

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Barbora Tonnerová

Studium oxidační degradace tikagreloru
The oxidative degradation study of ticagrelor

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Anna Kubičková, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 19. 12. 2019

Barbora Tonnerová

Abstrakt

Tikagrelor je protisrážlivá látka, která se používá jako léčivo při akutních koronárních syndromech. Jaterním metabolismem vzniká aktivní vedlejší produkt, který funguje na principu reverzibilního blokátoru P2Y₁₂ adenosindifosfát receptoru. Tikagrelor je rozpustný v nejméně 50 % (obj.) methanolu.

V rámci této práce byla vyvinuta a validována metoda stanovení tikagreloru pomocí ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při gradientu mobilní fáze (0-4 min: 20→80 % A; 4-6 min: 80 % A; 6-6,5 min: 80→20 % A; 6,5-8,5 min: 20 % A), kde A označuje acetonitril. Zbylá procenta mobilní fáze doplňuje roztok octanu amonného o koncentraci 20 mmol·dm⁻³ a pH 8,0. Jako reverzní stacionární fáze byla použita kolona Kinetex C18 100A (100 x 2,1 mm, 1,7 μm; Phenomenex, USA). Retenční čas tikagreloru při těchto podmínkách byl 4,91 min.

Dále byla vyvinutá metoda použita ke sledování oxidační degradace tikagreloru peroxidem vodíku. Z výsledků vyplývá, že k oxidačnímu rozkladu 20 % tikagreloru dochází po 7 hodinách oxidace při 50 °C. Stejnou rychlostí zániku účinné látky vznikal jeden degradační produkt, jehož retenční čas byl 3,95 min.

Klíčová slova

ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie, tikagrelor, degradace, oxidace

Abstract

Ticagrelor is a platelet aggregation inhibitor drug, used for treatment of patients with acute coronary syndrome. The only active metabolite, a reverse blocator of P2Y₁₂ adenosindiphosphate receptor, is produced by hepatic metabolism. Ticagrelor is soluble in 50 % (vol.) methanol solution.

The most efficient separation of ticagrelor using ultrahigh performance liquid chromatography turned out to be in gradient:
(0-4 min: 20→80 % A; 4-6 min: 80 % A; 6-6,5 min: 80→20 % A; 6,5-8,5 min: 20 % A; A stands for acetonitrile). Mobile phase is composed of acetonitrile and ammonium acetate buffer (20 mmol·dm⁻³ and pH 8,0). Reverse stationary phase is Kinetex C18 100A column (100 x 2,1 mm, 1,7 μm; Phenomenex, USA). Retention time of ticagrelor is 4,91 min.

The separation method was used to observe the oxidative degradation of ticagrelor. After 7 hours of exposition to hydrogen peroxide solution at 50 °C, 20 % of ticagrelor has degraded. One degradation product was formed at same speed as the degradation of ticagrelor had. Retention time of this degradation product is 3,95 min.

Key words

ultrahigh performance liquid chromatography, ticagrelor, degradation, oxidation

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala vedoucí této bakalářské práce RNDr. Anně Kubíčkové, Ph.D. za její vstřícnost, nadstandardní trpělivost, ochotu a velmi kvalitní odborné vedení po celou dobu vypracovávání mého bakalářského projektu. Mé poděkování patří také RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za pomoc se zpracováním MS spekter a Tomáši Uhrovi za pomoc s překladem abstraktu. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala mé rodině a blízkým za trpělivost a podporu.

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů.....	7
1 Teoretický úvod	9
1.1 Cíl práce	9
1.2 Tikagrelor.....	9
1.3 Akutní koronární syndrom.....	10
1.4 Ultravysokoučinná kapalinová chromatografie	11
1.5 Stabilita a degradace	14
1.5.1 Obecná definice	14
1.5.2 Degradace tikagreloru.....	15
2 Experimentální část.....	17
2.1 Použité chemikálie a přístroje	17
2.1.1 Chemikálie	17
2.1.2 Přístroje	17
2.2 Příprava vzorků, pufrů a kalibračních roztoků	18
2.2.1 Příprava vzorků tikagreloru	18
2.2.2 Příprava vzorků tikagreloru pro studium oxidační degradace	18
2.2.3 Příprava kalibračních roztoků.....	18
2.2.4 Příprava pufrů	19
2.3 Chromatografické podmínky	19
2.4 Analytické zpracování dat	20
2.4.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti	20
2.4.2 Linearita	20
2.4.3 Opakovatelnost	20
3 Výsledky a diskuze	21
3.1 Rozpustnost tikagreloru	21
3.2 Vývoj chromatografické metody stanovení tikagreloru	21
3.2.1 Volba vlnové délky detekce.....	21

