

SAIRAALA-APTEEKISSA VALMISTETTAVAT KIINTEÄT  
LÄÄKEVALMISTEET JA NIIDEN SÄILYVYYS

Veera Mertaniemi

Pro gradu -tutkielma

Proviisorin koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Farmasian laitos

Lokakuu 2020

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, terveystieteiden tiedekunta

Farmasian laitos

Proviisorin koulutusohjelma

Farmaseuttinen kemia

MERTANIEMI VEERA, T A: Sairaala-apteekissa valmistettavat kiinteät lääkevalmisteet ja niiden säilyvyys

Pro gradu -tutkielma, 64 s

Ohjaajat: FT Marko Lehtonen ja proviisori Hannes Niinikoski

Lokakuu 2020

---

Avainsanat: säilyvyys, kiinteä lääkemuoto, säilyvyystutkimus, sairaala-apteekin lääkevalmistus

Lääkevalmistus on tärkeä osa sairaala-apteekkien toimintaa, sillä aina ei ole saatavilla potilaalle sopivaa kaupallista valmistetta. Syynä voivat olla esimerkiksi potilaan yksilölliset tarpeet tai lääkkeen saatavuushäiriö. Sairaala-apteekin tulee tuntea lääkevalmisteen säilyvyys, jotta varmistutaan, että valmiste täyttää laatuvaatimukset kestoaikanaan ja on antohetkellä tehokas ja turvallinen potilaalle. Kiinteiden lääkevalmisteiden käytön etuna on niiden hyvä säilyvyys verrattuna puolikiinteisiin tai nestemäisiin lääkevalmisteisiin. Lisäksi niitä on helppo käsitellä ja ne ovat potilaalle käteviä sekä miellyttäviä annostella.

Tämän tutkielman kirjallisuusosassa perehdytään sairaala-apteeeissa valmistettaviin kiinteisiin lääkemuotoihin, joista Suomessa yleisimpiä ovat kapselit ja annosjauheet. Lisäksi käsitellään kiinteiden lääkevalmisteiden säilyvyyden tutkimista. Valmisteen kesto aika tulisi määrittää sairaala-apteekissa ensisijaisesti toteuttamalla säilyvyystutkimus, mikä voi olla haastavaa resurssien puuttuessa. Tulosten luotettavuuden varmistamiseksi tutkimuksessa on käytettävä käyttötarkoitukseensa sopivaa analyysimenetelmää. Kirjallisuusosassa käydään läpi myös kiinteiden lääkevalmisteiden kemiallista ja fysikaalista säilyvyyttä. Kemiallisessa hajoamisessa tyypillisiä reaktioita ovat hydrolyysi, hapettuminen ja fotolyysi. Fysikaalisessa hajoamisessa puolestaan ilmenee erilaisia kiderakenteen muutoksia, kuten polymorfiaa, amorfiaa ja hydraatiota.

Tutkielman kokeellisessa osassa tutkittiin sairaala-apteekissa valmistettujen misoprostolikapseleiden (25 µg) kemiallista säilyvyyttä. Säilyvyystutkimuksen tarkoituksena oli selvittää valmisteen kesto aika huoneenlämmössä. Misoprostolin kvantitatiivista määrittystä varten kehitettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografinen (HPLC) menetelmä, joka validointiin ICH:n Q1(R2)-ohjeiston mukaisesti. Misoprostolikapseleista tutkittiin myös Euroopan farmakopean mukaisesti annosyksiköiden yhdenmukaisuus eli kapseleiden jakelutarkkuus ja annosvaihtelu.

Validointitulosten perusteella HPLC-menetelmä todettiin sopivaksi misoprostolin pitoisuusmäärittelyyn. Misoprostolikapseleiden jakelutarkkuus ja annosvaihtelu olivat hyväksytyissä rajoissa, mikä osoittaa kapseleiden valmistusprosessin toimivan luotettavasti. Säilyvyystutkimuksen tulosten perusteella misoprostolikapselit säilyvät huoneenlämmössä ( $25 \pm 2$  °C) ja 60 % suhteellisessa kosteudessa muovipurkkiin pakattuina 35 vuorokautta. Säilyvyystutkimuksen aikana kapseleissa havaittiin mahdollisia hajoamistuotteita.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Pharmacy

Master of Science in Pharmacy program

Pharmaceutical Chemistry

MERTANIEMI VEERA, T A: Sairaala-apteekissa valmistettavat kiinteät lääkevalmisteet ja niiden säilyvyys

Master's thesis, 64 p

Supervisors: Ph.D (Chem) Marko Lehtonen and M.Sc. (Pharmacy) Hannes Niinikoski

September 2020

---

Keywords: stability, solid dosage form, stability study, hospital pharmacy compounding

Pharmaceutical compounding is an important part of the services of hospital pharmacies because a commercial product suitable for the patient is not always available. This may be due to, for example, the individual needs of the patient or a medicine shortage. The hospital pharmacist should know the shelf life of the pharmaceutical preparation to ensure that the product meets the quality requirements during its shelf life and is effective and safe for the patient at the time of administration. The advantage of using solid pharmaceutical preparations is their good stability compared to semi-solid or liquid preparations. In addition, they are easy to handle and convenient for the patient.

The literature part of this thesis examines solid dosage forms manufactured in hospital pharmacies, the most common of which are capsules and powders in Finland. In addition, the stability testing of solid pharmaceutical preparations is discussed. The shelf life of the preparation should be determined in a hospital pharmacy primarily by conducting a stability study, which can be challenging with limited resources. In order to ensure the reliability of the results, an appropriate analytical method should be used for the study. The literature part also covers the chemical and physical stability of solid pharmaceutical preparations. The typical reactions of chemical degradation include hydrolysis, oxidation and photolysis. Physical degradation involves various changes in the crystal structure, such as polymorphism, amorphisation and hydration.

In the experimental part of the thesis, the chemical stability of misoprostol capsules (25 µg) prepared in a hospital pharmacy was examined. The purpose of the stability study was to determine the shelf life at room temperature. For the quantitative determination of misoprostol, a high-performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed and validated in accordance with ICH's Q1(R2) guideline. The uniformity of dosage units of misoprostol capsules, i.e. the uniformity of mass of single-dose preparations and the uniformity of content of single-dose preparations, was also investigated in accordance with the European Pharmacopoeia.

Based on the validation results, the HPLC method was found to be appropriate for the determination of the misoprostol concentration. The uniformity of mass and the uniformity of content of the misoprostol capsules were within the accepted limits, indicating that the process of capsule manufacturing functioned reliably. According to the stability study, the misoprostol capsules are stable for 35 days when stored at room temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 60 % relative humidity in a plastic bottle. During the study, potential degradation products were observed in the capsules.

## **Esipuhe**

Tämä pro gradu -tutkielma on tehty Itä-Suomen yliopiston farmasian laitoksella farmaseuttisen kemian oppiaineessa vuosina 2019–2020. Haluan kiittää graduohjaajiani Marko Lehtosta ja Hannes Niinikoskea kannustuksesta, kärsivällisyydestä ja innoituksesta gradun teossa. Heidän asiantuntevat näkemyksensä auttoivat niin käytännön ongelmien ratkaisussa kuin tekstin työstämisessä. Kiitos myös erikoislaboratoriomestari Miia Reposelle sekä muulle laboratoriohenkilöstölle, jotka auttoivat käytännön työssä. Lisäksi haluan kiittää Lapin keskussairaalan ja Kuopion yliopistollisen sairaalan sairaala-apteekkeja yhteistyöstä tässä pro gradussa.

Kiitoksen ansaitsevat myös opiskelijatoverini ja ystäväni, joiden tuki on ollut korvaamatonta. Erityisesti lämmöllä muistelen niitä monia tunteja, jotka vietimme Moona Niemisen kanssa labratöiden parissa. Pro gradu -tutkielman saattaminen loppuun tuntuu samalla yhden aikakauden lopulta ja jäänkin haikeudella muistamaan opiskeluaikojani. Vielä lopuksi kiitän perhettäni ja rakasta puolisoani, joka on ollut rinnallani koko opiskeluajan. Ilman häntä tämä ei olisi ollut mahdollista.

Ivalossa lokakuussa 2020

Veera Mertaniemi

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>KIRJALLISUUSKATSAUS .....</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>7</b>
<b>2 SAIRAALA-APTEEKISSA VALMISTETTAVAT KIINTEÄT LÄÄKEMUODOT.....</b>	<b>8</b>
2.1 SAIRAALA-APTEEKIN LÄÄKEVALMISTUS.....	9
2.2 YLEISIMMIN VALMISTETTAVAT KIINTEÄT LÄÄKEMUODOT .....	10
2.3 KIINTEIDEN LÄÄKEVALMISTEIDEN SÄILYVYYDEN TUTKIMINEN .....	12
<b>3. KIINTEIDEN LÄÄKEVALMISTEIDEN SÄILYVYYS.....</b>	<b>16</b>
3.1 KEMIALLINEN SÄILYVYYS .....	16
3.1.1 Hydrolyysi.....	17
3.1.2 Hapettuminen.....	20
3.1.3 Fotolyysi .....	23
3.1.4 Lääke- ja apuaineen väliset kemialliset interaktiot.....	25
3.2 FYSIKAALINEN SÄILYVYYS .....	28
<b>4 POHDINTA .....</b>	<b>31</b>
<b>KOKEELLINEN OSA.....</b>	<b>32</b>
<b>5 JOHDANTO .....</b>	<b>32</b>
<b>6 MENETELMÄN KUVAUS .....</b>	<b>33</b>
6.1 MATERIAALIT .....	33
6.2 MISOPROSTOLIKAPSELEIDEN VALMISTUS .....	33
6.3 NÄYTTEIDEN JA STANDARDIEN VALMISTUS.....	34
6.4 NESTEKROMATOGRAFI-MASSASPEKTROMETRI .....	35
6.5 NESTEKROMATOGRAFI.....	36
6.6 MENETELMÄN VALIDOINTI.....	36
6.6.1 Spesifisyys .....	36
6.6.2 Lineaarisuus .....	37

6.6.3 Oikeellisuus.....	38
6.6.4 Toistettavuus .....	38
6.6.5 Haavoittuvuus .....	39
6.7 LÄÄKEVALMISTEEN LAADUNVALVONTA .....	39
6.7.1 Säilyvyystutkimus .....	40
6.7.2 Annosyksiköiden yhdenmukaisuus.....	41
<b>7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU .....</b>	<b>42</b>
7.1 MENETELMÄN KEHITYS .....	42
7.2 VALIDOINTITULOKSET .....	43
7.2.1 Spesifisyys .....	44
7.2.2 Lineaarisuus .....	46
7.2.3 Oikeellisuus.....	48
7.2.4 Toistettavuus .....	49
7.2.5 Haavoittuvuus .....	50
7.3 LÄÄKEVALMISTEEN LAADUNVALVONTA .....	51
7.3.1 Säilyvyystutkimus .....	51
7.3.2 Annosyksiköiden yhdenmukaisuus.....	54
<b>8 YHTEENVETO.....</b>	<b>56</b>
<b>LÄHTEET.....</b>	<b>58</b>

# KIRJALLISUUSKATSAUS

## 1 JOHDANTO

Farmasian alalla tapahtuneista muutoksista, kuten teollistumisesta, huolimatta lääkevalmistus on pysynyt maailmanlaajuisesti tärkeänä osana sairaala-apteekkien toimintaa (Carvalho ym. 2012). Lääkevalmistusta tarvitaan sopivan kaupallisen valmisteen puuttuessa. Esimerkiksi lapsille oikean vahvuuden löytäminen voi olla vaikeaa tai iäkkään potilaan nielemisvaikeuden vuoksi lääke täytyy annostella muuta kuin oraalista reittiä käyttäen. Potilaiden yksilöllisten tarpeiden lisäksi lääkevalmistusta tarvitaan, mikäli lääkkeiden saatavuudessa on häiriöitä tai valmistus lopetetaan. Lääkkeiden saatavuushäiriöt ovat aiheuttaneet ongelmia sairaala-apteeekeissa yhä enenevässä määrin koko Euroopan alueella ja kehityskulku vaikuttaa jatkuvan samana (EAHP 2020). Vuonna 2019 sairaala-apteeekeissa työskentelevästä farmaseuttisesta henkilökunnasta 95 % raportoi kohdanneensa ongelmia lääkkeiden saatavuudessa.

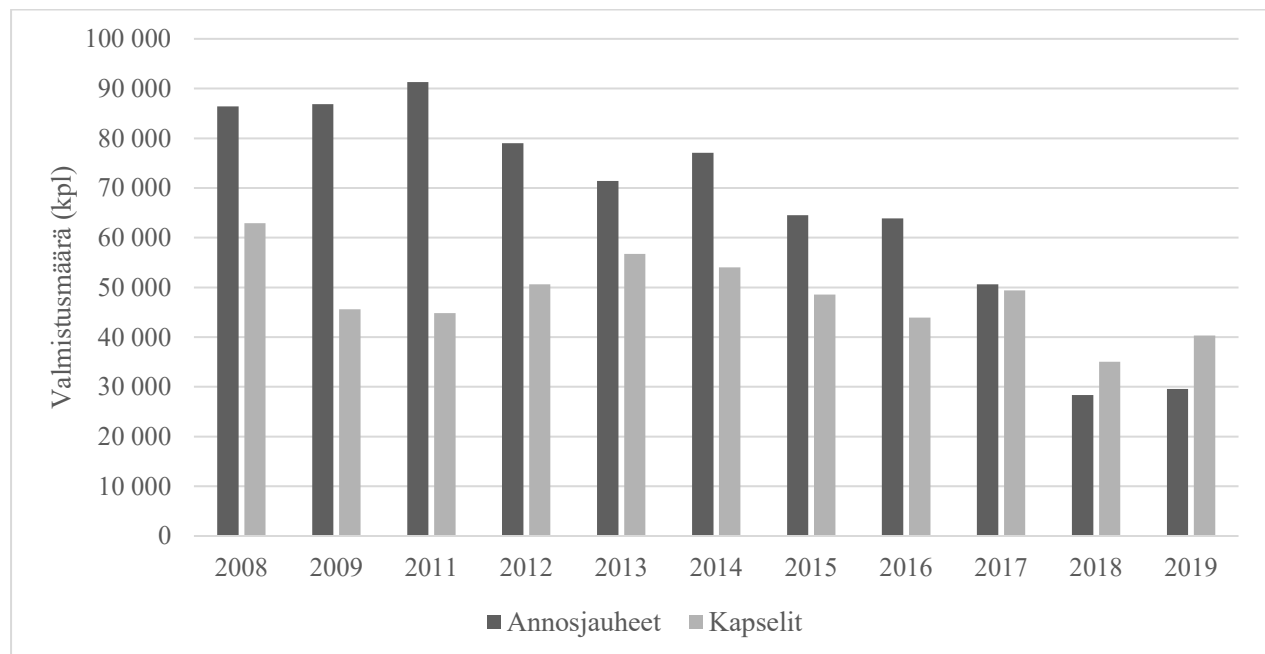
Lääkevalmisteeille tulee sairaala-apteekissa määrittää kesto aika ja säilytysolosuhteet, minkä vuoksi valmisteen säilyvyyden tunteminen on välttämätöntä (Pranker 2009). Säilyvyys tarkoittaa lääkevalmisteen kykyä täyttää sille asetetut laatuvaatimukset kesto aikanaan (Kommanaboyina ja Rhodes 1999). Lääkevalmisteeille asetetut laatuvaatimukset voivat koskea esimerkiksi kemiallisia, fysikaalisia, mikrobiologisia tai terapeuttisia ominaisuuksia. Valmisteen ominaisuuksien tulee pysyä samoina valmistuksesta käyttöhetkeen saakka, jotta varmistetaan lääkkeen olevan tehokas ja turvallinen potilaalle annosteltaessa.

Tämän pro gradu -tutkielman kirjallisessa osiossa luodaan katsaus Suomen sairaala-apteeekeissa valmistettaviin kiinteisiin lääkevalmisteisiin ja -valmisteesiin sekä niiden säilyvyyden tutkimiseen. Lisäksi perehdytään kiinteiden lääkevalmisteiden kemialliseen ja fysikaaliseen säilyvyyteen, joista esitellään yleisimmät hajoamistyyppit. Kolmas keskeinen säilyvyyden osa-alue, mikrobiologinen säilyvyys, on rajattu tästä tarkastelusta pois.

## 2 SAIRAALA-APTEEKISSA VALMISTETTAVAT KIINTEÄT LÄÄKEMUODOT

Markkinoilla olevat kaupalliset lääkevalmisteet eivät aina vastaa potilaan tarpeita, minkä vuoksi sairaala-apteekkien valmistamat lääkevalmisteet ovat tärkeä vaihtoehto hoitoa suunniteltaessa (Carvalho 2013 s. 27–28). Tällöin pystytään esimerkiksi valitsemaan lääkemuoto tai vahvuus, jota ei kaupallisissa valmisteissa ole tarjolla, tai muuttamaan valmisteen raaka-aineita ja organoleptisiä ominaisuuksia (maku, tekstuuri, väri) potilaalle sopiviksi. Kiinteiden lääkemuotojen valmistuksessa etuna on hyvä säilyvyys, jolloin valmisteseen ei tarvitse lisätä säilöntäaineita tai muita ylimääräisiä apuaineita (Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Kiinteät lääkevalmisteet ovat helppoja käsitellä, käteviä potilaalle ja standardisoituja, mutta myös joustavia annostelun suhteen.

Suomen lääkeviranomaisena toimiva Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea velvoittaa määräyksessään 6/2011 sairaala-apteekit ja lääkekeskukset ilmoittamaan kalenterivuoden aikana valmistetuista ex tempore -valmisteista muun muassa lääkemuodon ja valmistetun määrän. Vuosina 2008–2019 ilmoitetut kiinteät lääkemuodot olivat annosjauhe, kapseli ja tabletti, joista kapselien ja annosjauheiden vuosittaiset valmistusmäärät on esitetty kuvassa 1 (Fimea 2020).



Kuva 1. Suomen sairaala-apteekkien ja lääkekeskusten kapselien ja annosjauheiden valmistusmäärät vuosina 2008-2019 (Fimea 2020).



Kiinteiden lääkemuotojen valmistusmäärät ovat laskeneet sairaala-apteeekeissa ja lääkekeskuksissa (Fimea 2020). Annosjauheet ovat olleet Suomessa suositumpia *ex tempore* -valmisteita kuin kapselit, mutta vuodesta 2017 lähtien kapseleiden valmistusmäärät ovat nousseet annosjauheiden tasolle ja ylemmäs. Tablettien valmistusmääräksi raportoitiin vuosina 2008–2009 yhteensä 568 kappaletta, mutta vuoden 2009 jälkeen niitä ei ole valmistettu sairaala-apteeekeissa. Myös muualla Euroopassa kapselit, jauheet ja tabletit ovat yleisiä oraalisia kiinteitä lääkemuotoja (Carvalho 2013 s. 341). Niiden lisäksi sairaala-apteeekeissa valmistetaan joissain maissa oblaattikapseleita (eng. *cachet*) ja jauheita oraaliliuosta varten. Kiinteisiin oraalivalmisteisiin voidaan laskea myös rohdostabletit, -kapselit ja -jauheet sekä rohdosteet (Zhou ym. 2009, Helin-Tanninen ja Pinto 2015).

