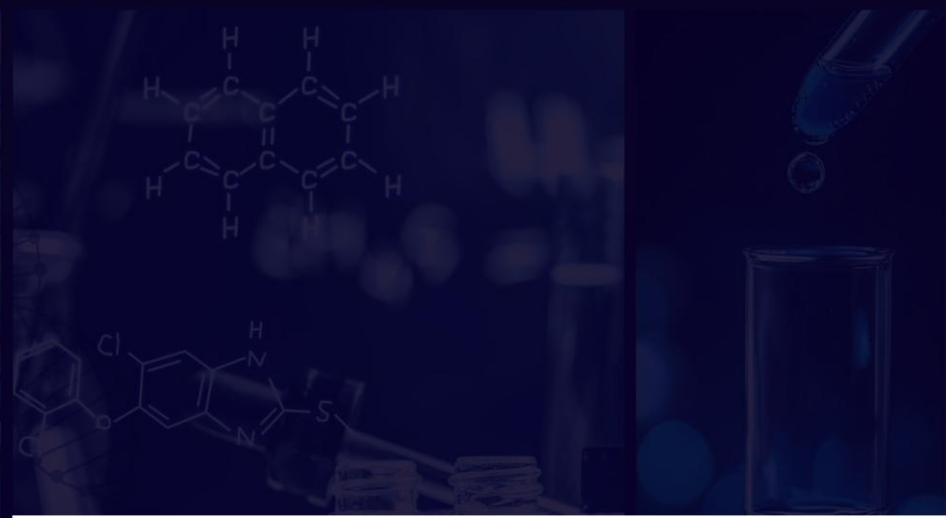
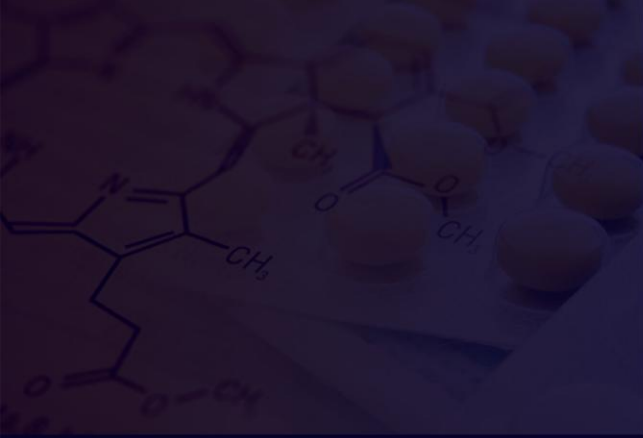
БИОГРАФСКИ ПОДАТОЦИ

Доц. д-р Ивана Митревска е родена на 21.7.1984 година во Скопје. Основното и средното образование ги завршила во родниот град. Своите додипломски студии ги завршила на Фармацевтскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, стекнувајќи се со академското звање магистер по фармација. Во 2008 година го положила стручниот испит пред Испитната комисија на Фармацевтската комора на Македонија, а во 2013 година пред Испитната комисија на Фармацевтскиот факултет полагала специјалистички испит по специјалноста Испитување и контрола на лекови и се стекнала со звање специјалист по испитување и контрола на лекови. Докторирала во 2020 година, со одбрана на докторската дисертација со наслов „Споредба на *in vitro* профили на растворливост со примена на конвенционални и мултиваријантни статистички методи“, стекнувајќи се со титулата доктор на фармацевтски науки.

Почнувајќи од јули 2007 година, доц. д-р Ивана Митревска е вработена во „Алкалоид“ АД Скопје, најпрво како аналитичар во Профитен центар Контрола на квалитет – фармација, а потоа и како истражувач во Одделот за аналитички развој, истражување и развој. Од декември 2011 година е на работно место помлад истражувач во Одделот за аналитички развој, истражување и развој при „Алкалоид“ АД Скопје, а од јануари 2018 година работи како постар/специјалист истражувач во одделот Технички операции, истражување и развој, истовремено раководејќи со тимот за следење на стабилноста на нови производи и производи во животен циклус. Во 2023 година е назначена за раководител на Одделот за стабилност при Институтот за истражување и развој, а од 2024 година станала и носител на дозвола за пуштање на серија лек во промет во рамките на Обезбедување на квалитет како клучно, квалификувано лице. Во овој период работи и како раководител на Одделот за ослободување на серија лек цефалоспорински *in house* производи.

Во текот на својот професионален и стручен развој, доц. д-р Ивана Митревска финализирала повеќе обуки и едукации во нејзината област, како и одредени апликативни тренинзи. Како резултат на нејзината досегашна научно-истражувачка работа, објавила повеќе научни трудови и истите ги презентирала на домашни и меѓународни конференции.

Член е и на Фармацевтската комора на Република Северна Македонија.



ISBN: 978-608-277-143-4