

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Nikol Vlčková

Vývoj UHPLC metody pro stanovení abirateronu acetátu  
a jeho oxidativní degradace

Development of an UHPLC method for determination of  
abiraterone acetate and its oxidative degradation

Bakalářská práce

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

Praha 2021

## 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 14.6.2021

Podpis

## Abstrakt

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu UHPLC pro stanovení farmaceuticky aktivní látky abirateronu acetátu v jeho práškové formě a provést nucenou degradaci pomocí peroxidu vodíku a zvýšené teploty. Kvůli nízké rozpustnosti abirateronu acetátu ve vodě, byla jako rozpouštědlo použita směs acetonitrilu a vody v poměru 1:1.

Optimalizovaná separace probíhala na koloně Acquity CSH PHENYL-HEXYL (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm), jejíž teplota byla 45  $^{\circ}\text{C}$ , mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a 0,1 % vodného roztoku kyseliny mravenčí a průtok činil 0,3 ml/min, dávkovaný objem činil 1  $\mu\text{l}$  a byla použita gradientová eluce. Byl použit UV/VIS absorpční detektor s diodovým polem při vlnové délce 2665 nm a kvadrupólový hmotnostní detektor.

Při validaci metody se testovala opakovatelnost, výtěžnost a meze detekce a stanovitelnosti. Také byla stanovena kalibrační závislost v rozmezí koncentrací 0,1 -  $1 \cdot 10^{-4}$  mg/ml.

Nucená degradace byla provedena na dvou sadách vzorků. K jedné sadě byl přidán 0,3 % peroxid vodíku. Obě sady vzorků následně byly skladovány za laboratorních podmínek a v degradační komoře, která byla nastavena na 50  $^{\circ}\text{C}$  po 1, 2 a 3 dny. Abirateron acetát vykazoval mírnou míru degradace bez přidání peroxidu vodíku jak za laboratorních podmínek, tak při zvýšené teplotě. Vzorky, ke kterým byl přidán 0,3 % peroxid vodíku naopak vykazovaly zvýšenou míru degradace, jak za laboratorní, tak zvýšené teploty.

### Klíčová slova

UHPLC, degradace, abirateron acetát

## Abstract

Aim of this thesis was to develop and validate a method for determination of pharmaceutical active substance abiraterone acetate for UHPLC and also to perform forced degradation with 0,3 % hydrogen peroxide and elevated temperatures. Because of poor solubility of abiraterone acetate in water, mixture of acetonitrile of water in ratio of 1:1 was chosen as solvent.

Optimized separation was performed on the column Acquity CSH PHENYL-HEXYL (1.7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2.1 mm) and its temperature was 45 °C. Mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1 % aqueous solution of formic acid, flow of mobile phase was 0,3 ml/min, sample injection volume was 1  $\mu\text{l}$  and gradient elution was used. UV/VIS detector with diode array was used at the 265 nm wavelength. Quadrupole mass detector was used as well.

For validation of the method repeatability, recovery and limits of detection and quantitation were tested. Calibration dependence was tested in the concentration in range of 0.1-1 $\cdot$ 10<sup>-4</sup> mg/ml.

Forced degradation was carried out on two sets of samples. Hydrogen peroxide of 0.3 % mass concentration was added to one set. Both of the sets were exposed to laboratory temperature and to temperature of 50 °C for 1, 2, 3 days. Abiraterone acetate exhibited small extent of degradation without hydrogen peroxide in laboratory conditions as well as in increased temperature. On the other hand, samples with hydrogen peroxide showed more significant extent of degradation in both conditions.

### Key words

UHPLC, degradation, abiraterone acetate

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Tomáši Křížkovi, PhD. za odbornou pomoc cenné rady při řešení dané problematiky a neskonalou trpělivost při vpracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu, kterou mi při průběhu studia poskytli.

# Obsah

Seznam zkratk a symbolů .....	8
1. Teoretická část.....	10
1.1 Cíl práce .....	10
1.2 Abirateron acetát a Zytiga .....	10
1.2.1 Mechanismus účinku .....	10
1.3 UHPLC.....	11
1.3.1 HPLC vs UHPLC.....	11
1.3.2 Instrumentace UHPLC .....	12
1.4 Vývoj chromatografické metody .....	13
1.5 Validace metody .....	14
1.6 Degradční studie léčiv .....	16
1.6.1 Podmínky nucených degradací .....	17
1.6.2 Studie stanovení a degradace Abirateronu acetátu .....	19
2. Experimentální část.....	20
2.1 Použité chemikálie.....	20
2.2 Instrumentace .....	20
2.3 Určení rozpustnosti API.....	21
2.4 Příprava zásobního roztoku API.....	21
2.5 Chromatografické podmínky.....	21
2.6 Příprava vzorků pro kalibraci .....	22
2.7 Příprava vzorků pro oxidační degradaci.....	22
2.8 Analytické zpracování dat.....	22
2.8.1 Opakovatelnost .....	22
2.8.2 Meze detekce a kvantifikace .....	23
2.8.3 Výtěžnost .....	23
3. Výsledky a diskuse.....	24
3.1 Určení rozpustnosti API .....	24
3.2 Výběr chromatografických podmínek .....	26
3.3 Validace metody .....	34

3.3.1 Kalibrační závislost .....	34
3.4 Oxidativní degradace.....	36
Závěr .....	43
Seznam použité literatury.....	44

## Seznam zkratek a symbolů

### Použité zkratky

API .....	léčivá látka přípravku (z anglického <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> )
ATA1E .....	depyridinylabirateron3-acetát-17-hydrazon
C8 .....	oktyl
C18 .....	oktadecyl
CYP 17 .....	cytochrom P-17
DHEA .....	dehydroepiandrosteron
HPLC .....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
ICH .....	Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci léčivých přípravků pro humánní použití (z anglického <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> )
IUPAC .....	Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii (z anglického <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
LOD .....	limit detekce (z anglického <i>Limit of Detection</i> )
LOQ .....	limit stanovitelnosti (z anglického <i>Limit of Quantification</i> )
MS .....	hmotnostní spektrometr (z anglického <i>Mass Spectrometry</i> )
RP-LC .....	kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (z anglického <i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i> )
RV .....	relativní vlhkost
UHPLC .....	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> )
UV/VIS .....	ultrafialová a viditelná oblast záření

### Použité symboly

°C .....	stupně Celsia
μl .....	mikrolitr
σ .....	průměrná hodnota šumu
φ <sub>A</sub> .....	objemové zastoupení ACN v mobilní fázi
φ <sub>B</sub> .....	objemové zastoupení 0,1 % vodného roztoku kyseliny mravenčí v mobilní fázi
AU .....	arbitrární jednotka
mg/ml .....	miligram na mililitr
ml .....	mililitr



mm ..... milimetr  
m/z..... poměr hmotnosti ku náboji  
n..... počet měření  
nm..... nanometr  
 $R^2$ ..... koeficient determinace  
RDS..... relativní směrodatné odchylka (z anglického *Relative Standard Deviation*)  
s ..... směrodatná odchylka měření  
t..... čas  
t<sub>rel.</sub> ..... relativní retenční čas  
 $x_i$  ..... prvek ze statistického souboru o indexu i  
 $\bar{x}$ ..... aritmetický průměr hodnot signálů při počtu měření n

# 1. Teoretická část

## 1.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo vytvořit metodu stanovení farmaceuticky aktivní látky abirateronu acetátu, následně provést její nucenou oxidativní degradaci a stanovit míru degradace a určit nejvýznamnější degradační produkty.

## 1.2 Abirateron acetát a Zytiga

Abirateron acetát (struktura znázorněna na Obr. 1.1) je pevná látka bílé barvy s molekulovou hmotností 391,55 g/mol, hodnota pKa se v různých zdrojích ([1,2]) uvádí kolem hodnoty 5,2. Jeho empirický vzorec je  $C_{26}H_{33}NO_2$  a název dle IUPAC je [(3S,8R,9S,10R,13S,14S)-10,13-dimethyl-17-pyridin-3-yl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15-decahydro 1H cyklopenta[a]phenanthren- 3yl] acetate.[1]

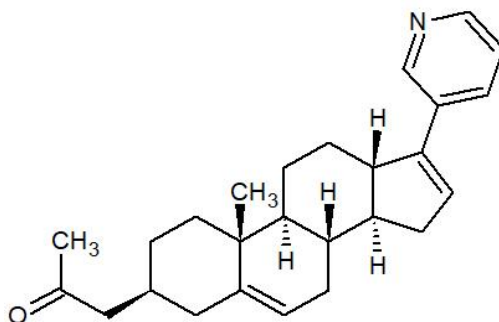
Zytiga® je lék na předpis, který se užívá zároveň s prednisonem. Tento lék obsahuje aktivní látku abirateron acetát a používá se na léčbu rakoviny prostaty, která se rozšířila do dalších částí těla. Tento lék vyrábí firma Janssen Biotech, Inc. [2]

### 1.2.1 Mechanismus účinku

Abirateron acetát je selektivní a ireverzibilní inhibitor CYP17. Je to enzym, který se nachází v endoplazmatickém retikulu buněk varlat, vaječníků a nadledvin a podporuje produkci sexuálních hormonů a glukokortikoidů. CYP17,20-lyázová a 17 $\alpha$ -hydroxylázová aktivita tohoto enzymu má zásadní roli v syntéze androgenů a kortisolu. [3]

Rakovina prostaty závisí na androgenech, z nichž 95 % tvoří testosteron, který se vytváří hlavně ve varlatech a zbytek se tvoří v nadledvinách. Při vstupu do varlat je volný testosteron přeměněn na dihydrotestosteron, která má pětinašobnou afinitu k androgenovým receptorům než k testosteronu. Růst rakoviny prostaty je závislý na množství androgenů v těle, které pomáhá udržovat rovnováhu v prospěch růstu buněk oproti apoptóze. [4]

Inhibice enzymatické aktivity CYP17 pomocí Abirateronu acetátu má za následek snížení hladiny androgenů a snížení periferní přeměny na účinnější androgeny jako je testosteron a také dihydrotestosteron, které jsou schopny aktivace androgenových receptorů. [5]



Obr 1.1 Struktura abirateronu acetátu vytvořená v programu ChemSketch [6].

### 1.3 UHPLC

UHPLC (Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je relativně nová chromatografická metoda, která byla vytvořena roku 1997 panem Jorgensonem. Popsal použití nano kolon s malými (1-1,5  $\mu\text{m}$ ) neporézními částicemi na bázi oxidu křemičitého v systému kompatibilním s vysokými tlaky (až 4100 barů v roce 1997 a 7200 barů v roce 2003). V roce 2004 firma Waters sestavila a uvedla na trh systém kompatibilní s tlakem až 1000 barů. Tato technika také poskytuje nové možnosti pro kapalinovou chromatografii, hlavně týkající se snížení času a spotřeby rozpouštědel. [7, 8]

#### 1.3.1 HPLC vs UHPLC

HPLC je jedna z nepoužívanějších a také nejvyspělejších separačních metod, která je celosvětově používaná už více než 40 let. Svou popularitu si získala hlavně díky spolehlivosti a také všestrannosti (možnost upravovat složení mobilní fáze a měnit kolony s různou stacionární fází). Hlavní princip chromatografické separace závisí na interakcích analytu se stacionární fází a mobilní fází (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt). U klasické metody HPLC však v řadě případů dochází k relativně dlouhé době analýzy. Zmenšení částic v koloně vede ke zvýšení účinnosti a rozlišení a také schopnosti pracovat s kratší dobou analýzy, což dalo vzniku metodě UHPLC. Kromě již zmíněných výhod UHPLC proti HPLC (také viz. 1.3.) patří mezi tyto výhody zvýšená citlivost díky ostřejším a vyšším píků analyzovaných látek a také asi 10 $\times$  menší objem nástřiku vzorku. Naopak mezi nevýhody patří nižší životnost kolony zapříčiněna právě vyššími tlaky, které se při UHPLC používají. [9, 10]

### 1.3.2 Instrumentace UHPLC

Jak už bylo řečeno v předchozím odstavci (1.3.1), metoda UHPLC vychází z metody HPLC, takže instrumentace obou metod bude velmi podobná. Základní prvky instrumentace těchto metod jsou čerpadla, vstřikovače, kolony a detektory. Avšak instrumentace UHPLC musí být přizpůsobena jiným podmínkám, aby mohly být využity výhody této metody. [11]

#### 1.3.2.1 Čerpadla

Ideální čerpadlo pro UHPLC musí dopravit mobilní fázi a analyzovaný vzorek do kolony plynule a reprodukovatelně při tlaku kolem 1000 barů při gradientové i isokratické separaci. U této metody se nejčastěji používají dvě sériově zapojená čerpadla s tlakovým limitem 1200 bar, které mají zabudované ventily, jenž umožňují vybrat přesný poměr rozpouštědel použité pro mobilní fázi. [10, 11]

#### 1.3.2.2 Dávkovače

Dávkování vzorku musí také proběhnout plynule, přesně, a aby došlo k ochraně kolony před vysokými tlaky musí také dávkování proběhnout bez pulsů. K využití rychlosti poskytované UHPLC je nutné, aby cyklus dávkování byl co nejrychlejší. Objem dávkovaného vzorku se obvykle pohybuje mezi 2-5  $\mu\text{l}$ . [12]

#### 1.3.2.3 Kolony

V UHPLC se používají kolony s menším vnitřním průměrem (1-2,1 mm) než v HPLC (3-4,6 mm). Tento rozdíl snižuje zahřívání mobilní fáze způsobené třením, které může zapříčinit nerovnoměrný tok mobilní fáze, což má na následek ztrátu efektivity metody.

