

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**Optimalizace metabolického postupu
pro porovnání profilů nečistot tablet
levothyroxinu s využitím UHPLC-HRMS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Bc. Anna Hrušková

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Anna Hrušková

Školitel: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Optimalizace metabolomického postupu pro porovnání profilů nečistot tablet levothyroxinu s využitím UHPLC-HRMS

Cílem této diplomové práce bylo porovnání 3 designů měření profilů nečistot tablet levothyroxinu a zhodnocení nejvhodnějšího postupu pro metabolomiku. Analýzy byly provedeny pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií.

Levothyroxin je lék užívaný při snížené funkci štítné žlázy. V této práci bylo analyzováno 23 šarží tablet od 2 různých výrobců.

Prvním krokem byla optimalizace metody přípravy vzorku tablet a interního standardu a sestavení 3 designů měření pomocí dat z předběžného screeningu. Designy byly sestaveny jako cílené metabolomické analýzy. Poté byla provedena cílená analýza 4 známých nečistot v designu 1 a 2, která byla semikvantitativní (relativní obsah nečistoty k obsahu levothyroxinu). Byly také zhodnoceny rozdíly v obsahu nečistot mezi designy. Dalším krokem bylo porovnání jednotlivých designů z hlediska variability, která byla hodnocena na základě změny odezvy interního standardu mezi jednotlivými nástřiky. Posledním krokem bylo porovnání designů na základě analýzy hlavních komponent.

Ze získaných dat byl design 3 vyhodnocen jako nejvhodnější pro profilování nečistot. Design 3 byl sestaven jako metabolomická analýza v jedné šarži.

Klíčová slova: levothyroxin; UHPLC-HRMS; nečistota; laktóza; mannitol; profilování nečistot; cílená metabolomická analýza; optimalizace; ICH

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Anna Hrušková

Supervisor: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Optimization of metabolomic workflow for a comparison of impurity profiles of levothyroxin tablets using UHPLC-HRMS

The aim of this diploma thesis was to compare 3 designs of measuring the impurity profiles of levothyroxine tablets and to evaluate the most suitable procedure. Analyses were performed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry.

Levothyroxine drug products are used to supplement reduced thyroid function. In this work, 23 batches of tablets from 2 different manufacturers were analysed.

The optimization of the tablet sample and internal standard preparation method and the compilation of 3 measurement designs using data from the preliminary screening was the first step. The designs were compiled as targeted metabolomics analyses. Then, a targeted analysis of 4 known impurities in designs 1 and 2 was performed, which was semi-quantitative (relative content of impurity to levothyroxine content). Differences in impurity content between designs were also evaluated. The next step was to compare individual designs in terms of variability, which was evaluated according to the change in the response of the internal standard between individual injections. The last step was to compare the designs based on a principal component analysis.

Based on the obtained data, design 3 was evaluated as the most suitable for profiling impurities. Design 3 was compiled as a metabolomics analysis in one batch.

Key words: levothyroxine; UHPLC-HRMS; impurity; lactose; mannitol; impurity profiling; targeted metabolomics analysis; optimization; ICH

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

V Hradci Králové dne 3.9.2021

.....
Bc. Anna Hrušková

Poděkování:

Mé poděkování patří prof. PharmDr. Lucii Novákové, PhD. za příležitost pracovat na takto zajímavém tématu, za odborné vedení, její cenné rady a především za její nezměrnou trpělivost. Děkuji i kolektivu Katedry analytické chemie.

Obsah

Abstrakt.....	2
Abstract.....	3
Obsah	6
Seznam zkratek	8
1. Úvod.....	10
2. Cíl a zadání DP.....	11
3. Teoretická část.....	12
3.1 Kapalinová chromatografie	12
3.1.1 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	12
3.2 Hmotnostní spektrometrie	14
3.2.1 Ionizační techniky.....	15
3.2.2 Analyzátoři.....	15
3.2.3 Detektory.....	16
3.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie	16
3.2.5 Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie	17
3.3 Metabolomika	17
3.3.1 Cílená metabolomika	20
3.3.2 Necílená metabolomika	20
3.4 Léčivé přípravky.....	21
3.4.1 Pomocné látky	22
3.4.2 Testy stability	23
3.4.3 Nečistoty v účinné látce	24
3.4.4 Nečistoty v léčivém přípravku	25
3.5 Levothyroxin.....	27
3.5.1 Léčivé přípravky s levothyroxinem.....	27
3.5.2 Pomocné látky používané v tabletách s levothyroxinem	28
3.5.3 Nečistoty levothyroxinu dle Českého lékopisu	30
3.5.4 Stanovení nečistot levothyroxinu dle Českého lékopisu	34
3.5.5 Další nečistoty levothyroxinu	35
3.5.6 Stanovení obsahu levothyroxinu v léčivých přípravcích	42
3.5.7 Změna pomocné látky v léčivém přípravku	46
4. Experimentální část	48
4.1 Použité přístroje a pomůcky	48

4.2	Použité chemikálie	48
4.3	Pracovní postup.....	49
4.3.1	Příprava roztoku vnitřního standardu.....	49
4.3.2	Příprava mobilních fází.....	49
4.3.3	Příprava kalibrantů MS.....	49
4.3.4	Příprava vzorků tablet	50
4.3.5	Příprava kontrol kvality, blankového extrakt a blanku	50
4.4	Analyzované tablety levothyroxinu.....	51
4.5	UHPLC na reverzních fázích.....	53
4.6	Nastavení parametrů HRMS.....	54
4.7	Metoda pro vyhodnocení analýz	55
4.7.1	Cílená analýza nečistot.....	55
4.8	Designy měření.....	56
5.	Výsledky a diskuze	61
5.1	Optimalizace metabolomického postupu	61
5.1.1	Příprava vzorku.....	61
5.1.2	Příprava roztoku IS	62
5.1.3	Analyzované sloučeniny	62
5.2	Cílená analýza nečistot a jejich semikvantitativní zhodnocení.....	63
5.2.1	Tablety s laktózou	64
5.2.2	Tablety s mannitolem.....	68
5.2.3	Zhodnocení obsahu nečistot.....	75
5.3	Porovnání jednotlivých designů	81
5.3.1	Porovnání designů dle odezvy IS.....	82
5.3.2	Porovnání designů z hlediska PCA.....	86
6.	Závěr	91
7.	Použitá literatura	93

Seznam zkratk

ABE	průměrná bioekvivalence
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BE	bioekvivalence
DMSO	dimethylsulfoxid
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
ESI	elektrosprej
FA	kyselina mravenčí
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	vysokorozlišovací hmotností spektrometrie
IBE	individuální bioekvivalence
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva
IS	vnitřní standard
LC	kapalinová chromatografie
m/z	poměr hmoty a náboje
M_R	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance

N-P plot	test předpokladu normality
PCA	analýza hlavních komponent
ppm	parts per million
QC	kontrola kvality
qTOF	spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu
R	rozlišení hmotnostního spektrometru
RSD	relativní směrodatná odchylka
s	směrodatná odchylka
S/N	poměr signálu k šumu pozadí
T4	tetraiodtyronin, tyroxin
TDI	celkový denní příjem
TIC	celkový iontový chromatogram
t_R	retenční čas
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
\bar{x}	aritmetický průměr
XIC	extrahovaný iontový chromatogram

1. Úvod

Tyroxin je hormon štítné žlázy zodpovědný za mnoho fyziologických funkcí organismu. Při jeho nedostatku v prenatální fázi vývoje lidského organismu dochází k nedostatečnému vývoji nervové tkáně. Nedostatek tyroxinu u dospělého člověka se projeví nemocí zvané myxedém, při které jsou narušeny mozkové a metabolické funkce. Při snížené funkci štítné žlázy je tyroxin suplementován syntetickým levothyroxinem, který je s ním chemicky identický.

Léčivá látka je sodná sůl levothyroxinu, která je zpracována nejčastěji do tablet. Hlavními pomocnými látkami v tabletách levothyroxinu jsou mannitol a monohydrát laktózy. Stabilita levothyroxinu a případný vliv pomocných látek byly několikrát zkoumány. V roce 2017 proběhla ve Francii změna složení tablet užívaných více než dvěma miliony pacientů. Přestože mezi složeními proběhl test bioekvivalence, změna složení přinesla nárůst nahlášených nežádoucích účinků.

Léčivé přípravky se skládají z jedné či více účinných látek s látkami pomocnými. Pro léčivé přípravky jsou uplatňovány směrnice Mezinárodní rady pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva, mezi kterými je i směrnice na obsah nečistot v léčivém přípravku. Profilování nečistot obnáší jejich detekci, objasnění struktury a stanovení obsahu v léčivém přípravku. Analýza levothyroxinu a jeho nečistot se zpravidla provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích.

Metabolomika se zabývá sloučeninami o molekulové hmotnosti menší než 1500 Da a je uplatňován tzv. metabolomický postup. Základem je biologická otázka, podle které se vytváří celý experiment – příprava vzorků, analýza vzorků, zpracování dat, analýza dat a interpretace dat. Cílem experimentu je získání odpovědi na původní biologickou otázku. Metabolické profilování je metoda metabolomiky pro identifikaci a stanovení předem určené skupiny sloučenin. Mezi zlatý standard metabolomické analýzy patří spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Tato diplomová práce se zabývá třemi různými přístupy k analýzám tablet levothyroxinu pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a zpracováním dat získaných těmito analýzami.

2. Cíl a zadání DP

Cílem této diplomové práce je optimalizace metabolického postupu při měření profilů nečistot tablet s obsahem sodné soli levothyroxinu. Jako separační metoda byla zvolena ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní detekcí (UHPLC-HRMS). Dalším cílem studie je ověření dvou hypotéz zadavatele: zda dochází ke změně v profilech nečistot v průběhu skladování a zda se odlišují profily nečistot tablet spojených s nežádoucími účinky od profilů nečistot jiných tablet.

Pro práci bylo nutné provést rešerši literatury zabývající se levothyroxinem a jeho nečistotami, které jsou známy a byly zkoumány. Poté bylo třeba optimalizovat metodu přípravy vzorků, přípravu roztoku vnitřního standardu a vzorků pro kontrolu kvality. Metoda kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byla předem definována zadavatelem studie. Cílem analýzy je identifikovat předem známé nečistoty v tabletách levothyroxinu a stanovit jejich obsah mezi šaržemi tablet.

Následně byly připraveny tři designy měření. První design byl vypracován dle doporučení zadavatele jako individuální analýza. V této části experimentu bylo prováděno měření vzorků ihned po jejich přípravě. Vzorky byly měřeny v triplikátu, byl omezen počet vzorků na den a střídal se mód hmotnostního spektrometru ESI^- a ESI^+ . Design 2 byl vypracován modifikací prvního – vzorky z prvního designu byly změřeny znovu v kratším časovém rámci, opět v triplikátu, pouze v ESI^- . Design 2 byl sestaven pro potvrzení hypotézy zadavatele ohledně změn ve složení vlivem skladovacích podmínek. Design 3 byl sestaven jako analýza v jedné šarži – společná příprava vzorků a následná analýza, ve které byla měřena pouze jedna tableta z každé šarže. Designy se tak mezi sebou lišily v časovém uspořádání a ve způsobu přípravy vzorků.

Designy byly porovnávány s využitím cílené analýzy z pohledu obsahu nečistot, z pohledu variability interního standardu a z pohledu analýzy hlavních komponent.

3. Teoretická část

3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) se řadí mezi separační metody analytické chemie umožňující kvantitativní i kvalitativní hodnocení separovaných analytů. Separace probíhá na principu mnohonásobně se ustavující rovnováhy složek analyzované směsi mezi dvě vzájemně se nemísitelné fáze – stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Distribuce složek se definuje pomocí distribuční konstanty K_D , která je dána poměrem koncentrace složky ve stacionární fázi (c_s) a koncentrace složky v mobilní fázi (c_m). Separacích mechanismů je několik – adsorpční, rozdělovací, iontově výměnný a založený na molekulových sítích. V LC se jako stacionární fáze používá chromatografická kolona, která je naplněna částicemi tuhé látky či kapalinou na tuhém nosiči, a jako mobilní fáze kapalina – eluent, eluční tekutina [1–3].

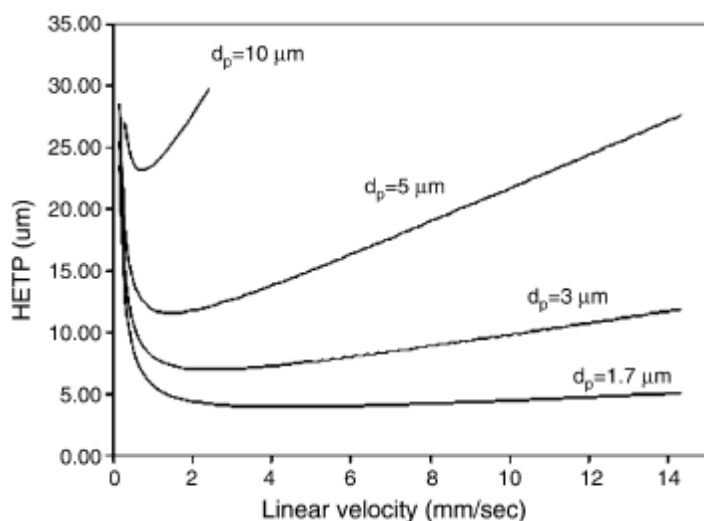
Modifikací klasické kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Při optimalizaci metody HPLC se musí brát ohled na vlastnosti analyzovaných látek ve směsi a jejich eluční parametry [1,2,4].

Biologické vzorky nebývají standardně kompatibilní s HPLC, a tak je třeba provést jejich přípravu. Ta zahrnuje izolaci, přečištění a eventuální zakoncentrování analytu ve vzorku. Matrice vzorku může nejen zanášet kolonu, ale i interferovat s analytem. Precipitace proteinů, extrakce na tuhou fázi či extrakce z kapaliny do kapaliny jsou nejčastější metody úpravy vzorku [5,6].

3.1.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC se stalo zlatým standardem v různých oborech laboratoří a byly vyvinuty snahy o rychlejší analýzu vzhledem k vysokému počtu vzorků. Snahy o rychlejší analýzu vedly ke zvýšení průtoku mobilní fáze a zkrácení délky kolony. Tento postup ovšem vedl zároveň ke ztrátě účinnosti, která souvisí s délkou kolony. Průlomem byl vývoj stacionárních fází o částicích menších než $2\ \mu\text{m}$ a ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) [2,4,5,7].

Zvýšení separační účinnosti pomocí zmenšení částic stacionární fáze vychází z teorií van Deemtera, Giddingse a Knoxe. Účinnost separace je vyjádřena výškovým ekvivalentem teoretického patra (HETP) a je úměrná druhé mocnině velikosti částic. Obrázek 1 znázorňuje závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární průtokové rychlosti udávané v milimetrech za sekundu. Čím nižší je hodnota HETP, tím vyšší je účinnost separace. Na grafu jsou znázorněny Van Deemterovy křivky pro částice o velikostech 1,7 - 10 μm . Je zřejmé, že částice o velikosti 1,7 μm vykazují vyšší účinnost separace (nižší hodnotu HETP) oproti větším částicím a vykazují pouze minimální rozdíly v širším rozmezí lineárních průtokových rychlostí díky nízkému odporu proti převodu hmoty [4,8].



Obrázek 1 - Van Deemterovy křivky částic o velikostech 1,7; 3; 5 a 10 μm v grafu závislosti HETP na lineární průtokové rychlosti MF [8].

Velikost částic není jediný parametr odlišující HPLC a UHPLC. V případě UHPLC došlo k minimalizaci mimokolonových objemů systému a celkového objemu systému. Mimokolonové objemy (objem čerpadla, dávkovače, detektoru a spojů v systému) jsou v UHPLC zhruba desetkrát menší než v HPLC. Se zmenšením mimokolonových objemů dojde i k zmenšení zpoždění gradientu, který je dán objemem mezi směšovačem mobilních fází a kolonou a je zodpovědný za izokratický krok v začátku gradientové eluce. Dalším parametrem je tlak v systému. Zatímco HPLC pracuje s tlakem pouze do 40 MPa, UHPLC pracuje s tlakem 100 MPa a vyšší (až 140 MPa). Pro tento účel je nutné použití robustních čerpadel schopných pracovat za vysokých tlaků, které zajišťují přesný průtok mobilní fáze. Nevýhodou vysokých tlaků je nárok na kolonu, která musí

být dostatečně odolná a stabilní. Dávkovač vzorků musí pracovat v rychlých cyklech s minimálním přenosem vzorku do další analýzy. Vzhledem k rychlosti analýzy je nutný i rychlý sběr dat detektorem pro dostatečný počet bodů píku na chromatogramu. Rychlost by tak měla být vyšší než 20 bodů/s. Pro rozvoj této metody musela být tedy optimalizována celá instrumentace. UHPLC je rychlá a efektivní separační metody a její rozdíly oproti HPLC jsou shrnuty v tabulce 1 [2,4,5,7–9].

Tabulka 1 – Základní rozdíly mezi HPLC a UHPLC.

Parametr	HPLC	UHPLC
Velikost částic SF	3 - 5 μm	< 2 μm
Max. zpětný tlak	35 - 40 MPa	> 100 MPa
Mimokolonový objem	70 - 200 μL	6 - 30 μL
Zpoždění gradientu	0,5 - 5 mL	0,3 - 0,4 mL
Nároky na detektor	nižší	vyšší

Studie z roku 2006 [10] porovnávala výsledky z HPLC a UHPLC analýzy metabolitů lidské plasmy a v případě UHPLC bylo nalezeno o 20 % více sloučenin. Také došli k závěru, že UHPLC vykazuje lepší reprodukovatelnost a S/N (poměr signálu k šumu pozadí, signal to noise ratio). Další studie z roku 2006 [8] porovnávala analýzy HPLC a UHPLC čtyř léčivých přípravků a jejich složek. UHPLC vykazovala vyšší rychlost, citlivost a rozlišení než HPLC.

3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je metoda založená na separaci látek na základě jejich poměru hmoty a náboje m/z a jejich následné detekci. Podmínkou analýzy je ionizace analytu v iontovém zdroji [2].

V hmotnostní spektrometrii se pracuje s monoizotopickou hmotností sloučenin (exact mass). Relativní molekulová hmotnost je dána součtem atomových hmotností všech prvků obsažených v molekule. Atomové hmotnosti pro výpočet relativní molekulové hmotnosti jsou průměrem všech vyskytujících se izotopů daného prvku. V případě monoizotopické hmotnosti se počítá s nejzastoupenějším izotopem každého jednotlivého prvku. V případě molekul s vysokým počtem izotopů se může molekulová a monoizotopická hmotnost lišit o jednotky Da. Tyto rozdíly jsou důležité u analyzátorů s vysokým rozlišením a správností a přesností hmoty [11].

3.2.1 Ionizační techniky

Ionizační techniky se dělí na měkké a tvrdé, podle energie a iontů, které se tvoří. Mezi měkké techniky se řadí ionizační techniky ionizace za atmosférického tlaku. Elektrosprej (ESI) je vhodný pro střední až velké molekuly (biopolymery) polárního charakteru. K ionizaci, tedy převedení analytu do stavu nabitého aerosolu, dochází pomocí napětí vloženého na sprejovací kapiláru. Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) využívá lampu vyzařující fotony jako zdroj energie. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) obsahuje koronovou jehlu, která svým výbojem ionizuje vznikající páry mobilní fáze a analytu. Při použití ionizačních technik za atmosférického tlaku vznikají protonované či deprotonované molekuly. Mezi tvrdé ionizační techniky patří elektronová ionizace, při které dochází vlivem interakce mezi analytem a proudem elektronů k vytržení elektronu z molekuly analytu. Elektronová ionizace pracuje za vakua a řadí se mezi tvrdé, protože dochází k velké fragmentaci iontů. V současnosti je to standardní metoda ve spojení s plynovou chromatografií a její výhodou je knihovna spekter, která je přenositelná mezi laboratořemi [2,12–16].

Vzniklé ionty jsou z ionizační techniky směřovány do analyzátoru.

3.2.2 Analyzátory

Zatímco ionizační techniky mohou pracovat za atmosférického tlaku nebo s použitím vakua, analyzátor a dále i detektor pracují výhradně za vysokého vakua. Důvodem je zamezení vlivu atmosférického tlaku na ionty [17].

V analyzátoru dochází k rozdělení iontů na základě poměru m/z . Využívá se několik principů. Zakřivení dráhy v magnetickém nebo elektrickém poli (či jejich kombinaci) využívá magnetický sektor. Dalším principem je rozdílná stabilita oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí, kam se řadí kvadrupól, lineární iontová past a sférická iontová past. Různou absorpci energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném a elektrickém poli využívá iontová cyklotronová rezonance. Různá frekvence harmonických oscilací je využívána v orbitální pasti. Různá doba letu v oblasti bez pole je typická pro analyzátor doby letu [2].

Při volbě analyzátoru je třeba dbát na charakteristické parametry jednotlivých analyzátorů [2,11,17]:

- Rozlišení: udává schopnost analyzátoru rozlišit ionty na základě poměru m/z .
- Hmotnostní rozsah: rozsah hodnot m/z , které je analyzátor schopen změřit.
- Správnost hmoty: udává rozdíl mezi teoretickou m/z a naměřenou m/z . Hodnota je udávána v ppm (parts per million).
- Účinnost: poměr iontů došlých k detektoru a iontů vstupujících do analyzátoru, tedy iontová ztráta v různých částech analyzátoru.
- Rychlost sběru dat.
- Citlivost.

3.2.3 Detektory

Detektory slouží k zaznamenání iontů po jejich separaci na základě hodnoty m/z v hmotnostním analyzátoru. Mezi klasické detektory řadíme Faradayovu klec a elektronové násobiče. Speciální skupinu tvoří analyzátor orbitální past a iontová cyklotronová rezonance, které při separaci zároveň zaznamenávají proudový obraz, který je následně interpretován pomocí Fourierovy transformace [11,18].

3.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Nedostatek strukturálních informací z jednoduché hmotnostní spektrometrie vedl k vývoji tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Jako MS/MS se označuje spojení dvou hmotnostních analyzátorů v čase či prostoru. Principem je analýza vybraného iontu, označovaného jako prekurzorový iont, jeho cílená fragmentace a poté analýza produktových iontů vzniklých z iontu prekurzorového. Některé instrumentace dovolují zvýšit počet fragmentačních kroků, nejde tedy jen o MS^2 , ale o MS^3 až MS^n [2,11,17].

MS/MS v čase je možné při použití analyzátorů iontových pastí, orbitální pasti a iontové cyklotronové rezonance. S těmito přístroji je možná fragmentace se 7-8 kroky. Spojením dvou analyzátorů se provádí analýzy MS/MS v prostoru. Nejčastějším

nástrojem této analýzy je spojení tří kvadrupólů, kdy prostřední z nich funguje jako kolizní cela. Spojení kvadrupólu s analyzátozem doby letu (qTOF) se označuje jako hybridní analyzátor [11].

3.2.5 Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie

Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS) se vyznačuje vysokým rozlišením (R) a správností hmoty. Kvalitativní HRMS analýza slouží k potvrzení známé sloučeniny ve vzorku či identifikaci neznámých. Kvantitativní užití tkví v identifikaci cílové sloučeniny a její rozlišení od matrice vzorku, která může narušovat její kvantifikaci. Analyzátoři schopné měřit ve vysokém rozlišení jsou iontová cyklotronová rezonance ($R = 1000 \times 10^3$), analyzátoř doby letu ($R = 50 \times 10^3$) a orbitální past ($R = 150 \times 10^3$). Pro správné určení malých molekul pomocí HRMS stačí správnost hmoty 1-3 ppm, avšak analyzátoři jsou schopny provádět analýzy se správností hmoty menší než 1 ppm. Pro správnou analýzu je nutné přístroje kalibrovat [11,17,19–21].

3.3 Metabolomika

Metabolomika patří spolu s genomikou, transkriptomikou a proteomikou do tzv. omické kaskády (obrázek 2). Tyto vědy společně popisují komplexní odpověď organismu na změny, jako jsou genetické choroby, nemoci či změny prostředí. Jak z kaskády vyplývá, metabolomika se ukázala být vhodným nástrojem sledování změny genotypu a jejího vlivu na fenotyp. Metabolom je typicky označován jako soubor molekul produkovaný buňkou, vzorky pro metabolomiku mohou tedy pocházet z tělních tekutin, buněk či tkání. Kromě sledování buněčného metabolismu má metabolomika své uplatnění i v dalších oborech, např. potravinářství, farmaceutickém výzkumu, mikrobiologii, toxikologii a další [22–27].



Obrázek 2 -Schéma omické kaskády. Převzato a upraveno ze zdroje [22].

Metabolomika se zabývá sloučeninami o malé molekulové hmotnosti (méně než 1500 Da), které se vyskytují v biologickém systému jako substráty nebo jako

produkty chemických reakcí. Rozvoj metabolomiky znamenal i pokrok v objevování diagnostických či prognostických markerů a v odhalování mechanismů onemocnění. Samotná analýza látek je tedy pouze první krok od biologické otázky k interpretaci získaných dat, jak znázorňuje obrázek 3. Data se musí připravit (kvantifikace, chemometrické metody), poté se musí data zpracovat a až dle výsledků se získaná data interpretují [24,28–31].



Obrázek 3 - Schéma metabolického postupu od biologické otázky k interpretaci dat. Převzato a upraveno ze zdroje [31].

Plánování metabolického postupu je naprosto zásadní v metabolickém experimentu. Počet vzorků musí být volen tak, aby prokázal statisticky významné rozdíly. Je vhodné provádět experimenty tzv. v jedné šarži – tedy všechny vzorky najednou, což zjednoduší analýzu získaných dat. Pokud je experiment prováděn ve více šaržích (např. epidemiologické studie), je náročnější data analyzovat a interpretovat mezi šaržemi měření, především kvůli recalibracím přístroje mezi analýzami. Prevence jakýchkoliv systematických chyb zahrnuje nejen kontrolu nad odběrem vzorku a jeho skladováním, ale např. i na dietu původního organismu, obalové materiály vzorku aj. Veškeré informace o průběhu metabolického experimentu by měly být zaznamenány (metadata) a měl by být na ně brán ohled v analýze a interpretaci dat [32,33].

Příprava vzorku je v metabolomice velice důležitá, protože je snaha o zachování metabolitů v původním stavu, v jakém se ve vzorku vyskytovaly, a je třeba brát ohled na povahu hledaných metabolitů. Jakékoliv chyby v přípravě ovlivní obsah metabolitů, kvalitu dat a tím i vyhodnocení dat. Mezi klasické metody přípravy vzorku se řadí precipitace proteinů, extrakce na tuhou fázi a extrakce kapalina-kapalina [22,28,34].

Při analýze vzorků je nejčastějším způsobem detekce hmotnostní spektrometrie vzhledem ke své citlivosti. Pro MS detekci je vhodné vzorky před detekcí separovat – kapalinovou nebo plynovou chromatografií, eventuálně kapilární elektroforézou. Další

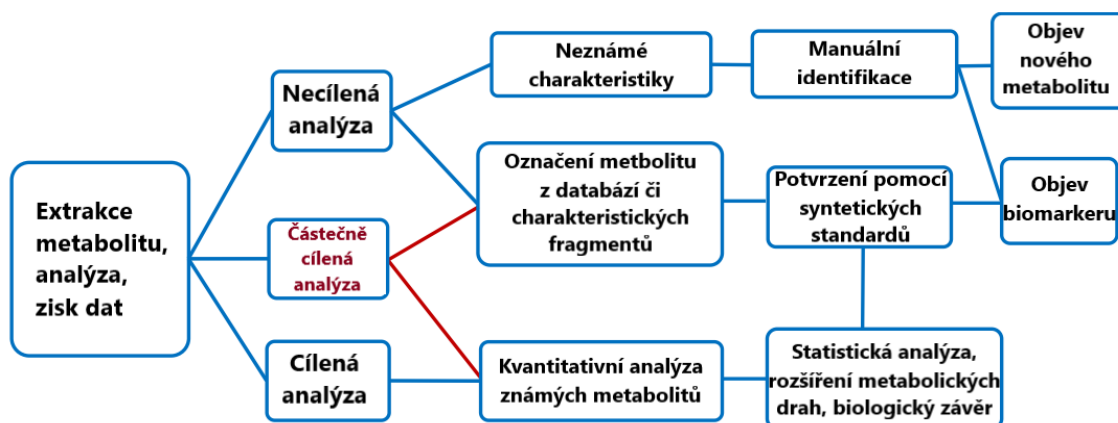
možnou detekční technikou je spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR), která analyzuje bez předchozí separace [24,30].

Zpracování dat zahrnuje analýzu a úpravu primárních dat získaných analýzou vzorku. Jedná se především o odstranění šumu pozadí a práce s chromatografickými píky (spektry) – detekce, označení a identifikace. U LC-MS probíhá identifikace metabolitů primárně na základě hodnoty m/z a retenčního času. Při zpracování dat je vhodné použít normalizaci pomocí interních standardů [22,24,28,35].

Dle zvoleného metabolomického postupu se volí i analýza dat. Analýza dat zahrnuje práci s metabolomickými daty dle zvoleného cíle. Nejčastěji se jedná o vyhledávání charakteristik či vzorů v získaných datech. Ke zpracování metabolomických dat byly vyvinuty softwary jako např. MZmine [36,37], MathDAMP [38], MetAlign [39], aj.

Interpretace získaných dat slouží k identifikaci analytů, jejich vyhledání v příslušné databázi, v případě metabolitů analýza funkce a role v metabolické dráze. V interpretaci dat je snaha získat odpověď na původní biologickou otázku, k čemuž mohou být potřeba i další omické vědy [31].

Množství hledaných analytů a jejich chemické složení je základní parametr při tvorbě metabolomického experimentu. Nejen kvůli přípravě vzorku a volbě instrumentace, ale i ve zvoleném přístupu metabolomického experimentu – cílený a necílený přístup. Přístupy mezi sebou souvisí, jak naznačuje obrázek 4. [23].



Obrázek 4 - Souvislosti mezi metabolomickými schémata v různých přístupech. Převzato a upraveno ze zdroje [28].

V metabolomice se používá několik pojmů, které souvisí s metabolomickým schématem [22,40]:

- Metabolické profilování: identifikace a kvantitativní analýza předem určené skupiny metabolitů vybrané metabolické dráhy, nebo obecně specifické skupiny sloučenin.
- Metabolický otisk prstu: rychlá a kompletní analýza vzorků k jejich kvalifikaci na základě vyskytujících se vzorů (otisků). Identifikace a kvantifikace se neprovádí.
- Metabolický otisk nohy (stopa): stejný přístup jako otisk prstu, avšak pro extracelulární metabolity v médiu buněčné kultury.

