

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Karolína Erdeová

Vývoj HPLC metody pro hodnocení čistoty a stability fesoterodinu
za použití přístupu plánování experimentu

Development of HPLC method for evaluating the purity and stability of
fesoterodine using design of experiments approach

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jakub Heřt

Praha 2017

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.

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 1.5.2017

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Mgr. Jakubu Heřtovi za všestrannou pomoc, cenné rady, vstřícnost a čas, který mi věnoval.

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce byl vývoj a validace metody pro hodnocení čistoty a stability fesoterodinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Vývoj HPLC metody byl proveden pomocí metody plánovaných experimentů (DOE), jež umožňuje nalezení optimálních podmínek separace za minimálního počtu experimentálních analýz. Design byl proveden pomocí lineárního modelu L18. Chromatografický systém vyvinuté metody se skládal z oktylové stacionární fáze (SF) XBridge BEH - C8 (100 x 4,6 mm, 2,5 μ m), dvousložkové mobilní fáze (MF) složené z 10mM borátového pufru o pH 9,2 a MeOH v různém poměru dle gradientového programu. Průtok činil 0,7 ml/min, teplota na koloně 35 °C a detekce byla provedena pomocí detektoru diodového pole (DAD) při 227 nm. Doba analýza činila 22 min.

Vyvinutá metoda byla zvalidována a byla provedena zátěžová studie. Byl sledován vliv zvýšené teploty (60 °C), vlhkosti (10 a 75% relativní vlhkosti (RV)), kyselého a zásaditého prostředí, vzdušného kyslíku a světla. Pro všechny experimenty zátěžových studií byla vyhodnocena čistota hlavního píku. Pomocí vyvinuté metody byla zjištěna citlivost účinné látky na hydrolýzu v rámci rozmezí hodnot pH 2 – 10.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to develop and validate a high performance liquid chromatography (HPLC) method for purity and stability evaluation of fesoterodine.

The HPLC method development was carried out using design of experiments (DOE), which allows to find optimal separation conditions within small number of experimental analysis. Design was done by using L18 linear model. Chromatographic system of the developed method consisted of a C8 stationary phase (SF) XBridge BEH - C8 (100 x 4.6 mm, 2.5 μ m), a binary mobile phase (MF) consisting of 10mM borate buffer pH 9.2 and MeOH in various ratios according to the gradient program. Flow rate was 0.7 ml/min, column temperature 35 °C and a diode-array detector (DAD) was applied for the detection at 227 nm. Analysis time was 22 min.

The optimized method was validated and the forced degradation study was performed. Studied effects were: the effect of elevated temperature (60 °C), humidity (10 and 75% relative humidity), acidic and basic conditions, oxidation and light. Peak purity of fesoterodine was evaluated for all experiments of forced degradation study. Additionally, the sensitivity of the active substance to hydrolysis was determined within the pH range of 2-10.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	8
1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Fesoterodin	11
2.1.1 Farmakologický profil.....	11
2.1.2 Stanovení fesoterodinu	13
2.2 Vývoj HPLC metody	16
2.2.1 Literární rešerše a uspořádání poznatků o sledovaném analytu	16
2.2.2 Způsob detekce	16
2.2.3 Chromatografický systém.....	17
2.2.4 Stacionární a mobilní fáze	17
2.3 Validace	19
2.4 Metoda plánovaných pokusů.....	21
2.4.1 Typy experimentálních plánů.....	21
2.4.2 Průběh experimentu	23
2.4.3 Vyhodnocení.....	24
2.5 Zátěžové zkoušky.....	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Materiál a pomůcky	27
3.1.1 Chemikálie.....	27
3.1.2 Přístroje a pomůcky.....	30
3.2 Výběr počátečních podmínek a screening kolon	30
3.2.1 Počáteční podmínky	30
3.2.2 Příprava vzorků a pufru	31
3.2.3 Screening kolon	31
3.3 Design of experiment	33
3.3.1 Příprava pufrů do DOE	36
3.4 Příprava vzorků do optimalizace	36
3.5 Validace	37
3.6 Zátěžové studie	42
3.7 pH závislost hydrolytické degradace	43
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
4.1 Počáteční podmínky a screening kolon.....	44

4.2 Design of experiments.....	53
4.2.1 Test krajních mezí teplot	53
4.2.2 Provedení a vyhodnocení designu	54
4.3 Optimalizace metody	61
4.4 Validace	64
4.4.1 Robustnost	64
4.4.2 Přesnost.....	68
4.4.3 Linearita.....	68
4.5.4 Odezvové faktory	70
4.4.5 Správnost.....	70
4.4.6 LOD, LOQ.....	71
4.4.7 Selektivita	71
4.5 Degradční studie.....	73
4.6 pH závislost hydrolytické degradace	79
5. ZÁVĚR	80
6. LITERATURA.....	81

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

2D-UV	derivační spektrofotometrie v ultrafialové oblasti světla
5-HMT	5-hydroxymethyltolterodin
API	aktivní farmaceutická substance
DAD	detektor diodového pole
DOE	plánovaný experiment
ELSD	detektor světelného rozptylu
FLD	fluorimetrický detektor
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICH	Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčiv
LC	kapalinová chromatografie
LC-ESI-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (ionizace elektrosprejem)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem
LC-UV	kapalinová chromatografie s UV detektorem
MF	mobilní fáze
MRM	sledování vícenásobné reakce (multiple reaction monitoring)
OAB	hyperaktivní močový měchýř
OFAT	jeden faktor v čase
PDA	detektor diodového pole
PLS	(partial least square) metoda částečných nejmenších čtverců
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
RV	relativní vlhkost
SF	stacionární fáze
SST	test způsobilosti systému
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UPLC/ESI-MS	ultra-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (ionizace elektrosprejem)
UV	ultrafialová oblast světla
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast světla

1 ÚVOD

Fesoterodin je účinná látka léčiva Toviaz, používaného pro léčbu hyperaktivity močového měchýře (OAB) a dalších dysfunkcí postihující močový trakt. Nesprávná funkce močového měchýře narušuje běžné denní aktivity a má negativní dopad na kvalitu života.

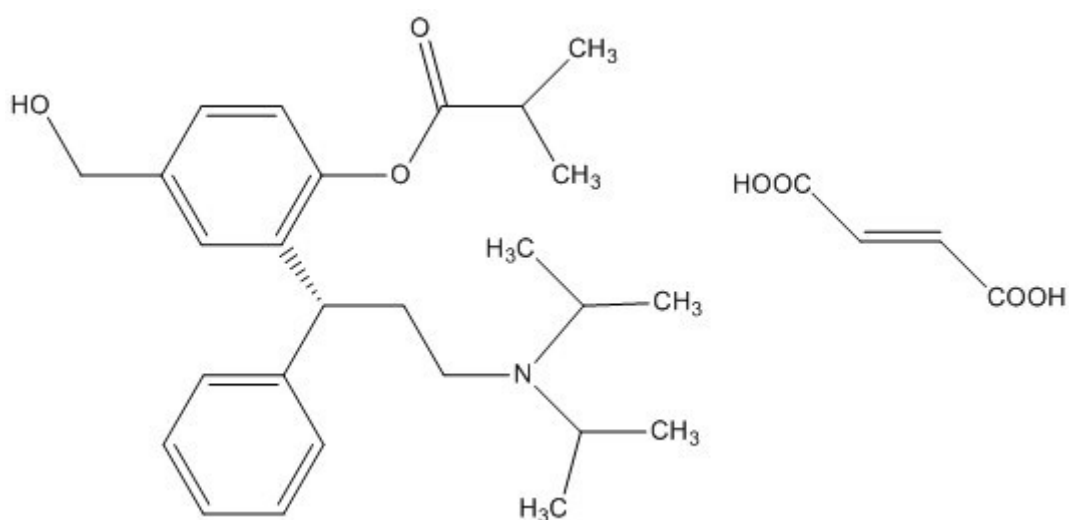
Nejčastěji používanou analytickou metodou ve farmaceutické analýze je HPLC. Při vývoji analytických postupů ve farmaceutické analýze je kladen důraz na robustnost daných postupů a rychlost samotného vývoje. V běžné praxi se stále využívá postupů, kdy dochází ke změně jednoho parametru dané metody a sleduje se vliv na zkoumanou veličinu (nejčastěji rozlišení, selektivita, popřípadě symetrie píku). Značné urychlení vývoje chromatografické metody může přinést použití přístupu plánování experimentů („Design of experiment“), kdy se současně mění více faktorů, které by mohli mít vliv na chromatografický proces. Použitím této statistické metody můžeme značně snížit počet experimentů, nutných k vývoji chromatografické metody. K prokázání, že vyvinutá metoda je vhodná k zamýšlenému použití slouží validace metody, která charakterizuje danou metodu z hlediska specifčnosti, správnosti, přesnosti a robustnosti.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu pro hodnocení čistoty a degradace fesoterodinu, nalezení optimálních podmínek pro separaci fesoterodinu a jeho nečistot za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Byl ukázán postup plánování experimentů při chromatografickém vývoji metody. Byla provedena validace vyvinuté metody a ukázána její vhodnost ke stabilitním studiím fesoterodinu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fesoterodin

Fesoterodin je antimuskarinikum, funkčně účinkující jako proléčivo, používané pro léčbu hyperaktivního močového měchýře, močové inkontinence a dalších dysfunkcí močového traktu. Komerčně je dostupný pod obchodním názvem Toviaz a prodává se ve formě tablet s prodlouženým uvolňováním, 4 nebo 8mg. V lékové formě se vyskytuje ve formě fumarátové soli. Fesoterodin fumarát je bílý prášek, dobře rozpustný ve vodě a polárních rozpouštědlech jako ACN či MeOH. Jeho molekulární hmotnost je 527,66, strukturální vzorec $C_{30}H_{41}NO_7$.



Obr. 2.1 Strukturální vzorec fesoterodin fumarátu

2.1.1 Farmakologický profil

OAB je porucha funkce močového měchýře. Osobám, trpícím touto poruchou, nepříznivě ovlivňuje životní komfort. Mezi její hlavní příznaky patří častá a naléhavá potřeba močení a to i během noci. Tato porucha je způsobena křečovitou kontrakcí detrusoru močového měchýře, což vede k neustálému tlaku močového měchýře. To může být způsobeno z různých důvodů, např. poraněním břicha, operací, kameny v močovém měchýři, nežádoucími účinky léčiv, neurologickými onemocněními aj¹.

Fesoterodin funguje jako orálně podávané proléčivo. V těle je rychle hydrolyzován nesespecifickými esterázami na jeho aktivní metabolit 5-hydroxymethyltolterodin (5-HMT). Přeměna fesoterodinu na 5-HMT není součástí jaterního enzymatického systému, na rozdíl od jeho farmakologického předchůdce tolterodinu². Hladina aktivního metabolitu 5-HMT v krvi a jeho klinický účinek je tedy méně variabilní než u tolterodinu. Aktivní metabolit, který se primárně váže na albumin a glykoproteiny krevní plazmy, je antagonist muskarinových receptorů ve stěně močového měchýře. Během normálního močení acetylcholin propuštěný z postgangliových parasympatických neuronů stimuluje kontrakce působením na muskarinové receptory hladkého svalstva močového měchýře. 5-HMT se váže na tyto receptory a inhibuje jejich aktivitu. Tím brání kontrakcím močového měchýře, což má za následek uvolnění jeho hladké svaloviny a navýšení kapacity měchýře^{3,4}.

Mezi nežádoucí účinky léčiv běžně používaných k tlumení hyperaktivity močového měchýře patří snížená sekrece slin a následné sucho v ústech či suchost očí. Je to způsobeno tím, že jedno z míst, ve kterých jsou zastoupeny muskarinové receptory M1, jsou slinné žlázy. Výhodou nových farmak pro léčbu OAB je jejich vysoká specifita na M3, případně M2 muskarinové receptory, nacházející se v močovém měchýři⁵.

Fesoterodin se vylučuje převážně ledvinami ve formě metabolitů (asi 70 %), v menší míře je vylučován do stolice⁶.

2.1.2 Stanovení fesoterodinu

Kapalinová chromatografie je hlavní metodou používanou ke stanovení fesoterodinu jako farmaceuticky aktivní účinné látky. Separace fesoterodinu a jeho nečistot (potenciálních degradačních produktů či nečistot vzniklých při výrobě) probíhala nejčastěji na oktadecylové stacionární fázi za použití hmotnostního detektoru (MS) nebo DAD detektoru.

Brazilská vědecká skupina okolo M.S. Sangoie se aktivně zapojuje do analýzy fesoterodinu ve farmaceutických přípravcích a vývojem stabilitu indikujících metod. Byla vyvinuta metoda pro stanovení fesoterodinu pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s UV detektorem (LC-UV) a kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a ionizací elektrosprejem (LC-ESI-MS) za použití trojitého kvadrupólu. Úspěšná separace léčiva od jeho degradačních produktů byla dosažena pomocí monolitické kolony Phenomenex Onyx C18 (100 x 4,6 mm). Jako mobilní fáze byla použita směs ACN/MeOH/30mM octan amonný pH 3,8 v poměru 30:15:55 (v/v/v), eluce probíhala isokraticky. Celková doba analýzy byla 2,5 min⁷.

Pro analýzy kontroly kvality byla vyvinuta rychlá metoda pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC), kdy byl stanovován fesoterodin fumarát v tabletové lékové formě. Retenční čas fesoterodinu činil 5,4 min. Analýza byla provedena za použití kolony Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) s UV detekcí při 225 nm. Eluce probíhala isokraticky za složení MF 0,025M dihydrogenfosforečnan amonný/triethylamin/ACN v poměru 49,5:0,5:50 (v/v/v), pH poté bylo upraveno na 7 pomocí ředěné kyseliny fosforečné⁸.

Oktadecylová stacionární fáze byla použita i v následující metodě, kdy stanovení fesoterodin fumarátu v tabletové formě bylo provedeno na koloně Inertsil ODS-3V (150 x 4,6 mm, 5 μm) za isokratické eluce. MF se skládala z pufru o pH 3 (1,15 g dihydrogenfosforečnan amonný/triethylamin/1l voda) a MeOH, v poměru 42:58 (v/v). K detekci byl použit PDA detektor při 210 nm a doba analýzy nepřekročila 5 min⁹.

K určení čistoty standardu API fesoterodin fumarátu byla použita kolona InterSustain C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm). Složka A MF obsahovala 3,0 ml 85% H₃PO₄ a 1,0g sodné soli oktansulfonové kyseliny v 1l vody (pH upraveno na 7,2 ředěným hydroxidem draselným)/ACN, 60:40 (v/v), složka MF B se skládala z ACN/voda, 90:10 (v/v). Eluce probíhala dle následujícího gradientového programu:

čas: 0,01-14-35-45-45,5-55 MF B: 5-19-70-70-5-5. Doba analýzy činila nepříliš praktických 55 min. V porovnání s ostatními metodami se zdá být příliš dlouhá a zbytečně složitá pro rutinní použití¹⁰.

J.M Parekh a spol. se pokusili o vyvinutí první metody pro ex-vivo stanovení fesoterodinu v lidské plazmě, současně s jeho aktivním metabolitem 5-HMT, pomocí kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem a za ionizace elektrosprejem (LC-ESI-MS/MS). Chromatografickou separaci analytů provedli na koloně Kromasil C18 (100 x 4,6 mm, 5 µm), za isokratických podmínek. MF obsahovala 15mM mravenčan amonný/ACN v poměru 25/75 (v/v). Účelem experimentu bylo stanovení fesoterodinu v plazmě během jeho absorpční fáze. Ovšem kvůli rychlé přeměně fesoterodinu na jeho metabolit 5-HMT ho ve vzorcích nebylo možné detekovat. Metoda tedy sloužila pouze ke kvantifikaci 5-HMT v krevní plazmě a mohla by být dále použita pro stanovení fesoterodinu v jiných fyziologických tekutinách¹¹.

Stanovení fesoterodinu v tabletách bylo provedeno také na oktylové koloně, a to Luna C8 (50 x 3 mm; 3 µm) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Detekce byla provedena v MRM módu, za použití ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Použitá MF se skládala z MeOH/0,1% kyseliny mravenčí v poměru 90:10 (v/v). Celková doba analýzy činila 2 min¹².

Za účelem oddělení fesoterodin fumarátu od jeho S-enantiomeru v aktivní farmaceutické substanci i léčivém přípravku byla vyvinuta chirální HPLC metoda. Separace v léčivém přípravku bylo dosaženo za pomoci chirální stacionární fáze na koloně Chiralpak IC-3 (250 x 4,6 mm; 3 µm). Jako MF byla použita směs obsahující n-hexan/propan-2-ol/dietylamin v poměru 950:5:1 (v/v/v). Retenční čas fesoterodinu činil 10,3 min, S-isomeru 11,8 min¹³.

Ke stanovení fesoterodinu v léčivém přípravku byly vyvinuty i alternativní analytické metody kromě HPLC, a to na kapilární zónové elektroforéze a metoda pomocí derivační UV (2D-UV) spektrofotometrie. Elektroforetická metoda byla provedena na křemenné kapiláře o průměru 50 µm a celkové délce 80,5 cm (efektivní délka 72 cm), jako základní elektrolyt byl použit 10mM fosforečnan sodný o pH 6,5

s vkládaným napětím 30 kV. Detekce byla prováděna pomocí PDA detektoru při 208 nm. Migrační čas fesoterodinu byl 4,96 min.

Spektra 2D-UV spektrofotometrické metody byly získány instrumentální elektronickou diferenciací s použitím 4nm intervalů vlnových délek v rozsahu 200-300 nm. Stanovení bylo provedeno při 228 nm. Výsledky získané pomocí derivační UV spektrofotometrie byly porovnány s ostatními metodami vyvinutými vědeckou skupinou okolo M.S. Sangoie (LC-UV, LC-MS/MS, elektroforetická metoda). Všechny vzorky byly připravovány z tablety Toviazu, obsahující 8 mg fesoterodin fumarátu. Experimentálně zjištěné hodnoty kvantitativní analýzy fesoterodinu v komerčních tabletách byly statisticky porovnány pomocí ANOVA testů a nebyl mezi nimi prokázán žádný významný rozdíl. Spektrofotometrická metoda je každopádně ekonomičtější a jednodušší volbou v případě stanovení fesoterodinu bez předchozí separace jeho excipientů v porovnání s ostatními metodami^{14,15}.

Za účelem stanovení kinetiky a identifikace produktů byla studována fotodegradace fesoterodinu. Efekty světla byly studovány na roztoku tabletové lékové formy, světelnými zdroji byly UV-A (320-400 nm) a UV-C (120-280 nm). Proces fotodegradace byl sledován pomocí již uvedené LC-UV metody⁷. Hlavní produkty degradace byly izolovány pomocí preparativní LC na koloně Luna C₁₈ (100 x 10 mm, 5 μm) a poté identifikovány pomocí LC-ESI-MS s trojitým kvadrupólem. Ve vzorku připraveném z 8mg tablety Toviazu bylo identifikováno 7 fotodegradačních produktů a byla navržena kompletní fotodegradační cesta. Studie uvádí, že je nutné chránit léčivo před světelnými efekty a musí mu být tedy věnována větší péče během přípravy, výroby i uchovávání¹⁶.

Ultra-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem za ionizace elektrosprejem (UPLC/ESI-MS) byla použita k identifikaci produktů elektrochemické oxidace léčivého přípravku fesoterodinu. Oxidace byla provedena pomocí lineární „sweep“ a cyklické voltametrie na pevné a rotující diskové elektrodě ze sklovitého uhlíku. Jako analyzátor byl použit analyzátor doby letu. Separace byla provedena na koloně Vertex Plus (50 x 2 mm, 1,8 μm) s gradientovou elucí o složení MF 0,01M octan amonný (složka A)/ACN (složka B). Parametry použitého gradientu byly: čas: 0-5-6-7-10 MF B:10-80-80-10-10. Na základě studie byl navržen a potvrzen mechanismus elektrochemické oxidace fesoterodinu¹⁷.

2.2 Vývoj HPLC metody^{18,19,20,21,22,23}

Cílem vývoje HPLC metody je dosáhnout takových podmínek, aby látky ve směsi byly co nejlépe separovány (ideální rozlišení píků $> 1,5$) a citlivě detekovány – oboje v co nejkratším čase. Před samotným vývojem je dobré stanovit si cíle vyvíjené metody, jelikož cílové požadavky na metodu se většinou liší a univerzální postup separace a detekce látek ve směsi neexistuje. Je důležité předem vědět, zdali je potřeba látku identifikovat nebo i kvantifikovat, jaká je maximální přijatelná doba analýzy, jakého rozlišení je zapotřebí docílit a v neposlední řadě jaké jsou přístrojové a finanční možnosti.

Při vývoji metody musí být zohledněny následující kroky:

2.2.1 Literární rešerše a uspořádání poznatků o sledovaném analytu

Do této fáze spadá primárně vyhledání fyzikálně-chemických vlastností analytu. Z hlediska vývoje HPLC metody jsou podstatné informace o struktuře látky a jejích funkčních skupinách, acidobazické vlastnosti (pK_a), polarita ($\log P$), molekulová hmotnost M_r , rozpustnost v rozpouštědlech či stabilita analytu. V dnešní době jsou tyto informace poskytnuty v internetových databázích jako např. Chemicalize či PubChem, kde je možné získat údaje z publikovaných článků nebo fyzikálně-chemických internetových tabulek.

2.2.2 Způsob detekce

Výběr detektoru závisí na struktuře a vlastnostech analytu, požadované citlivosti a selektivitě, ale i finanční dostupnosti. Ideální detektor by měl splňovat následující požadavky: univerzálnost (možnost detekovat všechny komponenty), okamžitá a lineární odezva v co nejširším koncentračním rozmezí, vysoká citlivost, robustnost vůči změnám teploty, tlaku a průtoku MF. Mezi nejčastější používané HPLC detektory patří UV/VIS, MS, fluorescenční či detektor světelného rozptylu (ELSD).

2.2.2.1 UV/VIS

Nejčastěji používanými detektory pro analýzu léčiv jsou spektrofotometrické detektory. Významnou roli hrají DAD detektory, které umožňují zaznamenávat celé UV-VIS spektrum (190-800 nm) v reálném čase, bez přerušení chromatografické separace.

Při UV detekci je zásadní, aby látka obsahovala chromofor, tj. část molekuly, která je zodpovědná za absorpci světla v UV nebo VIS oblasti. To mohou být např. konjugované dvojné vazby u aromatických sloučenin, nebo heterocyklické sloučeniny jako O či N s nevazebným elektronovým párem.

2.2.3 Chromatografický systém

O výběru chromatografického systému (separaci na normální fázi, reverzní fázi či použití hydrofilní interakční chromatografie [HILIC]) se rozhoduje na základě zásadních chemických vlastností analytu, jako je jeho rozpustnost, polarita a molekulární hmotnost. U nízkomolekulárních látek o $M_r < 5000$ je rozhodující hlavně jejich polarita, na základě které se rozhodne, zdali separace proběhne na polární nebo nepolární - reverzní fázi. Vhodným nástrojem pro toto rozhodnutí je hodnota $\log P$. Pokud je $\log P > 1$, je zapotřebí látku separovat na RP. Vysokomolekulární látky jako peptidy, polymery či nukleové kyseliny je možné dělit pomocí technik jako je gelová permeační či iontově výměnná chromatografie, díky jejich charakteristickým vlastnostem.

2.2.4 Stacionární a mobilní fáze

Volba stacionární a mobilní fáze souvisí s volbou separačního módu. Je možné vycházet z literatury či standardních podmínek první volby - pro chromatografii na normální fázi je typickou SF silikagel a MF hexan-propan-2-ol či hexan-ethanol + TEA. U chromatografie na fázi reverzní se jako SF první volby používá nejčastěji C18, jako MF ACN/MeOH + voda.

Volba MF dále závisí hlavně na rozpustnosti analytu a typu detekce. Také je nutné brát v úvahu, že pokud je součástí MF pufr, musí být kompatibilní s její organickou

složkou. Při smísení pufru s organickou složkou o vysoké koncentraci by totiž mohlo dojít k jeho srážení a následnému ucpání kapilár. Významnou roli hraje také kvalita rozpouštědel - pokud není použito tzv. HPLC grade či LC-MS grade rozpouštědlo (rozpouštědla nejvyšší čistoty), může docházet k driftu a šumu základní linie, zejména u gradientové eluce.

Výběr kolony (typ sorbentu, velikost kolony a jejích částic) může být klíčovým faktorem separace. U SF je třeba brát v úvahu pH MF, maximální použitý tlak a teplotu na koloně.

Je obecně známo, že se snižující se velikostí částic se zvyšuje účinnost chromatografické separace za optimálního průtoku MF (Van Deemterova křivka). Zároveň ale dochází k nárůstu tlakového spádu na koloně, a tak se pro částice menší než 2 μm používá ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC). Optimální volbou pro klasický HPLC systém jsou částice okolo velikosti 5 μm , povrchově porézní částice nebo monolitické kolony.

Selektivita je schopnost chromatografického systému odlišit komponenty ve vzorku. Jedním ze základních faktorů, které jí ovlivňují, je typ stacionární fáze. Její funkční skupiny ovlivňují typ interakce s analytem. Nejúčinnější technikou změny selektivity na vybrané koloně je gradientová eluce, nejčastěji používaná na RP. Složení MF se buď lineárním, nebo stupňovitým gradientem mění v čase. Dochází tedy ke zvýšení eluční síly MF zvýšením podílu méně polární složky a snížením obsahu vody v MF. Dosahuje se tak optimálního rozlišení a přijatelné doby analýzy.

Rozměry kolony se volí s ohledem na typ chromatografické aplikace (UHPLC, HPLC), rychlost analýzy, nebo náročnost separace. Délka kolony L a vnitřní průměr d_c mají vliv na faktory jako rozlišení, šířka píku, doba analýzy či objemový průtok MF. S klesajícím rozměrem kolony a zvyšujícím se objemovým průtokem se doba analýzy snižuje. Krátké kolony jsou sice vhodné pro rychlé separace jednoduchých směsí, snižují však separační účinnost a rozlišení.

2.3 Validace^{24,25}

Validace chromatografické metody je série experimentů, kterými se ověří, že metoda je vhodná k zamýšlenému použití a poskytuje použitelná analytická data. Jejím cílem je vymezit hranice, v rámci kterých metoda poskytuje spolehlivé výsledky. Jedná se tedy o formu dokumentace, která potvrzuje, že je metoda schopna plnit požadavky na ní kladené. Vhodnost metody je posouzena na základě vybraných validačních parametrů, u HPLC ve farmaceutické analýze se jedná hlavně o přesnost, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, selektivitu, linearitu či robustnost. Validaci je nutné provádět u metod nových nebo stávajících, které byly nějakým způsobem pozměněny.