Částice náplně jsou také porézní a mohou odolávat vysokým tlakům, aby byla zachována retence a kapacita podobná HPLC. Jedná se obvykle o částice na bázi oxidu křemičitého, které jsou mechanicky odolné, ale dají se použít pouze v omezeném rozsahu pH a zadržují bazické analyty. Jako náplň kolon se také používají polymerní částice, ty se na druhou stranu dají použít pro velký rozsah pH, ale mají nižší účinnost a kapacitu.

Na tyto porézní částice jsou ještě navázané stacionární fáze (např. fenyl, fenyl- hexyl, C8, C18 atd.), které vykazují různé interakce s analyty, jako jsou např. hydrofobní, dipól-dipól,  $\pi$ - $\pi$ , iontové a jiné interakce. Na základě těchto rozdílných interakcí mezi analytem a stacionární fází, vykazují tyto stacionární fáze různou selektivitu. [10, 13]

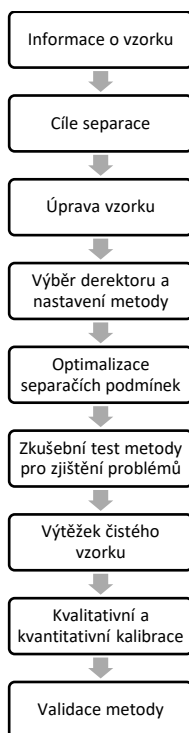
### 1.2.3.4 Detektory

Detektory používané pro metodu UHPLC by pro přesnou a reprodukovatelnou integraci píku analytu měly poskytnout vysokou vzorkovací frekvenci, aby mohlo být dosaženo co nejvíce datových bodů píku analytu. Tyto detektory jsou také 2-3 × citlivější než detektory u HPLC v závislosti na typu použitého detektoru.

Nejpoužívanější typy detektorů jsou UV/VIS detektory, které jsou citlivé na koncentraci. Dále se používají hmotnostní spektrometrické detektory (MS), jejichž detekce je metodou UHPLC vylepšena. [10, 13]

## 1.4 Vývoj chromatografické metody

Jelikož UHPLC je vylepšená a zmodernizovaná verze HPLC, většina postupů při vývoji metody v HPLC je s ohledem na jejich rozdíly, obecně použitelná také pro UHPLC. Vývoj chromatografické metody slouží převážně pro nové látky, které zatím nemají vyvinutou metodu stanovení, nebo také slouží k úpravě již existující metody, pro snížení nákladů a času či pro zpřesnění dané metody. [14, 15]



Obr. 1.2 Základní kroky pro vývoj metody HPLC [15]

Z kroků uvedených na Obr. 1.2 jsou nejdůležitější informace o vzorku a jeho úprava, chromatografické podmínky, optimalizace metody a její validace. [15]

Informace o fyzikálně-chemických vlastnostech vzorku má zásadní vliv na vývoj metody. Pro vývoj metody je třeba znát informace o vlastnostech vzorku jako jsou rozpustnost, polarita, pKa a také pH. Podle polaritě se určuje složení mobilní fáze, a také na ni závisí volba rozpouštědla vzorku. Na základě kyselosti či bazicity analytů lze stanovit hodnotu pH pro jejich ionizaci. [16]

Cíle metody musí být vystiženy velmi přesně. Tyto cíle se dají vytyčit odpověďmi na otázky jako jsou např. Je primárním cílem kvantitativní analýza, detekce nežádoucí látky, charakterizace neznámé látky nebo izolace čisté látky? Jestliže je nutná kvantitativní analýza, jaká úroveň přesnosti je nutná? Pro kolik různých vzorových matric má být metoda navržena? Kolik vzorků má být měřeno zároveň? Ještě před samotným vývojem dané metody, by měly být přibližně určeny základní požadavky, které tato metoda bude vyžadovat. [17]

Při úpravě vzorku před samotnou analýzou je hlavním cílem odstranění nerozpustných nečistot pomocí filtrace, odstředěním a také extrakcí (na pevné či kapalné fázi). [15]

Výběr chromatografických podmínek (nastavení metody) závisí na molekulové hmotnosti analytu a jeho polaritě. Nejběžnější režim pro malé organické molekuly je chromatografie na reverzní fázi (RP-LC), ionizovatelné molekuly jsou často separovány pomocí RP-LC s mobilními fázemi obsahující pufr nebo s činidly pro párování iontů. Další prvky patřící do této části vývoje metody jsou výběr mobilní a stacionární fáze, detektoru, typu pufru a jeho pH atd.

Optimalizace HPLC metody se hlavně zaměřuje na zlepšení chromatografických podmínek. Aby byl počet zkušebních měření co nejmenší, jsou zkoumány pouze parametry, které ovlivňují převážně selektivitu. Primárně se optimalizuje mobilní fáze, její složky, pH, gradient či průtok. Dále jsou to podmínky jako je teplota kolony či objem vzorku. U optimalizace stacionární fáze lze měnit typ fáze a rozměry částic. Cílem je nalezení rovnováhy mezi dobou analýzy a rozlišením metody. [16]

## **1.5 Validace metody**

Validace analytické metody je proces, kterým se pomocí laboratorních studií prokazuje, že funkční charakteristiky dané metody splňují požadavky na její zamýšlené použití. Tento proces začíná plánovaným a systematickým shromažďováním údajů na ověření analytických postupů. Pro validaci metody se používají postupy podle Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci léčivých přípravků pro humánní použití (ICH). [18]

Během procesu validace je nutné podle nynějších regulačních postupů prostudovat tzv. validační parametry. Mezi tyto parametry patří:

- Přesnost
- Preciznost
- Opakovatelnost
- Linearita
- Robustnost
- Selektivita
- Rozsah metody
- Limit detekce a kvantifikace
- Směrodatná odchylka
- Degradční studie [17, 18]

Přesnost metody vyjadřuje stupeň shody mezi hodnotou, která je akceptována jako konvekční či referenční hodnota a naměřenou hodnotou. Tato vlastnost metody má inverzní vztah vůči náhodným i systematickým chybám. Obvykle se preciznost stanoví pomocí analýzy vzorku o známé čistotě (referenční materiál), metodou standardního přídatku atd. [16]

Preciznost metody vyjadřuje stupeň rozptylu mezi sérií naměřených hodnot získaných z více měření stejného homogenního vzorku v rámci předem stanovených podmínek. Správnost metody lze rozdělit na tři úrovně: opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost. [15]

Opakovatelnost je odhad přesnosti metody, kdy je stejný vzorek mnohonásobně analyzován za stejných podmínek, stejným přístrojem a v krátkém časovém intervalu. Vypočítává se hodnota výtěžku metody. [18]

Linearita metody je schopnost (v daném rozsahu) získání odezvy, která je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Je také nezbytné určit rozsah ve kterém odezva odpovídá koncentraci analytu. Linearita se určuje pomocí kalibrační řady různých koncentrací standardů analytu. Píky jednotlivých vzorků (výšky nebo plocha) se integrují a tyto hodnoty se vynesou v grafu jako osa Y oproti hodnotám koncentrací vzorků jako osa X. Z těchto hodnot se vytvoří lineární regrese, jejíž koeficient determinace ( $R^2$ ) udává její kvalitu. Jako důkaz přijatelnosti linearity se považuje hodnota  $R^2$  stejná či vyšší než 0,998. [15]

Robustnost je schopnost analytické metody zůstat nezměněna malou, ale záměrnou odchylkou v parametrech metody jako jsou odchylka v pH, složení mobilní fáze, teplotě a nastavení přístroje. Robustnost poskytuje důkaz o spolehlivosti metody za běžného používání. [18, 19]

Selektivita je schopnost metody jednoznačně určit analyt ve vzorku, kde mohou být další látky, jako jsou nečistoty, degradační produkty či pomocné látky. Tato vlastnost se ověřuje porovnáním výsledků analýzy vzorků obsahující nečistoty či degradační produkty a výsledků analýzy pouze analytu bez nečistot nebo degradačních produktů. [15, 18]

Rozsah analytické metody vyjadřuje interval mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací analytu ve vzorku (včetně těchto koncentrací), pro které bylo prokázáno, že analytická metoda poskytne vhodnou úroveň přesnosti, správnosti a linearity. [19]

Limit detekce metody je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze stále detekovat, ale nemusí být vždy kvantifikovatelná. Limit kvantifikace je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze kvantifikovat s určitou přesností a správností. [15]

Mezilehlá přesnost vyjadřuje rozdíly v laboratořích, jako jsou např. různé přístroje, různí analytici. Tato přesnost se poté vyjadřuje jako směrodatná odchylka. [18]

## **1.6 Degradací studie léčiv**

Degradací studie léčiv jsou dlouho považované za důležitou část procesu vývoje léčiv. Jsou také hlavním nástrojem pro odhadnutí problémů se stabilitou, vývoje analytické metody a určení degradačních produktů a degradačních drah. [20]

Nucená degradace je proces, který zahrnuje degradaci léčiv za podmínek drastičtějších, než jsou u zrychlené degradace, a tím se generují produkty rozkladu, které mohou být studovány za účelem stanovení stability molekuly. Pokyny ICH pro nucené degradační studie jsou poměrně obecné a neposkytují podrobnosti o praktickém přístupu k nucené degradaci. [21]

Studie nucené degradace nabízejí následující informace:

- Stanovení pravděpodobných degradačních produktů.
- Stanovení degradačních drah.
- Stanovení vnitřní stability molekuly léčiva.
- Stanovení ověřené stability indikující analytické metody. [22]

Studie stability se používají k testování léčivého přípravku po delší dobu za různých podmínek. Studie stability jsou převážně 4 typů, dlouhodobé studie, střednědobé studie, zrychlené studie a studie v reálném čase.



Tabulka 1.1 Typy studií stability s podmínkami skladování a dobou trvání. RV znamená relativní vlhkost

Typy studií stability	Podmínky skladování	Doba trvání (měsíce)
Dlouhodobé	25±2 °C a 60±5 % RV nebo 30±2 °C a 65±5 % RV	12
Střednědobé	30±2 °C a 65±5 % RV	6
Zrychlené	40±2 °C a 75±5 % RV	6

Dlouhodobé studie stability se provádějí testováním vzorku ve specifických časových intervalech a podmínky externích parametrů se odpovídajícím způsobem mění. Hlavním cílem těchto studií je určení doby použitelnosti daného přípravku. [23]

Při zrychlených studiích je vzorek stresován podmínkami, který jsou vyšší než okolí (např. vyššími teplotami, než je laboratorní teplota). Tyto podmínky jsou nastaveny, aby se zrychlila degradace dané látky. Tyto informace se následně promítnou v předpovědi trvanlivosti nebo se používají k porovnání relativní stability alternativních formulací. [24]

### 1.6.1 Podmínky nucených degradací

Nejčastějšími mechanismy degradace při studiích stability jsou hydrolýza, oxidace, tepelná degradace a degradace světlem. K dosažení požadovaného stupně degradace je nutné zvolit vhodné podmínky (např. vhodná koncentrace kyseliny, zásady či výběr vhodného oxidačního činidla), kombinovaný stres a doba expozice. Nadměrná degradace vzorku může vést k dalším degradačním procesům, nečistotám a tvorbě sekundárních degradačních produktů, ty by nebylo možné zpozorovat při studiích v reálném čase. Nadměrná degradace může také vést k chybné interpretaci výsledků hmotnostní bilance, kvůli neznámému faktoru odezvy neznámých nečistot. Obecně doporučená hranice degradace se pohybuje mezi 5-20 %. [25]

Tabulka 1.2 Podmínky pro jednotlivé degradační mechanismy. ICH určují podmínky pro fotolýzu, kdy vzorky by měly být vystaveny světlu poskytující průměrné osvětlení ne více než 1,2 milionu lux, ultrafialovému záření o energii 200 watt/hodina/m<sup>2</sup> se spektrálním složením 320-400 nm. [21] Zkratka API znamená aktivní farmaceutické substance.

