

Potvrda identiteta farmaceutskih supstancija u ljekarničkom laboratoriju NIR spektroskopijom

Ćurak, Ivana

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:483936>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Ćurak

POTVRDA IDENTITETA FARMACEUTSKIH SUPSTANCIJA U LJEKARNIČKOM LABORATORIJU

NIR SPEKTROSKOPIJOM

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof.dr.sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 14.5.2024. na Zavodu za farmakognoziju, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Ana Mornar Turk, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. prof.dr.sc. Biljana Nigović, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. dr.sc. Maja Lusina Kregar, HALMED

Rad ima 77 listova.

PREDGOVOR

Ovim specijalističkim radom željela sam produbiti i prenijeti znanja i iskustva o važnosti kontrole kvalitete u magistralnoj izradi pripravaka u ljekarničkom laboratoriju te prikazati prednosti NIR spektroskopije.

Zahvaljujem se ravnateljici mag.pharm. Marini Marušić Fojs na podršci i ustupanju prostora i opreme ljekarničkog laboratorija ZU Ljekarna Marušić za odrađivanje mjerenja potrebnih za izradu ovog specijalističkog rada.

Također, velika zahvala od srca mentorici prof.dr.sc. Biljani Nigović na strpljenju, usmjerenju, svim korisnim savjetima te pomoći prilikom izrade i pisanja ovog specijalističkog rada.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Izrada magistralnih i galenskih pripravaka u ljekarničkom laboratoriju još uvijek predstavlja najpogodniju, u pojedinim slučajevima i jedinu, terapijsku opciju za pacijenta kad ne postoji industrijski lijek ili je potrebna priprema pogodnog terapijskog oblika ili doze individualno prema potrebi pacijenta. Magistralni i galenski pripravci ne prolaze strogu završnu kontrolu kvalitete kao industrijski lijekovi, a ljekarnik je u potpunosti odgovoran za kvalitetu farmaceutskih supstancija, izradu pripravaka te njihovo pravilno označavanje i izdavanje. Cilj specijalističkog rada je dati pregled regulative i smjernica o izradi magistralnih i galenskih pripravaka, obrazložiti važnost ulazne kontrole farmaceutskih supstancija (potvrde identiteta) koje se koriste za izradu pripravaka, prikazati analizu tri farmaceutske supstancije NIR spektroskopijom i objasniti njezine prednosti u potvrdi identiteta farmaceutskih supstancija te dati poticaj podizanju svijesti o potrebi uspostavljanja sustava kvalitete u ljekarničkom laboratoriju kao i podizanju kvalitete i sigurnosti izrade magistralnih i galenskih pripravaka.

MATERIJALI I METODE

Istraživanja u svrhu izrade rada uključuju pregled dostupne znanstvene literature o NIR tehnici i njenoj primjeni u analitici lijekova općenito, trenutnih studija, smjernica i zakonskih regulativa vezano uz izradu i kontrolu kvalitete magistralnih i galenskih pripravaka te ulaznu potvrdu identiteta farmaceutskih supstancija.

Specijalistički rad je eksperimentalnog karaktera. U praktičnom dijelu rada korištene farmaceutske supstancije za analizu NIR spektroskopijom (eritromicin, glicerol, bijeli vazelin) su zadovoljavajućih zahtjeva kvalitete u skladu s monografijama Europske farmakopeje. Analizirane su na uređaju Apo-Ident 2 NIR spektrometru prilagođenom potvrdi identiteta supstancija u ljekarništvu. Apo-Ident 2 u svom programu QuickStep sadrži referentne NIR spektre najčešćih supstancija korištenih u izradi pripravaka u ljekarnama. Potvrda identiteta bijelog vazelina provedena je dodatno i kemijskom

reakcijom prema monografiji Hrvatske farmakopeje usklađenoj s Europskom farmakopejom. Analize su provedene u ljekarničkom laboratoriju ZU Ljekarna Marušić, u prostoriji za analize u uvjetima reguliranog tlaka, temperature i izmjene zraka.

REZULTATI

Rezultati analize tri farmaceutske supstancije prikazani su u obliku NIR spektara, uz objašnjenje načela NIR tehnike i načina interpretacije rezultata mjerenja. Prikazan je rezultat i kemijske reakcije potvrde identiteta bijelog vazelina. Navode se prednosti NIR tehnike u svrhu potvrde identiteta pred nepouzdanim i nedovoljno selektivnim kemijskim reakcijama potvrde identiteta, uključujući jednostavnu i brzu analizu bez obrade uzorka koji se ne uništava mjerenjem te se dalje može koristiti u izradama pripravaka. NIR tehnika ne zahtijeva upotrebu standarda jer se identitet potvrđuje usporedbom NIR spektra ispitivane supstancije s referentnim spektrom iz baze podataka. Prikazano je kako je koncipiran sustav osiguranja kvalitete u ZU Ljekarni Marušić, zašto je važno slijediti propisane standardne operativne postupke, čuvati obaveznu dokumentaciju sirovina (certifikate analize) i analitička izvješća ulazne analize farmaceutskih supstancija.

ZAKLJUČAK

Magistralni i galenski pripravci još uvijek predstavljaju jedinu terapijsku opciju kada ne postoji industrijski lijek prikladnog oblika, doze, punila i slično. Ljekarnik je u potpunosti odgovoran za nabavu farmaceutskih supstancija, njihovu ulaznu analizu (potvrdu identiteta), izradu pripravaka prema smjernicama struke te pravilno izdavanje. NIR tehnika omogućava brzu i jednostavnu provjeru identiteta supstancija u tekućem, čvrstom i polučvrstom stanju, bez obrade uzorka, pripreme reagensa ili gubitaka analizirane supstancije. Potvrda identiteta u ZU Ljekarni Marušić uređajem Apo-Ident 2 NIR spektrometrom predstavlja vrlo jednostavnu, brzu i egzaktnu opciju, koja osigurava da pacijentima budu izdani sigurni i kvalitetni magistralni pripravci.

SUMMARY

OBJECTIVES

Compounding of magistral and galenic preparations in compounding laboratory in pharmacy in some cases is still most suitable and only therapeutic option for patient when industrial (registered) drug is unavailable or doesn't exist on the market, or is necessary to prepare specific pharmaceutical form, or adjust therapeutic doses individually depending on patient's needs.

Compounded magistral and galenic preparations are not subjected to strict final quality control testing as industrial drugs, and pharmacist is completely responsible for quality of pharmaceutical substances, compounding process, and proper labeling and dispensing of compounded preparations.

The aim of this paper is to give insight in regulations and guidelines of compounding of magistral and galenic preparations, explain importance of entry quality control of pharmaceutical substances (identity confirmation) used in compounding of preparations, show results of analyses of three pharmaceutical substances analyzed with NIR spectroscopy, explain advantages of NIR spectroscopy in identity confirmation of pharmaceutical substances, raise awareness of need of quality management system in compounding laboratory in pharmacy, also putting quality and safety of compounded preparations on higher level.

MATERIALS AND METHODS

Research for purpose of creating this paper includes review of available scientific literature about NIR technique and its application in analysis of drugs, current studies, guidelines and legal regulations about magistral and galenic preparations and entry identity confirmation of pharmaceutical substances.

This paper has experimental nature. In practical part of the paper, pharmaceutical substances (erythromycin, glycerol and white vaseline) used for analysis by NIR spectroscopy, meet the quality requirements according to monographs of European pharmacopoeia. They were analyzed on the

Apo-Ident 2 NIR spectrometer device adapted to confirm the identity of substances in pharmacy. Apo-Ident 2 in its QuickStep program contains the reference NIR spectrums of the most common substances used in compounding of preparations in pharmacies. Identity confirmation of white vaseline was additionally carried out by a chemical reaction according to the monograph of the Croatian Pharmacopoeia harmonized with the European Pharmacopoeia. The analyses were performed in the pharmacy laboratory of ZU Ljekarna Marušić, in the analysis room under conditions of regulated pressure, temperature and air exchange.

RESULTS

The results of the analysis of three pharmaceutical substances are presented in the form of NIR spectrums, with an explanation of the principles of NIR technique and how to interpret the measurement results. The result of the chemical reaction of identity confirmation of white vaseline is also shown. The advantages of the NIR technique for the purpose of identity confirmation over unreliable and insufficiently selective chemical identity confirmation reactions are listed, including simple and fast analysis without sample processing that is not destroyed by measurement and can further be used in compounding of preparations. The NIR technique does not require the use of standards because the identity is confirmed by comparing the NIR spectrum of the tested substance with a reference spectrum from the database. The concept of quality assurance system at ZU Ljekarna Marušić is shown, also stated why it is important to follow the prescribed standard operating procedures, to keep the mandatory documentation of raw materials (certificates of analysis) and analytical reports of entry analysis of pharmaceutical substances.

CONCLUSION

Magistral and galenic preparations are still the only therapeutic option when there is no industrial drug of suitable form, dose, excipient and so on. The pharmacist is fully responsible for the purchase of pharmaceutical substances, their entry analysis (identity confirmation), compounding of

preparations according to professional guidelines, and proper dispensing. NIR technique enables a quick and simple identity confirmation of a substance in liquid, solid and semi-solid form, without sample processing, preparation of reagents or losses of the analyzed substance. Identity confirmation at ZU Ljekarna Marušić with the Apo-Ident 2 NIR spectrometer is very simple, fast and exact option, which ensures that safe and high-quality preparations are dispensed to patients.

Sadržaj

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Magistralni i galenski pripravci.....	1
1.2. Prednosti magistralne i galenske izrade lijekova.....	2
1.2.1. Genetski testovi i personalizirana izrada lijekova.....	4
1.3. KONTROLA KVALITETE MAGISTRALNIH I GALENSKIH PRIPRAVAKA.....	5
1.3.1. Kvaliteta farmaceutskih sirovina i njihova dokumentacija.....	5
1.3.2. Stabilnost magistralnih i galenskih pripravaka.....	8
1.3.3. Ulazna i završna kontrola kvalitete	10
1.3.4. Publicirane studije o kontroli kvalitete magistralnih i galenskih pripravaka.....	13
1.3.5. Procjena rizika izrade i potreba za osiguranjem kvalitete	14
1.3.6. Sustav kvalitete u ljekarničkom laboratoriju.....	16
1.4. REGULATORNI ASPEKTI KONTROLE KVALITETE LJEKARNIČKIH PRIPRAVAKA.....	18
1.4.1. Zakonska regulativa magistralnih i galenskih pripravaka u Republici Hrvatskoj.....	18
1.4.2. Rezolucija CM/Res(2016)1 i PIC/S-ov Vodič dobre preparativne prakse	20
1.4.3. Usporedba s regulativom SAD-a.....	22
1.5. POTVRDA IDENTITETA FARMACEUTSKIH SUPSTANCIJA.....	23
1.5.1. Analitičke tehnike za potvrdu identiteta.....	24
1.5.2. NIR spektroskopija.....	27
1.5.3. Povijest NIR tehnike i zastupljenost u farmakopejama.....	28
1.5.4. Tipovi NIR spektrometara.....	30
1.5.5. Metode mjerenja uzoraka NIR tehnikom - transmisija, difuzna refleksija i transrefleksija.....	31
1.5.6. Prednosti NIR tehnike.....	32
1.5.7. Primjena NIR tehnike	34
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	36

3. MATERIJAL I METODE.....	37
3.1. NIR spektrometar Apo-Ident 2: karakteristike, kvalifikacija i validacija	37
3.2. Postupak mjerenja NIR spektrometrom Apo-Ident 2.....	39
3.2.1. Mjerenje odabranih farmaceutskih supstancija.....	39
3.2.2. Mogući utjecaj dodatnih čimbenika na mjerenja NIR spektrometrom.....	45
3.2.3. Praktični savjeti/upute za mjerenje.....	46
3.2.4. Sigurnost pri radu	46
3.3. Izvješća o analizi sirovine, radne upute i laboratorijski dnevni.....	47
4. REZULTATI	48
4.1. Prikaz rezultata analize eritromicina	48
4.2. Prikaz rezultata analize glicerola.....	50
4.3. Prikaz rezultata analize bijelog vazelina.....	52
4.3.1. Kemijska reakcija potvrde identiteta bijelog vazelina.....	55
5. RASPRAVA.....	57
6. ZAKLJUČAK.....	61
7. LITERATURA.....	62
8. ŽIVOTOPIS.....	67

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Magistralni i galenski pripravci

Magistralni i galenski pripravci pripadaju skupini lijekova izrađenih u ljekarni koji ne prolaze strogu kontrolu kvalitete i registraciju kao industrijski lijekovi. Izuzeti su od izdavanja odobrenja za stavljanje u promet lijekova te kao iznimka ne podliježu Direktivi 2001/83/EZ koja regulira registrirane lijekove. Oni su opcija kada tržište ne može osigurati adekvatan lijek za pacijenta, a razlozi mogu biti razni, poput privremene nedostupnosti industrijski proizvedenog lijeka ili općenito nemogućnosti njegovog oblikovanja i izrade u određenom farmaceutskom obliku zbog tehnoloških razloga. Tehnološki razlozi mogu biti primjerice, nestabilnosti ili nepovoljna svojstva farmaceutske supstancije (djelatne tvari) koja su limitirajuća za izradu gotovog farmaceutskog oblika koji bi bio zadovoljavajuće kvalitete, sigurnosti i ono najvažnije, stabilnosti. Vrlo čest primjer iz prakse je nemogućnost proizvodnje industrijskog lijeka u obliku sirupa koji bi bio prikladne stabilnosti, roka valjanosti i ostalih nužnih tehnoloških karakteristika (1,2). Mnogi ljekarnički pripravci koji ne podliježu odobravanju zahtijevaju preoblikovanje čvrstih oralnih farmaceutskih oblika u oralne tekućine ili suspenzije da bi se olakšala njihova primjena kod djece i starijih te putem nazogastričnih sondi.

Galenski pripravci se mogu izrađivati u serijama u galenskom ili ljekarničkom laboratoriju prema publiciranoj literaturi, odnosno provjerenim recepturama iz priznate farmaceutske literature te prema kriterijima dobre prakse izrade (engl. *Good preparation practice*, GPP). Osim receptnih, postoje i bezreceptni galenski pripravci koji pripadaju navedenoj kategoriji ovisno o djelatnoj tvari i primjeni. Magistralni lijek se izrađuje *ex tempore* prema receptu liječnika za pojedinog pacijenta (1,3). Sastoji se od djelatne tvari (farmaceutske supstancije koja je nositelj terapijskog djelovanja) te pomoćnih tvari (primjerice punila, konzervansa, otapala, korigensa okusa, podloge i slično) koje su

najčešće inertne i nemaju terapijski učinak, već omogućavaju uklapanje djelatne tvari u prikladni gotovi farmaceutski oblik poput sirupa, krema, pasta, gelova, supozitorija i slično (4).

Važno je napomenuti da su ljekarnici jedini zdravstveni djelatnici koji su educirani te imaju znanje i vještine izrade magistralnih i galenskih pripravaka za posebne potrebe pacijenata.

1.2. Prednosti magistralne i galenske izrade lijekova

Magistralni lijekovi su prijeko potrebni i imaju svoju još uvijek nezamjenjivu ulogu kada nema industrijski registriranih lijekova koji zadovoljavaju specifične kliničke potrebe pacijenta, što se posebno ističe u području pedijatrije i gerijatrije. Izvrsna su opcija za prilagodbu pomoćnih tvari, podloge i doze individualno prema masi pacijenta, njegovoj dobi te kliničkoj slici. Neki od primjera su sljedeći:

- kada ne postoje industrijski lijekovi u propisanoj dozi (vrlo čest slučaj u pedijatriji, kad je potrebno primijeniti puno manju dozu nego što postoji registrirana na tržištu, najčešći primjer su primjena prilagođenih doza kardiovaskularnih lijekova, uroantiseptika i slično)
- kada je potrebno primijeniti prikladan farmaceutski oblik lijeka (primjerice u pedijatriji kad je potrebna izrada sirupa ili izrada supozitorija i sublingvalnih sprejeva kod gastrointestinalnih disfunkcija koje onemogućavaju gutanje i adekvatnu apsorpciju lijeka primijenjenog oralnim putem)
- kod primjene lijeka putem nazogastrične sonde (primjerice, lijek je potrebno pripremiti s punilom topljivim u vodi kako bi se spriječilo zgrušavanje lijeka i zaštopavanje sonde)
- kada postoje alergije na pomoćna sredstva u gotovom lijeku (primjerice intolerancija na laktozu kao punilo, alergije na gluten ili bojila) (4). Konkretni primjer iz prakse su kapsule Utrogestana, trenutno jedine dostupne na tržištu koje u sastavu imaju progesteron i koje u sebi sadrže sojin lecitin. Za pacijente koji su alergični na sojin lecitin, pošto nema drugih

industrijskih lijekova istog sastava djelatne tvari i samo drugačijih pomoćnih supstancija, trenutno jedina alternativa bi bila magistralna izrada progesteronskih kapsula iz aktivne farmaceutske supstancije progesterona (engl. *Active pharmaceutical ingredient*, API) uz dodatak punila poput maltodekstrina koje je kompatibilno djelatnoj tvari, a ne izaziva alergiju kod pacijenta, ili u dogovoru s liječnikom promjena puta primjene progesterona (u obliku gela) i prilagodba doziranja.

Magistralna izrada pokriva i brojna terapijska područja poput izrade bioidentične hormonske nadomjesne terapije (BHRT), liječenje boli (engl. *pain management*), dermatologije, izrade veterinarskih lijekova (prilagodba doze i oblika prema veterinarskom receptu) i slično:

- BHRT pokriva brojne dijagnoze, specifična po tome što se u magistralnoj izradi koriste samo bioidentični API-ji, dakle farmaceutske supstancije koje su identične prirodnim hormonima koji se stvaraju u tijelu, što omogućava bolje reagiranje organizma na lijek i manje nuspojave.
- liječenje boli omogućava komponiranje i izradu magistralnih pripravaka u obliku krema koje sadrže kombinaciju više API-ja različitih mehanizama djelovanja, a ne postoje u obliku krema kao industrijski lijekovi na tržištu.
- dermatologija je uz pedijatrijsku izradu lijekova, najšire i najvažnije područje koje pokriva magistralna izrada, a radi se o lijekovima za liječenje alopecije, akni, psorijaze, rozaceje i slično. Za dermatologiju i izradu topikalnih lijekova poput krema, masti, gelova i pasti, velika je prednost što magistralna izrada omogućava prilagodbu doze i jačine individualno prema kliničkoj slici pacijenta te prilagodbu nosača/podloge prema tipu kože i drugim karakteristikama. Primjerice, postoje podloge koje su prilagođene za izuzetno suhu kožu jer su obogaćene lipidima te podloge koje sadrže biljne ekstrakte i komponente poput alfa-bisabolola, koji imaju protuupalno djelovanje te su pogodne za liječenje vrlo oštećene kože.

