Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza
Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Barbora Filounová

Analýza farmaceuticky aktivní látky vemurafenibu pomocí LC
Analysis of active pharmaceutical ingredient vemurafenib by LC

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha, 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze 23.05.2016

Podpis

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí vhodnou ke stanovení čistoty a obsahu vemurafenibu v pevné lékové formě a provést stabilitní studii daného léčiva.

Optimalizovaný separační systém se skládal z kolony Poroshell HPH-C18 (3 × 100 mm, 2,7 μm) temperované na 30 ºC a mobilní fáze 10 mM fosfát amonný pH 3,0/acetonitril při průtoku 0,6 ml/min za gradientové eluce. Detekce probíhala při vlnové délce 250 nm. Byla stanovena kalibrační závislost vemurafenibu v koncentračním rozmezí 0,4 – 1,2 mg/ml a určen limit detekce jako 5,0 μg/ml a limit kvantifikace jako 16,5 μg/ml.

Byl proveden stabilitní test vlivu samotného tepla (80 ºC) a tepla s vlhkostí (80 ºC/75 % relativní vlhkost) na práškovou formu vemurafenibu. Dále byla provedena degradační studie působením kyseliny chlorovodíkové (0,1M roztok), hydroxidu sodného (0,1M roztok), a peroxidu vodíku (3% a 0,3% roztok) na roztok vemurafenibu v methanolu. Byla zjištěna významná degradace působením kyseliny chlorovodíkové, naopak hydroxid sodný na vemurafenib žádný vliv neměl. Při oxidaci peroxidem vodíku byla také zaznamenána degradace. Teplo ani vlhko nezpůsobilo žádnou významnou změnu vemurafenibu. Žádný z testovaných excipientů neměl vliv na rozklad vemurafenibu.

Na základě provedených experimentů můžeme prohlásit vemurafenib z chemického hlediska za látku stabilní.

KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC, stabilitní studie, vemurafenib.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop and optimize liquid chromatography method with spectrophotometric detection applicable to assay and purity of vemurafenib in solid dosage form and perform its stability study.

The optimized separation conditions consisted of Poroshell HPH-C18 (3 × 100 mm, 2.7 μm) column tempered at 30 ºC, mobile phase composed of 10 mM ammonium phosphate, pH 3,0/acetonitrile. Flow rate was set at 0.6 mL/min and gradient elution was performed. Detection wavelength was 250 nm.

The calibration curve of vemurafenib was constructed in the concentration range 0.4 – 1.2 mg/mL. Limit of detection was 5.0 μg/mL and limit of quantitation was 16.5 μg/mL.

Stability and stress tests of vemurafenib were performed under several conditions: Heat (80 ºC), heat combined with humidity (80 ºC/75 % relative humidity), hydrochloric acid (0,1 M), sodium hydroxide (0,1 M) and hydrogen peroxide (3% and 0,3% solution). The significant degradation of vemurafenib was observed under acid condition. Vemurafenib also degradated under oxidation condition. No degradation was observed under base condition and under heat and heat combined with humidity. Degradation of vemurafenib was not effected by tested excipients.

Judging based on experiments vemurafenib is stable from the point of view of chemical stability.

KEYWORDS

HPLC, stability study, vemurafenib.

PODĚKOVÁNÍ

Za velice zajímavé téma práce, cenné rady, vědomosti a zkušenosti, pomoc a trpělivost děkuji svému školiteli RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D.

Za veškerou podporu během studia děkuji své rodině a přátelům.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ 8

TEORETICKÁ ČÁST 10

1. Úvod 10

1.1 Stabilitní studie 10

1.2 Kategorie stabilitních studií 10

2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 11

2.1 Obecně 11

2.2 Instrumentace v HPLC 12

3. Vemurafenib 13

3.1 Základní informace 13

3.2 Způsob použití a účinku vemurafenibu 13

3.3 Chemická struktura a vlastnosti vemurafenibu 14

4. Metody použité ke stanovení vemurafenibu 15

5. Degradační studie vemurafenibu 17

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 20

1. Seznam přístrojů a chemikálií 20

1.1 Přístroje 20

1.2 Chemikálie 20

2. Volba separačních podmínek 21

2.1 Isokratická separace 21

2.2 Gradientová eluce 21

3. Stabilitní studie 22

3.1 Test stability 22

3.2 Degradační studie 22

3.3 Analýza degradačních produktů pomocí hmotnostní spektrometrie 23

4. Stanovení kalibrační závislosti, meze detekce a meze stanovitelnosti 23

VÝSLEDKY A DISKUZE 24

1. Volba separačních podmínek 24

2. Stabilitní studie 28
2.1 Test stability 28
2.2 Degradační studie 30
2.2a Kyselá hydrolýza 30
2.2b Zásaditá hydrolýza 31
2.2c Oxidace peroxidem vodíku 32
2.2d Porovnání výsledků 32
2.3 Analýza degradačních produktů pomocí hmotnostní spektrometrie 32
3. Stanovení kalibrační závislosti, meze detekce a meze stanovitelnosti 33
ZÁVĚR 35
PŘÍLOHY 36
POUŽITÁ LITERATURA 37

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

°C ..... stupeň Celsia
µg/ml ..... mikrogram na mililitr
µl ..... mikrolitr
µm ..... mikrometr
ATP ..... adenosintrifosfát
C18 ..... oktadecyl
C8 ..... oktyl
DAD ..... detektor s diodovým polem
g ..... gram
h ..... hodina
HPLC ..... vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IUPAC ..... Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii
LC ..... kapalinová chromatografie
LC-MS ..... kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LLE ..... extrakce kapalina-kapalina
LLOQ ..... mez kvantifikace
M ..... mol na litr
m/z ..... poměr hmotnost/náboj
AU ..... absorbanční jednotky
MF ..... mobilní fáze
mg/ml ..... miligram na mililitr
min ..... minuta
ml ..... mililitr
ml/min ..... mililitr za minutu
mm ..... milimetr
mM ..... milimol na litr
MS ..... hmotnostní spektrometrie
nm ..... nanometr
p. a. ..... čistota látky pro analýzu
rpm ..... otáčky za minutu
RRT ..... relativní retenční čas

RV ..... relativní vlhkost
THF ..... tetrahydrofuran
UHPLC ..... ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV ..... ultrafialové záření
UV/VIS ..... oblast ultrafialového a viditelného záření
v ..... objemový díl
V600 ..... valin v pozici 600
V600E ..... kyselina glutamová místo valinu v pozici 600
WHO ..... Světová zdravotnická organizace

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

1.1 Stabilitní studie

Vizí vývoje farmaceutických přípravků je poskytnout pacientům specifické a účinné léčivo, které by nemělo negativní vedlejší účinky[1, 2, 3]. Za tímto účelem se kromě jiného provádí testy stability léčiv, kdy je třeba popsat chování léčiva při různých podmínkách. Během výroby, skladování a při užívání je léčivo vystaveno mnoha fyzikálně-chemickým a mikrobiologickým vlivům, to může způsobit změnu jeho vlastností. K méně závažným změnám patří například ztráta integrity a posléze změna biologické dostupnosti nebo změna vzhledu lékové formy. Dalším projevem bývá například ztráta účinnosti látky. Závažným důsledkem nestability přípravku je vznik toxických látek rozpadem účinné nebo pomocné látky. Faktory, které způsobují změnu kvality léčiva, lze rozdělit na vnější a vnitřní. Vnitřními faktory jsou fyzikálně-chemické vlastnosti pomocných a účinných látek, nečistot, množství vlhkosti v přípravku a vliv obalového materiálu. Jako vnější faktory lze označit působení okolní teploty, pH, vlhkosti prostředí a přítomnost kyslíku či světla.

1.2 Kategorie stabilitních studií

Stabilitní studie je jedním z požadovaných dokumentů již při registraci léčiv a jejím hlavním cílem je určit optimální podmínky skladování, obalový materiál a dobu expirace[1, 2]. Formát studie je řízen předpisy (v ČR pokyn Státního úřadu pro kontrolu léčiv[4]) a podle druhu zátěže se dělí na stresové testy, dlouhodobé testy a zrychlené testy. Studie se provádí při zavádění zcela nového léčiva, při změně jakékoli složky léčivého přípravku nebo technologického postupu a při pravidelné kontrole.

Zrychlené testy poskytují údaje, které se použijí ke stanovení optimálních podmínek pro skladování a technologii výroby[1, 2, 4]. Také se testují krátkodobé extrémní podmínky mimo optimální rozsah, které mohou nastat při manipulaci s léčivým přípravkem (např. při přepravě). Extrémními podmínkami jsou zde teplota a vlhkost, které napomáhají k urychlení chemické či fyzikální změny léčiva. Zrychlené testy probíhají maximálně jeden rok, obvykle však 6 měsíců.

Dlouhodobé testy se provádí kvůli stanovení doby použitelnosti léčiva[1, 2, 4]. Jednotlivé státy jsou podle předpisů WHO rozděleny do několika kategorií klimatických pásem podle průměrné teploty a vlhkosti. Z těchto hodnot vychází optimální podmínky skladování. Léčivo se testuje při těchto podmínkách a v primárním obalu po dobu až pěti let (tj. maximální doba použitelnosti). Pro Českou republiku činí tyto podmínky 25 °C a 60 % relativní vlhkosti[4].

Stresové testy trvají maximálně 3 měsíce a zkouší se při nich vliv zvýšené teploty, světla, vlhkosti, změny pH nebo vliv oxidačních činidel[1, 2, 4, 5]. Také se sleduje případná interakce účinné látky s pomocnými látkami nebo obalem. Testy probíhají již před registrací coby předběžná stabilitní studie. Cílem je urychlit rozklad účinné nebo pomocné látky a určit případné degradační produkty. U těchto produktů se poté zjišťuje jejich farmakologická aktivita a jiné fyzikálně-chemické vlastnosti. Pokud jsou degradační produkty nežádoucí, zamezí se situaci, při které tyto produkty vznikají – úprava optimálních podmínek skladování, změna technologie výroby, náhrada pomocných látek nebo jiný obal. Stresové testy se provádí zároveň s vývojem a validací analytické metody pro stanovení příslušného léčiva.

Léčivá látka je považována za stabilní, jestliže vyhovuje specifikaci za podmínek uchovávání 25 °C/60 % relativní vlhkosti po dobu dvou let a za podmínek uchovávání 40 °C/75 % relativní vlhkosti po dobu šesti měsíců[4].

2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

2.1 Obecně

Nejvyužívanější metoda ve farmaceutické analýze – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dále jen HPLC (z anglického high performance liquid chromatography), je založena na principu separace látek, kdy se látky dělí mezi dvě složky v systému, a to mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) složku[6]. Separace probíhá na základě odlišné afinity látek ke stacionární fázi – látky ve směsi jsou různě zadržovány v systému díky stacionární fázi a do detektoru putují již jako jednotlivé separované skupiny molekul. Mobilní fáze je zde kapalina a stacionární fáze může být jak pevná látka, tak i kapalina naadsorbovaná na pevném nosiči (sorbentu). K zadržování látek v sys-

tému dochází po celou dobu průchodu látek kolonou, neustále se díky fázovému rozhraní v systému ustavuje rovnováha dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Míra distribuce je popsána distribuční konstantou.

