

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



Lucie Pražáková

Využití elektrochemické oxidace v degračních studiích abacaviru  
The use of electrochemical oxidation in abacavir degradation studies

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Anna Kubičková, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Anně Kubíčkové, Ph.D. za její skvělý přístup, trpělivost, čas a odborné vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za rady, čas a výpomoc s bakalářskou prací a RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za výpomoc s bakalářskou prací. Také bych chtěla poděkovat své rodině a spolužačkám z mého oboru za podporu ve studiu.

## Abstrakt

V rámci této bakalářské práce byla studována elektrochemická degradace látky abacavir. Abacavir je účinná látka léku na infekci virem lidské imunodeficiency (HIV). Podařilo se vyvinout elektrochemickou metodu oxidace abacaviru, včetně jeho excipientů vyskytujících se v tabletě Ziagen podávané pacientům. Abacavir o koncentraci  $0,15 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  byl elektrochemicky oxidován za stálého potenciálu (1,15V) na speciálně sestavené aparatuře v tříelektrodovém zapojení. Následně bylo dříve optimalizovanou chromatografickou metodou stanoveno množství a druh vznikajících produktů. Oxidace probíhala poměrně rychle. Po 7 minutách bylo zoxidováno asi 20 % abacaviru. Vznikly dva oxidační produkty, jejichž struktury byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova: abacavir, elektrochemická oxidace, degradace, UHPLC, HIV

## Abstract

The focus of this bachelor's thesis is the electrochemical degradation of abacavir. Abacavir is the active pharmaceutical ingredient of the medicine for human immunodeficiency virus (HIV). It was developed an electrochemical method for the oxidation of abacavir, including its excipients found in Ziagen tablets given to patients. Abacavir at a concentration of  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  was oxidized electrochemically at a constant potential (1,15V) on a specially assembled three-electrode apparatus. Subsequently, the quantity and type of the resulting products were analysed by a previously optimized chromatography method. The oxidation was relatively fast. After 7 minutes about 20 % of abacavir was oxidized. Two oxidation products were formed and their structures were confirmed by mass spectrometry.

Key words: abacavir, electrochemical oxidation, degradation, UHPLC, HIV

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
1. Teoretický úvod.....	8
1.1 Cíl práce.....	8
1.2 Degradční studie .....	8
1.3 Abacavir.....	10
1.3 HIV .....	12
1.4 Metody oxidace abacaviru.....	13
1.4.1 Vliv pomocných látek na oxidaci.....	19
1.5 Elektrolýza a coulometrie .....	20
2. Experimentální část.....	21
2.1 Použité chemikálie a přístroje.....	21
2.1.1 Chemikálie .....	21
2.1.2 Přístroje .....	21
2.2 Příprava zásobních roztoků .....	22
2.3 Podmínky elektrochemických experimentů .....	23
2.4 Cyklická voltametrie.....	25
2.5 Coulometrická titrace hydrochinonu .....	25
2.6 Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	26
3. Výsledky a diskuze.....	27
3.1 Kontrolní měření hydrochinonu coulometrickou titrací za konstantního proudu .....	27
3.1.1 Oxidace hydrochinonu .....	28
3.2 Konduktometrie .....	29
3.3 Cyklická voltametrie.....	30
3.4.1 Elektrochemická oxidace abacaviru .....	31
3.4.2 Opakovatelnost elektrochemické oxidace abacaviru.....	33
3.4.3 Oxidace abacaviru s excipienty vyskytujícími se v tabletě .....	35
3.5 Hmotnostní spektrometrie .....	37
4. Závěr.....	40

**Použité zkratky:**

AIBN - azobisisobutyronitril

AIDS - syndrom získaného selhání imunity (z ang. acquired immune deficiency syndrome)

API – aktivní farmaceutická látka (z ang. active pharmaceutical ingredient)

DNA - deoxyribonukleová kyselina

HIV - infekce virem lidské imunodeficiency (z ang. human immunodeficiency virus)

ICH - Mezinárodní konference o harmonizaci (z ang. International conference on armonisation)

LC - kapalinová chromatografie (z ang. liquid chromatography)

LC-MS/MS - kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z ang. liquid chromatography–mass spektrometry/mass spectrometry)

MS - hmotnostní spektroskopie (s ang. mass spectrometry)

RNA - ribonukleová kyselina

UHPLC - ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (z ang. ultra-high performance liquid chromatography)

**Použité symboly:**

$F$  – Faradayova konstanta ( $96\,458,31\text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

$I$  – elektrický proud [A]

$I_0$  - počáteční proud [A]

$k$  – koeficient přenosu hmoty

$M$  – molární hmotnost stanovované látky [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

$Q$  – elektrický náboj [C]

$\text{p}K_{\text{a}}$  - záporný dekadický logaritmus disociační konstanty pro kyseliny při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

$RR_t$  – relativní retenční čas [min]

$t$  – čas [s]

$z$  – počet vyměňovaných elektronů

$\varphi$  - koncentrace eluční složky [%]

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Cíl práce

Cílem práce bylo vyvinout spolehlivou elektrochemickou metodu, vhodnou pro studium oxidační degradace účinné látky abacaviru, a poté identifikovat vzniklé oxidační produkty. Elektrochemická metoda musí být reprodukovatelná, rychlá a nenáročná na spotřebu abacaviru.

## 1.2 Degradáční studie

Stabilita léčiva je kritickým parametrem, který může ovlivnit čistotu, účinnost a bezpečnost léku. Změny ve stabilitě léčiva mohou ohrozit bezpečnost pacienta vytvářením toxických produktů degradace. Proto je nezbytné znát chování léčivé látky za různých podmínek prostředí.<sup>1</sup> Studie nucené degradace poskytují znalosti o možných degradačních cestách a degradačních produktech aktivních složek a pomáhají objasnit strukturu degradantů.<sup>2</sup> Podle pokynů Mezinárodní konference o harmonizaci (ICH) je nezbytné organizovat studie nucené degradace a je nařízeno provádět nucenou degradaci nových léčivých přípravků. Díky degradačním studiím je možné odhalit degradační dráhy farmaceuticky aktivních molekul léčiva a tím lze odhadnout stabilitu léčiva.<sup>3</sup> V typické studii jsou stresovými podmínkami světlo, teplo, vlhkost, hydrolýza (vliv kyseliny/báze) nebo oxidace, případně i kombinace těchto faktorů. Obecná doporučení pro oxidaci aktivní farmaceutické látky (API) jsou uvedena v Tabulka 1 1. Aby bylo dosaženo optimálních výsledků, musí být cílová degradace v rozmezí 5 % až 20 %.<sup>4</sup> Vyšší stupeň degradace bude mimo rozsah požadavků na stabilitu produktu a proto neadekvátní. Obvykle se stresové studie provádějí na pevné látce nebo roztoku. Studium kinetické degradace by mělo být vyzkoušeno za různých stresových podmínek a v různých časových intervalech.



**Tabulka 1:** Obecná experimentální oxidační degradace API (zdroj: Alsante a spol. <sup>5</sup>)

Iniciátor	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , AIBN, iniciátory rozpustné ve vodě
Koncentrace API	0,1 - 20 mg·cm <sup>-3</sup>
Koncentrace iniciátoru	20 mol% koncentrace API
Teplota	okolí - 60 ° C
Doba trvání	5 – 20% degradace nebo maximálně 14 dnů

Peroxid vodíku se široce používá pro oxidaci léčivých látek ve studiích nucené degradace, ale lze použít i jiná oxidační činidla, jako jsou kovové ionty, kyslík a iniciátory radikálů (např. AIBN).<sup>2</sup> Výběr oxidačního činidla, jeho koncentrace a podmínky závisí na léčivé látce. Uvádí se, že vystavení roztoků 0,1–3% peroxidu vodíku při neutrálním pH a pokojové teplotě po dobu sedmi dnů nebo až do maximální 20 % degradace by mohlo potenciálně generovat relevantní degradační produkty. Oxidační degradace léčivé látky zahrnuje mechanismus přenosu elektronů za vzniku reaktivních aniontů a kationtů.

Studie nucené degradace mohou vytvářet komplexní směsi degradačních produktů, ale vývoj metody by měl brát v úvahu pouze ty významné.<sup>5</sup> Tabulka 2 popisuje pokyny, které mohou být obecně použity. Účinek degradačního činidla ve vzorku může být považován za nevýznamný, pokud degradace nepřekročí některý z popsaných prahů.

**Tabulka 2:** Pokyny pro posuzování významnosti degradačních produktů pro studii nucené degradace (zdroj: Alsante a spol. <sup>5</sup>)

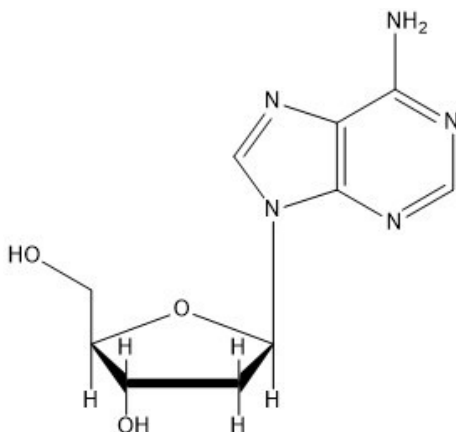
	API	Produkt degradace
% celkové degradace	25%	10% z celkové degradace
% největší degradující látky		25% z 10% celkové degradace

Většina farmaceutických společností provádí nucenou oxidační degradaci účinné látky pomocí peroxidu vodíku.<sup>6</sup> Oxidace probíhá nejčastěji za použití 1-3 % peroxidu vodíku při teplotě 30 ° C a době trvání studie 7 dnů.

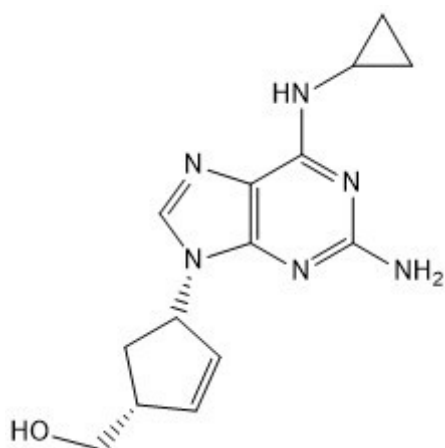
### 1.3 Abacavir

Abacavir je účinná látka léku Ziagen, který se řadí mezi antiretrovirotické léky. Princip fungování abacaviru je založen na podobnosti jeho struktury s 2'-deoxyguanosinovým nukleosidu (viz obrázek 1), který kompetitivně inhibuje HIV reversní transkriptázu a ukončuje prodlužování DNA řetězce. Tím dochází k inhibici replikace HIV viru v lidském těle.<sup>7</sup> Používá se v kombinaci s dalšími léky na snížení virové zátěže u pacientů s HIV a proti propuknutí nevléčitelné poslední fáze AIDS. Tím, že je abacavir analog guanosinu, mechanismus spočívá v kompetici tohoto guanosinu s virovými molekulami. Následně je začleněn do virové DNA a inhibuje virovou transkripci a HIV reverzní transkriptázu, aby se virus nemohl dále množit a šířit.<sup>8</sup> Antiretrovirotika nemohou HIV vyléčit, mohou však snížit riziko progresse nemoci na AIDS a snížit riziko přenosu téměř na minimum.<sup>9</sup>

Struktura abacaviru je znázorněna na obrázku 2. Obecné chemické vlastnosti abacaviru jsou popsány v tabulce 3.



