

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Biologicky aktivní látky – analýza (V)
Stabilitní studie léčiv a léčivých přípravků

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2006

Iva Votrubová

Děkuji PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za odborné vedení,
připomínky a cenné rady, které mi poskytl při zpracování mé
diplomové práce.

OBSAH

1. Úvod.....	2
2. Cíl práce	3
3. Stabilita léčiv a léčivých přípravků	4
4. Definice stability	7
5. Historický vývoj stabilitních studií.....	11
6. Regulační předpisy	14
6.1. Seznam pokynů ICH týkajících se kvality léčivých látek a léčivých přípravků:.....	20
7. Lékopisy	23
8. Základní postupy při zkoušení stability léčivých přípravků	33
9. Typy stabilitních testů.....	35
9.2. Stresové testy (zátěžové testy; stress testing)	35
9.3. Zrychlené testy (accelerated stability tests).....	37
9.4. Dlouhodobé testy (long-term stability studies)	40
9.5. Následné stabilitní zkoušky (on-going stability studies).....	43
10. Analytické metody využívané při testech stability	45
11. Validace analytických metod	51
12. Závěr	53
13. Použitá literatura	54

1. ÚVOD

Hlavním cílem farmaceutických věd je zabezpečit kvalitní, bezpečné a účinné léčivé přípravky. S těmito charakteristikami úzce souvisí stabilita léčiva, protože pouze stabilní přípravek může splnit všechny tyto požadavky. Stabilita léčiv je velmi aktuální oblast zkoumání, protože degradační procesy mohou ve výsledku způsobit ztrátu účinnosti léčiv a také nežádoucí účinky.

Stabilita neboli stálost léčiva a léčivého přípravku se vztahuje na jeho odolnost vůči různým chemickým, fyzikálním a mikrobiologickým vlivům, které mohou měnit původní vlastnosti v čase výroby, transportu, skladování a používání.

Testuje se stabilitními studii, což je soubor testů, které mají obsáhnout všechny změny v kvalitě testovaného produktu. Účelem je stanovit podmínky skladování a uchovávání, vhodný obalový materiál a dobu použitelnosti přípravku.¹

Studii stability se zabývají jak farmaceutická technologie tak farmaceutická kontrola, které využívají ještě další obory např. chemickou kinetiku (ta se zabývá rychlostí rozkladných reakcí, vysvětluje jejich mechanismus a studuje faktory ovlivňující jejich rychlost jako je teplota, pH prostředí, intenzita záření, přítomnost kyslíku a vlhkost), statistiku...²

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je shrnout problematiku stability léčiv a léčivých přípravků, jak z historického hlediska, tak i ze současného pohledu. Práce shrnuje nejnovější postupy a doporučení z oblasti stabilitních studií, které vychází především ze směrnic ICH (International Conference on Harmonisation) a jsou doplněny dalšími zahraničními i domácími publikacemi. Budou probrány jednotlivé typy stabilitních testů včetně nejčastěji užívaných analytických metody a jejich validace.

3. STABILITA LÉČIV A LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ

Pojem stability ve farmacii se vztahuje jednak na léčiva a jednak na léčivý přípravek. V obou případech se provádějí testy stability a zjišťují se změny v kvalitě léčiva v důsledku různých vlivů, v případě léčivého přípravku se sleduje především kvalita lékové formy.

Požadavek na stálost se vztahuje i na všechny části obalu a na signaturu.

V magistraliter přípravě se počítá se spotřebou léčivého přípravku v krátké době a problémem je tady hlavně stabilita surovin a pomocných látek a inkompatibility.³

Léčivý přípravek jako disperzní systém má v důsledku fyzikálních a chemických vlastností jeho jednotlivých složek omezenou stálost. Na dosažení požadované účinnosti je potřebné míru stálosti optimalizovat. Dále léčivý přípravek přichází do přímého kontaktu s biologickým prostředím organismu, a proto je důležité zajistit jeho bezpečnost. Atributy stability léčivého přípravku jsou dané nejenom fyzikální, chemickou, ale i biologickou stálostí léčivého přípravku a zachovanou mikrobiologickou čistotou na požadované úrovni. Všechny tyto formy stálosti léčivého přípravku se musí potvrdit v testech stability.²

Studie stability jsou součástí vývoje nového léku (s novou účinnou látkou). Za nové léčivo se považuje i léčivý přípravek, u něhož došlo ke změně ve složení léčivých i pomocných látek nebo ke změně v obalu, který přichází do styku s léčivem.

Účelem stabilitních zkoušek je prokázat, jak se mění kvalita látky nebo přípravku s časem vlivem různých faktorů jako je teplota, vlhkost a světlo, doporučit podmínky uchovávání a stanovit dobu použitelnosti pro léčivou látku, která je vyjádřena údajem o reatestaci („re-test period“,

„re-test date“), a dobu použitelnosti pro konečný přípravek („shelf-life“), která je vyznačená na obalu léčiva jako datum použitelnosti („expiry/expiration date“)⁴

Faktory ovlivňující stabilitu léčiv a léčivých přípravků můžeme rozdělit na vnitřní a vnější. Vnitřní faktory souvisí s fyzikálními a chemickými vlastnostmi léčivých a pomocných látek, nečistot (degradační produkty, rezidua rozpouštědel apod.) a primárního obalu. Důležitý je i obsah vlhkosti v lékové formě. Mezi vnější faktory počítáme vliv teploty, světla, kyslíku, oxidu uhličitého, vlhkosti prostředí, mikroorganismů, které mohou výrazně ovlivnit stabilitu léku. Roli může hrát i způsob technologického zpracování konečné lékové formy.²

Důsledkem nedostatečné stability léčivého přípravku může být např.: ztráta aktivity, zvýšení koncentrace léčivé látky (dochází k tomu při ztrátě nosiče léčivé látky, např. gel s lidokainem – dochází k odpaření nosiče lidokainu, tím se zvýší koncentrace volného léčiva), změna biologické dostupnosti, ztráta mikrobiologické nezávadnosti, zvýšení obsahu toxických rozkladných produktů nebo změna vzhledu lékové formy, ztráta integrity systému.⁵

Testy stability se v systému vývoje léčivého přípravku uplatňují v těchto oblastech : (v našich podmínkách se týká se především vývoje generik)

1. *Fáze vývoje léčivého přípravku :* využívají se zrychlené testy stability pro porovnávání alternativního složení, obalu a způsobu výroby. Po výběru konečného složení přípravku a způsobu výroby můžou zrychlené stabilitní testy sloužit k předpovědi času použitelnosti a podmínek uchování. Současně

se zakládají dlouhodobé testy stability za reálných podmínek pro ověření skutečného času použitelnosti.

2. *Registrační dokumentace (upravuje Vyhláška MZ a M zem. č. 288/2004 Sb.)*⁶ : kompetentní autority vyžadují předložení kompletní dokumentace z testů stability konečného složení lékové formy, s konkrétní dávkou léčiva, v konečném obalu a celkovém balení. Jsou použity výsledky zrychlených a dlouhodobých testů stability doplněné o známé informace o stabilitě léčiva a podobných léčivých přípravků.

3. *Post-registrační fáze (postmarketingové hodnocení)*: výrobce je povinen předběžnými zkouškami stability v čase běžné výroby (on-going real-time stability studies) ověřit datum expirace a podmínky uchovávání léku. V registrační dokumentaci se navržený čas použitelnosti těmito studii stability musí potvrdit.

4. *Soustavná kontrola kvality* : zrychlenými nebo dlouhodobými testy stability je potřebné ověřit každou změnu, ke které dojde v průběhu výroby léku a které ovlivňuje jeho stabilitu (změna složení, technologického postupu, balení apod.). Průběžné testy stability mohou sloužit k monitorování trvalé stability a kvality vyráběného léku po jeho uvedení na trh.⁷

4. DEFINICE STABILITY

Při studiu literatury byly nalezeny následující definice stability léčiv. Jsou srovnány chronologicky a je na nich vidět, jak se obsah pojmu vyvíjel.

Československá farmacie, M. Melichar (1963) :⁸

Přípravek se považuje za stálý, pokud vytváří jako celek jednotu všech jakostních ukazatelů, které přicházejí do úvahy.

Technológia galeník a liekov, M. Melichar (1973):⁹

Změny v léku, především rychlost a míra, kterými se tyto změny odehrávají, charakterizujeme pojmem stabilita. Pod stabilitou léčivých přípravků a léků se rozumí časový úsek od zhotovení přípravku do doby, kdy ještě léčivý přípravek a lék splňují požadavky stanovené lékopisem, případně jinou normou, anebo dokud se účinnost nesníží o určitou přípustnou hodnotu (obvykle 5-10%).

Farmaceutický obzor, Knapp, Ch.(1983) ¹⁰:

Stálost je konstantní obsah léčivé látky a nezměněný stav lékové formy v obale určeném pro skladování anebo použití za určitých podmínek skladování na určité období.

Kvantitativně se stabilita vyjadřuje jako čas použitelnosti, tj. čas relativní neměnnosti, v kterém nenastávají zjištěitelné změny chemických, fyzikálních, fyzikálně-chemických a farmakodynamických vlastností.

U této definice můžeme pozorovat viditelný posun v pojmech, především definování času použitelnosti.

Liekové formy, Chalabala (1985):¹¹

Stabilita je stav relativní neměnnosti léčivého přípravku nebo léku v určitém delším časovém úseku. Opakem stability je nestabilita (instabilita, nestálost), což je změna složek LP nebo léku, která nastává v průběhu jeho skladování, za jistý čas po přípravě.

Vymezení pojmu stálost a faktory, které ji ovlivňují:

Stabilní (stálé) je, co se stárnutím (skladováním) nemění.

Jakákoliv změna je projevem nestálosti. Protože nic není absolutně stálé, nejsou absolutně stálé ani LP.

Definice dle ČsL 4 (1987):¹²

Stabilita je vlastnost léčiva zachovávat si v příslušných mezích po určitou dobu a za určitých podmínek uchovávání stejné jakostní znaky, které léčivo mělo v době výroby.

Tato definice byla převzata i do vyhlášky č 411/2004 Sb. MZ ČR „O správné výrobní praxi“¹³

Podle ČSN 86 2002 Stabilita léčiv (účinnost od 1.4.1995) ¹⁴:

Vlastnost léčiva splnit na určité časové období kvalitativní požadavky kladené na něj technickou normou nebo lékopisem, pokud je v tomto období vystavená působení soustavy vlivů. Stabilita léčivé, případně pomocné látky závisí na jejich nevratných chemických, fyzikálních a mikrobiologických změnách.

Definice je tady rozšířena na všechny léčiva a předpokládá se vymezení podmínek, pro které nález o stabilitě platí. Jednotlivé změny jsou zde podrobněji rozebrány.

