

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Markéta Bolíková

DEGRADACE AKTIVNÍ FARMACEUTICKÉ LÁTKY  
CANAGLIFLOZINU POMOCÍ ELEKTROCHEMICKÉ  
OXIDACE

Degradation of the active pharmaceutical ingredient  
canagliflozin using electrochemical oxidation

Bakalářská práce

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

Praha 2020

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 12. 8. 2020

.....

podpis

## Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na degradaci aktivní farmaceutické látky canagliflozinu prostřednictvím elektrochemické oxidace. Cílem je prozkoumat vliv daných podmínek měření na samotný průběh a výsledek elektrochemické oxidace a zjistit, za jakých podmínek vzniká největší procento degradačních produktů. Zmiňovanými podmínkami jsou například koncentrace a hodnoty pH pufrů použitých pro rozpuštění vzorků canagliflozinu, rychlost průtoku roztoku elektrochemicky stresované látky průtokovou celou nebo tloušťka těsnění vkládaného před pracovní elektrodu.

Canagliflozin je orálně podávané antidiabetikum snižující hladinu glukosy v krvi a využívá se k léčbě onemocnění diabetes mellitus 2. typu. Řadí se mezi inhibitory sodíko – glukosového transportéru typu 2. Pro separaci degradačních produktů této farmaceuticky aktivní látky byla zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV/VIS detektorem s diodovým polem za použití chromatografické kolony Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2,1 × 100 mm; 2,7 μm). Mobilní fáze byla tvořena vodnou složkou, kterou představoval 10 mM mravenčanový pufr o pH 3,5 a organickou složkou, kterou tvořil acetonitril.

Elektrochemická oxidace canagliflozinu probíhala v radiální průtokové cele a podmínky, za kterých vzniká největší procento degradačních produktů, byly navrženy pomocí statistického softwaru Modde 12. Jednalo se o tyto podmínky: 100 mM fosfátový pufr o pH 4,0 sloužící k rozpuštění canagliflozinu, těsnění o tloušťce 50 μm vkládané před pracovní elektrodu a průtoková rychlost 0,05 ml/h.

Ukázalo se, že canagliflozin elektrochemickou oxidací degraduje a vytváří množství degradačních produktů. Vzniklo celkem 8 degradačních produktů s relativními retenčními časy 0,48, 0,50, 0,63, 0,67, 0,89, 0,90, 1,57 a 1,58.

**Klíčová slova:** API, canagliflozin, elektrochemická oxidace, HPLC, degradační produkty, degradace, stresové podmínky

## Abstract

This bachelor thesis is aimed at degradation of the active pharmaceutical ingredient canagliflozin by the electrochemical oxidation. The aim is to explore the influence of given measurement conditions on the course and the results of the electrochemical oxidation and to find out, under which conditions the largest percentage of the degradation products is formed. These conditions are, for example, the concentrations and pH values of the buffers which are used to dissolve the samples of canagliflozin, the flow rate of the electrochemically stressed substance solution through the flow cell or the thickness of the gasket inserted in front of the working electrode.

Canagliflozin is an orally administered blood glucose lowering antidiabetic and is used to treat diabetes mellitus 2. type. It is one of the inhibitors of the sodium-glucose transporter type 2. For the separation of the degradation products of this pharmaceutically active substance, a high performance liquid chromatography (HPLC) method with a UV/VIS diode array detector using an Agilent Poroshell 120 SB-Aq chromatographic column ( $2.1 \times 100$  mm;  $2.7 \mu\text{m}$ ) was chosen. The mobile phase contained an aqueous component, which was 10 mM formate buffer with pH 3.5 and the organic component, which was acetonitrile.

The electrochemical oxidation of canagliflozin took place in a radial flow cell and the conditions under which the largest percentage of degradation products were formed were designed using Modde 12 statistical software. These conditions were: 100 mM phosphate buffer with pH 4.0 used to dissolve canagliflozin,  $50 \mu\text{m}$  thick gasket inserted in front of the working electrode and the flow rate was 0.05 ml/h.

It has been found that canagliflozin degrades by electrochemical oxidation and form a number of degradation products. A total of 8 degradation products were formed with relative retention times of 0.48, 0.50, 0.63, 0.67, 0.89, 0.90, 1.57 and 1.58.

**Key words:** API, canagliflozin, electrochemical oxidation, HPLC, degradation products, degradation, stress conditions

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Tomáši Křížkovi, PhD. za vstřícnost, trpělivost, a především velmi cenné rady v celém průběhu sepisování této práce, za poskytnutí konzultace kdykoliv to bylo zapotřebí a za rychlé reakce na případné potíže při laboratorním měření. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Filipu Vymyslickému za užitečné rady a pomoc při měření v laboratoři. Velké díky patří mé rodině za podporu a trpělivost po celou dobu studia.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Teoretický úvod .....</b>	<b>11</b>
1.1 Cíl práce .....	11
1.2 Canagliflozin .....	11
1.2.1 Stanovení canagliflozinu .....	12
1.3 Spojení elektrochemické oxidace s hmotnostní spektrometrií .....	13
1.3.1 Použití EC/LC/MS ve farmaceutickém průmyslu .....	17
1.4 Stresové testování stability léčiv .....	18
1.4.1 Oxidativní degradace canagliflozinu .....	19
1.5 Plánování experimentů.....	21
<b>2 Experimentální část .....</b>	<b>22</b>
2.1 Použité chemikálie a instrumentace.....	22
2.1.1 Chemikálie .....	22
2.1.2 Instrumentace .....	23
2.2 Pracovní postupy .....	23
2.2.1 Příprava mobilní fáze.....	23
2.2.2 Příprava kalibrační řady .....	24
2.3 Elektrochemická oxidace .....	25
2.3.1 Příprava acetátového pufru.....	25
2.3.2 Příprava fosfátového pufru.....	25
2.3.3 Příprava vzorků pro elektrochemickou oxidaci.....	25
2.3.4 Průběh elektrochemické oxidace .....	26
2.4 Chromatografické podmínky.....	27
2.5 Analytické zpracování dat.....	28
2.5.1 Mez detekce a mez kvantifikace.....	28
2.5.2 Lineární dynamický rozsah .....	29
2.6 Podmínky elektrochemické oxidace z DoE .....	29

<b>3</b>	<b>Výsledky a diskuze.....</b>	<b>30</b>
3.1	Analýza pomocí HPLC s DAD detektorem .....	30
3.1.1	Kalibrační závislost.....	30
3.1.2	Nestresovaný vzorek canagliflozinu .....	31
3.2	Elektrochemická oxidace canagliflozinu .....	31
3.2.1	Analýza produktů elektrochemické oxidace .....	32
3.2.2	Nalezení optimálních podmínek pro degradaci.....	34
3.3	Vyhodnocení dat pomocí softwaru Modde 12 .....	37
3.4	Porovnání této práce s jinými studii.....	41
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>44</b>

## Seznam použitých zkratk a symbolů

### Použité zkratky

<b>API</b>	léčivá látka přípravku (z anglického <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> )
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>DAD</b>	detektor s diodovým polem (z anglického <i>Diode Array Detector</i> )
<b>DMPO</b>	5,5-dimethyl-1-pyrrolin <i>N</i> -oxid
<b>DoE</b>	Plánování experimentů (z anglického <i>Design of Experiments</i> )
<b>EC/LC/ESI-MS</b>	spojení elektrochemické oxidace v kombinaci s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová (z anglického <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ESI-MS</b>	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (z anglického <i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i> )
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HPTLC</b>	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (z anglického <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> )
<b>ICH</b>	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (z anglického <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> )
<b>LC-MS/MS</b>	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z anglického <i>Liquid Chromatography with tandem</i> )



*Mass Spectrometry)*

<b>LOD</b>	mez detekce (z anglického <i>Limit Of Detection</i> )
<b>LOQ</b>	mez kvantifikace (z anglického <i>Limit Of Quantification</i> )
<b>m/z</b>	poměr hmotnosti ku náboji
<b>OFAT</b>	jeden faktor v čase (z anglického <i>One Factor At a Time</i> )
<b>RP-HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (z anglického <i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>SGLT2</b>	sodíko – glukosový transportér typu 2 (z anglického <i>Sodium – Glucose co-Transporter 2</i> )
<b>UHPLC</b>	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>VIP</b>	Projekce významnosti proměnných (z anglického <i>Variable Importance in Projection</i> )

## Použité symboly

$\Phi_A$	procentuální zastoupení vodné složky A v mobilní fázi
$\Phi_B$	procentuální zastoupení organické složky B v mobilní fázi
$h_n$	hodnota šumu základní linie
$m$	směrnice regresní přímky kalibrační závislosti
$r$	poloměr válce
$t$	čas
$t_{rel}$	relativní retenční čas
$V$	objem válce
$v$	výška válce

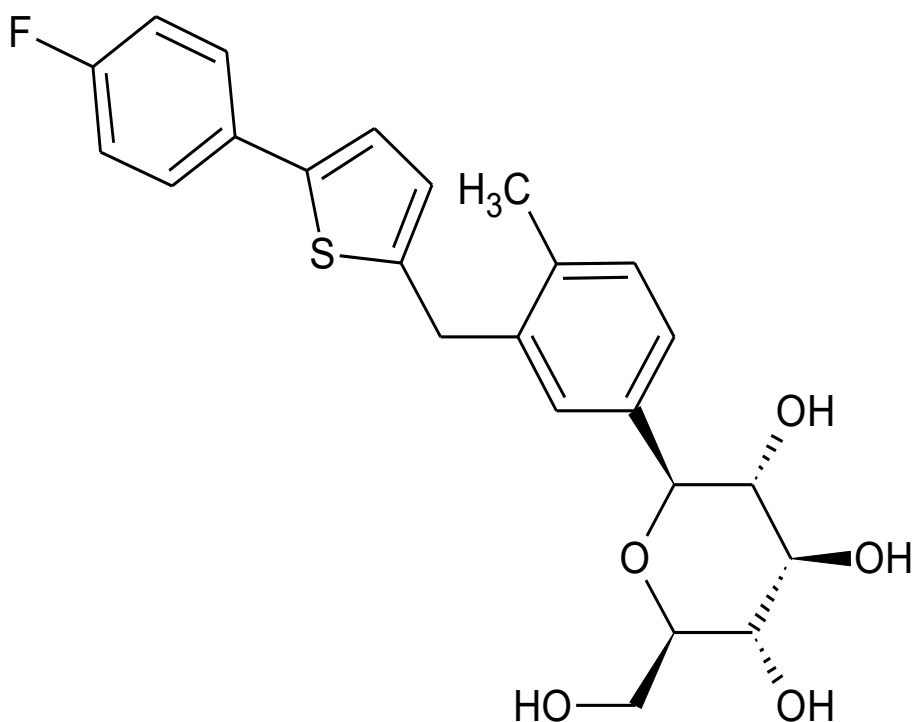
# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo provést elektrochemickou oxidaci aktivní farmaceutické látky canagliflozinu a vystavit ji tak stresovým podmínkám za účelem následného pozorování jejího chování. Dále bylo cílem nalézt takové podmínky, při kterých vznikne největší procento degradačních produktů a prozkoumat jejich vliv na samotný průběh a výsledek elektrochemické oxidace. Mezi zmiňované podmínky patřily koncentrace a hodnoty pH pufrů použitých při měření k rozpuštění vzorků, rychlost průtoku roztoku látky radiální průtokovou elektrochemickou celou a tloušťka těsnění vkládaného před pracovní elektrodu.

## 1.2 Canagliflozin

Canagliflozin je orálně podávaná látka inhibující sodíko – glukosový transportér typu 2 (SGLT2). Řadí se do skupiny antidiabetik a léčivý přípravek, který ji obsahuje, je dostupný pod komerčním názvem Invokana<sup>1</sup>. Canagliflozin je bílý prášek a mezi jeho fyzikální vlastnosti se řadí velmi nízká rozpustnost ve vodě a vysoká rozpustnost v organických rozpouštědlech<sup>2</sup>. Jeho účinky jsou studovány pro léčbu lidí s onemocněním diabetes mellitus 2. typu. Napomáhá ke snížení glykemie a krevního tlaku, mezi jeho další prospěšné účinky se řadí redukce tělesné hmotnosti a snížení albuminurie (tedy exkrece albuminu do moči)<sup>1</sup>. Schválení k používání tohoto léku pro léčbu onemocnění diabetes mellitus 2. typu proběhlo nedávno americkým úřadem pro potraviny a léčiva (US Food and Drug Administration)<sup>3</sup>. Canagliflozin blokuje renální glukosovou reabsorpci, která způsobuje snížení ledvinového prahu pro glukosu a zvýšení vylučování glukosy močí<sup>1</sup>. Chemická struktura canagliflozinu je znázorněna na obrázku 1.