**Obrázek 1:** Struktura 2'-deoxyguanosin nukleosidu (převzato a upraveno z Beneš a kol.<sup>10</sup>)



**Obrázek 2:** Struktura abacaviru (převzato a upraveno z Beneš a kol. <sup>10)</sup>)

**Tabulka 3:** Vlastnosti abacaviru (zdroj: Drugbank <sup>11)</sup>)

Molekulový vzorec	Molekulová hmotnost	CAS	Barva	Rozpustnost ve vodě při 25°C	p <i>K</i> <sub>a</sub>
C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O	286.332 g·mol <sup>-1</sup>	136470-78-5	bílá	77 mg·cm <sup>-3</sup> (síran)	5,01

### 1.3 HIV

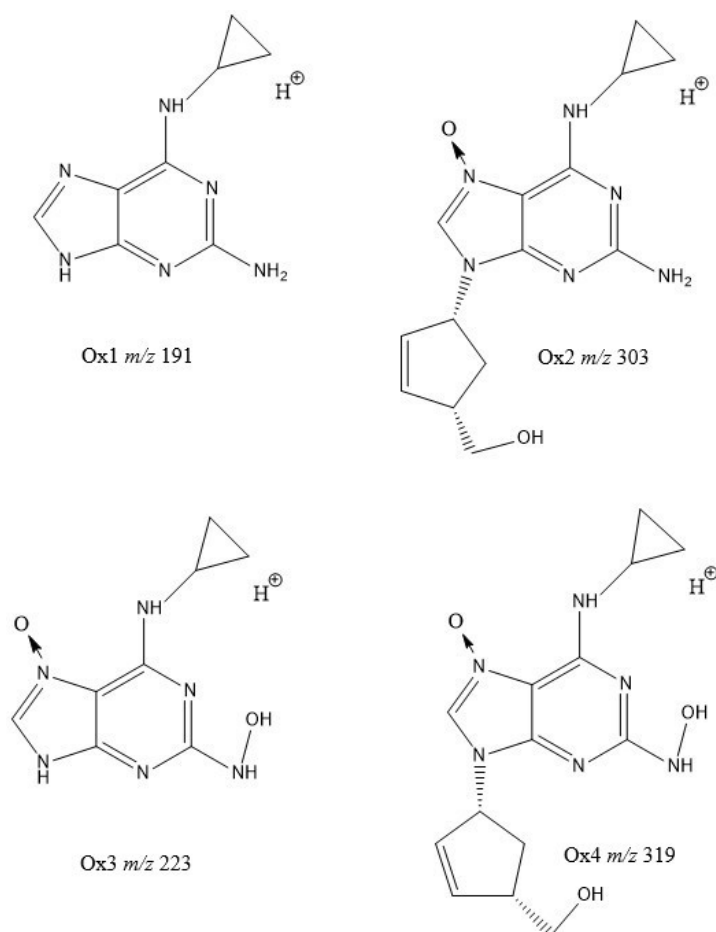
HIV se řadí mezi RNA obalené ss (+) viry čeledi retrovirus, nesoucí RNA nukleovou kyselinu.<sup>12</sup> Díky tomu, že obsahuje enzym reverzní transkriptázu je schopný přepsat svou genetickou informaci obsaženou v RNA do DNA a následně pomocí enzymu integrázy integrovat tuto DNA do DNA hostitelské buňky. Silnou stránkou viru je jeho velká antigenní variabilita, která vzniká rychlým množením s velkou pravděpodobností chybného kopírování nukleových kyselin. Virus napadá molekuly CD4, které se nacházejí na T-lymfocytech, monocytech, dendritických buňkách a gliových buňkách. Skrz tyto napadené buňky je schopen dostat se do centrální nervové soustavy a způsobit destrukci imunitního systému. Destrukce spočívá ve velkém namnožení viru v T-lymfocytech, které virus ničí, snižuje jejich množství a tím i obranyschopnost infikovaného člověka. Při úbytku T-lymfocytů pod kritickou hodnotu  $200 \text{ mm}^{-3}$  v periferní krvi přechází HIV na nemoc zvanou AIDS neboli konečné stádium HIV infekce. AIDS se zatím řadí mezi nevyléčitelné nemoci. Smrt nastává selháním lidské imunity, která není schopna bojovat proti jakékoliv běžné nemoci.

HIV se přenáší nechráněným sexuálním stykem, tělesnými tekutinami – krví, slinami, mateřským mlékem, a transplacentárně v děloze nakažené matky.<sup>13</sup> Díky léčbě antiretrovirotiky se daří snižovat šíření viru a počet úmrtí na AIDS.

## 1.4 Metody oxidace abacaviru

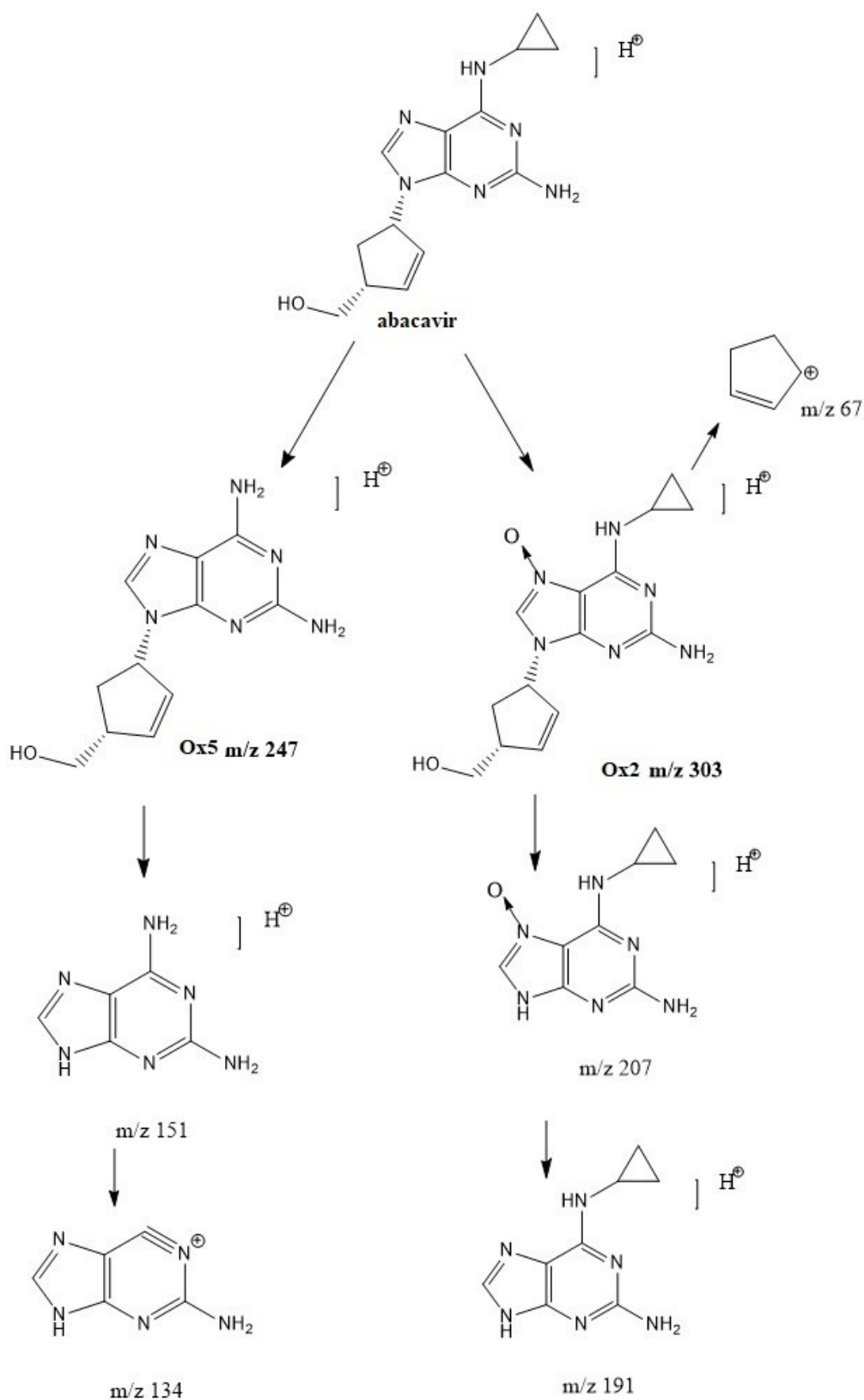
Farmaceutické laboratoře hledají levné a efektivní řešení degradačních studií léčiv. Celkově se náchylnost k oxidační degradaci testuje působením 3% peroxidu vodíku na účinnou látku. V odborných člancích se dá dohledat několik degradační studií abacaviru, převážně za použití peroxidu vodíku, ale jen jedna degradační studie za použití elektrochemického principu.

Vukkum a kol. vyvinul a optimalizoval metodu nucené oxidační degradace abacaviru za použití 3% peroxidu vodíku po dobu 7 dnů při teplotě okolí.<sup>8</sup> Následně separoval a identifikoval produkty pomocí UHPLC a LC-MS/MS. Byly zjištěny čtyři oxidační produkty Ox1-4, jejichž hmotnosti jsou shrnuty v tabulce 4. Pravděpodobné struktury produktů jsou znázorněny na obrázku 3.