Pro separaci látek se používají dva režimy nastavení složení mobilní fáze – režim isokratické eluce, kdy je složení mobilní fáze po celou dobu analýzy stejné a kdy nedochází ke změně eluční síly roztoku[6]. Druhým nastavením je režim gradientové eluce, kdy je nastaveno časové rozmezí, během kterého se mění poměr organické a vodné složky mobilní fáze. Dochází tím ke změně eluční síly mobilní fáze a tím pádem k lepší a rychlejší separaci složek vzorku.

2.2 Instrumentace v HPLC

Samotná separace složek analytu probíhá v koloně, což je místo, kde dochází ke styku stacionární a mobilní fáze[6]. Mobilní fáze je tudy pumpována pomocí vysokotlakého čerpadla. Čerpadla mohou být různých typů a jsou volena podle svých vlastností a požadavků pro analýzu – například čerpadla injekčního typu se používají tam, kde je potřeba absolutně bezpulzní provoz a stačí omezený objem zásobníku. Pístová čerpadla se používají, pokud je třeba neomezený přísun mobilní fáze. Jejich pulzní chod se eliminuje zapojením dvou čerpadel do systému, avšak nelze dosáhnout dokonale bezpulzního chodu. Další důležitou součástí HPLC systému je tzv. autosampler, kde dochází k dávkování vzorků pomocí různě konstrukčně řešených zařízení.

Po průtoku vzorku kolonou následuje detektor[6]. Nejvyužívanějšími detektory v HPLC jsou absorpční spektrometry v UV/VIS oblasti s diodovým polem a hmotnostní spektrometry. Detektor reaguje na změnu složení proudící kapaliny – zaznamenáván je rozdíl mezi odezvou při průtoku čisté mobilní fáze a mobilní fáze i se složkou analytu. Na základě odezvy je registrován chromatogram, což je graficky znázorněná závislost odezvy detektoru na čase od nadávkování vzorku na kolonu.

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce elektromagnetického záření[6]. Eluent je po průchodu kolonou veden do cely detektoru, kde dochází k detekci – spektrometry mohou být s fixní, měnitelnou nebo programovatelnou vlnovou délkou. Celé spektrum analytu v reálném čase mohou snímat detektory s diodovým polem.

U hmotnostního detektoru dochází k ionizaci neutrálních molekul pomocí různých technik – například ionizace za atmosférického tlaku elektrosprejem, fotoionizací nebo

chemickou ionizací. Dalším krokem je rozdělení vzniklých fragmentů podle poměru m/z (poměr hmotnost/náboj). Toto rozdělení je umožněno analyzátorem, což může být například kvadrupól, iontová past, analyzátor doby letu nebo magnetický analyzátor. Z analyzátoru dopadají ionty na detektor – elektronový násobič, fotonásobič, apod. Záznamem je hmotnostní spektrum znázorňující závislost intenzity na m/z.

3. Vemurafenib

3.1 Základní informace

Vemurafenib je účinná látka obsažená v léčivém přípravku Zelboraf, který je dostupný ve formě potahovaných tablet určených pro orální podání[7]. Monoterapie vemurafenibem je od roku 2011 schválena v USA. V únoru 2012 jeho užití povolila i Evropská léková agentura[8]. V České republice je Zelboraf hrazen pojišťovnou vybraným pacientům na smluvních pracovištích a podléhá dalšímu sledování a výzkumu[7, 9]. Jedná se o první personalizovanou cílenou léčbu neresekovatelného a metastazujícího melanomu. Obecně vzato je metastazující melanom jedním z nejzhoubnějších a nejnebezpečnějších nádorů, léčitelný bývá pouze pokud je diagnostikován v časném stádiu. V opačném případě je velmi agresivní a pacienti mívají celkovou šanci přežití v řádu měsíců. Medián přežití pacientů se podařilo po léčbě vemurafenibem prodloužit v průměru až na 16 měsíců, oproti dosavadním 6 – 10 měsícům[10,11].

3.2 Způsob použití a účinku vemurafenibu

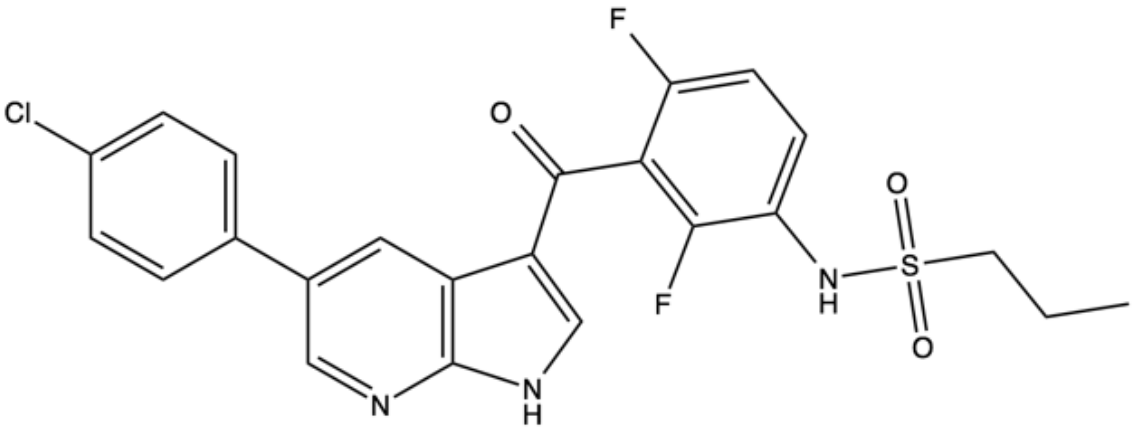
Vemurafenib se používá při léčbě pouze těch metastazujících melanomů, u kterých byla prokázána pozitivní mutace V600 genu BRAF[12]. Protein BRAF je zásadní složkou signální dráhy, která umožňuje růst a přežití buněk[13]. Mutace V600 (v pozici valin 600) může extrémně zvyšovat celkovou aktivitu této dráhy. To vede k proliferaci nádorových buněk i bez růstových faktorů, které jsou jinak k proliferaci nutné[7]. Tato mutace se objevuje u poloviny melanomů a u osmi procent solidních nádorů (nádory v tkáních a orgánech)[9, 12].

Jedná se o selektivní, silný a perorálně biologicky dostupný nízkomolekulární inhibitor serin-threonin proteinkinázy genu BRAF[13]. Vemurafenib je ATP kompetitivní a selektivně se váže na vazebné místo pro ATP na BRAF(V600E) kináze a inhibuje její aktivitu. Tím způsobuje inhibici signální dráhy přímo v genu s mutací V600E (glutamin místo valinu) a směřuje k redukci proliferace nádorových buněk[14].

3.3 Chemická struktura a vlastnosti vemurafenibu

Molekula vemurafenibu je podle pravidel pro názvosloví IUPAC N-[3-[5-(4-chlorofenyl)-1H-pyrolo[2,3-]pyridin-3-karbonyl]-2,4-difluorofenyl]propan-1-sulfonamid (strukturní vzorec viz obrázek A)[14]. Jedná se o bílou krystalickou látku, prakticky nerozpustnou ve vodě (0,032 mg/l při 25 °C). Molekulová hmotnost je 489,92 g/mol, proto se v literatuře mluví o nízkomolekulární látce. Bod tání byl stanoven na 272 °C[14].

Lékovou formou je potahovaná tableta, kde je účinnou látkou (240 mg) vemurafenib ve formě ko-precipitátu s acetátsukcinátem hypromelosy[7]. Jako pomocné látky jsou použity: na jádro – sodná sůl kroskarmelosy, koloidní bezvodý oxid křemičitý, magnesium-stearát, hyprolosa. Potahová vrstva – polyvinylalkohol, oxid titaničitý (E171), makrogol 3350, mastek, červený oxid železitý (E172). Jediným pokynem pro skladování je nutnost uchovávat přípravek v původním obalu, aby byl chráněn před vlhkostí[7].



Obrázek A – strukturní vzorec vemurafenibu.

4. Metody použité ke stanovení vemurafenibu

Pro účely klinického testování a pro podporu dalšího vývoje byly vyvinuty metody pro stanovení vemurafenibu v krevní plasmě. Bylo nutné popsat postupy, které by byly dostatečně citlivé, specifické a vliv matrice by byl potlačen v největším možném rozsahu. Onkologicky těžce nemocní pacienti zpravidla užívají i další léčiva, například analgetika, antikoagulancia, antacida, antiemetika a hypnotika. Proto je zde tak důležitá specifičnost analytické metody a potlačení vlivu matrice na stanovení vemurafenibu. Dnes se téměř veškerá analýza léčiv provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, liší se jen způsob detekce – z mnoha možností je nejužívanější hmotnostní spektrometrie. Ta umožňuje velmi citlivou i specifickou analýzu, cenou za to je náročnost a cena přístrojového vybavení. Lépe dostupnou a také velmi mnoho využívanou metodou detekce je spektrofotometrie v UV oblasti[6].

V roce 2012 byl publikován článek (Sparidans a kol.) o vývoji vysokoúčinné kapalinové chromatografické metodě s hmotnostní detekcí pro stanovení vemurafenibu v lidské plasmě a v plasmě potkanů[15]. Tento článek odkazoval na výzkum Flahertyho a kolektivu, kteří provedli stanovení farmakokinetického profilu vemurafenibu pomocí LC-MS metody, ovšem neuvedli podmínky analýzy – nebyla tedy k dispozici validovaná metoda pro stanovení vemurafenibu[16]. Sparidans a kolektiv tedy optimalizovali metodu a uvedli následující separační podmínky – stacionární fáze byla zajištěna kolonou Acquity UPLC BEH C18 (30 × 2,1 mm, 1,7 μm; Waters) s předkolonou VanGuard (5 × 2,1 mm; Waters), separace proběhla při teplotě 40 °C. Mobilní fáze se skládala ze směsi kyseliny mravenčí, vody a methanolu. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr s elektrosprejovou ionizací.

Jako další se věnovali stanovení vemurafenibu Zheng a kolektiv, kteří v roce 2013 popsali LC metodu se spektrometrickou detekcí v UV oblasti[17]. Jejich cílem bylo vyvinout metodu stanovení vemurafenibu v plasmě s levnějším způsobem detekce, než je hmotnostní spektrometrie. Také tím navázali na předchozí práci Sparidanse a kol., jejichž metoda byla tou dobou jedinou validovanou metodou pro stanovení vemurafenibu v plasmě, která šla dohledat v publikované literatuře. Zheng a kolektiv v práci popsali separaci dvou účinných látek – erlotinibu a vemurafenibu. Separovat tato dvě léčiva od sebe bylo označeno za přínosné pro budoucí klinické testy, jelikož erlotinib může být

v budoucnu využíván pro léčbu v kombinaci s vemurafenibem. Erlotinib je inhibitor kinázy používaný pro léčbu karcinomů plic, slinivky a dalších maligních onemocnění[18].