**Obrázek 1:** Chemická struktura canagliflozinu (převzato z cit. <sup>4</sup> a upraveno v programu ACD/ChemSketch)

### 1.2.1 Stanovení canagliflozinu

Objevuje se mnoho studií zabývajících se stanovením canagliflozinu. Ve většině případů se ke stanovení využívají metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC), přičemž stanovení se provádějí v biologických matricích, jakými jsou například lidská nebo krysí plasma<sup>5</sup>.

Jednou z takových studií se zabývali Kobuchi a kol.<sup>5</sup>, kteří uskutečnili stanovení canagliflozinu v krysí plasmě za účelem farmakokinetické studie. Pro toto stanovení validovali metodu kapalinové chromatografie s detekcí pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS). Jako vnitřní standard byl zvolen empagliflozin, což je látka o vysoké čistotě (> 98%), která stejně jako canagliflozin inhibuje SGLT2. Nejprve využili extrakci vzorků plasmy z kapaliny do kapaliny pomocí terc-butyl methyl etheru a následně chromatografickou separaci canagliflozinu a vnitřního standardu, která probíhala na koloně Quicksorb ODS s mobilní fází ve složení acetonitril

a 0,1% kyselina mravenčí v poměru 90:10 (v/v) s průtokem 0,2 ml/min. Detekci provedli pomocí hmotnostního spektrometru s elektrosprejovou ionizací v pozitivním módu. Pomocí této studie bylo zjištěno, že zmiňovaná metoda je dostatečně specifická, přesná a správná pro farmakokinetické posouzení a canagliflozin byl v krysí plasmě za daných podmínek stabilní.

Další metodu stanovení canagliflozinu publikovali Iqbal a kol.<sup>6</sup>. Touto metodou stanovovali canagliflozin v lidské plasmě pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Za vnitřní standard zvolili telmisartan, protože eluoval ve vhodném retenčním čase vůči canagliflozinu (nepřekrýval jeho pík) a měl minimální interference s plasmou. Oproti předchozímu stanovení byly vzorky plasmy extrahovány z kapaliny do kapaliny pomocí diethyl etheru. Samotná chromatografická separace proběhla na koloně Nucleodur Isis C18 s izokratickou elucí a mobilní fází tvořenou směsí 20mM dihydrogenfosfátu draselného a acetonitrilu v poměru 45:55 (v/v) s průtokem 1 ml/min. Následně byla provedena detekce na fluorescenčním detektoru. Stanovení bylo validováno na přesnost, selektivitu a specificitu. Výsledek studie ukázal, že canagliflozin absorboval při 280 nm a emitoval záření při 325 nm, tedy v UV oblasti.

Zaghary a kol.<sup>7</sup> porovnávali metodu HPLC a UHPLC s UV detekcí při 240 nm pro simultánní stanovení canagliflozinu a metforminu. Metoda HPLC byla provedena na koloně C18 s izokratickou elucí za použití směsi methanolu a 0,03M fosfátového pufru o pH 3,2 v poměru 75:25 (v/v). V metodě UHPLC byla použita kolona Hypersil gold C18 (USA) a mobilní fází tvořila směs methanolu a 0,03M fosfátového pufru o pH 3,2 v poměru 80:20 (v/v). Bylo zjištěno, že metoda UHPLC vykazuje vyšší citlivost, kratší retenční časy a spotřebuje méně analyzovaného materiálu.

### **1.3 Spojení elektrochemické oxidace s hmotnostní spektrometrií**

Elektrochemická oxidace je hojně využívaná metoda pro generování degradačních produktů, které následně separujeme a detekujeme. Tato metoda je výhodná z hlediska její selektivity a citlivosti, nebo z hlediska časové a finanční nenáročnosti. Benefitem je zejména použití malých objemů vzorků postačujících k provedení elektrochemické oxidace, což vede k nižší spotřebě analytu a celé stanovení je ekonomičtější a rychlejší<sup>8</sup>.

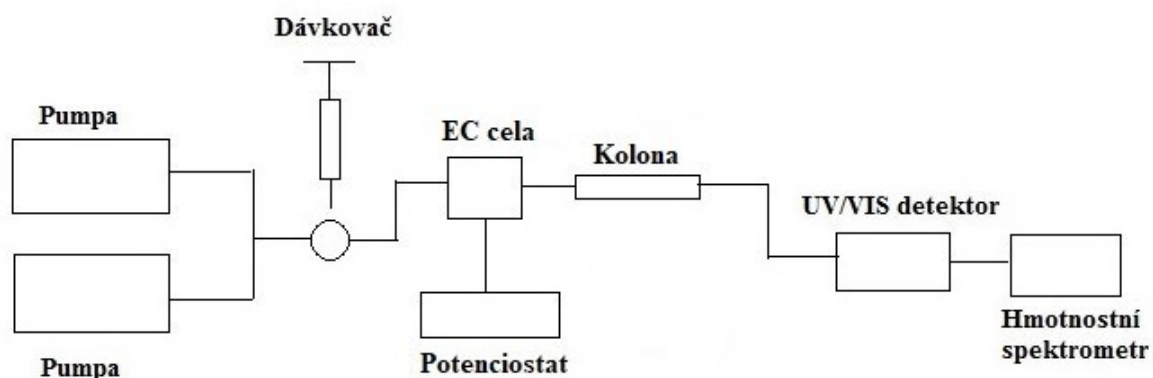
Existuje několik možností, jak detekovat produkty vzniklé elektrochemickou oxidací. Jednou z variant je klasická elektrochemická detekce související s měřením

proudu, prošlého náboje nebo elektrického potenciálu v závislosti na čase, kde naměřený signál je přímo úměrný látkovému množství stanovované složky. Nevýhodou této varianty je nutnost použít čistou mobilní fázi bez příměsi vzdušného kyslíku nebo vysokého obsahu kovů a ostatních nečistot, což jsou podmínky pro stabilní hodnoty základní linie a opakovatelnost měření. Elektrochemická detekce však není v řadě případů dostatečně selektivní<sup>9</sup>.

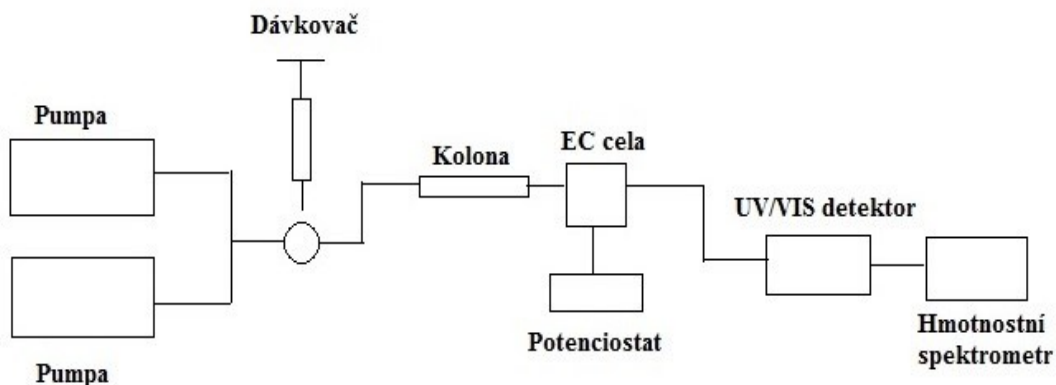
Další variantou je spojení elektrochemie a hmotnostní spektrometrie. Nejčastěji se využívá vazba mezi elektrochemií a hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací v kombinaci s kapalinovou chromatografií (EC/LC/ESI-MS). Je to alternativa ke klasické elektrochemické detekci, kdy detekce hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS) poskytuje více strukturních informací o detekované látce. Detekce pomocí ESI-MS je neomezeně slučitelná s kapalinovou chromatografií s gradientovou elucí a velkou výhodou je vysoká selektivita měření. Při LC-MS získáváme retenční čas detekované látky a poměr hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ), které jsou oboje kvalitativními parametry<sup>10</sup>.

Spojení elektrochemické oxidace, kapalinové chromatografie a následné hmotnostní detekce lze využít dvěma odlišnými způsoby. Jeden způsob využívá po sobě jdoucí seřazení metod EC/LC/MS, kdy po online elektrochemické oxidaci následuje separace kapalinovou chromatografií na reverzních fázích (RP-HPLC) a detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Toto spojení je znázorněné na obrázku 2. Tento způsob umožňuje oxidaci většího množství látek ze složité směsi najednou a následnou separaci jednotlivých produktů, čímž je možné získat informace o polaritě těchto produktů. Druhý způsob, zobrazený na obrázku 3, spočívá ve využití metod v pořadí LC/EC/MS, kde dochází k prvotnímu rozdělení složek směsi pomocí RP-HPLC a následně jsou jednotlivé látky separované ze směsi převedeny elektrochemickou oxidací na produkty, které jsou detekovány prostřednictvím hmotnostní spektrometrie. Tímto postupem je možné simultánně stanovit oxidační produkty pouze jedné látky vyseparované ze směsi<sup>10</sup>.

Nejpoužívanějšími pracovními elektrodami pro elektrochemickou oxidaci jsou elektrody s velkým povrchem, sloužící pro rutinní analýzu četného množství vzorků díky spojení kvantitativní konverze s dlouhými intervaly údržby. Nejčastěji se používá pracovní elektroda ze skelného uhlíku, neboť je chemicky inertní a má dobré elektrické a mechanické vlastnosti<sup>10</sup>.



**Obrázek 2:** Schématické uspořádání EC/LC/MS (převzato z cit. <sup>10</sup> a upraveno)



**Obrázek 3:** Schématické uspořádání LC/EC/MS (převzato z cit. <sup>10</sup> a upraveno)

V současnosti se hojně využívá spojení EC/LC/MS v různých oblastech, například při výzkumu metabolismu léčiv, k analýze proteinů, peptidů a DNA nebo ve forenzní a toxikologické analýze.

Uwe Karst a Sandra Jahn<sup>11</sup> ve svém článku vytvořili přehled výzkumných skupin, věnujících se použití této trojkombinace analytických metod. Některé skupiny z tohoto článku jsou zmíněny níže.

Diehl a kol.<sup>12</sup> sepsali práci zabývající se metodickým vývojem online propojení EC/LC/MS k analýze netěkavých sloučenin. Práci rozdělili do několika částí. První část zaměřili na využití elektrosprejové ionizace jako zdroje iontů pro redoxní reakci. Druhou část věnovali různým druhům elektrochemických průtokových cel s odlišnými ionizačními rozhraními a poslední část se zaměřila na propojení chromatografických metod s elektrochemií a hmotnostní detekcí.

Van Berkel a kol.<sup>13</sup> jako první propojili různé druhy elektrochemických cel s detektorem ESI-MS. Tato metoda se využívala ke stanovení netěkavých, polárních a teplotně nestálých látek. Předvedli univerzálnost a užitečnost této metody na několika příkladech: ionizovali neutrální analyty pro detekci ESI-MS, zkoumali produkty elektrodoových reakcí, a nakonec vylepšili stanovení kovů za použití anodické rozpouštěcí voltametrie a ESI-MS. Jako vzorové látky pro tato stanovení posloužily perylen, oktaethylporfyrin nikelnatý, elementární stříbro nebo  $\beta$ -karoten.

Jurva a kol.<sup>14</sup> představili systém, ve kterém využili elektrochemické průtokové cely k tvorbě hydroxylových radikálů na principu Fentonovy reakce pro následnou reakci s xenobiotiky a detekci produktů vzniklých oxidací pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Reakční směs obsahovala substrát (vychytávač radikálů DMPO: 5,5-dimethyl-1-pyrrolin *N*-oxid), chlorid železitý, peroxid vodíku a EDTA (k prevenci vysrážení). Fentonova reakce byla zahájena snížením obsahu železitých kationtů, směs byla dávkována do kapalinového chromatografu a její složky byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru. Takový systém slouží k vývoji vychytávačů radikálů a antioxidantů na základě simulace vzniku kyslíkových radikálů jako toxických metabolitů při různých onemocněních. Tímto článkem poukázali na schopnost metod EC/LC/MS napodobit řadu oxidačních metabolických reakcí a stát se užitečnými při vývoji léčiv<sup>15</sup>.