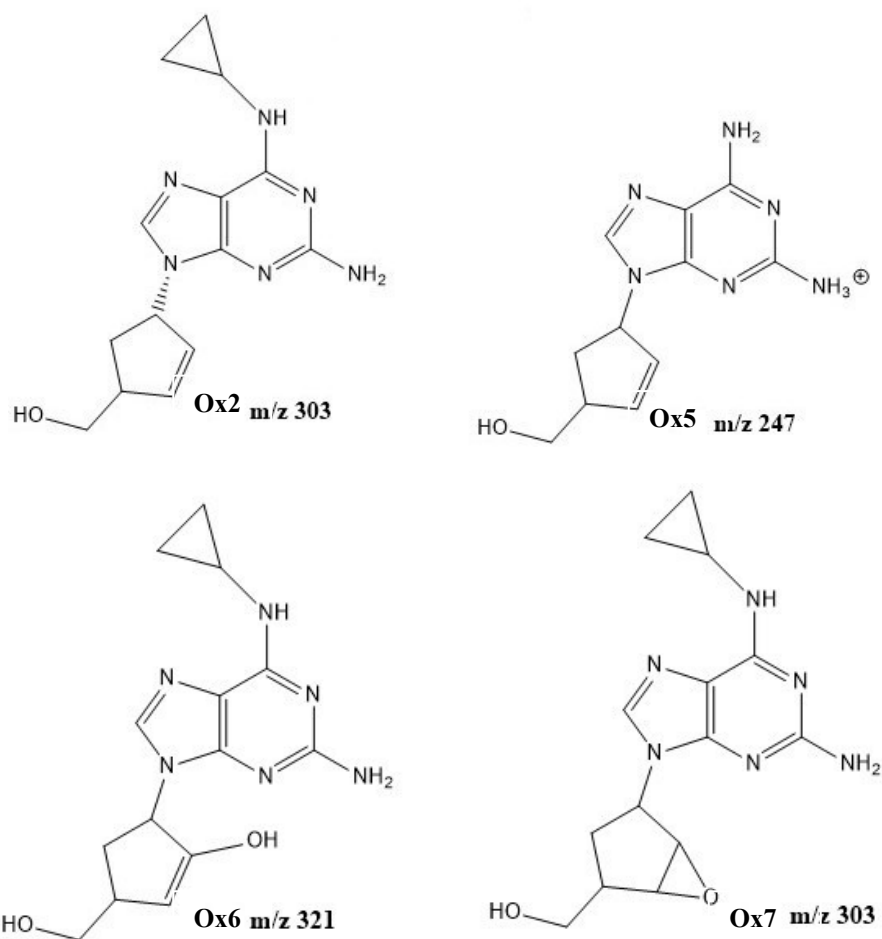
**Obrázek 3:** Pravděpodobné struktury produktů degradace abacaviru pomocí 3% peroxidu vodíku po dobu 7 dnů (převzato a upraveno z Vukkum a kol.<sup>8</sup>)

V další studii Rao a kol. použil na oxidaci abacaviru 3% a 6% peroxid vodíku.<sup>14</sup> Úplná oxidace trvala 7 dnů při pokojové teplotě. Bylo zjištěno, že při použití 3% peroxidu vodíku úplná oxidace neproběhla ani po 7 dnech, zatímco při použití 6% peroxidu vodíku po 7 dnech oxidace při pokojové teplotě proběhla. Separace a charakterizace degradačních produktů byla provedena pomocí LC-MS/MS. Rao a kol. pozoroval dva degradační produkty Ox2 a Ox5 charakterizované v tabulce 4. Struktura degradačního produktu Ox2 by mohl tvořit N-oxid a hydroxylamin v poloze 7 purinové skupiny. Fragmentové iontové struktury při  $m/z$  207 a 191 podporují přidavek kyslíku k purinové skupině. Produkt oxidace Ox5 byl pozorován při  $m/z$  247 a byl vytvořen ztrátou cyklopropanové skupiny. Z výsledků obou studií je patrné (viz tabulka 4), že se shodují pouze v jednom oxidačním produktu Ox2. Ostatní degradační produkty se neshodují. Možná degradační cesta abacaviru je znázorněna na obrázku 4.



**Obrázek 4:** Možná degradační cesta abacaviru pomocí 3% a 6% peroxidu vodíku (převzato a upraveno z Rao a kol. <sup>14</sup>)

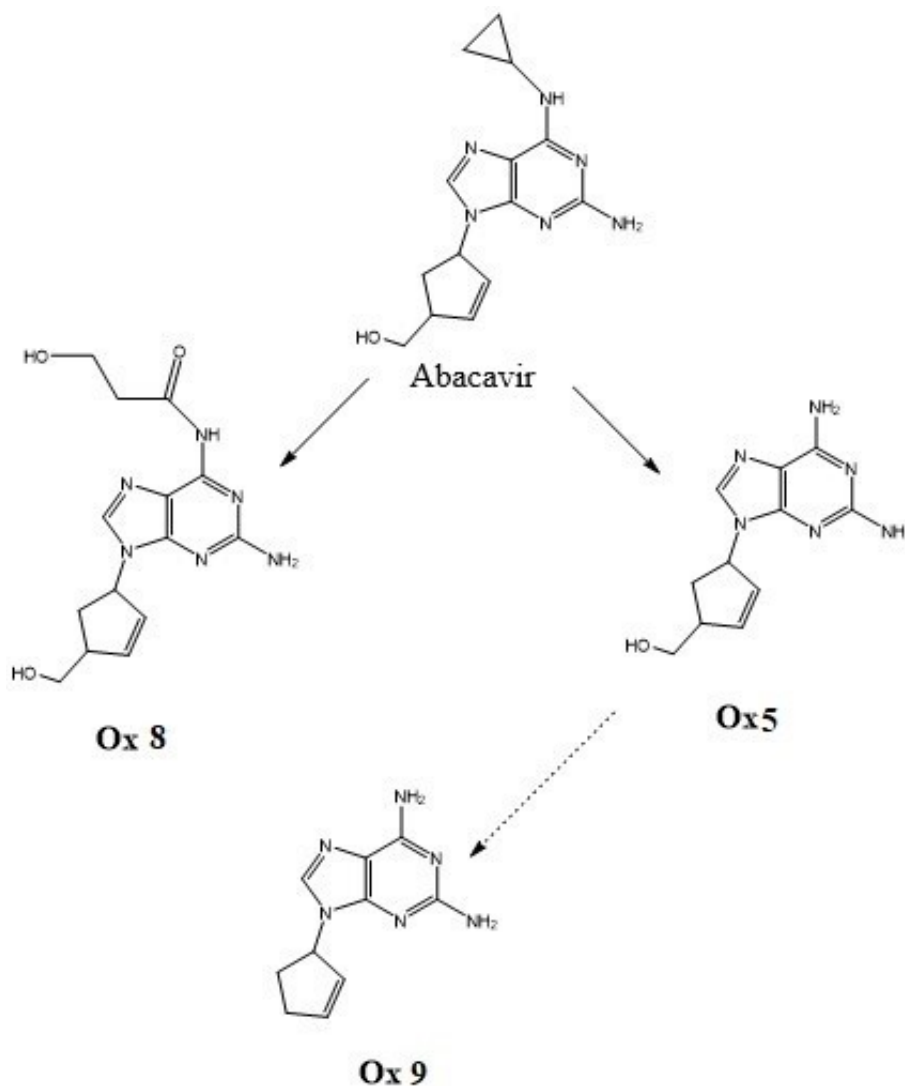
V další studii Kurmi a kol. podrobil abacavir oxidačnímu stresu zahrnujícímu 15% peroxid vodíku a skladovací teplotu 30°C.<sup>15</sup> Studie trvala 10 dnů a vedla k tvorbě celkem čtyř produktů degradace, které byly detekovány pomocí LC-MS/MS. Pravděpodobné struktury degradačních produktů Ox2, Ox5, Ox6 a Ox7, jsou znázorněny na obrázku 5. Degradační produkty byly podobné z již zmíněné studie od Rao a kol.<sup>14</sup> Dva produkty Ox2 a Ox5 se shodovaly, ale dva degradační produkty Ox6 a Ox7 byly charakterizovány odlišně. Výsledky již zmíněných studií a jejich shodné produkty jsou porovnány v tabulce 4. Produkty degradace Ox2, Ox6, Ox7 byly vytvořeny hydroxylací, dihydroxylací a epoxidací na dvojnou vazbu v cyklopent-2-enyl methanolovém zbytku léčiva. Produkt Ox5 byl charakterizován jako descyclopropyl abacavir, který je uveden ve farmakologii jako nečistota.<sup>16</sup>



**Obrázek 5:** Pravděpodobné struktury produktů degradace abacaviru pomocí 15% peroxidu vodíku po dobu 10 dnů (převzato a upraveno z Kurmi a kol.<sup>15</sup>)



Další studii oxidace abacaviru uskutečnil Zhou a kol. za účelem úplné degradace abacaviru a zjištění jeho toxicity mířené na vodní živočichy.<sup>17</sup> Elektrochemická degradace abacaviru byla zkoumána pomocí penetračního toku porézní anody Ti/SnO<sub>2</sub> – Sb připravené metodou sol-gel. Degradace více než 97 % byla provedena za pouhých 10 minut při proudové hustotě 0,2 mA·cm<sup>-2</sup>. Koncentrace abacaviru byla stanovena pomocí HPLC. Byly detekovány a identifikovány tři meziprodukty degradace abacaviru z toho jeden shodný (Ox5) s předchozími studiemi znázorněnými v tabulce 4. Detekované produkty Ox5, Ox8 a Ox9 a jejich možná degradační cesta jsou uvedeny na obrázku 6. Produkt Ox5 byl vytvořen štěpením cyklopropylového kruhu a Ox8 byl vyroben oxidací cyklopropylaminové skupiny. Produkt Ox9 byl generován další degradací Ox5.



**Obrázek 6:** Možná degradační cesta abacaviru během elektrochemické oxidace (převzato a upraveno z Zhou a kol.<sup>17</sup>)

Elektrochemické chování abacaviru dále studoval Uslu a kol., který oxidoval abacavir na grafitové pracovní elektrodě.<sup>18</sup> Studie cyklické voltametrie ukázaly jednu dobře definovanou oxidační vlnu při +1,10 V. Oxidace byla nevratná a vykazovala proces řízený difúzí v závislosti na pH. Z pozorování vyplynulo, že protony ovlivňující pH se účastní elektrochemické oxidace. Metoda byla použita na stanovení abacaviru ve farmaceutických lékových formách a ve vzorcích lidského séra a moči.

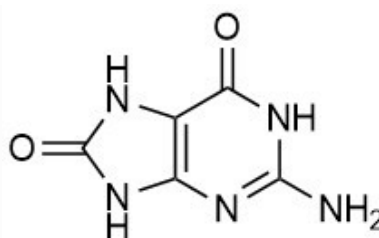
**Tabulka 4:** Souhrnná tabulka oxidačních produktů degradačních studií

Oxidační produkt	Naměřená hmotnost $m/z$ ( $amu$ )	Nejpravděpodobnější vzorec	Studie
Ox1	191,10		Vukkum a kol. <sup>8</sup>
Ox2	303,20	$C_{14}H_{19}N_6O_2^+$	Vukkum a kol. <sup>8</sup> , Rao a kol. <sup>14</sup> , Kurmi a kol. <sup>15</sup>
Ox3	223,20		Vukkum a kol. <sup>8</sup>
Ox4	319,20		Vukkum a kol. <sup>8</sup>
Ox5	247,13	$C_{11}H_{15}N_6O^+$	Rao a kol. <sup>14</sup> , Kurmi a kol. <sup>15</sup> , Zhou a kol. <sup>17</sup>
Ox6	321,17	$C_{14}H_{21}N_6O_3^+$	Kurmi a kol. <sup>15</sup>
Ox7	303,15	$C_{14}H_{19}N_6O_2^+$	Kurmi a kol. <sup>15</sup>
Ox8			Zhou a kol. <sup>17</sup>
Ox9			Zhou a kol. <sup>17</sup>

### 1.4.1 Vliv pomocných látek na oxidaci

Pomocné látky (excipienty) lze použít k potlačení oxidační degradace. Obvykle se přidává kombinace donoru atomu vodíku a chelátoru kovu, aby se snížily účinky oxidační degradace. Degradace léčiva ve výrobcích často vyplývá z reakce API s pomocnými látkami používanými ve formulaci.<sup>19</sup>

Ziagen je tableta obsahující 300 mg účinné látky abacaviru. U antivirových léčiv je důležité zamezit degradaci bází, u léku Ziagen to je guanin. Guanin je nejvíce náchylný k oxidačnímu poškození, protože jeho oxidační potenciál je 1,29 V. K relativně vysoké náchylnosti k oxidaci dochází z důvodu vysoké hustoty náboje na 5'-konci. Oxidační produkt guaninu 8-hydroxyguanin (viz obrázek 7) se přednostně páruje s adeninem namísto jeho normálního páru s cytosinem a může vést k transkripčním mutacím exprimované mRNA a nakonec k mutantním proteinům.<sup>20</sup>



**Obrázek 7:** Struktura 8-hydroxyguaninu (převzato a upraveno z Waterman<sup>20</sup>)

## 1.5 Elektrolýza a coulometrie

Při elektrolýze dochází po vložení stejnosměrného proudu k chemickým změnám na elektrodách ponořených do kapaliny. Pokud se měří prošlý náboj nutný k úplnému vyloučení nebo přeměnění látky na elektrodě, pak mluvíme o elektrochemické analytické metodě coulometrii.<sup>21</sup> Podle Faradayových zákonů je vyměněný elektrochemický náboj přímo úměrný množství látky vyloučené nebo jinak přeměněné na elektrodě.