Primjeri podloga su brojni i postoji jako puno varijanti od različitih proizvođača. Bez obzira što se podloge smatraju neaktivnim dijelom magistralnih pripravaka, danas su formulirane na način da

svakako mogu dobrim odabirom pomoći liječenju te biti prilagođene tipu kože pacijenta i indikaciji. Pri propisivanju i izradi ovih pripravaka, svakako je ključno kombinirati podloge s API-jima ovisno prema podacima publiciranim u literaturi, preporukama proizvođača u obliku službenih tablica kompatibilnosti i stabilnosti koje daju egzaktnu informaciju koju podlogu je moguće kombinirati s kojim API-jima i u kojem rasponu doza (5).

1.2.1. Genetski testovi i personalizirana izrada lijekova

Personalizirana izrada lijekova prema rezultatima genetskog testiranja danas predstavlja sve popularniji alat za brže i učinkovitije liječenje različitih bolesti. Za primjer se mogu navesti genetski testovi koji analiziraju genom, odnosno 26 genetskih varijacija uključenih u mehanizam pojave alopecije. Rezultati genetskog testa daju preporuku terapije (primjerice losiona, šampona, ulja, kapsula) točno individualno prema nalazu testa koji sugerira najadekvatniju terapiju prema genetskim karakteristikama pacijenta, odnosno odabire API-je koji imaju najveću vjerojatnost za uspješan ishod liječenja i najmanji rizik za pojavu nuspojava (6).

Magistralna izrada je u ovom slučaju jedina opcija izrade lijeka jer omogućava brojne kombinacije API-ja te njihovo individualno doziranje, što je nemoguće dobiti industrijskim lijekom jer ne postoje registrirani lijekovi takvih terapijskih oblika ni tolikog raspona jačina.

Vrlo zanimljiv primjer je odabir minoksidila prema genetskom testu za liječenje alopecije. Minoksidil je lijek koji se koristi za liječenje povišenog krvnog tlaka i lokalno za liječenje alopecije. Mehanizam nije dovoljno razjašnjen, smatra se da širi krvne žile, potiče angiogenezu i djeluje stimulirajuće na folikule dlaka. Za njegovu aktivaciju potrebni su enzimi sulfotransferaze SULT1A1. Njihova aktivnost ovisi o genetskim, ali i okolišnim faktorima. U slučaju da genetski nema dovoljne aktivnosti sulfotransferaze SULT1A1 (što rezultat genetskog testa pokaže), onda je manje stvaranje sulfatiranog aktivnog oblika minoksidila i slabiji učinak, odnosno djelovanje lijeka. U tom slučaju genetski test

sugerira druge API-je koji bi po enzimskoj aktivnosti pacijenta bili bolja opcija za liječenje. Zato je personalizirana medicina i individualizacija terapije budućnost, omogućava brže pronalaženje najadekvatnijeg lijeka, oblika i doze za uspješno liječenje. Stoga je magistralna izrada trenutno najbolji alat za personalizaciju i individualizaciju terapije (7).

Prema podacima HZZO-a iz 2020. godine, svega 1,83 % propisanih lijekova su magistralni pripravci, ali to se odnosi samo na magistralne pripravke s HZZO osnovne i dopunske liste magistralnih pripravaka. Većina personaliziranih magistralnih pripravaka se propisuju na privatni recept, bez refundacije HZZO-a pa izostaje službeni podatak/udio postotka magistralnih pripravaka od svih propisanih lijekova unutar RH, no u spomenutim granama poput pedijatrije i dalje su neizostavni lijekovi i jedina terapijska opcija.

Važno je napomenuti da osim znanja i vještine u izradi magistralnih pripravaka, jako je važno i znanje liječnika koji propisuje ovu vrstu terapije. Propisivanje i izrada magistralnih pripravaka zahtijevaju vrlo blisku i dobru suradnju liječnika i ljekarnika kako bi pacijent dobio lijek koji je personaliziran i najbolja terapijska opcija u tom trenutku. Ako je takav pripravak, osim što je personaliziran i povoljniji od više monokomponentnih industrijskih lijekova, onda ovakav način liječenja svakako predstavlja racionalno propisivanje uz smanjenje troškova liječenja.

1.3. KONTROLA KVALITETE MAGISTRALNIH I GALENSKIH PRIPRAVAKA

1.3.1. Kvaliteta farmaceutskih sirovina i njihova dokumentacija

Kad se govori o kvaliteti magistralnih i galenskih pripravaka, prvi korak obuhvaća kvalitetu farmaceutskih sirovina koje se koriste za njihovu izradu. Zatim se mogu razmatrati uvjeti (oprema i prostor), protokoli i način izrade magistralnih i galenskih pripravaka (potrebni su propisani i jasni postupci), edukacija djelatnika te završna kontrola pripravka prije izdavanja pacijentu.

Sve polazne farmaceutske sirovine koji se koriste u izradi magistralnih i galenskih pripravaka trebaju udovoljavati važećim farmakopejskim normama. Ljekarnički pripravci moraju odgovarati zahtjevima općih monografija pojedinog farmaceutskog oblika, kao i općoj monografiji *Farmaceutski pripravci* (engl. *Pharmaceutical preparations*) u Europskoj farmakopeji (Ph.Eur.), a djelatne i pomoćne tvari koje se koriste u oblikovanju dozirnih oblika moraju udovoljavati zahtjevima pojedinačnih monografija za djelatne i pomoćne tvari korištene u izradi magistralnih i galenskih pripravaka te općoj monografiji *Tvari za farmaceutsku uporabu* (engl. *Substances for pharmaceutical use*) u Ph.Eur.

Važno je spomenuti da je ljekarna odgovorna za sve farmaceutske sirovine koje naručuje i koristi u izradi magistralnih i galenskih pripravaka (3). Stoga je nužno sirovine naručivati samo od pouzdanih dobavljača farmaceutskih sirovina (koji imaju potrebnu certifikaciju poput Dobre proizvođačke prakse i Dobre distribucijske prakse te ostale uvjete) te sirovine koje zadovoljavaju uvjete propisane u monografijama službenih i priznatih farmakopeja.

Prvi korak pri narudžbi farmaceutskih sirovina svakako je provjera dokumentacije sirovine, obaveznih certifikata analize (CoA) i sigurnosno tehničkog lista (STL). Svi analitički parametri u certifikatu analize farmaceutske sirovine moraju odgovarati zahtjevima kvalitete definiranim u njezinoj monografiji u farmakopeji prema kojoj je sirovina deklarirana da zadovoljava zahtjeve kvalitete. Rezultati analiza u certifikatima moraju biti unutar propisanih zahtjeva/parametara specifikacije sirovine. Sigurnosno tehnički list farmaceutske sirovine također s vremenom može proći kroz revizije, a sadrži općenito podatke o rukovanju, skladištenju te prvoj pomoći pri neadekvatnim izlaganjima (udisanju/gutanju, prskanju) sirovina (8).

CoA se izdaje pri svakoj proizvodnji nove serije sirovine i mora se obavezno pregledati i čuvati za svaku seriju farmaceutske sirovine koja se naručuje i zaprima u ljekarnu. On sadrži organoleptičke karakteristike, analitičke parametre poput identifikacije, prisutnih onečišćenja, sadržaja, mikrobiologije, što također ovisi o karakteristikama same supstancije. Prema pravilima, certifikat API-ja mora sadržavati podatak ne samo o dobavljaču/distributeru, nego i samom proizvođaču koji je

proizveo (sintetizirao) API. Moguće je da monografija pojedine supstancije u različitim farmakopejama varira, odnosno da nema jednak raspon zahtjeva, ali je ključno da certifikat analize odgovara monografiji prema kojoj je deklariran da odgovara.

Osim provjere dokumentacije, prilikom zaprimanja sirovine potrebno je i ulaznom analizom potvrditi identitet supstancija, a u praksi se najčešće izvode nepouzdana kemijske reakcije potvrde identiteta. Osim upitne selektivnosti i pouzdanosti, izvođenje reakcija je vremenski zahtjevno, potrebni su kemijski reagensi, a nakon provedenih reakcija potrebno je zbrinjavanje kemijskog otpada i detaljno čišćenje prostora.

Kao alternativa provođenju kemijski reakcija identifikacije postoje modernije i sigurnije opcije potvrde identiteta pomoću instrumentalnih tehnika poput kromatografskih i spektrometrijskih. Spektrometrija u bliskom infracrvenom području (engl. *Near infrared spectrometry*, NIR) tehnika je koja se izdvaja kao pouzdana i lako primjenjiva u ljekarničkom laboratoriju za potvrdu identiteta farmaceutskih supstancija.

Zaključno, potvrda identiteta farmaceutskih sirovina uz provjeru dokumentacije predstavlja ključan korak koji je nužan prije izrade magistralnih i galenskih pripravaka kako bi se samo provjerene farmaceutske supstancije koristile za njihovu izradu.

1.3.2. Stabilnost magistralnih i galenskih pripravaka

Stabilnost pripravaka izrađenih u ljekarni, izuzetno je važan i ključan aspekt njihove kvalitete jer direktno utječe na sigurnost i učinkovitost ovih lijekova. Prema Američkoj farmakopeji (engl *United States Pharmacopeia*, USP), stabilnost lijekova možemo definirati kao vremenski period unutar kojeg lijek zadržava svoje kemijska, fizikalna, farmakološka, mikrobiološka, toksikološka svojstva kao i u trenutku njegove izrade.

Tipovi stabilnosti su sljedeći:

- **kemijska** stabilnost – označava da lijek ne mijenja svoja kemijska svojstva, odnosno da se u propisanom periodu preporučenog roka valjanosti ne odvijaju reakcije koje bi utjecale na njegova kemijska svojstva, poput hidrolize, vrlo česte oksidacije (izlaganje kisiku, držanje lijeka u otvorenoj ambalaži), polimerizacije, fotolize (izlaganju svjetlosti u neadekvatnim spremnicima prilikom skladištenja) i slično. Ostali faktori koji mogu narušiti kemijsku stabilnost su temperatura i pH (parametar koji je iznimno važan u izradi tekućih oblika poput losiona).
- **fizikalna** stabilnost – lijek kroz preporučeni rok valjanosti ne mijenja svoja fizikalna svojstva poput boje, teksture, okusa, mirisa, viskoznosti, topljivosti i slično. Fizikalnu stabilnost mogu narušiti faktori poput temperature, pH, vlage, utjecaja svjetla, interakcija s ambalažom ili interakcija djelatne tvari s ostalim pomoćnim tvarima i slično.
- **mikrobiološka** stabilnost – lijek zadržava svoja mikrobiološka svojstva, odnosno u periodu preporučenog roka valjanosti ne razvijaju se bakterije/mikroorganizmi iznad propisanih granica certifikata analize ili specifikacije. Temperatura, vlaga, pH, odabir konzervansa, sterilizacija i sam postupak aseptičke izrade su ključni za održavanje ovog oblika stabilnosti lijeka.

- **farmakološka** stabilnost – lijek zadržava svoj terapijski učinak kroz preporučeni rok valjanosti. U slučaju narušavanja kemijske ili fizikalne stabilnosti, direktno se utječe i na farmakološko djelovanje lijeka, njegova svojstva te apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju iz organizma.
- **toksikološka** stabilnost – označava da lijek zadržava svoj sigurnosni profil tijekom preporučenog roka valjanosti. U protivnom, toksikološka nestabilnost može rezultirati stvaranjem onečišćenja kao posljedice razgradnje, a nastala onečišćenja mogu izazvati nuspojave ili interakcije s djelatnom tvari i umanjiti učinak lijeka (9).

Da bi se očuvala stabilnost pripravaka koji se izrađuju u ljekarničkom laboratoriju i ne prolaze daljnje regulatorne provjere (od nadležnih regulatornih tijela), izrada magistralnih i galenskih pripravaka uvijek se mora oslanjati isključivo na publiciranu farmaceutsku literaturu, službene prihvaćene farmaceutske izvore poput *Formulae magistrales Croaticae* (10) ili farmakopejskih izvora, primjerice Američka farmakopeja (USP) i Britanska farmakopeja (BP) (11) koje sadrže i monografije farmaceutskih oblika (poput tableta, kapsula, sirupa i slično) određenih API-ja.

U svijetu magistralne izrade vrlo važan izvor protokola izrade je knjiga *Trissel's Stability of Compounded Formulations* (12) te publicirane tablice kompatibilnosti dobavljača farmaceutskih sirovina koje daju smjernice o preporučenoj koncentraciji API-ja, kompatibilnim podlogama te preporučenom roku valjanosti (engl. *Beyond Use Date*, BUD) (13) izrađenih lijekova te ostale formularije i protokole izrade.

Važno je napomenuti da se za pakiranje i izdavanje lijeka uvijek koristi preporučena ambalaža (plastika poput polietilena (engl. *Polyethylene*, PE), polietilena visoke gustoće (engl. *High Density Polyethylene*, HDPE), tamno staklo) koja je preporučena prema farmaceutskim protokolima jer adekvatna ambalaža također osigurava rok valjanosti i sprječava neželjene reakcije između lijeka i ambalaže čime mogu nastati onečišćenja te doći do narušavanja stabilnosti lijeka. Tamno staklo je važno radi zaštite lijeka od izloženosti svjetlu koje može razgraditi fotosenzitivne lijekove.

Pri izradi sirupa, gotove podloge za sirupe odabiru se ovisno o dobi pacijenta (za nedonošćad postoje podloge za sirupe bez konzervansa), ovisno o karakteristikama API-ja i njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima (postoje podloge za sirupe puferirane na različite pH vrijednosti). Vrlo je važno držati se koncentracija sirupa koje su preporučene studijama stabilnosti i farmaceutskim protokolima. Nije dozvoljeno izrađivati veću koncentraciju sirupa od publicirane, jer se ne može garantirati fizikalno-kemijska stabilnost i adekvatan učinak takvog lijeka.

Postoje poglavlja primjerice u USP koja daju općenite smjernice izrade primjerice nesterilnih (USP <795>), sterilnih (USP <797>) te opasnih magistralnih pripravaka (USP <800>). Ako stabilnost odnosno preporučeni rok valjanosti nije naveden u protokolima, svako navedeno poglavlje za određenu skupinu magistralnih pripravaka specificira općeniti preporučeni rok valjanosti (BUD), za određeni tip/oblik magistralnog pripravka prema dostupnoj i najnovijoj znanstvenoj literaturi, podacima proizvođača ili prema odrađenim analitičkim ispitivanjima.

BUD je vrijeme nakon kojeg se lijek ne smije koristiti i određuje se od dana izrade lijeka (primjerice 3 mjeseca od datuma izrade).

Stabilnost zahtjeva neprestano praćenje novih studija publiciranih u znanstvenoj literaturi, korištenje specijaliziranih podloga, punila i ostalog prema najnovijim farmaceutskim smjericama i preporukama, kako bi pripravci izrađeni u zdravstvenim ustanovama bili ispravni, djelotvorni i što bolje kvalitete (9,12).

1.3.3. Ulazna i završna kontrola kvalitete

Ulazna kontrola farmaceutskih sirovina obuhvaća obaveznu provjeru certifikata analize kojim se garantira deklarirana kvaliteta u roku valjanosti te provjeru dokumentacije sirovina. Potpuna ulazna kontrola farmaceutskih sirovina koje se koriste u izradama magistralnih i galenskih pripravaka

obuhvaća provjeru svih parametara certifikata (ispitivanje izgleda, identifikaciju, određivanje sadržaja, kvalitativna i kvantitativna ispitivanja onečišćenja).

Međutim, postupak utvrđivanja sukladnosti kakvoće farmaceutske sirovine s unaprijed postavljenim zahtjevima kakvoće, a koji je temeljen na laboratorijskoj provjeri, obuhvaća i analitička ispitivanja koja zahtijevaju složene instrumentalne tehnike nedostupne u zdravstvenim ustanovama koje bi provele provjeru kvalitete farmaceutskih sirovina. Primjerice, osim identifikacije, od ostalih parametara koji se provjeravaju u kontroli kvalitete značajna je provjera onečišćenja. Kao primjer može se navesti provjera onečišćenja etanola 96%-tnog s metanolom, alkoholom vrlo sličnog sastava koji je vrlo otrovan i čije konzumiranje može imati ozbiljne posljedice na zdravlje. Prema zahtjevu farmakopejske monografije provjera onečišćenja metanolom u etanolu 96%-tnom se provodi plinskom kromatografijom (engl. *Gas Chromatography*, GC) što nije primjenjivo u ljekarništvu pa se u praksi puno češće koriste jednostavnije razlučne kemijske reakcije ili provjera bojenjem plamena. Takva provjera u praksi je brza i jednostavna, no ona nije pouzdana i potreban je veliki oprez prilikom njenog izvođenja i tumačenja rezultata ispitivanja.

Završna kontrola izrađenih magistralnih i galenskih pripravaka u Republici Hrvatskoj nije jasno definirana odgovarajućim propisima koji utvrđuju stupanj provjere kakvoće pripravaka koji se izrađuju u ljekarnama. Postoje opće monografije određenih farmaceutskih oblika u farmakopejama (Hrvatska farmakopeja, HRF 6.3, Ph.Eur., USP,) koje definiraju zahtjeve i analitička ispitivanja za svaki pojedini farmaceutski oblik (14-16). Opseg provjere ljekarničkih pripravaka nakon izrade i prije izdavanja određenog farmaceutskog oblika definiran je i u općoj monografiji *Farmaceutski pripravci* u Ph.Eur. U njoj su navedena ispitivanja primjenjiva na većinu pripravaka, uključujući ispitivanje izgleda, potvrdu identiteta, ispitivanje čistoće, ujednačenost sadržaja i određivanje sadržaja (djelatnih i specifičnih pomoćnih tvari npr. konzervansa, antioksidansa). U završnoj kontroli magistralnog pripravka može se provjeriti izgled, boja, miris, homogenost, pH, gustoća, konačna količina izrađenog lijeka/zapremnina.