Podle Vyhlášky MZ ČR 284/1990 o „Správné výrobní praxi“:¹⁵

Stabilitou se rozumí vlastnost výchozí látky, meziprojektu nebo hotového výrobku zachovat si v přípustných mezích po určité době a za určených podmínek uchování stejných jakostních znaků, které měla výchozí látka, meziprojekt nebo hotový výrobek v době výroby.

Tato vyhláška byla zrušena vyhláškou 317/2000 Sb.

Podle WHO Guideline (1997):

Stabilita je schopnost léčivého přípravku zachovávat si chemické, fyzikální, mikrobiologické a biofarmaceutické vlastnosti ve stanovených rozmezech po celou dobu použitelnosti.

Technologie léků, Chalabala M. (2001):¹⁶

Stabilita léčiva a léku je vlastnost zachovat si ve stanovených mezích po určité době a za stanovených podmínek uchování určité jakostní znaky. Mírou stability je doba použitelnosti.

Podle ICH Guideline (2003)¹⁷:

Záměrem stabilitních zkoušek je poskytnout údaje o tom, jak se kvalita léčivé látky nebo léku mění s časem pod vlivem různých činitelů prostředí jako je teplota, vlhkost a světlo. Umožňují stanovit interval

ověřovací zkoušky léčiva, dobu použitelnosti a doporučit vhodné skladovací podmínky.

Podle REG-83 – Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci (2005):

Léčivá látka je považována za stabilní, jestliže vyhovuje specifikaci za podmínek uchovávání 25 °C/60 % RV po dobu 2 let a za podmínek uchovávání 40 °C/75 % RV po dobu 6 měsíců.

5. HISTORICKÝ VÝVOJ STABILITNÍCH STUDIÍ

Stabilitní studie byly vyvinuty k monitorování stability farmaceutické lékové formy jak během výzkumné fáze vývoje léčivého přípravku, tak i k jejímu sledování po uvedení přípravku na trh.¹⁸

Studie stability byly po dlouhá léta značně nejednotné a založené pouze na empirii, protože příprava léčiv byla převážně soustředěna v lékárnách s omezenými možnostmi. Protože znalosti z oblasti dějů probíhajících při skladování léčiv a léčivých přípravků byly velmi omezené, jednalo se pouze o sledování organolepticky zjistitelných změn, které byly způsobeny rozmnožením mikroorganismů nebo fyzikálními změnami a od nich se potom odvozovaly doby použitelnosti jednotlivých léčivých přípravků. Přesto lze pozorovat snahu zachovávat původní stálost léčiva a léčivého přípravku, vyhnout se možným inkompatibilitám a nevhodnému skladování.¹⁹

Značným pokrokem ve studiích stability byla až aplikace Arrheniova vztahu, který použili v roce 1950 Higuchi a Busse pro výpočet teploty a času sterilizace u roztoků citlivých na teplotu. Využili tedy jako jedni z prvních poznatky z chemické kinetiky ke sledování stupně hydrolyzy prokainu v roztoku během sterilizace. Zde bylo hlavním problémem nalézt takovou teplotu, která by byla optimální k ireversibilní denaturaci životně důležitých enzymů a proteinů v mikroorganismech a zároveň aby nenarušila stabilitu přípravku. Výsledky udávají například, že pro roztoky obsahující prokain je vhodnější sterilizace v autoklávu při 120°C než delší sterilizace při 100°C a že tato metoda je použitelná pro téměř všechny termicky labilní přípravky.²⁰

Až do padesátých let dvacátého století se údaje o stálosti nových léčiv a léčivých přípravků získávaly prakticky jen na základě dlouhodobých skladovacích testů.

Od poloviny 20.století se stále častěji začínají objevovat studie snažící se o kvantitativní předpověď stálosti léčiv. V roce 1948 v časopise *Drug and Cosmetic Industry* vyšel článek, který se zabýval rozkladem vitamínu A při různých teplotách. Výsledkem bylo, že rozklad vitamínu A při teplotě 42°C po období pěti týdnů odpovídá rozkladu stejného množství vitamínu A po období 2 roků při teplotě místnosti.²¹

V roce 1954 popsal R.H.Blythe využití zrychlených testů při zvýšených teplotách.²²

Další studie využívaly Arrheniův vztah pro předpověď rychlosti rozkladu léčiv při skladovací teplotě, byla to např. práce S.M.Freea publikována v časopise *Pharm. Mfg. Assoc.*²³ v roce 1955 a studie E. R. Garretta a R. F. Carpera z let 1955-1962^{24, 25, 26, 27}, které jsou založené na principech reakční kinetiky. Jejich metoda zrychleného stabilitního testu byla založena na stanovení rychlostních konstant rozkladu při zvýšených teplotách a předpověď stálosti na extrapolaci rychlostní konstanty na skladovací teplotu. První z těchto prací byla zaměřena na hodnocení barevné stability barveného materiálu při skladovací teplotě. Ve studii byl použit přípravek Citrasulfas®, což byl tekutý multikomponentní přípravek derivátů sulfanilamidu. Díky této studii byla barevná intenzita přípravku skladovaného po několik let určena během měsíce.

Postupně přibývaly další práce věnované studiu zrychlených testů stability a studie kinetiky chemické degradace léčiv. Základní údaje a literární odkazy ke stabilitě léčiv jsou uvedeny ve vícesvazkovém díle *Analytical Profiles of Drug Substance*, vydávaném od začátku sedmdesátých let K. Floreyem.²⁸

Většina farmaceutických prací byla ze začátku zaměřená na studium stability léčiv v roztocích nebo v tekutých lékových formách. Protože se obecně předpokládala mnohem vyšší stabilita léčiv v tuhých lékových formách, byla jen malá část prací věnována tomuto tématu. Překážkou mohla být i složitost kinetiky degradace léčiva v tuhé fázi. Problematiky stability léčiv v tuhé fázi se dotkl např. E. R. Garrett v článku publikovaném v roce 1962.²⁹ Až s rozvojem poznatků v oblasti biologie, genetiky, imunologie a biotechnologií v sedmdesátých letech se začíná objevovat mnohem větší počet prací zaměřených na stabilitu léčiv v tuhé fázi a to i biotechnologických přípravků.

6. REGULAČNÍ PŘEDPISY

V Československu jako první reguloval oblast farmacie **Zákon č. 271/1949 Sb.** o výrobě a distribuci léčiv. Zrušil do té doby platný zákon z 18.12 1906 č.5 ř. z r. 1907, kterým se upravovalo lékárenství, a ustanovení XVI. kapitoly zák.čl. XIV/1976, o uspořádání veřejného zdravotnictví. Účelem Z. 271/1949 bylo zajistit právo lidu na ochranu zdraví a úspěšnou léčebnou péči hodnotnými léčivy, řídila se jím výroba, dovoz, vývoz a distribuce léčiv plánem, který tvořil součást celostátního hospodářského plánu.³⁰ Byl zrušen a nahrazen **Zákonem č. 20/1966 Sb.** o péči o zdraví lidu. Stanovuje povinnost výrobců, odběratelů výrobků, zásobovacích orgánů a lékáren zajistit soustavnou kontrolu jakosti, označení, složení, dávkování a úpravu léčiv a zdravotnických prostředků podle zvláštních předpisů.³¹ Tyto předpisy obsahoval Československý lékopis a jeho Doplnky, Oborové normy (ON) a Československé státní normy (ČSN).

V roce 1969 vyšla **vyhláška** Ministerstva zdravotnictví ČSR č. **81/1969 Sb.**, o registraci hromadně vyráběných léčivých přípravků, regulující postup registrace léčivých přípravků.³²

Od roku 1976 byl podle Věstníku MZ ČSR (Směrnice o klinickém zkoušení léčiv) požadován Farmaceutický posudek vydávaný Státním ústavem pro kontrolu léčiv, jehož součástí byly i výsledky zkoušek stability. Tento doklad bylo nutné přiložit k žádosti o povolení klinického zkoušení.

V roce 1972 byla vydána norma **ČSN 86 2002 Stability léčiv**, obsahující základní ustanovení pro zkoušení a hodnocení stability a 2. vydání **ON 86 2000 Hromadně vyráběné léčivé přípravky**.

V roce 1987 vyšla novelizovaná **Vyhláška č. 43/1987 Sb.** Zák. část MZ. ČSR, o registraci hromadně vyráběných léčivých přípravků a úhradě nákladů s tím spojených, která kromě jiného jako součást registrační dokumentace požadovala i stanovení doby použitelnosti (expirace) přípravku doloženou studií o jeho stabilitě. Mimo to jsou výsledky stabilitních studií součástí předepsané dokumentace k povolení k výrobě.³³

Po roce 1989 probíhala restrukturalizace zdravotnictví a bylo nutno přijmout takové zásady, které by byly kompatibilní s předpisy EU.

Vyhláškou 284/1990 MZ ČR³⁴ se přijímají do čs. právního řádu *zásady správné výrobní praxe* ve výrobě a řízení jakosti léčiv. Zásady správné výrobní praxe zpracovala v roce 1974 SPOFA a vyhláška je uvedla v přepracovaném znění. Přináší definici stability a požaduje test stability dle ČSN 86 2002 popsány ve výrobní dokumentaci. Jsou zde zahrnuty základní požadavky WHO³⁵ a Konvence o vzájemném uznávání inspekce ve farmaceutické výrobě (PIC)³⁶, ale není ještě zcela kompatibilní s evropskými předpisy.

Později byla tato vyhláška nahrazena **Vyhláškou 296/2000 Sb.** a novelizovanou **Vyhláškou 411/2004 Sb.**, kterou se stanoví správná výrobní praxe, správná distribuční praxe a bližší podmínky povolování výroby a distribuce léčiv, včetně medikovaných krmiv a veterinárních autogenních vakcín, změn vydaných povolení, jakož i bližší podmínky vydávání povolení k činnosti kontrolních laboratoří. Tato vyhláška je již zcela v souladu s Evropskými předpisy.

V roce 1992 bylo vydáno úplné znění zákona 20/1966 o péči o zdraví lidu se všemi změnami a doplňky (210/1990; 425/1990; 548/1991) – úplné znění **zákon 86/1992 Sb.**

Zákon 142/1991 (novela 632/1992) Sb. o československých technických normách zrušil platnost Oborových norem a závaznost ČSN.