Separace byla provedena na koloně C8 Xterra® MS spojené s předkolonou se stejnou stacionární fází. Mobilní fáze sestávala z glycinového pufru a acetonitrilu při průtoku 0,9 ml/min. Analýza probíhala při teplotě 50 °C. Pro detekci byl použit režim dvojí vlnové délky, kdy pro vemurafenib a interní standard sorafenib byla použita vlnová délka 249 nm a pro erlotinib 331 nm. Metoda byla použita pro analýzu plasmy pacientů reálně léčených současně vemurafenibem i erlotinibem.

Na tyto dvě práce přímo navázal článek vydaný v roce 2013, na kterém se podíleli mimo jiných i dva z autorů první metody[19]. Rozhodli se potlačit vliv matrice a zvýšit robustnost metody zcela jinou přípravou vzorků a použitím stabilního izotopu jako interního standardu. Sorafenib, použitý v předchozích pracích nebylo podle nich možné považovat za spolehlivý interní standard. Byly analyzovány vzorky z lidské plasmy. Analýza probíhala na koloně Gemini C18 s odpovídající předkolonou při teplotě 40 °C. Nastaven byl eluční gradient sestavený z methanolu a roztoku acetátu sodného ve vodě při průtoku 0,25 ml/min. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr TSQ Quantum Ultra s trojitým kvadrupólem a elektrosprejovou ionizací nebo API300 také s trojitým kvadrupólem. Tyto dvě metody detekce byly porovnány – nebyl nalezen rozdíl v účinnosti těchto detektorů.

Použití $^{13}C_6$-vemurafenibu jako interního standardu následovalo v práci publikované v dubnu 2014, kde byla s odkazem na předchozí tři metody vyvinuta další[20]. Tato metoda byla použita na stanovení obsahu vemurafenibu v plasmě reálně léčených pacientů. Analýza byla provedena pomocí HPLC s tandemovou hmotnostní detekcí. Kolona (Hypersil Gold aQ polar endcapped) byla temperována na 40 °C a propojena s odpovídající předkolonou. Eluce byla provedena v isokratickém režimu při průtoku 0,5 ml/min směsí methanolu a kyseliny mravenčí ve vodě. Detekce proběhla na hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem s elektrosprejovou ionizací.

V únoru 2015 byl publikován článek, kde Bihan a kolektiv popisují vývoj a validaci metody pro kvantifikaci vemurafenibu v lidské plasmě s dalším využitím ve farmakokinetické studii[21]. Byla použita metoda $^{13}C_6$-vemurafenibu jako interního standardu a chromatografická separace proběhla na koloně Acquility UPLC BEH C18 (Waters). Detekce byla provedena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

Všechny tyto metody stanovují vemurafenib v plasmě, G. Radnad Prasad a kolektiv v září 2011 zveřejnili metodu pro stanovení vemurafenibu přímo v lékové formě Zelborafu[22]. Methanol, acetonitril a tetrahydrofuran byly použity jako mobilní fáze a rozpouštědlo. Tablety byly rozemlety, pomocí ultrazvuku rozpuštěny a roztoky přefiltrovány. Roztoky byly dále opakovaně ředěny a filtrovány. Analýza byla provedena na stacionárních fázích C8 a C18, kdy byla pro validaci vybrána kolona Chromasil C18. Detekce proběhla při vlnové délce 271 nm. Metoda byla validována coby jednoduchá, rychlá, přesná, citlivá a specifická metoda vhodná pro stanovení obsahu vemurafenibu v tabletě.

Přehled podmínek separace při výše uvedených metodách je uveden v tabulce A na str. 19.

5. Degradační studie vemurafenibu

Degradační studii vemurafenibu se věnovali J. Chhabda a kolektiv[23]. Článek byl publikován v roce 2013 a cílem práce bylo vyvinout metodu stanovení vemurafenibu v tabletě a podrobit tabletu zátěžový zkouškám, v případě degradace účinné látky kvantifikovat množství vzniklých degradačních produktů. Jako rozpouštědlo pro standard i vzorek byl použit roztok acetonitrilu ve vodě. Tablety byly rozemlety na prášek, pomocí ultrazvuku rozpuštěny a roztok byl přefiltrován. Ten byl dále ředěn na požadovanou koncentraci. Byly provedeny testy s přítomností kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného (oboje 0,1 M), kdy se po dobu 24 hodin při 80 °C nechaly tyto roztoky působit na vemurafenib. Poté byl roztok zchlazen, neutralizován, naředěn a nadávkován na kolonu. Test vlivu oxidačního činidla byl proveden s 5% roztokem peroxidu vodíku, kdy při laboratorní teplotě působil roztok na vemurafenib 24 hodin, poté byl roztok zředěn a nadávkován do kolony. Pro test termostability byl 1 g vemurafenibu ponechán po dobu 7 dní v 80 °C. Poté byl vzorek rozpuštěn a zanalyzován. Obdobně byl testován 1 g vemurafenibu na fotostabilitu ve fotokomoře.

K analýze byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Jako stacionární fáze posloužila kolona Zorbax Eclipsed XDB C8, mobilní fáze v isokratickém režimu (50:50) byla sestavena ze směsi kyseliny fosforečné (0,1% roztok ve vodě) a acetonitrilu. Pro detekci byla nastavena vlnová délka 254 nm. Metoda byla validována pro stanovení vemurafenibu v tabletě. Bylo zjištěno, že žádný z degradačních produktů nemá stejný eluční čas s vemurafenibem a metoda je selektivní

na degradační produkty vemurafenibu. Při zátěžových testech byl největší rozklad tablety zaznamenán při kyselé i zásadité hydrolýze, kdy došlo k degradaci vemurafenibu přibližně z devadesáti procent. Během teplotních zkoušek došlo k rozpadu 0,15 % vemurafenibu a při testech fotostability 1,22 %. Nebyl zaznamenán vliv oxidačního činidla. Vznikající degradační produkty byly stanoveny pouze kvantitativně a jejich struktura nebyla dále zjišťována.

Tabulka A – přehled publikovaných metod pro stanovení vemurafenibu

datum zveřej-nění	stacionární fáze	předkolona	teplota kolony [°C]	mobilní fáze	průtok MF [ml/min]	režim eluce	interní standard	detekce	LLOQ [μg/ml]	matrice	předúprava vzorku
únor 2012[15]	Acquity UPLC BEH C18 (30 × 2,1 mm, 1,7 μm; Waters)	VanGuard (5 × 2,1 mm; Waters)	40	kys. mravenčí (0,1%)-voda (10%), methanol (70%)-voda (20%)	0.6	isokra-tická	sorafenib	MS	0,1	plasma	precipitace proteinu
květen 2013[17]	C8 Xterra MS (250 × 4,6 mm, 5 μm; Waters)	same phase	50	glycinový pufr (pH = 9, 100mM) - acetoni-tril (45:55)	0.9	isokra-tická	sorafenib	UV 249 nm	1,25	plasma	precipitace proteinu
říjen 2013[19]	Gemini C18 (110A, 50 × 2,0 mm ID, 5,0 μm; Phenomenex)	corresponding (4,0 × 2,0 mm ID)	40	10 mM acetát amonný, methanol	0.25	gradi-entová	$^{13}C_6$ vemura-fenib	MS	1,0	plasma	LLE ex-trakce
duben 2014[20]	Hypersil Gold aQ po-lar endcapped (100 × 2,1 mm, 1,9 μm, ThermoFischer)	corresponding drop-in (10 × 2,1 mm)	40	0,1% kys. mravenčí-methanol (30:70)	0.5	isokra-tická	$^{13}C_6$ vemura-fenib	MS	0,1	plasma	precipitace proteinu
únor 2015[21]	Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 mm; Waters)		–	–	–	–	$^{13}C_6$ vemura-fenib	MS	0,1	plasma	precipitace proteinu
září 2011[22]	Chromasil C18 (250 × 4,6 mm, 7,5 μm, Prochrome)	–	labora-torní	methanol, acetonitril, THF (65:20:15, v:v:v), pH 4,2	0.8	isokra-tická	není	UV 271 nm	–	tableta	rozpuštění tablety
květen 2013[23]	Zorbax eclipsed XDB C8 (4,6 × 150 mm, 3,5 μm)	–	30	fosforečnanový pufr-acetonitril (50:50, v:v)	1	isokra-tická	není	UV 254 nm	0,55	tableta	rozpuštění tablety

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Seznam přístrojů a chemikálií

1.1 Přístroje

Kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1260 Series Infinity; software Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition verze C.01.06; (Waldbronn, Německo)
Kolona – Poroshell C18 HPH (3x10 mm, 2,7 μm), sériové č. USGYQ01197
Analytické váhy – APX 100 Denver Instrument (Německo)
Kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1290 (Waldbronn, Německo)
Hmotnostní spektrometr – trojitý kvadrupól QqQ 6460 Agilent (Waldbronn, Německo)
Ultrazvuková lázeň – Ultrasonic LC 30 H (Německo)
Centrifuga Allegra X-22R (Beckman Coulter, USA)
pH metr Jenway 3510 (Bibby Scientific Limited, Velká Británie)

1.2 Chemikálie

Vemurafenib – standard dodaný firmou Zentiva a. s.
Sodná sůl kroskarmelosy, koloidní bezvodý oxid křemičitý, magnesium stearát a hyprolosa – excipienty, dodány firmou Zentiva a. s.
Acetonitril – CHROMASOLV for HPLC 99,9%, Sigma-Aldrich, Německo
Fosforečnan amonný – 98%, Sigma-Aldrich, Japonsko
Peroxid vodíku – nestabilizovaný, 30%, Lach-Ner, Česká republika
Hydroxid sodný – 98% pevný, Lach-Ner, Česká republika
Kyselina chlorovodíková – 35% p. a., Lach-Ner, Česká republika
Methanol – CHROMASOLV for LC-MS 99,9%, Sigma-Aldrich, Izrael
Kyselina fosforečná – 85,0 – 88,0%, Sigma-Aldrich, Švýcarsko
Kyselina mravenčí – 98 – 100 %, Merck, Německo
Deionizovaná voda – získaná purifikací přístrojem Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

2. Volba separačních podmínek

2.1 Isokratická separace

Podle dostupné literatury byla pro analýzu zvolena kolona Poroshell C18 HPH (3x10 mm, 2,7 μm) s oktadecylovou stacionární fází. Kolona byla temperována na 30 °C. Mobilní fáze byla tvořena ze dvou složek, a to organické složky – acetonitrilu a vodné složky – 10mM fosforečnanového pufru o pH = 3,00 ±0,05 (úprava pH kyselinou fosforečnou).

