

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jitka Máchalová

VÝVOJ METODY UHPLC PRO STUDIUM STABILITY  
VENETOCLAXU

Development of an UHPLC method for stability study of venetoclax

Bakalářská práce

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

Praha 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

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

V Praze dne 18. května 2018

## Abstrakt

Tato práce se zabývá vývojem chromatografické metody pro stanovení venetoclaxu a kontrolu jeho čistoty pomocí techniky UHPLC. Venetoclax je nízkomolekulární inhibitor antiapoptického proteinu Bcl-2, který hraje důležitou roli při regulaci apoptózy a při vzniku hematologické malignace. Venetoclax se tedy používá pro léčbu chronické lymfocytární leukemie. Kvůli problematické rozpustnosti analytu byl jako rozpouštědlo vzorku zvolen 10mM vodný roztok  $\text{H}_3\text{PO}_4$  : ACN s 40% objemovým zastoupením acetonitrilu. Dále byla nalezena optimální kombinace stacionární a mobilní fáze. Optimalizace byla prováděna především s ohledem na faktor chvostování píku venetoclaxu a jeho rozlišení od nečistoty eluující v jeho těsné blízkosti. V optimalizované metodě byla použita kolona Acquity UPLC BEH Phenyl ( $100 \times 2,10$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ) a jako mobilní fáze směs pufru (10mM  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NH}_3$  o pH 2,5) s přidavkem 0,5% trifluoroctové kyseliny a ACN. Součástí validace metody bylo testování přesnosti, opakovatelnosti, meze detekce a kvantifikace, linearity a lineárního dynamického rozsahu, robustnosti metody a testování stability vzorku. Opakovatelnost retenčního času byla 0,07 % a opakovatelnost plochy píku byla 0,45 %. Hodnota meze detekce metody byla  $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mg mm}^{-1}$  a hodnota meze kvantifikace byla  $5,4 \cdot 10^{-5} \text{ mg mm}^{-1}$ . Linearita kalibrační závislosti odpovídala hodnotě 1,049, odezva detektoru je tedy lineární v celém testovaném rozsahu koncentrací. Vyvinutá metoda byla využita k testování stability účinné látky venetoclaxu volně a v tabletě přípravku Venclexta. V rámci testu byly účinná látka a tableta vystaveny různým teplotám a vlhkostem. Zjišťoval se vliv jednotlivých podmínek na obsah nečistot. Při zvýšené teplotě a vlhkosti přibývaly degradační produkty v tabletě výrazněji než u účinné látky venetoclaxu. Při ponechání vzorků ve vlhkém prostředí docházelo k výraznější degradaci jak u účinné látky venetoclaxu, tak u tablety Venclexty.

## Klíčová slova

UHPLC, venetoclax, nečistoty, degradace

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Tomáši Křížkovi, PhD. především za jeho cenné rady a odbornou pomoc při řešení dané problematiky a za velkou míru trpělivosti, kterou mi věnoval při vypracování této práce. Další poděkování patří Bc. Zdeňku Tesařovi za pomoc s formátováním této práce a na závěr chci poděkovat své rodině za veškerou podporu, kterou mi během studia poskytla.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk a symbolů</b>	<b>7</b>
<b>1 Teoretický úvod</b>	<b>9</b>
1.1 Cíl práce	9
1.2 Venetoclax a Venclexta	9
1.3 UHPLC	11
1.4 Vývoj chromatografické metody	12
1.5 Validace metody	13
1.6 Degradáční studie léčiv	15
<b>2 Experimentální část</b>	<b>16</b>
2.1 Použité chemikálie a přístroje	16
2.1.1 Chemikálie	16
2.1.2 Instrumentace	16
2.2 Příprava vzorků a kalibračních roztoků	17
2.2.1 Příprava vzorků pro testování rozpustnosti	17
2.2.2 Příprava vzorků pro vlastní měření	17
2.2.3 Příprava kalibračních roztoků	17
2.3 Chromatografické podmínky	18
2.4 Analytické zpracování dat	19
2.4.1 Mez detekce a mez kvantifikace	19
2.4.2 Linearita a lineární dynamický rozsah	19
2.4.3 Opakovatelnost	19
2.4.4 Interval odlehlosti	20
<b>3 Výsledky a diskuze</b>	<b>21</b>
3.1 Vývoj metody	21
3.1.1 Rozpustnost účinné látky	21
3.1.2 Volba stacionární a mobilní faze	23
3.2 Validace metody	31

3.2.1	Kalibrační závislost	31
3.2.2	Vyhodnocení analytických parametrů	31
3.2.3	Robustnost	32
3.2.4	Stabilita venetoclaxu v rozpouštědle vzorku	35
3.3	Stabilita a degradace venetoclaxu	38
3.3.1	Degradace API a tablety	38
4	Závěr	42
	Seznam použité literatury	44

# Seznam použitých zkratek a symbolů

## Použité zkratky

<b>API</b>	léčivá látka přípravku (z anglického <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> )
<b>FDA</b>	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z anglického <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>Bcl-2</b>	genová rodina Bcl genů, identifikovaná v souvislosti s lymfomem B buněk (z anglického <i>B-cell lymphoma-2</i> )
<b>BH3</b>	doména v genetickém kódu antiapoptického proteinu Bcl-2 (z anglického <i>Bcl-2 Homology domains 3</i> )
<b>CAPS</b>	3-cyklohexylamino-1-propansulfonová kyselina
<b>CLL</b>	chronická lymfatická leukemie (z anglického <i>Chronic lymphocytic leukemia</i> )
<b>ICH</b>	Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci léčivých přípravků pro humánní použití (z anglického <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> )
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie (z anglického <i>liquid chromatography</i> )
<b>LOD</b>	mez detekce (z anglického <i>limit of detection</i> )
<b>LOQ</b>	mez kvantifikace (z anglického <i>limit of quantification</i> )
<b>PEEK</b>	polyetheretherketon
<b>RV</b>	relativní vlhkost
<b>TFA</b>	trifluoroctová kyselina (z anglického <i>trifluoroacetic acid</i> )

**UHPLC** ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického *ultra-high performance liquid chromatography*)

## Použité symboly

$A$	plocha píku
$\sigma$	průměrná hodnota šumu
$\phi_A$	objemové zastoupení vodné složky A v mobilní fázi
$\phi_B$	objemové zastoupení organické složky B v mobilní fázi
$\alpha$	směrnice kalibrační přímky
$t_{rel}$	relativní retenční čas
$s$	směrodatná odchylka měření
$\bar{x}$	aritmetický průměr hodnot signálů při $n$ měřeních
$s_r$	relativní směrodatná odchylka
$x_i$	prvek ze statistického souboru o indexu $i$
$n$	počet měření
$\mu$	interval odlehlosti s 95% úrovní spolehlivosti



# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout a optimalizovat podmínky pro techniku UHPLC pro stanovení účinné látky (API) venetoclaxu tak, aby vyvinutá metoda mohla být následně použita pro kontrolu čistoty API i tablety a pro studium stability API volně a v tabletě.

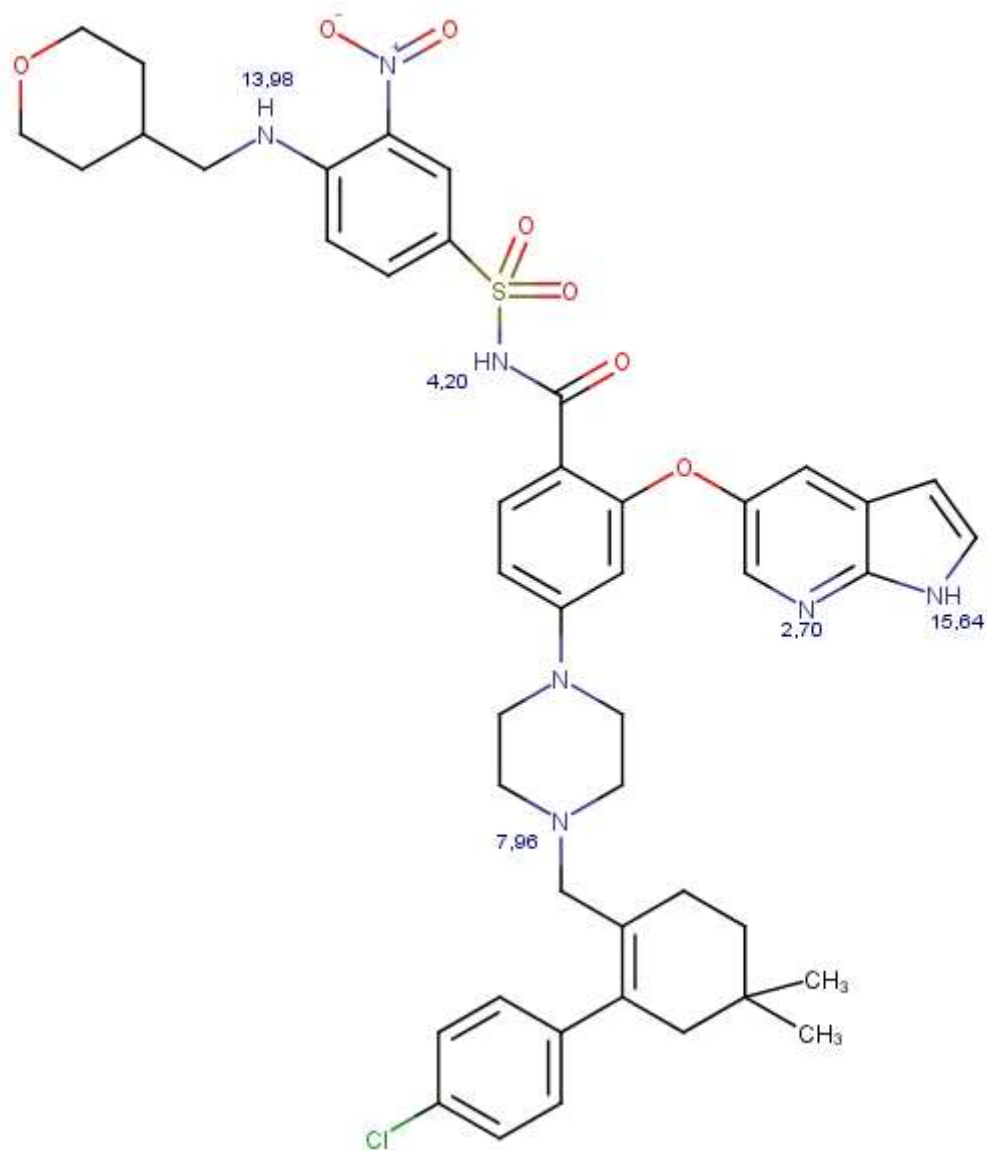
## 1.2 Venetoclax a Venclexta

Venetoclax (struktura znázorněna na Obr. 1.1) s molekulovou hmotností 868,447 g mol<sup>-1</sup> je nízkomolekulární selektivní inhibitor antiapoptického proteinu Bcl-2 (z anglického B-cell lymphoma-2), jehož empirický vzorec je C<sub>45</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S [1]. Venetoclax je pevná látka světle až tmavě žluté barvy, která se vyznačuje velmi malou rozpustností ve vodě. Hodnoty pKa se liší v závislosti na literárních zdrojích. Podle dokumentu (NDA 208573 Venetoclax [2]), zveřejněného FDA, jsou hodnoty pKa funkčních skupin 3,4 a 10,7. Podle DrugBank [3], který udává vypočtenou pKa ze zdroje ChemAxon, jsou hodnoty pKa 4,19 a 7,96.