3.2.2 Vývoj metody separace	22
3.3 Validace metody	26
3.3.1 Linearita.....	26
3.3.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti	27
3.3.3 Opakovatelnost.....	27
3.3.4 Robustnost.....	28
3.4 Studium oxidace tikagreloru	30
4 Závěr	32
Literatura	33

Seznam použitých zkratek a symbolů

Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
AIBN	azobisisobutyronitril
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického high performance liquid chromatography)
LOD	mez detekce (z anglického limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (z anglického limit of quantification)
MS	hmotnostní spektrometr (z anglického mass spectrometer)
PDA	detektor diodového pole (z anglického photodiode-array)
RPLC	kapalinová chromatografie s reverzní fází (z anglického reverse phase liquid chromatography)
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického ultrahigh performance liquid chromatography)
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra

Seznam použitých symbolů

A	absorbance
c	analytická koncentrace
φ	objemový zlomek
$HETP$	výškový ekvivalent teoretického patra (z anglického height equivalent to the theoretical plate)
h	výška píku
h_n	šum základní linie
P	rozdělovací koeficient
λ	vlnová délka
m	směrnice kalibrační přímky
M_r	relativní molekulová hmotnost
$R_{1,2}$	rozlišení
S	plocha píku

s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
S_{rel}	relativní plocha píku
t	čas
T	teplota
t_{exp}	doba expozice
t_r	retenční čas
u	průtoková rychlost
V	objem

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo vyvinout metodu separace tikagreloru použitím ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Následně tuto metodu validovat, konkrétně ověřit linearitu, robustnost, opakovatelnost a určit mez detekce a mez stanovitelnosti. Nakonec by tato metoda měla být použita ke studiu kinetiky oxidační degradace tikagreloru použitím 3% (obj.) peroxidu vodíku. Vzniklé degradační produkty by touto metodou měly být separovány a poté identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

1.2. Tikagrelor

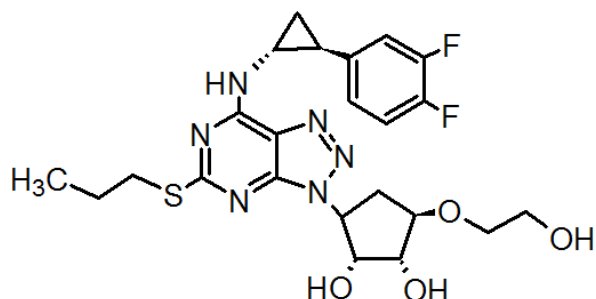
Tikagrelor je organická látka s relativní molekulovou hmotností 522,6, znázorněna na obrázku 1.1. Molekulový vzorec tikagreloru má podobu: $C_{23}H_{28}F_2N_6O_4S$. [1] Chemické a fyzikální vlastnosti této sloučeniny jsou uvedeny v tabulce 1.1. Při této práci byl používán tikagrelor ve formě narůžovělého krystalického prášku. Tikagrelor je účinná farmaceutická látka, která je součástí léčiv prodávajících se ve formě tablet pod označením Brilinta nebo Brilique. [2]

Tikagrelor se používá jako protisrážlivé léčivo při akutních koronárních syndromech. Jaterním metabolismem vzniká aktivní vedlejší produkt, který funguje na principu reverzibilního blokátoru $P2Y_{12}$ adenosin difosfát (ADP) receptoru. Ten brání aktivaci a agregaci trombocytů, ale neinteraguje přímo s vazebným místem pro ADP. [2-4]

Tikagrelor se užívá orálně ve formě potahovaných tablet. Farmakokinetika byla studována P. Adamski a spol. pro obsah účinné látky v tabletě 180 mg. Absorpce je rychlá, k maximálnímu účinku dochází po 1,5 až 3 hodinách. Pozdější nástup účinku byl pozorován u pacientů léčených morfinem a také při akutním koronárním syndromu bez elevace ST segmentu. V těchto případech dosáhla aktivní látka maximální koncentrace v plazmě po 4 až 5 hodinách. [4,10]

Tikagrelor je v krvi převážně vázán na plazmatické bílkoviny. Je odbouráván jaterním mechanismem. Hlavním enzymem odpovídajícím za jeho metabolismus je cytochrom P450 3A4, označovaný také jako CYP3A4. V případě, že byl podán

radioaktivně značený tikagrelor, bylo přibližně 58 % z jeho původního množství vyloučeno do stolice a 27 % do moči. Poločas eliminace tikagreloru je přibližně 7 hodin. [5,8]



Obrázek 1.1: Struktura tikagreloru, překresleno podle H. S. Yaye a spol. [3]

Tabulka č. 1.1: Základní fyzikální a chemické vlastnosti tikagreloru [1,6,7]

M_r	Molekulový vzorec	Rozpuštnost ve vodě	CAS číslo	$\log P$
522,6	$C_{23}H_{28}F_2N_6O_4S$	$10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	274693-27-5	2,31