Standard vemurafenibu byl navážen a rozpuštěn ve 100% methanolu – roztok standardu byl připravován vždy v koncentraci 1 mg/ml, pokud není uvedeno jinak. Po rozpuštění byl roztok standardu 5 minut ponechán v ultrazvukové lázni a poté přefiltrován 0,45 μm filtrem. Pro každou další sérii měření byl připraven vždy čerstvý roztok standardu podle výše uvedeného postupu.

Pro orientační určení elučních časů standardu byly provedeny jednotlivé isokratické eluce, a to vždy s různým poměrem organické a vodné složky mobilní fáze. Tímto způsobem byl sledován vliv obsahu organické složky v mobilní fázi na čas eluce vemurafenibu. Pro analýzu bylo zvoleno množství dávkovaného vzorku jako 1 μl a průtok mobilní fáze nastaven na 0,6 ml/min. Detekce byla provedena pomocí UV/VIS spektrometru s diodovým polem při 250, 290 a 310 nm.

2.2 Gradientová eluce

Pro účely stabilitní degradační studie bylo nutné zvolit program gradientové eluce. Při stejném průtoku mobilní fáze (0,6 ml/min) byly vyzkoušeny různé kombinace gradientových profilů. Při optimálním gradientovém profilu hlavní pík vemurafenibu eluoval kolem desáté minuty. Celkový čas analýzy byl 21 minut. Separace všech následujících vzorků ze stabilitní studie dále probíhala za stejných podmínek při programu gradientové eluce.

3. Stabilitní studie

3.1 Test stability

Pro zkoušku stability vemurafenibu v práškové formě byly zvoleny podmínky tepla (80 °C) a vlhkosti (75% RV). Do těchto podmínek byly umístěny vzorky standardu, směsi standardu a čtyřech excipientů a samotné excipienty bez standardu. Látky byly naváženy do odměrných baněk tak, aby po rozpuštění byla koncentrace standardu 1 mg/ml. Pomocné látky sodná sůl kroskarmelosy, koloidní bezvodý oxid křemičitý, magnesium stearát a hyprolosa byly naváženy v množství pro teoretickou koncentraci 10 mg/ml (pro každou látku). Směsi byly do stabilitní komory umístěny v otevřených a uzavřených baňkách, čímž byly získány dvojí vzorky – pro určení vlivu teploty i vlhkosti a pro určení vlivu samotné teploty. Po osmi dnech byly odměrné baňky se vzorky doplněny methanolem, ponechány 15 minut v ultrazvukové lázni a posléze osm minut centrifugovány při 10 tisících rpm (tento způsob centrifugace byl používán i nadále). Supernatant takto upravených vzorků byl nadávkován do kolony a podroben výše popsané separaci s gradientovou elucí. Společně se vzorky byly analyzovány i dva roztoky standardu, jeden roztok samotného standardu a jeden roztok standardu společně s excipienty, obojí bez zátěže.

3.2 Degradační studie

Byl připraven roztok vemurafenibu o koncentraci 1 mg/ml. Tento roztok byl pětkrát ředěn do odměrných baněk následovně: pro kyselou hydrolýzu 0,1M roztokem kyseliny chlorovodíkové, pro zásaditou hydrolýzu 0,1M roztokem hydroxidu sodného, pro oxidaci peroxidem vodíku ve dvou koncentracích, a to 3% a 0,3% roztokem. Kvůli špatné rozpustnosti vemurafenibu ve vodě bylo pětinásobné ředění nevhodné a vzorky byly připraveny znova – ze 3 ml zásobního roztoku standardu doplněním pětimililitrové odměrné baňky roztoky kyseliny chlorovodíkové nebo peroxidu vodíku (pro roztok NaOH bylo původní pětinásobné ředění vyhovující). Roztoky byly ponechány 5 minut v ultrazvukové lázni a poté centrifugovány. Supernatant byl nadávkován na kolonu, stejně jako standard a slepé vzorky každého z použitých roztoků (slepé vzorky byly před analýzou filtrovány 0,2 μm filtrem).

Analýza těchto stejných vzorků byla provedena za stejných podmínek i po dvaceti hodinách s cílem porovnání chromatogramů po uplynutí delšího časového úseku od smísení roztoků.

Roztoky byly ihned po smísení také umístěny do stabilitní komory (80 °C), kde byly ponechány 24 hodin za účelem možné katalýzy degradace. Po vyjmutí z inkubátoru byly vzorky promíseny, roztok byl centrifugován a supernatant nadávkován do kolony.

Test degradace vemurafenibu byl proveden také s minimální koncentrací standardu v roztoku. To proto, aby nedocházelo k vysrážení vemurafenibu z roztoku při ředění vodnými roztoky kyseliny chlorovodíkové, hydroxidu sodného a peroxidu vodíku jako při použití zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml. Do 25ml odměrné baňky byl navážen 1 mg standardu a rozpuštěn ve 4 ml methanolu. Takto vzniklý roztok byl doplněn po rysku příslušným roztokem pro degradaci. Po doplnění byly roztoky ultrazvukovány, filtrovány a nadávkovány na kolonu. Separace stejných vzorků byla provedena i po 20 hodinách. Roztoky byly ponechány 24 hodin v 80 °C, poté přefiltrovány a nadávkovány na kolonu.

3.3 Analýza degradačních produktů pomocí hmotnostní spektrometrie

Vzorek standardu a vzorek kyselé hydrolýzy byly podrobeny LC-MS analýze. Separace proběhla za výše uvedených podmínek, kdy fosforečnanový pufr byl nahrazen 0,1% roztokem kyseliny mravenčí.

4. Stanovení kalibrační závislosti, meze detekce a meze stanovitelnosti

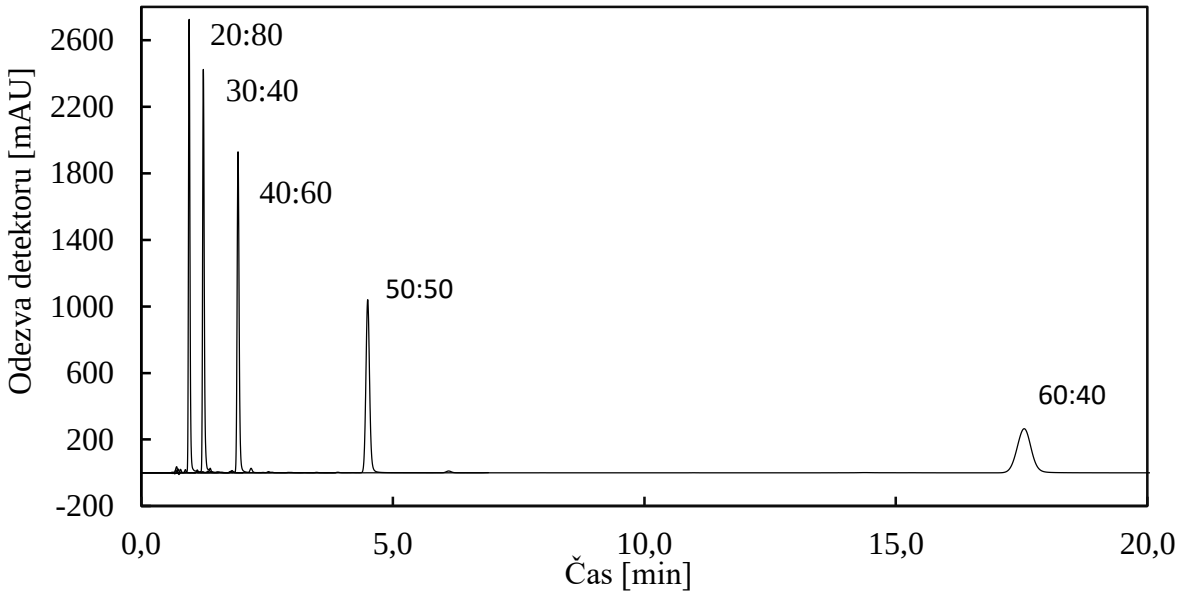
Do odměrných baněk byl navážen standard a čtyři pomocné látky. Standard byl rozpuštěn v methanolu, roztoky byly ultrazvukovány a centifugovány. Kalibrační řada byla připravena v koncentračním rozmezí 0,4 – 1,2 mg/ml vemurafenibu (40 – 120 % množství látky v lékové formě). Excipienty byly do směsi naváženy v absolutním množství 20 mg od každé látky. Od každé koncentrační hladiny byly připraveny tři jednotlivé roztoky. Kalibrační roztoky byly analyzovány pomocí již popsané gradientové eluce, přičemž každý roztok byl na kolonu nadávkován třikrát. Mezi různé koncentrace zásobních roztoků byl vždy vložen slepý vzorek methanolu. Na začátku i na konci sekvence byl změřen standard vemurafenibu o koncentraci 1 mg/ml bez excipientů. Vzorky byly na kolonu dávkovány od nejnižší koncentrace po nejvyšší.

VÝSLEDKY A DISKUZE

1. Volba separačních podmínek

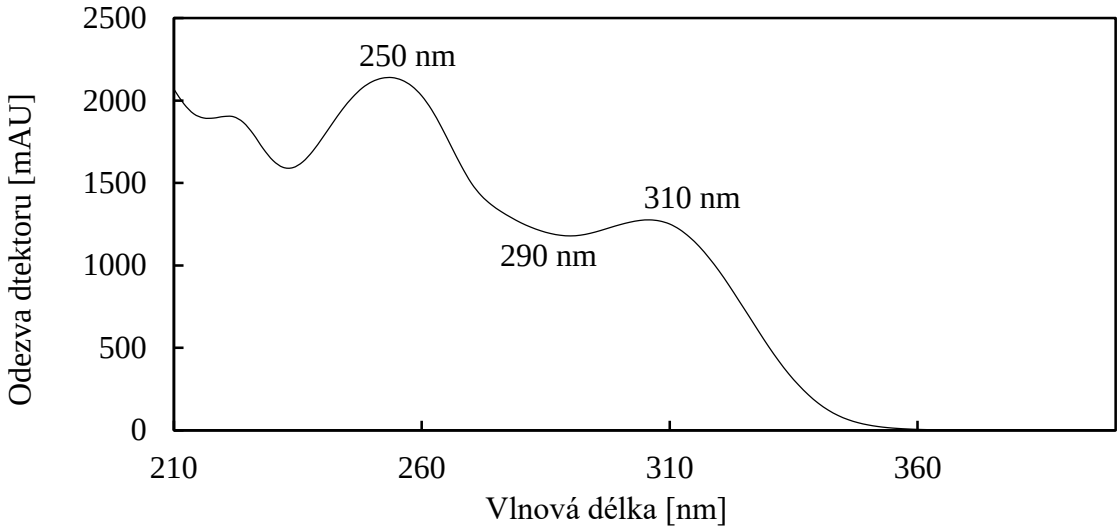
Bylo provedeno několik isokratických elucí s různým poměrem mezi organickou a vodnou složkou mobilní fáze (zkoušené složení mobilní fáze je uvedeno i s chromatogramy na obrázku č. 1). Z výchozího poměru 50:50 (pufr:acetonitril), kdy standard eluoval přibližně při 4,5 minutách, byl poměr změněn na 60:40 (pufr:acetonitril), kdy se analýza prodloužila až na 17,5 minut. Dále byl nastavován obsah acetonitrilu vždy po deseti objemových procentech až do poměru 20:80 (pufr:acetonitril), kdy se nejkratší eluce zkrátila na 55 sekund.