### 1.3.1 Použití EC/LC/MS ve farmaceutickém průmyslu

Jedna z hlavních cest eliminace léčiv z lidského těla je enzymatická biotransformace. Ta bývá vyvolána oxidačními reakcemi katalyzovanými enzymy cytochromu P450 (CYP)<sup>16</sup>. Je nutné sledovat biotransformaci léčiv z bezpečnostních důvodů, jelikož se většina z nich přeměňuje na různé metabolity s odlišnou biologickou aktivitou, která může být v některých případech pro člověka nebezpečná. To znamená, že mohou vznikat toxické metabolity nebo další nežádoucí biotransformační důsledky (př. biotransformace parathionu na paraoxon – inhibitor cholinesterasy)<sup>17</sup>.

S přibývajícím počtem vyvíjených léčiv je žádoucí zavádět spolehlivé a dostupné metody, které poskytnou informace o jejich biotransformaci. Čím dříve jsou testy uskutečněny, tím dříve může být přerušen vývoj léčiva, což přináší výhody z ekonomického a časového hlediska. Běžné testování probíhá na zvířatech (*in vivo*), je časově náročné a jeho reprodukovatelnost je omezená. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny metody, které simulují metabolismus léčiv *in vitro*. Takové metody jsou založeny na reakcích katalyzovaných enzymem CYP získaným z jater, hepatocytů nebo jaterních mikrozomů<sup>16</sup>.

Elektrochemie je jednou z metod nahrazujících klasické oxidační reakce katalyzované enzymy CYP. K oxidaci zde dochází tak, že zkoumaná látka předává své elektrony na pracovní elektrodě. Propojení elektrochemie s kapalinovou chromatografií a hmotnostní detekcí se stalo užitečnou metodou ke studiu metabolismu léčiv, jelikož poskytuje velké množství informací o povaze elektrochemicky generovaných metabolitů. Oxidativní metabolismus je simulován prostřednictvím elektrochemie a metabolity jsou následně odděleny pomocí HPLC, která poskytuje retenční časy umožňující identifikaci nejen generovaných oxidačních produktů a jejich polarity, ale i možných izomerů. Vzniklé produkty jsou detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Výhodou této metody je rychlost stanovení a vznik výsledného trojrozměrného grafu, tzv. hromadného voltamogramu, ze kterého je možné získat informace o půlvalnových potenciálech a první náhled na možné produkty oxidace<sup>16</sup>.

Ukazuje se, že elektrochemická oxidace je vhodná také pro syntézu metabolitů léčiv, jelikož standardů pro jejich identifikaci a kvantifikaci je nedostatek. Syntéza metabolitů léčiv je využívána také při dopingových kontrolách, kde se synteticky vzniklé metabolity použijí právě jako identifikační standard<sup>16</sup>.

Metoda EC/LC/MS byla validována pro řadu léčiv. Getek a kol.<sup>18</sup> simulovali metabolismus léčiv pomocí online EC/MS, kdy sledovali elektrochemickou oxidaci paracetamolu na *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin za použití skelné uhlíkové elektrody v elektrochemické průtokové cele a následně provedli konjugační reakci s thiolovými skupinami glutathionu a cysteinu, což je obdobný proces jako při katalýze CYP. Oxidační produkty i oba konjugáty byly následně přeneseny prostřednictvím elektrospreje do hmotnostního spektrometru a detekovány.

Nozaki a kol.<sup>19</sup> se ve svém článku věnovali elektrochemické oxidaci zotepinu a chlorpromazinu, což jsou strukturně podobná léčiva. Využili rovněž metodu EC/MS bez separačního chromatografického kroku, kde elektrochemická oxidace byla provedena v elektrolytické mikroprůtokové cele. Oxidačními produkty byly *S*-oxidy, *N*-dealkylované a dehydrogenované sloučeniny, které byly detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie a měly podobné vlastnosti jako metabolity generované cytochromem P450.

Van Leeuwen a kol.<sup>20</sup> se zabývali chováním antipsychotika clozapinu po elektrochemické oxidaci s on-line systémem EC/LC/MS. Clozapin vykazuje cytotoxické vedlejší účinky vyplývající z reaktivního meziprojektu nitroniového iontu, který je tvořen v průběhu CYP katalýzy. Tento reaktivní meziprojekt se při použití EC/LC/MS degradoval během separace kvůli své nestabilitě. Přidání glutathionu před elektrochemickou oxidací směřovalo k zachycení nitroniového iontu a poskytlo tři isomerní glutathionové adukty. Tímto krokem dokázali, že online separace pomocí HPLC před detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie má velký význam v souvislosti s detekcí jednotlivých izomerů.

## 1.4 Stresové testování stability léčiv

K určení stability léčiv se používá stresové testování, při kterém probíhá nucená degradace těchto farmaceutických látek<sup>21</sup>. Při stresovém testování je látka vystavena extrémním podmínkám, mezi které patří například vysoká teplota, kyselé nebo zásadité prostředí či světlo. Následně je pozorováno chování látky za těchto podmínek a stanoví se, kdy je látka schopná udržet si dané jakostní znaky a kdy se naopak její vlastnosti nepřijatelně změní. Testování probíhá z bezpečnostních důvodů, především k určení trvanlivosti a účinnosti testovaného léku. Stresové testování určuje, za jakých podmínek je stanovovaná látka stabilní a za jakých se rozpadá na další produkty. Dále usnadňuje

určení vnitřní stability molekuly prostřednictvím stanovení cest degradace, poskytuje údaje o degradačních produktech a pomáhá stanovit mechanismy rozkladu<sup>22</sup>.

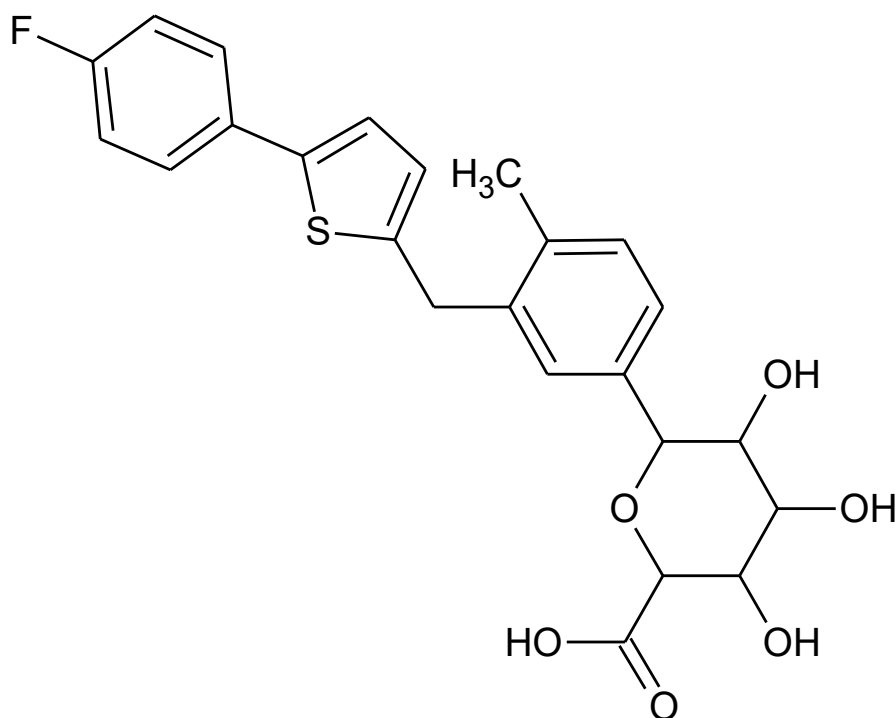
V důsledku toho dochází ke zvolení a validaci vhodných analytických metod k identifikaci látek vzniklých degradací. Pro každou testovanou léčivou látku jsou použity konkrétní stresové testovací podmínky vhodné pro daný případ. Samotné testování probíhá na jedné šarži léčivé substance a zahrnuje vliv vlhkosti, teploty, fotolýzy a oxidačních účinků na studovanou látku. Některé cesty rozpadu mohou být složité a mohou při nich vznikat nepravděpodobné produkty zapříčiněny zrychleným či dlouhodobým testováním, které by za běžných podmínek skladování léčivého přípravku nevznikaly<sup>22,23</sup>.

Stresové testování má za úkol odhalit problémy se stabilitou látek a má prediktivní povahu. Problémy se stabilitou látek mohou ovlivnit další oblasti, například parametry výroby a zpracování, vliv na životní prostředí, vývoj analytických metod, toxikologická a bezpečnostní opatření nebo vhodné podmínky pro skladování a expirační dobu<sup>23</sup>.

Nejpoužívanější analytickou metodou pro detekci degradačních produktů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP–HPLC), která využívá eluci s širokým gradientem, jenž pokrývá velký rozsah polarit. Obecně je dobré validovat a použít metodu, která poskytne separaci látky ze směsi a poskytne detekci a separaci degradačních produktů<sup>23</sup>.

#### **1.4.1 Oxidativní degradace canagliflozinu**

Na základě testování stability canagliflozinu podle zásad schválených Mezinárodní konferencí o harmonizaci (ICH)<sup>22</sup> bylo zjištěno, že je lék stabilní téměř vůči všem stresovým podmínkám, kromě oxidace<sup>24</sup>. Po oxidaci byl separován jeden degradační produkt, k jehož přípravě byl použit 3% (v/v) peroxid vodíku. Produkt byl následně detekován a strukturálně objasněn pomocí hmotnostní spektrometrie a infračervené spektroskopie<sup>25</sup>. Strukturu degradačního produktu je možné vidět na obrázku 4.



**Obrázek 4:** Struktura degradačního produktu vzniklého oxidativní degradací canagliflozinu (převzato z cit. <sup>25</sup> a upraveno v programu ACD/ChemSketch)

Pro tento případ stanovení popsal ve svém článku A. A. Emam<sup>25</sup> metodu vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC) s denzitometrickým vyhodnocením, která byla validována pro kvantifikaci canagliflozinu a jeho produktu vzniklého oxidativní degradací. Separace probíhala na stacionární fázi tvořené silikagelem naneseným na hliníkovou destičku. Destička byla vložena do vyvíjecí komory, která obsahovala směs rozpouštědel acetonu a ethanolu v poměru 80:20 (v/v). Výhodou této metody byl především nízký dopad na životní prostředí v důsledku zvolení směsi acetonu a ethanolu jako rozpouštědla. Tyto látky vykazují nízkou toxicitu a jsou produkty obnovitelných zdrojů.

Další variantu sledování produktů oxidativní degradace canagliflozinu popsali v článku Emam a Abdelwahab<sup>24</sup>. Byla použita metoda HPLC se stacionární fází C18 a mobilní fází tvořenou směsí methanolu a vody v poměru 98:2 (v/v). Methanol byl zvolen z důvodu nízké toxicity a ekologické šetrnosti oproti běžně používaným rozpouštědlům (acetonitril). Ke zvýšení přesnosti měření byl vybrán ibuprofen jako vnitřní standard, jelikož vykazoval chromatografické vlastnosti podobné analytu a poskytoval symetrický pík s vyhovujícím retenčním časem nezasahujícím do ostatních

píků. Metoda HPLC byla oproti denzitometrické HPTLC rychlejší, přesnější a měla vysokou opakovatelnost.

## 1.5 Plánování experimentů

Design of experiments (DoE), neboli plánování experimentů, je nedílnou součástí efektivního vývoje a optimalizace metod v analytické chemii. Využívá se pro plánování experimentů, díky kterým lze získat jednoznačné odpovědi na klíčové otázky výzkumu pomocí kombinace různých experimentálních podmínek za minimální finanční výdaje. Výsledkem je tvorba přehledných grafů, které porovnávají vliv vícero nezávisle proměnných současně, čímž je zredukováno četné množství testů. Prvním krokem je volba vhodných nezávisle proměnných. Nezávisle proměnné mohou mít jak kvalitativní charakter, jako je typ stacionární fáze, kolony nebo typ elektrolytu, tak i kvantitativní charakter, například hodnota pH pufru nebo teplota. Na základě nezávisle proměnných je zvolen vhodný statistický model. Pro vyhodnocení je třeba zvolit závisle proměnné. V případě vyhodnocení HPLC chromatogramů se mohou mezi závisle proměnné řadit faktory jako retenční čas, plocha píku, rozlišení píků a jiné chromatografické parametry. Na základě vyhodnocených závisle proměnných ze všech naplánovaných experimentů můžeme pomocí statistického softwaru vyšetřit vliv nezávisle proměnných na závisle proměnné<sup>26</sup>.

