

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Filip Vymyslický

Validace HPLC metody stanovení čistoty sofosbuviru a její  
převod na UPLC systém

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jakub Heřt

Praha 2017

## **PROHLÁŠENÍ**

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15.8.2017

.....

podpis

## **ABSTRAKT**

Cílem této bakalářské práce byla validace HPLC metody na stanovení čistoty sofosbuviru a její následný převod na UPLC systém.

Do plánu validace byly zahrnuty tyto parametry: test způsobilosti systému, robustnost, přesnost, linearita, výtěžnost, mez detekce a mez stanovitelnosti. Robustnost byla testována za pomoci přístupu design of experiments.

Po provedení validace byl proveden převod metody z HPLC systému na UPLC systém. Převoditelnost byla ověřena randomizačním testem, který byl vyhodnocen statistickými metodami a to párovým T-testem a korelační analýzou.

## **ABSTRACT**

The aim of this bachelor thesis was validation of HPLC method for determination of purity of sofosbuvir and its transfer to UPLC system.

The parameters included in the validation plan were: the system suitability test, robustness, accuracy, linearity, recovery, limit of detection, and limit of quantification. Robustness was tested by the design of experiments approach.

Method was transferred from the HPLC system to the UPLC system. The transfer was performed by randomization test, which was evaluated by statistical methods, namely by pairwise T-test and correlation analysis.

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat svému konzultantovi Mgr. Jakubu Heřtovi za trpělivost a pomoc, užitečné rady a čas který obětoval při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D za odborné vedení a hlavně za trpělivost při vypracování této bakalářské práce.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk, symbolů .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Cíl práce .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Teoretická část.....</b>	<b>12</b>
3.1. Sofosbuvir .....	12
3.2. Metody stanovení sofosbuviru.....	13
3.3. Validace.....	13
3.3.1. Test způsobilosti systému.....	14
3.3.2. Robustnost.....	14
3.3.3. Přesnost .....	14
3.3.4. Linearita.....	14
3.3.5. Výtěžnost .....	15
3.3.6. Mez detekce .....	15
3.3.7. Mez stanovitelnosti.....	15
3.4. Srovnání HPLC a UPLC systému .....	15
3.5. Statistické zpracování dat .....	17
3.5.1. Design of experiments .....	17
3.5.2. Korelační analýza .....	17
3.5.3. Párový T-test .....	18
<b>4. Experimentální část .....</b>	<b>20</b>
4.1. Materiály a pomůcky .....	20
4.1.1. Chemikálie .....	20
4.1.2. Přístroje a pomůcky .....	24
4.2. HPLC metoda pro hodnocení čistoty sofosbuviru .....	25
4.3. Design of experiments .....	28
4.4. Validace .....	29
4.4.1. Robustnost.....	29
4.4.2. Přesnost .....	29
4.4.3. Linearita.....	30
4.4.4. Výtěžnost .....	31
4.4.5. Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	32
4.5. Převod HPLC metody na UPLC systém.....	32

<b>5. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>35</b>
5.1. Validace .....	35
5.1.1. Robustnost.....	35
5.1.2. Přesnost .....	39
5.1.3. Linearita.....	40
5.1.4. Odezvový faktor .....	42
5.1.5. Výtěžnost .....	42
5.1.6. Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	43
5.2. Převod HPLC metody a její statistické vyhodnocení .....	44
5.2.1. Párový T-test .....	45
5.2.2. Korelační analýza .....	47
<b>6. Závěr.....</b>	<b>49</b>
<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>51</b>
<b>Přílohy .....</b>	<b>53</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

WHO	World health organization Světová zdravotnická organizace
DOE	Design of experiments Metoda plánovaných experimentů
OFAT	One factor at a time Jeden faktor v čase
HPLC	High-performance liquid chromatography Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie UltraPerformance Liquid Chromatography
SST	System suitability test Test způsobilosti systému
RSD	Relative standard deviation Relativní směrodatná odchylka
LOD	Limit of detection Mez detekce
LOQ	Limit of quantification Mez stanovitelnosti
DAD	Diode array detector Detektor diodového pole
MS	Mass spectrometer Hmotnostní spektrometr
MF	Mobilní fáze
VIP	Variable importance in projection Projekce významnosti proměnných



## Seznam použitých symbolů

$r$	Korelační koeficient
$r^2$	Koeficient determinace
$H$	Hypotéza
$R$	Testovací statistika
$\bar{Z}$	Rozdíl středních hodnot
$\bar{X}$	Soubor hodnot
$S_z$	Směrodatná odchylka
$c$	Koncentrace
$S$	Směrnice kalibrační závislosti
$\sigma$	Průměrná výška šumu
$t_\alpha(n - 1)$	Kritická hodnota t rozdělení

# 1 ÚVOD

Sofosbuvir je účinná látka, která je aktivní složkou léčebného přípravku Sovaldi, který slouží k léčbě hepatitidy typu C. Sofosbuvir se nachází na seznamu základních léků Světové zdravotnické organizace (WHO)<sup>1</sup>. Z důvodu kontroly kvality vstupních surovin a lékové formy je nezbytné mít k dispozici spolehlivou analytickou metodu stanovení sofosbuviru a jeho nečistot. Validace metody se provádí za účelem zdokumentovat kvalitu analytické metody a potvrdit její schopnost poskytovat správné výsledky.

Převod metody z HPLC systému na UPLC systém se provádí zejména z důvodů kratší doby analýzy a snížení nákladů v důsledku menší spotřeby rozpouštědel. Převod metody má také vliv na její vlastnosti, jako zvýšení separační účinnosti a citlivosti nebo snížení meze detekce. Převoditelnost metody je ale nutné ověřit, zda podává stejné výsledky na obou systémech. Ověření se provádí randomizačním testem a jeho následném vyhodnocení pomocí statistických metod.

## **2 Cíl práce**

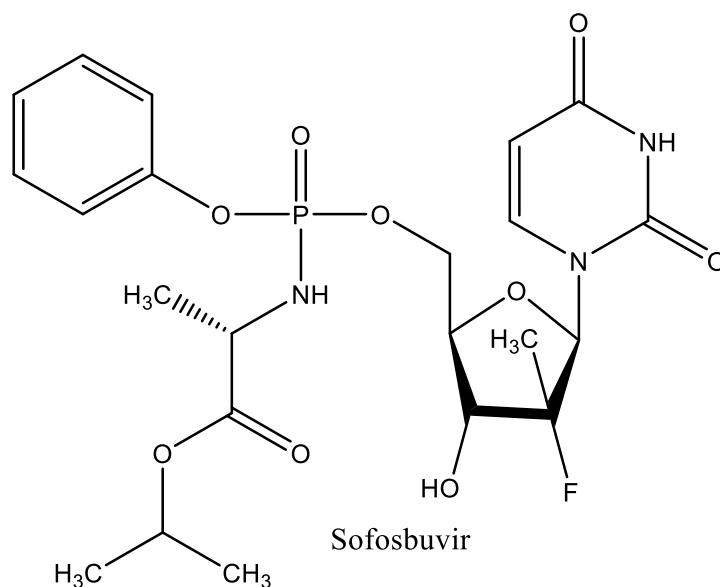
Cílem této bakalářské práce byla validace HPLC metody na zjištění čistoty sofosbuviru a její převod na UPLC systém.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Sofosbuvir

Sofosbuvir byl objeven v roce 2007. Používá se pro léčbu hepatitidy typu C. Doporučuje se užívat v kombinaci s jinými léčivy jako je například ribavirin nebo ladipasvir<sup>2</sup>.

Komerčně se prodává pod názvem Sovaldi o obsahu sofosbuviru 400 mg v potahovaných tabletách<sup>3</sup>. Sofosbuvir je bílý prášek. Molekulová hmotnost sofosbuviru je 529,453 g/mol a jeho sumární vzorec je  $C_{22}H_{29}FN_3O_9P$ . Struktura sofosbuviru je znázorněna na **Obr. 1**.



**Obr. 1** Struktura sofosbuviru.

### 3.2 Metody stanovení sofosbuviru

Pro stanovení sofosbuviru již bylo vytvořeno a zvalidováno několik chromatografických metod. Jedna z metod, kterou se stanovuje čistota sofosbuviru byla vytvořena pro systém HPLC-UV. Sofosbuvir je detekován na UV detektoru při vlnové délce 245 nm. Pro tuto metodu byla použita kolona Luna C8 (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm,) a jako mobilní fáze (MF) byl použit pufr octanu amonného o pH 7 a acetonitril v poměru 35:65. Celková doba analýzy byla 20 min<sup>4</sup>.

Metoda pro stanovení sofosbuviru je metoda na systému LC-MS/MS. K analýze byla použita kolona Xterra MS C8 (5  $\mu\text{m}$ , 50  $\times$  4,6 mm) a jako mobilní fáze byl použit mravenčan amonný o pH 3,5 a směs methanolu a acetonitrilu. Doba analýzy této metody byla 5 minut<sup>5</sup>.

V další metodě pro stanovení sofosbuviru na systému LC-MS/MS byla použita kolona: Inertsil ODS-3 C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm). Mobilní fáze v této metodě byla tvořena směsí methanolu a vody v poměru 70:30 a doba analýzy byla 5,5 minuty<sup>6</sup>.

Pro stanovení sofosbuviru na stejném systému jako u předchozí metody byla použita kolona Zorbax eclipse plus C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  4.6 mm), doba analýzy byla 2,8 minuty. Mobilní fáze v této metodě byla tvořena pufr octanu amonného o pH 4<sup>7</sup>.

Na UPLC systém s detekcí MS/MS byla vytvořena metoda s dobou analýzy 1 minuta. V této metodě byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ , 50  $\times$  2.1 mm) a jako mobilní fáze byla použita směs kyseliny mravenčí a acetonitrilu.

V další metodě na systém UPLC-MS/MS byla jako MF použita stejná směs a kolona jako v předchozí metodě, ale doba analýzy byla 3 minuty<sup>8</sup>.

### 3.3 Validace

Validace metody pro kapalinovou chromatografii je proces, který se provádí za účelem prokázat a dokumentovat kvalitu analytické metody za pomoci určení validačních parametrů a měření jejich hodnot. Mezi validační parametry HPLC v farmaceutické analýze patří přesnost, výtěžnost, linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti, selektivita nebo robustnost<sup>11</sup>. Validací metody jsme schopni vymezit hranice jejího použití, kdy je nám schopna podat spolehlivé výsledky.

Validaci musíme provádět při zavádění nové metody, revalidaci systému, při kontrole systému či zavedení metody stanovení publikované v Českém lékopise<sup>10</sup>.

### **3.3.1 Test způsobilosti systému**

Test způsobilosti systému (system suitability test SST) je nedílnou součástí HPLC metody. Provádí se na začátku každého měření. Slouží k ověření, zda systém funguje správně a spolehlivě. Při SST nejčastěji sledujeme opakovatelnost nástřiku, rozlišení, retenci a faktor symetrie. Tyto parametry se vyhodnocují pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) v našem případě pro 10 měření.

### **3.3.2 Robustnost**

Robustnost metody je schopnost metody poskytovat správné výsledky při malých změnách parametrů jako jsou průtok, pH nebo změnou pracovního postupu. Robustnost je tedy spolehlivost metody při běžném používání<sup>11</sup>.

### **3.3.3 Přesnost**

Přesnost metody představuje míru shody mezi vzájemně nezávislými výsledky za předem specifikovaných podmínek<sup>11</sup>. Přesnost je závislá jen na rozdělení náhodných chyb bez vztahu k pravé hodnotě. Vyhodnocujeme ji z minimálně 6 nezávislých zkoušek jako relativní směrodatnou odchylku.

### **3.3.4 Linearita**

Linearita popisuje nakolik se závislost mezi odezvou instrumentace a koncentrací analytu blíží lineární závislosti. Korelační koeficient  $r$  vyjadřuje těsnost vzájemné závislosti. V ideální případě, kdy je závislost mezi odezvou instrumentace a koncentrací analytu lineární nabývá korelační koeficient hodnoty 1. V reálném systému platí, že čím více se korelační koeficient blíží jedné, tím je závislost odezvy instrumentace na koncentraci analytu těsnější<sup>12</sup>.