V roce 1993 se přistoupilo k novelizaci **ČSN 86 2002 Stabilita léčiv** v souladu s požadavky pokynů ICH, WHO³⁷, pravidly EU (The rules Governing Medicinal Products in the European Community, Volume III)³⁸ a návrhem „Guideline on Stability Tests of Established Active Ingredient and Finished Products“. Tato norma se stala základním požadavkem Státního ústavu pro kontrolu léčiv na stabilitní studie pro léčivé přípravky. Je zde vymezen způsob jak obecně provádět stabilitní zkoušky, jsou dány způsoby hodnocení, teplotní režimy a intervaly pro hodnocení. Rovněž je předepsán způsob prezentování výsledků a vymezeny požadavky na zkrácené stabilitní zkoušky, prováděné za účelem předběžného určení doby použitelnosti. Podle této normy léčivo vyhovuje stabilitní zkoušce, jestliže splňuje požadavky uvedené v tabulce 1. V mezinárodních pokynech nejsou uváděny zkoušky na světle, v ČSN je tato možnost naznačena.³⁹

Tabulka 1¹⁷

Znaky jakosti	Požadavky na stabilitu
Fyzikální	Původní fyz. vlastnosti včetně vzhledu zůstávají zachovány ve stn. mezích.
Chemické	Množství LL, PL a případných rozkladných produktů ve stanovených mezích.
Biologické	Biologická účinnost se nemění, nebo její míra zůstává ve stanovených mezích, nedochází ke zvýšení toxicity a jiných negativních biologických jevů.
Mikrobiologické	Zachována požadovaná mikrobiologická čistota.

V roce 1991 zpracoval SÚKL **Standardní požadavky na registrační dokumentaci** platné od roku 1992, které vycházely z požadavku na registrační dokumentaci EU. Byly nahrazeny v roce

1995 novými požadavky na registrační dokumentaci (Věstník SÚKL 4/1995). V průběhu registračního řízení se na základě příslušných podkladů prověřuje kvalita, bezpečnost a účinnost léčivého přípravku. Součástí registrační dokumentace musí být zpráva o výsledcích stabilitních studií a čas použitelnosti, navržený na jejich základě.

SÚKL spolupracuje s Evropskou lékovou agenturou (EMA), která poskytuje nové nebo aktualizované dokumenty k problematice regulace léků v EU. Od 1.5.2004 je výrobce povinen dodržovat přímo pokyny vydávané Evropskou komisí, tedy bez jejich převádění do pokynů SÚKL.⁴⁰

Vypracování podrobných předpisů testů stability pro všechny lékové formy se stalo problémem, protože každá má svoje specifika (parametry kvality, skladovací podmínky apod.). Přesto můžeme nalézt společné prvky pro testování léčiv a lékových forem. V roce 1984 byl vydán Koncept stabilitních testů sdružením farmaceutických výrobců v USA (Pharmaceutical Manufacturers Association – PMA, dnes PhRMA), který zahrnoval testování stability od nové účinné látky přes vývoj lékové formy až po testování stability výrobních šarží a sledování vlivu obalu a nejrůznějších změn na stabilitu léčivého přípravku.⁴¹

První státní autoritou, která kontrolovala kvalitu a účinnost léků a schvalovala jejich registraci, byl Úřad pro potraviny a léky USA (Food and Drug Administration - FDA) schválený v roce 1930. Nutnost povinné registrace léků vyšla z industrializace farmaceutické výroby po první světové válce. Registrací léku potvrzují kompetentní státní úřady vlastnosti přípravku deklarované jeho výrobcem.

V šedesátých letech dochází k podstatnému zpřísnění předpisů pro výrobu a zkoušení léčiv a léků podle zásady Správné výrobní praxe (SVP). FDA (Food and Drug Administration) a WHO (Světová

zdravotnická organizace) zpracovali a publikovali první ucelené definice SVP : soubor směrnic WHO – Good Practices in the Manufacturing and Quality Control of Drugs (GMP)⁴². Jsou zde uvedeny definice a doporučení na zabezpečení kvality výroby, způsob zabezpečení kontroly farmaceutické výroby, pravidla výrobní činnosti. Kromě jiného směrnice v bodě 10 systému kontroly jakosti léčiv nařizuje výrobcům zabezpečit stálost přípravku a v případě potřeby i výchozích látek (surovin a meziproductů). Farmaceutické výrobky musí mít uvedenou expiraci vztahující se na konkrétní šarži a podmínky uchovávání, která je uvedena na obalu. Tento údaj musí být doložen příslušnými výsledky stabilitních studií, které jsou součástí registrační dokumentace. Jde tedy o detailně zpracovaný systém sledující léčivo ve všech etapách, t.j. ve vývoji, výrobě a skladování.⁴³

V roce 1975 vydala WHO směrnice týkající se certifikace léčiv, které jsou dosud platné.³⁶ U nás zásady správné výrobní praxe zpracovala v roce 1974 SPOFA.

V rámci evropských integračních procesů jsou patrné snahy o zjednodušení procesu registrace léčivých přípravků s cílem vzájemného uznávání registrace v jednotlivých zemích. Evropské hospodářské společenství (EHS) přijalo v roce 1965 první základní předpis regulující oblast léčiv a léčivých přípravků – směrnice 65/65/EEC. Komise Evropského společenství a poté Evropská léková agentura (EMA - European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) postupně během let vydaly několik přepracovaných pravidel, kterým podléhají léčivé přípravky v Evropské Unii. Současné předpisy jsou dostupné na internetových stránkách <http://pharmacos.eudra.org>. EMA mimo registračních aktivit také zabezpečuje zpracování dokumentů ICH do elektronické podoby.

Požadavky na stabilitu léčivých přípravků jsou obsahem mnohých mezinárodních směrnic (dokumentů), závazných pro více států současně. Pro Evropu je to série předpisů (Directive and Regulation requirements) s doplňkovými pokyny, které zpracovala a vydala Mezinárodní harmonizační konference (International Conference of Harmonisation - ICH) nebo výbor pro chráněné léčivé přípravky (Committee on Proprietary Medicinal Products – CPMP). Tyto dokumenty platí i pro oblast Japonska a USA. Pokyny převzal již USP 23.⁴⁴ Cílem ICH je zjednodušit požadavky na registrační dokumentaci v uvedených zemích tak, aby účinné a bezpečné léčivé přípravky byly dostupné bez zbytečného zdržení a bez potřeby vykonávat duplicitní testy při vývoji léčivých přípravků a při jejich registraci, což výrazně redukuje náklady.⁴⁵ Dokumenty ICH jsou rozdělené do čtyř kategorií : Q - Quality Topics -kvalita; S - Safety Topics - bezpečnost; E - Efficacy Topics - účinnost; M - Multidisciplinary Topics - multidisciplinární témata, které se dále dělí do čtyř skupin (M1, M2, M3, M4). Dokumenty týkající se stability léčiv a léčivých přípravků najdeme v kategorii Q - Quality Topics.

6.1. Seznam pokynů ICH týkajících se kvality léčivých látek a léčivých přípravků:

ICH Q1A (R2)	Stability Testing of New Drug Substances and Products	Step 4	February 2003
ICH Q1B	Stability testing: Photostability Testing of New Drug Substance and Products	Step 4	November 1996
ICH Q1C	Stability testing for New Dosage Forms	Step 5	November 1996
ICH Q1D	Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products.	Step 5	February 2002
ICH Q1E	Evaluation of Stability Data	Step 5	February 2003
ICH Q1F	Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV	Step 5	February 2003
ICH Q2(R1)	Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology	Step 5	October 1994
ICH Q3A (R1)	Impurities in New Drug Substances (Revised Guideline)	Step 5	February 2002
ICH Q3B (R1)	Impurities in New Drug Products (Revised Guideline)	Step 5	February 2003
ICH Q3C (R3)	Impurities : Guideline for Residual Solvents	Step 5	July 1997

ICH Q4	Pharmacopoeias		
ICH Q4A	Pharmacopoeial Harmonisation		
ICH Q4B	Regulatory Acceptance of Pharmacopoeial Interchangeability		
ICH Q5A (R1)	Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products derived from Cell Lines of Human or Animal Origin	Step 5	March 1997
ICH Q5B	Quality of Biotechnological Products : Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products	Step 5	November 1995
ICH Q5C	Quality of Biotechnological Products : Stability Testing of Biotechnological/Biological Products	Step 5	November 1995
ICH Q5D	Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products	Step 5	July 1997
ICH Q5E	Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process	Step 5	November 2004
ICH Q6	Specifications for New Drug Substances and Products		
ICH Q6A	Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for new Drug Substances and New Drug Products : Chemical Substances	Step 5	October 1999

ICH Q6B	Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products	Step 5	March 1999
ICH Q7	Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients	Step 5	November 2000
ICH Q8	Pharmaceutical Development	Step 5	November 2005
ICH Q9	Quality Risk Management	Step 5	November 2005

7. LÉKOPISY

Vydání dlouho připravovaného **Československého lékopisu**, první vydání (**ČsL 1**), zabránil vznik Protektorátu Čechy a Morava, v němž platil německý lékopis (DAB 6 - Deutsches Arzneibuch). Po druhé světové válce v roce 1947 byla znova ustavena Lékopisná komise a byl vydán Československý lékopis, vydání první, který byl již při svém vydání zastaralý, neboť jeho základem byl rukopis z roku 1937. Doplněk k ČsL 1 vyšel v roce 1952.

1. vydání Československého lékopisu (1947) bylo zaměřeno především na lékárny, což se týkalo i používaných kontrolních metod. U většiny drog s organisovanou strukturou a u některých amorfních je předepsáno jejich podrobné drobnohledné vyšetření, drobnohledné zkoumání prášku však toliko u významnějších drog hojně porušovaných nebo fyziologicky zvláště účinných. Jako doplněk drobnohledného vyšetření jsou předepsány pro některé drogy zvláště charakteristické mikrochemické reakce. U drog známých svou špatnou jakostí nebo častějším porušováním nebo záměnami předepíše lékopis zvláštní účelné zkoušky na čistotu.⁴⁶

2. vydání Československého lékopisu (1954) reaguje na vývoj farmaceutického průmyslu. Bylo upuštěno od dřívějšího hlediska, podle něhož lékopisem předepsané zkoušky musely být proveditelné v lékárnách. Ke zkoušení léčiv, léčivých přípravků byly předepsány nové, dokonalejší metody podle zkušeností výzkumných, vysokoškolských a kontrolních ústavů a laboratoří. Zařazené metody jsou i náročnější na přístroje. Hlavní nové způsoby stanovení jsou např.

polarografická metoda J. Heyrovského, elektrometrické titrační metody, stanovení solí organických zásad chromatografickou metodou výměny iontů. Definována je podstata elektroforetického stanovení a rozšířen text stanovení optické aktivity a stanovení světelné absorpce.⁴⁷ ČsL 2 uvádí ve Všeobecné části požadavek označování léčivého přípravku datem přípravy, datem expirace (u přípravků podléhajících v průběhu skladovací doby změnám), pokyny o uchovávání a případně i dobou použitelnosti. ČsL 2 byl prvním lékopisem na světě, který použil pojem „mikrobiologická nezávadnost“ léčiva. Tehdejší limity už dnes ovšem neplatí.

V **Doplňku ČSL 2 (1959)** byla uvedena metoda papírové chromatografie.