3.3.1 Cílená metabolomika

Cílený metabolomický přístup analyzuje analyty ve vzorku o známe chemické struktuře a vlastnostech. Jejím cílem je kvantitativní nebo semikvantitativní stanovení analytů pomocí vnitřního standardu. Tento přístup je vhodný například pro farmakokinetické studie včetně personalizované medicíny, ale i diagnostiku metabolických poruch [22,41–45].

Při hledání důležitých metabolitů předchází cílené analýze analýza necílená, z jejíž dat jsou vybrány metabolity a pro jejich cílenou analýzu je optimalizován metabolomický postup. Metabolomický postup cílené analýzy a její statistické zpracování musí být validovány [35].

3.3.2 Necílená metabolomika

Necílený metabolomický přístup měří všechny analyty ve vzorku, včetně těch neznámých. Výstupem z tohoto přístupu je obrovské množství dat (v řádech gigabytů), která poskytují komplexní informaci o vzorku. Zpracování dat slouží nejen k detekci a charakterizaci neznámých látek, ale i k zjištění spojitosti obsahu těchto látek mezi vzorky. Analyty jsou v případě použití hmotnostní spektrometrie definovány hodnotou m/z , intenzitou a retenčním časem. Necílená analýza klade vysoké nároky na přístrojové vybavení, proto je HRMS velmi vhodný nástroj [22,23,29,41,42].

V případě necílené metabolomiky je ovšem náročné analyzovat všechny analyty ve vzorku při jedné analýze, protože mezi skupinami analytů mohou být výrazné rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech. Optimalizace a volba metabolomického postupu proto není tak specifická jako v případě cílené metabolomiky [24].

Vzhledem k velikosti získaných dat je jejich zpracování velice náročné. Je možno využít metody jednorozměrné nebo vícerozměrné analýzy. Metody jednorozměrné analýzy, jako například T-test či U-test, jsou metody poskytující jednoduchý výsledek, avšak vzhledem k množství proměnných je riziko falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Metody vícerozměrné analýzy jsou schopny extrahovat hledané metabolity od zbytků dat. Analýza hlavních komponent (PCA) je statistická metoda pro zpracování vícerozměrných dat. Cílem metody je získat z dat potřebné informace transformací hodnot do tzv. hlavních komponent, čímž se sníží počet proměnných bez ztráty informační hodnoty a v grafickém zobrazení se podobné vzorky shlukují do skupin [24,35,46,47].

3.4 Léčivé přípravky

Léčivé přípravky jsou směsi jedné či více účinných látek s látkami pomocnými, které jsou zpracovány do konkrétní podoby – lékové formy. Léčivé přípravky jsou vyráběny a pacientům podávány za účelem příznivého ovlivnění zdravotního stavu. Léčivé přípravky mohou být vyráběny hromadně v šaržích, které definují jednotlivé výrobní cykly, nebo individuálně v lékárnách [48,49].

Lékové formy se dělí dle způsobu užití – ušní přípravky, oční přípravky, inhalační přípravky, orální přípravky aj a dle tvaru a konzistence – tablety, tobolky, roztoky, krémy, masti, suspenze aj [50].

Jednou z orálních lékových forem jsou tablety. Český lékopis [50] definuje tablety následovně:

„Jsou to pevné přípravky obsahující jednu dávku jedné nebo více léčivých látek v jedné tabletě. Získávají se slisováním stejných objemů částic nebo jiným vhodným výrobním postupem, jako je vytlačování (extruze), formování nebo lyofilizace. Jsou určeny k perorálnímu podání. Některé tablety se polykají celé, některé po rozžvýkání,

některé se před podáním rozpouštějí nebo dispergují ve vodě a některé se ponechají v ústech, kde se z nich uvolňuje léčivá látka.

Částice jsou tvořeny jednou nebo více léčivými látkami s pomocnými látkami nebo bez nich. Pomocnými látkami jsou plniva, pojiva, zvlhčovačla, rozvolňovačla, látky ovlivňující tokové vlastnosti, kluzké látky, látky modifikující chování přípravku v trávicím traktu, barviva schválená oprávněnou autoritou a chuťové a aromatické přísady.

Tablety jsou obvykle válcovitého tvaru, ploché nebo čokkovité, hrany musí být zkosené. Mohou mít rýhy k usnadnění jejich rozdělení a mohou být označeny nápisem nebo značkami. Tablety mohou být obalené.“

3.4.1 Pomocné látky

Lékové formy obsahují kromě účinné látky i látky pomocné, které pomáhají utvářet lékovou formu vhodnou pro užití pacientem (konstitutivní pomocné látky, tabulka 2) a zároveň mohou účinnou látku stabilizovat. Při výběru pomocných látek se musí brát zřetel na jejich interakci s látkou účinnou a na interakce pomocných látek mezi sebou, a zároveň na jejich čistotu a složení. Výběr pomocných látek je zásadním krokem při vývoji léčivého přípravku. Pomocné látky nesmí účinnou látku ovlivňovat fyzikálně ani chemicky, protože tím by mohly narušit její chemickou strukturu, stabilitu, biologickou dostupnost a efekt léčby. Inkompatibilita může způsobit fyzikální či chemickou nestabilitu lékové formy [51–55].

Tabulka 2 - Přehled konstitutivních pomocných látek [56].

Léková forma	Funkce	Příklady pomocných látek
tablety, granula	plniva	laktóza, mikrokrystalivká celulóza, sacharosa
	pojiva	škrob, želatina, methylcelulóza
	rozvolňovačla	škrob, mikrokrystalická celulóza, galaktomanany
	filmotvorné látky	povidon, ethyl-celulóza
	kluzké látky	stearan hořečnatý, mastek
roztoky	rozpouštědla hydrofilní	voda, ethanol, propylenglykol
	rozpouštědla oleofilní	oleje, isopropyl-myristát, isopropyl-palmitát
aerodisperze	plynné složky	galogenované parafíny
topické polotuhé léky	základ	uhlovodíky, vyšší alifatické alkoholy, triacylglyceroly, silikony
čípky a vaginální kuličky	základ	makrogoly, glyceroželatinový základ

Reaktivní nečistoty vzniklé z pomocných látek mohou být původem z jejich výroby či vzniklé degradací pomocné látky. Mezi takové nečistoty, které mohou ovlivňovat účinné látky a způsobit degradaci léčivého přípravku, patří redukující cukry, aldehydy, hydrogenperoxydy, organické kyseliny a jejich estery, nitráty, těžké kovy a volné radikály [54].

Kompatibilitu účinné látky a látek pomocných lze předpovídat na základě dostupných databází či testovat pomocí testů kompatibility. Testy kompatibility jsou založeny na tvorbě směsi účinné a pomocné látky, která se skladuje za stresových podmínek a poté se testuje vhodným způsobem. Další možností je provést tzv. stresovou zkoušku. Ta se provádí např. za zvýšené teploty a může vést k degradaci účinné látky a interakci mezi ní a pomocnou látkou. Další možností je směs rovnou testovat pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie. V ideálním případě se tyto dvě metody kombinují [51].

Kompatibilitu účinné a testované pomocné látky mohou ovlivňovat i další pomocné látky, které se použijí při výrobě konečné lékové formy. Z tohoto důvodu se provádí dlouhodobé stabilitní studie. Nejčastější reakce vedoucí k nestabilitě účinných látek o malé molekulové hmotnosti jsou hydrolýza, oxidace a Maillardova reakce. Inkompatibilita může být způsobena základními vlastnostmi těchto látek nebo schopností pomocné látky vázat vodu v průběhu výroby, balení či skladování, čímž urychluje degradaci účinné látky. Mezi takové pomocné látky patří např. škrob [51,53,54,57].

Stabilita léčivých přípravků závisí i na použité lékové formě a jejích charakteristikách – výrobní proces, balení, skladování a obsah všech pomocných látek [58].

3.4.2 Testy stability

Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (ICH) vydala v roce 2003 revidovanou směrnici ohledně testování stability nových sloučenin a přípravků Q1A(R2) [57]. Směrnice ukládá podmínky k registraci léčivé látky či léčivého přípravku v Evropě, Japonsku a USA.

Účelem testů stability léčivé látky je hodnocení změny její kvality a identifikace možných degradačních produktů vzniklých vlivem faktorů jako jsou změny teploty, vlhkost a působení světla. Z testů se také stanovuje časová frekvence opakování testů, expirace a doporučené skladovací podmínky. Testy stability se provádí na 3 pilotních šaržích účinné látky a zahrnují stresové testy, testování frekvence, testy skladovacích podmínek a jiné specifické testy včetně fyzikálních, chemických, biologických a mikrobiálních [57].

Testy stability lékové formy se provádí také ze 3 pilotních šarží. Provádí se testy fotostability, testy skladovacího systému, testování frekvence, testy skladovacích podmínek a specifické testy, které sledují možné změny v lékové formě za různých skladovacích podmínek a jejich vlivu na fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, mikrobiální stabilitu, testy stabilizačních látek a funkční testy. Pokud se výsledky mezi šaržemi neliší, lze léčivý přípravek za definovaných podmínek skladovat [57].

3.4.3 Nečistoty v účinné látce

Pro registraci účinné látky byla vydána směrnice ICH zaměřující se na nečistoty v účinných látkách Q3A(R2) [59]. Nečistoty se v této směrnici rozdělují na 3 skupiny: organické nečistoty, anorganické nečistoty a reziduální látky ze syntézy (kterých se týká směrnice Q3C).

Nečistotami jsou označovány jakékoliv součásti účinné látky, které nejsou definovány. Metody pro detekci a stanovení nečistot musí být validovány dle směrnice Q2(R1). Stanovení nečistot se provádí ve dvou možnostech – k validovanému standardu dané nečistoty nebo k účinné látce, a jejich obsah se uvádí k jednotlivým nečistotám a souhrnně ke všem přítomným. Limity obsahu těchto látek jsou shrnuty dle denního dávkování účinné látky v tabulce 3 [59,60].

Tabulka 3 - Limitní hodnoty nečistot účinné látky dle dávkování. Převzato a upraveno ze zdroje [59].

Max. denní dávka	Limit pro report	Limit pro identifikaci	Limit pro kvalifikaci
≤ 2 g	0,05 %	0,10 % nebo 1 mg/den	0,15 % nebo 1 mg/den
> 2 g	0,03 %	0,05 %	0,05 %

Při překročení limitu nahlášení musí být nečistota uvedena v registračním formuláři, při překročení limitu identifikace musí být nečistota identifikována a při překročení limitu kvalifikace by měla být kvalifikována, tzn. by měla být určena její biologická bezpečnost. Kvalifikace se provádí na základě dostupné literatury či určení bezpečnosti. Bezpečnost musí být testována v testech bezpečnosti a v klinických studiích a musí být určena k jednotlivým nečistotám i k jejím hodnotám. Limit pro kvalifikaci může být zvýšen či snížen na základě přechozích klinických zkušeností, jako například historie spojení dané nečistoty s nežádoucími účinky [59].

Nečistoty musí být uvedeny u jednotlivých šarží účinných látek. Pokud se hodnoty mezi šaržemi liší, je pravděpodobné, že výrobní podmínky mezi šaržemi nejsou ustálené [59].

3.4.4 Nečistoty v léčivém přípravku

Nečistoty v léčivém přípravku mohou vznikat reakcí mezi účinnou a pomocnou látkou, tvorbou degradační produktů účinné látky nebo mohly být do léčivého přípravku uvolněny látky z obalového materiálu. Pro tyto nečistoty platí směrnice ICH Q3B(R2) [61].

Stanovený limit pro nečistoty se vyjadřuje jako procentuální podíl k účinné látce nebo celkový denní příjem degradačního produktu (TDI). Používá se limit, který je nižší. Limity jsou shrnuty dle denního dávkování v tabulce 4.

Tabulka 4 – Limitní hodnoty pro degradační produkty dle dávkování. Převzato a upraveno ze zdroje [61].

	Max. denní dávka	Limit
Limit pro report	≤1 g	0,10%
	>1 g	0,05%
Limit pro identifikaci	<1 mg	1,0 % nebo 5 µg TDI
	1 – 10 mg	0,5 % nebo 20 µg TDI
	>10 mg – 2 g	0,2 % nebo 2 mg TDI
	≥2 g	0,10%
Limit pro kvalifikaci	<10 mg	1,0 % nebo 50 µg TDI
	10 – 100 mg	0,5 % nebo 200 µg TDI
	>100 mg – 2 g	0,2 % nebo 3 mg TDI
	≥2 g	0,15%

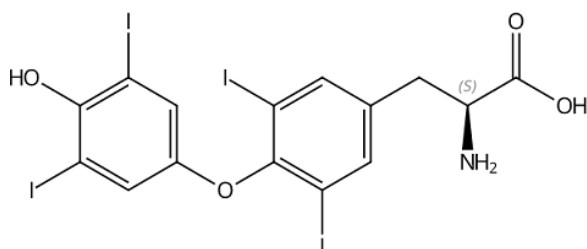
Stejně jako u směrnice Q3A, při překročení limitu nahlášení musí být nečistota uvedena v registračním formuláři léčivého přípravku, při překročení limitu identifikace musí být nečistota identifikována a při překročení limitu kvalifikace by nečistota měla být kvalifikována na základě své biologické bezpečnosti.

Mezi metody používané pro identifikaci a stanovení nečistot léčivých přípravků se používají analytické metody HPLC, tenkovrstvá chromatografie, elektroforetické metody a plynová chromatografie. Jako detekční techniky se používá UV detekce, NMR a MS [62].

Profilování nečistot obnáší jejich detekci, objasnění struktury a stanovení obsahu v léčivém přípravku či v prášku účinné látky [63].

3.5 Levothyroxin

Levothyroxin (obrázek 5) je chemickým názvem O-(4-hydroxy-3,5-dijodfenyl)-3,5-dijod-L-tyrosin [64,65].



Sumární vzorec: $C_{15}H_{11}I_4NO_4$

Molekulová hmotnost (M_r): 776,870 Da

Monoizotopická hmotnost: 776,6866 Da

Obrázek 5 - Struktura levothyroxinu [65].

Tyroxin, ve fyziologii lidského těla zvaný tetrajodtyronin (T₄), je hormon štítné žlázy. Při nedostatku hormonů štítné žlázy v prenatálním či raném postnatálním období dochází ke stavu zvanému kretenismus – narušený vývoj mozku, omezení růstu a diferenciaci buněk organismu. Postihne-li nedostatek hormonu dospělého člověka, dochází k rozvoji myxedému, který je charakteristický vzhledem postiženého a postižením mozkových i metabolických funkcí organismu. Syntetický levothyroxin, který je chemicky identický s tyroxinem produkovaným štítnou žlázou, se užívá k léčbě stavů spojených se sníženou funkcí štítné žlázy, mezi které patří hypotyreóza, pooperační stavy u nádorů štítné žlázy, aj [66–69].

3.5.1 Léčivé přípravky s levothyroxinem

V Českém lékopise 2017 [50] je léčivá látka definována jako Levothyroxin sodná sůl hydrát (Levothyroxinum natricum hydricum), chemickým názvem hydrát natrium-(2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl]propanoátu. Molekulový vzorec sloučeniny je $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4 \cdot nH_2O$. Jedná se o bílý až světle žlutý prášek, který je velmi těžce rozpustný ve vodě a těžce rozpustný v 96% ethanolu.

Sloučenina má 3 ionizovatelné skupiny: karboxylová skupina, fenolická skupina a aminoskupina [70,71].

Po příjmu léčivého přípravku levothyroxinu do trávicího ústrojí je vstřebáno přibližně 62 - 82 %, a to v prvních 3 hodinách. Levothyroxin má nízký terapeutický

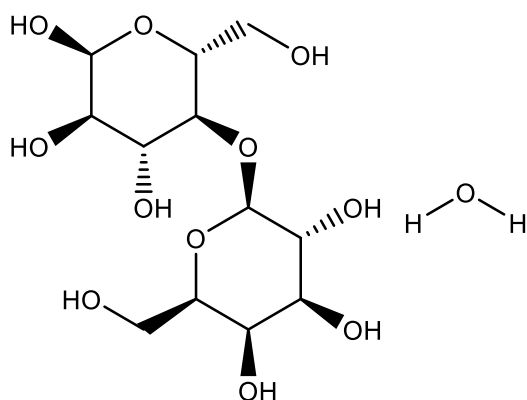
index (úzké terapeutické rozmezí). U pacientů je nutné brát ohled na složení stravy, chronické nemoci a jiné užívané léky [72–74].

3.5.2 Pomocné látky používané v tabletách s levothyroxinem

Mezi nejčastější pomocné látky levothyroxinu v tabletách se řadí laktóza a mannitol.

Laktóza je disacharid skládající se z galaktózy a glukózy. V léčivých přípravcích se používá jako plnivo v několika formách: bezvodá laktóza, laktóza monohydrát, laktóza monohydrát v kombinaci s dalšími látkami, a sprejem sušená laktóza [50,52,54].

Monohydrát laktózy (obrázek 6), také zvaný jako mléčný cukr, je monohydrát O-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-α-D-glukopyranosy [75,76].



Sumární vzorec: $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$

Molekulová hmotnost (M_r): 360,31 Da

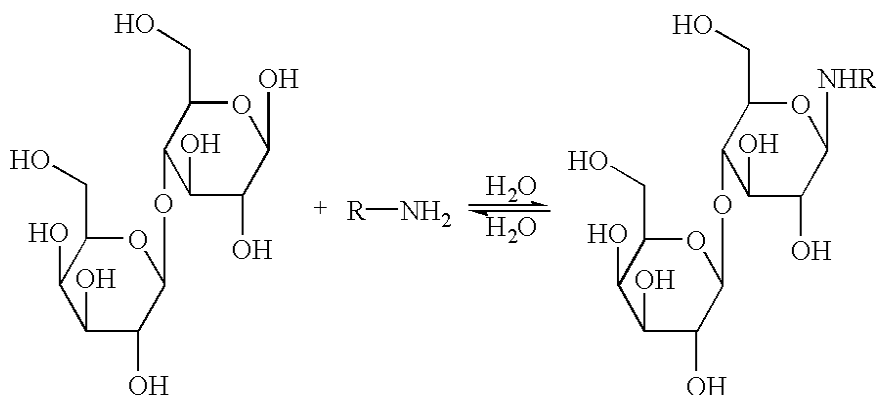
Monoizotopická hmotnost: 360,1268 Da

Obrázek 6 - Struktura laktózy monohydrátu [52].

Laktóza má tendenci krystalizovat za vyšší vlhkosti v průběhu skladování, což vede k narušení struktury jí samotné i léčivého přípravku [55].

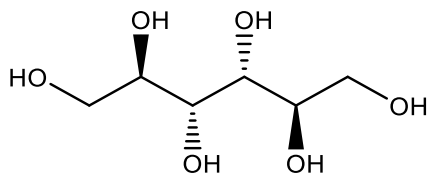
Laktóza není vhodná pomocná látka pro lidi s intolerancí laktózy způsobenou nedostatkem enzymu laktázy (EC 3.2.1.108). Rozvoj symptomů způsobených intolerancí laktózy je vysoce individuální [77,78].

Je nutno zmínit, že mezi redukcujícími cukry, mezi které laktóza patří, a primárními nebo sekundárními aminy dochází k Maillardově reakci (obrázek 7). Produkt vzniklý Maillardovou reakcí vzápětí podstupuje Amadoriho přesmyk [51,79,80].



Obrázek 7 – Schéma Maillardovy reakce mezi β -laktózou a primárním aminem [79].

D-mannitol (obrázek 8), izomer sorbitolu, je běžně užívaný jako pomocná látka pro svou stabilitu, inertnost vůči účinným látkám a nízkou hygroskopicitu. Nejčastěji se užívá jako plnivo do tablet [51,52,75,77,81].



Sumární vzorec: $C_6H_{14}O_6$

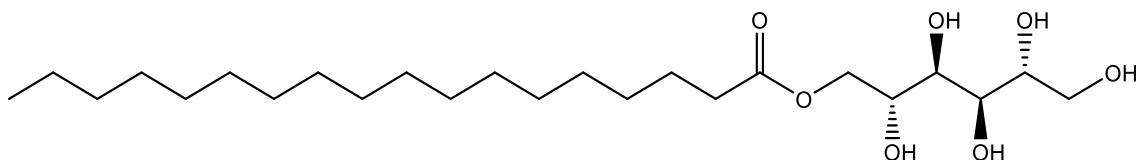
Molekulová hmotnost (M_r): 182,172 Da

Monoizotopická hmotnost: 182,0790 Da

Obrázek 8 - Struktura mannitolu.

Mannitol nepodléhá Maillardově reakci, která patří mezi nejčastější degradační reakce u léčivých přípravků, ale protože je z redukcí cukrů vyráběn, obsahuje redukcí cukry jako nečistoty. Limit těchto nečistot je v případě mannitolu stanoven na 0,3 % [54,77].

Tým vědců z Jerevanské státní univerzity zkoumal reakci mannitolu a sorbitolu s vyššími mastnými kyselinami, mezi které patří kyselina stearová, palmitová a olejová. Bez použití katalyzátorů a rozpouštědel probíhala esterifikační reakce. Produkt vzniklý reakcí mezi mannitolem a kyselinou stearovou se nazývá monostearát mannitolu (obrázek 9). Stearát mannitolu byl ve výsledcích jejich experimentu pevná, parafín připomínající látka se žlutou až světle hnědou barvou. Reakce probíhala rychleji za snížené vlhkosti [82].



Obrázek 9 - Struktura monostearátu mannitolu.

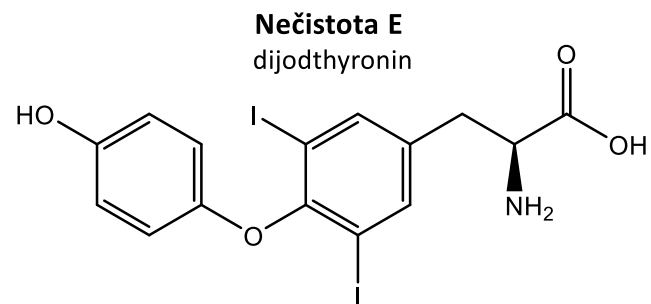
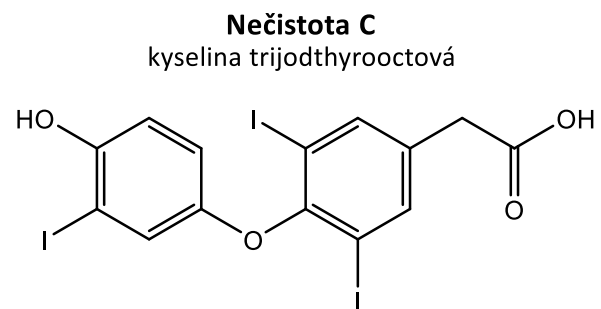
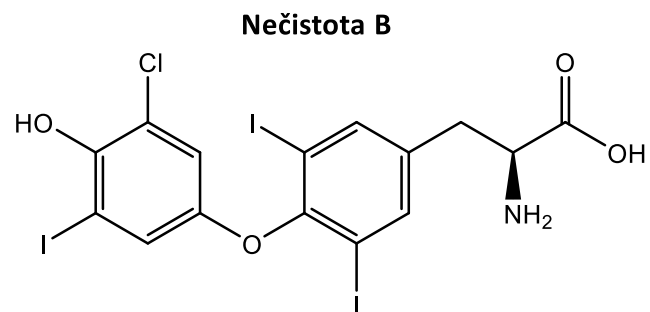
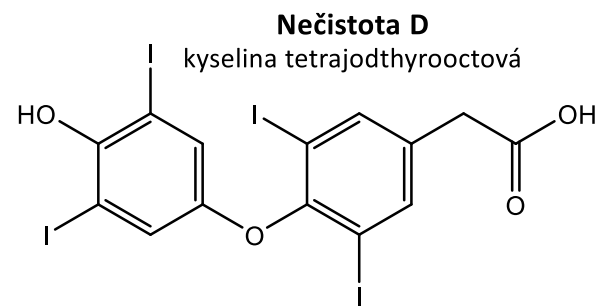
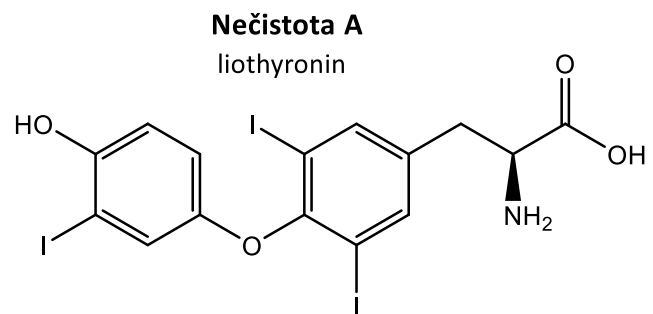
3.5.3 Nečistoty levothyroxinu dle Českého lékopisu

Český lékopis [50] udává nečistoty levothyroxinu s abecedním označením nečistota A až K. Názvy nečistot, jejich chemické názvy, sumární vzorce, monoizotopické hmotnosti, pK_a a $\log P$ jsou uvedeny v tabulce 5. Jejich struktury jsou znázorněny na obrázku 10 a 11.

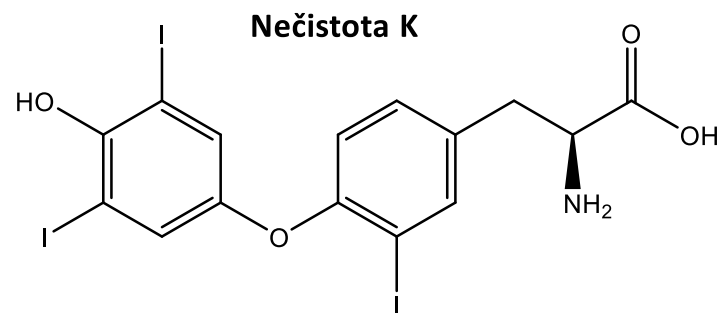
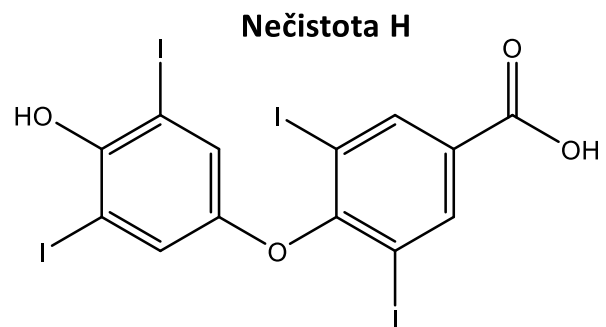
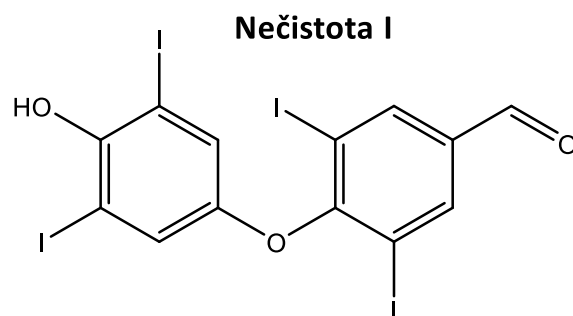
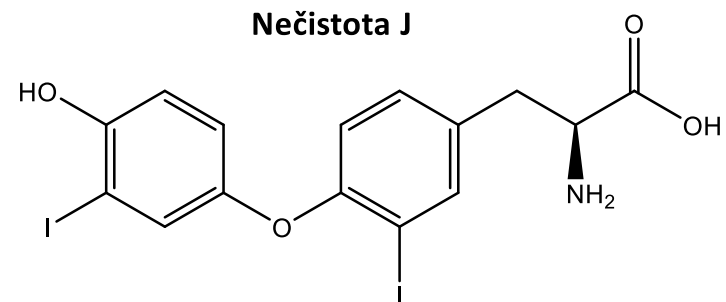
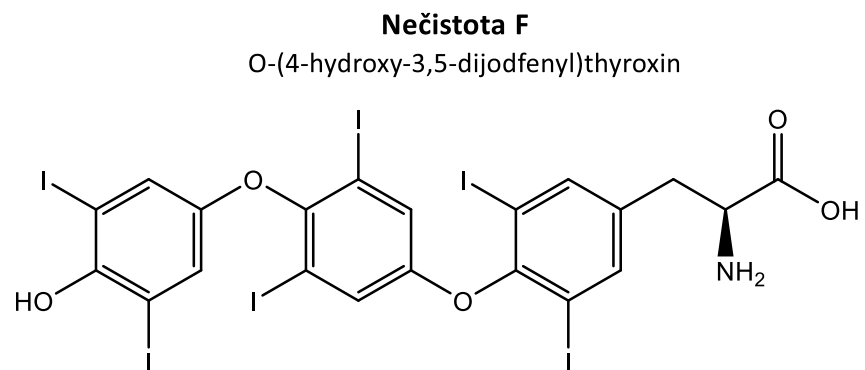
Struktura nečistoty G není známá.

Tabulka 5 - Nečistoty levothyroxinu dle Českého lékopisu [50].

Název	Chemický název	Sumární vzorec	MW [Da]	pK _a	Log P
nečistota A liothyronin	kyselina (2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3-jodfenoxy)-3,5-dijodfenyl] propionová	C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄	650,7900	6,96	6,00
nečistota B	kyselina (2S)-2-amino-3-[4-(3-chlor-4-hydroxy-5-jodfenoxy)-3,5-dijodfenyl]propionová	C ₁₅ H ₁₁ ClI ₃ NO ₄	684,7511	1,78	6,56
nečistota C kyselina trijodthyrooctová	kyselina [4-(4-hydroxy-3-jodfenoxy)-3,5-dijodfenyl]octová	C ₁₄ H ₉ I ₃ O ₄	621,7635	6,96	6,75
nečistota D kyselina tetrajodthyrooctová	kyselina [4-(4-hydroxy-3-jodfenoxy)-3,5-dijodfenyl]octová	C ₁₄ H ₈ I ₄ O	747,6601	4,72	8,11
nečistota E dijodthyronin	kyselina (2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodfenyl]propionová	C ₁₅ H ₁₃ I ₂ NO ₄	524,8934	9,81	4,64
nečistota F O-(4-hydroxy-3,5-dijodfenyl)thyroxin	kyselina O-(4-hydroxy-3,5-dijodfenyl)thyroxin, kyselina (2S)-2-amino-{4-[4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)3,5-dijodfenoxy]-3,5-dijodfenyl} propionová	C ₂₁ H ₁₃ I ₆ NO ₅	1120,5062	9,80	11,61
nečistota H	kyselina 4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodbenzoová	C ₁₃ H ₆ I ₄ O ₄	733,6445	3,31	8,17
nečistota I	4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodbenzaldehyd	C ₁₃ H ₆ I ₄ O ₃	717,6496	4,70	8,36
nečistota J	kyselina (2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3-jodfenoxy)-3-jodfenyl]propionová	C ₁₅ H ₁₃ I ₂ NO ₄	524,8934	9,87	4,64
nečistota K	kyselina (2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3-jodfenyl]propionová	C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄	650,7900	9,86	6,00



Obrázek 10 - Nečistoty levothyroxinu dle Českého lékopisu, část 1.