### 3.3.5 Výtěžnost

Výtěžnost metody je definována jako podíl mezi hodnotou koncentrace analytu měřené danou metodou a hodnotou skutečné koncentrace analytu<sup>11</sup>. Hodnota výtěžnosti se nejčastěji udává jako desetinný zlomek nebo v procentech.

### 3.3.6 Mez detekce

Mez detekce (LOD) je nejmenší koncentrace analytu, kterou jsme schopni detekovat za pomoci dané metody<sup>11</sup>. Hodnota LOD odpovídá nejnižší koncentraci, jejíž analytický signál se statisticky významně liší od šumu. LOD vyjadřujeme jako trojnásobek velikosti šumu základní linie.

### 3.3.7. Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti (LOQ) určuje nejmenší koncentraci analytu, kterou jsme schopni danou metodou stanovit s přijatelnou správností a přesností<sup>11</sup>. LOQ vyjadřujeme jako desetinásobek velikosti šumu základní linie.

## 3.4 Srovnání HPLC a UPLC systému

UPLC uspořádání systému je dalším krokem ve vývoj HPLC. Principiálně jsou UPLC a HPLC založeny na stejném mechanismu, jelikož to jsou obě chromatografické metody<sup>13</sup>. Z Van Deemeterovy křivky, která ukazuje závislost výšky ekvivalentu teoretického patra na průtoku mobilní fáze, kde velikost částic kolony je jednou z proměnných lze vyčíst, že zmenšením velikosti částic dojde ke zmenšení výšky ekvivalentu teoretického patra a tím zkrácení doby analýzy a zlepšení separační účinnosti<sup>14</sup>. Proto dalším krokem vývoje HPLC bylo zmenšování částic uvnitř chromatografických kolon. To mělo za následek zvyšování tlaku na koloně, které HPLC systém nemohl unést.

Postupem času a zaváděním nových technologií došlo k vyvinutí UPLC systémů. Kolony jsou naplněny malými sférickými částicemi. Obvykle platí, že čím menší částice, tím větší specifický povrch, na kterém probíhá separace látek a tím pádem lepší separační

účinnost a rychlost separace. U HPLC kolon se obvykle používají kolony o velikosti částic 2,5-5  $\mu\text{m}$ . Při vývoji a výrobě nových stacionárních fází se dbá na zmenšování částic stacionární fáze v koloně, a tudíž se při výrobě kolon pro UPLC systém velikost částic stacionární fáze pohybuje okolo 2  $\mu\text{m}$ <sup>15</sup>.

Separace při UPLC chromatografii probíhá za velmi vysokých tlaků až 100 MPa, přičemž vysoký tlak nemá vliv na kolonu ani na ostatní součásti systému. Zato u HPLC chromatografie dosahuje tlak maximálních hodnot okolo 35-40 MPa, z čehož vyplývá, že HPLC má oproti UPLC nižší separační účinnost<sup>16</sup>. Dalším důvodem, proč se UPLC systém v posledních letech upřednostňuje před HPLC systémem, je kratší doba analýzy, která je také způsobena zmenšením ekvivalentu teoretického patra pomocí zmenšování částic stacionární fáze a tím pádem i menší spotřeba rozpouštědel.

V **Tab. 1** je znázorněno porovnání některých vlastností HPLC a UPLC systémů. Převod metody, je-li zachována stejná stacionární fáze jako v našem případě, lze provést pomocí několika jednoduchých rovnic nebo za pomoci kalkulátoru, jako je například Thermo Scientific Method transfer recommendations<sup>17</sup>.

Při převodu metody se mění tyto parametry: průtok, nástřik a doba analýzy a tím pádem i gradientový program. Po převedení HPLC metody na UPLC systém je třeba ověřit, zda oba systémy podávají stejné výsledky.

**Tab. 1** Porovnání vlastností HPLC a UPLC systémů.

Technické údaje	UPLC	HPLC
Tlak	100 MPa	40 MPa
Velikost částic	1,7 $\mu\text{m}$	5 $\mu\text{m}$
Délka kolony	50-100 mm	100-250 mm
<b>Chromatografické vlastnosti</b>		
Čas analýzy	-	+
Spotřeba rozpouštědel	-	+
Spotřeba vzorku	-	+
Účinnost separace	+	-
Mez detekce	-	+
Citlivost	+	-
Rozlišení	+	-



## 3.5 Statistické metody

### 3.5.1 Design of experiments

Design of experiments (DOE) neboli metoda plánovaných experimentů je statistická metoda sloužící k efektivnímu získávání dat<sup>18</sup>. Na rozdíl od přístupu one factor at a time (OFAT), kde dochází ke změně pouze jednoho faktoru a ostatní faktory jsou konstantní, se při přístupu DOE mění více faktorů najednou. Při přístupu DOE oproti přístupu OFAT dojde k prozkoumání větší části experimentálního prostoru a tudíž může odhalit oblasti experimentálního prostoru, které při přístupu OFAT mohou být zanedbány. Další výhodou přístupu DOE je menší časová náročnost oproti přístupu OFAT, protože při přístupu DOE prozkoumáme větší část experimentálního prostoru za provedení menšího množství experimentů než při přístupu OFAT<sup>19</sup>. V této bakalářské práci byl přístup DOE použit při zkoumání robustnosti analytické metody na stanovení čistoty sofosbuviru.

### 3.5.2 Korelační analýza

Korelační analýza je nástroj na zkoumání vzájemné závislosti mezi souborem hodnot na ose X a Y<sup>20</sup>. Pro ověření existence vzájemné závislosti mezi proměnnými se využívá korelačního koeficientu  $r$ , což je odmocnina z koeficientu determinace  $r^2$ . Korelační koeficient může nabývat hodnot od -1 do 1. Čím více se absolutní hodnota korelačního koeficientu blíží 1, tím je závislost těsnější<sup>21</sup>. Je-li absolutní hodnota korelačního koeficientu rovna 1, hodnoty leží na přímce. Naopak, je-li absolutní hodnota korelačního koeficientu 0, není mezi body žádný lineární vztah<sup>22</sup>. Korelační koeficient lze vypočítat za pomoci programu Microsoft Excel za použití funkce „correl“, nebo za pomoci vztahu uvedeného pod tímto odstavcem.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$$

Dalším nástrojem, který byl použit pro hodnocení analýzy byl Bland-Altmanův diagram, který znázorňuje grafickou závislost rozdílu výsledků dvou měření, v našem případě na HPLC a UPLC systému pro jeden vzorek, na průměru výsledků obou měření<sup>23</sup>.

### 3.5.3 Párový T-test

Párový T-test rovnosti středních hodnot je statistická metoda pro porovnání dvou spárovaných souborů hodnot. Pomocí této statistické metody můžeme ověřit některou z následujících hypotéz  $H_0$ ,  $H_1$ <sup>24</sup>.

$H_0$ :  $\mu_1 = \mu_2$  střední hodnoty porovnávaných souborů se statisticky významně neliší

$H_1$ :  $\mu_1 \neq \mu_2$  střední hodnoty porovnávaných souborů se statisticky významně liší

Pro potvrzení jedné nebo druhé hypotézy musíme nejdříve vypočítat rozdíl  $\bar{Z}$  středních hodnot  $\bar{X}_1$  a  $\bar{X}_2$  obou souborů.

$$\bar{Z} = \bar{X}_1 - \bar{X}_2$$

$$\bar{X}_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_{1i}$$

$$\bar{X}_2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_{2i}$$

Dále je nutné vypočítat testovací statistiku  $R$ , podle vztahu:

$$R = \frac{\bar{Z}}{S_Z} \sqrt{n}$$

Kde  $S_Z$  je směrodatná odchylka veličiny  $Z$ , která se vypočítává podle vztahu

$$S_Z = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2} \quad Z_i = X_{1i} - X_{2i}$$

Z vypočtené hodnoty testovací statistiky  $R$  můžeme na základě vztahu potvrdit nebo zamítnout jednu z hypotéz.

$$|R| < t_{\alpha}(n - 1)$$

Kde  $t_{\alpha}(n - 1)$  je kritická hodnota  $t$  rozdělení s  $n-1$  stupněm volnosti, kterou je možné najít v tabulkách. Pokud je absolutní hodnota testovací statistiky  $R$  menší než kritická hodnota  $t$  rozdělení s  $n-1$  stupněm volnosti, můžeme zamítnout hypotézu  $H_1$  a prohlásit na základě platné hypotézy  $H_0$ , že oba spárované soubory dat poskytují stejné výsledky.

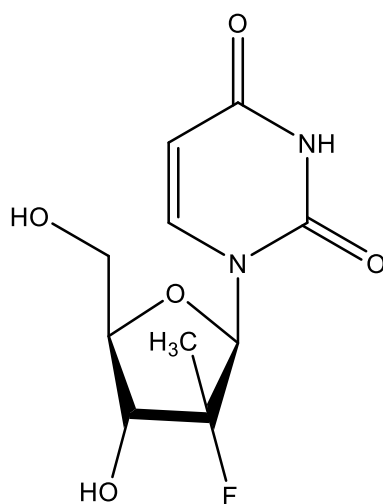
## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál a pomůcky

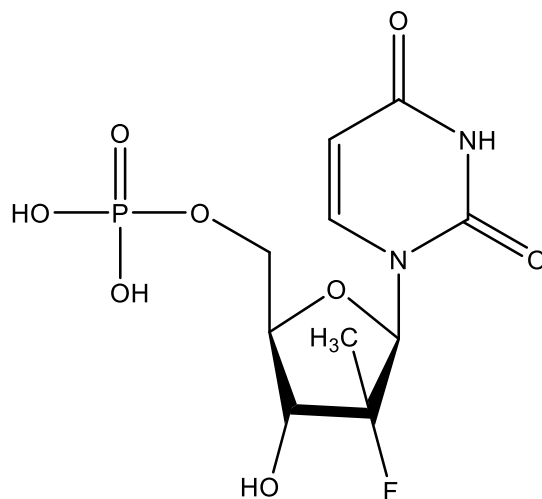
#### 4.1.1 Chemikálie

- Methanol Ultra gradient HPLC grade, J.T.BAKER, Nizozemsko
- Acetonitril Ultra gradient HPLC grade, J.T.BAKER, Japonsko
- Dihydrogenfosforečnan amonný, SIGMA-ALDRICH, EU
- Roztok kyseliny fosforečné 10 % připravený ředěním z 85 % roztoku kyseliny fosforečné, SIGMA-ALDRICH, EU
- Roztok hydroxidu amonného 10 % připravený ředěním z 25 % roztoku hydroxidu amonného, PENTA, Česká Republika
- Deionizovaná voda připravená pomocí přístroje Milli Q o měrném elektrickém odporu 18.2 MΩ•cm
- Sofosbuvir forma I ZENTIVA a.s.
- Nečistoty Sofosbuviru
  - F-Cukr
  - Di-OH
  - Triazindiol
  - Des-Isopropyl
  - Des-Alanin
  - Des-Phenyl
  - S,R-Sofosbuvir
  - Di-iPRP

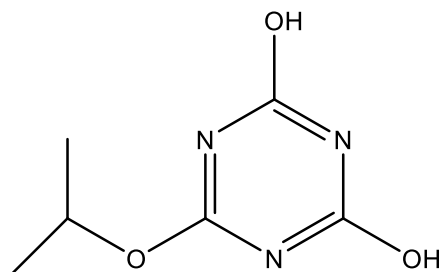
Na obrázcích **Obr.2-8** jsou vyobrazeny struktury nečistot.



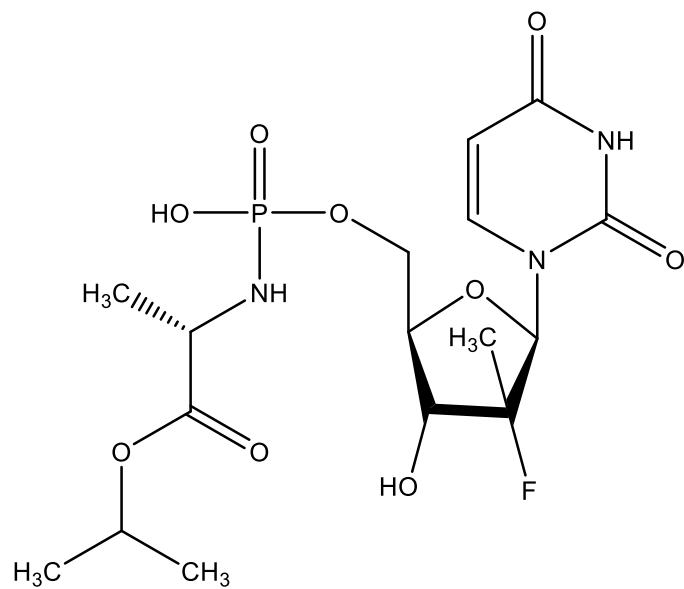
**Obr. 2** Struktura nečistoty F-Cukr.