V souvislosti s vývojem analytické chemie byly do **3.vydání Československého lékopisu (1970)** zařazeny některé nové analytické metody, které umožňují jednak dokonalejší a přesnější kontrolu léčiv, jednak zavádějí nové způsoby hodnocení. Jsou to titrace v nevodných prostředích, které nahradily zdlouhavější způsob stanovení metodou chromatografické výměny iontů u solí organických zásad, spektrofotometrie v IČ, mikrotitrace kyselinou tosylovou v prostředí chloroformu pro stanovení některých rozkladných produktů nebo malých koncentrací velmi silně účinných látek v lékových formách.⁴⁸ V ČsL 3 byly uvedeny tolerance nečistot zjišťovaných v léčivých přípravcích podle ČSN. V ČSN bylo uvedeno, že látka používaná k farmaceutickým účelům musí vyhovovat lékopisným požadavkům.

V **Doplňku ČsL 3 (1978)** byla uvedena chromatografie na tenké vrstvě.

Československý lékopis 4 (1987) uvádí definici pojmu stabilita: „*Stabilita je vlastnost léčiva zachovávat si v příslušných mezích po určité době a za určitých podmínek uchování stejné jakostní znaky, které léčivo mělo v době výroby.*“ Samostatnou kapitolu věnovanou stabilitě ovšem neobsahuje. O stálosti léčiv a léčivých přípravků se zmiňuje ustanovení o jejich přípravě a uchování. Na stálost přípravku také pamatuje mnohými konkrétními pokyny a požadavky na jiných místech lékopisu. Specifikuje např. jakost skleněných obalů pro infuzní, injekční a jiné přípravky. Do **ČsL 4** byly zařazené Zásady správné výrobní praxe jako základní lékopisné požadavky při výrobě a přípravě léčivých přípravků, které vypracovala v roce 1974 VHJ Spofa.

Lékopis dále definuje „individuální přípravu“ a „hromadnou výrobu léčiv“. Jako „individuální přípravu“ označuje množství léku připraveného naráz nejvýše pro 6 pacientů. Od této hranice je potom nutný odběr vzorků z vyrobených šarží a jejich uchování po celou dobu použitelnosti léčivého přípravku. Do zásoby mohou být vyráběny nebo připravovány jen ty léčivé přípravky, které jsou po určenou dobu stabilní.

Dále uvádí: „Požadované stability léčiv se dosáhne jejich vhodným technologickým zpracováním nebo úpravou, při níž lze použít vhodných stabilizačních přísad. Na stabilitu mají vliv vnitřní faktory, např. fyzikálně- chemické vlastnosti látky nebo složení přípravku, a vnější faktory, např. teplota, světlo, vlhkost, použité obaly; proto musí být stanoveny a dodržovány vhodné podmínky pro uchování léčiv a podle potřeby vymezena doba jejich použitelnosti, popř. expirace. Informace o stabilitě daného léčiva se získávají vhodnými metodami, testy a zkouškami, kterými se zjišťuje, zda se neodchylují fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické parametry nežádoucí měrou od původních hodnot. V průběhu zkoušky jsou léčiva vystavena po určitou

dobu normálním nebo mimořádným klimatickým podmínkám (zpravidla teploty nebo vlhkosti) a v určitých časových intervalech se zjišťují případné změny od původních jakostních znaků. Na základě zjištěných hodnot se určí doba použitelnosti popř. expirace.“

Definuje dobu použitelnosti jako časový interval, po který je léčivo stabilní a má požadovanou jakost a účinnost. Není-li uvedeno jinak, doba použitelnosti léčiva je 5 let. Pro léčivé přípravky, jejichž účinnost po přípravě trvale klesá, se stanoví doba expirace, to je doba po kterou má léčivý přípravek ještě požadovanou účinnost. Po uplynutí doby použitelnosti, resp. expirace nelze léčivo použít k terapeutickým účelům bez ověření jakosti, popř. účinnosti.

Lékopisnou jakost má látka, která splňuje všechny požadavky uvedené v příslušném článku, tj. v odstavcích Popis, Zkoušky na totožnost, Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu. Používá se k tomu předepsaných metod organoleptických, fyzikálních, chemických a biologických. Jiné než lékopisné metody lze použít jen v tom případě, jsou-li obě metody co do správnosti a přesnosti výsledků rovnocenné; rozhodující je výsledek získaný metodou lékopisnou.⁴⁹

4. vydání Československého lékopisu už využívá TLC jako rutinní metodu při zkouškách na totožnost a čistotu a zavedlo do kontroly léčiv HPLC.²²

Vzhledem k delším časovým intervalům, ve kterých lékopisy vycházejí, analytická kontrola stability by se neměla omezovat pouze na lékopisné metody.

Český lékopis 1997 vychází již z Evropského lékopisu, 3. vydání (Ph. Eur. 3). U článků chemických látek je dáována přednost zajištění kontroly nečistot dobře navrženou částí Zkoušky na čistotu před stanovením obsahu účinné látky. V článku je navrhován celý soubor

požadavků zajišťujících, že daný výrobek je vhodné jakosti. Na konci velkého počtu článků je uveden seznam známých nebo možných nečistot, které lze prokazatelně kontrolovat zkouškami na čistotu. Znamé nečistoty jsou nečistoty nalezené v řadě šarží určité látky. Možné nečistoty jsou pak takové nečistoty, u nichž by se mohlo na základě výrobního procesu očekávat, že budou nalezeny, avšak jejich přítomnost v šaržích nebyla během vypracování lékopisného článku prokazatelně zjištěna. Tento seznam nečistot je určen k tomu, aby usnadnil použití článku zejména během řízení, na jehož základě se vystavuje povolení k uvedení daného léčiva na trh. Bližší podrobnosti jsou uvedeny v publikaci **ICH : Impurities in new drug substances**.⁵⁰ Řada možných nečistot nějaké látky získané daným výrobním postupem může být porovnána se seznamem nečistot ke zjištění, zda lékopisný článek umožňuje dostatečnou kontrolu. Léčivý přípravek musí vyhovovat požadavkům lékopisu po celou dobu své použitelnosti. Dobu použitelnosti a datum, od kterého se tato doba počítá, schvaluje oprávněná autorita na základě výsledků stabilitních studií.⁵¹

Český lékopis 2002, Doplněk 2003 a 2004

ČL 2002 vychází z Evropského lékopisu, 4. vydání. Lékopisné texty uvedené v Evropské části ČL 2002 jsou překlady EL 4 a jeho 1. a 2. doplňku do češtiny. Evropský lékopis se účastní procesu harmonizace s Japonským lékopisem a Lékopisem Spojených států amerických v rámci neformální struktury nazývané Lékopisná diskusní skupina (PDG - Pharmacopoeial Discussion Group). Její činnost se rozvíjí v koordinaci s činností mezinárodní konference o harmonizaci (ICH).

ČL 2002 přináší další seznamy nečistot, které jsou uváděny na konci jednotlivých monografií.

Nově jsou uvedeny požadavky na zbytková rozpouštědla (*Corpora ad usum pharmaceuticum*), *Totožnost a kontrola zbytkových rozpouštědel a Zbytková rozpouštědla*. Všechny léčivé a pomocné látky jsou podrobeny zkoušce na zbytková rozpouštědla, i když v jednotlivém článku není uvedena žádná specifická zkouška. Zařazení těchto požadavků vychází ze směrnic ICH.

Požadavky na čistotu nejsou koncipovány tak, aby braly v úvahu všechny možné nečistoty. Není možné předpokládat, že lze tolerovat nějakou nečistotu, která není zjiřitelná pomocí předepsaných zkoušek, jestliže zkušenost a správná farmaceutická praxe požadují, aby byla nepřítomna. Předepsané limity jsou založeny na údajích získaných v běžné analytické praxi; počítají s běžnými analytickými chybami, s přijatelnými změnami ve výrobě a ve složení a se znehodnocením v rozsahu považovaném za přijatelný. Nejsou dovoleny žádné odchylky od předepsaných limitů.

Informace a doporučení uvedená v části Skladování nejsou zcela závazná. Oprávněná autorita může předepsat zvláštní podmínky skladování, které se musí dodržovat.

Pro ilustraci problému bych chtěla uvést několik případů hodnocení nečistot u několika léčivých látek v různých lékopisech.

Acidum salicylicum

1. Deutches Arzneibuch, 6. vydání 1926 (překlad 1941) s 1. a 2. doplňkem v textu:

Hodnotí se přítomnost *fenolu* jako rozkladného produktu kyseliny salicylové při rychlém zahřívání. Projevuje se charakteristickým zápachem. Dále se zjišťuje přítomnost *cizích organických látek*

(nečistoty nebo rozkladné produkty blíže nespecifikované), *kyseliny chlorovodíkové(chloridy)* a *solí železa* (mohou působit jako katalyzátory rozkladných reakcí). Mimo to ještě uvádí zkoušku na *vážitelný zbytek po spálení* ke stanovení množství anorganických látek. K hodnocení využívá jednoduché analytické reakce, které jsou použitelné v lékárně.

2. ČsL 1 a ČsL 2

Zkoušky na čistotu jsou analogické ke zkouškám prováděným v německém lékopise.

3. ČsL 3

Uvádí navíc zkoušku na *sírany* a *síranový popel*.

4. ČsL 4

Jako součást zkoušek na čistotu je nově uvedeno *hodnocení čirosti a barvy roztoku*. Objevení zákalu nebo sraženiny může indikovat reakci roztoku se skleněným obalem příp. uzávěrem nebo vzniká v důsledku jiných chemických změn v lékové formě např. změny pH.

Zkouška na přítomnost železa je nahrazena zkouškou na *těžké kovy*, které mohou katalyzovat rozkladné reakce. *Chloridy* a *sírany* se stanovují barevnými nebo srážecími analytickými reakcemi. Je stanoveno limitní množství těchto nečistot. Stanovení *fenolu* se provádí metodou TLC (Thin Layer Chromatography).

Ostatní zkoušky jsou stejné jako v předchozích lékopisech.

5. ČL 1997 a ČL 2002

Ke stanovení obsahu příbuzných látek v analyzovaném vzorku lékopis předepisuje metodu kapalinové chromatografie. Jako příbuzné látky (nečistoty) lékopis uvádí *fenol*, *kyselinu 4-hydroxyisofthalovou* a *kyselinu 4-hydroxybenzoovou*. Navíc je uvedena zkouška *vzhled roztoku, ztráta sušením*, pro stanovení obsahu vody v substanci (mohlo by dojít k hydrolýze léčivé látky), a *síranový popel*. Stejně jako v předchozím lékopise se stanovuje přítomnost *chloridů*, *síranů* a *těžkých kovů*.

Adrenalinum

1. ČsL 1

Adrenalinum chloratum solutum

Hodnotí se čírost roztoku, což je jeden z nespecifických ukazatelů stability. Dále se provádí titrační stanovení obsahu *chlorovodíku* (adrenalin se používá jako sůl kyseliny chlorovodíkové). Volný chlorovodík by mohl ovlivňovat hodnotu pH.