Tuto definici lze popsat rovnicí 1:

$$m = \frac{Q \cdot M}{z \cdot F} = \frac{I \cdot t \cdot M}{z \cdot F} \quad (1)$$

Kde  $Q$  je elektrický náboj [C],  $M$  – molární hmotnost stanovované látky [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ],  $z$  – počet vyměňovaných elektronů,  $F$  – Faradayova konstanta ( $F = 96\,458,31 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $I$  – elektrický proud [A],  $t$  – čas [s]

Podle Faradayova zákona lze říci, že oxidací 1 molu chemických ekvivalentů dochází ke spotřebě jednoho náboje odpovídajícího Faradayově konstantě. Toto tvrzení lze použít jen při splnění podmínky, že na pracovní elektrodě probíhá pouze jediná reakce se 100% proudovým účinkem.<sup>22</sup> Této podmínce je třeba přizpůsobit podmínky měření. Pracovní elektroda a ostatní elektrody by měly být odděleny solným můstkem, který zamezí vzájemné difuzi elektrolytu mezi poločlánky. V této práci byla použita elektrolýza za konstantního potenciálu na pracovní elektrodě. Po vložení tohoto napětí na pracovní elektrodu elektrolytický proud klesá s časem podle rovnice 2:

$$I_t = I_0 e^{-kt} \quad (2)$$

$I_0$  je počáteční proud [A],  $k$  – koeficient přenosu hmoty,  $t$  – čas [s]

Čím větší je hodnota koeficientu  $k$ , tím bude elektrolýza probíhat rychleji. Elektrolýza bude také probíhat rychleji, pokud bude použita pracovní elektroda s větším povrchem.<sup>22</sup> Také mícháním roztoku se urychlí elektrolýzu tím, že dojde ke zmenšení tloušťky difuzní vrstvy. Konec elektrolýzy nastane v momentě, kdy elektrolytický proud klesne téměř k nule na konstantní hodnotu odpovídající nabíjecímu proudu. Velikost náboje prošlého roztokem za dobu potřebnou k úplné reakci se vypočte z integrálu závislosti proudu na čase. Potenciostatická coulometrie má široké možnosti využití a metoda nevyžaduje žádnou kalibraci známými standardy, protože patří mezi metody absolutní. Metodu lze využít na stanovení rozpustné látky nebo přesně stanovit počet vyměňovaných elektronů.

## **2. Experimentální část**

### **2.1 Použité chemikálie a přístroje**

#### **2.1.1 Chemikálie**

Abacavir sulfát (Zentiva, Česká republika)

Bromid draselný p.a. (Penta, Česká republika)

Deionizovaná voda MiliQ

Dusičnan stříbrný p.a (Lach-ner, Česká republika)

Hydrochinon 99% (Penta, Česká republika)

Hydroxid amonný 28% (Penta, Česká republika)

Chlorid draselný p.a. (Lach-ner, Česká republika)

Koloidní bezvodý oxid křemičitý (Zentiva, Česká republika)

Kyselina sírová 96% (Penta, Česká republika)

Octan amonný p.a. (Lach-ner, Česká republika)

Polykrystalická celulóza (Zentiva, Česká republika)

Stearan hořečnatý (Zentiva, Česká republika)

Škrobový glykolát sodný (Zentiva, Česká republika)

#### **2.1.2 Přístroje**

Kapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC H Class (Waters, USA)

Kapalinový chromatogram 1290 Infinity (Agilent Technologies, USA)

Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem 6460 (Agilent Technologies, USA)

Analytické váhy 262 SMA-FR(Sartorius, Švýcarsko)

Konduktometr AD8000 pH/mV/EC/TDS (USA)

Magnetická míchačka (Thermo scientific, USA)

Mikrocentrifuga (Eppendorf minispin, Německo)

Potenciostat/galvanovat model 273 EG&G (Princeton applied research, USA)

Ultrazvukový sonikátor, Elma S15 (Elmasonic, Německo)

## 2.2 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky octanu amonného o koncentraci  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byly připraveny následovně: 0,385 g resp. 1,541 g pevného octanu amonného bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody. Hodnota pH byla zkontrolována a upravena 28 % hydroxidem amonným na hodnotu pH 7.

Zásobní roztok dusičnanu stříbrného o koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a octanu amonného o koncentraci  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,05 g dusičnanu stříbrného a 0,46 g octanu amonného ve 30 ml deionizované vody a promícháno.

Roztok abacaviru o koncentraci  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  abacaviru v octanu amonném o koncentraci  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,385 g octanu amonného ve 100 ml deionizované vody a následně byl tento roztok smíchán s 6,3 mg abacaviru.

Roztok  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  abacaviru v octanu amonného o koncentraci  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pro měření opakovatelnosti byl připraven rozpuštěním 1,541 g octanu amonného ve 400 ml deionizované vody, aby koncentrace odpovídala  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Následně byl tento roztok smíchán s 0,06 g abacaviru.

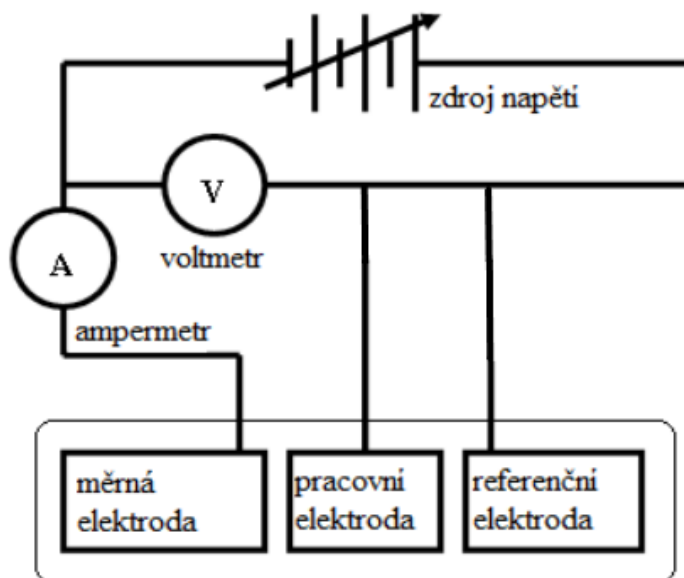
Roztok o koncentraci  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  abacaviru s přidanými excipienty, vyskytujícími se v tabletě Ziagen (viz tabulka 5) v octanu amonném o koncentraci  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byl připraven následovně. Podle oficiálních informací od výrobce tablety bylo použito  $0,384 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  abacavir sulfátu a  $0,4912 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  směsi excipientů. Roztoky byly uchovávány při  $5^\circ\text{C}$ .

**Tabulka 5:** Složení tablety Ziagen s abacavirem

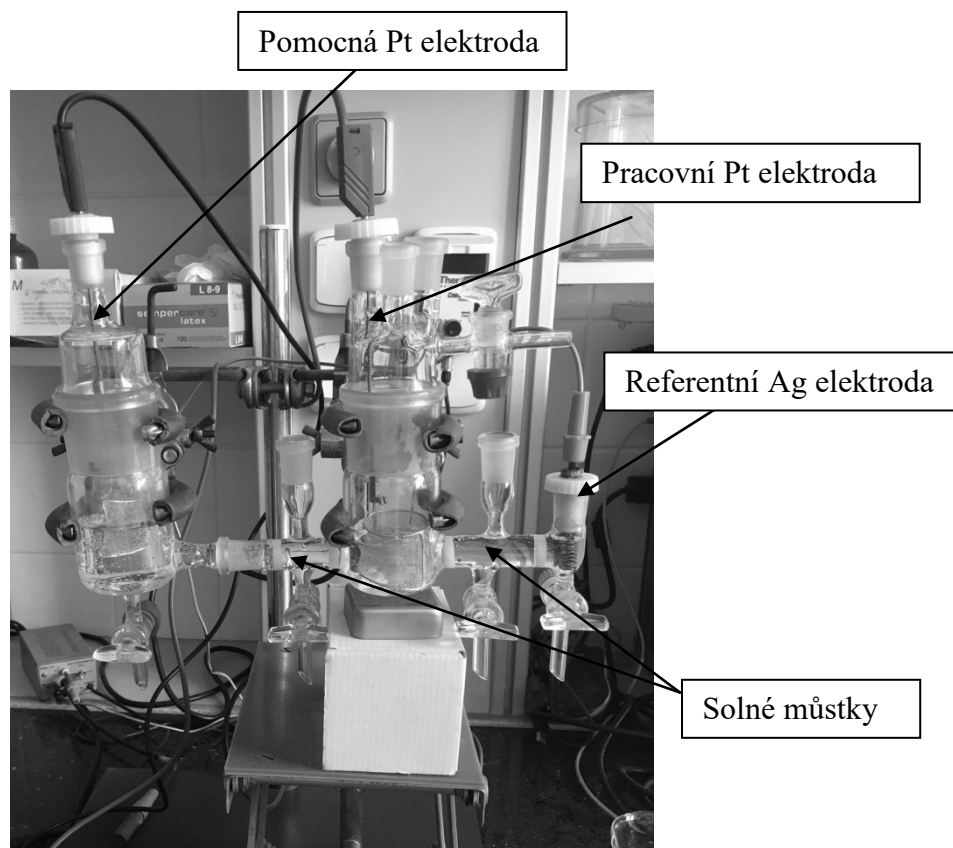
Látka	Hmotnost / mg	Procent v tabletě / %
Abacavir	300	
Sulfát abacaviru	351	43,875
Polykrystalická celulóza	414,6	51,825
Škrobový glykolát sodný	24	3
Stearan hořečnatý	8	1
Koloidní bezvodý oxid křemičitý	2,4	0,3

## 2.3 Podmínky elektrochemických experimentů

Elektrolýza byla prováděna na aparatuře skládající se z potenciostatu (model 273 EG&G Princeton applied research, USA) v tříelektrodovém zapojení (viz obrázek 8). Na obrázku 9 je znázorněna reálná aparatura. Jako pomocná elektroda byla použita platinová síťka ponořená do roztoku 40 ml octanu amonného o koncentraci  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Jako referenční elektroda byla použita stříbrná elektroda prvního druhu ponořená v 10 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a octanu amonného o koncentraci  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Jako pracovní elektroda byla využita speciálně stéricky upravená platinová síťka. Všechny elektrodové prostory byly odděleny solným můstkem naplněným roztokem octanu amonného o koncentraci  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Platinové elektrody byly před každým měřením čištěny žíháním v horním redukčním plamenu kahanu po dobu 3 minut. Mezi elektrody byl vložen konstantní potenciál 1150 mV. Analyzovaný roztok byl po celou dobu experimentu míchán pomocí magnetické míchačky.