Typ degradace	Experimentální podmínky	Podmínky skladování	Doba trvání (dny)
Hydrolýza	Pouze API (bez kyseliny či zásady)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	0,1 M HCl	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	0,1 M NaOH	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Pouze kyselina (bez API)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Pouze zásada (bez API)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	pH o hodnotách 2,4,6,8	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
Oxidace	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Pouze peroxid (bez API)	25 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Azobisisobutyronitril (AIBN)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Pouze AIBN (bez API)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
Fotolýza	Světlo 1 x ICH	/	1, 3, 5
	Světlo 3 x ICH	/	1, 3, 5
	Kontrola světla pomocí 3 x ICH	/	1, 3, 5
Tepelná	Tepelná komora	60 °C	1, 3, 5
	Tepelná komora	60 °C a 75 % RV	1, 3, 5
	Tepelná komora	80 °C	1, 3, 5
	Tepelná komora	80 °C a 75 % RV	1, 3, 5
	Kontrola tepla	Laboratorní telota	1, 3, 5

### 1.6.2 Studie stanovení a degradace Abirateronu acetátu

V americkém lékopise byl abirateron acetát stanoven pomocí kapalinové chromatografie. Byl rozpuštěn v acetonitrilu, jako mobilní fáze byla zvolena směs 10mM octanu sodného ve vodě, acetonitril a ethanol v poměru 50:20:30. Vzorek o objemu 10 µl byl hnán průtokem 0,45 ml/min kolonou se stacionární fází C18 o teplotě 15 °C a rozměrech 3 mm × 15 cm; 3 µm. Jako detektor byl použit UV detektor a vlnová délka byla nastavena na 254 nm. Doba této analýzy byla 70 minut. [26]

V další literatuře, jako je například článek z roku 2016 publikován B. Jalou, Chandra Reddym a N.C. Saradou, autoři vytvořili metodu HPLC za použití kolony Hypersil ODS C-18 (150 × 4,6 mm, 5 µm), jejich mobilní fáze se skládala z 0,1 % fosfátového pufru a acetonitrilu v poměru 40:60 a průtok byl 1 ml/min. Teplota kolony byla 30 °C a UV detektor byl nastaven na 235 nm a objem vzorku byl 20 µl. Kromě jiných druhů degradace se zabývali degradací abirateronu acetátu pomocí peroxidu vodíku, kdy 1 ml 30 % peroxidu přidali ke vzorku o objemu 1 ml a nechali vzorek oxidovat po dobu 12 hodin v 60 °C. Z jejich experimentu vyplynulo, že abirateron acetát je za daných podmínek stabilní. [27]

Další, kteří se zabývali tímto tématem jsou Kavitaapu, A. Maruthapillai, S. Mahapatra a J. A. Selvi. Tato skupina publikovala článek v roce 2021. Při vytváření metody použili kolonu Kinetex C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm). Mobilní fáze A byla tvořena dihydrogenfosforečnanem draselným o koncentraci 1 g/l, který byl upraven na přibližné pH o hodnotě 3,1±0,05 pomocí zředěné kyseliny ortofosforečné. Mobilní fáze B byl acetonitril. Objem měřeného vzorku byl 10 µl a teplota kolony byla 40 °C. Průtok během analýzy, která trvala 65 min, byl 0,8 ml/min. Jako detektor byl zvolen fotodiodový detektor při 205 nm. Pro oxidaci abirateronu acetátu zvolili vzorek o hmotnosti 0,1 g, který byl rozpuštěn 5 ml 30 % peroxidu vodíku, který byl ponechán v laboratorní teplotě v úplné tmě po dobu 25 hod. Výsledkem této studie bylo, že abirateron acetát se za daných podmínek degradoval z 5,37 %. Mezi degradační produkty, které identifikovali patří dimer abirateronu acetátu, abirateron a jeho dimer, hydroxy DHEA, DHEA acetát, ATA1E, N-acetyl ATA1E, hydroxy ATA1E, dimer diacetoxilu, hydroxy ATA2E a také oxid trifenylofosfátu (viz Seznam zkratk a symbolů) [28]

Ve stejném roce publikovali článek S. Beg, A. K. Malik a další. Ti ve své studii použili kolonu Hypersil BDS C<sub>18</sub> (250 × 4 mm, 5 µm). Složkou mobilní fáze A (vodná fáze) byla směs vody a 0,1 % ortofosforečné kyseliny, fáze B (organická fáze) se skládala z acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, teplota kolony činila 25 °C a UV detektor byl nastaven na 250 nm. Pro oxidaci abirateronu acetátu byl také použit peroxid vodíku, kdy se k 1 ml vzorku o koncentraci 100 µg/ml přidal 1 ml 1 % peroxidu vodíku. Tento vzorek se ponechal ve vodní lázni o teplotě 80 °C na 1 hodinu. Z této studie vyplynulo, že za daných podmínek se Abirateron acetát nedegradoval. [29]

## 2. Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie

Acetonitril CHROMASOLV<sup>®</sup>, FOR HPLC, gradient grade  $\geq 99,9\%$ , Honeywell, Francie

Methanol CHROMASOLV<sup>®</sup>, FOR HPLC, gradient grade  $\geq 99,9\%$ , Honeywell, Francie

Kyselina mravenčí, reagent grade,  $\geq 95\%$ , Sigma- Aldrich, Německo

Peroxid vodíku 30%, p.a., Penta, Česká republika

Abirateron acetát, Zentiva a.s.

Deionizovaná voda připravena na přístroji Milli Q o měrném elektrickém odporu  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$

### 2.2 Instrumentace

Acquity H- class UPLC s UV/VIS absorpčním detektorem s diodovým polem a QDa hmotnostním detektorem, Waters, USA

Ultrazvuková lázeň, Elma, S15 Elmasonic, Německo

Analytické váhy, 262 SMA-FR, Presica, Švýcarsko

Homogenizátor VORTEX, Chromservis, Česká republika

Chromatografická kolona KINETEX C18 ( $1,7 \mu\text{m}$ ,  $100 \times 2,1 \text{ mm}$ )

Chromatografické kolona Acquity UPLC BEH C18 ( $1,7 \mu\text{m}$ ,  $100 \times 2,1 \text{ mm}$ )

Chromatografické kolona Acquity UPLC CSH PHENYL-HEXYL ( $1,7 \mu\text{m}$ ,  $100 \times 2,1 \text{ mm}$ )

Degradační komora, Memmert Humidity Chamber HCP, Memmert, Německo

### **2.3 Určení rozpustnosti API**

Na analytických vahách se do vialek navážilo po 1 mg vzorku abirateronu acetátu. Tyto vzorky byly následně rozpouštěny ve směsích MeOH, ACN, deionizované vody a kyseliny mravenčí (viz Tabulka 3.1), následně byly všechny vzorky homogenizovány pomocí vortexu po dobu 5 minut.

### **2.4 Příprava zásobního roztoku API**

Zásobní roztok standardu byl připraven tak, aby jeho koncentrace činila 0,1 mg/ml. Na analytických vahách se navážilo 10 mg API, která se následně rozpouštěla ve směsi acetonitrilu a deionizované vody v poměru 1:1. Pro úplné rozpuštění API se zásobní roztok nechal po dobu 5 minut homogenizovat v ultrazvukové lázni.

### **2.5 Chromatografické podmínky**

Podle článku z roku z roku 2013 od A. Khedra, I. Darwische, a F. Bamana, kteří se zabývali degradační studií abirateronu, byl zvolen jako organická fáze (složka A) acetonitril a jako vodná fáze (složka B) 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí. [30] Byla použita gradientová eluce, optimalizovaný program gradientu je uveden v Tabulce 2.1.

Pro stanovení abirateronu acetátu v experimentální části byly vyzkoušeny tři kolony, první byla kolona Kinetex C18 (1,7  $\mu$ m, 100  $\times$  2,1 mm), druhá byla kolona Acquity BEH C18 (1,7  $\mu$ m, 100  $\times$  2,1 mm) a třetí kolona Acquity CSH PHENYL-HEXYL (1,7  $\mu$ m, 100  $\times$  2,1 mm), dávkovaný objem vzorku činil 1  $\mu$ l. Průtok mobilní fáze po dobu analýzy byl 0,3 ml/min. Teplota autosampleru byla 5 °C. Původní teplota kolony byla 30 °C a poté byla zvýšena na 45 °C. Jako detektor byl použit absorpční detektor s diodovým polem, zvolená vlnová délka detekce byla 265 nm a v průběhu měření byl také přidán hmotnostní detektor.

Tabulka 2.1 Gradientový program, podle kterého se změnilo zastoupení organické a vodné mobilní fáze v průběhu analýzy.  $\Phi_A$  označuje organickou fázi obsahující ACN a  $\Phi_B$  označuje vodnou fázi obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí.

t (min)	$\Phi_A$ (%)	$\Phi_B$ (%)
0	30	70
1	30	70
9	80	20
11	80	20
12	30	70
14	30	70

## 2.6 Příprava vzorků pro kalibraci

Vzorky pro měření kalibrační závislosti byly připraveny ze zásobního roztoku API. Do 10 ml odměrných baněk bylo odpipetován určitý objem zásobního roztoku a ten byl následně zředěn směsí ACN a vody v poměru 1:1 na výsledných 10 ml. Koncentrace jednotlivých vzorků činily 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,01,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  mg/ml.

## 2.7 Příprava vzorků pro oxidační degradaci

Vzorky pro oxidační degradaci byly připraveny tak, že do vzorků ze zásobního roztoku a vzorků rozpouštědla bylo odpipetováno množství 30 % peroxidu vodíku, aby jeho výsledná hmotnostní koncentrace činila 0,3 %. Vzorek pro každý typ podmínek byl připraven 3×. Jedna sada vzorků byla ponechána v laboratorní teplotě a druhá byla vložena do degradační komory, která byla nastavena na 50 °C. Vzorky byly v těchto podmínkách ponechány po dobu 1,2 a 3 dnů a poté nechány v mrazáku, který byl nastaven na -20 °C, než byly vzorky změřeny.

## 2.8 Analytické zpracování dat

### 2.8.1 Opakovatelnost

Pro opakovatelnost byl připraven vzorek ze zásobního roztoku API, do něhož se přidalo množství 30% roztoku peroxidu vodíku, tak aby jeho výsledná hmotnostní koncentrace činila 0,5 %. Tento vzorek byl pak po dobu 6 hodin ponechán v degradační komoře v 50 °C. Potom byl tento vzorek 7× změřen.

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí směrodatné odchylky a také relativní směrodatné odchylky.

Vzorec pro směrodatnou odchylku

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.1)$$

kde  $s$  vyjadřuje směrodatnou odchylku měření,  $x_i$  vyjadřuje prvek ze statistického souboru  $i$ ,  $\bar{x}$  vyjadřuje aritmetický průměr hodnot signálu a  $n$  vyjadřuje počet měření.

Vzorec pro relativní směrodatnou odchylku

$$s_r = 100 * \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \quad (2.2)$$

kde  $s_r$  (RSD) vyjadřuje relativní směrodatnou odchylku měření v procentech.

### 2.8.2 Meze detekce a kvantifikace

Pro mez detekce a kvantifikace byl jako první změřen vzorek pouze rozpouštědla, čili směs ACN a vody v poměru 1:1. Na chromatogramu pak byla odečtena hodnota šumu. Pak obě meze byly vypočteny pomocí následujících vzorců.

$$LOD = \frac{3,3 * \sigma}{\alpha} \quad (2.3)$$

$$LOQ = \frac{10 * \sigma}{\alpha} \quad (2.4)$$

kdy  $\sigma$  vyjadřuje průměrnou hodnotu šumu z chromatogramu rozpouštědla a  $\alpha$  vyjadřuje směrnici přímky závislosti výšky píku na koncentraci API.