Prema Pravilniku o provjeri kakvoće lijeka, provjeru kakvoće galenskih pripravaka iz prometa obavlja Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) na zahtjev farmaceutske inspekcije (17). Kakvoću galenskog pripravka HALMED provjerava prema farmakopejskim i drugim međunarodno prihvaćenim normama. Prema tom Pravilniku HALMED obavlja i izvanrednu provjeru kakvoće uslijed neuobičajenih pojava ili sumnji u kakvoću, odnosno krivotvorinu lijeka ili galenskog pripravka.

Važno je napomenuti da, kao pomoć našem ljekarništvu zbog manjka propisa, neobvezujući dio HRF sadrži prijevode poglavlja BP koji se odnose na pripravke koji ne podliježu odobravanju, izrađene u Ljekarni, s obzirom da Velika Britanija ima detaljnije razrađenu ljekarničku regulativu.

Budući da magistralni pripravci ne prolaze daljnje kontrole vanjskih tijela (osim u slučaju inspekcija i nasumičnih provjera nadležnih regulatornih tijela), završna analitička ispitivanja unutar ljekarničkog laboratorija jako su važna kako bi Ljekarna bila sigurna u ispravnost pripravka prije izdavanja. Stoga je potrebno raditi na uspostavljanju ljekarničkih sustava kvalitete, regulatornom uređivanju (izmjeni i dopuni) zakona i propisa, definiranjem strožih uvjeta izrade i izdavanja magistralnih pripravaka.

U laboratoriju ZU Ljekarna Marušić, provode se ispitivanja nekih parametara u završnoj kontroli magistralnog pripravka, poput testa ujednačenosti mase kapsula, provjere pH (losioni, vaginalne kreme), određivanje gustoće suspenzije, kontrola dobivene mase izrađenog pripravka, organoleptička ispitivanja (boja, izgled, miris, tekstura). Analitički podaci završne kontrole čuvaju se u sklopu protokola izrade lijeka, kako bi dokumentirani podaci o samom lijeku bili pohranjeni te dostupni za usporedbu prilikom sljedeće izrade istog magistralnog pripravka. Dokumentiranje i pohranjivanje protokola izrade i podataka o završnoj kontroli dio su internog sustava kvalitete ZU Ljekarna Marušić i važna karika za očuvanje sljedivosti podataka.

1.3.4. Publicirane studije o kontroli kvalitete magistralnih i galenskih pripravaka

Iz samog područja magistralne i galenske izrade, nema puno objavljenih znanstvenih ni stručnih radova koji obrađuju analitičke metode namijenjene završnoj provjeri kvalitete lijeka izrađenom u ljekarničkom ili galenskom laboratoriju, ili općenito za određivanje sadržaja i ispitivanje onečišćenja u magistralnim i galenskim pripravcima.

Jedan od primjera je rad Raggi i sur. koji opisuje razvoj novih metoda primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i linearno skenirajuće voltometrije (LSV) za određivanje sadržaja melatonina u galenskom pripravku u obliku tableta. Obje metode su pokazale dobre izvedbene značajke za završnu kontrolu i određivanje sadržaj melatonina u galenskom pripravku, LSV kao brža, a HPLC osjetljivija metoda (18).

U radu Bettiol i sur. obrađena je varijabilnost u koncentracijama kanabidiola, kanabinola, tetrahidrokanabinola i tetrahidrokanabinolne kiseline među različitim magistralnim pripravcima (uljima) proizvedenim u različitim galenskim laboratorijima. Tehnika kojom su određivani kanabinoidi je također HPLC. Dokazana kvantitativna varijabilnost kanabinoida u magistralnim pripravcima može utjecati na učinkovitost i sigurnost primjene pripravka. Kako bi svi pripravci bili jednakog sadržaja aktivnih tvari te omogućili terapijski kontinuitet kod pacijenta, potreban je standardizirani protokol izrade kojeg bi se svi laboratoriji pridržavali (19).

U stabilitetnoj studiji oralne suspenzije idebenona u Syrspendu, razvijena je vrlo osjetljiva i robusna metoda ultra visoko učinkovita tekućinska kromatografija s elektrosprej ionizacijom i tandemskom masenom spektroskopijom (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*, UHPLC-ESI-MS/MS) za kvantifikaciju idebenona u pripremljenoj suspenziji, u određenim vremenskim točkama. Određivan je sadržaj idebenona u tri suspenzije (koncentracija 50 mg/mL, 100 mg/mL i 150 mg/mL), u vremenu 0 (od vremena pripreme $t=0$), nakon 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90 dana suspenzija čuvanih i na sobnoj temperaturi i u hladnjaku.

Unatoč različitoj početnoj koncentraciji, studija je potvrdila da suspenzije imaju stabilnost 60 dana te da su u skladu sa zahtjevom talijanske farmakopeje (tal. *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana XII edition*, F.U.I XII) (20).

Magistralni lijekovi osim u javnom ljekarništvu, često su jedini izbor i pri bolničkom liječenju. Izrada sirupa i kapsula u bolničkoj ljekarni također zahtjeva provjeru stabilnosti prema relevantnoj i provjerenoj službenoj literaturi. Ovaj članak prikazuje presjek i daje informacije o stabilnosti najčešćih lijekova koji se izrađuju u obliku sirupa u bolnici (primjerice furosemid, metoprolol, varfarin), tehnikom HPLC-a (21).

Bolničkim ljekarnama i liječnicima za pravilno doziranje i primjenu onkološke terapije, nužan je podatak o stabilnosti pripremljenih otopljenih i razrijeđenih citostatika. Informacije o stabilnosti i preporučenom roku valjanosti od strane proizvođača citostatika su često limitirane, stoga rad Vigneron i sur. ukazuje na važnost i potrebu provođenja studija stabilnosti pripremljenih citostatika u bolničkoj ljekarni, kako bi imali što više informacija o samom lijeku te kako bi primjena lijeka bila sigurnija i uspješnija (22).

1.3.5. Procjena rizika izrade i potreba za osiguranjem kvalitete

Prvi korak prilikom zaprimanja liječničkog recepta za izradu magistralnog pripravka, svakako je detaljna provjera recepta koja uključuje:

- provjera postoji li takav lijek kao **registrirani industrijski lijek** ili lijek dostupan iz **uvoza** (u tom slučaju ljekarne zakonski ne smiju izraditi lijek nego ponuditi registrirani industrijski lijek)
- provjeru dostupnosti **supstancija** za izradu i jesu li odgovarajuće farmaceutske kvalitete
- provjeru propisane **doze**
- provjeru **kompatibilnosti** sastavnica magistralnog pripravka

- provjeru **protokola izrade pripravka** (može li se lijek izraditi u propisanom farmaceutskom obliku)
- provjera **preporučenog roka valjanosti** magistralnog pripravka (terapija mora biti osigurana za period valjanosti magistralnog pripravka).

U slučaju da se radi o lijeku koji zahtjeva posebnu opremu za izradu, rukovanje s opasnim supstancijama (engl. *Hazardous drugs*, HD), ili je primjerice lijek jakog djelovanja, prema Rezoluciji CM/Res(2016)1 koja će biti opisana u sljedećem poglavlju, preporuka je napraviti procjenu rizika (engl. *Risk assessment*) izrade lijeka. Metodologija uzima u obzir vrstu pripravka, broj izrađenih jedinica (u slučaju da se radi o izradi više pripravaka ili serija), farmakološki učinak, način izrade i isporuku ljekarničkog pripravka. Svakom navedenom kriteriju može biti dodijeljen faktor rizika u rasponu od 1 do 5. Množenjem dodijeljenih faktora rizika dobiva se broj koji ukazuje na nivo kvalitete/zaštite koji je potreban za pravilnu i sigurnu pripremu propisanog pripravka (23).

Jedan od najtežih zabilježenih slučajeva trovanja s ozbiljnim posljedicama i smrtnim ishodom, vezan za pripravke izrađene u ljekarni, dogodio se u Sjedinjenim Američkim Državama u listopadu 2012. godine kada je ljekarna u Massachusettsu distribuirala izrađeni pripravak (injekcije metilprednizolon acetata) koje su bile kontaminirane te izazvale oboljenje 753 pacijenta od gljivičnog meningitisa i uzrokovale smrt više ljudi (24). U SAD-u ljekarne koje izrađuju visoko rizične lijekove poput sterilnih pripravaka posebno su opremljene i imaju posebne dozvole od strane National Association of Boards of Pharmacy (NABP) i moraju zadovoljavati dodatne propisane uvjete opreme, prostora, edukacije osoblja i slično. Međutim ovaj slučaj, kao najgori primjer s tragičnim ishodom, pokrenuo je javnu raspravu o potrebi bolje regulacije i nadzora nad pripravcima koji se izrađuju u ljekarničkim laboratorijima jer oni ne prolaze kontrolu Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and drug administration*, FDA) prije stupanja na tržište odnosno izdavanja pacijentu.

U Republici Hrvatskoj zakonski nije dozvoljeno distribuiranje i slanje magistralnih pripravaka direktno pacijentima, a također se u ljekarnama još uvijek ne izrađuju sterilni pripravci visokog rizika.

1.3.6. Sustav kvalitete u ljekarničkom laboratoriju

Kao što je spomenuto, bolja i stroža regulativa te izgradnja i definiranje sustava kvalitete u ljekarničkom laboratoriju, ključno je uvesti u budućnosti i razraditi kako bi kvaliteta magistralnih i galenskih pripravaka bila neupitna. Uspostavljanje i kontroliranje sustava kvalitete za lijekove dosta je složeno, ali je jasno definirano.

Općenito, sustav kvalitete možemo definirati kao skup pravila, postupaka, procesa i resursa koji se koriste za osiguranje kvalitete proizvoda, u ovom slučaju magistralnih pripravaka. Sustav kvalitete temelji se na međunarodno priznatim normama (primjerice neke od ISO normi), koje definiraju zahtjeve koje organizacija mora udovoljavati kako bi se uspostavila i održavala prihvatljiva kvaliteta, smanjili troškovi, povećala učinkovitost (25).

U Republici Hrvatskoj se službeno za kontrolu kvalitete lijekova koristi HRF koja je u skladu sa zahtjevima Ph.Eur., no monografije i dijelovi USP mogu se koristiti kod uvoza lijekova iz SAD-a ili ako monografije nekih supstancija nisu dostupne u HRF i Ph.Eur. Zatim, Ph.Eur. ne sadrži općenita poglavlja i smjernice o uspostavljanju sustava kvalitete u ljekarni, kao primjerice USP.

Za osiguranje kvalitete i izradu ljekarničkih pripravaka najvažnije je poglavlje u USP <1163> Quality assurance in pharmaceutical compounding, koje općenito govori o osiguranju kvalitete (engl. *Quality Assurance*, QA) pri izradi ljekarničkih pripravaka te vrlo jasno i lijepo opisuje sve općenite aspekte ključne za izgradnju sustava kvalitete, a obuhvaćaju:

- trening/edukaciju osoblja - propisane edukacije i potvrde da je osoblje odgovarajuće osposobljeno te periodično osvježavanje i ponavljanje edukacija
- standardne operativne procedure (SOP) - raspisane procedure koje definiraju točno kako se obavljaju određeni zadaci u ljekarničkom laboratoriju, vezano za same izrade magistralnih i galenskih pripravaka, jasno raspisan način na koji se obavlja izrada, tko je obavlja, uz koju

opremu te tko je u konačnici odgovorna osoba. Potrebno ih je redovno revidirati i ažurirati u slučaju izmjena procedura

- dokumentaciju – poput *in-house* studija stabilnosti ili sterilnosti
- verifikaciju – redovno održavanje uređaja po preporuci proizvođača, primjerice redovno ovjeravanje analitičkih vaga što je zakonska obveza u RH svake 2 godine
- analitička ispitivanja – završna analiza pripravaka, ovisno o tipu pripravka, prema mogućnostima i dostupnoj opremi
- skladištenje – tip ambalaže (HDPE, PE, staklo), zahtjevi temperature/vlage, zaštita od svjetla i slično
- ispitivanje fizikalnih parametara – poput pH vrijednosti, test ujednačenosti mase kapsula
- mikrobiološko ispitivanje – ispitivanje sterilnosti, endotoksina, ispitivanje učinkovitosti konzervansa i slično
- čišćenje, dezinfekcija i sigurnost izrade
- ambalažu, označavanje signatura i skladištenje (u RH je izgled signature magistralnog pripravka zakonski propisan, Zakon o lijekovima definira boju signature te sve podatke koje signatura obavezno mora sadržavati) (1).
- *outsourcing* – nije primjenjivo u našoj regulativi, odnosi se na prodavanje magistralnih pripravaka među ljekarnama i sve potrebno od dokumentacija
- odgovorna osoba – dokumentacijom i ažuriranjem dokumentacije bavi se odgovorna osoba koja ima dovoljno iskustva, koja je educirana i specijalizirana za područje magistralne izrade (26).

Ovo poglavlje može biti odlična smjernica za izgradnju vlastitog sustava kvalitete dok god ne postoje službene preporuke ili pravilnici na ovu temu.

1.4. REGULATORNI ASPEKTI KONTROLE KVALITETE LJEKARNIČKIH PRIPRAVAKA

1.4.1. Zakonska regulativa magistralnih i galenskih pripravaka u Republici Hrvatskoj

Kao što je već opisano, magistralni i galenski pripravci pripadaju skupini lijekova izrađenih u ljekarni koji ne prolaze strogu kontrolu kvalitete i registraciju kao industrijski lijekovi. Izuzeti su od izdavanja odobrenja za stavljanje u promet lijekova te kao iznimka ne podliježu Direktivi 2001/83/EZ koja regulira industrijske lijekove (27).

Svaka ljekarna ima obavezni prostor laboratorija (28) te može izrađivati magistralne i galenske pripravke, što znači da za razliku od industrijskih gotovih lijekova, za njihovu izradu i izdavanje nisu potrebne posebne proizvodne dozvole od strane HALMED-a.

Zakon o lijekovima, članak 3. definira da galenski pripravak izrađen u ljekarni mora biti izrađen u skladu s normama dobre prakse za galenske laboratorije (1).

Prema Pravilniku o normativima i standardima za obavljanje zdravstvene djelatnosti, minimum laboratorijske opreme više ne prati današnju moderniju tehnologiju i mogućnosti u unapređenju tehnologije, prostora, opreme i zaštite osobe koja izrađuje pripravak. Također ne definira detaljno potrebnu zaštitnu opremu koju je nužno koristiti zbog zaštite samog operatera, ali i očuvanja kvalitete pripravka pripremljenog u ljekarničkom laboratoriju, a oprema ovisi o samom tipu pripravka koji se izrađuje, primjerice parenteralne otopine u bolnici ili slični sterilni pripravci zahtijevaju dodatnu zaštitu i dodatnu opremu (28).

Važno je napomenuti da članak 17. spomenutog Pravilnika definira da ljekarna mora imati opremu kojom će napraviti identifikaciju farmaceutskih sirovina, dakle prema tome potvrda identiteta supstancija u ljekarnama bila bi zakonska obveza.

Zakon o lijekovima definira odredbe o provjeri kakvoće koje se odnose i na galenske pripravke koji moraju zadovoljiti zahtjeve za kakvoću, sigurnost i djelotvornost propisane Zakonom o lijekovima i

podzakonskim aktima (1). Nadalje, Pravilnik o provjeri kakvoće lijeka definira da u RH regulatorno tijelo HALMED provodi provjeru kvalitete galenskih pripravaka prema farmakopeji i međunarodno priznatim normama u slučaju provjere kvalitete lijeka iz prometa i izvanredne provjere kvalitete lijeka. Nalaz o provedenoj provjeri kvalitete galenskog pripravka iz prometa ili u slučaju izvanredne provjere kvalitete dostavlja ljekarni koja je izradila galenski pripravak (17).

U Pravilima dobre ljekarničke prakse, u Članku 24. definirano je da magistralni i galenski lijek mora biti izrađen prema smjernicama Dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacturing practise*, GMP) te također definira da moraju zadovoljavati službene propise poput farmakopeje (3).

GMP se definira kao skup smjernica ili standarda koji se primjenjuju za proizvodnju farmaceutskih sirovina i gotovih lijekova. Osigurava da proizvođači lijekova (gotovih industrijskih lijekova) postave i razviju sustav osiguranja kvalitete kojim osiguravaju da su odobreni lijekovi proizvedeni konzistentno te strogo kontrolirano prema standardima kvalitete. GMP pokriva sve aspekte proizvodnje lijeka, od ulaznih sirovina, postupka proizvodnje, laboratorijsku opremu, edukaciju djelatnika, zaštitnu opremu (engl. *Personal protective equipment*, PPE) i slično. Regulatorno tijelo u Europskoj Uniji, Europska agencija za lijekove i medicinske proizvode (EMA) određuje da svi proizvođači lijekova obavezno moraju slijediti GMP smjernice (27). Lokalna regulatorna tijela, u Republici Hrvatskoj to je HALMED, kontrolira proizvođače lijekova udovoljavaju li zahtjevima spomenutih GMP smjernica te im izdaje proizvodnu dozvolu. Za magistralne pripravke nije potrebna proizvodna dozvola i GMP smjernice nisu usmjerene i prilagođene magistralnoj i galenskoj izradi pripravaka u ljekarnama ili primjerice bolničkim ljekarnama (1,29).

Kako bi se premostile razlike u kvaliteti i sigurnosti između lijekova izrađenih u ljekarnama i industrijski proizvedenih lijekova koji prolaze puno strožu kontrolu i zahtjeve, a pritom zaštitila sigurnost pacijenta, u Europskoj Uniji od strane Odbora ministara Vijeća Europe 9. studenog 2011. godine donesena je Rezolucija CM/Res(2011)1. Ona još uvijek ne predstavlja pravno obvezujući akt za

zemlje potpisnice, ali se preporuča njeno provođenje na nacionalnoj razini što predstavlja važan korak prema harmonizaciji standarda sigurnosti i kvalitete ljekarničkih pripravaka.

1.4.2. Rezolucija CM/Res(2016)1 i PIC/S-ov Vodič dobre preparativne prakse

Rezolucija daje smjernice o ujednačavanju normi vezano za osiguranje kvalitete i sigurnost pripravaka izrađenih u ljekarni za posebne potrebe pacijenata, međutim izrada ovakvih pripravaka podliježe i nacionalnim zakonima/uredbama, u kojima kako je spomenuto, postoje značajne razlike. Rezolucija utvrđuje načela osiguranja kvalitete u cijelom procesu izrade magistralnih i galenskih pripravaka, daje smjernice za upravljanje kvalitetom, definira zahtjeve za prostor i opremu, dokumentaciju, očuvanje kontrole kvalitete, rješavanje pritužbi, reklamacija, povlačenje lijeka, mehanizme samoprovjere. Rezolucija također potiče razmjenu informacija, vrijednih iskustava iz prakse, međusobno između ljekarnika, ali i regulatornih tijela vezanih uz regulativu ovih pripravaka.