**Obrázek 8:** Ilustrace zapojení potenciostatické coulometrie (převzato a upraveno z Bačová<sup>17)</sup>)



**Obrázek 9:** Aparatura pro potenciostatickou elektrolýzu

Studium oxidace abacaviru bylo prováděno ve 40 ml roztoku o koncentraci  $0,25 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  abacaviru v  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  octanu amonného. Do elektrochemické cely byl převeden analyzovaný roztok. Byly vynulovány hodnoty prošlého náboje a následně zapnut přívod proudu do cely. V momentě zapnutí přívodu proudu do cely byla spuštěna časomíra měření na stopkách. Prováděl se zápis prošlého náboje celou s roztokem nejprve po jedné minutě od první do desáté minuty a poté v dvouminutových intervalech do 20té minuty a následně po jednom desetiminutovém intervalu ve 30té minutě. Při každé kontrole prošlého náboje byl vypnut přívod proudu do cely a odebráno 200  $\mu\text{l}$  oxidovaného roztoku pro UHPLC analýzu. Vzorokly z oxidace s excipienty byly pipetovány do mikrozkuumavek a následně centrifugovány po dobu 2 minut. Dále bylo odebráno 200  $\mu\text{l}$  supermatanu pro UHPLC analýzu.



## 2.4 Cyklická voltametrie

Měření cyklického voltamogramu probíhalo v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektroda byla ze skelného uhlíku (Metrohm, Švýcarsko), jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (Elektrochemické detektory, Turnov) a jako referentní elektroda posloužila kalomelová elektroda s KCl o koncentraci  $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (Elektrochemické detektory, Turnov). Měření probíhalo v potenciálovém okně 0-1300 mV a byla používána rychlost polarizace  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Poměřeny byly roztoky octanu amonného o koncentraci  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a poté roztok abacaviru o koncentraci  $0,15 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  v octanu amonném o koncentraci  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

## 2.5 Coulometrická titrace hydrochinonu

Bylo připraveno 50 ml roztoku hydrochinonu o koncentraci  $2,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v deionizované vodě. Měření probíhalo v tříelektrodovém uspořádání. Do měřicí nádoby bylo odměřeno 50 ml bromidu draselného o koncentraci  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a 50 ml kyseliny sírové o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pomocná elektroda oddělená fritou byla naplněna roztokem kyseliny sírové o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pracovní platinová elektroda, sloužící ke generaci činidla, a indikační platinová dvojelektroda byly následně vloženy do nádoby s bromidem draselným a kyselinou sírovou, bylo přidáno magnetické míchadlo a cela byla umístěna na plotnu míchačky. Generační proud byl 3 mA a konečný indikační proud  $0,15 \mu\text{A}$ . Do roztoku bylo pipetováno automatickou pipetou 1 ml připraveného roztoku hydrochinonu a byla provedena titrace až do dosažení nastaveného konečného indikačního proudu. Stejným postupem byl roztok hydrochinonu titrován ještě čtyřikrát.

## 2.6 Ultravysokoučinná kapalinová chromatografie

Vzorky odebrané při elektrochemické oxidaci abacaviru byly analyzovány pomocí již dříve vyvinuté a optimalizované UHPLC metody. Separčním systémem použitým na analýzu byl kapalinový chromatograf Waters (Acquity UPLC H Class (Waters, USA)) s PDA detektorem a kolonou Kinetex C18 (Agilent Technologies, USA) o rozměru  $2,1 \times 100$  mm s velikostí částic  $1,7 \mu\text{m}$ . Optimální mobilní fáze se skládala z acetonitrilu jako složky A a octanu amonného ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) jako složky B. Poměr složek mobilní fáze se v průběhu gradientového programu (viz. tabulka 6) měnil od 10 do 70 % (v/v) acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl  $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , dávkovaný objem vzorků byl  $1 \mu\text{l}$ , detekce probíhala při vlnové délce  $254 \text{ nm}$ , teplota kolony a automatického dávkovače byla  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $8^\circ\text{C}$ . Celková doba analýzy do ustálení trvala 11 minut.

**Tabulka 6:** Optimalizovaný gradientový program zastoupení mobilní fáze v průběhu eluce

$t / \text{min}$	$\varphi (\text{CH}_3\text{CN}) / \%$	$\varphi (\text{CH}_3\text{COONH}_4) / \%$
0	10	90
2	10	90
7	70	30
8	70	30
9	10	90
11	10	90

### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1 Kontrolní měření hydrochinonu coulometrickou titrací za konstantního proudu

Před vlastní studií oxidačního chování abacaviru bylo třeba ověřit funkčnost aparatury pro elektrolýzu. Kontrolu je možné provést porovnáním množství prošlého náboje při coulometrické oxidaci v elektrochemické cele s nábojem prošlým při coulometrické titraci. Pro preparativní elektrolýzu bylo provedeno kontrolní měření coulometrickou titrací pomocí roztoku hydrochinonu, jehož elektrochemické vlastnosti jsou popsány v literatuře.<sup>23</sup>

Z výsledků plyne, že medián prošlých nábojů nutných na zoxidování celého hydrochinonu o koncentraci  $2,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  na chinon je 964 mC. Výsledky jsou znázorněny v **Tabulka** tabulce 7.

**Tabulka 7:** Výsledky kontrolního měření hydrochinonu

Počet opakování	Prošlý náboj /mC
1	975
2	964
3	955
4	971
5	959

### 3.1.1 Oxidace hydrochinonu

Pro ověření funkčnosti aparatury byl použit roztok hydrochinonu, jehož vlastnosti při coulometrické titraci byly zkoumány dříve. Roztok 25 ml hydrochinonu o koncentraci  $0,223 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a octanu amonného o koncentraci  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl oxidován na chinon po dobu 15 sekund v elektrochemické cele při konstantním napětí 1,15 V za použití potenciostatu a podmínek z experimentální části (str. 26). Pracovní elektroda byla ponořena do roztoku hydrochinonu. Měření bylo provedeno 5x. Roztok byl následně coulometricky dotitrován, za použití podmínek z experimentální části (str. 27), a byl porovnán prošlý náboj se skutečným množstvím zreagované látky. Výsledky shrnuty v tabulce 8 odpovídají zoxidovanému množství látky. Relativní směrodatná odchylka měření je 5,3 %. Z výsledků plyne, že aparatura pro elektrochemickou oxidaci je funkční, rychlá a poskytuje opakovatelné výsledky s relativní chybou 5,3 %.

**Tabulka 8:** Výsledky měření prošlého náboje elektrochemickou oxidací po dobu 15 sekund

Počet opakování	Prošlý náboj (mC)
1	-616
2	-602
3	-598
4	-554
5	-542

## 3.2 Konduktometrie

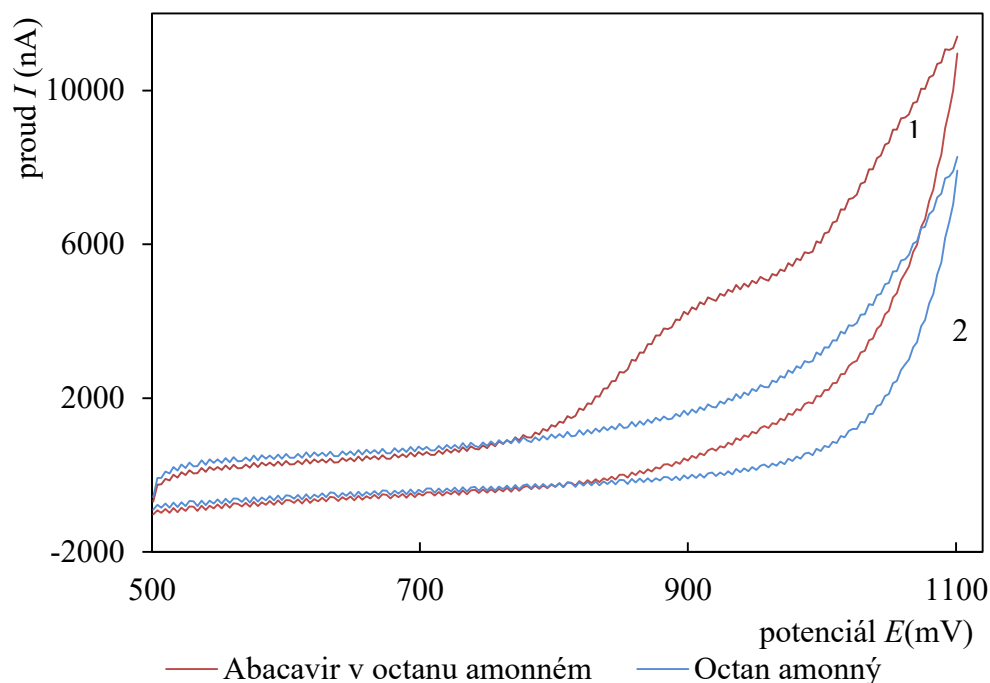
Konduktometrií byla ověřena vodivost použitých roztoků pufrů, jejichž nízké koncentrace byly použity z důvodu úspory chemikálií. Pro experimentální účely byla změřena vodivost octanu amonného o koncentraci  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9. Jako kalibrační roztok byl použit roztok chloridu draselného o koncentraci  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Z výsledků lze usoudit, že i roztok octanu amonného o koncentraci  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  je dostatečně vodivý a lze jej použít pro měření.