Z obrázku č. 1 jasně vyplývá, že na retenční čas vemurafenibu mělo složení mobilní fáze velký vliv. Změnil se retenční čas – s vyšším obsahem organické složky mobilní fáze docházelo k nižší retenci vemurafenibu a naopak. Také šířka píku se zmenšila a výška píku vzrostla s vyšším obsahem acetonitrilu.



Obrázek č. 1 – chromatogramy isokratické eluce při různých poměrech organické a vodné složky MF – poměry jsou uvedeny v pořadí pufr:acetonitril. Spektrofotometrická detekce při 250 nm.

Isokratická eluce byla provedena za účelem zjištění retenčního chování vemurafenibu v použité stacionární a mobilní fázi – byl získán symetrický pík standardu. Během isokratické eluce bylo získáno absorpční spektrum v UV/VIS oblasti elektromagnetického záření a byla určena vlnová délka absorpčního maxima (250 nm), která byla později použita pro vyhodnocování chromatogramů (absorpční spektrum vemurafenibu je zobrazeno na obrázku č. 2).



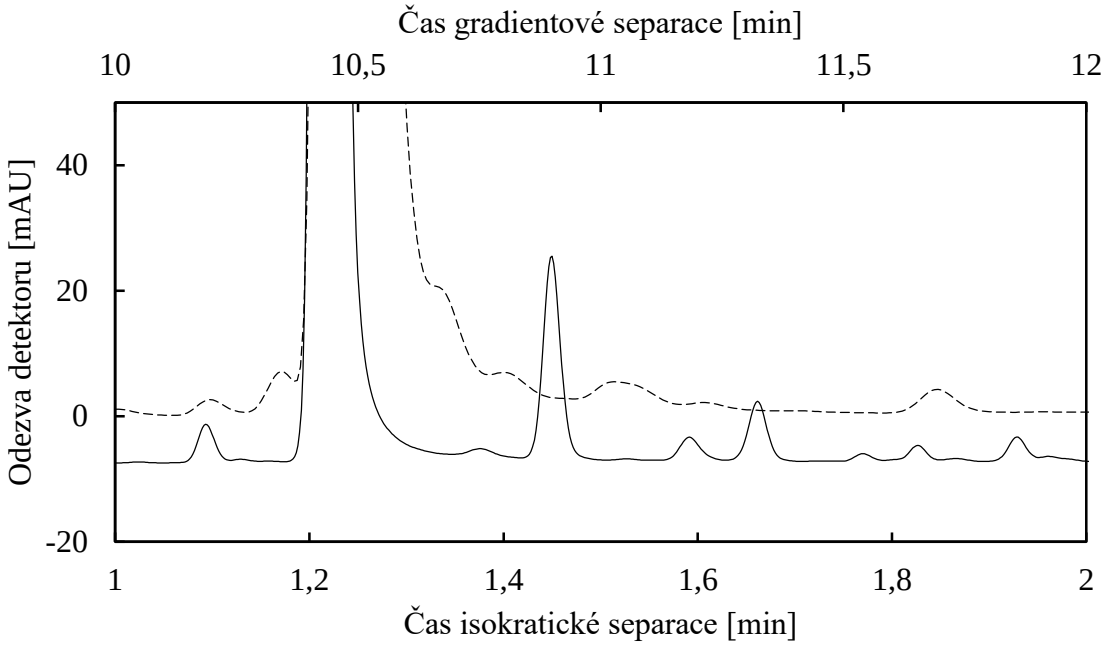
Obrázek č. 2 – absorpční spektrum vemurafenibu v oblasti UV/VIS.

Kvůli následujícím stabilitním testům byl zvolen gradientový program průtoku mobilní fáze, aby bylo možné separovat případné vznikající degradační produkty, jejichž vlastnosti nebyly předem známy. Bylo vyzkoušeno více kombinací gradientového nastavení mobilní fáze – různá časová rozmezí pro změnu poměru složek mobilní fáze. Separační podmínky zvolené pro další analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – Separační podmínky analýzy vemurafenibu

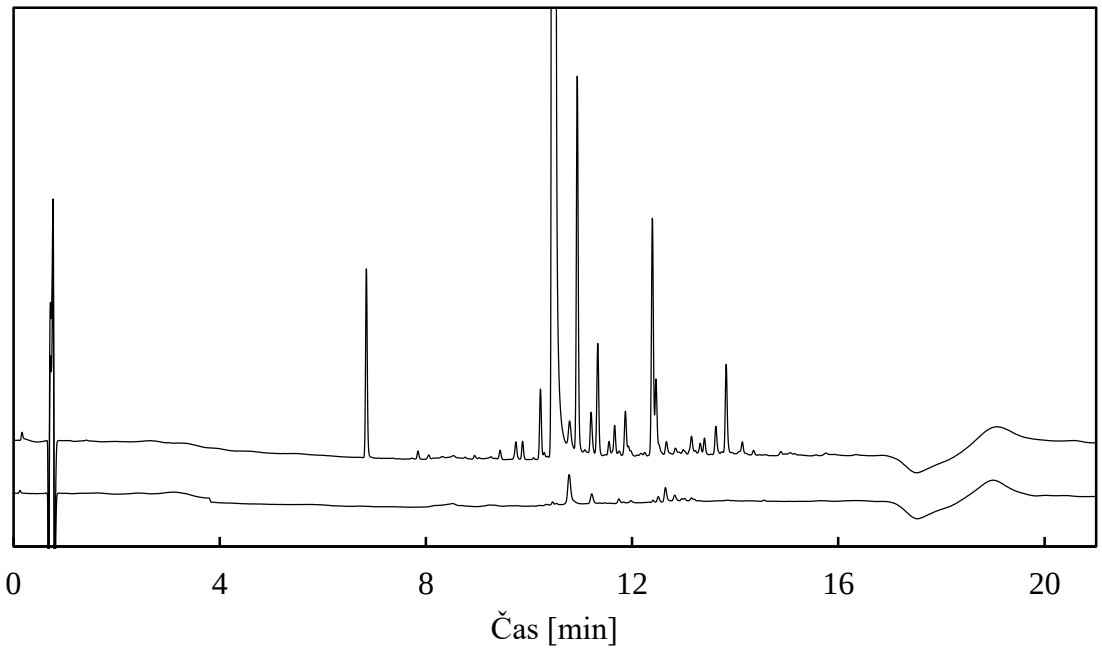
Stacionární fáze (kolona)	Poroshell HPH-C18 (3 × 100 mm, 2,7 μm)				
Teplota kolony	30 °C				
Dávkované množství vzorku	1 μl				
Mobilní fáze	acetonitril; fosfátový pufr (pH = 3)				
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min				
Nastavení gradientového programu					
Čas [min]	0 – 1	1 –12	12 – 15	15 – 16,5	16,5 – 21
pufr:acetonitril [v:v]	80:20	20:80	20:80	80:20	80:20

Při gradientové eluci standardu byl hlavní pík zaznamenán v 10,5 minutě, což je v polovině programu analýzy. Také byly zaznamenány v okolí hlavního píku menší píky, které při isokratické separaci nebyly oddělené od hlavního píku. Gradientová eluce tedy pomohla lépe rozseparovat složky nadávkovaného vzorku a zaznamenat tak i ostatní látky ve vzorku. Porovnání míry separace je znázorněno v obrázku č. 3.



Obrázek č. 3 – plnou čarou je vykreslen chromatogram z gradientové analýzy. Přerušovanou čarou je zaznamenána isokratická eluce při poměru 30:70 (pufr:acetonitril). Separační podmínky gradientové eluce viz tab. č. 1 (str. 26). Detekce spektrofotometricky při 250 nm.

Z porovnání chromatogramů standardu a slepého vzorku (methanolu) lze poznat, že standard vemurafenibu obsahoval neznámé nečistoty (viz obrázek č. 4). Tyto nečistoty byly zaznamenávány v každém dalším chromatogramu. Celkový podíl těchto nečistot činil 5,67 % relativní plochy pod křivkou, jak je uvedeno v příloze č. 1.



Obrázek č. 4 – srovnání analýzy blanku a standardu. Blank je vyznačen spodní linií ve stejném měřítku se standardem. Separační podmínky viz tab. č. 1 (str. 26). Detekce spektrofotometricky při 250 nm.

2. Stabilitní studie

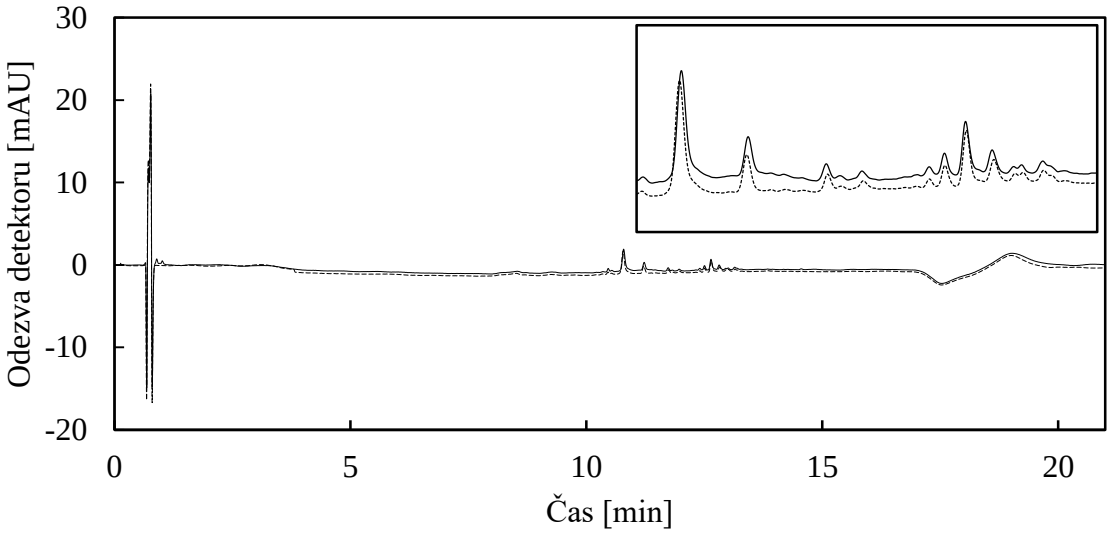
S cílem porovnat změny v chromatogramech číselně a nejen graficky byly do tabulky shrnuty hodnoty relativních ploch zaznamenaných píků v závislosti na jejich relativních retenčních časech. Hodnoty pro testy stability i pro degradační studii jsou uvedeny v příloze č. 1. Ze záznamů byly vyloučeny píky s menší relativní plochou, než je 0,05 %. Chromatogramy jsou zde zobrazeny jako výběr časového úseku, kdy byl zaznamenán pík vemurafenibu a ostatní píky s relativní plochou vyšší než 0,05 %.

