

*Arh.farm 2009;59: 294 – 304*

*Stručni rad/Professional paper*

## **Primena metode tečne hromatografije u ispitivanju stabilnosti farmaceutskih supstanci i farmaceutskih preparata**

**Mira Zečević<sup>1\*</sup>, Biljana Jocić<sup>1</sup>, Vesna Kuntić<sup>2</sup>,  
Zorica Vujić<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Institut za analitiku lekova, <sup>2</sup>Institut za fizičku hemiju,

<sup>3</sup>Institut za farmaceutsku hemiju, Farmaceutski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11152 Beograd

---

### **Kratak sadržaj**

Praćenje stabilnosti nekog leka je postupak kojim se određenom analitičkom metodom precizno mogu identifikovati i odrediti komponente nastale kao rezultat degradacije aktivne supstance kako u farmaceutskoj supstanci tako i u farmaceutskom proizvodu. Prema smernicama Agencije za hranu i lekove (eng. Food and drug administration, FDA), metoda za praćenje stabilnosti se definiše kao metoda farmaceutske analize kojom se precizno može kvantifikovati aktivna komponenta, u prisustvu degradacionih proizvoda, nečistoća koje potiču iz procesa sinteze, ekscipijensa ili drugih potencijalnih nečistoća. U te svrhe, danas se najčešće primenjuje metoda tečne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. High pressure liquid chromatography - HPLC, u daljem tekstu tečna hromatografija). Razvoj metode za praćenje stabilnosti podrazumeva nekoliko faza. U prvoj fazi se izvode studije forsirane degradacije sa čistom aktivnom supstancom, nakon toga se vrši ispitivanje interakcija aktivne supstance sa komponentama ekscipijensa farmaceutskog preparata, optimizacija hromatografskih uslova i validacija metode.

**Ključne reči:** metoda za praćenje stabilnosti, tečna hromatografija, studije forsirane degradacije

---

\*e-mail: [mzecevic@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:mzecevic@pharmacy.bg.ac.rs)

## **Stabilnost farmaceutskih supstanci i farmaceutskih preparata**

Mnoge farmaceutske supstance i farmaceutski preparati su podložni uticaju spoljašnjih faktora koji mogu dovesti do različitih fizičko-hemijskih i mikrobioloških promena. Fizička i hemijska degradacija aktivnih supstanci dovodi do promena njihovih farmakoloških osobina, što dalje rezultuje smanjenjem terapijske efikasnosti i pojavom sporednih toksičnih efekata. Svetska zdravstvena organizacija, u cilju zaštite zdravlja pacijenta, postavila je tri osnovna uslova prilikom puštanja leka u promet, a to su da je potrebno obezbediti kvalitet, efikasnost i bezbednost. Neophodno je da se ovi zahtevi održe dokle god je lek u upotrebi, zbog čega su potrebni podaci o njegovoj stabilnosti (1). Stabilnost farmaceutske supstance i preparata predstavlja sposobnost očuvanja identiteta, sadržaja, kvaliteta i čistoće predviđenih zahtevima specifikacije (2). Kvalitet i stabilnost leka moraju biti očuvani pod različitim uslovima tokom proizvodnje, transporta, čuvanja u skladištima, bolnicama, apotekama, kao i u kućnim uslovima. Iz tog razloga, veoma je važno poznavanje faktora koji mogu uticati na stabilnost leka (1).

Prvi korak u ispitivanju stabilnosti farmaceutskih preparata odnosi se na aktivnu supstancu i prvenstveno utvrđivanje različitih fizičko-hemijskih mehanizama nastanka degradacionih proizvoda koji mogu dovesti do pojave toksičnih efekata i smanjenja terapijskih i bezbednosnih osobina preparata.

### **Fizičko-hemijska stabilnost aktivnih supstanci i preparata**

Usled hemijskih promena u aktivnoj supstanci najčešće dolazi do gubitka sadržaja, što dalje rezultuje smanjenjem aktivnosti leka. Identifikacija proizvoda koji nastaju hemijskom degradacijom je od velikog značaja i omogućuje bolje razumevanje mehanizama tih reakcija. Degradacijom nekog leka mogu nastati toksične supstance, pa je zato veoma važno ne samo odrediti gubitak sadržaja sa vremenom, već identifikovati i tačno odrediti degradacione proizvode. Prvi znaci da je došlo do degradacije nekog leka mogu biti promene izgleda i organoleptičkih osobina leka. Promena mirisa ili ukusa je najčešće prvi znak degradacije, pa se već na osnovu toga može posumnjati u njegovu ispravnost.