Nadměrná exprese Bcl-2 proteinu může být v důsledku vzniku hematologické malignace (mnohočetný myelom, lymfom, leukemie) nebo pevného nádoru (prsu, prostaty, plic, tlustého střeva, štítné žlázy atp.) [4].

Venetoclax napodobuje pouze proteiny BH3, které jsou přirozenými ligandy Bcl-2 proteinů a aktivátory apoptózy tak, že se naváže na hydrofobní drážku proteinů Bcl-2. Tím potlačuje aktivitu Bcl-2 proteinů a obnovuje apoptické procesy v nádorových buňkách. Exprese Bcl-2 proteinu hraje důležitou roli v regulaci apoptózy. Jeho exprese je spojena se zvýšenou rezistencí vůči chemoterapeutikům a přežíváním nádorových buněk [1].

Venclexta je název léčivého přípravku vyráběného společností AbbVie a Genentech USA, který obsahuje API venetoclax. Léčivo se používá jako monoterapie při léčbě refrakterní chronické lymfocytární leukemie s delecí 17p [5]. Pacienti trpící CLL s de-



Obrázek 1.1: Molekula venetoclaxu. Na obrázku lze vidět piperazinové a sulfonamidové funkční skupiny s jednotlivými vypočtenými hodnotami  $pK_a$ . Struktura vytvořena v MarvinView 15.4.13.0 [6].

leci 17p nejprve užívají během čtyř týdnů přípravné léky obsahující venetoclax, pátý týden začínají užívat přímo tablety Venclexty v doporučené denní dávce 400 mg/den. Jedna tableta obsahuje 100 mg API venetoclaxu, vyrábějí se však tablety s 50mg a 10mg obsahem API venetoclaxu [7].

## 1.3 UHPLC

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) je relativně mladá chromatografická technika, která je zdokonalením techniky HPLC. UHPLC využívá kratší chromatografické kolony, jejichž stacionární fází jsou sloupce tvořené porézními částicemi s průměrem menším než 2  $\mu\text{m}$  (obvykle 1,7  $\mu\text{m}$ ), které se využívají v přístrojích umožňujících pracovat s vysokými tlaky (až 100 MPa). Chromatografický systém je navržen tak, aby odolal zatížení vysokým zpětným tlakem, který vzniká v důsledku zmenšení částic ve sloupcích stacionární fáze [8]. To umožňuje rychlé separace s vysokou účinností.

Instrumentace je stejná jako v HPLC, dochází k vylepšení konkrétních částí, umožňujících pracovat s vysokými tlaky. Tlak zajišťuje vysoce účinná pumpa. Vysokému tlaku musí být přizpůsobeny spojovací materiály, které jsou pro UHPLC nejčastěji tvořeny z ocele, pozlacené ocele, vysoce odolného polymeru PEEK (polyetheretherketon) či kombinace ocel-PEEK, a kapiláry nejčastěji tvořené z ocele, standardního PEEKu do 50,7 MPa zapouzdřeného v niklu — tato kombinace zvýší odolnost až do 252,5 MPa [9]. Velký důraz je kladen na zmenšení mrtvých objemů. Kolony v UHPLC jsou tvořeny stacionárními fázemi stejnými jako v HPLC, tzn. např. C18, C8, Phenyl-Hexyl aj. Každá stacionární fáze poskytuje rozdílné kombinace hydrofobicity, silanolové aktivity, hydrolytické stability a chemické interakce s analytem. Ze sorbentů pro UHPLC se používá anorganický (silikagel), organický (polymerní sorbenty, uhlíkový nosič), či jejich kombinace. [10] Velký význam v UHPLC má právě kombinace obou sorbentů. Tato technologie je označovaná jako Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology a mezi její hlavní výhody patří velká mechanická odolnost, zamezení vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu, vysoká separační účinnost a velká pH stabilita v širokém rozsahu pH pomocí tvorby methylenových

můstků. [10] Detekce je stejná jako v HPLC, tzn. lze použít UV-VIS, fluorimetrický detektor, hmotnostní detekci a další. [11]

Ve srovnání s HPLC má UHPLC nižší spotřebu rozpouštědel, pracuje v širším rozsahu tlaků, vyžaduje menší množství dávkovaného vzorku, má minimální mimokolonové objemy, vyšší separační účinnost, nižší mez detekce, vyšší citlivost a analýza je až 10× rychlejší, což je přínosné zejména v klinické praxi a farmaceutickém či potravinářském průmyslu. Malá velikost částic stacionární fáze však klade vysoké nároky na čistotu rozpouštědel a vzorky používané při UHPLC separaci. [12], [13]

## 1.4 Vývoj chromatografické metody

Při vývoji chromatografické metody by mělo být prvním krokem definování cíle metody. Následuje vyhledání informací o analytu, který se bude stanovovat (struktura, fyzikálně-chemické vlastnosti) a na základě těchto informací je navrhnout vhodný typ detekce a vhodný separační systém (např. systém s normálními fázemi, reverzními fázemi atp.). Podle typu chromatografického systému a vlastností vzorku je zvoleno počáteční složení mobilní fáze a následují počáteční experimenty se standardy. Poté následuje měření reálných vzorků a zjišťování optimálních chromatografických podmínek (např. dávkování vzorku, teplota kolony, pH mobilní fáze atp.). Posledním krokem je validace metody. Finální vývoj tedy zahrnuje jak samotnou optimalizaci metody, tak validaci. Optimalizace chromatografické metody je definována jako volba chromatografických podmínek, při kterých jsou látky ve směsi dokonale separovány a citlivě detekovány v co nejkratším čase. [14] Vývojem se získá analytická metoda, která v kombinaci se správnými postupy a správnou laboratorní praxí snižuje prostoje, které vznikají nevhodnými zásahy do chromatografického systému, minimalizuje finanční náklady na opravu UHPLC a udržuje UHPLC systém v dobrém stavu.

Na vývoj chromatografické metody pro stanovení venetoclaxu nebyly nalezeny publikované vědecké články. V českém lékopisu 2017 [15] také není pro stanovení venetoclaxu popsána žádná lékopisná metoda, proto během experimentální části této práce byly zkoušeny různé varianty a kombinace chromatografických podmínek.

## 1.5 Validace metody

Součástí vývoje metody je i její validace. Validace je definována jako získání důkazu ve formě dokumentace, který poskytuje vysoký stupeň jistoty, že určitý proces bude trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci. [16] Termín validace se používá při ověřování a kalibraci určitého procesu, jehož výsledkem je určitý produkt. Konfirmace (ve farmacii kvalifikace) je pak označení pro ověřování a kalibraci konkrétního zařízení či systému. [10] Validace a revalidace se provádí před uvedením metody do běžné praxe, při změně podmínek, pro které byla metoda validována, při změně vlastní metody či při přesunu metody do jiné laboratoře. [16] Pravidla pro validaci metod ve farmacii se řídí platnými předpisy a doporučeními. Orgány, které vydávají příslušné směrnice pro validaci, jsou například ICH (z anglického *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), FDA a další.

Součástí validačního procesu je zjištění správnosti a přesnosti metody, opakovatelnosti, linearity, zjištění meze detekce a meze kvantifikace, selektivity metody, robustnosti metody a stability analytu. [17]

Správnost je definována jako stupeň, do jakého stanovená hodnota analytu ve vzorku odpovídá přijaté referenční hodnotě. [10] Rozdíl mezi nalezenou a skutečnou hodnotou je nazýván chybou výsledku. Určitá část chyby, která se ve výsledcích mění předvídatelným způsobem nebo zůstává konstantní se nazývá systematická chyba výsledku, zatímco část chyby, která se ve výsledcích mění nepředvídatelným způsobem, se nazývá náhodná chyba výsledku. Náhodnou chybu nelze odstranit. Správnost metody lze zjistit například analýzou modelového vzorku, analýzou vzorku se standardním přídatkem, analýzou vzorku s přídatkem známých nečistot či nezávislou validovanou metodou.

Přesnost analytické metody vyjadřuje míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem předepsaných podmínek. [16] Přesnost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah ke skutečné hodnotě. Přesnost dané analytické metody může být ověřena ve třech stupních: opakovatelnost, meziuhlá přesnost a reprodukovatelnost. Opakovatelnost vyjadřuje míru shody výsledků

experimentálně získaných ve stejné laboratoři, týměž pracovníkem a za použití týchž přístrojů v krátkém časovém intervalu. Pokud jsou vzorky měřeny s větším časovým odstupem, různými pracovníky, na různých přístrojích, ale v rámci jedné laboratoře, pak se jedná o mezilehlou přesnost. Posledním stupněm je měření jednotlivých vzorků v různých laboratořích, různými analytiky a na různých přístrojích, míra shody takto získaných výsledků odpovídá reprodukovatelnosti. [18]

Linearita analytické metody vyjadřuje její schopnost poskytovat v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. [16] Míru shody vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných určuje korelační koeficient. Pokud je závislost lineární, pak korelační koeficient nabývá jednotkové hodnoty. Čím více se korelační koeficient blíží jedné, tím je míra shody dvou náhodných proměnných větší.

Mez detekce neboli detekční limit (LOD z anglického *limit od detection*) vyjadřuje nejmenší množství analyzované látky ve vzorku, které je za daných experimentálních podmínek detegovatelné, ale nemusí být nutně kvantifikované jako přesná hodnota. [18] Je důležitým parametrem pro stanovování nečistot.