Test způsobilosti systému (SST)

Test způsobilosti analytického systému je nezbytnou součástí validace a provádí se na počátku každého měření. Slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Obvykle se měří opakovatelnost nástřiku a separační účinnost, které se pak vyhodnocují pomocí relativní směrodatné odchylky.

Robustnost

Robustní metoda je schopna odolávat malým, záměrným změnám jejích parametrů, ke kterým dochází např. při provádění metody v jiné laboratoři i přes zachování popsaného postupu. Robustnost tedy poskytuje informaci o spolehlivosti metody.

Přesnost

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k pravé hodnotě. Vyhodnocuje se jako relativní směrodatná odchylka z minimálně 6 nezávislých analýz, provedených kompletním postupem.

Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Těsnost vzájemné závislosti vyjadřuje korelační koeficient (r).

Pokud je přímková závislost mezi odezvou instrumentace a koncentrací analytu lineární, nabývá hodnoty 1. Čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější.

Správnost

Správnost je odchylka výsledku metody od správné hodnoty. Podle směrnic ICH by správnost měla být vyhodnocena nejméně z devíti stanovení minimálně tří koncentračních úrovní pokrývajících stanovený rozsah koncentrací, např. tři nástřiky tří zvolených koncentračních úrovní. Parametr správnost se může vyjadřovat jako výtěžnost, která je definována jako poměr nalezené a skutečné hodnoty.

Selektivita

Selektivita je schopnost metody správně a přesně určit analyt v přítomnosti interferujících látek. Může se jednat např. o nečistoty z výroby či rozkladné produkty. Vyjadřuje se jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku s nečistotami a bez nich.

Limit detekce a kvantifikace

Detekční limit je nejnižší koncentrace látky, kterou jsme schopni danou metodou detekovat. Odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významný od šumu. Kvantitativní limit je nejnižší koncentrace látky, kterou jsme schopni danou metodou kvantifikovat s přijatelnou přesností a správností. LOD se vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a LOQ jako desetinásobek.

2.4 Metoda plánovaných pokusů

Metoda plánovaných experimentů je statistická metoda, využívaná k efektivnímu získávání dat, která jsou předpokladem dobrého statistického vyhodnocení. Na jejich základě je možné učinit správné závěry o vlivu testovaných faktorů na studovaný systém. V metodě plánovaných pokusů je důležitá jak tvorba plánu experimentu, tak následné statistické vyhodnocení²⁶.

Experimenty v analytické chemii mohou být prováděny dvojím přístupem. Tradičním přístupem je metoda OFAT (one factor at a time), kdy jsou faktory testovány v logickém sledu jeden po druhém. Vždy dochází ke změně hladiny pouze jednoho faktoru, zatímco ostatní zůstávají konstantní. Tento proces se opakuje s dalšími faktory, a to až do nalezení nejvhodnějšího nastavení systému. Při tomto způsobu testování ovšem nemusí být nalezeno optimální nastavení faktorů, jelikož nedojde k prozkoumání celého experimentálního prostoru. Námí zkoumaná oblast se tak může mylně jevit jako optimální. Další nevýhodou je časová náročnost tohoto postupu, přestože není zapotřebí pokročilá znalost statistiky pro jeho vykonávání a analýzu dat. Účinnějším způsobem provádění experimentů je metoda plánovaných pokusů. Mění se více faktorů najednou, čímž je možné získat informace o celém experimentálním prostoru v malém počtu experimentálních analýz. Navíc může být odhalena přítomnost interakcí 2 či více faktorů a jejich dopad na odpověď, což je další z hlavních výhod plánovaných experimentů oproti OFAT přístupu²⁷.

2.4.1 Typy experimentálních plánů

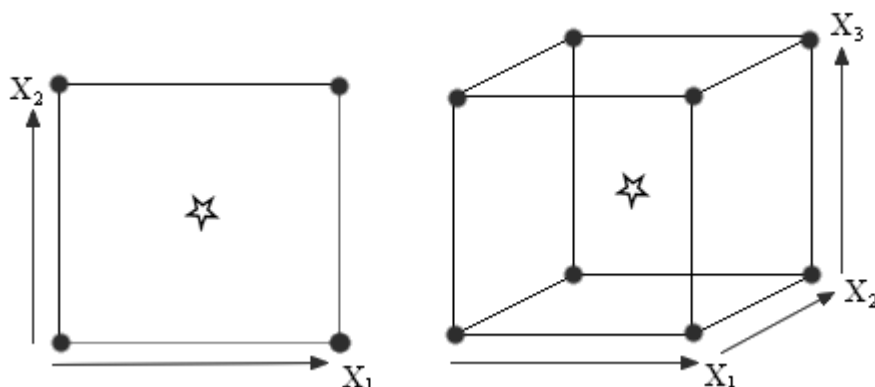
Důležitou součástí procesu je výběr experimentálního plánu, který závisí hlavně na fázi vývoje. Experimentální vývoj je možné rozdělit na tři hlavní fáze: screening, optimalizaci a testování robustnosti. Fáze screeningu se nejčastěji používá na začátku experimentálního procesu, kdy se hledají faktory s největším vlivem na systém. Při optimalizaci jsou do plánu zařazeny faktory, které mají na analýzu námi požadovaný vliv a hledají se optimální experimentální podmínky. Testování robustnosti se provádí ve finální fázi, kdy se testuje, zdali je systém schopný odolávat malým změnám hladin faktorů. DOE je možné použít pro každou z těchto fází. Výběr plánu závisí také na

časové a finanční náročnosti a musí být kompromisem všech požadavků. Je možné vybírat z následujících plánů:

2.4.1.1 Úplný faktorový plán

Základním přístupem plánování experimentů je úplný faktorový plán. Tímto přístupem jsou v experimentech prokombinovány hladiny všech sledovaných faktorů a je možné postihnout jejich vzájemné interakce. Nejjednodušší úplný faktorový plán obsahuje dva faktory na dvou úrovních, tedy 4 experimenty. Faktorové úrovně vytyčují meze experimentálního plánu.

Na obr. 2.2 jsou zobrazeny nejjednodušší příklady úplných faktorových plánů (dvoufaktorový a třífaktorový). Hvězda uprostřed zobrazuje středový bod experimentu, což je střední hodnota nastavených hladin. Pomocí středového bodu se ověřuje variabilita experimentálních dat. Analýza při tomto nastavení hladin se provádí typicky 3 - 5 x. Prostorově představuje dvoufaktorový design čtverec, třífaktorový design pak krychli. Experimenty s více jak 3 faktory jsou n - dimenzionální prostory²⁸.



Obr. 2. 2: Příklad nejjednodušších úplných faktorových plánů

2.4.1.2 Částečný faktorový plán

V případě většího množství faktorů (viz tab. 2.1) by muselo být úplným faktorovým plánem provedeno velké množství experimentů a tento přístup by nebyl dále výhodný. V takových případech se využívají tzv. částečné faktorové plány. Tyto plány umožňují provedení menšího množství experimentů při stejném množství faktorů. Toho je docíleno redukcí některých faktorů do jednoho²⁹.

Tabulka 2.1: Přehled počtu experimentů, potřebného k vykonání úplného faktorového plánu a příklad počtu experimentů částečného faktorového plánu.

počet faktorů	počet analýz úplného faktorového plánu	počet analýz částečného faktorového plánu
2	4	---
3	8	4
4	16	8
5	32	16
6	64	16
7	128	16
8	256	32
9	512	32
10	1024	32

2.4.1.3 Lineární plány

Lineární plán je typem částečného faktorového plánu, který se používá v případě různého počtu hladin faktorů. Použití lineárních plánů je vhodné pro fázi screeningu nebo testování robustnosti, jelikož často zahrnují menší počet měření a není potřeba hodnotit vzájemné interakce faktorů, které tento typ plánu nedokáže odhalit. Mezi nejvíce používané patří Taguchiho lineární plány. L18 je typem Taguchiho plánu, používaným pro analýzy, obsahující až 7 tříúrovňových faktorů a jeden dvouúrovňový. Z uvedených důvodů byl pro tuto diplomovou práci použit právě Taguchiho plán L18.

2.4.2 Průběh experimentu

Nejdříve se vybírají faktory (vstupní nezávislé proměnné), změnou jejichž hodnot se projeví vliv na systém nebo proces. Rozdělují se na kvantitativní a kvalitativní. Hodnota kvantitativního faktoru se může spojitě měnit a je pro ni nutné stanovit rozmezí hodnot. U HPLC se typicky jedná o pH mobilní fáze, teplotu na koloně či iontovou sílu. Kvalitativní faktor může nabírat jen určitých hodnot, příkladem je typ stacionární fáze nebo organická složka MF.

Po té, co jsou definovány faktory, je vybrán typ plánu. Ten udává nastavení hodnot faktorů pro jednotlivé testy experimentu v tzv. worksheetu – pracovním listě. Podle něj experimentátor dále postupuje při provádění experimentu.

Dalším krokem je výběr odpovědi (závisle proměnných) systému. Vybírají se relevantní odpovědi vzhledem k formulaci problému – např. rozlišení mezi píky či jejich symetrie u HPLC. Pro odpovědi se specifikují jejich cílené, minimální a maximální hodnoty.

Existuje množství statistických softwarů, které se používají pro tvorbu experimentálních plánů. Pro účely této diplomové práce byl použit software MODDE (MKS Data Analytics Solutions). Do programu se zadají informace o počtu faktorů, jejich úrovni a rozsah těchto úrovní a program je schopný navrhnout typ experimentálního plánu.

Po provedení experimentu přichází na řadu vyhodnocení designu na základě získaných odpovědí. V této fázi by mělo být určeno, které faktory jsou významné a nevýznamné a jakým způsobem ovlivňují danou odpověď³⁰.

2.4.3 Vyhodnocení²⁸

Vyhodnocení experimentálních dat zahrnuje tři základní kroky: analýzu primárních dat, regresní analýzu s interpretací dat a následné použití regresního modelu. Data mohou být vyhodnocena pomocí různých statistických metod, v této práci byla data zpracována pomocí PLS metody (metoda částečných nejmenších čtverců). PLS je vícerozměrná regresní metoda, využívaná v případech, kdy jsou některé z faktorů navzájem závislé, pokud model není symetrický nebo pokud jsou v odpovědích chybějící data.

Analýza primárních dat poskytuje základní informace o jejich rozložení, variabilitě a napomáhá provedení následné regresní analýzy. Nejúčinnějším nástrojem vyhodnocení této fáze je tzv. replicate plot – graf zobrazující rozdělení výsledků pro jednotlivé odpovědi. Replicate plot zobrazuje variabilitu dat a umožňuje odhalení odlehklých hodnot.

Fáze regresní analýzy zahrnuje samotný výpočet modelu, který spojuje faktory a odpovědi dohromady. Je důležité získat model s dobrou prediktivní schopností, k čemuž

slouží diagnostické parametry R^2 a Q^2 . Parametr R^2 (goodness of fit) udává, jak dobře daný regresní model prokládá experimentální data. Jeho hodnota se pohybuje mezi 0 – 1, kdy hodnota $> 0,5$ označuje významný model a 1 je perfektní model. Q^2 (goodness of prediction) udává prediktivní sílu modelu. Jeho hodnoty se rovněž pohybují mezi 0 – 1, pokud nabývá hodnoty $> 0,5$, je možné považovat model za dobrý, pokud přesahuje model $> 0,9$ je model excelentní. Parametry R^2 a Q^2 by se od sebe neměli lišit o více než 0,3. Pro každou odpověď je možné provést tzv. chí - square test, který odhalí případné nelinearity v modelu. Zařazením této nelinearity v podobě kvadratického členu do modelu se může zvýšit jeho prediktivní síla.

V posledním kroku je možné získaný regresní model použít k předpovězení optimálních experimentálních podmínek. Ty lze následně aplikovat, nebo je možné se od nich odrazit v budoucích experimentech.

2.4.3.1 PLS metoda

PLS metoda obsahuje účinné nástroje pro interpretaci složitých plánů. Používá se také v případě, že plán obsahuje velké množství odpovědí nebo faktorů. Mezi nástroje, použité při vyhodnocování této diplomové práce, patřil VIP plot, coefficient plot či prediction plot.

VIP (variable importance in the projection) plot je jednou ze základních grafických pomůcek vyhodnocení primárních dat v PLS modelu. Jedná se o sloupcový graf, zobrazující souhrnnou významnost vlivu faktoru v rámci PLS modelu. Pokud sloupec faktoru přesahuje hodnotu 0,8, může být považován za významný. VIP plot je vhodným začátkem interpretace získaných dat, nesdíljuje ovšem informace o míře vlivu faktorů na odpovědi.

Coefficient plot je sloupcový graf, zobrazující hodnoty regresních koeficientů, které vyjadřují míru vlivu faktorů na odpovědi. Pokud je sloupec orientován směrem do kladných hodnot, zvyšující se hodnota daného faktoru indikuje pozitivní vztah. Naopak sloupec orientovaný do záporných hodnot indikuje vztah záporný. Uvnitř sloupců se nachází konfidenční intervaly, které slouží k rozhodnutí, zdali je faktor významný či nikoliv a může být vyřazen.

Prediction plot zobrazuje modelem předpovídané hodnoty pro vybranou odpověď.

2.5 Zátěžové zkoušky

Zátěžové zkoušky jsou souborem testů doplňujících validaci metody. Slouží k testování chemické a fyzikální stability léčiva či léčivého přípravku, za účelem studování jeho vlastností a změn kvality. Jsou důležitou součástí vývoje léčiv. Léčivo nebo léčivý přípravek je podroben nadměrné fyzikální nebo chemické zátěži, čímž dochází k urychlení rozkladu aktivní látky či dalších složek léčivého přípravku. Na základě testu je pak možno stanovit základní vlastnosti léčiva či léčivého přípravku v modelových zátěžových situacích a podmínky pro skladování, uchovávání či dobu použitelnosti přípravku. Je tak zaručena jeho účinnost a bezpečnost během stanovené doby použitelnosti. U nestabilního léčivého přípravku by mohlo dojít k snížení obsahu aktivní látky, změně biologické dostupnosti či ke vzniku rozkladných produktů. Zátěžové zkoušky pomáhají identifikovat pravděpodobné degradační produkty, na základě kterých mohou být navrženy degradační mechanismy. Identifikací příčiny nestability zátěžové testy napomáhají při řešení problému, souvisejících se stabilitou, a tím umožňují vývoj a výrobu stabilnějších preparátů³¹.

Testy by měly být prováděny na jedné šarži materiálu a měly by zahrnovat vliv teploty, vlhkosti, oxidace a fotolýzy. Dále by měl být vyhodnocen vliv hydrolyzy v širokém rozmezí pH. Přijatelná degradace by se měla pohybovat v rozmezí 5 až 20 %, vyšší degradace již neodpovídá reálným podmínkám³².

V rámci zátěžových zkoušek se také vyšetřuje spektrální čistota hlavního píku (tzv. „peak purity“). Jedná se o vektorovou analýzu rozdílů ve spektrech v jednotlivých částech píků, a tím mohou být odhaleny případné koeluce látek. Čistota píku se vyhodnocuje porovnáním parametrů „purity threshold“ (limit spektrální čistoty) a „purity angle“ (spektrální čistota píku). Aby mohl být pík uznán jako spektrálně čistý, musí být hodnota purity angle < purity threshold.

Pro kontrolu a charakterizaci stability produktu se využívá různých analytických metod, především chromatografických a spektrofotometrických. Metoda musí být stabilitu - indikující, tedy schopna odlišit sledovanou látku a její rozkladné metabolity.

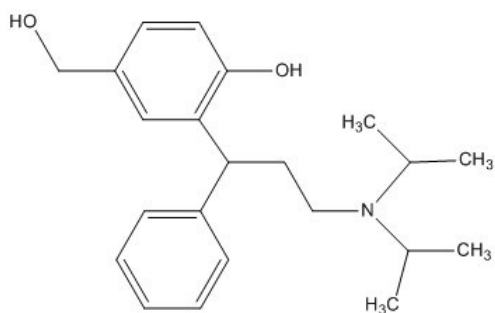
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a pomůcky

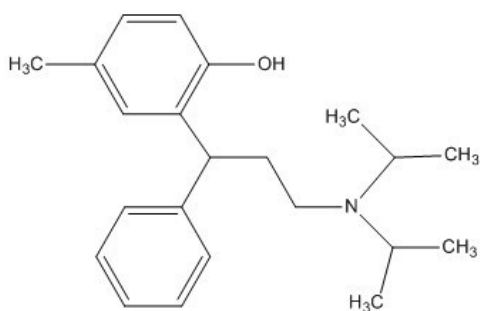
3.1.1 Chemikálie

- Acetonitril Ultra gradient HPLC grade, J.T BAKER
- Methanol (Ultra) gradient HPLC grade, J.T BAKER
- Dihydrogenfosforečnan amonný, SIGMA-ALDRICH
- Hydrogenfosforečnan amonný, SIGMA-ALDRICH
- Kyselina boritá, SIGMA-ALDRICH
- Kyselina octová, SIGMA-ALDRICH
- Hydroxid amonný, ACROS ORGANICS
- Roztok peroxidu vodíku (35 %), SIGMA-ALDRICH
- Toviaz 8 mg, PFIZER
- Fesoterodin fumarát, ZENTIVA A.S.
- Deionizovaná voda čištěná pomocí Milli-Q systému, MILLIPORE
- Nečistoty fesoterodinu, MSN Pharmachem Pvt. Ltd.
 - Diol (obr. 3.1.1)
 - Double bond (obr. 3.1.2)
 - Toluoyl hydroxy (obr. 3.1.3)
 - Benzyloxy (obr. 3.1.4)
 - Diacilated (obr. 3.1.5)
 - Dimer (obr. 3.1.6)

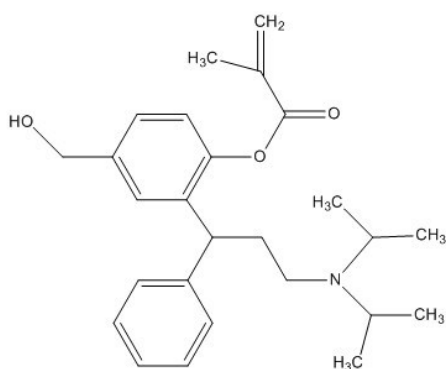
Fesoterodin má dva významné degradační produkty, prvním z nich je diol (5-HMT), který je zodpovědný za veškerou antimuskarinovou aktivitu fesoterodinu. Je to jeho hlavní degradační produkt, který vzniká hydrolýzou esterové vazby. Z diolu vzniká následnou reakcí druhý významný degradant diacilated. Zbylé nečistoty jsou procesní.



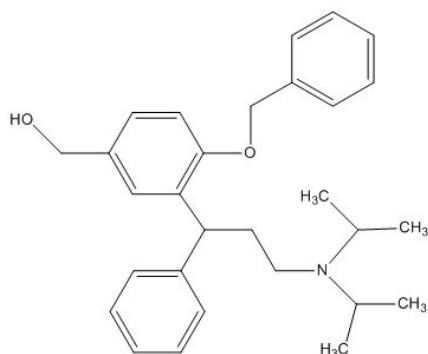
Obr. 3.1.1: nečistota „diol“ (5-HMT): (R)-2-[3-(diisopropylamino)-1-phenylpropyl]-4-hydroxymethyl phenol



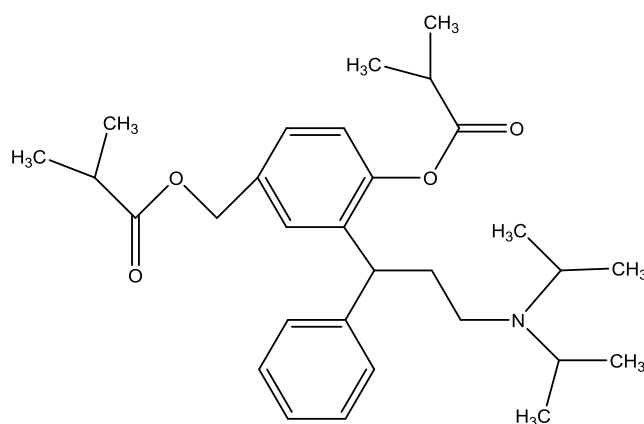
Obr. 3.1.2: nečistota „toluoyl hydroxy“: (R)-2-[3-(bis(1-methylethyl)-amino)1-phenylpropyl]-4-methylphenol tartarate



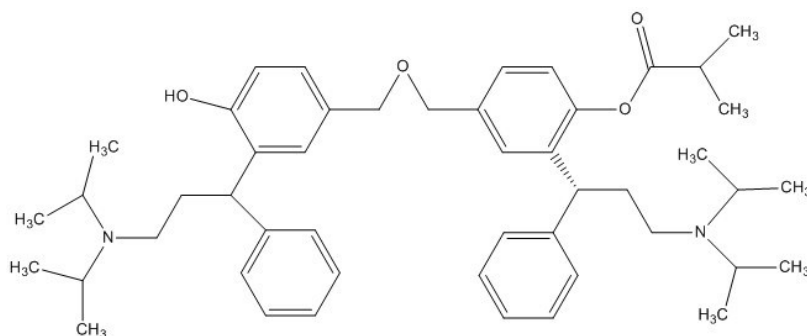
Obr. 3.1.3: nečistota „double bond“: (R)-2-[3-(diisopropylamino)-1-phenylpropyl]-4-(hydroxymethyl)phenyl methacrylate mandelate



Obr. 3.1.4: nečistota „benzyloxy“: (R)-[4-benzyloxy-3-(3-diisopropylamino-1-phenylpropyl)-phenyl]methanol



Obr. 3.1.5: nečistota „diacilated“: Propanoic acid, 2-methyl-, 2-[3-[bis(1-methylethyl)amino]-1-phenylpropyl]-4-[(2-methyl-1-oxopropoxy)methyl]phenyl ester



Obr. 3.1.6: nečistota „dimer“: isobutyric acid 2-(3-diisopropylamino-1-phenylpropyl)-4-[2-(3-diisopropylamino-1-phenylpropyl)-4-hydroxymethyl-phenoxymethyl]-phenyl ester, fumarate salt

3.1.2 Přístroje a pomůcky

- HPLC – kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series
 - vysokotlaké čerpadlo G1311A QuatPump
 - odplyňovač G1322A Degasser
 - autosampler G1329A ALS
 - kolonový termostat G1316A Colcom
 - DAD detektor G1315B DAD

Software pro sběr a zpracování dat ChemStation, později Empower

- ultrazvuková lázeň Kraintex K-6LE
- pH metr Seven Compact (Mettler Toledo)
- centrifuga MPW-65R (MPW)
- digitální váha Sartorius MC 1 LC 2200 P
- analytická váha AT-261 Delta Range (Mettler Toledo)
- teplotní a vlhkostní komory Memmert
- automatická pipeta Pipetman Concept (Gilson)
- běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.2 Výběr počátečních podmínek a screening kolon

3.2.1 Počáteční podmínky

Počáteční pH MF se odvíjelo od pK_a fesoterodinu (10,4). Hodnota pH byla zvolena 2,7, kdy je molekula fesoterodinu protonizována. Mobilní fáze první volby obsahovala fosfátový pufr o koncentraci 10 mM, s organickou složkou ACN nebo MeOH. Gradientový program je uvedený v tabulkách 3.1 a 3.2. Průtok MF byl zvolen 0,8 ml/min, nástřik 5 μ l. Analyzovala se stresovaná tableta Toviazu (16 h, 50 °C). Koncentrace fesoterodin fumarátu ve vialce byla 1 mg/ml v 80% ACN s 0,5% přídavkem nečistot.

Tabulka 3.1: Použitý gradient pro ACN jako složku B mobilní fáze

t [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
10	20	80
14	20	80
15	90	10
20	90	10

Tabulka 3.2: Použitý gradienty pro MeOH jako složku B mobilní fáze

t [min]	A [%]	B [%]
0	80	20
10	10	90
14	10	90
15	80	20
20	80	20

3.2.2 Příprava vzorků a pufru

10mM fosfátový pufr byl připraven navážením a rozpuštěním 1,15 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ v 1l vody, pH bylo upraveno na 2,7 pomocí 75% H_3PO_4 . Pufr byl umístěn do ultrazvukové lázně na 10 min.

Stresovaná tableta Toviazu, obsahující 8 mg účinné látky, byla rozdrcena a množství odpovídající 5 mg účinné látky bylo převedeno do 5 ml odměrné baňky. Do odměrné baňky bylo dále pipetováno po 100 μl od každé nečistoty ze zásobních roztoků a odměrná baňka byla doplněna po rysku 80% ACN. Vzorek byl na 15 min umístěn do ultrazvukové lázně a poté na 5 min do centrifugy při 14000 rpm.

Zásobní roztoky nečistot byly připraveny navážením vždy 1,25 mg příslušné nečistoty. Vzorky byly poté rozpuštěny v 5 ml 80% ACN a umístěny do ultrazvukové lázně na 10 min.

3.2.3 Screening kolon

Celkem bylo vybráno 13 kolon s potenciálně vyhovující stacionární fází (viz tab. 3.3). Výběr zahrnoval kolony s oktylovou, oktadecylovou, fenyl-hexylovou, bifenylovou a pentafluorfenylovou stacionární fází od různých výrobců, jejichž selektivita může být výrazně odlišná. Od každé fáze byla poté vybrána nejvhodnější

kolona, která pak byla použita do DOE. Byla posuzována hlavně schopnost kolony oddělit nečistoty od hlavního píku a jeho symetrie. Symetrie píku byla hodnocena pomocí tzv. faktoru symetrie A_s , jehož výpočet se provádí dle následujícího vzorce³³:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2 \times d}$$

kde $W_{0,05}$ = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou symetrii píku.

Rozlišení bylo počítáno pomocí vzorce:

$$R_{1,2} = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5(Y_1 - Y_2)}$$

kde t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy složek 1,2 a Y_1 a Y_2 odpovídající šířky píků na úrovni základní linie.