Iako su lekovi stabilni u okviru date formulacije, neophodno je pokazati njihovu stabilnost pri pH uslovima digestivnog trakta. Mnogi lekovi su stabilni pri neutralnim pH vrednostima u tankom crevu, a nestabilni pri kiselim pH vrednostima u želucu.

Kako je hemijska struktura lekova različita, različiti su i degradacioni putevi (mehanizmi) kojima se smanjuje ili u potpunosti gubi efikasnost leka: hidroliza, dehidracija, izomerizacija i racemizacija, eliminacija, oksidacija, fotodegradacija, razne interakcije sa ekscipijensom ili drugim aktivnim

supstancama. Iz tog razloga je od velike važnosti predvideti hemijsku nestabilnost supstance i puteve degradacije na osnovu njene molekulske strukture. Ovakva saznanja su neophodna u planiranju studija stabilnosti u najranijim fazama razvoja leka, u razvoju odgovarajuće formulacije lekova kako bi se hemijska degradacija svela na minimum. Dostupna literatura ne daje dovoljno željenih informacija, pa se u novije vreme formiraju različite ekspertske grupe koje se bave problemom potencijalnih nečistoća i stabilnosti lekova.

Osim hemijske, od značaja su i različiti mehanizmi fizičke degradacije. Najčešće fizičke promene u strukturi aktivnih supstanci su: kristalizacija amorfne oblika leka, polimorfizam (pojava da supstanca može da kristališe u više kristalnih oblika), prelaz jednog kristalnog oblika u drugi, formiranje i rast kristala, adsorpcija i apsorpcija vlage itd, što direktno utiče na farmakoterapijski efekat leka (1).

Farmaceutski preparati predstavljaju kompleksne sisteme, sastavljene ne samo od aktivnih supstanci, već i od različitih pomoćnih materija (ekscipijensi). Iako ekscipijensi nemaju terapijski efekat, mogu nepovoljno uticati na fizičko-hemijske osobine preparata tako što stupaju u interakciju sa aktivnom supstancom ili nastaju promene u okviru samog ekscipijensa. Studije koje se izvode u fazi preformulacije leka, podrazumevaju pravilan izbor odgovarajućeg oblika aktivne supstance i odgovarajućeg ekscipijensa, čime se već u ranim fazama razvoja preparata olakšava dalji proces dizajna (oblikovanja) i proizvodnje leka.

Postoje brojne metode farmaceutske analize za ispitivanje stabilnosti aktivnih supstanci i farmaceutskih preparata, pri čemu se posebno izdvajaju validirane hromatografske tehnike. HPLC i gasna hromatografija (eng. Gas chromatography - GC) zajedno sa tehnički unapređenim detektorima, postale su nezamenjive u određivanju, ne samo gubitka sadržaja aktivne supstance usled degradacije, već i određivanju nastalih degradacionih proizvoda (1).

## **Metoda za praćenje stabilnosti**

Metoda za praćenje stabilnosti služi za selektivno i tačno određivanje aktivne supstance, njenih degradacionih proizvoda i drugih komponenata koje su od interesa. Metoda za praćenje stabilnosti se definiše kao metoda farmaceutske analize kojom se precizno može kvantifikovati aktivna komponenta u prisustvu degradacionih proizvoda, nečistoća koje potiču iz procesa sinteze, ekscipijenasa ili drugih potencijalnih nečistoća. Takođe, metodom za praćenje stabilnosti se može smatrati i metoda kojom se precizno kvantifikuju degradacioni proizvodi. Prema tome, ova metoda mora biti

postavljena tako da omogući sagledavanje svih faktora koji mogu uticati na stabilnost proizvoda (temperatura čuvanja, vlaga, svetlost) i u skladu sa tim, mora se ostvariti odabir odgovarajućeg primarnog i sekundarnog pakovanja koja će uspešno zaštititi proizvod od tih uticaja. Metode za praćenje stabilnosti moraju biti osetljive, selektivne i specifične.