Mez kvantifikace (LOQ z anglického *limit of quantification*) je nejmenší množství analyzované látky ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s přijatelnou správností a přesností za daných experimentálních podmínek. [18] Stejně jako mez detekce je mez kvantifikace důležitým parametrem pro stanovování nečistot. Hodnoty LOD i LOQ by měly být ověřeny experimentálně.

Selektivita analytické metody vyjadřuje schopnost metody stanovit analyt ve vzorku v přítomnosti jiných složek, jejichž přítomnost lze očekávat. Jinými složkami mohou být pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla, těžké kovy aj. [18]

Posledním validačním parametrem je robustnost metody. Robustnost je definována jako míra vlivu mírného kolísání hodnot jednotlivých parametrů metody na výsledek analytického testování. [16] Při posuzování robustnosti metody se zvolí určité parametry (například rozlišení, relativní retence, faktor symetrie či chvostování) a sleduje se vliv dílčích podmínek právě na tyto parametry. Výsledkem testování robustnosti jsou informace o parametrech, které jsou kritické, mohou ovliv-

nit výsledky analýzy a vyžadují tedy zvýšenou kontrolu. Robustnost také vyjadřuje spolehlivost dané analýzy. [10] Součástí ověření robustnosti je i vyhodnocení stability vzorku, který může degradovat během přípravy, špatným nakládáním se vzorkem, skladováním v autosampleru, v chladícím zařízení atp. Běžně se stabilita testuje ponecháním vzorku v roztoku v autosampleru při nízké teplotě (např. 5 °C) po 24, 48 a 72 hodinách, dále ponecháním vzorku v roztoku při laboratorní teplotě po dobu 24, 48 a 72 hodin či ponecháním látky v pevném stavu při laboratorní teplotě po dobu 24, 48 a 72 hodin. [18]

## 1.6 Degradční studie léčiv

Degradční studie neboli stresové testování léčiv je dlouhou dobu považováno za důležitou součást procesu vývoje léčiv. Stresové testování je hlavním nástrojem, který slouží k objasnění vnitřní stability léčivé látky, k rozvoji analytických metod a k identifikování produktů z degradačních drah. [19]

Povaha zátěžového testování závisí na jednotlivé léčivé látce a typu daného léčivého přípravku. Stresové testování se nejčastěji provádí na jediné dávce léčivé látky a mělo by zahrnovat účinek teplot (při přírůstcích o 10 °C, např. 50 °C, 60 °C), vlhkosti (např. 75 % RV nebo vyšší), oxidaci a fotolýzu na léčivé látce (fotostabilita by měla být nedílnou součástí stresového testování). Testování by mělo také vyhodnotit citlivost léčivé látky k hydrolýze v širokém rozmezí hodnot pH v roztoku nebo suspenzi. [20]

Během stresového testování v pevném stavu se posuzují tři hlavní zátěžové podmínky: teplota, vlhkost a fotostabilita. Teplota je stresovou podmínkou, která se historicky považovala za nejpřirozenější k předpovědi degradace léčivé látky. Za předpokladu Arrheniovy kinetiky a vhodné aktivační energie lze předpovědět, že dlouhodobé vystavení léčivé látky stresovým teplotám má vliv na rychlost degradace a na zvýšení obsahu jednotlivých degradačních produktů. Aby bylo možné odvodit Arrheniovu teorii, a tedy i rychlost degradace při určitých teplotách, je nutno vzít v úvahu i relativní vlhkost. [21]

## 2. Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 2.1.1 Chemikálie

- Acetonitril CHROMASOLV<sup>®</sup>, for HPLC, gradient grade  $\geq 99,9\%$ , Honeywell, Francie
- Methanol, CHROMASOLV<sup>®</sup>, for HPLC, gradient grade  $\geq 99,9\%$ , Honeywell, Francie
- Kyselina trifluoroctová, 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Hydroxid amonný, 25% p. a., Lach-Ner, s. r. o. Česká republika
- Kyselina fosforečná 85%, p. a., Lach-Ner, s. r. o. Česká republika
- Deionizovaná voda připravená systémem od firmy Premier MFG'D, USA
- 3-cyklohexylamino-1-propansulfonová kyselina (CAPS), Sigma, USA
- Triethylamin, 99%, Sigma, USA
- Kyselina octová, 99% p. a., Lach-Ner, s. r. o. Česká republika

#### 2.1.2 Instrumentace

- Acquity H-class UPLC, Waters, USA
- Degradační komora Memmert Humidity Chamber HCP, Memmert, Německo
- Ultrazvukový sonikátor, Elma, S15 Elmasonic, Německo
- Analytické váhy, 262 SMA-FR, Precisa, Švýcarsko
- Mikrocentrifuga, Denver Instrument, USA
- pH metr, JENWAY 3540 pH/conductivity meter, UK
- Magnetická míchačka, Thermo scientific, CIMAREC i Mono, USA



## 2.2 Příprava vzorků a kalibračních roztoků

### 2.2.1 Příprava vzorků pro testování rozpustnosti

Vzorek API venetoclaxu byl vždy navážen na analytických váhách tak, aby koncentrace ve vialce byla přibližně  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Pro urychlení rozpouštění se vialka se vzorkem vložila do ultrazvukové lázně na 10 minut, rozpustnost se hodnotila vizuálně.

### 2.2.2 Příprava vzorků pro vlastní měření

Vzorek API pro vývoj metody a degradační testování byl připraven navážením daného množství API na analytických váhách a rozpuštěním ve směsi 10mM vodného roztoku kyseliny fosforečné a acetonitrilu (ACN) v objemovém poměru 60 : 40 tak, aby koncentrace ve vialce odpovídala  $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$ , nebo  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ . Následně byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně a ponechán 10 minut sonifikovat.

Vzorek tablety přípravku Venclexta byl připraven navážením daného množství rozetřené tablety na analytických váhách a rozpuštěním ve směsi 10mM vodného roztoku kyseliny fosforečné a ACN v objemovém poměru 60 : 40 tak, aby koncentrace ve vialce odpovídala  $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$ . Následně byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně a ponechán 10 minut sonifikovat.

### 2.2.3 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku API. Nejkoncentrovanější roztok o koncentraci  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  byl připraven odvážením 5,0 mg API a rozpuštěním v 10 ml směsi 10mM vodného roztoku kyseliny fosforečné a ACN v objemovém poměru 60 : 40. Následně byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně na 10 minut. Jednotlivé koncentrace kalibračních roztoků odpovídaly 0,5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,01,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  a  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mg ml}^{-1}$ .

## 2.3 Chromatografické podmínky

Mobilní fáze byla směs vodné a organické složky. Vodná složka (složka A) byla 10mM vodný roztok  $\text{H}_3\text{PO}_4$  s přidavkem 0,5% trifluoroctové kyseliny (TFA), pH bylo ve výsledném objemu mobilní fáze upraveno hydroxidem amonným na hodnotu 2,0. Organickou složku (složku B) tvořil ACN a zastoupení obou složek se měnilo podle gradientového programu, který je uveden v Tab. 2.1.

Experimentální část měření byla prováděna na koloně Acquity UPLC BEH Phenyl ( $100 \times 2,10$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ , Waters, USA), dávkovaný objem vzorku byl  $1 \mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze byl  $0,3 \text{ ml, min}^{-1}$ , teplota kolony byla  $30^\circ\text{C}$  a teplota autosampleru byla  $5^\circ\text{C}$ . Detekce byla prováděna pomocí detektoru s diodovým polem. Pro detekci byla zvolena vlnová délka  $282 \text{ nm}$ .

Tabulka 2.1: Gradientový program, podle kterého se měnilo zastoupení vodné (A) a organické složky (B) mobilní fáze v průběhu eluce.

$t$ (min)	$\phi_A$ (%)	$\phi_B$ (%)
0	70	30
1	70	30
14	30	70
16	30	70
18	70	30
20	70	30

## 2.4 Analytické zpracování dat

### 2.4.1 Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce, LOD, a mez kvantifikace, LOQ, venetoclaxu pro tuto analytickou metodu byly vypočteny dle následujících rovnic:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{\alpha}, \quad (2.1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{\alpha}, \quad (2.2)$$

kde  $\sigma$  je průměrná hodnota šumu z chromatogramů rozpouštědla vzorku a  $\alpha$  je směrnice přímky závislosti výšky píku na koncentraci venetoclaxu. [17]

### 2.4.2 Linearita a lineární dynamický rozsah

Linearita byla vypočtena vnesením logaritmických hodnot příslušných koncentrací kalibračních roztoků na osu  $x$  a hodnot plochy píku na osu  $y$ . Těmito body byla proložena regresní přímka. Směrnice přímky odpovídala linearitě měření. Podle hodnoty směrnice přímky bylo rozhodnuto, zda je odezva detektoru lineární v celém rozsahu koncentrací.

### 2.4.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost vyvinuté metody byla ověřena sedmi po sobě jdoucími měřeními vzorku tablety. Vyhodnocení opakovatelnosti bylo provedeno pomocí výpočtu směrodatné odchylky (viz rovnice 2.3) a relativní směrodatné odchylky (viz rovnice 2.4) podle následujících vzorců:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}, \quad (2.3)$$

kde  $s$  je směrodatná odchylka měření,  $x_i$  je prvek ze statistického souboru o indexu  $i$ ,  $\bar{x}$  je aritmetický průměr hodnot signálu a  $n$  je počet měření

$$s_r = 100 \left( \frac{s}{\bar{x}} \right), \quad (2.4)$$

kde  $s_r$  je relativní směrodatná odchylka měření. [22]

#### 2.4.4 Interval odlehlosti

Při výpočtu množství účinné látky v tabletě Venclexty z rovnice regrese kalibrační přímky byl výsledek zapsán ve tvaru  $\bar{x} \pm \mu \text{ mg ml}^{-1}$ . Interval odlehlosti ( $\mu$ ) byl vypočítán s 95% úrovní spolehlivosti podle následujícího vzorce:

$$\mu = 1,96 \left( \frac{s}{\sqrt{n}} \right), \quad (2.5)$$

kde  $s$  je směrodatná odchylka měření, hodnota 1,96 vyjadřuje konstantu zahrnující 95% úroveň spolehlivosti a  $n$  je počet měření. [23]

## 3. Výsledky a diskuze

Při optimalizaci podmínek a vývoji metody UHPLC pro stanovení venetoclaxu je důležité zvolit vhodné rozpouštědlo, ve kterém se složky vzorku během separace v koloně nevysráží, dále vhodnou stacionární fází a mobilní fází. Během vývoje metody je třeba také posoudit vliv teploty a způsobu eluce na separaci. Součástí vývoje metody je i validace dané metody. Byla testována správnost, přesnost, opakovatelnost měření, linearita, lineární dynamický rozsah, mez detekce a kvantifikace a dále robustnost metody. Po vyvinutí metody byl vzorek tablety léčivého přípravku Venclexta a vzorek API podroben degradačním studiím, kde bylo sledováno, jak se tableta či API rozkládají za zvýšené teploty při různé vzdušné vlhkosti.