**Tabulka 9:** Výsledky konduktometrického měření vodivosti

Elektrolyt	Koncentrace / $\text{mol dm}^{-3}$	Vodivost / $\text{mScm}^{-1}$
Octan amonný	0,05	4,4
Octan amonný	0,2	19,8
Chlorid draselný	0,1	12,6

### 3.3 Cyklická voltametrie

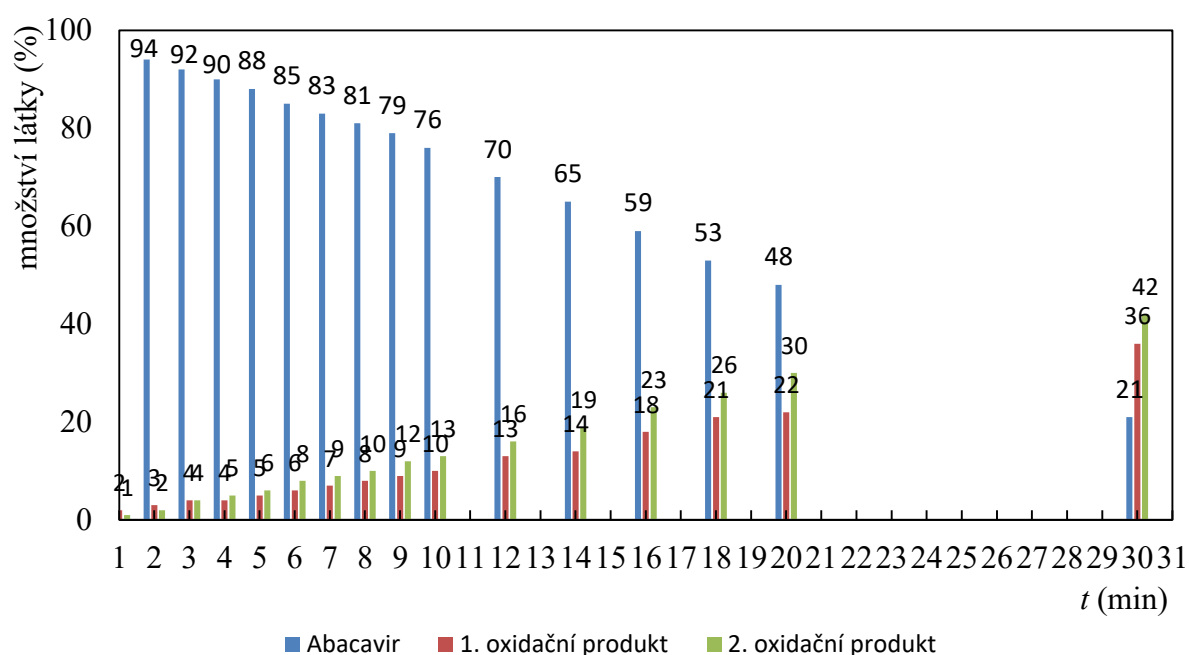
Cyklická voltametrie byla použita pro ověření oxidace abacaviru. K měření byla zvolena pracovní elektroda ze skelného uhlíku, která poskytovala dostatečně široké potenciálové okno bez kolidujících signálů v základním elektrolytu. Nejprve se potenciál lineárně zvyšoval rychlostí  $100 \text{ mVs}^{-1}$  od počátečního ke zlomovému potenciálu a poté se snižoval ke konečnému potenciálu. Počáteční potenciál byl shodný s konečným potenciálem a dopředný se zpětným scanem tvoří jeden cyklus. Takto byly provedeny 3 cykly, z nichž byl do grafu použit pouze druhý. Průběh cyklického voltamogramu je graficky znázorněn na obrázku 10, na kterém je vidět voltametrická vlna způsobená přítomností oxidace abacaviru v rozmezí 800-1000 mV. Maximální oxidační potenciál abacaviru je kolem 1100 mV. Pro elektrochemické degradace abacaviru byl proto použit maximální oxidační potenciál 1150 mV.



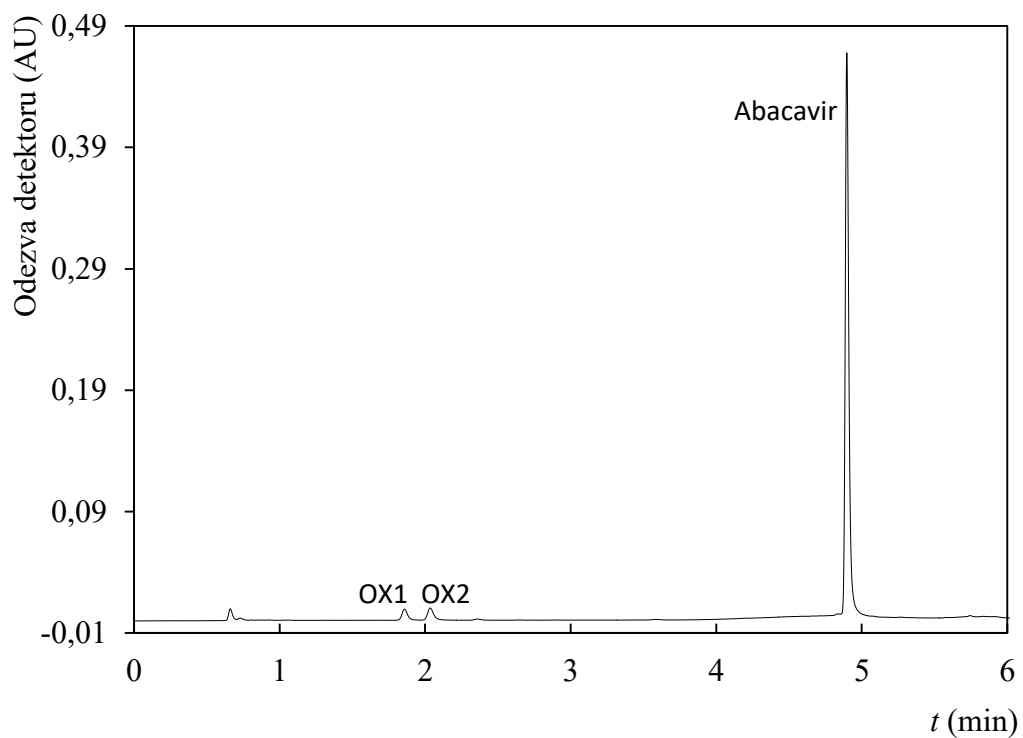
**Obrázek 60:** Cyklický voltamogram abacaviru (červená křivka 1) v octanu amonném (modrá křivka 2) na elektrodě ze skelného uhlíku (rychlost skenu  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , rozsah potenciálu 0-1200mV)

### 3.4.1 Elektrochemická oxidace abacaviru

Elektrochemická oxidace abacaviru byla prováděna na velkoplošné platinové elektrodě při potenciálu 1,15 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup> referentní elektrodě, který byl vybrán na základě výsledků měření cyklické voltmetrie a po zohlednění růstu nabíjecího proudu se zvyšujícím se vloženým potenciálem v použitém experimentálním uspořádání. Vzorky oxidovaného abacaviru o koncentraci 0,25 mg·cm<sup>-3</sup> byly průběžně odebírány po dobu 20 minut. Byly oxidovány za ideálních podmínek (viz experimentální část str. 25) a následně analyzovány pomocí UHPLC. Z UHPLC analýzy vyplývá, že abacavir při oxidaci poskytuje dva degradační produkty s relativními retenčními časy 0,388 min a 0,429 min. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 11. Z grafu je patrné, že abacavir byl zoxidovaný z cca 20 % v čase do 8 minut a rozpadl se na dva produkty oxidace, které odpovídají degradačním produktům zmíněným v literatuře (<sup>8,14,15,17</sup>). Chromatogram směsi vzniklé oxidací abacaviru po dobu 7 minut je znázorněn na obrázku 12.



**Obrázek 71:** Závislost úbytku abacaviru na době oxidace



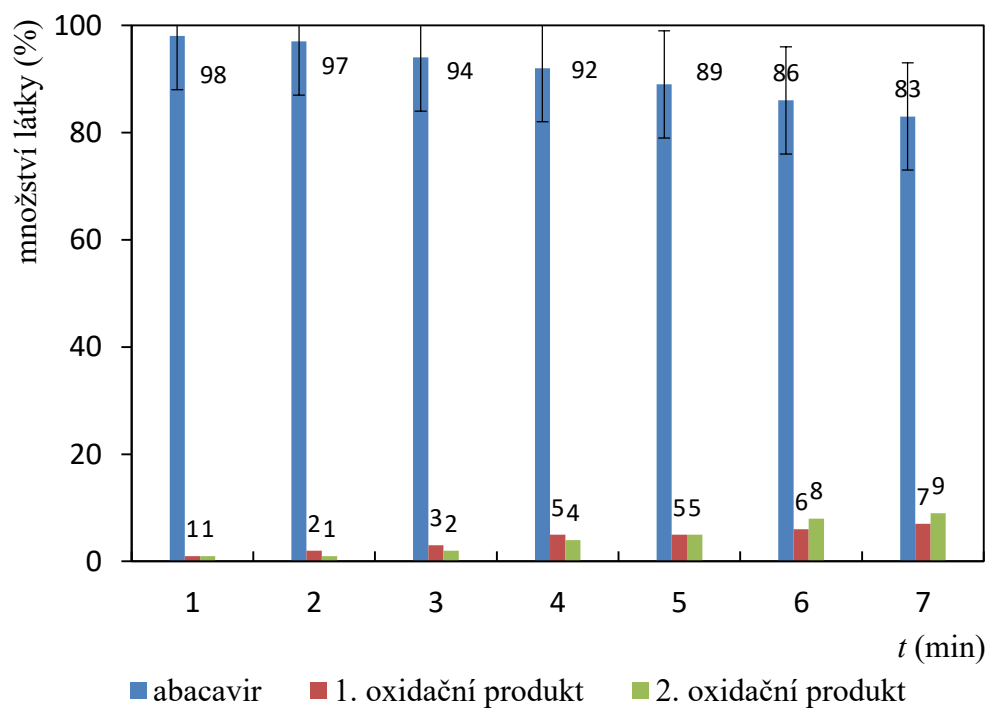
**Obrázek 82:** Chromatogram separace abacaviru a jeho dvou degradačních produktů po 7 minutách elektrochemické oxidace. Měřeno optimalizovanou UHPLC metodou.



### 3.4.2 Opakovatelnost elektrochemické oxidace abacaviru

Na základě předchozích výsledků měření bylo vyhodnoceno, že bude vhodné pro měření opakovatelnosti použít abacavir o koncentraci  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  v octanu amonném. Objem analyzovaného vzorku (25 ml), byl zvolen na základě velikosti platinové pracovní elektrody tak, aby byla zcela ponořená i při odebírání 200  $\mu\text{l}$  vzorků po dobu oxidace. Platinová elektroda byla speciálně stéricky upravena, aby při zachování stejného povrchu elektrody mohlo být použito co nejméně roztoku vzorku. Koncentrace abacaviru ( $0,15 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) byla zvolena proto, aby se snížilo množství použitého abacaviru vzhledem k jeho finanční nákladnosti.