Važno je spomenuti da su svoj doprinos izradi rezoluciji kroz savjetovanje pružili i Međunarodna farmaceutska federacija (engl. *International Pharmaceutical Federation*, FIP) i Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO).

Nova verzija CM/Res(2016)1 potvrđena je 1. lipnja 2016. od strane Odbora ministara vijeća Europe (23). Rezolucija preporuča vodič dobre preparativne prakse za izradu lijekova u zdravstvenim ustanovama (PIC/S GPP) koji sadrži smjernice izrade lijekova u ljekarni (za pripravke niskog rizika, visokorizični pripravci i dalje su pod preporukama GMP-a), a odnosi se na lijekove za humanu i veterinarsku upotrebu, ne uključuje kozmetičke pripravke. Vodič ističe da se GMP smjernice ne mogu primijeniti na izradu malih serija u javnim i bolničkim ljekarnama te uvodi pojam GPP za izradu pripravaka u ljekarnama. U vodiču se koriste različiti izrazi: priprema (engl. *preparation*) za izradu lijekova u ljekarnama i proizvodnja (engl. *manufacturing*) koji se odnosi na industrijsku proizvodnju lijekova.

Vodič dobre preparativne prakse strukturiran je poput GMP-a, ali je prilagođen ljekarničkoj izradi te izradi u manjim serijama. Rezolucija također ističe kako je ljekarna u potpunosti odgovorna za kvalitetu supstancija koje naručuje, a prije narudžbe mora provjeriti certifikat analize supstancije koji mora odgovarati zahtjevima monografije Ph.Eur. ili druge važeće farmakopeje. Osim provjere dokumentacije, potrebno je i ulaznom analizom potvrditi identitet supstancije koja se u praksi najčešće izvodi nepouzdanim kemijskim reakcijama potvrde identiteta. Vodič dobre preparativne prakse izdan je od strane PIC/S-a (engl. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme, PIC/S), shema suradnje farmaceutskih inspekcija, međunarodne organizacije koja okuplja nadležna tijela za inspekciju lijekova iz više od 50 zemalja.

PIC/S je izdao i najnoviju verziju Vodiča za dobru proizvođaču praksu (PE-009-17, stupila je na snagu 25. kolovoza 2023. godine) koji je namijenjen proizvođačima lijekova, nadležnim tijelima, ispitivačima/inspektorima i slično, promiče suradnju i usklađenost u području GMP-a, a sastoji od četiri dijela:

- Dio I – Osnovna načela dobre proizvođačke prakse
- Dio II – Osnovna načela dobre proizvođačke prakse za aktivne farmaceutske supstancije
- Dio III – Dodatne smjernice za dobru proizvođačku praksu
- Dio IV - Dodatne smjernice za dobru proizvođačku praksu za ispitivane lijekove

Neke dijelovi tog PIC/S-ovog vodiča koji se tiču magistralne i galenske izrade su sljedeći:

- Prilog 1. revidiran, sadrži smjernice za očuvanje aseptičkih uvjeta i sprječavanje kontaminacije tijekom proizvodnje sterilnih lijekova što može biti primjenjivo na magistralne pripravke koji se primjenjuju injekcijom ili infuzijom.
- Prilog 13. odnosi se na proizvodnju istraživačkih lijekova, sadrži smjernice za osiguranje kvalitete lijekova koji se koriste u istraživačke svrhe, što može biti relevantno i za magistralne pripravke koji se koriste u istraživačke svrhe (30).

Hrvatska je članica PIC/S-a od siječnja 2013. godine, kada je ispunila sve potrebne uvjete, kao što je usklađivanje zakonodavstva i sudjelovanje u zajedničkim inspekcijama.

1.4.3. Usporedba s regulativom SAD-a

Regulativa izrade magistralnih pripravaka u SAD-u je kompleksno pitanje koje uključuje više regulatornih tijela uz FDA. Magistralni pripravak nije odobren od strane FDA-a, što znači da FDA ne provjerava njihovu sigurnost, učinkovitost, kvalitetu prije izdavanja svakom pacijentu (što bi operativno bilo nemoguće, prije svega jer su ovo pripravci koji se izrađuju *ex tempore*, neposredno prije izdavanja). No, regulatorno FDA smije provoditi inspekciju u ljekarnama koje se bave magistralnom izradom te ih sankcionirati u slučaju kršenja Saveznog zakona o hrani, lijekovima i kozmetici (engl. *Federal Food, Drug and Cosmetic Act*) ili svojim radom predstavljaju rizik/ugrozu općem zdravlju i sigurnosti populacije.

Postoje dva tipa ljekarni/magistralnih laboratorija:

- 503A ljekarne koje izrađuju magistralne pripravke (engl. *Compounding pharmacies*), slično regulatorno kao i u RH, nisu podložne strogim zahtjevima kao proizvođači lijekova, ne moraju imati FDA odobrenje za svaki izrađeni pripravak, ali moraju zadovoljiti određene uvjete da bi bile izuzete tih zahtjeva, a opet osigurale kvalitetan i ispravan lijek
- 503B ljekarne su poput *outsourcing* objekata, ljekarne koje izrađuju lijekove za bolnice, kliničke centre i zdravstvene ustanove, mogu proizvoditi veće serije (količine lijeka) te moraju zadovoljavati puno strože standarde kvalitete i sigurnosti (31).

U perspektivi sukladno tomu, za izradu zahtjevnijih i rizičnijih lijekova i u RH bi bilo bolje zakonski definirati uvjete i registrirati bolje opremljene ljekarne s laboratorijima koji bi imali redovne kontrole HALMED-a te dozvolu za distribuciju svojih magistralnih i galenskih pripravaka drugim ljekarnama.

Često manje ljekarne u manjim gradovima nisu uvijek u mogućnosti (financijski, osobljem) imati najmoderniju i najnoviju opremu, pohraniti farmaceutske sirovine za izradu magistralnih pripravaka (koje mogu ovisno o indikaciji imati nizak obrtaj i biti neisplative). Distribuiranje iz opremljenih ljekarničkih laboratorija riješilo bi taj problem te bi na taj način bila puno bolja kontrola i veća sigurnost izrade i izdavanja takvih ljekarničkih pripravaka.

1.5. POTVRDA IDENTITETA FARMACEUTSKIH SUPSTANCIJA

Kao što se naglašava u cijelom uvodnom dijelu, kvaliteta lijeka mora biti neupitna, prije svega radi sigurnosti pacijenta, ali i povjerenja u magistralnu i galensku izradu pripravaka. Jedan od važnih čimbenika je i potvrda identiteta supstancija prilikom zaprimanja u ljekarnu odnosno ljekarnički laboratorij.

Ljekarna je u potpunosti odgovorna za kvalitetu farmaceutskih supstancija koje naručuje. Stoga, osim što se može osloniti na kvalitetu i povjerenje kvalificiranih dobavljača farmaceutskih sirovina, s kojima može imati i sklopljen ugovor o kvaliteti kao dodatnu garanciju ispravnosti sirovina, mora se oslanjati i na vlastiti sustav kvalitete i ulaznu kontrolu farmaceutskih sirovina.

Osim spomenutih poglavlja o sustavu kvalitete i općim zahtjevima za određene farmaceutske oblike, farmakopeje sadrže monografije pojedinačnih farmaceutskih supstancija s definiranim zahtjevima njihove kvalitete i opisanim analitičkim metodama za analizu svakog parametra opisanog u zahtjevu kvalitete. Dakle, monografija farmaceutske supstancije sadrži podatke o njezinim karakteristikama, izgledu, potvrdi identiteta, ispitivanju čistoće, uključujući i mikrobiološka onečišćenja (ako je primjenjivo), stabilnosti te određivanju sadržaja.

Potvrda identiteta je prvi korak u farmakopejskoj kontroli kakvoće djelatnih i pomoćnih tvari, a predstavlja i zakonsku obavezu. Ispitivanja navedena u ulomku farmakopejske monografije pod

naslovom *Identifikacija* nisu predviđena za punu potvrdu kemijske strukture, odnosno strukturnu karakterizaciju, već se njima potvrđuje da ispitivana supstancija odgovara deklariranom opisu, to jest da se radi uistinu o deklariranoj farmaceutskoj sirovini propisane kvalitete, da nije krivotvorena ili kontaminirana.

1.5.1. Analitičke tehnike za potvrdu identiteta

Potvrda identiteta se prema propisima Ph.Eur. u određenim monografijama farmaceutskih supstancija može provesti izborom postupka prve ili druge identifikacije pa je u tim monografijama poglavlje identifikacije podijeljeno na *Prvu identifikaciju* (engl. *First identification*) i *Drugu identifikaciju* (engl. *Second identification*). Ispitivanja provedena u postupcima prve identifikacije mogu se koristiti za identifikaciju u svim okolnostima, dok se ispitivanja provedena u postupcima druge identifikacije mogu koristiti u ljekarnama pod uvjetom da se može pokazati da je tvar ili pripravak u potpunosti sljediv do serije za koju je potvrđeno da udovoljava svim drugim zahtjevima u monografiji, odnosno što osigurava da ispitivana tvar potpuno odgovara opisu na certifikatu analize proizvođača. Propisivanjem postupaka prve i druge identifikacije Ph.Eur. daje mogućnost odabira između analitičkih metoda koje zahtijevaju složenu instrumentaciju i drugih, jednostavnijih metoda (32).

Različite analitičke tehnike kojima se može potvrditi identitet, ovisno o vrsti i svojstvima farmaceutske sirovine te opremi koju laboratorij posjeduje su:

- **kemijske reakcije** – postupak kojim se potvrđuje identitet supstancije provođenjem selektivne kemijske reakcije s reagensima pri čemu nastaju produkti karakteristične boje, izgleda, stvaranje taloga, oslobađanje topline i slično. U RH se i dalje većinom potvrda identiteta supstancija u ljekarništvu provodi kemijskim reakcijama što nije do kraja pouzdana metoda.

- **fizikalne metode** – parametri kao što su gustoća, talište, vrelište, krutište, indeks loma, viskoznost, optička rotacija ili pH vrijednost otopine ispitivanog uzorka, mogu biti vrlo jednostavna i jeftina opcija potvrde identiteta. Međutim postoje ograničenja, primjerice gustoća varira ovisno o promjeni temperature i tlaka što može utjecati na mjerenje, a također mnoge tekuće supstancije imaju sličnu gustoću. Isto vrijedi i za talište, mnoge čvrste supstancije imaju slične vrijednosti, koje mogu i varirati ovisno o proizvodnoj seriji supstancije uslijed različitog kristalnog oblika. Stoga, određivanje fizikalne konstante u svrhu potvrde identiteta može biti samo dodatni parametar u identifikaciji farmaceutske supstancije uz primjenu pouzdanije instrumentalne tehnike poput spektroskopije i kromatografije.
- **titrimetrijske metode** – odabir metode (primjerice neutralimetrijske ili kompleksometrijske titracije) ovisi o tipu supstancije koja se analizira, a osim što može potvrditi njezin identitet, titracija je i kvantitativna metoda kojom se može odrediti sadržaj analizirane supstancije. Titrimetrijskim metodama određuju se i karakteristični kemijski brojevi poput kiselinskog, hidroksilnog, esterskog, saponifikacijskog i jodnog broja, koji se koriste za potvrdu identiteta velikog broja pomoćnih tvari.
- **kromatografske tehnike** – vrlo važne za identifikaciju na temelju vremena zadržavanja farmaceutske supstancije koje ovisi o njezinim fizikalno-kemijskim karakteristikama. Također, one su i kvantitativne metode kojima se može odrediti sadržaj analita, ali i njihovih onečišćenja jer su separacijske tehnike, a uključuju:
 - HPLC za analizu čvrstih (otopljenih u otapalu) i tekućih analita, kao što su primjerice lijekovi, proteini, ugljikohidrati, konzervansi i slično.
 - GC koja se koristi za analizu farmaceutskih supstancija koje su lako hlapljive (ili se mogu prevesti u plinovito stanje bez razgradnje) i termostabilne, primjerice eterična ulja, alkoholi, esteri, ketoni, aldehidi i slično.

-tankoslojnu kromatografiju (engl. *Thin-layer chromatography*, TLC) brzu i jednostavnu metodu koja se često koristi za identifikaciju farmaceutskih supstancija na temelju njezine interakcije sa stacionarnom fazom, Rf vrijednosti, kao i razvoja boje sa specifičnim reagensnom u svrhu vizualizacije kromatograma.

-kombinaciju tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (engl. *Liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) koja omogućava paralelno razdvajanje sastavnica uzorka i pouzdanu identifikaciju farmaceutskih supstancija na temelju njihovih masenih spektara.

- **spektroskopske tehnike** – temelje se na mjerenju spektra elektromagnetskog zračenja koje apsorbira, emitira ili raspršuje neka tvar. Osim za kvalitativnu analizu (identifikaciju) koriste se i za kvantitativnu analizu (određivanje sadržaja), provjeru čistoće i slično. Većinom su *fingerprint* tehnike jer svaka molekula ima specifičan spektar.

Neki od primjera spektroskopskih tehnika koje su zastupljene u monografijama farmakopeje su:

-infracrvena apsorpcijska spektrometrija (engl. *Infrared Spectroscopy*, IR)

-bliska infracrvena spektrometrija (NIR)

-ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektrometrija (engl. *Ultraviolet Visible Spectroscopy*, UV-VIS)

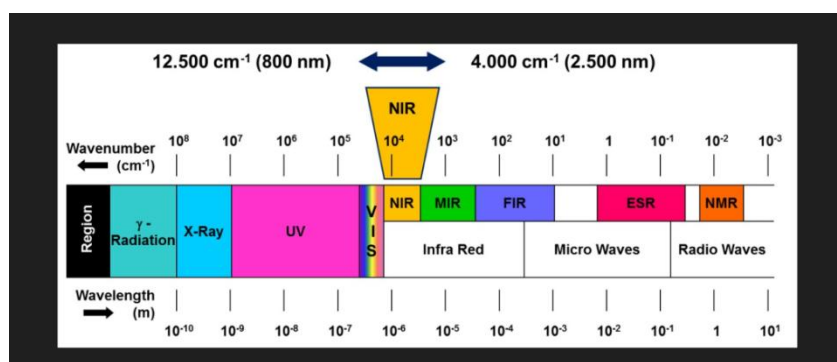
-nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR)

-masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*, MR)

Ph.Eur. u poglavlju 2.2. Fizikalne i fizikalno-kemijske metode sadrži potpoglavlja koja opisuju službene farmakopejske analitičke tehnike za identifikaciju supstancija, a jedno od njih je i potpoglavlje 2.2.40 *Near-Infrared spectroscopy* (33).

1.5.2. NIR spektroskopija

NIR spektroskopija je jedna od najbrže rastućih i najimpresivnijih analitičkih tehnika od 1990-tih godina, s vrlo širokom i raznolikom upotrebom u farmaceutskoj industriji.



Slika 1. Prikaz spektra elektromagnetskog zračenja, preuzeto (34)

Ova tehnika za analizu uzorka koristi blisko infracrveno područje (Slika 1.) s energijama između vidljive svjetlosti (VIS) i srednjeg infracrvenog svjetla (MIR) elektromagnetskog spektra od 780 do 2500 nm (12800–4000 cm⁻¹). Raspon valnih duljina 1000–1900 nm pogodan je za pouzdanu identifikaciju djelatnih i pomoćnih tvari.

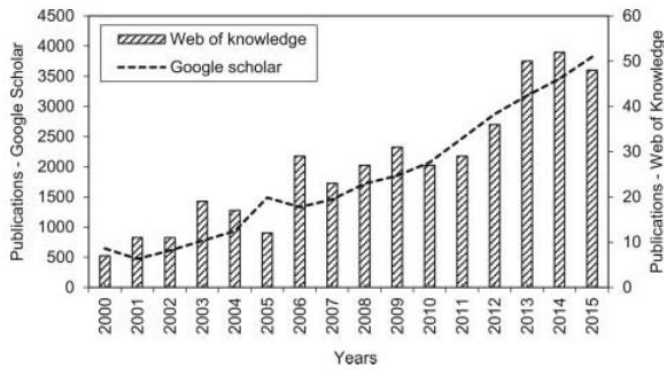
NIR spektroskopija je vibracijska tehnika koja mjeri apsorpciju spomenutog zračenja u NIR području pri različitim valnim duljinama. Tehnikom je moguće analizirati molekule koje sadrže X-H skupine veza (X= C,N,O,S), odnosno koje su NIR aktivne, jer apsorpcija NIR zračenja ovisi o kemijskoj strukturi molekule. Primjerice, anorganske soli nisu NIR aktivne i ne mogu se analizirati jer sadrže kristalnu rešetku koju nije moguće pobuditi i dovesti do vibracije djelovanjem NIR zračenja.

NIR spektar se formira kada bliska infracrvena svjetlost prolazi kroz uzorak te apsorbira zračenje koje pobuđuje vibracijske prijelaze. Apsorpcijom NIR zračenja kemijske kovalentne veze vibriraju, dolazi do istezanja veza i savijanja, odnosno deformacija kuteva, a vrpce u spektrima odgovaraju vibracijama tijekom kojih se mijenja dipolni moment. Dakle, vibracije ovise o duljini i obliku kemijske veze, ali i cjelokupnoj strukturi molekule. NIR spektar čine kombinirane vibracije, osnovne (temeljne) i viši tonovi. Viši tonovi nastaju uslijed apsorpcije zračenja kojima se pobuđuju prijelazi iz osnovnog vibracijskog stanja u drugo, treće i svako više vibracijsko stanje, dok su kombinacijske vrpce posljedica istovremene apsorpcije zračenja tijekom dviju vibracija X-H skupine veza. Intenzitet svjetlosti koji dolazi od uzorka mjeri detektor pri različitim valnim duljinama te stvara NIR spektar. Precizna asignacija vrpca u NIR području vrlo je otežana jer jedna vrpca može biti posljedica nekoliko različitih kombinacija osnovnih vibracija i viših tonova koje se ujedno i preklapaju. Stoga je za dobivanje željenih podataka iz snimljenih spektara neophodna matematička obrada spektara.