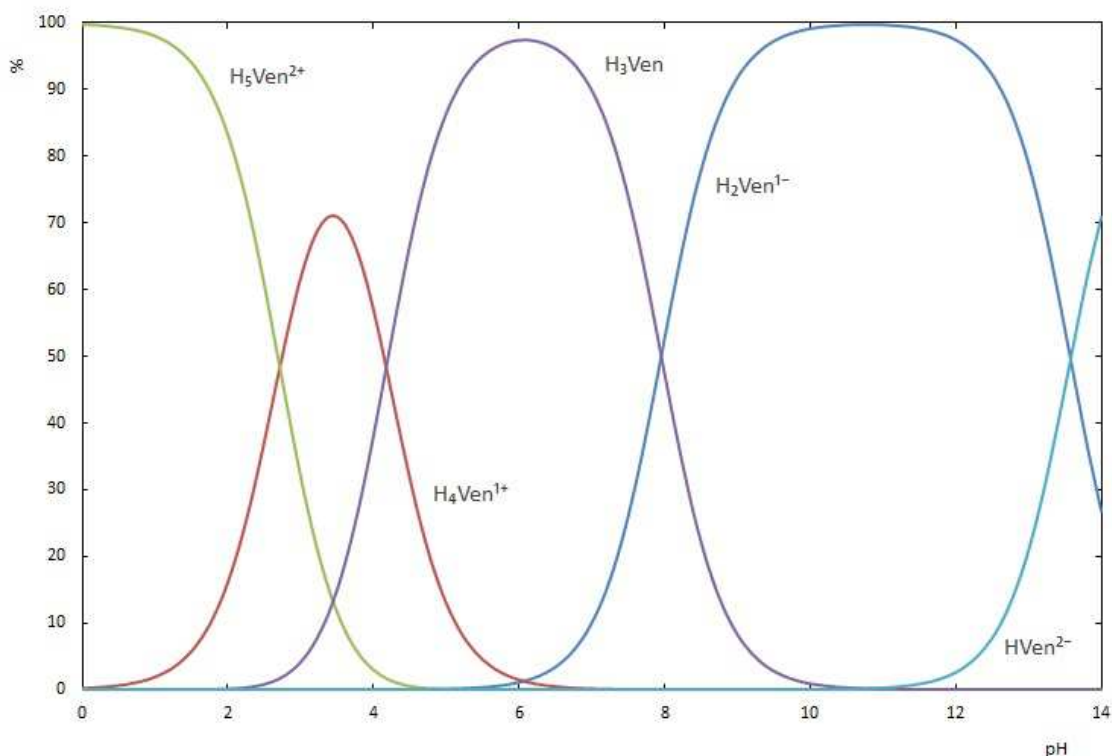
### 3.1 Vývoj metody

#### 3.1.1 Rozpustnost účinné látky

Rozpustnost API venetoclaxu v různých rozpouštědlech byla testována odvážením 1,0 mg API s přidáním 1 ml daného rozpouštědla (viz Tab. 3.1) a hodnocena vizuálně po sonifikaci. API byla nejdříve testována ve 100% ACN, ve kterém se rozpustila. Již 25% přídavek vody vedl k vysrážení API. V methanolu se API nerozpustila. Pokud byl zvolen jako rozpouštědlo vodný roztok hydroxidu sodného či kyseliny fosforečné s určitým objemovým zastoupením ACN, došlo k výraznému zvýšení rozpustnosti. Molekula API obsahuje sulfonamidové a piperazinové funkční skupiny (viz Obr. 1.1). Na základě distribučního diagramu (viz Obr. 3.1) lze odhadnout, že v rozmezí pH 4,5—8,0 je tato molekula z více než 50 % neutrální. Mimo toto rozmezí pH dojde k nabití funkčních skupin a molekula se stane více rozpustnou ve vodě a polárních rozpouštědlech. Z jednotlivých pokusů bylo zjištěno, že nejvhodnějším rozpouštědlem pro následující měření v kyselém prostředí je 10mM vodný roztok  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve směsi s ACN, kde k rozpuštění vzorku stačil 25% obsah ACN. Vhodným rozpouštědlem pro měření v zásaditém prostředí je například 10mM vodný roztok NaOH : ACN 70 : 30 v/v, avšak od zásaditého prostředí bylo v pozdějších měřeních upuštěno.

Tabulka 3.1: Testování rozpustnosti API v jednotlivých rozpouštědlech.

<b>Rozpouštědlo / obsah organické složky (% v/v)</b>	<b>Rozpustnost vzorku o koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup></b>
ACN : H <sub>2</sub> O (%)	
100	rozpustný
75	nerozpustný
MeOH (%)	
100	nerozpustný
ACN : 10mM NaOH (%)	
33	rozpustný
25	částečně rozpustný
10	nerozpustný
ACN : 3,2mM HCL (%)	
33	rozpustný
25	částečně rozpustný
10	nerozpustný
ACN : 0,1% v/v TFA	
33	rozpustný
25	nerozpustný
10	nerozpustný
ACN : 10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	
33	rozpustný
25	rozpustný
10	nerozpustný



Obrázek 3.1: Distribuční diagram protolytických forem venetoclaxu. Z obrázku je patrné, že přibližně v rozmezí pH 4,5–8,0 je molekula venetoclaxu z více než 50% neutrální. Nad a pod touto hodnotou pH dojde k nabití funkčních skupin, a tudíž se stane více rozpustnou ve vodě a polárních rozpouštědlech.

### 3.1.2 Volba stacionární a mobilní fáze

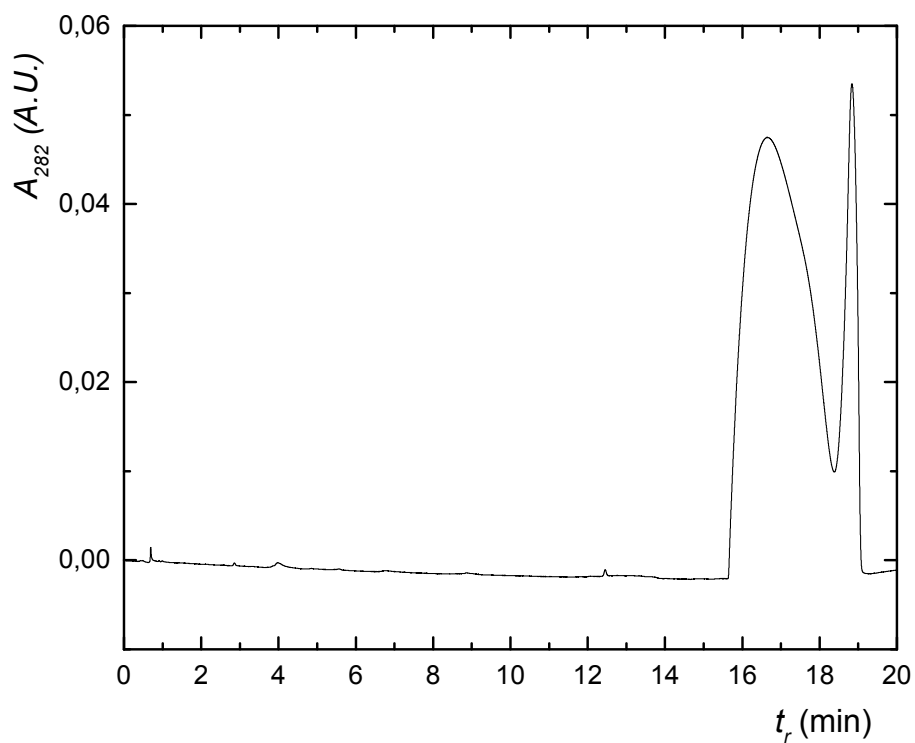
#### Zásadité prostředí

Aby bylo možné API rozpustit ve směsi ACN a vody, bylo nutné nabít funkční skupiny v molekule. Jako první rozpouštědlo pro vzorek byl zvolen pufr (vodný roztok 10mM triethylaminu a 3 mM roztok kyseliny octové, pH 10,9) ve směsi s ACN, 70 : 30 v/v a jako vodná složka mobilní fáze byl použit stejný pufr jako v rozpouštědle vzorku. Jako kolona byla použita Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2,10 mm; 1,7 μm), jelikož je to jedna z nejzákladnějších a nejvíce používaných kolon v daném rozsahu pH. Gradient vodné a organické složky mobilní fáze byl zvolen podle Tab. 2.1. Takto zvolené podmínky poskytovaly pík výrazně rozmytý vpředu. Proto byla v dalším

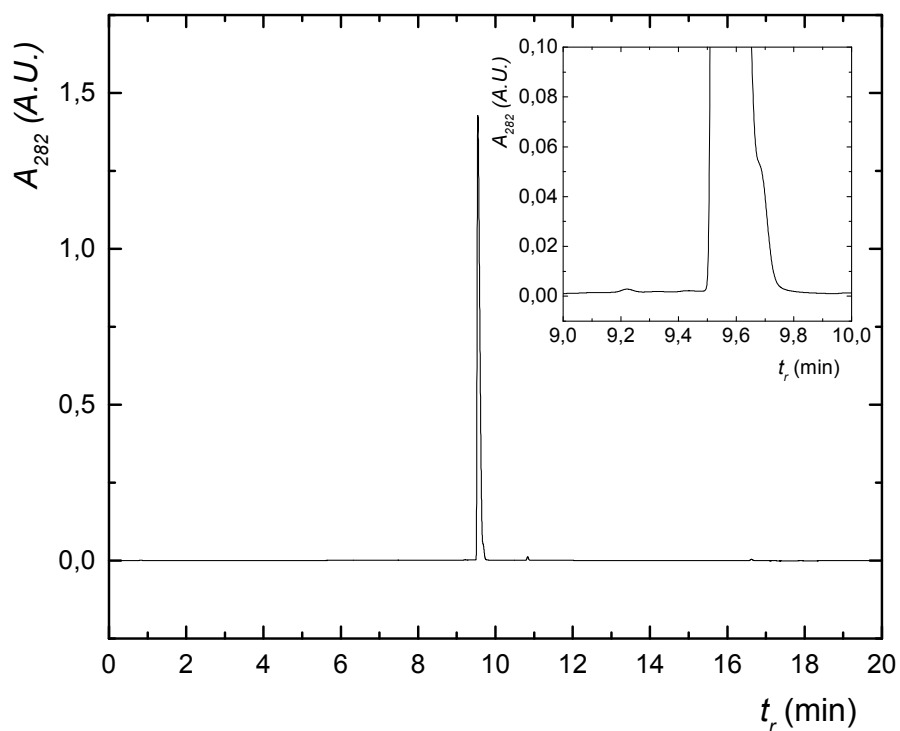
měření zvolena kolona Acquity UPLC BEH Phenyl ( $100 \times 2,10$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ), výsledný chromatogram však také znázorňoval pík rozmytý vpředu.