Tabulka 3.3: Kolony použité do screeningu

Jméno	Typ	Parametry	Výrobce
Xselect CSH C18	C18	100 x 4,6 mm; 2,5 μ m	Waters
Kinetex C18	C18	100 x 4,6 mm; 2,6 μ m	Phenomenex
Poroshell 120 EC-C18	C18	100 x 4,6 mm; 2,7 μ m	Agilent
Poroshell 120 SB-C18	C18	100 x 4,6 mm; 2,7 μ m	Agilent
Cortecs C18+	C18	100 x 4,6 mm; 2,7 μ m	Waters
Xbridge BEH C8	C8	100 x 4,6 mm; 2,5 μ m	Waters
Kinetex C8	C8	100 x 4,6 mm; 2,6 μ m	Phenomenex
Poroshell 120 EC-C8	C8	100 x 4,6 mm; 2,7 μ m	Agilent
Kinetex F5	F5	100 x 4,6 mm; 2,6 μ m	Phenomenex
Poroshell 120 Phenyl Hexyl	fenyl-hexylová	100 x 4,6 mm; 2,7 μ m	Agilent
Xselect CSH Phenyl Hexyl	fenyl-hexylová	100 x 4,6 mm; 2,5 μ m	Waters
Kinetex Phenyl-Hexyl	fenyl-hexylová	100 x 4,6 mm; 2,6 μ m	Phenomenex
Kinetex Biphenyl	bifenylová	100 x 4,6 mm; 2,6 μ m	Phenomenex

3.3 Design of experiment

Bylo provedeno celkem osmnáct experimentů, uvedených v tabulce 3.6. Pokusy byly vygenerovány v softwaru MODDE (MKS Data Analytics Solutions) na základě zadaných kvalitativních a kvantitativních faktorů.

Do designu byly vybrány následující kvalitativní a kvantitativní faktory:

kvalitativní faktory:

- typ kolony
 - C18 XSelect CSH
 - Poroshell 120 EC-C8
 - XSelect CSH Phenyl Hexyl
- organická složka
 - acetonitril
 - methanol

kvantitativní faktory:

- pH (3 - 9)
- teplota na koloně (20 - 50°C)
- iontová síla (10 – 50 mM)

Vyhodnocené byly následující odezvy:

- symetrie fesoterodinu
- rozlišení mezi jednotlivými nečistotami
- retenční čas fesoterodinu
- faktor separační oblasti

Analýzy designu byly prováděny dle následujícího gradientového programu:

Tabulka 3.4: Gradient použitý do DOE pro ACN jako složku B mobilní fáze

t [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
3	70	30
13	50	50
16	20	80
21	20	80
22	90	10
27	90	10

Tabulka 3.5: Gradient použitý do DOE pro MeOH jako složku B mobilní fáze

t [min]	A [%]	B [%]
0	80	20
3	60	40
13	40	60
16	10	90
21	10	90
22	80	20
27	80	20

Pro zjištění orientační hodnoty rozlišení prvního elujícího píku bylo v DOE jeho rozlišení počítáno od mrtvého času kolony. Rozlišení všech píků bylo počítáno dle stejného vzorce jako u screeningu kolon (kap. 3.2.3), jeho hodnota byla ale přiřazena k později elujícímu píku. Tímto způsobem měly všechny píky hodnotu rozlišení a mohly být vyplněny a následně vyhodnoceny jejich odpovědi.

Výsledky DOE byly vyhodnoceny opět pomocí softwaru MODDE.

Tabulka 3.6: Vygenerované pokusy plánovaného experimentu

č. exp.	pořadí exp.	kolona	organika	pH	T [°C]	iontová síla [mM]
n1	1	CSH Phenyl-Hexyl	ACN	3	20	10
n2	4	CSH Phenyl-Hexyl	ACN	6	35	30
n3	5	CSH Phenyl-Hexyl	ACN	9	50	50
n4	13	CSH C18	ACN	3	20	30
n5	18	CSH C18	ACN	6	35	50
n6	14	CSH C18	ACN	9	50	10
n7	10	Poroshell EC-C8	ACN	3	35	10
n8	12	Poroshell EC-C8	ACN	6	50	30
n9	7	Poroshell EC-C8	ACN	9	20	50
n10	6	CSH Phenyl-Hexyl	MeOH	3	50	50
n11	2	CSH Phenyl-Hexyl	MeOH	6	20	10
n12	3	CSH Phenyl-Hexyl	MeOH	9	35	30
n13	17	CSH C18	MeOH	3	35	50
n14	15	CSH C18	MeOH	6	50	10
n15	16	CSH C18	MeOH	9	20	30
n16	11	Poroshell EC-C8	MeOH	3	50	30
n17	8	Poroshell EC-C8	MeOH	6	20	50
n18	9	Poroshell EC-C8	MeOH	9	35	10
n19	20	CSH Phenyl-Hexyl	ACN	6	35	30
n20	15	CSH Phenyl-Hexyl	ACN	6	35	30
n21	16	CSH Phenyl-Hexyl	ACN	6	35	30

3.3.1 Příprava pufrů do DOE

Bylo připraveno celkem 9 různých pufrů jakožto složka A MF – 10mM, 30mM a 50mM; každý o pH 3,0, 6,0 a 9,0. Pufry o pH 3 a 6 byly připraveny navážením hydrogenfosforečnanu amonného, pufr o pH 9 z kyseliny borité. Příprava pufrů probíhala následovně:

Fosfátový pufr byl připravován vždy o objemu 2l navážením 2,64 g (10mM), 7,94 g (30mM) a 13,21 g (50mM) hydrogenfosforečnanu amonného a rozpuštěním ve 2l vody. Roztok byl poté vždy rozdělen na dva díly. pH jednoho dílu bylo upraveno na pH 3 a druhého na pH 6 pomocí 75% H₃PO₄.

Borátový pufr byl připraven navážením 0,62 g (10mM), 1,85 g (30mM) a 3,09 g (50 mM). Navážky byly rozpuštěny vždy v 1l vody, pH poté bylo upraveno pomocí 1M NaOH.

Všechny MF byly umístěny na 10 min do ultrazvukové lázně.

3.4 Příprava vzorků do optimalizace

Do optimalizace a všech dalších měření byl připravován vzorek fesoterodinu s 0,5% přídavkem nečistot o koncentraci 0,5 mg/ml aktivní látky. Relativní molekulová hmotnost fesoterodin fumarátu a nečistot dodaných výrobcem ve formě soli (double bond, toluoyl hydroxy a dimer) byla přepočítána na hmotnost samotné báze (viz tab. 3.7 a 3.8). Od této hodnoty se odvíjely navážky pro přípravu zásobních roztoků, které byly o daný poměr navýšeny. Zásobní roztoky nečistot byly připraveny navážením příslušných hmotností, uvedených v tabulce 3.8 do 10ml odměrné baňky, doplněním po rysku 80% ACN a rozpuštěním v ultrazvukové lázni. Analyzovaný vzorek byl připraven navážením 12,82 mg fesoterodin fumarátu do 20ml odměrné baňky, připipetováním 400 µl od každé nečistoty, doplněním po rysku 80% ACN a umístěním do ultrazvukové lázně na 10 min.

Tabulka 3.7: Přepočet navážky fesoterodinu pro přípravu analyzovaného vzorku

	M_r	M_r báze	báze [%]	navážka do 20 ml [mg]
fesoterodin	528	412	78	12,82

Tabulka 3.8: Přepočet navážek nečistot pro přípravu zásobních roztoků.

	M_r	M_r báze	báze [%]	navážka do 10 ml [mg]
diol	342	342	100	1,25
toluoyl hydroxy	474	326	69	1,81
double bond	562	410	73	1,71
dimer	851	735	86	1,45
benzyloxy	431	431	100	1,25
diacilated	482	482	100	1,25

3.5 Validace

V rámci analytické validace byla testována robustnost, přesnost, linearita, správnost, odezvové faktory, LOD, LOQ a selektivita.

Robustnost

V rámci robustnosti byly zkoumány změny následujících parametrů a jejich vliv na symetrii hlavního píku, diskriminační faktor pro nečistotu double bond a fesoterodin a retenční čas nečistoty dimer.

- pH MF \pm 0,3 (pH 8,9 a 9,5)
- teplota na koloně \pm 5°C (30 a 40 °C)
- průtok \pm 10% (0,63 a 0,77 ml/min)
- obsah organické složky \pm 2 %
- kolona jiné šarže

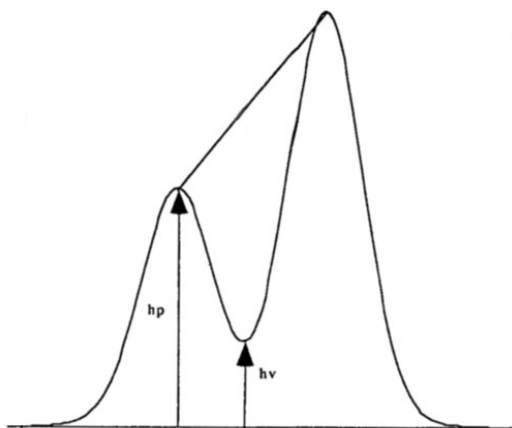
Metoda byla vyhodnocena jako robustní pokud se faktor symetrie pro fesoterodin pohyboval v rozmezí hodnot: $0,8 \geq A_s \leq 1,4$, diskriminační faktor byl vyšší než 0,8 a nečistota dimer poskytovala rozlišení vyšší než 1,5.

Test způsobilosti systému

Před každým měřením byl proveden test způsobilosti systému. Vyhodnocována byla opakovatelnost nástřiku a separační účinnost. Test probíhal pět nástřiky vzorku pro SST na kolonu. Z ploch hlavního píku byla vyhodnocena opakovatelnost nástřiku, kdy relativní směrodatná odchylka (RSD) nesměla přesáhnout 1,5 %. Separační účinnost byla hodnocena mezi nečistotou double bond a fesoterodinem. Na základě testované robustnosti metody byl posuzován tzv. diskriminační faktor d_o , jehož hodnota bere v úvahu poměr výšky menšího separovaného píku a výšku údolí mezi separovanými píky. Tato charakteristika je velice vhodná při hodnocení separace mezi píky, jejichž výšky signálů jsou řádově odlišné³⁴. Vzorec pro výpočet diskriminačního faktoru je

$$d_o = \frac{h_p - h_v}{h_p}$$

kde d_o = diskriminační faktor, h_p = výška menšího píku, h_v = výška údolí. Hodnota diskriminačního faktoru se nachází mezi 0 a 1, kdy 1 = úplná separace a v rámci validace musí být vyšší než 0,8 (cit. ³⁵).



Obr. 3.1.7: Parametry pro výpočet diskriminačního faktoru³⁴.

Přesnost

Pro stanovení přesnosti bylo samostatným postupem připraveno 6 roztoků (označených FF 1 – FF 6), obsahujících účinnou látku o koncentraci 0,5 mg/ml fesoterodinové báze. Vzorky byly připraveny navážením 6,4 mg fesoterodin fumarátu do 10 ml odměrné baňky, doplněním po rysku 80% ACN a vložení do ultrazvukové lázně na 10 min.

Vyhodnocení bylo provedeno metodou vnitřní normalizace z ploch píků, kdy RSD nečistoty nesmí přesahovat 5 %.

Tabulka 3.9: Navážky fesoterodin fumarátu pro hodnocení přesnosti

roztok	navážka [mg]
FF 1	6,4
FF 2	6,4
FF 3	6,4
FF 4	6,5
FF 5	6,4
FF 6	6,5

Linearita

Pro určení linearity byl připraven standardní roztok, obsahující fesoterodin a nečistotu diol (jakožto hlavní degradační produkt) na 120% hladině. Jeho postupným ředěním bylo získáno celkem 11 kalibračních roztoků o různých koncentracích (120 - 0,03 %, viz tab. 3.10). Standardní roztok byl připraven navážením 3,84 mg fesoterodinu a 3 mg nečistoty diol do 5 ml odměrné baňky a doplněním po rysku 80% ACN. Roztok byl umístěn do ultrazvukové lázně na 10 min.

Linearita byla vyhodnocena na základě ploch píků. K hodnocení byl použit korelační koeficient r , jehož hodnota by neměla klesnout pod 0,999 (API), respektive 0,997 (nečistoty).

Tabulka 3.10: Koncentrační hladiny fesoterodinu a diolu pro hodnocení linearity

koncentrační hladina [%]	reálná koncentrace [mg/ml]
120	0,6
100	0,5
75	0,375
50	0,25
25	0,125
10	0,05
5,0	0,025
2,5	0,0125
1,0	0,005
0,50	0,0025
0,03	0,00015

Odezvové faktory

Odezvový faktor c_f je roven odezvě jedné látky vztažené k odezvě stejného množství jiné látky. Znalost hodnot odezvových faktorů je nutná k vyhodnocení chromatogramů metodou vnitřní normalizace. Jeho hodnota byla vypočítána ze směrnice linearit pomocí vztahu:

$$c_f = \frac{sl_{ref}}{sl_{det}}$$

kde sl_{ref} = směrnice linearity porovnávané látky, sl_{det} = směrnice linearity látky, pro kterou stanovujeme odezvový faktor.

Správnost

Správnost, vyjádřena jako výtěžnost R , byla vyhodnocena celkem na 4 koncentračních hladinách. Za účelem validace metody do 100% degradace fesoterodinu byly připraveny 4 sady roztoků tak, aby součet hmotnosti fesoterodinu a nečistoty diol odpovídal celkové koncentraci obou látek 0,5 mg/ml a analýza mohla být

vyhodnocena pomocí vnitřní normalizace. Koncentrační hladiny činily 99,95 %, 95 %, 50 % a 0,05 % pro fesoterodin a 99,95 %, 50 %, 5 % a 0,05 % pro nečistotu diol. Pro každou hladinu byly provedeny 3 stanovení, příprava vzorků probíhala buď jejich přímým navážením (pro koncentrační hladiny > 90 %), nebo spikováním připravených zásobních roztoků. Ke každé hladině byl také připraven referenční roztok fesoterodinu, jelikož obsahuje malé množství nečistoty diol (je to hlavní degradační produkt) a jeho plocha musela být odečtena od výsledných ploch jednotlivých hladin.

Zásobní roztok fesoterodinu na 100% hladině (koncentrace 0,5 mg/ml fesoterodinové báze) byl připraven navážením 6,41 mg fesoterodin fumarátu do 10ml odměrné baňky a doplněním po rysku 80 % ACN. Vzorek byl umístěn do ultrazvukové lázně. Obdobným způsobem byl do jiné odměrné baňky připraven zásobní roztok diolu, jeho navážka činila 5 mg. Ze zásobních roztoků byly ředěním připraveny vzorky pro spikování 0,05% a 5% hladin.

Navážky jednotlivých stanovení byly prováděny do 5 ml odměrných baněk.

Pomocí vnitřní normalizace byly vyhodnoceny procentuální plochy píků ve vzorku, z navážek bylo vypočítáno teoretické zastoupení látky ve vzorku. Výtěžnost byla vyhodnocena pomocí vzorce:

$$R = n_{II} / n_I \cdot 100 (\%)$$

kde n_{II} = reálné zastoupení látky ve vzorku [%], n_I = teoretické zastoupení látky ve vzorku, vypočítané z navážky [%].

Na diol byl vztažen jeho korekční faktor. Výsledky výtěžnosti musely splňovat následující limity:

Výtěžnost 98,0 – 102,0 % a $RSD \leq 2,0$ % pro $10 \% \leq c < 100$ %

Výtěžnost 95,0 – 105,0 % a $RSD \leq 3,0$ % pro $1,0 \% \leq c < 10$ %

Výtěžnost 90,0 – 110,0 % a $RSD \leq 5,0$ % pro $0,10 \% \leq c < 1,0$ %

Výtěžnost 85,0 - 115,0 % a $RSD \leq 7,0$ % pro $0,03 \% \leq c < 0,10$ %

LOD, LOQ

Pro zjištění detekčního a kvantifikačního limitu byl změřen vzorek blanku a v okolí fesoterodinu a nečistoty diol ± 5 min byla vyhodnocena průměrná velikost šumu. LOD a LOQ pak byly vypočteny pomocí vzorců:

$$\text{LOD} = \frac{3 * \sigma}{\text{slope}} \quad \text{LOQ} = \frac{10 * \sigma}{\text{slope}}$$

kde σ = průměrná velikost šumu, slope = směrnice linearity, vypočítaná z výšky píku

3.6 Zátěžové studie

V rámci zátěžových studií byl sledován vliv zvýšené teploty (60 °C) a vlhkosti (10 a 75% RV), světla, kyseliny, zásady a vzdušného kyslíku na hlavní látku.

Vliv zvýšené teploty a vlhkosti

Byl studován vliv následujících podmínek na aktivní látku v pevné fázi:

- teplota 60 °C, 10 % RV
- teplota 60 °C, 75 % RV

Vzorky byly připraveny navážením 30 mg fesoterodin fumarátu do vialek, které byly vloženy do exsikátorů s danou relativní vlhkostí. Exsikátory byly umístěny do teplotní komory o teplotě 60 ° C. Po 72 h byly vzorky rozpuštěny a zředěny na koncentraci 0,5 mg/ml.

Fotostabilita

30 mg fesoterodin fumarátu bylo naváženo do vialky a vloženo do UV – VIS komory na 72 h, vzorek byl stresován v rozmezí vlnových délek 320 – 800 nm. Poté byl vzorek rozpuštěn na finální koncentraci 0,5 mg/ml fesoterodinové báze.

Oxidační stres

Byl studován vliv 3% H₂O₂ na aktivní látku v pevné fázi. Zkouška byla provedena vložением dvou malých vialek do společné headspace vialky. První vialka obsahovala definované množství fesoterodin fumarátu, druhá 1 ml oxidačního činidla. Aby mohlo činidlo působit na fesoterodin fumarát, byla uzavřena pouze headspace vialka a vzorek byl vložen do stabilitní komory o teplotě 60 °C. Byly zatíženy dvě sady vzorků, jedna po dobu 5 h, druhá 24 h. Po vyndání ze stabilitní komory byly vzorky zředěny na koncentraci 0,5 mg/ml fesoterodinové báze.

Vliv kyseliny a zásady

Byl studován vliv CH₃COOH a NH₄OH na aktivní látku v pevné fázi. Obě zkoušky byly provedeny obdobným způsobem jako u oxidačního stresu.

3.7 pH závislost hydrolytické degradace

Vyvinutá metoda byla použita pro zjištění pH stability aktivní látky v rozmezí pH 2 - 10, navážením 12,5 mg fesoterodin fumarátu do 5ml odměrných baněk. Ty byly doplněny buď fosfátovým nebo borátovým pufrem, vzhledem k jejich pufrací kapacitě v daném pH. Fosfátový pufr byl připravován z hydrogenfosforečnanu sodného, vytvořením 0,5l zásobního roztoku. Zásobní roztok byl rozdělen na 2 části, jedna část byla postupně upravována do nižších pH pomocí H₃PO₄, druhá část byla upravena na vyšší pH pomocí 1M NaOH. Borátový pufr byl připraven navážením kyseliny borité a úpravou pH pomocí 1M NaOH. Vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně na 10 min, převedeny do headspace vialek a vloženy do stabilitní komory o 60 °C po dobu 24 h. Před analýzou byly vzorky převedeny do 25ml odměrné baňky, doplněny po rysku 80% ACN a opět vloženy do ultrazvukové lázně na 10 min.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Počáteční podmínky a screening kolon

Počáteční podmínky separace byly vybrány s ohledem na strukturu fesoterodinu a její parametry jsou uvedeny v tabulce 4.1. Byl analyzován vzorek fesoterodinu s 0,5% přídatkem nečistot (jehož příprava je popsána v kapitole 3.2.2), vzorek bez přídatku nečistot a jednotlivé nečistoty.

Tabulka 4.1: Počáteční podmínky chromatografické separace

Mobilní fáze	složka A	10mM fosfátový pufr pH 2,7
	složka B	ACN; MeOH
Eluce	gradientová (tab. 3.1 a 3.2)	
Průtok MF	0,8 ml/min	
Dávkovaný objem	5 μ l	
Teplota na koloně	35 °C	
Detekce	220 nm	

Po stanovení základních podmínek byl jako první proveden screening kolon. Byla porovnávána selektivita různých stacionárních fází od odlišných výrobců. Analýza byla na každé koloně provedena vždy dvakrát – jednou byl organickým modifikátorem MF ACN a v druhé analýze MeOH. Analyzován byl vzorek připravený ze stresované tablety fesoterodinu s přidáním nečistot na 0,5% hladině. Cílem testu bylo vybrat nejvhodnější kolonu od každé fáze, aby poté mohla být zahrnuta do DOE. Hlavním posuzovaným faktorem byla schopnost kolony oddělit nečistoty double bond a toluoyl hydroxy od hlavního píku fesoterodinu a jeho symetrie.

Vybrány byly následující kolony, na kterých byla oddělena nečistota double bond od fesoterodinu pomocí alespoň jednoho z organických modifikátorů MF. Zároveň na nich bylo dosaženo nejlepší symetrie hlavního píku mezi daným typem stacionárních fází.

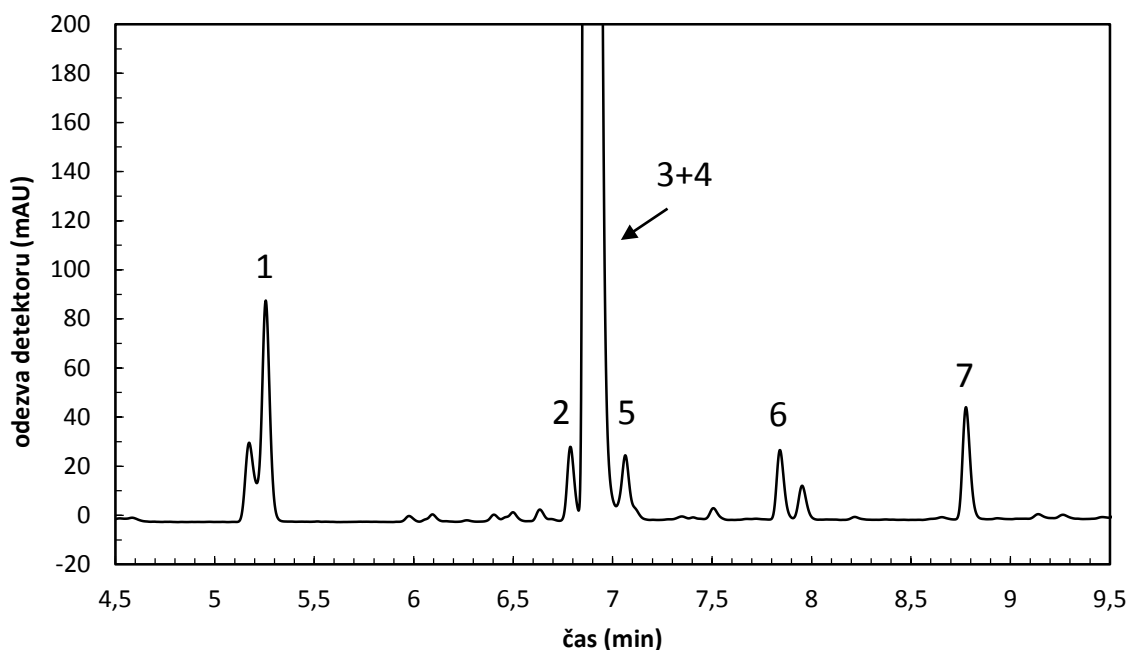
Xselect CSH Phenyl Hexyl (100 x 4,6 mm; 2,5 µm)

Jako kolona zastupující fenyl-hexylovou fázi byla zvolena Xselect CSH Phenyl Hexyl. Při použití ACN v MF došlo za daných podmínek k relativně dobrému oddělení nečistoty double bond od hlavního píku ($R_{1,2} = 1,13$) a relativně dobré symetrii fesoterodinu 0,68 (viz obr. 4.1.1) MeOH v MF tyto píky neoddělil, symetrie 0,50 ovšem stále patří k nejlepším hodnotám na fenyl-hexylové SF. Dobrá symetrie hlavního píku kladně ovlivnila separaci nečistoty double bond, jelikož se zúžil pík fesoterodinu (šířka píku = 0,066 min) a mohlo tak dojít k odseparování nečistoty. Nižší eluční síla MeOH způsobila delší retenci analytů na koloně a došlo k lepší separaci fesoterodinu od nečistoty dimer (viz obr. 4.1.2), která v analýze s ACN eluovala těsně za ním. Na této koloně došlo jako na jediné ke štěpení píku diolu z neznámých příčin. Separační veličiny jsou shrnuty v tabulce 4.2.

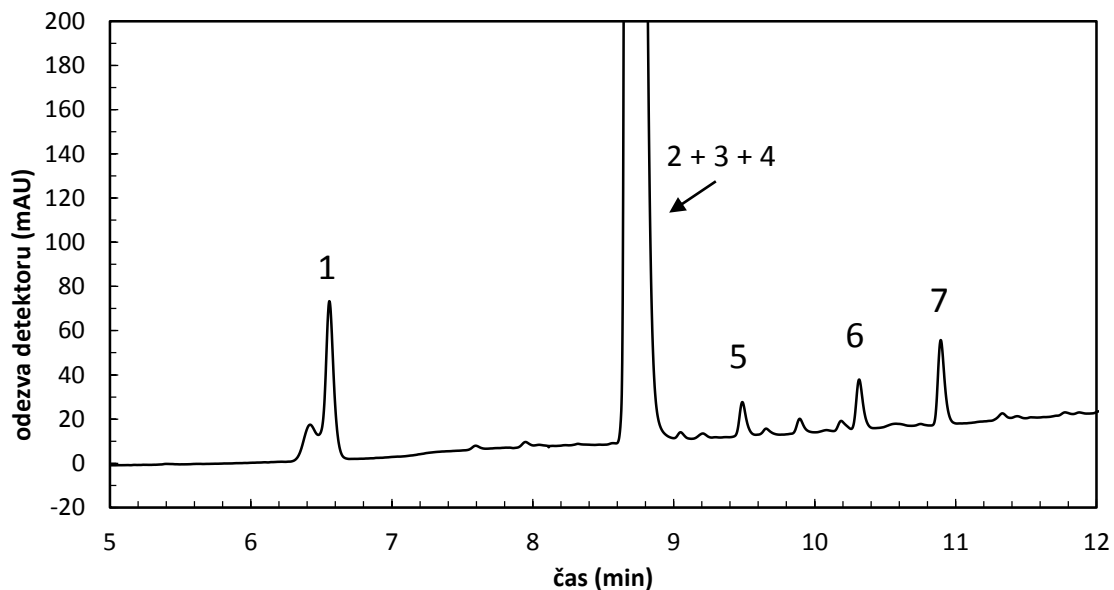
Tabulka. 4.2: Separační parametry získané analýzou na koloně Xselect Phenyl Hexyl

	ACN				MeOH			
	t_r [min]	$R_{1,2}$	plocha [%]	symetrie	t_r [min]	$R_{1,2}$	plocha [%]	symetrie
diol	5,17	22,00	3,83	1,69	6,42	14,88	3,77	1,64
double bond	6,79	1,13	0,81	0,89	-	-	-	-
toluoyl hydr.	-	-	-	-	-	-	-	-
fesoterodin	6,89	1,22	92,24	0,68	8,70	5,83	93,98	0,50
dimer	7,06	10,84	0,98	0,77	9,49	9,80	0,44	0,80
benzyloxy	7,84	13,64	0,82	0,80	10,32	6,80	0,67	0,71
diacilated	8,78	~	1,33	0,79	10,90	~	1,14	0,72

Symbol „-“ značí koeluci látek, „~“ značí poslední eluující pík (nemá hodnotu rozlišení).