### 2.8.3 Výtěžnost

Pro výtěžnost byly připraveny 2 vzorky ze zásobního roztoku API jeho zředěním na koncentrace 0,07 mg/ml a  $3 \cdot 10^{-3}$  mg/ml. Výsledky po oba vzorky byly vypočteny dosazením do vzorce rovnice přímky kalibrační řady.

### 3. Výsledky a diskuse

#### 3.1 Určení rozpustnosti API

Před samotnou analýzou API bylo potřeba určit její přibližnou rozpustnost a v jakých rozpouštědlech se rozpouští. Rozpustnost byla testována odvážením 1 mg API a tato navážka byla následně rozpouštěna ve 2 ml rozpouštědla či směsi rozpouštědel, a pak byl celkový objem zvýšen na 10 ml, po 5-ti minutové sonikaci byla rozpustnost hodnocena vizuálně. (viz Tab. 3.1). Jako první byla testována rozpustnost ve 2 ml deionizované vody, kdy se API nerozpustila. Dále byly k navážce přidány 2 ml ACN a 2 ml MeOH, zde bylo pozorováno u obou případů rozpuštění navážek API. Při přidání 1 ml ACN a 1 ml deionizované vody, stejně tak u směsi 1 ml deionizované vody a 1 ml MeOH, a také u 1 ml MeOH a 1 ml 0,1 % vodného roztoku kyseliny mravenčí nebylo pozorováno rozpuštění API. Avšak po přidání směsi 1 ml ACN a 1 ml 0,1% kyseliny mravenčí bylo pozorováno rozpuštění směsi. Následně se celkový objem vzorku zvýšil na 10 ml a navážka byla rozpouštěna v 5 ml ACN a 5 ml deionizované vody a bylo pozorováno rozpuštění navážky. Následně se API rozpustila ve směsi 3 ml ACN a 7 ml deionizované vody, kde byl pozorován zákal. Poslední směs pro rozpuštění API byla vytvořena smícháním 4 ml ACN a 6 ml deionizované vody, kde se pozorovalo rozpuštění směsi. Po zhodnocení výsledků byla jako rozpouštědlo zvolena směs ACN a deionizované vody v poměru 1:1.

Pozorované jevy při stanovování rozpustnosti API lze shrnout následovně. API se dobře rozpouští jak v ACN tak i v MeOH, ale je málo rozpustná ve vodě. Ve směsi vody a ACN bylo pozorováno zvýšení rozpustnosti po okyselení vodné složky o 0,1 % roztok kyseliny mravenčí. Pro rozpuštění API o koncentraci 0,1 mg/ml ve směsi ACN a vody je zapotřebí aspoň 40 % (v/v) obsah ACN.



Tabulka 3.1 Určování rozpustnosti API v jednotlivých rozpouštědél či jejich směsí

[ACN] ml	[H <sub>2</sub> O] ml	[MeOH] ml	[0,1% K.M.] ml	Rozpustnost vzorku o hmotnosti 1 mg
–	2	–	–	nerozpustný
2	–	–	–	rozpustný
–	–	2	–	rozpustný
1	1	–	–	nerozpustný
–	1	1	–	nerozpustný
1	–	1	–	nerozpustný
–	–	1	1	nerozpustný
1	–	–	1	rozpustný
5	5	–	–	rozpustný
4	6	–	–	rozpustný
3	7	–	–	nerozpustný

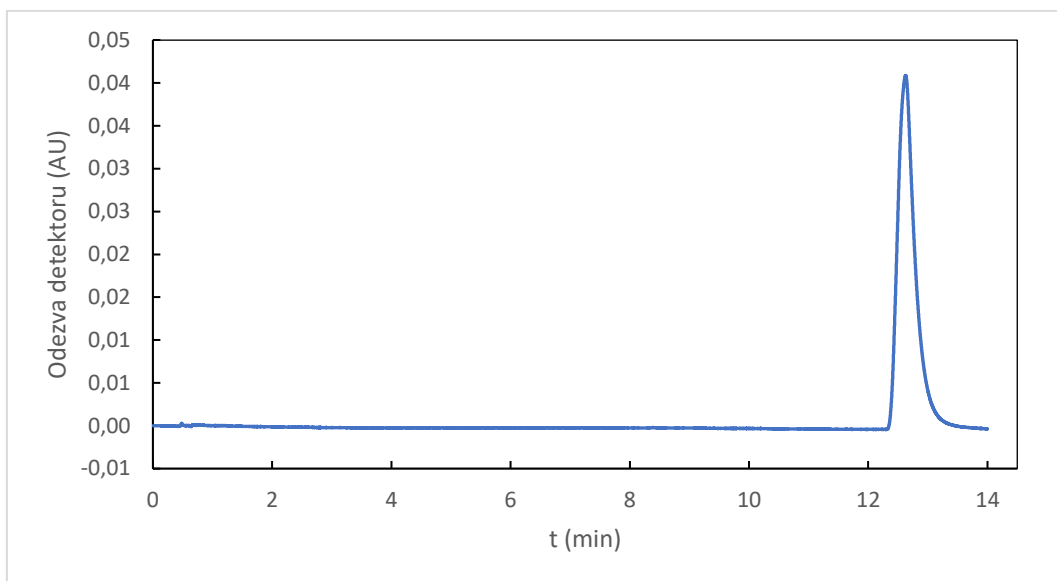
### 3.2 Výběr chromatografických podmínek

Pro výběr kolony byly k dispozici chromatografická kolona KINETEX C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm), chromatografická kolona Acquity BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm) a chromatografická kolona Acquity CSH PHENYL-HEXYL (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm). Jako první byla testována kolona KINETEX, na které se i testovalo retenční chování abirateronu acetátu v různém složení mobilní fáze.

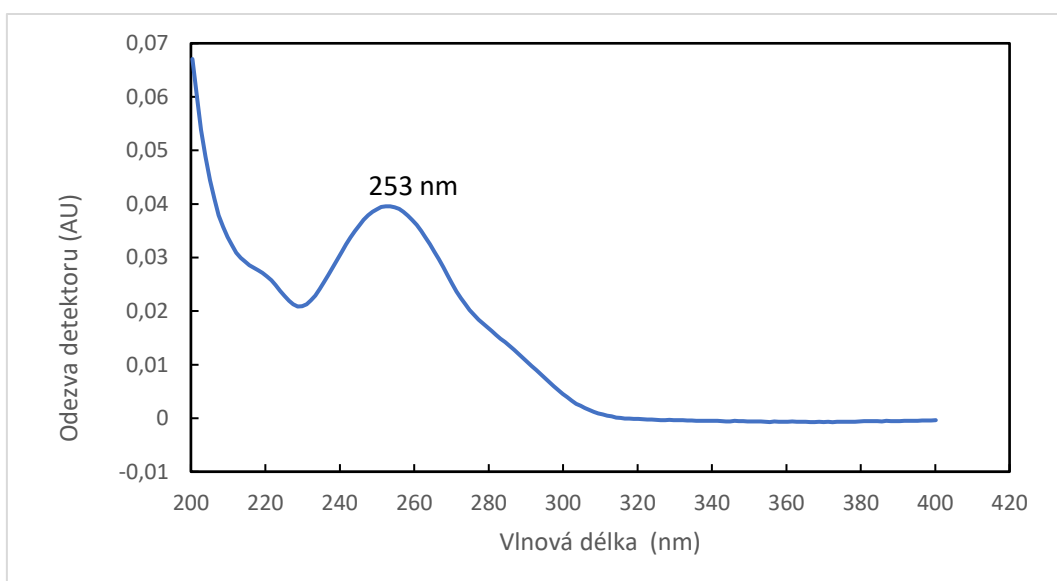
Pro separaci byla zvolena gradientová eluce dle tabulky 3.2, ta v porovnání s izokratickou elucí umožňuje pokrýt širší rozsah polaritý případných degradačních produktů. Při testování retenčního chování abirateronu acetátu byly provedeny dvě gradientové eluce, kdy první eluce byla provedena za složení mobilní fáze, která obsahovala ACN a deionizovanou vodu. Druhé složení obsahovalo ACN a 0,1 % vodný roztok kyseliny mravenčí.

Tabulka 3.2 Gradientový program, podle kterého se měnilo zastoupení organické a vodné části mobilní fáze v průběhu analýzy.  $\Phi_A$  označuje organickou část mobilní fáze (ACN) a  $\Phi_B$  označuje vodnou část mobilní fáze (deionizovanou vodu či 0,1 % vodný roztok kyseliny mravenčí).

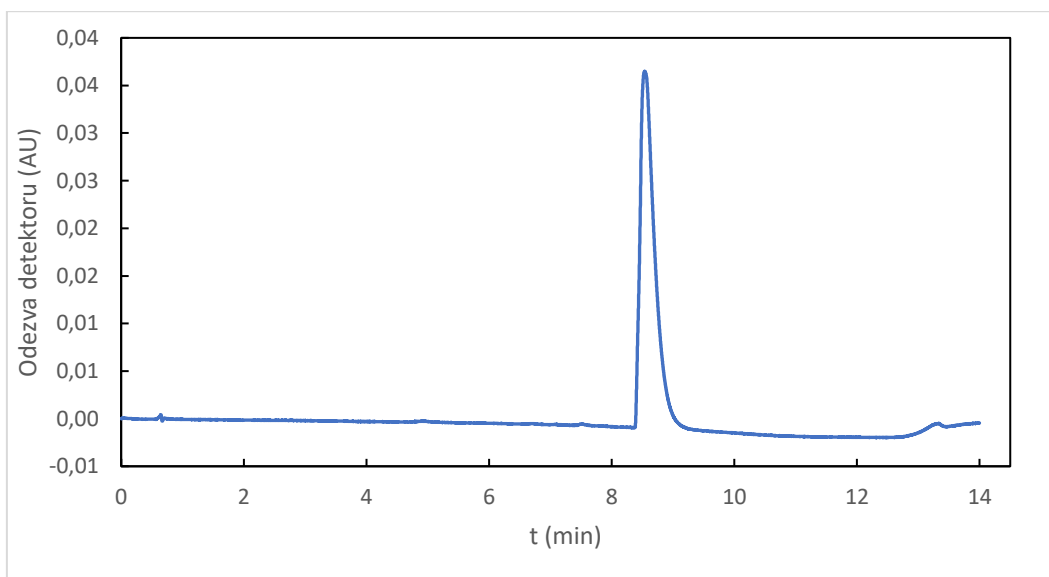
$t$ (min)	$\varphi_A$ (%)	$\varphi_B$ (%)
0	40	60
1	40	60
9	80	20
11	80	20
12	40	60
14	40	60



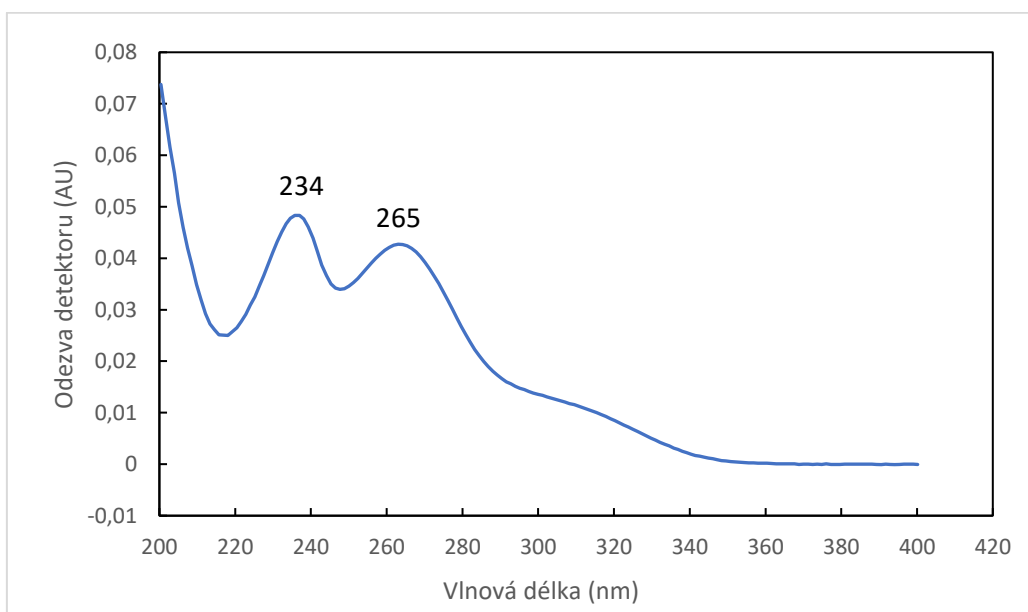
Obr. 3.1 Chromatogram gradientové eluce za použití kolony KINETEX C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm). Za použití mobilní fáze, která obsahovala ACN a deionizovanou vodu při dávkovaném objemu 1  $\mu\text{l}$ , průtoku 0,3 ml/min, teploty kolony 30  $^{\circ}\text{C}$  a vlnové délce 253 nm. Na ose X je čas v minutách a osa Y představuje odezvu detektoru.