Oproti variantě „One factor at a time” (OFAT), která je v analytické chemii běžně používána a při které lze měnit pouze jednu nezávisle proměnnou, je varianta DoE méně časově a finančně náročná, neboť lze měnit více proměnných zároveň a je rovněž více efektivní při získávání dat a prozkoumávání experimentálního prostoru<sup>27</sup>.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie a instrumentace

#### 2.1.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda, Mili-Q<sup>®</sup>, Merck Millipore, USA
- Acetonitril, CHROMASOLV<sup>™</sup>, gradient grade  $\geq 99\%$ , for HPLC, Honeywell, Francie
- Methanol, LC-MS CHROMASOLV<sup>™</sup>,  $\geq 99,9\%$ , Honeywell, Francie
- Hydroxid amonný, 25% p. a., Lach-Ner, s. r. o., Česká republika
- Fosforečnan amonný, ACS reagent,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Německo
- Octan amonný, ACS reagent,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina mravenčí, ACS reagent, 98 – 100%, Merck, USA
- Kyselina fosforečná, ACS reagent,  $\geq 85\%$ , Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina octová, ACS reagent, 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Canagliflozin, zr-1400118, Invokana<sup>®</sup>, Janssen, USA

## 2.1.2 Instrumentace

- 1260 Infinity LC system s DAD detektorem, Agilent Technologies, Německo
- Chromatografická kolona Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2,1 × 100 mm; 2,7 μm), uchovávaná ve 100% acetonitrilu, Agilent Technologies, USA
- Radiální průtoková cela o rozměrech 0,05 × 6 mm, ALS Co., Japonsko
- Pracovní elektroda ze skelného uhlíku, průměr 6 mm, ALS Co., Japonsko
- Referenční elektroda typu Ag/AgCl, průměr 10 mm, ALS Co., Japonsko
- Pomocná elektroda pro průtokový článek z nerezové oceli, průměr 1,6 mm, ALS Co., Japonsko
- Teflonová těsnění o tloušťkách 12, 50, 100 a 500 μm, ALS Co., Japonsko
- Potenciostat, PalmSens<sup>3</sup>, PalmSens, Nizozemsko
- Stříkačkové čerpadlo, KD Scientific, USA
- Ultrazvuková lázeň, Elma S15, Elmasonic, Německo
- pH metr, 3540 pH/conductivity meter, Jenway, UK
- Magnetická míchačka, Velp Scientifica, Itálie
- Analytické váhy, Entris<sup>®</sup>, Sartorius, Německo

## 2.2 Pracovní postupy

### 2.2.1 Příprava mobilní fáze

Jako mobilní fáze pro všechna měření metodou HPLC byla zvolena směs 10 mM mravenčanového pufru (A, vodná složka) a acetonitrilu (B, organická složka). 10 mM mravenčanový pufr byl připraven odměřením 191,0 μl 99% kyseliny mravenčí a doplněn deionizovanou vodou na celkový objem 500,0 ml. Pomocí 25% hydroxidu amonného bylo upraveno pH vodné složky na hodnotu 3,5.

## 2.2.2 Příprava kalibrační řady

Byl připraven zásobní roztok API canagliflozinu o koncentraci 20 mg/ml tak, že bylo naváženo 200 mg vzorku API na analytických vahách a rozpuštěno v 10,00 ml 100% acetonitrilu. Z důvodu špatné rozpustnosti canagliflozinu bylo zapotřebí vložit vialku se zásobním roztokem do ultrazvukové lázně a nechat přibližně 15 minut rozpouštět za působení ultrazvuku. Následně byly připraveny kalibrační roztoky postupným ředěním zásobního roztoku API canagliflozinu podle níže uvedeného ředicího schématu (viz Tabulka 1).

**Tabulka 1:** Příprava kalibračních roztoků API canagliflozinu. Objem všech roztoků byl doplněn deionizovanou vodou na 10,00 ml.

Koncentrace kalibračního roztoku mg/ml	Koncentrace zásobního roztoku mg/ml	Objem zásobního roztoku ml	Objem acetonitrilu ml
$11 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^1$	0,55	2,45
$5 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^1$	0,25	2,75
$3 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^1$	0,15	2,85
$1 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^1$	0,05	2,95
$5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-1}$	1,00	2,00
$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-1}$	0,20	2,80
$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-1}$	0,10	2,90
$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-2}$	0,20	2,80
$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-2}$	0,10	2,90
$2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	2,00	1,00
$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,50	2,50
$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,20	2,80



## **2.3 Elektrochemická oxidace**

### **2.3.1 Příprava acetátového pufru**

Podle předem rozvrženého plánu byl připravován acetátový pufr v závislosti na potřebné koncentraci (viz Tabulka 2) a hodnotě pH. Bylo vždy naváženo vypočtené množství octanu amonného a doplněno deionizovanou vodou na objem 50 ml. Poté bylo upraveno pH pufru s použitím pH metru dle potřeby (viz Tabulka 2) pomocí 99% kyseliny octové nebo 25% hydroxidu amonného na požadovanou hodnotu. Pro každou elektrochemickou oxidaci byl připravován čerstvý pufr, který bylo vždy nutné odplynit v ultrazvukové lázni.

### **2.3.2 Příprava fosfátového pufru**

Fosfátový pufr byl připravován podle předem rozvrženého plánu obdobným způsobem, jako acetátový pufr. Bylo navažováno množství fosforečnanu amonného odpovídající požadované koncentraci (viz Tabulka 2), doplněno deionizovanou vodou na objem 50 ml a pH vzniklého pufru upraveno přídavkem 85% kyseliny fosforečné nebo 25% hydroxidu amonného na požadovanou hodnotu.

### **2.3.3 Příprava vzorků pro elektrochemickou oxidaci**

Bylo naváženo vždy 5,50 mg API canagliflozinu na analytických vahách a k tomuto množství bylo přidáno 2,50 ml pufru a 2,50 ml methanolu. Vzorek byl vkládán do ultrazvukové lázně na 15 minut, aby se canagliflozin řádně rozpustil. Poté bylo ještě nutné vzorek po dobu cca 10 minut odplyňovat v ultrazvukové lázni, aby obsažený kyslík nerušil průběh samotné oxidace.

### 2.3.4 Průběh elektrochemické oxidace

Byla sestavena radiální elektrochemická průtoková cela, která obsahovala chemicky inertní pracovní elektrodu ze skelného uhlíku o průměru 6 mm, Ag/AgCl referentní elektrodu o průměru 10 mm a pomocnou elektrodu z nerezové oceli o průměru 1,6 mm. Injekční stříkačka sloužící k dávkování vzorku a promývání cely a elektrod byla s celou spojena pomocí silikonové hadičky o vnitřním průměru 0,4 mm a délce 27,4 cm. Cela byla před oxidací nejprve několikrát propláchnuta deionizovanou vodou a poté methanolem, aby byla zbavena případných nečistot, dále pufrem použitým při konkrétním měření a naposledy také třikrát 1 ml vzorku canagliflozinu, připraveného podle popisu v kapitole 2.3.3. Deionizovaná voda, methanol, vzorek i pufry musely být předem odplyněny v ultrazvukové lázni, aby nedocházelo k interferenci při oxidaci.

V programu PSTrace 5 (cit. <sup>28</sup>) byly nastaveny oxidační podmínky. Jako metoda byla zvolena chronoamperometrie, tedy metoda, při které se měří závislost prošlého proudu na čase při vloženém konstantním potenciálu, který byl nastaven na hodnotu 1,2 V. Získané hodnoty prošlého proudu posloužily v této práci pouze ke kontrole, zdali oxidace proběhla. Časový interval oxidace byl nastavován individuálně pro každé měření v závislosti na průtokové rychlosti.

Po nastavení podmínek pro měření a po propláchnutí cely byl do injekční stříkačky nabrán 1 ml vzorku canagliflozinu. Stříkačka byla vložena do stříkačkového čerpadla, které postupně dávalo malé množství vzorku do průtokové cely pomocí tlačného bloku. Výhodou tohoto čerpadla byla především eliminace pulzování.

Byly připraveny tři vialky – jedna obsahovala cca 0,7 ml slepého vzorku, který tvořila směs pufru a methanolu v poměru 50:50, druhá vialka obsahovala přibližně 0,5 ml nestresovaného vzorku canagliflozinu a do třetí vialky se jímala elektrochemickou oxidací stresovaný vzorek, vycházející z průtokové cely. Podmínky pro jednotlivá měření jsou shrnuty v tabulce 2. Plán experimentů byl navržen způsobem popsáním v kapitole 3.2.

**Tabulka 2:** Redukovaný kombinatorický plán experimentů znázorňující vybrané podmínky pro jednotlivá měření vytvořený pomocí softwaru Modde 12 (cit. <sup>29</sup>)

<b>Experiment</b>	<b>Koncentrace pufru mmol/l</b>	<b>pH pufru</b>	<b>Tloušťka těsnění μm</b>	<b>Průtoková rychlost ml/h</b>	<b>Typ pufru</b>
N1	100	6,0	12	0,05	fosfátový
N2	300	4,0	50	0,05	fosfátový
N3	200	5,0	200	0,05	acetátový
N4	200	4,0	500	0,10	fosfátový
N5	300	5,0	12	0,10	acetátový
N6	100	6,0	50	0,10	acetátový
N7	300	6,0	200	0,20	fosfátový
N8	100	5,0	500	0,20	fosfátový
N9	200	4,0	12	0,20	acetátový
N10	200	5,0	50	0,40	fosfátový
N11	100	4,0	200	0,40	acetátový
N12	300	6,0	500	0,40	acetátový
N13	300	6,0	500	0,40	acetátový
N14	200	4,0	500	0,10	fosfátový
N15	300	4,0	50	0,05	fosfátový

## 2.4 Chromatografické podmínky

Chromatografické podmínky byly převzaty z diplomové práce Bc. Jitky Máchalové<sup>30</sup>, která zvalidovala HPLC metodu pro stanovení canagliflozinu. Jako mobilní fáze byla zvolena směs 10 mM mravenčanového pufru o pH 3,5 a acetonitrilu, příprava mobilní fáze byla popsána v kapitole 2.2.1. Gradientový program, podle kterého se měnilo procentuální zastoupení jednotlivých složek mobilní fáze, je uveden v tabulce 3.

Ke stanovení byla použita chromatografická kolona Agilent Poroshell 120 SB-Aq o rozměrech 2,1 × 100 mm; 2,7 μm, objem nástřiku činil 1 μl a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,35 ml/min. Teplota automatického dávkovače byla 24 °C a teplota kolony

byla 30 °C. Jako detektor byl zvolen UV/VIS detektor s diodovým polem. Detekce jednotlivých analytů byla realizována při vlnové délce 292 nm, jelikož při této vlnové délce vykazuje canagliflozin absorpční maximum.

**Tabulka 3:** Gradientový program metody HPLC, podle kterého se měnilo zastoupení vodné složky (A) a organické složky (B) mobilní fáze při eluci.

$t$ (min)	$\Phi_A$ (%)	$\Phi_B$ (%)
0	70	30
1	70	30
10	60	40
12	20	80
13	20	80
14	70	30
20	70	30

## 2.5 Analytické zpracování dat

### 2.5.1 Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) canagliflozinu byla v této práci vypočtena podle uvedených rovnic:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times h_n}{m}, \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times h_n}{m}, \quad (2)$$

kde  $h_n$  je šum na základní linii a  $m$  je směrnice regresní přímky kalibrační závislosti<sup>31</sup>.

## 2.5.2 Lineární dynamický rozsah

Lineární dynamický rozsah byl získán vynesemím logaritmických hodnot koncentrací kalibračních roztoků na osu x a logaritmických hodnot ploch píků na osu y. Experimentálními body byla proložena regresní přímka, jejíž hodnota směrnice odpovídala koeficientu linearity. Tento koeficient posloužil k určení, v jakém rozsahu koncentrací je odezva detektoru lineární.