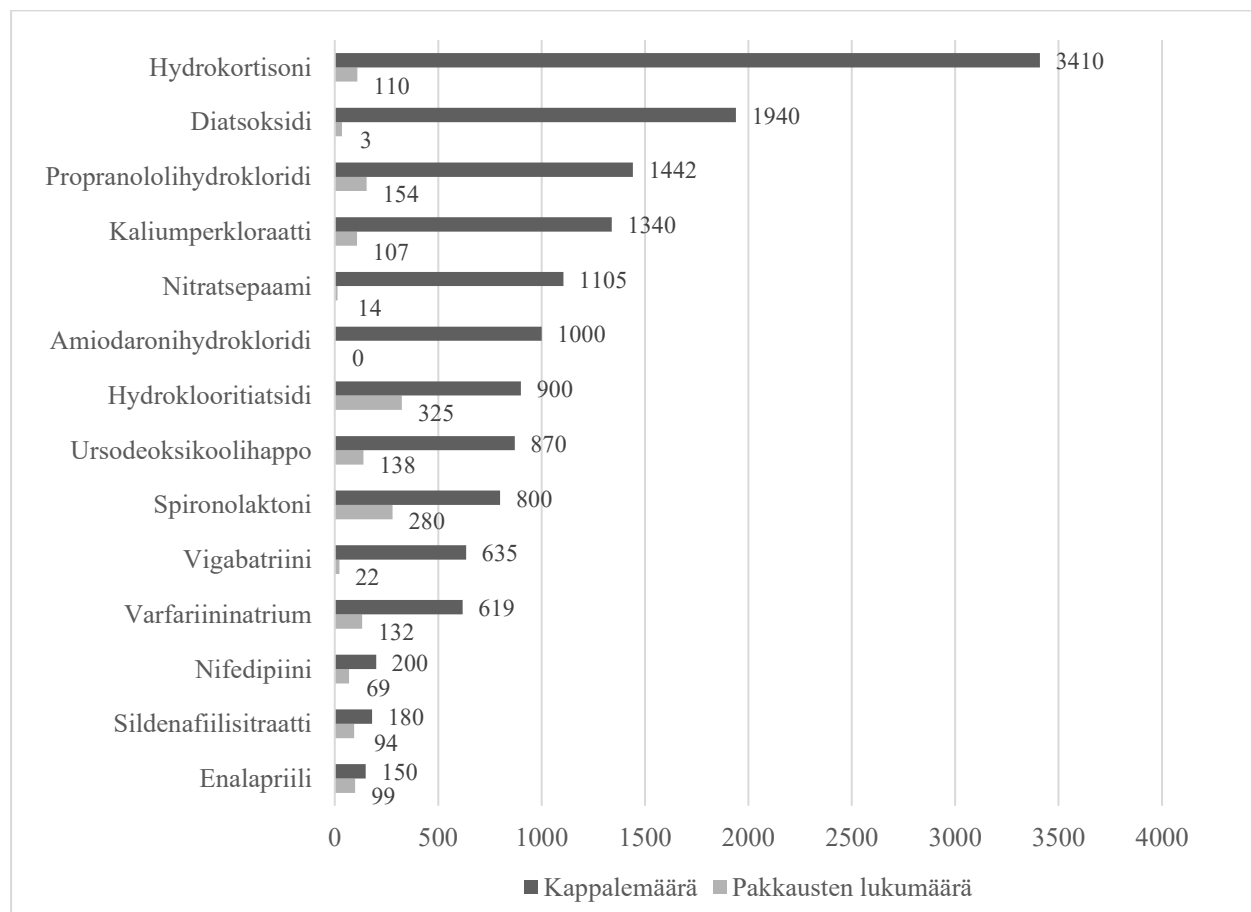
## **2.1 SAIRAALA-APTEEKKIN LÄÄKEVALMISTUS**

Sairaala-apteekkien ja lääkekeskusten ensisijainen tehtävä on vastata toimintayksikkönsä lääkehuollosta ja siten edistää turvallista ja tehokasta lääkehoitoa (Fimea 6/2012). Lääkevalmistus ja lääkkeiden käyttökuntoon saattaminen on yksi sairaala-apteekkien lääkehuollon toiminnoista. Sairaala-apteekkien, kuten muidenkin apteekkien, tulee toteuttaa lääkevalmistuksessaan hyviä tuotantotapoja, jotta voidaan varmistua lääkevalmisteiden laadusta ja turvallisuudesta (Fimea 6/2011). Samat määräykset koskevat myös teollisen mittakaavan lääkevalmistusta, minkä vuoksi sairaala-apteeekeissa ohjeita joudutaan soveltamaan pienemmän mittakaavan valmistukseen sopiviksi. Lääkevalmistuksessa noudatettavia ohjeita ovat Euroopan komission GMP-opas (Good Manufacturing Practice) sekä sitä täydentävät PIC/S:n (Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Co-operation Scheme) ja WHO:n (World Health Organization) ohjeistukset.

Sairaala-apteeekeissa valmistettavat lääkevalmisteet voidaan jakaa *ex tempore* - ja varastoon valmistettaviin lääkevalmisteisiin (Fimea 6/2011, Carvalho 2013 s. 19). Näillä valmisteilla ei ole myyntilupaa ja ne tulevat sairaalan potilaiden käyttöön. *Ex tempore* -valmisteet valmistetaan yksittäisen potilaan tarpeisiin ja ne otetaan käyttöön heti valmistuksen jälkeen (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed.). Varastoon valmistettavat lääkevalmisteet taas valmistetaan etukäteen ennen varsinaista tarvetta. Varastoon valmistuksessa laadunvalvonta on tarkempaa ja valmisteiden käyttöönotosta on tehtävä ennakkoilmoitus (Fimea 6/2011).

## 2.2 YLEISIMMIN VALMISTETTAVAT KIINTEÄT LÄÄKEMUODOT

Carvalho (2013) tutki oraalisten lääkkeiden valmistusta Euroopan sairaala-apteekeissa ja selvitti lääkevalmistusta myös Suomen sairaala-apteekeissa. Tutkimuksen mukaan Suomessa valmistettavia kiinteitä oraalisia lääkemuoja olivat kapselit ja jauheet, mikä on samassa linjassa Fimean sairaala-apteekkien lääkevalmistuksesta keräämien tietojen kanssa (Carvalho 2013 s. 231, Fimea 2020). Kuvassa 2 on esitetty yleisimmät vaikuttavat aineet, joita käytettiin Suomen sairaala-apteekeista jaelluissa kiinteissä oraalisisissa lääkkeissä eli kapsелеissa ja jauheissa vuonna 2008 (Carvalho 2013 s. 231–232). Kappalemäärältään eniten valmistettiin hydrokortisonivalmisteita, kun taas suurin terapeutinen ryhmä oli kardiovaskulaariset lääkkeet. Seuraavaksi eniten valmistettuja kiinteitä valmisteita kuului kortikosteroideihin ja antiepileptisiin lääkkeisiin.



Kuva 2. Vaikuttavat aineet oraalisisista kiinteistä lääkevalmisteista, joita jaeltiin Suomen sairaala-apteekeista eniten vuonna 2008 (mukaillen Carvalho 2013 s. 232).

Kapselit ovat kiinteitä lääkevalmisteita, joiden kuori on kova tai pehmeä ja sisältö voi olla kiinteää, nestemäistä tai puolikiinteää (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed.). Yleensä kapselit annostellaan oraalisesti. Kapselit ovat lääkemuotona hyvin monikäyttöisiä ja niitä on useita erilaisia ja erikokoisia (Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Euroopan farmakopea erottelee kovat kapselit, pehmeät kapselit, säädellysti vapauttavat kapselit, enterokapselit ja oblaattikapselit. Kapseleissa voi olla yhtä tai useampaa vaikuttavaa ainetta sekä apuaineita, ja useimmiten yksi kapseli vastaa yhtä annosta (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed.). Vaikuttavan aineen lähteenä voidaan käyttää puhdasainetta, murskattuja tabletteja tai toisten kapseleiden sisältöä (Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Kapseleiden valmistamiseen tarvitaan yleensä vähemmän apuaineita kuin esimerkiksi tablettien valmistukseen. Lisäksi valmistus on melko nopeaa ja edullista yleisesti käytetyillä manuaalisilla tai puoliautomaattisilla kapselointikoneilla (Carvalho 2013 s. 342). Toisaalta kapseleiden valmistukseen liittyvät laskut on tehtävä huolella, sillä kapselit täytetään kapselikuoren tilavuuden perusteella. Kapseleiden hyviä puolia ovat helppo nieltävyys, oikean annoksen tarkka annostelu, epämiellyttävän maun peittäminen, mahdollisuus avata kapseli ja sekoittaa sisältö juomaan tai ruokaan, sekä nopea dissoluutio (Carvalho 2013 s. 342–343, Helin-Tanninen ja Pinto 2015).

Oraaliset jauheet ovat perinteinen lääkemuoto, jossa yhden tai useamman vaikuttavan aineen sisältävä jauhe on pakattu sopivaan moniannospakkaukseen tai kerta-annoksina esimerkiksi annospusseihin tai paperipakkauksiin (Carvalho 2013 s. 343, Helin-Tanninen ja Pinto 2015, Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed). Jauheen partikkeleiden hienous voi vaihdella, mutta niiden tulee olla kiinteitä, kuivia ja irtonaisia (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed.). Jauhe suositellaan otettavaksi sekoitettuna veteen tai muuhun sopivaan nesteeseen tai nesteen kanssa, mutta jotkut jauheet voi niellä sellaisenaan. Oraaliset jauheet sopivat etenkin nielemisvaikeuksista kärsiville, kuten lapsille ja iäkkäille (Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Jauheiden etuna on myös nopea vaikutuksen alkaminen, sillä ne liukenevat ja imeytyvät nopeasti. Varsinkin kerta-annosjauheiden valmistaminen on kuitenkin aikaavievää, koska annos punnitaan pakkauksiin yksitellen ja usein käsin, minkä vuoksi on käytännöllistä valmistaa vain pieniä määriä (Carvalho 2013 s. 343, Helin-Tanninen ja Pinto 2015).

Tabletteihin kuuluu monia annostelutavaltaan ja lääkeaineen vapautumisnopeudeltaan poikkeavia lääkemuotoja: päällystettyjä, päällystämättömiä, liukenevia, dispergoituvia, suussa hajoavia, kylmäkuivattuja ja säädellysti vapauttavia tabletteja sekä puru-, pore- ja enterotabletteja (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed.). Tabletit annostellaan tavanomaisesti suun kautta, mutta myös muiden annostelureittien

kautta annosteltavat tabletit löytyvät omista lääkeuotomonografioistaan. Tableteissa on yhtä tai useampaa vaikuttavaa ainetta yhden annoksen verran. Kuten kapselit, myös tabletit mahdollistavat tarkan ja oikeellisen annostelun (Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Niiden käsittely on helppoa ja säilyvyys hyvä. Apteekeissa ongelmaksi nousee kuitenkin valmistuksen monimutkaisuus ja valmistuslaitteiden kalleus, joiden vuoksi pienen mittakaavan valmistus ei ole kannattavaa (Carvalho 2013 s. 344, Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Tabletit eivät myöskään ole valmiina niin helposti muokattavia potilaan tarpeisiin (esim. tabletin puolittaminen ei aina ole mahdollista).

## **2.3 KIIENTEIDEN LÄÄKEVALMISTEIDEN SÄILYVYYDEN TUTKIMINEN**

Lääkevalmisteen on potilaalle annettaessa oltava todistetusti tehokas, turvallinen ja laatuvaatimukset täyttävä (Sautou ym. 2013). Tämän vuoksi lääkevalmisteen säilyvyys on varmistettava joko käyttäen luotettavaa kirjallisuutta lähteenä tai, mikäli mahdollista, on suunniteltava ja toteutettava säilyvyystutkimus. Säilyvyystutkimuksen toteuttaminen on haastavaa, sillä useat tekijät vaikuttavat lääkevalmisteen säilyvyyteen ja ne tulee tuntea jo säilyvyystutkimuksen suunnitteluvaiheessa (Mehta 1993, Bajaj ym. 2012). Säilyvyyteen vaikuttavat muun muassa valmisteen lääkeuoto ja vahvuus, valmistusprosessi, vaikuttavan aineen ja apuaineiden väliset interaktiot, pakkaus sekä olosuhteet (valo, lämpö, kosteus) säilytyksen ja muun käsittelyn aikana.

Lääkevalmisteelle tehdyn riskinarvioinnin perusteella päätetään, kuinka laajasti säilyvyys on tutkittava, jotta voidaan varmistaa valmisteen laatu suunnitellulle kestoajalle (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed.). Varastoon valmistettavien lääkevalmisteiden laadunvalvonta on yleensä laaja-alaisempaa kuin ex tempore -valmisteiden. Taulukossa 1 on lueteltu tyypillisiä sairaala-apteenin valmisteisiin liittyviä tilanteita, joissa valmisteen säilyvyys suositellaan tutkittavaksi. Esimerkiksi kiinteän valmisteen säilyvyys on syytä tutkia, mikäli se on herkkä kosteudelle.

Taulukko 1. Sairaala-apteekin valmisteita tai niihin liittyviä tilanteita, jotka edellyttävät säilyvyyden tutkimista (mukaillen Mehta 1993).

Valmiste	Esimerkki
IV-injektiot muoviruiskeissa	sytotoksiset lääkkeet, analgeetit
IV-sekoitukset infuusiopussissa	antibiootit
Käyttökuntoon saatettavat lääkkeet	antibiootit
Saman infuusiolinjan kautta annettavat lääkkeet	yhteensopivuus
Erityiset oraaliset formulaatiot	suspensiot, siirapit
Topikaaliset valmisteet	voiteet, silmätipat
Kiinteät lääkevalmisteet	kosteuspitoisuus, alttius hajoamiselle
Valmisteen ja pakkauksen väliset interaktiot	adsorptio tai uuttuminen

IV= intrevenoosi, laskimonsisäinen

Jotta lääkevalmisteen säilyvyyttä voidaan tutkia luotettavasti, tulee tutkimuksessa käytettyjen analyysimenetelmien olla luotettavia ja käyttötarkoitukseensa sopivia (Sautou ym. 2013). Analyysimenetelmän tulee olla “stability indicating” eli sillä saadaan mitattua lääkeaine ilman, että hajoamistuotteet häiritsevät mittausta (Marshall 2018). Menetelmän tulee myös pystyä erottelamaan muut valmisteen komponentit, kuten apuaineet ja epäpuhtaudet (Mehta 1993). Suositeltavia menetelmiä ovat nestekromatografia ja kapillaarielektroforeesitekniikat (Sautou ym. 2013). Menetelmän luotettavuus voidaan varmistaa validoinnilla, jossa menetelmän toimivuutta tarkastellaan eri parametreille ennalta määritettyjen hyväksymiskriteerien avulla. Säilyvyystutkimuksessa tarvitaan kvantitatiivista menetelmää, jolloin tyypillisiä analysoitavia parametreja ovat oikeellisuus, toistettavuus, spesifisyys, lineaarisuus ja menetelmän alue (ICH Q2(R1) 2005, Sautou ym. 2013). Mikäli analyysimenetelmää ei voida esimerkiksi välineiden tai ajan puutteen vuoksi validoida, saatujen säilyvyystulosten luotettavuus on heikompi (Touw ja Vigneron 2015).

Varsinaisen säilyvyystutkimuksen olosuhteiden ja oletettavasti muodostuvien hajoamistuotteiden määrittämisen apuna voidaan käyttää kiihdytettyä säilyvyystutkimusta, jossa hajoamisreaktiota nopeutetaan korotetulla lämpötilalla ja kosteudella (Bajaj ym. 2012, Touw ja Vigneron 2015). Lisäksi tutkitaan lääkevalmisteen fotostabiilius. ICH:n (The International Council for

Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) standardi kiihdytetyille oloille on  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  lämpötila ja  $75 \pm 5\%$  suhteellinen kosteus (RH) (ICH Q1A(R2) 2003). Lääkekehityksen alkuvaiheessa korkeassa lämpötilassa tutkituista hajoamisreaktioiden nopeuksista voidaan Arrheniuksen yhtälön avulla laskea hajoamisnopeus lääkevalmisteen säilytyslämpötilassa ja siten arvioida valmisteen kestoaikaa (Bajaj ym. 2012). Arrheniuksen yhtälö soveltuu kiinteiden aineiden reaktioiden tutkimukseen vain varauksin, sillä lämpötilan muuttuessa esimerkiksi faasimuutokset ja reaktiomekanismien muuttuminen ovat mahdollisia (Zhou ym. 2009). Tällöin reaktio ei välttämättä noudata Arrheniuksen yhtälöä.

Pitkäkestoisella säilyvyystutkimuksella määritetään lääkevalmisteen kesto aika, joka apteekin valmistamilla valmisteilla on yleensä lyhyempi kuin myyntiluvallisilla lääkevalmisteilla johtuen muun muassa vähemmän kontrolloidusta suunnittelu- ja tuotantoprosessista (Touw ja Vigneron 2015). Useissa maissa apteekissa valmistettujen lääkevalmisteiden kesto aika on korkeintaan 3 vuotta, joskin annettu kesto aika on usein lyhyempi. Säilyvyystutkimuksen tulee kestää pidempään kuin valmisteen oletettu kesto aika (Mehta 1993). ICH ohjeistaa näytteenottoajat yli 12 kuukauden kesto ajan valmisteille, joten säilyvyystutkimusta tekevä apteekki joutuu muokkaamaan näytteenottoajankohdat sopivammiksi, mikäli kesto aika on lyhyempi (ICH Q1A(R2) 2003, Touw ja Vigneron 2015). Säilyvyystutkimuksessa valmistusprosessin, eräkoon ja pakkauksen tulee olla lopulliset. Suositeltavaa on tutkia vähintään kolme erillistä erää. Pitkäkestoisen tutkimuksen aikana on tärkeää pitää lämpötila vakiona ja kontrolloida myös suhteellista kosteutta, jos lääkevalmiste on pakattu vettä osittain läpäisevään materiaaliin (Touw ja Vigneron 2015). ICH:n yleisohje pitkäkestoisille olosuhteille on  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  ja  $60 \pm 5\%$  RH, tai  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  ja  $65 \pm 5\%$  RH (ICH Q1A(R2) 2003). Tutkimusolosuhteiden tulee vastata valmisteen todellisia säilytysolosuhteita, joten esimerkiksi jääkaapissa tai pakastimessa säilytettäville lääkevalmisteille on laadittu omat olosuhdesuosituksen.

Vaikuttavan aineen pitoisuuden muuttuminen säilyvyystutkimuksen aikana voidaan esittää regressiosuorana, jolle lasketaan 95 % luottamusväli (Bajaj ym. 2012). Datapisteiden yhteensopivuus on syytä tarkastaa ja tarvittaessa tehdä muitakin tilastollisia testejä. Regressiosuoran kuvaajasta voidaan lukea valmisteen viimeinen käyttöpäivä kohdasta, jossa 95 % luottamusvälin raja leikkaa 90 % lääkeainepitoisuuden rajan. Hajoamistuotteita ei puolestaan tarvitse välttämättä mitata kvantitatiivisesti, mutta niiden ilmentymistä tulisi seurata tutkimuksen

kuluessa (Sautou ym. 2013). Lisäksi on huomioitava muut lääke muodolle ominaiset kemialliset, fysikaaliset, biologiset ja mikrobiologiset laatuvaatimukset (ICH Q1A(R2) 2003). Kiinteille lääkevalmisteille tyypillisiä laatuvaatimuksia ovat muun muassa annosyksiköiden yhdenmukaisuus, dissoluutio, disintegraatio ja valmisteiden ulkonäön muutokset (Ph.Eur. 9<sup>th</sup> Ed.).

### 3. KIINTEIDEN LÄÄKEVALMISTEIDEN SÄILYVYYS

Suurin osa lääkkeistä annostellaan kiinteässä muodossa, joten kiinteässä muodossa olevien lääkeaineiden säilyvyyteen liittyy paljon tutkimusta (Loftsson 2015 s. 115). Verrattuna liuosmuodossa oleviin lääkevalmisteisiin, kiinteät lääkevalmisteet säilyvät hyvin (Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Mikäli valmisteen vesipitoisuus saadaan pidettyä pienenä, voidaan kemiallisia reaktioita ja fysikaalista hajoamista hidastaa merkittävästi. Muita valmisteen säilyvyyteen vaikuttavia tekijöitä ovat valo, happi, lämpötila, pH ja pakkausmateriaali (Sautou ym. 2013).

Seuraavissa kappaleissa tarkastellaan kiinteiden lääkevalmisteiden kemiallista ja fysikaalista säilyvyyttä ja käydään läpi niihin lukeutuvia yleisiä hajoamistyypppejä. Vaikka samat hajoamisreitit voivat koskea eri lääkemuodoissa olevia vaikuttavia aineita, seuraavissa kappaleissa on pyritty kuvaamaan hajoamista kiinteiden aineiden näkökulmasta. Esimerkiksi kappaleissa esitellyt lääkeaineet ovat ensisijaisesti sellaisia, joita tyypillisesti esiintyy sairaala-apteekeissa valmistettavissa kiinteissä lääkemuodoissa tai kiinteissä lääkevalmisteissa yleensä.

#### 3.1 KEMIALLINEN SÄILYVYYS

Kemiallisessa hajoamisessa lääkeaineen rakenteen sisäiset kovalenttiset sidokset katkeavat tai muodostuvat uudelleen, jolloin syntyy hajoamistuotteita ja lääkeaineen pitoisuus valmisteessa laskee (Yoshioka ja Stella 2002 s. 3, Loftsson 2014 s. 115). Syntyneet hajoamistuotteet ovat useimmiten farmakologisesti inaktiivisia, mutta joskus syntyy myös toksisia yhdisteitä (Touw ja Vigneron 2015). Kemialliset hajoamisreaktiot tapahtuvat pääasiassa liuosfaasissa, mikä kiinteissä lääkevalmisteissa tarkoittaa joko valmisteessa olevaa kosteutta eli vettä tai sulanutta apuainetta tai lääkeainetta (Loftsson 2014 s. 115). Tällöin kiinteän aineen liuenneet molekyylit liikkuvat vapaammin, jolloin niiden reaktiot ovat todennäköisempiä (Byrn ym. 2017 s. 279).

Seuraavissa luvuissa esitellään yleisimpiä kemiallisia hajoamisreaktioita, joita ovat hydrolyysi, hapettuminen ja fotolyysi (Touw ja Vigneron 2015). Lisäksi käydään läpi, miten vaikuttavan aineen ja apuaineiden väliset reaktiot vaikuttavat valmisteen kemialliseen säilyvyyteen. Muita hajoamisreaktioita, kuten isomerisaatiota, dehydrataatiota, dekarboksylaatiota ja eliminaatiota, ei



tässä kirjallisuuskatsauksessa käsitellä erikseen. Näitä hajoamisreaktioita sekä biologisten lääkeaineiden hajoamista on käsitelty muun muassa Yoshiokan ja Stellan teoksessa *Stability of drugs and dosage forms* (2002) ja Lin teoksessa *Organic Chemistry of Drug Degradation* (2012).

### 3.1.1 Hydrolyysi

Yksi yleisimmistä hajoamisreaktioista sekä kiinteillä että liuosmuodossa olevilla lääkeaineilla on hydrolyysi, jossa vesi aiheuttaa yhdisteen sisäisten kemiallisten sidosten katkeamisen ja lääkeaineen hajoamisen (Zhou ym. 2009, Li 2012 s. 16). Etenkin karbonyyliyhdisteet hajoavat usein hydrolyyttisessä reaktiossa, sillä ne sisältävät heikosti sitoutuneen funktionaalisen ryhmän. Tällaisia ryhmiä ovat esimerkiksi karboksyylihapon johdannaiset esterit, laktoni, amidi, laktaami, imidi, anhydridi, asyylihalidi ja tioliesteri. Muutkin lääkeaineille tyypilliset rakenteet (esim. fosfaatit, sulfamidit, eetterit) voivat altistaa hydrolyysille, joten veden aiheuttama hajoaminen koskee useita lääkeaineita. Taulukossa 2 on esimerkkejä hydrolyyttisesti hajoavista lääkeaineista.