V zásaditém prostředí byl testován v dalších měřeních pufr CAPS, jelikož je to jeden z doporučených pufrů pro danou kolonu (Acquity UPLC BEH Phenyl). Jako rozpouštědlo vzorku byl zvolen 10mM vodný roztok CAPS/ACN, 70 : 30 v/v, hodnota pH byla upravena triethylaminem na 10,9. Jako pufr v mobilní fázi byl zvolen taktéž 10mM vodný roztok CAPS, pH roztoku bylo upraveno triethylaminem na hodnotu 11,0. Gradient byl nastaven podle Tab. 2.1. Chromatogram však znázorňoval zdeformovaný pík (viz Obr. 3.2), jelikož část molekuly venetoclaxu zřejmě interagovala nežádoucím způsobem s funkčními skupinami stacionární fáze. Proto došlo k výměně kolony. V dalších měřeních byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18, ostatní podmínky zůstaly stejné. Chromatogram znázorňoval pík rozmývající se vzadu a tím pádem nedošlo k oddělení nečistoty, eluující v těsné blízkosti za píkem venetoclaxu (viz Obr. 3.3). Za těchto podmínek byly prováděny změny dílčích podmínek měření, jako byla změna teploty kolony na  $45^\circ\text{C}$ , úprava pH pufru mobilní fáze na 11,5 či úprava gradientu. Žádná z těchto změn nevedla ke snížení rozmytí píku a k oddělení nečistoty. Proto bylo upuštěno od zásaditého prostředí a následující experimenty byly prováděny v prostředí kyselém.





Obrázek 3.2: Chromatogram venetoclaxu v zásaditém prostředí. Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl ( $100 \times 2,10$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ), mobilní fáze: 10mM vodný roztok CAPS, pH upraveno triethylaminem na hodnotu 11,0, teplota kolony:  $30^\circ\text{C}$ , vlnová délka detekce: 282 nm, nástřik:  $1 \mu\text{l}$ , průtok:  $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ .



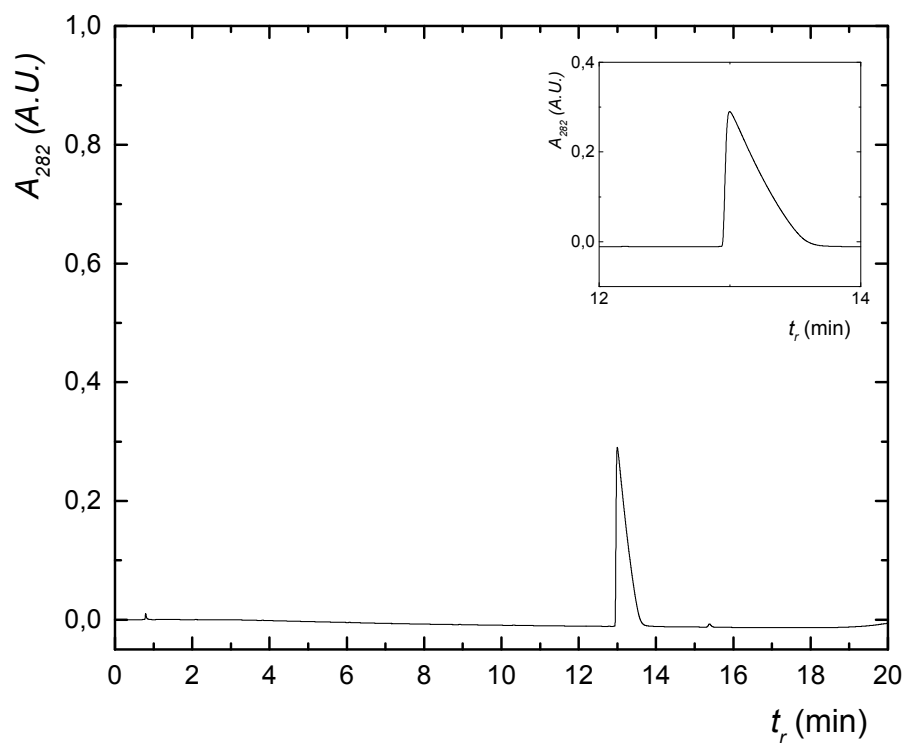
Obrázek 3.3: Změna kolony při měření v zásaditém prostředí. Kolona: Acquity UPLC BEH C18 ( $100 \times 2,10$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ), mobilní fáze: 10mM vodný roztok CAPS, pH upraveno  $\text{NH}_4\text{OH}$  na hodnotu 11,0, teplota kolony:  $30^\circ\text{C}$ , vlnová délka detekce: 282 nm, nástřik:  $1 \mu\text{l}$ , průtok:  $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ . V přiblíženém chromatogramu je možné vidět nečistotu, která nebyla oddělena od hlavního píku ani při změnách dílčích podmínek měření.

## Kyselé prostředí

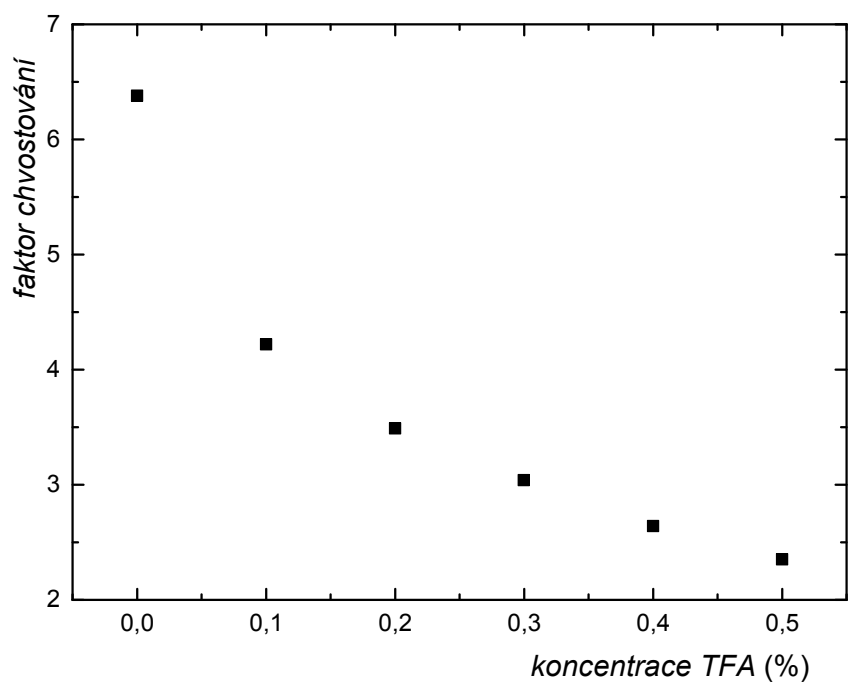
Jako rozpouštědlo pro vzorek v kyselém prostředí byl zvolen 10mM vodný roztok  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN}$  70 : 30 v/v (v pozdějších měřeních 60 : 40 v/v), mobilní fází byla směs pufru (10mM  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NH}_3$  o pH 2,5) a ACN. Zastoupení obou složek se měnilo podle Tab. 2.1. V takovýchto podmínkách chromatogram znázorňoval pík, který se výrazně rozmýval vzadu a zároveň nedošlo k oddělení nečistoty, která eluovala v těsné blízkosti za píkem venetoclaxu (viz Obr. 3.4). Do pufru byla proto přidána TFA jako iontové párové činidlo. [24] Došlo k vytvoření méně polárního iontového asociátu a tím se zamezilo nežádoucím interakcím části molekuly venetoclaxu s funkčními skupinami kolony. Přídavek TFA působil příznivě na tvar, výšku a faktor chvostování píku. Zlepšení faktoru chvostování píku s přídavkem TFA je ukázáno na Obr. 3.5. TFA také pomohla k lepšímu rozlišení nečistoty od píku API, jak je patrné z Obr. 3.6.

Po nalezení vhodného složení mobilní fáze byla dále zkoušena změna kolony, nebude-li chromatogram poskytovat pík s ještě lepším faktorem chvostování. Jako kolona byla použita Acquity UPLC BEH C18. Výsledkem byl však pík, který se rozmýval vpředu. V dalších měřeních byla proto používána původní kolona Acquity UPLC BEH Phenyl.

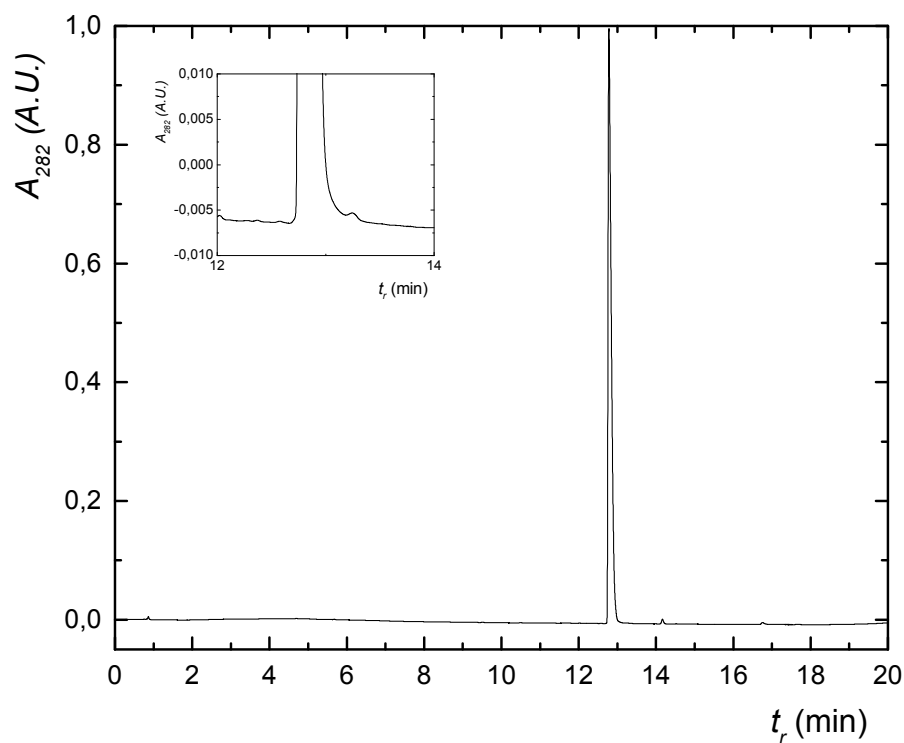
Při pozdějším testování robustnosti metody bylo zjištěno, že pokud pH pufru bylo zvýšeno na 3,1, rozlišení API od nečistoty bylo sníženo. Nečistota elující v těsné blízkosti API se stala součástí hlavního píku. To se projevilo deformací píku. Proto v následujících měřeních byl připravován pufr o hodnotě pH 2,0. Pokud se pH dále snižovalo na hodnotu 1,5, symetrie i faktor chvostování byly ještě příznivější (viz Tab. 3.2). Toto pH však nebylo použito pro další měření, jelikož toto prostředí je již příliš drastické pro kolonu a kvůli životnosti kolony bylo v dalších měřeních používáno pH mobilní fáze 2,0.