1.3. Akutní koronární syndrom

Akutní koronární syndrom bývá také označován jako akutní forma ischemické choroby srdeční. Jedná se o formu ischémie, místní nedokrvenosti srdeční, při které dochází k prasknutí aterosklerotického plátu, vrstvy tuku usazeného na stěně cévy, a následnému ucpání krevního řečiště. Příznakem tohoto onemocnění bývá bolest na hrudi, dušnost, závratě, pocení, návaly horka a pocity slabosti. Bolest na hrudi může trvat v řádu minut až hodin. V ojedinělých případech se nemusí vyskytovat žádné příznaky. [9]

1.4. Ultravysokoučinná kapalinová chromatografie

Ultravysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC) patří mezi všestranný a často používaný typ eluční chromatografie. Byla vyvinuta v roce 2004 firmou Waters. Oproti vysokoučinné kapalinové chromatografii (HPLC) probíhá UHPLC analýza přibližně při třikrát vyšších tlacích, které mohou nabývat hodnoty až 1000 bar. [12] Kolona je naplněna částicemi o průměru přibližně 2 μm . [11,14,19] Separace směsí použitím UHPLC je rychlejší, účinnější a s vyšším rozlišením. Zároveň bývá výrazně zredukován šum a píky jsou užší a strmější, což umožňuje analyzovat směs látek o blízkých retenčních časech. [13-15]

Přístroj pro UHPLC analýzu, jehož schéma je znázorněno na obrázku 1.2, se skládá z pěti hlavních komponent – dávkovacího zařízení, čerpadla, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Dávkovací zařízení nabere směs určenou k separaci, vstříkne ji do proudu mobilní fáze a tím je analyzovaná směs unášena na kolonu. Pokud separujeme v gradientovém režimu, bývá před čerpadlem směšovač, který mísí jednotlivé složky mobilní fáze. Vysokotlaké čerpadlo zajišťuje stabilní průtok mobilní fáze. Pracuje na principu vytlačování mobilní fáze ze zásobníku pístem či membránou. Pohybu pístu může být dosaženo tlakem plynu, tlakem hydraulické kapaliny nebo mechanickou silou. [11,12,13,16]

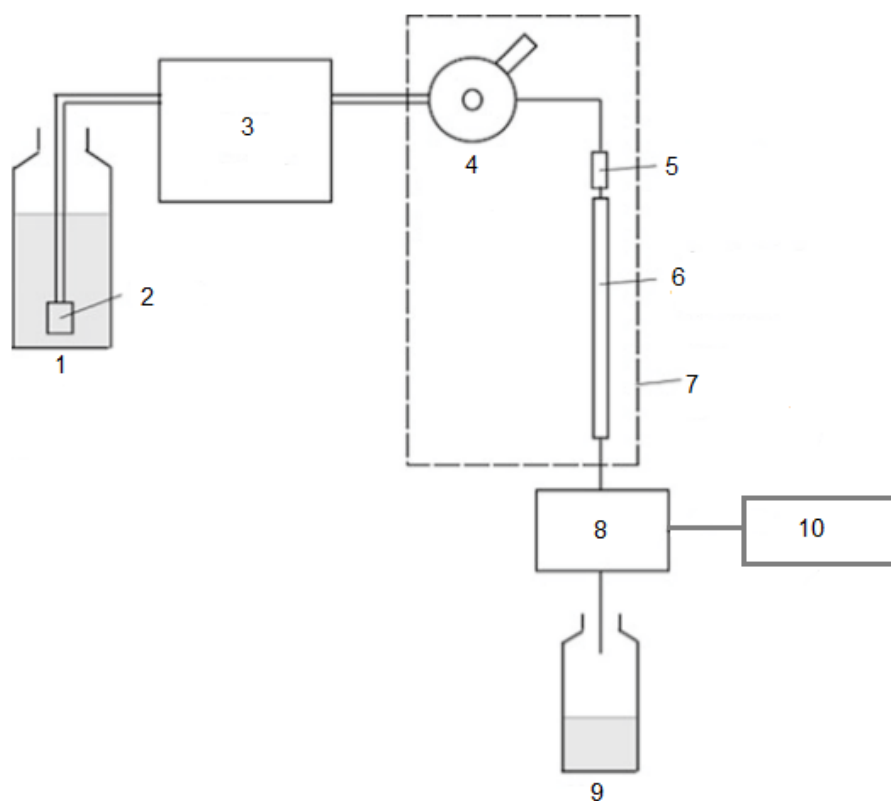
V koloně probíhá opakované rozdělování analytů mezi dvě fáze (stacionární a mobilní). Pokud se jedná o separaci na reverzní fázi (RPLC), bývá mobilní fáze polárnější než fáze stacionární. Reverzní fáze se využívá k separaci polárních látek, kterými jsou například léčiva. Nejčastěji používaná stacionární fáze v reverzním módu se označuje jako C_{18} . Je tvořena silikagelem s kovalentně vázanými funkčními skupinami s osmnácti uhlíky – oktadecyly. Tím se stacionární fáze stává nepolární. Mimo oktadecylů mohou být funkčními skupinami také oktyl, hexyl, propyl, ethyl a fenyl. Mobilní fází bývá voda s organickým rozpouštědlem, například methanolem, acetonitrilem a tetrahydrofuranem. Pro separaci v reverzním módu bývá často používána gradientová eluce. [12,15]