Taulukko 2. Esimerkkejä funktionaalisista ryhmistä ja niihin kuuluvista lääkeaineista, jotka hajoavat hydrolyysillä.

<b>Funktionaalinen ryhmä</b>	<b>Lääkeaine</b>
Esteri	Hydrokortisoni (natriumsukkinaatti) Asetyyylisalisyylihappo Enalapriili
Laktoni (syklinen esterit)	Varfariini Simvastatiini
Amidi	Indometasiini
Laktaami	Amoksisilliini
Imiini	Nitratsepaami
Imidi	Fenobarbitaali

Lähteet: Tishler ym. 1962, Han ym. 1977, Krasowska 1979, Ball 1994, Khedr ja Darwish 2000, Al-Omari ym. 2001, Yoshioka ja Stella 2002 s.7–8, Chen ym. 2012, Li 2012 s. 19–20, van Heugten ym. 2018.

Vettä on läsnä useimmissa lääkemuodoissa ja usein suuriakin määriä, mikä osaltaan selittää hydrolyysin yleisyyden (Li 2012 s. 16). Lisäksi on todettu, että kosteuden lisääntyminen kasvattaa aineen kemiallisten reaktioiden nopeutta, vaikka vesimolekyyli ei itse osallistuisikaan reaktioon (Byrn ym. 2017 s. 294–295). Tämä johtuu siitä, että vedellä on epästabiloiva vaikutus: liuenneen aineen molekyylit liikkuvat ja reagoivat herkemmin kuin kiinteän aineen ja vesi voi polaarisenä aineena edistää katalysoituja reaktioita.

Hydrolyyttisen reaktion mekanismiin ja nopeuteen vaikuttavat useat tekijät (Li 2012 s. 18). Reaktio voi myös tapahtua yhtä aikaa usealla eri mekanismilla. Yksi vaikuttavista tekijöistä on pH, sillä vety- ja hydroksidi-ionit voivat katalysoida ja nopeuttaa hajoamisreaktiota (Zhou ym. 2009). Kyseisten ionien toimiessa katalyytteinä reaktiota kutsutaan spesifiseksi happo- tai emäskatalysoiduksi hydrolyysiksi. Yleisestä happo-emäskatalyysistä taas puhutaan, kun reaktiossa protonin siirtoon osallistuu jokin muu nukleofiili, kuten esimerkiksi sitraatti- tai fosfaatti-ioni. Myös vesimolekyyli voi toimia yleisenä emäskatalyyttinä, mikäli hydrolyysissä ei ole läsnä happoa tai emästä (Li 2012 s. 16–17). Estereiden, amidien ja asetaalien hydrolyysiä voivat katalysoida tietyt metalli-ionit, kuten  $\text{Zn}^{2+}$  ja  $\text{Cu}^{2+}$ , jotka lisäävät karbonyyliryhmän polarisaatiota ja siten hydrolyysin todennäköisyyttä. Esterirakenteisilla lääkeaineilla sekä voimakkaasti happamat että emäksiset olosuhteet nopeuttavat hydrolyysiä, mutta yleensä emäskatalysoitu reaktio on nopeampi (Li 2012 s. 21). Harvemmin lääkeaineiden rakenteissa tavattavat asetaali- ja ketaaliryhmät, jotka muodostuvat alkoholin ja aldehydin tai ketonin kondensaatioreaktiossa, hydrolysoituvat happamassa vesiliuoksessa etenkin spesifisen happokatalyyysin seurauksena (Zhou ym. 2009). Amiinien ja ketonin tai aldehydin kondensaatiossa muodostuvien imiinien hydrolyysiä voi puolestaan usein katalysoida sekä hapoilla että emäksillä (Zhou ym. 2009, Li 2012 s. 36).

Muita hydrolyysireaktioon vaikuttavia tekijöitä ovat lämpötila, steeriset esteet molekyylissä ja lähtevän ryhmän ominaisuudet (Li 2012 s. 18). Esimerkiksi esterirakenteisten lääkemolekyylien alttius hydrolyysille vähenee, kun molekyylissä on steerisen esteen aiheuttava sivuryhmä (Li 2012 s. 20). Karbonyyliyhdisteillä hydrolyysiä puolestaan edistää karbonyylihiileen kiinnittynyt elektroneja puoleensa vetävä ryhmä, joka lisää hiilen elektrofiilisyyttä ja helpottaa reaktion käynnistävää nukleofiilistä hyökkäystä hiileen (Zhou ym. 2009). Samoin elektroneja puoleensa vetävä, elektrofiilinen lähtevä ryhmä nopeuttaa hydrolyysiä, sillä reaktiossa syntyvä negatiivinen varaus stabiloituu helpommin kuin nukleofiilisellä lähtevällä ryhmällä. Tästä esimerkkinä ovat

karboksyylihapojohdosten hydrolyysinopeudet: reaktion nopeudet nopeimmasta hitaimpaan ovat yleensä asyylihalidi, happoanhydridi, esteri ja amidi.

Vesimolekyylit voivat päätyä kiinteään lääkevalmisteseen eri tavoin (Byrn ym. 2017 s. 294). Valmiiseen tuotteeseen voi jäädä vettä, jos valmistusprosessin aikana on käytetty vettä (esim. märkärakeistus tai lyofilisaatio), eikä sitä ole kuivattu tuotteesta kunnolla. Vesi voi myös siirtyä höyrystymisen kautta valmisteeseen komponentista toiseen eli esimerkiksi apuaineista lääkeaineeseen. Lisäksi vettä voi siirtyä valmistukseen valmistus- ja pakkausprosessin sekä varastoinnin aikana, mikäli se altistuu ympäristön vesihöyrylle. Awa ja kumppanit (2015) selvittivät tutkimuksessaan mikrokiteisen selluloosan kiteisyyden vaikutusta asetyylisalisyylihapotabletin hydrofiilisiin ominaisuuksiin ja havaitsivat, että kiteisyyden vähentyessä vettä absorboitui tablettiin enemmän. Tästä puolestaan seurasi asetyylisalisyylihapon hydrolyysin nopeutuminen.

Vesi yleensä kiihdyttää lääkeaineen hajoamista, minkä vuoksi kiinteiden lääkevalmisteiden suojaaminen kosteudelta on erityisen tärkeää (Li 2012 s. 269). Kosteuden kontrollointiin on useita keinoja. Valmisteeseen pakkaukseen voidaan esimerkiksi lisätä kuivausainetta, kuten silikageeliä tai montmorilloniittisavea sitomaan kosteutta pakkauksen sisällä. Kuivausaine ei kuitenkaan sovi kaikille valmisteille, sillä esimerkiksi kovien gelatiinikapseleiden kuori voi haurastua suhteellisen kosteuden laskiessa alle 30 %:in. Kosteutta voidaan vähentää myös valitsemalla valmisteeseen formulaatioon vain vähän vettä sisältäviä tai jopa vettä hylkiviä apuaineita sekä huomioimalla lääkeaineen vesipitoisuus (Yang ym. 2019). Lisäksi etenkin tabletteja päällystetään kosteudelta suojaavilla polymeerikalvoilla, jotka estävät ilmankosteuden siirtymisen valmisteeseen. Toisaalta Mwesigwa ja Basit (2016) toivat esiin tutkimuksessaan, ettei kalvopäällystys ole tehokas tapa suojata lääkeainetta kosteudelta, jos valmiste ei itsessään ole hygroskooppinen.

Lääkevalmisteiden suojaamisessa kosteudelta oleellista on sopivan pakkausmateriaalin valinta (Murdan 2018). Materiaaleista lasi ja metalli suojaavat hyvin kosteudelta kuten muiltakin ilmakehän kaasuilta, mutta käsittelyominaisuuksiensa ja edullisuutensa puolesta muovit ovat yleisiä kiinteiden lääkevalmisteiden pakkauksissa. Muovityypeissä on kuitenkin eroja siinä, kuinka hyvin ne suojaavat kosteudelta. Yleisesti farmaseuttisissa pakkauksissa käytetyn HDPE:n (high-density polyethylene) kosteussuoja on verrattain hyvä. Muita hyvin kosteudelta suojaavia muovityyppejä ovat PP (polypropylene), PVDC (polyvinylidene chloride) ja PCTFE

(polychlorotrifluoroethylene). PVDC ja PCTFE ovat kuitenkin kalliita, joten niitä käytetään lähinnä ohuina kalvoina halvemman materiaalin kanssa esimerkiksi läpipainopakkauksissa.

### 3.1.2 Hapettuminen

Hydrolyysin jälkeen yksi yleisimmistä lääkkeiden hajoamisreiteistä on hapettuminen, joka on reaktiona monimutkainen ja tapahtuu usein usealla eri mekanismilla yhtäaikaaisesti (Zhou ym. 2009). Yksinkertaistettuna hapettuminen on vastakkainen reaktio pelkistymiselle eli hapettuessaan aine luovuttaa elektroneja tai sen hapetusaste kasvaa (Loftsson 2014 s. 81). Useimmiten hapettimena toimii ilmakehän molekulaarinen happi ( $O_2$ ), jolloin puhutaan auto-oksidaatiosta (Li 2012 s. 48). Elektronikonfiguraationsa vuoksi molekulaarinen happi ei voi perustilassaan reagoida useimpien orgaanisten yhdisteiden kanssa, joten joko happi- tai orgaanisen molekyylin tulee siirtyä viritystilaan (Zhou ym. 2009).

Auto-oksidaatio tapahtuu kolmessa vaiheessa (kuva 3) (Loftsson 2014 s. 85). Reaktion käynnistyminen (initiation) tapahtuu usein lämmön tai valon vaikutuksesta, jolloin orgaanisesta yhdisteestä muodostuu vapaa radikaali. Etenemisvaiheessa (propagation) reaktioketju etenee, kun vapaa radikaali ja happi muodostavat peroksidiradikaalin, joka reagoi edelleen muodostaen hydroperoksidin ja vapaan radikaalin. Viimeisessä vaiheessa ketjureaktio pysähtyy (termination), kun kaksi vapaata radikaalia reagoi keskenään eivätkä syntyneet hapetustuotteet jatka reaktiota. Auto-oksidaation lisäksi yleisiä hapettumismekanismeja ovat nukleo- tai elektrofiiliset prosessit, joissa tavallisesti peroksidi ja orgaaninen yhdiste reagoivat keskenään (Zhou ym. 2009). Yleinen mekanismi on myös elektronin siirtyminen matalan elektroniaffiniteetin omaavalta yhdisteeltä hapettavalle yhdisteelle.

Reaktion käynnistyminen	$RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$
Reaktion eteneminen	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$
Reaktion päättyminen	$ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow \text{ei-radikaali tuote}$ $ROO\cdot + ROOH \rightarrow \text{ei-radikaali tuote}$

Kuva 3. Auto-oksidaatiossa reaktio etenee kolmen vaiheen kautta, kunnes radikaalit reagoivat keskenään ja muodostuneet tuotteet eivät reagoi edelleen (mukaillen Loftsson 2014 s. 85).

Lääkevalmisteissa hapettuminen johtuu yleensä siihen jääneistä epäpuhtauksista, joiden pitoisuus voi olla hyvinkin vähäinen, mutta vaikea kontrolloida (Zhou ym. 2009). Näitä epäpuhtauksia ovat muun muassa peroksidiyhdisteet, siirtymämetallit ja vapaat radikaalit. Tyypillisiä hapettumista katalysoivia metalli-ioneja ovat  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ja  $Ni^{2+}$  (Loftsson 2014 s. 81). Tiettyt yhdisteet, kuten tiolit ja tioetterit, reagoivat herkemmin siirtymämetallien kanssa, minkä vuoksi metallin määrä tuotteessa tulee minimoida (Zhou ym. 2009). Tarvittaessa voidaan käyttää kelatoivia aineita, jotka sitovat hapettumisreaktiota kiihdyttäviä metalli-ioneita (Loftsson 2014 s. 86–87). Vapaiden radikaalien aiheuttamaa hapettumista voidaan puolestaan ehkäistä tai hidastaa käyttämällä valmisteissa fenolisia antioksidantteja, jotka estävät ketjureaktion etenemisen. Esimerkkejä antioksidanteista on esitetty taulukossa 3. Osa antioksidanteista estää peroksidiyhdisteiden aiheuttamaa hapettumista, joka on tyypillistä amineille, tioleille, tioettereille, pyrroleille ja indoleille (Zhou ym. 2009). Monet lääkevalmisteissa käytettävistä apuaineista, kuten Tween- ja PEG-yhdisteet, sisältävät epäpuhtauksina peroksidgeja.

Taulukko 3. Antioksidanttien luokittelu ryhmiin ja esimerkkejä kustakin ryhmästä.

<b>Fenoliset antioksidantit</b>	<b>Pelkistysaineet</b>	<b>Kelatoivat aineet</b>
Butyloitu hydroksitolueeni (BHT)	Askorbiinihappo	Sitruunahappo
Butyloitu hydroksianisoli (BHA)	Askorbyyilipalmitaatti	Etyleenidiamiinitetraetikka-happo (EDTA)
Tert-butyylhydrokinoni	Monotioglyseroli	Fumariinihappo
Gallushappo	Natriumbisulfiitti	Maliinihappo
Propyyligallaatti	Natriummetasulfiitti	Fosforihappo
Alfa-tokoferoli	Natriumsulfiitti	Viinihappo

Lähde: mukaillen Loftsson 2014 s. 86.

Hapettumista edistää oleellisesti myös lääkevalmisteen altistuminen ilman hapelle valmistuksen ja säilytyksen aikana (Marshall 2018). Näin ollen yksi tapa suojata valmistetta oksidatiiviselta hajoamiselta on poistaa happea valmisteesta tai valmistusympäristöstä. Happi voidaan esimerkiksi korvata säilytysastiasta typpellä tai hiilidioksidilla, jotka ovat inerttejä kaasuja. Lääkevalmisteseen voidaan myös lisätä pelkistysainetta, joka hapettuu lääkeainetta helpommin ja kuluttaa valmisteessa olevaa happea (Loftsson 2014 s. 87). Säilytysastian tulee olla ilmatiivis ja on huomioitava eri pakkausmateriaalien kyky suojata hapettumiselta: parhaiten toimivat lasi ja alumiinipakkaukset, kun taas muovilaatujen välillä on eroja (Marshall 2018). Joissain tapauksissa valo voi katalysoida hapettumista, mikä tulee ottaa huomioon säilytyksessä. Lämpötilan laskeminen ja liuosmuodossa olevilla valmisteilla pH:n laskeminen voivat joskus ehkäistä oksidatiivista hajoamista.

Edellä mainittujen amiinien, tioleiden ja tioettereiden lisäksi hapettumiselle alttiita funktionaalisia ryhmiä ovat muun muassa nitrilit, alkoholit, aldehydit ja fenolit (Zhou ym. 2009). Esimerkiksi losartaanin rakenteeseen kuuluva hydroksyyli-ryhmä voi hapettua, jolloin muodostuu losartaanin aldehydijohdannainen (Zhao ym. 1999). Myös kortikosteroidit ovat herkkiä hapettumiselle ja esimerkiksi hydrokortisoni sekä triamsinoloniasetonidi hajoavat pääasiassa oksidatiivisesti (van Heugten ym. 2018).

### 3.1.3 Fotolyysi

Fotolyysi on valon aiheuttamaa yhdisteen kemiallista hajoamista, joka vaatii tapahtuakseen valon absorboitumisen lääkevalmisteeseen (Zhou ym. 2009, Touw ja Vigneron 2015). Valohajoamiseen vaikuttavat yhdisteen absorboiman valon aallonpituus, varastointi- ja käyttöoloissa valmisteeseen kohdistuvan valon aallonpituus ja lääkemuoto eli kuinka paljon valoa pääsee absorboitumaan valmisteeseen (Albini ja Fasani 1998). Koska fotolyysi käynnistyy valon absorption myötä, reaktio on harvoin riippuvainen lämpötilasta (Zhou ym. 2009)

Kiinteillä valmisteilla fotolyysi riippuu siitä, kuinka syvälle valmisteeseen valo pääsee (Albini ja Fasani 1998). Usein valo absorboituu lähinnä pinnan ensimmäisiin molekyylikerroksiin eli hajoamisreaktio rajoittuu valmisteiden pinnalle. Vaikka reaktio etenee, valo ei pääse penetroitumaan syvemmälle kiderakenteeseen, mikä johtuu siitä, että hajoamistuotteet absorboivat valoa myös tai kiderakenteen muuttumisen myötä valo heijastuu pois. Tämän seurauksena valmisteiden ulkonäkö voi muuttua, mutta vaikuttavan aineen pitoisuus ei välttämättä muutu merkittävästi. Mikäli hajoamistuotteet eivät absorboi lääkeaineen absorboimaa aallonpituutta, hajoamisreaktio voi edetä syvemmälle kiderakenteeseen. Kiderakenteen jäykkyyden vuoksi lääkeaineen fotolyysi voi edetä kiinteässä aineessa eri tavalla kuin liuosmuodossa ja johtaa erilaisiin tuotteisiin. Kiinteiden valmisteiden fotolyysi on usein hitaampaa kuin liuosmuodossa olevien valmisteiden. Esimerkiksi diltiatseemi hajoaa UV-säteilyn vaikutuksesta puskuroidussa vesiliuoksessa, mutta kiinteässä muodossa se on stabiili (Suleiman ym. 1989).

Tiedetyt molekyyliarakenteet voivat altistaa lääkeaineen fotolyytiselle hajoamiselle, joskin fotokemiallisen reaktion tarkkaa mekanismia ja syntyviä tuotteita on vaikea ennustaa (Albini ja Fasani 1998). Tällaisten rakenteiden on oltava virittyneessä tilassaan reaktiivisia, jotta fotokemiallinen reaktio tapahtuu eikä virittynyt tila purkaudu esimerkiksi valon emissiona tai vapauttamalla lämpöä (Zhou ym. 2009, Li 2012 s. 165). Fotolyysille alttiita rakenteita ovat esimerkiksi karbonyyliryhmä, aromaattinen nitroryhmä, amiinioksidi (N-oksidi), hiili-hiili kaksoissidos ( $C=C$ ), aryylikloridi, heikko hiili-vety sidos ( $C-H$ , esim. bentsyyliisessä asemassa), sulfidi ja fenoli (Albini ja Fasani 1998). Koska kyseiset rakenteet ovat yleisiä monissa lääkeaineissa, voidaan olettaa, että fotolyysi on merkittävä tekijä lääkkeiden säilyvyydessä. Valon aiheuttamalla hajoamisella on merkitystä kuitenkin vain, jos suuri osa lääkeaineen absorboimista

aallonpituuksista vastaa ympäristöstä tulevan auringon- ja keinovalon aallonpituuksia. Fotokemiallisen reaktion aikaansaa yleensä UVA (320–400 nm), UVB (290–320 nm) tai näkyvä valo (400–700 nm), joiden aallonpituuksista auringonvalo koostuu (Ahmad ym. 2016). Hajoamisreaktion on oltava myös tarpeeksi nopea, jotta hajoamisella on merkitystä lääkkeen käyttöaikana (Albini ja Fasani 1998). Toisaalta vaikka lääkeaine sellaisenaan kestäisi valoaltistusta, voi joku muu valmiste sisältämä yhdiste herkistää sen fotolyysille.

Valon aiheuttamat hajoamisreaktiot ovat monivaiheisia ja välituotteina syntyy usein vapaita radikaaleja (Ahmad ym. 2016). Joskus hajoaminen voi tapahtua samanaikaisesti usealla reaktiomekanismilla. Kun fotolyysi tapahtuu hapen läsnä ollessa, valon absorptio aiheuttaa useimmiten yhdisteen hapettumisen (Li 2012 s. 187, Touw ja Vigneron 2015). Muita valon aiheuttamia hajoamisreaktioita ovat muun muassa hydrolyysi, isomerisaatio, additio, eliminaatio ja dehalogenaatio (Ahmad ym. 2016). Esimerkiksi nifedipiini dehydrogenoituu valon vaikutuksesta sekä liuos- että kiinteässä muodossa ja syntyvä hajoamistuote hapettuu edelleen toiseksi tuotteeksi (Sadana ja Ghogare 1991). Metanoli- ja vesiliuoksissa tutkittu hydroklooritiatsidi puolestaan hajoaa muun muassa hydrolyysillä ja substituutio- ja pelkistymisreaktioissa, kun se altistetaan UV-valolle (Tamat ja Moore 1982). Myös kiinteässä muodossa oleva hydroklooritiatsidi on altis UV- ja näkyvän valon aiheuttamalle hajoamiselle (Gumieniczek ym. 2018). Muita lääkeaineita, jotka hajoavat fotolyytisesti kiinteässä lääkevalmisteessa, ovat muun muassa enalapriili, propranololi ja furosemidi (De Villiers ym. 1993, Al-Omari ym. 2001, Uwai ym. 2005).