2.1 Test stability

Vzorky vyjmuté po osmi dnech ze stabilitní komory (80 °C a 75% relativní vlhkosti) po separaci ukázaly, že na degradaci vemurafenibu nemá teplota a vlhkost zásadní vliv.

Ani skladování roztoku standardu 24 hodin v 5 °C neukázalo žádnou degradaci vemurafenibu. U hlavního píku došlo k maximální změně relativní plochy (zmenšení o 0,61 %) při teplotní i vlhkostní zátěži standardu společně s excipienty. Rozdíl relativních ploch hlavního píku mezi teplotním testem a testem s teplotou i vlhkostí činil 0,26 % a to v obou případech – u samotného standardu i standardu s excipienty. Veškeré hodnoty relativních ploch a retenčních časů jsou shrnuty v příloze č. 1.

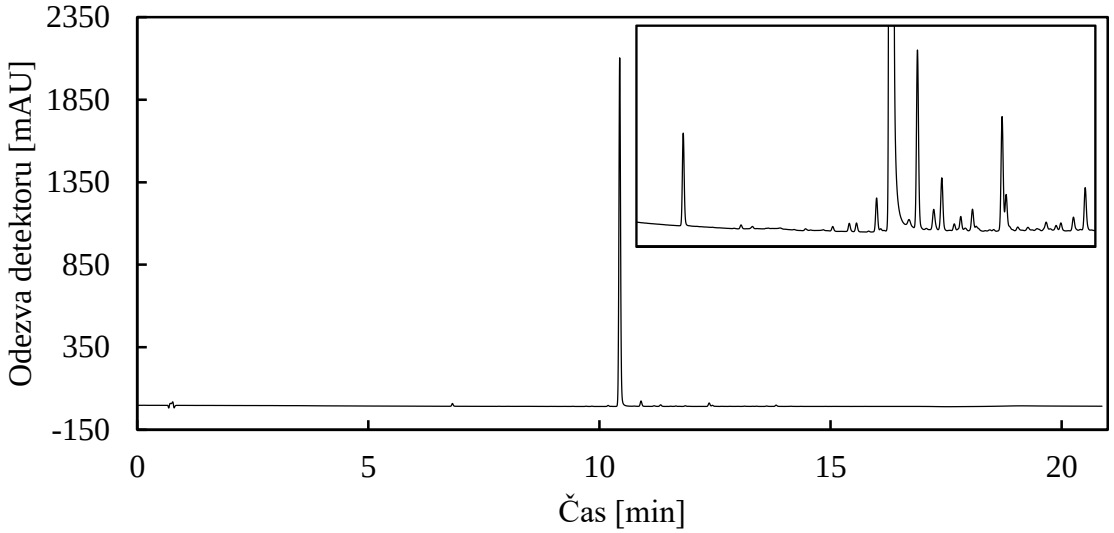
Testu stability byly podrobeny i samotné excipienty – při vlnové délce 250 nm nebyl zaregistrován žádný pík odlišující se od linie blanku. Excipienty tedy nepodlehly změně při testu stability nebo tuto změnu nebylo možné při použitém způsobu detekce zaregistrovat – je tedy možné vyloučit, že by nějaký z případných degradačních produktů byl produkt rozpadu excipientu. (viz obrázek č. 5). Excipienty obvykle neabsorbují v oblasti UV/VIS a tak je často není možné v jejich původní formě zaznamenat, případně dochází vlivem jejich polarity k eluci s mrtvým časem.



Obrázek č. 5 – srovnání chromatogramů blanku a excipientů po testu stability. V rohu je zobrazen výřez chromatogramu s osou x v rozpětí 10 – 14 minut a s osou y v rozsahu 5 mAU. Blank je zobrazen přerušovanou čarou a excipienty plnou čarou. Separační podmínky viz tab. č. 1 (str. 26). Detekce spektrofotometricky při 250 nm.

2.2 Degradační studie

Pro vyhodnocení vlivu oxidace, kyselé a zásadité hydrolýzy byly chromatogramy vzorků porovnány s chromatogramem roztoku standardu (obrázek č. 6) graficky. Také byly číselně porovnány změny relativních ploch píků se stejným relativním retenčním časem – hodnoty jsou uvedeny v příloze č. 1.

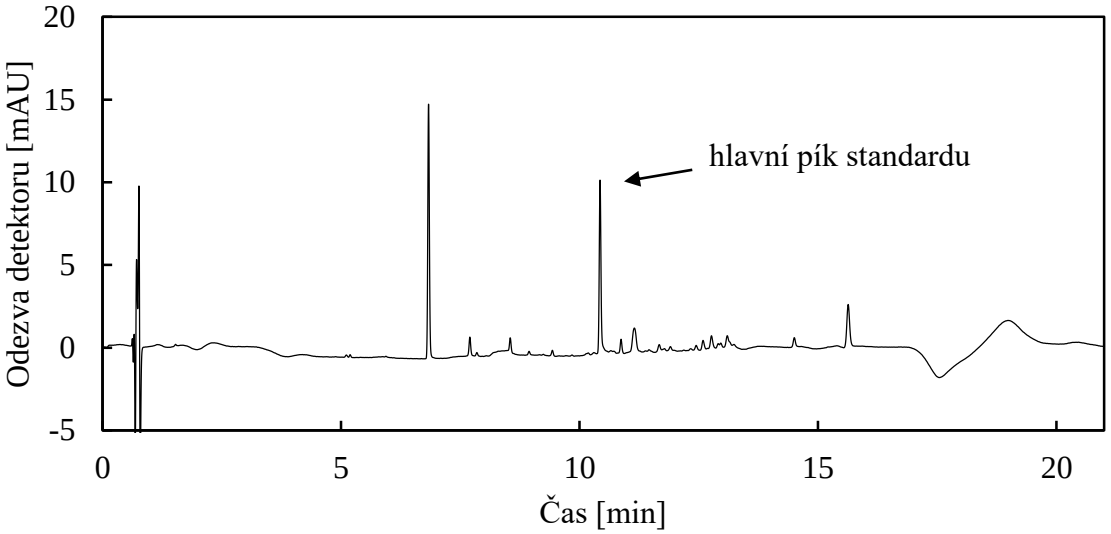


Obrázek č. 6 – Chromatogram standardu. v rohu je zobrazen výřez chromatogramu s osou x v rozpětí 6,5 – 14 minut a s osou y v rozsahu 30 mAU. Separační podmínky viz tab. č. 1 (str. 26). Detekce spektrofotometricky při 250 nm.

2.2a Kyselá hydrolýza

Roztok standardu vemurafenibu nebylo možné zředit 0,1M roztokem kyseliny chlorovodíkové pětkrát, jelikož docházelo k vysrážení standardu z roztoku. K prvnímu testu degradace bylo tedy použito menší ředění, aby vemurafenib zůstal v rozpuštěné formě. Během hydrolýzy došlo k výrazné degradaci vemurafenibu na neznámé produkty – hlavní pík tvořil 83,51 % místo původních 94,01 % relativní plochy. Degradace pokračovala i během následujících 20 hodin – byl zaznamenán úbytek relativní plochy píku až na 58,31 %. Po 24hodinové hydrolýze v 80 °C byla zaznamenaná relativní plocha hlavního píku jen 25,17 %. Na záznamu z DAD detektoru nebyl ani přes tento výrazný úbytek žádný nový zřetelný pík poukazující na přítomnost degradačního (nového) produktu. Došlo jen ke zmenšení hlavního píku téměř na úroveň šumu (viz obrázek č. 7).

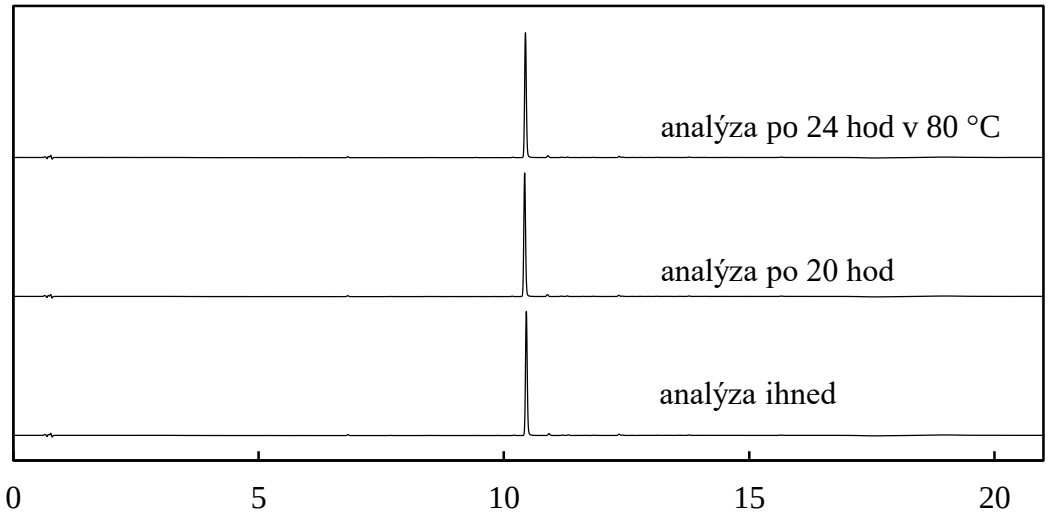
Při degradačním testu s nižší koncentrací vemurafenibu v roztoku došlo k stejnému efektu – hlavní pík téměř vymizel na úroveň šumu, což bylo podpořeno ještě nízkou počáteční koncentrací vemurafenibu v roztoku.



Obrázek č. 7 – Chromatogram vzorku (koncentrace vemurafenibu 0,6 mg/ml) po 24hod hydrolýze v 80 °C. Separační podmínky viz tab. č. 1 (str. 26). Detekce spektrofotometricky při 250 nm.

2.2b Zásaditá hydrolýza

Degradace vemurafenibu působením 0,1M roztokem NaOH byla vyloučena. Po analýze vzorku nebyla graficky (obrázek č. 8) zaznamenaná žádná změna oproti analýze standardu. Ani po číselném zhodnocení pomocí relativních retenčních časů a ploch (viz příloha č. 1) nebyla nalezena žádná degradace vemurafenibu.



Obrázek č. 8 – chromatogramy vzorků po zásadité hydrolýze. Separační podmínky viz tab. č. 1 (str. 26). Detekce spektrofotometricky při 250 nm.