Ova tehnika se vrlo često koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu organskih materijala u kemijskoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji. Dobiveni NIR spektar sadrži informacije o fizikalnim svojstvima uzorka i kemijskom sastavu molekule te je poput otiska prsta (*fingerprint*) jedinstven za svaku molekulu, a podaci se dobivaju modernim metodama obrade i evaluacije izmjerenih podataka (35,36).

1.5.3. Povijest NIR tehnike i zastupljenost u farmakopejama

NIR tehnologija počela se intenzivnije razvijati te koristiti kao samostalna tehnika osamdesetih i devedesetih godina prošlog stoljeća razvojem računala, prije svega na području prehrambene tehnologije, a potom i u ostalim granama industrije poput farmacije gdje postaje sve više prisutna i zastupljena u objavljenim znanstvenim publikacijama (Slika 2.).



Slika 2. Prikaz porasta objavljenih publikacija koje uključuju NIR spektroskopiju (37)

Godine 1993. objavljen je rad o primjeni NIR tehnike u analizi ampicilin trihidrata. NIR tehnika je korištena za identifikaciju i kvantifikaciju ampicilin trihidrata u farmaceutskim formulacijama te se pokazala kao dobra alternativa tada popularnijim tehnikama analize (38). FDA je ubrzo prihvatila NIR tehniku kao jednu od novih alternativa u području farmaceutske i prehrambene tehnologije, a 1990. godine prvi put je uvrštena u USP, kao opće poglavlje o NIR spektrometriji, poglavlje <1119> *Near Infrared Spectrophotometry*. Godine 1997. NIR spektroskopija je prvi put uvrštena u Ph.Eur., kao poglavlje 2.2.40 *Near-Infrared spectroscopy* te u opće poglavlje 5.16. *Crystallinity*, kao osobito dobra tehnika za analizu različitih kristalnih oblika (polimorfa), što je i danas jedna od njenih najvažnijih primjena u farmaceutskoj industriji. Prema podacima iz 2019., 46 monografija Ph.Eur. uključuje NIR tehniku za potvrdu identiteta, dok je u USP uključena u 24 monografije. Prema posljednjim podacima HALMED-a iz 2020. godine, NIR tehnika zastupljena je u 50 monografija Ph.Eur.

Bez obzira na svoje prednosti, razlog zbog kojeg ova tehnika nije još uvijek u većoj mjeri zastupljena u monografijama jest što je u verziji 7.8. Ph.Eur. propisano bolje razumijevanje algoritama i metoda zaslužnih za pozadinska preračunavanja izmjerenih podataka NIR tehnikom, što je bio prestrog zahtjev s obzirom da su u pitanju često brojne matematičke metode koje su specifične, a farmaceutska struka nije educirana za njihovo detaljnije razumijevanje. Međutim ovaj zahtjev je ipak drastično oslabljen 8. izdanjem Ph.Eur. u siječnju 2014. godine koji glasi da samo primjenjivost

izabranih algoritama za preračunavanje mora biti dokazano i dokumentirano u postupku validacije metode (35).

1.5.4. Tipovi NIR spektrometara

Važno je napomenuti da postoje različiti tipovi NIR spektrometara, ovisno o načinu na koji mjere apsorpciju bliskog infracrvenog zračenja. Neki omogućavaju mjerenje u cijelom rasponu valne duljine od 780–2500 nm ili primjerice samo u rasponu od 1000–1900 nm (uređaj Apo-Ident 2 koji će biti korišten za mjerenja u eksperimentalnom dijelu ovog rada), što je sasvim dovoljan raspon za analizu farmaceutskih tvari.

Osim navedenog, tipovi NIR spektrometra ovise i o krajnjoj primjerni, što se analizira, da li je laboratorij istraživački u kojem se razvijaju nove metode ili jednostavniji ljekarnički koji treba brzu tehniku za identifikaciju farmaceutskih sirovina ili se koristi kao procesni za analizu u postupku proizvodnje. Postoje dva tipa, sekvencijski i simultani NIR spektrometar.

Osnovni dijelovi NIR spektrometra su izvor zračenja, monokromator ili interferometar i detektor.

Najčešći monokromatori su akustičko–optički prilagodljivi filter (engl. *acousto–optical tuneable filter*, AOTF), rešetke ili prizme. U spektrometru s Fourierovom transformacijom valne duljine razdvajaju se pomoću interferometra. Kao izvor zračenja (svjetlosti) najčešće se koriste volfram–halogene žarulje, a detektor može biti silicijev, olovni sulfid, indij galij arsenid (InGaAs) i deuterirani triglicin sulfat. Uzorak se mjeri u kvarcnim kivetama, direktno ili pomoću optičkih vlakana, ovisno o njegovoj vrsti i načinu mjerenja (35,39).

Za ljekarne su pogodniji manji, jednostavniji NIR spektrometri, sekvencijskog tipa, koji imaju dobar omjer cijene i kvalitete. Sekvencijski spektrometri detektiraju zračenje jedno za drugim, na način da monokromatorom izoliraju pojedinu valnu duljinu blisko infracrvenog zračenja te detektorom mjere

intenzitet zračenja koje prolazi kroz uzorak. Za razliku od simultanog spektrometra, njegova tehnologija je jeftinija, pristupačnija i jednostavnija. Također su i točniji jer imaju bolju rezoluciju i manje šuma.

Simultani spektrometri generiraju spektre simultano kroz cijelo mjerenje uz pomoć niza detektora koji su osjetljivi na različite valne duljine blisko infracrvenog zračenja. Oni mjere apsorpciju uzorka na svim valnim duljinama istovremeno i mogu u jednom mjerenju generirati cijeli spektar (35).

1.5.5. Metode mjerenja uzoraka NIR tehnikom - transmisija, difuzna refleksija i transrefleksija

Mjerenja NIR tehnikom se mogu izvoditi na različite načine, ovisno o vrsti uzorka i cilju analize, a oni su:

- **transmisija** – blisko infracrveno zračenje se propušta kroz uzorak, dio se apsorbira, a ostatak propuštenog se prenosi na detektor. Ovom metodom rezultat mjerenja se može izraziti kao transmitancija ili apsorbancija (koliki dio zračenja pri određenoj valnoj duljini je apsorbiran u uzorku). Obično se koristi za analizu tekućih ili prozirnih uzoraka, primjerice otopina, ulja i slično. Osim čistih prozirnih uzoraka (direktna transmisija), moguće je analizirati zrnaste, polučvrste uzorke poput pasti, tablete vrlo tankog omotača/vanjskog sloja, u kojem se zračenje koje prolazi kroz uzorak raspršuje u različitim smjerovima (difuzna transmisija).
- **refleksija** – metoda koja se koristi većinom za analizu sastava te svojstva različitih čvrstih uzoraka. Svjetlo se reflektira s površine čvrstog uzorka, primjerice, praha, peleta, granulata, u različitim smjerovima. Difuzna refleksija se mjeri pomoću integrirajuće kugle (šuplja kugla koja ima unutrašnjost presvučenu materijalom visoke reflektivnosti i niske apsorpcije), koja koncentrira odbijeno svjetlo od uzorka na detektor. Detektor mjeri intenzitet reflektiranog zračenja, kao relativnu refleksiju, odnosno omjer intenzitet reflektiranog zračenja uzorka i referentne površine, standardne bijele ploče (vrijednost reflektiranog zračenja 100 %).

- **transrefleksija** – metoda ili način mjerenja koji kombinira transmisiju i refleksiju. Blisko infracrveno zračenje se propušta kroz uzorak, dio svjetla se apsorbira, a propušteno svjetlo se odbija od reflektora smještenog iza uzorka te dolazi do detektora. Transrefleksija mjeri i apsorpciju (odnosno transmisiju) od strane uzorka i refleksiju propuštenog zračenja. Obično se koristi za analizu poluprozirnih uzoraka, primjerice emulzija, gelova, zamućenih tekućina.

Također, postoji *on-line* i *in-line* primjena NIR tehnike u procesnoj kontroli postupka proizvodnje lijekova. *In-line* primjena NIR tehnike označava da se mjerenja događaju odmah tijekom procesa proizvodnje, bez uzimanja uzorka i pripreme uzorka, primjerice uz pomoć optičkih vlakana (direktno u reaktoru u kojem se proces odvija). Ta mjerenja se odvijaju kontinuirano i daju točne analitičke informacije o procesu u realnom vremenu. Spektrometar stoga mora biti otporan na procesne uvjete.

On-line NIR mjerenja se ne odvijaju direktno u procesu, nego se uzorci (određenih faza procesa) posebno odvajaju i mjere jer primjerice NIR spektrometar ne može izdržati uvjete (temperature/tlaka) koji su potrebni za odvijanje procesa. Mjerenja se odvijaju kontinuirano, uz manje zahtjevan spektrometar, ali se ne mjeri točno ono što se u trenutku odvija u procesu (35,39).

1.5.6. Prednosti NIR tehnike

Ljekarnički laboratoriji (za razliku od istraživačkih ili ugovornih laboratorija koji se bave isključivo analitikom) još uvijek nemaju dovoljno predviđenih farmaceuta koji bi se bavili isključivo samo analitičkim ispitivanjima, stoga je vrlo brzo i jednostavno mjerenje na NIR spektrometru koje traje svega nekoliko minuta odlična opcija za potvrdu identiteta u ljekarništvu.

Uređaj je vrlo jednostavan za primjenu, nije potrebno poznavanje složenih tehnika rada, ni prijašnje iskustvo rada na njemu ili sličnim uređajima. Također, zračenje nije opasno po ljudsko zdravlje i ne predstavlja nikakav rizik pri radu.

Rezultati se dobivaju jako brzo, tehnika je kojom se direktno ne uspoređuju spektri vizualno, nego se nakon snimanja uzorka podaci obrađuju kemometrijski, kompjuterskim i statističkim metodama unutar programske podrške te daju gotovi rezultat analize, odnosno da li je identitet ispitivane supstancije potvrđen ili ne.

NIR spektroskopija omogućava vrlo brzu, pouzdanu i jednostavnu potvrdu identiteta farmaceutskih supstancija bez upotrebe skupih standarda i bez prethodne obrade uzorka. Značajna prednost je i mogućnost analize čvrstih, tekućih i polučvrstih uzoraka, a moguće je analizirati i nehomogene uzorke, poput biljnih droga.

Tehnika je nedestruktivna, uzorak se ne oštećuje tijekom analize pa se može koristiti za daljnje izrade pripravaka.

Osim identifikacije i određivanja sadržaja, pomoću NIR tehnike moguće je odrediti više parametara istodobno, poput sadržaja vode, veličine čestica, provjeriti čistoću uzorka, kristalni oblik i druga fizikalna svojstva poput tvrdoće tableta, debljine ovojnice tableta, raspodjele veličine čestica u granulatu i ujednačenosti smjese za izradu formulacija.

U ljekarničkoj praksi, velika prednosti je i analiza koja je beskontaktna (mjerenje direktno u staklenoj posudici, može biti i original staklena ambalaža) i bez gubitaka, opasnih i skupih supstancija.

Također, NIR spektrometri imaju dugi vijek trajanja i jednostavno održavanje, NIR tehnika ne zahtjeva reagense ni dodatne potrošne materijale, manje troši energije i jako je brza (35).

Neki od **nedostataka** tehnike su:

- ograničena selektivnost i osjetljivost - moguća je slabija sposobnost razlikovanja sličnih molekula ili niskih koncentracija analita
- izrada matematičkih modela koji povezuju snimljene podatke o spektru s analitičkim parametrima što može biti jako složeno, zahtjevno, a također moraju biti redovno praćeni i ažurirani kako bi bili pouzdani
- utjecaj vanjskih čimbenika jer na kvalitetu mjerenja mogu utjecati vlaga, temperatura, tlak, rasvjeta i slično (35,39).

1.5.7. Primjena NIR tehnike

NIR tehnika jedna je od procesnih analitičkih tehnika (engl. *Process analytical technology*, PAT) koja se može primijeniti u različitim fazama proizvodnje lijeka za praćenje i kontrolu fizikalnih i kemijskih procesa (sinteza aktivne farmaceutske supstancije, tehnološki postupci poput mljevenja, miješanja, ujednačenosti smjese, granulacije, sušenja, oblaganja, tabletiranja i drugo), od farmaceutskih sirovina do gotovog farmaceutskog proizvoda te u istraživanju i razvoju novih procesa. PAT tehnike omogućavaju poboljšanje kvalitete, sigurnosti, efikasnosti proizvodnje te smanjenje troškova i otpada.

NIR tehnika koristi se za identifikaciju polaznih farmaceutskih sirovina i intermedijera u proizvodnji lijekova, direktno određivanje djelatnih i pomoćnih tvari u farmaceutskim oblicima, kvantitativnu analizu višekomponentnih uzoraka, određivanje fizikalnih svojstava farmaceutskih tvari (veličina čestica, udio vode, kristalni oblici) kao i određivanje fizikalnih svojstava farmaceutskih formulacija (veličina čestica, tvrdoća, raspadljivosti i otapanje, određivanje debljine film ovojnice tableta). NIR tehnika može se koristiti za praćenje otpuštanja djelatne tvari iz farmaceutskih oblika, primjerice alopurinola iz neobložene tablete s trenutnim oslobađanjem (40). Prepoznata je kao i odlična PAT tehnika za praćenje ujednačenosti smjese u procesima kontinuirane proizvodnje (engl. *Continuous*

manufacturing, CM), primjerice u proizvodnji čvrstih oralnih dozirnih oblika (41). Može se koristiti za kvantifikaciju supstancije (primjerice saharina) u praškastoj smjesi tijekom CM (42). Također, NIR tehnika se primjenjuje za nedestruktivnu kvantifikacija polisaharida i određivanje sadržaja vlage u ekstraktu *Ganoderma lucidum*, ključnih parametara za kontrolu kvalitete i određivanje roka valjanosti ekstrakta, značajno za *on-site* testiranja u prehrambenoj industriji (43). Osim u farmaciji i medicini, NIR tehnika koristi se u brojnim granama poput poljoprivredne, prehrambene i kemijske industrije.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovim specijalističkim radom obrađena je trenutna zakonska regulativa (EU i RH) koja se dotiče ulazne kontrole farmaceutskih supstancija za izradu magistralnih pripravaka, naglašava važnost sigurne magistralne izrade te korištenje kvalitetnih i provjerenih farmaceutskih sirovina. Eksperimentalni dio rada prikazuje analizu tri različite farmaceutske supstancije NIR spektroskopijom s pripadajućim spektrima i grafovima dobivenim kemometrijskom obradom koji omogućavaju pouzdanu potvrdu njihovog identiteta, a posebno se ističu sve prednosti NIR tehnike za potvrdu identiteta supstancija u ljekarni.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. NIR spektrometar Apo-Ident 2: karakteristike, kvalifikacija i validacija

U laboratoriju za magistralnu i galensku izradu pripravaka ZU Ljekarna Marušić za potvrdu identiteta ulaznih farmaceutskih sirovina koristi se NIR spektrometar Apo-Ident 2 njemačkog proizvođača Hiperscan GmbH, specijaliziranog za razvoj i proizvodnju MEMS NIR spektrometara koji koriste mikroelektromehanički sustav (MEMS) za snimanje i analizu NIR spektra. Tehničke karakteristike Apo-Ident 2 uređaja sažete su i prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike NIR spektrometra Apo-Ident 2

Raspon spektra	1000 - 1900 nm
Spektralna rezolucija:	10 nm
Raspršena svjetlost:	<0,2%
Vrijeme mjerenja:	< 15 s po skeniranju
Detektor:	InGaAs detektor
Točnost valne duljine:	± 1 nm (u cijelom temperaturnom rasponu)
Ponovljivost valne duljine:	± 0,3 nm (u cijelom temperaturnom rasponu)
Fotometrijska ponovljivost:	± 0,15% (prosjeak od 500 skeniranja na 25°C)
Fotometrijska linearnost (max/RMS):	<2% / 1,5%
Automatsko ponovno kalibriranje/ provjera uređaja	Integrirani standardi
Sonda/optički ulaz:	Difuzna refleksija, mjerna točka promjera 23 mm

Ph.Eur. navodi da je ispitivanje učinkovitosti uređaja potrebno odraditi u redovitim intervalima.

Prema zahtjevima farmakopeje, učestalost testiranja određuje se na temelju procjene rizika, ovisno o

specifičnosti, učestalosti i tipu izrada pripravaka i poslovanju ljekarne, odnosno odluci odgovorne osobe.

Apo-Ident 2 ima integrirane standarde (unutarnji referentni standardi) koji omogućavaju neprestane automatske provjere, stoga nije potrebna provjera na godišnjoj razini. Ipak, preporuka proizvođača HiperScana je pregled i provjera uređaja svake tri godine. Ljekarna može sama napraviti provjeru, ali to zahtjeva skupe certificirane referentne standarde te poznavanje samih procedura provjere učinkovitosti, tako da je dodatna prednost što proizvođač iz usluge može odraditi pregled učinkovitosti i dostaviti dostupnu dokumentaciju kao potvrdu ispravnosti uređaja.

Za svaki uređaj koji se koristi za ispitivanja ili analize u farmaciji, pa tako i ljekarništvu, mora se u svakom trenutku sigurno dokazati da je u trenutku mjerenja uređaj bio ispravan te davao ispravne rezultate. Budući da NIR instrumenti (tako i Apo-Ident 2) nisu osjetljivi na kvarove kada se pravilno koriste prema uputama proizvođača, mogu se svakih nekoliko godina odraditi rutinski pregledi za kvalifikaciju uređaja.

Jedna od jednostavnih preporuka izvedivih u ljekarništvu, je izabrati standardnu tvar i odraditi njeno mjerenje redovno, barem jednom mjesečno. Za standardnu tvar preporuča se supstancija kofeina koja je stabilna kroz dulji vremenski period. Odvoji se supstancija kofeina, označi, pravilno skladišti i koristiti samo kao standardna tvar za redovna mjerenja na Apo-Identu 2.

Korištenje uvijek istog kofeina kao standarda isključuje bilo kakve promjene u mjerenjima u slučaju promjene serije sirovine kofeina ili izmjene dobavljača ili čak proizvodnih protokola koji bi mogli dovesti ipak do neke razlike u mjerenjima. Za ovakve rutinske interne kvalifikacije preporuka je također čuvati dokumentaciju odnosno izvješće svih analiza.

U industrijskoj primjerni NIR spektrometara (primjerice proizvodnja lijekova), potrebno je implementirati nadzor/ispitivanje opreme te imati potrebnu validacijsku dokumentaciju. U

ljekarništvu, ovaj korak zakonski nije nužan, prema podacima proizvođača HiperScana s njemačkog tržišta, još uvijek ga vrlo malo ljekarni prakticira zbog visokih troškova i financijske neisplativosti (35).