Obr. 3.2 Absorpční spektrum UV/VIS oblasti elektromagnetického záření získané z analýzy abirateronu acetátu pomocí kolony KINETEX C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm) mobilní fáze obsahovala ACN a deionizovanou vodu. Vlnová délka absorpčního maxima byla určena jako hodnota 253 nm.



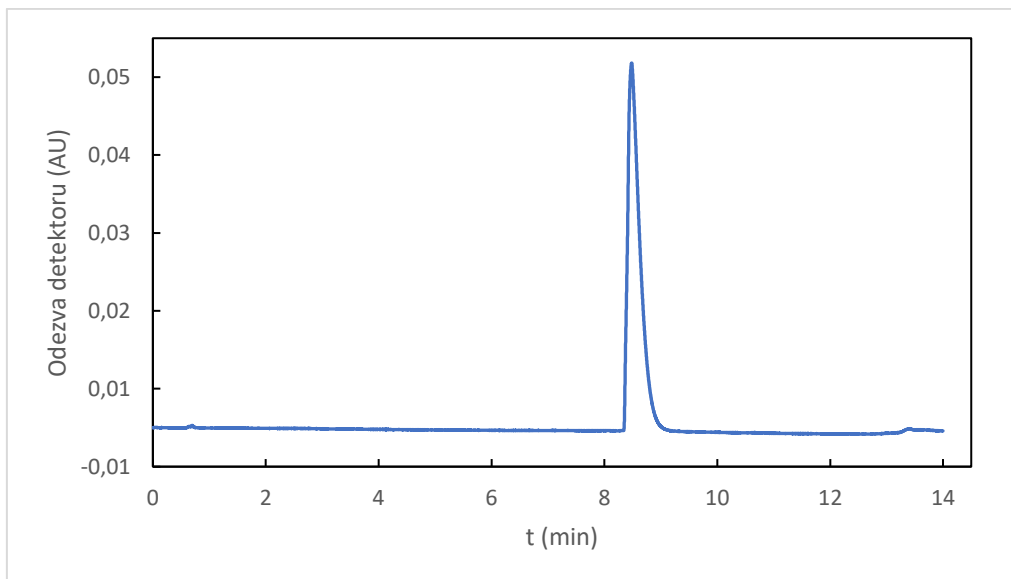
Obr. 3.3 Chromatogram gradientové eluce za použití kolony KINETEX C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm). Při analýze byla použita mobilní fáze, která se skládala z ACN a 0,1 % kyseliny mravenčí. Průtok mobilní fáze činil 0,3 ml/min, teplota kolony byla 30 °C a vlnová délka 253 nm.



Obr. 3.4 Absorpční spektrum UV/VIS oblasti elektromagnetického záření z analýzy abirateronu acetátu pomocí kolony KINETEX C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm) za použití mobilní fáze, která obsahovala ACN a 0,1 % kyseliny mravenčí. Jako vlnová délka absorpčního maxima byla určena hodnota 265 nm.

Při porovnání obou chromatogramů a příslušných absorpčních spekter byl zaznamenán rozdíl mezi retenčními časy abirateronu acetátu při použití jiného složení mobilní fáze. Retenční čas píku při použití mobilní fáze, kterou tvořil ACN a deionizovaná voda byl 12,6 min, zatím co retenční čas píku při použití ACN a 0,1 % kyseliny mravenčí jako mobilní fáze byl 8,5 min. Také byly zjištěny rozdíly u vlnové délky absorpčního maxima, která činila pro první analýzu 253 nm a pro druhou analýzu 236 nm a 265 nm. Tyto rozdíly byly způsobeny přidávkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Hodnota pKa kyseliny mravenčí činí 3,75 [31], což je menší, než je hodnota pKa abirateronu acetátu (5,2). Kyselina mravenčí je tedy silnější kyselina než protonovaná forma abirateronu acetátu. Tento rozdíl má za příčinu protonizaci abirateronu acetátu, který následně prochází kolonou rychleji, než jeho neprotonovaná forma. Z tohoto důvodu byla jako mobilní fáze zvolena směs ACN a 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí, díky vyšší polaritě API. Při použití deionizované vody jako vodné části mobilní fáze eluovala API až v samém závěru gradientového programu při nejvyšší eluční síle mobilní fáze. Hrozilo by tedy, že by nebyla dostatečně oddělena od svých degradačních produktů. V mobilní fázi, kde její vodná složka byl 0,1 % vodný roztok kyseliny mravenčí API vykazovala dostatečnou retenci, eluovala však dříve a nechala více prostoru po separaci degradačních produktů.

Jako další se zkoumal vliv teploty kolony. Byly testovány teploty, 30 °C (viz Obr. 3.3) a 45 °C (viz Obr. 3.5).



Obr. 3.5 Chromatogram analýzy abirateronu acetátu pomocí kolony KINETEX C18 (1,7  $\mu$ m, 100  $\times$  2,1 mm). Byla použita mobilní fáze skládající se z ACN a 0,1 % kyseliny mravenčí, její průtok byl 0,3 ml/min, dávkovaný objem byl 1  $\mu$ l, teplota kolony činila 45 °C a vlnová délka byla 265 nm.

Po porovnání chromatogramů analýz při různých teplotách kolony bylo zjištěno, že pík abirateronu acetátu vykazuje lepší tvar při 45 °C. Z tohoto důvodu byla zvolena teplota kolony na 45 °C.

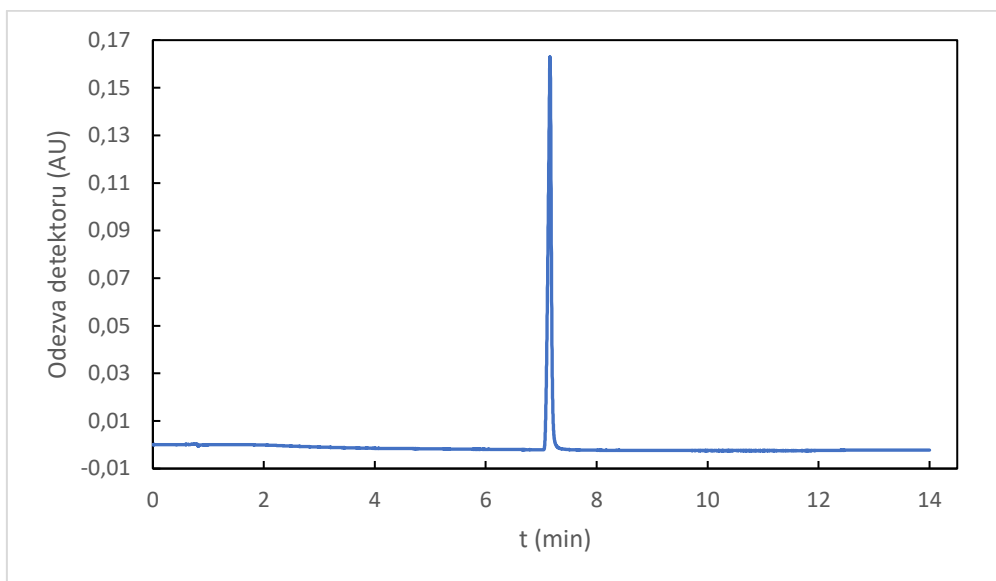
Kvůli nedostatečně ostrému tvaru píku při použití kolony KINTEX, byla testována kolona Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 100 × 2,1 mm). Jelikož již vytvořené gradienty pro tuto kolonu nebyly vhodné (chromatogram vykazoval pouze šum, nikoliv pík API), byly vytvořeny dva nové gradienty (viz Tabulka 3.3 a 3.4).

Tabulka 3.3 Gradientový program, podle kterého se změnilo zastoupení organické a vodné mobilní fáze v průběhu analýzy.  $\Phi_A$  označuje organickou fázi obsahující ACN a  $\Phi_B$  označuje vodnou fázi obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí.

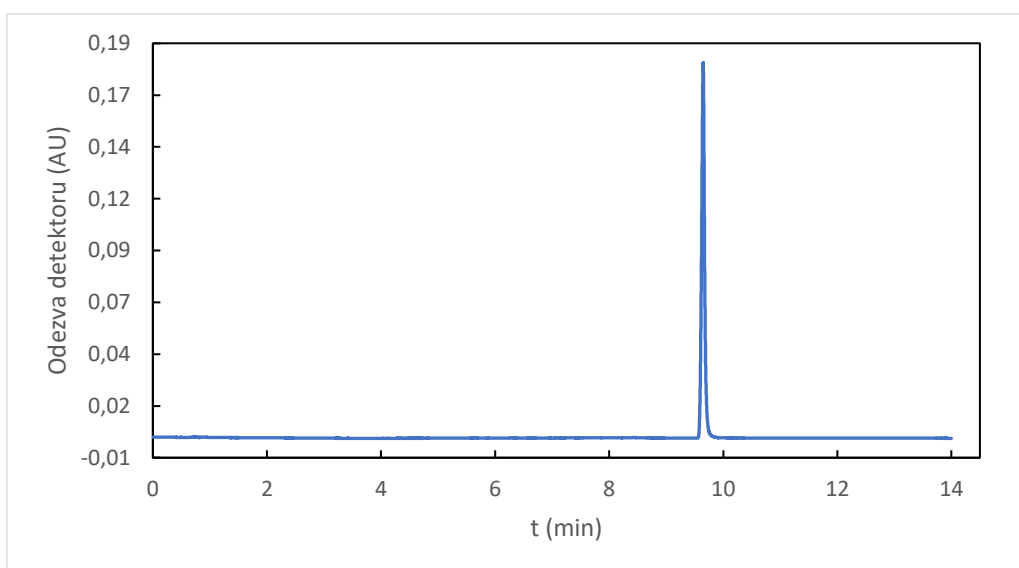
<i>t (min)</i>	$\varphi_A$ (%)	$\varphi_B$ (%)
0	30	70
6	80	20
10	80	20
14	30	70

Tabulka 3.4 Gradientový program, podle kterého se změnilo zastoupení organické a vodné mobilní fáze v průběhu analýzy.  $\Phi_A$  označuje organickou fázi obsahující ACN a  $\Phi_B$  označuje vodnou fázi obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí.

<i>t (min)</i>	$\varphi_A$ (%)	$\varphi_B$ (%)
0	30	70
1	30	70
7	80	20
10	80	20
12	30	70
14	30	70



Obr. 3.6 Chromatogram gradientové eluce na koloně Acquity UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm), vodná a organická fáze byly 0,1% kyseliny mravenčí a ACN, průtok mobilní fáze činil 0,3 ml/min, dávkovaný objem vzorku byl 1  $\mu\text{l}$ , teplota kolony byla 45  $^{\circ}\text{C}$  a vlnová délka 265 nm. Gradientový program viz Tabulka 3.3.



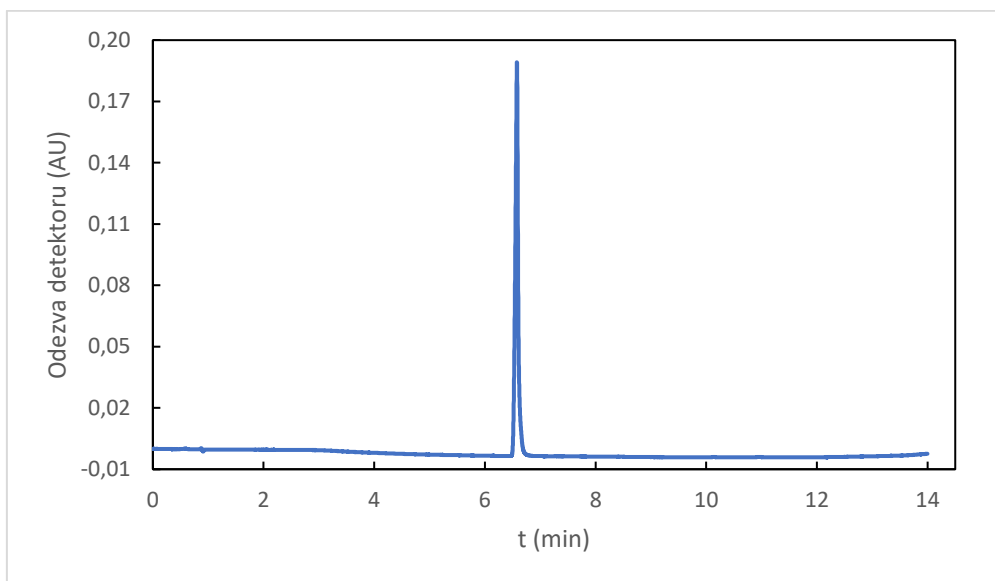
Obr. 3.7 Chromatogram gradientové eluce kolony Acquity UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm), vodná a organická fáze byly 0,1% kyselina mravenčí a ACN, průtok mobilní fáze činil 0,3 ml/min, teplota kolony byla 45  $^{\circ}\text{C}$ , dávkovaný objem byl 1  $\mu\text{l}$  a vlnová délka činila 265 nm. Gradientový program viz Tabulka 3.4.