Reakci mohou rušit látky vzniklé elektrolýzou, proto byla pracovní elektroda a ostatní elektrody odděleny solnými můstky, které zamezily vzájemné difuzi elektrolytu mezi poločlánky. Měření za ideálních podmínek (viz str. 23) probíhalo po dobu 7 minut. Doba oxidace byla zvolena na základě výsledků měření rychlosti oxidace abacaviru tak, aby se abacavir rozpadl do 20 %, jak je běžné ve farmaceutických degradačních studiích. Po každé minutě byla zapsána hodnota prošlého náboje a 200  $\mu\text{l}$  oxidovaného roztoku bylo odebráno pro UHPLC analýzu. Tento postup byl zopakován celkem šestkrát. Výsledky měření opakovatelnosti jsou graficky zaznamenány na obrázku 13. Jednotlivé sloupce znázorňují medián výsledků měření. Relativní směrodatná odchylka množství zoxidovaného abacaviru byla 4,6 %. První oxidace byla brána jako orientační a z výsledků byla vyloučena. Dochází při ní k pasivaci elektrody a ustálení podmínek na elektrodě.

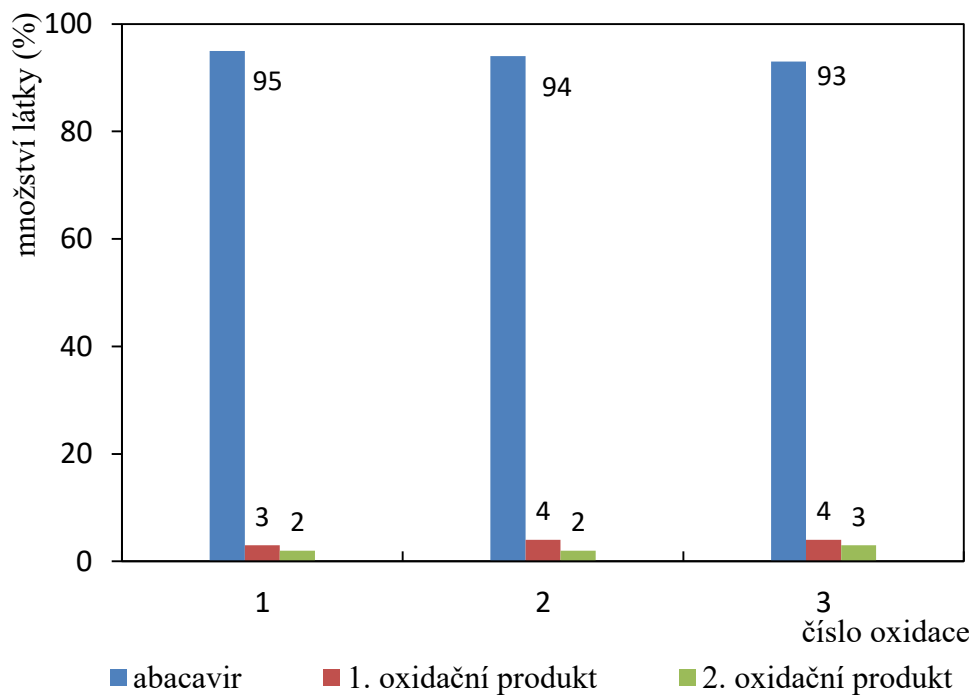


**Obrázek 13:** Průběh elektrochemické oxidace abacaviru

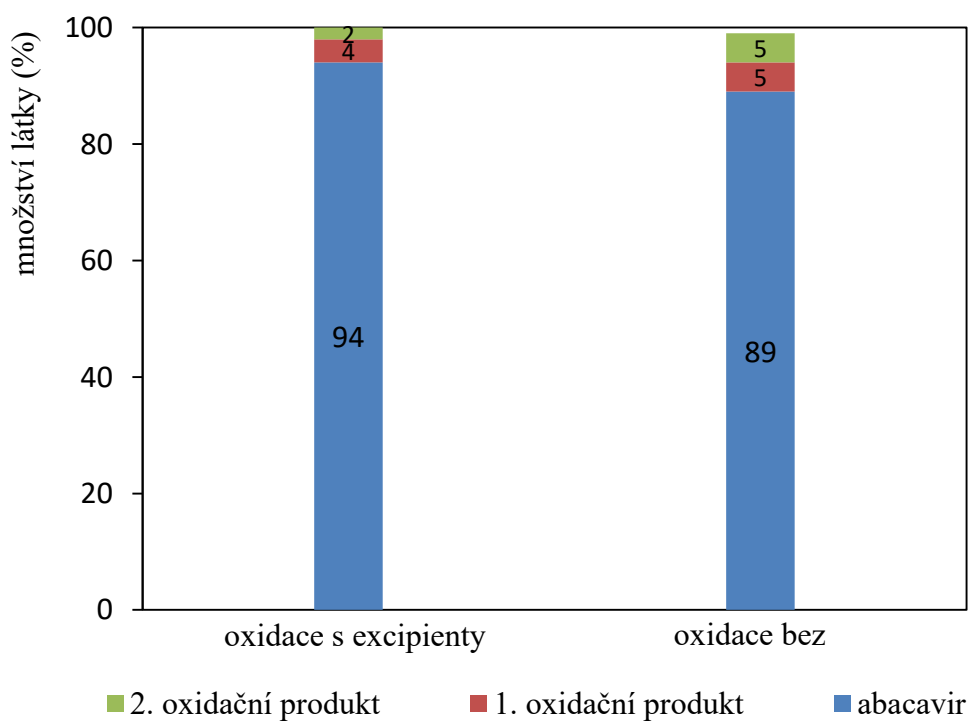
### 3.4.3 Oxidace abacaviru s excipienty vyskytujícími se v tabletě

Dále byl studován vliv excipientů, vyskytujících se v tabletě Ziagen, na elektrochemickou oxidaci abacaviru. Do roztoku abacaviru o koncentraci  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  v octanu amonném o koncentraci  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  bylo přidáno adekvátní množství excipientů vyskytujících se v tabletě (viz str. 22). Pro dokonalé rozpuštění excipientů v roztoku byl použit ultrazvuk. Oxidace 25 ml tohoto roztoku probíhala za optimálních podmínek jako bez excipientů (viz str. 23). Vzorky k UHPLC analýze byly odebírány po 5 minutách oxidace. Následně byl vzorek centrifugován a 200  $\mu\text{l}$  supernatantu odpipetováno do vialky pro UHPLC analýzu. Tímto postupem bylo uskutečněno 5 oxidací, jejichž výsledky jsou znázorněny na obrázku 14.

Z vyhodnocení byly vyřazeny výsledky první elektrolýzi, kdy se ustalovaly podmínky na elektrodě a dále třetí měření pro velmi odlehlý výsledek a nestandardní průběh elektrolýzi (vzorek se během oxidace zbarvil do žluta a prošlý náboj neodpovídal nábojům prošlých při ostatních oxidacích). Z výsledků UHPLC analýzy je patrné, že při oxidaci vzorků abacaviru obsahujících excipienty vznikají stejné produkty oxidace jako bez excipientů (obrázek 14). Oxidace ale neprobíhá stejně rychle, jako bez použití excipientů (obrázek 15). Excipienty oxidaci zpomalují a to o cca 5 %. Oxidace také mění poměr vzniklých produktů (viz obrázek 15).



**Obrázek 94:** Grafické znázornění výsledků tří oxidací abacaviru s excipienty vyskytujícími se v tabletě Ziagen



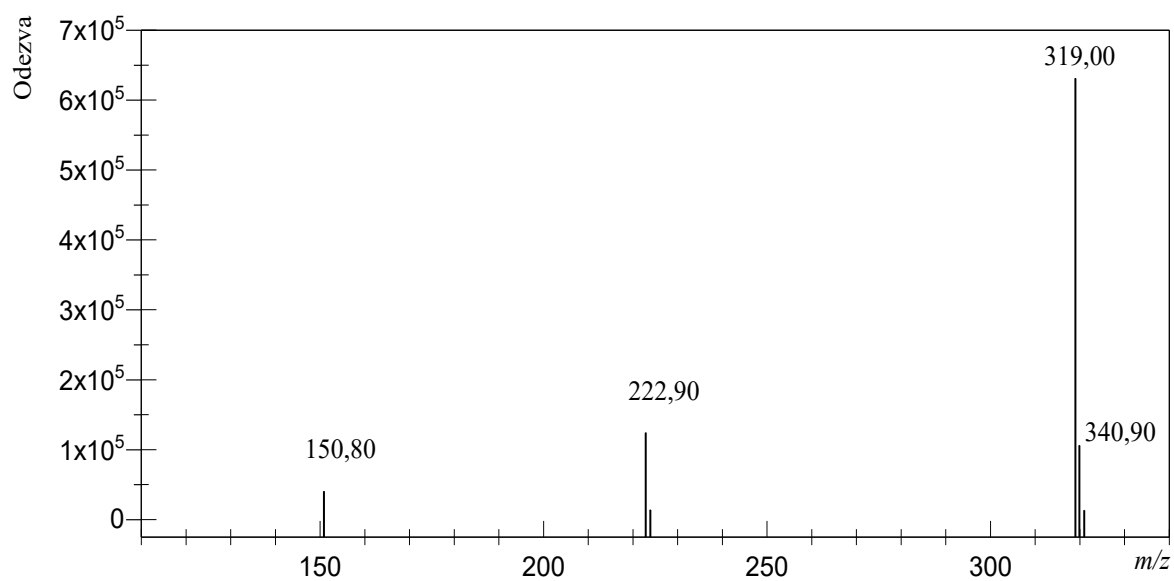
**Obrázek 105:** Grafické zpracování mediánu výsledků oxidace po 5ti minutách s excipienty vyskytujícími se v tabletě Ziagen a bez excipientů

### 3.5 Hmotnostní spektrometrie

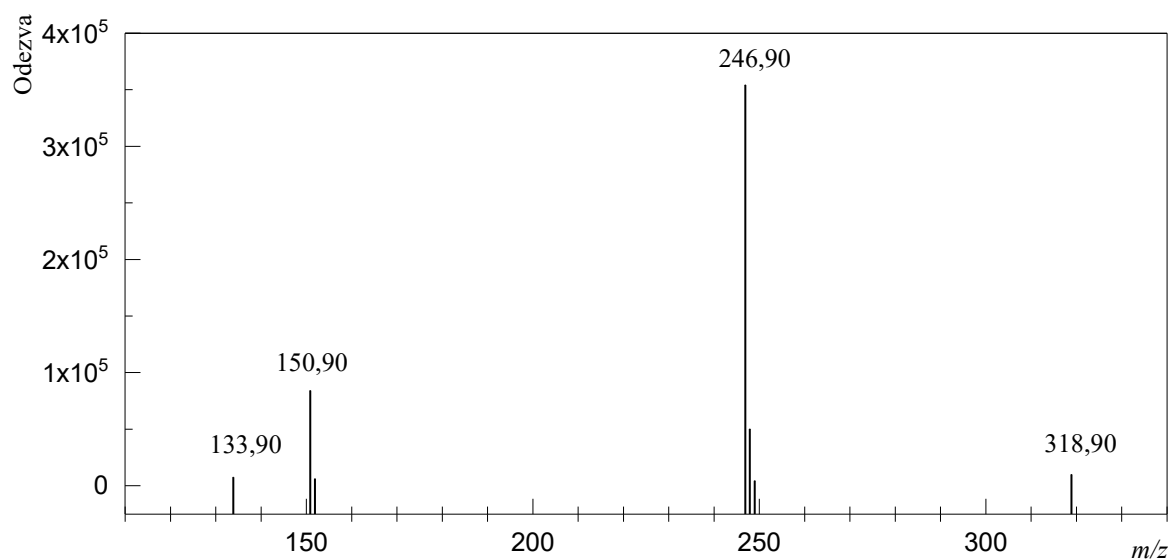
Produkty oxidační degradace byly identifikovány pomocí LC-MS analýzy. Nejvyšší pík v chromatogramu odpovídá abacaviru a jeho hmotnost je 286,90  $m/z$ . Další dva nejvyšší píky odpovídají oxidačním produktům. Prvnímu degradačnímu produktu OX1 byla stanovena  $m/z$  na 319,00, jak je vidět na obrázku 16. Druhému oxidačnímu produktu OX2 byla stanovena  $m/z$  na 246,90 (viz obrázek 17). Výsledky uvedené v tabulce 10 byly porovnány s literaturou. Z tabulky 4 je patrné, že první oxidační produkt OX1 je shodný s produktem oxidace Ox4 získaným oxidací 3% peroxidu vodíku po dobu 7 dnů. Druhý oxidační produkt se shoduje s více zdroji v literatuře. Konkrétně s oxidačním produktem Ox5 oxidovaným 3% a 6% peroxidem vodíku po dobu 7 dnů a v další studii oxidovaným 15% peroxidem vodíku po dobu 10 dnů. Odhadované struktury degradačních produktů jsou znárodněny na obrázku 18. Produkt Ox5 je veden ve farmakologii jako nečistota descyclopropyl abacavir.