2. ČsL 2

V rámci zkoušek na čistotu se zkouší přítomnost *alkaloidů* Mayerovým činidlem, *ztráta sušením* (obsah vody) a *zbytek po spálení* (anorganické látky).

3. ČsL 3

Adrenalinium hydrogentartaricum

Hodnotí se čírost a barva roztoku (porovnává se s barevnými roztoky), aktuální acidita (změna pH může indikovat přítomnost kyseliny nebo zásaditě reagující nečistoty, příp. rozkladného produktu), *ztráta sušením* a síranový popel. Je hodnocena přítomnost *adrenalonu* a *noradrenalinu*. Adrenalon vykazuje absorpční při 310 nm, u vzorku by neměla být větší než 2. Přítomnost noradrenalinu dokazujeme jeho vytřepáváním do toluenu. Pozorujeme intenzitu zbarvení toluenové vrstvy vzorku a porovnávacího roztoku (obsahuje známé množství hydrogenvinanu noradrenalinia a hydrogenvinanu adrenalinia prostého noradrenalinu).

4. ČsL 4

Adrenalinium hydrogentartaricum

Zkoušky jsou obdobné jako v předchozích lékopisech. Absorbance adrenalonu při 310 nm nesmí být větší než 0,16. Noradrenalin se stanovuje stejně jako v ČsL 3.

5. ČL 1997

Epinephrini hydrogenotartas

Srovnává se *vzhled roztoku* s porovnávacím barevným roztokem HŽ5. Jako stanovované nečistoty jsou uvedeny *adrenalon* a *noradrenalin*. Adrenalon vykazuje absorpenci při 310 nm, u vzorku by neměla být větší než 0,10 (oproti předchozím lékopisům je zde nižší limit). Ke stanovení norepinephrinu se používá metoda TLC. Porovnává se intenzita zbarvení skvrn standardu (norepinephriniumhydrogentartarat) a norepinefrinu, jako případné nečistoty přítomné v analyzovaném vzorku. Skvrny se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm a 365 nm. Dalšími zkouškami je ztráta sušením a síranový popel.

6. ČL 2002

Epinephrini tartras

Zkoušky na čistotu jsou stejné jako v ČL 1997. Jen u TLC je použit jako standart norepinefrin-tartarát CRL.

Coffeinum

1. ČsL 1

Coffeinum-natrium benzoicum

Hodnotí se bezbarvost roztoku, aktuální acidita (neutrální) a vážitelný zbytek. Provádějí se specifické barevné důkazy *cizích alkaloidů*, specifické reakce pro důkaz *síranů* (SO_4^{2-}), *chloridů* (Cl^-), *cizích organických látek*, *morfin*, *brucin*, *theobromin*, *theofyllin*, *parafenetidin*.

2. ČsL 2

Zkoušky na čistotu jsou stejné jako ČsL 1. Navíc je uvedena *ztráta sušením*.

3. ČsL 3

Coffeinum cum natrio benzoico

Prováděné zkoušky jsou analogické jako v předchozích lékopisech. Intenzita zbarvení vzorku u barevných analytických reakcí je srovnávána s porovnávacím roztokem, který je připraven z barevného roztoku.

4.ČsL 4

Posuzujeme přítomnost *látek nerozpustných ve vodě, cizích snadno zuhelnitelných organických látek, barvu a reakci roztoku, ztrátu sušením a síranový popel*. Stanovujeme *těžké kovy, chloridy a sírany* specifickými analytickými reakcemi. Metodou TLC detekujeme přítomnost *jiných alkaloidů*. Na chromatogramu nesmí žádná jiná skvrna převýšit velikostí a intenzitou zhášení fluorescence hlavní skvrnu kofeinu.

5. ČL 1997

Hodnotí se *čirost a bezbarvost roztoku, ztráta sušením a síranový popel*. Je využívána acidobazická titrace ke stanovení *kyselých reagujících látek*, které by mohly nastartovat hydrolytický rozklad léčiva. Ke stanovení *příbuzných látek* (nejsou přesně definovány) se používá metoda TLC. Opět se provádějí limitní zkoušky na *sírany* (specifické srážecí reakce), *těžké kovy* (porovnává se zbarvení mezi zkoušeným, porovnávacím a kontrolním roztokem).

6. ČL 2002

Prováděné zkoušky jsou stejné jako v ČL 97. Na konci článku jsou uvedeny specifické nečistoty - *theofylin* a jiné detegovatelné nečistoty - např. *isokofein*.

8. ZÁKLADNÍ POSTUPY PŘI ZKOUŠENÍ STABILITY LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ

Pro každé nové léčivo je třeba vypracovat jeho fyzikálně-chemický profil (rozpuštnost, pK_a , pH, rozdělovací koeficient), analytický profil, profil stability a profil čistoty.

Chemická a fyzikální degradace léčiva může vyústit v pozměněnou terapeutickou účinnost nebo v toxicitu léčivého přípravku. Proto je důležité porozumět faktorům, které mohou tyto změny vyvolat.⁵²

Pro testování stability léčivých přípravků se využívá organoleptické hodnocení, fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické zkoušky.⁵³

Mezi **organoleptické metody** se řadí zkouška na průzračnost, barevnost příp. bezbarvost, zápach, chuť. Určuje se druh a stupeň chuti, např. stupeň kyselosti, slanosti. Změny vzhledu je nutné pozorovat detailně. Lék musí vzbuzovat důvěru u pacienta, vzhled by ho neměl odrazovat od užití.

Použité **fyzikální metody** jsou závislé na typu lékové formy. U parenterálních roztoků hodnotíme čírost a barvu (může se řadit i k organoleptickým metodám). Může vznikat vířivá sraženina nebo zákal vzniklý reakcí roztoku se skleněným obalem příp. uzávěrem nebo v důsledku jiných chemických změn v roztoku např. změny pH. U suspenzí se hodnotí rychlost sedimentace, objem sedimentu, disoluční profil léčiva a roztřepatelnost sedimentu po skladování za určených podmínek. Pro stabilitu emulzních lékových forem je důležité sledování vlivu skladování na velikost částic a reologické vlastnosti emulze. U

polotuhých suspenzí lékových forem se klade důraz na konzistenci, viskozitu a polymorfismus. U tablet stanovujeme obsah vlhkosti, provádíme zkoušky mechanické odolnosti (pevnost, oděr) a zkoušku rozpadu, příp. disoluce. Skladování může mít vliv na rychlost uvolňování léčivé látky z transdermálních přípravků. U aerodisperzí může být stabilita narušena obsahem vlhkosti, což souvisí s těsností obalu.

Do **chemických metod** se řadí: stanovení obsahu léčivé látky, příp. pomocných látek (stabilizátory, antimikrobiální přísady) a zkouška na čistotu. Zkoušky na čistotu jsou zaměřeny především na nečistoty tj. nežádoucí látky nebo rozkladné produkty, které ve zkoušené látce mohou být přítomny v důsledky výrobní technologie, uchovávání apod.

Biologické hodnocení se užívá u přípravků obsahující hormony, antibiotika. Patří sem i test na přítomnost resp. nepřítomnost pyrogenních látek (LAL test).

Dále látka musí splňovat požadavky na mikrobiologickou čistotu, jejíž rozmezí je předepsáno pro jednotlivé lékové formy. Toto hodnocení se provádí při dlouhodobých stabilitních testech.^{17, 54, 55}

9. TYPY STABILITNÍCH TESTŮ

Tato kapitola byla vypracována podle požadavků v pokynech ICH (Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků pro registraci léčiv k humánnímu použití)⁵⁶, požadavků Světové zdravotnické organizace pro zkoušení stability léčivých přípravků obsahujících dobře známé léčivé látky v běžných lékových formách⁵⁷ a požadavků Státního ústavu pro kontrolu léčiv na stabilitní studie v registrační dokumentaci.⁵⁸ Požadavky na stabilitní zkoušky pro léčivé látky i léčivé přípravky se v podstatě shodují.

Stabilitní testy můžeme rozdělit podle podmínek zátěže na stresové, zrychlené a dlouhodobé.

9.2. Stresové testy (zátěžové testy; stress testing)

Používají se v předformulačních studiích pro ověření stability **léčivé látky** a její odolnosti vůči rozkladnému působení faktorů prostředí. Tyto stresové zkoušky nám pomohou identifikovat její pravděpodobné degradační produkty, mechanismus degradace, vnitřní stabilitu molekuly a dále ověřit vhodnost metod pro analýzu rozkladných produktů. Povaha a doba trvání stresových testů je variabilní a závislá na vlastnostech léčiva. Většinou nepřesahuje 3 měsíce (12 týdnů).

Při těchto testech se sleduje :

- vliv zvýšené teploty (přírůstky po 10 °C - např. 50 °C, 60 °C atd. - oproti teplotě, při níž je prováděna zrychlená stabilitní studie),

- vliv vlhkosti (např. 75 % RV nebo více), pokud je tato zkouška vhodná,
- vliv vzdušného kyslíku (oxidace),
- vliv světla (fotostabilita), viz. ICH Q1B⁵⁹,
- vnímavost k hydrolyze v rámci širokého rozmezí hodnot pH (stabilita léčivé látky u roztoků a suspenzí).

U **léčivého přípravku** mají být provedeny zkoušky fotostability s nejméně jednou primární šarží konečného přípravku, je-li to vhodné. Studie lékové formy provedené mimo jeho vnitřní obal nebo v jiných typech obalu mohou být užitečnou součástí zátěžových zkoušek nebo mohou být považovány za podpurné informace.

Ke kontrole se používají specifické analytické metody (např. TLC).

Není nutné uvádět ve specifikaci ty rozkladné produkty, pro něž bylo prokázáno, že nevznikají za podmínek dlouhodobé ani zrychlené studie.

Na základě těchto testů se následně zpracuje stabilitní profil léčiva.

Vykonávání zátěžových testů se nepožaduje, pokud je léčivá látka popsána v monografii Evropském lékopisu nebo v některém z národních lékopisů členských států EU a zcela splňuje její požadavky. Nejsou požadovány žádné údaje o rozkladných produktech, pokud jsou tyto uvedeny v odstavci „Zkoušky na čistotu“ a/nebo v odstavci „Nečistoty“ příslušné monografie. Žadatel deklaruje, že léčivá látka vyhovuje příslušné lékopisné monografii při zkoušení bezprostředně před výrobou konečného přípravku.

V případě, že léčivá látka není popsána v lékopisné monografii, předpokládaný mechanismus degradace může být doložen údaji publikovanými ve vědecké literatuře

Pokud tyto údaje nejsou k dispozici, je třeba provést zátěžové zkoušky.

V současných dokumentech ICH jsou pouze rámcové pokyny pro vykonávání těchto zkoušek.