Obr. 4.1.1: Analýza fesoterodinu s 0,5% přidavkem nečistot na koloně Xselect CSH Phenyl Hexyl, za použití organického modifikátoru ACN v MF: diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.



Obr. 4.1.2: Analýza fesoterodinu s 0,5% přidavkem nečistot na koloně Xselect CSH Phenyl Hexyl, za použití organického modifikátoru MeOH v MF: diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

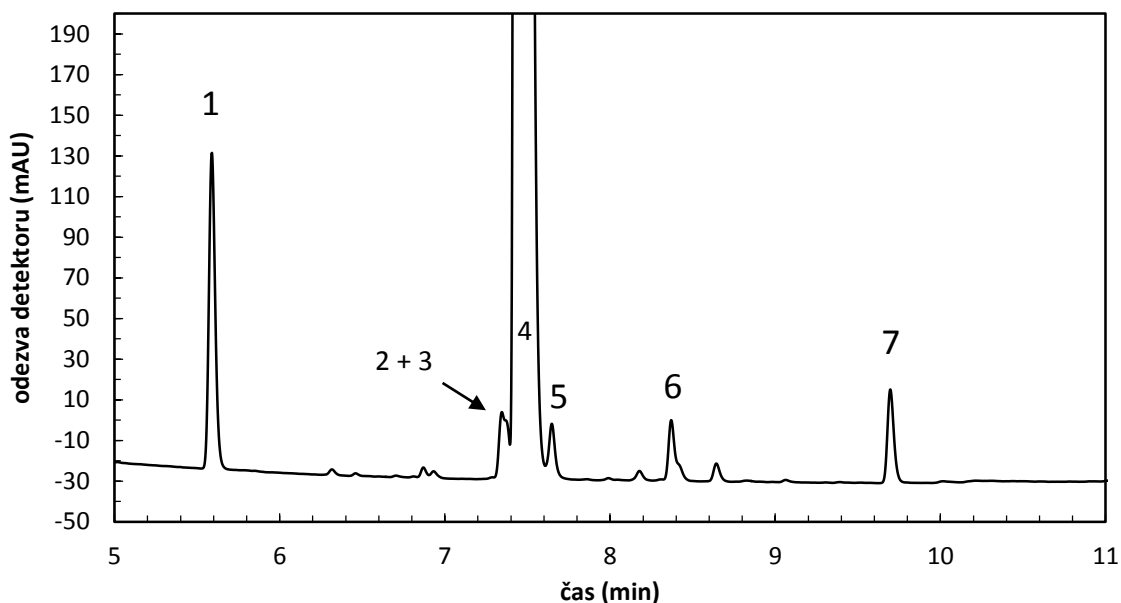
Xselect CSH C18 (100 x 4,6 mm; 2,5 µm)

Kolona XSelect CSH byla vybrána pro reprezentaci oktadecylových SF jelikož jako téměř jediná byla schopna oddělit nečistotu double bond od hlavního píku. U analýzy s ACN (viz obr. 4.1.3) je možné pozorovat náznak dělení píku double bond – jedná se o nečistotu toluoyl hydroxy, která eluuje v podobném čase jako fesoterodin. Kolona také poskytovala nejlepší symetrii hlavního píku ze všech oktadecylových fází. Retence analytů byla opět prodloužena při použití MeOH a došlo k lepšímu oddělení dimeru od fesoterodinu (viz obr 4.1.4). Separační veličiny jsou uvedeny v tabulce 4.3.

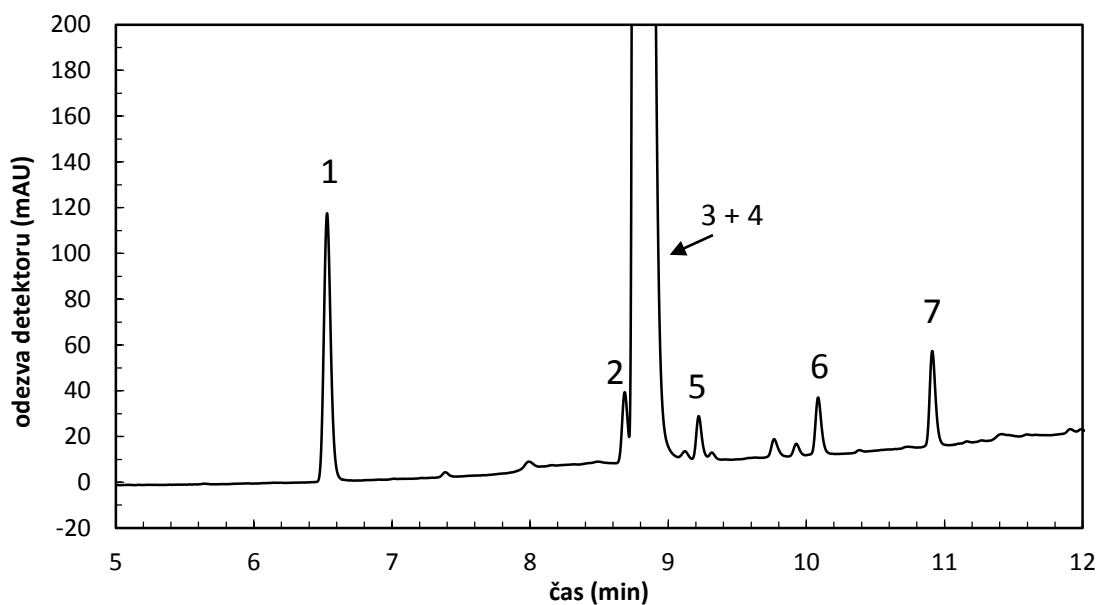
Tabulka. 4.3: Separační parametry získané analýzou na koloně Xselect CSH C18

	ACN				MeOH			
	t _r [min]	R _{1,2}	plocha [%]	symetrie	t _r [min]	R _{1,2}	plocha [%]	symetrie
diol	5,59	29,71	3,91	0,84	6,53	27,89	3,65	0,86
double bond	7,35	0,26	0,46	1,48	8,69	0,78	0,50	1,19
toluoyl hydr.	7,36	0,91	0,24	0,00	-	-	-	-
fesoterodin	7,45	1,97	92,9	0,45	8,78	3,41	93,63	0,43
dimer	7,65	11,50	0,48	0,89	9,22	11,64	0,43	0,83
benzyloxy	8,37	19,48	0,85	0,57	10,09	10,72	0,67	0,78
diacilated	9,70	~	1,18	0,80	10,91	~	1,12	0,75

Symbol „-“ značí koeluci látek, „~“ značí poslední eluující pík (nemá hodnotu rozlišení).



Obr. 4.1.3: Analýza fesoterodinu s 0,5% přidavkem nečistot na koloně Xselect CSH C18, za použití organického modifikátoru ACN v MF: diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.



Obr. 4.1.4: Analýza fesoterodinu s 0,5% přidavkem nečistot na koloně Xselect CSH C18, za použití organického modifikátoru MeOH v MF: diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

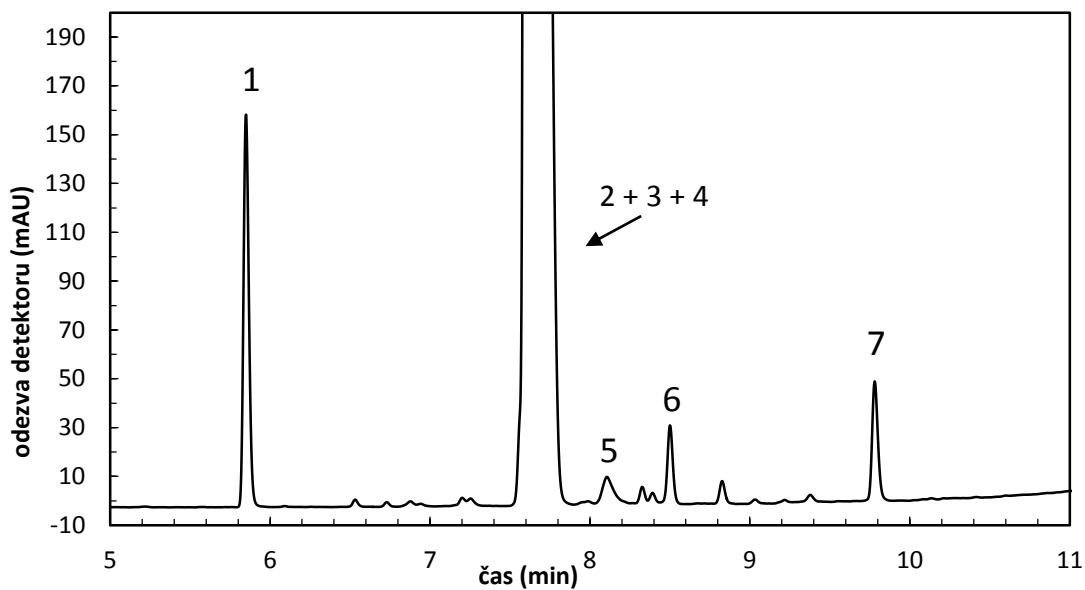
Poroshell 120 EC-C8 (100 x 4,6 mm; 2,7 μm)

Poroshell 120 EC-C8 byla vybrána ze stejných důvodů jako předchozí kolona, jelikož byla schopna oddělit nečistotu double bond od fesoterodinu. K separaci došlo za použití MeOH v MF (viz obr. 4.1.6), který vykazoval stejné vlastnosti jako u předchozích 2 kolon. Při použití ACN v MF (viz obr. 4.1.5) k oddělení nečistoty nedošlo. Jedním z důvodů koeluce mohla být šířka hlavního píku fesoterodinu, která činila 0,12 min, což je téměř dvojnásobná hodnota oproti analýze provedené na koloně s fenyl-hexylovou SF za stejných podmínek (kde byla nečistota double bond odseparována). Separační veličiny jsou shrnuty v tabulce 4.4.

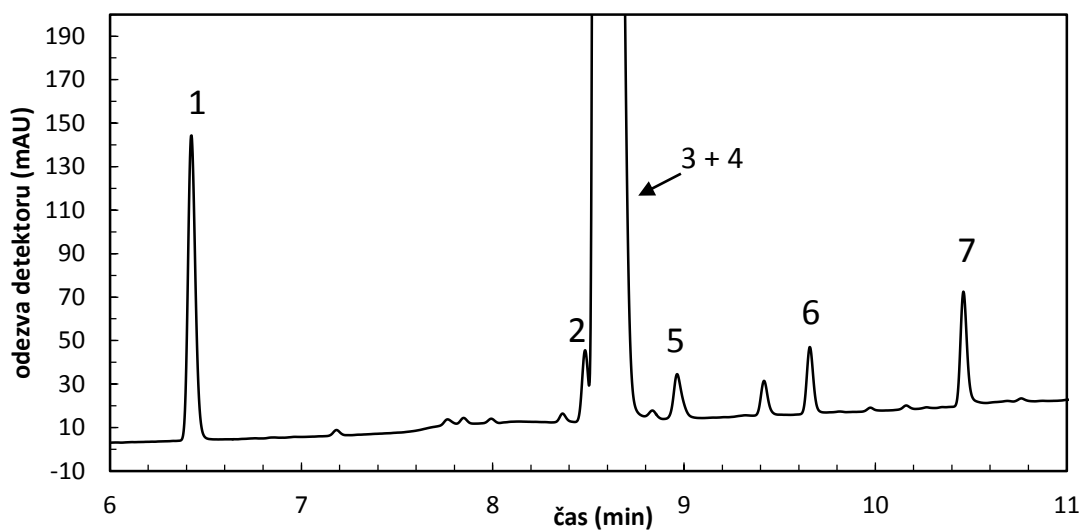
Tabulka. 4.4: Separační parametry získané analýzou na koloně Poroshell 120 EC-C8

	ACN				MeOH			
	t_r [min]	$R_{1,2}$	plocha [%]	symetrie	t_r [min]	$R_{1,2}$	plocha [%]	symetrie
diol	5,85	13,6	3,42	0,79	6,43	35,99	3,61	0,82
double bond	-	-	-	-	8,48	0,63	0,35	1,61
toluoyl hydr.	-	-	-	-	-	-	-	-
fesoterodin	7,61	3,08	94,25	0,25	8,56	3,17	93,55	0,30
dimer	8,11	4,28	0,50	0,66	8,94	10,00	0,59	0,69
benzyloxy	8,5	20,31	0,71	0,94	9,66	12,95	0,70	0,86
diacilated	9,78	~	1,13	0,79	10,46	~	1,20	0,80

Symbol „-“ značí koeluci látek, „~“ značí poslední eluující pík (nemá hodnotu rozlišení).



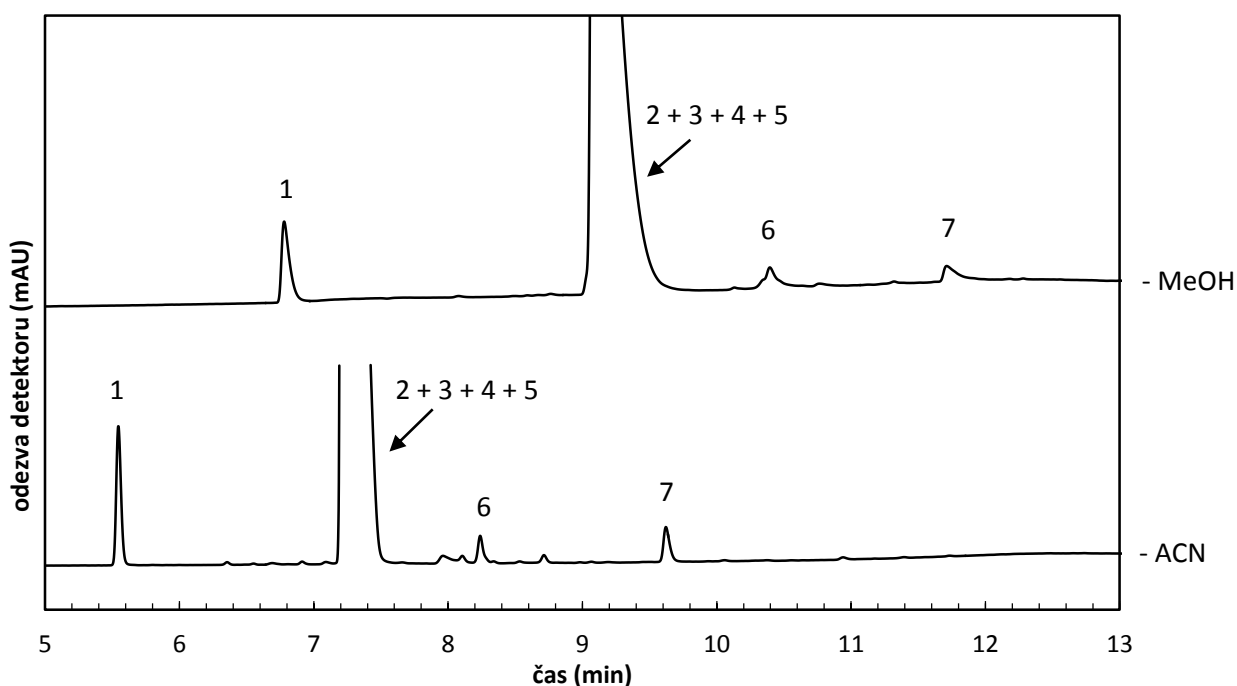
Obr. 4.1.5: Analýza fesoterodinu s 0,5% přidavkem nečistot na koloně Poroshell 120 EC-C8, za použití organického modifikátoru ACN v MF: diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.



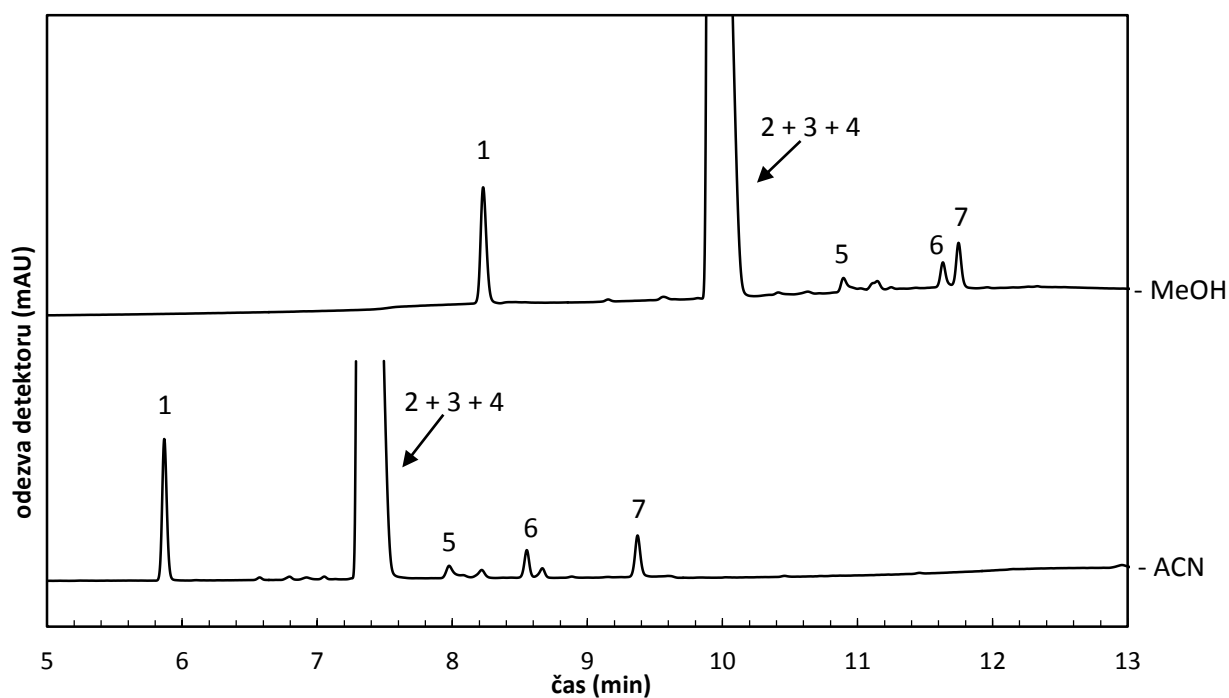
Obr. 4.1.6: Analýza fesoterodinu s 0,5% přidavkem nečistot na koloně Poroshell 120 EC-C8, za použití organického modifikátoru MeOH v MF: diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

Ostatní kolony s oktylovou, oktadecylovou a fenylohexylovou SF neposkytovaly lepší symetrie hlavního píku, než kolony vybrané do designu. Na většině nedocházelo k separaci nečistoty double bond od hlavního píku, nebo byla separace pouze částečná a látky nebyly odděleny s dostatečným rozlišením (kolony Poroshell s různými oktadecylovými SF).

Úplně nevhodnými se ukázaly být pentafluorfenylová a bifenylová stacionární fáze. Pentafluorfenylová SF nedokázala pomocí ani jedné MF odseparovat od fesoterodinu nejen nečistotu double bond, ale ani dimer. Chromatogramy obsahovaly pouze 4 píky s velmi špatnou symetrií fesoterodinu, která nepřekročila hodnotu 0,2 (viz obr. 4.1.7). Špatné separace bylo dosaženo rovněž na koloně s bifenylovou SF (viz obr. 4.1.8). Při použití MeOH v MF se prodloužila retence analytů, zhoršilo se ale rozlišení mezi nečistotami benzyloxy a diacilated. Na bifenylové koloně byla zaznamenána největší retence fesoterodinu, který při použití MeOH v MF eluoval v 10. minutě.



Obr. 4.1.7: Porovnání chromatogramů separace na koloně Kinetex F5 za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.



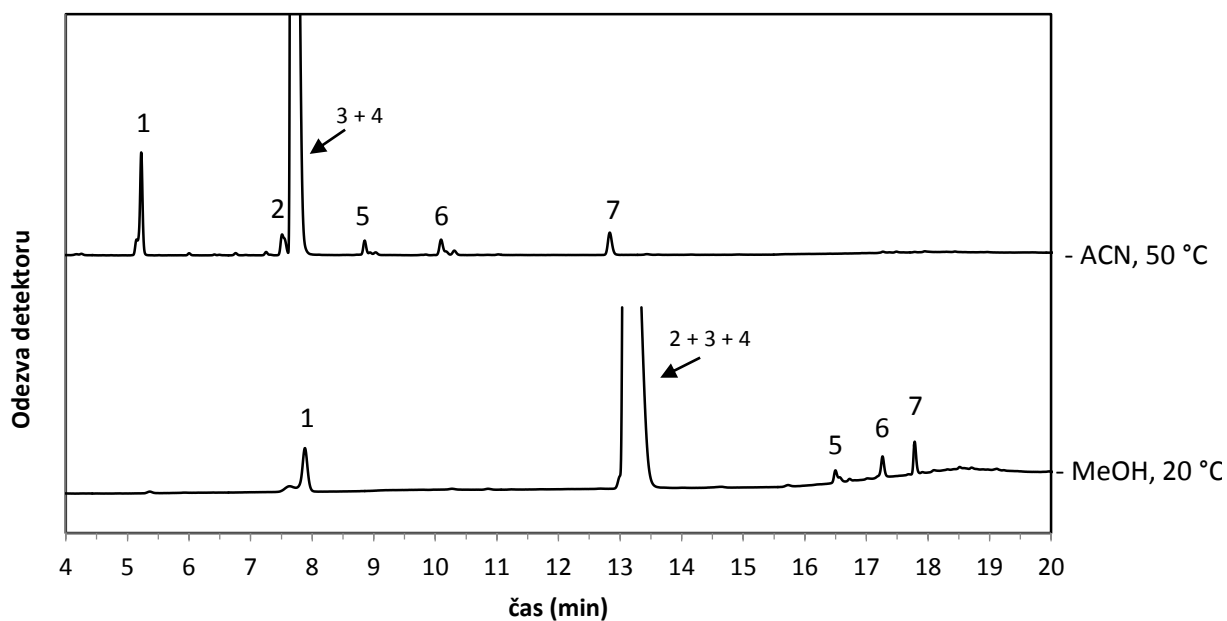
Obr 4.1.8: Porovnání chromatogramů separace na koloně Kinetex Biphenyl za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

Celkem bylo testováno 5 kolon z oktadecylovou SF, 3 kolony s oktylovou a fenyl - hexylovou SF a po 1 koloně pentafluorfenylové a bifenylové SF. Žádný typ SF nevykazoval jednoznačně lepší separaci než ostatní. Nejlepší symetrie za daných podmínek bylo dosaženo na koloně XSelect CSH Phenyl Hexyl při použití ACN v MF (symetrie = 0,68). Nečistota toluoyl hydroxy eluovala ve stejném čase jako hlavní pík a za daných podmínek nebylo dosaženo její úplné separace na žádné z testovaných kolon. Chromatogramy všech testovaných kolon jsou uvedeny v příloze (A-H).

4.2 Design of experiments

4.2.1 Test krajních mezí teplot

Před provedením samotného DOE byly otestovány krajní hodnoty plánovaných teplot na koloně. Provedeny byly celkem 2 analýzy, 1. za použití ACN v MF a teplotě kolony 50 °C a 2. s MeOH v MF a teplotou 20 °C. Jak je již patrné z chromatogramů ze screeningu kolon, MeOH má nižší eluční sílu a při jeho použití je retence analytů větší. Snížením teploty na 20 °C se retence dále zvyšuje a analýzou bylo tedy potvrzeno, že látky budou eluovat v pracovní části gradientu s dostatečným rozlišením a nedojde k jejich koeluci na jeho konci. Poslední nečistota v analýze za těchto podmínek eluovala v 17. minutě. ACN má naopak vyšší eluční sílu a analýza, provedena za teploty kolony 50 °C ujistila, že látky nebudou eluovat v mrtvém čase kolony. Retenční čas nečistoty diol, která vždy eluuje jako první v pořadí, byl 5,29 min. Na obrázku 4.2.1 jsou porovnány chromatogramy obou analýz.



Obr. 4.2.1: Testování krajních hodnot teploty na koloně XSelect CSH Phenyl Hexyl, za použití ACN/MeOH v MF. Analýza vzorku fesoterodinu s 0,5% přídavkem nečistot: diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). Podmínky gradientu: čas: 0-3-13-16-21-22-27, MF B_{ACN}: 10-30-50-80-80-10-10 / MF B_{MeOH}: 20-40-60-90-90-20-20. $F_m = 0,8$ ml/min, detekce při $\lambda = 220$ nm.

4.2.2 Provedení a vyhodnocení designu

Pro design byl zvolen lineární plán L18, zahrnující 18 experimentů + 3 analýzy středového bodu (viz tab. 3.6). Pro středový bod byla použita data z experimentu č. 2, jelikož podmínky analýzy byly totožné se středovým nastavením hladin faktorů. Tento plán byl vybrán, jelikož byl zvolen víc jak jeden kvalitativní faktor a jednalo se o screeningovou analýzu. Bylo potřeba určit efekty samotných faktorů a nikoli jejich vzájemné interakce.