Lääkevalmisteiden fotolyysin estämiseen voidaan käyttää ulkoista tai sisäistä suojausta (Albini ja Fasani 1998). Ulkoisella suojauksella tarkoitetaan keinoja, joilla estetään valmisteiden ja lääkeaineiden altistuminen valolle. Tyypillisesti tämä tapahtuu primaari- ja sekundaaripakkauksella, jotka valitaan lääkevalmisteiden ominaisuuksien mukaan. Pakkauksen tulee olla läpinäkymätön tai se voi olla värjätty niin, että materiaali absorboi lääkeaineen hajoamista aiheuttavaa valon aallonpituutta. Esimerkiksi fotolabiilin lääkevalmisteiden lasipakkaus on usein ruskeaa lasia. Tablettien ja kapselien kohdalla valoaltistusta voidaan vähentää myös lisäämällä päällystykseen tai kapselikuoreen pigmenttejä ja muita aineita, jotka absorboivat tai heijastavat valoa (Ahmad ym. 2016). Sisäisessä suojauksessa voidaan myös käyttää apuaineita, kuten elintarvikeväriä, jotka absorboivat valoa vaikuttavan aineen sijasta. Mikäli valon aiheuttama hapettuminen on



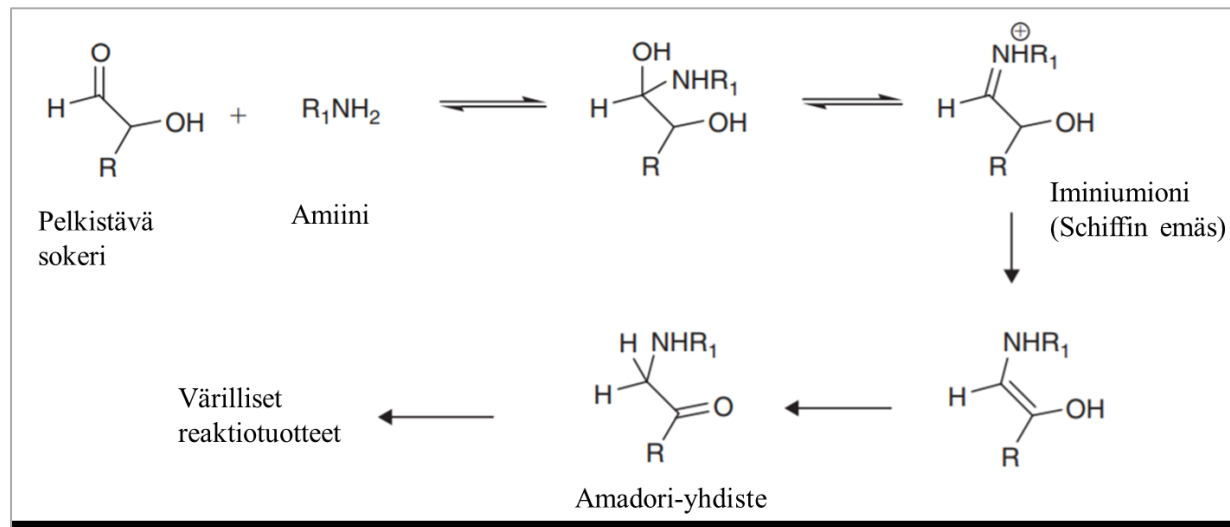
odotettavissa, voidaan valmisteeseen lisätä antioksidanttia. Muita lääkeainetta fotolyysilta suojaavia yhdisteitä ovat syklodekstriinit, jotka muodostavat lääkeaineen kanssa kompleksin, ja liposomit, joiden sisällä lääkeaine on suojassa valolta.

### **3.1.4 Lääke- ja apuaineen väliset kemialliset interaktiot**

Lääkkeen valmistamisessa käytetyt apuaineet on valittava huolella, jotta vältetään vaikuttavan aineen ja apuaineiden välisiltä tai apuaineiden keskinäisiltä interaktioilta (Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Valmistusaineiden epäsojivuus voi ilmetä jo valmistusvaiheessa tai vasta säilytyksen aikana, minkä vuoksi suunniteltua formulaatiota on hyvä tutkia etukäteen. Tyypillisiä apuaineryhmiä kiinteissä lääkevalmisteissa ovat täyte-, sidos-, liuku- ja hajotusaineet. Mikäli kapselien, tablettien ja jauheiden valmistuksessa käytetään lääkeaineen lähteenä kaupallisia valmisteita, apuaineina kannattaa usein käyttää samoja aineita, joita kaupallisessa valmisteessa on käytetty.

Apuaineet voivat vaikuttaa lääkevalmisteen kemialliseen säilyvyyteen useilla tavoilla (Narang ym. 2012). Apuaine tai sen mukana tuleva epäpuhtaus voi reagoida suoraan lääkeaineen kanssa tai katalysoida tämän hajoamisreaktiota. Suorassa reaktiossa aineet reagoivat funktionaalisten ryhmiensä kautta ja molekyylien välille muodostuu sidos. Reaktion todennäköisyys on yleensä sitä suurempi mitä enemmän apuainetta on, koska aineiden välinen kosketuspinta-ala kasvaa (Byrn ym. 2017 s. 298). Tunnettu suora reaktio lääke- ja apuaineen välillä on Maillardin reaktio, jossa primaarisen tai sekundaarisen alifaattisen amiiniryhmän sisältävä lääkeaine reagoi pelkistävän sokerin karbonyyliryhmän kanssa (kuva 4) (Narang ym. 2012). Reaktio etenee synnyttäen useita lopputuotteita, joista osa voi olla rusehtavia, mikä vaikuttaa valmisteen ulkonäköön. Abdoh ja kumppanit (2004) osoittivat tutkimuksessaan, että amlodipiinibesilaatin ja laktoosin välillä tapahtuu veden läsnä ollessa Maillardin reaktio, kun sitä on katalysoimassa emäksinen apuaine kuten magnesiumstearaatti. Myös hydroklooritiatsidin ja laktoosin välillä on havaittu Maillardin reaktio, joskaan reaktio ei synnyttänyt värinmuutosta (Harmon ym. 2000). Maillardin reaktion lisäksi lääke- ja apuaineiden välillä voi ilmetä myös muun muassa estereiden ja amidien muodostumista (Narang ym. 2012). Apuaineen katalysoimia hajoamisreaktioita ilmenee puolestaan esteri- ja amidiryhmän omaavilla lääkeaineilla, joilla hydrolyyttinen hajoaminen

nopeutuu, kun läsnä on useita hydroksiryhmiä omaava apuaine (esim. sakkaroosi, sorbitoli, laktoosi). Polyhydroksiapuaineet vaikuttavat esimerkiksi beetalaktaamiantibioottien hajoamiseen.



Kuva 4. Maillardin reaktiossa pelkistävä sokeri ja primaarinen tai sekundaarinen amiini reagoivat, jolloin välituotteiden kautta syntyy usein värillisiä reaktiotuotteita (mukaillen Narang ym. 2009 s. 131).

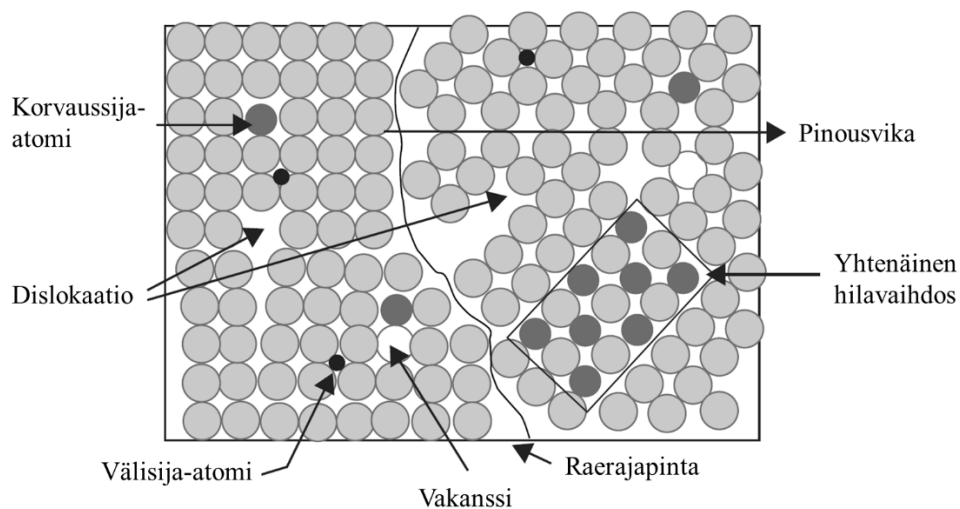
Apuaine voi myös muuttaa valmisteen kosteuspitoisuutta, mikä vaikuttaa etenkin hydrolyysille herkkien lääkeaineiden hajoamiseen (Narang ym. 2012). On kuitenkin huomioitava, että vaikka useat lääkevalmisteen raaka-aineet sisältävät vettä, se ei ole aina vapaana. Esimerkiksi kidevesi tai muuten rakenteeseen tiukasti sitoutunut vesi ei ole vapaa reaktioihin, ellei se vapaudu valmistusprosessin tai olosuhteiden muutoksen myötä. Kosteudelle herkkien lääkeaineiden formulaatioissa suositellaan yleisesti käytettäväksi apuaineita, joilla on matala vesiaktiivisuus (Rajabi-Siahboomi ym. 2015). Vesiaktiivisuus kuvaa aineessa tai valmisteessa olevan vapaan veden määrää: mitä lähempänä arvo on nollaa, sitä vähemmän aineessa on vapaasti liikkuvia vesimolekyylejä. Mikäli apuaineet tai lääkeaine ovat hygroskooppisia ja vetävät valmisteeseen kosteutta, muutkin kuin hydrolyyttiset hajoamisreaktiot tyypillisesti nopeutuvat. Toisaalta hygroskooppinen apuaine voi olla myös hyödyllinen, jos se sitoo kosteuden tiukasti itseensä suojaten vaikuttavaa ainetta hajoamiselta. Kiinteissä valmisteissa tällaisina kuivausaineina on

käytetty esimerkiksi silikageeliä, kolloidista silikaa, hydroksipropyylimetyyliselluloosaa (HPMC), mikrokiteistä selluloosaa ja erilaisia suoloja (mm. natriumsulfaatti, kalsiumkloridi).

Joissain tapauksissa apuaine voi muuttaa lääkevalmisteen sisäisen mikroympäristön pH-arvoa, mikä usein edesauttaa hajoamista, jos lääkeaine on emäs- tai happolabiili (Narang ym. 2012). Esimerkiksi kroskarmelloosinatrium, kalsiumkarbonaatti, dikalsiumfosfaatti, magnesiumstearaatti ja steariinihappo voivat muuttaa pH:ta, sillä niillä on ionisoituvia funktionaalisia ryhmiä. Apuaineen funktionaaliset ryhmät määrittävät, onko yhdiste hapan vai emäksinen. Esimerkiksi HPMC:n ftalaatti- ja asetaattisukkinaattijohdannaiset ovat happamia aineita, kun taas magnesiumstearaatti on emäksinen. Koska monet lääkeaineet ovat orgaanisten emästen tai happojen suoloja, pH:n muuttuminen voi aiheuttaa suolamuodon muuttumisen vapaaksi emäkseksi tai hapoksi. Tästä voi seurata muutoksia lääkkeen dissoluutionopeudessa tai epästabiilin vapaan muodon nopeampi hajoaminen.

### 3.2 FYSIKAALINEN SÄILYVYYS

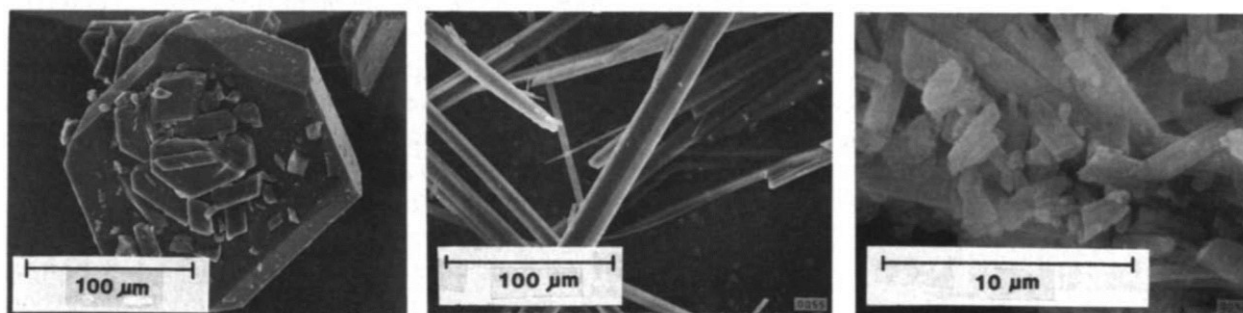
Fysikaalisessa hajoamisessa lääkeaine ei itsessään hajoa eli kovalenttisia sidoksia ei katkea tai muodostu (Loftsson 2014 s. 115). Sen sijaan valmisteessa tapahtuu fysikaalisia muutoksia, jotka vaikuttavat etenkin lääkemuodolle tyypillisiin ominaisuuksiin (Touw ja Vigneron 2015). Kiinteillä valmisteilla fysikaalisia muutoksia ovat muun muassa kiteisen rakenteen muuttuminen amorfiseksi, polymorfiset faasimuutokset, sulaminen ja hydraatio sekä dehydraatio (Byrn ym. 2017 s.265–267). Nämä voivat edelleen vaikuttaa valmisteen yhdisteiden partikkelikokoon ja morfologiaan ja siten johtaa ongelmiin valmistusprosessissa tai biologisessa käytettävyydessä. Fysikaalisista muutoksista etenkin rakenteen kiteisyyden vähentyminen lisää hajoamisreaktioiden nopeutta. Hajoaminen alkaa todennäköisimmin kidevirheen alueelta, jossa kiderakenne on epäjärjestyksessä (kuva 5). Kidevirheitä voi syntyä lääkeaineeseen jo valmistuksen aikana kiteyttämiprosessissa tai myöhemmin jatkokäsittelyn ja säilytyksen aikana esimerkiksi mekaanisen paineen tai sulamisen ja uudelleenkiteytymisen seurauksena.



Kuva 5. Kiteisessä rakenteessa esiintyviä kidevirheitä (muokattu Byrn ym. 2017 s. 267).

Polymorfia tarkoittaa molekyylin kykyä järjestäytyä kiderakenteeseen eri tavoin (Byrn ym. 2017 s. 22–26). Aineen sisäinen rakenne voi poiketa esimerkiksi kidehilan koon tai molekyylin konformaation osalta, jolloin erilaisia kidemuotoja kutsutaan polymorfeiksi. Niiden ominaisuudet

voivat olla huomattavan erilaiset. Esimerkiksi furosemidin polymorfien välillä on huomattu eroja termodynaamisessa stabiiliudessa, dissoluutionopeudessa sekä kiteiden muodossa ja koossa (kuva 6) (Matsuda ja Tatsumi 1990). Etenkin lämpötila vaikuttaa polymorfien muodostumiseen, sillä korkeissa lämpötiloissa reaktion aktivaatioenergia saavutetaan helpommin ja metastabiilit polymorfit pyrkivät muuntumaan stabiilimmaksi polymorfiksi (Byrn ym. 2017 s. 34). Samalla tavalla käyttäytyvät myös amorfiset aineet, joilla ei ole selkeää kiderakennetta (Byrn ym. 2017 s. 69–71). Amorfinen aine pyrkii järjestäytymään kidemuotoon, jossa vapaa energia on pienin ja rakenne on stabiilimpi. Kiteytymisen lisäksi amorfisen lääkeaineen epästabiilius ilmenee reaktioherkkyytenä, mikä johtuu molekyylien liikkuvuudesta. Lääkevalmisteseen kannattaakin valita vaikuttavan aineen kiteinen muoto ja valikoida mahdollisista polymorfeista stabiilein (Byrn ym. 2017 s. 266). Toisaalta valitsemalla lääkeaineesta vähemmän stabiilin polymorfin tai jopa amorfisen muodon voidaan usein parantaa valmisteeseen dissoluutionopeutta sekä biologista hyötyosuutta.



Kuva 6. Furosemidin kolmen eri polymorfin kiderakenteet pyyhkäiselektronimikroskoopilla kuvattuna (Matsuda ja Tatsumi 1990).

Solvaattien rakenteessa ja ominaisuuksissa on samoja piirteitä kuin polymorfismissa (Byrn ym. 2017 s. 38). Solvaatit ovat molekyylikomplekseja, joissa aineen kiderakenteeseen on sitoutunut liuotinmolekyyliä. Sitoutuneen liuottimen stoikiometrinen määrä voi vaihdella. Kun sitoutunut liuotin on vesi, puhutaan hydraatista. Kiinteät aineet solvatoituvat useammin veden kuin orgaanisten liuottimien kanssa, sillä vesimolekyyli on pieni ja muodostaa helposti vetysidoksia. Aineen hydrataatio ja dehydrataatio riippuu muun muassa ympäristön lämpötilasta ja vapaan veden

määrästä (Byrn ym. 2017 s. 45). Lääkeaineista 30 prosentin on arvioitu voivan muodostaa hydraatteja, mitä edesauttaa veden yleisyys valmistusprosesseissa ja säilytyksen aikana (Byrn ym. 2017 s. 38). Esimerkiksi teofylliini ja karbamatsepiini esiintyvät hydraattimuodossa, kuten myös apuaineista laktoosi, magnesiumstearaatti ja sorbitoli (Giron ym. 2002, Pinto ym. 2014). Sitoutuneiden vesimolekyylien määrä vaikuttaa usein merkittävästi kiinteän lääkeaineen kiderakenteeseen sekä edelleen sen stabiiliuteen ja muihin ominaisuuksiin (Byrn ym. 2017 s. 38). Esimerkiksi liukoisuus on anhydraattimuodoilla parempi kuin hydraattimuodoilla, mikä taas voi johtaa erilaisiin dissoluutionopeuksiin (Byrn ym. 2017 s. 39). Dehydraation myötä lääkeaine voi puolestaan menettää aiemman kiderakenteensa ja muuttua jopa amorfiseksi. Esimerkiksi Kitamura ja kumppanit (1990) osoittivat, että kefiksiimitrihydraatti muuttuu dehydratoituessaan epästabiilimmaksi kiderakenteen muutoksen vuoksi.

Muita yleisiä kiinteässä aineessa tapahtuvia kiderakenteen muutoksia ovat yhdistelmäkiteiden ja suolojen muutokset (Zhou ym. 2009 s. 116). Sekä yhdistelmäkiteen että suolan kidehilassa on lääkeainemolekyylin lisäksi yksi tai useampi toisen yhdisteen molekyyli (Byrn ym. 2017 s. 60). Yhdistelmäkiteessä ionisoitumattomien molekyylien kompleksia pitävät kasassa muun muassa van der Waalsin voima ja vetysidokset, kun taas suola koostuu ionisoituvista molekyyleistä, joiden välillä on ionisidoksia. Muutoksia voi tapahtua esimerkiksi päämolekyyliin liittyneiden vastinmolekyylien tai -ionien määrissä tai yhdisteet voivat kokonaan erkaantua tai vaihtua (Zhou ym. 2009 s. 116). Kiinteissä valmisteissa suolamuotoiset lääkeaineet ovat yleensä fysikaalisesti stabiileja (Byrn ym. 2017 s. 67). Yhdistelmäkiteiden fysikaalinen stabiilius vaihtelee enemmän ja riippuu esimerkiksi lähtömolekyylien polymorfiasta.

## 4 POHDINTA

Lääkkeiden säilyvyyden määrittäminen on monimutkaista, koska säilyvyyteen vaikuttavia tekijöitä on useita ja valmisteessa tapahtuvat reaktiot voivat johtaa uusiin reaktioihin (Kommanaboyina ja Rhodes 1999). Säilyvyys voidaan teoriassa jaotella eri osa-alueisiin kuten kemialliseen ja fysikaaliseen säilyvyyteen, mutta tosiasiallisesti säilyvyyden osa-alueet vaikuttavat toisiinsa. Esimerkiksi kemiallisen hajoamisen synnyttämät hajoamistuotteet voivat vaikuttaa lääkevalmisteen morfologiaan, jolloin valmisteessa ilmenee fysikaalinen muutos (Marshall 2018). Fysikaalinen säilyvyys puolestaan vaikuttaa kemialliseen säilyvyyteen, kun esimerkiksi lääkeaineen muuttuminen amorfiseen muotoon lisää kemiallisten reaktioiden ja siten hajoamisen todennäköisyyttä (Byrn ym. 2017 s. 265). Lääkevalmisteen säilyvyyttä tulisi siis tarkastella aina kokonaisuutena.

Kiinteiden lääkevalmisteiden eduksi luetaan yleensä hyvä säilyvyys, mutta valmistuksen tai säilytyksen aikaiset kosteuden, lämpötilan ja valon muutokset voivat vaikuttaa lääkevalmisteen hajoamiseen merkittävästi (Sautou ym. 2013, Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Etenkin kosteudelta suojaaminen korostuu kiinteiden lääkkeiden valmistuksessa, koska sillä ehkäistään paitsi hydrolyysiä, mutta myös muita hajoamisreaktioita. Lääkevalmisteen pakkaaminen ja säilytysolosuhteet tulee siis huomioida alusta alkaen.

Säilyvyyden tutkiminen sairaala-apteekissa voi olla haastavaa, sillä lääkeaineen hajoaminen tai muut valmisteessa tapahtuvat reaktiot eivät useinkaan aiheuta silminnähtäviä muutoksia (Mehta 1993). Tällöin säilyvyyden tutkimiseen tarvitaan analyysimenetelmiä sekä muita resursseja, joita sairaala-apteekilla ei välttämättä ole käytössään. Lääkevalmisteen kestoajan määrittäminen on kuitenkin tärkeää etenkin potilasturvallisuuden kannalta, koska lääkkeen tulee olla antohetkellä todistetusti tehokas ja turvallinen (Touw ja Vigneron 2015). Lisäksi säilyvyystutkimuksella voidaan joskus pidentää kestoaikaa, mikä vähentää lääkehävikkiä ja säästää rahaa. Mikäli tutkimukseen on käytettävissä vain rajallisesti resursseja, täytyy tutkimuksen laajuus rajata lääkevalmistelle tehdyn riskinarvioinnin perusteella (Mehta 1993, Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed.). Kirjallisuudesta saadun tiedon perusteella voidaan edelleen rajata tutkimuksia säilyvyyteen oleellisesti vaikuttaviin tekijöihin.