9.3. Zrychlené testy (accelerated stability tests)

Zrychlené stabilitní zkoušky jsou prováděny za extrémních skladovacích podmínek, účelem je urychlení chemického rozkladu nebo fyzikální změny léčiva či léčivého přípravku. Využívají se při kinetických studiích rozkladu léčiva a lékové formy. Porovnávací (komparativní) zrychlené testy lze užít pro výběr vhodného složení, obalu při formulačních studiích, příp. ověření vhodnosti technologického postupu. Umožňují určit předběžný čas použitelnosti ještě před ukončením dlouhodobých testů stability.

FDA definuje zrychlený test stability jako „studie o urychlení chemické nebo fyzikální degradace léčiva (účinné látky) nebo léku (lékové formy) při nadsazených skladovacích podmínkách.“⁶⁰ Podobnou definici uvádí i WHO v „Quality assurance of pharmaceuticals.“ Data získaná při zrychlených testech a doplněná o poznatky získané při dlouhodobých testech stability jsou použity ke zhodnocení dlouhodobého působení chemických vlivů při skladování za doporučených podmínek a dopadu krátkodobého pobytu mimo doporučené podmínky, např. při distribuci. Na základě těchto studií může být stanovena pouze prozatímní skladovací doba. Získané

výsledky musí být ještě doplněny o data získaná při dlouhodobých testech.

Délka studie by měla pokrýt celou dobu použitelnosti léčivého přípravku a simulovat podmínky skladování. Provádí se na třech šaržích u nových léčivých látek. Novou léčivou látkou se rozumí taková léčivá látka, která není obsažena v žádném léčivém přípravku, registrovaném v rámci Evropského společenství. Za novou léčivou látku se považuje i nová sůl známé léčivé látky, její ester nebo derivát s jinou než kovalentní vazbou.

U generik je dostatečně známá stabilita účinné látky, a proto se prokazuje pouze stabilita lékové formy, a to u dvou šarží přípravků obsahujících dostatečně stálé účinné látky a u třech šarží v případě obsahu snadno se rozkládajících účinných látek.

Výběr teploty je třeba přizpůsobit lékové formě. Například u čípků je nejvyšší přípustná teplota 30°C, u mastí a aerosolů 35°C. Zrychlené testy stability se uskutečňují při teplotě nejméně o 15°C vyšší, než je horní hranice doporučené skladovací teploty pro dané léčivo. Obvykle tedy při 40°C a relativní vlhkosti 75%. Minimální doba trvání tohoto testu by měla být 6 měsíců. Pokud léčivo vydrží tyto podmínky po stanovenou dobu, můžeme odhadnout dobu použitelnosti na 2 roky (extrapolace doby použitelnosti). V případě, že během studie dojde u léčivého přípravku k „významným změnám“, za které je považována např. 5% ztráta účinnosti, rozkladné produkty převyšující povolený limit, hodnoty pH, disoluce a změny fyzikálních vlastností nevyhovují specifikaci, provádí se zrychlený test za přechodných („intermediate“) podmínek, tj. se skladováním vzorků v režimu 30°C/60% RV po dobu jednoho roku. Tento typ testů nazýváme **zkoušky vlhkým teplem**.

Volba podmínek by měla brát v úvahu i vlastnosti obalu. Např. u parenterálních přípravků ve skleněných ampulích nemá smysl testovat vliv zvýšené vlhkosti prostředí. V tomto případě stačí **zkouška suchým**

teplem při teplotě 30°C, 35°C nebo 45°C a nejvýše 60% relativní vlhkosti okolního prostředí. U konečného přípravku uchovávaného v nepropustném obalu mohou být zkoušky prováděny za podmínek bez kontroly vlhkosti prostředí.

Pro přípravky skladované za chladu je test prováděn při teplotě 25°C ± 2°C a 60% RV ± 5%.

U zrychlené stabilitní studie je třeba provést stanovení v minimálně třech časových bodech, (tzn. 0, 3 a 6 měsíců).

Metody použité ke zkoušení musí podchytit předpokládané změny během skladování, které mohou ovlivnit kvalitu, bezpečnost a účinnost léčiva. Zkoušení má hodnotit chemickou a biologickou stabilitu, ale i organoleptické a fyzikální vlastnosti. Mělo by zahrnovat stanovení obsahu účinné látky, rozkladných produktů event. antimikrobiálních přísad a fyzikálně-chemické zkoušky jako je tvrdost, rozpadavost, disoluce apod. Limity ve zkušebním předpise pro stabilitní zkoušky by měly odpovídat specifikaci pro propuštění přípravku s event. doplněním zkoušek a změn pozorovaných během uchovávání.⁶¹

System, který se ukázal jako nestabilní ve zrychleném testě, nemusí být nevyhnutelně nestabilní i v podmínkách dlouhodobého testu.

Výsledky zrychlené stabilitní studie a, je-li to vhodné, výsledky stabilitní studie za přechodných („intermediate“) podmínek uchovávání, mohou být využity k vyhodnocení vlivu krátkodobé odchylky od podmínek uchovávání vyznačených na obalu, ke které může dojít např. během přepravy.

9.4. Dlouhodobé testy (long-term stability studies)

Účelem těchto testů je potvrzení výsledků ze zrychlených testů, ověření stability šarží připravených na klinické zkoušení, stanovení času použitelnosti a určení způsobu uchovávání.

Tyto testy poskytují nejuvěrnější a nejobjektivnější údaje o stabilitě léčiv a léčivých přípravků a o změnách kvality, ke kterým může dojít při jejich dlouhodobém uchovávání. Testované vzorky (šarže) se uchovávají v podmínkách, které odpovídají podmínkám země (spadající do příslušného klimatického pásma), ve které bude příslušný léčivý přípravek registrován a distribuován. V našem podnebním pásmu je to pro většinu léků skladování za teploty 10-25°C a za relativní vlhkosti do 60%. Vzorky se uchovávají na horní hranici těchto podmínek, tedy při 25°C a 60% RV. Ostatní klimatická pásma a podmínky uchovávání jsou uvedeny v tabulce. Léčiva citlivá k teplotě se skladují za alternativních podmínek nižší teploty, stabilitní zkoušky se tedy provádějí při teplotě +15°C (za snížené teploty) nebo při +5°C (za chladu).

Přípravky se testují v originálním uzavřeném primárním obalu. Doporučuje se provádět odběry co tři měsíce během prvního roku, v druhém roce dlouhodobého testu každých 6 měsíců a dále pak v očních intervalech.

Při podání žádosti o registraci musí výrobce předložit 12ti měsíční stabilitní test za skutečných podmínek skladování, který bude dále pokračovat a jeho výsledky, pokrývající celou dobu použitelnosti, budou dodány regulační autoritě do skončení registračního řízení.

Na základě těchto testů se potom potvrdí skutečný čas použitelnosti léku. Stabilitní zkoušce nevyhoví lék, který se ukázal jako nevyhovující v jediném bodě předepsaných hodnocení.

Jako doklad o provedených stabilitních zkouškách slouží **protokol o stabilitě**, který je součástí registrační dokumentace. Ten musí obsahovat návrh zkoušek s uvedením názvu přípravku, síly a lékové formy, výrobce, počtu zkoušených šarží, jejich velikost a čísla, složení přípravku, data výroby, výrobce účinné látky a popisu obalu přípravku. V protokolu se dále uvádějí zkušební metody včetně jejich validace nebo odkaz na příslušný validovaný předpis a výsledky zkoušek. Pro každou šarži musí být uvedeny počáteční hodnoty, výsledky získané během zkoušky v předepsaných intervalech a požadované limity. V závěru jsou výsledky vyhodnoceny, komentovány a na jejich základě jsou určeny podmínky pro uchovávání, druh obalu a doba použitelnosti. Podrobné informace týkající se vyhodnocování výsledků stabilitních studií a extrapolace lze najít v pokynu ICH “Guidance on Evaluation of Stability Data”⁶².

Tabulka 2: Doporučené skladovací podmínky :

Typ testu	Podmínky	Minimální doba trvání testu	Minimální délka při podání žádosti o registraci
Dlouhodobý*	25°C +- 2°C / 60% RV +- 5%; 30 °C ± 2 °C/65 % RV ± 5 % RV	12 měsíců	6 měsíců (postup a) 12 měsíců (postu b)
Zrychlený	40°C +- 2°C / 75% RV +- 5%	6 měsíců	6 měsíců
Zrychlený test za přechodných („intermediate“) podmínek	30°C +- 2°C / 65% RV +- 5%	12 měsíců	6 měsíců

* Je na uvážení žadatele, zda bude provádět dlouhodobé stabilitní studie při 25 °C ± 2 °C/60 % RV ± 5 % nebo při 30 °C ± 2 °C/65 % RV ± 5 % RV. V druhém případě nejsou již zapotřebí žádné další výsledky zkoušek prováděných za přechodných („intermediate“) podmínek uchovávání.⁶⁰

Tabulka 3: Podmínky dlouhodobých testů pro jednotlivá klimatická pásma:

Klimatické pásmo	Teplota	Relativní vlhkost	Interval analýzy
I. – mírné pásmo (severní Evropa, Kanada, většina Ruska)	25°C	60%	3, 6, 9, 12, 18, 24 (36, 48, 60)
II. – subtropické pásmo (USA, Japonsko, jižní Evropa)	30°C	65%	3, 6, 9, 12, 18, 24 (36, 48, 60)
III. – horké, suché (Írán, Súdán)	30°C	35% 70%	3, 6, 9, 12, 18, 24 (36, 48, 60)
IV. – horké, vlhké (Brazílie, Ghana, Indonésie)	30°C	75%	3, 6, 9, 12, 18, 24 (36, 48, 60)

9.5. Následné stabilitní zkoušky (on-going stability studies)

Tyto testy vykonává výrobce, pokud při podávání žádosti o registraci ještě nemá k dispozici výsledky dlouhodobých testů v plném rozsahu. Předkládá pouze minimální požadované výsledky studií stability. Výrobce je provádí průběžně u vybraných šarží svého běžného výrobního sortimentu. Přípravek se hodnotí na počátku, po 6, 12 a 24 měsících, dále event. v ročních intervalech. Výsledky těchto stabilitních studií bude výrobce přikládat k žádostem o prodloužení registrace.