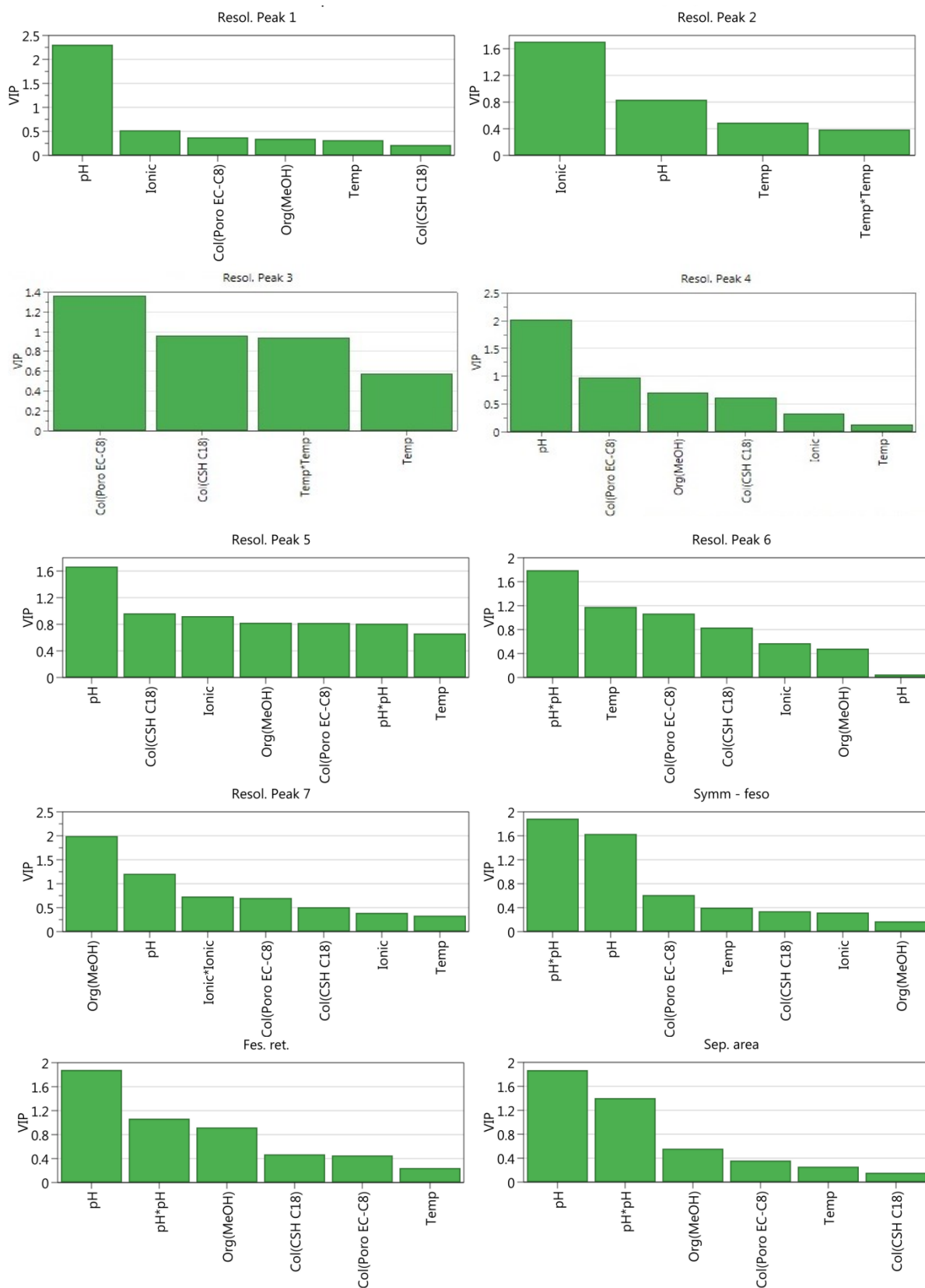
Do vyhodnocovaných odpovědí bylo zvoleno rozlišení všech píků (cílená hodnota $> 1,5$), symetrie fesoterodinu ($0,8 < \text{sym.} < 1,2$), retenční čas fesoterodinu a tzv. faktor separační oblasti - hodnota zobrazující, jakou celkovou část chromatogramu zabírají separované látky. Tato veličina byla zavedena pro potřeby HPLC vývoje za pomoci DOE. Faktor separační oblasti byl vypočítán odečtením retenčního času posledního píku od prvního a následným vydělením pracovní dobou gradientu (21 min). Často bylo pozorováno, že se faktor separační oblasti za určitých podmínek zmenšuje, retenční časy analytů se navzájem přibližují a dochází k jejich koeluci. Vysledování tohoto trendu napomohlo pozdější optimalizaci metody, kdy byl upravován gradient.

Odpovědi, získané z chromatogramů jednotlivých analýz (viz tabulka 4.5) byly vyplněny do softwaru Modde. Následovalo jejich vyhodnocení pomocí různých grafických metod. Z pohledu do tabulky 4.5 je patrné, že kritickým faktorem bylo rozlišení píku č. 2 a 3 (toluoyl hydroxy a double bond). Pouze v experimentech 5,7,8,13 a 18 došlo k jejich separaci od hlavního píku fesoterodinu a jednalo se výhradně o kolony s oktylovou a oktadecylovou fází (parametry jednotlivých experimentů jsou uvedeny v tabulce 3.6). Dále je patrné, že dobré symetrie fesoterodinu bylo dosaženo pouze při použití nejvyššího pH 9. Za těchto podmínek se nejvíce zmenšil faktor separační oblasti, což bylo způsobeno delší retencí diolu (první eluující nečistota), jehož retenční čas se značně přiblížil k ostatním nečistotám. Nízká hodnota faktoru separační oblasti může být varováním, že došlo k přiblížení retenčních časů látek a mohlo by docházet k případné koeluci píku. Na druhou stranu pokud se rozlišení píků ukáže jako dostatečné, může být upraven gradientový program a zkrácena celková doba analýzy. Podle retenčního času fesoterodinu je zřejmé, že se celé separační pole posunulo směrem ke konci pracovní části gradientu oproti nižším pH.

Tabulka 4.5: Separační parametry provedených experimentů včetně 3 středových bodů (SB).

č. exp	R _{1,2} pík 1	R _{1,2} pík 2	R _{1,2} pík 3	R _{1,2} pík 4	R _{1,2} pík 5	R _{1,2} pík 6	R _{1,2} pík 7	sym. feso.	t _r feso.	sep. plocha
n1	24,8	32,7	0	1,3	11,0	11,6	23,8	0,39	9,4	0,44
n2	71,7	34,9	0	0,8	14,1	0,7	25,0	0,26	10,4	0,46
n3	100,0	49,8	0	1,0	3,2	6,0	12,4	0,81	17,7	0,32
n4	45,6	38,0	0	1,9	9,9	9,2	34,4	0,39	10,2	0,47
n5	67,1	37,3	1,9	0,7	13,0	1,5	30,0	0,34	10,7	0,50
n6	100,0	26,1	0	1	3,6	3,3	0,0	0,71	19,2	0,25
n7	67,1	46,9	0,4	1,1	8,9	6,8	36,8	0,17	9,6	0,47
n8	74,5	38,6	2,8	2,1	12,9	7,9	31,3	0,24	9,6	0,49
n9	100,0	60,6	0	1,6	1,5	7,2	7,7	0,93	18,6	0,51
n10	33,7	39,2	0	1,0	24,1	2,1	10,5	0,38	12,3	0,47
n11	70,2	0	0	17,8	8,1	6,0	1,7	0,34	16,0	0,39
n12	100,0	0	0	20,5	19,3	8,1	3,9	0,76	18,7	0,18
n13	37,1	41,4	1,5	1,1	17,2	5,2	11,6	0,45	13,5	0,48
n14	66,7	35,6	0	0,7	10,9	1,1	18,7	0,23	11,6	0,51
n15	96,4	20,6	0	1,1	0,0	6,9	9,3	0,60	19,2	0,26
n16	54,8	41,7	0	2,1	15,9	5,8	23,6	0,27	11,3	0,50
n17	78,4	49,1	0	2,6	18,3	5,4	10,3	0,36	14,3	0,47
n18	100,0	31,5	2,8	1,1	4,5	8,4	14,0	0,84	18,5	0,28
SB	71,7	34,9	0	0,8	14,1	0,7	25,0	0,26	10,4	0,46
SB	71,7	34,9	0	0,8	14,1	0,7	25,0	0,26	10,4	0,46
SB	71,7	34,9	0	0,8	14,1	0,7	25,0	0,26	10,4	0,46

Z korelační matice faktorů bylo zjištěno, že kolony s oktylovou a oktadecylovou SF nejsou vzájemně nezávislé, a proto byly výsledky vyhodnoceny pomocí PLS metody. Replicate plot prokázal dobrou variabilitu získaných dat. Pomocí chí - square testu byly odhaleny nelinearity v modelu a byly zavedeny kvadratické členy faktorů, mezi nejvýznamnější patřil kvadratický člen $\text{pH} \cdot \text{pH}$ ovlivňující odpověď symetrie fesoterodinu. Nejprve byla data vyhodnocena pomocí VIP plotu (viz obr. 4.2.2), který umožnil odhalit významnost faktorů v rámci modelu, z hlediska jednotlivých odpovědí.



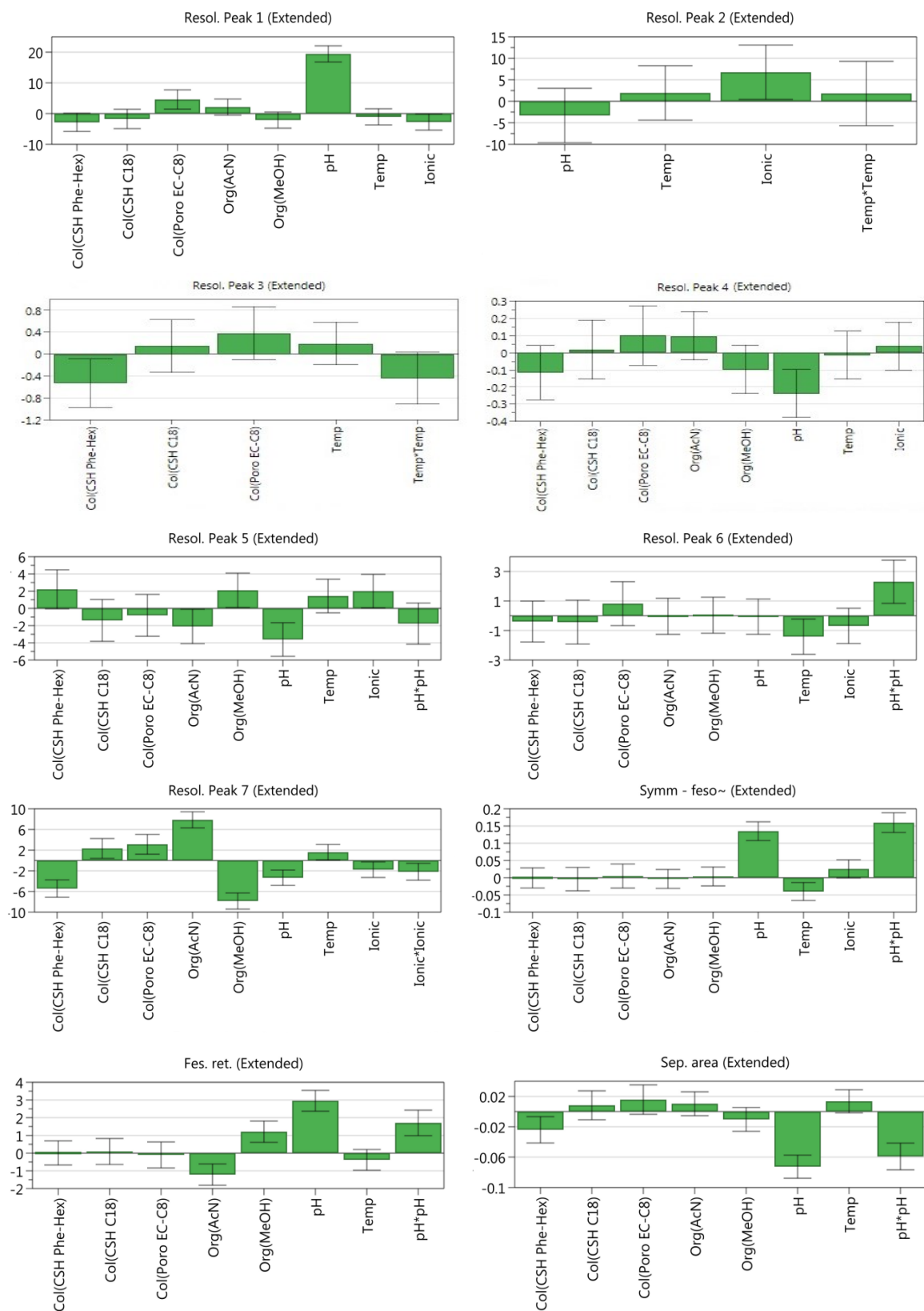
Obř 4.2.2: VIP plot zobrazující významnost faktorů v modelu, z hlediska jednotlivých odpovědí. Pokud hodnota VIP přesahuje 0,8, lze jí považovat za významnou.

Pro přehlednost byly odpovědi s významnými faktory vypsány do tabulky 4.6. Nejčastěji se jednalo o pH MF a jeho kvadratický člen (nelineární závislost). Dalším významným faktorem byl typ SF (C8 a C18), MeOH v MF, teplota na koloně a její kvadratický člen.

Tabulka. 4.6: Vlivné faktory pro jednotlivé odpovědi dle VIP plotu

	pH	T	iont. síla	kolona	organika	T*T	pH*pH	Ion*ion
R_{1,2} 1	ANO	-	-	-	-	-	-	-
R_{1,2} 2	ANO	-	ANO	-	-	-	-	-
R_{1,2} 3	-	-	-	C8, C18	-	ANO	-	-
R_{1,2} 4	ANO	-	-	C8	-	-	-	-
R_{1,2} 5	ANO	-	ANO	C8, C18	MeOH	-	ANO	-
R_{1,2} 6	-	ANO	-	C8, C18	-	-	ANO	-
R_{1,2} 7	ANO	-	-	-	MeOH	-	-	-
sym.fesot.	ANO	-	-	-	-	-	ANO	-
tr fesot.	ANO	-	-	-	MeOH	-	ANO	-
sep. plocha	ANO	-	-	-	MeOH	-	ANO	-

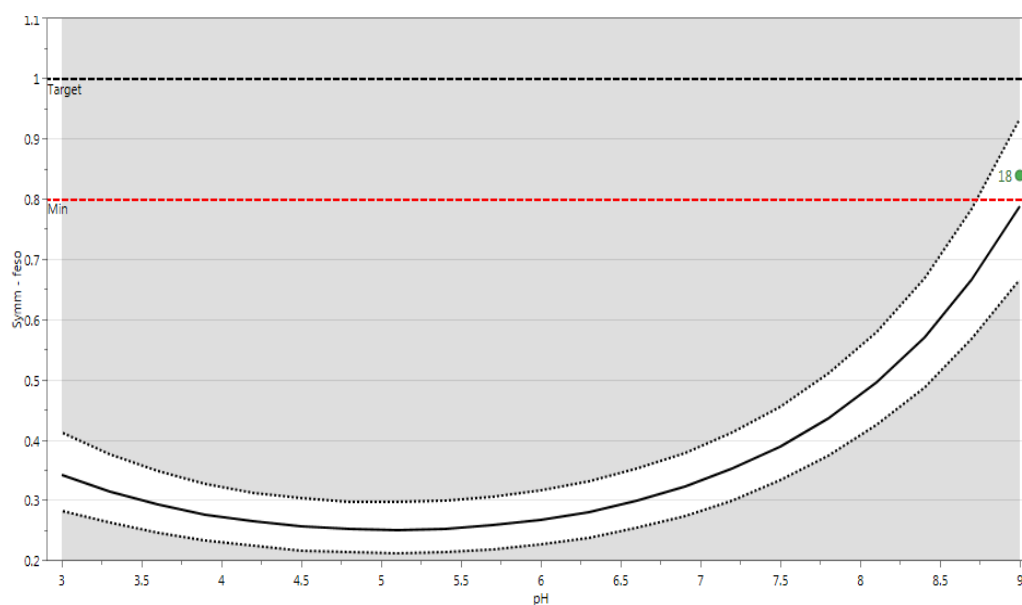
Dále byla data vyhodnocena pomocí coefficient plotu (viz obr. 4.2.3), kdy bylo zjištěno, jakým způsobem jsou odpovědi jednotlivými faktory ovlivněny. Největší pozitivní vliv na rozlišení píků měla kolona s oktylovou stacionární fází, fenyl-hexylová SF se na základě designu ukázala jako naprosto nevhodná. Negativní vliv na rozlišení mělo vysoké pH, kdy došlo ke zhoršení separace píků 4, 5 a 7. Pozitivní vliv mělo vysoké pH na symetrii fesoterodinu, přičemž kvadratický člen prozrazuje, že vliv pH na symetrii nemá lineární odezvu (v pH 3 a 9 bylo většinou dosaženo lepší symetrie než v pH 6, viz obr. 4.2.4). Vyšší iontová síla pozitivně ovlivnila separaci píků 2 a 5. Typ organického modifikátoru MF měl hlavní vliv na délku separačního pole – při použití ACN se separační pole zvětšovalo, MeOH v MF způsoboval opačný efekt. Na základě zvyšování pH se látky ještě více zadržovaly a nejmenších hodnot faktoru separačního pole bylo dosaženo v analýzách o pH 9 s MeOH. Výsledky získané z coefficient plotu byly pro přehlednost vypsány do tabulky 4.7.



Obř. 4.2.3: Coefficient plot – hlavní efekty faktorů na sledované odpovědi, vyhodnocené na základě provedeného designu.

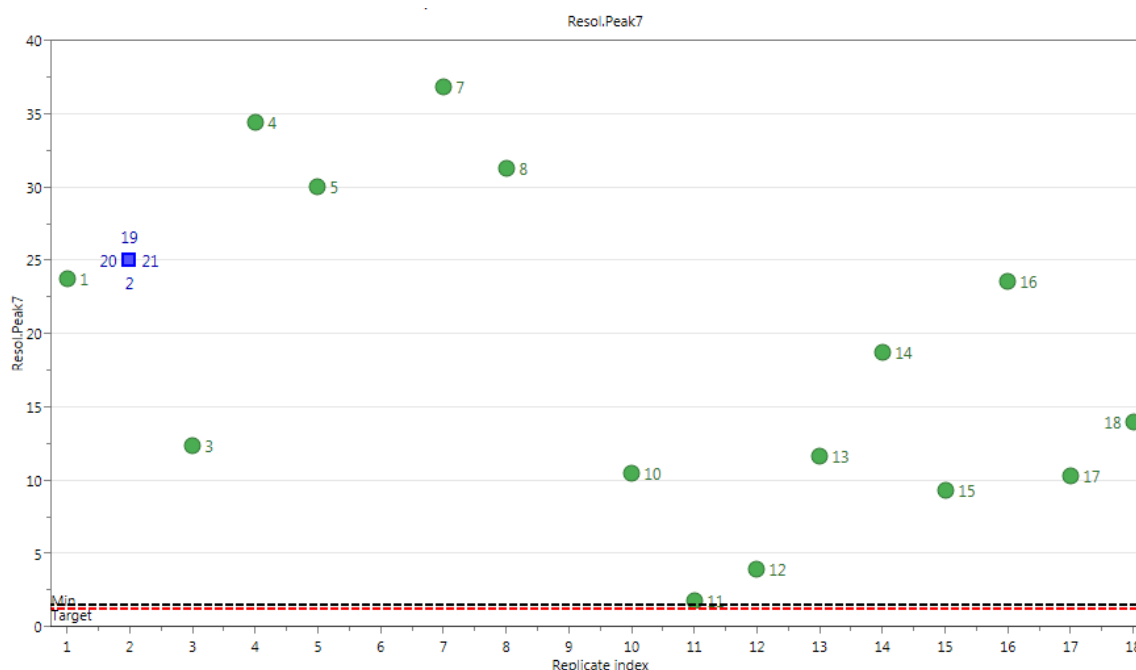
Tabulka. 4.7: Vliv významných faktorů na odpovědi dle coefficient plotu

	pH	T	iont. síla	kolona	organika	T*T	pH*pH	Ion*ion
R_{1,2} 1	pozitiv.	-	negativ.	C8 pozitiv. Phe-hex neg.	-	-	-	-
R_{1,2} 2	-	-	pozitiv.	-	-	-	-	-
R_{1,2} 3	-	-	-	Phe-hex neg.	-	-	-	-
R_{1,2} 4	negativ	-	-	-	-	-	-	-
R_{1,2} 5	negativ.	-	pozitiv.	Phe-hex neg.	ACN neg. MeOH poz.	-	-	-
R_{1,2} 6	-	negativ.	-	-	-	-	pozitiv.	-
R_{1,2} 7	negativ.	pozitiv.	negativ.	C8, C18 poz. Phe-hex neg.	ACN poz. MeOH neg.	-	-	negativ.
sym. fesot.	pozitiv.	negativ.	-	-	-	-	pozitiv.	-
t_r fesot.	pozitiv.	-	-	-	ACN neg. MeOH poz.	-	pozitiv.	-
sep. plocha	negativ.	-	-	Phe-hex neg.	-	-	negativ.	-



Obr. 4.2.4: Nelineární závislost symetrie fesoterodinu na pH mobilní fáze za použití MeOH v MF, kolony Poroshell 120 EC - C8 a iontové síly 10 mM. Zobrazeno pomocí prediction plotu. Experiment 18 se nachází v požadované oblasti pro symetrii.

Na obrázku 4.2.5 je replicate plot, zobrazující jak bylo rozlišení píku č. 7 ovlivněno typem organického modifikátoru MF. Experiment 9 byl z analýzy vyřazen, jelikož se jednalo o vychýlenou hodnotu. Experimenty 19 – 21 jsou hodnoty středního bodu.



Obr: 4.2.5: Replicate plot zobrazující rozdělení dat na 2 skupiny - nižší rozlišení píku 7 pro experimenty 10-18 (MeOH v MF), vyšší rozlišení pro experimenty 1-8 (ACN v MF).

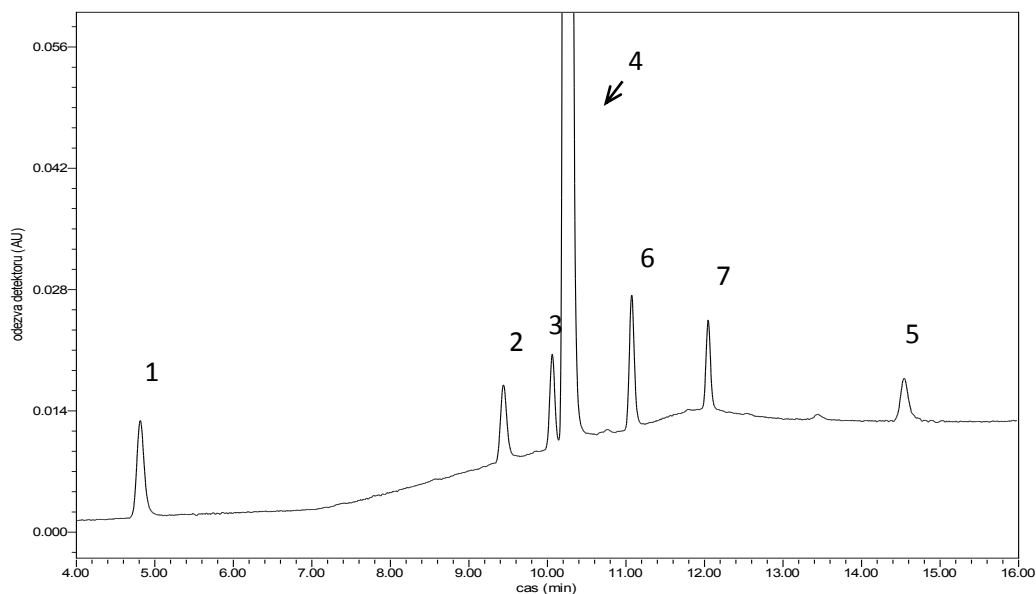
Z vyhodnoceného designu vyplynulo, že symetrie píků se zlepšuje s vyšším pH a nejlepší symetrie bylo tedy dosaženo při použití pufru o pH 9. Nejvyššího rozlišení bylo docíleno na koloně Poroshell 120 EC-C8. Teplota a iontová síla sice projevíly jistý vliv na některé z odpovědí, z celkového hlediska ovšem nebyl vliv významný. Bylo proto zachováno jejich původní nastavení 35 °C a 10 mM. Jako organický modifikátor MF byl zvolen MeOH, jelikož pozitivně ovlivňoval rozlišení píků.

4.3 Optimalizace metody

Aby byla metoda robustní i při menších změnách pH, bylo zvoleno pH 9,2. Z důvodu pH stability byla kolona Poroshell 120 EC-C8 vyměněna za jinou kolonu s oktylovou fází. Bylo sice ověřeno výrobcem, že kolonu Poroshell 120 EC-C8 je možné použít až do pH 10, při zkoumání robustnosti by se však analýza dostala téměř na hranici pH limitu a proto byla testována jiná kolona s oktylovou SF a vyšší pH stabilitou - XBridge BEH C8. Selektivita této kolony se ukázala být velmi podobná, a tak byla do dalšího vývoje použita tato kolona. XBridge BEH C8 obsahuje částice s ethylenovými můstky mezi klasickými silanolovými skupinami a je tak na rozdíl od kolony Poroshell 120 EC-C8 schopna odolávat širším rozmezí pH. Pro úplné odseparování jednotlivých nečistot byl gradient zkrácen a upraven – za účelem urychlení eluce prvního píku byl zvýšen podíl organiky v MF na začátku gradientu na 60 % a z důvodu zadržování nečistoty dimer na koloně bylo nutno posunout maximum organické složky na 90 %. Průtok byl snížen na 0,7 ml/min za účelem rozšíření chromatografického pole a dosažení lepšího rozlišení píků, pro detekci byla zvolena vlnová délka 227 nm. Optimalizované podmínky vyvinuté metody jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce 4.8, chromatogram je zobrazen na obrázku 4.3.1.