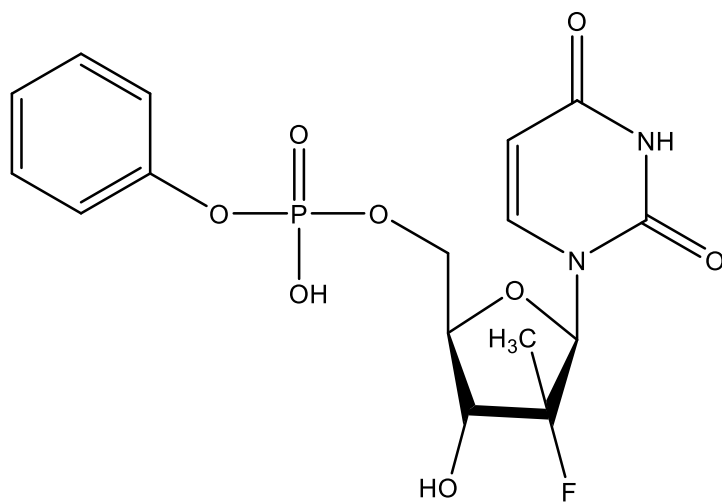
**Obr. 3** Struktura nečistoty Di-OH.



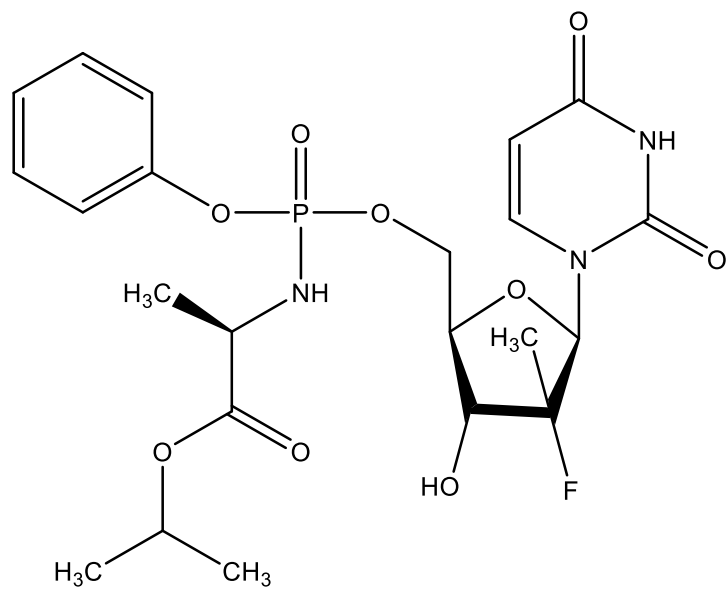
**Obr. 4** Struktura nečistoty Triazindiol.



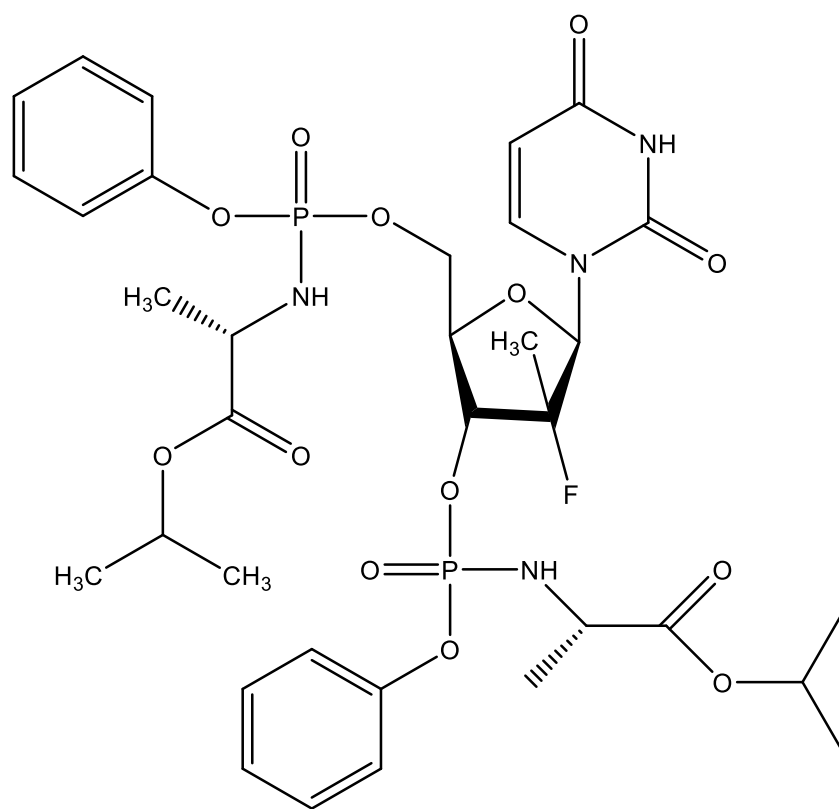
**Obr. 5** Struktura nečistoty Des-Phenyl.



**Obr. 6** Struktura nečistoty Des-Alanin.



**Obr. 7** Struktura enantiomeru S,R-Sofosbuvir.



**Obr. 8** Struktura nečistoty Di-IPRP.

## 4.1.2 Přístroje a pomůcky

- Digitální váha Sartorius MC 1LC 2200 P
- Analytická váha AT-261 Delta Range, Mettler Toledo
- Ultrazvuková lázeň Kraintex K-6LE
- Centrifuga MPW-65R, MPW
- pH meter Seven Compact, Mettler Toledo
- Automatická pipeta Pipetman, Gilson
- Laboratorní sklo
- Software Modde Pro, Umetrics
- Sada nástrojů Microsoft Office 2016
- Kolony
- HPLC Stará XBridge BEH C8 2,5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 $\times$ 100 mm  
(provedeno přes 150 nástřiků)
- HPLC Nová XBridge BEH C8 2,5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 $\times$ 100 mm
- UPLC Acquity UPLC BEH C8 1,7  $\mu\text{m}$ ; 2,1 $\times$ 100 mm
- Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity
  - Vysokotlaké čerpadlo G4220A
  - Autosampler G4226A
  - Termostat G4220A
  - DAD detektor G4212A
  - Software Empower
- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series
  - Vysokotlaké čerpadlo G1311A QuatPump
  - Odplyňovač G1322A Degasser
  - Autosampler G1329A ALS
  - Termostat G1316A Colcom
  - DAD detektor G1315B DAD
  - Software Empower



## 4.2 HPLC metoda pro hodnocení čistoty Sofosbuviru

Metodu, jejíž validace je předmětem této bakalářské práce, jsem převzal od Ing. Jakuba Petříka z Vysoké školy chemicko-technologické<sup>25</sup>. Ukázkový chromatogram, na kterém jsou vidět jednotlivé píky nečistot a sofosbuviru, je uveden v příloze 1.

### Sofosbuvir čistota

Vytvořeno Jakubem Petříkem

#### Přístroj

HPLC systém s kvartérní pumpou, kolonovým termostatem, autosamplerem, UV detektorem a data stanicí

#### Chemikálie

---

Methanol

---

Dihydrogenfosforečnan amonný

---

Voda pro chromatografii

---

**Tab. 2 Podmínky separace**

Kolona:	XBridge BEH C8 2,5 $\mu$ m; 4,6 $\times$ 100mm
Mobilní fáze:	Složka A a složka B dle gradientového programu
Složka A:	10mM fosforečnanový pufr pH 2,5 Rozpustí se 1,15 g dihydrogenfosforečnanu amonného R ve 1000ml vody pro chromatografii a pH se upraví pomocí kyseliny fosforečné na 2,5
Složka B:	Methanol
Průtok mobilní fáze:	0,8 ml/min
Objem nástřiku:	7,0 $\mu$ l
Doba analýzy	24 min
Teplota na koloně:	50°C
Vlnová délka detekce:	220nm

**Tab. 3 Gradientový program**

Čas [min]	Složka A [%]	Složka B [%]
0,0	90	10
3,0	90	10
14,0	10	90
18,0	10	90
19,0	90	10
24,0	90	10

**Rozpouštědlo vzorku**

10 % methanol

### **Roztok vzorku**

Naváží se 10 mg sofosbuviru do 10 ml odměrné baňky a doplní se rozpouštědlem vzorku po rysku. Následně se vzorek umístí do ultrazvuku na dobu 20 min.

### **Retenční časy aktivní látky a nečistot (přibližné)**

- F-cukr: 2,58 min
- Di-OH: 4,24 min
- Triazindiol: 4,73 min
- Des-Isopropyl: 8,42 min
- Des-Alanin: 9,12 min
- Des-Phenyl: 10,11 min
- S,R-Sofosbuvir: 12,55 min
- Sofosbuvir: 12,85 min
- Di-iPRP: 15,20 min

### **Hodnocení**

Metoda vnitřní normalizace

### 4.3 Design of experiments

V softwaru MODDE Pro bylo navrženo 9 experimentů, jejichž přehled je v **Tab. 5**. Schéma pokusů bylo vygenerováno na základě určených faktorů, které jsou shrnuty v **Tab. 4**.

**Tab. 4** Tabulka faktorů, které byly zahrnuty do DOE.

Kolony	Stará XBridge BEH C8 2,5 $\mu$ m; 4,6x100 mm Nová XBridge BEH C8 2,5 $\mu$ m; 4,6x100 mm
pH	2,5 $\pm$ 0,5
Průtok	0,80 ml/min $\pm$ 0,05 ml/min
Teplota	50 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C
Složka B v MF	$\pm$ 2 %

**Tab. 5** Tabulka naplánovaných experimentů za pomoci přístupu DOE

Označení experimentu	Název experimentu	Kolona	pH	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Průtok [ml/min]	Složka B v MF [%]
1	N1	Stará	2,0	45	0,85	2
2	N2	Nová	2,0	45	0,75	-2
3	N3	Stará	3,0	45	0,85	-2
4	N4	Nová	3,0	45	0,75	2
5	N5	Stará	2,0	55	0,75	2
6	N6	Nová	2,0	55	0,85	-2
7	N7	Stará	3,0	55	0,75	-2
8	N8	Nová	3,0	55	0,85	2
9	N9	Stará	2,5	50	0,80	0

Za pomoci softwaru MODDE Pro byla vyhodnocena tato kritéria:

- Symetrie hlavního píku sofosbuviru
- Rozlišení všech píku
- Retenční čas všech píku

Pro měření všech vygenerovaných experimentů byla použita metoda pro stanovení čistoty sofosbuviru, která byla vytvořena Ing. Jakubem Petříkem. Tato metoda je uvedena v kapitole **3.2**.

## 4.4 Validace

Při validaci analytické metody byly testovány následující parametry: robustnost, přesnost, linearita, výtěžnost, odezvoový faktor, mez detekce a mez stanovitelnosti.

### 4.4.1 Test způsobilosti systému

Test způsobilosti systému byl proveden před každým měřením. Nástřik vzorku obsahující sofosbuvir a jeho nečistoty byl proveden 10× a následně se hodnotilo rozlišení a symetrie píků. Na základě testování robustnosti bylo do testu způsobilosti systému přidáno sledování rozlišení kritických párů Di-OH - trianzdiol a S,R-sofosbuvir - sofosbuvir.

### 4.4.1 Robustnost

Pomocí software MODDE Pro byl vytvořen plán experimentů zahrnujících tyto faktory: opotřebovanost kolony, teplota, průtok mobilní fáze, zastoupení organické složky v mobilní fázi a pH. Plán těchto experimentů je uveden v **Tab. 5**. Vzorek obsahující směs všech nečistot o koncentraci 1 mg/ml a sofosbuviru byl analyzován pomocí metody na stanovení čistoty sofosbuviru. Z chromatogramů jsme vyhodnotili retenční časy, rozlišení a symetrii píku sofosbuviru.