## 2.6 Podmínky elektrochemické oxidace z DoE

Pomocí softwaru Modde 12 bylo vygenerováno 15 experimentů, při kterých byl zjišťován vliv různých faktorů na elektrochemickou oxidaci. Na základě softwaru byly vyhodnocovány vlivy těchto faktorů, které představovaly nezávisle proměnné:

- Typ pufru
- Koncentrace pufru
- pH pufru
- Průtoková rychlost
- Tloušťka těsnění vkládaného před pracovní elektrodu

Za závisle proměnnou bylo v případě zkoumání stability canagliflozinu při probíhající oxidaci zvoleno procentuální zastoupení canagliflozinu, tzn. kolik procent canagliflozinu zůstalo nezdegradováno, a v případě zjišťování účinnosti elektrochemické oxidace bylo za závisle proměnnou zvoleno procento vznikajících nečistot. Z 15 výše zmíněných experimentů byla díky Modde 12 získána kombinace optimálních podmínek, za kterých vzniká největší procento produktů oxidace. Tyto podmínky byly ověřeny provedením tří kontrolních měření.

Ze softwaru bylo získáno také několik grafů znázorňujících vliv nezávisle proměnných na závisle proměnné, mezi které patří VIP Plot, který shrnuje celkový vliv faktorů na průběh elektrochemické oxidace, Coefficient Plot, který znázorňuje pozitivní/negativní vliv individuálních jmenovaných faktorů na stabilitu canagliflozinu a Box Whisker Plot, jenž poskytuje grafické znázornění procentuálního zastoupení produktů degradace pomocí kvartilů.

## 3 Výsledky a diskuze

V této bakalářské práci byla provedena elektrochemická oxidace canagliflozinu jako jedna ze stresových podmínek stabilitního testování léčivých látek. Canagliflozin byl zvolen jako dobrá modelová látka pro elektrochemickou oxidaci, jelikož je za všech ostatních stresových podmínek (teplota, vlhkost, ...) stabilní, ale při oxidaci, ať už chemické, nebo elektrochemické, podléhá degradaci.

Nestresované i stresované vzorky byly analyzovány metodou HPLC a poté bylo z výsledných chromatogramů vyhodnoceno množství degradačních produktů vzniklých za různých experimentálních podmínek při elektrochemické oxidaci. Vyhodnocení proběhlo pomocí statistického softwaru Modde 12 společnosti Umetrics<sup>29</sup>.

### 3.1 Analýza pomocí HPLC s DAD detektorem

#### 3.1.1 Kalibrační závislost

Nejprve byla změřena kalibrační závislost, na základě které byl stanoven lineární dynamický rozsah, LOD a LOQ metody. Po proměření kalibračních roztoků o koncentracích  $11 \cdot 10^{-1}$ ,  $5 \cdot 10^{-1}$ ,  $3 \cdot 10^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{-1}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  a  $2 \cdot 10^{-5}$  mg/ml za použití techniky HPLC byla zhotovena kalibrační závislost pro plochy a výšky píků na koncentracích příslušných kalibračních roztoků. Směrnice kalibrační závislosti signálů pro výšky píků na koncentracích kalibračních roztoků byla použita pro výpočet meze detekce a meze kvantifikace. Hodnota směrnice této kalibrační závislosti odpovídala  $760,44 \text{ mAU} \cdot \text{ml/mg}$  a hodnota úseku činila  $0,0195 \text{ mAU}$ . Chyba směrnice byla určena jako  $3,071 \text{ mAU} \cdot \text{ml/mg}$  a chyba úseku dosahovala hodnoty  $1,157 \text{ mAU}$ . Dále byl stanoven koeficient determinace pro tuto kalibrační závislosti, jehož hodnota činila  $0,9999$ .

Pro výpočet LOD a LOQ bylo nutné znát šum základní linie, který byl určen z chromatogramu slepého vzorku, tedy směsi 30% acetonitrilu a vody, a jeho hodnota činila  $0,03 \text{ mAU}$ . Hodnota LOD byla vypočtena na  $1,18 \cdot 10^{-4} \text{ mg/ml}$  a hodnota LOQ byla vypočtena na  $3,95 \cdot 10^{-4} \text{ mg/ml}$ . LOD a LOQ byly ověřeny rovněž experimentálně.

Směrnice kalibrační závislosti ploch píků na koncentracích kalibračních roztoků odpovídala hodnotě  $5573,2 \text{ mAU} \cdot \text{s} \cdot \text{ml/mg}$  a úsek této závislosti hodnotě  $-8,3481 \text{ mAU} \cdot \text{s} \cdot \text{ml/mg}$ . Chyba směrnice dosahovala hodnoty  $31,57 \text{ mAU} \cdot \text{s} \cdot \text{ml/mg}$  a chyba

úseku hodnoty  $11,39 \text{ mAU} \cdot \text{s} \cdot \text{ml/mg}$ . Koeficient determinace této závislosti činil 0,9997.

Dále byl vyhodnocen lineární dynamický rozsah metody, který byl získán vynesemím logaritmických hodnot koncentrací kalibračních roztoků na osu x a logaritmických hodnot ploch píků na osu y. Ze směrnice této závislosti byl stanoven koeficient linearity, jehož hodnota činila 1,004. Lze tedy říci, že lineární dynamický rozsah metody je  $2 \cdot 10^{-4} - 11 \cdot 10^{-1} \text{ mg/ml}$ .

### **3.1.2 Nestresovaný vzorek canagliflozinu**

Po provedení analýzy nestresovaného vzorku canagliflozinu připraveného postupem popsáním v kapitole 2.3.3 bylo zjištěno, že pík canagliflozinu eluuje v čase 8,9 min. Retenční čas nestresovaného vzorku canagliflozinu posloužil k porovnání s retenčními časy elektrochemicky stresovaných vzorků a byl použit rovněž pro výpočet relativních retenčních časů jednotlivých nečistot vzniklých degradací. Ve výsledném chromatogramu se vyskytly minoritní píky, které poukazovaly na přítomnost nečistot z výrobního procesu API canagliflozinu nebo z přípravy roztoku canagliflozinu.

### **3.2 Elektrochemická oxidace canagliflozinu**

K nalezení optimálních podmínek elektrochemické oxidace byl sestaven redukovaný kombinatorický plán experimentů pomocí statistického softwaru Modde 12 (cit. <sup>29</sup>), díky kterému bylo možné vygenerovat kombinaci vícero nezávisle proměnných parametrů, jejichž vliv na analýzu lze pozorovat současně. Mezi sledované nezávisle proměnné patřil typ pufru, hodnota jeho koncentrace a pH, rychlost průtoku roztoku průtokovou celou a tloušťka těsnění.

Byly zvoleny dva typy pufrů. Jedním byl acetátový, který je zároveň vhodný pro hmotnostní spektrometrii, a druhým typem pufru byl fosfátový, který se řadí mezi nejpoužívanější pufrů a slouží ke stabilizaci pH v neutrálních oblastech. Oba tyto pufrů byly zvoleny z důvodu vyšší vodivosti, než má směs methanol a voda. Acetátový pufr má navíc pufrací kapacitu v oblasti hodnot pH cca 4-6, což jsou zvolené experimentální hodnoty pH.

Pro elektrochemickou oxidaci je nutné zvolit hodnoty pH tak, aby nebyly v příliš kyselé oblasti, tzn. pH 4, 5 a 6, neboť v kyselé oblasti hodnot pH vzniká množství  $\text{H}^+$  iontů, které by uměle podpořily oxidaci. V zásaditých oblastech by díky přebytku  $\text{OH}^-$

iontů byla naopak oxidace uměle tlumena. Při pH nižším než 4 by mohla hrozit nežádoucí hydrolýza canagliflozinu.

Vybrané hodnoty koncentrací pufrů se pohybovaly v rozmezí 100-300 mM. Takové rozmezí bylo určeno na základě vlivu iontové síly, jelikož bylo žádoucí, aby měl roztok určitou vodivost, při které dochází k přenosu elektronů. Při koncentracích vyšších než 300 mM by měl roztok iontovou sílu příliš vysokou a docházelo by ke srážení canagliflozinu, jak bylo zjištěno při předchozích experimentech v laboratoři.

Rychlost průtoku roztoku průtokovou celou byla nastavena tak, aby stihl systémem protéct dostatek vzorku k HPLC analýze. Při průtocích 0,05 a 0,10 ml/h trvala oxidace 3 hodiny, při průtoku 0,20 ml/h trvala 1,5 hodiny a při průtoku 0,40 ml/h trvala 1 hodinu.

### **3.2.1 Analýza produktů elektrochemické oxidace**

Po elektrochemické oxidaci byly stresované vzorky proměřeny pomocí HPLC za účelem získání retenčních časů jednotlivých degradačních produktů. Ze zjištěných retenčních časů degradačních produktů a retenčního času API canagliflozinu byly spočteny relativní retenční časy sloužící k identifikaci jednotlivých nečistot. K nim pak byly přiřazeny relativní plochy píků těchto nečistot a na základě toho bylo možné spočítat sumu ploch píků vzniklých degradačních produktů za účelem zjištění, za jakých podmínek vzniká nejvíce produktů degradace. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

Z této tabulky a tabulky 2 je zřejmé, že největší procento degradačních produktů vzniklo při použití 300 mM fosfátového pufru o pH 4,0, průtokové rychlosti 0,05 ml/h a tloušťce těsnění 50  $\mu\text{m}$  (experiment N15). Nejmenší procento degradačních produktů vzniklo naopak při použití 200 mM fosfátového pufru o pH 5,0, průtokové rychlosti 0,4 ml/h a tloušťce těsnění 50  $\mu\text{m}$  (experiment N10).

Z tabulky je možné vyzorovat trend, který říká, že čím je zvolená hodnota průtokové rychlosti menší, tím více oxidačních produktů bude vznikat. Je zřejmé, že nečistoty 7 a 8 vznikají pouze při pH 4 a 5, nikoliv při pH 6. Jejich vznik tedy podporuje spíše slabě kyselé prostředí. Při vysokém průtoku vznikají přednostně nečistoty 5 a 6 na úkor nečistot 1 a 2 (experimenty N10, N12 a N13) a pokud je pH nízké a průtok vysoký (experiment N11), probíhá degradace ve větší míře.



**Tabulka 4:** Plochy píkú vzniklých degradačních produktů vyjádřené jako procenta sumy plochy všech píkú včetně API.

<b>Relativní plochy píkú nečistot</b>									
<b>Experiment</b>	<b><i>t</i><sub>rel</sub></b>	<b><i>t</i><sub>rel</sub></b>	<b><i>t</i><sub>rel</sub></b>	<b><i>t</i><sub>rel</sub></b>	<b><i>t</i><sub>rel</sub></b>	<b><i>t</i><sub>rel</sub></b>	<b><i>t</i><sub>rel</sub></b>	<b><i>t</i><sub>rel</sub></b>	<b><math>\Sigma</math> relativních ploch píkú</b>
	<b>0,48</b>	<b>0,50</b>	<b>0,63</b>	<b>0,67</b>	<b>0,89</b>	<b>0,90</b>	<b>1,57</b>	<b>1,58</b>	
<b>N1</b>	1,050	1,171	-	0,364	1,218	1,327	-	-	5,130
<b>N2</b>	0,702	0,796	-	0,259	1,201	1,346	0,100	0,097	4,501
<b>N3</b>	0,970	1,004	0,097	0,313	0,818	0,923	0,055	0,083	4,263
<b>N4</b>	0,525	0,580	0,170	0,247	0,583	0,636	0,099	0,105	2,945
<b>N5</b>	0,274	0,211	0,112	0,127	0,454	0,464	-	-	1,642
<b>N6</b>	0,471	0,531	0,162	0,254	0,808	0,886	-	-	3,112
<b>N7</b>	0,311	0,342	0,150	0,12	0,619	0,659	-	-	2,201
<b>N8</b>	0,269	0,304	0,102	0,143	0,394	0,430	0,070	0,069	1,781
<b>N9</b>	0,482	0,482	0,108	0,143	0,711	0,834	0,062	0,058	2,880
<b>N10</b>	0,061	0,065	-	-	0,221	0,233		-	0,580
<b>N11</b>	0,366	0,402	0,086	0,129	0,551	0,627	0,104	-	2,265
<b>N12</b>	0,152	0,174	-	0,069	0,421	0,477	-	-	1,293
<b>N13</b>	0,180	0,195	-	0,111	0,496	0,553	-	-	1,535
<b>N14</b>	0,403	0,446	0,214	0,248	0,496	0,539	0,079	0,072	2,497
<b>N15</b>	1,354	1,518	-	0,535	1,292	1,423	0,182	0,197	6,501

