

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**STABILITA LÉČIVÝCH LÁTEK Z POHLEDU
ANALYTICKÉ CHEMIE**

HABILITAČNÍ PRÁCE

(Soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

2018

PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala za to, že mám to štěstí pracovat na Katedře analytické chemie. Děkuji prof. RNDr. Petrovi Solichovi, CSc. za umožnění profesního růstu, pomoc a motivaci během práce na katedře.

Díky patří Petrovi Chocholoušovi, Pavlovi Jáčovi, Haně Kočové Vlčkové, Ludmile Matysové, Lucii Novákové, Haně Sklenářové a Daliborovi Šatínskému za to, že mě vzali do svých pracovních skupin a pomohli mi nakouknout do tajů analytické chemie, zejména do kapalinové chromatografie, s trochou hmotnostní spektrometrie, do metod přípravy vzorků, do úskalí sepisování odborných prací a hledání nových vědeckých témat a také do práce se studenty. Všem výše jmenovaným bych ráda poděkovala za jejich ochotu mi pomoci a bez odkladu zodpovědět moje dotazy. Můj dík patří také prof. RNDr. Rolfovi Karlíčkoví, DrSc., doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc., doc. RNDr. Miroslavu Poláškoví, CSc. a ostatním členům katedry za vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc při řešení akademických a vědecko-výzkumných otázek.

Díky patří Martině Hákové za její pracovní elán a nadšení řešit nanovláknenné problémy a za nadějnou vizi i do mé vědecko-výzkumné budoucnosti.

Díky bych ráda řekla také doc. Hannelore Kopelent, která mi pomohla s první prací na HPLC přístroji a přivedla mě ke zjištění, že mě práce v laboratoři baví.

Můj největší dík patří mojí rodině, hlavně mamce, tatkoví a Ivče za to, že vždycky stáli při mně a podporovali mě, i když to se mnou nebylo vždy jednoduché. Petrovi a Adámkovi děkuji za to, že tu pro mě jsou a že mi umožnili sepsat tuto práci. Za podporu, nápady, odborné i neoborné denní konzultace a také za pomoc při sepisování této práce bych chtěla poděkovat právě mému manželovi Petrovi. Dík patří také Martinovi, Míšovi a Filípkovi.

Ráda bych poděkovala také Janě Malenovské, Marcele Seifrtové a Haně Kočové Vlčkové za přátelství, podporu a pomoc při řešení každodenních pracovních a životních situací během doktorského studia a v průběhu zaměstnání.

Děkuji grantovým agenturám FRVŠ, GAUK, Výzkumným záměrům MŠMT, Univerzitnímu výzkumnému centru (UNCE 204026/2012) a GAČR za finanční podporu mé práce a za možnost prezentovat získané výsledky na zahraničních konferencích. Dále děkuji programu Erasmus, stipendijní agentuře Landesstiftung Baden-Württemberg, Fondu mobility Univerzity Karlovy a projektu FAFIS za finanční podporu mých zahraničních pobytů.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Habilitační práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

.....

Lucie Chocholoušová Havlíková

Seznam použitých zkratek

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
CAD	Detektor nabitého aerosolu
CE	Kapilární elektroforéza
CRL	Referenční látka
C18	Oktadecylsilikagel
CTD	Formát Registrační dokumentace - Common technical document
ČL	Český lékopis
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELSD	Odpařovací detektor rozptylu světla
GC	Plynová chromatografie
EMA	Evropská léková agentura
ESI	Ionizace elektrosprejem
EU	Evropská unie
FDA	Americký ústav pro kontrolu potravin a léčiv
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva
IR	Infračervená spektrometrie
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
MS	Hmotnostní spektrometrie, hmotnostní spektrometr
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PDA	Detektor diodového pole
QuEChERS	Akronym ze slov Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe – rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný
RV	Relativní vlhkost
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop

SOP	Standardní operační postup
SPE	Extrakce na tuhou fázi
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TDI	Celkový denní příjem
TIC	Celký iontový proud
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TTC	Toxikologický práh
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialový

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl.....	10
3. Teoretická část.....	11
3.1. Stabilita.....	11
3.1.1. Definice pojmů	16
3.2. Stresové testy (zátěžové zkoušky).....	18
3.2.1. Stresové testy ve směrnících autorit	19
3.2.2. Postup provedení stresových testů.....	23
3.2.3. Strategie volby a výběru podmínek provedení stresových testů	23
3.2.4. Limity rozkladu, délka provedení testování	28
3.2.5. Koncentrace substance	29
3.2.6. Stresové testy ve fázích výroby substance	29
3.2.7. Příprava vzorku	30
3.2.8. Rozkladné reakce a mechanismy.....	30
3.2.9. Stresové testy biologických a biotechnologických léčiv	31
3.3. Stabilitu indikující metoda	33
3.3.1. Strategie vývoje stabilitu indikující metody.....	33
3.3.2. Příprava vzorku	34
3.3.3. Volba techniky	34
3.3.4. Optimalizace metody.....	36
3.3.5. Validace stabilitu indikující metody.....	39
3.4. Analytické hodnocení profilu nečistot.....	42
3.4.1. Kinetika rozkladných reakcí.....	45
3.4.2. Kontrola nečistot v látkách pro farmaceutické použití	46
3.4.3. Specifikace	48
3.4.4. Stanovení definovaných nečistot.....	48
3.4.5. Určení struktury pravděpodobných nečistot.....	49
3.4.6. Nečistoty biologických a biotechnologických léčiv	51
3.4.7. Genotoxické nečistoty	51
3.4.8. Enantiomerní čistota substancí	52
3.5. Pokročilé oxidační procesy	54
3.5.1 Heterogenní fotokatalýza oxidem titaničitým	55
4. Komentář k publikovaným pracím.....	60
4.1. Vývoj metod pro sledování stability účinných látek, stanovení obsahu vybraných pomocných látek v léčivých přípravcích a sledování výskytu nečistot.....	61
4.2. On-line SPE HPLC, využití nanovláken jako sorbentů pro extrakci na tuhou fázi, moderní metody úpravy vzorku pro analýzu.....	65

4.3. Využití moderních typů stacionárních fází v HPLC v analýze látek přírodního původu a doplňcích stravy	68
4.4. Analytická chemie jako součást botanické a biochemické studie	70
5. Shrnutí	72
6. Závěr	73
7. Reference	74
8. Podíl autorky habilitační práce na předložených publikačních výstupech.....	80

1. Úvod

Na sledování stability léčivých látek a léčivých přípravků je celosvětově kladen stále větší důraz. Léčivé přípravky nejsou neomezeně neměnné systémy. Probíhají v nich rozkladné děje a časem může klesat účinnost přípravku. Léčivý přípravek, který se dostane k pacientovi, musí vyhovovat všem jakostním požadavkům, být bezpečný, kvalitní a účinný. Proto je sledovaná také jeho stabilita nejen po stanovenou dobu použitelnosti.

Testování stability účinných látek a léčivých přípravků vyžaduje použití vhodně zvolené analytické metody, která je schopna sledovat obsah látky bez interferencí s rozkladnými produkty a ostatními nečistotami. Jakýkoliv přístup pro jejich hodnocení by měl být komplexní, jednoduchý a snadno proveditelný.

Léčivé látky (účinné látky, aktivní substance, substance) představují skupinu rozličných molekul od malých po velké, navíc v současnosti zahrnují i bioléčiva a látky přírodního původu.

Stabilita látek se v analytické laboratoři sleduje na několika úrovních od jejich výroby, přes dobu použitelnosti až po jejich likvidaci. Látka se záměrně podrobí stresovým podmínkám a sleduje se její stabilita a vznik rozkladných produktů. Výsledek je důležitým vstupem pro vývoj a validaci stabilitu indikujících metod léčivých přípravků. Důležité je si hned na začátku dát cíle analytického hodnocení a tím si i stanovit požadavky na analytickou metodu. Často je potřeba identifikovat a stanovit pouze jeden analyt, nebo naopak celou skupinu analytů, které se mohou lišit pouze nepatrně ve svých vlastnostech a molární hmotnosti anebo naopak skupinu analytů, které mají výrazně rozdílné fyzikálně chemické vlastnosti, a ještě jsou obsaženy ve výrazně odlišných koncentračních hladinách (léčivé látky a nečistoty). Analytické hodnocení zahrnuje monitorování kvalitativní i kvantitativní charakteristiky nečistot, sledování kinetiky rozkladných reakcí probíhajících v látkách a léčivých přípravcích.

Podáním do organismu nebo dobou použitelnosti ale „životní“ stabilita látek nekončí. Pomocí analytických metod se hodnotí osud léčivé látky v organismu a sledují se farmakokinetické parametry. Sledují se mechanismy absorpce látky z místa podání, distribuce tělním oběhem, eliminace látky, její biotransformace a exkrece. Analyticky se hodnotí časové závislosti změn koncentrace látky v jednotlivých tělních kompartmentech a popisují se vznikající metabolity.

Léčivá látka může být v nezměněné podobě vyloučena z organismu močí nebo stolicí a dostat se i přes čističky odpadních vod do životního prostředí, například do půdy, podzemních a povrchových vod. Do životního prostředí se dostane i nesprávnou manipulací s látkou během výroby, nebo nesprávnou likvidací přípravku po vypršení expirační doby. V současné době roste pozornost a zpřísňuje se legislativa věnovaná

problematice znečištění životního prostředí léčivými látkami. Úlohou analytické laboratoře je sledovat hladinu látek ve všech matricích životního prostředí a podílet se na hodnocení efektivity metod vyvíjených pro odbourání reziduí těchto látek.

2. Cíl

Cílem předložené habilitační práce je na základě prezentovaných odborných prací ukázat význam analytické chemie v problematice stability léčivých látek a léčivých přípravků od jejich výroby, přes dobu použitelnosti až po jejich likvidaci.

Habilitační práce volně navazuje svým tématem na Dizertační práci uchazečky. Pozornost teoretické části je věnována zejména stresovým testům, stabilitu indikujícím metodám a tvoření profilu nečistot.

Malá kapitola teoretické části habilitační práce je věnována i problematice stability látek po ukončení jejich doby použitelnosti, jejich perzistence v životním prostředí a moderním metodám použitých k jejich odbourání.

Hodnocení parametrů farmakokinetiky není předmětem předložené habilitační práce.

Tématem odborných prací zařazených do habilitační práce byla také problematika přípravy vzorků před analýzou látek přírodního původu, kratší kapitola je věnována i on-line spojení extrakce na tuhou fázi s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

3. Teoretická část

3.1. Stabilita

Stabilita účinné látky nebo léčivého přípravku je vlastnost, zachovat si ve stanovených mezích, po určitou dobu a za stanovených podmínek skladování deklarované jakostní znaky, a tím i bezpečnost, účinnost a aplikovatelnost. Sledování stability je důležité pro zajištění kvalitního, bezpečného a účinného léčivého přípravku po celou dobu jeho použitelnosti (1) (2).

Ve **stabilitní studii** se sledují všechny parametry léčivé látky a konečného přípravku, které se mohou s časem měnit a které by mohly mít vliv na jakost, bezpečnost a účinnost. Stabilitní studie má hodnotit fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické vlastnosti léčivé látky. Na začátku se vypracuje plán studie, který definuje cíl, účel a rozsah zkoušek a podmínky zkoušení. Plán stabilitních studií léčivého přípravku by měl vycházet ze znalostí chování a vlastností účinné látky a lékové formy.

Léčivá látka je považována za stabilní, jestliže vyhovuje specifikaci za podmínek uchovávání 25 °C/60% RV po dobu 2 let a za podmínek uchovávání 40 °C/75% RV po dobu 6 měsíců (3). Látka a léčivý přípravek vyhovují požadavkům na stabilitu, pokud splňují nároky uvedené v tabulce 1. Všechny zkoušky musí být provedeny za použití validovaných a stabilitu indikujících kontrolních metod (3).

Tabulka 1: Požadavky na znaky jakosti při stabilitní zkoušce (2)

Znaky jakosti	Požadavky na stabilitu
Fyzikální	Původní fyzikální vlastnosti včetně vzhledu zůstávají zachovány ve stanovených mezích
Chemické	Obsah léčivých látek, pomocných látek a rozkladných produktů je ve stanovených mezích (minimálně 90% účinné látky, 80% konzervačních přísad)
Biologické	Biologická účinnost se nemění nebo její míra zůstává ve stanovených mezích, nedochází ke zvýšení toxicity a jiných negativních biologických jevů
Mikrobiologické	Zůstává zachována požadovaná mikrobiologická čistota

Hlavním cílem hodnocení stability a výsledkem stabilitních studií je popis změny kvality látky nebo přípravku s časem vlivem různých faktorů prostředí, doporučení podmínek uchovávání a stanovení doby reatestace pro léčivou látku a doby použitelnosti pro konečný léčivý přípravek. Hlavními důsledky nevyhovující stability léčivého přípravku

může být snížení nebo zvýšení koncentrace účinné látky, změna biologické dostupnosti, ztráta mikrobiologické nezávadnosti a zvýšení obsahu toxických rozkladných produktů (1).

Stabilita je aktuální otázkou po celou dobu „životnosti“ účinné látky a léčivého přípravku. Ve fázi vývoje látek se provádějí stresové testy a zakládají se zrychlené stabilitní zkoušky pro porovnání přípravků i ještě nefinálního složení. Dále se zakládají dlouhodobé stabilitní studie s již konečným složením léčivého přípravku a konečnou technologií výroby. Při podání žádosti o registraci je součástí registrační dokumentace i kompletní dokumentace stabilitních studií konečného složení léčivého přípravku. Výsledky jsou doloženy zrychlenými a dlouhodobými stabilitními studii (alespoň trvající po dobu šesti měsíců) (3). Zavedení nové léčivé látky nebo léčivého přípravku do výroby nebo změna technologie výroby či vnitřního obalu jsou hlavními důvody pro opětovné provedení stabilitních studií (1).

Problematikou sledování stability látek a léčivých přípravků se autority začaly zabývat koncem sedmdesátých let minulého století. V roce 1975 se v Americkém lékopisu objevila zmínka o době použitelnosti léčivých přípravků. Kromě toho v roce 1984 FDA (U.S. Food and Drug Administration, FDA) zavedla první dokument zahrnující testování stability. V roce 1993 ICH vydala směrnici týkající se testování stability nových substancí a přípravků (Q1A) (4).

Autority vydávají směrnice a pokyny, které pomáhají žadatelům o registraci léčivých látek a léčivých přípravků. Žadatelé o registraci by měly postupovat podle směrnic svých národních regulačních orgánů, které odrážejí požadavky zemí Evropské unie vytvořené mezinárodními autoritami. Mezi tyto autority patří Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) a Evropská léková agentura (European medicines agency, EMA).

ICH sjednotila požadavky pro registraci a zajištění kvality, bezpečnosti a účinnosti přípravků pro oblast Evropy, USA a Japonska. ICH vydala směrnice, rozdělené do 4 kategorií – kvalita, bezpečnost, účinnost a multidisciplinární kategorie.

EMA zajišťuje vědecké hodnocení, dohled a kontrolu bezpečnosti humánních i veterinárních léčivých přípravků v Evropské unii.

Obdobným orgánem v USA je Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration, FDA).

Pokyny s tematikou zajištění kvality, bezpečnosti a účinnosti léčivých přípravků se zabývá i Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO). Směrnice WHO jsou určeny pro činitele zdravotnické politiky. Mají být nezávislým a výzkumem podloženým vodítkem při přípravě národních strategií kvality a bezpečnosti, vyhovujících místním podmínkám.

Hlavním cílem je ochrana a podpora lidského zdraví i zdraví zvířat.

V České republice je autoritou pro oblast léčivých látek a přípravků Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). SÚKL řeší požadavky na informace o stabilitě léčivé látky a konečného přípravku, které jsou součástí registrační dokumentace, ve svém pokynu „REG-83-Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci“ (3). Problematika registrací je také řešena v tak zvané „registrační vyhlášce“: **Vyhláška 255/2013**, kterou se mění vyhláška č. 228/2008 Sb. o registraci léčivých přípravků, ve znění pozdějších předpisů (Vyhláška 228/2008 Sb., Vyhláška, kterou se stanoví podrobnosti o registraci léčivých přípravků, jejich změnách, prodloužení, klasifikaci léčivých přípravků pro výdej, převodu registrace, vydávání povolení pro souběžný dovoz, předkládání a navrhování specifických léčebných programů s využitím neregistrovaných humánních léčivých přípravků, o způsobu oznamování a vyhodnocování nežádoucích účinků léčivého přípravku, včetně náležitostí periodicky aktualizovaných zpráv o bezpečnosti, a způsob a rozsah oznámení o použití neregistrovaného léčivého přípravku) (5).

REG-83 shrnuje základní požadavky o doložení stability léčivé látky a konečného přípravku, přičemž je možná určitá flexibilita pro specifické praktické situace, kdy je možné zvolit alternativní postup, který je vědecky zdůvodněný (3). Tento pokyn se ve svém závěru odkazuje na pokyny ICH (6) (7) a EMA (8). Texty jsou rozděleny zvlášť pro léčivou látku a pro konečný přípravek. Jsou zde shrnuty požadavky na výběr šarží, na specifikace, četnost zkoušení, podmínky uchovávání a obaly. Jsou zde uvedeny obecné případy hodnocení stabilitních studií, podmínky uchovávání i pro látky a přípravky skladované v rozdílných podmínkách, pokyny pro vyhodnocení výsledků a informace o sledování stability v poregistračním období.

V následujících odstavcích je stručný popis vybraných bodů z jednotlivých pokynů, zejména pokynu REG-83. Detailní informace jsou uvedeny v jednotlivých pokynech (6) (7) (8) a také v dizertační práci „Studium problematiky stability léčivých přípravků metodou HPLC“ (9).

Informace o stabilitě látky a konečného přípravku jsou součástí hodnocení stability. Pro látky, které nejsou popsány v monografii uznávaného lékopisu, jsou požadovány stabilitní zkoušky (stabilitní studie).

Stabilitní studie jsou **dlouhodobé, zrychlené a přechodné**. Součástí hodnocení léčivé látky a přípravku by měly být i **stresové testy** (zátěžové zkoušky), které se provádějí zejména za účelem získání informací o možných rozkladných produktech.

Dlouhodobé stabilitní zkoušky se provádějí za doporučených podmínek skladování pro určení doby použitelnosti (1). Dlouhodobé stabilitní zkoušky mají být prováděny s dostatečnou četností, aby byl zjištěn stabilitní profil léčivé látky a přípravku. Zkoušky uvedené ve specifikaci se obvykle provádějí na počátku studie, každé 3 měsíce během prvního roku, každých 6 měsíců během druhého roku a dále jednou ročně až do navrhované doby reatestace a doby použitelnosti (3) (6).

Zrychlená studie se provádí za extrémních skladovacích podmínek za účelem urychlení chemického rozkladu nebo fyzikální změny látky nebo přípravku (1). U zrychlené

stabilitní studie je třeba provést stanovení v minimálně třech časových bodech (0, 3 a 6 měsíců). Je-li na základě zkušeností z vývoje předpoklad, že výsledky zrychlené studie povedou k významné změně (změna, kdy látka nebo přípravek nevyhovují specifikaci), mělo by být zkoušení posíleno buď přidáním dalších vzorků v posledním časovém bodě nebo zařazením čtvrtého časového bodu (3). Pokud je po provedení zrychlené studie přípravek stabilní, lze extrapolovat dobu použitelnosti na dva roky.

Zkoušky se provádějí za předepsaných podmínek platných pro dané klimatické pásmo.

U zkoušek se uvedou kritéria popsanych zkoušek (číselné limity, rozmezí), včetně horních limitů pro obsah jednotlivých nečistot a rozkladných produktů i pro jejich celkový obsah. Zdůvodnění těchto limitů má být založeno na požadavcích bezpečnosti nebo účinnosti. Pro léčivé látky popsané v monografii uznávaného lékopisu (Evropský lékopis nebo lékopisy členských států EU) mají být zkoušky provedeny v souladu s touto monografií nebo za použití metody, která byla validována oproti metodě lékopisné („cross-validation“). Rovněž je třeba doložit, že všechny potenciální nečistoty (rozkladné produkty i nečistoty pocházející ze syntézy nebo výrobního postupu) jsou dostatečně kontrolovány (3).

Specifikace, které má přípravek vyhovovat po celou navrhovanou dobu použitelnosti („shelf-life“ specifikace), má brát v úvahu již dostupné informace o stabilitě. Případné odchylky „shelf-life“ specifikace od specifikace platné při propouštění z výroby („release“ specifikace) mají být zdůvodněny vyhodnocením stability a změn pozorovaných během skladování (3) (6) (7) (8).

Součástí registrační dokumentace je **protokol o stabilitě**. Tento protokol obsahuje informace o složení léčivého přípravku, název přípravku, výrobce přípravku, sílu a lékovou formu, čísla a velikosti zkoušených šarží, datum a místo výroby, složení zkoušených šarží, výrobce léčivé látky, popis vnitřního obalu.

Součástí protokolu jsou limity pro jednotlivé zkoušky platné během doby použitelnosti a podrobně se popíšu metody, jakými byly zkoušky provedeny. Součástí je i validační protokol. Výsledky zkoušek mají být shrnuty přehledně do tabulek pro každou šarži. V tabulce mají být uvedeny počáteční hodnoty, výsledky získané během stabilitních studií v předepsaných intervalech a limity jednotlivých zkoušek. V závěru protokolu o stabilitě mají být výsledky vyhodnoceny, komentovány a na jejich základě určeny podmínky pro uchovávání, druh vnitřního obalu a doba použitelnosti léčivého přípravku (3).

Vyhodnocení by se nemělo týkat jen stanovení obsahu látky, ale také rozkladných produktů a dalších parametrů. Informace o profilu nečistot, zejména o rozkladných produktech, jejich struktuře, vzniku, výskytu se získá prostřednictvím provedení **stresových testů**. Hodnocení studií se provádí pomocí validovaných **stabilitu indikujících metod**.

Kromě stability se při vývoji léčivých přípravků hodnotí také **kompatibilita** (2). Kompatibilita vyjadřuje vzájemnou snášenlivost jednotlivých složek léčivého přípravku.

Jak již z definice vyplývá, kompatibilita souvisí se stabilitou. Na rozdíl od stability je sledování kompatibility krátkodobá zkouška (hodiny až týdny). Rozdíl mezi kompatibilitou a stabilitou je v rychlosti změn jakostních znaků a v tom, že kompatibilita se hodnotí pouze u léčivých přípravků, zatímco stabilita se hodnotí i u substancí. K inkompatibilitě může dojít mezi substancemi, mezi substancí a pomocnou látkou nebo mezi pomocnými látkami. Inkompatibilita může být fyzikální nebo chemická, skrytá nebo zjevná. Skrytou je nutné odhalit vhodnými analytickými metodami (2).

Většina směrnic, které jsou zahrnuty do habilitační práce, se nevěnují problematice stability oligonukleotidů, radiofarmak, semisyntetickým produktům, ani se nevztahují na látky rostlinného nebo živočišného původu, nebo na rostlinné produkty. Tyto skupiny látek přípravků se hodnotí podle vlastních statí a kapitol.

Biologická a biotechnologická léčiva (díky své výrazné odlišnosti od klasických léčiv) mají zpravidla také vlastní směrnice, z nichž některé jsou v habilitační práci zahrnuty (10). Důvodem je skutečnost, že biotechnologická léčiva představují rychle se rozvíjející skupinu léčiv, tvořící již kolem 20% objemu dostupných přípravků. Definice biologických a biotechnologických léčiv (biofarmaceutik) zatím není zcela vyřešena. Evropská legislativní autorita EMA definuje biologická léčiva (Biological medicinal products, Biopharmaceutics) jako substance připravené rekombinantní DNA technologií krevní a plazmatické deriváty a imunologika. Mezi tyto léčiva patří například látky typu proteinů (somatotropin), enzymy (insulin), peptidy (interferony), vakcíny, alergeny a krevní a plasmatické deriváty a jejich rekombinantní alternativy.

3.1.1. Definice pojmů

V následující kapitole jsou uvedeny **definice pojmů**, které se vztahují k problematice stability. S uvedenými pojmy a s jejich detailnějším vysvětlením se v habilitační práci dále pracuje.

Stabilita je vlastnost, zachovat si ve stanovených mezích, po určitou dobu a za stanovených podmínek skladování deklarované jakostní znaky (1).

Stabilitní studie – soubor zkoušek, které mají obsáhnout všechny změny v kvalitě testovaného vzorku (1).

Stabilitu indukující metoda je validovaná analytická metoda, která je schopna přesně a správně hodnotit pokles obsahu účinné látky v čase a která je dále schopna odlišit nečistoty od účinné látky (4).

Stresové testy - jsou zkoušky, během kterých jsou léčivé látky nebo léčivý přípravek záměrně vystaveny stresovým podmínkám za účelem rozkladu léčivé látky s cílem získání informací o stabilitě.

Validace analytické metody je série experimentů, kterými se zjistí nejdůležitější charakteristiky metody. Potvrdí se, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky a je vhodná pro zamýšlené použití (11).

Nečistota je definována jako jakákoliv složka nové léčivé látky, která není chemickou entitou definovanou jako nová léčivá látka (12) (13).

Definované (specifikované) nečistoty jsou individuálně vyjmenovány a limitovány kritériem přijatelnosti ve specifikaci a jsou buď identifikované (byla provedena identifikace jejich struktury) nebo neidentifikované (nečistota bez určené strukturní charakteristiky). Nečistoty neznámé struktury jsou definované pouze kvalitativní analytickou vlastností (například relativní retence) (12) (13).

Nedefinované (nespecifikované) nečistoty jsou limitovány obecným akceptačním kritériem a nemají vlastní specifické rozmezí tolerance jejich přítomnosti (12).

Potenciální nečistota - nečistota, která se teoreticky může objevit během výroby nebo skladování. Může, ale nemusí být skutečně v látce přítomna. Pokud je potenciální nečistota detekovatelná zkouškami uvedenými v lékopisném článku, ale není známo, že by byla normálně přítomna v látkách použitých v léčivých přípravcích, zařadí se pro informaci do odstavce Nečistoty pod označením Jiné detekovatelné nečistoty (13).