U postupku razvoja ove metode potrebno je uključiti studije forsirane degradacije i to u ranim fazama razvoja metode, uz kvalifikaciju najznačajnijih degradacionih proizvoda. Tačnije, forsirana degradacija treba da bude prvi korak u postupku razvoja metode, jer se na taj način može paralelno vršiti razvoj metode i identifikacija primarnih degradacionih proizvoda (3).

### **Primena tačne hromatografije za praćenje stabilnosti**

U savremenoj farmaceutskoj analizi se zbog identifikacije novonastalih degradacionih proizvoda najčešće koriste kombinovane hromatografske metode (LC-MS, LC-MS-MS, LC-NMR, GC-MS), a u manjoj meri i kapilarna elektroforeza (CE-MS). Smatra se da je danas dominantna primena HPLC tehnike, pošto se 85 – 90 % do sada objavljenih literaturnih podataka upravo odnosi na ovu tehniku (6-20).

Metoda za praćenje stabilnosti uz primenu tačne hromatografije je validirana, kvantitativna metoda za ispitivanje stabilnosti farmaceutskih supstanci i farmaceutskih proizvoda. U okviru tog ispitivanja, prate se promene hemijskih, fizičkih ili mikrobioloških parametara koji određuju kvalitet proizvoda, a koji se tokom vremena mogu menjati u zavisnosti od uslova čuvanja, transporta i sl. (FDA, Guidance for Industry, Stability Testing of Drug Substances and Drug Products) (3). Razvoj metode za praćenje stabilnosti uz primenu tačne hromatografije podrazumeva prvo izvođenje studije forsirane degradacije, zatim optimizaciju hromatografskih uslova i validaciju metode.

### **Studije forsirane degradacije**

Studije forsirane degradacije se izvode kao sastavni deo razvoja leka. Budući da se izvode pod drastičnijim eksperimentalnim uslovima, njihovim sprovođenjem može se ustanoviti suštinska stabilnost lekova i predvideti svi potencijalni putevi degradacije. Ove studije se izvode sa čistim supstancama i sa farmaceutskim preparatima, pa se tako može ispitati stabilnost leka i u prisustvu pomoćnih materija. Izvođenje studije forsirane degradacije u što ranijoj fazi razvoja leka omogućuje poboljšanje procesa sinteze lekovite supstance i formulacije lekovitog proizvoda.

Prema smernicama Međunarodne konferencije za harmonizaciju i mnogim revijalnim radovima posvećenim studijama stabilnosti novih lekova i

farmaceutskih oblika, supstanca se testira na: baznu, kiselu i pH neutralnu hidrolizu, oksidativni stres na sobnoj temperaturi, uticaj termičke degradacije zagrevanjem uzoraka na 70° C i uticaj sunčeve svetlosti na supstancu u čvrstom stanju i nakon rastvaranja. Cilj studija forsirane degradacije je stvaranje tipičnih degradacionih proizvoda, koji se očekuju u studijama dugoročnog ispitivanja stabilnosti i to u meri koja će omogućiti njihovu identifikaciju (5 – 20 %). Degradacija ispod 5 % se ne uzima u razmatranje zbog toga što nastaju jako male količine degradacionih proizvoda pri stres uslovima, pa se smatra da pri preporučenim uslovima čuvanja isti ne bi nastali. Sa druge strane, degradacija lekovite supstance ili u farmaceutskom preparatu preko 20% je beskorisna, jer sa ovim procentom degradacije se može pouzdano i potpuno definisati degradacioni profil u skladu sa očekivanim degradacionim proizvodima pri preporučenim uslovima čuvanja.

### **Razvoj metode za praćenje stabilnosti uz primenu tečne hromatografije**

U postupku razvoja metode za praćenje stabilnosti uz primenu tečne hromatografije, mora se obratiti pažnja na:

- izgled pikova komponenata analizirane smeše,
- vrednosti faktora simetrije, rezolucije, retencionih vremena i relativnih retencionih vremena,
- izgled bazne linije,
- čistoću glavnog pika.