Jako poslední byla studována kolona Acquity UPLC CSH PHENYL-HEXYL (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm) na této koloně se také testovaly dvě gradientové eluce (viz Tabulka 3.4 a 3.5)

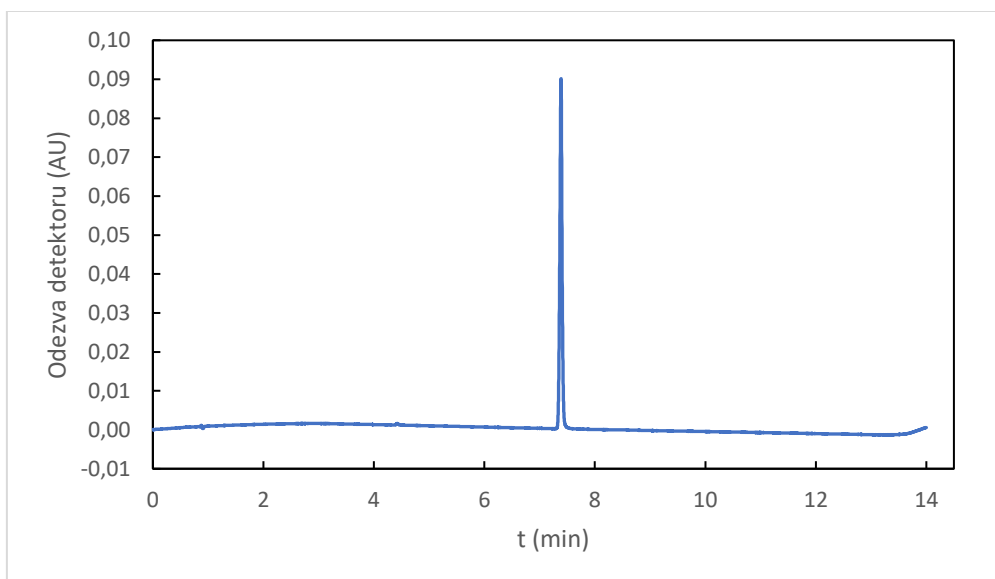
Tabulka 3.5 Gradientový program, podle kterého se změnilo zastoupení organické a vodné mobilní fáze v průběhu analýzy.  $\Phi_A$  označuje organickou fázi obsahující ACN a  $\Phi_B$  označuje vodnou fázi obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí.

<i>t (min)</i>	<i><math>\varphi_A</math> (%)</i>	<i><math>\varphi_B</math> (%)</i>
0	30	70
1	30	70
9	80	20
11	80	20
12	30	70
14	30	70





Obr. 3.8 Chromatogram gradientové eluce kolony Acquity UPLC CSH PHENYL- HEXYL (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm), vodná a organická fáze byly 0,1% kyseliny mravenčí a ACN, průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min, dávkovaný objem vzorku byl 1  $\mu\text{l}$  a teplota kolony 45  $^{\circ}\text{C}$ , vlnová délka činila 265 nm. Gradientový program viz Tabulka 3.4.



Obr. 3.9 Chromatogram gradientové eluce kolony Acquity UPLC CSH PHENYL- HEXYL (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1  $\mu\text{m}$ ), vodná a organická fáze byly 0,1% kyseliny mravenčí a ACN, průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min, dávkovaný objem vzorku byl 1  $\mu\text{l}$ , teplota kolony byla 45  $^{\circ}\text{C}$ , vlnová délka činila 265 nm. Gradientový program viz Tabulka 3.5.

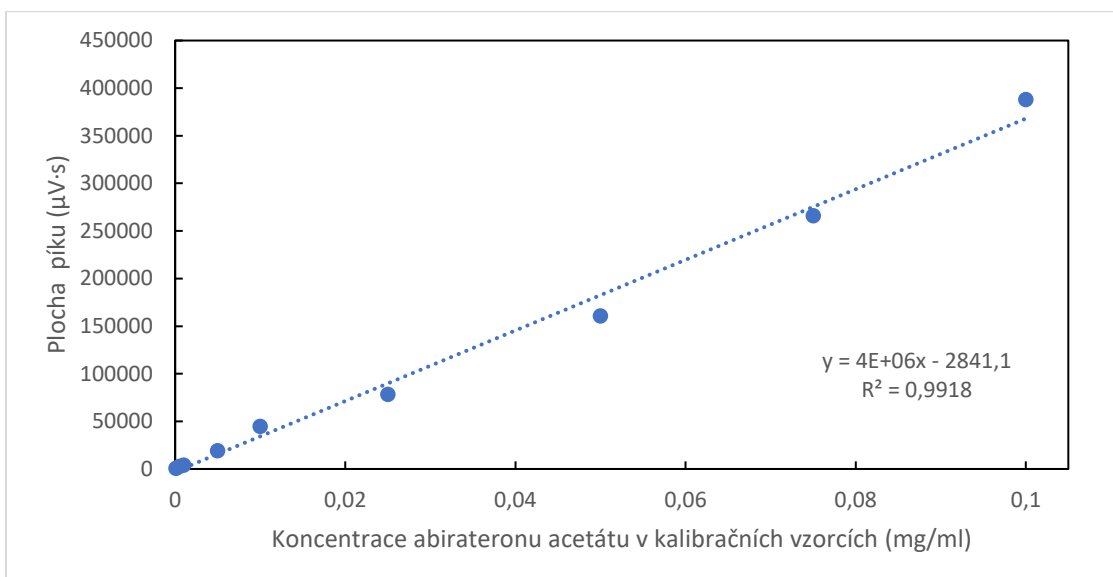
Po porovnání všech chromatogramů byla jako používaná kolona vybrána Acquity UPLC CSH PHENYL-HEXYL (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm) s druhou gradientovou elucí (viz Tabulka 3.5). K tomuto závěru se došlo po porovnání tvaru všech píků a jejich retenčních časů. Jak už bylo řečeno dříve a tomto odstavci, pík při analýze na koloně KINETEX C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm) nevykazoval dostatečně úzký tvar. Gradientové eluce testované na koloně Acquity UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm) vykazovaly retenční čas píku API v 7,159 min (viz Obr. 3.6) a 9,648 min (viz Obr 3.7). Zatím co gradientové eluce testované na koloně Acquity UPLC CSH (1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1mm) vykazovaly retenční čas píku API v 6,579 min (viz Obr. 3.8) a 7,388 min (viz Obr. 3.9).

Obě testované kolony vykazovaly téměř totožný tvar píku, takže rozhodujícím faktorem byl retenční čas píku API a jelikož cílem je oxidativní degradace, bylo třeba, aby před i za píkem API bylo dostatek místa pro píky degradačních produktů. Proto byla vybrána právě tato kolona a gradient.

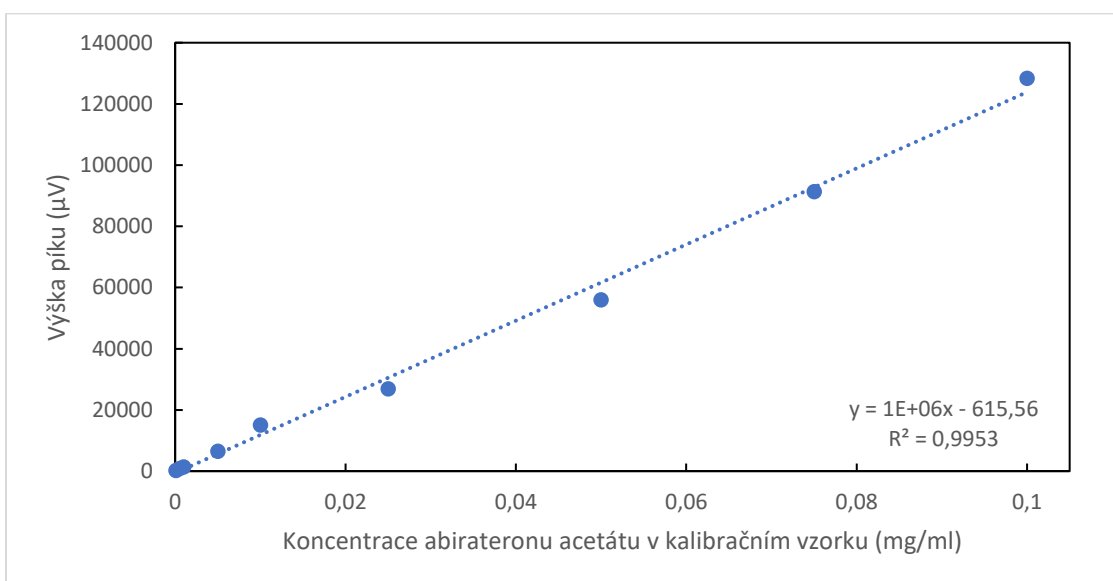
### **3.3 Validace metody**

#### **3.3.1 Kalibrační závislost**

Po tom, co byla vyvinuta metoda bylo provedeno měření kalibrační závislosti pomocí kalibračních roztoků. Jejich koncentrace činila 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,01,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  mg/ml. Po tomto měření byla sestrojena kalibrační závislost plochy a výšky jednotlivých píků na koncentraci příslušného kalibračního vzorku. Závislostí byla proložena regresní přímka a byly vypočteny koeficienty determinace, pro závislost hodnoty plochy píku na koncentraci daného kalibračního vzorku tato hodnota činila 0,9918 a pro závislost hodnoty výšky píku na koncentraci daného kalibračního vzorku byla 0,9953.



Obr. 3.10 Graf závislosti plochy píku na koncentraci daného kalibračního vzorku. Měření proběhlo na koloně Acquity UPLC CSH PHENYL-HEXYL, složení mobilní fáze bylo ACN a 0,1 % roztok kyseliny mravenčí, teplota kolony činila 45 °C, průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min, dávkovaný objem byl 1 μl a vlnová délka 265 nm. Gradientový program viz Tabulka 3.5.



Obr. 3.11 Graf závislosti výšky píku na koncentraci daného kalibračního roztoku. Měření proběhlo na koloně Acquity UPLC CSH PHENYL-HEXYL, složení mobilní fáze bylo ACN a 0,1 % roztok kyseliny mravenčí, teplota kolony činila 45 °C, průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min, dávkovaný objem byl 1 μl a vlnová délka 265 nm. Gradientový program viz Tabulka 3.5.

Z kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci kalibračního vzorku abirateronu acetátu byly vypočteny LOD a LOQ podle vzorců 2.3 a 2.4. Hodnota šumu základní linie chromatogramu byla 50  $\mu$ V. Vypočtená hodnota LOD činila  $1,3 \cdot 10^{-4}$  mg/ml a hodnota LOQ činila  $4,0 \cdot 10^{-4}$  mg/ml.

Z rovnice kalibrační přímky závislosti plochy píku na koncentraci kalibračního vzorku byla vypočtena výtěžnost metody. Koncentrace pro zjištění výtěžnosti metody byly 0,07 a  $3 \cdot 10^{-3}$  mg/ml. Pro koncentraci 0,07 mg/ml byla stanovena hodnota 0,073 mg/ml a pro koncentraci  $3 \cdot 10^{-3}$  mg/ml byla hodnota  $3,78 \cdot 10^{-3}$  mg/ml. V převedení na procenta to jsou hodnoty 104% skutečné koncentrace pro hladinu 0,07 mg/ml a 125 % skutečné koncentrace pro hladinu  $3 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.