Jiné detekovatelné nečistoty jsou potenciální nečistoty s definovanou strukturou, které jsou detekovatelné zkouškami uvedenými v článku, ale není známo, že by byly normálně přítomny v množství nad mezí identifikace (mezní hodnotou pro identifikaci) v látkách použitých v léčivých přípravcích. Jsou to nespecifikované nečistoty limitované obecným kritériem přijatelnosti. Kritéria přijatelnosti pro zkoušku Příbuzné látky se uvádějí v lékopisných článcích buď porovnáním ploch píků (porovnávací zkoušky), nebo číselnými hodnotami (13).

Rozkladný (degradační) produkt je definován jako nečistota pocházející z chemické změny v substanci během výrobního procesu anebo vznikající během skladování léčivého přípravku vlivem světla, teploty, pH, vlhkosti nebo reakcí s pomocnou látkou nebo obalovým materiálem. Rozkladné produkty jsou buď definované, nebo nedefinované (pro rozdělení platí stejná pravidla, jako bylo uvedeno u nečistot) (14).

Identifikační práh (mez identifikace) - horní hranice, nad kterou by nečistota měla být identifikována (12) (13).

Kvalifikační práh (mez kvalifikace) - limit, nad kterým by měla být nečistota kvalifikována, což znamená stanovení biologické bezpečnosti nečistoty (12) (13).

Mez uvádění (hladina uvádění nečistoty) je limit, nad kterým se nečistota uvádí (13).

Profil nečistot – popis definovaných a nedefinovaných nečistot v substanci (12).

Limit zanedbatelnosti - jmenovitý obsah při chromatografických zkouškách, při kterém nebo pod kterým se píky při výpočtu součtu nečistot neberou v úvahu (13).

Specifikace látky nebo přípravku stanovuje soubor kritérií, která musí daná látka/přípravek splňovat, aby mohly být považovány za přijatelné pro zamýšlené použití. Jde v podstatě o seznam zkoušek s odkazy na analytické metody a také s uvedenými kritérii přijatelnosti pro jednotlivé zkoušky, případně rozmezími přijatelnosti nebo dalšími kritérii pro popsání zkoušky (9) (15).

Látky pro farmaceutické použití jsou jakékoliv organické nebo anorganické látky, které se používají jako léčivé látky nebo pomocné látky pro výrobu léčivých přípravků pro humánní nebo veterinární použití (13).

Léčivá látka je jakákoliv látka nebo směs látek určená k použití při výrobě nebo přípravě léčivého přípravku, která se po použití při této výrobě nebo přípravě stane účinnou složkou léčivého přípravku určenou k vyvinutí farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění fyziologických funkcí anebo ke stanovení lékařské diagnózy (16). Léčivé látky lze také nazvat účinnými látkami anebo aktivní farmaceutickou substancí, zkráceně aktivní substancí nebo substancí.

Léčivým přípravkem se rozumí

a) látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat

b) látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy (16). V Českém lékopisu je definice obdobná - farmaceutické přípravky jsou léčivé přípravky obvykle tvořené léčivými látkami, které mohou být kombinovány s pomocnými látkami a jsou zpracovány do lékové formy vhodné pro zamýšlené podání (13).

3.2. Stresové testy (zátěžové zkoušky)

Stresové testy (zátěžové zkoušky, zátěžová studie) jsou zkoušky, během kterých jsou aktivní substance nebo léčivý přípravek záměrně vystaveny stresovým podmínkám za účelem rozkladu aktivní substance s cílem získání informací o stabilitě. Pod pojmem stresové podmínky se rozumí vystavení vlivu série nadměrných fyzikálních a chemických zátěží (teplota, světlo, pH), jejichž působením se mohou v krátké době tvořit dosud neznámé rozkladné produkty, které se mohou vyskytnout ve finálním léčivém přípravku během skladování. Stresové testy se provádějí za podmínek o vyšší zátěži než ve zrychlených stabilitních testech. V porovnání s dlouhodobou stabilitní studií, jsou výsledky stresových testů získány rychleji, a to během několika týdnů. Výsledek je důležitý vstup pro vývoj a validaci stability indikujících metod. Stresové testy jsou součástí validace většiny metod pro stanovení obsahu nečistot. Podmínky pro provedení stresových testů by měly být reálné a ne nepřiměřené (17). Důkladná znalost stability aktivní substance je důležitá při výběru vhodné lékové formy, balení, definování podmínek skladování a určení doby použitelnosti léčivého přípravku (18).

Stresové testy se provádějí s cílem (18):

- porozumět vlastnostem molekuly
- popsat vnitřní stabilitu substance
- odhalit rozkladné mechanismy – oxidace, hydrolýza, rozklad za zvýšené teploty, rozklad působením světla
- popsat rozkladné produkty (RP)
- vytvořit profil nečistot substance, předchází „překvapením“ v průběhu stabilitní studie
- vytvořit vodítko pro vývoj stability indikujících metod
- odlišit rozkladné produkty substance od rozkladných produktů, které v léčivém přípravku se substancí nesouvisí
- řešit stabilitní problémy léčivého přípravku, nastínit podmínky skladování, obaly.

Stresovým testům se ve svých pokynech věnují lékové authority. První směrnice, která se zmiňovala o stresových testech byla ICH směrnice Q1A z roku 1993 (Stability Testing of New Drug Substances and Products). Směrnice zpravidla uvádějí, u kterých substancí a přípravků mají být stresové testy provedeny. Postup provedení stresových testů je uveden ve směrnici jen velmi obecně a neuvádí praktické detaily jednotlivých zkoušek. Tento fakt je pochopitelný i z vlastní podstaty a cílů stresových testů. Každá aktivní substance bude v zátěžových podmínkách reagovat jinak a bude rozdílně stabilní, proto není možné uvést detailní univerzální protokol pro postup jejich provedení.

Nejednotnost je v názvu, který se pro stresové testy používá. SÚKL používá výraz „zátěžové zkoušky“ (3). ICH používá většinou výraz „stress testing“. Ve směrnici Q1B a v dokumentu týkajícího se CTD (M4Q(R1)) je však uvedeno „forced degradation“ (19) (20). WHO používá „stress testing“, Čínský lékopis používá „affecting factors testing“

(21). Evropská léková agentura (EMA) v textu dokumentu EMA/454576/2016 používá výraz „forced degradation study“ (22), zatímco v dokumentu CPMP/QWO/122/02, rev 1, který navazuje na směrnici ICH, používá výraz „stress testing“ (23). FDA používá termín „stress studies“ (24).

Nicméně všechny výše uvedené termíny znamenají ve své podstatě totéž. Pro účely habilitační práce byl zvolen termín „stresové testy“.

3.2.1. Stresové testy ve směrnicích autorit

Následující kapitola je věnována stresovým testům z pohledu lékových autorit. V textu jsou uvedeny výňatky z jednotlivých směrnic a dokumentů, ve kterých jsou stresové testy uvedeny. Cílem tohoto shrnutí je nastínit pohled na to, jakým způsobem k provedení testů jednotlivé autority přistupují. Největší pozornost je věnována dokumentům ICH a EMA, na které se odkazuje i SÚKL v Reg-83 (3). Aby byl obrázek pohledu autorit kompletnější, je dále v práci věnována kapitola i FDA a WHO.

The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)

ICH směrnice **Q1A(R2)** definuje stresové testy pro aktivní substanci a léčivý přípravek (6). U substancí se provádějí s cílem získání informací o vnitřní stabilitě látky. Stresové testy pomáhají charakterizovat rozkladné produkty, odhalit rozkladné mechanismy a také pomáhají optimalizovat a validovat stabilitu indikující metodu. Povaha a rozsah stresových testů závisí na testované substanci a léčivém přípravku. Testy se provádějí s jednou šarží substance. Testování by mělo zahrnovat sledování vlivu teploty (rostoucí teplota v deseti stupňových intervalech, například 50 °C a 60 °C a teplotě vyšší než ve zrychlené stabilitní studii), vlivu vlhkosti (75% RV a vyšší), vlivu světla (fotostabilita) a oxidaci. Dále by měl být zahrnut popis náchylnosti k hydrolýze v širokém rozmezí pH, pokud se jedná o roztok nebo suspenzi. Toto testování je součástí vývojových fází a mělo by být provedeno za podmínek zátěže vyšší než zrychlená stabilitní studie. U léčivých přípravků se hodnotí vliv různých podmínek, zejména testování vlivu světla (podle směrnice ICH Q1B) a specifické testování v souvislosti s konkrétní lékovou formou (emulze, krém) (6).

ICH dále doporučuje porovnat výsledky stresových testů a výsledky dlouhodobé a zrychlené stabilitní studie. Rozkladné produkty není nutné zahrnout ve stabilitní studii, pokud nebyly prokázány v průběhu zrychlené nebo dlouhodobé stabilitní studie. Výsledky stresových testů jsou součástí registrační dokumentace (6).

Ve směrnici **Q2(R1)**, která se věnuje validaci, se o stresových testech mluví v kapitole selektivita. Pokud nejsou k dispozici standardy rozkladného produktu, je vhodné skladovat vzorky za stresových podmínek a hodnotit vliv parametrů světlo, teplo, vlhkost, oxidace, kyselá a bazická hydrolýza (25).

Ve směrnici **Q3A(R2)**, věnované nečistotám v nových substancích, je uvedeno, že by měly být provedeny studie, které najdou nové, tedy dosud nepopsané, nečistoty. Měly by být uvedeny výsledky stresových testů, které se provádějí k identifikaci nečistot vzniklých během uchovávání. Profil nečistot by měl být porovnán s výsledky studií provedených při vývoji látky a v případné rozdíly by měly být vysvětleny (12).

Směrnice **Q3B(R2)**, věnované nečistotám v nových léčivých přípravcích, zmiňuje stresové testy v kapitole analytické metody. Ve směrnici je uvedeno, že validované analytické metody by měly zahrnovat výsledky rozboru vzorků skladovaných za stresových podmínek (sledování vlivu světla, tepla, vlhkosti, kyselá a zásaditá hydrolyzy a oxidace). Pokud analytická metoda odhalí přítomnost jiných nečistot, než jsou známé (popsané) rozkladné produkty, mají být tyto nečistoty označeny a jejich původ má být ve validační dokumentaci diskutován (14).

Směrnice **Q5C**, věnovaná stabilitě biotechnologických léčiv a bioléciv, uvádí, že stresové testy jsou užitečné při hodnocení vlivu neúmyslného vystavení neočekávaným podmínkám (například během převozu) na stabilitu léčivého přípravku. Stresové testy pomáhají odhalit schéma rozkladných mechanismů. Podmínky pro provedení testů u bioléciv musí být pečlivě vybrány podle charakteru hodnoceného produktu individuálně, tedy „případ od případu“ (10).

Směrnice **Q5E**, která se také týká bioléciv a změn v jejich výrobě, uvádí, že stresové testy by měly být součástí informací o stabilitě a o rozkladných mechanismech. Testy jsou vhodným nástrojem k porovnání například profilu nečistot produktů před a po změně technologického postupu.

CTD (Common technical document – formát Registrační dokumentace) v části **M4Q(R1)**, v kapitole věnované stabilitě (3.2.S.7), uvádí, že součástí CTD má být shrnutí výsledků provedených stabilitních studií. Součástí shrnutí mají být výsledky provedených stresových testů a použité stresové podmínky, stejně tak jako závěry všech studií s ohledem na podmínky uchovávání a doporučenou dobu použitelnosti. Výsledky stresových testů mají být prezentovány formou tabulek, grafů anebo popsány v textu (20). V dokumentu je odkaz na směrnice ICH Q1A(R2), Q1B, Q2(R1) a Q5C.

Evropská léková agentura (European medicine Agency, EMA)

EMA se na svých stránkách věnovaných stabilitě odkazuje na směrnice ICH. Uvádí i vlastní směrnice, které mohou být rozšířením ICH směrnic věnovaných stabilitě.

Ve směrnici **CPMP/QWP/122/02**, která se týká stability látek a přípravků, je kapitola věnovaná stresovým testům, ve které je stručně popsán účel stresových testů. U aktivních substancí popisuje variantu, kdy aktivní substance splňuje požadavky uznávané lékopisné monografie, zejména článku o rozkladných produktech s vhodnými limity (zkoušky na čistotu nebo nečistoty). Pokud žadatel o registraci potvrdí, že substance splňuje tuto specifikaci, stabilitní studie nemusí být provedena. Žadatel má stanovit periodu

opětovného testu. Pro substance, které nejsou zahrnuty v lékopisných člancích, rozlišuje směrnice dvě množnosti. Lze se odkázat na výsledky relevantních vědeckých studií. Pokud informace nejsou dostupné, je nutné provést stresové testy (23). U substancí a přípravků rostlinného původu není obvykle nutné provádět stresové testy. Stresové podmínky jsou popsány v rozsahu stejném jako je ve směrnici ICH Q1A(R2) (6).

V dokumentu **EMA/454576/2016**, týkající se substancí, EMA uvádí, že protokol věnovaný stabilitě by měl uvádět detailní výsledky stabilitních studií včetně stresových testů a popisu stresových podmínek. Stabilita má být sledována pomocí validované metody. Hlavní rozkladné mechanismy testované substance by měly být diskutovány. Opět je uvedeno, že pokud lékopisná monografie obsahuje článek o substancí, který zahrnuje i rozkladné produkty s vhodnými limity a substance vyhovuje specifikaci, není nutné provádět stabilitní studie (22).

V dalších dokumentech se EMA zmiňuje o stresových testech ve smyslu, že stresové testy jsou doporučeny, protože pomáhají porozumět stabilitě a rozkladným mechanismům substance a stanovit dobu použitelnosti (26) (27). O stabilitě a stresových testech se krátce zmiňuje i ve směrnících, které jsou věnované konkrétním lékovým formám a radiofarmakům.

Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL)

SÚKL ve svém pokynu **REG-83** (3) uvádí, že za základ svého textu považuje pokyn Evropské lékové agentury CPMP/QWP/122/02, rev.1 „Guideline on Stability Testing: Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products“ (23). Pokyn se shoduje s výše uvedeným pokynem EMA a i směrnici ICH Q1A(R2) (6). Přesto je text tohoto pokynu v habilitační práci zahrnut ve svém nezkráceném znění.

V kapitole „Zátěžové zkoušky“ je uvedeno, že zkoušky léčivé látky mohou pomoci identifikovat pravděpodobné rozkladné produkty, což může následně pomoci stanovit mechanismus degradace a vnitřní stabilitu molekuly. Zkoušky mají ověřit, že použité analytické metody jsou stabilitu indikující.

Pro léčivou látku mohou být použity tyto postupy: 1) pokud je léčivá látka popsána v monografii uznávaného lékopisu (Evropský lékopis nebo lékopisy členských států EU) a zcela splňuje její požadavky, nejsou požadovány žádné údaje o rozkladných produktech (odstavec „Zkoušky na čistotu“ a/nebo „Příbuzné látky“) a 2) pro léčivou látku nepopsanou v monografii uznávaného lékopisu mohou být použity dva postupy: a) předpokládaný mechanismus rozkladu může být doložen údaji publikovanými ve vědecké literatuře, b) jestliže ve vědecké literatuře, včetně oficiálních lékopisů, nejsou dostupné žádné údaje, je třeba provést zátěžové zkoušky.

Zátěžové zkoušky je možné provádět s jednou šarží léčivé látky. Mají zahrnovat vliv teploty (přírůstky po 10 °C - například 50 °C, 60 °C - oproti teplotě, při níž je prováděna zrychlená stabilitní studie), vliv vlhkosti (například 75% RV nebo více), je-li to vhodné,

vliv vzdušného kyslíku (oxidace), vliv světla (fotolýza) na léčivou látku. Zkoušky také mají hodnotit stabilitu léčivé látky v roztoku nebo v suspenzi (hydrolýza) v rámci širokého rozmezí hodnot pH. Nedílnou součástí zátěžových zkoušek mají být zkoušky fotostability.

Sledování rozkladných produktů během zátěžových zkoušek je užitečné pro stanovení mechanismu rozkladu a pro vývoj a validaci vhodných analytických metod. Nemusí však být nutné uvádět ve specifikaci ty rozkladné produkty, pro něž bylo prokázáno, že nevznikají za podmínek dlouhodobé ani zrychlené studie (3).

Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration, FDA)

U FDA je rozsah informací o stresových testech obdobný jako u ostatních autorit, s odkazy na směrnice ICH (24). Směrnice „**Analytické postupy a validace metody**“, například uvádí, že informace z provedených stresových testů (kyselá, zásaditá hydrolýza, vliv zvýšené teploty, světla, oxidace) o rozkladu aktivní substance jsou důležité k prokázání selektivity analytické metody pro hodnocení nečistot. Stresové testy mají prokázat, že nečistoty a rozkladné produkty neinterferují se stanovením aktivní substance. Výsledky stresových testů mají být součástí informací o stabilitě. Výsledky mají být dokládány chromatogramy, tabulkami apod. (28).

Ve své další směrnici se FDA zabývá otázkou, ve které fázi přípravy k registraci by se měly stresové testy provést. FDA je poměrně benevolentní, uvádí, že informace o stabilitě aktivní substance by měly být provedeny co nejdříve, protože výsledky stresových testů jsou klíčové pro vývoj stability indikující metody. Informace o stabilitě by měly být doloženy v druhé fázi klinického hodnocení. Dále však uvádí, že pokud nejsou stabilitní studie provedeny dříve, tak mají být doloženy až ve třetí fázi klinického zkoušení (29).

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO)

WHO se ve svém technickém dokumentu **TRS 970** („Specifications for Pharmaceutical Formulations, Forty-sixth report“), v kapitole o stabilitě, také věnuje stresovým testům. V textu se odkazuje na směrnice ICH. V dokumentu je mimo jiné uvedeno, že rozumný je rozklad substance z 10-30%. Dále je uvedeno, že pokud nedochází za uvedených podmínek k rozkladu v průběhu 10 dní, je aktivní substance považována za stabilní. Zároveň zde uvedeno, že informace o stabilitě substance a případných rozkladných produktech a mechanismech může být také doložena relevantními daty publikovanými ve vědecké literatuře. Pokud nejsou informace v literatuře dostupné, měly by být provedeny stresové testy (30). Dokument navazuje na TRS 953 (Příloha 2) (31) a TRS 929 (Dodatek 3, Tabulka 1) (32), kde je uvedený i příklad podmínek pro provedení testů.

3.2.2. Postup provedení stresových testů

Jak je z výše uvedených pokynů patrné, jednotlivé lékové autority hovoří o účelech stresových testů a také diskutují případy, kdy je nutné stresové testy provést a které stresové podmínky by měly být v testech zahrnuty. Bližší informace ve směrnících nejsou. Zajímavý je přístup farmaceutických firem k provedení stresových testů (21) (33) (34). Některé firmy používají vytvořené Standardní operační postupy (SOP), jiné přistupují k provedení stresových testů individuálně podle charakteru studovaných substancí a lékové formě přípravku, všechny postupy musí být v souladu s požadavky autorit. Druhý přístup je racionálnější. Zatímco stejné podmínky provedení stresových testů mohou u jedné látky vyvolat rozklad v rozmezí 5-15%, u druhé látky mohou vést k rozkladu z více než 50%. Aplikace příliš „drsných“ podmínek po krátký časový úsek může vést k rozkladu rozdílnou rozkladnou reakcí, než ke které dojde v průběhu zrychlené nebo dlouhodobé stabilní studie, což není žádoucí. Shrnutí podmínek provedení stresových testů od několika farmaceutických firem uvedli ve své práci Singh a Bakshi (33).

V literatuře je dostupná řada vědeckých experimentálních i rešeršních prací, které se tematikou stresových testů také zabývají. Autoři popisují provedení stresových testů u konkrétních látek, často uvádějí postupy testování, a výsledky, které zahrnují popis a charakterizaci rozkladných produktů a zpravidla jsou testované substance kompletně rozloženy a jsou diskutována reakční schémata.

V následující části habilitační práce je vypracován přehled základních otázek a nástin postupů, které lze při provádění stresových testů použít.

Základní otázky jsou:

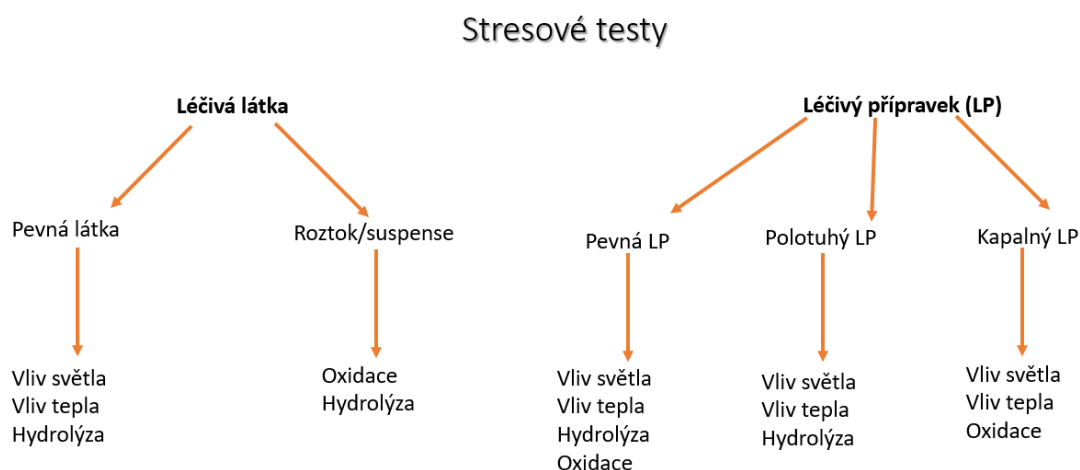
- jaké zvolit podmínky pro provedení stresových testů
- použití činidel
- kdy ukončit stresové testy, pokud se látka nerozkládá
- kdy ukončit stresové testy, pokud se látka rozkládá, tedy stanovit limity rozkladu.

3.2.3. Strategie volby a výběru podmínek provedení stresových testů

Jak již bylo uvedeno výše, v dostupné literatuře není jednotně uvedeno, jak stresové testy provést. Na jedné straně je jasné, že není možné uvést jeden univerzální protokol pro provedení stresových testů platný pro všechny substance, na druhou stranu univerzální návod by usnadnil provedení testů a zamezil by nesprávnému testování a například vniku sekundárních rozkladných produktů a podobně.

Je nutné pečlivě uvážit charakter látky, zamýšlenou lékovou formu a zamyslet se také nad očekávanými výsledky a podle toho zvolit podmínky testování (18) (34). Je jasné, že látky se liší náchylností k rozkladu, rozkladnými mechanismy i kinetikou rozkladných reakcí (33).

Výběr podmínek pro provedení stresových testů musí být v souladu s rozkladem látky za běžných podmínek. Tedy není vhodné zvolit příliš agresivní podmínky. Pod pojmem agresivní podmínky se rozumí například delší doba vystavení nebo vyšší teplota, než je uvedeno ve většině doporučení. V průběhu stresových testů se sledují výsledky vlivu světla, oxidace, hydrolýzy a zvýšené teploty. Není nutné provádět všechny testy u všech typů látek a léčivých přípravků. Obecný diagram a doporučení, které testy je vhodné provádět u látek a léčivých přípravků je uveden na obrázku 1 (18).



Obrázek 1: Obecný diagram pro výběr zkoušek v rámci stresových testů (18)

V žádném pokynu autorit nebo směrnici není blíže specifikováno jaké rozmezí hodnot pH je vhodné testovat, jaké rozmezí teploty, a jaká oxidační činidla je vhodné použít. Výjimkou je testování fotostability, na které je přímo směrnice ICH (19).

Prvotní pokus by měl zahrnovat podmínky, při kterých dochází k rozkladu látky z 10%. Někdy je doporučeno začít s extrémnějšími podmínkami (například 80 °C) a testovat po kratší dobu. Tím se získá informace o míře rozkladu. Primární a sekundární rozkladné produkty, tedy rozkladné produkty pocházející z testované látky a rozkladné produkty pocházející již z rozkladných produktů testované látky mohou být odlišeny použitím postupně mírnějších podmínek rozkladu. Tím lze lépe porozumět celému rozkladnému mechanismu (18). Nebo lze naopak začít mírnými podmínkami a podle výsledků lze podmínky upravit, aby mohl být sledován časový profil rozkladu. Druhý přístup je výhodnější z praktického pohledu, kdy příliš kyselé nebo zásadité vzorky mohou být obtížně neutralizovány, pokud je to nutné před vlastním analytickým hodnocením (35). Druhým důvodem je, že více extrémní podmínky mohou způsobit změnu mechanismu rozkladu (34) (35). V následujících odstavcích je vypracován přehled provedení jednotlivých testů.

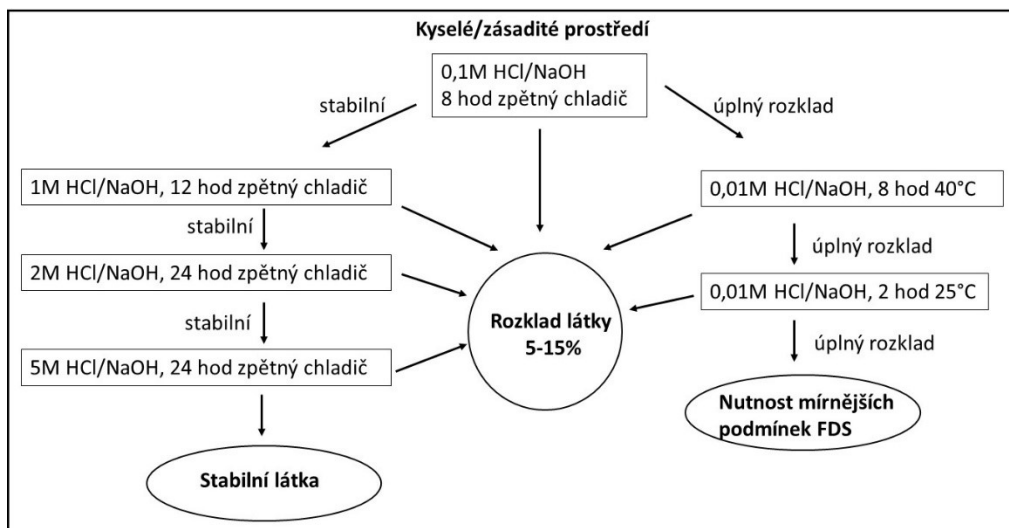
Jeden z příkladů používaných podmínek rozkladu je uveden v tabulce 2 (18). Jiné postupy jsou uvedeny na obrázcích 2-5.