### 4.4.2 Přesnost

Pro test přesnosti analytické metody bylo připraveno 6 vzorků (označených PS1-PS6) o koncentraci 10 mg/ml navážením 10 mg sofosbuviru do 10 ml odměrné baňky a doplněním po risku 10 % roztokem methanolu. Baňky s připraveným roztokem byly vloženy do ultrazvukové lázně na 20 min. Přesné navážky sofosbuviru při přípravě jednotlivých vzorků jsou uvedeny v **Tab. 6**.

Vyhodnocení bylo provedeno metodou vnitřní normalizace z ploch píků nečistot, kde relativní směrodatná odchylka (RSD) nesměla přesáhnout 5 %.

**Tab. 6** Navážky sofosbuviru pro hodnocení přesnosti metody.

Označení vzorku	Navážka (mg)
PS 1	10,04
PS 2	10,06
PS 3	10,16
PS 4	9,98
PS 5	9,98
PS 6	10,20

#### 4.4.3 Linearita

K ověření linearity byl připraven zásobní roztok sofosbuviru a nečistoty des-alaninu na koncentrační hladině odpovídající 150 % koncentrace očekávané v reálném vzorku. Postupným ředěním zásobního roztoku bylo připraveno dalších 11 roztoků o hladinách (150 %-0,05 %) viz **Tab. 7**. Zásobní roztok byl připraven diferenčním navážením 30,22 mg sofosbuviru a 30,07 mg des-alaninu do 20 ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn po rysku 10 % roztokem methanolu a vložen do ultrazvukové lázně po dobu 20 minut.

K vyhodnocení linearity byly použity plochy píků. Jako výpovědní hodnota linearity byl použit korelační koeficient  $r$ . Hodnota korelačního koeficientu pro sofosbuvir by neměla klesnout pod 0,999 a pro des-alanin pod hodnotu 0,997.

**Tab. 7** Tabulka koncentračních hladin a koncentrací sofosbuviru a des-alaninu ve vzorcích pro hodnocení linearity.

Koncentrační hladina (%)	Koncentrace (mg/ml)
150	15
100	10
75	7,5
50	5
25	2,5
10	1
5	0,5
1	0,1
0,5	0,05
0,25	0,025
0,1	0,01
0,05	0,005

#### 4.4.4. Výtěžnost

K měření výtěžnosti byla vytvořena sada roztoků o koncentracích sofosbuviru odpovídajících 99,95 %, 99,5 %, 95 %, 50 %, 5 %, 0,5 % a 0,05 % hodnoty očekávané u reálných vzorků. K těmto vzorkům bylo přidáno odpovídající množství des-alaninu do hodnoty 100 %. Tato řada roztoků byla připravena v triplicátu. Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky sofosbuviru o koncentrační hladině 100 % navážením 20,04 mg sofosbuviru a rozpuštěním v 20 ml odměrné baňce doplněné po rysku 10 % roztokem methanolu. Stejným způsobem byl připraven zásobní roztok nečistoty des-alaninu, navážením 20,32 mg a rozpuštěním v 20 ml odměrné baňce doplněné po rysku 10 % roztokem methanolu. Tyto zásobní roztoky byly dále 20× ředěny do objemu 20 ml.

Výtěžnost byla vyhodnocena za pomoci vnitřní normalizace z teoretické a skutečné procentuální koncentrace vypočtené z ploch píků, přičemž na plocha píku des-alaninu byla korigována odezvoovým faktorem. Výtěžnost byla vypočítaná podle vzorce, kam jsme koncentraci zadávali v procentech hodnoty očekávané v reálném roztoku.

$$\text{Výtěžnost} = \frac{C_{\text{skutečná}}}{C_{\text{teoretická}}} * 100$$

Výsledky testu výtěžnosti musely splňovat stanovené limity uvedené v **Tab. 8**.

**Tab. 8** Tabulka limitů, které musí výtěžnost splňovat.

Výtěžnost	RSD	Koncentrace
98,0-102,0 %	≤ 2,0 %	10 %-100 %
95,0-105,0 %	≤ 3,0 %	1,0 %-10 %
90,0-110,0 %	≤ 5,0 %	0,1 %-1,0 %
85,0-115,0 %	≤ 7,0 %	0,03 %-0,10 %

#### 4.4.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Při zjišťování LOD a LOQ byl pro měření použit slepý vzorek, tedy 10 % roztok methanolu. Na chromatogramu byla vyhodnocena průměrná hodnota šumu v okolí hlavního píku sofosbuviru a nečistoty des-alaninu ± 5 min. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly následně vypočítány podle následujících vzorů.

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{slope}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{slope}$$

Kde  $\sigma$  je průměrná výška šumu a slope je směrnice lineární kalibrační závislosti, vypočítaná z výšky píku.

#### 4.5 Převod HPLC metody na UPLC systém

V programu MS excel byl vytvořen soubor 20 náhodných hodnot (**Tab.9**) v intervalu 0-1 %. Hodnoty uvedené v **Tab.9** vyjadřují relativní koncentraci des-alaninu vztaženou ke koncentraci sofosbuviru na 100 % koncentrační hladině, tedy 10 mg/ml.

Pro vytvoření tohoto souboru roztoků byl připraven zásobní roztok sofosbuviru o koncentraci 10 mg/ml diferencíálním navážením 250,72 mg sofosbuviru a doplněním po rysku 10 % roztokem methanolu do 250 ml odměrné baňky. Dále byl připraven zásobní roztok des-alaninu o koncentraci 10 mg/ml diferenčním navážením 20,07 mg do 20 ml



odměrné baňky a doplnění po rysku 10 % roztokem methanolu. Oba zásobní roztoky byly po dobu 20 minut ponořeny do ultrazvukové lázně. Ze zásobního roztoku des-alaninu byl odebrán 1 ml pomocí automatické pipety a převeden do 20 ml odměrné baňky a doplněn po rysku roztokem 10 % methanolu. Takto byl připraven 20x ředěný roztok des alaninu k přípravě 20 vzorků pro test přenositelnosti metody. Do 10 ml odměrných baněk označených 1-20 byl přidán zásobní roztok sofosbuviru. Podle **Tab.9.** byl do každé z 20 odměrných baněk pipetován pomocí automatické pipety 20× ředěný roztok des-alaninu. Odměrné baňky byly poté doplněny po rysku 10 % roztokem methanolu.

**Tab. 9** Relativní koncentrace des-alaninu a objemy 20× zředěného zásobního roztoku použité pro přípravu roztoků k randomizačnímu testu.

Číslo vzorku	Relativní koncentrace des-alaninu [%]	Objem 20× ředěného roztoku des-alaninu [μl]
1	0,50	1000
2	0,26	523
3	0,70	1417
4	0,97	1949
5	0,91	1843
6	0,58	1172
7	0,09	191
8	0,20	397
9	0,81	1628
10	0,31	632
11	0,33	663
12	0,46	923
13	0,14	281
14	0,30	605
15	0,13	272
16	0,81	1630
17	0,76	1534
18	0,05	106
19	0,78	1565
20	0,06	118

Pro měření na HPLC systému byla použita metoda pro stanovení čistoty sofosbuviru vytvořená Ing. Jakubem Petříkem kapitola 4.2. Pro úpravu metody na UPLC systém byla použita webová aplikace Thermo Scientific Method transfer recommendations<sup>17</sup> jejíž výstup je uveden v **Tab. 10**. Ze získaných chromatogramů byly odečteny hodnoty ploch píků a procentuální zastoupení ploch píku pro sofosbuvir a des-alanin. Tyto hodnoty byly použity pro statistické vyhodnocení přenositelnosti metody pomocí korelační analýzy a T-testem.

**Tab. 10** Tabulka úpravy HPLC metody na UPLC systém<sup>17</sup>.

HPLC			UPLC		
Kolona			Kolona		
Délka	100	mm	Délka	100	mm
Průměr	4,6	mm	Průměr	2,1	mm
Velikost částic	2,5	µm	Velikost částic	1,7	µm
Podmínky metody			Podmínky metody		
Průtok	0,8	ml/min	Průtok	0,3	ml/min
Objem nástřiku	0,7	µl	Objem nástřiku	1,2	µl
Maximální tlak	30	MPa	Maximální tlak	116,4	MPa
Gradientový program			Gradientový program		
Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)	Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	90	10	0	90	10
3	90	10	1,7	90	10
14	10	90	7,5	10	90
18	10	90	10	10	90
19	90	10	10,5	90	10
24	90	10	12	90	10

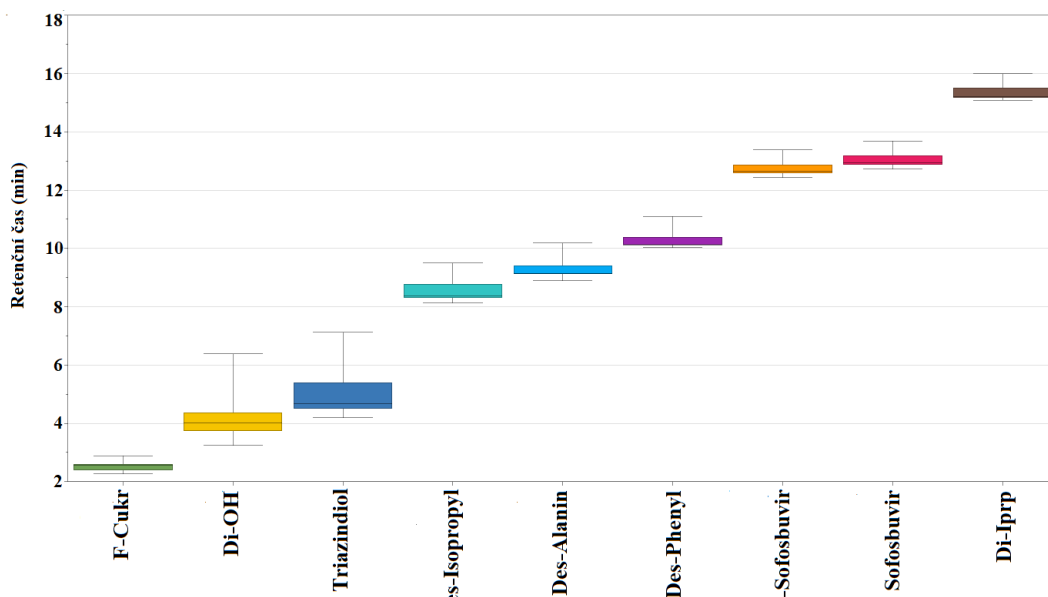
## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Validace

Při validaci jsme se zabývali hodnocením nečistot. V našem případě jsme validaci provedli na nečistotě des-alanin, jelikož jsme pouze tuto nečistotu měli v dostatečném množství. Validace byla navržena tak, aby byla hodnocena metodou vnitřní normalizace.