Poté se stanovovala opakovatelnost metody. Ke vzorku API ze zásobního roztoku se přidalo takové množství 30 % peroxidu vodíku, aby jeho hmotnostní koncentrace činila 0,5 % a tento vzorek se nechal temperovat v 50 °C po dobu 6 hodin a následně se tento vzorek změřil 7 $\times$ . V chromatogramu vzorku byly zjištěny kromě samotné API ještě dva degradační produkty, jejich relativní retenční časy činily 0,97 a 1,11 jejich procentuální zastoupení činilo 0,46 % a 6,64 %. Opakovatelnost se hodnotila pomocí hodnot relativní směrodatné odchylky, které byly získány z rovnic 2.1 a 2.2. Pro API byly hodnoty relativní směrodatné odchylky 0,20 % pro plochu píku, 0,51 % pro výšku píku a 0,11 % pro retenční čas. Pro první degradační produkt hodnoty relativní směrodatné odchylky byly 0,11 % pro retenční čas, 6,58 % pro plochu píku a 3,43 % pro výšku píku. Pro druhý degradační produkt byly hodnoty relativní směrodatné odchylky 0,06 % pro retenční čas, 1,50 % pro plochu píku a 1,36 % pro výšku píku.

Vyhodnocením těchto hodnot bylo rozhodnuto, že metoda vykazuje výbornou opakovatelnost pro plochy a časy píku API. Pro degradační produkty opakovatelnost už není tak vysoká, kvůli jejich malému zastoupení, což vede k větším relativním chybám měření, a také při integraci píků.

### 3.4 Oxidativní degradace

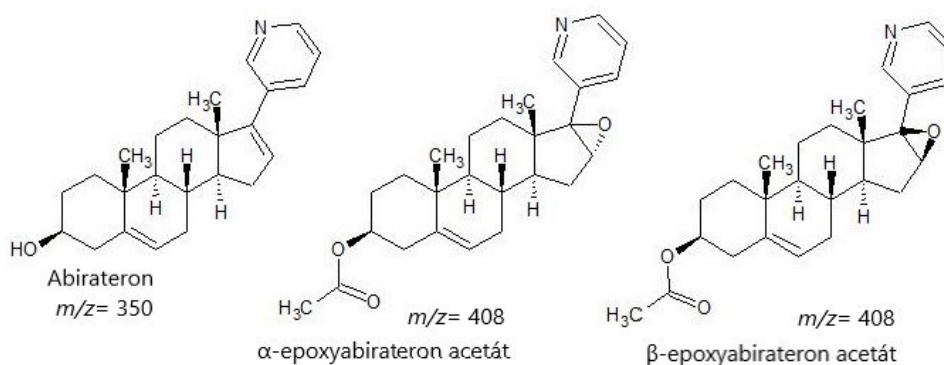
Příprava vzorku zásobního roztoku pro oxidativní degradaci a postup samotné degradace je popsán v odstavci 2.7. Jako první se vyhodnocovala sada vzorků, která obsahovala samotnou API, bez přídavku peroxidu vodíku. V průběhu nucené degradace kromě nečistoty, jejíž relativní retenční čas ( $t_{rel}$ ) činil 1,15, která už se ve vzorku nacházela před oxidací, byl pozorován jeden degradační produkt, který začal vznikat v průběhu 1. dne za laboratorní teploty, jeho  $t_{rel}$  vůči API je 0,623 a hodnota  $m/z$  350 (viz Tabulka. 3.7).

Z této tabulky je zřejmé, že se obsah nečistoty s  $t_{rel.}$  1,15 v průběhu experimentu téměř nezměnil. Tato látka je zřejmě nečistota, která se neúčastní degradace API. Relativní obsah nečistoty o  $t_{rel.}$  0,623 v průběhu experimentu narůstal i za laboratorní teploty, kde za 3 dny narostl na 0,34 %. Zvýšená teplota (50 °C) degradaci výrazně urychlila tak, že během dvou dnů vzrostla relativní plocha na 11,61 % a třetí den klesla na 8,72 %.

Při vyhodnocování sady vzorků API s 0,3 % peroxidem vodíku byly degradační produkty pozorovány i ve vzorcích analyzovaných bezprostředně (v řádu minut) po přidání peroxidu. Během samotné nucené degradace bylo pozorováno mnoho degradačních produktů API. V případě některých degradačních produktů se jejich obsah začal po čase zmenšovat (viz Tabulka 3.8) např.  $t_{rel.}$  0,434, 0,534 atd. Příčina tohoto jevu může být nadměrná nucená degradace, kdy z primárních degradačních produktů vznikají sekundární degradační produkty, a to mohlo být zapříčiněno ponecháním vzorků API s peroxidem vodíku v 50 °C po příliš dlouhou dobu.

Ani v průběhu této části degradace se obsah nečistoty s  $t_{rel.}$  1,15 téměř nezměnil a potvrdilo se, že se tato látka neúčastní degradace API. Nejzastoupenější degradační produkt API má  $t_{rel.}$  1,101 obsah této látky se v průběhu experimentu měnil z 2,86 % po přidání peroxidu vodíku na 17,89 % po třech dnech v laboratorní teplotě a po třech dnech v 50 °C na 32,87 %. Obsah dalších degradačních produktů se na konci degradace pohyboval mezi 0,205 – 7,34 %.

Následně byly ze všech degradačních produktů vybrány ty s největším zastoupením (degradační produkt degradace bez přidání peroxidu vodíku a degradační produkty s přidáním peroxidu vodíku s relativními retenčními časy 0,903, 0,971, 1,101 a 1,15) a byla ověřována jejich identita pomocí hodnot  $m/z$ . Dle amerického lékopisu [26] byly určeny látky pomocí jejich hodnot poměru  $m/z$ . Hodnota  $m/z$  350 odpovídá látce abirateron, pro hodnotu 408 jsou možné látky  $\alpha$ - epoxyabirateron acetát,  $\beta$ - epoxyabirateron acetát a pro hodnotu 440 nebyla nalezena látka, která by této hodnotě odpovídala.



Obr. 3.12 Struktury možných degradačních produktů

Tabulka 3.7 Relativní plochy píků jednotlivých degradačních produktů abirateronu acetátu obsažených ve stresovaných vzorcích vztažené k ploše píků API. V závorkách jsou uvedeny hodnoty RSD v procentech (n=3).

	Relativní plochy vznikajících degradačních produktů (%)		
	$t_{rel. 0,623}$	$t_{rel. 1,15}$	$\Sigma$ relativních ploch
nestresovaná API	–	0,35 (1,19)	0,35
API ponechána v lab. tep. po 1 den	0,19 (0,04)	0,32 (0,02)	0,51
API ponechána v lab. tep. po 2 dny	0,27 (0,07)	0,36 (0,01)	0,63
API ponechána v lab. tep. po 3 dny	0,34 (0,12)	0,35 (0,01)	0,69
API ponechána v 50 °C po 1 den	4,04 (2,05)	0,41 (0,06)	4,45
API ponechána v 50 ° po 2 dny	11,61 (1,32)	0,41 (0,004)	12,02
API ponechána v 50 ° po 3 dny	8,72 (1,13)	0,32 (0,04)	9,04
hodnota m/z	350	–	–

Tabulka 3.8 Relativní plochy píků jednotlivých degradačních produktů abirateronu acetátu obsažených ve stresovaných vzorcích vztažené k ploše píků API. V závorkách jsou uvedeny hodnoty RSD v procentech (n=3).

	Relativní plochy vznikajících degradačních produktů (%)									
	<i>t<sub>rel.</sub> 0,434</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,455</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,469</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,475</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,543</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,566</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,62</i>	<i>t<sub>el.</sub> 0,654</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,687</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,706</i>
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,23 (0,02)	–	0,38 (0,08)	–	0,41(0,03)	0,25 (0,08)	–	–	–	–
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v lab. tep. po 1 den	0,3 (0,07)	0,22 (0,04)	0,53 (0,12)	–	0,6 (0,05)	0,38 (0,07)	–	0,2 (0,02)	–	0,25 (0,04)
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v lab. tep. po 2 dny	0,135 (0,01)	0,21 (1,46)	0,41 (0,21)	–	0,46 (0,03)	0,8 (0,09)	–	0,34 (0,01)	–	0,33 (0,04)
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v lab. tep. po 3 dny	0,29 (0)	0,21 (0,01)	0,44 (0,13)	–	0,26 (0,06)	0,76 (0,163)	–	0,35 (0,06)	–	0,38 (0,07)
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v 50 °C po 1 den	–	–	–	0,545 (0,21)	–	1,23 (0,47)	0,47 (0,06)	0,405 (0,12)	0,22 (0)	0,925 (0,14)
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v 50 °C po 2 dny	–	–	–	0,62 (0,05)	–	1,62 (0,08)	0,71 (0,05)	0,45 (0,01)	0,38 (0,2)	1,03 (0,17)
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v 50 °C po 3 dny	–	–	–	1,28 (0)	–	0,825 (0,03)	1,035 (0,17)	0,635 (0,01)	0,58 (0)	1,57 (0,01)
hodnota m/z	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

<sup>1</sup>Do tabulky nebyly kvůli přehlednosti zahrnuty degradační produkty. Hodnoty relativní ploch byly započítány v součtu relativních ploch degradačních produktů.

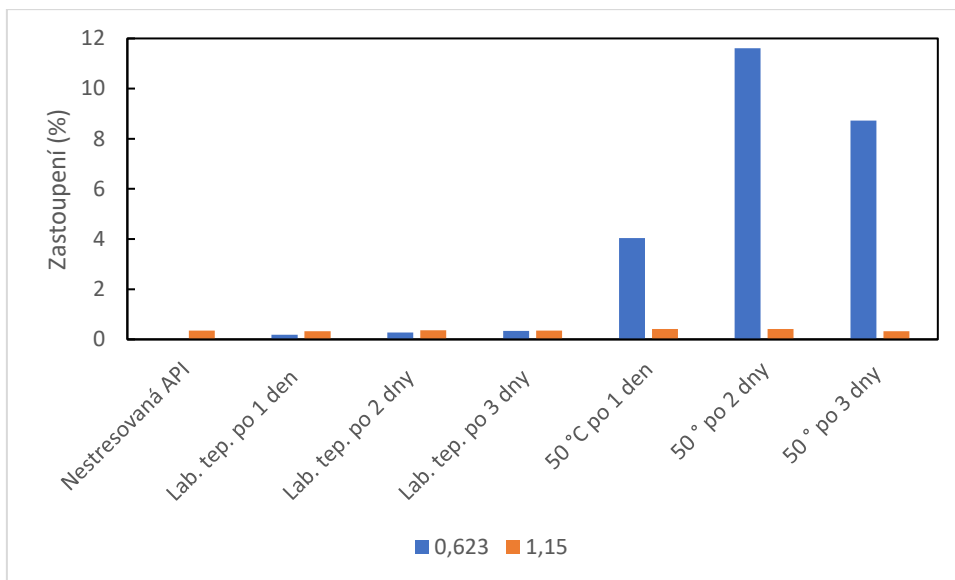
Tabulka 3.8 Relativní plochy píků jednotlivých degradačních produktů abirateronu acetátu obsažených ve stresovaných vzorcích vztažené k ploše píků API. V závorkách jsou uvedeny hodnoty RSD v procentech (n=3).