Tabulka 2: Podmínky pro provedení stresových testů (18)

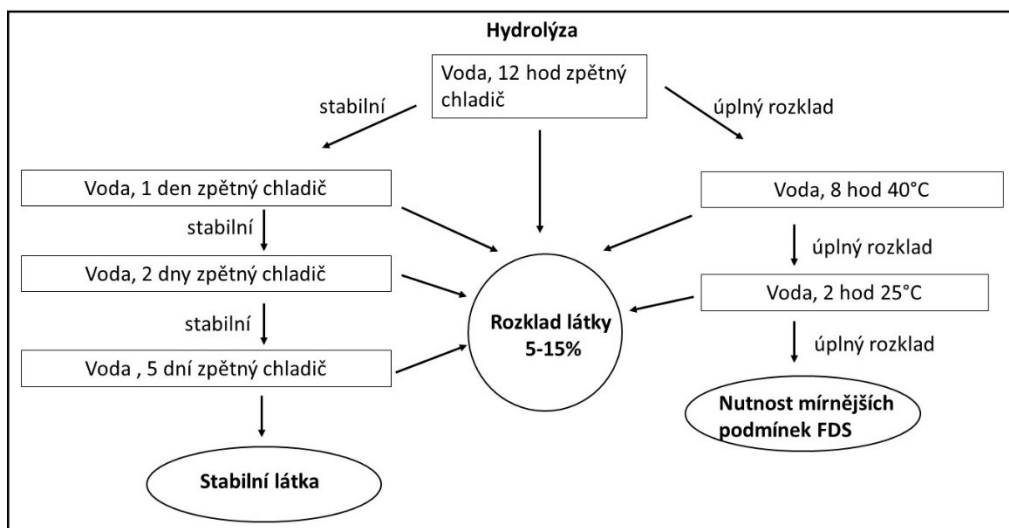
Stresová zkouška	Experimentální podmínky	Teplota	Délka testu (dny) (analýza vzorku)
Hydrolyza	Kontrolní vzorek	40 °C, 60 °C	1,3,5
	0,1M HCl + substance	40 °C, 60 °C	1,3,5
	0,1M NaOH + substance	40 °C, 60 °C	1,3,5
	0,1M HCl kontrola	40 °C, 60 °C	1,3,5
	0,1M NaOH kontrola	40 °C, 60 °C	1,3,5
	pH: 2,4,6,8	40 °C, 60 °C	1,3,5
Oxidace	3% H ₂ O ₂ + substance	25 °C, 60 °C	1,3,5
	3% H ₂ O ₂ kontrola	25 °C, 60 °C	1,3,5
	Azodiisobutyronitril + substance	40 °C, 60 °C	1,3,5
	Azodiisobutyronitril kontrola	40 °C, 60 °C	1,3,5
Vliv světla	Světlo 1× ICH (19)	-	1,3,5
	Světlo 3× ICH (19)	-	1,3,5
	Světlo kontrola	-	1,3,5
Vliv teploty		60 °C	1,3,5
		60 °C/75% RV	1,3,5
		80 °C	1,3,5
		80 °C/75% RV	1,3,5
		Laboratorní teplota	1,3,5

Hydrolyza

Hydrolyza v širším rozmezí pH je jednou z nejběžnějších reakcí, ke které může dojít. Kyselá a zásaditá hydrolyza zahrnuje reakci ionizovatelných skupin v molekule. Výběr typu a koncentrace použité kyseliny a zásady závisí na povaze testované látky. Kyselina chlorovodíková nebo kyselina sírová a hydroxid sodný nebo draselný jsou vhodnými činidly pro provedení hydrolyzy. Vhodná koncentrace činidel se uvádí v rozmezí 0,1-1M. Kyselina sírová jako oxidační činidlo může kromě hydrolytické reakce způsobit i oxidaci některých látek. Tedy pokud je cílem testování zjistit rozkladné produkty vzniklé v kyselém prostředí je vhodné použít spíše kyselinu chlorovodíkovou. Pokus se provádí za laboratorní teploty, pokud k rozkladu nedochází, použije se teplota vyšší. Testování by nemělo přesáhnout 7 dní. Kyselý nebo zásaditý vzorek je poté neutralizován, aby se zamezilo dalšímu rozkladu. Na obrázcích 2 a 3 je nastíněn jeden z možných postupů provedení hydrolyzy.



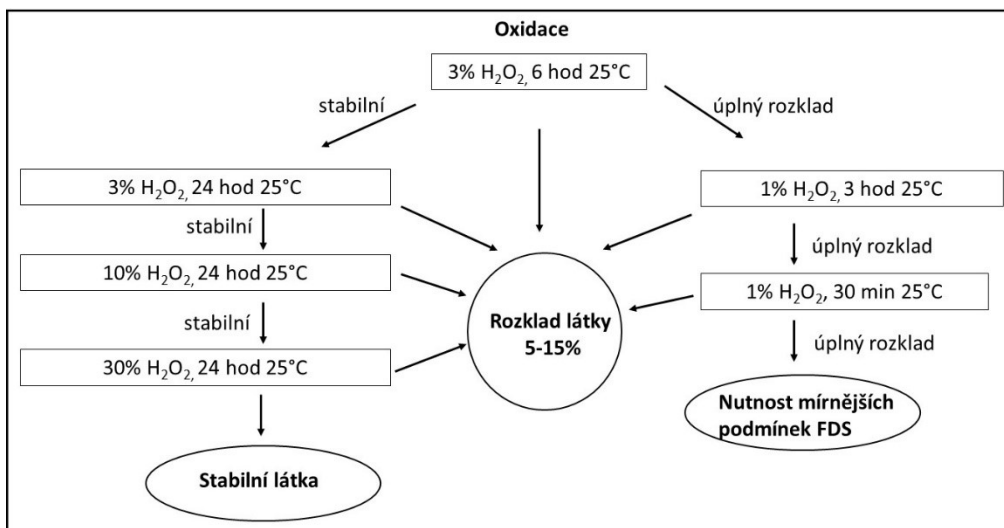
Obrázek 2: Provedení testu kyselé/zásadité hydrolyzy (33).



Obrázek 3: Provedení testu kyselé/zásadité hydrolyzy (33).

Oxidace

Pro účely oxidace se nejčastěji volí jako činidlo peroxid vodíku. Lze použít i jiná oxidační činidla, kovy nebo termické iniciátory, mezi které patří například azodiisobutyronitril. Oxidace se zpravidla provádí s peroxidem vodíku 0,1-3%, při neutrálním pH a pokojové teplotě po dobu 7 dní. Funkční skupiny podléhající oxidaci jsou například aminy, sulfidy a fenoly za vzniku N-oxidů, hydroxylaminu, sulfonů a sulfoxidů. Oxidační reakce jsou citlivé na reakční podmínky (teplota, koncentrace, katalyzátory), konečným produktem těchto reakcí může být až oxid uhličitý. Na obrázku 4 je nastíněn jeden z možných postupů provedení oxidace.



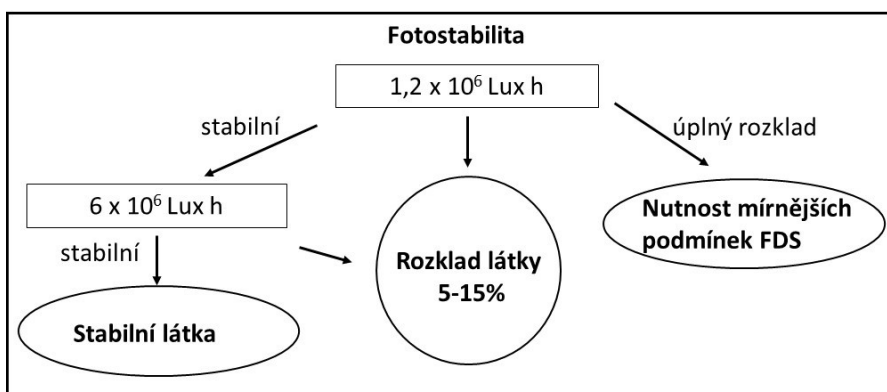
Obrázek 4: Postup provedení testu oxidace (33).

Vliv tepla

Testování vlivu zvýšené teploty (suché teplo anebo vlhké teplo, kde se počítá i s vlivem hydrolyzy) by mělo být provedeno za vyšší teploty než u zrychlené stabilitní studie. Doporučuje se rozmezí 40-80 °C. Vzorky léčivé substance a léčivého přípravku pevné lékové formy by měly být vystaveny suchému, a i vlhkému teplu. Vzorky léčivého přípravku kapalných lékových forem by měly být vystaveny suchému teplu.

Vliv světla (fotostabilita)

Celý proces fotostability je podrobně popsán ve směrnici ICH Q1B (19). Výsledkem testování fotostability je zhodnocení, zda světlo způsobí změny v molekule léčivé látky a také ve složení léčivého přípravku (34). Na obrázku 5 je nastíněn jeden z možných postupů provedení testu, také vycházející ze směrnice ICH Q1B.



Obrázek 5: Provedení testu sledování vlivu světla (33).

Jak už bylo uvedeno výše, směrnice **ICH Q1B** se zabývá tematikou testování vlivu světla na stabilitu substancí a léčivých přípravků (fotostabilita). Hodnocení fotostability by mělo být součástí stresových testů. Testování by mělo potvrdit, že světlo nepůsobí žádné změny ve vnitřní stabilitě substance nebo ve stabilitě léčivého přípravku. Testování se provádí s jednou šarží substance nebo léčivého přípravku. Test je doporučeno provádět při běžné teplotě, aby se vyloučil vliv tepla na rozklad, a zároveň je doporučeno provést současně pokus za stejných teplotních podmínek, ale za nepřístupu světla. Vzorky by měly být umístěny tak, aby byly ozářeny homogenně a v co nejnižší vrstvě. Léčivé přípravky se testují přímo bez obalu, v primárním obalu a obalu pro distribuci. Po ukončení testu se sledují změny ve fyzikálních vlastnostech (vzhled, barva) a také se hodnotí obsah rozkladných produktů validovanými analytickými metodami. K provedení testu lze použít jakýkoliv zdroj světla, který produkuje výstup totožný s mezinárodně uznávaným standardem D65/ID65. D65 je simulované denní světlo, ID65 je simulované nepřímé vnitřní osvětlení. Lze použít například umělé denní světlo fluorescenční lampy, která kombinuje viditelné a UV záření, nebo xenonovou či halogenovou lampu. UV lampa by měla vyzařovat paprsky o vlnové délce od 320 do 400 nm a maximální energii při vlnové délce v rozmezí 350 až 370 nm. Celkový osvit by měl být minimálně 1,200000 lx.h. Dávka ozáření by neměla být v případě UV světla nižší než 200 W.h.m⁻² (19).

Farmaceutické firmy doporučují provést test vlivu světla za podmínek 1-3 krát nebo 2-5 krát silnější než je doporučení ICH (21).

3.2.4. Limity rozkladu, délka provedení testování

Předmětem diskuzí zůstává, jak moc by měla být substance v průběhu stresových testů rozložena. Někteří autoři a autority považují za vhodný rozklad 5-15%, poté by mělo být testování ukončeno (34) (36) (37). Jiní popisují, že 10% je dostatečným vzhledem k tomu, že obsah léčivé látky 90% se považuje za vyhovující (17) (18). Rozklad maximálně 20% substance je považován za standardní (38). Rozmezí rozkladu do 20% vychází z myšlenky, že vyšší rozklad by už mohl vést k rozkladu vlastních vzniklých rozkladných produktů, což není žádoucí (4) (34). Výsledky stresových testů musí poskytnout reprezentativní výsledky. Na druhou stranu kompletním rozkladem substance lze získat komplexní pohled na stabilitu substance.

Délka a intenzita provedení stresových testů jsou další diskutabilní oblastí, která není nikde přesně definována. Při provádění testů je nutné si uvědomit, že každá látka je individualita, na kterou budou podmínky působit rozdílně, a je nutné přizpůsobit stresové podmínky charakteru individuální látky. Pokud k rozkladu látky nedochází, lze zvolit podmínky agresivnější. Dalším bodem pro zvážení je, jak dlouho je potřeba pokračovat v provedení stresových testů, pokud k rozkladu nedochází. Obecně se doporučuje 14 dní pro substance a léčivé přípravky v roztoku a 3 měsíce pro tuhé substance a lékové formy. Výjimkou je oxidace, kterou je vhodné ukončit po 24 hodinách (34). Fotostabilita se provádí podle směrnice ICH (19). Je vhodné porovnat výsledky stresových testů a

výsledky dlouhodobých a zrychlených stabilitních studií po jejich ukončení k ověření relevantnosti provedení a výsledků stresových testů.

Jak již bylo uvedeno výše, samostatnou kapitolou by mohlo být provedení stresových testů pro vědecké účely a získání komplexní informace o testované látce. V těchto případech se rozklad neukončuje a reakční kinetika se sleduje až do úplného rozkladu látky (34).

3.2.5. Koncentrace substance

Stresové testy nejsou požadovány, u již známých substancí, pokud je substance popsána v lékopisné monografii včetně kapitoly o rozkladných produktech (příbuzné látky, nečistoty) anebo pokud je informace o stabilitě substance podložena dostatečným množstvím informací v odborné literatuře (3) (21) (23).

Koncentrace testované substance je dalším bodem, který není blíže specifikován v doporučeních. Důležité je si uvědomit, že rozkladné produkty vznikají jen ve velmi malých koncentracích. Z toho vyplývá, že koncentrace testované látky by měla být dostatečně vysoká, aby zvolená detekční technika umožnila hodnocení i rozkladných produktů. Při příliš vysoké výchozí koncentraci testované substance však může být problematická její rozpustnost (34). Jedno z doporučení radí použít koncentraci 1 mg/ml (21) (33). Někteří autoři doporučují provést testování s koncentrací, která bude v zamýšleném léčivém přípravku (35).

3.2.6. Stresové testy ve fázích výroby substance

Farmaceutické firmy provádějí stresové testy během optimalizace složení léčivého přípravku. Výsledky testů jsou vodítkem k volbě pomocných látek a obalu. Stresové testy jsou zopakovány i s finálním přípravkem a substancí po dokončení vývojových prací (34) (39). Zatímco ICH hovoří o uvedení výsledků stresových testů v celkovém shrnutí informací o stabilitě (6), které je součástí registrační dokumentace, FDA zdůrazňuje provedení stresových testů ve druhé nebo třetí fázi klinických testů (29).

Cílem testů v první fázi vývoje je získání informace o tom, zda je nebo není substance stabilní. Teprve při zopakování testů s finální substancí a přípravkem se provede bližší charakterizace rozkladných produktů, včetně stanovení hladin výskytu a popisu možných rozkladných mechanismů (39).

Výsledky testů by měly být součástí registrační dokumentace příslušného léčivého přípravku.

3.2.7. Příprava vzorku

Jedním krokem je vytvoření vzorků za podmínek stresových testů a tím druhým je vyhodnocení rozkladných produktů, které během testování vznikly. Lze analyzovat jednotlivé vzorky samostatně a druhým způsobem je analyzování směsi vzorků (směs vzorků z jednotlivých zkoušek). První způsob je časově náročnější, ale získáme tak informace o rozkladných produktech vznikajících během jednotlivých testů. U druhého způsobu hrozí vznik pseudo rozkladných produktů vlivem směsi stresových faktorů po smíchání vzorků (21). Před vlastní analýzou je zpravidla potřeba upravit například pH vzorku (neutralizace u kyselých nebo zásaditých vzorků nebo naředění mobilní fází) (21).

3.2.8. Rozkladné reakce a mechanismy

Ze struktury, zejména z charakteristických funkčních skupin, lze navrhnout předpokládané reakční mechanismy. Velké množství nových substancí je strukturní obměnou látek stávajících, a proto ze znalosti stability těchto látek lze navrhnout i rozkladnou cestu nových derivátů (35).

Nejčastěji probíhající reakce jsou reakce hydrolytické a oxidační. K hydrolytickému rozkladu jsou náchylné látky typu esterů, amidy, anilidy a karbamáty, ale i laktony, thiostry a thioamidy a další. Na oxidaci jsou citlivé především sloučeniny obsahující ve své molekule násobné vazby (nenasyčené mastné kyseliny, terpeny), oxidaci podléhají aldehydy, ketony, fenoly, terciární aminy a další skupiny látek. Oxidace je často spojena s přijetím kyslíku nebo s odebráním vodíku. Látka se oxiduje tím snadněji, čím má menší redoxní potenciál, a tak se bude její oxidace při vyšším pH zrychlovat (redoxní potenciál se zmenšuje zvýšením pH). Oxidaci vzdušným kyslíkem ovlivňuje kromě pH i světlo, teplo, katalyticky působí těžké kovy. Ke změně optické aktivity dochází u chirálních látek. Při racemizaci se opticky aktivní sloučenina mění na směs enantiomerů. Přitom jeden z enantiomerů může mít odlišný farmakodynamický efekt, což se projeví ztrátou účinnosti (33). V tabulce 3 jsou uvedeny některé možné reakce rozkladu u některých funkčních skupin. Rozkladné mechanismy v roztoku se mohou lišit od mechanismů probíhajících při testování v pevné formě, proto je vhodné provádět testování u obou forem substance, je-li to možné (21).

Tabulka 3: Rozkladné reakce u vybraných funkčních skupin (33)

Funkční skupina	Rozkladná reakce	Produkt reakce
ester	hydrolýza	karboxylová kyselina a alkohol
amid	hydrolýza	karboxylová kyselina a amin
lakton	hydrolýza	otevření kruhu, karboxylová kyselina
imid	hydrolýza	otevření kruhu
alkylchlorid	hydrolýza	alkohol
thiol	oxidace	tvorba S-oxidů nebo disulfidu
thioether	oxidace	S-oxid
Bi- a tricyklické fenolické sloučeniny	oxidace	dimerizace
polyhydroxybenzen	oxidace	chinon
thiazin	oxidace	S-oxid

3.2.9. Stresové testy biologických a biotechnologických léčiv

Bioléčiva jsou složitější struktury než chemická léčiva a jsou zde i některé specifika k přístupu provedení stresových testů a jejich hodnocení (40).

Stabilita bioléciv je jedním z limitujících faktorů jejich použití v praxi a jejich registrace. Stabilitu lze rozdělit na chemickou a fyzikální. Fyzikální stabilita souvisí s prostorovým uspořádáním molekuly. Například vlivem teploty může dojít k rozbalení proteinů, disociaci, denaturaci, agregaci, nebo precipitaci v molekule bioléciva. Chemická stabilita souvisí se změnami v chemických kovalentních vazbách molekuly, které jsou vyvolané různými rozkladnými reakcemi, jako jsou například oxidace, redukce, deaminace a hydrolýza (33) (41).

U každé provedené zkoušky je vhodné se předem zamyslet nad tím, která „místa“ v molekule bioléciva jsou náchylná k některým reakcím. Hlavní rozkladné reakce, ke kterým může během testování dojít, jsou shrnuty v následujících odstavcích. „Zranitelným“ místem proteinů a peptidů jsou aminokyseliny a také jejich pořadí v řetězci, tedy primární struktura. Deaminace je jednou z hlavních rozkladných reakcí probíhajících u peptidů a proteinů. Deaminaci může vyvolat změna hodnoty pH a zvýšená teplota. Nejvíce náchylné aminokyseliny k deaminaci jsou glutamin a asparagin.

Sklon k oxidaci je vysoký u aminokyselin methionin a cystein, vzhledem k přítomnosti molekuly síry. Oxidace methioninu a cysteinu vede ke vzniku sulfoxidu a sulfonu. K oxidaci jsou náchylné i histidin, tyrosin a tryptamin. Jako oxidační činidla se používá peroxid vodíku a tert-butylhydroperoxid (t-BHP). Oxidační reakce některých aminokyselin může být katalyzována ionty kovů.

Častou reakcí je i hydrolýza. Reakční místo náchylné k hydrolýze je dvojice asparagová kyselina-glycin nebo prolin. Asparagová kyselina a serin mají sklon k tvorbě imidu, což může vést až k přerušení řetězce aminokyselin.

Dalším reakčním mechanismem je i izomerizace. Asparagin a asparagová kyselina podléhají izomerizaci za tvorby cyklického sukcinimidu a následně aspartyly a isoaspartyly.

U monoklonálních protilátek je důležitým faktorem rozkladu teplota a oxidace, kdy dochází k fragmentaci molekuly, v bazickém prostředí dochází k agregaci nebo deaminaci.

Terciární struktura bílkovin hraje důležitou roli nejenom v jejich biologické aktivitě, ale také ovlivňuje jejich rozpustnost, sklon k agregaci a povrchové aktivitě. Tato struktura je termodynamicky stabilní v určitém rozmezí fyzikálních podmínek. Zahřátím vzorku, změnou pH, přidáním některých chaotropních činidel (močovina), konzervačních látek a solí může dojít ke změnám nativní prostorové struktury bílkovin, tedy k denaturaci. Proteiny jsou z podstaty nestabilní a snadno podléhají tvorbě inaktivních agregátů shromážděním nativních nebo strukturně narušených proteinů, které pak tvoří neaktivní struktury. Některé chemické rozkladné reakce mohou pokračovat ve fyzikální nestabilitu bílkovin. Příkladem může být oxidace histidinu a tyrosinu, která může vést k agregaci a precipitaci (41).

Stejně jako u malých molekul, je při provedení stresových testů kladen důraz zejména na rozsah rozkladných reakcí, zjištění rozkladného mechanismu a zabránění vzniku sekundárních rozkladných produktů, které jsou rozdílné od reálných podmínek dlouhodobých a zrychlených stabilitních studií.

Jak již bylo uvedeno výše, provedení stresových testů u bioléciv se věnuje směrnice **ICH Q5C** (10). V kapitole věnované zrychleným a stresovým testům je ve směrnici uvedeno, že výběru podmínek pro provedení stresových testů by měla být věnována pozornost „případ od případu“, tedy individuálně u každého bioléciva (10). U bioléciv je doporučeno sledovat vliv hydrolýzy, vliv teploty, průběh oxidace, deaminace, fotostabilitu, hodnotit mechanický stres a průběh cyklu opakovaného tání a mražení. Bioléciva podléhají v rámci testů různým rozkladným mechanismům v závislosti na podílu reaktivních skupin v molekule (4) (18) (41).

3.3. Stabilitu indikující metoda

Stabilitu indikující metoda („stability indicating method“, „stability-indicating assay“, SIM) je validovaná analytická metoda, která je schopna přesně a správně hodnotit pokles obsahu účinné látky v čase, a která je dále schopna odlišit nečistoty od účinné látky (4) (18) (38). Stabilitu indikující metoda přesně měří obsah účinné látky bez interferencí rozkladných produktů, nečistot z výroby, pomocných látek a ostatních potenciálních nečistot (28). Stabilitu indikující metoda napomáhá vytvoření vhodné lékové formy a stanovení podmínek skladování léčivého přípravku. Důležitým vodítkem pro vývoj těchto metod jsou výsledky stresových testů (kapitola Stresové testy) (36).

V průběhu vývoje stability indikující metody je důležité zvolit, které rozkladné produkty jsou relevantní pro další hodnocení, to znamená, které by vznikly i během zrychlených a dlouhodobých stabilitní studií. Důležitou součástí je i identifikace pravděpodobných rozkladných produktů, které vznikly během stresových testů, metodami s vysokým rozlišením a stanovení jejich obsahu v průběhu stabilitních studií (42).

ICH směrnice se také věnují tématice stability indikujících metod. V dokumentech je uvedeno, že analytické metody pro stanovení obsahu aktivních substancí a nečistot mají být selektivní validované stability indikující (6) (15) (43). Bližší definice v dokumentech chybí. EMA se odkazuje na ICH směrnice.

Někteří autoři rozlišují selektivní a specifickou stabilitu indikující metodu. Specifická je schopna jednoznačně hodnotit obsah účinné substance v přítomnosti rozkladných produktů, nečistot a pomocných látek. Selektivní metoda je schopna jednoznačně stanovit obsah účinné substance a jejich rozkladných produktů v přítomnosti všech ostatních nečistot, pomocných látek a podobně (35).

Ať už je do metody zahrnuto hodnocení pouze účinné substance nebo jsou zahrnuty i rozkladné produkty, vždy musí být selektivní pro sledovanou substanci.

Tématika stresových testů a vývoje stability indikujících metod je široce diskutovaná v odborné literatuře. Pouze malá část prací je opravdu stability indikující, postihující provedení stresových testů v celém rozsahu a věnující pozornost vznikajícím rozkladným produktům (35).

3.3.1. Strategie vývoje stability indikující metody

Základní kroky při vývoji stability indikující metody jsou (4) (38):

- Příprava vhodných vzorků pro testování selektivity metody
- Volba vhodné techniky
- Optimalizace metody
- Validace metody.

Na začátku vývoje metody je důležité stanovit si cíle metody. Potřeba je zhodnotit, jaké citlivosti je potřeba dosáhnout a kolik nečistot bude nebo by mělo být do studie zahrnuto a podobně.

Neméně důležitým krokem je studium fyzikálně chemických vlastností cílové substance (polarita, molekulová hmotnost, acidobazické vlastnosti), studium struktury substance vzhledem k možným rozkladným cestám ještě před započítím vývoje metody, provedení stresových testů, identifikace a charakterizace rozkladných produktů a také vytvoření podrobné literární rešerše o dané substanci.

3.3.2. Příprava vzorku

Příprava vhodného vzorku pro vývoj selektivitu indikující metody je klíčová pro hodnocení selektivity metody. Je potřeba hodnotit vzorky substance a léčivého přípravku, které obsahují také rozkladné produkty substance. Zpravidla je vhodné vzorek substance a léčivého přípravku podrobit stresovým testům a zrychlené stabilitní studii (4) (18). Vzorek pro vývoj metody tedy není jeden, ale je to celá série vzorků substance a léčivého přípravku, které byly podrobeny stresovým podmínkám (38).