#### 5.1.1 Robustnost

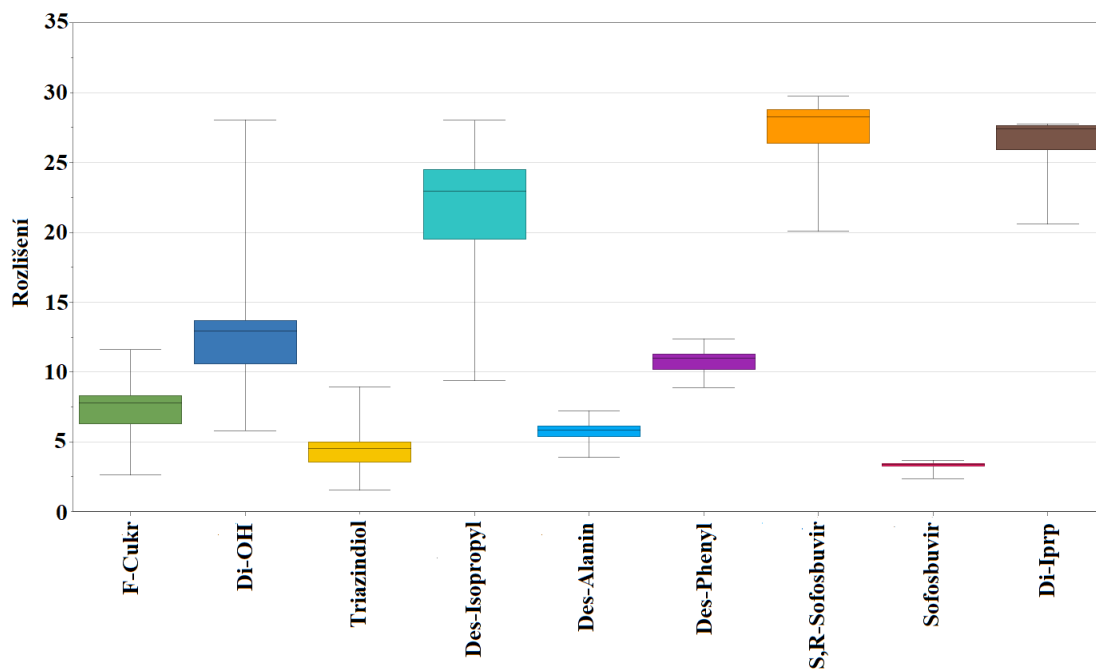
Výsledky testu robustnosti byly vyšetřeny v programu na DOE MODDE Pro. Nejdříve jsme se při hodnocení zaměřili na studium získaných dat pomocí grafu Box Whisker plot. Graf Box Whisker plot znázorňuje rozdělení dat do kvartilů a zvýrazňuje medián a odlehlé hodnoty. Jako první jsme se zabývali posuny retenčních časů píků studovaných nečistot v závislosti na změnách podmínek. Graf Box Whisker je znázorněn na **Obr. 9**. Kromě posunů retenčních časů píků nečistot je na něm také vidět pořadí, ve kterém jdou jednotlivé píky za sebou.



**Obr. 9** Box Whisker plot znázorňující retenční časy v závislosti na změně podmínek.

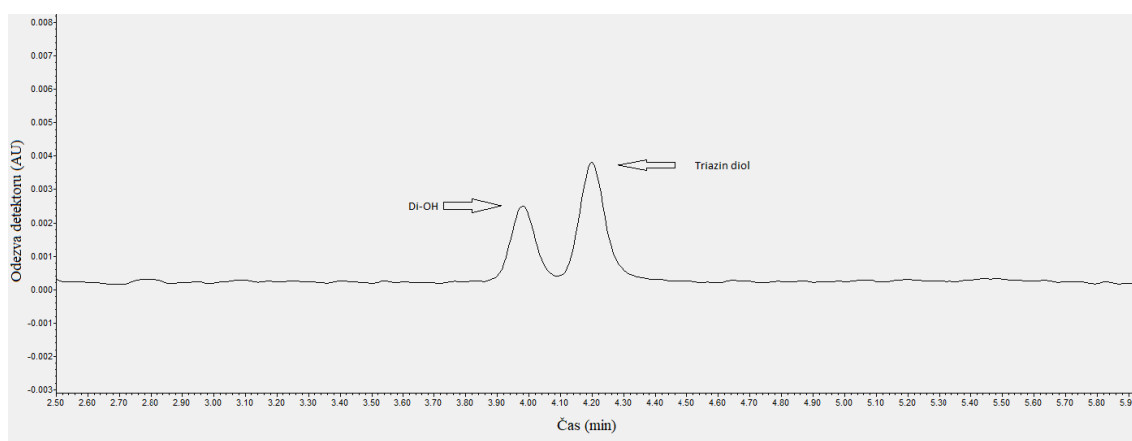
Na grafu jsou dále vidět tři regiony, kde jsou píky poměrně blízko u sebe a mohlo by zde být potenciální riziko koeluce. V prvním regionu se nachází dvojice nečistot Di-OH a Triazindiol. Druhý region zahrnuje tři nečistoty a to des-isopropyl, des-alanin a des-

phenyl. V třetím regionu se nachází Sofosbuvir a jeho enantiomer S,R-Sofosbuvir. Z těchto tří regionů jsme si vybrali první a třetí region k dalšímu šetření z důvodu, že se jejich hraniční hodnoty překrývají, a proto je nutné dále vyšetřit, zda nedochází ke koeluci. Dvojice v daných regionech jsme si označili jako kritické páry. Pro šetření koeluce jsme si hodnoty rozlišení nečistot zobrazili také v grafu Box Whisker plot, který je znázorněn na **Obr. 10**.



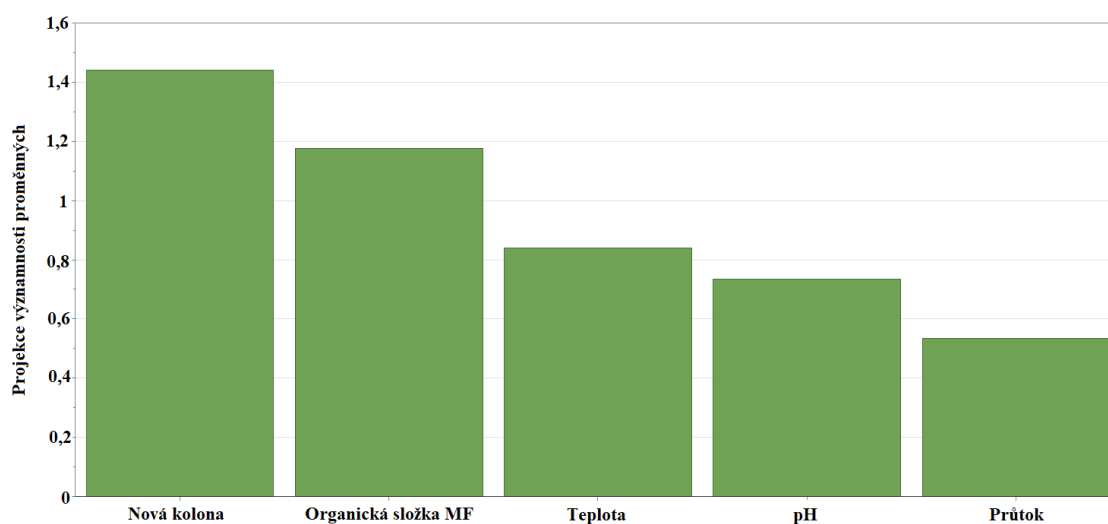
**Obr. 10** Box Whisker plot znázorňující rozlišení v závislosti na změně podmínek.

Z grafu je zřejmé, že rozlišení mezi Di-OH - triazindiolem a S,R-sofosbuvirem - sofosbuvirem je v každém případě nad hodnotou 1,5; a proto můžeme konstatovat, že v daných rozmezích testovaných parametrů ke koeluci nedochází. Další důkaz, že ke koeluci nedochází je ukázán na obrázku **Obr. 11**, kde je vyobrazena část chromatogramu experimentu N1, při kterém byla zjištěna nejmenší hodnota rozlišení 1,54 mezi nečistotami Di-OH a triazindiolem. Ostatní píky nečistot mají vyšší hodnotu rozlišení a tudíž z hlediska robustnosti nepředstavují žádný problém.



**Obr.11** Chromatogram experimentu N1, na kterém je znázorněna separace nečistot Di-OH a triazindiolu. Na ose X je znázorněn čas v minutách a na ose Y je odezva detektoru v jednotkách AU.

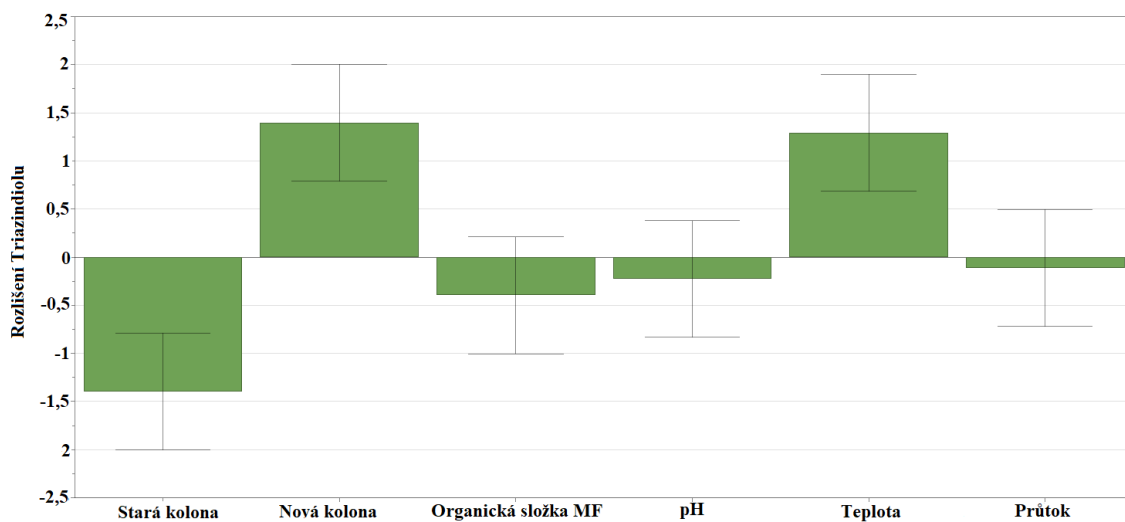
Dále byl studován vliv jednotlivých faktorů (chromatografických podmínek), které byly v testu robustnosti měněny. Pro celkové zhodnocení významnosti jednotlivých faktorů robustnosti byl použit VIP plot. Z něj je vidět, že faktory, které nejvíce ovlivňují metodu jsou stáří kolony a podíl organické složky v mobilní fázi a to proto, že hladina jejich významnosti je větší než hodnota 1. Méně významnými faktory jsou teplota a pH jejichž hodnota se pohybuje od 0,6 do 1. Nejméně významným faktorem, který metodu téměř neovlivňuje je průtok. VIP plot je znázorněn na **Obr. 12**.



**Obr.12** VIP plot znázorňující míru celkové významnosti studovaných faktorů.

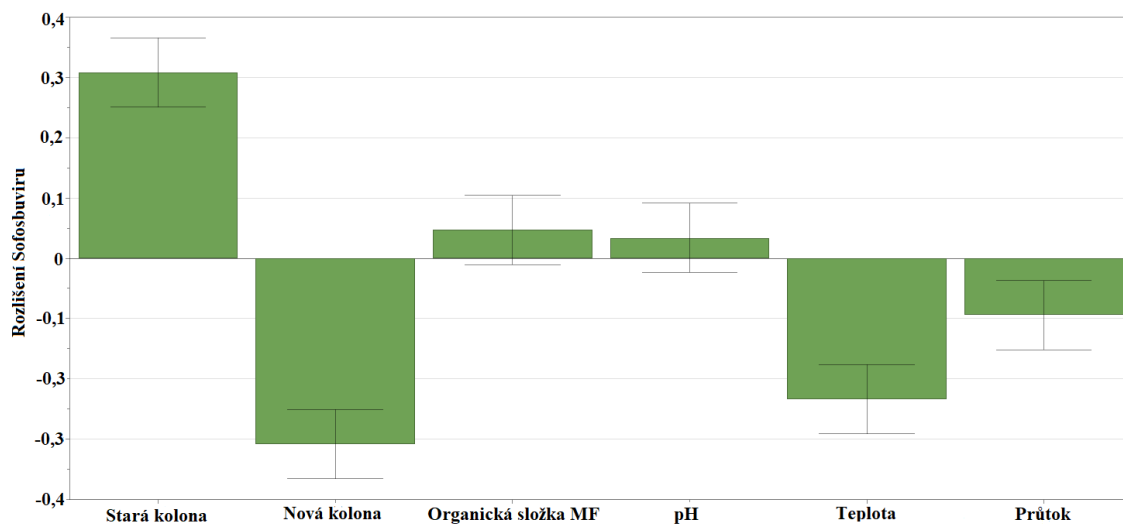
Jako poslední jsme vyšetřovali jaké konkrétní faktory ovlivňují separaci kritických párů Di-OH-triazindiol a S,R-sofosbuvir-sofosbuvir. K tomuto účelu byl použit coefficient plot. Graf coefficient plot pro rozlišení Di-OH a triazindiolu je zobrazen na

obrázku **Obr. 13**. Z grafu jasně vyplývá, že rozlišení píku Di-OH a triazindiolu nejvíce ovlivňuje stáří kolony a teplota. Jelikož růst hodnoty rozlišení je přímo úměrný při použití staré kolony, lze konstatovat, že stárnutím kolony se rozlišení zhoršuje. Na druhou stranu přímá úměra mezi rozlišením a zvyšující se teplotou ukazuje na pozitivní vliv teploty. Na základě všech informací o separačním chování kritického páru Di-OH-triazindiol v rámci testu robustnosti jsme zařadili sledování rozlišení tohoto kritického páru v SST a to s limitem 1,5.