Obrázek 3.4: Chromatogram venetoclaxu v kyselém prostředí znázorňující pík rozmývající se vzadu. Rozmytí znemožňovalo oddělení nečistoty. Kolona Acquity UPLC BEH Phenyl ( $100 \times 2,10$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ), mobilní fáze: směs pufru ( $10\text{mM H}_3\text{PO}_4/\text{NH}_3$  o pH 2,5) bez přídavku TFA a ACN, teplota kolony:  $30^\circ\text{C}$ , vlnová délka detekce: 282 nm, nástřik:  $1 \mu\text{l}$ , průtok:  $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ .



Obrázek 3.5: Závislost faktoru chvostování píku API na koncentraci TFA v mobilní fázi. Docházelo k postupnému snižování faktoru chvostování, doprovázenému zvýšením výšky píku a vyšším rozlišením API od sousední nečistoty.



Obrázek 3.6: Chromatogram venetoclaxu v kyselém prostředí s minimálním rozmýváním vzadu a oddělením nečistoty. Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl ( $100 \times 2,10$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ), mobilní fáze: směs pufru ( $10\text{mM H}_3\text{PO}_4/\text{NH}_3$ ) s přidavkem 0,5% TFA o pH 2,5 a ACN teplota kolony:  $30^\circ\text{C}$ , vlnová délka detekce: 282 nm, nástřik:  $1 \mu\text{l}$ , průtok:  $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ .

## 3.2 Validace metody

### 3.2.1 Kalibrační závislost

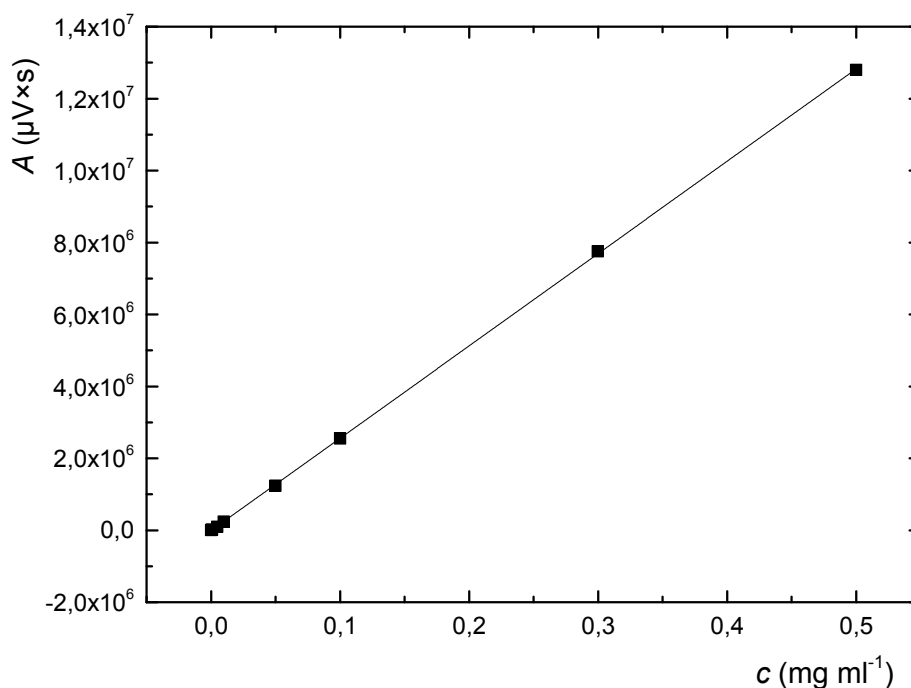
Po vyvinutí dané metody byla kalibrace provedena proměřením kalibračních roztoků o koncentracích 0,5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,01,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  a  $2 \cdot 10^{-5}$  mg ml<sup>-1</sup>. Po proměření daných vzorků byla sestrojena kalibrační závislost hodnot signálů pro plochu píku na koncentraci daného kalibračního roztoku (viz Obr. 3.7). Body byly proloženy regresní přímkou a byl vypočten koeficient determinance, jehož hodnota byla 1,0000. Z kalibrační přímky byla vypočtena hmotnost účinné látky API v tabletě Venclexty. Následně byl vypočítán interval odlehlosti podle rovnice 2.5. Hmotnost účinné látky v tabletě Venclexta odpovídala  $102,8 \pm 0,34$  mg, což je v dobré shodě s deklarovanou hodnotou 100 mg.

### 3.2.2 Vyhodnocení analytických parametrů

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) byly vypočteny podle rovnic 2.1 a 2.2. Pro výpočet byla použita směrnice regresní přímky z kalibrační závislosti hodnot signálů pro výšku píku na koncentraci daného kalibračního roztoku, která odpovídala hodnotě  $3,72 \cdot 10^6$  μV ml mg<sup>-1</sup>. Šum základní linie byl vyhodnocen z chromatogramu slepého vzorku a odpovídal hodnotě 20 μV. Hodnota LOD odpovídala  $1,6 \cdot 10^{-5}$  mg ml<sup>-1</sup> a hodnota LOQ odpovídala  $5,4 \cdot 10^{-5}$  mg ml<sup>-1</sup>. Hodnoty byly ověřeny experimentálně.

Linearita dané metody byla vypočtena vnesením logaritmických hodnot koncentrace na osu  $x$  a logaritmických hodnot ploch píku na osu  $y$  (viz Obr. 3.8). Ze směrnice rovnice regresní přímky byla určena hodnota linearity, která odpovídala hodnotě 1,049. Vzhledem k tomu, že směrnice regresní přímky se nelišila od hodnoty 1 o více než 5 %, lze říci, že odezva detektoru je lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací a lineární dynamický rozsah metody je  $5,4 \cdot 10^{-5}$ – $0,50$  mg ml<sup>-1</sup>.

Opakovatelnost měření byla určena ze sedmi po sobě jdoucích měření vzorku tablety na základě relativní směrodatné odchylky, která byla získána z rovnic 2.3 a 2.4. Relativní směrodatná odchylka retenčního času píku venetoclaxu odpoví-



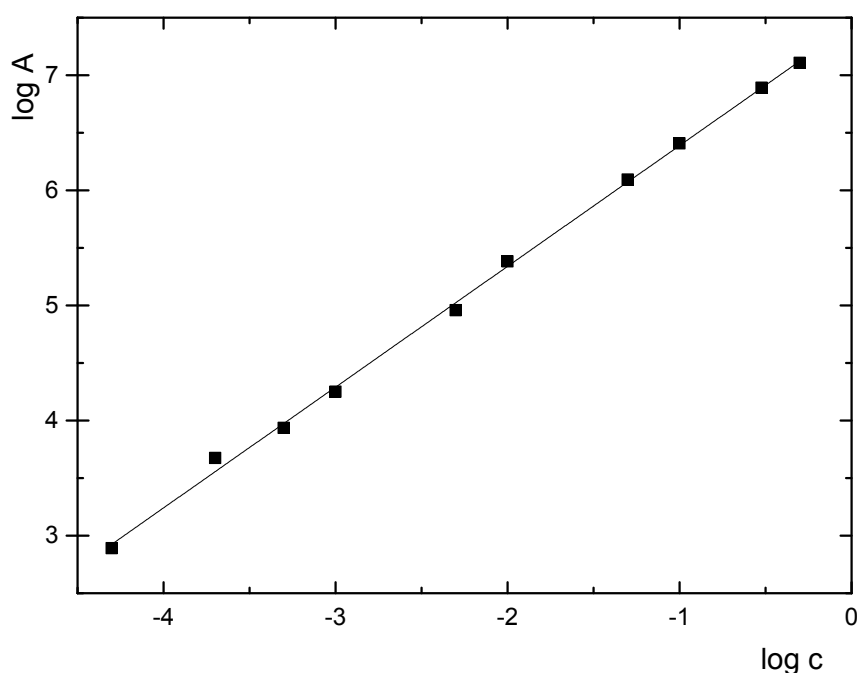
Obrázek 3.7: Kalibrační závislost hodnot plochy píku na koncentraci daného kalibračního roztoku. Podmínky měření: kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl (100 × 2,10 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ), mobilní fáze: směs pufru (10mM  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NH}_3$ ) s přídavkem 0,5% TFA o pH 2,0 a ACN, teplota kolony: 30 °C, vlnová délka detekce: 282 nm, nástřík: 1  $\mu\text{l}$ , průtok: 0,3 ml min<sup>-1</sup>.

dala 0,07% a relativní směrodatná odchylka pro plochu píku odpovídala 0,45%. Relativní směrodatná odchylka je ve farmaceutické analýze zpravidla limitována hodnotou 2%. Pokud je přesažena tato hodnota, metoda není dostatečně přesná. Z hodnot relativních směrodatných odchylek pro retenční čas i plochu píku vyplývá, že daná metoda je přesná.