Nedílnou součástí hodnocení léčivých přípravků je také jejich úprava před vlastním analytickým stanovením. Příprava vzorku musí být dostatečně selektivní a nedestruktivní na cílové analyty, měla by zahrnovat co nejméně kroků. Mezi konvenční způsoby úpravy vzorku patří přímá extrakce rozpouštědlem, extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE). Moderní trendy v přípravě vzorku si kladou za cíl zkrátit čas potřebný pro přípravu vzorku, snížit objem používaných organických rozpouštědel, snížit spotřebu vzorku, zvýšit selektivitu procesu a umožnit automatizaci celého postupu. Jedním z možných postupů automatizace je použití on-line SPE HPLC.

3.3.3. Volba techniky

Hlavním cílem je výběr techniky a optimalizace metody, zejména směrem k selektivitě a citlivosti, aby bylo zajištěno, že všechny sledované analyty budou odděleny a náležitě detekovány. Při volbě techniky je nutné si uvědomit, že obsah rozkladných produktů a ostatních nečistot je mnohonásobně nižší než obsah cílové substance. Výběr metody se odvíjí od charakteru substance, a i léčivého přípravku.

Metodami volby jsou metody separační, v první řadě **HPLC/UHPLC**, a to na reverzní fázi. HPLC techniku lze použít pro hodnocení velkého množství substancí. HPLC v závislosti na zvolené detekční technice umožňuje dosažení potřebné citlivosti metody. UHPLC vyniká zejména v rychlosti separace, rozlišení, citlivosti a v kombinaci s PDA detektorem nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií se stává silnou technikou pro stabilitu indikující metody (4).

K výhodám HPLC patří kompatibilita s vodnými i organickými rozpouštědly, vysoká přesnost a správnost, možnost analyzovat i termolabilní a polární sloučeniny, variabilní citlivost v souvislosti se zvolenou detekční technikou. Další výhodou HPLC je, že lze získat nejenom představu o klesající koncentraci sledovaného analytu, ale i o rostoucím obsahu rozkladných produktů v průběhu času (4) (44).

V menší míře se využívají i jiné módy kapalinové chromatografie, například na normálních fázích, iontově výměnná chromatografie a hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) (44).

Své místo mezi technikami používanými pro vývoj tohoto typu metod začíná zaujímat i superkritická fluidní chromatografie (SFC). SFC je separační metoda, kde mobilní fáze je kapalina v superkritickém stavu (oxid uhličitý). Díky unikátním vlastnostem mobilní fáze umožňuje SFC velmi rychlou analýzu vzorků řádově v několika minutách (4).

Pro účely vývoje stability indikující metody nebývá vhodné zvolit plynovou chromatografii (GC). GC není univerzální metoda, je vhodná pro těkavé analyty nebo látky, které lze vhodně derivatizovat. Tyto faktory omezují její použití při hodnocení stability látek (4) (35).

Využití tenkovrstvé chromatografie (TLC) jako stability indikující metody ustupuje do pozadí, zejména z důvodu problematického kvantitativního hodnocení (35). Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPLTC) by mohla vyřešit problematickou oblast TLC, zejména v případech, kdy není potřeba separovat více analytů. Je to metoda finančně nenáročná, spolehlivá, nenáročná na spotřebu organických rozpouštědel, nicméně ani HPTLC vedoucí pozici HPLC určitě neohrozí.

Kapilární elektroforéza má sice řadu výhod, mezi které patří poměrně dobrá citlivost a vysoká separační účinnost, ale na druhé straně často nižší přesnost a robustnost. Spektroskopické metody, jako je UV spektrofotometrie a fluorimetrie, nejsou pro vývoj stability indikující metody vhodné, vzhledem k jejich nízké selektivitě. Někteří autoři použili i NMR (4) (36).

Významnou roli hrají i tandemové techniky. Především nízké koncentrace rozkladných produktů, které se vyskytují ve vzorcích, a snaha zvýšit spolehlivost identifikace separovaných složek a zvýšení separační účinnosti vedlo analytické chemiky ke kroku kombinovat různé vysokoúčinné separační techniky a citlivé detekční techniky. První skupinu tandemových technik tvoří metody založené na kombinaci dvou separačních mechanismů s cílem zvýšit separační účinnost celého systému (dvourozměrná 2D HPLC nebo GC). Druhá skupina využívá spektrometrické techniky jako detekční metody v chromatografii (LC-MS, GC-MS, LC-MS/MS, LC-NMR) (4) (35) (45).

V další části (optimalizace metody, validace) se bude práce věnovat shrnutí jednotlivých kroků, které zahrnují optimalizaci HPLC metody pro vývoj spolehlivé stability indikující metody.

3.3.4. Optimalizace metody

Optimalizace metody se provádí s cílem dosáhnout co nejlepší separace všech analytů v co nejkratším čase, s použitím robustní metody a vhodné detekční techniky. Jak již bylo uvedeno výše, očekávaná hladina výskytu rozkladného produktu je v oblasti 0,05% sledované látky. Při optimalizaci metody je potřeba dosáhnout separace sledované látky a ostatních nečistot alespoň na základní linii (parametr rozlišení vyšší než 1,5).

Kroky, které je potřeba optimalizovat jsou:

- výběr vhodné stacionární fáze
- výběr mobilní fáze a separačního modu
- výběr vhodné detekční techniky.

Optimalizaci metody je možné provést experimentálně krok za krokem anebo s využitím některých z optimalizačních chromatografických programů (Chromsword, Drylab). Zpravidla je vhodné postupovat tak, že se nejprve provede prvotní screening podmínek na několika vzorcích (ze stresových testů) a slepém vzorku. Vhodné je vycházet z literární rešerše a vlastních zkušeností. Volba stacionární a mobilní fáze spolu úzce souvisí a často se prolínají. Vhodné je použít například tři různé stacionární fáze (například C8, C18 a kyano) a kombinovat je s různým složením mobilní fáze (dva organické modifikátory – methanol a acetonitril a dva pufrů – kyselý a bazický pH) pomocí automatického vývoje metody. Na základě výsledků se provede doladění podmínek. Při této finální optimalizaci metody je vždy vhodné měnit postupně pouze jeden parametr metody, ne najednou více podmínek, než se dosáhne požadované separace. Optimalizovanou metodou by se mělo dosáhnout vyhovující separace všech sledovaných analytů, při vysoké účinnosti, dostatečné selektivitě a za co nejkratší doby analýzy (4) (44).

Podle charakteru analyzované substance, zejména fyzikálně chemickým vlastnostem, se zvolí vhodný chromatografický systém – normální fáze, reverzní fáze, iontově výměnná chromatografie nebo HILIC.

Výběr stacionární fáze

Při výběru stacionární fáze je potřeba zvážit vhodnost sorbentu pro zamýšlené užití s ohledem na pH mobilní fáze, teplotu separace, požadovanou účinnost a rychlost separace a tlakových možností použité instrumentace (HPLC/UHPLC) (46).

Největší skupinu analytů tvoří nízkomolekulární substance. Podle polarity substance se pro separaci zvolí normální nebo reverzní fáze ($\log P \geq 1$). Pro malé polární molekuly by byl vhodným systémem HILIC (46).

Stále nejvíce používaným systémem je chromatografie na reverzních fázích a stacionární fáze na bázi modifikovaného silikagelu (chemicky vázaná stacionární fáze) (4). Vhodnost

sorbentu je určena selektivitou sorbentu a jejich porovnání lze provést experimentálně. Nejčastěji používanou fází je C18 nebo C8. S ostatními modifikacemi (fenylová fáze, pentafluorofenyl, diolová fáze, propylaminová fáze) se v případě stability indikujících metod příliš nesetkáváme.

Vhodný rozměr kolony souvisí s náročností separace a požadovanou rychlostí analýzy. Délka kolony a její vnitřní průměr ovlivňují rozlišení, šířku píku, mez stanovitelnosti a tlakový spád na koloně (46). Často používanou délkou kolony je kolona o délce 25 cm nebo 15 cm. Kratší kolony se používají méně, s délkou kolony se snižuje účinnost kolony a rozlišení. Autoři prací se přiklánějí k použití kolon o velikosti částic 5 μm , zřídka dokonce i k 7 μm a 10 μm , než ke kolonám s částicemi 3 μm , povrchově porézním částicím nebo monolitickým kolonám, přestože se snižující se velikostí částic dochází k nárůstu účinnosti systému. Kolony se sorbenty s částicemi o velikosti méně než 2 μm se používají pro UHPLC systém.

Z výše uvedeného vyplývá, že autoři stability indikujících metod se příliš nepouštějí do experimentování se stacionárními fázemi a často vycházejí z lékopisných metod. Tato skutečnost může být vysvětlena také tím, že celá řada těchto metod je vyvíjena pro běžnou analytickou praxi farmaceutických firem (u kterých může být omezen výběr stacionárních fází) a dlouhodobé použití pro kontrolu kvality. Z dlouhodobého pohledu jsou klasické C18 stacionární fáze vyzkoušené, robustní a dlouhodobě stabilní. I to může být důvod pro jejich stále široké využití (4) (18) (36).

Výběr mobilní fáze

Volba vhodného složení mobilní fáze závisí na typu analyzované látky a jejích fyzikálně-chemických vlastnostech, zvoleném typu detekce, chromatografickém módu a zvolené stacionární fázi (46).

Při vývoji a optimalizaci stability indikující metody se díky své univerzálnosti používá separace na reverzních fázích. Při reverzní eluci je mobilní fáze polární a stacionární fáze má nepolární charakter. Při reverzní eluci se jako mobilní fáze používají organická rozpouštědla ve směsi s vodou nebo pufrům o vhodném pH. Při spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií je zpravidla nutné přidat do mobilní fáze vhodné aditivum (kyselina mravenčí, octan amonný) z důvodu podpory ionizace v iontovém zdroji.

Teplota termostatů se zpravidla volí v rozmezí 25-35 °C. Použitím teploty lze upravit selektivitu metody.

Pro počáteční optimalizaci metody je vhodný delší gradient. Na základě výsledků se získá pohled na retenční vlastnosti substance a rozkladných produktů a na selektivitu metody. Postupně se pak mění složení mobilní fáze, pH, průtok mobilní fáze, teplota a profil gradientu, nebo se zvolí izokratická eluce. U látek iontové povahy se retence zvýší potlačením disociace. U organických kyselin dojde k potlačení disociace snížením hodnoty pH na hodnotu 2-5 a u organických bází zvýšením na hodnotu pH 8-10 (46).

Pro počáteční fázi vývoje se obvykle doporučuje použít gradient s celkovou dobou analýzy ne delší, než je 2,5násobek retenčního času cílového analytu (35), často se doporučuje doba analýzy ne delší než 15-20 minut (36). U gradientové eluce se upravuje počáteční koncentrace organické složky mobilní fáze, strmost gradientu a průběh gradientu. Izokratická eluce je výhodnější z pohledu, že není potřeba čas pro reekvilibraci kolony, na druhou stranu komplexní analýza substancí a jejich rozkladných produktů obvykle vyžaduje právě gradientovou eluci umožňující „nastavit“ selektivitu podle potřeby. Často se vyskytuje situace, kdy molekula substance má nepolární charakter a předpokládané rozkladné produkty budou malé polární molekuly, i z tohoto důvodu je výhodnější použít gradientový způsob eluce (4) (18) (37) (38) (46) (47).

Detekční technika

Detektorem volby pro stabilitu indikující metody jsou detektory UV, zejména detektor diodového pole (PDA). Nicméně v dnešní době už ani tento detektor neodpovídá nejvyšším požadavkům a charakteru metod, které často vyžadují kombinaci kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Je důležité, aby detekční technika byla schopná odhalit možné koeluce látky s nečistotou, a aby odezva detekovaných látek byla v lineárním rozsahu detektoru (4) (18).

U analýz hodnocených HPLC s UV detekcí je nutností, aby molekula obsahovala ve své struktuře chromofor. Pro získání potřebných výsledků je důležitým bodem nastavení vhodné vlnové délky pro hodnocení. Při nízkých koncentracích nečistot je vhodné posunout vlnovou délku detekce směrem k absorpčnímu maximu nečistot (46).

Použití univerzálních detektorů (CAD, ELSD, MS) je vhodné v případech, že látka nebo její nečistoty neobsahují chromofor. V případě univerzálních detektorů na bázi aerosolu (CAD, ELSD), je nutné použít tekavou mobilní fázi. Nevýhodou je, že při použití gradientové eluce je potřeba zapojit za kolonu další pumpu z důvodu kompenzace mobilní fáze, aby nedocházelo k falešně vyšším odezvám detektoru v průběhu eluce látek (vyšší citlivost detekce je při použití organických rozpouštědel v mobilní fázi) (46). Při detekci hmotnostní spektrometrií je nutné použít tekavou mobilní fázi upravenou pomocí vhodně zvoleného aditiva (kyselina mravenčí, octová, amoniak, octan amonný). Koncentrace aditiva bývá nižší než při UV detekci, aby se zabránilo nežádoucímu snížení ionizace látky a citlivosti detekce soutěžením o získaný náboj mezi látkou a použitým aditivem (46). Hmotnostní spektrometr je důležitou volbou při snaze o identifikaci vzniklých rozkladných produktů. U MS však může nastat situace, kdy koelující látka (ať už substance nebo významná nečistota, látka z matrice vzorku) potlačí nebo naopak zesílí signál odezvy (matricové efekty). U MS dále hrozí koeluce u diastereoizomerů. Při kvantifikaci pomocí MS je nejvhodnější použít izotopicky značené vnitřní standardy. LC-NMR není příliš používaným spojením, zejména z důvodu vyšší náročnosti na koncentraci analyzovaných látek (nečistot) (4) (18) (38).

3.3.5. Validace stability indikující metody

Tématikou validace analytických metod se ve svých doporučeních zabývá ICH, EMA i FDA (8) (25) (48). V České republice je také platný pokyn SÚKLu (11). Testu způsobilosti, který slouží k ověření přiměřené účinnosti chromatografického systému je věnována kapitola v lékopisných monografiích (13) (49).

Cílem validace je prokázat pomocí experimentálních dat a jejich hodnocení, že analytická metoda je vhodná pro své zamýšlené použití.

Kompletní validaci stability indikující metody je vhodné provést s látkou nebo přípravkem definitivního složení a vyrobených již neměnným technologickým postupem a po dokončení optimalizace stability indikující metody. Pokud byla validace provedena na přípravku, u kterého byla provedena ještě změna ať už ve složení nebo v technologickém postupu, je nutné provést revalidaci metody.

Jednotlivé autority se liší nejenom ve svých požadavcích na parametry, které musí být součástí validace, ale také i v hodnotách požadovaných limitů a pojmenování jednotlivých parametrů. Jednotlivá pracoviště si předem vypracují vlastní plán validace s definováním jednotlivých parametrů a s uvedením všech limitů pro hodnocení. Tento plán musí být v souladu s požadavky autorit.

Provedení kompletní validace se musí doložit u každé nově vyvinuté analytické metody. Při každé změně výrobního postupu musí být provedena revalidace analytické metody, stejně tak při změně složení přípravku nebo při změnách požadavcích na sledované degradační produkty. Rozsah revalidace je dán povahou změn.

Záznam o validaci (**validační zpráva**) dokumentuje jednotlivé kroky provedení a jejich výsledky. Součástí validační zprávy je uvedení analytického postupu, včetně postupu přípravy vzorků a standardů, charakterizace analytické metody (u HPLC specifikace analytické kolony, složení mobilní fáze, podmínky detekce apod.) a uvedení použitých matematických vzorců pro výpočet obsahu účinných látek a hodnocení nečistot. Další kapitolou je test vhodnosti chromatografického systému. Poslední kapitolou je vlastní validace, která zahrnuje parametry: přesnost (opakovatelnost, intermediární přesnost, reprodukovatelnost), linearita, správnost, selektivita, limit detekce a kvantifikace a robustnost (11). U každého parametru je komentář o tom, zda odpovídá nebo neodpovídá stanoveným kritériím.

Definice jednotlivých parametrů a postupy jejich provedení nejsou v habilitační práci uvedeny.

ICH ve své směrnici Q2(R1) rozlišuje čtyři typy analytických postupů (25):

- test totožnosti
- kvantitativní hodnocení obsahu nečistot
- limitní testy pro kontrolu nečistot
- kvantitativní hodnocení obsahu účinných látek ve vzorcích léčivých látek a přípravků nebo obsah jiných vybraných přítomných látek v léčivých přípravcích.

ICH směrnice dále obsahuje přehled, ve kterém uvádí, které parametry doporučuje otestovat u jednotlivých postupů (Tabulka 4). Pro test totožnosti požaduje pouze prokázání selektivity metody a pro limitní test nečistot test prokázání selektivity a uvedení limitu detekce. Pro zbývající dva postupy požaduje provedení většiny validačních parametrů (Tabulka 4).

Tabulka 4: Typy analytických postupů a k nim doporučené doložení validačních parametrů (25)

Analytická metoda	Kvantitativní hodnocení účinné látky	Kvantitativní hodnocení nečistot	Limitní zkoušky pro nečistoty	Test totožnosti
Parametr validace				
Správnost	+	+	-	-
Přesnost				
-Opakovatelnost	+	+	-	-
-Intermediární přesnost	+	+	-	-
Selektivita	+	+	+	+
Limit detekce	-	-	+	-
Limit kvantifikace	-	+	-	-
Linearita	+	+	-	-
Rozsah	+	+	-	-

Z definice stability indikujících metod a z cílů hodnocení nečistot vyplývá, že klíčovým parametrem je **selektivita**. ICH definuje selektivitu jako schopnost metody jednoznačně stanovit sledovaný analyt v přítomnosti ostatních složek, které mohou být ve vzorku přítomny (například nečistoty, pomocné látky). V případě testů totožnosti se selektivita vztahuje k ověření identity analytu. Při hodnocení nečistot se týká prokázání, že metoda poskytuje přesné výsledky obsahu nečistot. U kvantitativních metod zajišťuje hodnocení parametru selektivita správné vyjádření obsahu analytu ve vzorku (25).

V případě kvantitativního stanovení a hodnocení nečistot se **selektivita** dokládá předložením reprezentativních chromatogramů (v případě chromatografie). U dvou velmi blízko eluujících látek, může být selektivita ukázána pomocí faktoru rozlišení. Pokud je standard nečistoty nebo pomocné látky k dispozici, lze selektivitu hodnotit pomocí

záměrného obohacení („spikování“) vzorku čisté substance nebo přípravku na vhodně zvolené koncentrační úrovni tak, aby bylo možné prokázat, že stanovení látky není přítomností nečistoty nebo pomocné látky ve vzorku ovlivněno. Pokud není k dispozici standard nečistoty, provádí se hodnocení selektivity porovnáním výsledků s jinou metodou (například lékopisnou).

Vhodným parametrem pro prokázání selektivity metody je také testování spektrální čistoty píku („peak purity“) (4). Spektrální čistota píku je matematické vektorové porovnání rozdílů ve spektrech v jednotlivých částech píku. Čistota píku se vyhodnocuje porovnáním parametrů limit spektrální čistoty („purity threshold“) a spektrální čistota píku („purity angle“). Pro pík spektrálně čistý musí být hodnota purity angle < purity threshold (50).

Další možností hodnocení je pomocí záměrné změny jednoho nebo několika parametrů metody (složení mobilní fáze, teplota, pH), které změní selektivitu metody. Výsledek je porovnán s původní metodou. Hodnotí se počet nečistot na záznamech a procentuální plocha aktivní substance (37) (38).

3.4. Analytické hodnocení profilu nečistot

Monitorování profilu nečistot je nezbytnou součástí farmaceutického průmyslu a technologie výroby. I malá změna ve výrobě, v dodavateli výchozích surovin, ve způsobu skladování a podobně, může ovlivnit profil nečistot substance. Farmaceutický technolog musí znát chování substance a dobře vědět, které nečistoty pocházejí z výroby a které vznikají rozkladem substance v průběhu manipulace s ní. Tím nejdůležitějším cílem procesu sledování a vytvoření profilu nečistot je zajištění bezpečných, účinných a kvalitních léčivých přípravků. Nečistoty obsažené v léčivém přípravku mohou mít negativní vliv na zdraví pacienta, některé mohou být i toxické. V poslední době je věnována zvýšená pozornost také genotoxickým nečistotám.

Nečistota je definována jako jakákoliv složka nové léčivé substance, která není chemickou entitou definovaná jako nová léčivá substance (12). Rozkladné produkty mohou být považovány za podskupinu nečistot (kapitola Definice pojmů).

Nečistoty mohou vznikat v různých fázích výroby a mohou být různého původu. Kontrolu výskytu nečistot je potřeba provádět po celou dobu vývoje a výroby. Nečistoty pocházející z výrobního procesu (meziprodukty reakcí nebo vedlejší produkty reakcí), se mohou stát zdrojem dalších nečistot v konečném přípravku a substanci. Dalšími zdroji nečistot mohou být látky účastníci se syntézy (zbytková rozpouštědla), pomocné látky léčivého přípravku a obaly (51).

Ve fázích vývoje nelze ani opomenout existenci substancí ve více než jedné pevné formě (například polymorfní a amorfni krystaly). Jednotlivé pevné formy léčiv mohou vykazovat výrazně odlišné fyzikální a chemické vlastnosti, včetně barvy, stability, rozpustnosti, sypkosti, a biologické dostupnosti (52). Charakterizace těchto forem se provádí spektrálními metodami (IR, NMR, Ramanova spektroskopie, optická mikroskopie) (52).

V minulosti byla většina syntetických chirálních látek vyráběna ve formě racemátů. Obvykle však pouze jeden izomer vykazuje terapeutické účinky a druhý může vést ke vzniku rozdílných metabolitů a nežádoucích vedlejších účinků. V současné době roste počet substancí syntetizovaných ve formě čistých enantiomerů. U těchto látek se nežádoucí enantiomery řadí mezi nečistoty a jejich výskyt by měl být monitorován (44) (53).

Ve výčtu nelze opomenout nečistoty pocházející z vlastní substance, vznikající v průběhu jejího skladování, tedy rozkladné produkty.

Vždy je potřeba diskutovat původ nečistoty – zda pochází ze syntézy nebo zda se jedná o rozkladný produkt, nečistotu pocházející z pomocných látek a obalu v léčivém přípravku, i když hranice není vždy úplně ostrá. Znat původ nečistoty je důležité k tomu, abychom mohli její výskyt v substanci nebo přípravku minimalizovat. V konečném přípravku je nutné hodnotit rozkladné produkty nebo doložit, že k rozkladu nedochází (stresové testy).

Vytvoření profilu nečistot je komplexní problematika zahrnující celou řadu kroků a otázek, které musí být v průběhu tvoření profilu zodpovězeny. Vytvoření profilu nečistot zahrnuje detekci, vyhodnocení struktury a kvantitativní hodnocení organických a anorganických nečistot, včetně rozkladných produktů a zbytkových rozpouštědel v substanci a přípravku (44).

V následujícím textu je pozornost věnována zejména organickým nečistotám s důrazem na rozkladné produkty.

ICH, EMA a FDA podávají ve svých směrnících základní pokyny pro sledování profilu nečistot v analyzovaných látkách a přípravcích. Hodnocením nečistot v léčivých přípravcích se podrobně zabývají ICH směrnice: Impurities in New Drug Substances Q3A(R2) (12), Impurities in New Drug Products Q3B(R2) (14), Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R6) (54) a Guideline for Elemental Impurities Q3D (55). ICH směrnice tedy slouží jako výchozí podklady při přípravě registrační dokumentace v části týkající se přítomnosti nečistot v nové léčivé látce nebo léčivém přípravku, jejich kvalifikace a kvantitativního hodnocení. ČL 2017 (13), Ph. Eur. 9 (49) a USP 41 (56) se také zabývají tematikou hodnocení nečistot.

Směrnice ICH diskutují přítomnost nečistot z chemického hlediska a z hlediska bezpečnosti. U léčivé látky zahrnují rozdělení nečistot a jejich charakterizaci, pravidla uvádění nečistot ve specifikacích a také podmínky pro použité analytické metodiky (12). Směrnice ICH **Q3B(R2)** se zabývá pouze nečistotami v nové léčivé látce, které jsou klasifikovány jako rozkladné produkty účinné látky nebo reakční produkty účinné látky s pomocnými látkami nebo s obalovým materiálem. Obecně platí, že nečistoty přítomné v nové léčivé látce nemusí být monitorovány v léčivém přípravku, pokud nejsou také rozkladnými produkty (14).

ICH směrnice Q3B(R2) uvádí, že analytické metody pro hodnocení nečistot mají být validované a vhodné pro detekci a kvantitativní hodnocení rozkladných produktů. Metody by měly být selektivní zejména směrem k specifikovaným a nespecifikovaným nečistotám. Pokud jsou na záznamech jiné píky než píky rozkladných produktů (například látky ze syntézy substance), mají být tyto píky označeny a jejich původ má být diskutován ve validační dokumentaci (12).

Směrnice také předepisují limity a opatření pro uvádění nečistot, pro jejich identifikaci a kvalifikaci. Hodnoty jednotlivých prahů pro nečistoty v léčivé látce jsou uvedeny v tabulce 5.

Hodnoty jednotlivých prahů pro rozkladné produkty požadovaných směrnicí jsou uvedeny v tabulce 6. Pro neobvykle toxické látky je vhodné stanovit nižší práh.

Tabulka 5: Meze uvádění, identifikace a kvalifikace organických nečistot v léčivých látkách (12) (13)

Použití	Maximální denní dávka	Mez uvádění	Mez identifikace	Mez kvalifikace
Pro humánní a veterinární použití	≤ 2g za den	> 0,05%	> 0,10% nebo denní příjem > 1,0 mg (podle toho, co je nižší)	> 0,15% nebo denní příjem > 1,0 mg (podle toho, co je nižší)
	> 2g za den	> 0,03%	> 0,05%	> 0,05%
Pro veterinární použití	neuveдено	> 0,10%	> 0,20%	> 0,50%

Tabulka 6: Hodnoty jednotlivých prahů pro rozkladné produkty požadované směrnici Q3B(R2) (14)

Maximální denní dávka	Mez uvádění	Mez identifikace	Mez kvalifikace
≤ 1 g	0,1%		
>1 g	0,05%		
< 1 mg		1,0% nebo 5 µg TDI	
1 mg – 10 mg		0,5% nebo 20 µg TDI	
< 10 mg			1,0% nebo 50 µg TDI
10 mg – 100 mg			0,5% nebo 200 µg TDI
> 10 mg – 2 g		0,2% nebo 2 mg TDI	
> 2 g		0,10%	0,15%
Meze rozkladných produktů jsou vyjádřeny buď jako % léčivé látky nebo jako TDI (total daily intake = celkový denní příjem) rozkladného produktu.			