**Obr. 13** Coefficient plot pro rozlišení Di-OH a Triazindiolu.

Druhý kritický pár S,R-sofosbuvir a sofosbuvir byl také vyšetřen pomocí grafu coefficient plot pro rozlišení S,R-sofosbuviru a sofosbuviru. Graf je znázorněn na **Obr. 14**. Z grafu je vidět, že kolona má na rozlišení S,R-sofosbuviru od sofosbuviru opačný vliv oproti triazindiolu. Rozlišení S,R-sofosbuviru a sofosbuviru negativně ovlivňuje teplota a průtok. Separaci kritického páru S,R-sofosbuvir a sofosbuvir jsme na základě informací, které jsme získali také zařadili do sledování při SST, a to s limitem pro rozlišení 1,5.



**Obr. 14** Coefficient plot pro rozlišení S,R-Sofosbuviru a Sofosbuviru.

Co se týče faktorů, které ovlivňují rozlišení ostatních píků, jejich coefficient ploty jsou k nahlédnutí v příloze 1. Vliv kolony na rozlišení ostatních píků má na všechny rozlišení až na rozlišení píků Di-OH a triazindiolu stejný vliv jako na rozlišení S,R-sofosbuviru a sofosbuviru. Snižování teploty snižuje hodnotu rozlišení u všech píků kromě kromě rozlišení Di-OH a triazindiolu.

### 5.1.2 Přesnost

K určení přesnosti metody bylo samostatně připraveno 6 roztoků sofosbuviru navážky jsou uvedeny v kapitole (4.4.2). Přesnost byla vyhodnocena pro nečistoty F-cukr, des-alanin a S,R-sofosbuvir a RSD ploch jejich píků byla zaokrouhlena na 3 platné číslice. Hodnoty RSD jednotlivých nečistot jsou uvedeny v **Tab. 11**. Metoda je považována za přesnou je-li splněn limit pro RSD plochy píků jednotlivých nečistot menší než 5 %.

**Tab. 11** Přehled procentuálního zastoupení ploch píků nečistot a jejich RSD.

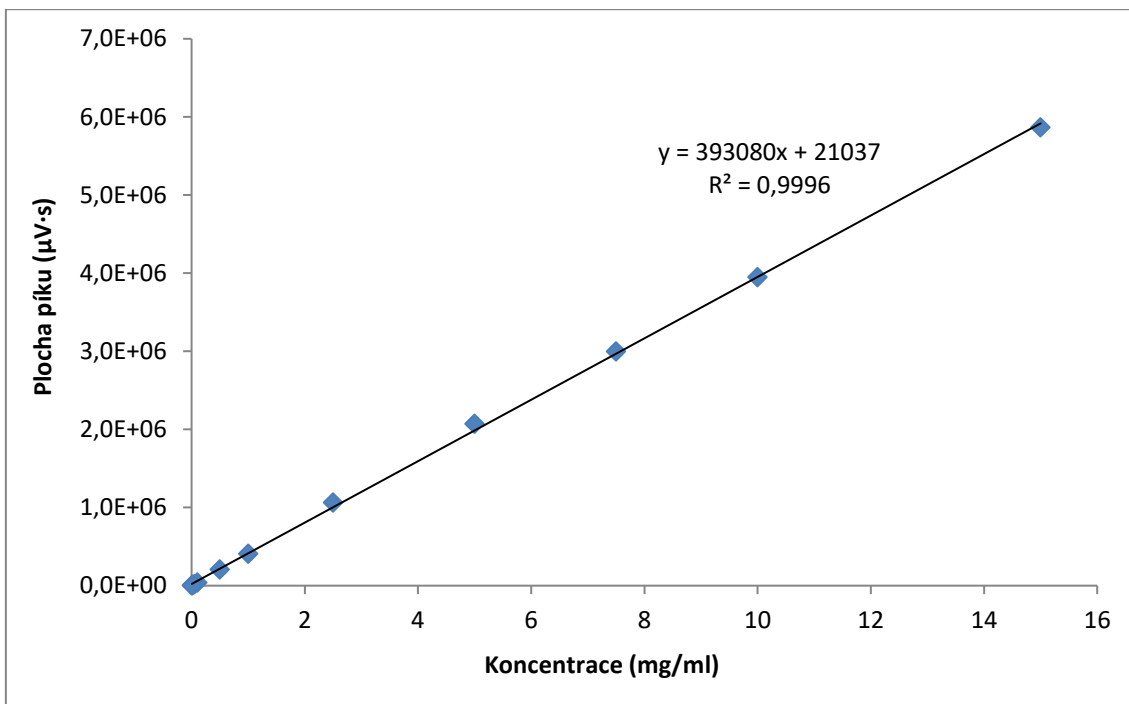
Vzorek	Procentuální zastoupení plochy [%]		
	F-Cukr	Des-Alanin	S,R-Sofosbuvir
PS 1	0,020	0,037	0,149
PS 2	0,020	0,040	0,161
PS 3	0,019	0,038	0,154
PS 4	0,021	0,041	0,152
PS 5	0,021	0,040	0,153
PS 6	0,021	0,042	0,159
Průměr	0,020	0,040	0,155
RSD [%]	4,02	4,69	2,91

Stanovený limit pro přesnost RSD < 5 % byl splněn u všech nečistot, na kterých jsme přesnost vyhodnocovali. Díky splněné podmínce pro přesnost můžeme tvrdit, že metoda na stanovení čistoty sofosbuviru je přesná.

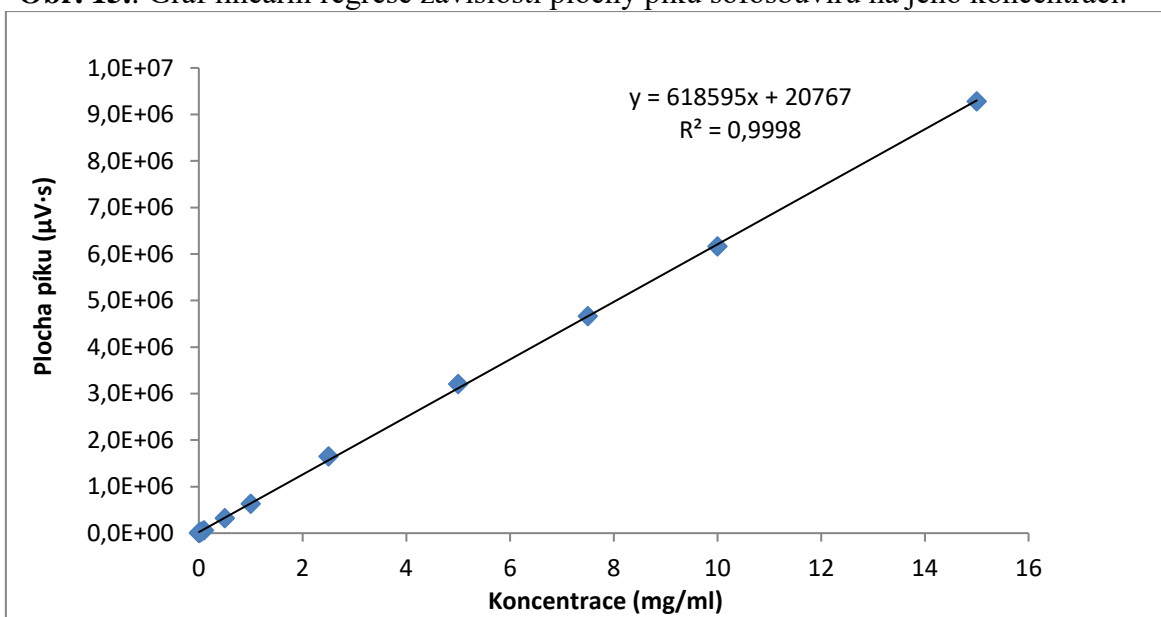
### 5.1.3 Linearita

Pro ověření linearity metody na stanovení čistoty sofosbuviru bylo připraveno 12 roztoků obsahujících sofosbuvir a des-alanin o koncentracích uvedených v **Tab. 7**. Linearita byla vyhodnocena za účelem vypočítat odezvoový faktor des alaninu ze směrníc lineárních kalibračních závislostí. Za pomoci programu Microsoft Office Excel 2016 byly metodou lineární regrese vyhodnoceny závislosti ploch píků na koncentraci. Grafy lineárních regresí jsou uvedeny na **Obr.15** a **Obr. 16**, kde se na ose x nachází koncentrace v (mg/ml) a na ose y plocha píku ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ).





**Obr. 15.:** Graf lineární regrese závislosti plochy píku sofosbuviru na jeho koncentraci.



**Obr. 16.:** Graf lineární regrese závislosti plochy píku des-alaninu na jeho koncentraci.

### 5.1.4 Odezvový faktor

Odezvový faktor ( $C_f$ ) bylo nutné vypočítat pro správné vyhodnocení výtěžnosti. Odezvový faktor byl vypočítán pro nečistotu des-alanin podle vzorce:

$$C_f = \frac{S_{Sfb}}{S_{DAI}} = \frac{393079}{618548} = 0,636$$

Kde  $S_{Sfb}$  je směrnice kalibrační závislosti sofosbuviru a  $S_{DAI}$  je směrnice kalibrační závislosti des-alaninu.

### 5.1.5 Výtěžnost

Výtěžnost byla vyhodnocena pro nečistotu des-alanin na hladinách 99,95 %, 99,5 %, 95 %, 50 %, 5 %, 0,5 %, 0,05 % koncentrace sofosbuviru očekávané v reálném vzorku. Hodnoty výtěžnosti a RSD pro des-alanin jsou uvedeny v **Tab. 12**.

Výsledky testu výtěžnosti odpovídaly stanoveným limitům uvedeným v **kapitole 4.4.4**. Hodnota výtěžnosti se pohybovala v intervalu od 92,45 % do 111,45 % přičemž hodnota RSD se pohybovala v intervalu od 0,0013 % do 3,7731 v závislosti na dané koncentrační hladině.

**Tab.12** Tabulka vyhodnocení výtěžnosti des-alaninu pro různé koncentrační hladiny.

Hladina (%)	Teoretická koncentrace (%)	Naměřená Koncentrace (%)	Výtěžnost (%)	RSD (%)
99,95	101,63	99,95	98,35	0
	101,63	99,95	98,35	
	101,63	99,95	98,35	
99,5	101,23	99,48	98,27	0,12
	101,23	99,47	98,26	
	101,03	99,48	98,46	
95	96,36	96,36	98,24	0,05
	96,26	96,26	98,24	
	96,56	96,56	98,15	
50	49,99	49,59	99,2	0,33
	49,99	49,27	98,55	
	49,99	49,4	98,81	
5	5,01	4,84	96,57	1,65
	5,01	4,83	96,39	
	5,01	4,97	99,26	
0,5	0,5	0,49	97,78	2,8
	0,5	0,46	92,45	
	0,5	0,48	95,18	
0,05	0,05	0,05	109,15	3,77
	0,05	0,06	111,45	
	0,05	0,05	103,53	

### 5.1.6 Mez stanovitelnosti a mez detekce

Meze stanovitelnosti a detekce byly vypočteny z analýzy slepého vzorku, tedy 10 % roztoku methanolu. Vyhodnocena byla výška šumu v okolí hlavního píku sofosbuviru a nečistoty des-alaninu, která byla následně použita k výpočtu LOD a LOQ podle vztahů uvedených v kapitole 4.4.5. Vypočtené hodnoty LOD a LOQ jsou společně s hodnotami šumu a směrnic kalibrační závislosti uvedeny v **Tab. 13**.