**Tabulka 10:** Charakteristika oxidačních produktů degradace získaných elektrochemicky

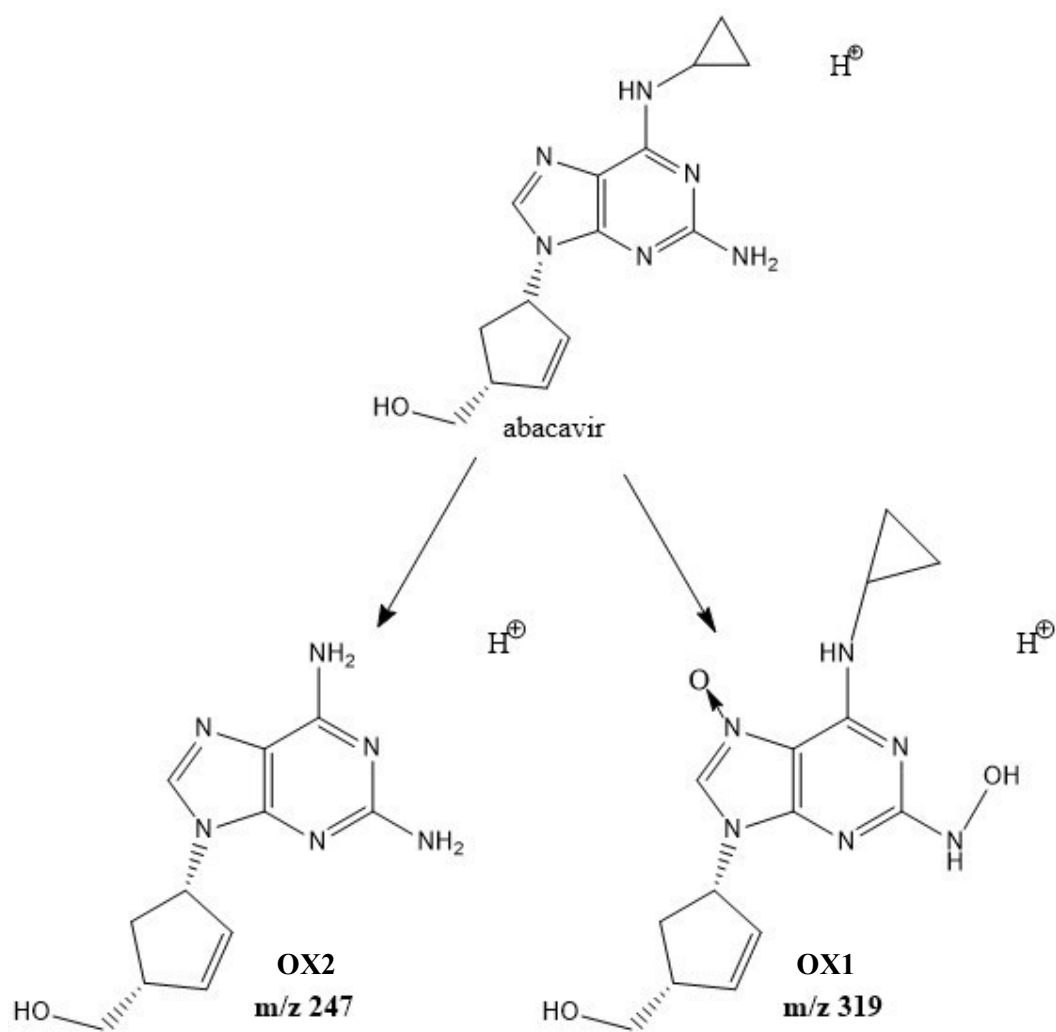
Oxidační produkty	Hmotnostní množství $m/z$ ( <i>amu</i> )	Relativní retenční čas ( <i>RR</i> ) /min
1. oxidační produkt (OX1)	319,00	0,388
2. oxidační produkt (OX2)	246,90	0,429



**Obrázek 16:** Hmotnostní spektrum produktu oxidační degradace OX1



**Obrázek 17:** Hmotnostní spektrum produktu oxidační degradace OX2



**Obrázek 18:** Struktury degradačních produktů OX2 a OX1 za použití elektrochemické oxidace.

## 4. Závěr

V rámci této bakalářské práce byla vyvinuta nová metoda oxidace abacaviru pomocí elektrolýzy za konstantního potenciálu. Degradace abacaviru na požadovanou hodnotu 20 % trvala při potenciálu 1,15 V cca 7 minut. Doba oxidace je výrazně kratší oproti běžně používané oxidaci peroxidem vodíku, která trvá řádově hodiny až dny. Dále byla ověřena opakovatelnost vyvinuté metody. Relativní směrodatná odchylka pěti po sobě jdoucích oxidačních degradací je 4,6 %. Elektrochemickou oxidací vznikly dva degradační produkty, které se shodují s produkty z literatury. První degradační produkt má hmotnost 319,00 *m/z* a druhý oxidační produkt 246,90 *m/z*. Pomocí literatury byla odhadnuta jejich struktura. Dále bylo zjištěno, že elektrochemická oxidace abacaviru byla vlivem excipientů zpomalena o 5 %.



- (1) Brummer, H.: How to Approach a Forced Degradation Study. *Life Sci*, 1–4vvvv (2011).
- (2) Blessy, M.; Patel, R. D.; Prajapati, P. N.; Agrawal, Y. K.: Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs. *J. Pharm. Anal.* 4 (3), 159–165 (2014).
- (3) Husain, A.: Forced Degradation Studies. *J. Anal. Pharm. Res.* 3 (6) (2016).
- (4) Ngwa, G.: Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. *Drug Deliv. Technol.* 10 (5), 4 (2010).
- (5) Alsante, K.; Ando, A.; Brown, R.; Ensing, J.; Hatajik, T.; Kong, W.; Tsuda, Y.: The Role of Degradant Profiling in Active Pharmaceutical Ingredients and Drug Products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (1), 29–37 (2007).
- (6) Alsante, K. M.; Martin, L.; Baertschi, S. W.: A Stress Testing Benchmarking Study. *Pharm. Technol.* 8 (2003).
- (7) Hervey, P. S.; Perry, C. M.: Abacavir: A Review of Its Clinical Potential in Patients with HIV Infection. *Drugs* . 60 (2), 447–479 (2000).
- (8) Vukkum, P.: Stress Degradation Behavior of Abacavir Sulfate and Development of a Suitable Stability-Indicating UHPLC Method for the Determination of Abacavir, Its Related Substances, and Degradation Products. *Sci. Pharm.* 80 (4), 903–921 (2012).
- (9) Bernardino de la Serna, J. I.; Xavier Zamora, F.; Luisa Montes, M.; García-Puig, J.; Ramón Arribas, J.: Hipertensión arterial, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y tratamiento antirretrovírico de gran actividad. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica.* 28 (1), 32–37 (2010).
- (10) Beneš, J.: *Infekční Lékařství*; Galén (2009).
- (11) Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; et al. DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 46 (D1), D1074–D1082 (2018).
- (12) *WHO Case Definitions of HIV for Surveillance and Revised Clinical Staging and Immunological Classification of HIV-Related Disease in Adults and Children.*; World Health Organization Geneva (2007).
- (13) Trávníček, R.: Důvody Dobrovolné Diagnostiky v Prevenci Přenosu Nákazy Virem HIV. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno (2014).
- (14) Rao, R. N.; Vali, R. M.; Ramachandra, B.; Raju, S. S.: Separation and Characterization of Forced Degradation Products of Abacavir Sulphate by LC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2), 279–285 (2011).

- (15) Kurmi, M.; Sahu, A.; Singh, S.: Stability Behaviour of Antiretroviral Drugs and Their Combinations. Characterization of Novel Degradation Products of Abacavir Sulfate by Mass and Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134, 372–384 (2017).
- (16) National Center for Biotechnology Information: Descyclopropyl Abacavir. *PubChem Database*. CID=130245 (2020).
- (17) Zhou, C.; Wang, Y.; Chen, J.; Xu, L.; Huang, H.; Niu, J.: High-Efficiency Electrochemical Degradation of Antiviral Drug Abacavir Using a Penetration Flux Porous Ti/SnO<sub>2</sub>-Sb Anode. *Chemosphere*. 225, 304–310 (2019).
- (18) Uslu, B.; Özkan, S. A.: Anodic Voltammetry of Abacavir and Its Determination in Pharmaceuticals and Biological Fluids. *Electrochimica Acta*. 49 (25), 4321–4329 (2004).
- (19) Wu, Y.; Levons, J.; Narang, A. S.; Raghavan, K.; Rao, V. M.: Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug–Excipient Incompatibility. *AAPS PharmSciTech*. 12 (4), 1248–1263 (2011).
- (20) Waterman, K. C.; Adami, R. C.; Alsante, K. M.; Hong, J.; Landis, M. S.; Lombardo, F.; Roberts, C. J.: Stabilization of Pharmaceuticals to Oxidative Degradation. *Pharm. Dev. Technol.* 7 (1), 1–32 (2002).
- (21) Skoog, A.: *Analytická Chemie*; VŠCHT: Praha (2019).
- (22) Kalous, V.: *Základy Fyzikálně Chemických Metod*; Praha (1963).
- (23) Bačová, V.: Stanovení Kyseliny Askorbové a Fosforečnanů Coulometricky. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno (2010).
- (24) Li, Y. B.; Trush, M. A.: Oxidation of Hydroquinone by Copper: Chemical Mechanism and Biological Effects. *Arch. Biochem. Biophys.* 300 (1), 346–355 (1993).