Pokud **lékopisná monografie** obsahuje článek o substanci, který zahrnuje i rozkladné produkty s vhodnými limity, provede se hodnocení podle odpovídajícího článku. Nicméně otázkou zůstává, zda lékopisné články vždy používají stabilitu indukující metodu, zda obsáhnou všechny relevantní nečistoty a zda jsou dostatečně selektivní pro potenciální rozkladné produkty. Směrnice ICH Q7A uvádí, že i přestože je o látce lékopisný článek, musí být vhodnost metody ověřena (43).

Jisté je, že všechny substance a přípravky, ať už originální nebo generické, musí být kontrolovány z důvodu výskytu nečistot po celou dobu jejich „existence“. Tedy od výroby, přes přepravu, distribuci, skladování až k podání pacientovi. V celém průběhu je cílem získání co nejvíce informací o možných nečistotách s důrazem na výskyt rozkladných produktů. Tyto informace zahrnují (21):

- popis jak nečistoty vznikají
- za jakých katalytických podmínek
- v jakém rozsahu nečistota za daných podmínek vzniká
- informace o bezpečnosti nečistot
- které z nečistot a v jakém rozsahu jsou tvořeny během zrychlených a dlouhodobých stabilitních studií
- které nečistoty jsou klíčové, vyžadující zvýšenou pozornost
- specifikace kontrolních limitů ve finálním produktu
- upřesnění vhodné lékové formy, balení a informace o označení.

Důležitým aspektem je získání co nejvíce informací nejenom o fyzikálně chemických vlastnostech látky, zahrnující například pK_a , $\log P$, rozpustnost v některých rozpouštědlech, ale také informace o metodách stanovení a hodnocení látky. Podrobná rešerše odborné literatury usnadní počátky experimentů. Na základě chemické struktury a zejména na základě přítomnosti některých funkčních skupin je možné předpovědět možné rozkladné mechanismy a možné rozkladné produkty (21). Funkční skupiny podléhající hydrolýze jsou například amidy, estery, laktony. Thioly a thioetry podléhají oxidaci (35).

Pokud bylo zjištěno, že může vzniknout více rozkladných produktů, je nutné zvážit, zda je potřebné zahrnovat do hodnocení všechny produkty. ICH uvádí, že není nutné hodnotit produkty, které nevznikají během zrychlených a dlouhodobých stabilitních studií (6).

3.4.1. Kinetika rozkladných reakcí

Faktorů, které mohou ovlivnit kinetiku rozkladných reakcí, je celá řada (druh rozpouštědla, koncentrace substance, teplota, pH, přítomnost katalyzátorů). Většina rozkladných reakcí probíhá podle kinetiky nultého, prvního nebo pseudoprvního řádu (51). S reakcemi pseudoprvního řádu se setkáváme při rozkladných reakcích často. Například při hydrolýze je voda ve velkém nadbytku a rychlost reakce tak závisí pouze na koncentraci sledované substance.

3.4.2. Kontrola nečistot v látkách pro farmaceutické použití

Český lékopis ČL 2017 a Evropský lékopis Ph. Eur. 9.0 věnují nečistotám kapitolu s názvem „Kontrola nečistot v látkách pro farmaceutické použití“ (13) (49) s cílem zajistit dostatečnou kontrolu nečistot. Požadavky týkající se hodnocení nečistot jsou uvedeny přímo ve speciálních člancích (monografiích látek) a také v obecném článku Látky pro farmaceutické použití („Corpora ad usum pharmaceuticum, Substances for Pharmaceutical use“) (13) (49).

Obecný článek definuje látky pro farmaceutické použití jako jakékoliv organické nebo anorganické látky, které se používají jako léčivé látky nebo pomocné látky pro výroby léčivých přípravků pro humánní nebo veterinární použití. Mohou se získávat z přírodních zdrojů nebo mohou být vyráběny extrakcí z výchozích materiálů, fermentací nebo syntézou. Výroba látek musí probíhat za podmínek správné výrobní praxe. Obecný článek dále rozebírá potřebu kvalifikace, identifikace a uvádění organických nečistot, které se vyskytují v léčivých látkách.

Organické nečistoty v léčivých látkách se musí uvádět, identifikovat, kdykoliv je to možné a při překročení limitů i kvalifikovat (Tabulka 5). Pokud se pro látku vyvine nový výrobní postup nebo se provede změna v zavedeném výrobním postupu a tyto změny vedou k výskytu nové nečistoty, musí se vyvinout zkouška, která se zahrne do specifikace látky.

Jednotlivé články vyjmenovávají nečistoty a soubor zkoušek pro jejich hodnocení v rámci odstavce „**Příbuzné látky**“ (součástí Zkoušek na čistotu) a „**Nečistoty**“. Odstavec Příbuzné látky uvádí analytický postup a předepisuje kritéria přijatelnosti pro hodnocení nečistot včetně uvedených limitů. V části nečistoty jsou jmenovitě vypsány specifikované nečistoty a uvedena pravidla pro hodnocení jiných detekovatelných nečistot, zpravidla s odkazem na obecný článek Látky pro farmaceutické použití. Tyto zkoušky jsou určeny ke stanovení organických a anorganických nečistot, které jsou závažné z pohledu původu léčivých látek v registrovaných léčivých přípravcích. Kontrola zbytkových rozpouštědel se provádí podle obecného článku Corpora ad usum pharmaceuticum a obecné stati „Zbytková rozpouštědla“.

Nečistoty, které se vyskytují nad mezí identifikace, mají být identifikovány (kdekoliv je to možné) a nečistoty, které se vyskytují nad mezí kvalifikace (mezí hodnotou pro kvalifikaci), mají být kvalifikovány, není-li zdůvodněno jinak.

Článek se zkouškou na **příbuzné látky** založenou na kvantitativním postupu (například kapalinové chromatografii, plynové chromatografii a kapilární elektroforéze) poskytuje odpovídající kontrolu nečistot v látce, jestliže nečistoty přítomné v množství nad platnou mezí identifikace (mezí hodnotou pro identifikaci) jsou uvedeny v odstavci Nečistoty jako Specifikované nečistoty. Nejčastěji používanou technikou pro hodnocení příbuzných látek je HPLC. Nečistoty jsou hodnoceny metodou vnějšího standardu nebo metodou normalizace. Při metodě vnějšího standardu se koncentrace stanovené složky určí porovnáním odezvy naměřené pro zkoušený roztok a odpovídající odezvy porovnávacího

roztoku (zředěný roztok zkoušené látky). Při metodě normalizace se obsah nečistot v procentech vypočítá stanovením plochy dané nečistoty jako procenta celkové plochy všech píků, s výjimkou píků rozpouštědel, zkoumadel nebo matrice vzorků a píků, jejichž plocha je rovna nebo nižší limitu zanedbatelnosti. Pokud je u metod používán pro porovnání zředěný roztok zkoušené látky, jsou odezvy příbuzných látek podobné odezvě účinné látky (odezvový faktor 0,8 až 1,2.), jinak jsou uvedeny v textu korekční faktory (převrácená hodnota odezvového faktoru). Odezvový faktor je poměrná hodnota, která je rovna odezvě jedné látky vztažené k odezvě stejného množství jiné látky za podmínek popsaných ve zkoušce.

Identifikace nečistot se provádí za použití referenční látky, typického chromatogramu nebo relativní retence.

Odstavec „**Nečistoty**“ v článku analyzované látky, obsahuje nečistoty specifikované nebo i jiné detekovatelné nečistoty, které jsou obvykle organické a o kterých je známo, že jsou detekovatelné zkouškami předepsanými v článku. Sám lékopis uvádí, že informace o nečistotách vycházejí z informací dostupných v době vypracování nebo revize článku a že tyto informace nemusí být vyčerpávající. Jestliže látka obsahuje jiné nečistoty než ty, které jsou uvedeny v odstavci Nečistoty, musí se ověřit, že tyto nečistoty jsou detekovatelné metodou popsanou v článku, jinak se musí vyvinout nová metoda a požádat o revizi článku. V závislosti na zjištěném obsahu a navrhovaných limitech se musí zvážit identifikace a/nebo kvalifikace těchto nečistot.

V obecném článku **Látky pro farmaceutické použití** se hovoří o limitu zanedbatelnosti obecně 0,05%. Pro stanovení obsahu nečistoty lze zvolit také příslušnou referenční látku dané nečistoty (CRL) (13).

Rozhodnutí o provedení nebo neprovedení stabilitních studií pro látky s lékopisnou monografií s obsahem nečistot, je potřeba dobře zvážit. Nečistoty v lékopisných člancích mohou být nevyhovující současným požadavkům na kvalitu léčivých přípravků. Některé nečistoty jsou zde uvedeny spíše jen z historického hlediska a v substancích se již téměř nevyskytují anebo naopak často v seznamu chybí některé nové informace.

Americký lékopis USP 41 se také ve svých statích věnuje nečistotám (Impurities in Drug Substances and Drug Products, Organic Impurities in Drug Substances and Drug Products), požadavkům na jejich hodnocení, rozdělení, limitům a lékopis obsahuje i kapitolu s tematikou stability (56).

3.4.3. Specifikace

Ve Specifikaci nové léčivé látky by měl být uveden seznam nalezených nečistot. Pro předpoklad výskytu těchto nečistot se používají data ze stabilitní studie, chemických vývojových studií a z rutinní analýzy předešlých šarží. Měla by být uvedena kritéria přijatelnosti pro nedefinované nečistoty a také pro celkovou sumu nečistot (9) (12).

Specifikace nové účinné látky by tedy měla zahrnovat (12):

- organické nečistoty
- každou definovanou známou nečistotu
- každou definovanou neznámou nečistotu
- jakoukoliv nedefinovanou nečistotu
- celkovou sumu nečistot
- anorganické nečistoty a zbytková rozpouštědla.

Specifikace nového léčivého přípravku by měla zahrnovat seznam rozkladných produktů, u kterých se očekává, že se objeví během výrobního procesu a za doporučených skladovacích podmínek. Kritérium přijatelnosti pro daný rozkladný produkt by mělo být stanoveno s ohledem na kritéria přijatelnosti, která platí pro léčivou látku, na hladinu kvalifikace rozkladného produktu a na nárůst jeho koncentrací během stabilitních studií a také na navrhovanou použitelnost a skladovací podmínky nového léčivého přípravku (9) (14).

Specifikace nového přípravku by měly zahrnovat (14):

- každý definovaný známý rozkladný produkt
- každý definovaný neznámý rozkladný produkt
- jakýkoliv nedefinovaný rozkladný produkt s akceptačním kritériem
- celkovou sumu přítomných rozkladných produktů.

Nečistoty mohou být již se známou strukturou (definované), pak je stanovení jejich obsahu jednodušší, anebo nedefinované, kdy proces zjištění jejich struktury a následná kvantifikace jsou podstatně náročnější na požadavky analytické techniky.

3.4.4. Stanovení definovaných nečistot

Stanovení definovaných nečistot je jednodušší proto, že zpravidla jsou k dispozici i standardy nečistot. Cílem je vyvinout analytickou metodu s vyhovující selektivitou, správností a přesností (44). Následující kapitola bude věnována krátkému shrnutí nejčastěji používaných instrumentálních technik pro stanovení definovaných nečistot.

Stále nejpoužívanější technikou je HPLC a kolony se sorbentem C18. V posledních letech byly konvenční kolony s náplní 5 μ m postupně nahrazovány kolonami s menší velikostí části (sub-2 μ m kolony) a technikou UHPLC, s cílem zvýšit citlivost stanovení a zároveň zkrátit čas analýzy. Dalším trendem posledních let je využití kolon s povrchově

porézními částicemi. UV detekce není detekcí univerzální a není vhodná pro stanovení některých látek. Pro stanovení nečistot lze zvolit univerzální detektory typu ELSD a CAD. Nejvíce zastoupenou metodou je spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií, zejména z důvodu vysoké citlivosti a selektivity.

Někteří autoři využívají metodu HILIC (pro stanovení látek více polárních a malých molekul). Nelze opomenout ani SFC, jejíž podíl po zavedení moderních přístrojů narůstá zejména v analýze chirálních a nepolárních nečistot. Při použití nepolárního oxidu uhličitého a vhodných modifikátorů má SFC blízko k chromatografii na normálních fázích a je tak komplementární k HPLC na reverzních fázích. Propojení tohoto typu chromatografické separace s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem představuje velmi rychlý a účinný nástroj pro analýzu vzorků (57).

Využití GC je omezeno (ve farmacii) na malé a těkavé sloučeniny. Zpravidla se využívá spojení GC-MS. Kapilární elektroforéza má zastoupení například v analýze některých bioléčiv charakteru proteinů (44).

3.4.5. Určení struktury pravděpodobných nečistot

Určení struktury doposud neznámých nečistot je zdlouhavý proces vyžadující použití vhodných, dostatečně selektivních separačních a citlivých detekčních technik. Pro identifikaci separovaných nečistot lze zvolit konvenční způsob jejich izolace a následné identifikace spektrálními metodami (MS, NMR, IR). Tento postup je však často časově náročný a je potřebné izolovat dostatečné množství rozkladných produktů (35). Infračervená spektrometrie se používá pro potvrzení struktury po izolaci nečistot a jejich NMR analýze (44). Využití NMR spektroskopie je zejména ve zjištění chemické struktury nečistot převážně organického původu. Ve srovnání s jinými analytickými metodami, je NMR méně citlivou metodou, náročnější na množství analyzovaného vzorku. Měření je však nedestruktivní a vzorek je možné po analýze dále použít.

Výhodnější je použití tandemových technik (LC-MS, LC-NMR), kde probíhá separace a identifikace „v jednom kroku“ (35).

Při použití **tandemové hmotnostní spektrometrie** je pro začátek potřeba použít přístup necílené analýzy, kdy jsou zaznamenáváná celková spektra (TIC – total ion current) a záznamy jsou poté extrahovány pomocí vybraných iontových chromatogramů. Pro potvrzení identity se někdy používá základní sken v úzkém rozmezí hodnot (46). Nejvíce používané v analýze nečistot jsou ionizační techniky elektrosprej (ESI) nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a průletový analyzátor (TOF) nebo Orbitrap jako analyzátoři. Pro přesné určení hmoty nečistot je vhodné použít spektrometry s vysokým rozlišením. Důležité je pečlivě nastavit podmínky pro měření hmotnostního spektrometru s ohledem na ionizaci substance a nečistot, získání optimálního signálu a tím také citlivosti. Nutné je počítat s tím, že se mohou vyskytnout problémy s nalezením molekulárního iontu, případných aduktů, produktových iontů, mohou chybět

charakteristické fragmentové ionty, naopak se mohou objevit nečekané fragmenty. Při interpretaci spekter se musí brát v úvahu všechna základní pravidla interpretace spekter (dusíkové pravidlo, možnost tvorby aduktů v souvislosti s použitou mobilní fází a obsahem solí ve vzorku, ověřit, zda pozorované ionty patří do spektra daného píku a zda nepochází například z šumu, nebo paměťového efektu předchozích píků, vzít v úvahu kontaminaci zdroje, a podobně) (58). Nutností je vzít v úvahu strukturu látky a zamyslet se nad možnými rozkladnými mechanismy a poté přenést tyto informace i na možné fragmentační chování určitých funkčních skupin v rámci hmotnostních spekter.

Identifikace nečistot by měla být podpořena rozkladnými mechanismy s vysvětlením, jakou reakcí ke vzniku rozkladného produktu došlo (21). Po navržení struktury nečistoty by mělo být provedeno shrnutí všech získaných informací včetně informací o původu vzorku, dat získaných UV spekter změřených PDA detektorem a záznamů dalších analytických technik. Určení struktury (identifikace) jednotlivých nečistot lze také provést porovnáním s komerčně dostupným nebo syntetizovaným standardem, které byly zakoupeny nebo připraveny na základě predikce struktury nečistoty (21). To znamená, že v optimálním případě by se porovnála hmotnostní spektra a retenčního chování připraveného standardu pravděpodobné struktury se spektry neznámé nečistoty měřené za identických podmínek, a tím by se potvrdila identita sledované nečistoty (58).

Stanovení obsahu nečistot se v ideálním případě provádí porovnáním se standardem nečistoty, pokud je dostupný. Nebo lze vztahovat obsah nečistoty k píku substance, pokud mají podobné odezvové faktory. V opačném případě, lze tento přístup také zvolit, ale současně se zavedením korekčních faktorů (12). Po vyčerpání výše uvedených možností však zůstanou stále některé nečistoty neidentifikované.

Některé rozkladné produkty mohou být, na rozdíl od vlastní látky, těkavé nebo nemají ve své struktuře chromofory. I z toho důvodu řada farmaceutických firem doporučuje hodnocení parametru hmotnostní bilance, i když tento parametr autority často opomíjejí (21). Neméně důležitá je úvaha nad možným vznikem izomerů (17).

Podrobněji jsou výhody a nevýhody jednotlivých metod, moderní trendy jednotlivých technik, možnosti a limity jejich využití popsány v řadě odborných prací – například v knize „Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals“ (51) nebo v přehledových člancích „Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade“ (44) a „Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling“ (59).

Rozlišení

Při hodnocení nečistot je hlavním cílem vyhovující separace (rozdělení) nečistot od sledované substance. Nejpoužívanějším parametrem pro vyjádření kvality rozdělení dvou sousedících elučních křivek je rozlišení. Jestliže není nečistota zcela oddělena od

analyzované látky, lze použít poměr výšky píku k sedlu jako kritérium pro způsobilost zvoleného systému k rozdělení látek (13).

Hmotnostní bilance

Při hodnocení vzniklých nečistot ze substance je vhodné sledovat také hmotnostní bilanci (souvislost stanovení rozkladných produktů a stanovení substance). Hmotnostní bilance je ve své podstatě využití zákona zachování hmotnosti. Správným hodnocením hmotnostní bilance lze také potvrdit selektivitu vyvinuté metody a prokázat, že množství nalezených rozkladných produktů odpovídá poklesu obsahu účinné látky (60).

ICH popisuje hmotnostní bilanci („mass balance“) jako hodnocení spojení hodnot stanovení obsahu látky a hladin rozkladných produktů (25). Tato definice je zdánlivě jednoduchá. V pokynu SÚKLu Reg-83 je uvedeno, že vyhodnocení stability by se mělo týkat nejenom látky, ale také rozkladných produktů. Kde je to vhodné, měla by být pozornost věnována posouzení hmotnostní bilance (5). Důležité je hodnotit hmotnostní bilanci správně. Jak správně stanovit hmotnostní bilanci je však diskutabilní (60). Pro výpočet bilance lze použít molekulovou hmotnost, hodnoty vyjádřené v jednotkách hmotnosti (gramy) anebo plochu píku na chromatogramu.

Stanovení hodnoty hmotnostní bilance může být problematické z několika důvodů: rozkladné produkty mohou mít nižší odezvu při UV detekci z důvodu například ztráty chromoforu, rozkladné produkty mají rozdílné odezvové faktory, mohou vznikat těžké rozkladné produkty, mohou se vyskytnout problémy s elucí a retencí rozkladných produktů. Pokud jsou k dispozici standardy rozkladných produktů, k podobným problémům nedochází. Toto však často není možné (35) (42). Při nízkém rozkladu substance, kdy obsah rozkladných produktů je 1-3%, je obtížné hodnotit hmotnostní bilanci i proto, že se musí počítat s chybou měření danou vlastní analytickou metodou a relativní směrodatnou odchylkou výsledků (42).

3.4.6. Nečistoty biologických a biotechnologických léčiv

U biologických léčiv je problematika sledování výskytu nečistot složitější. Na rozdíl od syntetických malých molekul, jsou biotechnologická léčiva vyráběna pomocí živých, často geneticky modifikovaných buněčných a speciálních tkáňových kultur. Standardizace výrobního procesu je jen velmi obtížně zajistitelná. Zdrojem znečištění mohou být chemikálie, ale také antibiotika použita v průběhu výrobního procesu. Provedené testy musí potvrdit výslednou nepřítomnost jakýchkoliv nečistot (39) (61).

3.4.7. Genotoxické nečistoty

Stále větší důraz je kladen na kontrolu obsahu potenciálně genotoxických nečistot v léčivých látkách. Problematika genotoxicity zasahuje všechna odvětví výzkumu a průmyslu, která nakládají s novými látkami, zvláště pak z oblasti nanomateriálů.

Genotoxicita je schopnost látky (ať už přirozeně se vyskytující nebo syntetické) způsobovat poškození genetické informace uvnitř buňky. Genotoxické látky jsou schopny uvnitř buňky interagovat a poškozovat genom. Tento zásah do DNA může vést k mutacím, které následně podporují karcinogenezi, případně mohou dát základ vývoji vrozených vývojových vad (62).

Tématice genotoxických nečistot se věnují i směrnice ICH: ICH M7(R1) (63) a ICH S2(R1) (64) se zmínkou i ve směrnících Q3A(R2) (12) a Q3B(R2) (14). Směrnice **ICH M7(R1)** se týká doporučení pro předpovědění a následné zjištění možných genotoxických vlastností nečistot v léčivých látkách a přípravcích během celého procesu výroby i po uvedení přípravku na trh (63). Nečistoty by měly být testovány na toxicitu při překročení identifikačních a kvalifikačních mezí (12). Testování genotoxicity je časově i finančně náročné, pozornost vědců se orientuje k vytvoření efektivního nástroje pro sledování genotoxicity. V současné době je nejrozšířenějším experimentálním testem pro vyšetření genotoxicity **Amesův test**. Jedná se o relativně známou, rychlou a citlivou in vitro metodu vyvinutou pro zjištění, zda studovaná látka má potenciál působit poškození DNA.

U potenciálních či jistých genotoxických nečistot se pak stanovují prahové limitní koncentrace TTC (toxikologický práh, Threshold of Toxicological Concern). Podle denní dávky látky a také doby expozice látce se stanovují limity na maximální množství genotoxinu, které může potenciálně zapříčinit vznik rakoviny s pravděpodobností 1/100000. Tento limit je 1,5 µg/den (63). Existují i programy, podle kterých lze genotoxickou látku odhadnout (DEREK, TOPKAT) (65). Funkční skupiny, u kterých hrozí největší riziko genotoxicity, jsou: aldehydy, aromatické aminy/hydroxylaminy, epoxidy a polyaromatické uhlovodíky, a α,β -nenasyčené karbonylové sloučeniny (65). Reakce, které nejčastěji vedou ke vzniku těchto nečistot, jsou hydrolyza a oxidace.

Při analýze genotoxických nečistot, je potřeba dosahovat detekčních limitů v hodnotách ppm, metodou volby je kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (65).

3.4.8. Enantiomerní čistota substancí

Pro enantiomerní nečistoty neplatí pokyn ICH Q3A(R2) (12). Naopak ve směrnici **ICH Q6A** (15) je uvedeno, že se k tomuto typu nečistot má přistupovat stejně jako k ostatním organickým nečistotám, včetně dodržení všech limitů, pokud tomu nebrání technická omezení. Pokud je látka používána jako čistý enantiomer, použité metody by měly být schopny rozlišit oba enantiomery a také tyto látky hodnotit. Pro hodnocení lze použít i achirální metodu, pokud bylo prokázáno, že k tvorbě druhého enantiomeru nedochází (15).

Dříve hojně zastoupené polarimetrické metody dnes již nevyhovují požadavkům na hodnocení nečistot. Při použití enantioselektivních metod HPLC a CE lze kontrolovat enantiomerní čistotu substancí na požadovaných hladinách. U metod se postupuje buď

tak, že se použije chirální stacionární fáze (u HPLC zejména v normálním uspořádání), anebo se pracuje v achirálním systému a použije se derivatizace chirálním činidlem (53). Další z moderních možností chirálního hodnocení substancí je využití SFC. Použití SFC se stává dokonce metodou volby. Výhodou je rychlost separace a vyšší účinnost a také možnost využití SFC v preparativním měřítku. Často používané stacionární fáze jsou na bázi polysacharidů (deriváty celulózy a amylozy) (57).

3.5. Pokročilé oxidační procesy

Léčivá látka se může v nezměněné podobě vyloučit močí a stolicí z organismu a dostat se přes čističky odpadních vod do povrchových nebo podzemních vod, nebo u veterinárních léčiv do půdy (hnojením) a do sedimentu. Látka se dostane do životního prostředí také nesprávnou manipulací s léčivým přípravkem nebo látkou. Léčivé látky se ve vodách vyskytují na velmi nízkých koncentračních hladinách a hovoří se o tzv. mikropolutantech. V současné době se neustále zpřísňuje legislativa a roste pozornost věnovaná problematice mikro znečištění povrchových vod, ale také pitné vody (66).

Úlohou analytické chemie je vyvíjet a optimalizovat analytické metody pro stanovení obsahu reziduí léčivých látek ve vodách a dalších složkách životního prostředí. Tyto metody musí být dostatečně citlivé a také musí obsáhnout široké spektrum možných kontaminantů. Mezi metody volby patří opět kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (67).

Metody efektivního odstraňování léčivých látek z vod se teprve postupně rozvíjejí, mezi efektivní metody by mohla patřit membránová filtrace nebo oxidační procesy. Právě **pokročilé oxidační procesy** (Advanced Oxidation Process, AOP) představují vhodnou alternativu k sanaci podzemních a povrchových vod.