Obrázek 11 - Nečistoty levothyroxinu dle Českého lékopisu, část 2.

3.5.4 Stanovení nečistot levothyroxinu dle Českého lékopisu

Zkoušky na příbuzné látky levothyroxinu sodné soli se dle Českého lékopisu 2017 [50] provádí pomocí kapalinové chromatografie za chránění před světlem se spektrofotometrickou detekcí. Jako mobilní fáze se užívají roztoky kyseliny fosforečné ve vodě a v acetonitrilu. K analýze se používají 3 porovnávací roztoky:

- a) roztok *levothyroxinu sodné soli hydrátu CRL* a *liothyroninu sodné soli CRL* (obsahuje nečistotu A)
- b) roztok *a* zředěn v poměru 1:10 rozpouštěcí směsí
- c) roztok *levothyroxinu pro identifikaci píku CRL* (obsahuje nečistoty F a G).

Obsah nečistot je stanovován pomocí porovnání plochy píku příslušné nečistoty a píku porovnávacího roztoku. Pro zmíněné a další nečistoty jsou dány následující limity:

- nečistota A: 1,0 % (nejvýše plocha píku porovnávacího roztoku *a*)
- nečistota F: 0,5 % (nejvýše pětinásobek plochy píku porovnávacího roztoku *b*)
- nečistota G: 0,3 % (nejvýše trojnásobek plochy píku porovnávacího roztoku *b*)
- nespecifikované nečistoty: 0,2 % (nejvýše dvojnásobek plochy píku porovnávacího roztoku *b*)
- celkový obsah nečistot: nejvýše 2,0 %

Jiné detekovatelné nečistoty (B, C, D, E, H, I, J, K) jsou limitovány obecným kritériem přijatelnosti pro jiné/nespecifikované nečistoty [50].

3.5.5 Další nečistoty levothyroxinu

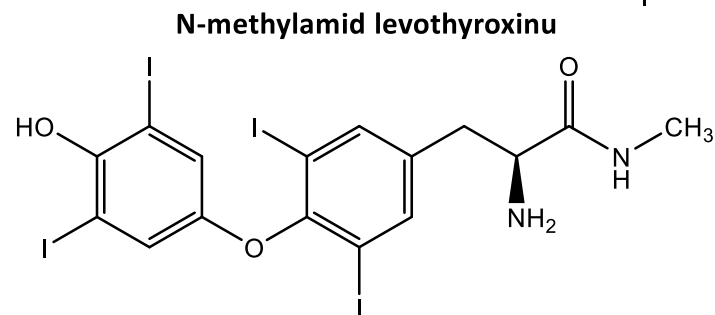
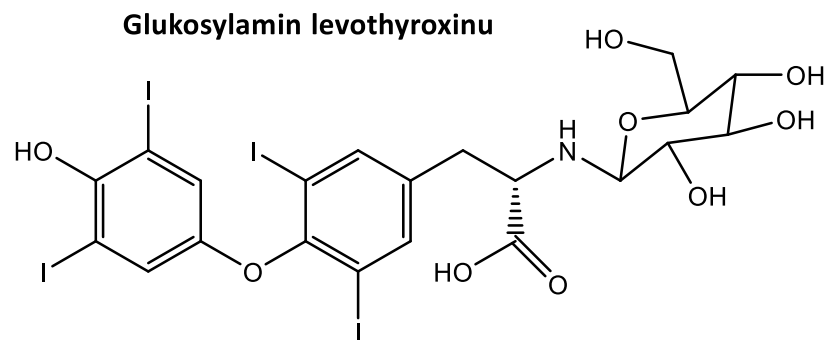
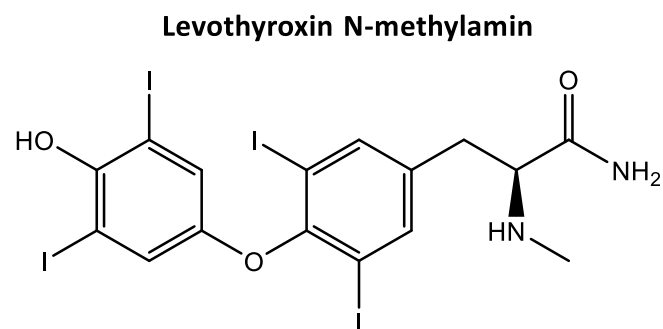
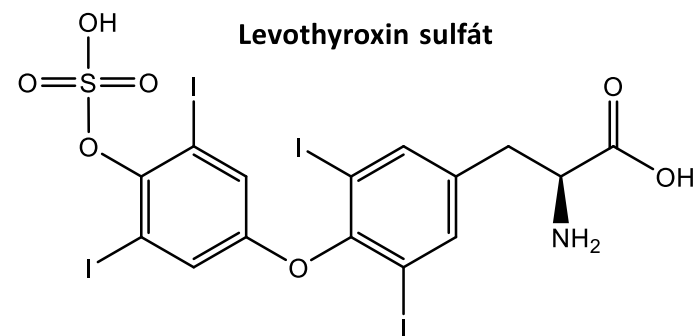
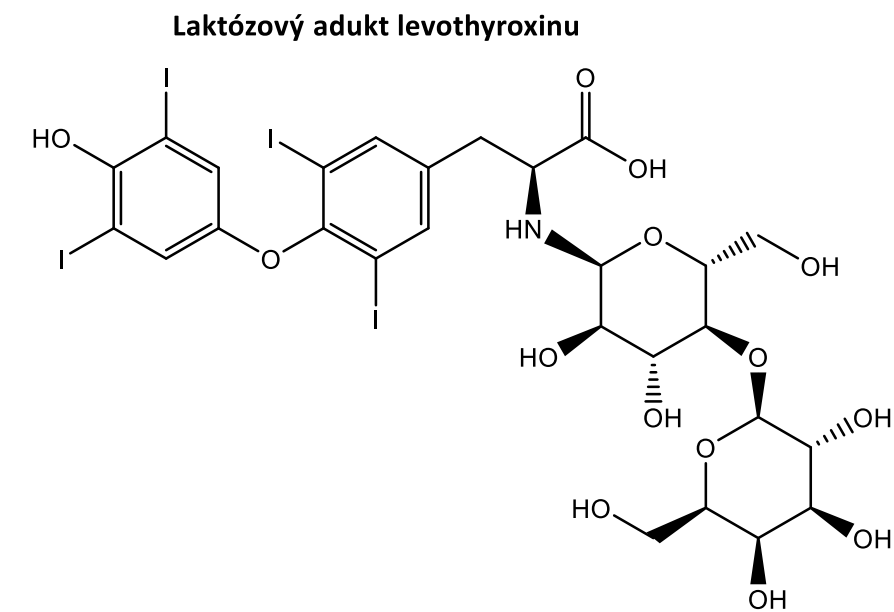
Kromě již zmíněných nečistot dle Českého lékopisu byly v literatuře popsány a jsou komerčně dostupné standardy dalších nečistot a látek podobných levothyroxinu. Sloučeniny byly na základě svých struktur a chemických vlastností rozřazeny do dvou skupin. Každá skupina má svou tabulku, ve které jsou jejich chemické názvy, sumární vzorce, monoizotopické hmotnosti, pK_a a $\log P$.

První skupinou nečistot jsou adukty (tabulka 6; obrázek 12 a 13), souhrnně látky vzniklé reakcí levothyroxinu a další sloučeniny/sloučenin.

Další skupinou nečistot levothyroxinu jsou jeho degradační produkty (tabulka 7; obrázek 14 a 15).

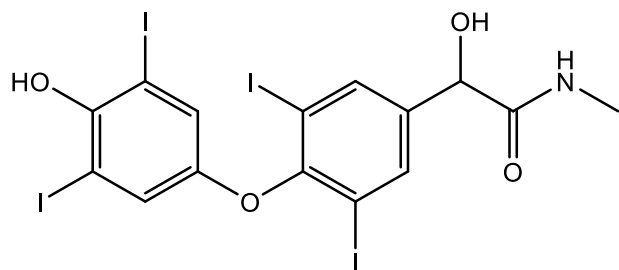
Tabulka 6 - Názvy a chemické názvy nečistot levothyroxinu: adukty.

Název	Chemický název	Sumární vzorec	MW [Da]	pK _a	Log P
Laktózový adukt levothyroxinu [80]	Kyselina (S)-2-(((2S,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)amino)-3-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)propionová	C ₂₇ H ₃₁ I ₄ NO ₁₄	1100,7923	6,67	4,17
Glukosylamin levothyroxinu [83]	Kyselina (2S)-3-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)-2-(((2S,3S,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)amino)propionová	C ₂₁ H ₂₁ I ₄ NO ₉	938,7395	4,72	5,91
Levothyroxin sulfát [84]	Kyselina (S)-2-amino-3-(4-(3,5-dijod-4-(sulfooxy)fenoxy)-3,5-dijodfenyl)propionová	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₇ S	856,6435	9,8	5,48
Levothyroxin N-methylamin [85]	(S)-3-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)-2-(methylamino)propanamid	C ₁₆ H ₁₄ I ₄ N ₂ O ₃	789,7183	7,03	7,23
N-methylamid levothyroxinu [86]	(S)-2-amino-3-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)-N-methylpropanamid	C ₁₆ H ₁₄ I ₄ N ₂ O ₃	789,7183	4,72	6,94
Nečistota levothyroxinu 24 [87]	2-hydroxy-2-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)-N-methylacetamid	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₄	776,6867	4,72	7,04
Nečistota levothyroxinu 21 [88]	Kyselina 2-amino-3-hydroxy-3-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)propionová	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₅	792,6816	1,53	6,54
Nečistota levothyroxinu 18 [89]	Ethyl (S)-2-acetamido-3-(4-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)propionát	C ₂₅ H ₁₉ I ₆ NO ₆	1190,548	4,72	12,14
Nečistota levothyroxinu 22 [90]	Kyselina (S)-3-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)-2-(hydroxyamino)propionová	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₅	792,6816	1,23	7,74
Nečistota levothyroxinu 23 [91]	Kyselina (S)-2-amino-3-(4-(4-(4-hydroxy-3-jodfenoxy)-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl)propionová	C ₂₁ H ₁₄ I ₅ NO ₅	994,6095	9,8	10,25

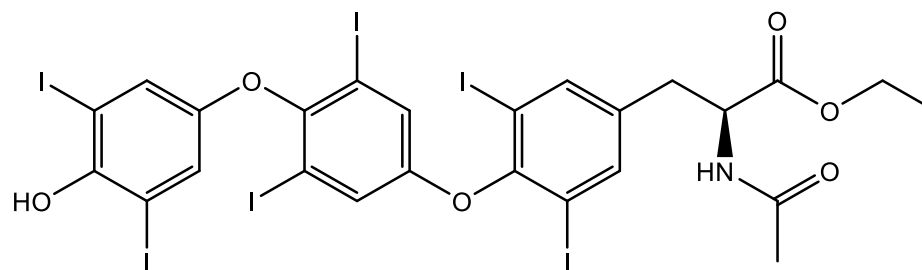


Obrázek 12 - Struktury nečistot levothyroxinu: adukty, část 1.

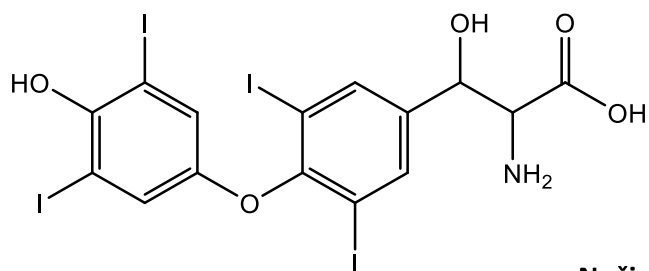
Nečistota levothyroxinu 24



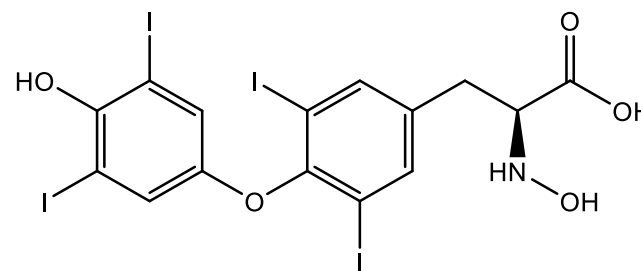
Nečistota levothyroxinu 18



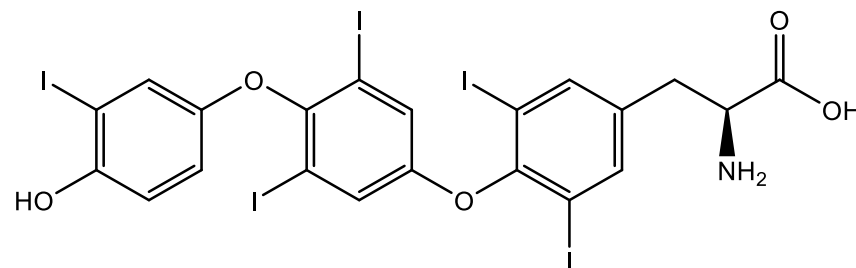
Nečistota levothyroxinu 21



Nečistota levothyroxinu 22



Nečistota levothyroxinu 23

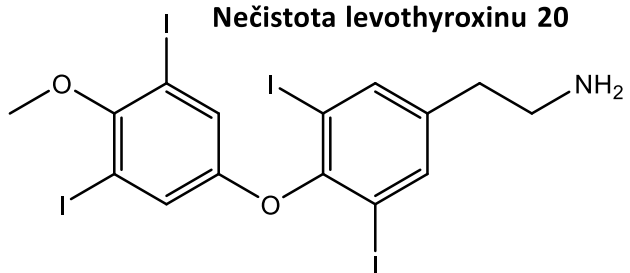


Obrázek 13 - Struktury nečistot levothyroxinu: adukty, část 2.

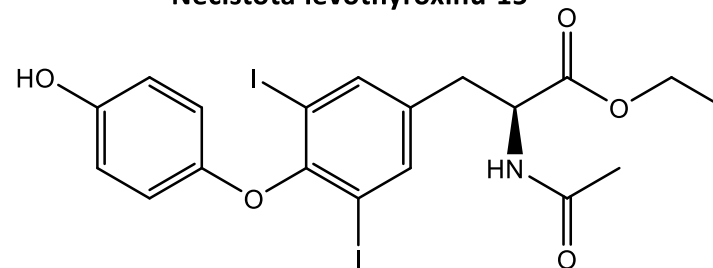
Tabulka 7 - Názvy a chemické názvy nečistot levothyroxinu: degradační produkty.

Název	Chemický název	Sumární vzorec	MW [Da]	pK _a	Log P
Nečistota levothyroxinu 20 [92]	2-(4-(3,5-dijod-4-methoxyfenoxi)-3,5-dijodfenyl)ethan-1-amin	C ₁₅ H ₁₃ I ₄ NO ₂	746,7125	9,89	8,2
Nečistota levothyroxinu 12 [93]	4-(4-ethyl-2,6-dijodfenoxi)-2,6-dijodfenol	C ₁₄ H ₁₀ I ₄ O ₂	717,686	4,72	9,52
Nečistota levothyroxinu 16 [94]	Ethyl (S)-2-acetamido-3-(4-(4-hydroxy-3-jodfenoxi)-3,5-dijodfenyl)propionát	C ₁₉ H ₁₈ I ₃ NO ₅	720,8319	6,96	6,53
Nečistota levothyroxinu 15 [95]	Ethyl (S)-2-acetamido-3-(4-(4-hydroxyfenoxi)-3,5-dijodfenyl)propionát	C ₁₉ H ₁₉ I ₂ NO ₅	594,9353	9,2	5,17
Nečistota levothyroxinu 19 [96]	Kyselina (S)-3-(4-(4-hydroxy-3-jodfenoxi)-3,5-dijodfenyl)-2-nitropropionová	C ₁₅ H ₁₀ I ₃ NO ₅	664,7693	6,96	6,98
Nečistota levothyroxinu 17 [97]	Kyselina 3-(4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxi)-3-jodfenyl)propionová	C ₁₅ H ₁₁ I ₃ O ₄	635,7791	4,84	7,17
Nečistota levothyroxinu 10 [98]	Kyselina (S)-2-amino-3-(3-chloro-4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxi)-5-jodfenyl)propionová	C ₁₅ H ₁₁ ClI ₃ NO ₄	684,7511	1,8	6,56
Nečistota levothyroxinu 11 [99]	Kyselina 2-(4-(4-hydroxyfenoxi)-3,5-dijodfenyl)octová	C ₁₄ H ₁₀ I ₂ O ₄	495,8668	9,21	5,4
L-thyronin [100]	Kyselina (S)-2-amino-3-(4-(4-hydroxyfenoxi)fenyl)propionová	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	273,1001	9,93	1,93
3,5-Dijod-L-tyrosin [100]	Kyselina (S)-2-amino-3-(4-hydroxy-3,5-dijodfenyl)propionová	C ₉ H ₉ I ₂ NO ₃	432,8672	10,55	3,1
3-jod-L-tyrosin [100]	Kyselina (S)-2-amino-3-(4-hydroxy-3-jodfenyl)propionová	C ₉ H ₁₀ I ₁ NO ₃	306,9705	10,61	1,75
L-tyrosin [100]		C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,0739	10,67	0,39
Nečistota levothyroxinu 14 [101]	Kyselina 2-amino-2-(4-hydroxy-3,5-dijodfenyl)mravenčí	C ₈ H ₇ I ₂ NO ₃	418,8515	4,59	2,82

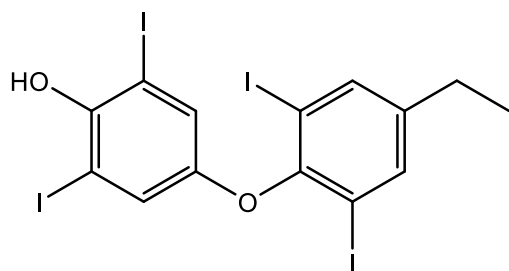
Nečistota levothyroxinu 20



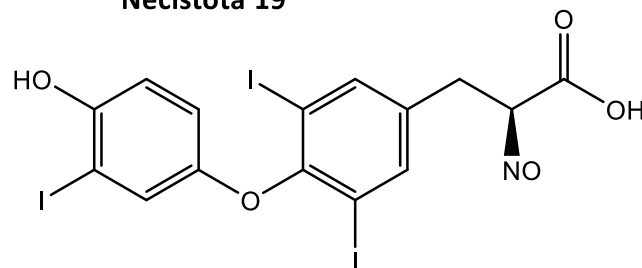
Nečistota levothyroxinu 15



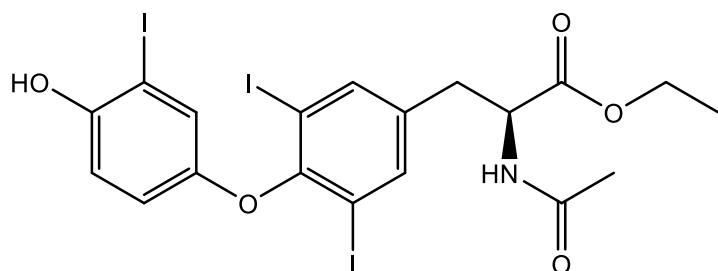
Nečistota levothyroxinu 12



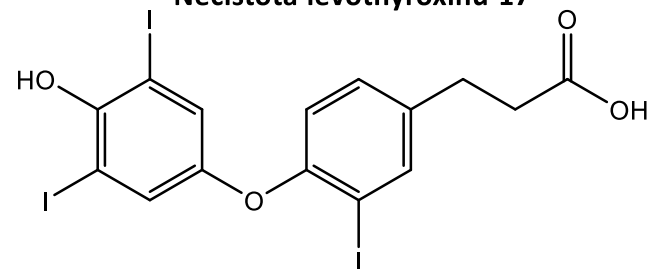
Nečistota 19



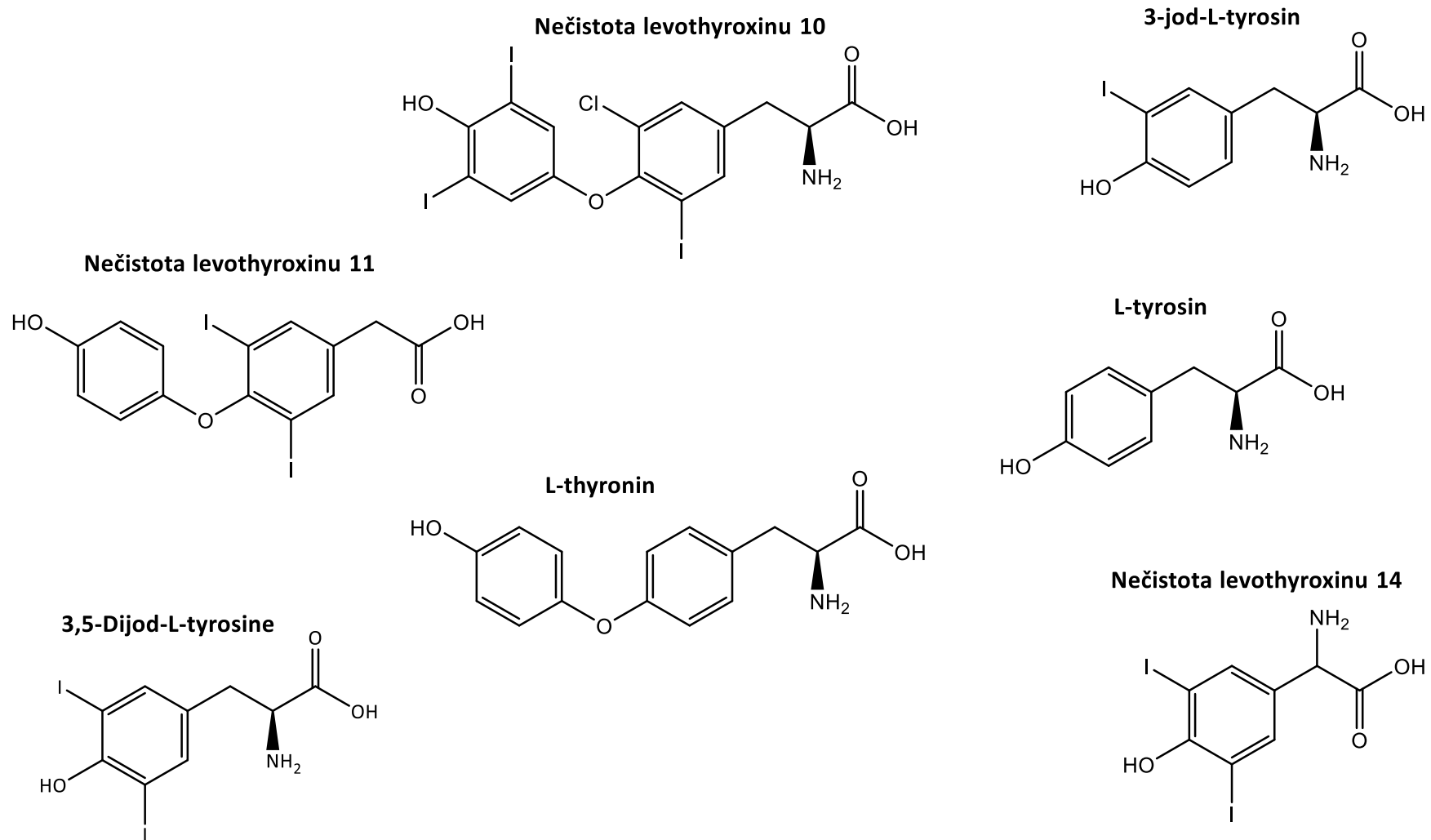
Nečistota levothyroxinu 16



Nečistota levothyroxinu 17



Obrázek 14 - Struktury nečistot levothyroxinu: degradační produkty, část 1.



Obrázek 15 - Struktury nečistot levothyroxinu: degradační produkty, část 2.

3.5.6 Stanovení obsahu levothyroxinu v léčivých přípravcích

Bylo již publikováno několik studií na obsah levothyroxinu v léčivých přípravcích a na jeho stabilitu.

Ve všech studiích byla použita HPLC na reverzních fázích. V některých se analyzovaly i degradační produkty, především liothyronin, diiodthyronin, thyronin, diiodtyrosin, jodtyrosin a tyrosin.

Na obsah levothyroxinu v jeho léčivých přípravcích byly publikovány dvě studie. Studie z roku 1984 [102] byla provedena pod záštitou FDA a byl stanoven levothyroxin a liothyronin v tabletách, lyofilizovaných injekcích a prášku účinné látky. Studie z roku 2001 [103] analyzovala levothyroxin a jeho degradační produkty v tabletách. Byly použity dva způsoby detekce a pro každou detekci byla zvolena jiná mobilní fáze HPLC. Studie také potvrdila zvýšenou degradaci levothyroxinu za přístupu světla a za vysoké teploty.

Několik studií mělo za cíl optimalizaci metody pro stanovení levothyroxinu a jeho degradačních produktů. Studie publikována v roce 2005 [100] se zabývala vývojem metody pro stanovení analytů v tabletách levothyroxinu a v biologických vzorcích. V této studii byla použita gradientová eluce. Pro farmaceutické vzorky a biologické vzorky moči a séra se metoda ukázala být vhodná. Pro vzorky tkáně nebyly výsledky přínosné – metoda se neukázala být dostatečně specifická pro komplexní matici vzorku tkáně. S výsledky této studie pracovala studie [71], jejímž cílem bylo optimalizovat použitou metody pro stanovení dalších nečistot, které v původní práci nebyly stanoveny. Studie se také zabývala směsmi běžně užívaných pomocných látek s levothyroxinem, z nichž jediný butylhydroxyanosil neinterferoval analýzu analytů. Porovnání výsledku analýzy při použití izokratické a gradientové eluce se zabývala studie [104]. Gradientová eluce zkrátila dobu analýzy na polovinu (z 65 minut na 30) za cenu ztráty rozlišení. Pro optimalizaci separace bylo testováno 5 kolon, a z výsledků vyplývá, že polární interakce ovlivňují retenci vysoce polárních degradačních produktů levothyroxinu. Optimalizace podmínek iontového zdroje a průběhu gradientové eluce umožnila detekci stopových sloučenin a zvýšení kvality hmotnostních spekter.

Zjištění vlivu pomocných látek na stabilitu levothyroxinu bylo cílem několika dalších studií. Tým University of Cincinnati (USA) provedl výzkum na efekt pomocných látek a hodnoty pH na stabilitu levothyroxinu [70]. Všechny postupy studie byly v souladu s tehdy platnými směrnici ICH a FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA). Z výsledku bylo zjištěno, že pH ovlivňuje stabilitu levothyroxinu v každé směsi a levothyroxin je stabilnější při vyšších hodnotách pH. Dalším cílem studie bylo hodnocení stability tablet s obsahem levothyroxinu. Byly vybrány tablety vyrobené s různými rozpouštědly a s různými pH modifikátory. Bylo prokázáno, že rozpouštědla jsou kritickým prvkem při degradačních procesech levothyroxinu a že pH modifikátory mohou zlepšit stabilitu tablet.

Vliv různých pomocných látek na stabilitu levothyroxinu byl testován v další studii [105]. Směs byla připravena z navážky hydratované či dehydratované formy levothyroxinu a vybrané pomocné látky. Různé pomocné látky ovlivňovali stabilitu účinné látky. V případě použití polyvinylpyrrolidonu a laurylsíranu sodného za přítomnosti vody docházelo dehydrataci a deaminaci. Výsledky přechodných studií potvrdila studie [106], ve které bylo opět prokázáno, že levothyroxin degraduje při nízké vlhkosti. Dle této studie je potvrzena hypotéza, že stabilita levothyroxinu je závislá na celistvosti krystalické struktury. V prostředí s nízkou vlhkostí levothyroxin svou vodu ztrácí, a tak je umožněn přístup kyslíku. Studie ve svém závěru zmiňuje, že levothyroxin tvoří výjimku v lécích svou stabilitou za vysoké vlhkosti, a tak by směrnice ICH měly brát ohled při stresových podmínkách svých testů na tuto vlastnost krystalických hydrátů.

Přehled použitých metod je shrnut v tabulce 8 a 9.

Tabulka 8 - Přehled metod použitých v analýze levothyroxinu a jeho degradačních produktů, část 1.

Stanovované analyty	Materiál	Rozpouštědlo	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LOD	Zdroj
levothyroxin sodná sůl, liothyronin sodná sůl	tablety	0,01 M NaOH v 50% MeOH	sonifikace - třepání - filtrace	Modifikovaný silikagel - kyanoalkyly (300x3,9 mm; 10 μm)	ACN:H ₂ O:H ₃ PO ₄ (350:650:1)	UV (229 nm)	n/a	1984 [102]
	prášek účinné l.	0,01 M NaOH v 50% MeOH	sonifikace - třepání - filtrace					
	injekce	0,01 M NaOH v 50% MeOH	pouze rozpuštění					
levothyroxin, liothyronin, dijodthyronin, dijodtyrosin, jodthyronin, jodtyrosin, tyrosin, acetyltyrosin, acetylfenylalanin	tablety	n/a	n/a	LiChrospher 60 RP-select B (125x4,6 mm; 5 μm)	0,5% FA v 40% ACN (pH 3,12) 0,3% AA v 40% ACN (pH 3,27)	EC (800 mV) MS	< 0.1 ng/μL	2001 [103]
levothyroxin, liothyronin, dijodthyronin, kys. tetrajodthyroctová, kys. trijodthyroctová, kys. dijodthyroctová	tablety, standarty látek	pomocné látky, deionizovaná voda	v některých případech úprava pH pomocí 0,1N HCl nebo 0,1N NaOH	Waters® Spherisorb Cyano (250x2 mm; 5 μm)	ACN:H ₂ O:H ₃ PO ₄ ACN:H ₂ O:TFA (v případě modifikace pH vzorku)	UV (225 nm) ESI-MS	n/a	2003 [70]
levothyroxin, liothyronin, dijodthyronin, thyronin, dijodtyrosin, jodtyrosin, tyrosin	tablety	0,01 M NaOH:MeOH (1:1, v/v)	sonifikace - filtrace	Inertsil ODS (250x4 mm; 5 μm)	A: 0,1% TFA v H ₂ O, pH 3 B: ACN	DAD	0,02 - 0,1 ng/μL	2005 [100]
	biologické vzorky (moč, sérum)	ACN	SPE - vysušení - rozpuštění v roztoku IS					
	tkáňové vzorky (štítná žláza v parafínu)	ACN:0.1M NaOH (2:1, v/v)	sonifikace při 40 °C - centrifugace - vysušení supernatantu - rozpuštění v roztoku IS					

n/a – nevedeno, NaOH – hydroxid sodný, MeOH – methanol, ACN – acetonitril, FA – kys. mravenčí, AA – kys. octová, TFA – kys. trifluoroctová, EC - elektrochemická detekce, DAD – detektor diodového pole, LOD – limit detekce

Tabulka 9 - Přehled metod použitých v analýze levothyroxinu a jeho degradačních produktů, část 2.