## KOKEELLINEN OSA

### 5 JOHDANTO

Misoprostoli on synteettinen prostaglandiini  $E_1$ :n analogi, joka alun perin kehitettiin peptisen ulkustaudin hoitoon sen mahahapon eritystä vähentävän ja limakalvoa suojaavien ominaisuuksien vuoksi (Collins ym. 1985, Moilanen ja Nieminen 2018). Nykyään käyttöaiheeksi on vakiintunut myös synnytyksen käynnistäminen ja raskaudenkeskeytys, sillä prostaglandiinianalogina misoprostoli kypsyttää kohdunsuuta ja aiheuttaa kohdun supistelua (Rahkonen ja Heinonen 2019). Kohdunkaulan kypsytyksessä tyypillinen annos on 25–50  $\mu\text{g}$  4–6 tunnin välein joko oraalisesti tai vaginaalisesti (Kruit ym. 2016). Raskaudenkeskeytyksessä misoprostolin annos on huomattavasti suurempi eli 400–800  $\mu\text{g}$  (Heinonen 2018).

Synnytyksen käynnistämiseen indikoituja misoprostolivalmisteita on ollut Suomessa markkinoilla vaihtelevasti (Lääkehaku 2020). Sopivan myyntiluvallisen valmisteiden puuttuessa Suomen sairaala-apteekit ovat valmistaneet miedompia ex tempore -misoprostolikapseleita kaupallisista tableteista. Vaikka misoprostolista on tällä hetkellä saatavilla yksi myyntiluvallinen tablettimuotoinen valmiste synnytyksen käynnistämiseen, ex tempore -kapselit ovat edelleen yleisesti käytössä (Duodecim-lääketietokanta 2020). Sairaala-apteekissa valmistettujen misoprostolikapseleiden säilyvyyttä ei tähän mennessä ole laajamittaisesti tutkittu, vaikka misoprostoli on tablettimuodossa altis hajoamiselle etenkin kosteuden vaikutuksesta (Collins ym. 1985, Berard ym. 2014).

Tässä erikoistyön kokeellisessa osuudessa tutkittiin sairaala-apteekissa valmistettujen misoprostolikapseleiden kemiallista säilyvyyttä tarkoituksena selvittää valmisteiden kestoajan huoneenlämmössä säilytettyinä. Misoprostolin kvantitatiivista määrittystä varten kehitettiin HPLC-menetelmä, joka validoitiin ICH:n Q2(R1)-ohjeiston mukaisesti. Validoinnissa tutkittiin menetelmän spesifisyys, lineaarisuus, oikeellisuus, toistettavuus, haavoittuvuus ja alue (ICH 2005). Säilyvyyden lisäksi misoprostolikapseleista tutkittiin Euroopan farmakopean mukaisesti annosyksiköiden yhdenmukaisuus eli kapseleiden jakelutarkkuus ja annosvaihtelu (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> ed.). Tutkimuksissa käytetyt misoprostolikapselit valmistettiin Lapin keskussairaalan (LKS) ja Kuopion yliopistollisen keskussairaalan (KYS) sairaala-apteeekeissa sekä Itä-Suomen yliopiston farmasian laitoksella.



## **6 MENETELMÄN KUVAUS**

### **6.1 MATERIAALIT**

Säilyvyystutkimuksessa käytetyt misoprostolikapselit valmistettiin Cytotec-tableteista (Cytotec 0,2 mg tabl, erät B20862 ja B23057, Pfizer) ja laktoosimonohydraatista (Lactose monohydr. 80, Ph.Eur., erä 18H30-H08-00340, Fagron Hellas; Lactos. monohydr. parve gran, Ph.Eur., erä 1807297/2, Oriola). Kapselikuorina käytettiin koon 1 kirkkaita gelatiinikuoria (Ph.Eur., erä 18I13-H08-00340, Fagron Hellas).

Kalibraatiostandardit valmistettiin misoprostolin puhtasaineesta (Misoprostol 1 mg/100 µl, erä 0526216–7, Cayman Chemical Company). Näytteiden ja kalibraatiostandardien valmistukseen käytettiin Honeywellin CHROMASOLV™ LC-MS Ultra -laadun metanolia. Näytteenvalmistuksessa metanolin haihdutukseen näytteistä käytettiin typpikaasua (4.0 AGA). HPLC-ajoliuosten valmistuksessa käytettiin ultrapuhdasta vettä (MilliQ), asetonitriiliä (VWR Chemicals, HiPerSolv Chromanorm LC-MS-laatu) ja muurahaishappoa (Fisher Chemical, Optima 99,0 % LC-MS-laatu).

### **6.2 MISOPROSTOLIKAPSELEIDEN VALMISTUS**

Säilyvyystutkimuksessa 0-hetken pitoisuuden määrittämiseen käytetyt misoprostolikapselit valmistettiin Kuopiossa Itä-Suomen yliopiston farmasian laitoksella. Kapselit sisälsivät 25 µg misoprostolia, ja valmistettavan erän koko oli 80 kapselia. Valmistus tapahtui LKS:n sairaala-apteekin valmistusohjeen mukaisesti Cytotec-tableteista hiertämällä. Tabletit (10 kpl) hierrettiin posliinihuhmareessa hienoksi jauheeksi. Lisättävän laktoosin määrä laskettiin sen kaatotiheyden perusteella ja laktoosi lisättiin tablettijauheeseen geometrisessä sarjassa. Tasa-aineinen jauhe jaettiin korttien avulla kapselikuoriin Feton-kapselointilaitteella. Valmistuksen aikaiset punnitukset tehtiin yläkuppi- ja analyysivaa'alla. Laktoosin kaatotiheys määritettiin kirjallisuudesta löytyneiden vastaavien laktoosilaatujen kaatotiheyksien perusteella (Rowe ym. 2009).

Varsinaisessa säilyvyystutkimuksessa ja annosyksiköiden yhdenmukaisuus -testeissä tutkitut misoprostolikapselit valmistettiin LKS:n sairaala-apteekissa valmistusohjeen mukaisesti. Lisäksi KYS:n sairaala-apteekki valmisti kapseleita oman valmistusohjeensa mukaisesti niiden annosyksiköiden yhdenmukaisuuden tutkimiseen. Sairaala-apteekeissa kapseleihin lisättävän laktoosin määrä laskettiin laktoosin tärytiheyden perusteella, mikä ei kuitenkaan merkittävästi vaikuta tulosten vertailukelpoisuuteen, sillä ero käytetyn laktoosityypin kaato- ja tärytiheyden välillä ei ole suuri.

### **6.3 NÄYTTEIDEN JA STANDARDIEN VALMISTUS**

Kalibraatiostandardit valmistettiin misoprostolin puhtasaineesta (1 mg/100 µl metyyliasetaattia), joka laimennettiin ensin metanolilla pitoisuuteen 1 mg/ml. Liuos laimennettiin edelleen metanolilla 20 ml mittapullossa kantaliuokseksi, jonka pitoisuus oli 50 µg/ml. Kantaliuoksesta laimennettiin metanolilla viiteen 5 ml mittapulloon standardiliuokset STD 1–5, joiden pitoisuudet olivat 15–35 µg/ml eli 60–140 % tutkittavasta pitoisuudesta. Tutkimuspäivänä 2 tehtyjä standardiliuoksia käytettiin myös tutkimuspäivänä 7, mutta muutoin liuokset valmistettiin joka tutkimuspäivä uudelleen.

Kapselinäytteiden valmistuksessa kapseleiden sisältö tyhjennettiin 5 ml mittapulloihin, jotka täytettiin metanolilla merkkiviivaan asti välillä ravistellen. Sekoitusta jatkettiin ravistelijassa (Heidolph Multi Reax) 5 minuuttia, jotta kiinteässä aineessa oleva misoprostoli saatiin liuotettua metanoliin. Ravistelun jälkeen sakan annettiin laskeutua mittapullojen pohjalle 15 minuutin ajan. Kirkasta liuosta pipetoitiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin, joita sentrifugoitiin (Centrifuge 5804R, Eppendorf) 10 minuutin ajan (10 000 rcf, 10 °C). Erottunutta supernatanttia pipetoitiin 1 ml toisiin Eppendorf-putkiin, joista metanoli haihdutettiin pois typpihaihduttimella (N-EVAP 112 Nitrogen evaporator, Organomation Associates Inc.). Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin 200 µl metanolia, jolloin ne konsentroituivat pitoisuuteen 25 µg/ml. Näytteitä sentrifugoitiin vielä 5 minuuttia, jotta vältyttiin pipetoimasta kiinteitä partikkeleita HPLC-vialiin.

## 6.4 NESTEKROMATOGRAFI-MASSASPEKTROMETRI

Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria-laitteistoa (LC-MS/MS) käytettiin tutkimuksen menetelmänkehityksessä misoprostolin piikin tunnistamiseen. LC-MS/MS-laitteisto sisälsi nestekromatografian (Agilent Technologies HPLC 1200, Agilent Technologies Inc.), johon kuului näytteensyöttöyksikkö, binääripumppu, kaasunpoistoyksikkö ja kolonniuuni, sekä kolmoiskvadrupoli-massaspektrometri (6410, G6410A, Agilent Technologies). Nestekromatografian kolonni oli Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT 4,6 mm x 50 mm; 1,8  $\mu$ m (Agilent Technologies). Tulosten analysointiin käytetty ohjelmisto oli Masshunter Qualitative and Quantitative Analysis Software (Agilent Technologies).

Ajoliuoksina käytettiin ajoliuosta A, joka sisälsi vettä ja 0,1 % (V/V) muurahaishappoa, ja ajoliuosta B, joka sisälsi metanolia. Gradienttajan ajoaika oli 12 minuuttia, jonka aikana ajoliuoksen B osuus vaihteli: 0–1 min 20%; 1–2,5 min 20%→95%; 2,5–8 min 95%; 8–8,1 min 95%→20%; 8,1–12 min 20%. Injektioilavuus oli 1  $\mu$ l, kolonnin lämpötila 30 °C ja virtausnopeus 0,5 ml/min.

Massaspektrometrin ionisaatiomenetelmänä käytettiin positiivista sähkösumutus-ionisaatiota, kuivauskaasun lämpötila oli 300 °C ja virtausnopeus 8 l/min. Sumutuksessa paine oli 40 psi ja kapillaarijännite 4000 V. Taulukossa 4 on esitetty mittauksessa seurattujen misoprostolin prekursorien ja tuoteionien  $m/z$ -arvot sekä fragmentaatio- ja törmäysjännitteet. Analyysissa käytettiin MRM-menetelmää (Multiple Reaction Monitoring) ionien seurantaan.

Taulukko 4. Massaspektrometrillä määritetyt misoprostolin prekursori- ja tuoteionien  $m/z$ -arvot sekä fragmentaatio- ja törmäysjännitteet.

Prekursori-ioni ( $m/z$ )	Tuoteioni ( $m/z$ )	Fragmentaatiojännite (V)	Törmäysjännite (V)
405	405	150	1
267	235	100	7

## 6.5 NESTEKROMATOGRAFI

Tutkimuksessa aineiden erotteluun ja pitoisuuksien määrittämiseen käytettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (Agilent Technologies HPLC 1100, Agilent Technologies Inc.). Laitteistoon kuului näytteensyöttöyksikkö, kaasunpoistoyksikkö, binääripumppu, kolonniuuni ja diodorividetektor (DAD). Ohjelmistona laitteessa oli Agilent Technologies ChemStation for LC 3D.

Ajoihin käytettiin kahta eri ajoliuosta: ajoliuos A sisälsi vettä ja 0,1 % (V/V) muurahaishappoa, ja ajoliuos B sisälsi asetonitriiliä ja 0,1 % (V/V) muurahaishappoa. Ajo oli isokraattinen ja sen aikana orgaanisen ajoliuoksen B osuus oli 60 %. Kolonnina oli Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT; 4,6 mm x 50 mm; 1,8 µm (Agilent Technologies). Näytteiden injektioilavuudeksi valittiin 10 µl. Kolonnin lämpötilaksi säädettiin 30 °C ja isokraattisen ajon virtausnopeus oli 1,5 ml/min. Ajoaika oli 2,5 minuuttia. DAD-detektorin aallonpituudeksi valittiin 200 nm. UV-spektri kerättiin alueelta 190–400 nm.

## 6.6 MENETELMÄN VALIDOINTI

Validoinnilla osoitetaan, että analyysimenetelmä on käyttötarkoitukseensa sopiva eli se antaa toistettavasti luotettavia tuloksia käyttöalueellaan (ICH Q2(R1) 2005). Misoprostolin kvantitatiiviseen määrittämiseen kehitetty HPLC-menetelmä validoitiin ICH:n Q2(R1)-ohjeiston mukaisesti. Tutkittaviksi parametreiksi valittiin spesifisyys, lineaarisuus, oikeellisuus, toistettavuus ja haavoittuvuus. Analyysimenetelmän alueeksi valittiin 60–140 % tutkittavan näytteen pitoisuudesta. Menetelmän tulee käyttöalueellaan antaa todistetusti oikeellisia, toistettavia ja lineaarisia tuloksia.

### 6.6.1 Spesifisyys

Menetelmä on spesifinen, kun mitattava signaali on peräisin vain tutkittavasta yhdisteestä (ICH Q2(R1) 2005). On siis tärkeää varmistaa, etteivät muut valmisteiden yhdisteet häiritse mittausta.

Menetelmän spesifisyyden osoittamiseksi valmistettiin hajoamisnäytteet, joiden kromatogrammeja vertailtiin misoprostolin standardin kromatogrammiin. Samoin tutkittiin myös, aiheuttavatko ajoliuokset ja näytteenvalmistuksessa käytetty metanoli määritystä haittaavia piikkejä kromatogrammeihin.

Hajoamisnäytteet valmistettiin käsittelemällä misoprostolin standardiliuosta (STD3 25 µg/ml) emäksellä, hapolla ja hapettimella. Kuhunkin näytteeseen pipetoitiin 1 ml standardiliuosta, johon lisättiin 100 µl joko 2 M NaOH:a, 2 M HCl:a tai 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:a. Lisäksi jätettiin yksi näyte käsittelemättä vertailuksi ja tehtiin vertailunäytteet reagensseista (vesi, hapetin, happo ja emäs samassa näytteessä). Näytteenotto tapahtui 15 minuutin ja tunnin kuluttua, jolloin happonäytteet neutraloitiin 2 M NaOH:lla ja emäsnäytteet 2 M HCl:lla. Käsittelemätön ja hapetusnäyte laimennettiin vedellä vastaamaan emäs- ja happonäytteiden pitoisuutta.

Mahdollisia hajoamistuotteita tutkittiin myös pitämällä kahta misoprostolikapselia avonaisessa lääkelasissa olosuhdekaapissa (25 °C, suhteellinen kosteus 60 %) vuorokauden ajan. Kapseleista valmistettiin näytteet samalla tavalla kuin muista kapseleista (kappale 6.3).

### 6.6.2 Lineaarisuus

Lineaarinen menetelmä antaa käyttöalueellaan tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia tutkittavan näytteen konsentraatioon (ICH Q2(R1) 2005). Menetelmän lineaarisuus tulee tutkia koko menetelmän alueella: määritys tulisi tehdä vähintään 5 eri pitoisuuden avulla. Misoprostolin HPLC-menetelmän lineaarisuus tutkittiin pitoisuuksilla 15, 20, 25, 30 ja 35 µg/ml, eli 60–140 % tutkittavan näytteen pitoisuudesta. Tutkimus tehtiin kolmena rinnakkaisena määrittymenä kalibraatiostandardeilla STD1–5.

Mittalaitteen kullekin pitoisuudelle antamien vasteiden avulla laskettiin lineaarinen regressiosuora eli kalibraatiosuora, jota tarkasteltiin visuaalisesti ja laskennallisilla arvoilla. Näitä arvoja olivat y-akselin leikkauspisteen etäisyys origosta, vastetekijän arvot verrattuna 100 % vasteeseen sekä regressiosuoran y-residuaalit, joista muodostettiin jäännöskaavio. Lisäksi määritettiin kalibraatiosuoran korrelaatiokerroin, jonka tuli olla  $\geq 0,997$ .

### 6.6.3 Oikeellisuus

Menetelmän oikeellisuus kuvaa sitä, kuinka lähellä saadut arvot ja todellinen tai vertailuarvo ovat toisiaan (ICH Q2(R1) 2005). Oikeellisuus tulee tutkia koko menetelmän alueella vähintään yhdeksän näytteen avulla ja vähintään kolmella pitoisuustasolla. Koska kapselinäytteen taustaa ei ollut saatavilla, misoprostolin analyysimenetelmän oikeellisuus tutkittiin lisäämällä tunnettu määrä misoprostolistandardia näytteisiin.

Oikeellisuusnäytteet valmistettiin punnitsemalla kapselijauhetta yhtäläiset määrät näyteputkiin ja käsittelemällä näytteet kuten kapselinäytteet yleensä (kappale 6.3). Konsentroinnin jälkeen näytteisiin 4–6 ja 7–9 lisättiin standardiaineesta valmistettua liuosta. Standardiliuos oli aiottua laimeampaa (48,3 µg/ml), minkä vuoksi oikeellisuusnäytteiden 4–9 pitoisuudet olivat tavoiteltua laimeammat. Lopullisten näytteiden pitoisuudet olivat 15, 20,55 ja 26,10 µg/ml, ja kutakin pitoisuutta valmistettiin kolme rinnakkaista näytettä. Saatuja tuloksia verrattiin todellisiin pitoisuuksiin, jolloin voitiin laskea oikeellisuusprosentit. Rinnakkaisten näytteiden oikeellisuusprosentista laskettiin keskiarvo (KA) ja 95 % luottamusväli (CI), keskihajonta (SD) ja suhteellinen keskihajonta (RSD).

### 6.6.4 Toistettavuus

Toistettavuus kuvaa menetelmällä saatujen, toisistaan riippumattomien tulosten läheisyyttä ja satunnaisvaihtelua (ICH Q2(R1) 2005). Misoprostolin HPLC-menetelmän toistettavuutta tutkittiin kolmella tasolla. Injektiotoistettavuus tutkittiin jokaisena analyysipäivänä injektoimalla samasta STD3-näytteestä kuusi kertaa. Injektiotoistettavuus kertoo menetelmän ja laitteiston kunnosta sekä toiminnasta. Tuloksista laskettiin piikkien pinta-alojen ja retentioaikojen keskiarvot ja 95 % luottamusvälit, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Injektiotoistettavuus oli hyväksyttävä, kun piikkien pinta-alojen  $RSD \leq 2 \%$  ja retentioaikojen  $RSD \leq 0,5 \%$ .

Päivän sisäinen toistettavuus (laboratorion sisäinen toistettavuus) kertoo menetelmän antamien tulosten toistettavuudesta lyhyellä aikavälillä, kun työskentelyolosuhteet eivät muutu. Sitä tutkittiin tekemällä kuusi rinnakkaista toistettavuusnäytettä Cytotec-tableteista hierretystä jauheesta ja

käsitlemällä näytteet samoin kuin kapselinäytteet. Näytteiden pitoisuuksille laskettiin keskiarvo ja 95 % luottamusväli, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta.

Päivän sisäinen toistettavuus tutkittiin kolmena päivänä, jolloin tuloksista voitiin määrittää päivien välinen toistettavuus (laboratorion sisäinen uusittavuus). Päivien välinen toistettavuus kuvaa menetelmän toistettavuutta eri päivinä ja eri käyttäjillä sekä mahdollisesti eri laitteilla. Päivien välinen toistettavuus oli hyväksyttävä, kun päivän sisäiset toistettavuudet olivat hyväksyttävät eivätkä päivien pitoisuuksien keskiarvot poikenneet toisistaan merkittävästi.

### **6.6.5 Haavoittuvuus**

Menetelmän haavoittuvuus kertoo, kuinka luotettavasti menetelmä toimii sekä normaaleissa olosuhteissa että menetelmän parametrien vaihdellessa (ICH Q2(R1) 2005). Haavoittuvuutta tutkittiin selvittämällä standardinäytteiden säilyvyyttä jääkaapissa (3–7 °C) ja huoneenlämmössä (19–23 °C) näytteensyöttäjässä. Standardiliuoksia pidettiin jääkaapissa mittapulloissa viikon ajan ja STD3-liuosta HPLC-vialeissa näytteensyöttäjässä 1 ja 3 vuorokauden ajan. Näytteistä arvioitiin pitoisuuden muutos määrittämällä misoprostolin piikin pinta-alan muutos.

## **6.7 LÄÄKEVALMISTEEN LAADUNVALVONTA**

Misoprostolikapseleiden laatua tarkasteltiin tutkimuksessa säilyvyyden ja annosyksiköiden yhdenmukaisuuden osalta. Säilyvyys tutkittiin kontrolloiduissa olosuhteissa säilytetyillä kapseleilla määrittämällä pitoisuuden muuttuminen ajan funktiona. Euroopan farmakopea ohjeistaa annosyksiköiden yhdenmukaisuuden tutkimisesta kapseleiden monografiassa. Alle 2 mg vaikuttavaa ainetta sisältävien kapselien tulee täyttää annosvaihtelutestin vaatimukset (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed. 2.9.6). Lisäksi kapseleille voidaan määrittää jakelutarkkuus, kuten tässä erikoistyössä tehtiin (Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed. 2.9.5).