3.2. Postupak mjerenja NIR spekrometrom Apo-Ident 2

3.2.1. Mjerenje odabranih farmaceutskih supstancija

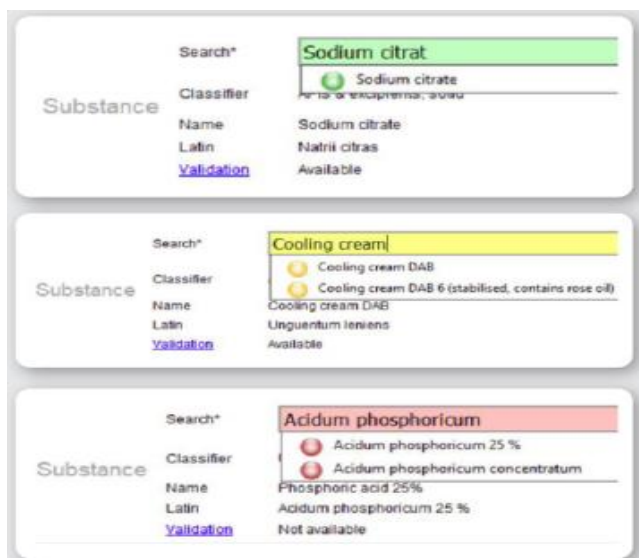
U ovom radu opisat će se postupak mjerenja i potvrda identiteta NIR spektroskopijom tri farmaceutske supstancije koje dolaze u tri različita stanja (čvrstom, tekućem i polučvrstom), a koje se vrlo često koriste u ljekarničkim izradama magistralnih pripravaka te gotovo svaka ljekarna u RH ima barem jednu od njih u svom ljekarničkom asortimanu:

- eritromicin Ph.Eur., djelatna tvar (čvrsta supstancija)
- glicerol Ph.Eur., pomoćna tvar (tekuća supstancija)
- bijeli vazelin Ph.Eur., pomoćna tvar (polučvrsta supstancija)

Sve supstancije korištene za mjerenja nabavljene su od distributera Fagron Hrvatska d.o.o, imaju pripadajuće certifikate analize po kojima zadovoljavaju zahtjeve monografije Ph.Eur. Mjerenja se izvode u prostoriji za analitička ispitivanja u ljekarničkom laboratoriju ZU Ljekarna Marušić. Prostorije laboratorija imaju vlastiti sustav ventilacije i zadane izmjene zraka unutar prostorija, regulirane uvjete temperature i tlaka. Zrak se filtrira HEPA filterima.

Postupak mjerenja je jednak za sve tri farmaceutske supstancije u različitom obliku, osim što je za mjerenje tekuće i polučvrste supstancije potrebno referentno mjerenje transfleksije s transflektivnim umetkom (engl. transfectance insert). Prije mjerenja prvo se provjeri je li ispitivana supstancija u bazi podataka QuickStep (program Apo-Ident 2) i može li se analizirati (zelena kategorija supstancija).

Primjer prikaz iz QuickStep programa za tri kategorije supstancija predstavljen je na Slici 3.



Slika 3. Prikaz iz QuickStep programa za tri kategorije supstancija: zelena (moguća analiza), žuta (djelomično moguće potvrditi identitet, potrebna je dodatna identifikacija) i crvena (nije moguće analizirati); preuzeto (44).

- **Analiza eritromicina**

Eritromicin se prenese u mjernu staklenu posudicu. Uzorak eritromicina mora prekrivati cijelo dno staklene posude za mjerenje, također je potrebno paziti da je staklena posuda u potpunosti čista i da nema ostataka kamenaca koji mogu ometati mjerenje.

Uvijek je potrebno imati na umu o kakvoj supstanciji se radi (STL), ako se radi o hormonima, kancerogenim supstancijama, onda je svakako korak presipavanja supstancije u mjernu posudu potrebno vršiti unutar biozaštitnog kabineta sa zaštitnom opremom koja štiti osoblje/operatora od izlaganja i smanjuje kontaminaciju radnog prostora.

U programu QuickStep odabere se ispitivana tvar, eritromicin (kao na Slici 3.), ispune se podaci o dobavljaču farmaceutske sirovine, seriji, roku valjanosti. Ti će podaci biti navedeni na izvješću analize te na etiketi koja se može ispisati nakon mjerenja i naljepiti na spremnik ispitane supstancije.

Mjerna posudica s eritromicinom se stavi na mjerni prozorčić te pokrene mjerenje (Slika 4.). Svako prvo mjerenje nakon što se uključi uređaj zahtjeva neposredno nakon mjerenja farmaceutske sirovine, referentno mjerenje koje se odradi uz pomoć crnog i bijelog standarda (Slika 5.). Mjerenje referentnim standardima potrebno je izvršiti samo jednom, pri prvom mjerenju. Nakon 60 minuta, potrebno je ponoviti mjerenja s referentnim standardima. Crni standard apsorbira, a bijeli odbija gotovo svo elektromagnetsko zračenje pa se koriste za određivanje nulte i maksimalne točke reflektancije, ispravljanje pozadinskog signala koji nastaje zbog raspršenja zračenja u spektrometru (35).

Nakon mjerenja standarda, uređaj daje rezultate odnosno izvješće o tome podudara li se NIR spektar ispitivane supstancije s referentnim spektrom iz baze podataka u programu QuickStep i u kojem postotku. Izvješće se automatski pohranjuje u pdf obliku u QuickStep programu. Ovisno o internoj organizaciji ljekarne, sva izvješća mjerenja mogu se čuvati i na dodatnim serverima uz sigurnosno kopiranje kako bi se osiguralo da sva mjerenja ostaju pohranjena i dostupna.

Na kraju se ispiše etiketa koja sadrži podatke o analiziranoj farmaceutskoj sirovini te se zalijepi na ambalažu sirovine i daje vrlo lijep i brz pregled je li sirovina na polici laboratorija analizirana ili nije.



Slika 4. Prikaz mjerenja ispitivane farmaceutske sirovine eritromicina i referentnog mjerenja bijelim standardom



Slika 5. Prikaz crnog i bijelog standarda potrebnog za referentna mjerenja

- **Analiza glicerola**

Za analizu tekuće supstancije, potrebno je prvo odraditi referentno mjerenje transrefleksije transflektivnim umetkom (Slika 6.). Referentno mjerenje transrefleksije u NIR-u temelji se na uspostavljanju veze između intenziteta transreflektiranog zračenja i referentnih vrijednosti. Umetak se pravilno stavi u mjernu posudu (bez sirovine), crnim prstenom stacionira na mjerni prozorčić i pokrene mjerenje. Važno je onda analizu farmaceutске sirovine provesti unutar 5 minuta od referentnog mjerenja te koristiti istu mjernu posudu i umetak koji su iskorišteni za referentno mjerenje.

Potom se mjeri ispitivana tekuća supstancija. Glicerol se stavi u vrlo maloj količini u mjernu posudicu, samo da prekrije dno mjerne posudice (okvirno 4 mm visine) te se stavi transflektivni umetak iz prvog mjerenja.

Ponovi se isti postupak mjerenja kao i za eritromicin (Slika 7.)

Nakon mjerenja, dobije se izvješće o potvrdi identiteta i generira etiketa za spremnik sirovine.



Slika 6. Transfleksivni umetak u mjernoj posudici i crni mjerni prsten koji olakšava fiksiranje mjerne posude na mjerni prozorčić



Slika 7. Prikaz referentnih standarda i transfleksivnog umetka za mjerenje te samo mjerenje glicerola s transfleksivnim umetkom

- **Analiza bijelog vazelina**

Za polučvrste supstancije postupak je jednak kao i za tekuće supstancije, prvi korak je referentno mjerenje transfleksije s transfleksivni umetkom u mjernoj posudici bez sirovine.

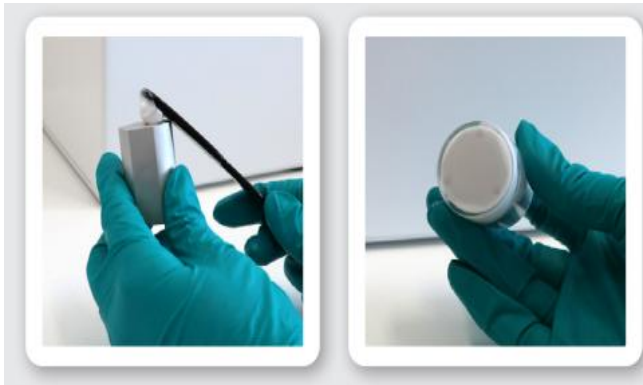
Prije mjerenja, ispitivana polučvrsta supstancija vazelin se mora pravilno nanijeti na dno umetka i pravilno rasporediti (Slika 8.) te utisnuti u mjernu posudicu. Ako ostane zraka na dnu mjerne posude ili se uzorak ne rasporedi pravilno, može doći do pogreške u mjerenju.

Ponovi se isti postupak mjerenja kao i za dvije prethodne farmaceutske sirovine (Slika 9.).

Nakon mjerenja, dobije se izvješće o potvrdi identiteta i generira etiketa za spremnik farmaceutske sirovine.

Mjerene sirovine se mogu vratiti u originalne ambalaže sirovina (paziti da ne dođe do zamjene ili kros-kontaminacije), a mjerne posudice dobro oprati i posušiti (sterilizator po potrebi).

Zadnji korak je čišćenje sobe za analizu i uređaja.



Slika 8. Pravilno nanošenje bijelog vazelina na dno transflektivnog umetka za mjerenje; preuzeto (44).



Slika 9. Prikaz mjerenja bijelog vazelina

3.2.2. Mogući utjecaj dodatnih čimbenika na mjerenja NIR spektrometrom

- vlažnost i temperatura okoline – laboratorij ZU Ljekarna Marušić je temperiran, temperatura se regulira preko termostata, također pojedine prostorije sadrže *data loggere* za dodatno praćenje temperature. Laboratorij ima svoj sustav ventilacije, s definiranim izmjenama zraka te stropnim HEPA filterima koji omogućavaju dodatnu zaštitu i filtriranje pri izlasku zraka iz laboratorija.
- temperatura uzorka – laboratorij je temperiran, a farmaceutske sirovine skladištene prema preporuci proizvođača.
- analiza higroskopnih tvari – važno je pravilno skladištenje (vrlo kratko otvaranje spremnika higroskopnih supstancija i sprječavanje da predugo budu otvorene i izložene vanjskim uvjetima), pravilno pranje i sušenje pribora za uzorkovanje i mjernih staklenih posudica. Problematika analize higroskopnih tvari više je izražena kod kvantitativnih analiza nego kvalitativnih, jer vezana vlaga može utjecati na određivanje sadržaja, ali u slučaju da sirovina uistinu veže puno vode ili dođe do stvaranja solvata, program QuickStep će javljati grešku u mjerenju i neće moći izvršiti potvrdu identiteta.
- ostaci vlage i otapala na staklenoj posudici za mjerenje – izuzetno je važno dobro oprati mjerne posude, između ostalog i zbog sprječavanja kontaminacije uzoraka. Staklene posudice se peru ručno (dodatno se limunskom kiselinom uklanja kamenac ako je potrebno), suše se u sterilizatoru na optimalnoj temperaturi kako bi se u potpunosti uklonili ostaci vlage ili otapala.
- debljina sloja uzorka – dovoljno je nanijeti tanki sloj uzorka, visine 4 mm, samo da prekrije dno mjerne staklene posudice. Ako se radi o nehomogenom uzorku različitih veličina čestica, potrebno je protresti posudicu više puta da bi se uzorak što pravilnije rasporedio po dnu mjerne posudice.

- starost uzorka – nije primijećeno da farmaceutske sirovine koje su pri isteku roka valjanosti ne daju ispravna mjerenja, iako se većinom radi ulazna analiza novih farmaceutskih sirovine koje su najčešće novije serije dobrog roka valjanosti (35).

3.2.3. Praktični savjeti/upute za mjerenje

U praksi je moguće da se prilikom mjerenja javljaju pogreške, pri čemu program QuickStep automatski sugerira koji su mogući razlozi pogrešaka te daje daljnje upute kako da sljedeće mjerenje bude uspješno, primjerice:

- provjeriti da li je ispravna farmaceutska tvar postavljena u staklenu posudicu za mjerenje
- da li je posudica ispravno popunjena s ispitivanom tvari
- da li je postavljen plastični pomoćni crni prsten za mjerenje (koji fiksira mjernu posudicu na mjerni prozorčić)
- kod analize polučvrstih i tekućih tvari je li donja strana transflektivnog umetka oštećena i ima li u uzorku uklopljenog zraka
- da li su nehomogeni uzorci dobro izmiješani i homogenizirani prije mjerenja.

3.2.4. Sigurnost pri radu

Kako je spomenuto, uređaj je jednostavan za rad, ali je ujedno i siguran s obzirom da NIR zračenje kojem operater može biti izložen nije opasno za ljudsko zdravlje. Međutim, uređaj se koristi za analizu brojnih supstancija, od kojih neke mogu biti kancerogene, opasne, zapaljive i slično, tako da je svakako nužno da osoblje koje vrši analize, poznaje sigurnosne zahtjeve koji su nužni pri rukovanju ispitivanim supstancijama. ZU Ljekarna Marušić za sve ispitivane supstancije posjeduje i čuva sigurnosne tehničke listove, obaveznu dokumentaciju koja daje detaljnije upute oko rukovanja

supstancijama (da li su potrebne jače zaštitne rukavice, naočale, koje su mjere prve pomoći u slučaju nepredviđenog izlaganja, udisanja, prskanja supstancije i slično).

3.3. Izvješća o analizi sirovine, radne upute i laboratorijski dnevnici

Bez obzira što ljekarnički laboratoriji još uvijek nisu certificirani i nije uvjetovano da posjeduju GMP certifikat ili neki drugi oblik certifikacije, svaki ljekarnički laboratorij i sustav bi trebao težiti imati definiran i implementiran sustav upravljanja kvalitetom (engl. *Quality management system*, QMS). Jedan od koraka svakako je propisivanje radnih uputa, raspisivanje standardnih operativnih postupaka i slično.

Laboratorij ZU Ljekarna Marušić ima raspisanu detaljnu radnu uputu za upotrebu i održavanje Apo-Ident 2 NIR spektrometra, ali i definirano i propisano kako se pohranjuju izvješća analize, pod kojim nazivom te zajedno s certifikatom ispitivane farmaceutske sirovine. U nazivu elektronskog oblika izvješća i certifikata farmaceutske sirovine, navodi se serija sirovine kako bi se u slučaju povlačenja, ili bilo kakvih naknadnih obavijesti od dobavljača, brzo moglo doći do ulazne dokumentacije problematične sirovine te posljedično i do protokola izrade u kojima se može brzo vidjeti kojim pacijentima je isporučen izrađeni farmaceutski pripravak sa spornom sirovinom.

Spomenuto je da prilikom potvrde narudžbe supstancije treba imati na uvid njen certifikat analize koji mora odgovarati zahtjevima monografije deklarirane farmakopeje. Također, prilikom zaprimanja, farmaceutska sirovina se upisuje u laboratorijski dnevnik, zatim prolazi potvrdu identiteta i tek onda smije biti na policama laboratorija spremna za korištenje u laboratorijskim izradama magistralnih pripravaka. Izvješća i certifikati se pohranjuju u elektronskom i pisanom obliku.

4. REZULTATI

4.1. Prikaz rezultata analize eritromicina

Izvešće analize eritromicina NIR spektroskopijom prikazano je na Slici 10. Sadrži u prvim redovima podatke koji se prije analize upisuju u QuickStep program, a uključuju proizvođača farmaceutske sirovine, broj proizvodne serije i rok valjanosti ispitivane supstancije. Pod tipom mjerenja, izvješće pokazuje da se radi o NIR tehnici, prema 10.0 verziji Ph.Eur., poglavlje 2.2.40. *Near Infrared Spectroscopy*, a metoda mjerenja je difuzna refleksija. Spomenuto je da tip mjerenja uređaj automatski odabire kada se odabere farmaceutska sirovina koja se analizira. Izvješće navodi kategoriju supstancije i stanje kojoj analizirani uzorak eritromicina pripada (API, čvrsta supstancija).

Izvešće sadrži dva grafička prikaza, lijevi prikaz je spektar mjenenog uzorka eritromicina. Desni graf pokazuje usporedbu snimanih vrijednosti spektra ispitivane tvari (plava linija) i referentnog spektra iz baze podataka (crvena linija). Uređaj zapravo ne uspoređuje direktno spektre ispitivane i referentne tvari, nego se nakon snimanja ispitivane tvari prikupljaju podaci koji se obrađuju računalnim i statističkim metodama unutar programa QuickStep koji potom daje gotovi rezultat analize. Radi se o složenim pozadinskim kemometrijskim preračunavanjima i algoritmima. Usporedba obrađenih spektara ispitivane tvari s referentnim spektrom iz baze podataka programa prikazana je zelenom linijom na desnom grafu Slike 10. te iskazuje razliku u apsorbancijama uspoređenih spektara po valnim duljinama.

Pod rezultatom izvješća uvijek je naveden postotak po kojem se ispitivana supstancija podudara sa spektrom iz referentne baze QuickStep programa. Ta vrijednost mora biti u rasponu od 98-100 % da bi identitet bio potvrđen. U slučaju analize eritromicina, podudaranje iznosi 99,5 %. Na kraju izvješća se stavlja potpis odgovorne osobe (za ulaz sirovina i laboratorijske izrade, ovisno o organizaciji same ustanove odobrava voditelj laboratorija te magistri farmacije koji su educirani za rad na uređuju).