Stanovované analyty	Materiál	Rozpouštědlo	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LOD	Zdroj
levothyroxin, liothyronin, diiodthyronin, thyronin, diiodtyrosin, jodtyrosin, tyrosin, kys. triiodthyrooctová, kys. tetrajodthyrooctová	standardy látek	0,01 M NaOH v MeOH	pouze rozpuštění	Inertsil ODS 2 (250×4,6 mm; 5 μm)	A: 0,1% TFA v H ₂ O B: ACN	UV (223 nm)	1 μg/ml	2008 [71]
		pomocné látky 0,01 M NaOH v MeOH	směs 1:1					
levothyroxin, liothyronin, diiodthyronin, kys. tetrajodthyrooctová, kys. triiodthyrooctová, kys. triiodthyropropionová, kys. tetrajodthyromravenčí	standardy látek	NaOH v H ₂ O s přídavkem MeOH	rozpuštění a ředění 1:10 roztokem ACN:H ₂ O (30:70, v/v) + FA	YMC C18 Pro (150×1 mm; 3 μm)	A: 0,1% FA v H ₂ O (v/v) B: 0,1% FA v ACN (v/v)	UV (225 nm) ESI-TOF-MS	n/a	2008 [104]
levothyroxin, liothyronin, diiodthyronin, thyronin, diiodtyrosin, jodtyrosin, tyrosin, kys. triiodthyrooctová, kys. diiodthyrooctová	účinná látka	pomocné látky, deionozovaná voda	sonifikace, ředění 0,01 M NaOH:MeOH (1:1, v/v)	Inertsil ODS 2 (250×4,6 mm; 5 μm)	A: 0,1% TFA v H ₂ O B: ACN	UV (223 nm)	n/a	2010 [105]
levothyroxin	standardy látek	0,01 M NaOH v MeOH	n/a	Dionex Acclaim® 120 C8 (250×4,6 mm; 5 μm)	A: 0,025% TFA v H ₂ O B: ACN	UV (223 nm)	n/a	2019 [106]

n/a – neuvedeno, NaOH – hydroxid sodný, MeOH – methanol, ACN – acetonitril, FA – kys. mravenčí, AA – kys. octová, TFA – kys. trifluoroctová, EC - elektrochemická detekce, DAD – detektor diodového pole, LOD – limit detekce

3.5.7 Změna pomocné látky v léčivém přípravku

V březnu roku 2017 se změnilo složení tablet s obsahem sodné soli levothyroxinu prodávaných ve Francii firmou Merck Serono, patřící pod německou farmaceutickou firmu Merck KGaA. Původní složení léku Levothyrox[®], vykazovalo nestabilitu, a tak bylo vyvinuto nové složení, které mělo být bioekvivalentní k tomu původnímu dle farmakokinetické studie vydané roku 2017. V novém složení byla jako pomocná látka nahrazena laktóza za mannitol a kyselinu citrónovou. Bylo v plánu nové složení produkovat do dalších 21 zemí Evropské unie. Léčivé přípravky s obsahem sodné soli levothyroxinu užívá ve Francii přes dva miliony lidí a po změně složení tablet Levothyrox[®] (nová formulace s mannitolem) bylo hlášeno přes 30 tisíc případů nežádoucích účinků [69,107].

Firma Merck Serono vyrábí krom preparátu Levothyrox[®] další preparáty sodné soli levothyroxinu Eutirox a Euthyrox, které společně pokrývají škálu obsahu účinné látky od 25 do 200 µg [69].

V roce 2019 byl publikován aktuální názor [107] autorů z Francie a Anglie zabývajících se vhodností provedené studie bioekvivalence (BE) pro změnu složení tablet s obsahem levothyroxinu sodné soli. Testy BE byly provedeny v přístupu ABE (průměrná bioekvivalence), která porovnávala mediány ploch pod píkem plasmatické koncentrace po podání léčiva v obou skupinách. Bioekvivalence je potvrzena, pokud mají mediány podobnou hodnotu a jsou ve stanoveném rozmezí 90 – 111 %. Autoři upozorňují, že testy BE se provádí před uvedením léku na trh, avšak ne v případě, kdy má nové složení léku nahradit to staré. Zároveň se testy BE provádí na zdravé populaci, a tak mohou být výsledky rozdílné oproti populaci pacientů. Autoři si tak kladou otázku, zda přístup ABE, který nezahrnuje populační a individuální BE, prokazuje možnou zaměnitelnost léku kvůli individuálnímu terapeutickému oknu.

V Evropských směrnících příslušných organizací se nevyskytuje algoritmus testů individuální bioekvivalence (IBE), který zahrnuje intra-individuální variabilitu v biodostupnosti a individuální interakci mezi subjektem a lékem. Při tomto přístupu subjekt studie užívá obě léková složení, a tak by tento přístup mohl dle autorů lépe ukázat možnost zaměnitelnosti lékových složení. Autoři také z dostupných dat ze

studie BE [69] zjistili, že ačkoliv medián byl splněn, více než 50 % dobrovolníků bylo mimo stanovené rozmezí BE (90 – 111,11 %) [107].

Stejní autoři publikovali další aktuální názor v roce 2020 (online v roce 2019) [108] s názvem „Proč bylo třeba více než 200 subjektů k důkazu bioekvivalence nové formulace Levothyroxinu se starou formulací?“. V reakci na tento článek byl publikován dopis editorovi od zaměstnanců firmy Merck z Francie, Švýcarska a Německa, kteří upozorňují na nepřesnosti a špatné interpretace původních autorů.

4. Experimentální část

4.1 Použité přístroje a pomůcky

- UHPLC systém: Waters ACQUITY UPLC I-Class Systém (Milford, MA, USA)
 - čerpadlo: ACQUITY UPLC I-Class Binary solvent manager (Waters, USA)
 - dávkovač vzorku: ACQUITY UPLC Sample manager FTN (Waters, USA)
 - kolonový termostat: Column heater (Waters, USA)
- chromatografická kolona: Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Column, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm (Milford, MA, USA)
- hmotnostní analyzátor: Waters SYNAPT G2-Si (Manchester, UK)
- analytické váhy: Sartorius (Göttingen, Německo)
- automatické pipety: Eppendorf (Hamburk, Německo)
- ultrazvuková lázeň: Sonorex Digitec, Bandelin Elextronic (Berlín, Německo)
- centrifuga: Mikro 220R, Hettich (Tuttlingen, Německo)
- třepačka: Vortex Genius 3, IKA (Staufen, Německo)
- mikrozkušavky: Eppendorf (Hamburg, Německo)
- software pro sběr dat z HRMS: Waters MassLynx V4.1 (Manchester, UK)
- software pro zpracování dat: Waters TargetLynx (Milford, MA, USA)
- software pro statistickou analýzu: Sartorius SIMCA (Göttingen, Německo)
- software pro znázornění chemických struktur sloučenin a získání chemických vlastností: PerkinElmer ChemDraw 20.1.1 (Waltham, MA, USA)

4.2 Použité chemikálie

- ultračistá voda LC-MS grade: Milli Q, Millipore (Bedford, MA, USA)
- Acetonitril LC-MS CHROMASOLV (≥99%), VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika)

- Kyselina mravenčí ($\geq 99\%$), VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika)
- Dimethylsulfoxid ($\geq 99,7\%$), Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
- Octan leucin-enkefalinu hydrát ($\geq 95\%$), Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
- Hydroxid sodný, Penta (Chrudim, Česká republika)
- Interní standard levothyroxinu (IS Levothyroxine D3), TRC (Toronto, Kanada)

4.3 Pracovní postup

4.3.1 Příprava roztoku vnitřního standardu

- Zásobní roztok standardu byl připraven z navážky IS Levothyroxinu 0,137 mg, která byla rozpuštěna v 137 μL DMSO pro finální koncentrace 1 mg/mL.
- Pracovní roztok IS byl připraven zředěním 90 μL zásobního roztoku v 50 mL DMSO pro finální koncentraci 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.3.2 Příprava mobilních fází

V experimentu byly použity dvě složky mobilní fáze:

- MF A: 0,1% kyselina mravenčí (FA) ve vodě. Odměrná baňka o objemu 2000 mL byla naplněna ultračistou vodou po rysku a pomocí pipety byly pod hladinu nadávkovány 2 mL FA.
- MF B: 0,1% kyselina mravenčí (FA) v ACN. Odměrná baňka o objemu 2000 mL byla naplněna ACN po rysku a pomocí pipety byly pod hladinu nadávkovány 2 mL FA.

Mobilní fáze byly připravované před každým designem měření.

4.3.3 Příprava kalibrantů MS

- Externí kalibrant – 0,5 mM roztok mravenčanu sodného: odměrná baňka o objemu 20 mL byla naplněna 16 mL ACN, ke kterému se přidalo 100 μL 0,1M roztoku NaOH a 200 μL 10% FA. Baňka byla po rysku doplněna ultračistou vodou.
- Interní kalibrant - 200 $\text{pg}/\mu\text{L}$ leucin enkefalin: odměrná baňka o objemu 250 mL byla pod rysku naplněna ředící směsí 50:50 ACN/ H_2O s přidavkem 0,1% FA, do níž

bylo nadávkováno 125 μL roztoku leucinu enkefalinu (400 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Baňka byla poté naplněna po rysku ředící směsí.

4.3.4 Příprava vzorků tablet

Dle protokolu zadavatele byl jako rozpouštědlo tablet použit DMSO. Protože různé šarže tablet měly různý obsah levothyroxinu, první krok byl přizpůsoben potřebnému objemu rozpouštědla, aby se docílilo koncentrace 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- Tablety s obsahem 100 μg byly rozpouštěny v 1000 μL DMSO.
- Tablety s obsahem 75 μg byly rozpouštěny v 750 μL DMSO.
- Tablety s obsahem 50 μg byly rozpouštěny v 500 μL DMSO.

Rozpuštění tablet do vzorku bylo provedeno v následujících krocích:

1. Přidání potřebného množství DMSO k tabletě v mikrozkuhavce o objemu 2 mL k docílení koncentrace Levothyroxinu 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
2. Krátké protřepání na vortexu.
3. Sonifikace 30 minut s krátkým protřepáním na vortexu každých 10 minut.
4. Stočení na centrifuze 15 minut na 5000 RPM při 20°C.
5. Odebrání supernatantu pomocí mikropipety a zředění 1:10 DMSO do konečné koncentrace 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.3.5 Příprava kontrol kvality, blankového extrakt a blanku

V průběhu měření byly do sekvence vzorků zařazeny blanky, blankové extrakty a vzorky QC (kontrola kvality).

- Blank: čistý DMSO.
- Blankový extrakt: rozpouštědlo tablet (DMSO), které se připravovalo stejně jako vzorky tablet.

- QC: dva způsoby provedení – první pro design 1 a 2, a druhý pro design 3.:
 1. Šest reprezentativních šarží tablet bylo individuálně rozpuštěno stejným postupem jako vzorky tablet. Z každého supernatantu bylo odebráno 10 μL , smícháno, a směs byla ředěna 1:10 DMSO. Vzorek směsi byl převeden do vialky a ke směsi bylo přidáno 10 μL pracovního roztoku IS o koncentraci 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Vzorek QC byl připraven každý den před měřením a byl připraven z tablet měřených téhož dne.
 2. Tableta z každé šarže byla rozpuštěna dle postupu přípravy vzorků. Z každého supernatantu bylo odebráno 10 μL , smícháno, a směs byla ředěna 1:10 DMSO. Vzorek směsi byl převeden do vialky a ke směsi vzorků bylo přidáno 10 μL pracovního roztoku IS o koncentraci 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.4 Analyzované tablety levothyroxinu

Pro analýzu byly použity tablety od tří různých výrobců s různými obsahy účinné látky a s různými pomocnými látkami – laktózou nebo mannitolem. Tablety byly pro účely této práce rozděleny do tří skupin:

1. G1 – formulace před rokem 2017 (pomocná látka laktóza): S1 – S5, S19, A1
2. G2 – formulace po roce 2017 (pomocná látka mannitol): S6 – S12, A2
3. G3 – formulace po roce 2019 (pomocná látka mannitol): S13 – S18, A3, H

Toto rozdělení bylo učiněno na základě změny složení v roce 2017 a pozdější změně v roce 2019.

Seznam použitých tablet včetně čísla šarží je shrnut v tabulce 10.

Tabulka 10 - Seznam použitých šarží tablet.

Tableta	Výrobce	Šarže	Obsah Levothyroxinu (µg)	Expirace	Pomocná látka	Skupina
S1	Merck	Levothyrox® 19341020	100	11/2017	laktóza	G1
S2	Merck	Levothyrox® 21167620	100	12/2018	laktóza	G1
S3	Merck	Levothyrox® 22175520	100	07/2019	laktóza	G1
S4	Merck	Levothyrox® 22359420	100	07/2019	laktóza	G1
S5	Merck	Levothyrox® 22401620	100	08/2019	laktóza	G1
S6	Merck	Levothyrox® 22943220	75	12/2018	mannitol	G2
S7	Merck	Levothyrox® 23181520	75	02/2019	mannitol	G2
S8	Merck	Levothyrox® 23207320	100	02/2019	mannitol	G2
S9	Merck	Levothyrox® 23239520	100	02/2019	mannitol	G2
S10	Merck	Levothyrox® 23239620	100	02/2019	mannitol	G2
S11	Merck	Levothyrox® 23999520	100	07/2019	mannitol	G2
S12	Merck	Levothyrox® 24295720	100	09/2019	mannitol	G2
S13	Merck	Levothyrox® 13561020	100	06/2021	mannitol	G3
S14	Merck	Levothyrox® 13562020	100	06/2021	mannitol	G3
S15	Merck	Levothyrox® 13563020	100	06/2021	mannitol	G3
S16	Biogaran	Lévothyroxine Biogaran® 457	50	11/2015	mannitol	G3
S17	Biogaran	Lévothyroxine Biogaran® 485	75	04/2017	mannitol	G3
S18	Ratiopharm	Lévothyroxine Ratiopharm® 345	100	01/2014	mannitol	G3
S19	Merck	Eutirox® 18308P	75	02/2021	laktóza	G1
A1	Merck	Levothyrox® 21819120	100	04/2019	laktóza	G1
A2	Merck	Levothyrox® 23207420	100	02/2019	mannitol	G2
A3	Merck	Levothyrox® 25582621	100	04/2021	mannitol	G3
H	Merck	Euthyrox® G005MA20	50	05/2022	mannitol	G3

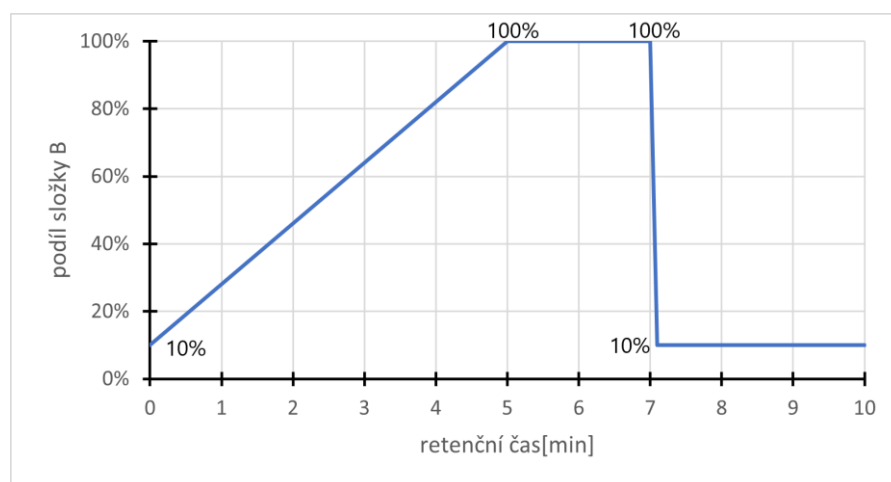
4.5 UHPLC na reverzních fázích

- chromatografická kolona: BEH Shield RP18 (2,1 mm x 50 mm; 1,7 µm)
- eluce: gradientová
- složka mobilní fáze A: 0,1 % FA v H₂O
- složka mobilní fáze B: 0,1 % FA v ACN
- rychlost průtoku MF: 0,5 mL/min
- délka separace: 10 min
- objem nástřiku vzorku: 1 µL
- teplota dávkovače vzorku: 20 °C
- ekvilibrace kolony: 3 min
- teplota kolony: 40 °C
- silná oplachová kapalina: 100% ACN
- slabá oplachová kapalina: 50% ACN v ultračisté vodě

Průběh gradientové eluce je shrnut v tabulce 11 a graficky znázorněn na obrázku 16.

Tabulka 11 - Parametry gradientové eluce.

Čas [min]	A: 0,1% FA v H ₂ O [%]	B: 0,1% FA v ACN [%]
0	90	10
5	0	100
7	0	100
7,1	90	10
10	90	10



Obrázek 16 - Podíl složky B (MF 0,1% FA v ACN) při gradientové eluci.

4.6 Nastavení parametrů HRMS

Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si byl před každým měřením kalibrován na rozpětí hmoty 50 - 1200 m/z pomocí 0,5 mM roztoku mravenčanu sodného. Pro ověření přesnosti a správnosti měření byl jako interní kalibrant použit roztok leucinu enkefalinu (m/z v negativním módu 554,2615) o koncentraci 200 pg/ μ L.

Jako ionizační technika byl použit elektrosprej (ESI). Jako analyzátor byl použit jednoduchý kvadrupól ve spojení s analyzátozem doby letu (qTOF).

- typ skenu: MS sken ESI⁻
- teplota iontového zdroje: 120 °C
- napětí na kapiláře: 1 kV
- průtok zmlžujícího plynu: 6 bar
- teplota sušícího plynu: 600 °C
- průtok sušícího plynu: 1000 L/h
- napětí na vstupním kuželu: 40 V
- průtok plynu na vstupním kuželu: 50 L/h
- mód analyzátoru: resolution
- rozsah měření hmoty: 50 - 1200 m/z
- typ dat: centroidní
- skenovací čas: 0,085 s

4.7 Metoda pro vyhodnocení analýz

Chromatogramy z UHPLC-HRMS byly vždy kontrolovány a integrace jednotlivých píků byla ručně upravována v programu TargetLynx (Waters).

Z celkových iontových chromatogramů (TIC) byly extrahovány chromatogramy pro určitou hmotu s tolerancí 0,2 Da – extrahované iontové chromatogramy (XIC). V XIC byla provedena integrace ploch pod píky.

Dle pokynů zadavatele byla analýza sestavena jako semikvantitativní hodnocení nečistot. Pro každou látku byly definovány následující parametry (tabulka 12):

- hmota – poměr m/z pro XIC
- retenční čas – t_R

Tabulka 12 - Parametry účinné látky a sledovaných nečistot.

Látka	m/z	t_R [min]
levothyroxin	775,6794 ± 0,02	1,9550 ± 0,0550
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	493,3322 ± 0,02	4,0850 ± 0,2050
stearát mannitolu [M-H] ⁻	447,3327 ± 0,02	4,0750 ± 0,2150
adukt Levo-laktóza 1	1099,7851 ± 0,02	1,7900 ± 0,0500
adukt Levo-laktóza 2	1099,7851 ± 0,02	2,1350 ± 0,0450
supramolekulární komplex levothyroxin-laktóza	1117,7956 ± 0,02	2,0000 ± 0,0400
neznámá sloučenina 1	480,309 ± 0,02	3,22 ± 0,06
neznámá sloučenina 2	504,309 ± 0,02	3,06 ± 0,06
neznámá sloučenina 3	594,397 ± 0,02	4,64 ± 0,05
neznámá sloučenina 4	650,46 ± 0,02	5,02 ± 0,06

4.7.1 Cílená analýza nečistot

Dle zvoleného designu měření byly šarže měřeny v triplikátu nebo pouze v jednom vzorku. Pokud byly v triplikátu, byly jednotlivé tablety měřené šarže označeny písmeny A, B a C. Každá tableta byla dávkována a měřena dvakrát, ihned po sobě. Z těchto dvou měření byl pro každou tabletu vypočítán průměr plochy pod píkem pro každou sloučeninu. Z těchto hodnot a z hodnot plochy pod píkem levothyroxinu, byl vypočítán poměr nečistoty k účinné látce v procentech (relativní koncentrace). V případě měření triplikátů byl ze získaných poměrů vypočítán aritmetický průměr (\bar{x}).

Ze stejných hodnot byla vypočítána i směrodatná odchylka (s). Z poměru směrodatné odchylky k aritmetického průměru, to celé vynásobeno 100, byla vypočtena relativní směrodatná odchylka RSD v procentech.

Pomocí statistické analýzy byly hodnoceny rozdíly v obsahu nečistot mezi designy. Nejprve byly vypočteny rozdíly v průměrném obsahu nečistoty mezi designy (D2 – D1). S těmito hodnotami bylo poté provedeno testování předpokladu normality, tzv. N-P plot. Pokud byla hodnota p menší než 0,05; byl nalezen v hodnotách statisticky významný rozdíl a bylo nutné použít neparametrickou variantu Wilcoxonova testu. Pokud byla hodnota p větší než 0,05; měly hodnoty normální rozdělení a bylo možné použít párový t-test. Pomocí párového t-testu a neparametrické variaty Wilcoxonova testu byly zhodnoceny statistické rozdíly v obsahu nečistot mezi designy.

4.8 Designy měření

Celkem byly v této práci použity tři designy měření.

Design 1 byl sestaven dle parametrů zadavatele: bylo požadováno semikvantitativní hodnocení nečistot, měření v triplikátu, příprava vzorků těsně před analýzou, měření stejného vzorku v módu ESI⁻ i ESI⁺. Módy byly kontinuálně střídány, tedy mód ESI⁻ s přípravou těsně před analýzou a následné měření stejných vzorků v módu ESI⁺. Musel být vypracován přesný časový plán, aby vzorky byly připraveny těsně před vložením do UHPLC chromatografu. Každý vzorek byl dávkován a měřen dvakrát, ihned po sobě. Celkový počet vzorků se vyšplhal na 256 a dle zadání byl počet vzorků na den omezen. Vzorek QC byl připraven dle postupu č. 1 (z šesti reprezentativních šarží tablet), a byl připravován každý den měření. Při přípravě sekvence měření (tabulka 13) byla provedena randomizace vzorků, ale jelikož příprava musela těsně předcházet měření, nemohla být provedena randomizace v přípravě vzorků.

Tabulka 13- Sekvence měření v designu 1.

31.03.2020		01.04.2020		02.04.2020		03.04.2020		04.04.2020	
1. blank 1	32. blank 12	1. blank 1	32. blank 12	1. blank 1	32. blank 12	1. blank 1	32. blank 12	1. blank 1	32. blank 12
2. blank 2	33. A2B a	2. blank 2	33. S10A a	2. blank 2	33. A3A a	2. blank 2	33. S8C a	2. blank 2	33. S16B a
3. blankový extrakt 1	34. A2B b	3. blankový extrakt 1	34. S10A b	3. blankový extrakt 1	34. A3A b	3. blankový extrakt 1	34. S8C b	3. blankový extrakt 1	34. S16B b
4. blank 3	35. QC 5	4. blank 3	35. QC 5	4. blank 3	35. QC 5	4. blank 3	35. QC 5	4. blank 3	35. QC 5
5. QC 1	36. blank 13	5. QC 1	36. blank 13	5. QC 1	36. blank 13	5. QC 1	36. blank 13	5. QC 1	36. blank 13
6. blank 4	37. HA a	6. blank 4	37. S17A a	6. blank 4	37. A1C a	6. blank 4	37. S15C a	6. blank 4	37. S2C a
7. S5A a	38. HA b	7. S7C a	38. S17A b	7. S11A a	38. A1C b	7. S19B a	38. S15C b	7. S6C a	38. S2C b
8. S5A b	39. blank 14	8. S7C b	39. blank 14	8. S11A b	39. blank 14	8. S19B b	39. blank 14	8. S6C b	39. blank 14
9. blank 5	40. S10C a	9. blank 5	40. S4A a	9. blank 5	40. S16A a	9. blank 5	40. S3A a	9. blank 5	40. S13A a
10. S9C a	41. S10C b	10. S12C a	41. S4A b	10. A3B a	41. S16A b	10. 9B a	41. S3A b	10. S17C a	41. S13A b
11. S9C b	42. QC 6	11. S12C b	42. QC 6	11. A3B b	42. QC 6	11. 9B b	42. QC 6	11. S17C b	42. QC 6
12. QC 2	43. blank 15	12. QC 2	43. blank 15	12. QC 2	43. blank 15	12. QC 2	43. blank 15	12. QC 2	43. blank 15
13. blank 6	44. blankový extrakt 3	13. blank 6	44. blankový extrakt 3	13. blank 6	44. blankový extrakt 3	13. blank 6	44. blankový extrakt 3	13. blank 6	44. blankový extrakt 3
14. S4C a	45. blank 16	14. S1C a	45. blank 16	14. S18A a	45. blank 16	14. A2C a	45. blank 16	14. S1A a	45. blank 16
15. S4C b	46. S15B a	15. S1C b	46. S14B a	15. S18A b	46. A1B a	15. A2C b	46. S18B a	15. S1A b	46. S8B a
16. blank 7	47. S15B b	16. blank 7	47. S14B b	16. blank 7	47. A1B b	16. blank 7	47. S18B b	16. blank 7	47. S8B b
17. S12B a	48. blank 17	17. S11C a	48. blank 17	17. S6A a	48. blank 17	17. S18C a	48. blank 17	17. S19C a	48. blank 17
18. S12B b	49. S16C a	18. S11C b	49. S13B a	18. S6A b	49. S5C a	18. S18C b	49. A3C a	18. S19C b	49. S8A a
19. QC 3	50. S16C b	19. QC 3	50. S13B b	19. QC 3	50. S5C b	19. QC 3	50. A3C b	19. QC 3	50. S8A b
20. blank 8	51. QC 7	20. blank 8	51. QC 7	20. blank 8	51. QC 7	20. blank 8	51. QC 7	20. blank 8	51. QC 7
21. S9A a	52. blank 18	21. S14A a	52. blank 18	21. S7B a	52. blank 18	21. S7A a	52. blank 18	21. S17B a	52. blank 18
22. S9A b	53. S5B a	22. S14A b	53. S12A a	22. S7B b	53. S2B a	22. S7A b	53. S3C a	22. S17B b	53. HC a
23. blank 9	54. S5B b	23. blank 9	54. S12A b	23. blank 9	54. S2B b	23. blank 9	54. S3C b	23. blank 9	54. HC b
24. blankový extrakt 2	55. blank 19	24. blankový extrakt 2	55. blank 19	24. blankový extrakt 2	55. blank 19	24. blankový extrakt 2	55. blank 19	24. blankový extrakt 2	55. blank 19
25. blank 10	56. S2A a	25. blank 10	56. A2A a	25. blank 10	56. S14C a	25. blank 10	56. S6B a	25. blank 10	56. A3A a
26. A1A a	57. S2A b	26. S19A a	57. A2A b	26. S13C a	57. S14C b	26. S3B a	57. S6B b	26. S15A a	57. A3A b
27. A1A b	58. QC 8	27. S19A b	58. QC 8	27. S13C b	58. QC 8	27. S3B b	58. QC 8	27. S15A b	58. QC 8
28. QC 4	59. blank 20	28. QC 4	59. blank 20	28. QC 4	59. blank 20	28. QC 4	59. blank 20	28. QC 4	59. blank 20
29. blank 11	60.	29. blank 11	60.	29. blank 11	60.	29. blank 11	60. S13B a	29. blank 11	60. S5C a
30. S1B a	61.	30. S10B a	61.	30. S11B a	61.	30. HB a	61. S13B b	30. S4B a	61. S5C b
31. S1B b	62.	31. S10B b	62.	31. S11B b	62.	31. HB b	62. blank 21	31. S4B b	62. blank 21

Design 2 navazoval na design 1 pro potvrzení hypotézy zadavatele, že dochází ke změnám v obsahu nečistot v roztoku v průběhu času. Vzorky, které byly analyzovány v prvním designu, byly opětovně změřeny, včetně vzorků QC. Vzorky tedy nebyly připraveny ihned před měřením, čímž se zkrátil čas přípravy experimentu. Nedošlo ke změně polarity iontového zdroje, celý experiment byl měřen v módu ESI⁻. Počet vzorků na den již nebyl omezen. Opět proběhla randomizace měření při sestavování sekvence (tabulka 14).

Design 3 byl sestaven odlišně od předchozích designů. Při tvorbě designu se přihlíželo především na správnost metabolomického postupu – tedy příprava i měření vše v jedné šarži za jednotných podmínek. Všechny vzorky byly připraveny před experimentem najednou a již se neprovádělo měření v triplicátu, ale pouze v jednom vzorku kvůli nedostatečnému množství některých tablet. Tablety S1, S18 a A2 nebyly v tomto designu analyzovány, protože již nebyly dostupné. Vzorky QC byly připraveny dle postupu č. 2 (ze všech šarží tablet). Pro přípravu vzorků i sekvenci měření (tabulka 15) byla provedena randomizace.

Tabulka 14 - Sekvence měření v designu 2.