Velikost částic silikagelu používaného pro přípravu stacionární fáze se nejčastěji pohybuje okolo 2 μm . [14,19] V této práci byly použity částice o velikosti 1,7 μm . Kolona může dosahovat délky od 30 do 150 mm a její vnitřní průměr bývá 2,1 nebo 1 cm. [17] Silikagelové kolony mají znatelnou mechanickou odolnost, ale mohou být

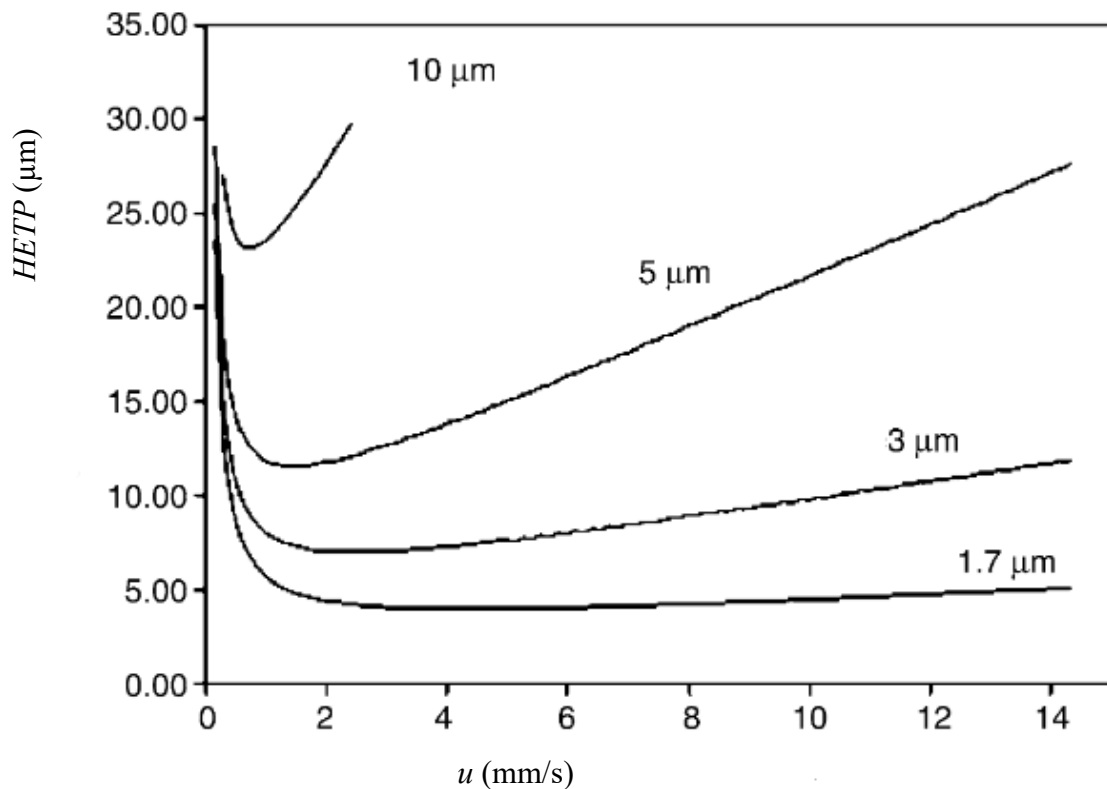
používány pouze v určitém rozmezí pH. Kolona používaná v této práci má rozsah pH 1,5 – 8,5. [18]

K detekci v UHPLC se nejčastěji používá spektrofotometrický detektor, detektor s diodovým polem (PDA), fluorescenční, hmotnostní nebo elektrochemický detektor. Spektrofotometrické detektory detekují vlnové délky od 190 do 800 nm. Limitujícím faktorem může být vyšší absorpance mobilní fáze při nižších vlnových délkách, případně nižší absorpance analytu. Hmotnostní spektrometrie poskytuje informace o molekulární struktuře látky. [12] PDA detektor snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Funguje na základě nabíjení a vybíjení kondenzátorů. K vypracování této bakalářské práce byl použit PDA a MS detektor. [11,16]