Může být použit redukovaný plán stabilitních zkoušek, tzv. „matrixing“ nebo „bracketing“, kdy rozsah a četnost zkoušení jsou určitým způsobem omezeny. Podmínky použití tohoto postupu jsou popsány v pokynu ICH „Guidance on Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products“⁶³

10. ANALYTICKÉ METODY VYUŽÍVANÉ PŘI TESTECH

STABILITY

Jeden z hlavních úkolů farmaceutů je zpracování léčiva tak, aby se neporušila jeho původní stabilita a vyloučily se nevhodné kombinace léčiv s pomocnými látkami nebo nevhodný způsob uchovávání. Z toho vyplývá náročnost a složitost posuzování kvality, která se projeví v konečném důsledku v účinnosti a bezpečnosti léku. Kvalita údajů o stabilitě testovaného léčiva a léčivého přípravku je závislá na použitých analytických kontrolních metodách. Při studiu stability se volí takové analytické metody, které umožňují postihnout už malé změny. Při studiu stability se kromě stanovení obsahu účinné látky klade důraz i na čistotu, a proto je třeba využít širokou škálu analytických metod.⁶⁴

Až do padesátých let 20. století nebyly analytické metody ke kvantitativnímu stanovení účinné látky, rozkladných produktů a jiných nečistot dostatečně citlivé a hlavně běžně dostupné. Proto ani výpočty dob použitelnosti založené na chemické kinetice nebyly optimální. Velkým pokrokem v té době bylo zavedení *spektrofotometrického a volumetrického stanovení* do farmaceutické praxe. Ovšem ani tyto metody nebyly dostatečně specifické. Obsah účinné látky se hodnotil pouze v určitých intervalech a ke konci skladovací doby. Reakční pořádek rozkladné reakce se tak mohl určit jen aproximativně a vypočítané hodnoty tak měly pouze informativní charakter. V padesátých a šedesátých letech byla postupně zaváděna metoda *tenkovrstvé chromatografie* (TLC) a dále metoda *vysokoučinné kapalinové chromatografie* (HPLC).

Padesáté léta 20. století se nesly ve znamení objevů celé řady nových, především syntetických léčiv, což znamenalo obrovský rozmach farmaceutického průmyslu a hromadně vyráběných léčiv na úkor individuální přípravy v lékárnách. Tento trend můžeme sledovat i ve vývoji našich lékopisů a v používaných metodách.

Vzhledem k delším časovým intervalům, ve kterých lékopisy vycházejí, analytická kontrola stability by se neměla omezovat pouze na lékopisné metody.

Studium stability kromě stanovení obsahu účinné látky klade důraz hlavně na zkoušky čistoty. Proto je využívána celá škála analytických metod od nespecifických pro indikaci rozkladu až po vysoce kvantitativní metody. Volba a aplikace analytických metod je závislá na povaze léčiva a druhu lékové formy.

Elektrochemické metody patří mezi nespecifické metody, jejichž hlavní využití spočívá v hodnocení pH profilu léčiva a stanovení aktuální acidity.

Český lékopis 2002 a 2005 uvádí potenciometrické stanovení pH a potenciometrické stanovení koncentrace iontů pomocí iontově selektivních elektrod.

Titrace jsou jednou z nejstarších metod užívaných ke stanovení léčivých substancí. Nevodné acidobazické titrace se uplatňují při stanovení obsahu slabých kyselin a bází, např. aminů, alkaloidů, sulfonamidů, antihistaminik v léčivých přípravcích. Konkrétně potom u albendazolu, dopaminu nebo sotalolu. Oxidačně-redukční titrace mohou být použity ke stanovení množství železa (Fe^{3+}) v léčivých přípravcích užívaných v léčbě anémií, nebo ke stanovení množství redukujících cukrů jako nečistot v manitolu. Chelatometrickými titracemi můžeme

stanovit dvou a vícemocné prvky. Český lékopis 2002 a 2005 tyto titrace předepisuje pro stanovení obsahu vápníku, bismutu, hliníku, hořčíku, olova a zinku. Dalším typem titrací jsou srážecí titrace užívané např. ke stanovení obsahu chloridů v léčivých přípravcích.

Český lékopis 2002 a 2005 uvádí amperometrickou a potenciometrickou titraci jako základní zkušební fyzikálně-chemické metody.

Nevýhodou titračních metod je jejich nespecifita a nedostatečná citlivost při stanování mikrogramových množství nečistot.

V současnosti jsou užívány především ke stanovení obsahu účinné látky v léčivých přípravcích, často v kombinaci s jinými metodami, a ke stanovení konvenčních parametrů (číslo kyselosti, peroxidové číslo, hydroxidové číslo aj.) u polotuhých lékových forem. Titrační stanovení obsahu bylo u některých léčiv postupně nahrazeno více citlivými separačními metodami (HPLC, GC). Dříve byla běžně užívanou metodou u stabilitních stanovení beta-laktámových antibiotik (ampicilin, penicilin G) merkurimetrická titrace. Dnes je již nahrazena kapalinovou chromatografií.^{65, 66}

Spektrofotometrické metody (UV –VIS spektrofotometrie)

Přímé stanovení účinné látky a rozkladných produktů je možné, jen pokud mají odlišné maxima a minima ve spektru. V tomto případě je vhodné použít derivační spektrofotometrii. Údaje o absorpci charakterizují určitou látku a určují stupeň její čistoty. Využívá se ke stanovení obsahu léčivé látky v substancích a v lékových formách, zkouškám totožnosti (shodnost spekter), určení spektrální čistoty (založeno na porovnávání absorbancí při dvou různých vlnových délkách), hodnocení barevnosti kolorimetricky a k hodnocení obsahu uvolnění léčiva při disolučních testech.

Na jejich základě můžeme identifikovat jednotlivé skvrny na chromatogramu TLC nebo je můžeme použít jako detektory u HPLC.

ČL 2002 a 2005 uvádí absorpční spektrofotometrii v ultrafialové a viditelné oblasti, derivační spektrofotometrii,

Spektrometrické metody jako infračervená spektroskopie (IČ), nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS) slouží k identifikaci léčiva. Jsou užívané hlavně u zkoušek totožnosti, ale lze je využít i při hodnocení tzv. diastereoisomerní čistoty (NMR). Infračervená spektrofotometrie se používá pro analýzu nečistot v plynech. Nukleární magnetická rezonance a hmotnostní spektrometrie se kombinují se separačně chromatografickými metodami (GC – MS; LC – MS), což nám umožňuje identifikovat jednotlivé látky ve směsích a určit jejich strukturu.

ČL 2002 a 2005 uvádí absorpční spektrofotometrii v infračervené oblasti, nukleární magnetickou rezonanční spektrometrii, spektrometrii v blízké infračervené oblasti pro identifikaci organických látek a hmotnostní spektrometrii.

V literatuře z roku 1987 se lze dočíst, že **tenkovrstevná chromatografie (TLC)** byla ve své době velmi široce užívanou metodou především v kvalitativní analýze stabilitních studií.⁶⁷ Je to velmi rychlý postup k odhalení stop degradačních produktů. Často je spojena s identifikací UV spektra separovaných skvrn z TLC. Dnes představuje prakticky první stupeň analytického určení rozkladu v zátěžových nebo zrychlených testech nebo při sledování interakcí léčiva s pomocnými látkami. Pokud chceme použít TLC ke kvantitativní analýze ve stabilitních studiích, musíme pečlivě vybrat používanou mobilní fázi. Ta musí dostatečně separovat malé množství degradačních produktů od

hlavní substance. Detekční limit u TLC je vyšší než u HPLC, z čehož vyplývá omezené použití této metody.

Používá se k hodnocení čistoty, zkouškám totožnosti obsahových látek, k určení totožnosti a stanovení obsahu pomocných látek (konzervantů).

Velmi často užívanou metodou ke kvantitativní analýze během stabilitních studií chemicky definovaných sloučenin je **vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**. Je to vysoce citlivá specifická metoda indikující stabilitu. Umožňuje stanovit obsah účinné látky, rozkladných produktů a nečistot vedle sebe. Můžeme díky ní získat informace o průběhu rozkladného procesu v léčivém přípravku. Hlavní výhodou této metody je její časová nenáročnost, která je přínosná především při rutinních analýzách mnoha vzorků. U HPLC lze využít řady detektorů, které se liší citlivostí a selektivitou. Nejčastěji využívané jsou spektrometrické a elektrochemické detektory. Detektory laserem indukované fluorescence jsou schopny detekovat značně nízké koncentrace analytů a dosahují velmi nízkých detekčních limitů. HPLC ve spojení s MS (hmotnostní spektrometr) nebo NMR (nukleární magnetická resonance) detekcí může být využito i k identifikaci neznámých nečistot a rozkladných produktů. Množství chromatografované látky se zjišťuje podle velikosti ploch pod elučními křivkami (plochy píků) nebo podle výšky píků. Ke kvantitativní analýze v kapalinové chromatografii lze použít metodu standardního přídatku, vnějšího standardu, vnitřního standardu a kalibrační křivky.^{68, 69}

Plynová chromatografie je vysoce citlivá a selektivní metoda. Používá se ke stanovení a identifikaci látek méně polárních, prchavých a

termicky stálých. Polární látky často vyžadují derivaci, což může představovat limitující faktor použití.

Využívá se ke stanovení zbytkových rozpouštědel v léčivech, hodnocení obsahu etanolu příp. methanolu v extraktech, stanovení obsahových látek ze skupiny silic a éterických olejů.

ČL 2002 a 2005 uvádí papírovou chromatografii, tenkovrstvou chromatografii, plynovou chromatografii, kapalinovou chromatografii, vylučovací chromatografii a superkritickou fluidní chromatografii.

Jinými používanými metodami mohou být gravimetrické metody, termogravimetrie, termické metody, fluorimetrie aj.

Méně se ve stabilitních studiích používaly některé další metody jako polarografie či oscilopolarografie.^{70, 71}

11. VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD

Všechny použité kontrolní metody musejí odpovídat současným vědeckým poznatkům. Musejí být validovány a popsány dostatečně přesně a podrobně, aby odborník byl schopen je zreprodukovat.. Je to proces, kterým se prostřednictvím specifických testů potvrzuje, že vybraný analytický postup je spolehlivý a výsledky jím získané jsou reprodukovatelné. Pokud výrobce zvolí pro některou zkoušku metodu, která není shodná s lékopisnou monografií, musí být validací prokázáno, že poskytne stejné informace o kvalitě látky (např. že stanoví stejné nečistoty). Vše musí být náležitě dokumentováno.⁷² Podle toho, k jakému účelu má analytická metoda sloužit, ověřují se následující parametry (tabulka 4). Další podrobnosti k validaci analytických metod např.^{73, 74, 75}

Tabulka 4: Přehled testovaných validačních parametrů podle účelu použití.⁷⁶

	Identifikace	Test. nečistot Kvantitativní	Test. nečistot Limitní	Obsah
Správnost	-	+	-	+
Přesnost – Opakovatelnost	-	+	-	+
Mezilehlá přesnost	-	+ ¹	-	+ ¹
Selektivita	+	+	+	+
Detekční limit	-	-	+	-
Kvantitativní limit	-	+	-	-
Linearita	-	+	-	+
Rozsah	-	+	-	+
Robustnost	-	+	-	+

1 – neprovádí se, je-li provedena reprodukovatelnost.

12. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla zpracována rešerše na téma stability léčiv a léčivých přípravků, která se týká období od počátku 20. století až po současnost. Pozornost byla věnována historickým i současným definicím stability, regulačním předpisům včetně lékopisných ustanovení, byly rozebrány jednotlivé typy stabilitních testů, používané analytické metody až po validaci použitých metodik.