05.04.2020								06.04.2020							
1.	blank 1	34.	blank 12	67.	blank 22	100.	16B a	1.	blank 1	34.	blank 12	67.	blank 22	100.	S8B a
2.	blank 2	35.	S7C a	68.	A1A a	101.	16B b	2.	blank 2	35.	S13B a	68.	S17C a	101.	S8B b
3.	blankový extrakt 1	36.	S7C b	69.	A1A b	102.	blank 32	3.	blankový extrakt 1	36.	S13B b	69.	S17C b	102.	blank 32
4.	blank 3	37.	blank 13	70.	QC 10	103.	A2A a	4.	blank 3	37.	blank 13	70.	QC 10	103.	S3C a
5.	QC 1	38.	S11A a	71.	blank 23	104.	A2A b	5.	QC 1	38.	S16C a	71.	blank 23	104.	S3C b
6.	blank 4	39.	S11A b	72.	S3B a	105.	QC 15	6.	blank 4	39.	S16C b	72.	S10A a	105.	QC 15
7.	S4B a	40.	QC 6	73.	S3B b	106.	blank 33	7.	S3A a	40.	QC 6	73.	S10A b	106.	blank 33
8.	S4B b	41.	blank 14	74.	blank 24	107.	A2C a	8.	S3A b	41.	blank 14	74.	blank 24	107.	S19A a
9.	blank 5	42.	blankový extrakt 2	75.	S18B a	108.	A2C b	9.	blank 5	42.	blankový extrakt 2	75.	S14C a	108.	S19A b
10.	S9B a	43.	blank 15	76.	S18B b	109.	blank 34	10.	S12A a	43.	blank 15	76.	S14C b	109.	blank 34
11.	S9B b	44.	S2C a	77.	QC 11	110.	S11B a	11.	S12A b	44.	S19B a	77.	QC 11	110.	S13A a
12.	QC 2	45.	S2C b	78.	blank 25	111.	S11B b	12.	QC 2	45.	S19B b	78.	blank 25	111.	S13A b
13.	blank 6	46.	blank 16	79.	S2A a	112.	QC 16	13.	blank 6	46.	blank 16	79.	S8A a	112.	QC 16
14.	S5A a	47.	S18A a	80.	S2A b	113.	blank 35	14.	S4 a	47.	S6C a	80.	S8A b	113.	blank 35
15.	S5A b	48.	S18A b	81.	blank 26	114.	A2B a	15.	S4 b	48.	S6C b	81.	blank 26	114.	A1C a
16.	blank 7	49.	QC 7	82.	S1A a	115.	A2B b	16.	blank 7	49.	QC 7	82.	S6B a	115.	A1C b
17.	S12C a	50.	blank 17	83.	S1A b	116.	blank 36	17.	S6A a	50.	blank 17	83.	S6B b	116.	blank 36
18.	S12C b	51.	S12B a	84.	QC 12	117.	S7A a	18.	S6A b	51.	S18C a	84.	QC 12	117.	S5B a
19.	QC 3	52.	S12B b	85.	blank 27	118.	S7A b	19.	QC 3	52.	S18C b	85.	blank 27	118.	S5B b
20.	blank 8	53.	blank 18	86.	S10B a	119.	QC 17	20.	blank 8	53.	blank 18	86.	S10C a	119.	QC 17
21.	S2B a	54.	A3C a	87.	S10B b	120.	blank 37	21.	S1B a	54.	S1C a	87.	S10C b	120.	blank 37
22.	S2B b	55.	A3C b	88.	blank 28	121.	HC a	22.	S1B b	55.	S1C b	88.	blank 28	121.	S16A a
23.	blank 9	56.	QC 8	89.	S13C a	122.	HC b	23.	blank 9	56.	QC 8	89.	S15C a	122.	S16A b
24.	A3B a	57.	blank 19	90.	S13 b	123.	blank 38	24.	S8C a	57.	blank 19	90.	S15C b	123.	blank 38
25.	A3B b	58.	S11C a	91.	QC 13	124.	S7B a	25.	S8C b	58.	S14B a	91.	QC 13	124.	S19C a
26.	QC 4	59.	S11C b	92.	blank 29	125.	S7B b	26.	QC 4	59.	S14B b	92.	blank 29	125.	S19C b
27.	blank 10	60.	blank 20	93.	S9A a	126.	blank 39	27.	blank 10	60.	blank 20	93.	A1B a	126.	QC 18
28.	S17A a	61.	S17B a	94.	S9A b			28.	S15B a	61.	S4C a	94.	A1B b	127.	blank 39
29.	S17A b	62.	S17B b	95.	blank 30			29.	S15B b	62.	S4C b	95.	blank 30	128.	S15A a
30.	blank 11	63.	QC 9	96.	A3A a			30.	blank 11	63.	QC 9	96.	HB a	129.	S15A b
31.	HA a	64.	blank 21	97.	A3A b			31.	S14A a	64.	blank 21	97.	HB b	130.	blank 40
32.	HA b	65.	S9C a	98.	QC 14			32.	S14A b	65.	S5C a	98.	QC 14		
33.	QC 5	66.	S9C b	99.	blank 31			33.	QC 5	66.	S5C b	99.	blank 31		

Tabulka 15 - Sekvence měření v designu 3.

09.04.2020					
1.	blank 1	34.	S10 b	67.	QC 11
2.	blank 2	35.	blank 13	68.	blank 23
3.	blankový extrakt 1	36.	S14 a	69.	blankový extrakt 3
4.	blank 3	37.	S14 b	70.	blank 24
5.	QC 1	38.	QC 6	71.	S13 a
6.	blank 4	39.	blank 14	72.	S13 b
7.	euthyrox H a	40.	blankový extrakt 2	73.	QC 12
8.	euthyrox H b	41.	blank 15	74.	blank 25
9.	blank 5	42.	S12 a	75.	S2 a
10.	QC 2	43.	S12 b	76.	S2 b
11.	blank 6	44.	blank 16	77.	blank 26
12.	A4 a	45.	QC 7	78.	S17 a
13.	A4 b	46.	blank 17	79.	S17 b
14.	blank 7	47.	S7 a	80.	QC 13
15.	A1 a	48.	S7 b	81.	blank 27
16.	A1 b	49.	blank 18	82.	S19 a
17.	QC 3	50.	M a	83.	S19 b
18.	blank 8	51.	M b	84.	blank 28
19.	S11 a	52.	QC 8	85.	S1 a
20.	S11 b	53.	blank 19	86.	S1 b
21.	blank 9	54.	S16 a	87.	QC 14
22.	S3 a	55.	S16 b	88.	blank 29
23.	S3 b	56.	blank 20	89.	S4 a
24.	QC 4	57.	S6 a	90.	S4 b
25.	blank 10	58.	S6 b	91.	blank 30
26.	S9 a	59.	QC 9	92.	S8 a
27.	S9 b	60.	blank 21	93.	S8 b
28.	blank 11	61.	S15 a	94.	QC 15
29.	S5 a	62.	S15 b	95.	blank 31
30.	S5 b	63.	QC 10	96.	blankový extrakt 4
31.	QC 5	64.	blank 22	97.	blank 32
32.	blank 12	65.	A3 a		
33.	S10 a	66.	A3 b		

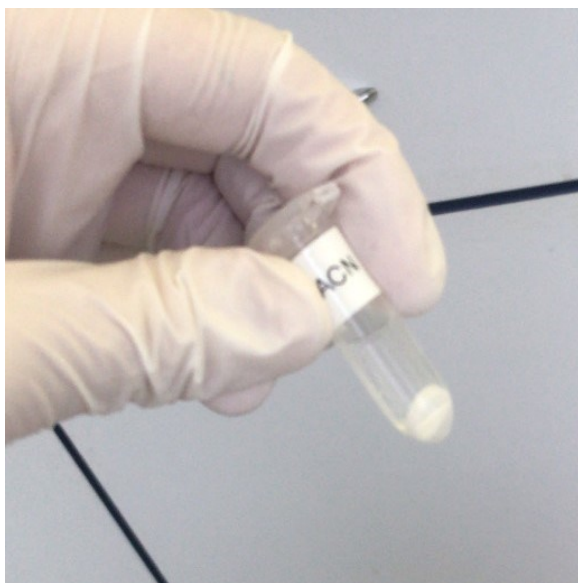
5. Výsledky a diskuze

5.1 Optimalizace metabolického postupu

Optimalizace experimentu byla značně omezená vzhledem k požadavkům zadavatele. Postup analýzy a metoda UHPLC-HRMS byly pevně dány. Mohly být tedy provedeny změny v přípravě vzorků tablet a v přípravě roztoku interního standardu.

5.1.1 Příprava vzorku

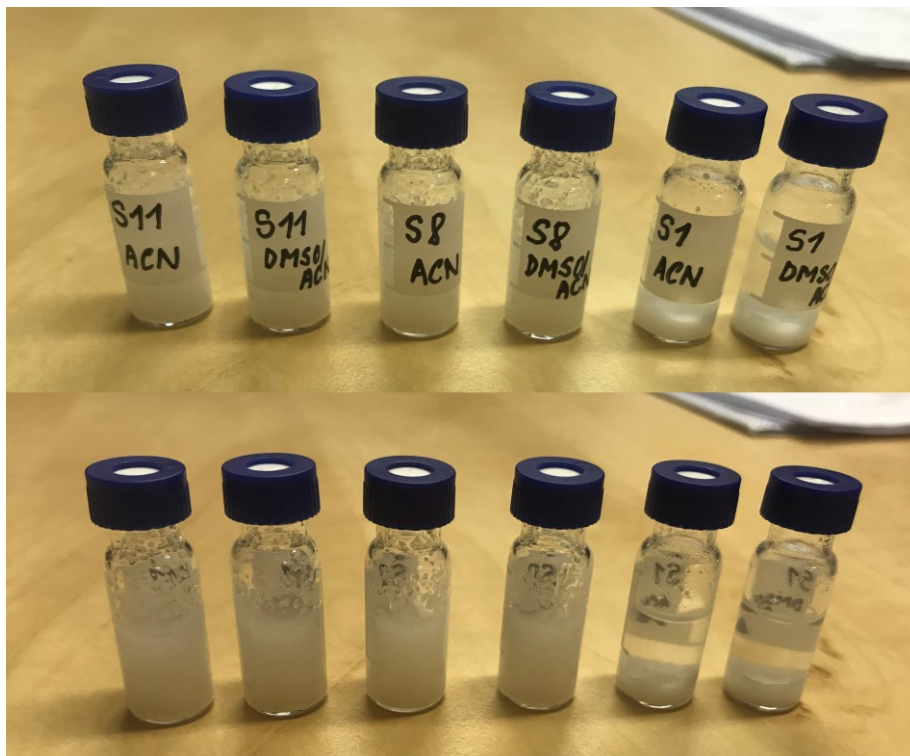
Z důvodu ne příliš dobré kompatibility DMSO s hmotnostní spektrometrií a bodu tuhnutí 18,5 °C [109], byly provedeny pokusy o rozpuštění tablet v ACN. První pokusy o rozpuštění tablet nepřinesly žádný úspěch. (obrázek 17). Pro další pokusy byla prodloužena doba sonifikace na 60 minut, z původních 30 minut, pro alespoň částečné rozpuštění.



Obrázek 17 - Nerozpuštěná tableta v ACN.

Později se přistoupilo na pokus kombinace DMSO jako rozpouštědla vzorku a ACN jako ředícího rozpouštědla. Porovnávalo se rozpouštění tří šarží tablet v duplikátech. Jedna tableta ze šarže byla smíchána s DMSO a jedna s ACN. U tablet smíchaných s ACN se prodloužila doba sonifikace téměř na dvojnásobek (50 min), avšak tablety nebyly zcela rozpuštěny. Po stočení na centrifuze byly supernatanty

jednotlivých tablet ředěny 1:10 ACN. Obsah všech vialek se po přidání ACN srazil (obrázek 18).



Obrázek 18 - Rozpustnost tablet v ACN a v DMSO/ACN.

Pro vlastní experiment byl jako rozpouštědlo vzorku použit DMSO dle protokolu zadavatele, ACN byl zcela vyloučen.

5.1.2 Příprava roztoku IS

Standard Levothyroxinu byl při optimalizaci metody rozpouštěn v ACN i v DMSO s úspěchem a nedocházelo ke srážení. Vzhledem k postupu přípravy vzorků byl jako ředící rozpouštědlo použit DMSO.

5.1.3 Analyzované sloučeniny

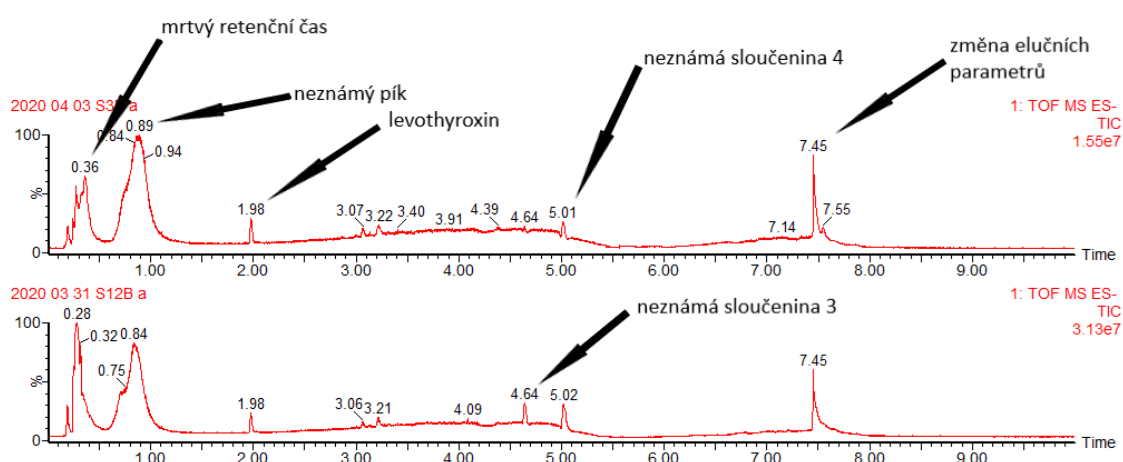
Dle parametrů zadavatele byly hledány analyty adukt Levo-laktóza 1, adukt Levo-laktóza 2, supramolekulární komplex levothyroxin-laktóza a stearát mannitolu. Při přípravě experimentu a optimalizaci metody nebyla nalezena sloučenina supramolekulární komplex levothyroxin-laktóza. Došlo se tedy k závěru, že se pravděpodobně jednalo o artefakt vznikající v iontovém zdroji při měření zadavatele.

Při analýze dat z optimalizace byly ve vzorcích opakovaně nalezeny látky, které nebyly v zadání zadavatele zmíněny (m/z 480,309, m/z 504,309, m/z 594,397, m/z 650,46). Tyto sloučeniny byly přidány do seznamu hledaných analytů při přípravě dat a jejich obsahy byly použity při analýze PCA. Identifikace látek nebyla prozatím provedena.

5.2 Cílená analýza nečistot a jejich semikvantitativní zhodnocení

Cílená analýza nečistot byla provedena v designech 1 a 2 dle požadavků zadavatele.

Chromatogramy designu 1 jsou znázorněny na obrázku 19, na kterém jsou i popsány známé píky. Horní chromatogram je tablety S3, která je s obsahem laktózy, a spodní chromatogram je tablety S12 s obsahem mannitolu.



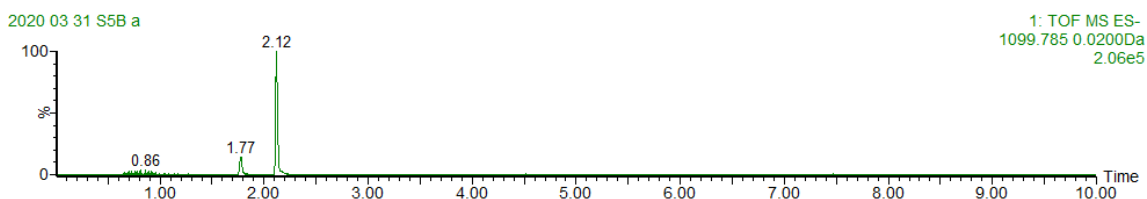
Obrázek 19 – Celkový iontový chromatogram tablety s obsahem laktózy (S3, horní chromatogram) a tablety s obsahem mannitolu (S12, dolní chromatogram) v designu 1.

Při přípravě experimentu nebyl v laktózových tabletách nalezen stearát mannitolu, a v mannitolových tabletách nebyly nalezeny adukty Levo-laktóza. Tablety byly tedy rozděleny do dvou skupin dle účinné látky.

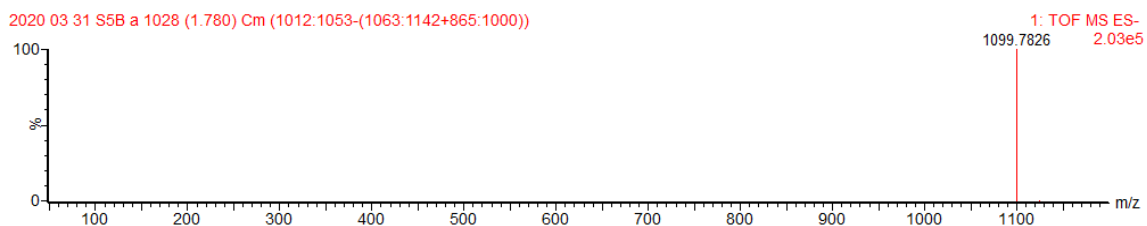
5.2.1 Tablety s laktózou

Hledanými nečistotami byl adukt Levo-laktóza 1 a adukt Levo-laktóza 2.

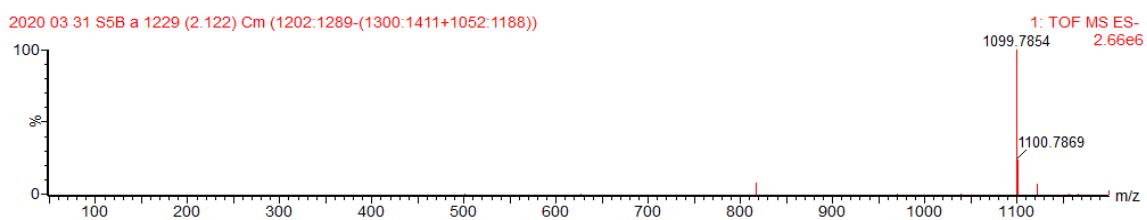
Z TIC tablety S5 byl extrahován XIC pro adukty Levo-laktóza měřené dle designu 1 (obrázek 20). Z XIC bylo získáno spektrum pro pík v čase 1,77 (adukt Levo-laktóza 1; obrázek 21) a pro pík v čase 2,12 (adukt Levo-laktóza 2; obrázek 22). Průběh chromatogramu i spektrum byly v designu 2 totožné s designem 1, proto nejsou tato data znovu uvedena.



Obrázek 20 – Extrahovaný iontový chromatogram tablety S5 pro adukty Levo-laktóza v designu 1.



Obrázek 21 - Spektrum v čase 1,78 min (adukt Levo-laktóza 1) tablety S5 měřené dle designu 1.



Obrázek 22 - Spektrum v čase 2,12 min (adukt Levo-laktóza 2) tablety S5 měřené dle designu 1.

V tabulkách 16 – 22 jsou pod sebou seřazeny relativní obsahy A, B a C (dle tablety) laktózových aduktů v procentech z designu 1 a 2. Dále jsou uvedeny aritmetické průměry \bar{x} , směrodatné odchylky s a relativní směrodatné odchylky RSD.

Tabulka 16 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S1.

S1						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
adukt Levo-laktóza 1	2,25	2,33	2,33	2,30	0,05	2,12
adukt Levo-laktóza 2	5,60	1,70	9,34	5,55	3,82	68,81
Design 2						
adukt Levo-laktóza 1	2,15	2,25	2,62	2,34	0,25	10,52
adukt Levo-laktóza 2	7,91	9,40	14,75	10,69	3,60	33,68

Tabulka 17 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S2.

S2						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
adukt Levo-laktóza 1	2,57	5,06	1,92	3,19	1,66	51,98
adukt Levo-laktóza 2	17,88	28,56	12,44	19,63	8,20	41,79
Design 2						
adukt Levo-laktóza 1	2,80	5,14	1,86	3,26	1,69	51,79
adukt Levo-laktóza 2	21,00	28,29	14,22	21,17	7,04	33,24

Tabulka 18 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S3.

S3						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
adukt Levo-laktóza 1	1,30	0,97	1,02	1,10	0,18	16,52
adukt Levo-laktóza 2	11,87	1,70	4,02	5,86	5,33	90,89
Design 2						
adukt Levo-laktóza 1	1,62	1,09	1,26	1,32	0,27	20,47
adukt Levo-laktóza 2	16,10	4,07	6,73	8,97	6,32	70,46

Tabulka 19 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S4.

S4						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
adukt Levo-laktóza 1	1,67	1,46	1,47	1,53	0,12	7,78
adukt Levo-laktóza 2	12,94	6,02	5,10	8,02	4,28	53,43
Design 2						
adukt Levo-laktóza 1	1,96	1,32	1,53	1,60	0,33	20,58
adukt Levo-laktóza 2	17,38	7,59	9,73	11,57	5,15	44,50

Tabulka 20 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S5.

S5						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
adukt Levo-laktóza 1	1,16	1,28	1,30	1,24	0,07	5,70
adukt Levo-laktóza 2	2,05	7,45	6,21	5,24	2,83	53,99
Design 2						
adukt Levo-laktóza 1	1,11	1,30	1,20	1,20	0,10	8,00
adukt Levo-laktóza 2	6,53	13,09	9,04	9,56	3,31	34,64

Tabulka 21 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S19.

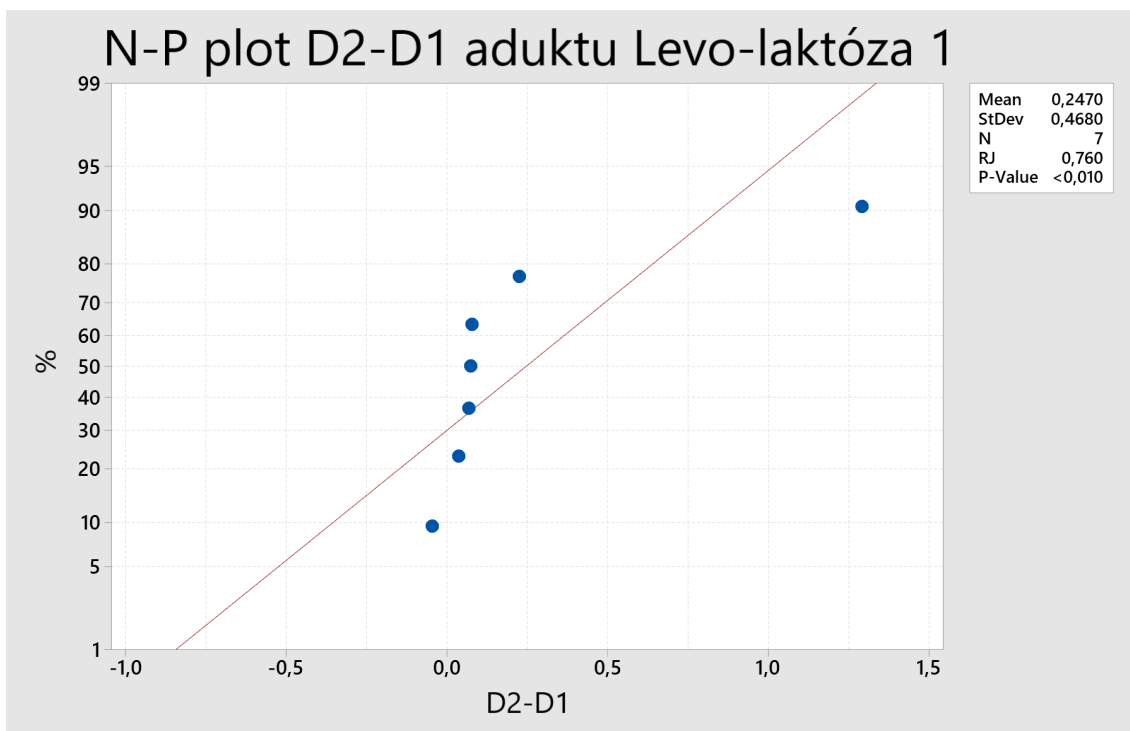
S19						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
adukt Levo-laktóza 1	0,73	0,74	0,82	0,77	0,05	6,72
adukt Levo-laktóza 2	3,73	6,45	6,30	5,49	1,53	27,81
Design 2						
adukt Levo-laktóza 1	0,78	0,95	0,79	0,84	0,09	11,17
adukt Levo-laktóza 2	8,87	9,88	8,43	9,06	0,74	8,18

Tabulka 22 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu A1.

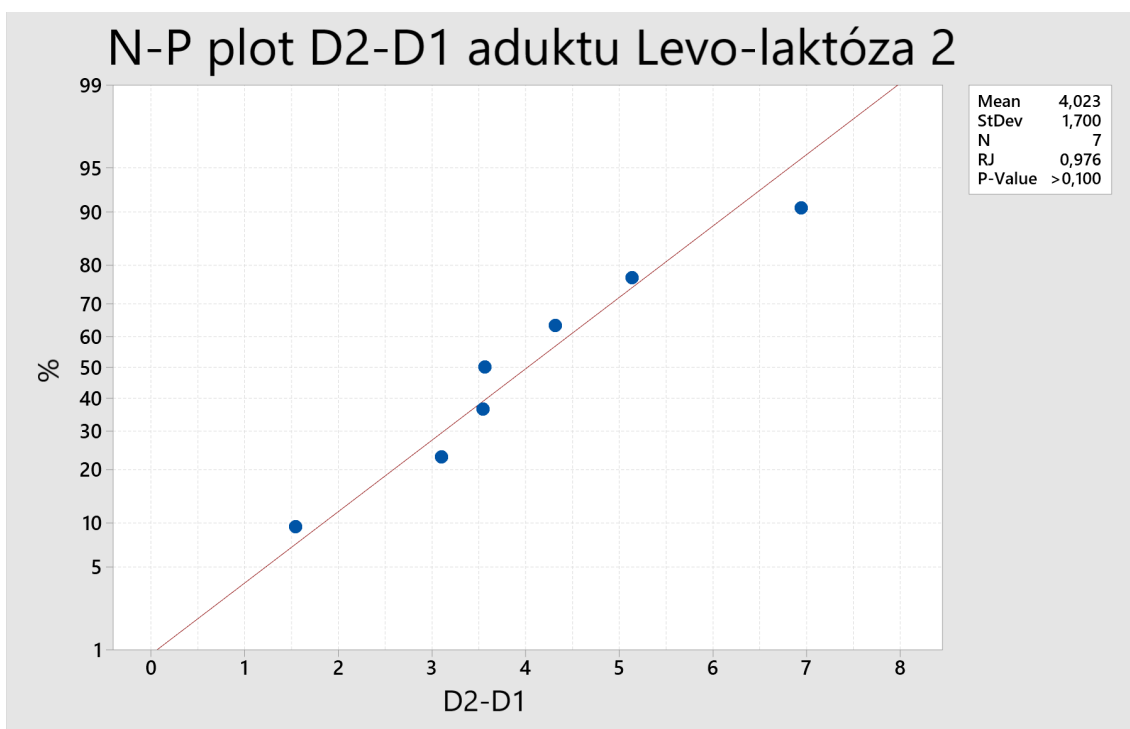
A1						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	sD	RSD
Design 1						
adukt Levo-laktóza 1	2,07	2,23	2,17	0,77	0,08	3,90
adukt Levo-laktóza 2	7,23	8,31	8,39	5,49	0,65	8,10
Design 2						
adukt Levo-laktóza 1	2,07	2,14	1,96	2,06	0,09	4,54
adukt Levo-laktóza 2	11,81	12,88	12,64	12,44	0,56	4,51

Pro statistické zhodnocení rozdílu průměrných obsahů aduktu Levo-laktóza 1 mezi designy bylo nejprve provedeno testování předpokladu normality (N-P plot, obrázek 23). Hodnota p byla vypočtena na 0,01 a rozdíly v obsahu nečistot nesplňovaly podmínky normálního rozdělení. Bylo třeba použít neparametrický Wilcoxonův test. Pomocí Wilcoxonova testu nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi designy. Designy byly zhodnoceny jako shodné v relativním obsahu aduktu Levo-laktóza 1.

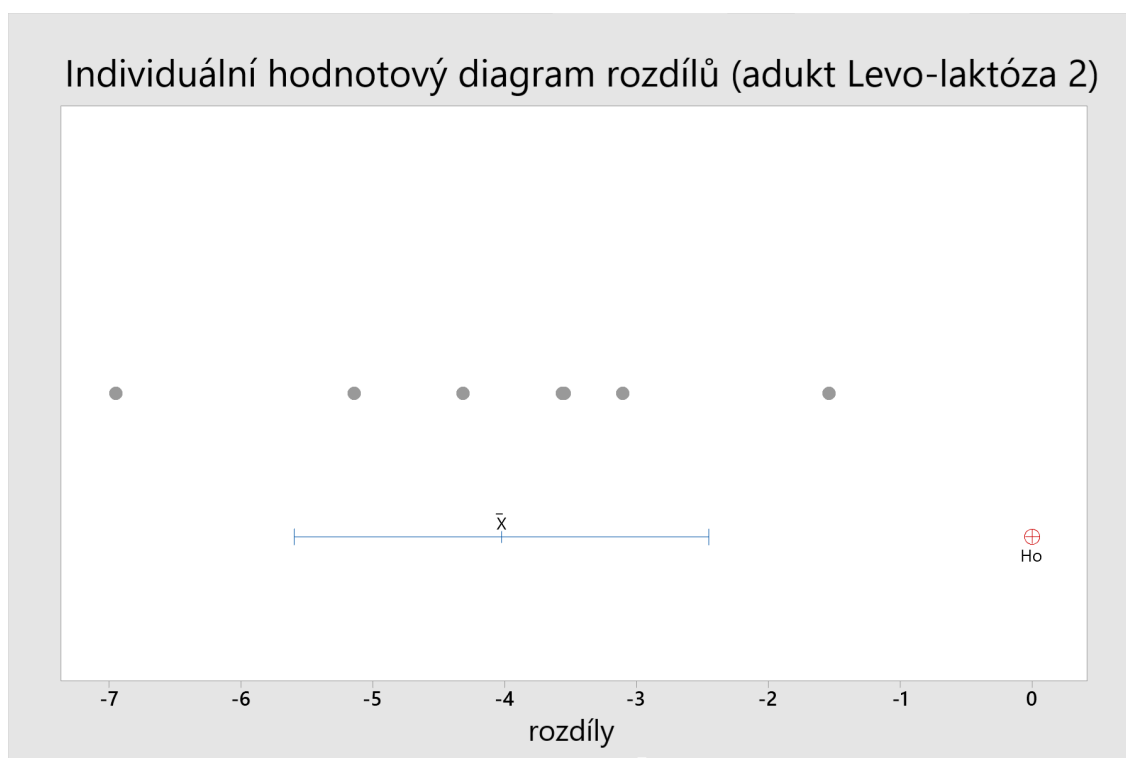
V případě aduktu Levo-laktóza 2 bylo nalezeno normální rozdělení hodnot ($p=0,1$; obrázek 24) a pomocí párového t-testu byly nalezeny statisticky významné rozdíly pro relativní koncentrace aduktu Levo-laktóza 2 mezi designy (obrázek 25).