### 3.2.3 Robustnost

Při testování robustnosti vyvinuté metody byly sledovány se změnou jednotlivých chromatografických podmínek tyto kritické parametry: faktor chvostování, relativní retenční čas nejbližší nečistoty (dále jen nečistota  $X$ ) ve vztahu k retenčnímu času





Obrázek 3.8: Závislost logaritmických hodnot ploch píků na logaritmických hodnotách koncentrací jednotlivých kalibračních roztoků. Ze směrnice regresní přímky byla odečtena hodnota linearit 1,049 a určen lineární dynamický rozsah  $5,4 \cdot 10^{-5}$ – $0,50 \text{ mg ml}^{-1}$ .

píku API a rozlišení píků API a nečistoty  $X$  (viz Tab. 3.2). Co se týče robustnosti metody, je zásadní zachování rozlišení píků API a nečistoty  $X$ . Toto rozlišení je však závislé na faktoru chvostování i na relativním retenčním čase, proto je vhodné sledovat i zbylé dva parametry.

Robustnost metody byla testována vůči změně teploty o  $5^\circ\text{C}$ , změně obsahu organické složky v mobilní fázi o 2% a změně pH vodné složky mobilní fáze o 0,5.

Faktor chvostování se významně nemění v závislosti na změně dílčích podmínek. Nejvyšší hodnoty 1,87 nabývá při zvýšeném pH a zvýšené teplotě. To odpovídá pouze 3,3% odchylce od původní hodnoty 1,81. Nejnižší faktor chvostování 1,71 je při snížené teplotě. To odpovídá 5% odchylce od původní hodnoty.

Relativní retence byla za všech testovaných podmínek stabilní. Odchylka od původní hodnoty nepřekročila v žádném z případů 1%.

Tabulka 3.2: Závislosti faktoru chvostování, relativního retenčního času nečistoty *X* a rozlišení píků API a nečistoty *X* na jednotlivých podmínkách. Podmínky původního měření: kolona Acquity UPLC BEH Phenyl (100 × 2,10 mm; 1,7 μm), mobilní fáze: směs pufru (10mM vodného roztoku H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub>) s přidavkem 0,5% TFA o hodnotě pH 2 a ACN. Program gradientové eluce je uveden v Tab. 2.1.

Podmínky	Faktor chvostování API	Relativní retenční čas nečistoty <i>X</i>	Rozlišení API a nečistoty <i>X</i>
Původní	1,81	1,05	4,02
+5 °C	1,87	1,05	4,87
-5 °C	1,71	1,05	3,98
Grad. +2 % B	1,78	1,05	4,60
Grad. -2 % B	1,78	1,05	4,35
+0,5 % pH	1,87	1,03	3,46
-0,5 % pH	1,81	1,06	4,65

Při vyšším obsahu ACN v mobilní fázi se rozlišení API a vedlejší nečistoty zvýšilo z původní hodnoty 4,02 na 4,60. Při snížení obsahu ACN v mobilní fázi o 2 % došlo také ke zvýšení rozlišení obou píků na hodnotu 4,35.

Při zvýšené teplotě se rozlišení zvýšilo na hodnotu 4,87. Snížení teploty vedlo pouze k mírnému snížení rozlišení na hodnotu 3,98.

V průběhu vývoje metody se ukázalo, že při snižování pH vodné složky mobilní fáze se zvyšuje rozlišení píku API a nečistoty *X*. Kvůli zajištění robustnosti metody vůči odchylkám hodnoty pH bylo jako optimální zvoleno pH 2,0. Při snížení pH na hodnotu 1,5 lze vidět zvýšení rozlišení na hodnotu 4,65. Okyselením mobilní fáze dojde patrně ke zvýšení rozdílu ve stupni protonizace API a nečistoty *X*, a tudíž dojde i ke zvýšení rozlišení jejich píků. Při zvýšení pH na hodnotu 2,5 bylo rozlišení API od vedlejší nečistoty 3,46. To je nižší rozlišení než původní hodnota, stále však postačuje pro účel metody.

Z tabulky je patrné, že metoda je robustní vůči mírným odchylkám teploty, obsahu organické složky v mobilní fázi a pH. Největší vliv na změny sledovaných

kritických parametrů má pH. Nejnižší rozlišení je při zvýšení pH o 0,5, to odpovídá hodnotě 3,46, což je stále dostatečné rozlišení.

### 3.2.4 Stabilita venetoclaxu v rozpouštědle vzorku

Vyvinutá metoda byla použita k měření stability roztoku API venetoclaxu a tablety Venclexty v rozpouštědle vzorku, kterým byla směs 10mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : ACN (60 : 40 v/v). API i tableta byly měřeny hned po připravení vzorku, dále po jednom dnu, kdy byly vzorky ponechány v autosampleru při 5 °C a po dvou dnech v autosampleru, také při 5 °C. Hodnoty relativních ploch píků nečistot lze vidět v Tab. 3.3 a 3.4. Z Tab. 3.3 je patrné, že API se nerozkládala. V původním vzorku bylo přítomné malé množství nečistot, které se nezměnilo. Stejně tak nepřibýly nečistoty nové. V Tab. 3.4 lze vidět, že nečistot v tabletě je více než v API. To je dáno pomocnými látkami, které se přidávají do tablety při výrobě. Ani v případě tablety v rozmezí dvou dnů nečistot nepřibývalo. Roztoky API i tablety v rozpouštědle vzorku jsou tedy v rozmezí dvou dnů při 5 °C stabilní.

Tabulka 3.3: Závislost ploch píku jednotlivých nečistot vztažených k ploše hlavního píku API (vnitřní normalizace), vznikajících během degradace venetoclaxu při vystavení API jednotlivým degradačním podmínkám.

—	Relativní plocha píku nečistot obsažených v API (metoda vnitřní normalizace) (%)		
	$t_{rel} 1,09$	$t_{rel} 1,25$	$t_{rel} 1,28$
API ihned po přípravě vzorku	0,46	—	0,30
10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : ACN (60 : 40 v/v)/5 °C/1 den	0,47	—	0,30
10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : ACN (60 : 40 v/v)/5 °C/2 dny	0,46	—	0,30
80 °C/11,3 RV/25 hodin	0,48	—	0,33
80 °C/75 RV/25 hodin	0,43	—	0,29
80 °C/11,3 RV/4 dny	0,47	—	0,29
80 °C/75 RV/4 dny	0,36	0,14	0,14

Tabulka 3.4: Závislost ploch píků jednotlivých nečistot obsažených v tabletě vztažených k ploše píku API (vnitřní normalizace), vznikajících během degradace Venclexty při vystavení tablety jednotlivým degradačním podmínkám.

—	Relativní plocha píku nečistoty (metoda vnitřní normalizace) (%)													
	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$	$t_{rel}$
—	0,43	0,57	0,63	0,77	0,88	0,93	0,95	0,99	1,05	1,09	1,1	1,25	1,4	
tableta ihned														
po přípravě vzorku	—	—	—	0,07	—	0,05	0,05	—	—	0,06	—	0,05	0,08	
10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : ACN														
(60 : 40 v/v)/5 °C/1 den	—	—	—	0,07	—	0,05	0,05	—	—	0,06	—	0,05	0,08	
10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : ACN														
(60 : 40 v/v)/5 °C/2 dny	—	—	—	0,07	—	0,05	0,05	—	—	0,06	—	0,05	0,09	
80 °C/11,3 RV/														
25 hodin	—	—	—	—	—	0,06	0,08	0,07	—	0,06	—	—	0,10	
80 °C/75 RV/														
25 hodin	0,05	—	—	0,10	—	0,05	0,14	—	—	0,06	—	—	0,09	
80 °C/11,3 RV/														
4 dny	0,05	0,05	—	0,11	0,10	0,05	0,11	0,07	0,07	0,07	—	0,08	0,11	
80 °C/75 RV/														
4 dny	0,10	0,12	0,05	0,17	0,05	0,06	0,30	0,05	0,11	0,06	0,08	0,08	0,10	

## 3.3 Stabilita a degradace venetoclaxu

### 3.3.1 Degradace API a tablety

API a tableta byly podrobeny degradačním studiím, kde se testovala jejich stabilita během stresových podmínek při zvýšené teplotě a různých vlhkostech. Metoda vyvinutá v této práci byla použita ke sledování obsahu nečistot ve vzorcích podrobených stresovým podmínkám. V Tab. 3.3 a 3.4 jsou ukázány nově vznikající nečistoty při vystavení API / tablety různým degradačním podmínkám, zatímco v Tab. 3.5 a 3.6 je možné vidět celkový přírůstek obsahu nečistot, stanovený metodou vnitřní normalizace a rychlost degradace. Celková rychlost degradace byla vypočtena z rozdílu součtu ploch píků nečistot vyskytujících se ve vzorku před vystavením stresovým podmínkám a součtu ploch píků nečistot po vystavení dané stresové podmínce. Tento rozdíl byl vztažen na počet hodin vystavení API nebo tablety stresové podmínce a poté byla hodnota rychlosti degradace převedena na dny.

Z výsledků je zřejmé, že nečistota s relativním retenčním časem 1,28 nacházející se pouze ve vzorku API se rozkládala při vystavení 80 °C a 75% relativní vlhkosti (RV). Po čtyřech dnech při stejných podmínkách lze vidět výraznější degradaci nečistoty, díky které klesla relativní plocha píku z 0,30 % na 0,14 %. Při 80 °C v suchém prostředí (RV 11 %) se obsah této nečistoty významně nezměnil ani po čtyřech dnech.

Nečistota s relativním retenčním časem 1,09 nacházející se ve vzorku API se také rozkládala při 80 °C a 75% RV. Po 25 hodinách se její obsah snížil o 0,03 % a za čtyři dny při stejných podmínkách o 0,1 %. V suchém prostředí (RV 11 %) se její obsah podobně jako v případě nečistoty s relativním retenčním časem 1,28 významně nezměnil. V degradaci obou nečistot tedy hraje důležitou roli vlhkost. Nečistota s relativním retenčním časem 1,09 se nacházela i v tabletě Venclaxy. Při teplotě 80 °C byla tato nečistota stabilní a její relativní plocha se po 25 hodinách ani po čtyřech dnech významně nezměnila, a to jak při RV 11 %, tak při RV 75 %. Jedná-li se o stejnou látku jako ve vzorku API, je stabilizována dalšími látkami přítomnými v tabletě.