Stabilitní studie nabývají stále většího významu v hodnocení kvality, bezpečnosti a účinnosti léčiv a léčivých přípravků. Zasahují do kontroly léčiv jako nesmírně důležitá problematika tohoto oboru a její význam se neustále zvyšuje a prudce vyvíjí.

Současným trendem je snaha o sjednocení požadavků na registraci přípravků v souvislosti s výrobou přípravků nadnárodními společnostmi. S registracemi logicky velice úzce souvisí stabilita léčiv, a proto se v mezinárodním měřítku sjednocují i požadavky na stabilitní testy.

13. POUŽITÁ LITERATURA

-
- [1]. Vetchý D., Frýbortová K., Rabišková M.: Testování stability léčivých přípravků, *Chem. Listy*, 2006, s. 24-29.
- [2]. Beňo, P. , Truplová E., Ostrovská V.: Stabilita liečiv a liekov. Bratislava : vydavateľství Slovenské akademie vied, 2003, s. 9-10, 87-106.
- [3]. Melichar M., Chalabala M., Malý J., Šanda M.: Farmaceutické inkompatibility. Avicenum, Praha, 1961.
- [4]. REG-49: Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci. Věstník SÚKL **6/2000**.
- [5]. Carstensen T. J., Rhodes C. T.: Drug stability: Principles and practices. Marcel Dekker Inc., New York, 2000.
- [6]. **Vyhláška MZ a M zemědělství č. 288/2004 Sb.**
- [7]. WHO: Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical products Containing Well-established Drug Substance in Conventional Dosage Forms. WHO/Pharm/94, 1994, s. 556.
- [8]. Melichar M., *Českoslov. Farm.* **12**, 1963, s.524.
- [9]. Melichar, M. : Technologia galeník a liekov; Osveta, Martin 1973, s. 612-613.
- [10]. Knapp, Ch.: *Farm Obz.* **52**, 1983, s. 215 – 222.
- [11]. Chalabala, M. : Liekové formy, Osveta, Martin, 1985, s. 354.
- [12]. Kol. autorů: Československý lékopis 4: Všeobecná část. 4 vyd. Praha: Avicenum 1987, sv. I., s. 48-49.
- [13]. **Vyhláška ministerstva zdravotnictví České republiky č. 411/2004 Sb.**
- [14]. **ČSN 86 2002** Stabilita léčiv. Český normalizační institut, 1994.

-
- [15]. **Vyhláška** ministerstva zdravotnictví České republiky **284/1990 Sb.**
- [16]. Chalabala M., Komárek P., Kopecký F. a kol.: *Technologie léků*. Praha, Galén, 2001, s. 351-356.
- [17]. ICH Harmonised Tripartite guideline: International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Q1A (R2), Feb., 2003.
- [18]. Judy P. Boehlert: „Assay Development in stability test methods.“ *Drug Dev Ind Pharm*, **10**, 1984, č 8 – 9, s. 1343 – 1371.
- [19]. Göber, B.: *Pharmazie* **39**, 1984, č.8, s.570-571
- [20]. Higuchi, T., Busse, L. W.: *J Am Pharm Assoc, Sci Ed*, **39**, 1950, s. 411.
- [21]. Beňo, P. , Truplová E., Ostrovská V.: *Stabilita liečiv a liekov*. Bratislava, vydavateľství Slovenské akademie vied, 2003, s. 11 – 14.
- [22]. Blythe, R. H.: „Shelf-Life and Stability Tests in Drug Packaging “*The Glass Packer*, August, 1954. Citované podľa : Beňo, P. , Truplová E., Ostrovská V.: *Stabilita liečiv a liekov*. Bratislava, vydavateľství Slovenské akademie vied, 2003.
- [23]. Free S. M.: *Phar. Mfg. Assoc.*,Nov., 1955.
- [24]. Garrett, E. R., Carper, R. F.: *J Am Pharm Assoc, Sci Ed*, **44**, 1955, s. 515 (I).
- [25]. Garret E. R. : *J Am Pharm Assoc, Sci Ed*, **45**, 1956, s. 171 (II).
- [26]. Garret E. R. : *J Am Pharm Assoc, Sci Ed*, **46**, 1957, s. 584-586 (IV).
- [27]. Garret E. R. :“Stability Prediction in the Pharmaceutical Industry“*Amer. Perf. and Arom.*,August, 1959.
- [28]. Florey K. : *Analytical Profiles of Drug Substances*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1972.
- [29]. Garrett, E.R.: *J Pharm Sci*, **51**, 1962, č. 9, s. 811 – 833.

-
- [30]. **Zákon 271/1949 Sb.** republiky Československé ze dne 19.prosince 1949, o výrobě a distribuci léčiv.
- [31]. **Zákon 20/1966 Sb.** Československé socialistické republiky ze dne 30. března 1966, § 63.
- [32]. **Vyhláška 81/1969 Sb.** ministerstva zdravotnictví České socialistické republiky.
- [33]. **Vyhláška č. 43/1987 Sb.** Zák. část MZ. ČSR.
- [34]. **Vyhláška 284/1990 Sb.** ministerstva zdravotnictví České republiky.
- [35]. WHO: Good Practices in the Manufacture and Quality Control of Drugs, WHO Official Records No 226, 1975.
- [36]. Basic standards of good manufacturing practice for pharmaceutical products, PH3/83, PIC, June 1983.
- [37] WHO Guidelines on stability testing of pharmaceutical products containing well-established drug substances in conventional dosage forms, WHO/Pharm/94.565, 1994.
- [38].Office for Official Publications of the European Communities: The Rules Governing Medicinal Products in the European Community, Vol. III, Luxembourg, 1989.
- [39]. Pešák M.: Stabilitní zkoušky, *Farm Obzor*, **LXV**, 1996, s.35.
- [40].VYR-32: Pokyny pro správnou výrobní praxi. Staženo z: www.sukl.cz/download/cs08pokynform/vyr/vyr32.rtf; 8.3.2006.
- [41]. PMA´s Point-PDS Stability Committee: „Stability Concepts“ Pharmaceutical Technology, June 1984. Citované podle : Beňo, P. , Truplová E., Ostrovská V.: Stabilita léčiv a liekov. Bratislava, vydavateľství Slovenské akademie vied, 2003.
- [42]. WHO: Good Practices in the Manufacturing and Quality Control of Drugs. WHO Technical Report Series No 418, 1968.

-
- [43]. Beňo P., Gasparič J.: Sledování stability léčiv. *Československá farmacie*, ročník **XLII**, č. 5, 1993.
- [44]. American Pharmacopoeial Convention, Inc.: United States Pharmacopeia ed. 23 (Official 1.1.1995), Rockville 1994, s. 1959-1993.
- [45]. Mazzo, D. J.: International Stability Testing, Buffalo Grove, Interpharm Press, Inc. 1999.
- [46]. Kol. autorů, Československý lékopis 1: Všeobecná část. 1. vyd. Praha: Avicenum 1947, sv. I, s. 9.
- [47]. Kol. autorů, Československý lékopis 2: Všeobecná část. 2. vyd. Praha: Avicenum 1954, sv. I, s. 17.
- [48]. Kol. autorů, Československý lékopis 3 : Všeobecná část. 3. vyd. Praha: Avicenum 1970, sv. I., s. 20.
- [49]. Kol. autorů, Československý lékopis 4: Všeobecná část. 4. vyd. Praha: Avicenum 1987, sv. I., s. 53- 82.
- [50]. ICH tripartite note for guidance : Impurities in new drug substances, May 1995.
- [51]. Kol. autorů, Český lékopis 1997. Grada Publishing a.s., Praha 1997.
- [52]. Sumie Yoshioka; Valentino J. Stella: Stability of drugs and Dosage Forms, Kluwer Academic / Plenum publishers; New York, November 2000.
- [53]. Kol. autorů, Český lékopis 2002. Grada Publishing a.s., Praha 2002.
- [54]. Kol. autorů, Československý lékopis 4: Všeobecná část. 4. vyd. Praha: Avicenum 1987, sv. I., s. 53- 82.
- [55]. Carstensen T.J., Rhodes C.T. : Drug stability. Marcel Dekker Inc., New York 2000.
- [56]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH):

Q1A(R₂) - Stability testing of new drug substances and products, Feb. 2003.

[57]. WHO: Quality assurance of Pharmaceuticals : Guideline for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms, Volume 1, Geneva, 1997, s.48.

[58]. REG-83 – Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci, Věstník SÚKL **8**/2005.

[59]. ICH: Q1B - Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products (Note for Guidance on Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products), CPMP/ICH/279/95.

[60] FDA: Guideline for Submitting Documentation for the Stability Studies of Human Drugs and Biologics. February 1987.

[61]. Pospíšilová B.: Stabilitní studie v registrační dokumentaci. Věstník SÚKL **1**/1994, s. 1-3.

[62]. ICH: Q1E: Evaluation of Stability Data, Step 5, February, 2003

[63]. ICH: Q1D: Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products, Step 5, February, 2002.

[64]. Hanyšová L., Kastner P., Klimeš J.: Degradální produkty a nečistoty paracetamolu z hlediska jejich detekce. *Chem.Listy* **99**, 2005, s. 647-652.

[65]. Kumar, V.; Sunder, N.: Stability Indicating Test Procedure – In Perspective. *The Eastern Pharmacist*, **32**, August, 1989, s. 47 – 50.

[66]. Kol. autorů, Český Lékopis 2005, Grada Publishing a.s., Praha 2005.

[67]. Ebel S.: „Analytical methods of Stability testing for chemically defined Substances”. In: Grimm W. (ed.): *Stability Testing of Drug*

Products. Paperback APV, **Band 16**, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1987, s. 170-186.

[68]. Hanyšová L.: Kontrolně.analytické studie vybraných léčiv s využitím kapalinové chromatografie. Disertační práce, Kontrola chemických léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Universita Karlova v Praze, 2004.

[69] Poole, C.P. and Poole S.K.: *Chromatography today*, Elsevier science B.V., The Netherlands, 1997.

[70]. Boehlert, J. P. : Assay developement in stability test methods, *Drug Dev Ind Pharm*; Marcel Dekker, Inc., 1984, s. 1343 – 1371.

[71]. Beňo, P. , Truplová E., Ostrovská V.: *Stabilita liečiv a liekov*. Bratislava, vydavateľství Slovenské akademie vied, 2003, s. 68 – 69.

[72]. REG-21- Část II. Chemická, farmaceutická a biologická dokumentace, *Věstník SÚKL*, **1/1996**.

[73]. Šabartová J.: Kontrolní metody, validace analytických metod v kontrole léčiv. *SÚKL*, 1992.

[74]. ICH: Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Step 5, October 1994.

[75]. FDA: Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation. Feb. 1987.

[76]. Klimeš J. a kol.: Validace analytických metod v kontrole léčiv; *Kontrola léčiv II.*, 2004, str. 79.