Obrázek 23 – N-P plot pro hodnoty rozdílů mezi designy D2 a D1 aduktu Levo-laktóza 1.



Obrázek 24 – N-P plot pro hodnoty rozdílů mezi designy D2 a D1 aduktu Levo-laktóza 2.



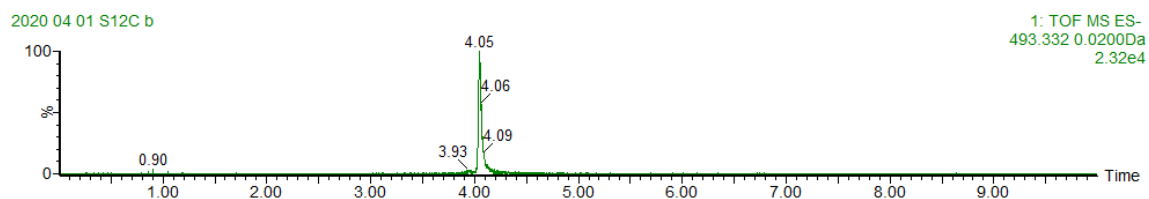
Obrázek 25 - Párový t-test pro rozdíly hodnot aduktu Levo-laktóza 2. H_0 je označení pro nulovou hypotézu, která nebyla tímto testem potvrzena.

Metoda byla potvrzena pomocí jednotlivých (nezprůměrovaných) hodnot obsahů nečistot.

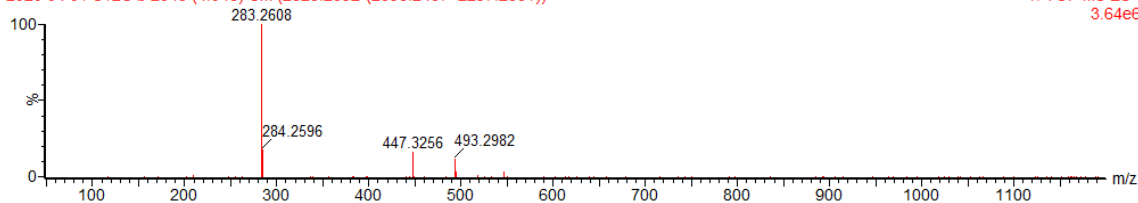
5.2.2 Tablety s mannitolem

Hledanými nečistotami byl stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$ a $[M-H]^-$.

Z TIC tablety S12 byl extrahován XIC pro stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$ měřeného dle designu 1 (obrázek 26). Z XIC bylo získáno spektrum pro pík v čase 4,11 (obrázek 27). Ve spektru byl nalezen i iont $[M-H]^-$ díky stejnému retenčnímu času. Průběh chromatogramu i spektrum byly v designu 2 shodné s designem 1, proto nejsou tato data znovu prezentována.



Obrázek 26 – Extrahovaný iontový chromatogram šarže S12 pro stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$ v designu 1.



Obrázek 27 - Spektrum v čase 4,04 (stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$ a $[M-H]^-$) měřené dle designu 1.

Stejně jako v případě laktózových tablet jsou v tabulkách 23 – 38 pod sebou seřazeny relativní obsahy A, B a C (dle tablety) stearátů mannitolu z designu 1 a 2. Dále jsou uvedeny aritmetické průměry \bar{x} , směrodatné odchylky s a relativní směrodatné odchylky RSD.

Tabulka 23 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S6.

S6						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$	1,81	1,35	1,65	1,60	0,24	14,82
stearát mannitolu $[M-H]^-$	2,64	2,19	2,30	2,38	0,23	9,72
Design 2						
stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$	1,61	1,71	1,42	1,58	0,15	9,44
stearát mannitolu $[M-H]^-$	2,51	2,53	2,11	2,38	0,24	10,04

Tabulka 24 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S7.

S7						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$	1,52	1,76	1,55	1,61	0,13	8,10
stearát mannitolu $[M-H]^-$	2,32	2,62	2,34	2,43	0,17	6,91
Design 2						
stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$	1,72	1,58	1,53	1,61	0,10	6,02
stearát mannitolu $[M-H]^-$	2,65	2,41	2,37	2,48	0,15	6,24

Tabulka 25 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S8.

S8						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$	1,13	1,16	0,86	1,05	0,17	15,81
stearát mannitolu $[M-H]^-$	1,71	1,76	1,35	1,61	0,23	14,13
Design 2						
stearát mannitolu $[M+HCOO]^-$	1,08	1,13	1,05	1,09	0,04	3,76
stearát mannitolu $[M-H]^-$	1,64	1,69	1,59	1,64	0,05	3,09

Tabulka 26 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S9.

S9						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	1,12	1,00	1,11	1,08	0,07	6,19
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,73	1,49	1,64	1,62	0,13	7,75
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	1,08	1,00	1,09	1,05	0,05	4,82
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,66	1,48	1,63	1,59	0,10	6,22

Tabulka 27 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S10.

S10						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	1,05	1,06	0,98	1,03	0,04	4,04
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,58	1,65	1,61	1,61	0,03	2,15
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	1,01	1,04	1,17	1,07	0,08	7,79
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,55	1,62	1,73	1,63	0,09	5,52

Tabulka 28 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S11.

S11						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	1,26	1,06	0,89	1,07	0,18	17,02
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,71	1,69	1,34	1,58	0,21	13,12
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,99	1,05	0,95	1,00	0,05	5,19
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,46	1,58	1,42	1,49	0,08	5,68

Tabulka 29 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S12.

S12						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,91	1,21	1,35	1,16	0,22	19,36
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,46	1,88	1,93	1,76	0,26	14,68
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,99	1,09	1,07	1,05	0,06	5,35
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,56	1,81	1,64	1,67	0,13	7,59

Tabulka 30 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S13.

S13						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,35	0,31	0,47	0,38	0,08	21,73
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,54	0,52	0,72	0,59	0,11	18,78
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,32	0,37	0,44	0,38	0,06	15,81
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,52	0,61	0,65	0,59	0,07	11,26

Tabulka 31 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S14.

S14						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,44	0,33	0,33	0,37	0,07	17,86
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,69	0,54	0,56	0,60	0,08	13,88
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,40	0,36	0,35	0,37	0,03	6,87
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,67	0,58	0,59	0,61	0,05	8,27

Tabulka 32 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S15.

S15						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,41	0,41	0,33	0,38	0,04	11,39
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,63	0,66	0,57	0,62	0,04	7,22
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,38	0,43	0,42	0,41	0,03	6,77
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,60	0,67	0,67	0,65	0,04	6,21

Tabulka 33 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S16.

S16						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,18	x	0,26	x	x	x
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,44	0,38	0,47	0,43	0,05	10,96
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	x	0,42	x	x	x	x
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,69	0,80	0,50	0,67	0,15	22,50

Tabulka 34 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S17.

S17						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,21	x	0,28	x	x	x
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,43	0,38	0,44	0,42	0,03	8,12
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	x	0,97	x	x	x	x
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,35	1,57	0,32	0,74	0,71	95,88

Tabulka 35 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu S18.

S18						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,36	x	0,36	x	x	x
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,61	x	0,66	x	x	x
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	x	x	0,97	x	x	x
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,55	0,90	1,76	1,41	0,45	31,76

Tabulka 36 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu A2.

A2						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	1,02	0,97	1,11	1,03	0,07	6,88
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,53	1,51	1,63	1,56	0,06	4,09
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	1,00	1,16	1,21	1,12	0,11	9,47
stearát mannitolu [M-H] ⁻	1,52	1,72	1,75	1,66	0,12	7,44

Tabulka 37 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu A3.

A3						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,47	0,61	0,37	0,48	0,12	25,71
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,71	0,87	0,59	0,72	0,14	19,51
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,51	0,42	0,42	0,45	0,05	12,07
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,77	0,65	0,74	0,72	0,06	8,43

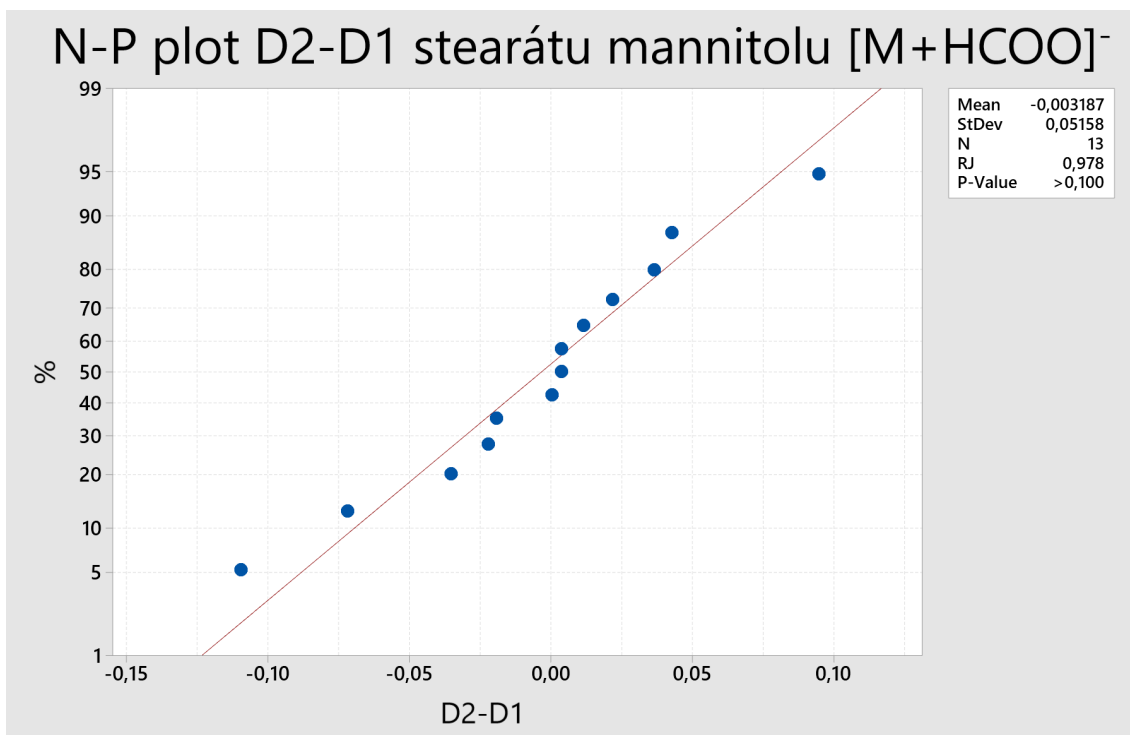
Tabulka 38 - Porovnání obsahu nečistot mezi designy 1 a 2 pro tabletu H.

H						
	A [%]	B [%]	C [%]	\bar{x}	s	RSD
Design 1						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,45	0,38	0,55	0,46	0,09	18,50
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,75	0,63	0,84	0,74	0,11	14,53
Design 2						
stearát mannitolu [M+HCOO] ⁻	0,43	0,42	0,57	0,47	0,08	17,82
stearát mannitolu [M-H] ⁻	0,73	0,66	0,91	0,76	0,13	16,91

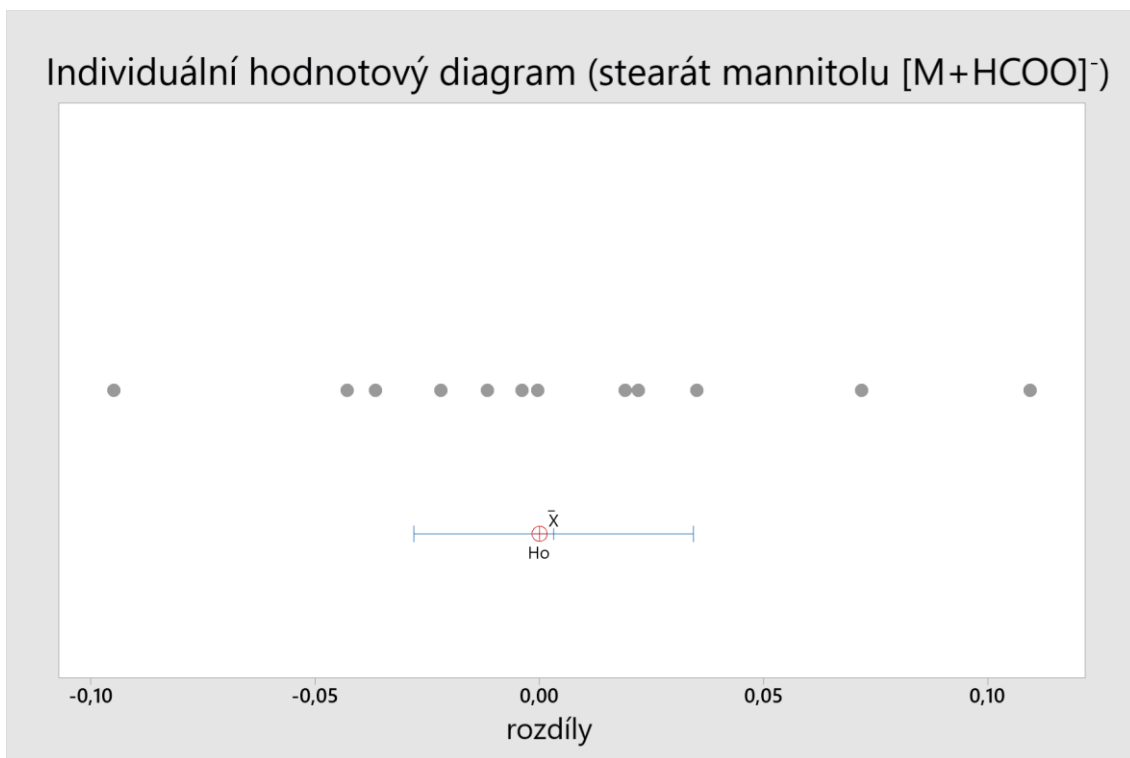
V případech tablet S16 – S18 (tabulka 33 – 35) nebyly ve všech případech stanoveny relativní obsahy. Důvodem je, že plocha pod píkem příslušné nečistoty v dané tabletě nesplňovala limit LOD.

Pro statistické zhodnocení rozdílů průměrných obsahů stearátu mannitolu na základě iontu [M+HCOO]⁻ mezi designy bylo nejprve provedeno testování předpokladu normality. Hodnota p byla vypočtena na 0,1 (obrázek 28), a tak byla splněna podmínka normálního rozdělení. Použitím párového t-testu (obrázek 29) nebyl mezi designy nalezen rozdíl. Designy jsou v relativním obsahu iontu [M+HCOO]⁻ shodné.

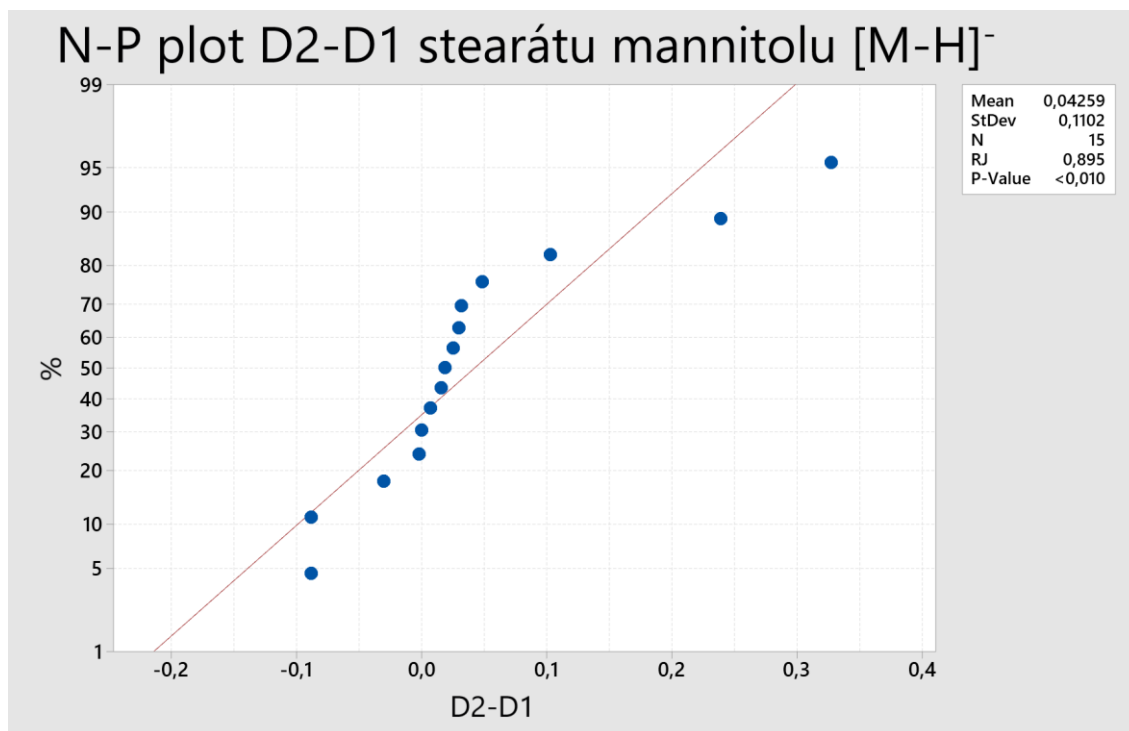
V případě rozdílů průměrných relativních obsahů stearátu mannitolu na základě iontu [M-H]⁻ mezi designy nebylo nalezeno normální rozdělení (p=0,01; obrázek 30) a bylo nutno provést neparametrický Wilcoxonův test. Z výsledku testu bylo stanoveno, že stejně jako v případě obsahu iontu [M+HCOO]⁻, nebyl mezi designy nalezen statisticky významný rozdíl a designy jsou shodné v relativním obsahu iontu [M-H]⁻.



Obrázek 28 – N-P plot pro hodnoty rozdílů mezi designy D2 a D1 stearátu mannitolu na základě iontu [M+HCOO]⁻.



Obrázek 29 - Párový t-test pro rozdíly hodnot stearátu mannitolu na základě iontu [M+HCOO]⁻. H_0 je označení pro nulovou hypotézu, která byla tímto testem potvrzena.



Obrázek 30 – N-P plot pro hodnoty rozdílů mezi designy D2 a D1 stearátu mannitolu na základě iontu [M-H]⁻.

Metoda byla potvrzena pomocí jednotlivých (nezprůměrovaných) hodnot obsahů.

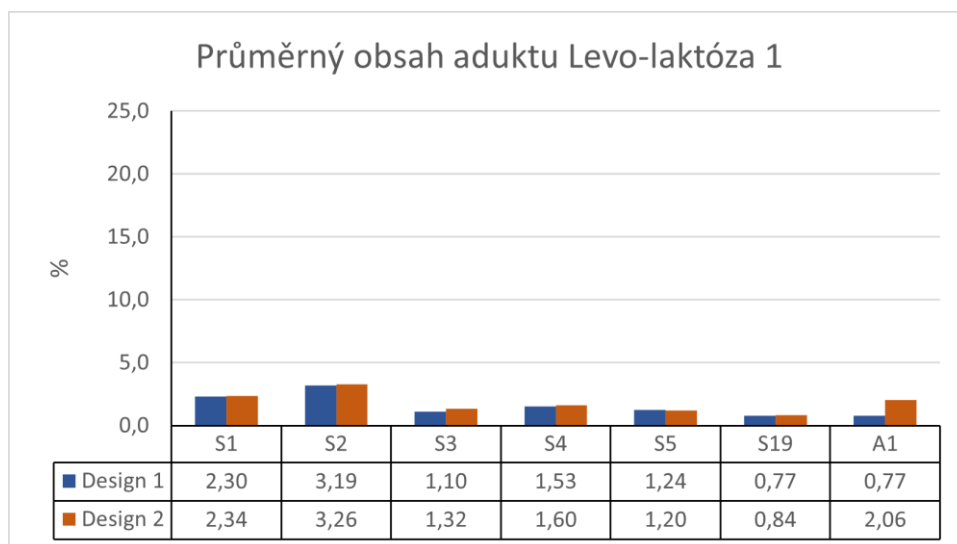
5.2.3 Zhodnocení obsahu nečistot

Směrnice Q3B(R2) [61] stanovuje limity nečistot v léčivých přípravcích.

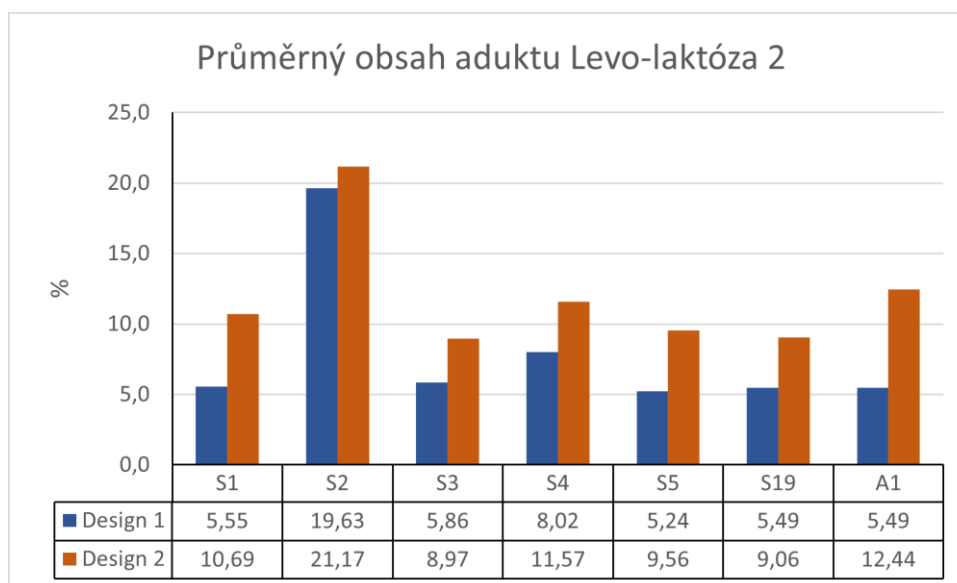
Obvyklá denní dávka levothyroxinu sodné soli je pro dospělého člověka 50 - 200 $\mu\text{g}/\text{den}$ [110]. Pro tuto dávku jsou limity dle Q3B(R2) následující: limit nahlášení 0,10 %; limit identifikace 1,0 %; limit kvalifikace 1,0 %.

Tato práce byla provedena jako semikvantitativní hodnocení. Relativní obsahy nečistot byly stanoveny na základě poměru plochy pod píkem dané sloučeniny a plochy pod píkem levothyroxinu stejného nástřiku. V designu 1 a 2 byly tablety měřeny v triplikátu a v následující kapitole se pracuje se zprůměrovanými obsahy (\bar{x}) ze všech tří replikátů. Směrnice Q3B(R2) uvádí limity i v hodnotách TDI, které nemohly být stanoveny, protože se jedná o přesné obsahy nečistot. Pro přesné kvantitativní hodnocení by bylo třeba analýzu provést s pomocí izotopově značených standardů levothyroxinu a stanovovaných nečistot a stanovit přesný obsah těchto látek v jednotlivých tabletách.

Relativní obsah nečistoty adukt Levo-laktóza 1 je shrnut v grafu na obrázku 31, obsah nečistoty adukt Levo-laktóza 2 v grafu na obrázku 32. Z grafů je patrné, že obsah aduktu Levo-laktóza 1 byl celkově menší (max. hodnota 3,19 %) než obsah aduktu Levo-laktóza 2 (max. hodnota 21,17 %).



Obrázek 31 - Porovnání průměrného relativního obsahu aduktu Levo-laktóza 1 v designu 1 a 2.



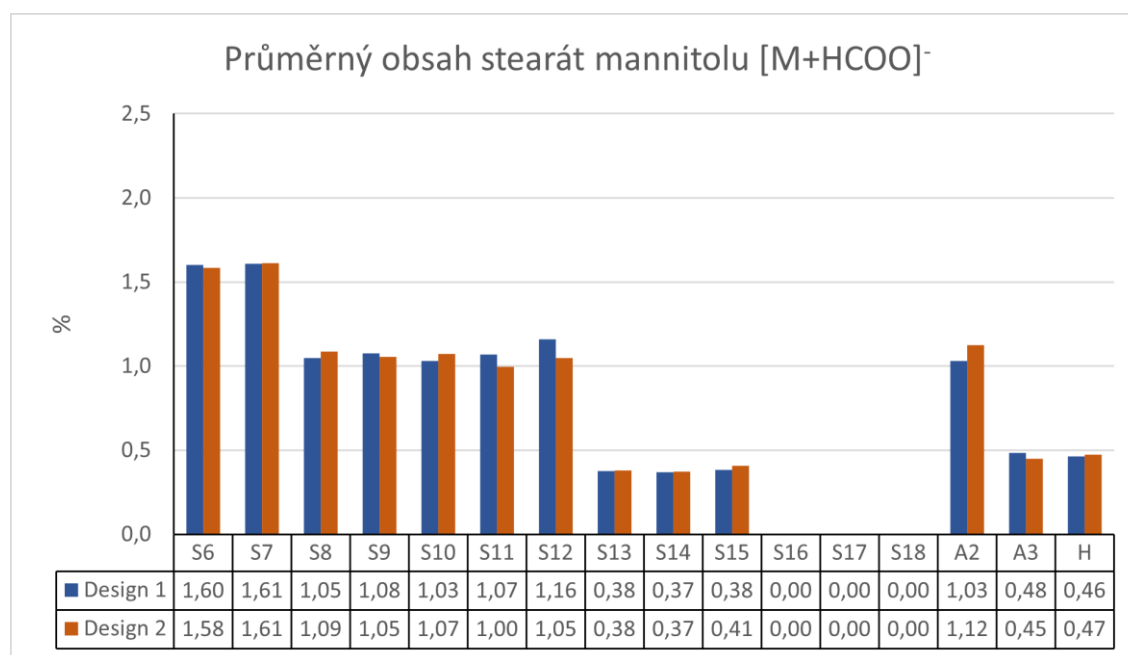
Obrázek 32 - Porovnání průměrného relativního obsahu aduktu Levo-laktóza 2 v designu 1 a 2.

Ve všech případech byly limity dané směrnici Q3B překročeny.

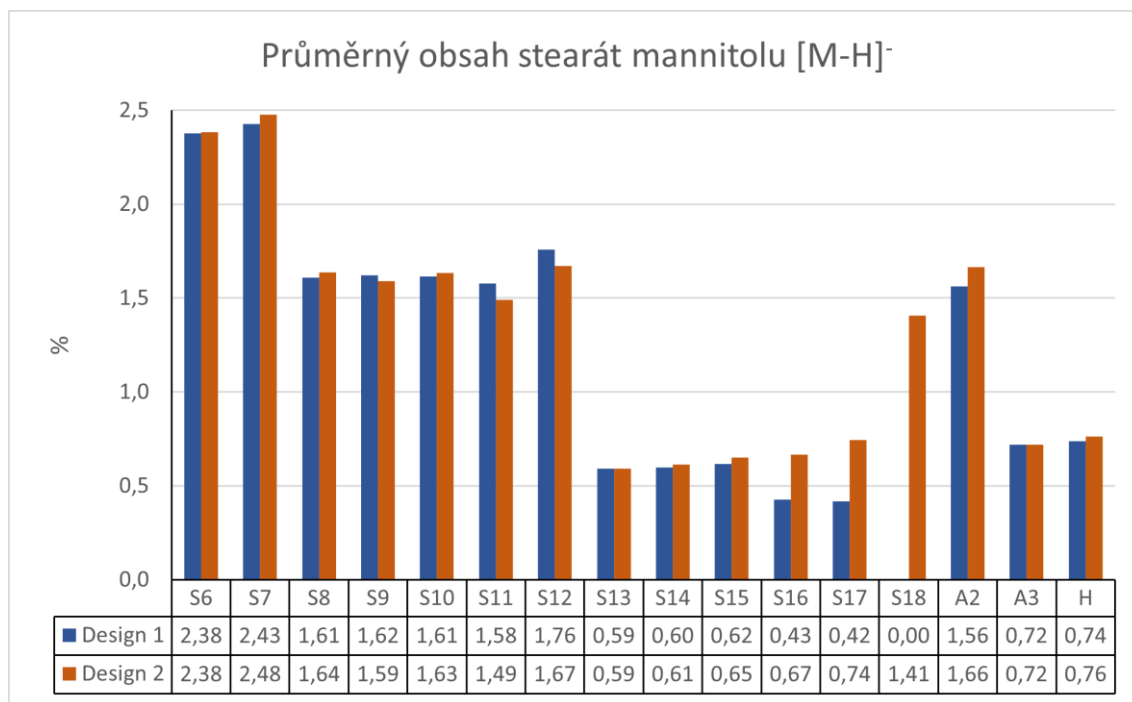
V případě aduktu Levo-laktóza 2 byl z grafu patrný nárůst mezi designy. Tento fakt potvrdila i statistická analýza, která mezi designy našla statisticky významné rozdíly. Vzorky byly mezi designy skladovány za laboratorní teploty kvůli zamrznání

DMSO při nižších teplotách. Zvýšení relativního obsahu tohoto degradačních produktu potvrzuje hypotézu zadavatele, tedy že dochází ke změnám v složení v průběhu času. Naše měření ovšem stanovuje pouze relativní obsah vzhledem k levothyroxinu, což mohlo statistiku zkreslit, protože úměrně příbytku aduktů by ubývalo levothyroxinu. Pro přesné rozdíly před a po skladování je třeba stanovit přesný obsah levothyroxinu i jeho nečistot pomocí interních standardů.

Relativní obsah nečistoty stearát mannitolu na základě iontu $[M+HCOO]^-$ je shrnut v grafu na obrázku 33, obsah nečistoty stearát mannitolu na základě iontu $[M-H]^-$ v grafu na obrázku 34. Maximální obsah iontů nečistoty se lišil podstatně méně než v případě laktózových nečistot (iont $[M+HCOO]^-$ max. 1,61 % a iont $[M-H]^-$ max. 2,48 %).