### 3.2.2 Nalezení optimálních podmínek pro degradaci

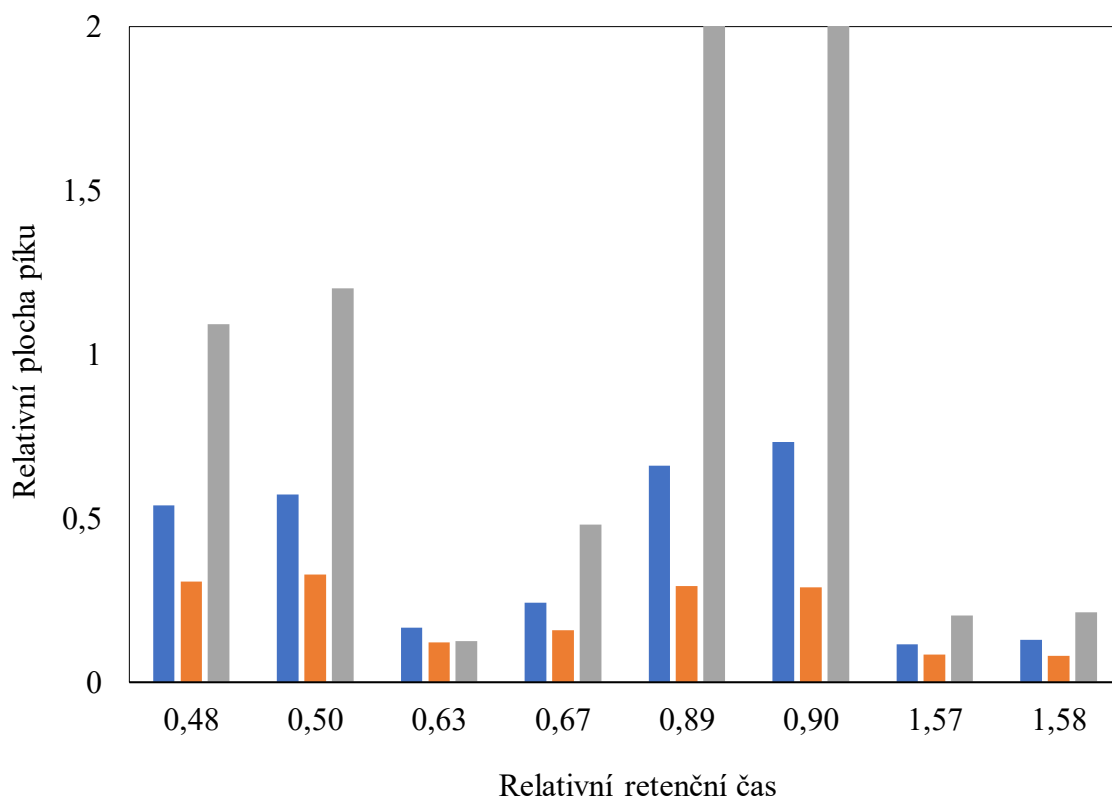
Pomocí funkce Optimizer v softwaru Modde 12 byly získány optimální podmínky, za kterých vzniká největší množství degradačních produktů. Jedná se o tyto podmínky:

- 100 mM fosfátový pufr
- pH 4,0
- Tloušťka těsnění 50  $\mu\text{m}$
- Průtoková rychlost 0,05 ml/h

Poté byla metodou HPLC ověřována opakovatelnost měření za výše zmíněných podmínek, tedy zdali vzniká přibližně stejné procento degradačních produktů. Výsledky byly zpracovány do tabulky 5.

**Tabulka 5:** Plochy píků degradačních produktů vzniklých za optimálních podmínek vztažené k ploše píku API canagliflozinu.

Relativní plochy píků nečistot									
Měření	$t_{\text{rel}}$ 0,48	$t_{\text{rel}}$ 0,50	$t_{\text{rel}}$ 0,63	$t_{\text{rel}}$ 0,67	$t_{\text{rel}}$ 0,89	$t_{\text{rel}}$ 0,90	$t_{\text{rel}}$ 1,57	$t_{\text{rel}}$ 1,58	$\Sigma$ relativních ploch
1	0,540	0,573	0,166	0,242	0,66	0,733	0,115	0,13	3,159
2	0,308	0,328	0,121	0,158	0,293	0,29	0,084	0,081	1,663
3	1,092	1,202	0,125	0,481	2,102	2,34	0,203	0,214	7,759



**Obrázek 5:** Graf zobrazující relativní plochy píků nečistot vzniklých elektrochemickou oxidací při třech opakováních experimentu za optimálních podmínek.

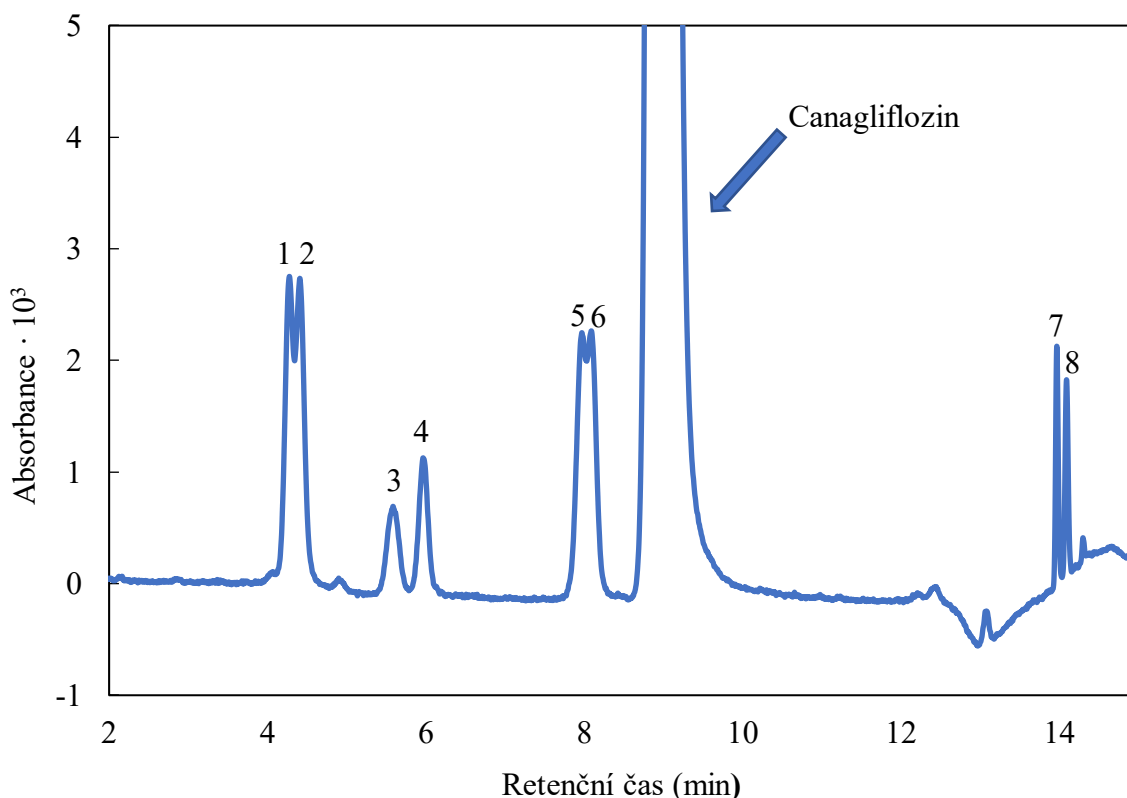
Na obrázku 5 jsou graficky zpracovány výsledky z tabulky 5, tedy z měření tří vzorků vzniklých elektrochemickou oxidací za optimálních podmínek. Elektrochemická oxidace byla provedena v každém případě stejným způsobem, tedy za použití 100 mM fosfátového pufru o pH 4,0, průtokové rychlosti 0,05 ml/h a tloušťky těsnění 50  $\mu\text{m}$ . Modré sloupce zobrazují měření č. 1, oranžové sloupce měření č. 2 a šedé sloupce měření č. 3.

Z grafu je patrné, že elektrochemická oxidace probíhala vždy stejným mechanismem, neboť vzájemné poměry jednotlivých nečistot jsou u všech tří měření zhruba shodné. Rozdílná byla však účinnost oxidace. Hodnoty relativních ploch píků nečistot při třetím měření jsou téměř dvojnásobné oproti prvním měření, a to především v relativních retenčních časech 0,48, 0,50, 0,67, 1,57 a 1,58.

Obecně lze říct, že nejvíce nečistot vzniklo při měření č. 3, potom při měření č. 1 a nejméně nečistot se vytvořilo při měření č. 2. Důvodem velké odlišnosti výsledků získaných třetím měřením může být například příprava fosfátového pufru a vzorku

canagliflozinu v jiný den, než při prvním a druhém měření. To znamená, že mohlo dojít k mírně odlišné kalibraci pH metru či nepřesnostem při navažování fosforečnanu amonného pro přípravu pufru, nebo při navažování canagliflozinu. Dalším důvodem odlišnosti výsledků by mohl být fakt, že oxidační děje na pracovní elektrodě nemají vysokou reprodukovatelnost.

Na obrázku 6 je vzorový chromatogram zobrazující hlavní pík API canagliflozinu a píky jednotlivých nečistot vzniklých elektrochemickou oxidací při použití 100 mM fosfátového pufru o pH 4,0, průtokové rychlosti 0,05 ml/h a těsnění o tloušťce 50  $\mu\text{m}$ .

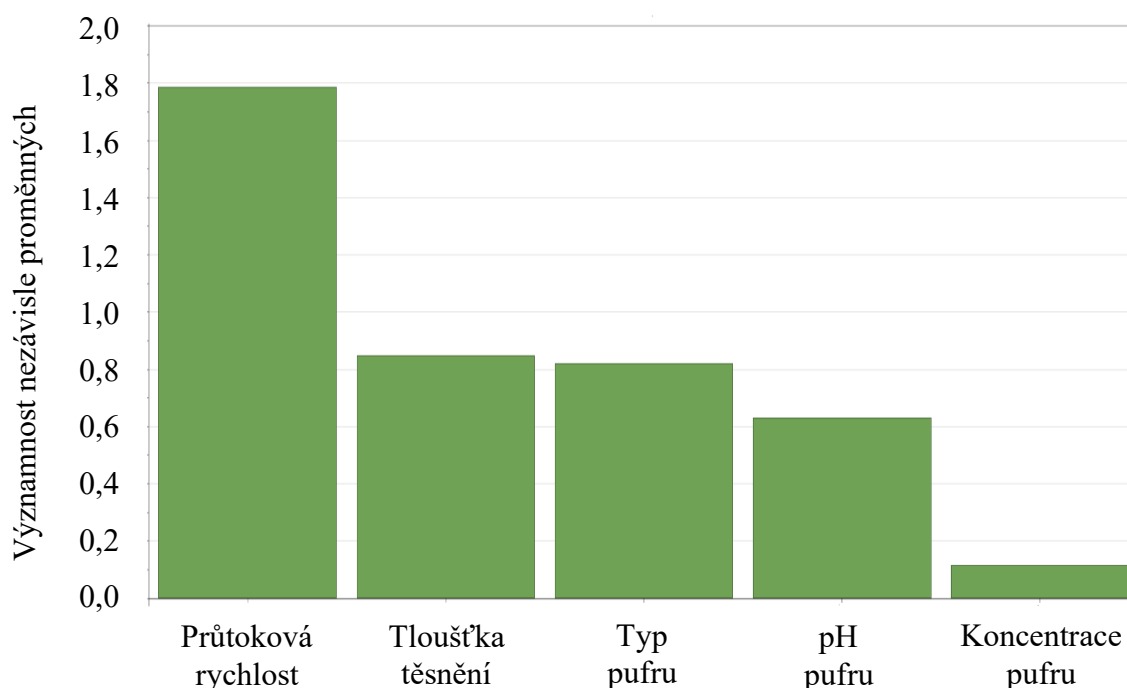


**Obrázek 6:** Chromatogram produktů elektrochemické oxidace za optimálních podmínek. Na ose x je znázorněn retenční čas v minutách a na ose y je absorbance. Chromatografická kolona Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2,1 × 100 mm; 2,7  $\mu\text{m}$ ), mobilní fáze: směs 10 mM mravenčanového pufru o pH 3,5 a acetonitrilu s gradientovou elucí popsanou v kapitole 2.4, teplota kolony: 30 °C, teplota automatického dávkovače: 24 °C, průtok: 0,35 ml/min, objem nástřiku: 1  $\mu\text{l}$ , vlnová délka: 292 nm.