Principem AOP je neselektivní oxidace **hydroxylovými radikály**. Hydroxylový radikál je částice s poměrně nízkou životností, avšak s extrémně vysokou reaktivitou. Cílem provedení je v ideálním případě celková mineralizace organického polutantu na anorganické sloučeniny (oxid uhličitý, voda). Hydroxylové radikály reagují s jakoukoliv sloučeninou schopnou oxidace (66). Atak hydroxylového radikálu může být doprovázen přenosem protonu, kdy se z napadené organické molekuly stává organický radikál, který dále reaguje s kyslíkem za vzniku peroxoradikálu. Následují řetězové reakce vedoucí až ke vzniku anorganických sloučenin. V závislosti na struktuře organické molekuly se může uplatnit i princip elektrofilní adice (dvojně vazby v molekule) anebo se kromě atomu vodíku odtrhne také elektron. Většina AOP potřebuje „dodat“ energii, nejčastěji formou UV záření (68).

K **výhodám** procesů patří, že atak hydroxylovými radikály není příliš selektivní, je rychlý a probíhá za normální teploty a tlaku. **Nevýhodou** je poměrně velká finanční náročnost, stále omezené praktické zkušenosti při použití v oblasti pitné vody a neuniverzálnost (některé látky jsou pouze obtížně oxidovatelné). Mezi další nevýhody patří omezená předpověď účinnosti procesu, která vyplývá z rozdílné kvality vody a také přítomnost zbytkového peroxidu vodíku, ozonu a práškového katalyzátoru (musí být odstraněny – například s využitím granulovaného aktivního uhlí nebo membránovými procesy) (66).

Mezi AOP patří Fentonova oxidace, foto Fentonova oxidace, fotokatalytická oxidace, fotolýza peroxidem vodíků a procesy užívající ozon (66) (68).

AOP jsou vhodné například pro látky typu chlorovaných uhlovodíků, pro pesticidy a herbicidy, z léčivých látek jsou popsány rozklady například antibiotik a hormonálních látek. Vhodnost konkrétní metody AOP na konkrétní látku závisí na mnoha faktorech, mezi které patří kvalita vody (UV absorbance), možnost vzniku nežádoucích vedlejších produktů reakce a pohlcovače radikálů (66).

Habilitační práce se bude blíže věnovat stručné charakteristice fotokatalytické oxidaci oxidem titaničitým.

3.5.1 Heterogenní fotokatalýza oxidem titaničitým

V případě tohoto procesu se jedná o fotokatalýzu založenou na systému $\text{TiO}_2/\text{UV}/\text{O}_2$. Fotokatalytická oxidace využívá oxid kovu, který vstupuje do reakce jako katalyzátor a zvyšuje oxidační účinek kyslíku.

3.5.1.1. Oxid titaničitý

V přírodě se oxid titaničitý vyskytuje ve třech modifikacích – anatas, rutil a brookit. Modifikace mají pro fotokatalytickou reakci různou aktivitu, přičemž nejvyšší má oxid titaničitý anatasového typu. Oxid titaničitý (TiO_2) anatasového typu vykazuje při nízké ceně zdravotní nezávadnost, má vhodné elektrické a optické vlastnosti, vysokou stabilitu a účinnost (68) (69). Důležité je, že TiO_2 je polovodič, u kterých je životnost reaktivních skupin delší než u vodičů (u vodičů nosiče náboje podléhají bezprostřední rekombinaci) (70). Je to jemný bílý prášek, který se používá jako pigment (titanová běloba). Nově syntetizované materiály, zejména rozmanité nanostrukturní formy TiO_2 , mohou mít oproti běžné titanové bělobě unikátní vlastnosti (71).

3.5.1.2. Princip fotokatalýzy

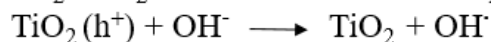
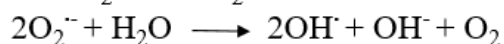
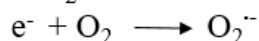
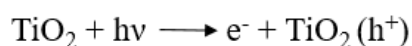
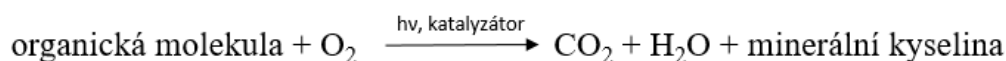
Fotokatalytická reakce začíná vystavením TiO_2 světlu a probíhá vždy za přítomnosti vzdušného kyslíku. Ozářením světlem vhodné vlnové délky (zpravidla 388 nm), dochází na povrchu TiO_2 k absorpci fotonu, dojde k přechodu elektronu z valenčního pásu do vodivostního. Tím vznikne ve valenčním pásmu díra a vytvoří se pár elektron (e^-) – díra (h^+) na povrchu katalyzátoru. Excitace elektronu z valenčního pásu do pásu vodivostního nastane, pokud fotokatalyzátor absorbuje záření o energii, která je rovna nebo vyšší, než je šířka zakázaného pásu polovodiče. Zakázaný pás polovodiče je oblast mezi nejvyšším bodem zaplněného valenčního pásu a nejnižším bodem prázdného vodivostního pásu. Šířka zakázaného pásu (E_g) souvisí s vodivostí dané látky. Oxid titaničitý anatasového typu má E_g 3,23 eV (72) (73). Jako zdroj světla se používá rtuťová výbojka emitující polychromatické záření v oblasti 254-400 nm, sluneční světlo, žárovky nebo LED diody (68).

Povrch aktivovaného TiO₂ s aktivovanými elektronovými dírami, které jsou kladně nabitě a mají vysoký oxidační potenciál, adsorbuje vodu nebo hydroxylové ionty a vzniká hydroxylový radikál. Elektrony, které mají redukční schopnost, redukují přítomný kyslík, který se mění na superoxidový radikál (peroxoradikál). Hydroxylový radikál a superoxidový radikál se za přítomnosti vzdušného kyslíku podílejí na rozkladných reakcích organických molekul (70) (73).

Aby nedošlo k rekombinaci elektronů a děr je důležité, aby se na povrchu oxidu titaničitého vyskytovaly naadsorbované OH skupiny a molekuly kyslíku. Celý proces probíhá za přítomnosti vody, vzduchu, fotokatalyzátoru a cílové molekuly (69).

Hydroxylový radikál vytrhne z organické molekuly vodíkový atom, a tak vzniká organický radikál a voda. Organický radikál dále reaguje s molekulou kyslíku a vzniká opět organický peroxoradikál, ten dále reaguje s hydroxyl radikálem a celý proces se opakuje. Reakční mechanismy, proces tvorby radikálů a následné reakce jsou komplexní a velmi pestré.

Výše uvedené reakce lze popsat následujícími rovnicemi a schématem (69) (74):



3.5.1.3. Faktory ovlivňující průběh fotokatalytického procesu

Faktorů, které mohou ovlivnit průběh fotokatalytického procesu, je celá řada. Je vhodné experimentálně vybrat formu katalyzátoru, jeho koncentraci, hodnotu pH, teplotu, typ záření i v závislosti na charakteru odbourávané látky, aby celý proces odbourání byl co nejrychlejší a efektivní.

Velikost částic

Velikost částic oxidu titaničitého je jedním z faktorů, který může ovlivnit jeho fotokatalytickou aktivitu. Oxid titaničitý lze s výhodou použít i ve formě nanočástic. Zvýšená aktivita TiO₂ se zvýší zmenšením částic a tím zvětšením aktivního povrchu katalyzátoru, zejména z toho důvodu, že chemické reakce probíhají na jeho povrchu (75). Kromě velikosti částic hraje roli i prostorové uspořádání částic oxidu titaničitého. Lze využít například sférické částice, vlákna nebo nanovrstvy (75).

Použitá forma

Katalyzátor lze použít v práškové formě nebo ve formě tenké vrstvy nanesené na vhodný nosič. Oxid titaničitý ve **formě prášku** se používá jako jemná disperze částic na pórovitém materiálu nebo jako vodná suspenze částic. Při použití částic katalyzátoru v suspenzní formě, závisí reakční rychlost na intenzitě světla, na povrchu, na hloubce pronikání UV záření, na katalyzátoru a na adsorpčních vlastnostech přítomných reagujících a nereagujících složek. Nevýhodou použití suspenze je nestabilita v čase při různém pH, sedimentace v průběhu reakce a mutnost odstranění katalyzátoru z čištěné kapaliny po ukončení reakcí. Vzhledem k velikosti částic katalyzátoru je pro jeho odstranění vhodné použití polopropustné membrány (76).

Metody nanesení **tenké vrstvy na inertní nosič** zahrnují například metodu rotačního lití, vytahování z roztoku, nanášení litím, stříkáním anebo sol-gel proces (76).

Existuje několik typů suspenzních reaktorů a reaktorů s imobilizovaným katalyzátorem. Mezi suspenzní patří například kruhový reaktor, „upflow“ reaktor, reaktor s membránovou jednotkou nebo Taylorův reaktor. Reaktory se skládají z reakční nádoby (transparentní na UV záření – sklo Pyrex), ve které cirkuluje suspenze, zdroje světla a zdroje probublávajícího kyslíku. Reaktory s imobilizovaným katalyzátorem jsou obdobně uspořádány, pouze s tím rozdílem, že katalyzátor je umístěn na nosiči, který je omýván kapalinou (76).

Povaha a koncentrace polutantu

Na rychlost průběhu celého procesu má vliv charakter organické molekuly, například aromatické látky s nitroskupinou se budou efektivněji adsorbovat na povrch katalyzátoru a snáze podléhat oxidaci než například fenolické látky.

Při příliš vysoké koncentraci látky může dojít k nasycení všech míst katalyzátoru a tím i k deaktivaci katalyzátoru pro další molekuly polutantu (69). S počáteční koncentrací polutantu souvisí také rychlost reakce; při vysoké koncentraci je rychlost reakce nezávislá na koncentraci rozpuštěné látky na rozdíl od nižších koncentrací, kdy reakce probíhá závislostí prvního řádu (69) (77).

Použitá záření

Vliv na celý proces má také použité záření. Zvýšená intenzita záření může vést ke zrychlení odbourání, dokud nedojde k omezení přenosu hmoty (kritický je krok přenesení elektronu z katalyzátoru na kyslík v systému). Typ a intenzita záření neovlivní charakter rozkladných reakcí (69).

Vliv pH

Povrch TiO_2 získává při $\text{pH} \geq 6,3$ záporný náboj a při pH nižším náboj kladný. Vyšší aktivitu vykazuje oxid titaničitý při nižším pH , ale pH nižší než 3 může způsobit sníženou efektivitu rozkladu (69). Vysvětlit vliv pH na proces fotokatalýzy je velmi obtížné, mezi povrchem katalyzátoru a organickou molekulou může dojít k elektrostatickému

přitahování nebo odpuzování v závislosti na pH a charakteru molekuly. Vyšší účinnost odbourávání v alkalickém prostředí může být vysvětlena díky vyšší koncentraci hydroxylových iontů a tím účinnějšímu vzniku hydroxylových radikálů (71).

Přítomnost kyslíku

Provzdušňování reakční směsi je velmi důležitým faktorem, protože kyslík působí jako zachytávač elektronu a tím snižuje rekombinaci páru elektron-díra (77).

Koncentrace katalyzátoru

Při vyšší koncentraci katalyzátoru také roste jeho povrchová plocha, která je k dispozici pro adsorpci a degradaci. Na druhou stranu příliš vysoká koncentrace katalyzátoru může způsobit tzv. stínící efekt, nebo může dojít k aglomeraci částic a tím opět ke zpomalení procesu odbourání látky (69) (77).

Teplota

Obecně se doporučuje pracovat za laboratorní teploty. Při teplotě nad 80 °C dochází ke zpomalení reakce, stejně tak při teplotě pod 20 °C (71).

3.5.1.4. Kinetika heterogenní fotokatalytické reakce

Fotokatalytická reakce probíhá na mezifázovém rozhraní, které tvoří povrch oxidu titaničitého a kapalné reakční prostředí. Během reakce dojde k interakci nosičů náboje na povrchu TiO₂ s naadsorbovanou organickou molekulou a dojde k chemickým změnám. Celý proces zahrnuje několik kroků, které mohou ovlivnit výslednou rychlost reakcí – pohyb látek k povrchu katalyzátoru a jejich difuze z vnějšího k vnitřnímu povrchu, adsorpce látek na povrchu katalyzátoru, chemická reakce a desorpce produktů zpět do kapaliny (71).

Průběh celého fotokatalytického procesu lze popsat Langmuir – Hinshelwoodovým modelem (69) (74):

$$r = -\frac{dc}{dt} = \frac{kKc}{1 + Kc}$$

r je reakční rychlost, c je molární koncentrace rozkládané látky, k je rychlostní konstanta rozkladu, K je adsorpční koeficient látky, t je čas ozáření.

U tohoto formátu je předpokládáno, že při vysokých koncentracích organické látky ($Kc > 1$) je reakční rychlost konstantní a reakce probíhá podle kinetiky 0. řádu. Průběh odbourávání organických látek ve vodě však probíhá při nízké počáteční koncentraci látek ($Kc \ll 1$) a reakční rychlost je úměrná koncentraci látky a reakce probíhá podle kinetiky 1. řádu. Většina autorů však popisuje děje pomocí kinetiky pseudo-prvního řádu, z toho důvodu, že koncentrace odbourávané látky je velmi nízká a koncentrace ostatních činidel lze považovat za konstantní. Rozklad lze popsat vztahem (69) (74):

$$\ln\left(\frac{c_0}{c}\right) = kKt = k_0t$$

c_0 je počáteční koncentrace látky, c je koncentrace v čase t , k_0 je rychlostní konstanta pseudo-prvního řádu. Grafické znázornění závislosti $\ln c_0/c$ na čase má tvar přímky, a její směrnice představuje formální rychlostní konstantu prvního řádu k_0 .

Popsané přístupy nelze použít obecně, protože celý proces je komplexní, zahrnující meziprodukty a další přítomné látky, které v tomto přístupu nejsou uvažovány.

Úloha analytické chemie

V problematice odbourávání organických látek ze životního prostředí pomocí pokročilých oxidačních procesů je **úlohou analytické chemie** monitorování kinetiky odbourávání, sledování rozkladných mechanismů a popis vznikajících reakčních produktů. Důležitým bodem je i vhodně zvolený typ vzorku, jeho odběr a úprava před analýzou (67). V průběhu celého procesu se hodnotí kinetické parametry rozkladu (rychlostní konstanta), sledují se rozkladné produkty, hodnotí se celkový obsah organického uhlíku a navrhuje se reakční mechanismy rozkladných reakcí.

Zajímavým aspektem je i posouzení, které reaktivní částice se na odbourání více podílejí, zda dochází k rozkladu zejména vlivem volných děr anebo vlivem hydroxylových radikálů. Do reakční směsi se záměrně přidávají inhibitory volných radikálů (vychytávače, „scavengers“) a hodnotí se změna rychlostních konstant. Jodid draselný se používá jako vychytávač volných děr i hydroxylových radikálů. Isopropanol lze použít jako inhibitor volných radikálů. Jako inhibitor hydroxylových radikálů může působit i acetonitril. Vychytávačem superoxidových radikálů je benzochinon (74).

V závislosti na typu organické sloučeniny může dojít v průběhu celého procesu k tvorbě řady reakčních produktů, které opět podléhají rozkladným reakcím vedoucím až k úplnému odbourání léčivé látky ze životním prostředí.

4. Komentář k publikovaným pracím

Výsledky prezentované v této habilitační práci vznikaly v letech 2003-2018 a zahrnují i práce vytvořené během doktorského studia.

Experimentální práce probíhaly v laboratoři kapalinové chromatografie a laboratoři hmotnostní spektrometrie na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

Cíle a zaměření prezentovaných publikací lze rozdělit do několika kategorií. Rozdělení není jednoznačné, jednotlivá témata se prolínají, protože v rámci vývoje a validací metod je vždy součástí metody i příprava vzorku a optimalizace chromatografického systému.

Kategorie:

1. Vývoj metod pro sledování stability účinných látek, stanovení obsahu vybraných pomocných látek v léčivých přípravcích a sledování výskytu nečistot.
Tato kategorie zahrnuje i práce, v rámci kterých byly provedeny stresové testy sledovaných látek.
2. On-line SPE HPLC, využití nanovláken jako sorbentů pro extrakci na tuhou fázi, moderní metody úpravy vzorku pro analýzu.
3. Využití moderních typů stacionárních fází v HPLC v analýze látek přírodního původu a doplňcích stravy.
4. Analytická chemie jako součást botanické a biochemické studie.

4.1. Vývoj metod pro sledování stability účinných látek, stanovení obsahu vybraných pomocných látek v léčivých přípravcích a sledování výskytu nečistot

- 1) NOVÁKOVÁ Lucie, MATYSOVÁ Ludmila, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr, Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, vol. 37, no. 5, p. 899-905.
- 2) MATYSOVÁ Ludmila, SOLICH Petr, MAREK Petr, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, NOVÁKOVÁ Lucie, ŠÍCHA Jan, Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method. *Talanta*, 2006, vol. 68, no. 3, p. 713-720.
- 3) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYSOVÁ Ludmila, NOVÁKOVÁ Lucie, SOLICH Petr, HPLC determination of calcium pantothenate and two preservatives in topical cream. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41, no. 2, p. 671-675.
- 4) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, NOVÁKOVÁ Lucie, MATYSOVÁ Ludmila, ŠÍCHA Jan, SOLICH Petr, Determination of estradiol and its degradation products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1119, no. 1-2, p. 216-223.
- 5) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYSOVÁ Ludmila, NOVÁKOVÁ Lucie, HÁJKOVÁ Renata, SOLICH Petr, HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, vol. 43, no. 3, p. 1169-1173.
- 6) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYSOVÁ Ludmila, HÁJKOVÁ Renata, ŠATÍNSKÝ Dalibor, SOLICH Petr, Advantages of pentafluorophenylpropyl stationary phase over conventional C18 stationary phase—Application to analysis of triamcinolone acetonide. *Talanta*, 2008, vol. 76, p. 597–601.
- 7) Žáková Petra, Sklenářová Hana, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYSOVÁ Ludmila, ŠATÍNSKÝ Dalibor, Optimalizace HPLC stanovení klotrimazolu. *Chemické Listy*, 2009, vol. 103, p. 251–255.
- 8) MATYSOVÁ Ludmila, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, HÁJKOVÁ Renata, KRIVDA Anton, SOLICH Petr, Application of HILIC stationary phase to determination of dimethindene maleate in topical gel. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, vol. 50, no. 1, p. 23-26.
- 9) MATYSOVA Ludmila, KOBLOVÁ Petra, GALLA Lubomír, SKLENÁŘOVÁ Hana, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr, Chromatographic determination of active compounds in topical formulations. *Analytical Methods*, 2012, vol. 4(6), p. 1525-1529.
- 10) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, BRABCOVÁ Ivana, ŠATÍNSKÝ Dalibor, MATYSOVÁ Ludmila, LUSKAČOVÁ Alena, OSIČKA Zdeněk, SOLICH Petr, Optimisation of an HPLC method for the simultaneous determination of pyrantel pamoate, praziquantel, fenbendazole, oxfendazole and butylhydroxyanisole using a phenyl stationary phase. *Analytical Methods*, 2012, vol. 4(6), p. 1592–1597.
- 11) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, PANNYOVÁ Anna, MATYSOVÁ Ludmila, SOLICH Petr, Development of novel stability-indicating method for the determination of

- dimethindene maleate and its impurities. *Chromatographia*, 2013, vol. 76(21), p. 1545-1551.
- 12) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYÁŠ Robert, IHNÁT Lukáš, NOVÁKOVÁ Lucie, ŠATÍNSKÝ Dalibor, Degradation study of nitroaromatic explosives 2-diazo-4,6-dinitrophenol and picramic acid using HPLC and UHPLC-ESI-MS/MS. *Analytical Methods*, 2014, vol 6, p. 4761-4768.
- 13) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, ŠATÍNSKÝ Dalibor, SOLICH Petr, Aspects of Decontamination of Ivermectin and Praziquantel from Environmental Waters using Advanced Oxidation Technology. *Chemosphere*, 2016, vol 144, p. 21-28.

Metody v publikacích č. **1-10** byly vyvíjeny ve spolupráci s Kontrolní laboratoří Farmaceutické fakulty a farmaceutickými firmami. Tyto práce zahrnují vývoj, optimalizaci a validaci HPLC metod pro stanovení obsahu účinné látky, v některých případech i vybraných pomocných látek (konzervačních nebo antioxidačních látek) a vybraných nečistot v léčivých přípravcích. Většinou se jednalo o topické léčivé přípravky pro humánní nebo veterinární použití. Obvykle byly hodnoceny definované nečistoty podle zadávací dokumentace firmy ve spolupráci se SÚKLEM.

Před zavedením přípravků na trh je potřeba doložit jejich stabilitu pomocí stabilitních studií. Analýza léčivých přípravků zahrnuje celou řadu dílčích kroků, včetně získání prvotních informací o sledovaných substancích. Nedílnou součástí prací je i optimalizace chromatografických podmínek a izolačního postupu. Většina prací využívala izokratické podmínky separace a pro kvantitativní hodnocení metodu vnitřního standardu. Optimalizace výběru analytické kolony byla prováděna s cílem sledovat moderní trendy v oblasti stacionárních fází. V práci byly použity stacionární fáze na bázi modifikovaného silikagelu nebo také stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého (7 a 9), metoda HILIC (8) či kolony s povrchově porézními částicemi (12). Hlavním typem detekce byla spektrofotometrická (UV) nebo fluorimetrická (10) detekce.

Vyvinuté metody byly kompletně validovány. Všechny validované parametry vyhovovaly požadavku autorit. Vyvinuté a validované metody prací **1-10** byly použity v Kontrolní laboratoři pro rutinní analýzy léčivých přípravků a provedení stabilitních studií léčivých přípravků.

Součástí prací **11-13** bylo provedení stresových testů a popis stability cílových substancí a jejich rozkladných produktů. Charakterizace rozkladných produktů byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie (**11-13**).

Cílem publikace **1**), bylo vyvinout HPLC metodu pro současné stanovení účinné látky indometacinu a jeho dvou rozkladných produktů - kyseliny 5-methoxy-2-methylindolyloctové a kyseliny 4-chlorbenzoové v topickém léčivém přípravku. K HPLC separaci byl použit nový typ chromatografické kolony s fenylovou stacionární fází.

V práci **2**) byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení účinné látky terbinafinu. Kromě terbinafinu se v přípravku sledovala hladina i jeho rozkladných produktů: β -terbinafinu, Z-terbinafinu a 4-methylterbinafinu. Současně byla hodnocena i nečistota pocházející

z výchozích surovin syntézy: 1-methylaminomethylnaftalen. K HPLC separaci byla použita stacionární fáze s kyano skupinou.

V práci **3)** byla vyvinuta kontrolní metoda pro sledování obsahu pantothenanu vápenatého a dvou konzervačních přísad (methyl- a propylparaben) v masti.

Cílem práce **4)** bylo vyvinout stabilitu indikující metodu pro sledování obsahu účinné látky beta-estradiolu v gelu. Kromě estradiolu byl hodnocen i výskyt několika nečistot, které byly uvedeny v Drug Master File dokumentaci. Hodnocené rozkladné produkty byly: estron, $\Delta^{9(11)}$ – estron, $\Delta^{9(11)}$ – estradiol, hemidydrát 17α -estradiolu, 17α -ethinylestradiol, 3-methoxy- 17β -estradiol a 17β -estradiol-17-acetát. Dále byla sledována hladina $\Delta^{9(11)}$ – estronu jako výchozí látky syntézy a hladina $\Delta^{9(11)}$ – estradiolu, který je meziproduktem při syntéze estradiolu. Nejlepších výsledků separace bylo dosaženo se stacionární fází s kyanovou skupinou.

Další cílovou substancí byl chlorhexidin diglukonát. V práci **5)** byla vyvinuta a validována HPLC metoda pro stanovení jejího obsahu a také pro stanovení obsahu rozkladného produktu p-chloranilinu v masti, určené pro veterinární použití. Pro HPLC analýzu byla použita stacionární fáze s fenylovou skupinou.

V práci **6)** bylo provedeno porovnání použití konvenční oktadecylsilikagelové stacionární fáze s novou fází obsahující silikagel modifikovaný pentafluorofenylovou skupinou, pro analýzu triamcinolon acetonidu, dvou konzervačních přísad a nečistoty (triamcinolon) v krému. Použitím nové stacionární fáze bylo dosaženo lepšího rozdělení látek, rychlejší analýzy a zároveň byl odhalen výskyt nové nedefinované nečistoty triamcinolon acetonidu, která vznikala jeho rozkladem v průběhu dlouhodobé stabilitní studie krému.

Cílem práce **7)** bylo nastavit podmínky HPLC pro současné stanovení obsahu klotrimazolu a jeho dvou rozkladných produktů ((2-chlorfenyl)difenylmethanol a imidazol) ve spreji. V práci byla použita stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého.

Pro stanovení obsahu neionogenního tenzidu nonoxynol-9 a lokálního anestetika trimekainu hydrochloridu v lubrikačním gelu byla vyvinuta HPLC metoda, a pro stanovení obsahu terpinen-4-olu byla použita metoda GC (práce **9)**).

V rámci práce **10)**, byl proveden vývoj, optimalizace a validace HPLC metody pro současné stanovení tří účinných látek pyrantel pamoátu, prazikvantelu a fenbendazolu, antioxidantní přísady butylhydroxyanisolu a rozkladného produktu oxfendazolu v orální pastě a v tabletách (bez antioxidantní přísady) pro veterinární použití. V práci byla použita kolona s fenyl-hexylovou stacionární fází a mobilní fáze o pH 9. Z důvodu velkých koncentračních rozdílů látek obsažených v pastě, bylo nutné analyzovat antioxidantní přísadu pomocí fluorescenčního detektoru. Fluorescenční detektor vykazoval za uvedených podmínek vyšší citlivost a antioxidantní přísada mohla být stanovena s požadovanou přesností a správností.