U okviru analize čistoće glavnog pika ispituje se mogućnost koeluiranja nekog od degradacionih proizvoda sa glavnom komponentom, usled čega njihov pik može biti prekriven pikom aktivne supstance. Ova analiza obavlja se izračunavanjem *peak purity factor*-a, koji se u idealnom slučaju nalazi u opsegu vrednosti od 990 - 1000. Izračunavanje ovog faktora moguće je ukoliko se za detekciju koristi *diode-array* detektor, pomoću koga se mogu analizirati UV spektri komponenata analizirane smeše, pod uslovom da ispoljavaju različita svojstva u UV oblasti spektra.

U slučaju da sva jedinjenja ne apsorbuju u UV oblasti (nemaju hromofore), ili ako su hromofore veoma slične, kao detektor se koristi maseni spektrometar.

U oba slučaja može se odrediti balans mase, kojim se izračunava da li je pad sadržaja aktivne supstance praćen odgovarajućim porastom nivoa degradacionih proizvoda i da li je suma sadržaja aktivne supstance i nivoa degradacionih proizvoda bliska (100 %) početnom (inicijalnom) sadržaju aktivne supstance. Naime, prilikom razvoja metode za praćenje stabilnosti, u

postupku određivanja balansa mase, treba obratiti pažnju na činjenicu da suma sadržaja aktivne supstance i degradacionih proizvoda, koji nastaju nakon forsirane degradacije, nikada ne može biti jednaka početnom sadržaju aktivne supstance zbog sledećih razloga:

- degradacioni proizvod ne sadrži hromoforu
- postoji razlika u apsorptivnosti između degradacionih proizvoda i aktivne supstance
- gubitak degradacionog proizvoda koji nastaje usled njihove isparljivosti
- slaba rastvorljivost supstanci u rastvaraču
- eluacioni problemi (ko-eluiranje, vreme trajanja analize – preporučeno 2,5 puta duže trajanje analize u odnosu na retenciono vreme ispitivane supstance...)
- greške u određivanju aktivne supstance (potrebno korišćenje internog standarda...)

Kako bi se razvila odgovarajuća metoda za praćenje stabilnosti, neophodno je dobro proučiti hemijsku strukturu aktivne supstance čija se stabilnost ispituje. Pri tome naročita pažnja treba da se posveti funkcionalnim grupama, koje podležu hidrolizi (amidi, estri, laktami, laktoni), oksidaciji (tioli, tioetri), i jedinjenjima kao što su olefini, aril halogeni derivati, jedinjenja sa aromatičnom nitro grupom i N-oksidi koji podležu fotorazgradnji. Pre nego što se pristupi razvoju neke metode za farmaceutsku analizu, potrebno je poznavati osnovne fizičkohemijske parametre, kao što su pKa, logP, rastvorljivost, apsorpcija na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije i slično.

Postoje dva osnovna degradaciona puta aktivne supstance u farmaceutskom preparatu:

- suštinska degradacija aktivnih supstanci bez kovalentnog vezivanja ili kovalentnih reakcija sa ekscipijensima. To su najčešće reakcije hidrolize i oksidacije
- kovalentne reakcije aktivne supstance sa ekscipijensima

Osnovne smernice za sprovođenje studija stabilnosti, koje su date u ICH uputstvu "Stability testing of new drug substance and products Q1A(R2)", International Conference on Harmonization, Ženeva, (2003), daju neka uputstva za izvođenje studija forsirane degradacije (3). Ove studije imaju za cilj definisanje puteva degradacije aktivne supstance i prisutnih nečistoća, što vodi sagledavanju osetljivosti, odnosno stabilnosti samog molekula aktivne supstance. Ovim studijama se definišu degradacioni proizvodi aktivnih supstanci, ekscipijensa i nečistoće (iz aktivnih supstanci i ekscipijensa) prisutne u gotovom proizvodu.