Obsah nečistot s relativními retenčními časy 0,77 a 0,95 nacházejících se v tabletě se při teplotě 80 °C zvyšoval. Rychleji se zvyšoval při ponechání vzorku tablety

Tabulka 3.5: Závislost součtu ploch píků nečistot vztažených k hlavnímu píku (vnitřní normalizace) a rychlost degradace na jednotlivých stresových podmínkách, kterým byla vystavena API.

stresové podmínky	všechny nečistoty		nečistoty degradující v pozorovaném čase	
	součet ploch píků nečistot (%)	rychlost degradace (% / den)	součet ploch píků nečistot (%)	rychlost degradace (% / den)
—	0,76	—	—	—
10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : ACN (60 : 40 v/v)/5 °C/1 den	0,77	0,01	—	—
10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : ACN (60 : 40 v/v)/5 °C/2 dny	0,76	0,00	—	—
80 °C/11,3 RV/ 25 hodin	0,81	0,05	—	—
80 °C/75 RV/ 25 hodin	1,19	0,41	0,47	0,45
80 °C/11,3 RV/ 4 dny	0,76	0,00	—	—
80 °C/75 RV/ 4 dny	0,64	-0,3	0,14	0,04

ve vlhkém prostředí. Po čtyřech dnech při teplotě 80 °C ve vlhkém prostředí se obsah nečistoty s relativním retenčním časem 0,77 zvětšil o 0,1 % a obsah nečistoty s relativním retenčním časem 0,95 se zvětšil o 0,25 %. Nečistota s relativním retenčním časem 0,95 tedy zvyšovala svůj obsah rychleji.

Obsah ostatních nečistot v tabletě Venclexty se výrazně nezvětšoval ani nesnižoval.

Jak již bylo uvedeno, z Tab. 3.3 a 3.5 je patrné, že nečistoty s relativním retenčním časem 1,28 a 1,09 nacházející se v API podléhaly degradaci. Celková rychlost degradace API při 80 °C a 75% RV vyšla proto záporná a celkový součet ploch píků

Tabulka 3.6: Závislost součtu ploch píků nečistot vztažených k hlavnímu píku (vnitřní normalizace) a rychlost degradace na jednotlivých stresových podmínkách, kterým byla vystavena API.

stresové podmínky	součet ploch píků nečistot (%)	rychlost degradace (% / den)
10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : ACN (60 : 40 v/v)/5 °C/1 den	0,36	0,00
10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : ACN (60 : 40 v/v)/5 °C/2 dny	0,37	0,01
80 °C/11,3 RV/ 25 hodin	0,37	0,01
80 °C/75 RV/ 25 hodin	0,49	0,12
80 °C/11,3 RV/ 4 dny	0,87	0,13
80 °C/75 RV/ 4 dny	1,33	0,24

nečistot vztažených hlavního píku byl menší než před vystavením stresovým podmínkám. Proto byla rychlost degradace v Tab. 3.5 vypočítána také s vynecháním degradujících nečistot, čímž byly získány smysluplnější výsledky s větší vypovídací hodnotou. V Tab. 3.5 lze vidět, že rozklad nečistot probíhal až při ponechání vzorku API ve vlhkém prostředí po dobu delší než 25 hodin.

V Tab. 3.5 a 3.6 lze vidět, že pokud byly API i tableta ponechány v suchém prostředí (RV 11 %) v exsikátoru s nasyceným roztokem LiCl při stejné teplotě, degradace byla pomalejší než při ponechání vzorku ve vlhkém prostředí (RV 75 %).

Podle Tab. 3.5 a 3.6 lze vidět, že během stresového testování tablety i API vznikaly nečistoty a tableta i API podléhaly degradaci. Součty ploch píků nečistot vztažených k ploše hlavního píku se měnily u API léčivého přípravku Venclexta jen málo a rozdíl v rychlostech degradace je také malý. Rychlost degradace u tablety Venclexty byla



větší než u API. Venetoclax i Venclexta při vystavení daným stresovým podmínkám se jevily jako poměrně stabilní.

## 4. Závěr

V této práci byla vyvinuta metoda pro stanovení venetoclaxu pomocí techniky UHPLC. Tato metoda byla dále využita k stresovému testování API venetoclaxu a tablety přípravku Venclexta. Pro zajištění rozpustnosti venetoclaxu je zapotřebí kyselé nebo zásadité prostředí. Jako nejvhodnější rozpouštědlo pro vzorek se ukázal 10mM vodný roztok  $\text{H}_3\text{PO}_4$  : ACN s 25% zastoupením ACN, k vlastnímu vývoji metody byl použit stejný roztok avšak se 40% zastoupením ACN, aby byla kolona ochráněna před případným vysrážením vzorku API. Separace byla testována v zásaditěm i kyselém prostředí. Optimální chromatografické podmínky, poskytující nejlepší hodnoty faktoru chvostování a rozlišení hlavního píku API a nečistoty eluující v jeho těsné blízkosti byly separační systém s reverzními fázemi, kolona Acquity UPLC BEH Phenyl ( $100 \times 2,10$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ), optimální mobilní fáze byla směs pufru (10mM  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NH}_3$ ) s přídavkem 0,5% TFA o hodnotě pH 2,0 a ACN, dávkování 1  $\mu\text{l}$  vzorku, teplota kolony  $30^\circ\text{C}$ , vlnová délka detekce 282 nm a průtok mobilní fáze  $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ . Během validace metody byla zjištěna přesnost měření, opakovatelnost, kalibrační závislost, meze detekce a kvantifikace, linearita měření a lineární dynamický rozsah, robustnost metody a dále proběhlo testování stability vzorku. Směrodatná odchylka retenčních časů byla 0,07 % a směrodatná odchylka ploch píků byla 0,45 %, vyvinutá metoda je tedy přesná. Hodnota meze detekce metody byla  $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mg mm}^{-1}$  a meze kvantifikace byla  $5,4 \cdot 10^{-5} \text{ mg mm}^{-1}$ . Linearita měření odpovídala hodnotě 1,049 a na základě této hodnoty bylo vyhodnoceno, že odezva detektoru je lineární v celém testovaném rozsahu koncentrací. Vyvinutá metoda je robustní vůči mírným odchylkám teploty, obsahu organické složky v mobilní fázi a pH. Při testování stability vzorků bylo vyhodnoceno, že roztoky API i tablety v rozpouštědle vzorku jsou v rozmezí dvou dnů při  $5^\circ\text{C}$  stabilní. Vyvinutá metoda byla použita ke zjištění obsahu nečistot v API venetoclaxu a v tabletě Venclexty a ke zjištění degradace API a tablety. Během stresového testování se ukázalo, že rozdíly v součtech ploch píků nečistot vztažených k ploše hlavního píku u API i tablety byly malé a rozdíl v rychlostech degradace byl také malý. V porovnání s API tableta Venclexty obsahovala větší množství nečistot

díky pomocným látkám, které se přidávají do tablety během výroby. Dále i rychlost degradace tablety byla větší než u API. API i tableta byly vyhodnoceny jako stabilní.

# Seznam použité literatury

- [1] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=49846579, dostupné z URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/49846579> (accessed Mar. 12, 2018).
- [2] Center for drug evaluation and research. Clinical pharmacology and biopharmaceutics review(s). Application number: 208573Orig1s000, NDA208573 Venetoclax, převzato 4. 5. 2018, dostupné z URL: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2016/208573Orig1s000ClinPharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/208573Orig1s000ClinPharmR.pdf)
- [3] DrugBank, převzato 4. 5. 2018, dostupné z URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11581>
- [4] Mitsiades C. S., Mitsiades N. S., McMullan C. J., Poulak V., Shringarpure R., Akiyama M., Hideshima T., Chauhan D., Joseph M., Libermann T. A., Garcí'a-Echeverri' a C., Pearson M. A., Hofmann F., Anderson K. C., Kung A. L.: Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer cell*, Volume 5, issue 3, 221–223, 2004. CELL PRESS, dostupné z URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610804000509>
- [5] Deeks E. D.: Venetoclax: First global Approval. *Drugs*, Volume 76, issue 9, 979–987, 2016. Springer International Publishing, dostupné z URL: <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0596-x>
- [6] MarvinView Product Version 15.4.13.0., dostupné z URL: <http://www.chemaxon.com>
- [7] Venclexta. The VENCLEXTA™ starting Pack provides the first 4 week for treatment, převzato 26. 4. 2018, dostupné z URL: <https://www.venclexta.com/venclexta-dosing-schedule-for-patients/venclexta-starting-pack.html>

- [8] Nováková L., Matysová L., Solich P.: Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, Volume 68, 908–918, 2006, dostupné z URL: <http://www.elsevier.com/locate/talanta>
- [9] Háková E.: Pokroky v moderních separačních metodách, 2012, převzato 26. 2. 2018, dostupné z URL: <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc/>
- [10] hplc.cz, převzato 25. 2. 2018, dostupné z URL: <http://hplc.cz/>
- [11] Waters the science of what's possible, převzato 26. 2. 2018, dostupné z URL: [http://www.waters.com/waters/en\\_CZ/Detectors-for-HPLC-UHPLC-Systems/nav.htm?locale=en\\_CZ&cid=514288](http://www.waters.com/waters/en_CZ/Detectors-for-HPLC-UHPLC-Systems/nav.htm?locale=en_CZ&cid=514288)
- [12] Nováková L., Douša M. a kolektiv: *Moderní HPLC v teorii a praxi I.*, 221–223, 1. vydání, Praha 2013.
- [13] Nováková L., Solichová D., Solich P.: Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel. *Journal of separation science*, Volume 28, Issue 16, 2433–2443, 2006, dostupné z URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jssc.200600147#citedby-section>
- [14] Nováková L., Douša M. a kolektiv: *Moderní HPLC v teorii a praxi II.*, 32, 1. vydání, Praha 2013.
- [15] Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv. *Obsah Českého lékopisu 2017*. Převzato 26. 4. 2018, dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/farmaceuticky-prumysl/cesky-lekopis>
- [16] Nováková L., Douša M. a kolektiv: *Moderní HPLC v teorii a praxi II.*, 141–156, 1. vydání, Praha 2013.
- [17] Harris D. C.: *Quantitative chemical analysis*, 82–86, 7th ed. New York, Freeman 2007.

- [18] ICH quality guidelines, Q2 analytical validation, převzato 27. 2. 2018, dostupné z URL: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- [19] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation*, 1–10, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011
- [20] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation*, 142–143, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011
- [21] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation*, 40, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011
- [22] Harris D. C.: *Quantitative chemical analysis*, 54–56, 7th ed. New York, Freeman 2007.
- [23] Microsoft, *Confidence (funkce)*, převzato 28. 3. 2018, dostupné z URL: <https://support.office.com/cs-cz/article/confidence-funkce-75ccc007-f77c-4343-bc14-673642091ad6>
- [24] Cai B., Li J.: Evaluation of trifluoroacetic acid as an ion-pair reagent in the separation of small ionizable molecules by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, Volume 399, Issue 3, 249–258, 1999, dostupné z URL: [URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267099004614?via%3Dihub](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267099004614?via%3Dihub)