Jak již bylo zmíněno, separace UHPLC je efektivnější a rychlejší než HPLC. Vyplývá to z van Deemterovy křivky, která popisuje závislost výškového ekvivalentu teoretického patra, *HETP*, na lineární rychlosti mobilní fáze, *u*. Tato závislost je znázorněna na obrázku 1.3. Minimum křivky odpovídá průtokové rychlosti, při které je účinnost kolony nejvyšší. Se snižující se velikostí částic sorbentu se zvyšuje možnost použití vyšších průtokových rychlostí. Při velikosti částic 1,7 μm je van Deemterova křivka při vyšších průtokových rychlostech téměř konstantní. Díky tomu lze průtokovou rychlost měnit, aniž by došlo ke změně citlivosti a efektivity separace. [12,16,20]



Obrázek 1.2: Schématické znázornění přístroje pro HPLC či UHPLC analýzu. 1 – zásobní láhev, 2 – filtr, 3 – vysokotlaké čerpadlo, 4 – dávkovací zařízení, 5 – předkolona, 6 – kolona, 7 – kolonový termostat, 8 – detektor, 9 – odpadní láhev a 10 – vyhodnocovací zařízení. Převzato a upraveno z S. H. Hansen. [12]



Obrázek 1.3: Znárodnění van Deemterovy křivky pro různé velikosti částic stacionární fáze. Přeřzato a upraveno z L. Nováková a spol. [20]

1.5. Stabilita a degradace

1.5.1. Obecná definice

Stabilita léčivé látky je zásadní parametr, který může ovlivnit bezpečnost pacientů z důvodu možnosti vzniku toxických degradačních produktů a úbytku účinné látky v organismu. Degradální studie se provádí za účelem pozorování degradačních procesů a identifikace degradačních produktů. Tyto studie bývají prováděny pomocí stresových testů. Léčivo je vystaveno působení světla, tepla, vlhkosti, hydrolýze kyselinou nebo zásadou a oxidaci po určitý časový úsek. Jednotlivé stresové podmínky se mezi sebou velmi často kombinují. Optimální degradace bývá od 5 do 20 %. V tabulce 1.2 jsou uvedeny nejčastější podmínky stresových testů. [21-23]

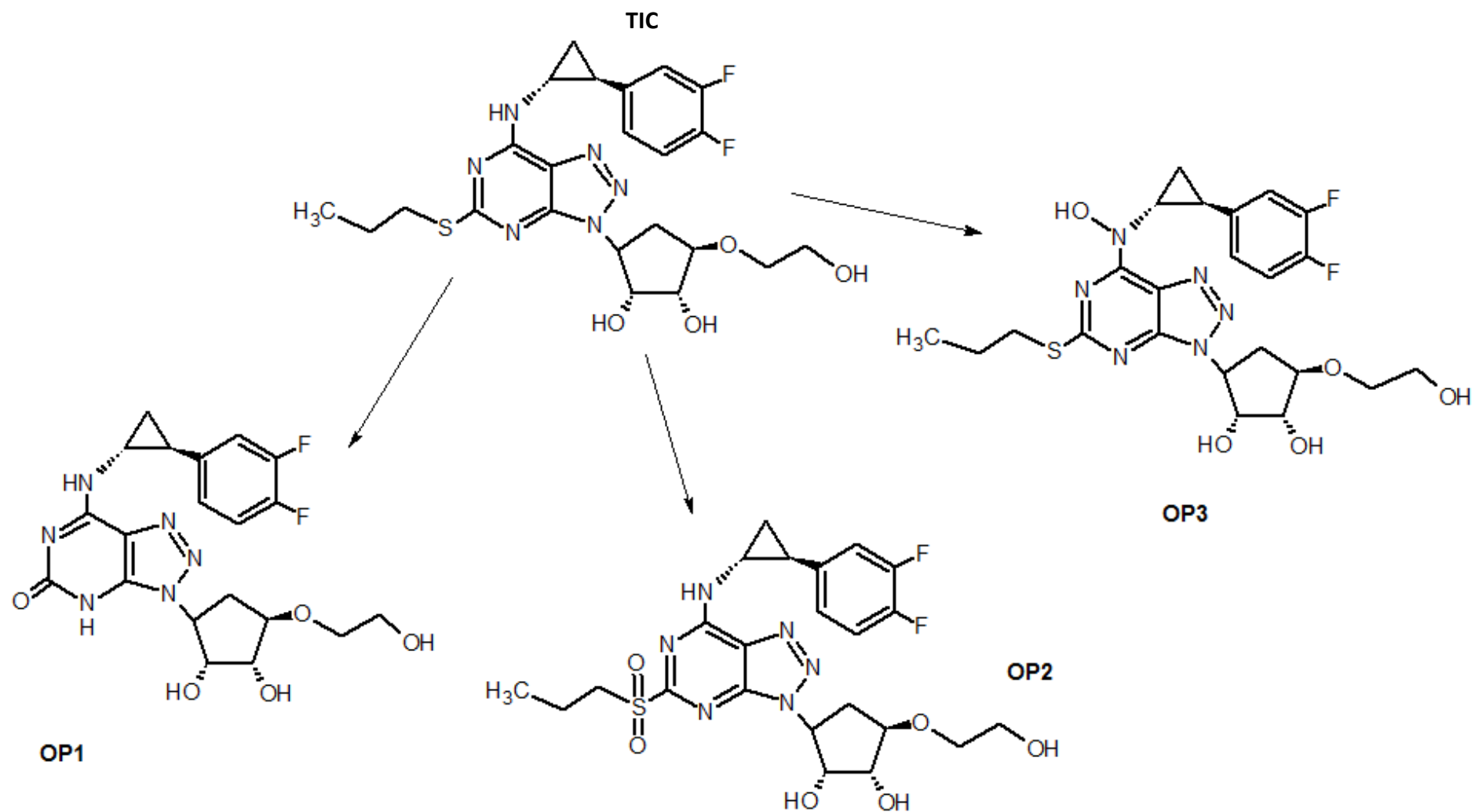
Tabulka 1.2: Nejčastější stresové podmínky a způsoby jejich provedení [21]