Na chromatogramu jsou zobrazeny nečistoty 1 až 8 a hlavní pík API canagliflozinu. U nečistot 1 a 2 a zároveň u nečistot 5 a 6 je patrné, že jejich píky nejsou rozlišeny až na základní linii.

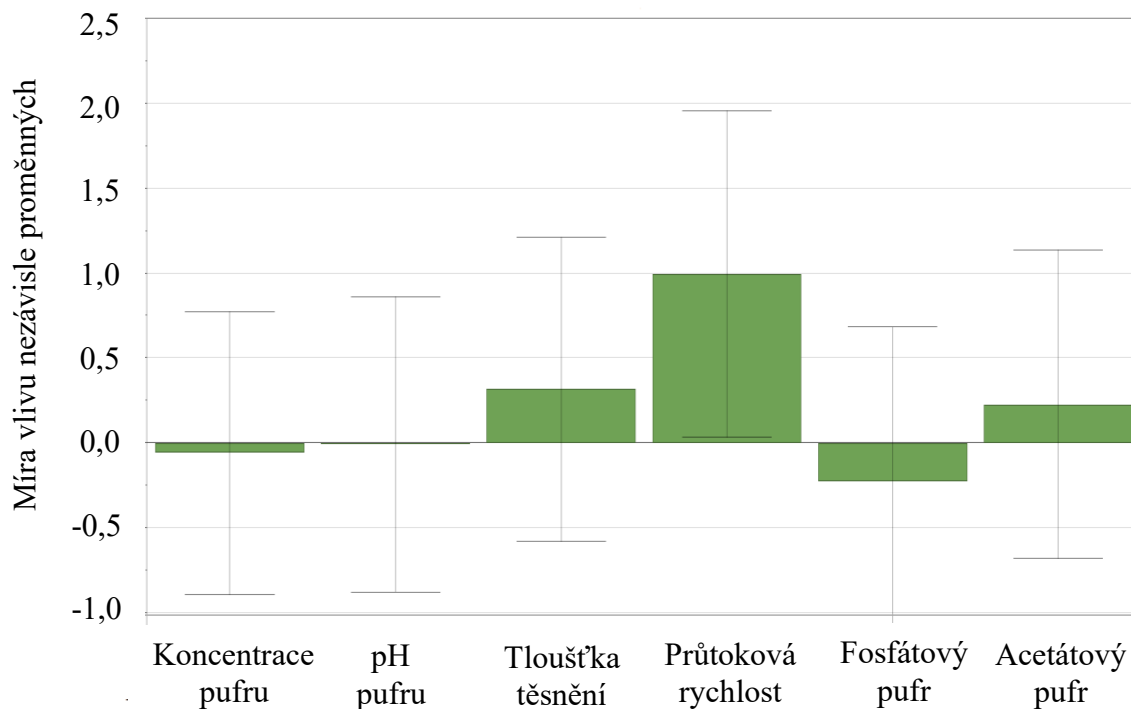
### 3.3 Vyhodnocení dat pomocí softwaru Modde 12

Prvním krokem při vyhodnocení dat vložených do softwaru Modde 12 bylo zhodnocení, jak jednotlivé nezávisle proměnné ovlivňují experimentální prostor jako celek. K tomuto účelu posloužila projekce významnosti proměnných neboli VIP plot (variable importance in projection). Vliv nezávisle proměnných je zřejmý z grafu na obrázku 7. Na ose x jsou zobrazeny jednotlivé nezávisle proměnné a na ose y je promítnuta významnost nezávisle proměnných. Z grafu lze vyčíst, že největší vliv na experimentální prostor má průtoková rychlost. Tento závěr lze zároveň logicky odvodit, neboť průtoková rychlost určuje, jakou dobu stráví analyt v průtokové cele a jak dlouho se udrží u povrchu pracovní elektrody. Daleko menší vliv má tloušťka těsnění, stejně jako typ pufru či pH pufru. Tyto faktory jsou z grafu patrně statisticky méně významné, hladina významnosti se pohybuje pod hodnotou 1. Koncentrace pufru neovlivňuje experimentální prostor téměř vůbec.



**Obrázek 7:** Míra vlivu nezávisle proměnných na průběh elektrochemické oxidace

Dále bylo žádoucí vyšetřit, zdali jednotlivé nezávisle proměnné mají pozitivní či negativní vliv na oxidaci canagliflozinu v cele. To je znázorněno na obrázku 8.



**Obrázek 8:** Graf negativních a pozitivních vlivů nezávisle proměnných na procentuální zastoupení canagliflozinu ve vzorku po elektrochemické oxidaci.

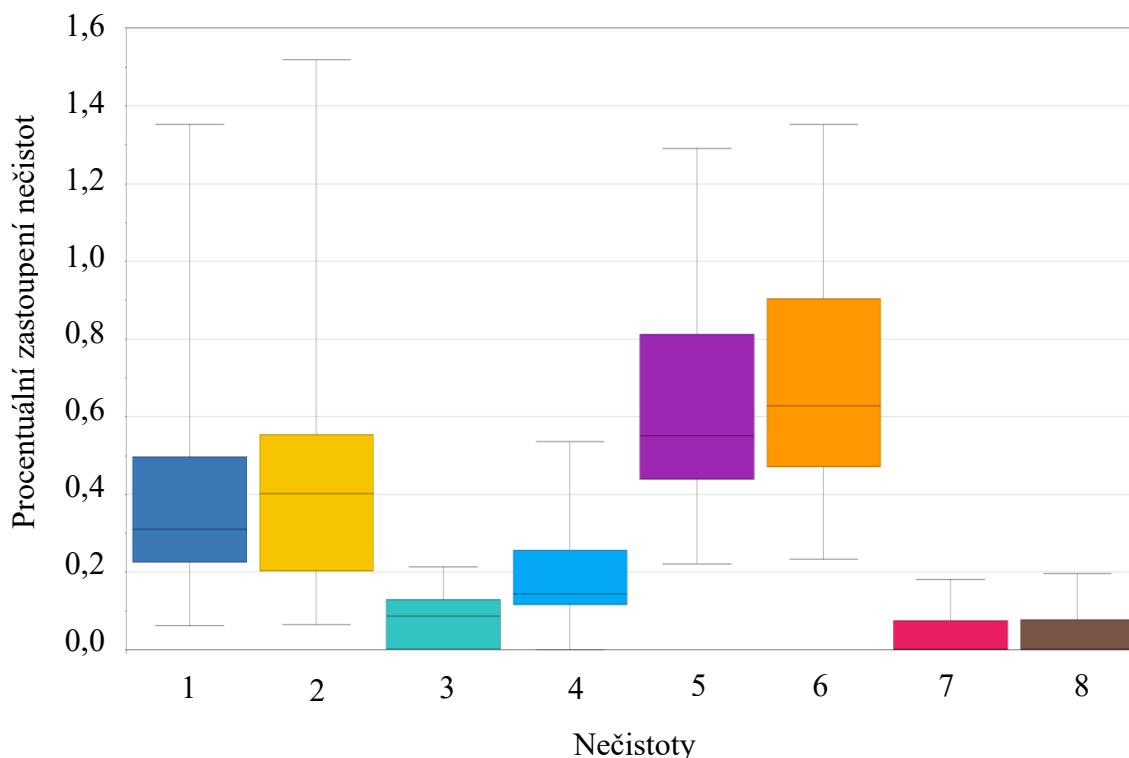
Na obrázku 8 je zobrazen sloupcový graf koeficientů, který interpretuje vliv jednotlivých nezávisle proměnných faktorů na procentuální zastoupení nezdegradovaného canagliflozinu. Pozitivní vliv na procentuální zastoupení canagliflozinu znamená, že s rostoucí hodnotou dané nezávisle proměnné bude po oxidaci v roztoku zůstat větší množství canagliflozinu, oxidace bude tedy probíhat v menším rozsahu. Negativní vliv znamená, že s rostoucí hodnotou nezávisle proměnné bude oxidace probíhat ve větším rozsahu<sup>32</sup>.

Z grafu je zřejmé, že statisticky nejvýznamnější vliv na obsah nepřeměněného canagliflozinu ve vzorku po oxidaci má průtoková rychlost, a to vliv pozitivní. To znamená, že čím vyšší průtoková rychlost bude použita, tím větší bude procentuální zastoupení canagliflozinu na úkor vznikajících nečistot. Naopak čím nižší průtokovou rychlost použijeme, tím více degradačních produktů bude vznikat. Dále například fosfátový pufr má negativní vliv na stabilitu canagliflozinu, tím pádem při použití

fosfátového pufru bude vznikat větší množství degradačních produktů než při použití acetátového pufru, který má pozitivní vliv na stabilitu canagliflozinu, a tak bude procentuální zastoupení canagliflozinu větší. Tloušťka těsnění ovlivňuje obsah canagliflozinu pozitivně, to znamená, že čím větší tloušťka těsnění bude použita, tím více canagliflozinu zůstane nepřeměněno. Koncentrace pufru a pH pufru nejsou statisticky významné, jejich chybové úsečky jsou daleko větší než samotné sloupce grafu, tudíž jejich vliv je zanedbatelný.

Nejvýznamnější vliv na oxidaci canagliflozinu má průtoková rychlost jeho roztoku a dále tloušťka těsnění, tedy velikost cely. Oba tyto parametry ovlivňují dobu, kterou analyt stráví v průtokové cele. Naše průtoková cela měla rozměry  $0,05 \times 6$  mm a tvar válce. Objem válce byl spočten s využitím vztahu  $V = \pi r^2 v$ , kde  $r$  je poloměr válce a  $v$  je výška válce. Po vypočtení objemu válce, který činil  $1,41 \text{ mm}^3$ , a zohlednění průtokové rychlosti se dalo spočítat, že při optimální průtokové rychlosti  $0,05 \text{ ml/h}$  se analyt uvnitř cely udržel vždy po dobu  $100 \text{ s}$ . Pro porovnání, při nejvyšší průtokové rychlosti  $0,40 \text{ ml/h}$  a stejné velikosti cely strávil analyt uvnitř cely dobu  $13 \text{ s}$ . Čím větší je tedy průtoková rychlost, tím menší dobu analyt v cele stráví a tím méně času je na jeho oxidaci. Poněkud složitější je situace ohledně velikosti cely. Čím je cela větší, tím delší dobu v ní analyt setrvá, ale zároveň je díky velkému objemu větší jeho průměrná vzdálenost od povrchu pracovní elektrody, a tedy doba jeho difúze k tomuto povrchu. Tím pádem je průběh elektrochemické oxidace méně efektivní než při použití cely o menších rozměrech.

Posledním grafem získaným ze softwaru Modde 12 je Box Whisker Plot neboli krabicový diagram, který rozděljuje výsledná data do kvartilů, vymezuje medián a zobrazuje odlehle hodnoty. Box Whisker plot je znázorněný na obrázku 9.



**Obrázek 9:** Krabicový diagram zobrazující procentuální zastoupení jednotlivých nečistot vzniklých elektrochemickou oxidací canagliflozinu.

Spodní hranice jednotlivých krabicových diagramů zobrazuje vždy nejnižší hodnotu relativní plochy píku degradačního produktu v daném relativním retenčním čase a horní hranice hodnotu nejvyšší. Linie uvnitř diagramu znázorňuje medián hodnot relativních ploch píků degradačních produktů.