### 6.7.1 Säilyvyystutkimus

Säilyvyystutkimuksen misoprostolikapseleita ei voitu analysoida heti valmistuksen jälkeen kuljetukseen kuluneen ajan vuoksi, joten 0-hetken jälkeistä kahden vuorokauden aikaista misoprostolipitoisuutta tutkittiin Kuopiossa valmistetuilla misoprostolikapseleilla. Määrittäminen tehtiin viidestä rinnakkaisesta näytteestä heti kapseleiden valmistuspäivänä. Saatua tuloksia verrattiin sairaala-apteekissa valmistettujen kapseleiden pitoisuuksiin, jotka määritettiin ensimmäisen kerran kaksi päivää valmistamisen jälkeen (tutkimuspäivä 2). Tällä varmistettiin, ettei pitoisuus laske merkittävästi kapseleiden kuljetuksen aikana ja voidaan olettaa tutkimuspäivän 2 misoprostolipitoisuus 100 % pitoisuudeksi säilyvyystutkimuksessa.

Säilyvyystutkimuksen päivien 2, 7, 21 ja 35 pitoisuusmääritykset tehtiin Lapin keskussairaalan sairaala-apteekissa valmistetuista kapseleista. Kapseleiden valmistus tapahtui galeenisen valmistuksen puhdastiloissa farmaseutin toimesta. Valmistuksen ohje oli sama, jota käytettiin kapselien valmistuksessa Itä-Suomen yliopistolla (kappale 6.2). Kapselieran koko oli 80 kapselia. Kapselit pakattiin muovipurkkiin, joka oli polypropeenaa, ja kuljetettiin Kuopioon lämpötilaseurattuina. Kapseleita säilytettiin yliopistolla olosuhdekaapissa, jonka lämpötilaksi oli säädetty 25 °C ja suhteelliseksi kosteudeksi 60 %, mikä vastaa ICH:n Q1A(R2)-ohjeiston mukaisia pitkäkestoisen säilyvyystutkimuksen olosuhteita. Lämpötilaa ja kosteutta seurattiin dataloggereilla, jotta voitiin puuttua mahdollisiin poikkeamiin.

Näytteet otettiin 2, 7, 21 ja 35 vuorokauden kohdalla. Pitoisuus määritettiin HPLC-DAD-laitteistolla viidestä rinnakkaisesta näytteestä eli viidestä kapselistä jokaisena tutkimuspäivänä. Tutkimuspäivänä 2 tutkittiin myös kapseleiden annosvaihtelu ja jakelutarkkuus. Pitoisuusmääritysten tulokset laskettiin misoprostolipiikkien pinta-aloista kalibraatiosuoran avulla. Misoprostolipiikit tunnistettiin kromatogrammeista retentioajan perusteella. Kunkin tutkimuspäivän pitoisuudesta laskettiin prosenttiosuus verrattuna 100 % pitoisuuteen eli tutkimuspäivän 2 pitoisuuteen. Saaduista pitoisuuksien prosenttiosuuksista laskettiin lineaarisella regressiolla säilyvyystulokset, joille määritettiin 95 % luottamusvälit. Kalibraatiosuoran, pitoisuuksien ja säilyvyystulosten laskemiseen käytettiin Microsoft Excel -ohjelmaa ja GraphPad Prism8 -ohjelmistoa (versio 8.4.0). Useimmissa julkaisuissa valmisteen säilyvyys on hyväksyttävä, kun sen pitoisuus on  $\geq 90$  % alkuperäisestä (Sautou ym. 2013). Tämän perusteella



misoprostolikapseleiden hyväksymiskriteeriksi valittiin  $\pm 10 \%$  alkuperäisestä pitoisuudesta. Misoprostolipitoisuuden tulee siis pysyä annetun säilyvyysajan aikana 90–110 % välillä alkuperäisestä pitoisuudesta.

### 6.7.2 Annosyksiköiden yhdenmukaisuus

Kapseleiden jakelutarkkuus (uniformity of mass of single-dose preparations, Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed. 2.9.5) määritettiin 20 satunnaisesti valitusta misoprostolikapselista. Kapselit punnittiin yksitellen analyysivaa'alla (Sartorius BP2215), jonka jälkeen kapseleiden sisältö tyhjennettiin mahdollisimman täydellisesti. Tyhjä kapselikuori punnittiin, ja kapselin massa (sisällön massa) saatiin täyden kapselin ja tyhjän kapselin punnitusten erotuksesta. Euroopan farmakopean mukaisesti kapseleiden massoista laskettiin keskimääräinen massa, johon yksittäisiä massoja verrattiin. Korkeintaan kahden kapselin massa sai poiketa enintään 7,5 % massojen keskiarvosta. Yhdenkään kapselin massa ei saanut poiketa yli 15 % massojen keskiarvosta.

Annosvaihtelu (uniformity of content of single-dose preparations, Ph. Eur. 9<sup>th</sup> Ed. 2.9.6) tutkittiin määrittämällä misoprostolipitoisuus 10 satunnaisesti valitusta kapselista. Kunkin kapselin sisältö tyhjennettiin 5 ml mittapulloon. Näytteet käsiteltiin samoin kuin kapselinäytteet (kappale 6.3). Kapseleiden pitoisuus määritettiin misoprostolille kehitetyllä nestekromatografisella analyysimenetelmällä. Määritetyistä pitoisuuksista laskettiin Euroopan farmakopean mukaisesti pitoisuuksien keskiarvo, johon yksittäisten kapseleiden pitoisuuksia verrattiin. Annosvaihtelu oli hyväksyttävä, kun korkeintaan yhden kapselin pitoisuus oli alle 85 % tai yli 115 % pitoisuuksien keskiarvosta. Lisäksi yksikään pitoisuus ei saanut olla alle 75 % tai yli 125 % pitoisuuksien keskiarvosta.

## 7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

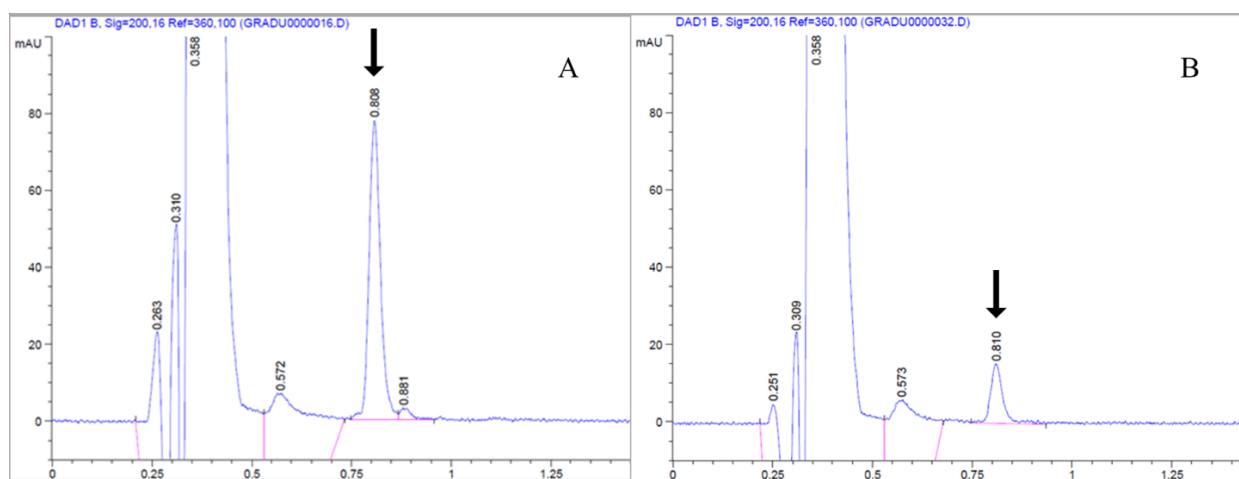
### 7.1 MENETELMÄN KEHITYS

Misoprostolikapseleiden analyysimenetelmän kehittämiseksi tehtiin kirjallisuushaku misoprostolivalmisteiden säilyvyystutkimuksista. Euroopan farmakopean misoprostolin pitoisuusmäärittelyn menetelmä perustuu normaalifaasikromatografiaan, mutta tästä poiketen suuri osa haun antamista tutkimuksista käytti pitoisuusmäärittelyssä käänteisfaasikromatografiaa (Chen ym. 2000, Williams ym. 2002, Chu ym. 2007, Mehta ym. 2010, Carr ym. 2012, Anyakora ym. 2018). Erikoistyössä päädyttiin siten käyttämään käänteisfaasikolonnia. Kolonniksi kokeiltiin välillä hieman heikommin retentoivaa lyhyemmän hiiliketjun Zorbax Eclipse XDB-C8 -kolonnia (Agilent Technologies), mutta lopulta valittiin Zorbax Eclipse XDB-C18 -kolonni.

LC-MS/MS-menetelmällä varmistettiin, että seurattava piikki on misoprostolin aiheuttama. Chu ja kumppanit 2007 kuvasivat tutkimuksessaan misoprostolin pitoisuusmäärittelyn LCMS:lla ja käyttivät misoprostolin tunnistukseen muun muassa ionifragmentteja 267 ja 405 ( $m/z$ ). Näiden fragmenttien avulla tunnistettiin misoprostoli standardinäytteestä (7 µg/ml) ja kapselinäytteestä. Näytteet antoivat toisiaan vastaavat piikit samanlaisilla retentioajoilla.

Ajoliuoksina testattiin aluksi vesi/asetonitriili/trifluorietikkahappo-seosta (75/25/0,1% V/V) ja asetonitriiliä, mutta misoprostolista ei saatu selvää signaalia. Päädyttiin pitämään toisena ajoliuoksena edelleen asetonitriili, jolloin pystyttiin säätämään orgaanisen liuoksen osuutta liikkuvassa faasissa. Epäorgaanisena ajoliuoksena kokeiltiin veden ja trifluorietikkahapon (0,1%) seosta sekä pelkkää vettä, jotka eivät kuitenkaan toimineet. Kun HPLC:lla saatu misoprostolipiikki varmistettiin massaspektrometrillä, käytettiin toisena ajoliuoksena 0,1% muurahaishapon vesiliuosta. Tämän perusteella tehtiin muutokset HPLC:n ajoliuoksiin siten, että ajoliuos A oli 0,1% muurahaishapon vesiliuos ja ajoliuos B oli asetonitriilin ja muurahaishapon (0,1%) seos. Optimaaliseksi epäorgaanisen ja orgaanisen ajoliuoksen suhteeksi osoittautui 40 % epäorgaanista ja 60 % orgaanista. Lisäksi päädyttiin isokraattiseen ajoon, koska se oli toistettavampi ja vakaampi kuin gradienttiao.

Näytteen pienen misoprostolipitoisuuden vuoksi kapseleista tehdyt näytteet jouduttiin konsentroimaan haihduttamalla. Ilman konsentrointia misoprostolin piikki oli kromatogrammissa liian pieni, jolloin sitä ei pystytty integroimaan toistettavasti (kuva 7). Myös injektioilavuus oli aluksi 5 µl, mutta paremmin erottuva piikki saatiin, kun tilavuudeksi vaihdettiin 10 µl. Kolonnin lämpötilaksi puolestaan säädettiin 30 C. Virtausnopeutta vaihdeltiin aluksi 0,6-1,2 ml/min. Kun muut parametrit oli säädetty, virtausnopeus nostettiin 1,5 ml/min, jotta ajoaika saatiin lyhennettyä 2,5 minuuttiin. Näillä parametreilla misoprostoli eluoitui detektorille noin 0,8 minuutissa. DAD-detektorin aallonpituudeksi valittiin kirjallisuuden perusteella 200 nm. Myös 210 ja 214 nm aallonpituutta kokeiltiin, mutta misoprostolin signaali oli tällöin heikompi.



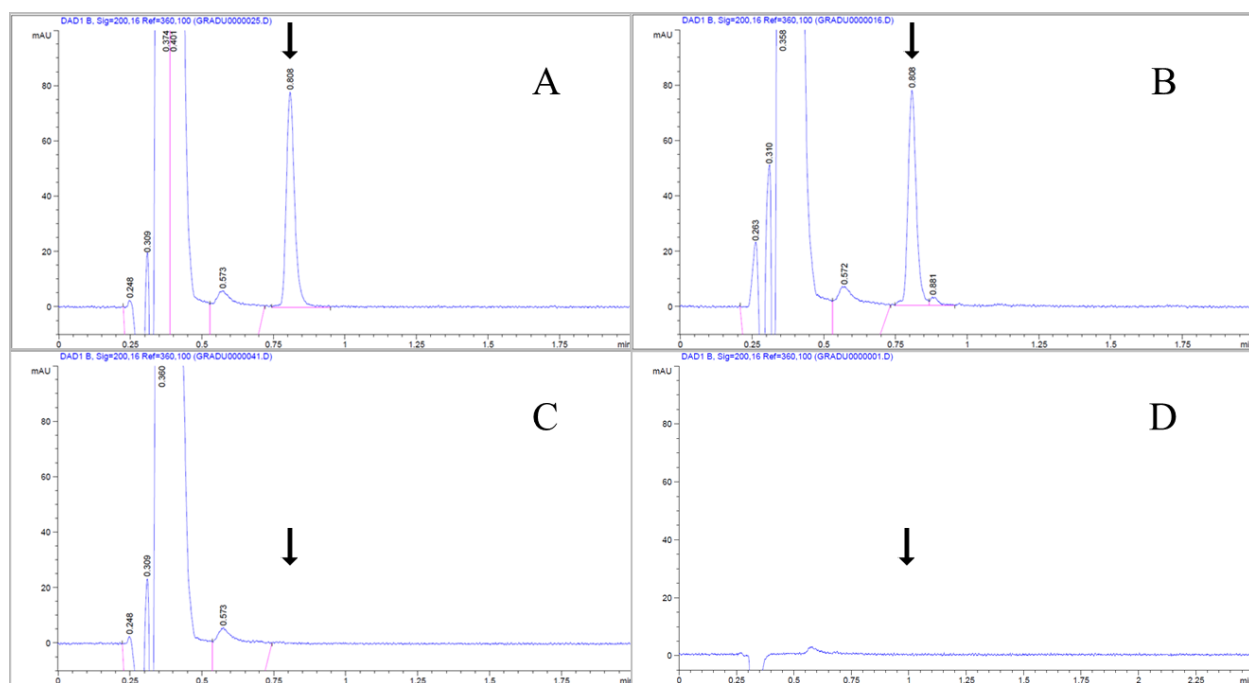
Kuva 7. Konsentroidun kapselinäytteen (A) kromatogrammista misoprostolin piikki saatiin integroitua toistettavammin kuin ennen haihdutusta otetun näytteen kromatogrammista (B), sillä piikki oli suurempi.

## 7.2 VALIDOINTITULOKSET

Misoprostolin HPLC-menetelmä validoitiin ICH:n Q2(R1)-ohjeiston mukaisesti, jotta voitiin osoittaa sen soveltuvuus käyttötarkoitukseensa. Validoinnin perusteella HPLC-menetelmä todettiin käyttöalueellaan spesifiseksi ja lineaariseksi. Menetelmän oikeellisuus todettiin riittäväksi säilyvyystutkimuksen tarpeisiin nähden, samoin kuin päivän sisäinen ja päivien välinen toistettavuus. Injektioitettavuuden perusteella laitteisto toimi toivotusti.

## 7.2.1 Spesifisyys

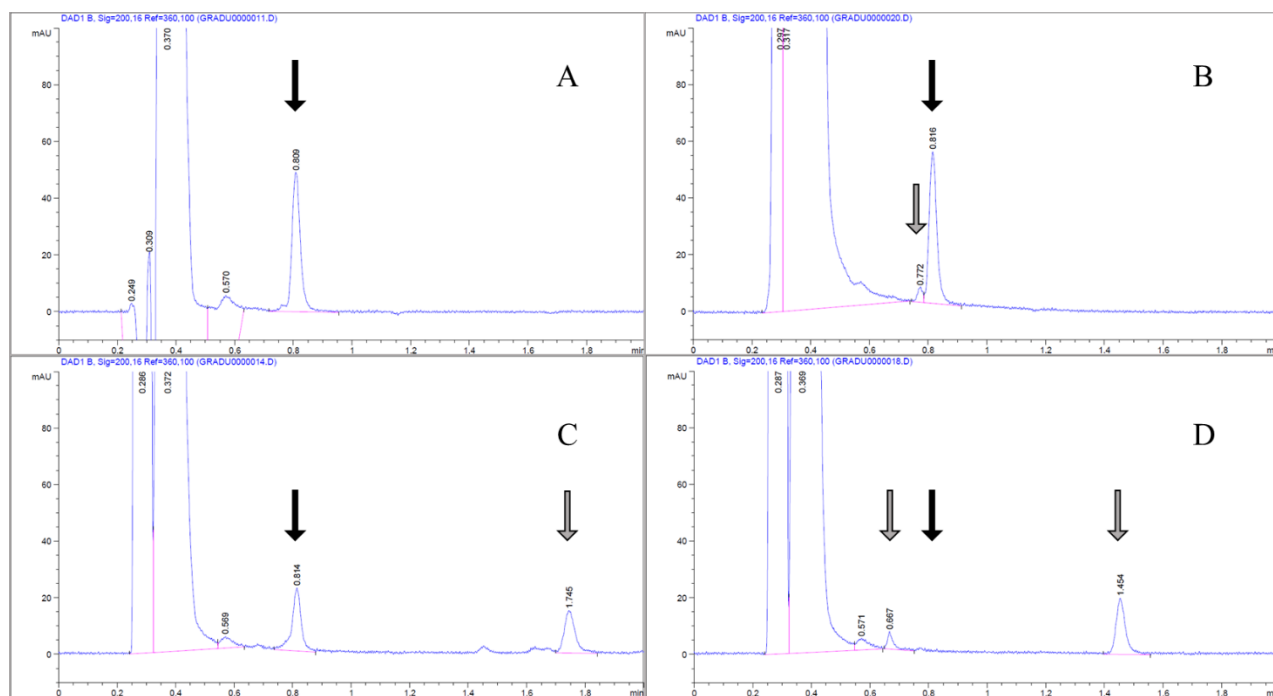
Analyysimenetelmän spesifisyyttä tutkittiin vertaamalla kapselinäytteen, näytetaustan metanolin (blanko) ja ajoliuosten kromatogrammeja misoprostolin standardinäytteen (STD3, 100 %) kromatogrammiin (kuva 8). Sekä standardi- että kapselinäytteen kromatogrammeissa havaittiin misoprostolin piikki retentioajalla 0,81 min. Kapselinäytteen kromatogrammissa on nähtävissä valmistetaustasta aiheutuva pieni piikki retentioajalla 0,88 min, mutta se ei haitannut mittausta. Samoin metanolin aiheuttama piikki retentioajalla 0,57 min ei häirinnyt mitttausta. Ajoliuosten kromatogrammit olivat samanlaiset, eikä niissäkään ollut määrittystä häiritseviä piikkejä.



Kuva 8. Misoprostolin HPLC-DAD:lla mitatut kromatogrammit. Misoprostoli synnytti piikit standardin STD3 (A) ja misoprostolikapselin (B) kromatogrammeihin, mutta ei blankon (C) ja HPLC-ajoliuoksen (D) kromatogrammeihin. Ajoliuosten kromatogrammit olivat samanlaiset, joten kuvassa on esitetty vain toisen ajoliuoksen kromatogrammi.

Spesifisyyttä tutkittiin myös hajoamiskokeilla, joilla osoitettiin, etteivät misoprostolin hajoamistuotteet aiheuta mittausta haittaavia piikkejä. Kuvassa 9 on esitetty kromatogrammit käsittelemättömälle misoprostolistandardille ja hajoamisnäytteille, joissa misoprostolistandardi on

käsitelty hapolla, emäksellä ja hapettimella 15 minuutin ajan. Käsittelemättömän standardin kromatogrammissa misoprostolin piikki havaittiin retentioajalla 0,81 min. Myös hapolla ja hapettimella käsiteltyt näytteet aiheuttivat kromatogrammiin misoprostolipiikin hieman poikkeavilla retentioajoilla (~ 0,81 min). Happokäsittelyn jälkeen misoprostolin piikki pieneni ja retentioajalle 1,75 min syntyi mahdollisen hajoamistuotteen piikki. Hapetinkäsittely aiheutti pienen piikin ennen misoprostolipiikkiä (0,77 min). Emäksellä käsitellyn näytteen kromatogrammissa ei puolestaan havaittu misoprostolia, mutta retentioajalla 1,45 min eluoitui hajoamistuote. Pieni piikki havaittiin myös retentioajalla 0,67 min. Hajoamisnäytteissä käytetyt vesi, NaOH, HCl ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eivät aiheuttaneet piikkejä misoprostolin tai edellä esitettyjen hajoamistuotteiden retentioajoilla. Kummatkin käsittelyn kestot (15 ja 60 min) tuottivat lähes samanlaiset kromatogrammit.



Kuva 9. Käsittelemättömän standardin (A) sekä hapettimella (B), hapolla (C) ja emäksellä (D) käsitellyn standardin kromatogrammit HPLC-DAD:lla määritettynä. Mustalla nuolella on merkitty misoprostolin piikin paikka ja harmaalla nuolella hajoamistuotteiden paikat.