stresové podmínky	způsob provedení	t_{exp} / dny	T / K
Hydrolyza	0,1M HCl	1, 3, 5	
	0,1M NaOH		313 a 333
Oxidace	3 % H ₂ O ₂	1, 3, 5	298 a 333
	AIBN		
Fotolýza	záření o vlnové délce 300–800 nm	1, 3, 5	-
	tepelná komora	1, 3, 5	333–353

1.5.2. Degradace tikagreloru

Stabilita tikagreloru byla popsána pouze v jedné práci H. S. Yaye [3]. Tikagrelor je stabilní při působení hydrolytických a termolytických stresových podmínek. Poločas rozpadu při 80 °C je 1125 hodin. Pokud je tikagrelor hydrolyzován použitím octanu amonného o koncentraci 10 mmol·dm⁻³ v rozmezí pH 4–9, nelze pozorovat žádné degradační produkty. Tikagrelor podléhá světelné a oxidační degradaci. Působí-li na něj 30% (obj.) peroxid vodíku po dobu čtyř hodin, vznikají tři degradační produkty. Poločas rozpadu byl v tomto případě 7,45 hodin. Působením světla o vlnové délce 300–800 nm při světelné intenzitě 1,5 W·m², byly pozorovány čtyři degradační produkty. Polovina původního množství tikagreloru se rozpadla po 1,92 hodinách. [3]

Při měření, publikovaném H. S. Yaye a spol., byly po HPLC separaci určeny tři oxidační produkty. Všechny eluovaly na koloně C₁₈ XTerra dříve než tikagrelor. Možné mechanismy vzniku oxidačních produktů podle H. S. Yaye jsou uvedeny na obrázku 1.4. První oxidační produkt vznikl pravděpodobně odštěpením propylenu z atomu síry, která je navázaná v poloze 2 na adeninu. Poté byl kyslíkem vytěsněn atom síry. Druhý oxidační produkt vznikl navázáním dvou atomů kyslíku na atom síry. Hydroxylací 6-aminoadeninu na necyklickém dusíku vznikl oxidační produkt číslo tři.



Obrázek 1.4: Schéma pravděpodobných degradačních cest tikagreloru vystavenému působení 30% (obj.) peroxidu vodíku po 4 hodiny.

TIC – tikagrelor, OP1-OP3 – vzniklé oxidační produkty. Převzato a upraveno z H. S. Yaye a spol. [3]

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Použité chemikálie a přístroje

2.1.1. Chemikálie

acetonitril CHROMASOLV[®], for HPLC, gradient grade $\geq 99,9\%$, Honeywell, USA

methanol, CHROMASOLV[®], for HPLC, gradient grade $\geq 99,9\%$, Honeywell, USA

octan amonný, LiChropur[®] for LC-MS, Merck, Německo

roztok amoniaku, 28% p. a., LiChropur[®] for LC-MS, Merck, Německo

deionizovaná voda, MiliQ, Milipore, USA

2.1.2. Přístroje

kapalinový chromatograf, Waters Acquity UHPLC H Class, USA

ultrazvukový sonikátor, Elma S15, Elmasonic, Německo

analytické váhy, 262 SMA-FR, Sartorius, Švýcarsko

pH metr, JENWAY 3540 pH/conductivity metr, UK

kapalinový chromatograf, Agilent 1290 infinity, Agilent Technologies, Německo

trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr, Agilent 6460, Agilent Technologies, Německo

klimatická komora, ICH 260L, Memmert, Německo

2.2. Příprava vzorků, pufrů a kalibračních roztoků

2.2.1. Příprava vzorků tikagreloru

Vzorek tikagreloru o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 5,2 mg látky v 10 ml 50% (obj.) roztoku methanolu v deionizované vodě. Roztok byl vložen na 10 minut do sonifikátoru, aby došlo k úplnému rozpuštění tikagreloru. Výsledný roztok byl uchováván v lednici, taktéž i roztoky a vzorky dále uvedené v této práci.