Tabulka 4.8: Souhrn optimálních podmínek pro analýzu

Kolona	X Bridge BEH-C8 (2,5 μ m, 100 x 4,6 mm)		
Mobilní fáze	složka A	10 mM borátový pufr pH 9,2	
	složka B	MeOH	
Eluce	gradientová		
Průtok MF	0,7 ml/min		
Dávkovaný objem	5 μ l		
Teplota na koloně	35 °C		
Detekce	227 nm		
Gradientová eluce	t [min]	A [%]	MeOH [%]
	0	40	60
	4	35	65
	9	10	90
	16	10	90
	17	40	60
	22	40	60

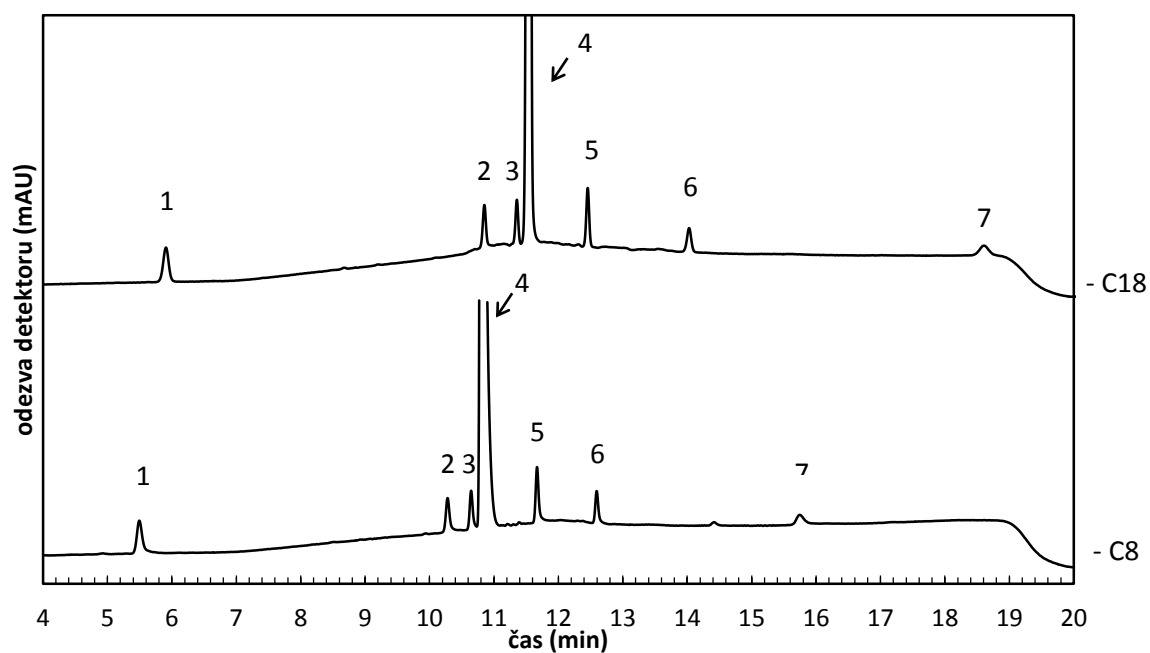


Obr. 4.3.1: Analýza fesoterodinu s 0,5% přidavkem nečistot vyvinutou HPLC metodu. Diol (1), toluoyl hydroxy (2), double bond (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,7$ ml/min, detekce při $\lambda = 227$ nm.

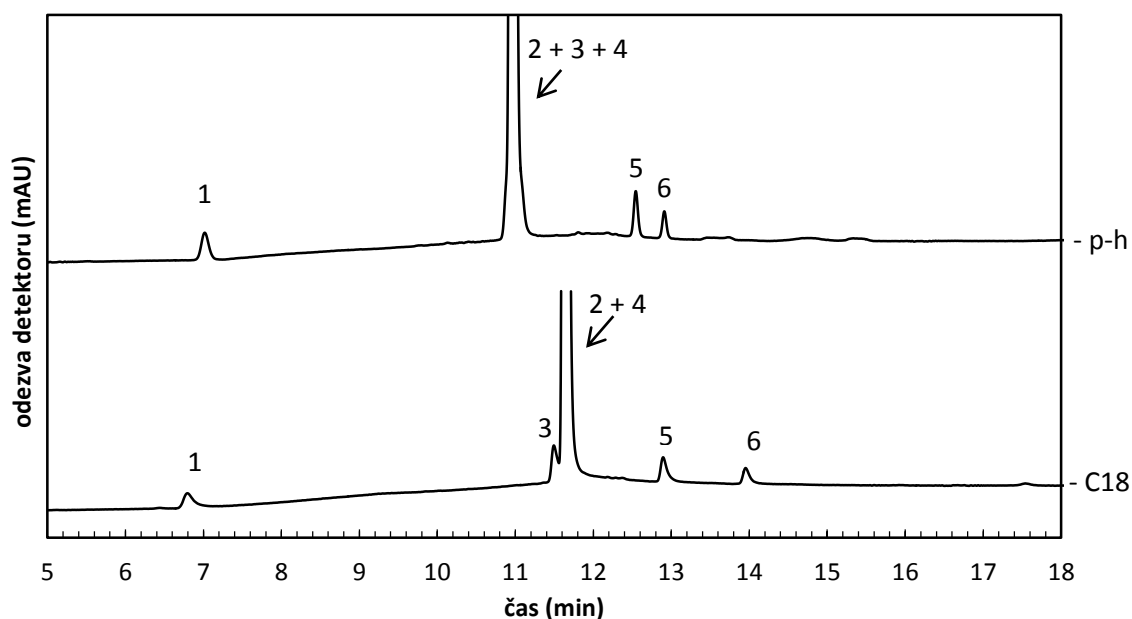
Kolony ze screeningu byly otestovány s optimalizovanými podmínkami vyvinuté HPLC metody. Z důvodu vysokého pH MF (9,2) nemohly být otestovány všechny kolony, jelikož nejsou vyráběné pro použití ve vysokém pH. Analýza byla provedena na koloně Poroshell 120 EC - C8, Poroshell 120 EC-C18, XSelect Phenyl Hexyl a XSelect CSH C18.

Dobré separace látek bylo dosaženo na koloně Poroshell 120 EC - C8. Tato kolona byla porovnána s kolonou Poroshell EC - C18 (viz obr. 4.3.2), jelikož se jedná se o velmi podobné kolony od stejného výrobce, které se od sebe liší o 10 uhlíků delším nepolárním alkylem v případě C18. Na méně polární koloně C18 došlo k prodloužení retenčního času všech látek, nejvíce se nižší polarita kolony odrazila na dimeru, který eluoval na samotném konci pracovní části gradientu před 19. minutou. Rozlišení ostatních látek je ovšem stejně vyhovující jako na koloně Poroshell EC - C8.

Kolona XSelect Phenyl Hexyl nedělila nečistoty ani za použití optimalizovaných podmínek, stejně jako XSelect CSH C18 (viz obr. 4.3.3). U těchto kolon nedošlo k eluci nečistoty dimer.



Obr. 4.3.2: Porovnání analýzy vyvinuté metody s optimalizovanými podmínkami na kolonách Poroshell 120 EC-C8 a Poroshell 120 EC-C18. Diol (1), toluoyl hydroxy (2), double bond (3), fesoterodin (4), benzyloxy (5), diacilated (6), dimer (7). $F_m = 0,7$ ml/min, detekce při $\lambda = 227$ nm.



Obr. 4.3.3: Porovnání analýzy vyvinuté metody s optimalizovanými podmínkami na kolonách XSelect CSH C18 a XSelect Phenyl Hexyl. Diol (1), toluoyl hydroxy (2), double bond (3), fesoterodin (4), benzyloxy (5), diacilated (6). Na těchto kolonách nedošlo k eluci dimer (7). $F_m = 0,7$ ml/min, detekce při $\lambda = 227$ nm.

4.4 Validace

Jelikož je vyvinutá metoda zamýšlena ke stanovení čistoty účinné látky, zabývá se pouze hodnocením nečistot. Pro vyhodnocení výsledků byla zvolena metoda vnitřní normalizace. Validace byla provedena na hlavním degradačním produktu fesoterodinu nečistotě diol.

4.4.1 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na separaci bylo provedeno na vzorku fesoterodin fumarátu s 0,5% přídatkem nečistot, jehož příprava je popsána v kapitole 3.4. Sledován byl vliv pH, průtoku MF, teploty kolony a podílu organické složky v MF na rozlišení píků, diskriminační faktor d_o pro píky double bond – fesoterodin, symetrii fesoterodinu a retenční čas nečistoty dimer, která byla nejcitlivější na změny podmínek separace a měla největší tendenci ke změnám retenčního času. Dále byl testován vliv kolony jiné šarže na selektivitu metody.

Vliv změny pH

Vliv změny pH MF byl testován na hodnotách $\text{pH} \pm 0,3$ od základních podmínek ($\text{pH} 9,2$). Jak bylo již zjištěno z DOE, pH MF má velký vliv na symetrii hlavního píku – se snižováním pH klesá také symetrie fesoterodinu. Zvyšování pH nad hodnoty základní podmínky analýzy již zlepšení symetrie nepřineslo. Hodnoty rozlišení všech píků i diskriminační faktor byly při změnách pH MF vyhovující. Nečistota dimer měla se snížením pH větší retenci na koloně. Separační veličiny jsou uvedeny v tabulce 4.9.

Vyvinutá metoda je v testovaném pH 8,9 - 9,5 robustní, nejkritičtější rozlišení mezi píky double bond – fesoterodin (vyjádřeno pomocí diskriminačního faktoru) nekleslo pod 0,93 a symetrie hlavního píku se pohybovala v rozmezí 1,22 – 1,40.

Tabulka 4.9: Separační veličiny vlivu změny pH MF na separaci

	pH		
	8,9	zákl. podmínky	9,5
rozlišení:			
diol - toluoyl	30,17	31,21	30,32
toluoyl - double bond	5,17	5,12	4,92
double bond – fesoterodin	1,69	1,70	1,68
fesoterodin – benzyloxy	7,96	7,40	7,30
benzyloxy – diacilated	10,19	9,71	9,57
diacilated – dimer	22,45	18,63	18,83
<i>d_o</i> double bond – fesoterodin	0,97	0,93	0,95
<i>t_r</i> dimer [min]	15,87	14,51	14,65
symetrie fesoterodin	1,40	1,21	1,22

Vliv změny průtoku MF

Změna průtoku byla sledována pro $\pm 10\%$ jeho základní hodnoty (0,7 ml/min). Výsledky nepřinesly žádnou významnější změnu pro symetrii fesoterodinu, rozlišení či diskriminační faktor. Retence nečistoty dimer se s menším průtokem MF zvyšovala, naopak jeho zvýšením se retence snížila. Separační veličiny jsou uvedeny v tabulce 4.10. Vyvinutá metoda je ve sledovaném rozmezí průtoku robustní, *d_o* double bond - fesoterodin neklesl pod hodnotu 0,94 a symetrie fesoterodinu se pohybovala v rozmezí 1,16 - 1,19.

Tabulka 4.10: Separační veličiny vlivu změny průtoku MF na separaci

	průtok		
	0,63 ml/min	zákl. podmínky	0,77 ml/min
rozlišení:			
diol-toluoyl	31,58	32,67	32,06
toluoyl-double bond	4,91	5,50	5,68
double bond – fesoterodin	1,70	1,79	1,81
fesoterodin – benzyloxy	7,32	7,74	7,82
benzyloxy – diacilated	9,32	10,37	10,77
diacilated – dimer	18,86	18,51	18,10
<i>d_o</i> double bond – fesoterodin	0,93	0,94	0,96
<i>t_r</i> dimer [min]	15,16	14,36	13,78
symetrie fesoterodin	1,18	1,19	1,16

Vliv změny teploty na koloně

Vliv teploty kolony na separaci byl testován pro ± 5 °C základních podmínek (35 °C). Nejvíce se změna teploty projevila na t_r dimeru, změna retenčního času vykazovala stejný trend jako u změny průtoku. Teplota má malý vliv také na symetrii fesoterodinu, která se zvýšením teploty zvyšuje a naopak.

Z tabulky 4.11 je patrné, že metoda je v testovaném rozmezí teplot kolony robustní, d_o double bond – fesoterodin neklesl pod hodnotu 0,93 a symetrie hlavního píku se pohybovala v rozmezí 1,15 – 1,25.

Tabulka 4.11: Separační veličiny vlivu změny teploty kolony na separaci

	teplota na koloně		
	30 °C	zákl. podmínky	40 °C
rozdílení:			
diol - toluoyl	30,51	31,21	31,68
toluoyl - double bond	5,58	5,12	4,62
double bond – fesoterodin	1,70	1,70	1,77
fesoterodin – benzyloxy	7,47	7,40	7,52
benzyloxy – diacilated	9,90	9,71	9,96
diacilated – dimer	19,82	18,63	18,10
d_o double bond – fesoterodin	0,95	0,93	0,96
t_r dimer [min]	15,07	14,51	14,15
symetrie fesoterodin	1,25	1,21	1,15

Vliv změny obsahu organické složky MF

Změna podílu organické složky MF byla testována zvýšením a snížením jeho podílu o 2 % během celého gradientového programu (počáteční obsah MeOH v MF 60 %). Jeho změny se opět nejvíce projevily na t_r dimeru – snížením obsahu MeOH v MF o 2 % způsobilo jeho větší retenci a naopak. Separační veličiny jsou uvedeny v tabulce 4.12.

Vyvinutá metoda se ukázala být robustní pro testovanou změnu organického modifikátoru, d_o double bond – fesoterodin opět neklesl pod hodnotu 0,93 a symetrie fesoterodinu se pohybovala v rozmezí 1,21 – 1,22.

Tabulka 4.12: Separační veličiny vlivu změny obsahu organické složky MF na separaci

	gradient		
	-2% MeOH	zákl. podmínky	+2% MeOH
rozlišení:			
diol - toluoyl	31,77	31,21	29,91
toluoyl - double bond	5,04	5,12	5,20
double bond – fesoterodin	1,71	1,70	1,77
fesoterodin – benzyloxy	7,57	7,40	7,60
benzyloxy – diacilated	9,70	9,71	10,14
diacilated – dimer	20,51	18,63	17,45
<i>d_o</i> double bond – fesoterodin	0,93	0,93	0,97
t_r dimer [min]	15,65	14,51	13,82
symetrie fesoterodin	1,21	1,21	1,22

Kolona jiné šarže

V rámci testování robustnosti byla provedena analýza na koloně jiné šarže sorbentu. Cílem testu bylo rovněž otestovat selektivitu dříve používané kolony. Na starší koloně bylo dosaženo obdobné selektivity jako na hlavní (nové) používané koloně, všechny separační veličiny jsou uvedeny v tabulce 4.13.

Tabulka 4.13 Separační veličiny za použití kolony jiné šarže

	zákl. podmínky	jiná šarže
rozlišení:		
diol - toluoyl	31,21	29,12
toluoyl - double bond	5,12	4,70
double bond – fesoterodin	1,70	1,58
fesoterodin – benzyloxy	7,40	6,96
benzyloxy – diacilated	9,71	8,81
diacilated – dimer	18,63	17,02
<i>d_o</i> double bond – fesoterodin	0,93	0,95
t_r dimer [min]	14,51	14,55
symetrie fesoterodin	1,21	1,15

4.4.2 Přesnost

Pro stanovení přesnosti bylo připraveno 6 zkoušených roztoků fesoterodin fumarátu (FF 1 - FF 6), připravených samostatným postupem. Vyhodnocení přesnosti je uvedeno v tabulce 4.14. RSD činila po zaokrouhlení na tři desetinná místa 2,56 %.

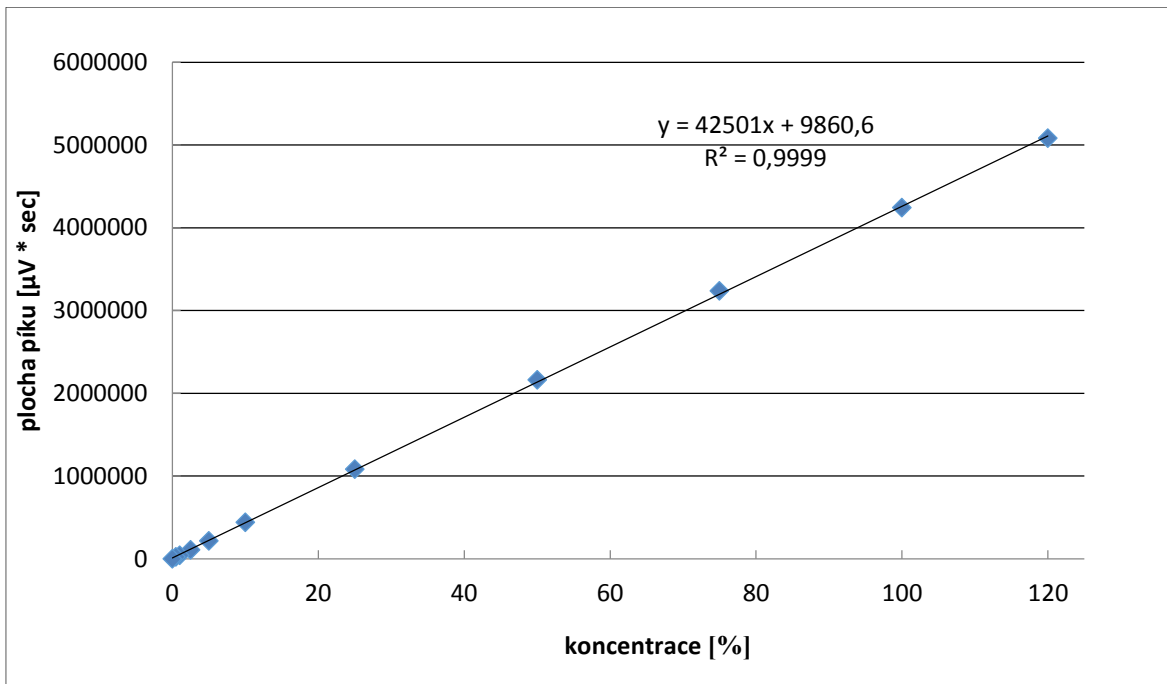
Tabulka 4.14: Vyhodnocení přesnosti metodou vnitřní normalizace

vzorek	plocha diol [%]
FF 1	0,135
FF 2	0,130
FF 3	0,128
FF 4	0,125
FF 5	0,129
FF 6	0,128
průměr	0,129
% RSD	2,56

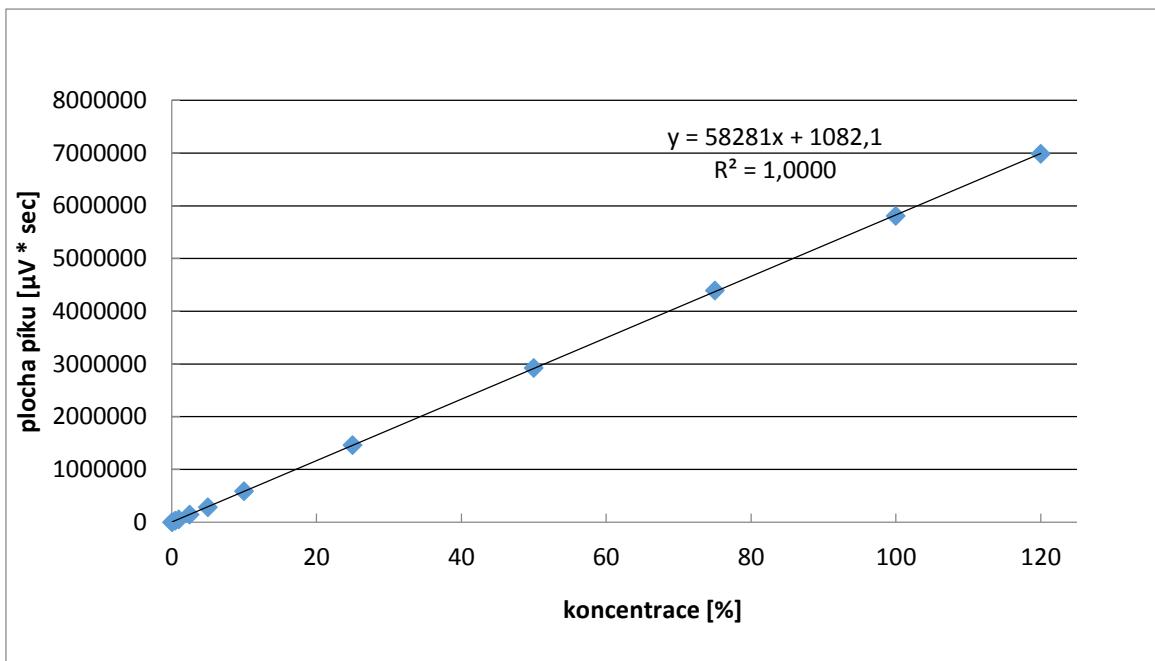
Metoda se ukázala být přesná, jelikož byl splněn požadavek $RSD < 5 \%$.

4.4.3 Linearita

Linearita byla vyhodnocena pro diol i fesoterodin, aby bylo možno vypočítat odezvový faktor diolu ze směrnice linearit. Bylo připraveno 11 analyzovaných roztoků obsahujících tyto dvě látky s odstupňovanou koncentrací (příprava viz kapitola 3.5). Vyhodnocení bylo provedeno metodou lineární regrese pomocí ploch píků v Microsoft Office Excel 2007. Kalibrační přímky byly použity pouze k vyhodnocení linearity, nikoli pro hodnocení správnosti. Grafy lineárních regresí jsou uvedeny na obrázcích 4.4.1 a 4.4.2.



Obr. 4.4.1: Graf lineární regrese fesoterodinu



Obr. 4.4.2: Graf lineární regrese diolu

Hodnota korelačního koeficientu pro diol byla $R = 1,0000$ a splňuje tedy požadavek na linearitu $R_{\text{imp}} \geq 0,997$.

4.5.4 Odezvové faktory

Odezvový faktor nečistoty diol byl vypočítán pro správné vyhodnocení výtěžnosti za použití následujícího vzorce:

$$c_f = \frac{sl_{ref}}{sl_{det}} = \frac{42501}{58281} = 0,729$$

sl_{ref} = směrnice linearit fesoterodinu, sl_{det} = směrnice linearit diolu

4.4.5 Správnost

Správnost, vyjádřena jako výtěžnost, byla vyhodnocena pro diol na hladinách 99,95 %, 50 %, 5 % a 0,05 % (viz tab. 4.15). Hodnoty teoretických ploch pro hladiny 50, 5 a 0,05 % se neměnily, jelikož byly vzorky připravovány spikováním ze stejných zásobních roztoků.

Tabulka 4.15: Vyhodnocení výtěžnosti nečistot diol pro různé koncentrační hladiny

hladina	nalezená plocha [%]	teoretická plocha [%]	výtěžnost [%]	RSD [%]
99,95 %	99,962	101,6	98,39	0,37
	99,962	100,8	99,17	
	99,962	100,8	99,17	
50 %	49,221	50	98,44	0,02
	49,222		98,44	
	49,201		98,40	
5 %	4,939	5	98,78	1,76
	4,761		95,22	
	4,947		98,94	
0,05 %	0,057	0,05	114,00	1,46
	0,055		110,00	
	0,056		112,00	

Výtěžnost se v závislosti na dané koncentrační hladině pohybovala v rozmezí 95,22 - 114,00 %, RSD se pohybovalo v rozmezí 0,02 – 1,76 %. Výtěžnost odpovídala limitním požadavkům pro všechny koncentrační hladiny (limity jsou uvedeny v kapitole 3.5).

4.4.6 LOD, LOQ

Z provedené analýzy placebo byl vyhodnocen šum v okolí účinné látky a nečistoty diol. Pomocí směrnice linearit byly vypočítány hodnoty LOD a LOQ, viz tabulka 4.16. Limity byly vypočítány i pro fesoterodin, aby tyto hodnoty mohly reprezentovat limity ostatních nečistot (pro které nebyla validace provedena) a mohou být přítomny při určování čistoty.

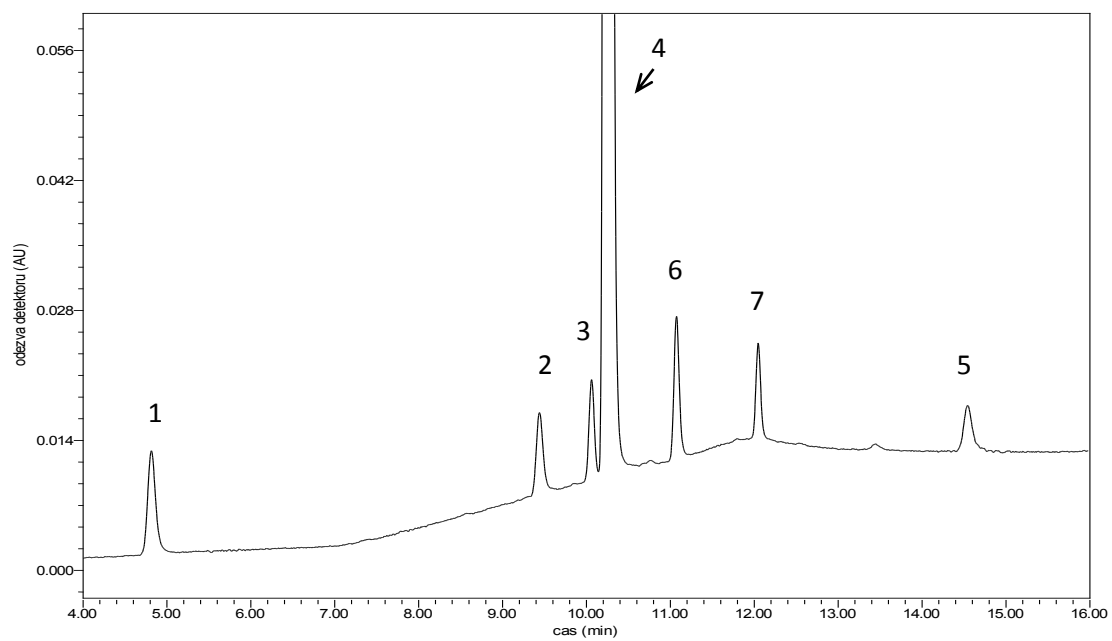
Tabulka 4.16: Detekční a kvantitativní limity

	fesoterodin	diol
σ šum	32,29	32,29
směrnice linearit	10042	8724
LOD	0,010 % (0,05 µg/ml)	0,011 % (0,06 µg/ml)
LOQ	0,032 % (0,16 µg/ml)	0,037 % (0,19 µg/ml)

Nejnižší detekovatelná koncentrace fesoterodinu za použití vyvinuté HPLC metody je 0,05 µg/ml, kvantitativní limit představuje koncentrace 0,16 µg/ml. Pro nečistotu diol jsou to hodnoty LOD = 0,06 µg/ml a LOQ = 0,19 µg/ml.