Stanovení obsahu dimetinden maleinátu v gelu bylo provedeno pomocí HPLC metody s využitím ZIC-HILIC analytické kolony v práci **8**). Na tuto práci navázala práce **11**), ve které byla vyvinuta a validována HPLC stabilitu indikující metoda pro stanovení dimetindenu maleinátu a jeho tří nečistot s využitím stacionární fáze s kyano skupinou. Definovanou nečistotou byl 2-ethylpyridin. Byly provedeny stresové testy s dimetindenem maleinátem a s kyselinou maleinovou. Bylo prokázáno, že kyselina maleinová byla stabilní za testovaných podmínek. Dále bylo zjištěno, že zvýšená teplota, voda, a ani kyselé prostředí nemají vliv na stabilitu dimetindenu. Přítomnost oxidačního činidla vedla k rozkladu dimetindenu za vzniku dvou rozkladných produktů, které byly charakterizovány pomocí techniky UHPLC-ESI-MS/MS. V zásaditém prostředí vznikl jeden rozkladný produkt, tato nečistota nebyla dále hodnocena (příloha 11).

Cílem práce **12**) bylo zjištění stability diazodinitrofenolu (DDNP). DDNP je diazosloučenina, která se používá jako třaskavina. Diazodinitrofenol a kyselina pikramová (výchozí látka pro syntézu DDNP) byly podrobeny stresovým testům. Kyselina pikramová byla za testovaných podmínek stabilní. DDNP byl stabilní v kyselém a zásaditém prostředí, zatímco v průběhu sledování vlivu zvýšené teploty, oxidace a světla vznikly tři rozkladné produkty. Rozkladné produkty byly charakterizovány pomocí techniky UHPLC-ESI-MS/MS. Výsledky práce byly důležitými vstupy pro optimalizaci skladovacích podmínek testované třaskaviny.

Tématem práce **13**) je fotokatalytický rozklad pomocí oxidu titaničitého dvou vybraných anthelmintik, ivermektinu a prazikvantelu. Aby byl pohled na rozkladné mechanismy obou látek kompletní, byly provedeny také stresové testy. Ivermektin se v průběhu fotokatalýzy rozkládal na tři rozkladné produkty, další dva vznikly během kyselého a zásadité hydrolyzy. Prazikvantel se rozložil za vzniku šesti rozkladných produktů, čtyři z nich vznikly během fotokatalytického rozkladu. Výsledek práce ukazuje, že fotokatalýza pomocí TiO_2 (pokročilý oxidační proces) je účinný postup dekontaminace ivermektinu a prazikvantelu ze životního prostředí.

4.2. On-line SPE HPLC, využití nanovláken jako sorbentů pro extrakci na tuhou fázi, moderní metody úpravy vzorku pro analýzu

- 14) ŠATÍNSKÝ Dalibor, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr, HPLC column switching technique for sample preparation and fluorescence determination of propranolol in urine using fused-core columns in both dimensions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, vol. 405(20), p.6583-6587.
- 15) LHOTSKÁ Ivona, ŠATÍNSKÝ Dalibor, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr, A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, vol. 408(12), pp 3319-3329.
- 16) HÁKOVÁ Martina, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, CHVOJKA Jiří, SOLICH Petr, ŠATÍNSKÝ Dalibor, An on-line coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography - a case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples. *Talanta*, 2018, vol. 178, p. 141-146.
- 17) HÁKOVÁ Martina, Raabová Hedvika, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, Chocholouš Petr, CHVOJKA Jiří, ŠATÍNSKÝ Dalibor, Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent. *Talanta*, 2018, vol. 181, p. 326-332.
- 18) HÁKOVÁ Martina, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, CHVOJKA Jiří, ŠVEC František, SOLICH Petr, ŠATÍNSKÝ Dalibor, Nanofiber polymers as novel sorbents for on-line solid phase extraction in chromatographic system: A comparison with monolithic reversed phase C18 sorbent. *Analytica Chimica Acta*, 2018, vol. 1018, p. 26-34.
- 19) HÁKOVÁ Martina, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, CHVOJKA Jiří, ERBEN Jakub, SOLICH Petr, ŠVEC František, ŠATÍNSKÝ Dalibor, A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system. *Analytica Chimica Acta*, 2018 vol. 1023, p. 44-52.
- 20) HUERTAS-PÉREZ José Fernando, ARROYO-MANZANARES Natalia, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, GÁMIZ-GRACIA Laura, SOLICH Petr, GARCÍA-CAMPAÑA Ana M. Method Optimization And Validation For The Determination Of Eight Sulfonamides In Chicken Muscle And Eggs By Modified QuEChERS And Liquid Chromatography With Fluorescence Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, vol.124, p. 261-266.
- 21) **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, URBANOVÁ Martina, CHOCHOLOUŠ Petr, SOLICH Petr. Novel Dispersed Sorbent Sorptive Extraction Method for the Chromatography Profiling of Active Substances in Ginger. *Food Analytical Methods*, 2017, vol. 10, p. 1016-1023.

Příprava vzorku před vlastní analýzou je nedílnou součástí celého analytického postupu a bývá často jeho kritickým místem. Vlastní příprava vzorku (extrakce) musí být dostatečně selektivní a nedestruktivní pro cílové analyty, měla by zahrnovat co nejméně kroků (možné vnesení chyby) a výsledkem by měl být také dostatečně zakoncentrovaný

vzorek, aby následná separace a zejména detekce byly nenáročné. V této kategorii jsou prezentované práce, které jsou zaměřeny na metody úpravu vzorku.

Metody úpravu vzorků a izolace látek u experimentálních prací z kategorií 1,2 a 4 jsou detailněji popsány v jednotlivých pracích (odkazy jsou uvedeny v kapitole 9).

Jednou z nejvíce používaných metod úpravu vzorku je extrakce na tuhou fázi (SPE). Nové trendy v oblasti vývoje metod pro úpravu vzorku se zaměřují především směrem k nalezení nových sorbentů, zvýšení rychlosti extrakce, snížení spotřeby vzorků a rozpouštědel, a zvýšení selektivity postupu úpravu vzorku. Dalším směrem je možnost on-line spojení přípravy vzorků s vhodnými analytickými technikami. Při on-line zapojení extrakce na pevné fázi do chromatografického systému se extrakční kolonka zapojí pomocí vícecestného ventilu před analytickou kolonu. Po nástřiku neupraveného vzorku tak během jednoho kroku získáme automatizovanou metodu schopnou extrakce i z komplexnější matrice, separace a následného vyhodnocení.

V pracích **14)** a **15)** byly pro on-line SPE použity předkolony s povrchově porézními částicemi. V práci **14)** byla vyvinuta on-line SPE HPLC metoda pro analýzu propranololu z moči s využitím fluorimetrické detekce. Filtrovaná moč (1,5 ml) byla nastříkováána přímo do chromatografického systému. V práci **15)** byl on-line systém použit pro analýzu mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu v pivu, opět s fluorimetrickou detekcí. V rámci práce bylo analyzováno 48 vzorků piva.

Využití nanovláken jako sorbentů pro SPE bylo předmětem prací **16-19)**. Nanovlákná jsou slibným materiálem v problematice úpravu vzorku, který vyniká především velkým aktivním povrchem, což může přinést zkrácení doby extrakce, snížení spotřeby rozpouštědel a zefektivnění extrakčního procesu. Využití nových typů nanovláken může přinést zvýšení selektivity při přípravě vzorků. Použitá nanovlákná byla připravena na Technické univerzitě Liberec pomocí technologie elektrospinningu.

V práci **17)** byla testována polymerní nanovlákná typu polyamid 6 jako sorbent pro SPE. Cílem práce bylo popsat schopnost nanovláken zachytávat různé látky, lišící se molekulovou hmotností a hydrofilně-lipofilními vlastnostmi. Byly testovány látky ze skupiny parabenů, steroidů a flavonoidů, dále pak fenoxycarb, hydroxypyren a permethrin, jako zástupci lipofilních sloučenin. Testovaná nanovlákná se ukázala jako poměrně vhodný sorbent, zejména pro lipofilní sloučeniny a sloučeniny s fenolickou skupinou v molekule (estrogeny a flavonoidy).

V pracích **16), 18)** a **19)** byla předkolonka s vláknými polymery zapojena vícecestným selekčním ventilem přímo do systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie. On-line spojení umožňuje zvýšit reprodukovatelnost, citlivost stanovení, dále minimalizovat vliv vnějších podmínek a snížit nároky na obsluhu. Extrakce v systému přepínání kolon (column switching) v on-line provedení s nanovláknými polymery jsou v odborné literatuře zatím velmi málo popsána. Velkou výhodou využití nanovláken je možnost opakovaného použití připravené kolonky. Nanovlákná/mikrovlákná byla po skončení měření hodnocena pomocí SEM. Nanovlákná nevykazovala po skončení experimentu

žádné výrazné změny uspořádání. V experimentální práci **16)** byla polyamidová nanovláknina použita jako sorbent pro on-line extrakci bisfenolu A z říčních vod. V práci **18)** byla na modelové skupině látek insekticidů provedena srovnávací studie získaných polymerních nanovláknenných materiálů (polyamid 6, polykaprolakton, polystyren) s komerčním sorbentem. V této, v podstatě naší pilotní práci, byly diskutovány úskalí on-line zapojení kolony, včetně optimalizování způsobu upevnění nanovláken do kolony nebo trubičky a také množství použitého nanovláknenného materiálu pro extrakci. Publikace **19)** se týkala využití nových polykompozitních materiálů pro analýzu ochratoxinu A ve vzorcích piva. Jako sorbenty pro on-line SPE byla testována nanovláknina typu polyamid 6 a polyvinylidendifluorid a polyethylenová mikrovlákna. Dále byly zkoušeny zcela nové kompozitní směsi (kombinace dvou polymerů, které jsou zvláknovány ve stejný čas a výsledkem je stabilní kompozitní směs dvou mikro- a nanovláknenných polymerů), s využitím polymerů typů polykaprolakton a polyvinylidendifluorid.

V práci **20)** byla použita metoda úpravy vzorku QuEChERS (akronym ze slov Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe – rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný). QuEChERS je metoda úpravy vzorku, při které je v jednom kroku provedena extrakce vzorku a následně i jeho předčištění pomocí disperzní extrakce na tuhou fázi. Tento výzkum probíhal během zahraniční stáže v laboratoři katedry analytické chemie Univerzity Granada ve Španělsku.

Cílem práce **21)** bylo popsat možnost využití disperzní extrakce na tuhou fázi jako metody pro zakoncentrování a retenci analytů a ne jako metodu pro přečištění vzorků. K výhodám této metody patří jednoduchost, použití menších objemů vzorků a možnost velkého faktoru zakoncentrování. Sorbent je přidán do vzorku, vzorek je protřepán, filtrován a analyty jsou eluovány pomocí organického rozpouštědla. Tato metoda byla v práci použita pro analýzu vybraných obsahových látek zázvorovníku lékařského. Práce byla částečně validována a použita pro analýzu čajů a sirupů s obsahem zázvorovníku lékařského.

4.3. Využití moderních typů stacionárních fází v HPLC v analýze látek přírodního původu a doplňcích stravy

- 22) CITOVÁ Ivana, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, URBÁNEK Lubor, SOLICHOVÁ Dagmar, NOVÁKOVÁ Lucie, SOLICH Petr, Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, vol. 388, no. 3, p. 675-681.
- 23) BRABCOVÁ Ivana, KOVÁŘOVÁ Lenka, ŠATÍNSKÝ Dalibor, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr, A Fast HPLC Method for Determination of Vitamin E Acetate in Dietary Supplements Using Monolithic Column. *Food Analytical Methods*, 2013, vol. 6, p. 380-385.
- 24) ŠATÍNSKÝ Dalibor, JAGEROVÁ Kateřina, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr, A New and Fast HPLC Method for Determination of Rutin, Troxerutin, Diosmin and Hesperidin in Food Supplements Using Fused-Core Column Technology. *Food Analytical Methods*, 2013, vol. 6(5), p. 1353-1360.
- 25) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, OPLETAL Lubomír, ŠATÍNSKÝ Dalibor, SOLICH Petr, A Fast Determination of Chlorophylls in Barley Grass Juice Powder Using HPLC Fused-Core Column Technology and HPTLC. *Food Analytical Methods*, 2014, vol 7 (3), p. 629-635.
- 26) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MACÁKOVÁ Kateřina, OPLETAL Lubomír, SOLICH Petr, Rapid determination of α -Hederin and Hederacoside C in Extracts of Hederia helix Leaves Available in the Czech Republic and Poland. *Natural Product Communications*, 2015, vol 10, p. 1529-1531.
- 27) FIBIGR Jakub, ŠATÍNSKÝ Dalibor, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr, A new method for rapid determination of indole-3-carbinol and its condensation products in nutraceuticals using core-shell column chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, vol 120, p. 383-390.
- 28) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, PARMOVÁ Martina, CHOCHOLOUŠ Petr, SOLICH Petr, Sensitive monitoring of amygdalin and 5-hydroxytryptamine in food supplements using HILIC OH5 chromatography. *Food Analytical Methods*, 2016, vol. 9(6), p. 1849-1856.
- 29) **HAVLÍKOVÁ Lucie**, VLČKOVÁ Hana, SOLICH Petr, NOVÁKOVÁ Lucie, HILIC UHPLC-MS/MS for fast and sensitive bioanalysis: accounting for matrix effects in method development. *Bioanalysis*, 2013, vol. 5(19), p. 2345-2357.
- 30) NOVÁKOVÁ Lucie, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, VLČKOVÁ Hana, Hydrophilic Interaction Chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC. *Trac - Trends in Analytical Chemistry*, 2014, vol 63, p. 55-64.

Cílem první práce této kategorie (22) byla optimalizace a vývoj UPLC metody pro stanovení vitamínů retinolu a alfa-tokoferolu v krevním séru a porovnání výsledků analýzy metodou UPLC s metodou HPLC, využívající k analýze monolitickou kolonu. Celková doba analýzy byla téměř shodná, UPLC přinesla výsledky analýzy s nízkým průtokem mobilní fáze, a tedy nižší spotřebou mobilní fáze což snížilo cenu jedné analýzy. Tato práce byla jednou z prvních na našem pracovišti využívající sub-2 μ m kolony.

Práce **23-28** se zabývají analýzou látek přírodního původu. V práci **23)** byla vyvinuta HPLC metoda pro analýzu tokoferolu acetátu v doplňcích stravy s využitím monolitické kolony. Cílem práce **24)** bylo vyvinout HPLC metodu pro stanovení vybraných flavonoidů (rutin, troxerutin, diosmin and hesperidin) v doplňcích stravy a v jednom registrovaném léčivém přípravku. Separace byla provedena na koloně s povrchově porézními částicemi, tzv. fused-core analytické koloně. Tyto stacionární fáze jsou tvořeny částicemi s pevným jádrem a vrstvou porézního silikagelu. Kolony s povrchově porézními částicemi byly použity i v pracích **25), 27) a 28)**.

Práce **25)** byla zaměřena na HPLC stanovení chlorofylu *a* a chlorofylu *b* v doplňcích stravy. V rámci této práce byla provedena i potvrzovací studie pomocí metody HPTLC.

Práce **27)** se zabývala stanovením indol-3-karbinolu a jeho rozkladných produktů v doplňcích stravy.

Práce **26)** byla zaměřena na HPLC stanovení triterpenických saponinů hederakosidu C a alfa hederinu v sirupech s obsahem extraktu z listů *Hedera helix L.* V této studii byla použita kolona se sorbentem typu X-Terra, umožňující analýzu v širokém rozmezí pH (v práci bylo použito pH 8,5).

V práci **28)** byla vyvinuta a validována metoda pro stanovení obsahu amygdalinu a serotoninu v doplňku stravy za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kolony Ascentis® Express OH5. Stacionární fáze pro HILIC byla použita v této práci zejména pro potlačení nežádoucího chování serotoninu na koloně (chvostování na kolonách typu C18).

Do této kategorie je zařazena i práce **29)** a také přehledový článek **30)**. Studie **29)** se zabývala hodnocením matricových efektů po SPE a proteinové precipitaci na obohacených vzorcích séra a 34 modelových analytech. V rámci studie byly porovnány matricové efekty (metodou postextrakčního přídatku) při UHPLC-ESI-MS/MS analýze v reverzním nebo HILIC uspořádání.

Přehledový článek **30)** shrnoval použití HILIC v UHPLC. Pouze 10% všech prací HILIC bylo použito v technice UHPLC. Práce prezentovala hlavní úskalí HILIC, shrnula stacionární fáze pro HILIC-UHPLC, diskutovala aspekty ovlivňující citlivost, selektivitu, separační účinnost a představila hlavní oblasti aplikace HILIC v UHPLC analýze.

4.4. Analytická chemie jako součást botanické a biochemické studie

- 31) CAHLÍKOVÁ Lucie, ALI Badreldin H., **HAVLÍKOVÁ Lucie**, LOČÁREK Mirek, SIATKA Tomáš, OPLETAL Lubomír, BLUNDEN Gerald, Anthocyanins of Hibiscus sabdiffera Calyces from Sudan. *Natural Product Communications*, 2015, vol 10, p. 77-79.
- 32) CHLEBEK Jakub, DE SIMONE Angela, HOŠTÁLKOVÁ Anna, OPLETAL Lubomír, PERÉZ Concepción, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, CAHLÍKOVÁ Lucie, ANDRISANO Vincenza, Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from Corydalis cava (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets. *Fitoterapia*, 2016, vol. 109, p. 241-247.
- 33) OPLETAL Lubomír, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, SIATKA Tomáš, CAHLÍKOVÁ Lucie, LOČÁREK Miroslav, ALI Badreldin H, MANOJ Priyadarsini, RAMKUMAR A., AL SULEIMANI Yousuf M., AL ZA'ABI Mohammed, KARACA Turan, NEMMAR Abderrahim, Preparation and validated analysis of anthocyanin concentrate from the calyces of Hibiscus sabdariffa. *Natural Product Communications*, 2017, vol. 12, p. 43-45.
- 34) ALI Badreldin H., OPLETAL Lubomír, KARACA Turan, MANOJ Priyadarsini, AL SULEIMANI Yousuf M., AL ZA'ABI Mohammed, NEMMAR Abderrahim, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, LOČÁREK Miroslav, SIATKA Tomáš, BLUNDEN Gerald, Effect of aqueous extract and anthocyanins of calyces of Hibiscus sabdariffa (Malvaceae) in rats with adenine-induced chronic kidney disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2017, vol. 69(9), p.1219-1229.
- 35) ŠKARYDOVÁ Lucie, TOMANOVÁ Radana, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, ŠTAMBERGOVÁ Hana, SOLICH Petr, WSÓL Vladimír, Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2014, vol 29, p. 177-184.
- 36) MALÁTKOVÁ Petra, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, WSÓL Vladimír, The role of carbonyl reducing enzymes in oxcarbazepine in vitro metabolism in man. *Chemico-Biological Interactions*, 2014, vol 220, p. 241-247.
- 37) MALÁTKOVÁ Petra, SOKOLOVÁ Simona, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, WSÓL Vladimír, Carbonyl reduction of warfarin: Identification and characterization of human warfarin reductases. *Biochemical Pharmacology*, 2016, vol 109, p. 83-90.

V pracích, které jsou uvedeny v této kategorii, byla moje úloha a úloha analytické chemie pouze prostředkem k vyhodnocení některé části botanické nebo biochemické studie.

Ve studiích **31)**, **33)** a **34)** byly analyzovány extrakty z ibišku (*Hibiscus sabdariffa*). Mým úkolem v práci **31)** bylo identifikovat majoritně zastoupené antokyany v extraktu. Charakterizace antokyanů byla provedena pomocí metody UHPLC-ESI-MS/MS. Nejvíce zastoupeny byly (podle očekávání) delfinidin-3-sambubiosid a cyanidin-3-sambubiosid. V práci **33)** a **34)** bylo provedeno kvantitativní hodnocení nejvíce zastoupených antokyanů (delfinidin-3-sambubiosid a cyanidin-3-sambubiosid), rutinu a kyseliny chlorogenové validovanou metodou HPLC.

V práci **32)** byla vyvinuta a částečně validována HPLC metoda pro analýzu patnácti alkaloidů dymnivky duté (*Corydalis cava*). HPLC analýza byla provedena s využitím

gradientové eluce. Výsledkem analytické části byla informace o procentuálním zastoupení patnácti alkaloidů v extraktu.

V pracích **35-37** byl studován redukční metabolismus vybraných léčivých látek. Cílem bylo identifikovat enzymy, které by se mohly podílet na redukci studovaných látek. Mým úkolem bylo vyvinout a validovat metody pro stanovení substancí a jejich metabolitů a analyticky zpracovat připravené vzorky. Pomocí výsledků metody HPLC byly stanoveny specifické aktivity jednotlivých testovaných enzymů a frakcí.

Cílem práce **35)** bylo studovat metabolismus bupropionu a sledovat vznik jeho metabolitů (hydroxybupropion, erythrobupropion a threohydrobupropion).

V práci **36)** byl studován redukční metabolismus oxkarbazepinu a vznik jeho 10-monohydroxy metabolitů (izomer (*R*) a (*S*)).

V práci **37)** byl studován redukční metabolismus warfarinu na warfarin-alkohol. Úkolem bylo vyvinout a validovat HPLC metodu pro stanovení obsahu warfarinu (izomer (*R*)-warfarin a (*S*)-warfarin) a alkoholů warfarinu (izomery (*S,R*), (*S,S*), (*R,R*), (*R,S*)-warfarin-alkoholu) a analyticky zpracovat připravené vzorky.

V práci **36)** a **37)** byly pro chromatografickou separaci použity chirální stacionární fáze.

Podrobněji lze výsledky prací všech kategorií najít na odkazech uvedených v kapitole 8.

5. Shrnutí

Předložená habilitační práce přibližuje čtenáři roli analytické chemie v problematice stability léčivých látek od jejich výroby, přes sledování stability v léčivých přípravcích po celou dobu použitelnosti až k jejich vyloučení z organismu a následného záměrného odbourání ze životního prostředí a tím i ukončení jejich „životního cyklu“.

Teoretická část je rozdělena na několik kapitol. První kapitola je věnovaná stabilitě léčivé látky a léčivého přípravku. Jsou zde shrnuty principy a typy stabilitních studií, stručně popsány důležité definice a požadavky autorit. Tato kapitola navazuje na podrobnější rozpracování v Dizertační práci autorky. V druhé kapitole stresové testy jsou charakterizovány jednotlivé zkoušky a podrobněji diskutovány základní otázky a principy provedení stresových testů a uvedeny směrnice autorit zabývajících se danou tematikou. Další kapitola shrnuje kroky vývoje stability indikujících metod se zaměřením na HPLC. Teoretická část se také věnuje problematice hodnocení profilu nečistot, jejich kvalitativnímu a kvantitativnímu hodnocení. Závěrečná kapitola teoretické části přibližuje čtenáři problematiku moderních způsobů odstranění reziduí léčivých látek ze životního prostředí, tato část je zaměřena na heterogenní fotokatalýzu oxidem titaničitým.

V komentářích k jednotlivým odborným pracím jsou tyto rozděleny do čtyř kategorií, přičemž první z nich se věnuje vývoji a validaci HPLC metod pro sledování stability účinných látek, stanovení obsahu vybraných pomocných látek v léčivých přípravcích a sledování výskytu nečistot, včetně provedení stresových testů. Druhou kategorií je příprava vzorků, zaměřená především na moderní trendy v této oblasti (on-line SPE HPLC). Třetí kategorie řeší použití moderních typů stacionárních fází v HPLC analýze. Poslední kategorii tvoří práce, ve kterých byly analytické výsledky použity k řešení botanických a biochemických studií.

6. Závěr

Habilitační práce se věnuje stále aktuální tématice sledování stability látek a léčivých přípravků. Doložení výsledků testování stability látek s důrazem na hodnocení obsahu nečistot, je čím dál více vyžadováno autoritami. Vznikající rozkladné produkty léčivých látek mohou být toxické a mohou tak způsobit nežádoucí účinky léčivých přípravků.

Látky podstupují Stresové testy za extrémních podmínek, jejichž cílem je zároveň odhadnout, jak se bude látka chovat v reálných podmínkách během doby použitelnosti. Součástí testování je vývoj a validace stability indikujících metod pro sledování výskytu nečistot a rozkladných produktů v léčivých přípravcích. Vyvinout stabilitu indikující metodu je na první pohled poměrně jednoduchý úkol. Účinná substance se vyskytuje v léčivých přípravcích na vysoké koncentrační úrovni a detekovat ji většinou není problém, Avšak podstatně náročnější je zahrnutí hodnocení rozkladných produktů do analytické metody. Většinou není předem známo, kolik substancí bude nutné separovat a hodnotit. Mnohdy je vhodné soustředit se na separaci a stanovení významných nečistot než dosáhnout rozdělení všech možných rozkladných produktů a nečistot.

Řada látek je stabilní i po ukončení doby použitelnosti a závisí na manipulaci s nimi, jestli se nestanou kontaminanty životního prostředí. Velice aktuální je snaha najít účinnější a ekonomicky výhodnější procesy odstraňování léčivých látek z odpadních i povrchových vod. Jednou ze zkoumaných metod je fotokatalytická oxidace pomocí UV záření, která patří mezi pokročilé oxidační procesy, často využívající oxid titaničitý jako katalyzátor. Vhodným uspořádáním celého procesu lze dosáhnout úplného rozkladu léčivých látek až na oxid uhličitý, vodu a další jednoduché anorganické látky.

Analýza léčivých přípravků tedy vyžaduje komplexní přístup, který zahrnuje celou řadu dílčích kroků, od získání prvotních informací o sledovaných substancích, přes optimalizaci podmínek zvolené analytické techniky, izolačního postupu substancí ze vzorku až k validaci celé vyvinuté metody. Pro hodnocení rozkladných produktů je stále nejvíce používanou metodou HPLC s UV detekcí. Nicméně současné trendy a nejvyšší požadavky na citlivost a selektivitu často vyžadují kombinaci kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Vývoj a optimalizace analytických metod, které jsou prezentovány v habilitační práci, byly prováděny s cílem sledovat moderní trendy v oblasti HPLC se zaměřením na použité stacionární fáze, úpravu vzorku a možnosti automatizace jednotlivých kroků.

Role analytika je nezbytná ve všech výše uvedených oblastech. Téměř vždy je potřeba najít vhodnou analytickou metodu, která bude schopná selektivně, správně a přesně hodnotit obsah účinné látky vedle jejích rozkladných produktů a dalších nečistot v daném vzorku.