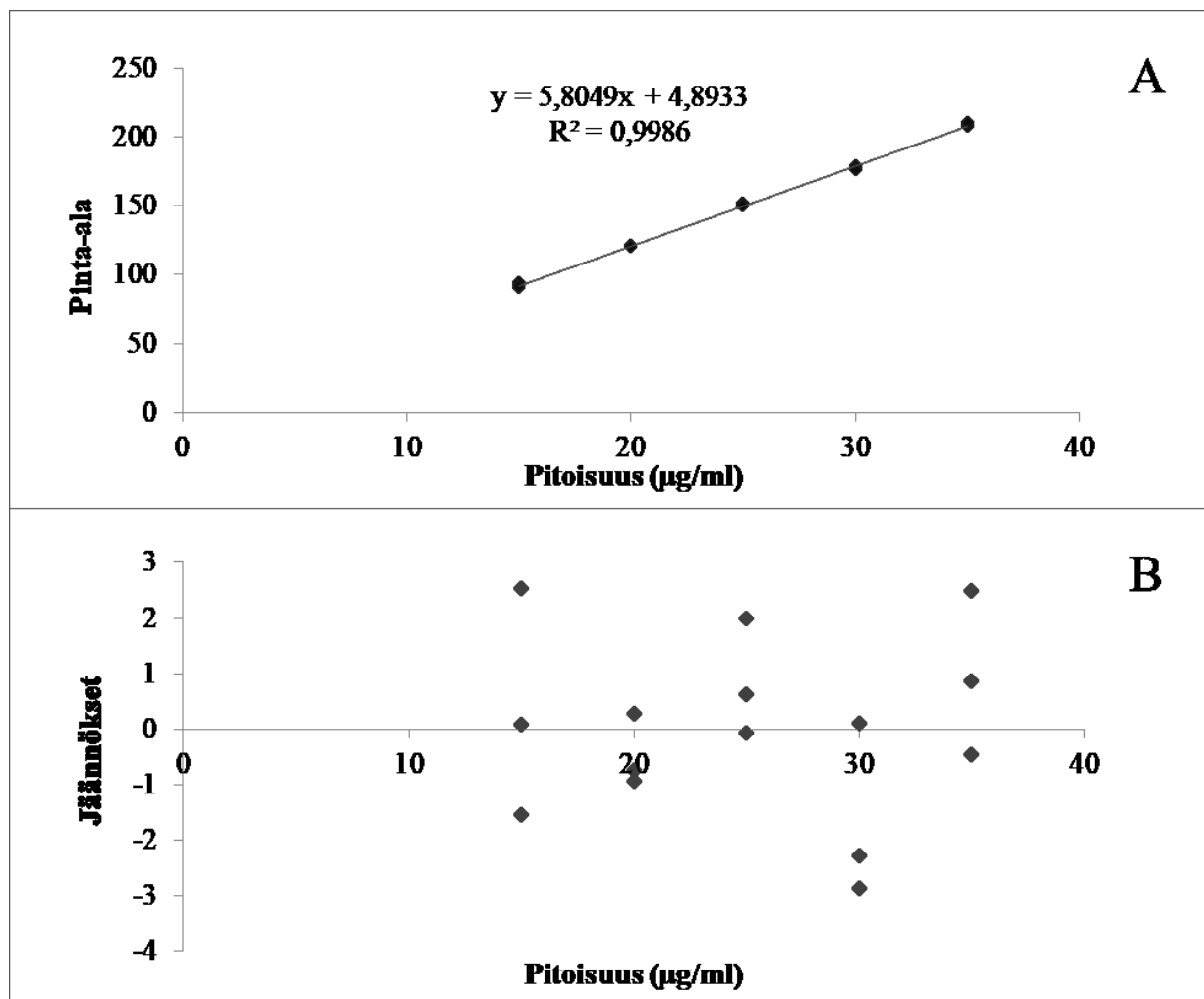
Rasituskokeessa misoprostolikapseleita pidettiin vuorokauden ajan olosuhdekaapissa 25 °C:ssa ja 60 % suhteellisessa kosteudessa. Näiden misoprostolikapseleiden kromatogrammeissa ei havaittu

poikkeavia piikkejä verrattuna kapsleihin, jotka oli säilytetty kosteudelta suojattuina samassa lämpötilassa.

Menetelmä on spesifinen misoprostolin suhteen, sillä näytetausta, HPLC-ajoliuokset ja muut käytetyt liuottimet eivät aiheuta misoprostolin määrittystä häiritseviä kromatografisia piikkejä. Myöskään misoprostolin hajoamistuotteet eivät haittaa määrittystä. Misoprostolin piikin puhtaus tarkastettiin UV-spektrin avulla, millä varmistuttiin siitä, että piikki ei koostunut useammasta yhdisteestä.

### **7.2.2 Lineaarisuus**

Menetelmän lineaarisuutta tutkittiin määrittämällä kalibraatiosuora viidellä eri misoprostolipitoisuulla kolmena rinnakkaisena mittauksena. Kalibraatiosuora laskettiin lineaarisella regressioanalyysillä, ja suoran korrelaatiokertoimen arvoksi määritettiin 0,9986 (kuva 10). Korrelaatiokerroin on hyväksymiskriteerin mukainen ( $\geq 0,997$ ), joten menetelmä on tämän mukaan lineaarinen. Kalibraatiosuoralta laskettiin myös y-residuaalit eli jäännökset, jotka esitettiin jäännöskaaviossa pitoisuuden funktiona (kuva 10). Jäännöskaaviosta nähdään, että y-residuaalit jakautuvat tasaisesti molemmiin puolin vaaka-akselia. Koska jäännöskaaviossa ei ole poikkeavia arvoja, kalibraatiosuoraa voidaan pitää lineaarisena.



Kuva 10. Misoprostolin kalibraatiosuora, suoran yhtälö ja korrelaatiokerroin (A) sekä kalibraatiosuoran jäännökset (B).

Kalibraatiosuoran y-akselin leikkauspisteen etäisyys origosta määritettiin vertaamalla y-akselin leikkauspisteen arvoa STD3:n vasteeseen kalibraatiosuoralla (100 % pitoisuus). Saatu tulos oli prosentteina 3,3 %, mikä ei ole ihanteellinen, mutta suora kulkee riittävän läheltä origoa. Lisäksi kunkin pitoisuustason kolmelle rinnakkaiselle näytteelle laskettiin vastetekijät eli piikin pinta-ala jaettiin vastaavan näytteen teoreettisella pitoisuudella. Saatuja arvoja verrattiin 100 % näytteen vastetekijöiden keskiarvoon, jolloin saatiin vastetekijöiden poikkeamat prosentteina. Poikkeamat olivat kahta lukuun ottamatta alle 2,5 % eli näytteiden vastetekijät ovat lähellä 100 % pitoisuuden arvoa.

Misoprostolin analyysimenetelmää voidaan siis pitää lineaarisena, sillä kalibraatiosuoran korrelaatiokerroin on hyväksymiskriteerin mukainen. Tätä päätelmää tukevat osaltaan jäännöskaavio, y-akselin leikkauspisteen etäisyys origosta ja vastetekijöiden poikkeamat.

### 7.2.3 Oikeellisuus

Oikeellisuusnäytteitä valmistettiin kolmella pitoisuustasolla kolme rinnakkaista näytettä. Näytteiden valmistuksessa sattui poikkeama, sillä näytteisiin 4–6 ja 7–9 konsentroidin jälkeen lisätty standardiliuos oli aiottua laimeampaa. Siispä oikeellisuusprosenttien määrittämiseen käytettiin standardiliuoksen todellisen pitoisuuden mukaan laskettuja näytteiden pitoisuuksia. Laimeammat näytteet johtivat siihen, että oikeellisuutta ei saatu tutkittua menetelmän alueen ylärajalla. Oikeellisuusmäärittämisestä saadut tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Oikeellisuusprosentit kolmella pitoisuustasolla ja niistä lasketut tulokset.

Pitoisuus	15,00 µg/ml	20,55 µg/ml	26,10 µg/ml
1	95,0 %	93,7 %	92,4 %
2	86,2 %	95,1 %	89,6 %
3	93,9 %	99,3 %	87,0 %
KA	91,9 %	96,0 %	89,6 %
SD	5,1	3,0	2,7
RSD	5,5 %	3,1 %	3,0 %
95 % CI	5,7	3,3	3,1

Oikeellisuusprosenttien keskiarvot olivat alimmalla ja keskimmaisella pitoisuustasolla yli 90 %, ja ylimmälläkin pitoisuustasolla lähes 90 %. Menetelmän oikeellisuus on tulosten perusteella riittävä erikoistyon säilyvyystutkimukseen, jossa menetelmän tulee olla ennen kaikkea toistettava. Alhaisten oikeellisuusprosenttien syynä voi olla se, että oikeellisuusnäytteet valmistettiin misoprostolikapseleiden jauheesta, joka ei välttämättä ollut homogeenistä misoprostolin suhteen.



Tällöin näytteeseen punnitussa jauheessa on tosiasiaa voinut olla vähemmän misoprostolia kuin oletettiin. Lisäksi näytteenkäsittelyssä haihdutus on voinut vaikuttaa pitoisuuksiin.

#### 7.2.4 Toistettavuus

Menetelmän toistettavuus tutkittiin sekä päivän sisällä että päivien välillä. Jokaisena analyysipäivänä määritettiin injektioitoistettavuus, jonka hyväksymiskriteereinä olivat piikkien pinta-alojen  $RSD \leq 2 \%$  ja retentioaikojen  $RSD \leq 0,5 \%$ . Injektioitoistettavuus oli hyväksyttävissä rajoissa toistettavuuskokeen ja säilyvyystutkimuksen aikana, joten voidaan olettaa, että laitteisto ja menetelmä toimivat.

Päivän sisäisen ja päivien välisen toistettavuuden näytteet valmistettiin Cytotec-tableteista tehdystä jauheesta ja niiden laskennallinen pitoisuus oli  $25 \mu\text{g/ml}$ . Toistettavuuskokeessa käytetyt standardit olivat kuitenkin aiottua laimeammat, minkä vuoksi HPLC-mittauksen antamat toistettavuusnäytteiden pitoisuudet olivat todellista suuremmat (noin  $34 \mu\text{g/ml}$ ). Tämä ei kuitenkaan vaikuttanut toistettavuuden tutkimiseen, sillä samoja standardeja käytettiin kaikkien toistettavuusnäytteiden analysointiin.

Päivän sisäinen toistettavuus tutkittiin kuudella rinnakkaisella pitoisuusmäärittelyksellä, joiden tuloksista laskettiin pitoisuuden keskiarvo ja hajontaa kuvaavat luvut. Päivien välinen toistettavuus selvitettiin toistamalla päivän sisäinen toistettavuus kolmena päivänä. Tulokset on esitetty taulukossa 6. Vaihtelua toistettavuusnäytteiden pitoisuuksiin ovat voineet aiheuttaa virheet näytteenvalmistuksessa (esim. jauheen punnitseminen) tai misoprostolin epätasainen jakautuminen näytteisiin käytetyssä tablettijauheessa. Päivien sisällä rinnakkaisten näytteiden pitoisuuksien  $RSD$  oli kuitenkin alle  $5 \%$  ja päivien pitoisuuksien keskiarvot eivät poikenneet suuresti toisistaan, joten menetelmän toistettavuus päivän sisällä ja päivien välillä on riittävä säilyvyystutkimuksen tarpeisiin.

Taulukko 6. Päivien välisen toistettavuuden tulokset.

	Misoprostoli (µg/ml)		
	Päivä I	Päivä II	Päivä III
KA	34,9	34,6	33,2
SD	1,3	1,0	1,6
RSD	3,8	2,9	4,9
CI 95 %	1,1	0,8	1,3

### 7.2.5 Haavoittuvuus

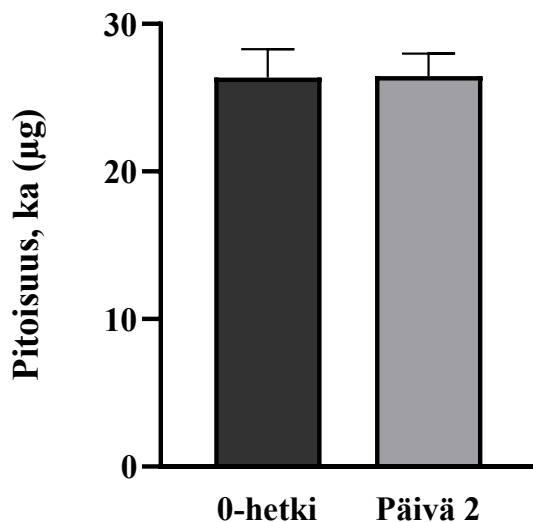
Menetelmän haavoittuvuutta kuvattiin selvittämällä standardinäytteiden säilyvyys jääkaapissa ja huoneenlämmössä. Jääkaapissa (2–8 °C) pidetyistä standardiliuoksista (STD1–5) määritettiin viikon kuluttua valmistuksesta kalibraatiosuora, jota verrattiin valmistuksen jälkeen määritettyyn kalibraatiosuoraan. Prism GraphPad -ohjelmistolla määritettyjen kalibraatiosuorien välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa, minkä perusteella standardiliuosten todettiin säilyvän mittapulloissa jääkaapissa viikon ajan.

Huoneenlämmössä näytteensyöttäjässä pidetyn STD3-näytteen säilyvyyttä tutkittiin 1 ja 3 vuorokauden ajan. Huoneenlämmössä vuorokauden olleella näytteellä misoprostolipiikin pinta-ala kasvoi 4,5 % ja kolme vuorokautta olleella näytteellä 8,7 % verrattuna näytteen alkuperäiseen piikin pinta-alaan. Näytteiden pitoisuus siis kasvoi huoneenlämmössä sekä 1 että 3 vuorokauden aikana. Syynä tähän on luultavasti liuottimen haihtuminen HPLC-vialin kumikorkin läpi, jolloin liuos konsentroituu.

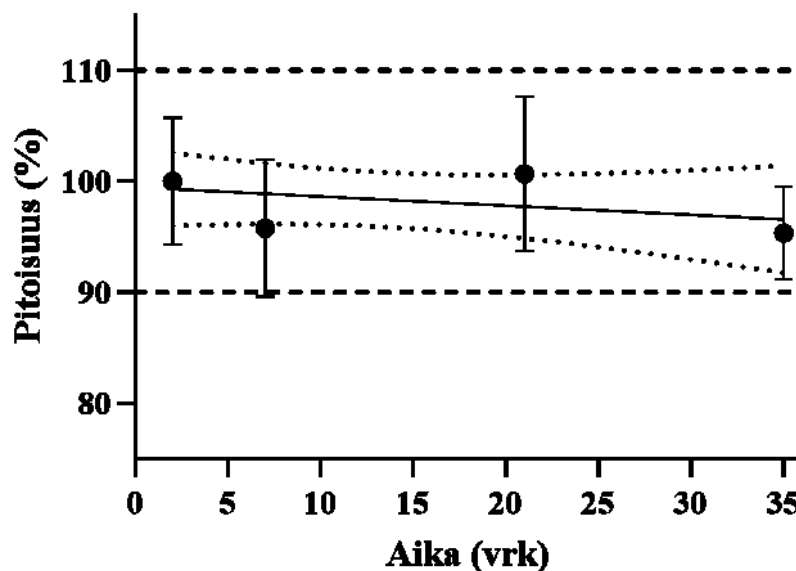
## 7.3 LÄÄKEVALMISTEEN LAADUNVALVONTA

### 7.3.1 Säilyvyystutkimus

Misoprostolikapseleiden kemiallista säilyvyyttä tutkittiin määrittämällä misoprostolipitoisuuden muuttuminen kapseleissa 35 vuorokauden aikana. Säilyvyys tutkittiin  $25 \pm 2$  °C lämpötilassa ja 60 % suhteellisessa kosteudessa. Misoprostolikapseleiden pitoisuus 0-hetkellä määritettiin Itä-Suomen yliopistolla valmistetuista kapseleista heti valmistamisen jälkeen. 0-hetkellä kapseleiden pitoisuuden keskiarvo oli 26,37 µg. Tutkimuspäivän 2 kapseleiden pitoisuuksien keskiarvo taas oli 26,47 µg, josta 0-hetken pitoisuuksien keskiarvo eroaa vain 0,37 %. Pitoisuuksien keskiarvot ja keskihajonnat on esitetty kuvassa 11. Koska pitoisuudet olivat lähellä toisiaan, misoprostolin määrä kapseleissa ei muutu merkittävästi 0-hetken ja tutkimuspäivän 2 välillä. Päivän 2 kapseleiden pitoisuutta voidaan siis käyttää säilyvyystutkimuksessa 100 % vertailuarvona, joten tutkimuspäivinä 7, 21 ja 35 määritettyä rinnakkaisten näytteiden keskipitoisuutta verrattiin tutkimuspäivän 2 keskipitoisuuteen. Saadut tulokset muutettiin prosenteiksi verrattuna 100% pitoisuuteen, jolloin pitoisuuden muuttuminen voitiin esittää ajan funktiona (kuva 12).



Kuva 11. Misoprostolipitoisuuden keskiarvo (ka) ja keskihajonta 0-hetkellä ja tutkimuspäivänä 2 mitatuista misoprostolikapseleista (n=5)

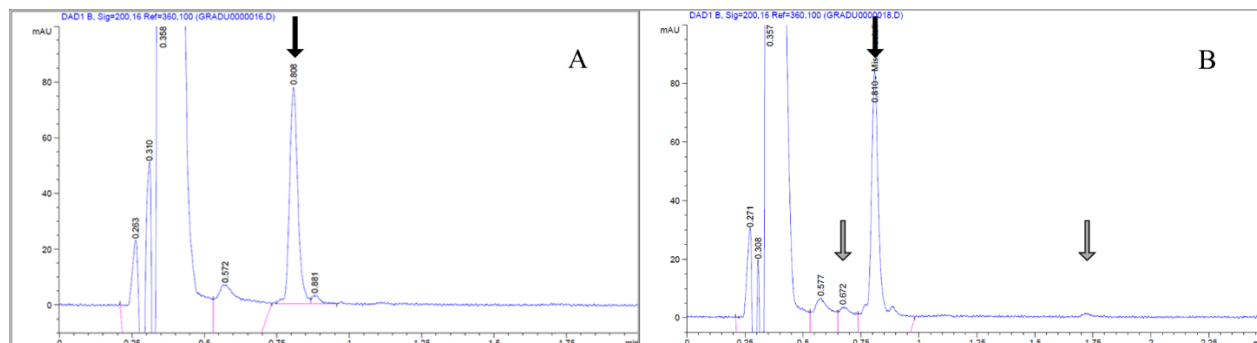


Kuva 12. Misoprostolikapseleiden pitoisuuden muutos 35 vuorokauden aikana verrattuna tutkimuspäivän 2 kapseleiden keskipitoisuuteen.

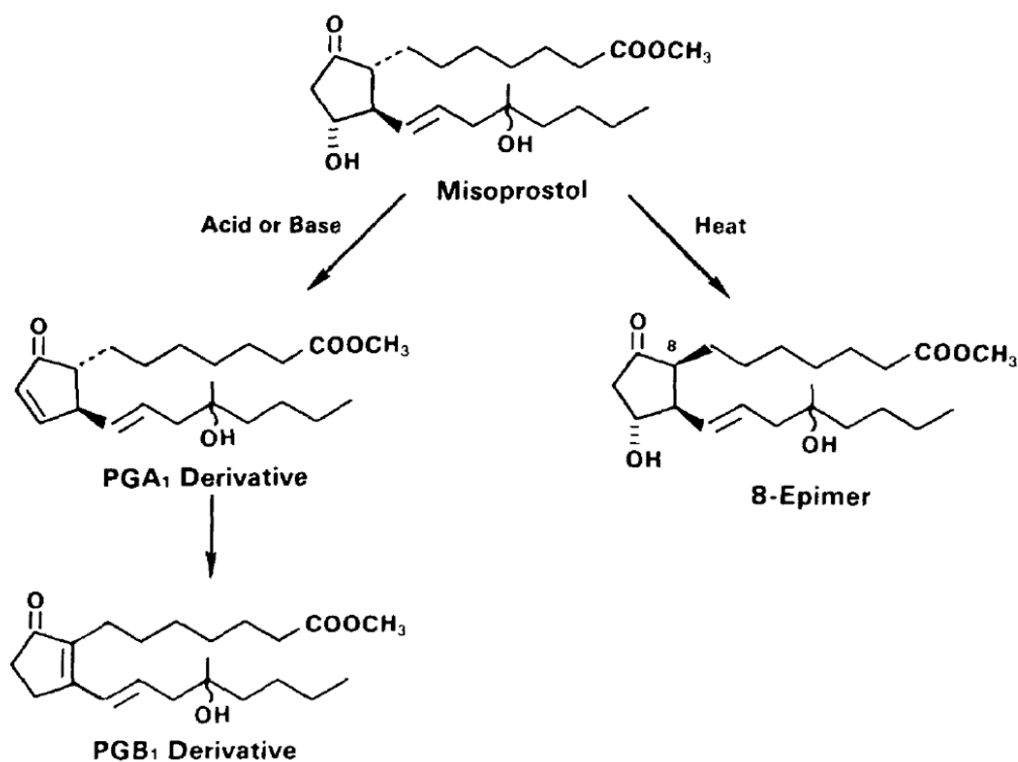
Kuten kuvasta 12 käy ilmi, misoprostolin pitoisuus kapseleissa laski säilyvyystutkimuksen aikana, mutta regressiosuoralle määritetty 95 % luottamusvälin alaraja ei laskenut alle 90 % hyväksymisrajan. Rinnakkaisten näytteiden pitoisuuksissa tosin esiintyi melko paljon hajontaa, mutta eri päivien mittapisteet asettuivat tasaisesti suoran molemmiin puoliin ja hyväksymisrajojen sisään. Visuaalisesti tarkastelemalla kapseleiden ulkonäössä ei myöskään huomattu muutoksia tutkimuksen aikana. Kosteus voi aiheuttaa kapselikuoren pehmenemisen ja muuttumisen tahmaiseksi (Helin-Tanninen ja Pinto 2015). Tällaista ei kuitenkaan havaittu, kuten ei myöskään muutoksia kapseleiden tai kapselisisällön värissä. Voidaan siis todeta, että misoprostolikapselit säilyivät tutkimusolosuhteissa 35 vuorokauden ajan.