4.4.7 Selektivita

Pro zjištění selektivity byl použit roztok vzorku fesoterodinu s 0,5% přídavkem všech zkoumaných nečistot (příprava viz kap. 3.4). Separace všech složek je zobrazena na chromatogramu na obrázku obr. č. 4.4.3. Chromatografické píky jednotlivých nečistot mají odlišné retenční časy od účinné látky. Oddělení nečistoty double bond od fesoterodinu bylo vyhodnocováno pomocí diskriminačního faktoru, který bere v úvahu relativní výšku píků. Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píku účinné látky fesoterodinu a všem zkoumaným nečistotám.



Obr. 4.4.3: Chromatogram prokazující selektivitu metody. Diol (1), toluoyl hydroxy (2), double bond (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7).

4.5 DegradáčnÍ studie

V degradačních studiích byla hodnocena míra nárůstu degradačních produktů fesoterodinu za různých podmínek. Dále byla vyšetřena spektrální čistota hlavního píku porovnáváním jednotlivých UV/VIS spekter v rámci píku.

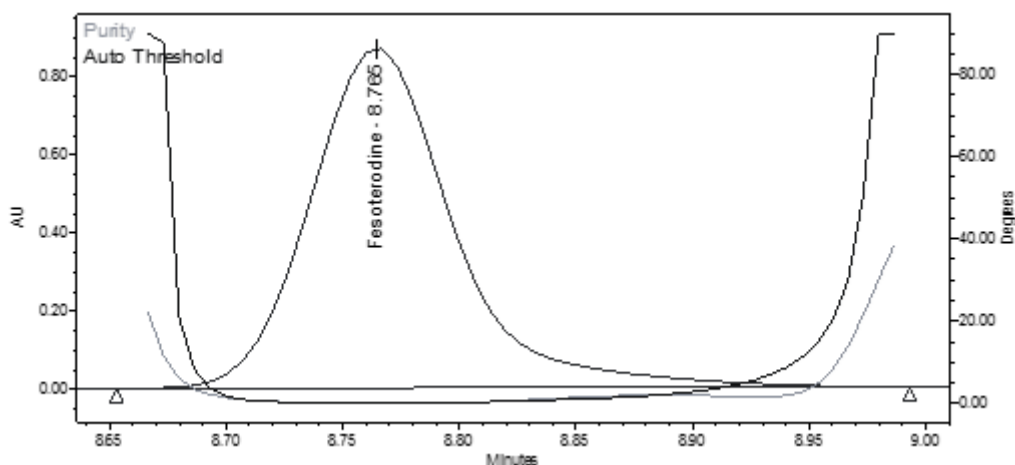
Teplota a vlhkost

Teplotou 60 °C byly zatíženy celkem dva vzorky, první při relativní vlhkosti (RV) 10 %, druhý při relativní vlhkosti 75 %. Suché teplo (10 % RV) nemělo na aktivní látku vliv, jelikož nedošlo k tvorbě žádných degradačních produktů. Ukázalo se však, že na degradaci má velký vliv působení vlhkosti, neboť celkový součet nečistot ve vzorku zatíženého vlhkostí 75% RV byl 35,87 %. Hlavním degradačním produktem byl diol (21,88 %), který byl zároveň jedinou známou nečistotou fesoterodinu. V tabulce 4.17 jsou uvedeny všechny vznikající nečistoty v jejich retenčním pořadí, neznámé nečistoty jsou označeny „imp“ a jejich retenčním časem.

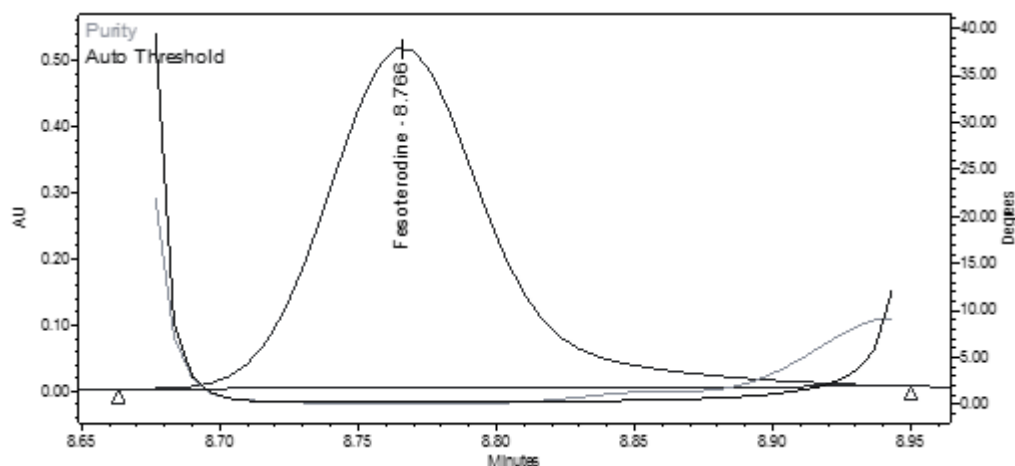
Tabulka. 4.17: DegradáčnÍ produkty vzorků zatížených teplotou a vlhkostí po dobu 72 h.

degradační produkty [%]								
	celkem nečistot	imp 2,6	Diol	imp 5,3	imp 6,2	feso.	imp 10,4	imp 11,8
nezatížený vz.	0,18	-	0,18	-	-	99,82	-	-
60 °C, 10 % RV	0,18	-	0,18	-	-	99,82	-	-
60 °C, 75 % RV	35,87	1,08	21,88	1,48	1,19	64,13	4,38	5,86

Na obrázcích 4.5.1 a 4.5.2 jsou uvedeny výsledky testů spektrální čistoty píku fesoterodinu pro teplotní a vlhkostní zátěžové zkoušky.



Obr. 4.5.1: Výsledek spektrální čistoty fesoterodinu ve vzorku zatíženém 60 °C, 10% RV. Spektrální čistota = 0,198, limit spektrální čistoty = 0,323. Výsledek hodnocení spektrální čistoty – vyhovuje.

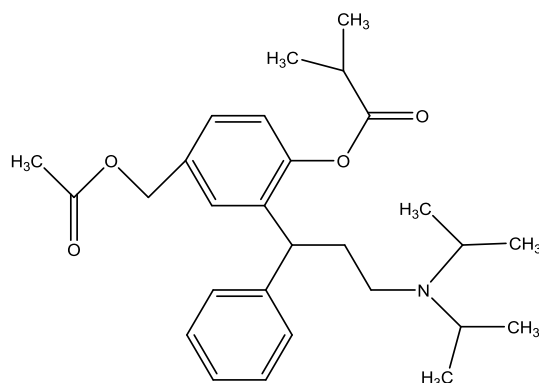


Obr. 4.5.2: Výsledek spektrální čistoty fesoterodinu ve vzorku zatíženém 60 °C, 75% RV. Spektrální čistota = 0,147, limit spektrální čistoty = 0,218. Výsledek hodnocení spektrální čistoty – vyhovuje.

Vliv kyseliny a zásady

V méně zatíženém vzorku kyselinou octovou byl celkový součet degradačních produktů 4,49 %. Za těchto podmínek se tvořila převážně nečistota diol (1,04 %) a neznámá nečistota v čase 11,4 min (2,79 %). Při delším zatížení vzorku byla degradace

již 29,60 % a reakce přešla ve prospěch neznámé nečistoty, diol již ve vzorku nebyl. Jelikož se neznámá nečistota vyskytovala ve vzorku ve významném množství, bylo možné ji dobře identifikovat pomocí LC-ESI-MS. Struktura této nečistoty je navržena na obrázku 4.5.3. Všechny degradační produkty, vznikající vlivem CH₃COOH, jsou uvedeny v tab. 4.18.

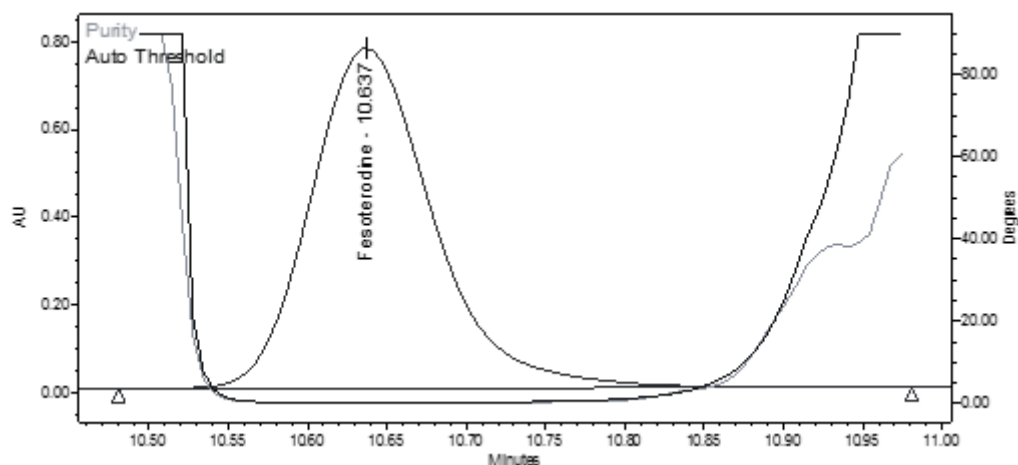


Obr. 4.5.3: Struktura nečistoty, vznikající po zatížení vzorku kyselinou octovou. Struktura navržena na základě MS spektra.

Tabulka. 4.18: Degradační produkty vzorků zatížených CH₃COOH.

CH ₃ COOH								
degradační produkty [%]								
	celkem nečistot	diol	imp 7,0	imp 7,9	feso.	imp 11,4	diacil.	imp 13,7
nezatížený vz.	0,18	0,18	-	-	99,82	-	-	-
5 h	4,49	1,04	0,66	-	95,51	2,79	-	-
24 h	29,60	-	1,71	1,45	70,40	25,81	0,33	0,30

Na obrázku 4.5.4 je uveden výsledek spektrální čistoty píku fesoterodinu.

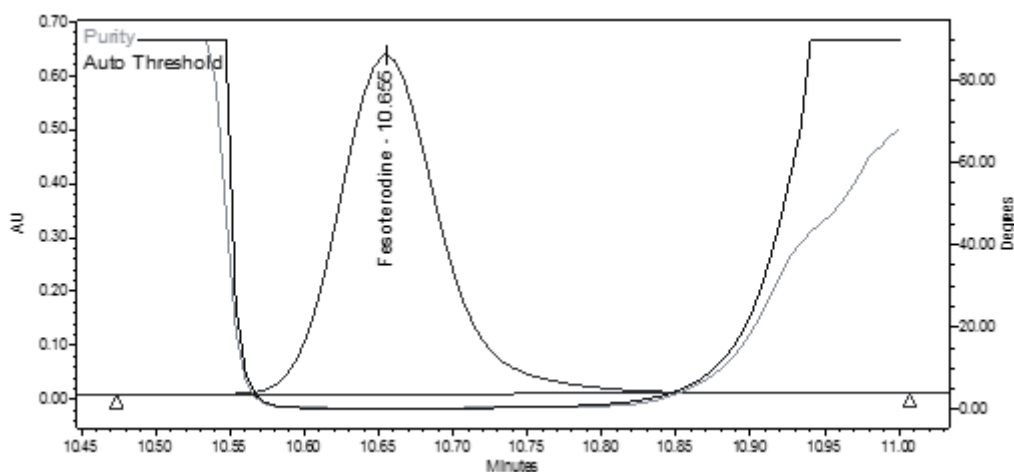


Obr. 4.5.4: Výsledek spektrální čistoty fesoterodinu ve vzorku zatíženém CH₃COOH. Spektrální čistota = 0,108, limit spektrální čistoty = 0,264. Výsledek hodnocení spektrální čistoty – vyhovuje.

Vliv NH₄OH ukázal, že je fesoterodin náchylný na alkalické podmínky. Jelikož se u FDS hodnotí degradace do 10 %, lze 5 i 24 hodinový vzorek považovat za přetížený (31,50 a 99,69 % degradačních produktů). Hlavním degradačním produktem obou vzorků byl diol, dále bylo možno pozorovat nárůst nečistoty diacilated, což je degradační produkt, který vzniká následně po vzniku diolu. V tabulce 4.19 jsou uvedeny všechny degradační produkty, vznikající po zatížení vzorku NH₄OH. Spektrální čistota píku fesoterodinu je vyhovující (viz obrázek 4.5.5).

Tabulka. 4.19: Degradační produkty vzorků zatížených NH₄OH.

NH ₄ OH								
degradační produkty [%]								
	celkem nečistot	imp 2,5	diol	imp 6,2	imp 6,4	feso.	diacil.	imp 12,8
nezatížený vz.	0,18	-	0,18	-	-	99,82	-	-
5 h	31,50	-	28,04	-	0,38	68,50	3,09	-
24 h	99,69	0,98	93,64	1,70	0,41	0,31	1,49	0,48



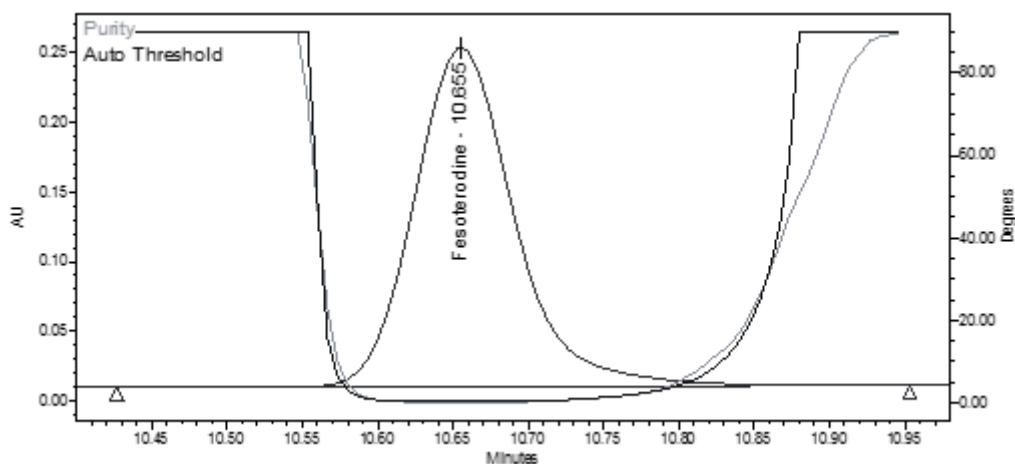
Obr. 4.5.5: Výsledek spektrální čistoty fesoterodinu ve vzorku zatíženém NH_4OH . Spektrální čistota = 0,213, limit spektrální čistoty = 0,32. Hodnocení spektrální čistoty – vyhovuje.

Oxidace

Diol byl hlavním degradačním produktem při zatížení vzorku 3% H_2O_2 . Po 5 hodinách došlo k celkové degradaci 5,18 %. V menším množství došlo také ke vzniku nečistoty diacilated (0,16 %). Výše zmíněné nečistoty však nemohou vznikat oxidací, ale vznikají hydrolyzou a esterifikací fesoterodinu. Vznikly pravděpodobně působením vody obsažené v testovacím roztoku H_2O_2 . 24 hodinový vzorek byl opět příliš zatížen, jelikož došlo k degradaci 15,13 %. Degradační produkty jsou uvedeny v tabulce 4.20, výsledek spektrální čistoty na obrázku 4.5.6.

Tabulka. 4.20: Degradační produkty vzorků zatížených 3% H_2O_2 .

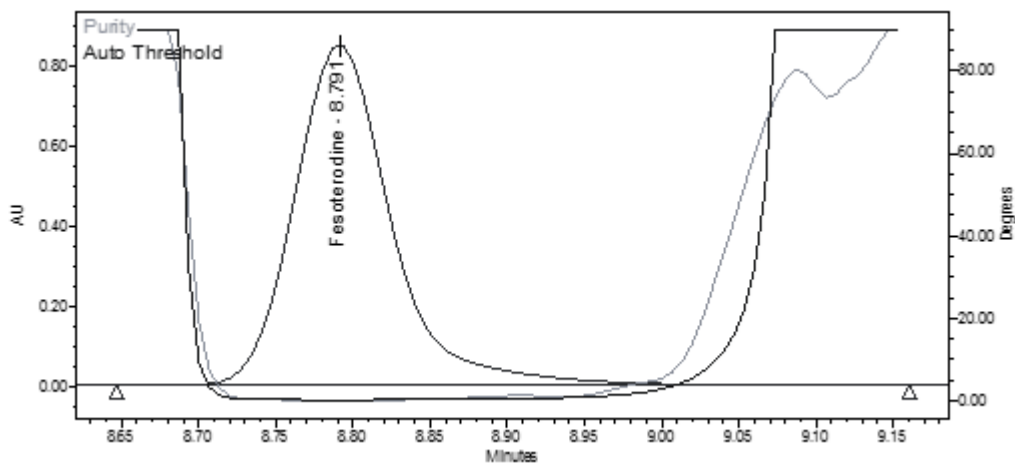
3 % H_2O_2									
degradační produkty [%]									
	celkem nečistot	imp 4,7	diol	imp 7,0	imp 8,0	feso.	imp 11,1	diacil.	imp 13,7
nezatížený vz.	0,18	-	0,18	-	-	99,82	-	-	-
5 h	5,18	0,55	4,12	-	-	94,82	0,16	0,16	0,19
24 h	15,13	0,65	10,87	0,55	0,54	84,87	0,36	0,95	1,21



Obr. 4.5.6: Výsledek spektrální čistoty fesoterodinu ve vzorku zatíženém 3% H₂O₂. Spektrální čistota = 0,247, limit spektrální čistoty = 0,363. Výsledek hodnocení spektrální čistoty – vyhovuje.

Světlo

Analýza vzorku, který byl vystaven světlu ve světelné komoře, neodhalila žádné degradační produkty. Fesoterodin tedy lze vůči světlu považovat za stabilní. Výsledek hodnocení spektrální čistoty je uveden na obrázku 4.5.7.

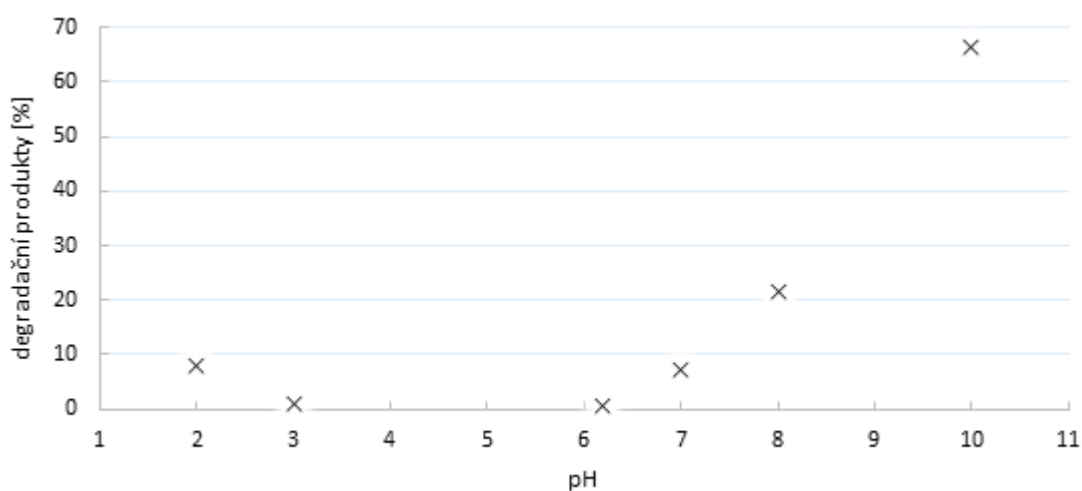


Obr. 4.5.7: Výsledek spektrální čistoty fesoterodinu ve vzorku zatíženém světlem. Spektrální čistota = 0,132, limit spektrální čistoty = 0,216. Výsledek hodnocení spektrální čistoty – vyhovuje.

4.6 pH závislost hydrolytické degradace

Vyvinutá HPLC metoda byla dále použita k podrobnější charakterizaci pH stability fesoterodinu v roztoku. Byl studován vliv pH na aktivní látku v rozmezí pH 2 – 10. Jediný degradační produkt, vznikající ve významném množství během hydrolyzy, byl diol. Na základě jeho procentuálního zastoupení ve vzorku byla sestrojena křivka, zobrazující pH profil hydrolyzy fesoterodinu (viz obr. 4.6.1.). Potvrdilo se, že aktivní látka je citlivá na alkalické prostředí (hydrolyzu). Ve vzorku s roztokem o pH 6,2 byl nárůst nečistoty diol 0,44 %, v pH 7 už tento nárůst činil přes 7 %. V roztoku o pH 8 přešlo v diol 21,4 % fesoterodinu a v pH 10 více jak 66 %. V kyselé oblasti pH 2 byla rovněž zaznamenána významná degradace aktivní látky, která činila 7,7 %. V rozmezí pH 3 - 6,2 je možno pozorovat stabilní oblast, ve které nedochází k významnému vzniku degradačních produktů.

Výsledky degradace v roztoku byly porovnány s experimenty, prováděnými v pevné fázi. Hydrolytická nečistota diol se projevila jako jediný degradační produkt, což představovalo hlavní rozdíl mezi experimenty v pevné fázi. Vzorek v pevné fázi po 24 hodinovém působení CH_3COOH neobsahoval tuto nečistotu vůbec a působením NH_4OH vznikal v menším množství rovněž produkt esterifikace nečistota diacilated. Obojí provedení experimentu prokázalo vysokou náchylnost fesoterodinu na alkalické prostředí.



Obr. 4.6.1: pH profil hydrolyzy fesoterodinu, analýza pomocí vyvinuté HPLC metody.

5. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla vyvinuta HPLC metoda pro hodnocení stability a čistoty léčiva fesoteorodinu. Cílem práce bylo nalézt optimální podmínky pro separaci fesoteorodinu od jeho šesti známých nečistot a provést charakterizaci jeho chemické stability.

K vývoji HPLC metody byl použita metoda plánovaných pokusů. Celkem bylo testováno 13 chromatografických kolon. Optimální chromatografický systém se skládal z kolony X Bridge BEH-C8 (2,5 μm , 100 x 4,6 mm), mobilní fáze obsahovala 10mM borátový pufr pH 9,2 (složka A) a methanol (složka B). Eluce byla gradientová (čas: 0-4-9-16-17-22, složka B: 60-65-90-90-60-60) a průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min. Dávkovaný objem vzorku byl 5 μl , teplota kolony byla 35 $^{\circ}\text{C}$ a detekce probíhala při 227 nm pomocí DAD detektoru.

Vyvinutá HPLC metoda byla validována pro nečistotu diol, validované parametry byly robustnost, přesnost, správnost, linearita, odezvosvý faktor, LOD, LOQ a selektivita (selektivita metody pro fesoterodin a všechny nečistoty). Metoda vyhověla všem validačním požadavkům. RSD pro přesnost byla 2,56 %, korelační koeficient linearity byl 1,000 a odezvosvý faktor nečistoty diol byl 0,729. Správnost, vyhodnocena jako výtěžnost byla měřena na 4 koncentračních hladinách – 99,95 %, 50 %, 5 % a 0,05 % a RSD se pohybovala v rozmezí 0,02 - 1,76 %. LOD a LOQ nečistoty diol byly 0,06 $\mu\text{g/ml}$ a 0,19 $\mu\text{g/ml}$.

Byla provedena degradační studie, která prokázala, že vyvinutá HPLC metoda je stabilitu indikující. Získané výsledky byly dále použity pro zhodnocení chemické stability fesoterodinu. Bylo zjištěno, že fesoterodin je velmi citlivý na vysokou vlhkost a naopak nízká vlhkost má výrazný stabilizační vliv. Vlhkost vytváří prostředí pro hlavní degradační mechanismus, kterým je hydrolýza. Tímto mechanismem vzniká hlavní degradační produkt diol. Největší vliv má hydrolýza v alkalické oblasti pH, což bylo prokázáno také následným testem závislosti degradace fesoterodinu na pH. V rámci tohoto testu bylo odhaleno, že v rozmezí pH 3,0 – 6,2 je degradace fesoterodinu nejnižší. Dále bylo zjištěno, že za studovaných podmínek fesoterodin netvoří oxidační produkty a je velice stabilní na světle (320 – 800 nm) po dobu 72 h. Výše uvedené závěry jsou klíčové pro chemickou stabilizaci fesoterodinu v následném vývoji léčivého přípravku.