Z grafu vyplývá, že nejvíce procentuálně zastoupená je nečistota 6 s relativním retenčním časem 0,90 a mediánem 0,627 %. Druhou nejvíce zastoupenou nečistotou je nečistota 5 s relativním retenčním časem 0,89 a mediánem 0,551 %. Třetí největší procentuální zastoupení má nečistota 2 s relativním retenčním časem 0,50 a mediánem 0,402 %. Po ní následují nečistoty 1 a 4 s relativními retenčními časy 0,48 a 0,67 a mediány 0,366 % a 0,143 %. Nejméně procentuálně zastoupeny jsou nečistoty 3, 7 a 8 s relativními retenčními časy 0,63; 1,57 a 1,58 a mediány 0,112 %; 0,089 % a 0,083 %. U těchto nečistot často spodní hranice nabývá nulových hodnot. To znamená, že při



některých experimentech vůbec nebyly detekovány. Naopak nečistoty 1, 2, 5 a 6 vznikly při všech testovaných podmínkách.

### **3.4 Porovnání této práce s jinými studiemi**

Při vyhledávání odborné literatury sloužící k porovnání s touto bakalářskou prací se ukázalo, že se doposud chemickou oxidací canagliflozinu zabývalo jen velmi málo výzkumných skupin. Elektrochemická oxidace canagliflozinu je pak mezi odbornými články téměř nedohledatelná.

Chemickou oxidací zmiňovanou v teoretické části vznikl jeden degradační produkt, zatímco elektrochemickou oxidací, která byla předmětem této práce, vzniklo celkem osm degradačních produktů. Odlišnost v počtu vznikajících degradačních produktů může být vysvětlena rozdílností mechanismů obou oxidací a různými podmínkami měření. Zatímco při chemické oxidaci léčiv se jako stresový faktor používá ve většině případů peroxid vodíku, elektrochemická oxidace je prováděna v průtokové cele a stresovým faktorem je zde převážně napětí vkládané mezi elektrody.

Odlišná je také doba trvání chemické či elektrochemické oxidace, která se může pohybovat v řádu hodin či dnů.

Dále by mohla být provedena identifikace degradačních produktů pomocí hmotnostní spektrometrie a jejich porovnání s literaturou. Předmětem této práce však bylo pouze navržení optimálních podmínek, za kterých vzniká co největší množství degradačních produktů.

## 4 Závěr

V této bakalářské práci byla provedena elektrochemická oxidace modelové látky, za kterou byl zvolen lék canagliflozin jakožto látka podléhající chemickým i elektrochemickým oxidacím. Úkolem bylo zjistit, kolik degradačních produktů tímto typem oxidace vznikne a za jakých podmínek se vytvoří nejvíce degradačních produktů.

Pro analýzu oxidovaných vzorků byla použita převzatá chromatografická metoda. Nejdříve byla provedena kalibrace za účelem výpočtu meze detekce a kvantifikace a lineárního dynamického rozsahu. Hodnota meze detekce činila  $1,18 \cdot 10^{-4}$  mg/ml a meze kvantifikace  $3,95 \cdot 10^{-4}$  mg/ml. Koeficient linearity měření byl vypočten jako 1,004 a lineární dynamický rozsah byl v rozsahu koncentrací  $2 \cdot 10^{-4}$  až  $11 \cdot 10^{-1}$  mg/ml.

Poté probíhala elektrochemická oxidace canagliflozinu, který byl pro tyto účely rozpouštěn ve fosfátovém nebo acetátovém pufru o koncentracích 100-300 mM a pH hodnotách v rozmezí 4-6 ve směsi s methanolem. Oxidace probíhala za konstantního potenciálu 1,2 V. Měření se uskutečnilo v 15 experimentech kombinatorického redukovaného plánu za kombinace různých experimentálních podmínek. Měnily se následující parametry: typy pufrů, jejich hodnoty koncentrace a pH, tloušťka těsnění vkládaného před pracovní elektrodu a rychlost průtoku vzorku průtokovou celou.

Prostřednictvím statistického softwaru Modde 12 byly navrženy optimální podmínky, za kterých vzniklo největší množství nečistot. Jednalo se o kombinaci 100 mM fosfátového pufru o pH 4,0, tloušťky těsnění 50  $\mu$ m a průtokové rychlosti 0,05 ml/h. Pomocí Modde 12 bylo rovněž zjištěno, jak jednotlivé parametry ovlivňují experimentální prostor jako celek. Nejvíce byl experimentální prostor ovlivněn průtokovou rychlostí. Ostatní parametry (tloušťka těsnění, typ pufru, koncentrace a pH pufru) vykazovaly značně menší vliv na efektivitu elektrochemické oxidace. Dále bylo zjištěno, které parametry mají pozitivní a které negativní vliv na procentuální zastoupení nezdegradovaného canagliflozinu. Z analýzy vyplynulo, že s rostoucí průtokovou rychlostí klesá míra oxidace. Dále bylo zjištěno, že při použití fosfátového pufru probíhá oxidace ve větší míře než při použití acetátového pufru. Koncentrace a pH pufru byly posouzeny jako statisticky nevýznamné.

Ukázalo se, že canagliflozin podléhá elektrochemické oxidaci a vytváří 8 degradačních produktů s relativními retenčními časy 0,48, 0,50, 0,63, 0,67, 0,89, 0,90,

1,57 a 1,58. Nejvíce zastoupená byla nečistota s relativním retenčním časem 0,90 a nejméně zastoupenou se stala nečistota s relativním retenčním časem 1,58. Po uskutečnění tří ověřovacích měření za optimálních podmínek a následné separaci degradačních produktů vyšlo najevo, že za stejných experimentálních podmínek vznikly nečistoty všech tří měření v přibližně shodných poměrech, ale výsledný součet relativních ploch píků jednotlivých nečistot se při všech měřeních značně lišil.

## 5 Seznam použité literatury

1. Devineni D., et al.: Canagliflozin improves glycaemic control over 28 days in subjects with type 2 diabetes not optimally controlled on insulin. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, Volume 14, Issue 6, p. 539-545 (2012) [cit. 2019-10-09].
2. Assessment of Canagliflozin. European medicines agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMA/374133/2013 (2013) [cit-2019-12-02].  
Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/invokana-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/invokana-epar-public-assessment-report_en.pdf)
3. Bailey C. J.: Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes. *Trends in pharmacological sciences*, Volume 32, Issue 2, p. 63-71 (2011) [cit. 2019-12-02].
4. Dias B. C. L., et al.: A new HPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of SGLT2 inhibitors and metformin in plasma and its application to a pharmacokinetic study in healthy volunteers. *Biomedical Chromatography*, Volume 33, Issue 11 (2019) [cit. 2019-12-02].
5. Kobuchi S., Yano K., Ito Y., Sakaeda T.: A validated LC-MS/MS method for the determination of canagliflozin, a sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT-2) inhibitor, in a lower volume of rat plasma: application to pharmacokinetic studies in rats. *Biomedical Chromatography*, Volume 30, Issue 10, p. 1549-1555 (2016) [cit. 2019-12-02].
6. Iqbal M., Khalil N. Y., Alanazi A. M., Al-rashood K. A.: A simple and sensitive high performance liquid chromatography assay with a fluorescence detector for determination of canagliflozin in human plasma. *Analytical Methods*, Volume 7, Issue 7, p. 3028-3035 (2015) [cit. 2019-12-02].

7. Zaghary W. A., Mowaka S., Hendy M. S.: Comparative Liquid Chromatographic Study for Concurrent Determination of Canagliflozin and Metformin in Combined Tablets. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Volume 2017, p. 1-9 (2017) [cit. 2019-12-02].
8. Jane I., Mckinnon A., Flanagan R. J.: High-performance liquid chromatographic analysis of basic drugs on silica columns using non-aqueous ionic eluents. *Journal of Chromatography A*, Volume 323, Issue 2, p. 191-225 (1985) [cit. 2019-10-15].
9. Elektrochemické HPLC detektory-Electrochemical detectors. Hplc.cz [cit. 2019-11-26]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/EC\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html)
10. Karst U.: Electrochemistry/Mass Spectrometry (EC/MS) - A New Tool To Study Drug Metabolism and Reaction Mechanisms. *Angewandte Chemie International Edition*, Volume 43, Issue 19, p. 2476-2478 (2004) [cit. 2019-11-27]
11. Jahn S., Karst U.: Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry—Current state and future perspectives. *Journal of Chromatography A*, Volume 1259, p. 16-49 (2012) [cit. 2019-11-27].
12. Diehl G., Karst U.: On-line electrochemistry – MS and related techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 373, Issue 6, p. 390-398 (2002) [cit. 2019-11-27].
13. Van Berkel G. J., Zhou F.: Electrochemistry Combined Online with Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, Volume 67, Issue 20, p. 3643-3649 (2002) [cit. 2019-11-27].
14. Jurva U., Wikström H. V., Bruins A. P.: Electrochemically assisted Fenton reaction: reaction of hydroxyl radicals with xenobiotics followed by on-line analysis with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, Volume 16, Issue 20, p. 1934-1940 (2002) [cit. 2019-11-27].
15. Lohmann W., Karst U.: Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 391, Issue 1, p. 79-96 (2008) [cit. 2019-11-28].

16. Lohmann W., Baumann A., Karst U.: Electrochemistry and LC–MS for Metabolite Generation and Identification: Tools, *Technologies and Trends LCGC Europe*, Volume 23, Issue 1, p. 8-16 (2010) [cit. 2019-11-28].
17. Gram T.E., Gillette J. R.: Biotransformation of Drugs. *Fundamentals of Biochemical Pharmacology*. Amsterdam, Elsevier, p. 571-609, 1971 [cit. 2019-11-12].
18. Getek T. A., et al.: Utility of solution electrochemistry mass spectrometry for investigation the formation and detection of biologically important conjugates of acetaminophen. *Journal of Chromatography A*, Volume 474, Issue 1, p. 245-256 (1989) [cit. 2019-11-12].
19. Nozaki K. et al.: Investigation of the electrochemical oxidation products of zotepine and their fragmentation using on-line electrochemistry/electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, Volume 41, Issue 5, p. 606-612 (2006) [cit. 2019-11-13]
20. Van Leeuwen S. M., Blankert B., Kauffmann J. M., Karst U.: Prediction of clozapine metabolism by on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Volume 382, Issue 3, p. 742-750 (2005) [cit. 2019-11-13].
21. Baira S. M. et al.: Characterization of forced degradation products of canagliflozine by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and in silico toxicity predictions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 32, Issue 3, p. 212-220 (2018) [cit. 2019-10-09].
22. Guideline, ICH Harmonised Tripartite. "Stability testing of new drug substances and products." Q1A (R2), current step 4 (2003): 1-24.[cit. 2019-10-09]  
Dostupné z: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)
23. Baertschi S. W., Mills A. K., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. 2nd Ed., New York, Informa Healthcare, 2011.
24. Emam A. A., Abdelwahab N. S.: Stability-indicating chromatographic and chemometric methods for environmentally benign determination of canagliflozin and its major degradation product; A comparative study and greenness

- assessment. *Biomedical Chromatography*, Volume 33, Issue 10, p. 822-830 (2019) [cit. 2019-10-09].
25. Emam A. A.: Canagliflozin stability study and ecofriendly chromatographic determination of its degradation product: A comparative study. *Journal of Separation Science*. Volume 41, Issue 4, p. 822-830 (2018) [cit. 2019-10-09].
26. Anderson M. J., Whitcomb P. J.: Design of experiments. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, New Jersey, John Wiley & Sons, 2010 [cit. 2020-05-02].
27. United States Pharmacopoeial Convention, *United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34*. United States Pharmacopoeial, 2016 [cit. 2020-06-23]
28. PSTRace5, PalmSens. Dostupné z: <http://palmsens.com> [cit. 2020-05-02]
29. Statistický software Modde 12, Umetrics, Sartorius, Švédsko [cit. 2020-05-02]
30. Máchalová J.: *Studium nucené degradace canagliflozinu s využitím HPLC*. Diplomová práce, Univerzita Karlova, 2020. Vedoucí práce RNDr. Tomáš Křížek, Ph. D.
31. Mez detekce a mez stanovitelnosti. Hplc.cz [cit. 2020-03-22]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Tip/lod\\_loq.htm](http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm)
32. Eriksson L. et al.: *Design of Experiments, Principles and Applications*. 3rd Ed., Stockholm, Umetrics Academy, 2008 [cit. 2020-06-26]