2.2.2. Příprava vzorků tikagreloru pro studium oxidační degradace

Nejprve byl připraven zásobní roztok tikagreloru o koncentraci $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, navážením 51 mg látky a doplněním v 50ml odměrné baňce po rysku 100% (obj.) methanolem. Takto připravený roztok byl 10 minut sonifikován.

Roztoky tikagreloru o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v 50% (obj.) methanolu pro studium oxidační degradace byly připraveny následovně: Ze zásobního roztoku tikagreloru bylo odebráno 750 μl a doplněno 150 μl roztoku 30% (obj.) peroxidu vodíku a 600 μl deionizované vody. Vedle vzorků obsahujících peroxid vodíku byly také připraveny tzv. blanky. Tyto vzorky obsahovaly pouze zásobní roztok tikagreloru a deionizovanou vodu v poměru 1:1.

2.2.3. Příprava kalibračních roztoků

Pro přípravu kalibračních roztoků byl použit roztok tikagreloru o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v 50% (obj.) methanolu, který byl připraven navážením 13 mg tikagreloru a doplněním 50% (obj.) methanolem do 25ml odměrné baňky. Celkem bylo připraveno sedm koncentračních úrovní kalibračních roztoků: $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,08 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,80 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zmíněných koncentrací bylo dosaženo ředěním vyšší koncentrační úrovně roztokem 50% (obj.) methanolu v 10ml odměrné baňce, jak je uvedeno v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1: Postup přípravy kalibračních roztoků tikagreloru.

$c_{\text{výsledná}}/\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$V_{\text{výsledný}}/\text{ml}$	$c_{\text{zásobní}}/\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$V_{\text{zásobní}}/\text{ml}$
1,00	10,0	1,00	10,0
0,80	10,0	1,00	8,0
0,50	10,0	1,00	5,0
0,20	10,0	1,00	2,0
0,10	10,0	1,00	1,0
0,08	10,0	0,80	1,0
0,05	10,0	0,50	1,0

2.2.4. Příprava pufrů

Byly připraveny pufrы o hodnotách pH 6,5 a 8,0. Roztok octanu amonného o koncentraci $20\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pH 6,5 byl připraven odvážením 1,54 g látky a rozpuštěním v jednom litru deionizované vody. Hodnota pH výsledného roztoku byla upravována přidáváním 25% (obj.) roztoku amoniaku na 8,0. Výsledný roztok byl přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti částic $0,45\text{ }\mu\text{m}$ za použití vakuové pumpy.

2.3. Chromatografické podmínky

K UHPLC separaci byl použit kapalinový chromatograf Waters Acquity UHPLC H Class, USA. Jako reverzní stacionární fáze byla použita kolona Kinetex C18 100A ($100\text{ x }2,1\text{ mm}$, $1,7\text{ }\mu\text{m}$; Phenomenex, USA). Mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitrilu a roztoku octanu amonného o koncentraci $20\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pH 8,0. Poměr acetonitrilu a roztoku octanu amonného se měnil podle gradientového programu (0-4 min: $20\rightarrow 80\%$ A; 4-6 min: 80% A; 6-6,5 min: $80\rightarrow 20\%$ A; 6,5-8,5 min: 20% A), kde A značí procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Tento gradient je znázorněn na obrázku 3.2 (strana 23). Další separační podmínky byly nastaveny následovně: teplota kolony $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota autosampleru $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a optimální průtoková rychlost $0,250\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem vzorku $1\text{ }\mu\text{l}$ byl detekován PDA detektorem při vlnové délce 295 nm .

2.4. Analytické zpracování dat

2.4.1. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je koncentrace, jejíž signál je statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je koncentrace, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Vypočítají se ze vztahů

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m} \quad (2.1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m}, \quad (2.2)$$

kde h_n je šum základní linie a m je směrnice kalibrační křivky, počítané pro výšku píku tikagreloru. [24]

2.4.2. Linearita

Linearita je přímá závislost nezávislé proměnné (koncentrace) na závislé proměnné (ploše píku). Výsledkem vynesení této závislosti je rovnice přímky ve směrnicovém tvaru a korelační koeficient, který charakterizuje těsnost závislosti obou proměnných. Korelační koeficient by měl nabývat nejméně hodnoty 0,9990. V této práci byla linearita měřena na sedmi koncentračních úrovních stanovované látky. [25]

2.4.3. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla měřena na dvou koncentračních hladinách ($1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tikagreloru). Byla vypočtena z výsledků deseti po sobě jdoucích měření. Z naměřených hodnot plochy píků, výšky píků a retenčních časů byla vypočítána nejdříve směrodatná odchylka, s , a následně relativní směrodatná odchylka,

s_{rel}

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.3)$$

$$s_{\text{rel}} = \frac{s}{\bar{x}}, \quad (2.4)$$

kde n je celkový počet měření, x_i je hodnota i -tého měření a \bar{x} je průměrná hodnota ze všech měření. [26]