**Tab.13** Tabulka s hodnotami LOD a LOQ.

	Sofosbuvir	Des-Alanin
Průměr šumu ( $\mu\text{V}$ )	41,75	32,74
Směrnice kalibrační závislosti ( $\mu\text{V}/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	108194	87278
LOD (%)	0,12	0,11
LOQ (%)	0,39	0,38

Z hodnot LOD a LOQ uvedených v tabulce vyplývá, že mez detekce pro sofosbuvir byla 0,12 %, což odpovídá koncentraci 0,012 mg/ml, a mez stanovitelnosti byla 0,39 %, což odpovídá koncentraci 0,039 mg/ml. Pro nečistotu des-alanin byla hodnota LOD 0,11 %, což odpovídá koncentraci 0,011 mg/ml, a LOQ byla 0,38 %, tedy 0,038 mg/ml.

## 5.2 Převod metody a statistické vyhodnocení její přenositelnosti

Převod metody byl proveden analýzou 20 vzorků o koncentracích uvedených v **Tab. 14** jednou na HPLC systému a podruhé na UPLC systému. Vyhodnocena byla plocha píku sofosbuviru a nečistoty des-alaninu. Z těchto hodnot byla vypočtena skutečná hodnota relativní koncentrace des-alaninu, která je uvedena v tabulce. Získané hodnoty z analýz na HPLC a UPLC systému byly použity na porovnání výsledků mezi jednotlivými systémy pomocí statistických metod korelační analýzy a za pomoci T-testu.

**Tab. 14** Hodnoty relativních koncentrací des-alaninu naměřené na HPLC a UPLC systém v rámci testu přenositelnosti.

č. experimentu	Naměřená hodnota relativní koncentrace (%)	
	HPLC	UPLC
1	0,48	0,47
2	0,24	0,23
3	0,67	0,66
4	1,01	0,97
5	0,96	0,93
6	0,58	0,56
7	0,08	0,10
8	0,18	0,20
9	0,78	0,78
10	0,29	0,29
11	0,31	0,31
12	0,43	0,42
13	0,13	0,12
14	0,27	0,28
15	0,13	0,13
16	0,80	0,79
17	0,71	0,72
18	0,05	0,06
19	0,73	0,73
20	0,04	0,07

### 5.2.1 Párový T-test

Vyhodnocení pomocí párového T-testu bylo provedeno z hodnot naměřené procentuální koncentrace des-alaninu získané jak z HPLC systému tak UPLC systému. V programu Microsoft Excel 2016 a ze vzorců uvedených v kapitole 3.5 byla vypočítána hodnota testovací statistiky  $R$  pro des-alanin. Hodnoty jednotlivých statistických veličin popsaných v kapitole 2.4.3 jsou shrnuty v **Tab.15**.

**Tab.15** Tabulka statistických veličin párového T-testu.

	HPLC vs UPLC
$Z$	0,004175
$Sz$	0,1666
$R$	1,12099
$t_{99\%}(n-1)$	1,729

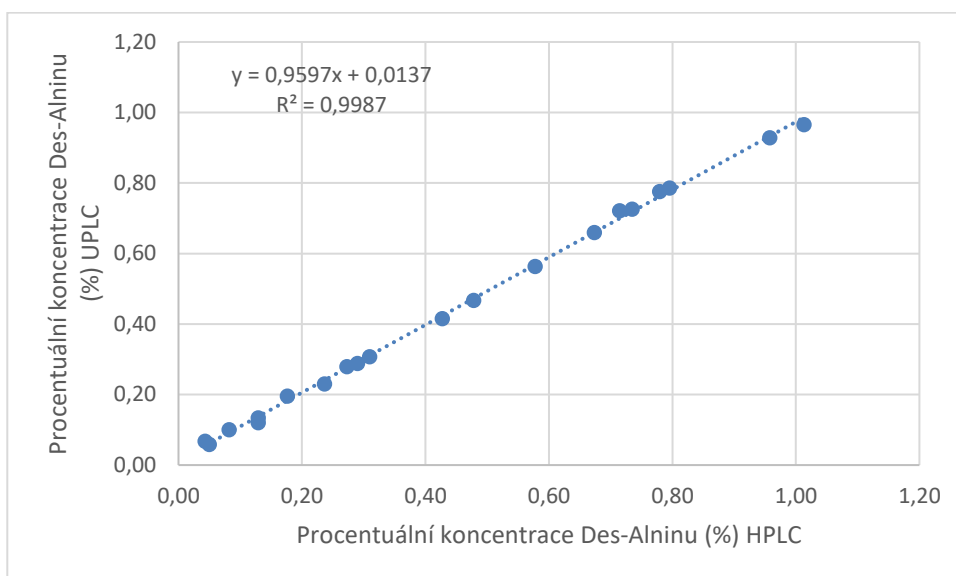
Tabelovaná hodnota  $t_{99\%}(19)$  je 1,729 a tudíž

$$|R| < t_{\alpha}(n - 1)$$

je hodnota testovací statistiky  $R$  menší než kritická hodnota  $t$  rozdělení. Proto jsme mohli zamítnout hypotézu  $H_1$  a prohlásit, že obě metody, na 1 % hladině významnosti, poskytují stejné výsledky. Na základě výsledku párového T-testu lze tedy usuzovat, že HPLC metoda pro stanovení čistoty sofosbuviru je přenositelná na UPLC systém.

## 5.2.2 Korelační analýza

Korelační analýza byla použita na hodnoty procentuální koncentrace des-alaninu získané analýzou na HPLC a UPLC systému. Tabulka hodnot naměřených procentuální koncentrací des-alaninu je uvedena v **kapitole (5.2.)**. V programu Microsoft Excel 2016 byl sestrojen graf korelační závislosti, která je zobrazena na obrázku **Obr.17**.

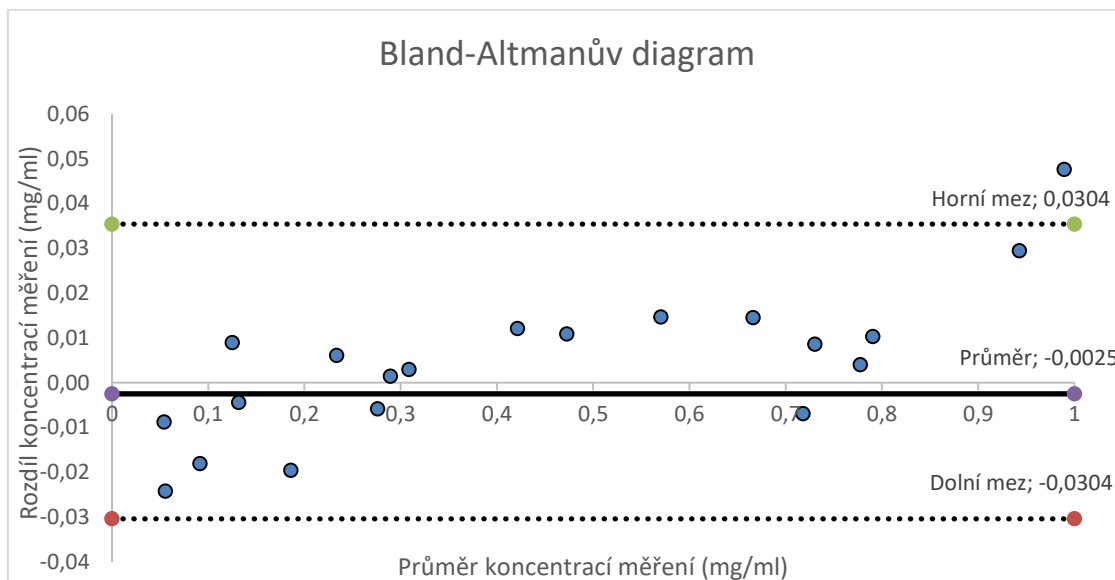


**Obr.17.:** Graf korelační analýzy.

Hodnota korelačního koeficientu byla 0,99935. Tato hodnota se velmi blíží 1 z toho lze usuzovat, že závislost hodnot získaných z HPLC a UPLC systému je lineární. Dále rozborem rovnice lineární křivky je vidět, že hodnota směrnice 0,9597 je velmi blízká ideální hodnotě 1 a hodnota úseku 0,0137 zase velice blízká ideální hodnotě 0. Tato fakta poukazují na schopnost metody na stanovení čistoty sofosbuviru podávat stejné výsledky jak na HPLC systému, tak i na UPLC systému.

K dalšímu hodnocení korelační analýzy jsme použili Bland-Altmanův diagram, který je vyobrazen na **Obr.18**. Na ose X jsou vyneseny hodnoty průměru koncentrací a na ose Y jsou vyneseny hodnoty rozdílu koncentrací zjištěných v daném vzorku oběma metodami. Vedlejší osa, označena jako průměr, znázorňuje průměr rozdílu jednotlivých koncentrací. Osy označené jako horní a dolní mez představují 1,96 násobek standardní směrodatné odchylky vypočtené z rozdílu jednotlivých koncentrací odečtené pro dolní mez a přičtené pro horní mez od průměru rozdílu koncentrací. Z grafu je patrné, že 95 %

hodnot tedy 19 hodnot z 20 leží v intervalu mezi a jediná hodnota, která nevyhovuje mezím není odchýlena nijak významně, což značí výbornou převoditelnost metody.



**Obr.18** Bland-Altmanův diagram.



## 6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla validace HPLC metody na stanovení čistoty sofosbuviru a převod této metody na UPLC systém.

Validace metody byla provedena na nečistotě des-alanin a mezi validované parametry bylo zahrnuto: SST, přesnost, linearita, výtěžnost, LOD, LOQ a robustnost. Robustnost byla testována za pomoci plánování experimentů (DOE).

Metoda splnila všechny validační parametry, RSD plochy píku des-alaninu byla 4,69 %, korelační koeficient lineární kalibrační závislosti byl 0,9998 a odezvový faktor des-alaninu vztažený k sofosbuviru byl 0,636. Výtěžnost byla hodnocena na 7 koncentračních hladinách 99,95 %, 99,5 %, 95 %, 50 %, 5 %, 0,5 %, 0,05 %. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí od 92,45 % do 111,45 % a RSD bylo v rozmezí od 0,0013 % do 3,7731 %. LOD byla stanovena na 0,011 mg/ml a LOQ byla stanovena hodnota 0,038 mg/ml. Robustnost byla prozkoumána pomocí statistického programu MODDE Pro. Za kritické páry s rizikem koeluce byly určeny Di-OH - triazindiol a S,R-sofosbuvir – sofosbuvir, které byly dále vyšetřeny. Následně byla metoda uznána robustní. Rozlišení kritických párů bylo navrženo na pozorování při SST.