Tested substance: **Erythromycin**

Synonyms: Erythromycinum

Batch: 197338

Producer: Fagron

PPN:

Corr. factor

weighing:Distributor:

Price:

Expiry_date: 31/07/2024

Quantity:Delivery date:

Type of measurement: Near-infrared spectroscopy (Ph. Eur 10.0/2.2.40) Solids, diffuse reflectance Instrument:

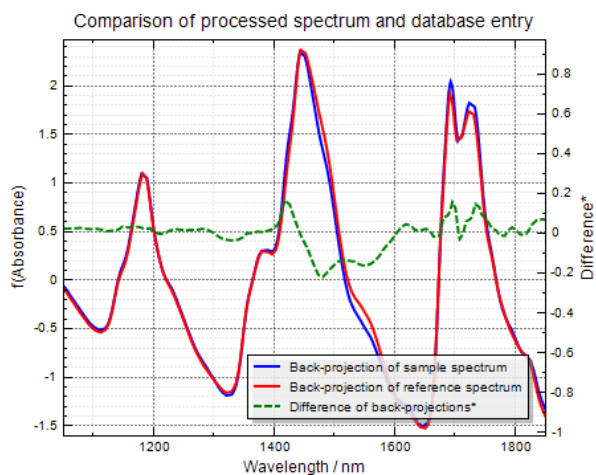
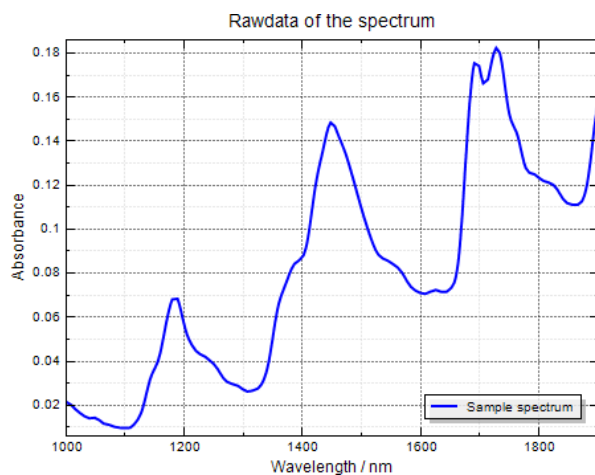
Name: H2203 3837 / serial number: W2020717

Substance class: APIs & excipients, solid

Model: Submodell 07 (2023-05-25

02:45)Sample/Substance ID: 21056/20011

Report file: Erythromyc1973382023-10-25_16-47-07.pdfComment:



Result NIRS: **Match**

The sample has been identified as:

Erythromycin

Value: 99.5% (limits 98.0% to 100%)

Additional tests:(Method and results)

>Attach test certificate here or on the following page<

Slika 10. Izvješće analize uzorka eritromicina

4.2. Prikaz rezultata analize glicerola

Na Slici 11. prikazan je izvještaj analize uzorka glicerola NIR spektroskopijom. Izvještaj sadrži u prvim redovima podatke koji se prije analize upisuju u QuickStep program poput proizvođača farmaceutske sirovine, broja proizvodne serije i roka valjanosti ispitivane supstancije. Pod tipom mjerenja, izvješće pokazuje da se radi o NIR tehnici, prema 10.0 verziji Ph.Eur., *poglavlje 2.2.40. Near Infrared Spectroscopy*. Metoda mjerenja je transrefleksija, kombinacija transmisije i refleksije, a ista metoda korištena je i za dobivanje referentnog spektra u bazi. Transrefleksija je najpogodniji odabir pri mjerenju uzoraka koji sadrže mjehuriće ili su tekućeg/polučvrstog stanja. Izvješće navodi kategoriju i stanje kojoj supstancija pripada (API i pomoćne tvari, tekuća/polučvrsta supstancija).

Izvješće sadrži dva grafička prikaza, lijevi prikaz je spektar mjenenog uzorka glicerola. Desni graf pokazuje usporedbu snimanih vrijednosti spektra ispitivane tvari (plava linija) i referentnog spektra (crvena linija) iz baze podataka programa QuickStep. Uređaj zapravo ne uspoređuje direktno spektre ispitivane i referentne tvari, nego se nakon snimanja NIR spektra ispitivane tvari prikupljaju podaci koji se obrađuju kompjuterskim i statističkim metodama unutar programa te daju gotovi rezultat analize. Radi se o složenim pozadinskim kemometrijskim preračunavanjima i algoritmima. Usporedba obrađenih NIR spektara ispitivanog glicerola s referentnim spektrom glicerola iz baze podataka programa prikazana je zelenom linijom na desnom grafu Slike 11. te iskazuje razliku u apsorbancijama uspoređenih spektara po valnim duljinama.

U rezultatu analize vidljivo je 99,9%-tno podudaranje NIR spektra ispitivanog glicerola s njegovim referentnim spektrom iz baze, dakle analizom je potvrđen identitet ispitivanog uzorka glicerola. Kao i za eritromicin, na kraju izvješća se stavlja potpis odgovorne osobe (voditelja laboratorija ili magistara farmacije koji su educirani za rad na uređuju).

Tested substance:

Glycerol

Exp.

Date 06/07/2025

Batch:

230829-C340-13753

Producer:

Fagron

Type of measurement:

Near-infrared spectroscopy (Ph. Eur 10.0/2.2.40) Liquids, transfectance Instrument:

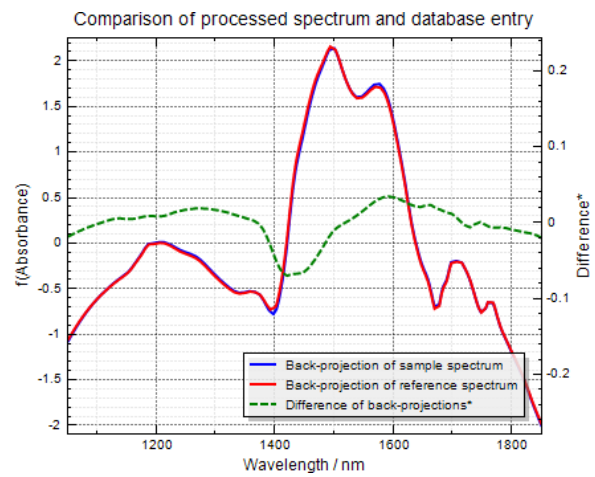
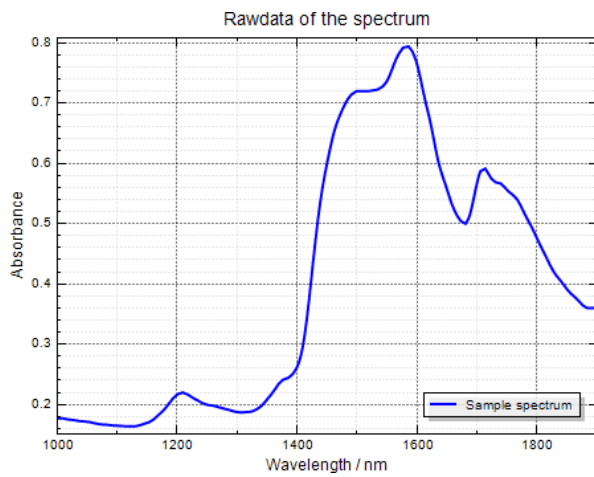
Substance class:

APIs & excipients, liquid/semi-solid (with analysis certificate) Model: Arzneistoffe Halbfest/Flüssig (mit Prüfzert.) (2023-05-25 02:30) Sample/Substance 30871/30189

ID:

Report file:

Glycerolum230829-C340-137532023-10-25_16-43-38.pdf Comment:



Result NIRS: Match

The sample has been identified as:

Glycerol

Value: 99.9% (limits 98.0% to 100%)

Additional tests:(Method and results)

>Attach test certificate here or on the following page

Approved by:

Slika 11. Izveščje analize uzorka glicerola

4.3. Prikaz rezultata analize bijelog vazelina

Na Slici 12. prikazan je izvještaj analize bijelog vazelina NIR spektroskopijom. Pripada istoj kategoriji supstancija kao i glicerol (API i pomoćne tvari, tekuća/polučvrsta supstancija), a korištena je i ista metoda mjerenja, transrefleksija, kombinacija transmisije i refleksije jer je najpogodnija za polučvrste tvari.

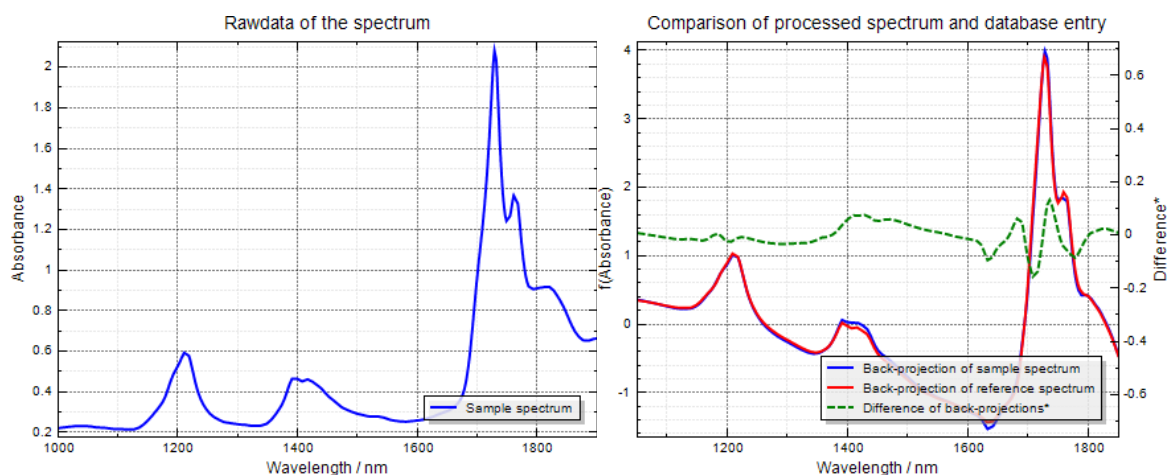
No za razliku od eritromicina i glicerola, bijeli vazelin je u kategoriji žutih supstancija programa QuickStep (Slika 3.). Za žutu kategoriju supstancija, program potvrđuje da pripadaju općenitoj kemijskoj skupini, u ovom slučaju parafinima (podudaranje 98,4 %), a u kategoriji parafina osim vazelina mogu biti i druge farmaceutske sirovine koje u svom sastavu imaju veliki udio parafina (primjerice hidrofobni bazni gel koji je mješavina parafina i parafinskog ulja). Međutim, referentne spektre tih sličnih supstancija uređaj u postavkama isključuje pri mjerenju NIR spektra bijelog vazelina. Primjerice, biljna ulja su vrlo često u žutoj kategoriji sirovina, pri čemu za rezultat analize uređaj potvrđuje samo da se radi o kemijskoj skupini triglicerida i nema dovoljno podataka za točno specificiranje o kojoj vrsti biljnog ulja se radi.

Za potpunu pouzdanu identifikaciju, žuta kategorija supstancija na kraju analitičkog izvješća ima uvijek zadanu opciju *Complementary test* (dodatno ispitivanje). Ova opcija je zadana automatski za supstancije u žutoj kategoriji koje se ne mogu jednoznačno odrediti, ali se može po potrebi isključiti. Na opciji dodatnog ispitivanja, QuickStep program nudi prijedloge mogućnosti za dodatnu identifikaciju koja bi se mogla provesti kako bi ispitanoj supstanciji u potpunosti bio potvrđen identitet. Međutim, magistar farmacije procjenjuje koja bi tehnika bila pogodna i ne mora nužno odabir biti sugerirana tehnika programa. Dobiveni rezultati dodatnog ispitivanja mogu se umetnuti u QuickStep izvješće ispitivane farmaceutske sirovine što je vrlo sistematično jer su tada sve odrađene analize na jednom mjestu.

Provedeno analitičko izvješće NIR spektroskopijom za ispitivani uzorak bijelog vazelina sadrži grafički prikaz obrađenog NIR spektra mjenenog uzorka bijelog vazelina, usporedbu tog spektra (plava linija) s referentnim spektrom (crvena linija) iz baze podataka programa QuickStep te rezultat analize koji navodi 98,4%-tno podudaranje NIR spektra. Međutim, rezultat analize navodi da je ispitivanom uzorku bijelog vazelina potvrđen identitet samo kao supstanciji koja pripada skupini parafina, a ispod navodi sve ostale farmaceutske sirovine koje pripadaju toj skupini. Rezultat mjerenja potvrđuje da su isključene sve ostale supstancije iz baze spektara programa na temelju njihovih NIR spektara, ali da treba provesti dodatno ispitivanje za razlikovanje ispitivane supstancije bijelog vazelina i ostalih iz skupine parafina.

Za dodatnu potvrdu identiteta ispitivanog uzorka vazelina provedena je kemijska reakcija potvrde identiteta, opisana u poglavlju identifikacija pod oznakom C iz HRF izdane 2007. godine, međutim tu istu reakciju navodi i aktualna monografija bijelog vazelina opisna u HRF izdanje 6.3 (na snazi od 2023. godine) koja je usklađena s važećim 11. izdanjem Ph.Eur.

Tested substance: **Vaselineum album**
 Synonym: Paraffin, white soft
 Batch: 231003-C340-14155
 Producer: Fagron
 Expiry_date: 03/08/2026
 Type of measurement: Near-infrared spectroscopy (Ph.Eur10.0/2.2.40) Liquids, transfectance Instrument:
 Substance class: APIs & excipients, liquid/semi-solid (with analysis certificate)
 Model: Arzneistoffe Halbfest/Flüssig (mit Prüfzert.) (2023-05-2502:30)
 Sample/Substance ID: 31473/30006
 Report file: Vaselineum_231003-C340-141552023-10-25_17-18-00.pdf



Result NIRS: The sample has been identified as a substance within the group Paraffin classification*.

Value: 98.4% (limits 98.0% to 100%)

All other substances of the database have been excluded on the basis of the NIR spectrum. The test results only conclusive with additional tests which differentiates within the group.

*Paraffin, whitesoft; Eyeparaffin; Unguentum Cordes®; Eyeointment, emulsifying DAC; Woolalcohol ointment SR with white paraffin; Hydrophobic basegel DAC; Emulsifying hydrophobic basegel DAC; Wool alcohol ointment DAB; Hydrophilic ointment DAB; Paraffin, yellowsoft; Wool alcohol ointment SR/DAC; Paraffin, lightliquid; Paraffin, liquid; Abwaschbare Salbengrundlage (NRF S.31)

Complementary tests:
(Method and results)

Identifikacija C, Hrvatska Farmakopeja 2007 _____

Conclusion: Vaselineum album has been clearly identified.

Yes No

>Attach test certificate here or on the following page<

Approved by: _____
Name

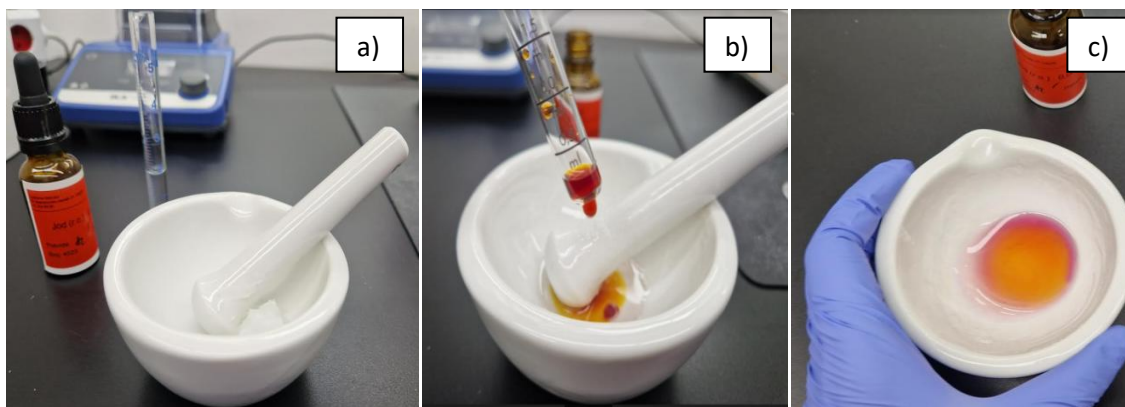
Date/Signature

Slika 12. Izvješće analize uzorka bijelog vazelina

4.3.1. Kemijska reakcija potvrde identiteta bijelog vazelina

Kako bi sa sigurnošću bio potvrđen identitet ispitivanog uzorka bijelog vazelina, prema naputku QuickStep programa uređaja Apo-Ident 2 NIR spektrometra, provedeno je i dodatno ispitivanje identiteta usklađeno s mogućnostima i opremi ljekarničkog laboratorija. Provedena je kemijska reakcija prema monografiji bijelog vazelina iz trenutno važećih HRF i Ph.Eur. (45,46).

Prema monografiji, tali se 2 g (Slika 13.a) bijelog vazelina, do nastajanja prozirne homogene faze. Zatim se dodaje 2 mL pročišćene vode, 0,2 mL 0,05 M otopine joda (Slika 13.b). Potom se smjesa dobro protrese, izmiješa pa ohladi. Čvrst gornji sloj mora biti ljubičasto-ružičast ili smeđ da bi identitet bio potvrđen (Slika 13.c).



Slika 13. Koraci kemijske reakcije (a-c) potvrde identiteta bijelog vazelina prema propisu HRF i Ph.Eur.

Ovaj primjer kemijske reakcije za identifikaciju je dosta jednostavan, ne zahtjeva pripremu zahtjevnih reagensa (reagens se može pripremiti u laboratoriju), postupak je jednostavan i brz, ali ipak cijeli postupak, od pripreme reagensa i same provjere, traje duže od mjerenja na Apo-Ident 2 NIR spektrometru. Kod kemijskih reakcija najčešće su promjena boje (kao u opisanom primjeru) ili stvaranje taloga nastalog produkta reakcije pokazatelj potvrde identiteta. U nekim slučajevima, to nije dovoljno selektivno, kao primjerice identifikacija uz sofisticiraniju opremu instrumentalnom tehnikom kao što je NIR koja kao *fingerprint* tehnika daje u potpunosti točne i nedvojbene rezultate. Slične molekule, sličnih karakteristika odnosno kemijskog sastava (funkcionalnih grupa) često vrlo

slično kemijski reagiraju. Primjerice, žuti vazelin daje istu kemijsku reakciju, isto obojenje kao i bijeli vazelin, iako ih možemo organoleptički razlikovati.

5. RASPRAVA

Apo-Ident 2 NIR spektrometar, koji se koristio u ovom radu za potvrdu identiteta uzoraka eritromicina, glicerola i bijelog vazelina u ljekarničkom laboratoriju, može identificirati oko 1100 farmaceutskih supstancija. Prilagođen je za ljekarništvo jer se u bazi podataka programa QuickStep, koji podržava rad uređaja, nalaze referentni NIR spektri supstancija koje se najčešće koriste u ljekarništvu u izradama magistralnih i galenskih pripravaka. Prednost za upotrebu u ljekarništvu je i njegova jednostavnost pri rukovanju te mogućnost vrlo brzih mjerenja jer ljekarne najčešće nemaju iskusnog analitičara koji bi obavljao složenija analitička ispitivanja. Također, primjenu skupljih i kompliciranijih farmakopejskih analitičkih tehnika za kontrolu kvalitete ljekarničkih pripravaka bilo bi zbog specifičnosti tržišta još uvijek vrlo teško ugraditi u cijenu pripravka (čija cijena nije definirana HZZO osnovnom i dopunskom listom magistralnih pripravaka) pa stoga zasad složenije tehnike zbog skupih instrumenata i neisplativosti još uvijek nisu primjenjive u ljekarništvu.