2.2c Oxidace peroxidem vodíku

Při mísení roztoku standardu a peroxidu vodíku docházelo při pětinásobném ředění k vysrážení vemurafenibu z roztoku, proto bylo použito výše popsané menší ředění, stejně jako v případě kyselé hydrolýzy a to v případě 3% i 0,3% roztoku. Došlo taktéž ke zmenšení relativní plochy hlavního píku, a to o 2,57 % v případě 3% peroxidu a o 6,35 % v případě 0,3% roztoku. Degradace pokračovala dále i po 20 hodinách, kdy se relativní plochy z původní hodnoty zmenšily o 5,70, resp. 7,70 %. Při vložení roztoků vzorku do 80 °C došlo pravděpodobně ke změně mechanismu degradace a hlavní píky se zmenšily o 3,38, resp. 2,47 %. Je zřejmé, že na degradaci vlivem peroxidu vodíku měla vliv jak teplota okolního prostředí, tak koncentrace samotného roztoku peroxidu vodíku. Tyto výsledky budou ověřeny a podrobeny dalšímu zkoušení, například s více různými koncentracemi roztoku peroxidu vodíku nebo s různými okolními teplotami.

2.2d Porovnání výsledků

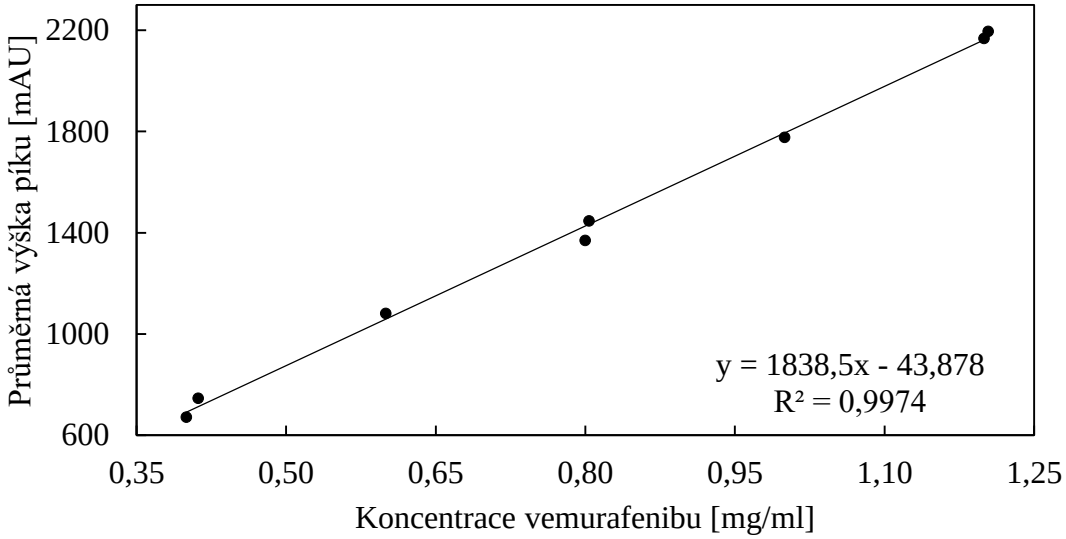
Výsledky získané v této práci je možné porovnat s výsledky získanými v roce 2013[23]. Byla provedena také degradační studie, ovšem výsledek byl odlišný – degradace přibližně 90% účinné látky byla pozorována u kyselé i zásadité hydrolýzy, naopak u oxidace 5% peroxidem vodíku nebyla zaznamenána žádná degradace. Při degradaci byl zaznamenán výrazný nově vzniklý pík údajného produktu, ovšem nebyla provedena další identifikace této látky. Výsledné chromatogramy po teplotní a fotolytické zátěži nejsou k dispozici, ale v práci je uvedena degradace z 0,15, resp. 1,22 %.

2.3 Analýza degradačních produktů pomocí hmotnostní spektrometrie

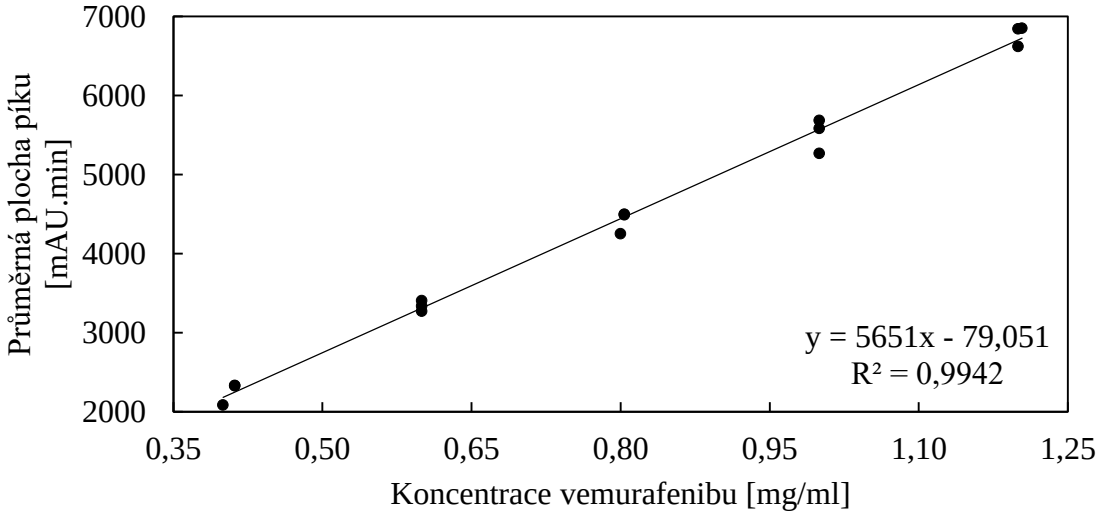
Metoda byla přenesena z chromatografu Agilent Technologie 1260 Series Infinity na Agilent Technologies 1290 Series. Fosforečnanový pufr v mobilní fázi byl nahrazen 0,1% kyselinou mravenčí a byly nastaveny shodné separační podmínky. Proběhla analýza vzorku s hmotnostní detekcí, k tomu byla použita ionizace pomocí elektrospreje v pozitivním i negativním módu. Ve výsledném záznamu nebylo možné rozeznat známky přítomnosti vzniklých degradačních produktů, jedná se tedy pravděpodobně o látky, jež není možné ionizovat. V rámci dalšího zkoušení bude vhodné vyzkoušet jiný způsob ionizace – chemickou ionizaci.

3. Stanovení kalibrační závislosti, meze detekce a meze stanovitelnosti

Byly zaznamenány výšky a plochy píků standardu. Z každého kalibračního roztoku byly provedeny tři analýzy a do výpočtu byl uvažován aritmetický průměr těchto hodnot. Byly vytvořeny grafy závislosti průměrné výšky píku (obrázek č. 8) a průměrné plochy píku (obrázek č. 9) na koncentraci standardu v roztoku. Z grafu byla lineární regresí určena směrnice přímky a hodnota koeficientu determinace. Pomocí rovnice přímky popisující závislost výšky píku na koncentraci byly stanoveny mez detekce a mez stanovitelnosti.

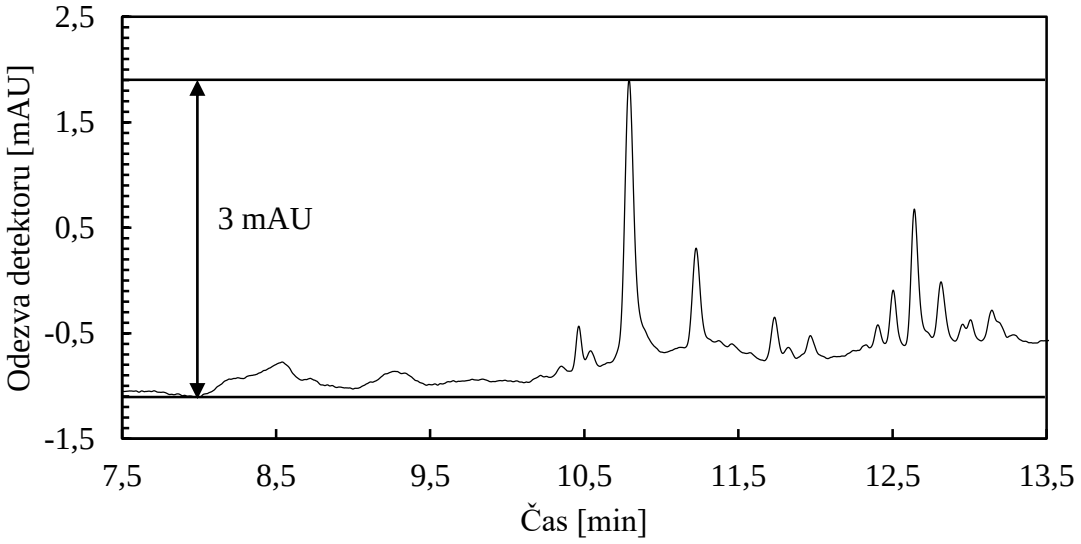


Obrázek č. 8 – závislost průměrné výšky píku na koncentraci standardu.



Obrázek č. 9 – závislost průměrné plochy píku na koncentraci standardu.

Nejprve byla stanovena hodnota šumu základní linie (obrázek č. 10), jelikož se jednalo o stanovení kalibrační závislosti standardu v přítomnosti excipientů. Jako hodnota šumu bylo určeno rozmezí mezi maximální a minimální hodnotou signálu roztoku excipientů v okolí tří minut eluce standardu (7,5. – 13,5. minuta). Rozmezí šumu bylo 3 mAU. Limit detekce byl stanoven na 5,0 µg/ml vemurafenibu, limit stanovitelnosti činil 16,5 µg/ml. Tyto hodnoty byly získány vydělením trojnásobku, resp. desetinásobku hodnoty šumu základní linie hodnotou směrnice kalibrační přímky (závislosti výšky píku na koncentraci).



Obrázek č. 10 – určení velikosti šumu základní linie na chromatogramu excipientů. Separační podmínky viz tab. č. 1 (str. 26). Detekce spektrofotometricky při 250 nm.

ZÁVĚR

Byly zvoleny optimální podmínky pro analýzu standardu účinné látky vemurafenibu. Zvolen byl program gradientové eluce, kde bylo možné v čase 21 minut účinně separovat složky dávkovaného vzorku. Již v dodaném standardu vemurafenibu byly detekovány neznámé nečistoty. Standard v práškové formě byl podroben testu stability – byl sledován vliv teploty a vliv teploty s vlhkostí na tento standard. Po rozpuštění vzorků byla provedena separace a byl zaznamenán jen minimální vliv těchto podmínek – relativní plocha hlavního píku se změnila maximálně o 0,61 %, což lze brát jako známku toho, že teplota ani vlhkost nemá na stabilitu vemurafenibu vliv. Ani v přítomnosti excipientů nedošlo k degradaci látky, tudíž i excipienty coby možné katalyzátory rozpadu lze vyloučit.