6. LITERATURA

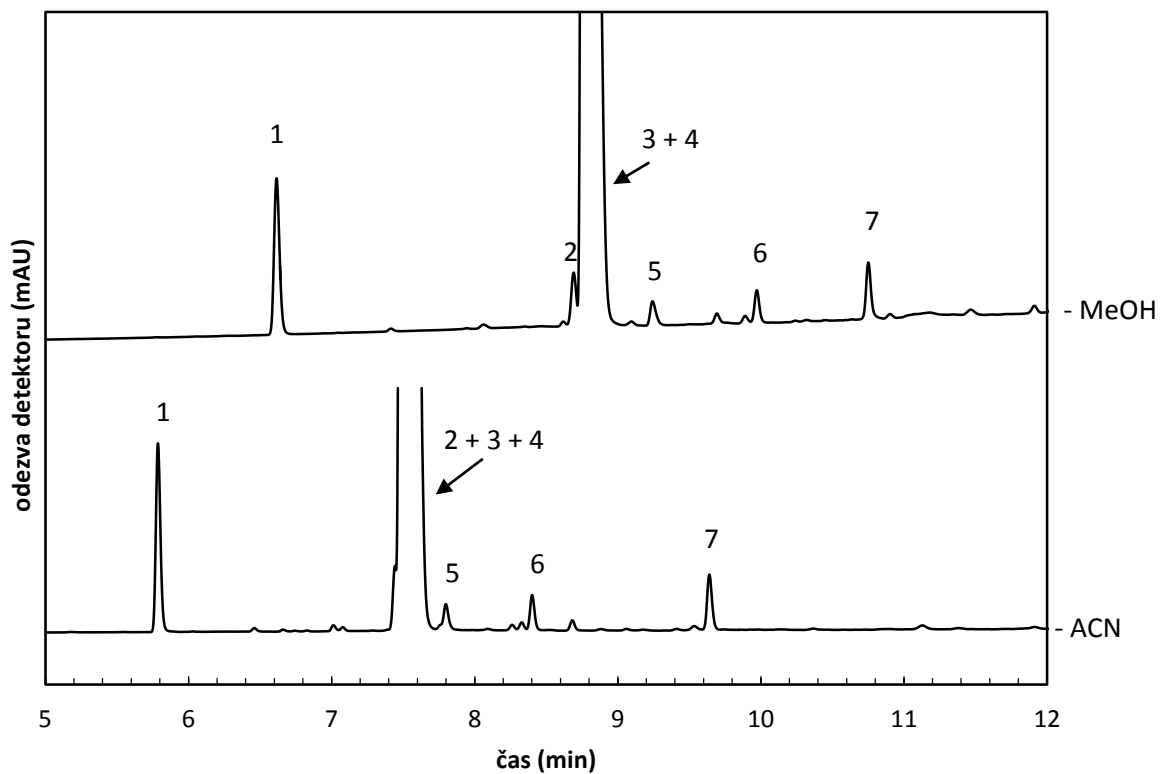
- 1 Sicras-Mainar A.; Navarro-Artieda R.; Ruiz-Torrejón A.; Sáez-Zafra M.; Coll-de Tuero G.: Persistence and concomitant medication in patients with overactive bladder treated with antimuscarinic agents in primary care. An observational baseline study. *Actas Urológicas Españolas* **40**:2, 96-101 (2016).
- 2 Michel M.C.: Fesoterodine: a novel muscarinic receptor antagonist for the treatment of overactive bladder syndrome. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **9**:10, 1787-1796 (2008).
- 3 Anderson K.E.; Yoshida M.: Antimuscarinics and the Overactive Detrusor – Which Is the Main Mechanism of Action? *European Urology* **43**, 1-5 (2003).
- 4 Mock S.; Dmochowski R.R.: Evaluation of fesoterodine fumarate for the treatment of an overactive bladder. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **9**:12, 1659-1666 (2013).
- 5 Romžová M.: Farmakoterapie urgentní inkontinence a hyperaktivního močového měchýře. *Urologie pro Praxi* **14**:2, 59-62 (2013).
- 6 Zachoval R.: Fesoterodin – nové anticholinergikum pro léčbu hyperaktivního močového měchýře. *Urologie pro Praxi* **9**:6, 316-322 (2008).
- 7 Sangoi M.S.; Todeschini V.; Steppe M.: Fesoterodine stress degradation behavior by liquid chromatography coupled to ultraviolet detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta* **84**, 1068-1079 (2011).
- 8 Rao T.N.; Suresh G.; Raghu babu K.; Reddy S.: Estimation of Fesoterodine fumarate in tablet dosage forms by a new RP-HPLC method. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences* **2**:4, 35-40 (2012)
- 9 Reddy B.V.R.; Reddy B.S.; Kumar M.S.; Rambabu C.: A validated stability-indicating HPLC assay method for determination of fesoterodine fumarate. *Rasayan Journal of Chemistry* **5**:2, 239-245 (2012).
- 10 Kotla N.R.; Nagaraju Ch.V.S.; Rajan S.T.; Eshwaraiah S.; G., Reddy S.K.; Rakesh M.; Chakravarthy I.E.: Stability indicating HPLC method for the quantification of fesoterodine fumarate and its related substances. *Der Pharma Chemica* **5**:5, 155-122 (2013).
- 11 Parekh J.M.; Sanyal M.; Yadav M.; Shrivastav P.S.: Investigation of ex vivo stability of fesoterodine in human plasma and its simultaneous determination together with its active metabolite 5-HMT by LC–ESI-MS/MS: Application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography B* **913-914**, 1-11 (2013).

-
- 12 Sangoi M.S.; Steppe M.: Determination of fesoterodine in pharmaceutical formulations by using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* **16**:6, 653–661 (2010).
- 13 Rajput A.P; Sonanis M.C: Stability Indicating HPLC Method for the Enantiomeric Separation of Fesoterodine Fumarate in Drug Product and Drug Substance Using Chiral Stationary Phase. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **4**:9, 4127-4133 (2012).
- 14 Sangoi M.S.; Todeschini V.; Steppe M.: Determination of Fesoterodine in a Pharmaceutical Preparation by a Stability-Indicating Capillary Zone Electrophoresis Method. *Journal of AOAC International* **96**:6, 1308-1314 (2013).
- 15 Sangoi M.S.; Todeschini V.; Steppe M.: Second-Order Derivative UV Spectrophotometric Method for the Determination of Fesoterodine and Comparison with LC, CE and LC-MS/MS in Commercial Extended-Release Tablets. *Acta Chimica Slovenica*. **59**, 136-143 (2012).
- 16 Sangoi M.S.; Todeschini V.; Goelzer G. K.; Steppe M: Photochemistry of a novel antimuscarinic drug fesoterodine and identification of its photodegradation products by LC-ESI-MS studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **256**, 16-22 (2013).
- 17 Kučerová P.; Skopalová J.; Kučera L.; Hrbáč J.; Lemr K.: Electrochemical oxidation of fesoterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry. *Electrochimica Acta* **159**, 131-139 (2015).
- 18 Nováková L.; Douša M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha, Europrint 2013.
- 19 Nováková L.; Douša M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha, Europrint 2013.
- 20 Snyder L.R.; Kirkland J.J; Dolan J.W.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. Wiley 2010.
- 21 Meyer V.R: *Practical High Performance Liquid Chromatography*, 4th ed. Wiley 2014.
- 22 Agilent Technologies: *The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development*. USA 2016.
- 23 Dolan J.W.; Maule A.; Bingley D.; Wrisley L.; Chan C.C; Angod M.; Lunte C.; Krisko R.; Winston J.M; Homeier B.A; McCalley D.V; Snyder L.R: Choosing an equivalent replacement column for a reversed-phase liquid chromatographic assay procedure. *Journal of Chromatography* **1057**, 59-74 (2004).

-
- 24 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. Dostupné z URL: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf> [cit. 17.1.2017]
- 25 Validace analytických metod. Dostupné z URL: <<http://www.hplc.cz/validace/>> [cit. 17.1.2017]
- 26 Michálek J.: *Navrhování a vyhodnocování experimentů (DOE)*. Dostupné z URL: http://www.crr.vutbr.cz/system/files/brozura_05_1012_2.pdf [cit. 20.2.2017]
- 27 Wahid Z.; Nadir N.: Improvement of One Factor at a Time Through Design of Experiments. *World Applied Sciences Journal* **21**, 56-61 (2013).
- 28 Eriksson L.; Johansson E.; Kettaneh-Wold N.; Wikström C.; Wold S.: *Design of Experiments: Principles and Applications*, 3rd ed. Umetrics Academy 2008.
- 29 Tošenovský J.: *Plánování experimentů*. Dostupné z URL: <http://www.person.vsb.cz/archivcd/FMMI/DOE/Planovani%20experimentu.pdf> [cit. 20.2.2017]
- 30 Anthony J.: *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. Butterworth Heinemann 2003.
- 31 Vetchý D.; Frýbortová K.; Rabišková M.; Häring A.: Testování stability léčivých přípravků. *Chemické listy* **100**, 24-29 (2006).
- 32 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2)*. Dostupné z URL: <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf> [cit. 10.4.2017]
- 33 Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha, Grada Publishing 2009.
- 34 Fallah, M. Z.El; Martin, M.: Influence of the Peak Height Distribution on Separation Performances: Discrimination Factor and Effective Peak Capacity. *Chromatographia* **24**:1, 115-122 (1987).
- 35 Xu Q.A.: *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*. Wiley 2013.

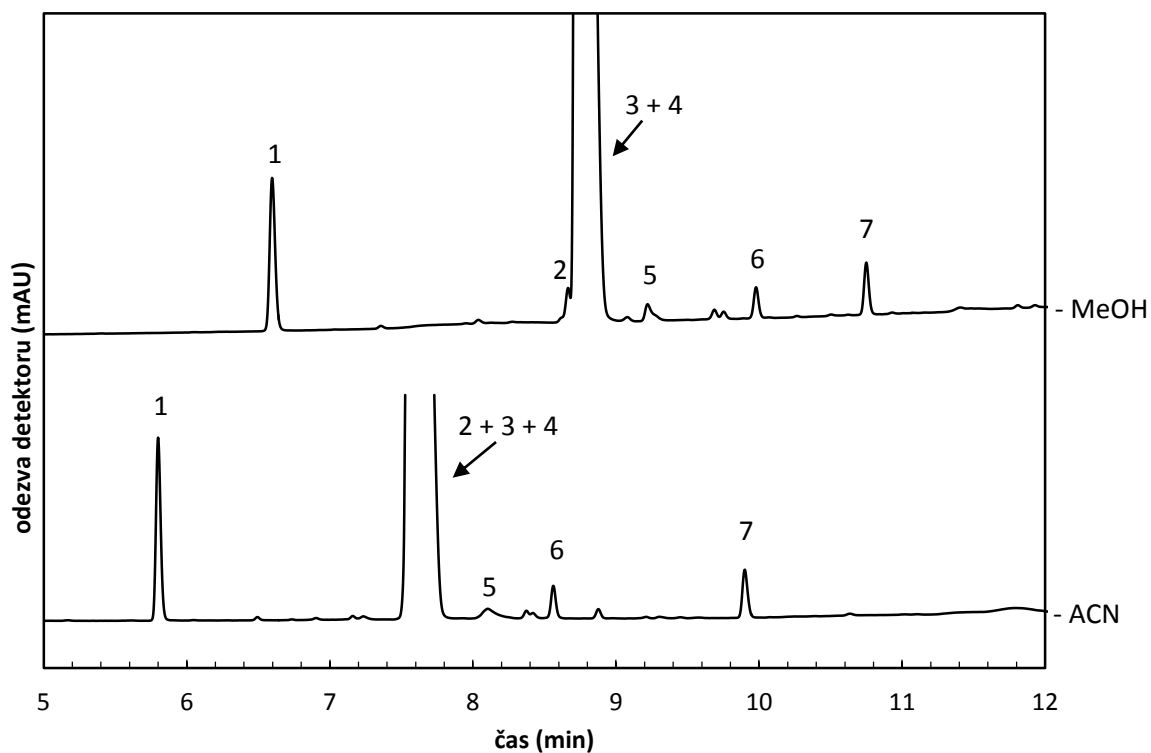
PŘÍLOHY

Poroshell 120 SB-C18



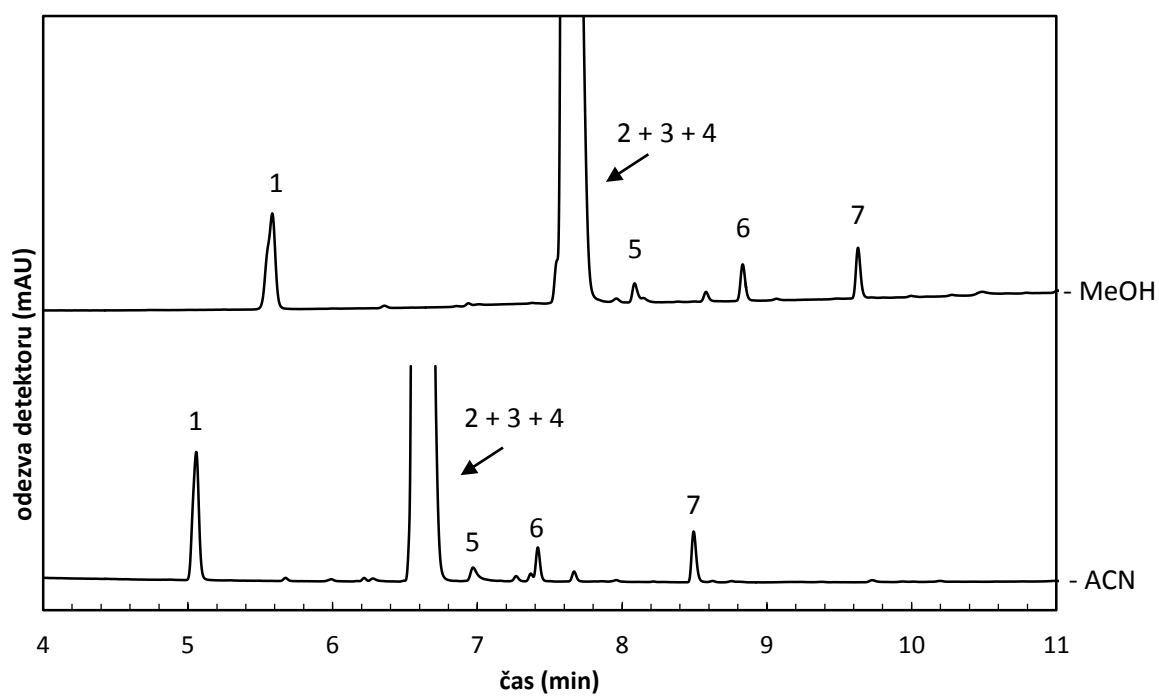
Příloha A: Porovnání chromatogramů separace na koloně Poroshell 120 SB-C18 za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

Poroshell 120 EC-C18



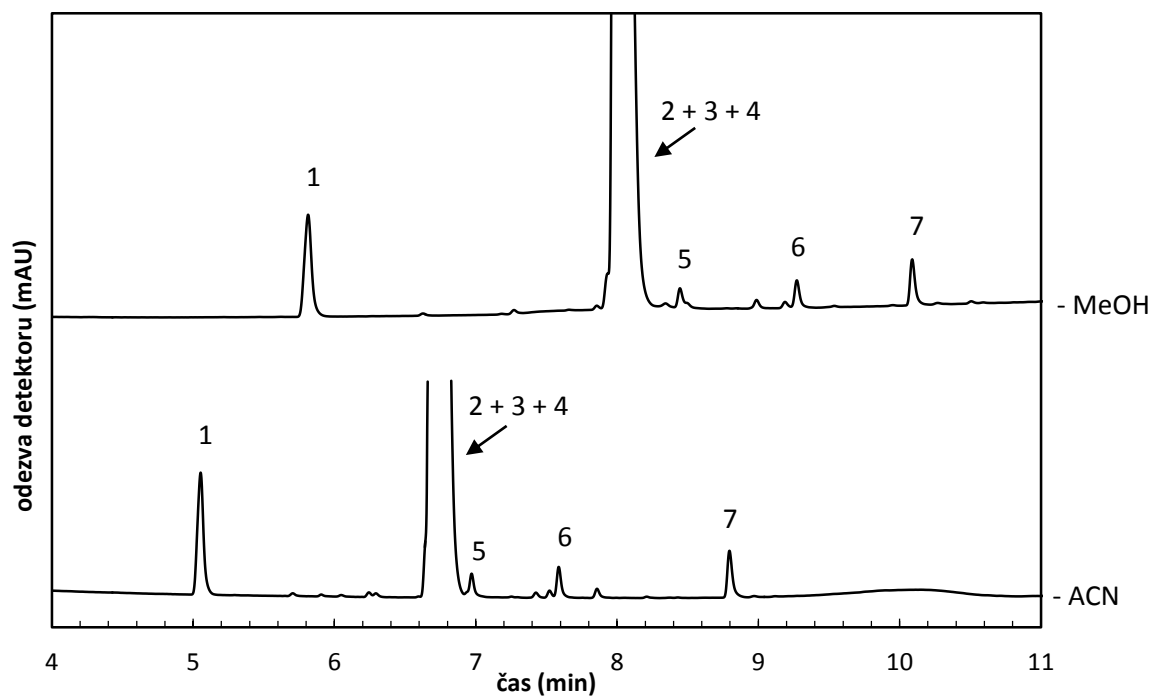
Příloha B: Porovnání chromatogramů separace na koloně Poroshell 120 EC-C18 za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

Kinetex C18



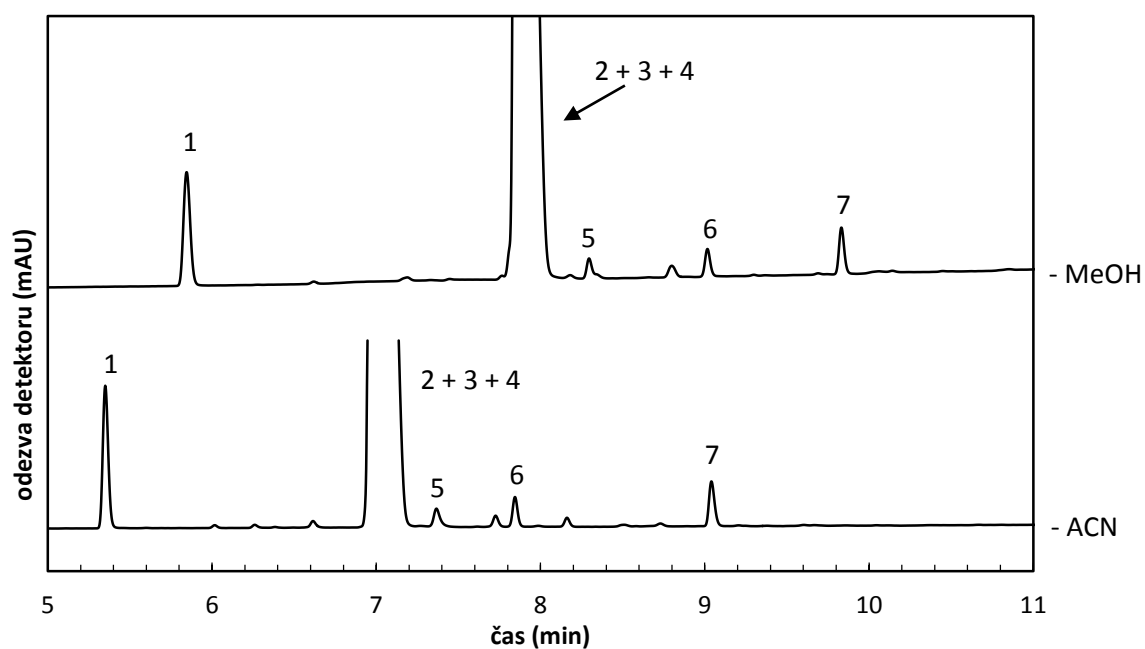
Příloha C: Porovnání chromatogramů separace na koloně Kinetex C18 za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

Cortecs C18+



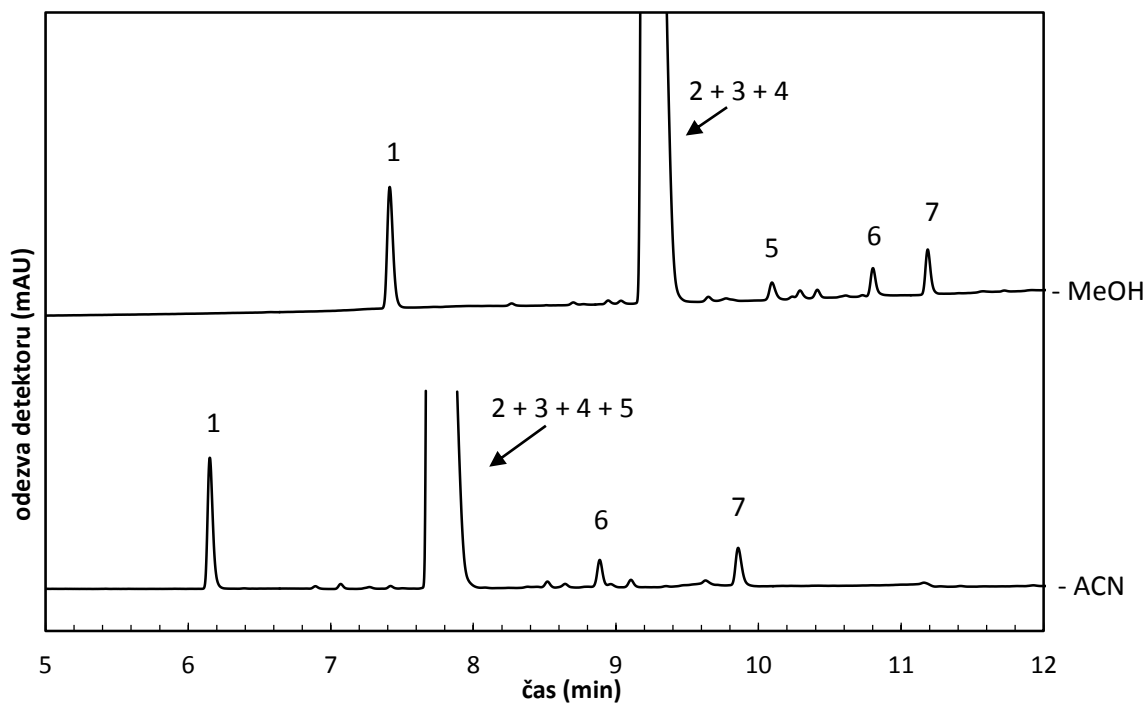
Příloha D: Porovnání chromatogramů separace na koloně Cortecs C18+ za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

Kinetex C8



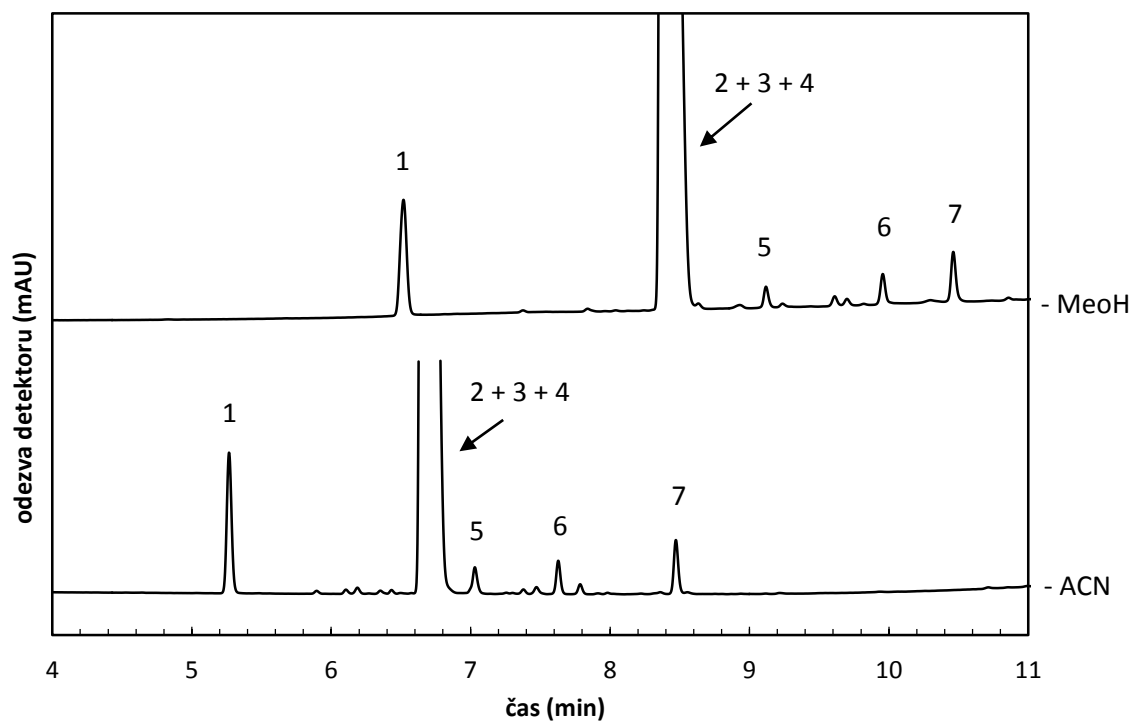
Příloha E: Porovnání chromatogramů separace na koloně Kinetex C8 za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

Poroshell 120 Phenyl Hexyl



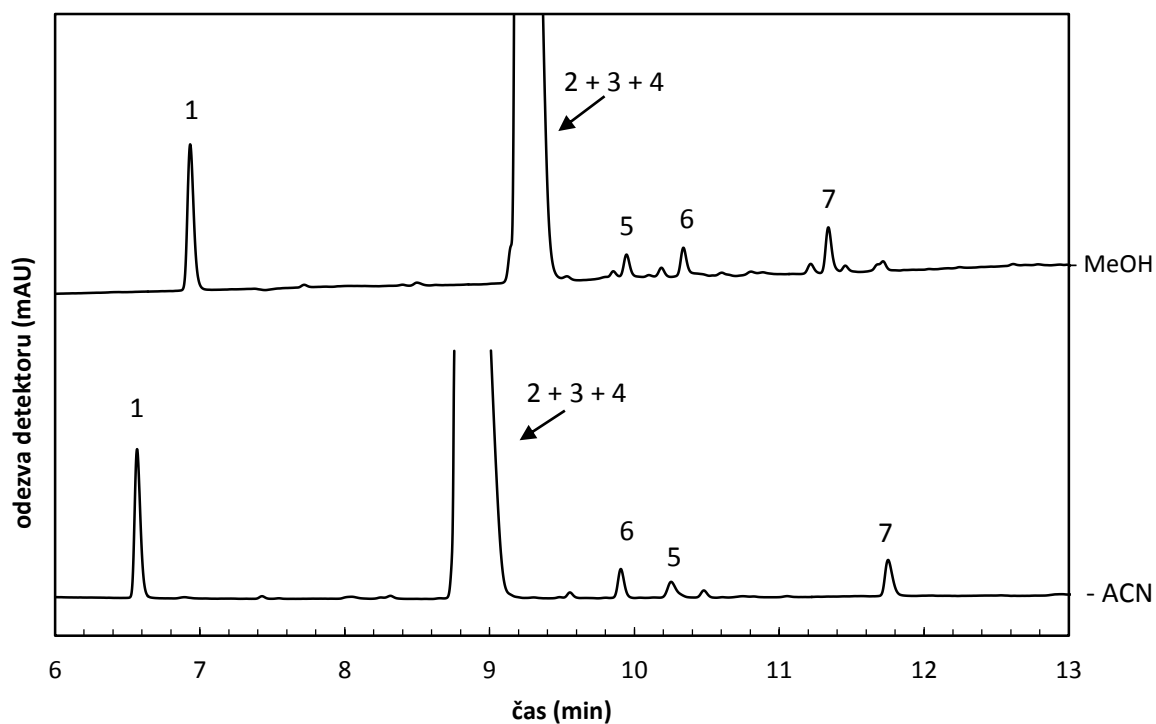
Příloha F: Porovnání chromatogramů separace na koloně Poroshell 120 Phenyl Hexyl za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

Kinetex Phenyl Hexyl



Příloha G: Porovnání chromatogramů separace na koloně Kinetex Phenyl Hexyl za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodín (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.

XBridge BEH C8



Příloha H: Porovnání chromatogramů separace na koloně XBridge BEH C8 za použití MeOH a ACN jako organický modifikátor MF. Diol (1), double bond (2), toluoyl hydroxy (3), fesoterodin (4), dimer (5), benzyloxy (6), diacilated (7). $F_m = 0,8$ ml/min, $T_k = 35$ °C, detekce při $\lambda = 220$ nm.