Prema ICH smernicama studije forsirane degradacije treba da obuhvate sledeće reakcije:

- hidroliza (kisela ili bazna)
- fotoliza / fotodegradacija
- oksidacija
- temperatura / toplotna degradacija

Na ovaj način se ispituje ponašanje aktivne supstance u ekstremnim uslovima, što treba da obuhvati sledeće uslove:

- kisela hidroliza - HCl (0,1 M, 2 M, 5 M) sobna temperatura / povišena temperatura
- bazna hidroliza - NaOH (0,1 M, 2 M, 5 M) sobna temperatura / povišena temperatura
- fotodegradacija – uslovi za izvođenje studija fotodegradacije dati su u ICH smernici „Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B”, International Conference on Harmonization, Ženeva, (1996) (4).
- oksidacija - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 – 30 %), sobna temperatura / povišena temperatura
- temperatura – potrebno je postepeno povećavati temperaturu u koracima od po 10 °C u odnosu na temperaturu ubrzanih studija stabilnosti (50 °C, 60 °C)

U toku pripreme rastvora za izvođenje studije forsirane degradacije potrebno je uvek rastvor uzorka pripremiti u većoj koncentraciji. Ispitivanja se izvode sa ispitivanom supstancom bez i nakon rastvaranja. Ispitivanja stabilnosti supstance nakon rastvaranja su testiranja supstance na hidrolizu i oksidaciju, dok su ispitivanja stabilnosti supstance bez rastvaranja testiranja na foto i termičku degradaciju. Stabilnost supstance nakon rastvaranja ispituje se mešanjem određene zapremine rastvora uzorka sa određenom zapreminom stres reagensa. Za ispitivanje stabilnosti supstance bez rastvaranja, praškasta supstanca se u tankom sloju npr. u Petrijevoj šolji stavi u sušnicu ili pod izvor zračenja predviđeno vreme. Po isteku tog vremena, prašak se iskoristi za pripremanje rastvora postupkom sličnim kao i za ispitivanje stabilnosti supstance nakon rastvaranja.

Za ispitivanje svakog stres uslova potrebno je pripremiti kontrolne uzorke. Prvi kontrolni uzorak je rastvor supstance bez stres agensa; drugi je tzv. *zero time* uzorak koji sadrži rastvor supstance sa dodatim stres agensom, a analizira se odmah pošto je napravljen; treći je tzv. slepa proba (blanko uzorak) koji sadrži samo stres agens koji je stajao kao što je prethodno opisano za

odgovarajući test uzorak sa supstancom i četvrti je uzorak supstance izložen stres uslovima kao što je prethodno opisano (4-20).

### **Validacija metode za praćenje stabilnosti uz primenu tečne hromatografije**

U validaciji metode za praćenje stabilnosti postoje dve faze. Prva faza se definiše pri ispitivanju stabilnosti aktivne supstance, na osnovu saznanja o mehanizmima razgradnje supstance. Osnovni zadatak na ovom nivou je postavljanje odgovarajućih uslova za specifičnost/selektivnost, a nakon toga za tačnost, preciznost, linearnost, opseg ispitivanja, robusnost i odgovarajuće limite (limit detekcije i limit kvantifikacije). U drugoj fazi validirana metoda za praćenje stabilnosti se primenjuje na čitavu formulaciju lekovitog preparata, uzimajući u obzir uticaj svih ekscipijenasa. U ovoj fazi vrši se revalidacija parametara specifičnost/selektivnost, tačnost i preciznost (6).

### **Zaključak**

Praćenje stabilnosti farmaceutskih supstanci i farmaceutskih preparata je jedno od najvažnijih ispitivanja u toku razvoja formulacije farmaceutskog proizvoda kao i važan deo ispitivanja i kontrole kvaliteta lekova. U ovoj vrsti ispitivanja posebno je značajna upotreba metode tečne hromatografije pod visokim pritiskom koja se ovoga puta razvija u nekoliko pomenutih faza kao tzv. *Stability indicating method*, tj. Metoda za praćenje stabilnosti lekova. Za pouzdano praćenje stabilnosti i identifikaciju svake potencijalne nečistoće koja ima apsorpcione osobine u UV oblasti neophodna je primena posebne vrste detektora, *diode-array* detektora ili masenog spektrometra.