Tutkimuspäivän 35 kapselinäytteiden kromatogrammeissa havaittiin pienet piikit retentioajoilla 0,67 ja 1,74 min (kuva 13). Validointitutkimuksissa tehtyjen hajoamiskokeiden perusteella kyseiset piikit viittaavat emäs- ja happokatalysoituun hajoamiseen. Aiemmissa tutkimuksissa on todettu, että misoprostoli voi happamissa tai emäksisissä olosuhteissa veden läsnä ollessa dehydratoitua, jolloin hajoamistuotteena syntyy prostaglandiinin A-johdannainen (kuva 14) (Collins ym. 1985).

Tämä hajoamistuote voi edelleen isomerisoitua B-tyyppin prostaglandiiniksi. Lämmön vaikutuksesta misoprostoli voi puolestaan epimerisoitua misoprostolin 8-epimeeriksi.



Kuva 13. Säilyvyystutkimuksen päivän 2 kapselinäytteen kromatogrammissa (A) nähdään vain misoprostolin piikki, kun taas päivän 35 kromatogrammissa (B) nähdään myös hajoamistuotteiden piikit retentioajoilla 0,67 ja 1,74 min. Misoprostolin piikki on merkitty mustalla nuolella ja hajoamistuotteiden paikat harmailla nuolilla.



Kuva 14. Misoprostoli dehydratoituu tyypin A ja B prostaglandiineiksi emäksen tai hapon katalysoidessa ja epimerisoituu 8-epimeeriksi lämmön vaikutuksesta (Collins ym. 1985).

Berard ja kumppanit (2014) tutkivat blisteripakkauksesta poistettujen misoprostolitablettien säilyvyyttä 25 °C lämpötilassa ja 60 % suhteellisessa kosteudessa. He havaitsivat, että kahden ensimmäisen vuorokauden aikana misoprostolipitoisuus laski 5,1 % ja hajoamistuotteiden pitoisuudet nousivat: tyypin A hajoamistuotteen pitoisuus nousi 50 %, tyypin B 25 % ja 8-epimeerin 11 % verrattuna blisterissä säilytettyjen tablettien pitoisuuksiin. Tässä erikoistyon säilyvyystutkimuksessa misoprostolikapselit säilytettiin muovipakkauksessa, joten hajoamistuotteiden määrät ovat todennäköisesti pienemmät kuin Berardin ja kumppaneiden tutkimuksessa. Misoprostolikapseleiden pakkaus oli polypropeenaa, joka suojaa hyvin kosteudelta. Hajoamistuotteiden syntymistä ja pitoisuuden muuttumista ei mitattu, mutta kromatogrammeissa niiden piikit olivat pienet verrattuna misoprostolin piikkiin (kuva 14). Kuten Kahsay ja kumppanit (2015) toteavat, misoprostolin hajoamistuotteiden erottaminen nestekromatografilla on haastavaa, sillä misoprostoli itsessään esiintyy diastereomeerinä ja hajoamistuotteet voivat isomerisoitua. Analyysimenetelmä tulisi siis kehittää nämä tekijät huomioiden.

### 7.3.2 Annosyksiköiden yhdenmukaisuus

LKS:n ja KYS:n sairaala-apteekkien valmistamien misoprostolikapseleiden jakelutarkkuudet määritettiin Euroopan farmakopean mukaisesti 20 kapselistä. Kapseleiden massoista laskettiin keskiarvot ja hajontaluvut, jotka ovat taulukossa 7. Myös hyväksymisrajat jakelutarkkuuksille on esitetty taulukossa 7. Ensimmäisen misoprostolikapselierän pienin mitattu kapselin yksittäinen massa oli 391,5 mg ja suurin massa oli 414,4 mg. Toisen erän kapseleiden pienin massa oli 402,2 mg ja suurin massa 413,4 mg. Kummankin sairaala-apteen valmistamat kapselit siis täyttivät jakelutarkkuuden hyväksymisrajat, sillä yhdenkään kapselin massa ei poikennut keskimassasta yli 7,5 %, eikä siten myöskään yli 15 %. Hajonnan vähyys viittaa siihen, että kapselointilaite ja -prosessi toimivat hyväksyttävästi (Smeets ym. 2015).

Taulukko 7. Misoprostolikapseleiden jakelutarkkuus.

	Kapselin massa ka (mg)	SD (mg)	RSD (%)	Hyväksymisrajat ±7,5 % (mg)	Hyväksymisrajat ±15 % (mg)
Erä 1	405,8	5,3	1,3	375,3 – 436,2	344,9 – 466,7
Erä 2	408,4	3,7	0,9	377,8 – 439,0	347,1 – 469,7

Annosvaihtelun tutkimista varten mitattiin 10 kapselin misoprostolipitoisuus sekä LKS:ssa että KYS:ssa valmistetuista misoprostolikapseleista ja laskettiin pitoisuuksien keskiarvo Euroopan farmakopean mukaisesti. Pitoisuuksien keskiarvo, hajontaluvut ja hyväksymisrajat on esitetty taulukossa 8. Ensimmäisen erän misoprostolikapseleista pienin mitattu pitoisuus oli 23,5 µg ja suurin pitoisuus 28,3 µg. Toisen erän kapseleiden vastaavat pitoisuudet olivat 24,3 µg ja 27,3 µg. Kummankin sairaala-apteekin valmistamien misoprostolikapseleiden pitoisuudet ovat siis hyväksymisrajojen sisällä, joten annosvaihtelu on hyväksyttävä. Tämä osoittaa, että vaikuttava aine on sekoittunut tasaisesti apuaineisiin ja seos on pysynyt homogeenisenä myös kapseleiden täytön ajan (Smeets ym. 2015).

Taulukko 8. Misoprostolikapseleiden annosvaihtelu.

	Kapselin pitoisuus ka (µg)	SD (µg)	RSD (%)	Hyväksymisrajat ±15 % (µg)	Hyväksymisrajat ±25 % (µg)
Erä 1	26,5	1,5	5,7	22,5 – 30,4	19,9 – 33,1
Erä 2	26,5	0,9	3,2	22,5 – 30,4	19,9 – 33,1

## 8 YHTEENVETO

Erikoistytön kokeellisessa osiossa misoprostolikapseleiden pitoisuusmäärittämiseen kehitettiin kirjallisuuden pohjalta HPLC-DAD-menetelmä, joka validointiin ICH:n Q1(R2)-ohjeiston mukaisesti. Saatujen validointitulosten perusteella analyysimenetelmä todettiin käyttötarkoitukseensa sopivaksi, sillä se oli spesifinen, lineaarinen, toistettava sekä riittävän oikeellinen. Menetelmän alueeksi valittiin 60–120 % tutkittavasta pitoisuudesta. Tutkittavien misoprostolikapseleiden pitoisuus (25 µg) oli niin alhainen, että menetelmän kehityksen aikana päädyttiin näytteen konsentrointiin.

Kehitettyä analyysimenetelmää käytettiin misoprostolikapseleiden säilyvyystutkimuksessa, jonka tulosten perusteella muovipurkkiin pakatut kapselit säilyvät huoneenlämmössä ( $25 \pm 2$  °C) ja 60 % suhteellisessa kosteudessa 35 vuorokautta. Käytännössä tämä vastaa yhden kuukauden säilyvyysaikaa. Kapseleiden misoprostolipitoisuus laski tutkimuksen aikana, mutta ei alittanut 90 % hyväksymisrajaa. Myöskään kapseleiden ulkonäkö ei muuttunut visuaalisen tarkastelun perusteella. Vertaamalla viimeisen tutkimuspäivän kromatogrammeja hajoamiskokeiden kromatogrammeihin havaittiin, että kapseleissa on mahdollisesti syntynyt hajoamistuotteita. Hajoamistuotteiden tarkempaa määrittämistä varten analyysimenetelmää tulisi kehittää lisää.

Kokeellisessa osassa tutkittiin myös Euroopan farmakopean ohjeiden mukaisesti annosyksiköiden yhdenmukaisuus kahdesta misoprostolikapselierästä, jotka oli valmistettu eri sairaala-apteekeissa. Kummassakin erässä sekä jakelutarkkuus että annosvaihtelu olivat hyväksytyissä rajoissa. Tämä viittaa siihen, että jauheseos pysyy homogeenisenä kapselointiprosessissa ja kapselit täyttyvät tasaisesti eli valmistusprosessi on toimiva kummassakin sairaala-apteekissa.

Berard ja kumppanit (2014) osoittivat tutkimuksessaan, että misoprostolitabletin farmaseuttis-teknisten ominaisuuksien muutos on yhteydessä tabletin sisältämän veden määrään. Vesi toimii tabletissa sekä misoprostolin hajoamisreaktion katalyyttinä että tablettirakenteen plastisoijana. Tässä erikoistytössä ei tutkittu misoprostolikapseleiden vesipitoisuuden muutosta säilyvyystutkimuksen aikana, mikä olisi valottanut enemmän misoprostolin hajoamista. Tulevaisuudessa olisi siis tarpeen tutkia, miten ilmakehän kosteus vaikuttaa erilaisissa primaaripakkauksissa säilytettyjen misoprostolikapseleiden vesipitoisuuden verrattuna ilman



pakkausta säilytettyihin kapseleihin. Jatkossa tulisi tutkia myös misoprostolin hajoamistuotteiden syntymistä ja määriä kapseleissa säilytyksen aikana.

## LÄHTEET

Abdoh A, Al-Omari MM, Badwan AA, Jaber AM: Amlodipine Besylate–Excipients Interaction in Solid Dosage Form. *Pharm Dev Technol* 9; 15–24, 2004.

Ahmad I, Ahmed S, Anwar Z, Sheraz MA, Sikorski M: Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products. *International Journal of Photoenergy*; 8135608, 2016.

Albini A, Fasani E: *Photochemistry on Drugs: An Overview and Practical Problems*. Kirjassa *Drugs: Photochemistry and Photostability*, 1. painos, s. 1–65. Toim. Albini A, Fasani E, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.

Al-Omari MM, Abdelah MK, Badwan AA, Jaber AM: Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. *J Pharm Biomed Anal* 25; 893–902, 2001.

Anyakora C, Oni Y, Ezedinachi U ym.: Quality medicines in maternal health: Results of oxytocin, misoprostol, magnesium sulfate and calcium gluconate quality audits. *BMC Pregnancy Childbirth* 18;44, 2018.

Awa K, Shinzawa H, Ozaki Y: The Effect of Microcrystalline Cellulose Crystallinity on the Hydrophilic Property of Tablets and the Hydrolysis of Acetylsalicylic Acid as Active Pharmaceutical Ingredient Inside Tablets. *AAPS PharmSciTech* 16; 865–870, 2015.

Bajaj S, Singla D, Sakhuja N: Stability Testing of Pharmaceutical Products. *J Appl Pharm Sci* 2; 129–138, 2012.

Ball MC: Solid-state Hydrolysis of Aspirin. *J Chem Soc Faraday Trans*, 90; 997–1001, 1994.

Berard V, Fiala C, Cameron S, Bombas T, Parachini M, Gemzell-Danielsson K: Instability of Misoprostol Tablets Stored Outside the Blister: A Potential Serious Concern for Clinical Outcome in Medical Abortion. *PloS ONE* 9; e112401, 2014.

Byrn SR, Zografi G, Chen X: *Solid State Properties of Pharmaceutical Materials*. 1. painos, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2017.

Carr SA, Darbyshire-Brown A, Allen C, McCrossen SD, Brett T: Analytical methodology to determine the potency and quality of misoprostol tablets. *Appropriate Healthcare Technologies for Developing Countries*, 7th International Conference, IET Conference Publications 2012.

Carvalho M, Taylor K, Tuleu C: Why do we need hospital pharmacy preparation? *Eur J Hosp Pharm* 19; 467–468, 2012.

Carvalho M: Compounding Practices in Europe: Extemporaneously Compounded Oral Medicines in European Hospital Pharmacies. PhD thesis, UCL School of Pharmacy, Lontoo 2013.

Chen D, Tsay R-J, Lin H-I, Chen H, Chao S-C, Ku H: Stabilization and sustained-release effect of Misoprostol with Methacrylate copolymer. *Int J Pharm* 203; 141–148, 2000.

Chen WL, Guo DW, Shen YY, Guo SR, Ruan KP: Effects of Highly Hygroscopic Excipients on the Hydrolysis of Simvastatin in Tablet at High Relative Humidity. *Indian J Pharm Sci* 74; 527–534, 2012.

Chu KO, Wang CC, Pang CP, Rogers MS: Method to determine stability and recovery of carboprost and misoprostol in infusion preparations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 857; 83–91, 2007.

Collins PW, Pappo R, Dajani EZ: Chemistry and Synthetic Development of Misoprostol. *Digestive Diseases and Sciences* 30; s. 1145–1175, 1985.

De Villiers MM, der Watt JG, Lötter AP: Influence of the cohesive behaviour of small particles on the soli-state photolytic degradation of furosemide. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 19; 383–394, 1993.

Duodecim-lääketietokanta. Haettu internetistä 20.4.2020. [www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi)

EAHP (European Association of Hospital Pharmacists): 2019 EAHP Medicines Shortages Report: Medicines Shortages in European Hospitals. Julkaistu 7.4.2020.

European pharmacopoeia (Ph. Eur). 9<sup>th</sup> Edition. Council of Europe, Strasbourg 2019.

Giron D, Goldbronn C, Mutz M, Pfeiffer S, Piechon P, Schwab P: Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. *J Therm Anal Cal* 68; 453–465, 2002.

Gumieniczek A, Galeza J, Mroczek T, Wojtanowski K, Lipska K, Pietras R: Kinetics and Characterization of Degradation Products of Dihydralazine and Hydrochlorothiazide in Binary Mixture by HPLC-UV, LC-DAD and LC–MS Methods. *Chromatographia* 81; 1147–1162, 2018.

Han WW, Yakatan GJ, Maness DD: Kinetics and Mechanisms of Hydrolysis of 1,4-Benzodiazepines III: Nitrazepam. *J Pharm Sci* 66: 795–798, 1977.

Harmon PA, Yin W, Bowen WE, Tyrrell RJ, Reed RA: Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and Proton Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Trace Level Condensation Products Formed Between Lactose and the Amine-Containing Diuretic Hydrochlorothiazide. *J Pharm Sci* 89; 920–929, 2000.

Heinonen S: Prostaglandiinit. Kirjassa: Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Kustannus Oy Duodecim 3.12.2018. Artikkelin tunnus: lft00363 (032.056). [www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi)

Helin-Tanninen M, Pinto JF: Oral Solids. Kirjassa: Practical pharmaceuticals: an international guideline for the preparation, care and use of medicinal products. 1. painos, s. 52–75. Toim. Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P, Springer International Publishing, 2015.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2), 2003.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

Kahsay G, Song H, Eerdeken F ym.: Development and validation of LC methods for the separation of misoprostol related substances and diastereoisomers. *J Pharm Biomed* 111; 91–99, 2015.

Khedr A, Darwish I: A validated stability-indicating high performance liquid chromatographic assay of amoxicillin. *Bull Pharm Sci, Assiut University* 23; 11–21, 2000.

Kitamura S, Koda S, Miyamae A, Yasuda T, Morimoto Y: Dehydration effect on stability of cefixime trihydrate. *Int Jour Pharm* 59: 217–224, 1990.

Kommanaboyina B, Rhodes CT: Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. *Drug Dev Ind Pharm* 25; 857–868, 1999.

Krasowska H: The hydrolysis of indomethacin in aqueous solutions of polysorbates. *Int J Pharm* 4; 89–97, 1979.

Kruit H, Nuutila M, Rahkonen L: Synnytyksen käynnistäminen, kun raskaus on täysiaikainen. *Suom Lääkäril* 71; 1845–1851, 2016.

Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea. Sairaala-apteekkien ja lääkekeskusten lääkevalmistuksen kootut valmistusmäärät. 2020

Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea: Apteekkien lääkevalmistus. Määräys 6/2011.

Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea: Sairaala-apteekin ja lääkekeskuksen toiminta. Määräys 6/2012.

Lääkehaku. Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea. Haettu internetistä 20.4.2020. [https://www.fimea.fi/laakehaut\\_ja\\_luettelot/laakehaku](https://www.fimea.fi/laakehaut_ja_luettelot/laakehaku)

Li M: *Organic Chemistry of Drug Degradation*. 1. painos, RSC Publishing, Cambridge 2012.

Loftsson T: *Drug stability for pharmaceutical scientists*. 1. painos, Elsevier Academic Press, Amsterdam 2014.

Marshall P: *Product stability and stability testing*. Kirjassa: *Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines*. 5. painos, s. 862–885. Toim. Aulton ME, Taylor K, Elsevier, Edinburgh, 2018.

Matsuda Y, Tatsumi E: Physicochemical characterization of furosemide modifications. *Int J Pharm* 60; 11–26, 1990.

Mehta AC: *Practic research: Strategies for stability studies on hospital pharmaceutical preparations*. *Int J Pharm Pract* 2; 49–52, 1993.

Mehta J, Patidar K, Patel V, Kshatri N, Vyas N: Development & validation of an *in vitro* dissolution method with HPLC analysis for misoprostol in formulated dosage form. *Anal. Methods* 2; 72–75, 2010.

Moilanen E, Nieminen R: Prostanoidien terapeuttinen merkitys. Kirjassa: *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. Kustannus Oy Duodecim 3.12.2018. Artikkelin tunnus: lft00074 (010.038). [www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi)

Murdan S: Packaging. Kirjassa: Aulton's pharmaceutics: the design and manufacture of medicines. 5. painos, s. 820–835. Toim. Aulton ME, Taylor K, Elsevier, Edinburgh, 2018.

Mwesigwa E, Basit AW: An investigation into moisture barrier film coating efficacy and its relevance to drug stability in solid dosage forms. *Int J Pharm* 497; 70–77, 2016.

Narang AS, Desai D, Badawy S: Impact of Excipient Interactions on Solid Dosage Form Stability. *Pharm Res* 29: 2660–2683, 2012.

Narang AS, Rao VM, Raghavan KS: Excipient Compatibility. Kirjassa: Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice. 1. painos, s. 125–145. Toim. Qiu Y, Chen Y, Zhang G, Elsevier Academic Press, Amsterdam 2009.

Pinto MA, Ambrozini B, Ferreira AP, Cavaleiro ÉT: Thermoanalytical studies of carbamazepine: hydration/dehydration, thermal decomposition and solid phase transition. *Braz J Pharm Sci* 50; 877–884, 2014.

Rahkonen L, Heinonen S: Synnytyksen käynnistäminen. Kirjassa: Naistentaudit ja synnytykset. Kustannus Oy Duodecim 1.7.2019. Artikkelin tunnus: njs15400 (054.000). [www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi)

Rajabi-Siahboomi AR, Levina M, Upadhye SB, Teckoe J: Excipient Selection in Oral Solid Dosage Formulations Containing Moisture Sensitive Drugs. Kirjassa Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery. 1. painos, s. 385–421. Toim. Narang AS, Boddu SH, Springer International Publishing, 2015.

Rowe CR, Sheskey PJ, Quinn ME: Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. painos, s. 366–367. Pharmaceutical Press, Lontoo, 2009.

Sadana GS, Ghogare AB: Mechanistic studies on photolytic degradation of nifedipine by use of H-NMR and C-NMR spectroscopy. *Int J Pharm* 70; 195–199, 1991.

Sautou V, Brossard D, Chedru-Legros V ym.: Methodological guidelines for stability studies of hospital pharmaceutical preparations. Part 1: liquid preparations. SFPC (French Society of Clinical Pharmacy), GERPAC (Evaluation and Research Group on Protection in Controlled Atmosphere), 2013.

Smeets O, Santillo M, van Rooji H: Quality Requirements and Analysis. Kirjassa: Practical pharmaceuticals: an international guideline for the preparation, care and use of medicinal products. 1. painos, s. 707–729. Toim. Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P, Springer International Publishing, 2015.

Suleiman MS, Abdulhameed ME, Najib NM, Muti HY: Effect of ultraviolet radiation on the stability of diltiazem. *Int J Pharm* 50; 71–73, 1989.

Tamat SR, Moore DE: Photolytic Decomposition of hydrochlorothiazide. *J Pharm Sci* 72; 180–183, 1983.

Tishler F, Sinsheimer JE, Goyan JE: Mechanism of Phenobarbital Degradation. . *J Pharm Sci* 51; 214–216, 1962.

Touw D, Vigneron J: Stability. Kirjassa: Practical pharmaceuticals: an international guideline for the preparation, care and use of medicinal products. 1. painos, s. 435–461. Toim. Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P, Springer International Publishing, 2015.

Uwai K, Tani M, Ohtake Y ym.: Photodegradation products of propranolol: The structures and pharmacological studies. *Life Sciences* 78: 357–365, 2005.

van Heugten AJP, de Boer W, de Vries WS, Pieters RJ, Vromans H: Topically used corticosteroids: What is the big picture of drug product degradation? *Eur J Pharm Sci* 117; 1–7, 2018.

Williams MC, Tsibris JCM, Davis G, Baiano J, O'Brien WF: Dose variation that is associated with approximated one-quarter tablet doses of misoprostol. *Am J Obstet Gynecol* 187; 615–619, 2002.

Yang Q, Yuan F, Xu L ym: An Update of Moisture Barrier Coating for Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 11 (9), 436, 2019.

Yoshioka S, Stella VJ: Stability of Drugs and Dosage Forms. Kluwer Academic Publishers, New York, USA 2002.

Zhao Z, Wang Q, Tsai EW, Qin XZ, Ip D: Identification of losartan degradates in stressed tablets by LC–MS and LC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal* 20; 129–136, 1999.

Zhou D, Porter WR, Zhang GGZ: Drug Stability and Degradation Studies. Kirjassa: Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice. 1. painos, s. 87–124. Toim. Qiu Y, Chen Y, Zhang G, Elsevier Academic Press, Amsterdam 2009.