Obrázek 33 - Porovnání průměrného relativního obsahu stearát mannitolu na základě iontu $[M+HCOO]^-$ v designu 1 a 2.



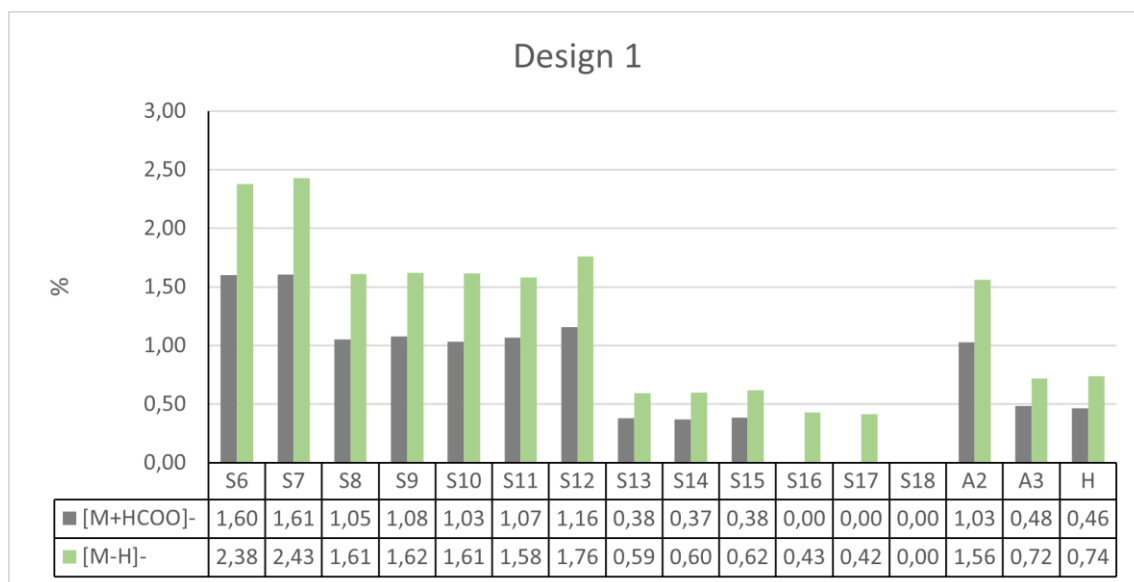
Obrázek 34 - Porovnání průměrného relativního obsahu stearát mannitolu na základě iontu [M-H]⁻ v designu 1 a 2.

Tablety S16-S18 nebyly v případě iontu [M+HCOO]⁻ ve statistice zhodnoceny. Problémem bylo, že v některých tabletách (či pouze v jednom nástřiku dané tablety) nedosáhl obsah nečistoty limitu detekce, a tak nemohla být provedena statistická analýza. V případě iontu [M-H]⁻ nedošlo ke stanovení v tabletě S18 v designu 1. Pro lepší zhodnocení těchto tablet poslouží další analýzy dat této práce.

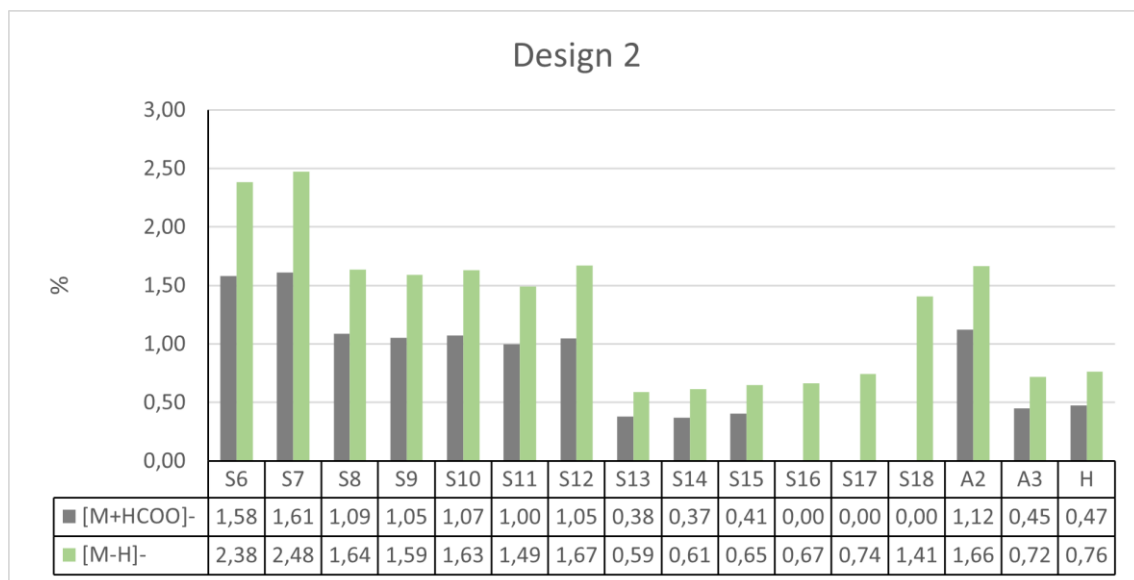
Ačkoliv byly pozorovány na první pohled nižší obsahy mannitolových nečistot než v případě laktózových nečistot, limity stanovené směrnici Q3B nebyly ve všech případech splněny. Mezi designy však nebyly pozorovány výrazné změny, což potvrdila i statistická analýza, a došlo se k závěru, že sloučenina byla ve vzorcích od přípravy vzorků tablet stabilní a její koncentrace nevykazovala změny za použitých laboratorních podmínek.

Ionty stearátu mannitolu se liší svým vznikem v iontovém zdroji. Iont [M+HCOO]⁻ vzniká adicí kyseliny mravenčí k molekule stearátu mannitolu, iont [M-H]⁻ vzniká deprotonací molekuly stearát mannitolu. Rozdíl v m/z těchto dvou iontů je 46,0055. Jelikož se jedná o jednu látku, relativní obsahy těchto iontů by měly být v jednotlivých tabletách stejné. Na obrázku 35 jsou znázorněna porovnání relativních

obsahů těchto iontů v jednotlivých tabletách. Při vyloučení tablet S16 – S18 byl průměrný relativní obsah iontu $[M-H]^-$ o 0,47 % vyšší, než průměrný relativní obsah iontu $[M+HCOO]^-$. V případě designu 2 (obrázek 36) byl také pozorován vyšší průměrný relativní obsah iontu $[M-H]^-$, a to o 0,48 %.



Obrázek 35 - Porovnání průměrných relativních obsahů iontů mannitolu stearátu v jednotlivých tabletách v designu 1.



Obrázek 36 - Porovnání průměrných relativních obsahů iontů mannitolu stearátu v jednotlivých tabletách v designu 2.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem nehodnotíme semikvantitativní hodnocení jako vhodný postup profilování nečistot, protože nezohledňuje změny v obsahu levothyroxinu, ke kterému jsou relativní obsahy nečistot vztaženy. Pro přesné stanovení těchto nečistot je třeba použít izotopově značené standardy levothyroxinu i stanovovaných nečistot. Vzhledem k těmto skutečnostem je tato práce považována za pilotní a pro přesné stanovení nečistot je třeba další výzkum.

Také je nutno zmínit, že většina tablet byla již po datu expirace, a tak bylo očekáváno, že obsah degradačních produktů nebude splňovat limity dané ICH.

5.3 Porovnání jednotlivých designů

Při porovnání designu 1 a 2 v obsahu laktózových nečistot byly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi designy v případě laktózového aduktu 2. V případě stearátu mannitolu nebyl pozorován mezi designy rozdíl. Avšak v případě jednotlivých tablet byla pozorována velká variabilita měření, kterou vyjadřuje relativní směrodatná odchylka (variační koeficient). Pro určení limitního rozmezí byl použit limit směrnice EMA pro validaci bioanalytických metod 15 % [111].

Relativní směrodatné odchylky v případě laktózových tablet jsou shrnuty v tabulce 39. Hodnoty RSD překračující limit 15 % jsou tučně zvýrazněny.

Tabulka 39 - Relativní směrodatné odchylky relativních obsahů nečistot laktózových tablet.

	S1	S2	S3	S4	S5	S19	A1
Design 1	RSD [%]						
adukt Levo-laktóza 1	2,12	51,98	16,52	7,78	5,70	6,72	3,90
adukt Levo-laktóza 2	68,81	41,79	90,89	53,43	53,99	27,81	8,10
Design 2	RSD [%]						
adukt Levo-laktóza 1	10,52	51,79	20,47	20,58	8,00	11,17	4,54
adukt Levo-laktóza 2	33,68	33,24	70,46	44,50	34,64	8,18	4,51

Relativní směrodatné odchylky v případě mannitolových tablet jsou shrnuty v tabulce 40. Ačkoliv jsou hodnoty celkově nižší než u laktózových tablet, stále je limit 15 % několikrát překročen. V případě šarže S17 je hodnota RSD dokonce 95,88 %.

Tabulka 40 - Relativní směrodatné odchylky relativních obsahů nečistot mannitolových tablet.

	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
Design 1	RSD [%]							
steáráť mannitolu [M+HCOO] ⁻	14,82	8,10	15,81	6,19	4,04	17,02	19,36	21,73
steáráť mannitolu [M-H] ⁻	9,72	6,91	14,13	7,75	2,15	13,12	14,68	18,78
Design 2	RSD [%]							
steáráť mannitolu [M+HCOO] ⁻	9,44	6,02	3,76	4,82	7,79	5,19	5,35	15,81
steáráť mannitolu [M-H] ⁻	10,04	6,24	3,09	6,22	5,52	5,68	7,59	11,26
	S14	S15	S16	S17	S18	A2	A3	H
Design 1	RSD [%]							
steáráť mannitolu [M+HCOO] ⁻	17,86	11,39	x	x	x	6,88	25,71	18,50
steáráť mannitolu [M-H] ⁻	13,88	7,22	10,96	8,12	x	4,09	19,51	14,53
Design 2	RSD [%]							
steáráť mannitolu [M+HCOO] ⁻	6,87	6,77	x	x	x	9,47	12,07	17,82
steáráť mannitolu [M-H] ⁻	8,27	6,21	22,50	95,88	31,76	7,44	8,43	16,91

Variabilita měření nebyla uspokojivá ani v jednom designu a kolísala mezi sloučeninami i designy. Pro další hodnocení variability měření je využito zhodnocení na základě IS.

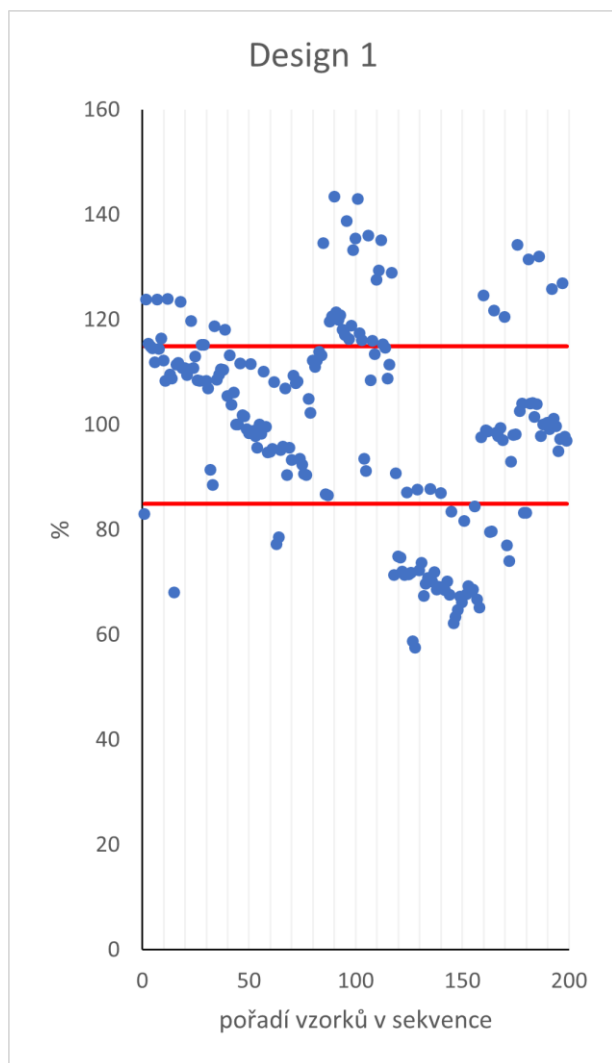
5.3.1 Porovnání designů dle odezvy IS

Stabilita plochy IS značí integritu měření. Pokud jsou v této hodnotě velké změny, jednota měření není dodržena. Původci těchto změn mohou být lidská chyba, matricové efekty, nevhodné pomůcky, porucha přístroje, změny v parametrech měření během experimentu či nevhodnost použité analytické metody [112]. Pro odstranění chyb měření byla provedena randomizace v každém designu.

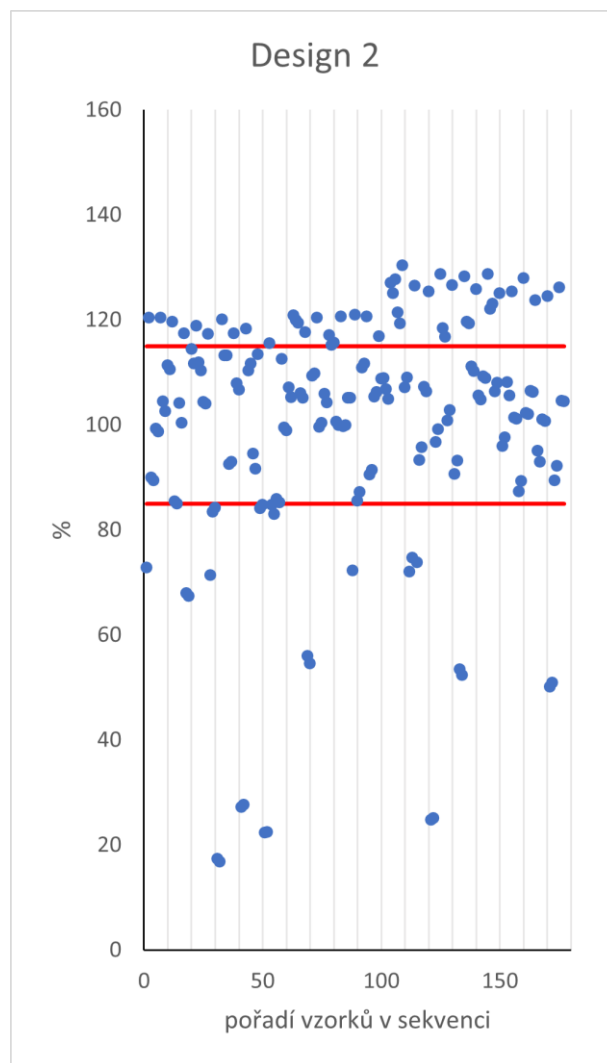
Designy byly mezi sebou porovnány na základě chování IS a změny jeho odezvy v čase. Do každého vzorku bylo přidáno 10 μ L roztoku interního standardu levothyroxinu, a to včetně QC a blankového extraktu. Do blanků se IS nepřidával.

V každém designu byl vypočítán průměr ploch odezvy IS a k této hodnotě (100 %) byla každá plocha vztažena. Horní limitní mez byla stanovena na 115 % a dolní limitní mez byla stanovena na 85 %, dle směrnice EMA pro validaci bioanalytických metod [111]. Přestože je směrnice určena pro bioanalytické metody a tato studie tato kritéria nespĺňuje, je směrnice aplikovatelná na LC-MS metodu.

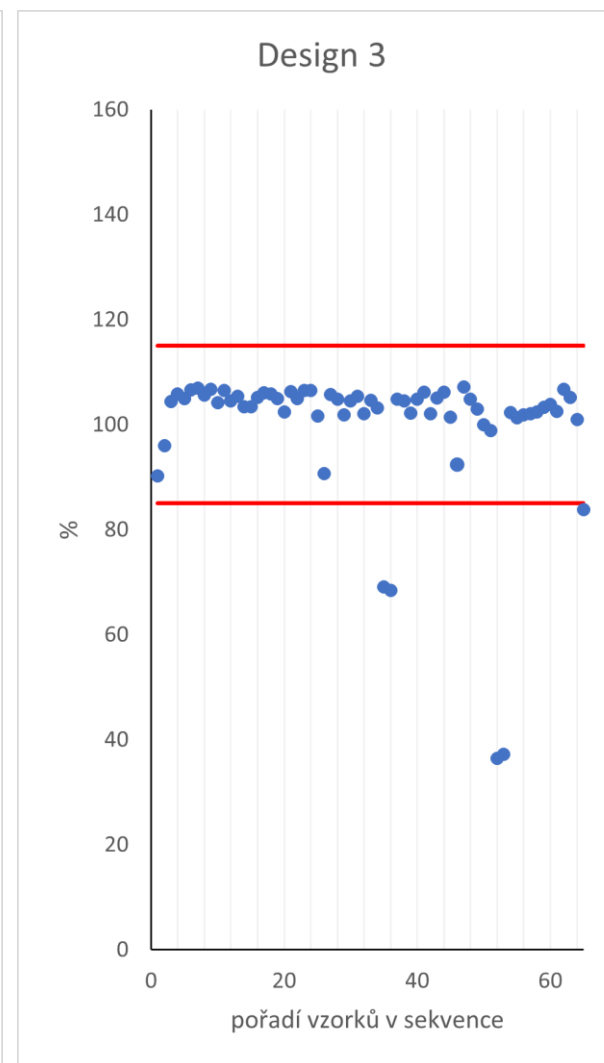
Grafy (obrázek 37 – 39) znázorňují chování IS v jednotlivých designech v závislosti na vzorku. Pořadí vzorků v grafu odpovídá sekvenci měření (viz. kap. 4.8), ze které byly odstraněny blanky, do kterých se IS nepřidával.



Obrázek 37 – Variabilita IS v designu 1.



Obrázek 38 – Variabilita IS v designu 2.



Obrázek 39 – Variabilita IS v designu 3.

V designu 1 (obrázek 37) byly nalezeny výkyvy v obsahu IS mezi dny. Měření bylo naplánováno na pět dnů a počet vzorků na den omezen – 39, 39, 39, 41, 41. Dle požadavků zadavatele se střídal ESI⁻ mód ve dne a ESI⁺ v noci. První den byly nalezeny hodnoty spíše vyšší, ačkoliv v případě jednoho vzorku byla stanovená hodnota naprosto odlišná od ostatních (blankový extrakt, 67,5 %). Pět vzorků překračovalo mez 120 %, což byly ve všech případech vzorky QC toho dne. Ve druhém dni byly nalezeny pouze dvě odchylky z limitního rozmezí – dva nástřiky replikátu tablety S17A (77,8 % a 79 %). Přesto však i v limitním rozmezí byly nalezeny dvě klastrující se skupiny. Skupina s vyššími hodnotami byla identifikována jako všechny vzorky QC, jeden blankový extrakt a oba nástřiky replikátu S13B. Třetí den byla také nalezena skupina vzorků klastrujících se od ostatních (hodnota nad 120 %), mezi kterými byly nalezeny vzorky QC 2 – 8 a oba nástřiky replikátu tablet A3A a S5C. Čtvrtý den byl nalezen velký pokles pod dolní limitní mez a vzorky se opět klastrovaly do dvou skupin. Skupina blíže ke stanovenému rozmezí, a částečně v něm, byla identifikována jako vzorky QC (7 z celkových 8). V pátém dnu byl nalezen velký rozptyl (74 – 134 %) ve třech klastrujících se skupinách. Průběh měření byl velice podobný třetímu dni, avšak posunutý k nižším hodnotám. Vzorky ve skupině pod dolní mezí limitu byly identifikovány jako oba nástřiky replikátů tablety S17B a S17C, a oba nástřiky replikátu tablety S16B. Skupina překračující horní mez limitu byla identifikována jako všechny QC vzorky toho dne. Jak je z grafu (obrázek 37) patrné, integrita měření byla narušena. Celkový rozptyl byl stanoven na 58 – 143 %. Tento jev je přisuzován především každodenní recalibraci a ověřovacím testům nastavení detektoru a referenční hmoty HRMS kvůli střídání negativního a pozitivního módu iontového zdroje. Přesto je patrné, že vzorky QC byly ve všech dnech nalezeny klastrující se od ostatních vzorků, a to k vyšším hodnotám.

V designu 2 (obrázek 38) byla nalezena větší variabilita v rámci jednotlivých dní než v designu 1, avšak nebyly nalezeny rozdíly mezi dny. Měření bylo naplánováno na dva dny a počty vzorků s obsahem IS byly 87 a 90. Tablety s hodnotou nižší než 60 % byly identifikovány jako replikát tablety S13C a tablety S16A, 2 replikáty tablety S17 (B a C) a všechny replikáty tablety S18. Ve všech případech se odlišovaly oba nástřiky daného vzorku. Změna variability mohla být způsobena tím, že vzorky nebyly

připraveny těsně před měřením ani v den měření. Již ale nebyl pozorován skok v hodnotách mezi dny, což bylo způsobeno vynecháním ESI⁺ měření v noci.

Variabilita v designu 3 (obrázek 39) byla zhodnocena jako nejmenší. Tablety již nebyly měřeny v triplikátu. Čtyři vzorky, které nebyly nalezeny v limitním rozmezí, byly identifikovány jako oba nástříky tablet S16 a S17. Jeden vzorek byl nalezen přesně na dolní limitní mezi a byl identifikován jako blankový extrakt. I v limitním rozmezí byly nalezeny 4 vzorky, které se odlišovaly. Byly identifikovány jako tři vzorky extraktu blanku a jeden vzorek QC. Zbytek vzorků byl zhodnocen jako stabilní a v linii jejich IS nejsou patrné velké skoky. V případě designu 3 se potvrdila správnost zvoleného postupu – randomizace přípravy vzorku, randomizace měření, příprava a měření v jedné šarži (v jenom dni) – a z tří navržených designů byl zhodnocen jako nestabilnější. Jedinou nevýhodou ve zvoleném postupu byl omezený počet analyzovaných vzorků (65), který byl stanoven kvůli časovým možnostem laboratoře i omezenému počtu tablet.

Při hodnocení designů byl zjištěn posun mimo limity tablet S16, S17 a S18. Je nutno podotknout, že jejich změny v IS k nižším hodnotám značí interakci s IS nebo iontovou supresi, což potvrzují i výsledky cílené analýzy, ve které nebyly stanoveny relativní obsahy v některých replikátech těchto tablet. Pro zhodnocení těchto tablet lépe poslouží analýza PCA a další necílená analýza.

Variabilita měření mohla být ovlivněna i aplikovanou randomizací. Při použití randomizace je snaha eliminovat chyby v přípravě, měření a v analytickém systému. Při tvorbě designu 1 byly randomizovány vzorky pro sekvenci měření mezi jednotlivými dny i v rámci jednotlivých dnů. V druhém designu byla eliminována možnost randomizace přípravy, avšak vzorky byly opět randomizovány v sekvenci. Při sestavování designu 3 byla provedena randomizace přípravy vzorků i sekvence měření.

Z hlediska integrity měření byly designy 1 a 2 zhodnoceny jako zcela nevhodné. V případě designu 3 byla potvrzena správnost postupu a byl zhodnocen jako vhodný kandidát k další optimalizaci.

5.3.2 Porovnání designů z hlediska PCA

K porovnání designů a vyhodnocení rozdílů mezi designy byla použita analýza hlavních komponent pomocí programu SIMCA. PCA slouží k rozdělení vzorků do skupin na základě zvolených komponent. U každého designu byly provedeny dvě analýzy – se zahrnutím obsahu levothyroxinu (část A v grafickém zpracování) a bez obsahu levothyroxinu (část B v grafickém zpracování) pro posouzení případné změny ve statistické analýze.

Pro PCA analýzu byly použity hodnoty plochy pod píky všech definovaných sloučenin (viz. Tabulka 12) vzorků tablet, QC vzorků a blankových vzorků, mezi které byly zařazeny i blankové extrakty.

Ve všech grafech byly barevně odlišeny 3 skupiny tablet. Také byly barevně odlišeny vzorky QC a blankové vzorky. Příslušné barvy byly znázorněny v legendě grafického zpracování analýzy.

Analýza PCA designu 1 je graficky znázorněna na obrázku 40. Ve skupině G3 bylo pozorováno klastrování několika vzorků blíže k blankovým vzorkům. To naznačuje, že obsahy hledaných sloučenin a zvolené komponenty jsou bližší blanku než zbytku skupiny G3. Ve zhodnocení bez započítání levothyroxinu byly rozdíly ve skupině G3 ještě patrnější. Všechny tyto klastrující se vzorky byly identifikovány jako tablety S16 - S18. Zbylé vzorky ze skupiny G3 byly nalezeny blízko skupiny G2, což bylo předpokládáno vzhledem k obsahu stejné účinné látky a stejného výrobce.

Analýza PCA designu 2 je graficky znázorněna na obrázku 41. Byly nalezeny podobné výsledky jako v případě designu 1, avšak s menší variabilitou. To je přisuzováno kratšímu měření a zachování jednotných podmínek měření. Opět byly skupiny G2 a G3 zhodnoceny jako velice si podobné, a ze skupiny G3 bylo několik vzorků nalezeno v oblasti blanků. Změna v této skupině byla opět patrnější v analýze bez levothyroxinu a tyto klastrující se tablety skupiny G2 byly opět identifikovány jako tablety S16 – S18. Skupina blanků v tomto designu nebyla jednotná.

Analýza PCA designu 3 je graficky znázorněna na obrázku 42. Vzorků bylo v tomto designu méně, protože byl měřen pouze jeden replikát tablet a některé tablety

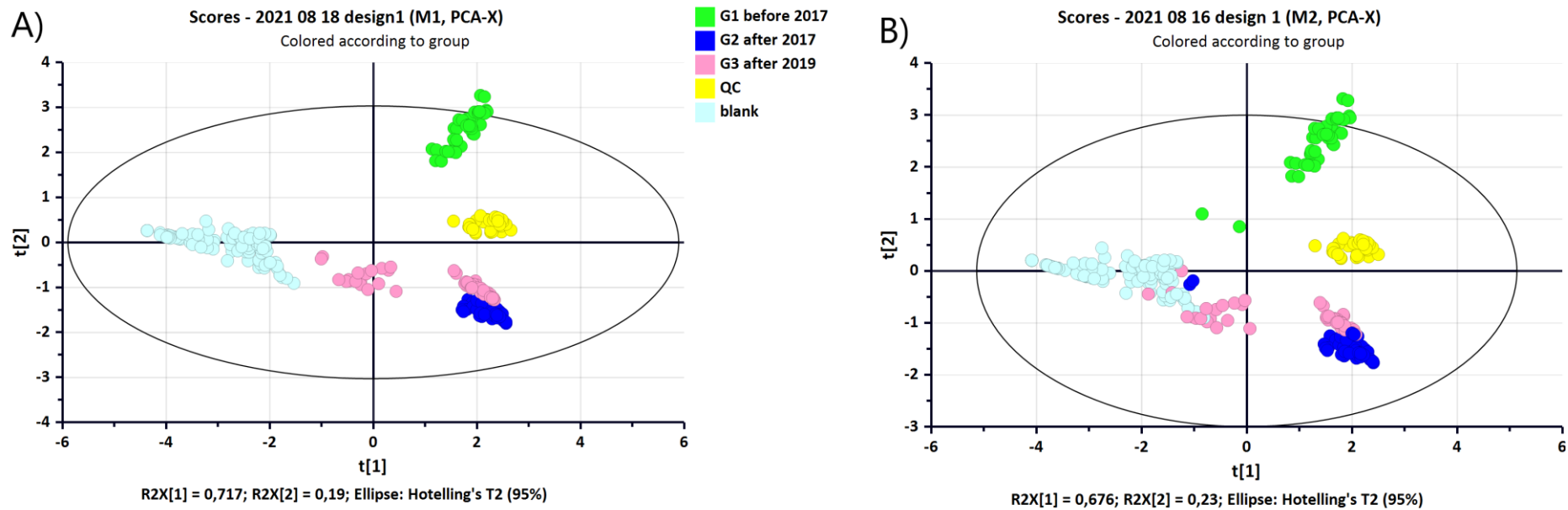
již nebyly dostupné (S1, S18, A2). Ve skupinách byla nalezena celkově menší variabilita než v předchozích designech. Skupina G3 byla opět nalezena rozdělená – vzorky klastrující se k blankovým vzorkům byly v případě designu 3 identifikovány jako tablety S16 a S17. Skupiny G2 a G3 nebyly již nalezeny překrývající se, ale byly mezi nimi statistickou analýzou nalezeny rozdíly. Nebyly nalezeny rozdíly ve statistice se započítáním levothyroxinu a bez něj. Do tohoto designu byly zařazeny i dva kontrolní vzorky tablet (šedivě označené vzorky) – tableta M a tableta A4. Tableta M byla s účinnou látkou laktóza, a byla správně nalezena ve skupině G1. Tableta A4 měla účinnou látku mannitol, a byla nalezena u skupiny G2, což opět odpovídalo předpokladu. Tímto byla ověřena správná funkce analýzy PCA.

Patrný rozdíl mezi skupinami G2 a G3 v designu 3 naznačuje, že přístup tohoto designu byl správný. Pro nedostatek vzorků nedokážeme zhodnotit přesné rozdíly mezi těmito dvěma skupinami. Další výzkum bude zaměřen na tyto dvě skupiny tablet a bude provedena necílená analýza, ve které díky většímu množství komponent bude možné diskriminovat rozdíly mezi nimi.