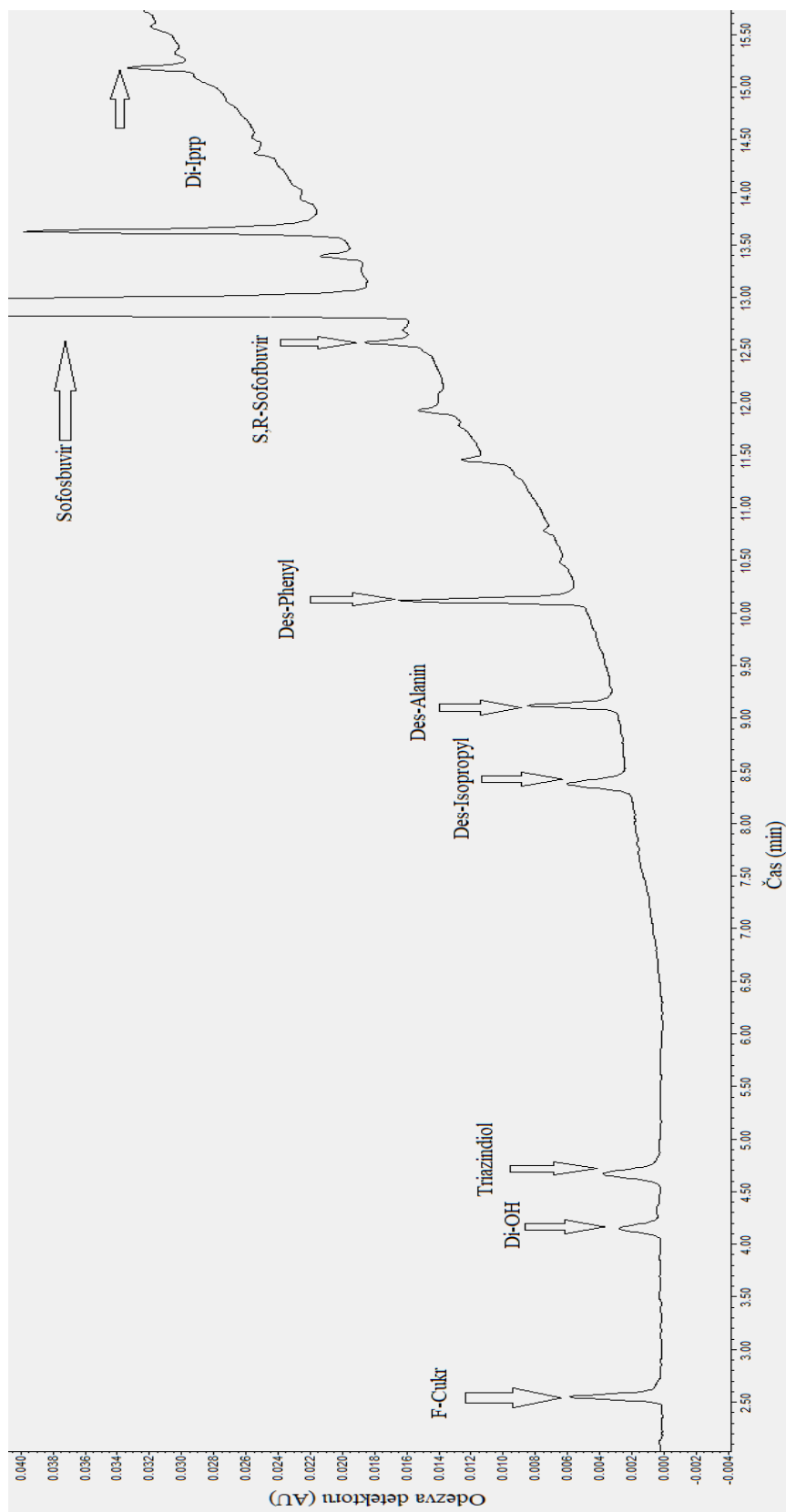
Pro přenos metody byla použita aplikace Thermo Scientific Method transfer recommendations<sup>17</sup> a následně byla testována přenositelnost metody na sadě vzorků připravených randomizačním postupem. Výsledky byly zpracovány statistickými metodami, tj. párovým T-testem a korelační analýzou. Při párovém T-testu byla hodnota testovací statistiky  $R$  menší než kritická hodnota  $t_{99\%}$  rozdělení, a tudíž byla na 1 % hladině významnosti zamítnuta hypotéza  $H_1$ . Na základě výsledku párového T-testu a přijetí hypotézy  $H_0$  lze konstatovat, že metoda podává srovnatelné výsledky jak na HPLC, tak i na UPLC systému. Dále jsme pro srovnání testovali přenositelnost metody korelační analýzou. Korelační koeficient byl 0,99933, což je velmi blízké 1, směrnice regresní křivky byla 0,9597, což je velmi blízké hodnotě 1, úsek regresní křivky byl 0,0137, což je velmi blízké hodnotě 0 a Bland-Altmanův diagram ukazuje, že 95 % hodnot se nachází ve stanovených mezích. Tento fakt poukazuje na těsnost hodnot získaných z HPLC a UPLC systému, z čehož lze také usuzovat, že metoda je přenositelná mezi HPLC a UPLC systémem. Obě statistické metody, kterými byla přenositelnost metody testována

poukázaly na velmi dobrou schopnost metody podávat stejné výsledky na HPLC a UPLC systému.

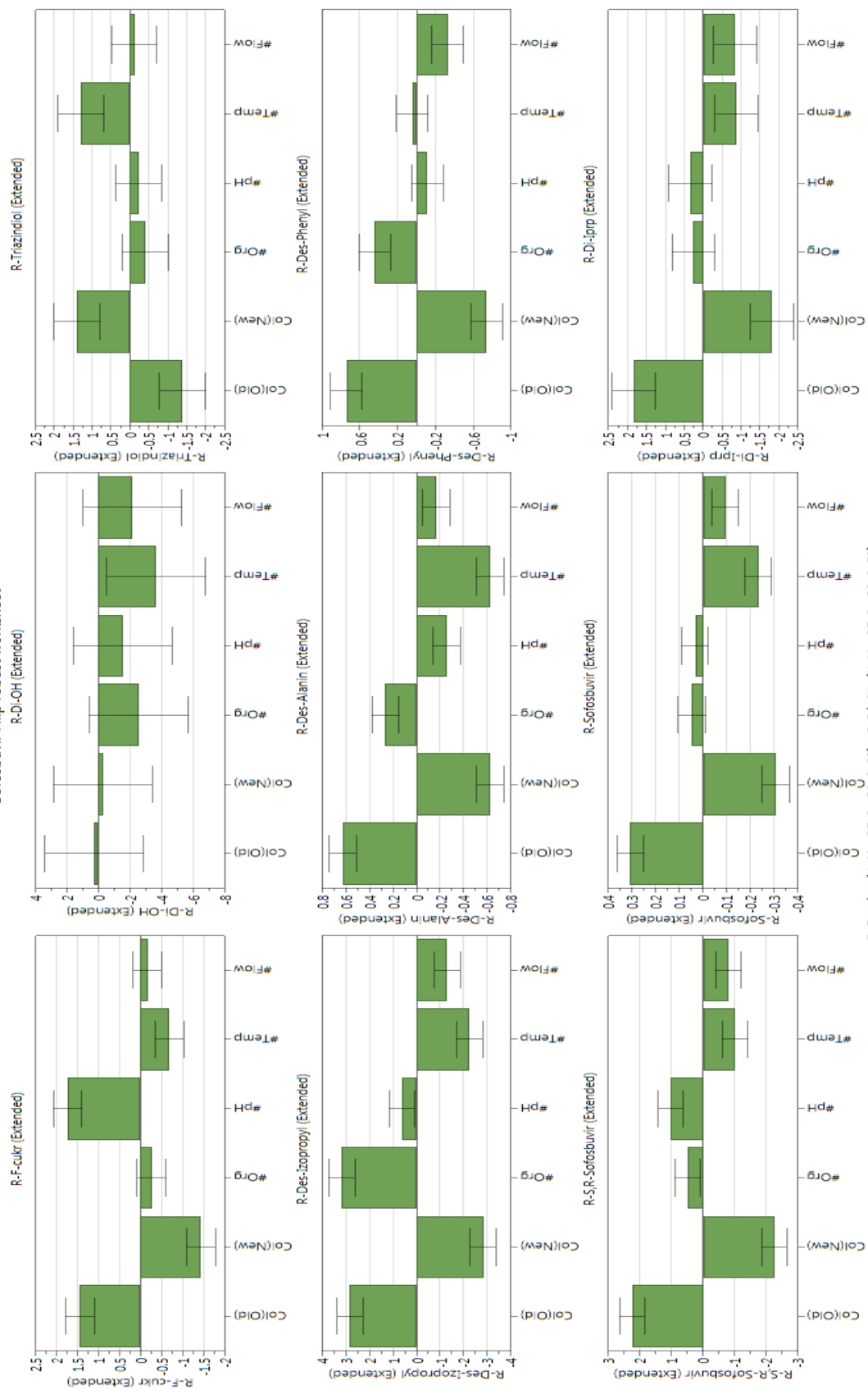
## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Reuters, T.: *Sofosbuvir* 2015, dostupné z URL:  
[http://www.who.int/phi/implementation/ip\\_trade/sofosbuvir\\_report\\_updated.pdf](http://www.who.int/phi/implementation/ip_trade/sofosbuvir_report_updated.pdf)  
[citováno 14.8.2017]
- (2) Farmaceutická encyklopedie, dostupné z URL  
<https://www.drugs.com/mtm/sofosbuvir.html> [citováno 14.8.2017]
- (3) Příbalový leták přípravku Solvaldi. Dostupné z URL  
[http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002798/WC500160597.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002798/WC500160597.pdf) [citováno 14.8.2017]
- (4) Zaman, B.; Siddique, F.; Hassan, W.: RP-HPLC method for simultaneous determination of sofosbuvir and ledipasvir in tablet dosage form and its application to in vitro dissolution studies. *Chromatographia* **79**:23-24, 1605-1613 (2016)
- (5) Abdallah, O. M.; Abdel-Megied, A. M.; Gouda, A. S.: Development a validated highly sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantification of Ledipasvir, sofosbuvir and its major metabolite GS-331007 in human plasma: Application to a human pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **143**, 305-310 (2017)
- (6) Nebsen, M.; Elzanfaly, E. S.: Stability-indicating method and lc-ms-ms characterization of forced degradation products of sofosbuvir. *Journal of chromatographic science* **54**:9, 1631-1640 (2016)
- (7) Elkady, E. F.; Aboelwafa, M. A.: A rapid and optimized lc-ms/ms method for the simultaneous extraction and determination of sofosbuvir and ledipasvir in human plasma. *Journal of AOAC international* **99**:5, 1252-1259 (2016)
- (8) Rezk, M. R.; Basalious, E. B.; Amin, M. E.: Novel and sensitive UPLC-MS/MS method for quantification of sofosbuvir in human plasma: application to a bioequivalence study. *Biomedical chromatography* **30**:9, 1354-1362 (2016)
- (9) *Český lékopis 2009*. Praha, Grada (2009)
- (10) Ing. Lenka Jarmarová; *Validace v analytické chemii*: Uničov (2015)
- (11) Nováková L.; Douša M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha, Europrint (2013)

- (12) *Validace analytických metod*. Dostupné z URL [www.hplc.cz/validace](http://www.hplc.cz/validace)  
[citováno 14.8.2017]
- (13) Nováková L.; Douša M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha, Europrint (2013). [citováno 14.8.2017]
- (14) Gumustas, M.; Kurbanoglu, S.; Uslu, B.; Ozkan, S. A.: UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia* **76**:21-22, 1365-1427 (2013)
- (15) *UPLC versus UHPLC: Comparison of Loading and Peak Capacity for Small Molecule Drugs*. Dostupné z URL  
<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003869en.pdf>  
[citováno 14.8.2017]
- (16) *Agilent Technologies* Dostupné z URL: <http://www.home.agilent.com/>  
[citováno 14.8.2017]
- (17) *Aplikace na upravení HPLC metody na UPLC*. Dostupné na URL  
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html> [citováno 20.8.2017]
- (18) Tošenovský J.: *Plánování experimentů*. Dostupné z URL:  
<http://www.person.vsb.cz/archivcd/FMMI/DOE/Planovani%20experimentu.pdf>  
[citováno 14.8.2017]
- (19) Eriksson L.; Johansson E.; Kettaneh-Wold N.; Wikström C.; Wold S.: *Design of Experiments: Principles and Applications*, 3rd ed. Umetrics Academy (2008)
- (20) Hendl, J.; *Přehled statistických metod*: Portál (2015)
- (21) Meloun, M.; Militký, J. *Statistické zpracování experimentálních dat*; PLUS: Praha (1994)
- (22) Brabenec. V, Šařencová. P, Hošková. P, Procházková. R, Louda. Z; *Statistika a biometrika-přednášky a cvičení pro FAPPZ a ITS*, Praha (2009)
- (23) Plzák, Z.; *Porovnání výsledků analytických metod*; (2012)
- (24) Jaroš, F.; et al.; *Pravděpodobnost a statistika*; VŠCHT, Praha (2002)
- (25) Ing. Jakub Petřík; Diplomová práce: *Vývoj HPLC metody stanovení čistoty sofosbuviru*; VŠCHT, (2017)



Coefficients (scaled and centered) (PLS, comp.=5)  
Sofosbuvir Filip robust worksheet



R-F-cukr (N=11; DF=5; R2=0.98); R-Di-OH (N=11; DF=5; R2=0.79);  
 R-Triazindiol (N=11; DF=5; R2=0.93); R-Des-Izopropyl (N=11; DF=5; R2=0.99);  
 R-Des-Alanin (N=11; DF=5; R2=0.99); R-Des-Phenyl (N=11; DF=5; R2=0.98);  
 R-S-R-Sofosbuvir (N=11; DF=5; R2=0.98); R-Sofosbuvir (N=11; DF=5; R2=0.98);  
 R-Di-Ippr (N=11; DF=5; R2=0.95); Confidence=0.95