Apo-Ident 2 NIR spektrometar svakako nudi prednost u identifikaciji farmaceutskih sirovina zbog jednostavnosti i brzine analize, između ostalog i jer nije potrebna nikakva obrada uzorka (nisu potrebne slijepe probe, reagensi i skupi standardi), mjerenje se odvija kraće od 15 sekundi, a uzorak se ne uništava mjerenjem te se dalje može koristiti u izradama pripravaka. Uređajem je moguće analizirati čvrste, tekuće i polučvrste farmaceutske sirovine, što je velika prednost jer pokriva širok raspon ljekarničkih supstancija. Uređaj se jednostavno održava, a može biti i prijenosan (težine svega 2,95 kg).

Važno je redovno ažurirati program QuickStep prema uputama proizvođača NIR spektrometra. Program sadrži potpuno validiranu bazu referentnih NIR spektara, a prednost je i što se redovno novim ažuriranjem dodaju u njegovu bazu podataka NIR spektri novih farmaceutskih supstancija. Svakim novim ažuriranjem moguće je proširiti primjenu NIR tehnike u ljekarničkom laboratoriju i analizirati neku novu farmaceutsku sirovinu za izradu magistralnih ili galenskih pripravaka.

Metoda mjerenja NIR tehnikom ne funkcionira na način da se spektar ispitivane farmaceutske supstancije uspoređuje direktno s referentnim spektrom iz baze podataka već se obrađuje kemometrijskim modelom. NIR spektri iz baze podataka dobiveni su snimanjem više referentnih spektara istih farmaceutskih sirovina od različitih dobavljača i proizvođača te mjerenjem većeg broja serija. To je velika prednost, jer ljekarne mogu naručivati supstancije od više dobavljača, a razlike u proizvodnji ili primjerice mikronizaciji ili gustoći materijala mogu dovesti do različitih svojstava koja onda utječu na izgled NIR spektra, no kvaliteta supstancije koja se koristi za izradu magistralnih i galenskih pripravaka i sva svojstva i dalje moraju biti unutar propisanih zahtjeva monografije farmakopeje. Dakle, prilikom izrade NIR spektara za referentnu bazu ispitivanih tvari, snima se veliki broj ispitivanih farmaceutskih tvari, različitih serija i od različitih dobavljača, a pri snimanju i pri prikupljanju spektara profilira se da li je najučinkovitije mjerenje putem transmisije, difuzne refleksije ili transrefleksije. U ljekarni se ista metoda mjerenja NIR spektra mora odabrati prilikom mjerenja ispitivanog uzorka, no ovaj korak je već programski određen i zadan, tako da operater mora odabrati samo naziv supstancije čiji identitet želi ispitati (44).

Apo-Ident 2 NIR spektrometar može se koristiti samo za potvrdu identiteta, dakle bez obzira što je NIR tehnikom moguće provesti i kvantitativna ispitivanja te je koristiti za brojne druge svrhe već spomenute u uvodnom dijelu rada. Za korištenje Apo-Ident 2 NIR spektrometra nije potrebno posebno iskustvo u analitici ili na radu sa sličnim uređajima s obzirom da je rukovanje jako jednostavno te QuickStep program uređaja vrlo jasno vodi kroz svaki korak postupka snimanja spektra ispitivane supstancije i potom usporedbe s referentnim NIR spektrom iz baze podataka. Uređaj već ima zadane postavke poput vremena snimanja (prikladno za ispitivanu tvar), broj skeniranja za početne materijale i slično, tako da ih operater ne mora postavljati.

U radu su prikazane potvrde identiteta uzoraka eritromicina, glicerola i bijelog vazelina u ljekarničkom laboratoriju primjenom NIR spektroskopije uređajem Apo-Ident 2, objašnjeni su postupci snimanja NIR spektra, usporedba s odgovarajućim referentnim spektrom iz baze podataka

te tumačenje dobivenih rezultata mjerenja. Za identifikaciju NIR tehnikom izabrani su uzorci farmaceutskih sirovina u različitom stanju, čvrstom (eritromicin), tekućem (glicerol) i polučvrstom (bijeli vazelin), kao i supstancije iz različitih kategorija definiranih u QuickStep programu, zelene (moguća je pouzdana analiza NIR tehnikom, u tu kategoriji pripadaju eritromicin i glicerol) i žute (djelomično moguće potvrditi identitet svrstavanjem u skupinu srodnih spojeva pa je preporučeno i dodatno ispitivanje, u tu kategoriju pripada bijeli vazelin).

Kako je već spomenuto, različiti kristalni oblici farmaceutske supstancije mogu se razlikovati NIR analitičkom tehnikom, također i hidrati i solvati koji u kristalnoj rešetki sadrže vodu ili otapalo pa je struktura rešetke drugačija i razlika se može vidjeti u NIR spektrima. Navedena prednost NIR tehnike je i u ljekarništvu vrlo značajna što pokazuje sljedeći primjer izrade pripravka s teofilinom kao djelatnom tvari.

Teofilin, kao lijek uske terapijske širine, koristi se za izradu pedijatrijskih sirupa za najmanje i najrizičnije pacijente. Teofilin je jedan od najpoznatijih lijekova uske terapijske širine, što znači da je vrlo mala razlika između doze koja je učinkovita te doze koja je štetna za pacijenta i može izazvati ozbiljne nuspojave i posljedice za zdravlje. Zato je kod izrade tog sirupa važna kvaliteta upotrijebljene supstancije, ali i ispravno pripremljena koncentracija sirupa teofilina.

Teofilin kao supstancija na tržištu farmaceutskih sirovina dolazi u dva oblika, kao teofilin i teofilin monohidrat. Farmaceutski protokoli za izradu sirupa navode teofilin, uz napomenu da u slučaju upotrebe supstancije teofilin monohidrata, svakako je potrebno i ključno preračunati odvagu teofilin monohidrata kako bi koncentracija djelatne tvari u pripremljenom sirupu bila jednaka bez obzira koji se oblik te supstancije koristi. U laboratoriju ZU Ljekarna Marušić se nalaze oba oblika teofilina zbog čestih nestašica supstancija i slabe dostupnosti. Ako se prije izrade sirupa potvrđuje identitet djelatne tvari teofilina (čiji NIR spektar postoji u bazi podataka QuickStep programa Apo-Ident 2 NIR spektrometra), a slučajno se greškom uzela supstancija teofilin monohidrata (ili je primjerice zaprimljena pogrešna supstancija od dobavljača), uređaj će detektirati usporedbom NIR spektra

ispitivanog uzorka teofilin monohidrata i referentnog spektra teofilina iz baze da uzeta farmaceutska sirovina za izradu sirupa nije teofilin.

Ovom jednostavnom analizom se isključuje mogućnost zamjene dva oblika teofilina, bilo kod dobavljača farmaceutske sirovine ili prilikom izrade pripravka u ljekarni, a uzimanjem odgovarajućeg oblika supstancije moguće je prilagoditi odvag u ovisno o tipu teofilina koji se koristi za izradu sirupa. Na taj način ljekarnik koji izrađuje magistralni pripravak i snosi zakonsku odgovornost za korištene farmaceutske sirovine može biti siguran u kvalitetu izrađenog pripravka, a time i u njegovu djelotvornost i sigurnost primjene za pacijenta.

Navedeni primjer ukazuje na nužnost uvođenja sustava kvalitete u zdravstvene ustanove za izradu magistralnih i galenskih pripravaka, a primjena NIR spektroskopije za potvrdu identiteta ulaznih sirovina može na jednostavan i pouzdan način u ljekarničkom laboratoriju pridonijeti izradi kvalitetnih pripravaka.

6. ZAKLJUČAK

Radom se ističe važnost ulazne kontrole farmaceutskih sirovina u ljekarni uključujući obveznu provjeru certifikata analize kojim se garantira deklarirana kvaliteta u roku valjanosti te provedbu ulazne potvrde identiteta farmaceutskih sirovina prije same upotrebe za izradu magistralnih i galenskih pripravaka. Sve polazne farmaceutske sirovine koji se koriste u izradi pripravaka trebaju udovoljavati važećim farmakopejskim normama.

Eksperimentalno je pokazano kako se NIR tehnikom može vrlo brzo, jednostavno i pouzdano potvrditi identitet farmaceutskih supstancija u ljekarničkom laboratoriju. Moguće je analizirati čvrste, tekuće i polučvrste farmaceutske sirovine, nije potrebna obrada uzorka, niti upotreba standarda jer se identitet potvrđuje usporedbom NIR spektra ispitivane supstancije s referentnim spektrom iz baze podataka. Može se identificirati oko 1100 farmaceutskih supstancija koje se najčešće koriste u izradama magistralnih i galenskih pripravaka.

Ljekarnička struka mora intenzivnije raditi na podizanju kvalitete izrade magistralnih i galenskih pripravaka što doprinosi ne samo njezinom napretku, već i sigurnosti primjene pripravaka izrađenih u ljekarni. Definiranje sustava kvalitete u zdravstvenim ustanovama podići će kvalitetu izrade ljekarničkih pripravaka.

7. LITERATURA

1. Zakon o lijekovima, NN 76/13, 90/14, 100/18, Narodne novine 2018., *dostupno na:*
https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_07_71_2181.html, *datum pristupa*
19.1.2024.
2. Pravilnik o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju i izdavanju lijekova na recept,
NN 86/2013, *dostupno na:*
https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_86_1937.html, *datum pristupa*
19.1.2024.
3. Pravila dobre ljekarničke prakse, Članak 24, *dostupno na:*
[https://www.hljk.hr/storage/upload/reading_articles/Pravila_dobre_ljekarnicke_prakse -
_procisceni_tekst_14251.pdf](https://www.hljk.hr/storage/upload/reading_articles/Pravila_dobre_ljekarnicke_prakse_-_procisceni_tekst_14251.pdf), *datum pristupa* 19.1.2024.
4. Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb: Školska knjiga; 1994, str.13-19.
5. Fagron: Protokoli izrade i kompatibilnost, *dostupno na:*<https://fagron.com/formulary/>,
datum pristupa 20.2.2024.
6. Fagron: TrichoTest, *dostupno na:*[https://fagrongenomics.com/products/1-genetic-test/2-
trichotest](https://fagrongenomics.com/products/1-genetic-test/2-trichotest), *datum pristupa* 20.2.2024.
7. Ramos PM, Sinclair R, Miot HA, Goren A. Sulfotransferase activity in plucked hair follicles
predicts response to topical minoxidil treatment in Brazilian female pattern hair loss patients.
Dermatol Ther 2020; 33(1):e13195.
8. Zakon o kemikalijama, NN 18/13, 115/18, 37/20, *dostupno na*
<https://www.zakon.hr/z/465/Zakon-o-kemikalijama>, *datum pristupa* 19.1.2024.
9. Američka farmakopeja (USP43/NF38, 2020), USP Convention, poglavlje <1191> Stability
consideration in dispensing practise, str. 3029.
10. Bećirević Laćan M, Begović-Dolinić V, Buhač I i sur. Formulae Magistrales Croaticae. Zagreb:
Hrvatska ljekarnička komora; 2010, str. 13-39.

11. Britanska farmakopeja (BP), The Stationery Office, London, 2009.
12. Trissel LA, Ashworth LD, Ashworth J. Trissel's Stability of Compounded Formulations, 6.izd. American Pharmacists Association Publication, 2018.
13. Tabellen für die Rezeptur: Plausibilitätsprüfung in der Apotheke, Pharmazeutisches Laboratorium des DAC/NRF, 2021.
14. Hrvatska farmakopeja HRF 6.3, Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2022.
15. Europska farmakopeja (Ph.Eur 11.0, 01/2023), Strasbourg, Council of Europe, poglavlje 7. Dosage forms, Semisolid preparations for cutaneous application, str. 1001
16. Američka farmakopeja (USP43/NF38,2020), USP Convention, poglavlja <795> Pharmaceutical compounding – nonsterile preparations, str. 7025, <800> Hazardous drugs –Handling in healthcare settings, str. 7071.
17. Pravilnik o provjeri kakvoće lijeka, NN 60/14, 16.5.2014, *dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_05_60_1118.html, datum pristupa: 19.1.2024.*
18. Raggi MA, Bugamelli F, Pucci V. Determination of melatonin in galenic preparations by LC and voltammetry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2002; 29(1-2): 283-289.
19. Bettiol A, Lombardi N, Crescioli G, i sur. Galenic Preparations of Therapeutic Cannabis sativa Differ in Cannabinoids Concentration: A Quantitative Analysis of Variability and Possible Clinical Implications. *Frontiers in Pharmacology* 2019; 17:9:1543
20. Porru E, Piro F, Comito R. i sur. Analytical Method and Stability Study for Oral Suspension of Idebenone in Syrspond. *Separations* 2023; 10(9), 517.
21. Mattos da Silva M.R, Pereira Dysars L, Pereira dos Santos E, Ricci Júnior E, Preparation of extemporaneous oral liquid in the hospital pharmacy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020; 56:e18358.
22. Vigneron J, D'Huart E, Demoré B. Stability studies in oncology , A marketing tool for pharmaceutical companies, a scientific mission for hospital pharmacists. *European Journal of Oncology Pharmacy* 2019, 2:2(e12).

23. Resolution CM/Res (2016)1, *dostupno na:*
<https://statements.eahp.eu/sites/default/files/resources/resource%20statement%203.3-compounding.pdf>, *datum pristupa 21.2.2024.*
24. Centers for DiseaseControl and Prevention, Outbreaks and Public Health Response, *dostupno na:*<https://www.cdc.gov/meningococcal/outbreaks/index.html>, *datum pristupa: 21.2.2024.*
25. Sustavi upravljanja kvalitetom - Zahtjevi (ISO 9001:2015; EN ISO 9001:2015), *dostupno na*
<https://repositorij.hzn.hr/norm/HRN+EN+ISO+9001%3A2015>, *datum pristupa: 21.2.2024.*
26. Američka farmakopeja (USP43/NF38,2020), USP Convention, poglavlje <1163> Quality assurance in pharmaceutical compounding, str. 7979.
27. Direktiva 2001/83/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. studenoga 2001. o Zakoniku Zajednice o lijekovima za humanu upotrebu, *dostupno na:*<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:02001L0083-20210526&from=DA>, *datum pristupa: 19.1.2024.*
28. Pravilnik o normativima i standardima za obavljanje zdravstvene djelatnosti, NN 52/2020 (29.4.2020.), *dostupno na* <https://www.zakon.hr/cms.htm?id=44394>, *datum pristupa: 21.2.2024.*
29. Pravilnik o uvjetima za davanje proizvodne dozvole, zahtjevima dobre proizvođačke prakse te potvrdi o provođenju dobre proizvođačke prakse za lijekove, NN 83/2013, *dostupno na:*https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_83_1799.html, *datum pristupa: 21.2.2024.*
30. PIC/S Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products, PE 009-17, 25.8.2023., *dostupno na:*<https://picscheme.org/docview/6606>, *datum pristupa: 21.2.2024.*
31. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, section 503A, section 503B, *dostupno na:*
<https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/human-drug-compounding>, *datum pristupa: 21.2.2024.*

32. Nigović B, Mornar A, Sertić M, Amidžić Klarić D. Analitika lijekova, priručnik za vježbe za studente farmacije, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2022., str. 13-44.
33. Europska farmakopeja (Ph.Eur 11.0, 01/2023), Strasbourg, Council of Europe, poglavlja 2.2. Physical and physico-chemical methods, str.23, 2.2.40 Near-Infrared Spectrophotometry, str. 76-81.
34. Bruker: Infrared and Raman, FT-NIR spectrometers, *dostupno na:*
<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-nir-spectrometers/what-is-ft-nir-spectroscopy.html>
35. Link A, Watzig H. Gute NIR-Praxis. Moderne Infrarot spektrometrie in der Apotheke. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2016, str. 2, str. 4-7, str. 16-19, str. 31-34.
36. Donald AB, Ciurczak EW. Handbook of Near-Infrared Analysis. CRC Press; 2008. 7-18 str.
37. Skvaril J, Kyprianidis K.G, Dahlquist E. Applications of near-infrared spectroscopy (NIRS) in biomass energy conversion processes. Applied spectroscopy reviews 2017; 679 str.
38. Plugge W, Van der Vlies CJ. Near-infrared spectroscopy as an alternative to assess compliance of ampicillin trihydrate with compendial specifications. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1993; 11(6):435-42.
39. Američka farmakopeja (USP43/NF38, 2020), USP Convention; poglavlja <856> Near-Infrared Spectroscopy, str. 7161, <1856> Near-Infrared Spectroscopy – Theory and Practise, str. 8658.
40. Smetiško J, Miljanić S. Dissolution assessment of allopurinol immediate release tablets by near infrared spectroscopy. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2017; 145:322-330.
41. Velez NL, Drennen JK, Anderson CA. Challenges, opportunities and recent advances in near infrared spectroscopy applications for monitoring blend uniformity in the continuous manufacturing of solid oral dosage forms. International journal of pharmaceutics 2022; 615:121462.

42. Alam MA, Liu YA, Dolph S, Pawliczek M, Peeters E, Palm A. Benchtop NIR method development for continuous manufacturing scale to enable efficient PAT application for solid oral dosage form. *International journal of pharmaceutics* 2021; 601:120581.
43. Hongfei N, Weiliang F, Jing W i sur. Non-destructive detection of polysaccharides and moisture in *Ganoderma lucidum* using near-infrared spectroscopy and machine learning algorithm. *LWT* 2023; 183: 115001.
44. Operating manual for the NIR analysers Apo-Ident 1 and Apo-Ident 2 based on version 2.4, str.3 *dostupno na:*
https://www.apoident.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/Anleitungen/APO-Ident--Manual-EN.pdf
45. Hrvatska farmakopeja 2007, Hrvatsko farmaceutsko društvo, Zagreb, 2007, Norme kakvoće, Vazelin bijeli, str. 242.
46. Europska farmakopeja (Ph.Eur 11.0, 01/2023), Strasbourg, Council of Europe, Paraffin, whitesoft, str. 2670.