	Relativní plochy vznikajících degradačních produktů (%)									$\Sigma$ relativních ploch
	<i>t<sub>rel.</sub> 0,73</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,762</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,787</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,861</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,875</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,903</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 0,971</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 1,101</i>	<i>t<sub>rel.</sub> 1,15</i>	
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	–	–	–	–	–	–	0,43 (0,04)	2,86 (0,03)	0,49 (0,05)	5,05
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v lab. tep. po 1 den	–	–	–	–	–	0,17 (0,01)	1,52 (0,2)	9,19 (0,26)	1,26 (0,09)	15,06
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v lab. tep. po 2 dny	–	–	–	–	0,3 (0)	0,28 (0,06)	2,05 (0,11)	15,02 (2,15)	1,65 (0,01)	22,765
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v lab. tep. po 3 dny	0,76 (0,04)	–	–	–	0,35 (0,03)	0,5 (0,01)	2,5 (0,3)	17,89 (2,4)	1,73 (0,24)	26,76
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v 50 °C po 1 den	1,075 (0,16)	1,295 (0,09)	0,415 (0,11)	0,605 (0,11)	1,815 (0,2)	1,84 (0,17)	5,29 (0,56)	30,205 (4,68)	2,22 (0,5)	49,105
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v 50 °C po 2 dny	1,13 (0,14)	2,14 (0,05)	0,47 (0,02)	1,33 (0,15)	2,63 (0,05)	3,48 (0,40)	5,45 (0,17)	42,27 (0,43)	0,9 (0,07)	66,41
API + 0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v 50 °C po 3 dny	1,325 (0,01)	2,82 (0,05)	0,515 (0,04)	1,405 (0,13)	3,845 (0,03)	3,935 (0,23)	7,34 (0,09)	32,87 (1,05)	1,42 (0,01)	64,87
hodnota m/z	–	–	–	–	–	440	408	408	440	–

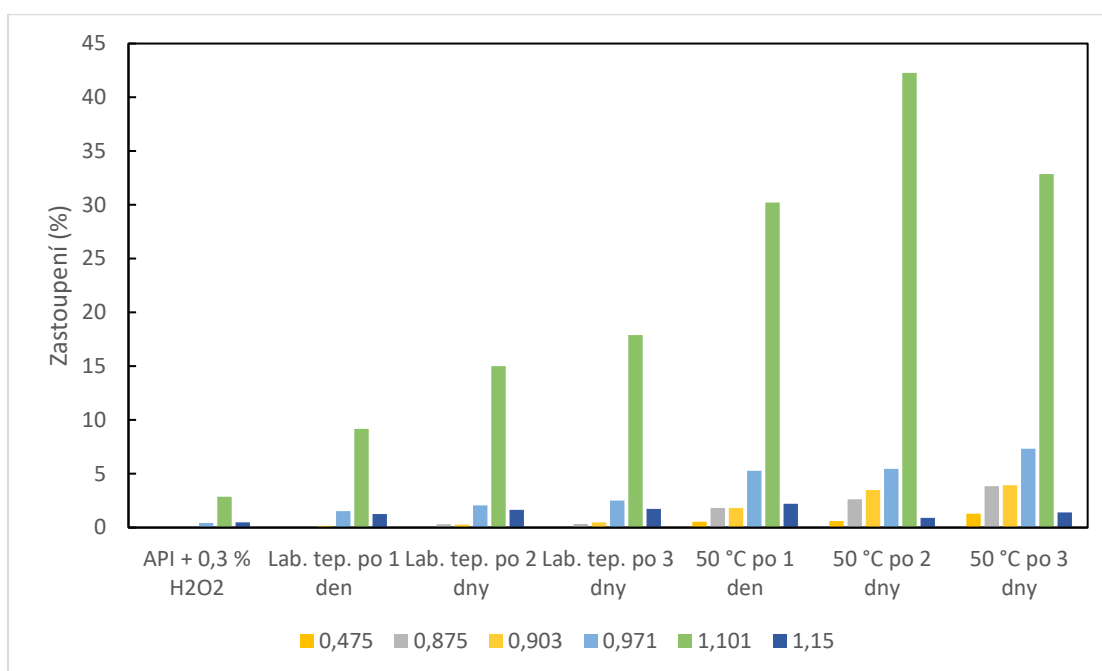
<sup>2</sup>Do tabulky nebyly zahrnuty některé degradační produkty kvůli jejich malému výskytu v průběhu degradace. Hodnoty relativní ploch byly započítány v součtu relativních ploch degradačních produktů.



Při degradaci abirateronu acetátu bez přidání peroxidu vodíku byl jako hlavní degradační produkt abirateron, což bylo potvrzeno hodnotou  $m/z$ . Došlo k hydrolyze esterové vazby a odštěpení acetátu. V přítomnosti peroxidu vodíku dochází k oxidaci, při které se na molekulu abirateronu acetátu naváže jeden atom kyslíku ( $t_{rel.}$  0,971 a 1,101,  $\Delta m/z= 16$ ) nebo pravděpodobně tři atomu kyslíku ( $t_{rel.}$  0,903 a 1,15  $\Delta m/z= 48$ ).



Obr. 3.13 Graf procentuálního zastoupení jednotlivých nečistot, které vznikly při degradaci API bez přidání peroxidu vodíku.



Obr. 3.14 Graf procentuálního zastoupení vybraných degradačních produktů abirateronu acetátu s 0,3 % peroxidem vodíku.

Při porovnání obou způsobů nucené degradace abirateronu acetátu bylo pozorováno, že abirateron acetát podléhá v malé míře hydrolyze na abirateron i v laboratorních podmínkách. Hydrolyza je výrazně rychlejší 50 °C. Při přidání 0,3 % peroxidu vodíku do vzorku byla pozorována zvýšená degradace i v laboratorních podmínkách oproti vzorku bez peroxidu. Po skladování vzorku s peroxidem v 50 °C byla zjištěna velká míra degradace, která přesáhla v nadměrnou degradaci. Z toho vyplývá, že samotný abirateron acetát je náchylný k degradaci už ve zvýšených teplotách a při přidání peroxidu vodíku je snadno degradovatelný.

## Závěr

Byla vyvinuta metoda pro stanovení pro stanovení farmaceuticky aktivní látky abirateronu acetátu pro systém UHPLC a byla provedena nucená degradace pomocí peroxidu vodíku a zvýšené teploty.

Práškový vzorek abirateronu acetátu se rozpustil ve směsi deionizované vody a ACN v poměru 1:1. Následně byly zjišťovány nejlepší podmínky pro stanovení abirateronu acetátu. Hlavní faktor při výběru byl tvar píku a jeho retenční čas. Nejlépe tyto požadavky splňovala kolona Acquity CSH PHENYL-HEXYL (1,7 $\mu$ m, 100  $\times$  2,1 mm) s mobilní fází skládající se z ACN a 0,1 % vodného roztoku kyseliny mravenčí. Teplota kolony činila 45 °C, průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min, objem dávkovaného vzorku činil 1 $\mu$ l a vlnová délka detekce byla 265 nm. Během procesu validace metody byla zjištěna výtěžnost, LOD, LOQ a opakovatelnost. Mez detekce byla stanovena na 1,3 $\cdot$ 10<sup>-4</sup> mg/ml a mez stanovitelnosti 4,0 $\cdot$ 10<sup>-4</sup> mg/ml. Výtěžnost metody se stanovovala pro dvě koncentrace, a to pro 0,07 mg/ml a 3 $\cdot$ 10<sup>-3</sup> mg/ml, hodnoty výtěžnosti činily 0,073 mg/ml a 3,78 $\cdot$ 10<sup>-3</sup> mg/ml, což v procentuálním zastoupení činí 104 % a 125 %. Hodnoty relativních směrodatných odchylek abirateronu acetátu činily 0,11 % pro retenční čas, 0,20 % pro plochu píku a 0,51 % pro výšku píku. Byla také určena kalibrační závislost pro hodnoty koncentrací 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,01, 5 $\cdot$ 10<sup>-3</sup>, 1 $\cdot$ 10<sup>-3</sup>, 5 $\cdot$ 10<sup>-4</sup>, 1 $\cdot$ 10<sup>-4</sup> mg/ml.

Pro nucenou degradaci byl použit 0,3 % peroxid vodíku a degradační komora nastavena na 50 °C. Byly použity dvě sady vzorků, jedna, kde se ke vzorku abirateronu acetátu nepřidal 0,3 % peroxid vodíku a druhá, kde se peroxid přidal. Obě sady potom byly vystaveny laboratorním podmínkám a teplotě 50 °C po 1,2 a 3 dny. Porovnáním všech výsledků nucené degradace byla pozorováno, že abirateron acetát je poměrně stabilní při laboratorní teplotě. Při zvýšené teplotě u vzorků však dochází k poměrně rychlé hydrolyze. U vzorků s peroxidem vodíku byla pozorována větší míra degradace při laboratorních podmínkách a ještě vyšší míra degradace při 50 °C.

## Seznam použité literatury

- [1] National Centre for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. CID=9821849. Dostupné z URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9821849> (převzato ze dne 26.3.2020)
- [2] Zytiga® Dostupné z URL: <https://www.zytiga.com> (převzato ze dne 26.10.2020)
- [3] Thakur, Abhimanyu, et al. "Abiraterone acetate in the treatment of prostate cancer." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101 (2018): 211-218.
- [4] Rehman, Yasser, and Jonathan E. Rosenberg. "Abiraterone acetate: oral androgen biosynthesis inhibitor for treatment of castration-resistant prostate cancer." *Drug design, development and therapy* 6 (2012): 13.
- [5] Reid, Alison HM, et al. "Significant and sustained antitumor activity in post-docetaxel, castration-resistant prostate cancer with the CYP17 inhibitor abiraterone acetate." *Journal of Clinical Oncology* 28 (2010): 1489.
- [6] Program ChemSketch <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>
- [7] Nováková, Lucie, Ludmila Matysová, and Petr Solich. "Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis." *Talanta* 68 (2006): 908-918.
- [8] Fekete, Szabolcs, et al. "Current and future trends in UHPLC." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 63 (2014): 2-13.
- [9] Gumustas, Mehmet, et al. "UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters." *Chromatographia* 76 (2013): 1365-1427.
- [10] Zotou, Anastasia. "An overview of recent advances in HPLC instrumentation." *Central European Journal of Chemistry* 10 (2012): 554-569.
- [11] Kumar, Ashok, et al. "UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis." *Acta Polonicae Pharmaceutica* 69 (2012): 371-380.
- [12] Chawla, Gita, and Chanda Ranjan. "Principle, instrumentation, and applications of UPLC: a novel technique of liquid chromatography." *Open Chemistry Journal* 3 (2016).
- [13] Taleuzzaman, M., et al. "Ultra performance liquid chromatography (UPLC)-a review." *Austin Journal of Analytical Pharmaceutical Chemistry* 2 (2015): 1056.
- [14] Dong, Michael W., and Kelly Zhang. "Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 63 (2014): 21-30.
- [15] Singh, Ranjit. "HPLC method development and validation-an overview." *Journal of Pharmaceutical Education & Research* 4 (2013).
- [16] Bhardwaj, Santosh Kumar, K. Dwivedia, and D. D. Agarwala. "A review: HPLC method development and validation." *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* 5 (2015): 76-81.

- [17] Snyder, Lloyd R., Joseph J. Kirkland, and Joseph L. Glajch. *Practical HPLC method development*. John Wiley & Sons, 2012.
- [18] Gupta, Vibha, et al. "Development and validation of HPLC method-a review." *International research journal of pharmaceutical and applied sciences* 2 (2012): 17-25.
- [19] Patil, Ms Pallavi Nemgonda. "HPLC Method Development–A Review." *Journal of Pharmaceutical Research and Education* 1 (2017): 243-260.
- [20] Baertschi, Steven W., Karen M. Alsante, and Robert A. Reed, eds. *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. CRC Press, 2016.
- [21] Rawat, Trivikram, and I. P. Pandey. "Forced degradation studies for drug substances and drug products-scientific and regulatory considerations." *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7 (2015): 238.
- [22] Iram, Farah, et al. "Forced degradation studies." *Journal of Analytical & Pharmaceutilcal Research* 3 (2016): 00073.
- [23] Aashigari, Sneha, et al. "Stability studies of pharmaceutical products." *World Journal of Pharmaceutical Sciences Res* 8 (2018): 479-492.
- [24] Bajaj, Sanjay, Dinesh Singla, and Neha Sakhuja. "Stability testing of pharmaceutical products." *Journal of applied pharmaceutical science* 2 (2012): 129-138.
- [25] Sharma, M. K., and M. Murugesan. "Forced degradation study an essential approach to develop stability indicating method." *Journal Chromatography Sep Tech* 8.1 (2017): 349.
- [26] The United States Pharmacopeia 2018: Usp 41, the National Formulary: Nf 36., 2017. Print.
- [27] Chandra Reddy, B. Jala, and N. C. Sarada. "Development and validation of a novel RP-HPLC method for stability-indicating assay of Abiraterone acetate." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 39.7 (2016): 354-363.
- [28] Kavitaapu, DasameswaraRao, et al. "New stability indicating RP-HPLC method for the determination of Abiraterone acetate, its related substances and degradation products in bulk and dosage form." *Materials Today: Proceedings* 34 (2021): 469-478.
- [29] Beg, Sarwar, et al. "Systematic Development and Validation of a RP-HPLC Method for Estimation of Abiraterone Acetate and its Degradation Products." *Journal of Chromatographic Science* 59.1 (2021): 79-87.
- [30] Khedr, Alaa, Ibrahim Darwish, and Faida Bamane. "Analysis of abiraterone stress degradation behavior using liquid chromatography coupled to ultraviolet detection and electrospray ionization mass spectrometry." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 74 (2013): 77-82.

[31] National Centre for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. CID=284. Dostupné z URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/284> (převzato dne 3.5.2021)