## Literatura

1. Yoshioka S, Stella V. *Stability of Drugs and Dosage Forms*, Springer, New York, 2001.
2. Guideline for submitting Documentation for the stability of Human drugs and Biologics, Centre for Drugs and Biologics, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, 2001.
3. International Conference on Harmonization, topic Q1A (R2), Stability testing on new drug substances and products, Ženeva, 2003.
4. International Conference on Harmonization, topic Q1B, Photostability testing of new drug substances and products, Ženeva, 1996.
5. Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, Tsuda Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 29-37.
6. Baksi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 28: 1011-1040.
7. Bhardwaj SP, Singh S, Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 46: 113-120.
8. Dutta AK, Avery BA, Wyandt CM. Development and validation of a stability-indicating reversed-phase high performance liquid chromatography method for NPC 1161C, a novel 8-aminoquinoline anti-malarial drug. *J Chromatogr A* 2006; 1100: 35-45.
9. Pathare DB, Jadhan AS, Shingare MS, A validated stability indicating LC method for oxcarbazepine. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 1825-1830.
10. Kumar V, Bhutani H, Singh S. ICH guidance in practice: Validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of ampicillin and cloxacillin in combination drug products. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 769-773.
11. Dunge A, Sharda N, Singh B, Sing S. Validated specific HPLC method for determination of zidovudine during stability studies. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37: 1109-1114.
12. Xu X, Bartlett MG, Stewart JT. Determination of degradation products of sumatriptan succinate using LC-MS and LC-MS-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 26: 367-377.
13. Bansal G, Singh M, Jindal KC. Forced degradation study on gliclazide and application of validated stability-indicating HPLC-UV method in stability testing of gliclazide tablets. *Chromatographia* 2007; 66: 751-755.
14. Singh S, Singh B, Bahuguna R, Wadhwa L, Saxena R. Stress degradation studies on ezetimibe and development of a validated stability-indicating HPLC assay. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 41: 1037-1040.

15. Burana-osot J, Ungboriboonpisal S, Sriphong L. A stability-indicating HPLC method for medroxyprogesterone acetate in bulk drug and injection formulation. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40: 1068–1072.
16. Subba Rao DV, Surendranath KV, Radhakrishnanand P, Suryanarayana MV, Raghuram P. A Stability Indicating LC Method for Vardenafil HCl. *Chromatographia* 2008; 68: 829–835.
17. Bedse G, Kumar V, Singh S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC–MS/TOF and MS<sup>n</sup>. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 49: 55–63.
18. Bansal G, Singh M, Jindal KC, Singh S. LC–UV–PDA and LC–MS studies to characterize degradation products of glimepiride. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 788–795.
19. Chen Q, Zielinski D, Chen J, Koski A, Werst D, Nowak S. A validated, stability-indicating HPLC method for the determination of dexamethasone related substances on dexamethasone-coated drug-eluting stents. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 732–738.
20. Saravanan G, Ravikumar M, Jadhav MJ, Suryanarayana MV, Someswararao N, Acharyulu PVR. A stability-indicating LC assay and degradation behavior of temozolomide drug substances. *Chromatographia* 2007; 66: 291–294.

# **Stability – indicating method based on liquid chromatography for investigation of pharmaceutical substances and pharmaceutical preparations**

**Mira Zečević<sup>1\*</sup>, Biljana Jocić<sup>1</sup>, Vesna Kuntić<sup>2</sup>,  
Zorica Vujić<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Institute of drug analysis, <sup>2</sup>Institute of physical chemistry,  
<sup>3</sup>Institute of pharmaceutical chemistry, Faculty of Pharmacy,  
University in Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11152 Belgrade

---

## **Summary**

The stability - indicating method is an analytical procedure used to detect a decrease in the amount of an active pharmaceutical ingredient present due to degradation. According to FDA guidelines, stability - indicating method is defined as a validated analytical procedure that accurately and precisely measures active ingredients free from potential interferences like degradation products, process impurities, excipient or other potential impurities. During stability studies, liquid chromatography is used routinely to separate and determine the analytes of interest. For implementing the stability - indicating method, several steps are needed. An active pharmaceutical substance is firstly subjected to the forced degradation studies followed with the investigations of its interactions with the excipient from the pharmaceutical preparation, the optimization of chromatographic conditions and the method validation.

**Key words:** Stability - indicating method, liquid chromatography,  
forced degradation studies

---

\*e-mail: mzecevic@pharmacy.bg.ac.rs