Během degradačních testů na vliv kyselé a zásadité hydrolýzy došlo k zjištění, že vemurafenib se výrazně rozkládá při působení 0,1 M HCl na neznámé produkty. Tyto produkty nebylo možné na spektrofotometrickém detektoru zaznamenat, jedná se tedy o látky, které neabsorbují záření použitých vlnových délek. Rozklad pokračoval i s časem a byl také podpořen vložením roztoku do prostředí s vyšší teplotou. Naopak při zásadité hydrolýze nedošlo k žádné změně a standard zůstal v původní formě. Oxidace peroxidem vodíku také ukázala rozklad vemurafenibu. Degradaci potvrdily i zkoušky s velmi nízkou koncentrací standardu, kdy po smísení s degradačním roztokem došlo k téměř vymizení hlavního píku – opět kromě zásadité hydrolýzy, kde se chromatogram vzorku shodoval s chromatogramem standardu.

Byla určena kalibrační závislost v rozmezí koncentrace 0,4 – 1,2 mg/ml pro stanovení vemurafenibu ve směsi s excipienty – limit detekce byl stanoven na 5,0 μg/ml vemurafenibu, limit stanovitelnosti na 16,5 μg/ml.

Stabilitní testy							Degradační studie												
		Standard samotný		Standard + excipienty		Standard + excipienty	Standard	Měřeno ihned				Měřeno po 20 hodinách				Měřeno po 24 hodinách v 80 °C			
RRT	Standard bez zátěže	Teplo	Teplo + vlhko	Teplo	Teplo + vlhko	Bez zátěže	Bez zátěže	Kyselá hydrolýza	Zásaditá hydrolýza	Oxidace 3%	Oxidace 0.3%	Kyselá hydrolýza	Zásaditá hydrolýza	Oxidace 3%	Oxidace 0.3%	Kyselá hydrolýza	Zásaditá hydrolýza	Oxidace 3%	Oxidace 0.3%
0,65	0,69	0,68	0,69	0,68	0,69	0,69	0,68	5,19	0,67	1,73	3,01	3,60	0,69	2,67	3,57	33,54	0,67	1,05	1,26
0,93	–	–	–	0,07	0,06	0,07	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
0,94	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,15	0,07	0,09	0,13	0,09	0,07	0,11	0,14	–	0,07	0,15	0,09
0,98	0,28	0,26	0,26	0,29	0,29	0,29	0,26	0,25	0,27	0,25	0,22	0,14	0,28	0,31	0,21	–	0,31	0,25	0,25
0,99	–	–	–	–	–	–	0,06	0,14	–	0,07	0,09	–	–	0,06	–	–	–	–	–
1,00	**94,28**	**94,14**	**93,88**	**93,93**	**93,67**	**94,08**	**94,07**	**83,51**	**93,37**	**91,50**	**87,72**	**58,31**	**93,65**	**88,37**	**86,37**	**25,17**	**93,37**	**90,69**	**91,60**
1,03	–	0,24	0,27	0,25	0,28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1,04	1,51	1,47	1,49	1,50	1,57	1,51	1,40	3,70	1,45	2,24	3,19	2,55	1,46	2,89	3,54	2,04	1,45	1,79	1,95
1,07	0,18	0,20	0,19	0,18	0,19	0,19	0,19	1,16	0,39	0,49	0,78	0,78	0,40	0,72	0,87	8,02	0,37	0,32	0,35
1,08	0,46	0,47	0,47	0,46	0,47	0,46	0,45	0,39	0,48	0,47	0,44	0,17	0,47	0,47	0,42	–	0,41	0,46	0,45
1,10	0,05	0,05	0,05	–	0,06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,07
1,11	0,15	0,19	0,19	0,11	0,14	0,12	0,24	–	0,11	–	–	–	0,10	–	–	1,06	0,09	0,10	0,10
1,12	–	–	–	–	–		–	0,17	–	–	0,16	0,72		0,07	0,11	–	–	–	–
1,13	0,19	0,19	0,24	0,24	0,24	0,20	0,26	–	0,26	0,17	0,16	1,06	0,16	0,16	0,17	0,95	0,19	0,24	0,18
1,18	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	1,04	0,97	1,04	1,11	0,87	0,95	1,03	1,09	–	0,96	0,98	1,01
1,19	0,36	0,37	0,37	0,38	0,38	0,39	0,34	–	0,35	0,27	–	–	0,34	0,21	–	0,83	0,33	0,31	0,29
1,20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1,21	0,06	–	0,08	0,10	0,12	0,14	–	0,32	0,08	0,14	0,26	1,78	0,08	0,19	0,31	1,60	0,10	0,09	0,13
1,22	–	–	–	–	–	–	–	0,36	0,09	0,12	0,21	3,53	0,09	0,19	0,26	2,38	0,09	0,07	0,08
1,24	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4,39	–	–	–	1,33	–	–	–
1,26	0,07	0,10	0,12	0,11	0,11	0,10	0,13	0,40	0,17	0,18	0,27	3,26	0,17	0,25	0,29	2,47	0,16	0,13	0,14
1,28	0,07	0,07	–	0,07	0,07	0,06	0,07	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1,30	0,13	0,12	0,14	0,15	0,13	0,11	0,12	–	0,11	–	–	–	0,10	–	–	–	–	0,08	0,07
1,32	0,41	0,39	0,40	0,38	0,41	0,37	0,04	0,32	0,33	0,37	0,35	0,18	0,33	0,37	0,37	–	0,34	0,36	0,38
1,35	–	–	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	–	0,07	–	–	–	–	–	–	–	0,08	0,07	0,07
1,39	–	–	–	–	–	–	–	0,41	0,07	0,13	0,32	2,29	–	0,18	0,47	3,11	0,10	0,09	0,17
1,50	–	–	–	–	–	–	0,12	1,82	0,54	0,64	1,40	16,01	0,45	1,01	1,50	10,25	0,56	0,47	0,60

Příloha 1 – přehled hodnot relativních ploch píků seřazených podle relativních retenčních časů.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Vetchý, D.; Frýbortová, K.; Rabišková, M.; Häring, A., Testování stability léčivých přípravků. *Chemické listy* **2006,** *100,* 24-29.

2. Vetchý, D., Stabilitní testy ve farmacii. *Praktické lékárenství* **2006,** *6*.

3. Votrubová, I., Diplomová práce - Stabilitní studie léčiv a léčivých přípravků. Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, 2006.

4. Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci. Státní ústav pro kontrolu léčiv: p 14.

5. Ngwa, G., Forced degradation studies as an integral part of HPLC stability indicating method development. *Drug delivery technology* **2010,** *10* (5).

6. Nováková, L.; Douša, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* Praha, 2013; p 299.

7. Souhrn údajů o přípravku Zelboraf. Stání úřad pro kontrolu léčiv: (cit. 4/2016)

8. Léčivý přípravek Zelboraf byl registrován v EU pro léčbu pacientů s agresivní formou kožního nádoru » Linkos.cz 2012. http://www.linkos.cz/aktualne-odbornikum/lecivy-pripravek-zelboraf-byl-registrovan-v-eu-pro-lecbu-pacientu-s-agresivni-formou-kozniho-nadoru/ (cit. 4/2016).

9. Arenbergerová, M.; Puzanov , I., Mutace BRAF: nový přístup k cílené léčbě melanomu. *Klinická onkologie* **2012,** *25* (5), 323-328.

10. doc. MUDr. Jana Prausová, Ph. D., MBA, *Cílená léčba maligního melanomu,* Brněnské onkologické dny, Brno, Onkologická klinika 2. LF UK a FN Motol: Brno, 2013.

11. Sosman, J. A.; Kim, K. B.; Schuchter, L.; Gonzalez, R.; Pavlick, A. C.; Weber, J. S.; McArthur, G. A.; Hutson, T. E.; Moschos, S. J.; Flaherty, K. T.; Hersey, P.; Kefford, R.; Lawrence, D.; Puzanov, I.; Lewis, K. D.; Amaravadi, R. K.; Chmielowski, B.; Lawrence, H. J.; Shyr, Y.; Ye, F.; Li, J.; Nolop, K. B.; Lee, R. J.; Joe, A. K.; Ribas,

A., Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *New England Journal of Medicine* **2012,** *366* (8), 707-714.

12. Metastatický melanom a BRAF mutace. https://www.mojemedicina.cz/pro-lekare/leciva/zelboraf-vemurafenib/metastaticky-melanom-a-braf-mutace/ (cit. 4/2016)

13. Zelboraf - mechanismus účinku. https://www.mojemedicina.cz/pro-lekare/leciva/zelboraf-vemurafenib/zelboraf-mechanismus-ucinku/ (cit. 4/2016)

14. PubChem Compound Database, CID=42611257. National Center for Biotechnology Information. (cit. 4/2016)

15. Sparidans, R. W.; Durmus, S.; Schinkel, A. H.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H., Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the mutated BRAF inhibitor vemurafenib in human and mouse plasma. *Journal of Chromatography B* **2012,** *889–890*, 144-147.

16. Flaherty, K. T.; Puzanov, I.; Kim , K. B.; Ribas, A.; McArthur, G. A.; Sosman, J. A.; O'Dwyer, P. J.; Lee, R. J.; Grippo, J. F.; Nolop, K.; Chapman, P. B., Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2010,** *363* (9), 809-819.

17. Zhen, Y.; Thomas-Schoemann, A.; Sakji, L.; Boudou-Rouquette, P.; Dupin, N.; Mortier, L.; Vidal, M.; Goldwasser, F.; Blanchet, B., An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients. *Journal of Chromatography B* **2013,** *928*, 93-97.

18. Souhrn údajů o přípravku Tarceva. Státní úřad pro kontrolu léčiv: (cit. 4/2016)

19. Nijenhuis, C. M.; Rosing, H.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H., Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay quantifying vemurafenib in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014,** *88*, 630-635.

20. Alvarez, J.-C.; Funck-Brentano, E.; Abe, E.; Etting, I.; Saiag, P.; Knapp, A., A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib.

Application to treated melanoma patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014,** *97*, 29-32.

21. Bihan, K.; Sauzay, C.; Goldwirt, L.; Charbonnier-Beaupel, F.; Hulot, J.-S.; Funck-Brentano, C.; Zahr, N., Development and Validation of a Rapid and Simple LC-MS/MS Method for Quantification of Vemurafenib in Human Plasma: Application to a Human Pharmacokinetic Study. *Therapeutic Drug Monitoring* **2015,** *37* (1), 132-136.

22. Prasad, R.; Babu, S.; Rao, S., New reverse phase HPLC method development and validation for the estimation of vemurafenib in formulation. *International journal of research and reviews in pharmacy and appled sciences* **2011,** *1* (3), 140-146.

23. Chhabda, P.; Balaji, M. S., V.; Rao, A., Development and validation of a new simple and stability indicating RP-HPLC method for the determination of vemurafenib in presence of degradant products. *Der Pharma Chemica* **2013,** *5* (5), 189-198.