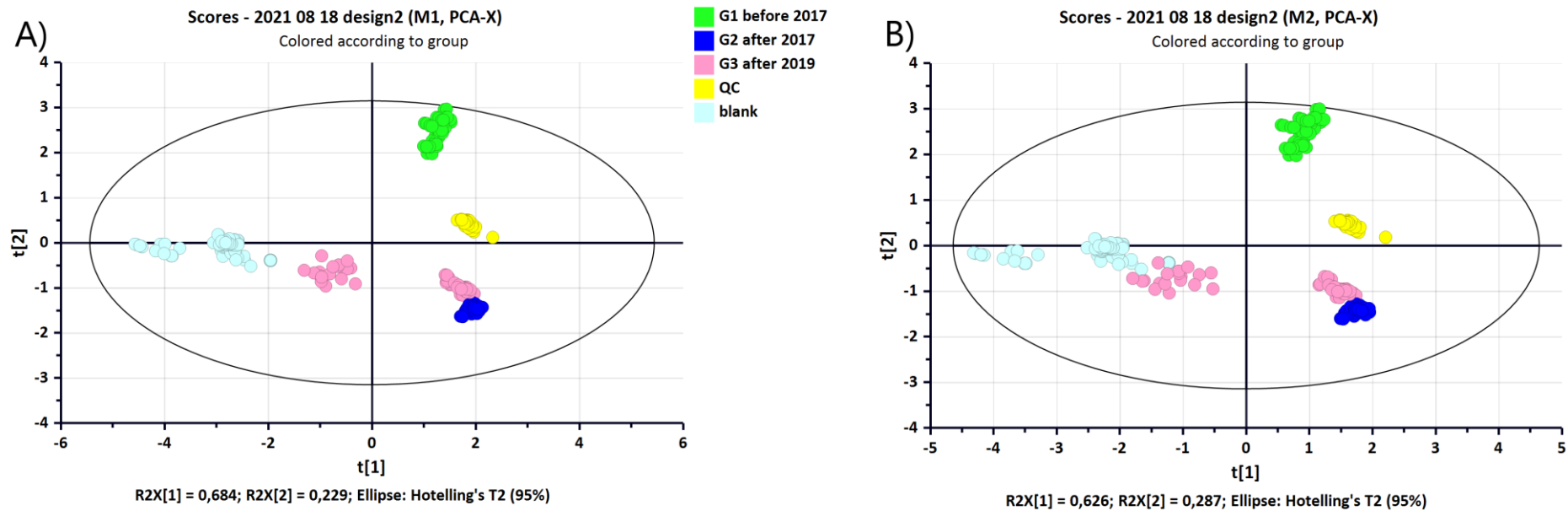
Hypotéza zadavatele studie, že se skupina G2 bude odlišovat profilem nečistot od ostatních, nebyla prozatím potvrzena. Tablety stejného výrobce skupiny G2 i G3 byly nalezeny v grafech u sebe, a v designu 1 a 2 se dokonce mírně překrývaly. Tato práce neposkytuje dostatečné množství dat pro spojitost profilu nečistot skupiny G2 a zvýšeným počtem nežádoucích účinků.

Z hlediska statistiky se tablety S16 – S18 vždy lišily – jak v cílené analýze nečistot, hodnotách IS, tak i v analýze PCA. Tyto tablety byly jediné od jiného výrobce a analýza této práce potvrdila jiný profil nečistot a neznámých látek. Výsledky jsou pravděpodobně ovlivněny interakcí s IS či iontovou supresí, což ovlivňuje analýzu a interpretaci veškerých získaných dat. Opět vyvstává problém v přístupu zadavatele práce s relativní kvantifikací, která neposkytuje dostatečná data k přesnému zhodnocení profilu nečistot.

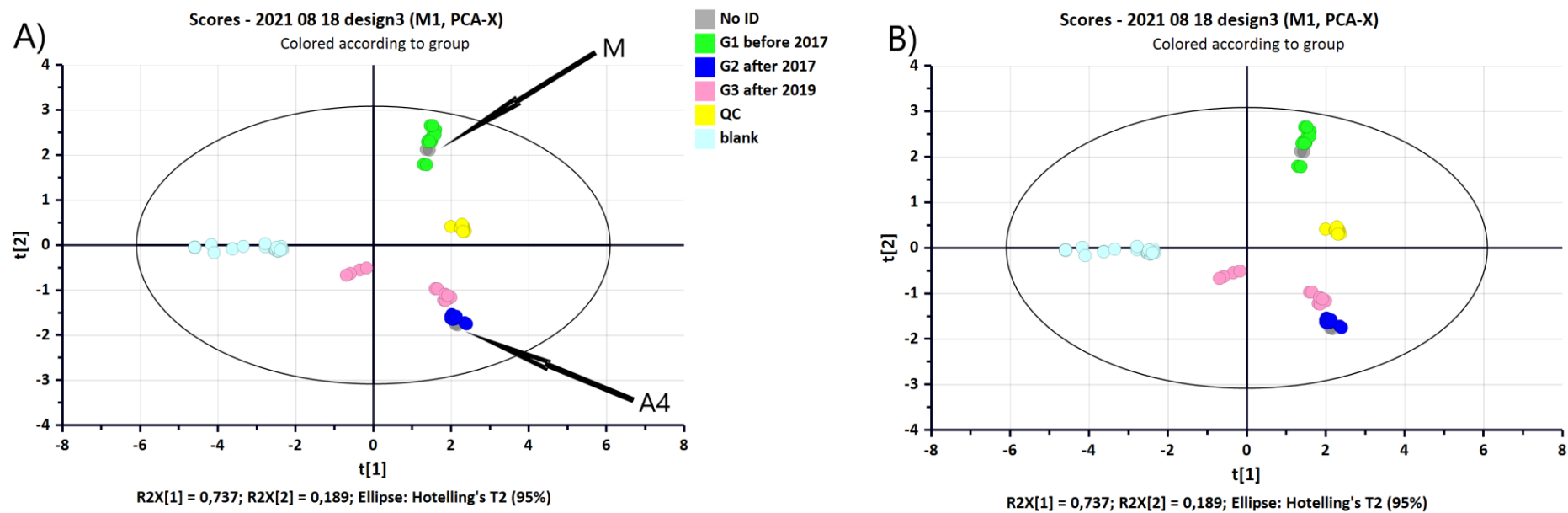
S pomocí PCA analýzy byl design 3 zhodnocen jako nevhodnější k metabolomickému profilování nečistot v léčivém přípravku, avšak je nutno upozornit na jeho negativum, a to byl omezený počet vzorků v dané šarži měření.



Obrázek 40 – Grafické znázornění PCA analýzy designu 1. Graf A se zahrnutím obsahu levothyroxinu, graf B bez zahrnutí levothyroxinu.



Obrázek 41 – Grafické znázornění PCA analýzy designu 2. Graf A se zahrnutím obsahu levothyroxinu, graf B bez zahrnutí levothyroxinu.



Obrázek 42 – Grafické znázornění PCA analýzy designu 3. Graf A se zahrnutím obsahu levothyroxinu, graf B bez zahrnutí levothyroxinu.

6. Závěr

Cílem této práce byla optimalizace metabolomického postupu při profilování nečistot. Design 1 byl sestaven dle parametrů zadavatele. Design 2 byl modifikací designu 1, u kterého byla snaha potvrdit hypotézu zadavatele, že dochází ke změnám profilu nečistot v průběhu skladování. Design 3 byl sestaven pro účely této práce podle správného metabolomického postupu.

Byla provedena cílená analýza nečistot laktózový adukt 1, laktózový adukt 2 a stearát mannitolu. Laktózové tablety ani v jednom designu nesplnily limity obsahu nečistot stanovené Mezinárodní radou pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (ICH). Mannitolové nečistoty byly nalezeny v tabletách celkově v menší míře, přesto nesplňují limity ICH.

Hypotéza zadavatele, že dochází ke změně v profilu nečistot v průběhu skladování, byla touto prací potvrzena. Statistická analýza prokázala v případě laktózového aduktu 2 statisticky významné rozdíly mezi designy, a při porovnání relativních obsahů této nečistoty v tabletách byl patrný nárůst mezi designem 1 a 2.

Při hodnocení obsahu nečistot byla hodnocena i variabilita měření na základě relativní směrodatné odchylky v obsahu nečistot mezi jednotlivými tabletami každé šarže. Ani jeden z porovnávaných designů nebyl stabilní.

Pro přesnější zhodnocení integrity měření bylo použito hodnocení na základě změny odezvy interního standardu (IS). Limit variability 85 - 115 % byl stanoven dle směrnic Evropské agentury pro léčivé přípravky (EMA). Designy 1 a 2 se v tomto ohledu ukázaly jako zcela nevhodné. U designu 1 se ukázala velká variabilita mezi dny, což bylo způsobeno přepínáním módu iontového zdroje ESI⁻ a ESI⁺ dle požadavků zadavatele. V případě designu 2 nebyly nalezeny výkyvy mezi jednotlivými dny, protože již nebyly přepínány módy iontového zdroje a měřilo se pouze v módu ESI⁻. Viditelné rozdíly byly ovšem v rámci jednotlivých dní, což může být důvodem použití dříve připravených vzorků, ve kterých mohlo docházet k degradačním reakcím. Design 3, který byl sestaven jako jednodenní měření menšího počtu vzorků, se ukázal z hlediska variability jako nejstabilnější. V designu 3 bylo eliminováno narušení integrity měření

přepínáním módů, vzorky byly připraveny v den měření před spuštěním analýzy všechny najednou, což mohlo přispět k eliminaci chyb při přípravě.

Designy byly porovnávány také s použitím statistické analýzy hlavních komponent (PCA). Všechny měřené vzorky byly při analýze rozděleny do 5 skupin – 3 skupiny tablet, vzorky kontroly kvality a blankové vzorky. Analýza nepotvrdila rozdíly mezi skupinami G2 a G3 tablet od stejného výrobce, čímž nemohla být potvrzena hypotéza zadavatele v odlišném profilu nečistot skupiny G2. Skupina G3 byla v analýze rozdělena do 2 skupin, ve kterých se odlišovaly tablety různých výrobců. Design 3 byl i po zhodnocení analýzy PCA vyhodnocen jako nejvhodnější k metabolomickému profilování nečistot.

Již při předběžném screeningu a plánování experimentu bylo v plánu udělat statistickou analýzu. Data z předběžného screeningu ovšem ukázala nevhodnost designu 1 a designu 2 pro tyto účely. Proto byl sestaven design 3, u kterého bylo dodrženo měření v jedné šarži. Po zhodnocení všech získaných dat se potvrdilo, že design 3 je nejvhodnější způsob při metabolomické studii tohoto typu. Tato práce je považována za pilotní a je třeba ještě další optimalizace, aby mohly být stanoveny přesné profily nečistot, avšak další experiment bude sestaven dle podmínek designu 3. Hlavním nedostatkem této práce je relativní kvantifikace vzhledem k obsahu levothyroxinu, která nezohledňuje změny v jeho obsahu. Pro přesné stanovení profilů nečistot je nutné použít izotopově značené standardy levothyroxinu a analyzovaných nečistot a sloučenin. Dalším postupem studie pro zadavatele bude necílená analýza nečistot a diskriminace rozdílů v profilech nečistot jednotlivých tablet či skupin tablet pomocí PCA analýzy.

7. Použitá literatura

- [1] R. Karlíček, Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [2] L. Nováková, M. a kol. Douša, Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Lucie Nováková (Hradec Králové), Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [3] J. Klimeš a kol., Kontrolně analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Jiří Klimeš, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [4] L. Nováková, H. Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta.* 656 (2009.) 8–35. doi:10.1016/j.aca.2009.10.004.
- [5] D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *J. Sep. Sci.* 29 (2006.) 1836–1848. doi:10.1002/jssc.200600189.
- [6] L. Nováková, M. a kol. Douša, Moderní HPLC separace v teorii a praxi II., Lucie Nováková (Hradec Králové), Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [7] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme, Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014.) 105–119. ISBN 9781849733885. doi:10.1016/j.jpba.2013.03.012.
- [8] L. Nováková, L. Matysová, P. Solich, Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta.* 68 (2006.) 908–918. doi:10.1016/j.talanta.2005.06.035.
- [9] A. Kumar, G. Saini, A. Nair, R. Sharma, UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis, *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 69 (2012.) 371–380.
- [10] A. Nordström, G. O'Maille, C. Qin, G. Siuzdak, Nonlinear data alignment for UPLC-MS and HPLC-MS based metabolomics: Quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum, *Anal. Chem.* 78 (2006.) 3289–3295. doi:10.1021/ac060245f.

- [11] E. De Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Third Edition, John Wiley & Sons, Ltd, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [12] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* (80-.). 246 (1989.) 64–71. doi:10.1126/science.2675315.
- [13] D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins, Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000.) 3653–3659. doi:10.1021/ac0001636.
- [14] B.A. Thomson, Atmospheric pressure ionization and liquid chromatography/mass spectrometry - Together at last, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998.) 187–193. doi:10.1016/S1044-0305(97)00285-7.
- [15] Q. Hu, J. Zhang, P. Chen, B. Wang, Compound identification via deep classification model for electron-ionization mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 463 (2021.). doi:10.1016/j.ijms.2021.116540.
- [16] M. Caban, P. Stepnowski, Electron ionization induced fragmentation of fluorinated derivatives of bisphenols, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 34 (2020.). doi:10.1002/rcm.8860.
- [17] R.E. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*, John Wiley & Sons, Ltd, 2003. ISBN 0-471-49801-7.
- [18] Friedecký D, Lemr K, Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klin. Biochem. Metab.* 20 (2012.) 152–157.
- [19] L. Sleno, ed., *Applications of high-resolution mass spectrometry in drug discovery and development*, 2014. ISBN 9781909453555. doi:10.4155/9781909453555.
- [20] M. Narayanam, T. Handa, P. Sharma, S. Jhajra, P.K. Muthe, P.K. Dappili, R.P. Shah, S. Singh, Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2013.) 191–217. doi:10.1016/j.jpba.2013.04.027.

- [21] M. Bedair, L.W. Sumner, Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008.) 238–250. doi:10.1016/j.trac.2008.01.006.
- [22] K. Dettmer, P.A. Aronov, B.D. Hammock, Mass spectrometry-based metabolomics, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007.) 51–78. doi:10.1002/MAS.20108.
- [23] G.J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012.) 263–269. doi:10.1038/nrm3314.
- [24] C.H. Johnson, J. Ivanisevic, G. Siuzdak, Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 (2016.) 451. doi:10.1038/NRM.2016.25.
- [25] M. Bouhifd, T. Hartung, H.T. Hogberg, A. Kleensang, L. Zhao, Review: Toxicometabolomics, *J. Appl. Toxicol.* 33 (2013.) 1365–1383. doi:10.1002/JAT.2874.
- [26] B.B. Aldridge, K.Y. Rhee, Microbial metabolomics: Innovation, application, insight, *Curr. Opin. Microbiol.* 19 (2014.) 90–96. doi:10.1016/J.MIB.2014.06.009.
- [27] L. Puchades-Carrasco, A. Pineda-Lucena, Metabolomics in pharmaceutical research and development, *Curr. Opin. Biotechnol.* 35 (2015.) 73–77. doi:10.1016/J.COPBIO.2015.04.004.
- [28] X. Liu, J.W. Locasale, Metabolomics: A Primer, *Trends Biochem. Sci.* 42 (2017.) 274–284. doi:10.1016/j.tibs.2017.01.004.
- [29] C. Hu, G. Xu, Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 52 (2013.) 36–46. doi:10.1016/j.trac.2013.09.005.
- [30] S. Kalim, E.P. Rhee, An overview of renal metabolomics, *Kidney Int.* 91 (2017.) 61–69. doi:10.1016/j.kint.2016.08.021.
- [31] K. Kusonmano, W. Vongsangnak, P. Chumnanpuen, Informatics for metabolomics, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016.: pp. 91–115. ISBN 10.1007/9789811. doi:10.1007/978-981-10-1503-8_5.
- [32] S. Barnes, H.P. Benton, K. Casazza, S.J. Cooper, X. Cui, X. Du, J. Engler, J.H.

- Kabarowski, S. Li, W. Pathmasiri, J.K. Prasain, M.B. Renfrow, H.K. Tiwari, Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data, *J. Mass Spectrom.* (2016.) 461–475. doi:10.1002/jms.3782.
- [33] J. Rodríguez-Coira, M.I. Delgado-Dolset, D. Obeso, M. Dolores-Hernández, G. Quintás, S. Angulo, D. Barber, T. Carrillo, M.M. Escribese, A. Villaseñor, Troubleshooting in large-scale LC-ToF-MS metabolomics analysis: Solving complex issues in big cohorts, *Metabolites.* 9 (2019.) 1–17. doi:10.3390/metabo9110247.
- [34] R. Wawrzyniak, A. Kosnowska, S. Macioszek, R. Bartoszewski, M.J. Markuszewski, New plasma preparation approach to enrich metabolome coverage in untargeted metabolomics: Plasma protein bound hydrophobic metabolite release with proteinase K, *Sci. Rep.* 8 (2018.) 9541. doi:10.1038/s41598-018-27983-0.
- [35] S.P. Putri, S. Yamamoto, H. Tsugawa, E. Fukusaki, Current metabolomics: Technological advances, *J. Biosci. Bioeng.* 116 (2013.) 9–16. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.01.004.
- [36] M. Katajamaa, M. Orešič, Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data, *BMC Bioinformatics.* 6 (2005.). doi:10.1186/1471-2105-6-179.
- [37] M. Katajamaa, J. Miettinen, M. Orešič, MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data, *Bioinformatics.* 22 (2006.) 634–636. doi:10.1093/bioinformatics/btk039.
- [38] R. Baran, H. Kochi, N. Saito, M. Suematsu, T. Soga, T. Nishioka, M. Robert, M. Tomita, MathDAMP: A package for differential analysis of metabolite profiles, *BMC Bioinformatics.* 7 (2006.). doi:10.1186/1471-2105-7-530.
- [39] A. Lommen, Metalign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing, *Anal. Chem.* 81 (2009.) 3079–3086. doi:10.1021/ac900036d.
- [40] W.B. Dunn, D.I. Ellis, Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24 (2005.) 285–294.

doi:10.1016/j.trac.2004.11.021.

- [41] L.D. Roberts, A.L. Souza, R.E. Gerszten, C.B. Clish, Targeted metabolomics, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 1 (2012.) Unit30.2. doi:10.1002/0471142727.mb3002s98.
- [42] L. Lacalle-Bergeron, D. Izquierdo-Sandoval, J. V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, T. Portolés, Chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry in untargeted metabolomics for investigation of food (bio)markers, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 135 (2021.) 116–161. doi:10.1016/j.trac.2020.116161.
- [43] J.K. Nicholson, J. Connelly, J.C. Lindon, E. Holmes, Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002.) 153–161. doi:10.1038/nrd728.
- [44] B. Li, X. He, W. Jia, H. Li, Novel Applications of Metabolomics in Personalized Medicine: A Mini-Review, *Molecules.* 22 (2017.). doi:10.3390/molecules22071173.
- [45] E.E. Balashova, D.L. Maslov, P.G. Lokhov, A metabolomics approach to pharmacotherapy personalization, *J. Pers. Med.* 8 (2018.). doi:10.3390/jpm8030028.
- [46] What Is Principal Component Analysis (PCA) and How It Is Used?, (n.d.). <https://www.sartorius.com/en/knowledge/science-snippets/what-is-principal-component-analysis-pca-and-how-it-is-used-507186> (accessed May 6, 2021).
- [47] S. Barnes, H.P. Benton, K. Casazza, S.J. Cooper, X. Cui, X. Du, J. Engler, J.H. Kabarowski, S. Li, W. Pathmasiri, J.K. Prasain, M.B. Renfrow, H.K. Tiwari, Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future, *J. Mass Spectrom.* 51 (2016.) 535–548. doi:10.1002/jms.3780.
- [48] J. Martínková a kol, *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, 2nd ed., Grada Publishing, a.s., Praha, 2018. ISBN 978-80-247-4157-4.
- [49] J. Švihovec a kol, *Farmakologie*, Grada Publishing, a.s., Praha, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

- [50] Český lékopis 2017, Grada Publishing, a.s., Praha, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [51] S.S. Bharate, S.B. Bharate, A.N. Bajaj, Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: A comprehensive review, *J. Excipients Food Chem.* 1 (2010.) 3–26.
- [52] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn, eds., *Handbook of pharmaceutical excipients*, Sixth edit, Pharmaceutical Press, 2009.
- [53] P.J. Crowley, Excipients as stabilizers, *Pharm. Sci. Technol. Today.* 2 (1999.) 237–243. doi:10.1016/S1461-5347(99)00158-3.
- [54] Y. Wu, J. Levons, A.S. Narang, K. Raghavan, V.M. Rao, Reactive impurities in excipients: Profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility, *AAPS PharmSciTech.* 12 (2011.) 1248–1263. doi:10.1208/s12249-011-9677-z.
- [55] M.A. Darji, R.M. Lalge, S.P. Marathe, T.D. Mulay, T. Fatima, A. Alshammari, H.K. Lee, M.A. Repka, S. Narasimha Murthy, Excipient Stability in Oral Solid Dosage Forms: A Review, *AAPS PharmSciTech.* 19 (2018.) 12–26. doi:10.1208/s12249-017-0864-4.
- [56] P. Komárek, M. Rabišková, *Technologie léků*, 3. přeprac, Galén, Praha, 2006. ISBN 80 7262423 7.
- [57] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), (2003.). [https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29 Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf) (accessed April 22, 2021).
- [58] A.S. Narang, S.H. Boddu, Impact of Excipient Interactions on Solid Dosage Form Stability, in: A.S. Narang, S.H. Boddu (Eds.), *Excip. Appl. Formul. Des. Drug Deliv.*, Springer, 2015.: pp. 93–137. ISBN 9783319202068. doi:10.1007/978-3-319-20206-8.
- [59] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug substances Q3A(R2), (2006.). <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29>

- Guideline.pdf (accessed April 25, 2021).
- [60] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), (2005.).
- [61] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug products Q3B(R2), (2006.). <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29Guideline.pdf> (accessed April 25, 2021).
- [62] D. Bartos, S. Gorog, Recent Advances in the Impurity Profiling of Drugs, *Curr. Pharm. Anal.* 4 (2008.) 215–230. doi:10.2174/157341208786306199.
- [63] S. Görög, Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 101 (2018.) 2–16. doi:10.1016/j.trac.2017.09.012.
- [64] Levothyroxine | C₁₅H₁₁I₄NO₄ | ChemSpider, (n.d.). <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5614.html> (accessed April 19, 2021).
- [65] SciFinder, SciFinder Substance Detail, Scifinder. (n.d.) 1–2. <https://scifinder-n.cas.org/searchDetail/substance/611187951a9f09133e63addd/substanceDetails> (accessed August 9, 2021).
- [66] J. Mourek, *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů - 2., doplněné vydání*, Grada Publishing, a.s., Praha, 2012. ISBN 978-80-247-3918-2.
- [67] J. Bernal, Thyroid hormone receptors in brain development and function, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3 (2007.) 249–259. doi:10.1038/ncpendmet0424.
- [68] U.S National Library of Medicine, Levothyroxine: MedlinePlus Drug Information, Am. Soc. Heal. Pharm. Inc. (2017.). <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682461.html> (accessed April 19, 2021).
- [69] U. Gottwald-Hostalek, W. Uhl, P. Wolna, G.J. Kahaly, New levothyroxine formulation meeting 95–105% specification over the whole shelf-life: results from two pharmacokinetic trials, *Curr. Med. Res. Opin.* 33 (2017.) 169–174. doi:10.1080/03007995.2016.1246434.

- [70] H. Patel, A. Stalcup, R. Dansereau, A. Sakr, The effect of excipients on the stability of levothyroxine sodium pentahydrate tablets, *Int. J. Pharm.* 264 (2003.) 35–43. doi:10.1016/S0378-5173(03)00387-9.
- [71] R.B. Shah, A. Bryant, J. Collier, M.J. Habib, M.A. Khan, Stability indicating validated HPLC method for quantification of levothyroxine with eight degradation peaks in the presence of excipients, *Int. J. Pharm.* 360 (2008.) 77–82. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.04.018.
- [72] G. Di Girolamo, G.A. Keller, A.R. de los Santos, D. Schere, C.D. Gonzalez, Bioequivalence of two levothyroxine tablet formulations without and with mathematical adjustment for basal thyroxine levels in healthy Argentinian volunteers: A single-dose, randomized, open-label, crossover study, *Clin. Ther.* 30 (2008.) 2015–2023. doi:10.1016/j.clinthera.2008.11.005.
- [73] M. Skelin, T. Lucijanić, D. Amidžić Klarić, A. Rešić, M. Bakula, A.M. Liberati-Čizmek, H. Gharib, D. Rahelić, Factors Affecting Gastrointestinal Absorption of Levothyroxine: A Review, *Clin. Ther.* 39 (2017.) 378–403. doi:10.1016/j.clinthera.2017.01.005.
- [74] L. Liwanpo, J.M. Hershman, Conditions and drugs interfering with thyroxine absorption, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 23 (2009.) 781–792. doi:10.1016/j.beem.2009.06.006.
- [75] Český lékopis 1997, Grada, Praha, 1997. ISBN 80-7169-625-0.
- [76] lactose monohydrate | C₁₂H₂₄O₁₂ | ChemSpider, (n.d.). http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.94699.html?rid=9f8232f4-d5d8-4ea4-b0a9-ab7b2f9089d9&page_num=0 (accessed April 23, 2021).
- [77] H.L. Ohrem, E. Schornick, A. Kalivoda, R. Ognibene, Why is mannitol becoming more and more popular as a pharmaceutical excipient in solid dosage forms?, *Pharm. Dev. Technol.* 19 (2014.) 257–262. ISBN 4961517291. doi:10.3109/10837450.2013.775154.
- [78] EC 3.2.1.108, (n.d.). <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/2/1/108.html> (accessed May 4, 2021).

- [79] M.J. Lovdahl, T.R. Hurley, B. Tobias, S.R. Priebe, Synthesis and characterization of pregabalin lactose conjugate degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002.) 917–924. doi:10.1016/S0731-7085(01)00710-5.
- [80] Levothyroxine Lactose Adduct Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4644&name=LEVOTHYROXINE> (accessed May 5, 2021).
- [81] D-(-)-Mannitol | C₆H₁₄O₆ | ChemSpider, (n.d.).
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6015.html?rid=86bd3c54-19bd-437b-9e7a-b96d813036a0> (accessed May 2, 2021).
- [82] G.S. Grigoryan, Z.G. Grigoryan, A.T. Malkhasyan, OBTAINING ESTERS OF MANNITOL AND SORBITOL USING STEARIC, PALMITIC AND OLEIC ACIDS, *Proc. YSU B Chem. Biol. Sci.* (2016.) 13–16. doi:10.46991/PYSU:B/2016.50.2.013.
- [83] Levothyroxine Glucose Adduct Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4643&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [84] Levothyroxine sulfate Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4604&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [85] Levothyroxine N-Methylamine Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4615&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [86] N-Methylamide Levothyroxine Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4616&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [87] Levothyroxine Impurity 24 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4646&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [88] Levothyroxine Impurity 21 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L->

- 4613&name=LEVOTHYROXINE (accessed August 3, 2021).
- [89] Levothyroxine Impurity 18 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4640&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [90] Levothyroxine Impurity 22 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4605&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [91] Levothyroxine Impurity 23 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4645&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [92] Levothyroxine Impurity 20 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4642&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [93] Levothyroxine Impurity 12 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4634&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [94] Levothyroxine Impurity 16 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4638&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [95] Levothyroxine Impurity 15 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4637&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [96] Levothyroxine Impurity 19 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4641&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [97] Levothyroxine Impurity 17 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4639&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [98] Levothyroxine Impurity 10 Product Page, (n.d.).

- <https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4631&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [99] Levothyroxine Impurity 11 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4633&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [100] H.G. Gika, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, Development of a validated HPLC method for the determination of iodotyrosines and iodothyronines in pharmaceuticals and biological samples using solid phase extraction, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 814 (2005.) 163–172. doi:10.1016/j.jchromb.2004.10.025.
- [101] Levothyroxine Impurity 14 Product Page, (n.d.).
<https://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=L-4636&name=LEVOTHYROXINE> (accessed August 3, 2021).
- [102] J.F. Brower, D.Y. Toler, J.C. Reepmeyer, Determination of sodium levothyroxine in bulk, tablet, and injection formulations by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Sci.* 73 (1984.) 1315–1317. doi:10.1002/jps.2600730937.
- [103] A.G. Kazemifard, D.E. Moore, A. Aghazadeh, Identification and quantitation of sodium-thyroxine and its degradation products by LC using electrochemical and MS detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001.) 697–711. doi:10.1016/S0731-7085(01)00370-3.
- [104] I. Gostomski, R. Braun, C.G. Huber, Detection of low-abundance impurities in synthetic thyroid hormones by stationary phase optimized liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008.) 279–288. doi:10.1007/s00216-008-1920-4.
- [105] J.W. Collier, R.B. Shah, A. Gupta, V. Sayeed, M.J. Habib, M.A. Khan, Influence of formulation and processing factors on stability of levothyroxine sodium pentahydrate, *AAPS PharmSciTech.* 11 (2010.) 818–825. doi:10.1208/s12249-010-9434-8.
- [106] H.S. Shah, K. Chaturvedi, M. Hamad, S. Bates, A. Hussain, K. Morris, *New Insights*

- on Solid-State Changes in the Levothyroxine Sodium Pentahydrate during Dehydration and its Relationship to Chemical Instability, AAPS PharmSciTech. 20 (2019.). ISBN 1224901812640. doi:10.1208/s12249-018-1264-0.
- [107] D. Concordet, P. Gandia, J.L. Montastruc, A. Bousquet-Mélou, P. Lees, A. Ferran, P.L. Toutain, Levothyrox[®] New and Old Formulations: Are they Switchable for Millions of Patients?, Clin. Pharmacokinet. 58 (2019.) 827–833. doi:10.1007/s40262-019-00747-3.
- [108] D. Concordet, P. Gandia, J.L. Montastruc, A. Bousquet-Mélou, P. Lees, A.A. Ferran, P.L. Toutain, Why Were More Than 200 Subjects Required to Demonstrate the Bioequivalence of a New Formulation of Levothyroxine with an Old One?, Clin. Pharmacokinet. 59 (2020.) 1–5. ISBN 0123456789. doi:10.1007/s40262-019-00812-x.
- [109] SciFinder, SciFinder Substance Detail, Scifinder. (n.d.) 1–2. <https://scifinder-n.cas.org/searchDetail/substance/612e4ee11fbc231a4797555a/substanceDetails> (accessed August 31, 2021).
- [110] MEDICAL TRIBUNE CZ: Optimální využívání levotyroxinu v ambulantní praxi, (n.d.). <https://www.tribune.cz/clanek/31000-optimalni-vyuzivani-levotyroxinu-v-ambulantni-praxi> (accessed May 1, 2021).
- [111] Guideline on bioanalytical method validation, (2011.). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (accessed April 30, 2021).
- [112] A. Tan, S. Hussain, A. Musuku, R. Massé, Internal standard response variations during incurred sample analysis by LC-MS/MS: Case by case trouble-shooting, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 877 (2009.) 3201–3209. doi:10.1016/j.jchromb.2009.08.019.