7. Reference

1. **D. Vetchý, K. Frýbortová, M. Rabišková, A. Haring.** Testování stability léčivých přípravků. *Chemické listy*. 100 (2006) 24-29.
2. **M. Chalabala.** *Technologie léků*, Galén, 2001, ISBN 8072621289.
3. **Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv, REG-83.** Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci, 2005. <http://www.sukl.cz/leciva/reg-83> (03/2018).
4. **R.M. Maggio, S.E. Vignaduzzo, T.S. Kaufman.** Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 49 (2013) 57-70.
5. **Vyhláška č. 255/2013 Sb., kterou se mění vyhláška č. 228/2008 Sb., o registraci léčivých přípravků, ve znění pozdějších předpisů.** http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2013-255-novela-228-2008.html (04/2018).
6. **ICHQ1A(R2).** Stability Testing of New Drug Substances and Products. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf (03/2018).
7. **ICHQ1C.** Stability Testing for New Dosage Forms. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1C/Step4/Q1C_Guideline.pdf (03/2018).
8. **Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2.** http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (03/2018).
9. **L. Havlíková.** Studium problematiky stability léčivých přípravků metodou HPLC, Dizertační práce, Univerzita Karlova, 2006.
10. **ICHQ5C.** Stability Testing of Biotechnological/Biological Products. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf (03/2018).
11. **Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv, Validace Analytických Metod.** *Věstník SÚKL*, 1/1994.
12. **ICHQ3A(R2).** Impurities in New Drug Substances. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf (03/2018).
13. **Český lékopis 2017.** Grada Publishing a.s., 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
14. **ICHQ3B(R2).** Impurities in New Drug Products. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf (03/2018).
15. **ICHQ6A.** Specification : Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances.

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf. (03/2018).

16. **Zákon č. 378/2007 Sb. o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), v platném znění.** Sbírka zákonů 2007. [https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378\(05/18\)](https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378(05/18)).

17. **D.W. Reynolds, K.L. Facchine, J.F. Mullaney, K.M. Alsante, T.D. Hatajik, M.G. Motto.** Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. *Pharmaceutical Technology*. (2002) 48-56.

18. **M. Blessy, R.D. Patel, P.N. Prajapati, Y.K. Agrawal.** Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 4 (2014) 159-165.

19. **ICHQ1B.** Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf (03/2018).

20. **ICHM4Q(R1).** The Common Technical Document: Quality. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/CTD/M4_R1_Quality/M4Q_R1_.pdf (03/2018).

21. **S. Singh, M. Junwal, G. Modhe, H. Tiwari, M. Kurmi, N. Parashar, P. Sidduri.** Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 49 (2013) 71-88.

22. **Guideline on the chemistry of active substances, EMA/454576/2016.** http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/11/WC500216712.pdf (03/2018).

23. **Guideline on stability testing: Stability testing of existing active substances and related finished products, CPMP/QWP/122/02, rev 1 corr.** http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003466.pdf (03/2018).

24. **Guidance for Industry ANDAs: Stability Testing of Drug Substances and Products, FDA, 2013.** <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm320590.pdf> (03/2018).

25. **ICHQ2(R1).** Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2A, Q2B. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (03/2018).

26. **Guideline on the requirements for quality documentation concerning biological investigational medicinal products in clinical trials, EMA/CHMP/BWP/534898/2008 rev.1.** http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2017/10/WC500237742.pdf (03/2018).

27. **Guideline on the requirements for the chemical and pharmaceutical quality documentation concerning investigational medicinal products in clinical trials, EMA/CHMP/QWP/545525/2017.** http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2017/11/WC500239381.pdf (03/2018).

28. **Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation, FDA, 2000.**
<https://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/001424gl.pdf> (03/2018).
29. **Guidance for Industry INDs for Phase 2 and Phase 3 Studies Chemistry, Manufacturing, and Controls Information, FDA, 2003.**
<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070567.pdf> (03/2018).
30. **WHO.** WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series 970, Forty-sixth report.
http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/expert_committee/TRS-970-pdf1.pdf (03/2018).
31. **WHO.** WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series 953, Forty-third report.
http://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/pdf_trs953.pdf (03/2018).
32. **WHO.** WHO Technical Report Series 929, Thirty- ninth report,WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43157/1/WHO_TRS_929_eng.pdf (03/2018).
33. **S. Singh, M. Bakshi.** Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical Technology.* 24 (2000), 1-14.
34. **S. Klick, P.G. Muijselaar, J. Waterval, T. Eichinger, C. Korn, T.K. Gerding, A.J. Debets, C. Sänger-Van De Griend, C. Van Den Beld, G.W. Somsen, G.J. De Jong.** Toward a generic approach for: Stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology.* 29 (2005) 48-66.
35. **M. Bakshi, S. Singh.** Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 28 (2002) 1011-1040.
36. **S.P. Biradar, T.M. Kalyankar, S.J. Wadher, R.S. Moon, S.S. Dange.** Stability indicating HPLC method development: Review. *Asian journal of medicinal and analytical chemistry.* 1 (2014) 21-26.
37. **M.P. Riddhiben, M.P. Piyushbhai, M.P. Natubhai.** Stability indicating HPLC method development – a review. *International Research Journal of Pharmacy.* 2 (2011) 79-87.
38. **J.W. Dolan.** Stability-indicating assays. *LC-GC North America.* 20 (2002) 346-349.
39. **B.A. Olsen, A. Sreedhara, S.W. Baertschi.** Impurity investigations by phases of drug and product development, *Trac-Trends in Analytical Chemistry.* 101 (2018) 17-23.
40. **M. Kuchař.** Výzkum a vývoj léčiv. VŠCHT Praha 2008. ISBN 978-80-7080-677-7.
41. **E. Tamizi, A. Jouyban.** Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 98 (2016) 26-46.
42. **S.W. Baertschi.** Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities, *Trac-Trends in Analytical Chemistry.* 25 (2006) 758-767.
43. **ICHQ7A.** Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients.
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7_Guideline.pdf (03/2018).
44. **S. Görög.** Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade. *Trac-Trends in Analytical Chemistry.* 101 (2018) 2-16.

45. **J. Čáslavský.** Pokroky v chromatografii a jejich využití při analýze vod, Sborník konference Pitná voda 2010, W&ET Team, Č. Budějovice 2010. ISBN 978-80-254-6854-8, 205-210.
46. **L. Nováková, M. Douša.** Moderní HPLC separace v teorii a praxi II., Praha 2013, ISBN 978-80-260-4244-0.
47. **A-F. Aubry, P. Tattersall, J. Ruan.** Development of Stability Indicating Methods, in: K. Huynh-Ba, Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies and Best Practises, Springer, 2009, 139-162.
48. **Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, FDA, 2015.** <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf> (03/2018).
49. **European Pharmacopoeia 9th edition (Ph. Eur. 9).** Council of Europe, Strasbourg, 2017.
50. **K. Erdeová.** Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Vývoj HPLC metody pro hodnocení čistoty a stability fesoterodinu za použití přístupu plánování experimentu, Praha 2017.
51. **S. Ahuja, K. Alsante.** Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, Volume 5, 1st Edition, Academic Press , 2003, ISBN: 9780120449828.
52. **P. Matějka a kol.** Charakterizace farmaceutických látek a jejich systémů se zaměřením na spektrální metody. http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Charakterizace%20farmaceutickych%20latek%20a%20jejich%20systemu-upr_B.pdf.
53. **M. Doležalová, M. Tkaczyková.** Kontrola enantiomerní čistoty léčiv. Chemické Listy. 94 (2000) 994-1002.
54. **ICHQ3C(R6).** Impurities: Guideline for Residual Solvents. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C__R6__Step_4.pdf (04/2018).
55. **ICHQ3D.** Guideline for Elemental Impurities. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D__Step_4.pdf (04/2018).
56. **USP41-NF36, United States Pharmacopoeia 41.** United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852, 2017.
57. **L. Nováková, K. Plachká.** Pharmaceutical Applications, in: C.Poole, Supercritical Fluid Chromatography, 1st Edition, Elsevier, 2017, 461-494.
58. **M. Narayanam, T. Handa, P. Sharma, S. Jhajra, P.K. Muthe, P.K. Dappili, R.P. Shah, S. Singh.** Critical practical aspects in the application of liquid chromatography–mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 87 (2014) 191-217.
59. **R. Holm, D.P. Elder.** Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 87 (2016) 118-135.
60. **S.W. Baertschi, B.W. Pack, C.S. Hoaglund Hyzer, M.A. Nussbaum.** Assessing mass balance in pharmaceutical drug products: New insights into an old topic. Trac-Trends in Analytical Chemistry. 49 (2013) 126-136.

61. **T. Svoboda.** Problematika originálních léčiv, generických přípravků a biosimilars – záměny léků dnes a zítra s hlavním zacílením na rizika spojená s bio technologiemi. *Klinická Onkologie*. 23 (2010) 416–420.
62. **J. Boroň, P. Kačer.** Určení genotoxicity extraktů oxidované celulosy metodikou pro vysokokapacitní screening. *Chemické Listy*. 110 (2016) 828-831.
63. **ICHM7(R1).** Assessment and Control of DNA Reactive (mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk.
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_R1_Addendum_Step_4_2017_0331.pdf.
64. **ICH S2(R1).** Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use.
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf (04/2018).
65. **D.Q. Liu, A.S. Kord.** Analytical challenges in stability testing for genotoxic impurities, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 49 (2013) 108-117.
66. **J. Beneš.** Pokročilé oxidační procesy –AOP. Sborník konference Pitná voda 2008, 2008 W&ET Team, ISBN 978-80-254-2034-8, 135-140. <http://www.wet-team.cz/files/konference/2008/PV%20Tabor/20-Benes.pdf> (06/2018).
67. **B. Petrie, E.J. McAdam, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, E. Cartmell.** Fate of drugs during wastewater treatment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 49 (2013) 145-159.
68. **L. Dušek.** Čištění odpadních vod chemickou oxidací hydroxylovými radikály. *Chemické listy*. 104 (2010) 846-854.
69. **U.I. Gaya, A.H. Abdullah.** Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide: A review of fundamentals, progress and problems. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 9 (2008) 1-12.
70. **A. Fujishima, T.N. Rao, D.A. Tryk.** Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 1 (2000) 1-21.
71. **V. Pišťková.** Studium průběhu degradace xenobiotik a biologicky aktivních látek s využitím oxidu titaničitého, Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, 2012 .
https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=50581 (06/2018).
72. **A.L. Linsebigler, G. Lu, J.T. Yates.** Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. *Chemical Reviews*. 95 (1995) 735-758.
73. **P. Rypák.** Oxid titaničitý a jeho vlastnosti v prostředí stavebních poživ, Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, 2013.
<https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/28573/14125.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (06/2018).
74. **M. Răileanu, M. Crișan, I. Nitoi, A. Ianculescu, P. Oancea, D. Crișan, L. Todan.** TiO₂ - based Nanomaterials with Photocatalytic Properties for the Advanced Degradation of Xenobiotic Compounds from Water. A Literature Survey. *Water, Air & Soil Pollution*, 22.
75. **K. Nakata, A. Fujishima.** TiO₂ photocatalysis: Design and Applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 13 (2012) 169-189.

76. **J. Češková.** Studium fotokatalytické degradace organického znečištění UV zářením, Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2017.
https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/68154/CeskovaJ_Studium_fotokatalyticke_PD_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y (06/2018).
77. **K. Mehrotra, G.S. Yablonsky, A.K. Ray.** Kinetic Studies of Photocatalytic Degradation in a TiO₂ Slurry System : Distinguishing Working Regimes and Determining Rate Dependences. *Industrial & Engineering Chemistry Research.* 42 (2003) 2273– 2281.

8. Podíl autorky habilitační práce na předložených publikačních výstupech

Práce jsou uvedeny chronologicky a podíl autorky je stručně komentován.

U každé práce je uvedený odkaz na elektronické informační zdroje. Elektronické informační zdroje byly aktualizovány v červnu 2018 (21/6/2018).

Autorka habilitační práce je podtržena u prací, na kterých je první autor nebo korespondující autor.

^{*}IF 2017, Q1-Q4 = JIF Quartile

1. NOVÁKOVÁ Lucie, MATYSOVÁ Ludmila, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr
Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, vol. 37, no. 5, p. 899-905. (IF: 2.831 – Q2/Q2)
Podíl autorky práce: účast na experimentální práci – validace, účast na přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.09.012>
2. MATYSOVÁ Ludmila, SOLICH Petr, MAREK Petr, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, NOVÁKOVÁ Lucie, ŠÍCHA Jan
Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method.
Talanta, 2006, vol. 68, no. 3, p. 713-720. (IF: 4.244 – Q1)
Podíl autorky práce: účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.05.013>
3. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYSOVÁ Ludmila, NOVÁKOVÁ Lucie, SOLICH Petr
HPLC determination of calcium pantothenate and two preservatives in topical cream.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, vol. 41, no. 2, p. 671-675. (IF: 2.831 – Q2/Q2)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.012>
4. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, NOVÁKOVÁ Lucie, MATYSOVÁ Ludmila, ŠÍCHA Jan, SOLICH Petr
Determination of estradiol and its degradation products by liquid chromatography.
Journal of Chromatography A, 2006, vol. 1119, no. 1-2, p. 216-223. (IF: 3.716 – Q1/Q1)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.085>

5. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYSOVÁ Ludmila, NOVÁKOVÁ Lucie, HÁJKOVÁ Renata, SOLICH Petr
HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, vol. 43, no. 3, p. 1169-1173. (IF: 2.831 – Q2/Q2)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.09.037>
6. CITOVÁ Ivana, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, URBÁNEK Lubor, SOLICHOVÁ Dagmar, NOVÁKOVÁ Lucie, SOLICH Petr
Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, vol. 388, no. 3, p. 675-681. (IF: 3.307 – Q2/Q1)
Podíl autorky práce: provedení části experimentální práce (HPLC), účast na přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1237-8>
7. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYSOVÁ Ludmila, HÁJKOVÁ Renata, ŠATÍNSKÝ Dalibor, SOLICH Petr
Advantages of pentafluorophenylpropyl stationary phase over conventional C18 stationary phase—Application to analysis of triamcinolone acetonide.
Talanta, 2008, vol.76, p. 597–601. (IF: 4.244 – Q1)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.048>
8. Žáková Petra, Sklenářová Hana, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYSOVÁ Ludmila, ŠATÍNSKÝ Dalibor
Optimalizace HPLC stanovení klotrimazolu.
Chemické Listy, 2009, vol. 103, p. 251–255. (IF: 0.260 – Q4)
Podíl autorky práce: účast na přípravě článku
Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1567/1567>
9. MATYSOVÁ Ludmila, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, HÁJKOVÁ Renata, KRIVDA Anton, SOLICH Petr
Application of HILIC stationary phase to determination of dimethindene maleate in topical gel.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, vol.50, no. 1, p. 23-26. (IF: 2.831 – Q2/Q2)
Podíl autorky práce: účast na experimentální práci a přípravě článku, korespondující autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.032>

10. MATYSOVA Ludmila, KOBLOVÁ Petra, GALLA Lubomír, SKLENÁŘOVÁ Hana, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr
Chromatographic determination of active compounds in topical formulations.
Analytical Methods, 2012, vol. 4(6), p. 1525-1529. (IF: 2.073 – Q3/Q2/Q2)
Podíl autorky práce: účast na experimentální práci (GC) a přípravě článku
Dostupné z: <http://doi.org/10.1039/C1AY05336A>
11. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, BRABCOVÁ Ivana, ŠATÍNSKÝ Dalibor, MATYSOVÁ Ludmila, LUSKAČOVÁ Alena, OSIČKA Zdeněk, SOLICH Petr
Optimisation of an HPLC method for the simultaneous determination of pyrantel pamoate, praziquantel, fenbendazole, oxfendazole and butylhydroxyanisole using a phenyl stationary phase.
Analytical Methods, 2012, vol. 4(6), p.1592–1597. (IF: 2.073 – Q3/Q2/Q2)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <http://doi.org/10.1039/C2AY05847B>
12. BRABCOVÁ Ivana, KOVÁŘOVÁ Lenka, ŠATÍNSKÝ Dalibor, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr
A Fast HPLC Method for Determination of Vitamin E Acetate in Dietary Supplements Using Monolithic Column.
Food Analytical Methods, 2013, vol. 6, p. 380-385. (IF: 2.245 – Q2)
Podíl autorky práce: účast na přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9452-0>
13. ŠATÍNSKÝ Dalibor, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr
HPLC column switching technique for sample preparation and fluorescence determination of propranolol in urine using fused-core columns in both dimensions.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, vol. 405(20), p.6583-6587. (IF: 3.307 – Q2/Q1)
Podíl autorky práce: účast na experimentální práci a přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7098-4>
14. ŠATÍNSKÝ Dalibor, JAGEROVÁ Kateřina, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr
A New and Fast HPLC Method for Determination of Rutin, Troxerutin, Diosmin and Hesperidin in Food Supplements Using Fused-Core Column Technology.
Food Analytical Methods, 2013, vol. 6(5), p. 1353-1360. (IF: 2.245 – Q2)
Podíl autorky práce: účast na přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9551-y>
15. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, VLČKOVÁ Hana, SOLICH Petr, NOVÁKOVÁ Lucie
HILIC UHPLC-MS/MS for fast and sensitive bioanalysis: accounting for matrix effects in method development.
Bioanalysis, 2013, vol. 5(19), p. 2345–2357. (IF: 2.478 – Q2/Q2)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/bio.13.217>

16. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, PANNYOVÁ Anna, MATYSOVÁ Ludmila, SOLICH Petr
Development of novel stability-indicating method for the determination of dimethindene maleate and its impurities.
Chromatographia, 2013, vol. 76(21), p. 1545-1551. (IF: 1.401 – Q4/Q3)
Podíl autorky práce: vedení studenta při experimentální práci, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2449-z>
17. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MATYÁŠ Robert, IHNÁT Lukáš, NOVÁKOVÁ Lucie, ŠATÍNSKÝ Dalibor
Degradation study of nitroaromatic explosives 2-diazo-4,6-dinitrophenol and picramic acid using HPLC and UHPLC-ESI-MS/MS.
Analytical Methods, 2014, vol 6, p. 4761-4768. (IF: 2.073 – Q3/Q2/Q2)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C4AY00401A>
18. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, OPLETAL Lubomír, ŠATÍNSKÝ Dalibor, SOLICH Petr
A Fast Determination of Chlorophylls in Barley Grass Juice Powder Using HPLC Fused-Core Column Technology and HPTLC.
Food Analytical Methods, 2014, vol 7 (3), p. 629-635. (IF: 2.245 – Q2)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9665-x>
19. ŠKARYDOVÁ Lucie, TOMANOVÁ Radana, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, ŠTAMBERGOVÁ Hana, SOLICH Petr, WSÓL Vladimír
Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver.
Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2014, vol 29, p. 177-184. (IF: 2.087 – Q3)
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (HPLC) a přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-051>
20. MALÁTKOVÁ Petra, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, WSÓL Vladimír
The role of carbonyl reducing enzymes in oxcarbazepine in vitro metabolism in man.
Chemico-Biological Interactions, 2014, vol 220, p. 241-247. (IF: 3.296 – Q2/Q2/Q2)
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (HPLC) a přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.07.005>
21. NOVÁKOVÁ Lucie, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, VLČKOVÁ Hana
Hydrophilic Interaction Chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC.
Trac - Trends in Analytical Chemistry, 2014, vol 63, p. 55-64. (IF: 7.034 – Q1)
Podíl autorky práce: účast na přípravě přehledového článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.004>

22. CAHLÍKOVÁ Lucie, ALI Badreldin H., **HAVLÍKOVÁ Lucie**, LOČÁREK Mirek, SIATKA Tomáš, OPLETAL Lubomír, BLUNDEN Gerald
Anthocyanins of Hibiscus sabdiffera Calyces from Sudan.
Natural Product Communications, 2015, vol 10, p. 77-79. **(IF: 0.809 – Q4/Q4)**
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (HPLC) a přípravě článku
23. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, MACÁKOVÁ Kateřina, OPLETAL Lubomír, SOLICH Petr
Rapid determination of α -Hederin and Hederacoside C in Extracts of Hedera helix Leaves Available in the Czech Republic and Poland.
Natural Product Communications, 2015, vol 10, p. 1529-1531. **(IF: 0.809 – Q4/Q4)**
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
24. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, ŠATÍNSKÝ Dalibor, SOLICH Petr
Aspects of Decontamination of Ivermectin and Praziquantel from Environmental Waters using Advanced Oxidation Technology.
Chemosphere, 2016, vol 144, p. 21-28. **(IF: 4.427 – Q1)**
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.039>
25. FIBIGR Jakub, ŠATÍNSKÝ Dalibor, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr
A new method for rapid determination of indole-3-carbinol and its condensation products in nutraceuticals using core-shell column chromatography method.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, vol 120, p. 383-390. **(IF: 2.831 – Q2/Q2)**
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (nečistoty)
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.12.039>
26. CHLEBEK Jakub, DE SIMONE Angela, HOŠTÁLKOVÁ Anna, OPLETAL Lubomír, PERÉZ Concepción, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, CAHLÍKOVÁ Lucie, ANDRISANO Vincenza
Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from Corydalis cava (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets.
Fitoterapia, 2016, vol. 109, p. 241-247. **(IF: 2.642 – Q2/Q2)**
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (HPLC)
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.008>
27. LHOTSKÁ Ivona, ŠATÍNSKÝ Dalibor, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, SOLICH Petr
A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, vol. 408(12), pp 3319-3329. **(IF: 3.307 – Q2/Q1)**
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (hodnocení matrice)
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9402-6>

28. HUERTAS-PÉREZ José Fernando, ARROYO-MANZANARES Natalia, **HAVLÍKOVÁ Lucie**, GÁMIZ-GRACIA Laura, SOLICH Petr, GARCÍA-CAMPAÑA Ana M. Method Optimization And Validation For The Determination Of Eight Sulfonamides In Chicken Muscle And Eggs By Modified QuEChERS And Liquid Chromatography With Fluorescence Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, vol.124, p. 261-266. (IF: 2.831 – Q2/Q2)
Podíl autorky práce: provedení experimentální práce (kromě validace metody) a účast na přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.040>
29. **HAVLÍKOVÁ Lucie**, PARMOVÁ Martina, CHOCHOLOUŠ Petr, SOLICH Petr Sensitive monitoring of amygdalin and 5-hydroxytryptamine in food supplements using HILIC OH5 chromatography. *Food Analytical Methods*, 2016, vol. 9(6), p. 1849-1856. (IF: 2.245 – Q2)
Podíl autorky práce: vedení studenta při experimentální práci, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0362-9>
30. MALÁTKOVÁ Petra, SOKOLOVÁ Simona, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, WSÓL Vladimír Carbonyl reduction of warfarin: Identification and characterization of human warfarin reductases. *Biochemical Pharmacology*, 2016, vol 109, p. 83–90. (IF: 4.235 – Q1)
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (HPLC) a přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.03.025>
31. OPLETAL Lubomír, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, SIATKA Tomáš, CAHLÍKOVÁ Lucie, LOČÁREK Miroslav, ALI Badreldin H, MANOJ Priyadarsini, RAMKUMAR A., AL SULEIMANI Yousuf M., AL ZA'ABI Mohammed, KARACA Turan, NEMMAR Abderrahim Preparation and validated analysis of anthocyanin concentrate from the calyces of Hibiscus sabdariffa. *Natural Product Communications*, 2017, vol. 12, p. 43-45. (IF: 0.809 – Q4/Q4)
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (HPLC)
32. **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, URBANOVÁ Martina, CHOCHOLOUŠ Petr, SOLICH Petr Novel Dispersed Sorbent Sorptive Extraction Method for the Chromatography Profiling of Active Substances in Ginger. *Food Analytical Methods*, 2017, vol. 10, p. 1016-1023. (IF: 2.245 - Q2)
Podíl autorky práce: vedení studenta při experimentální práci, příprava článku, první autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0662-8>

33. ALI Badreldin H., OPLETAL Lubomír, KARACA Turan, MANOJ Priyadarsini, AL SULEIMANI Yousuf M., AL ZA'ABI Mohammed, NEMMAR Abderrahim, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, LOČÁREK Miroslav, SIATKA Tomáš, BLUNDEN Gerald
Effect of aqueous extract and anthocyanins of calyces of *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) in rats with adenine-induced chronic kidney disease.
Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2017, vol. 69(9), p.1219-1229. (IF: 2.309 – Q3)
Podíl autorky práce: účast na provedení experimentální práce (HPLC)
Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jphp.12748>
34. HÁKOVÁ Martina, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, CHVOJKA Jiří, SOLICH Petr, ŠATÍNSKÝ Dalibor
An on-line coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography - a case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples.
Talanta, 2018, vol. 178, p. 141-146. (IF: 4.244 -Q1)
Podíl autorky práce: vedení studenta experimentální práci, účast na přípravě článku, korespondující autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.098>
35. HÁKOVÁ Martina, Raabová Hedvika, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, Chocholouš Petr, CHVOJKA Jiří, ŠATÍNSKÝ Dalibor
Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent.
Talanta, 2018, vol. 181, p. 326-332. (IF: 4.244 -Q1)
Podíl autorky práce: vedení studenta experimentální práci, účast na přípravě článku, korespondující autorka
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.043>
36. HÁKOVÁ Martina, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, CHVOJKA Jiří, ŠVEC František, SOLICH Petr, ŠATÍNSKÝ Dalibor
Nanofiber polymers as novel sorbents for on-line solid phase extraction in chromatographic system: A comparison with monolithic reversed phase C18 sorbent.
Analytica Chimica Acta, 2018, vol. 1018, p. 26-34. (IF: 5.123 - Q1)
Podíl autorky práce: vedení studenta experimentální práci, účast na přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.065>
37. HÁKOVÁ Martina, **CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ Lucie**, CHVOJKA Jiří, ERBEN Jakub, SOLICH Petr, ŠVEC František, ŠATÍNSKÝ Dalibor
A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system.
Analytica Chimica Acta, 2018 vol. 1023, p. 44-52. (IF: 5.123 – Q1)
Podíl autorky práce: účast na přípravě článku
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.023>