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

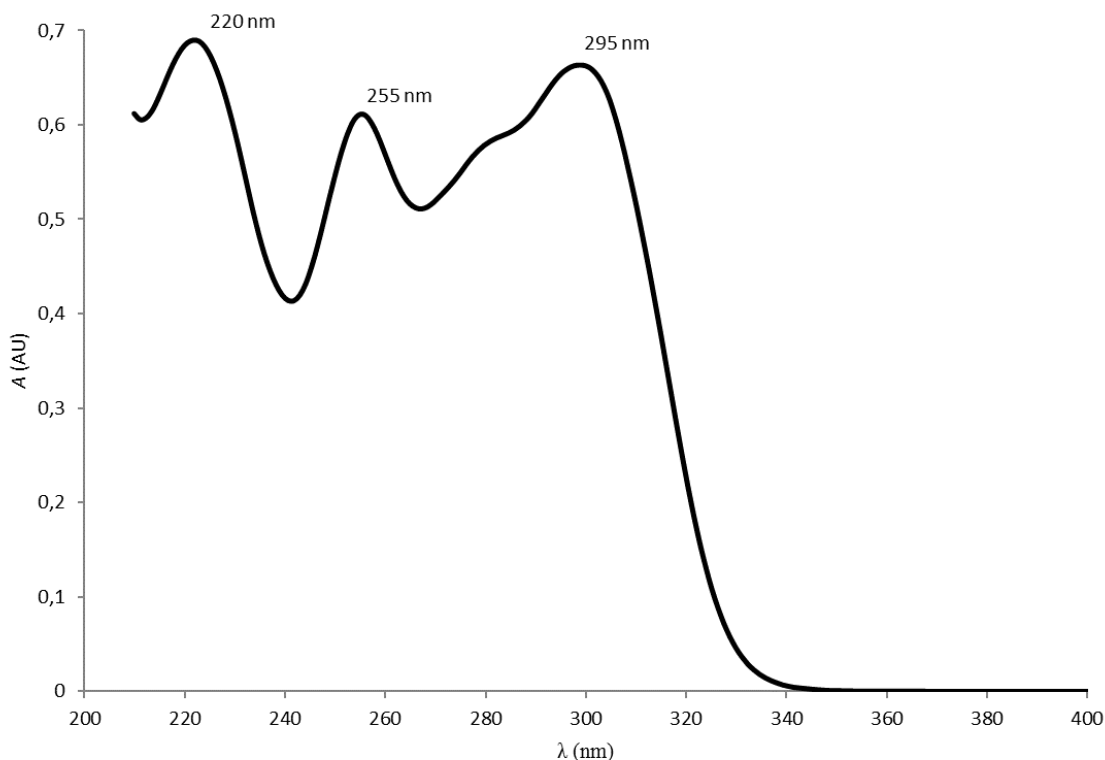
3.1. Rozpustnost tikagreloru

Rozpustnost tikagreloru byla testována rozpouštěním 1 mg látky v 1 ml rozpouštědla, tedy při koncentraci $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Bylo zjištěno, že tikagrelor je rozpustný v minimálně 50% (obj.) roztoku methanolu ve vodě. K úplnému rozpuštění je nutné použít sonifikátor. Ve 100% (obj.) methanolu je tikagrelor rozpuštěn ihned, i bez použití sonifikátoru. Při poměrech methanolu ve vodě nižších, než 50 % (obj.) nedošlo ani po sonifikaci k úplnému rozpuštění. Po zahřátí na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ byl tikagrelor plně rozpuštěn i v 40% (obj.) roztoku methanolu ve vodě. Po ochlazení vzorku bylo rozpuštění opět nedostatečné.

3.2. Vývoj chromatografické metody stanovení tikagreloru

3.2.1. Volba vlnové délky detekce

Tikagrelor vykazuje tři absorpční maxima při vlnových délkách 220, 255 a 295 nm. Jak ukazuje obrázek 3.1, který představuje naměřené absorpční spektrum tikagreloru. Během vývoje chromatografické metody stanovení tikagreloru byly k detekci použity všechny tři vlnové délky. Při vlnové délce 220 nm byly před píkem tikagreloru o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ viditelné nečistoty, které se při vyšších vlnových délkách neobjevovaly. Detekce při vlnových délkách 255 nm a 295 nm se lišila pouze ve výšce píku tikagreloru. Při detekci 295 nm byl pík tikagreloru přibližně o 10 % vyšší, proto byla k následné detekci použita tato vlnová délka.



Obrázek 3.1: Absorpční spektrum tikagreloru měření vlnových délek od 200 do 400 nm.

3.2.2. Vývoj metody separace

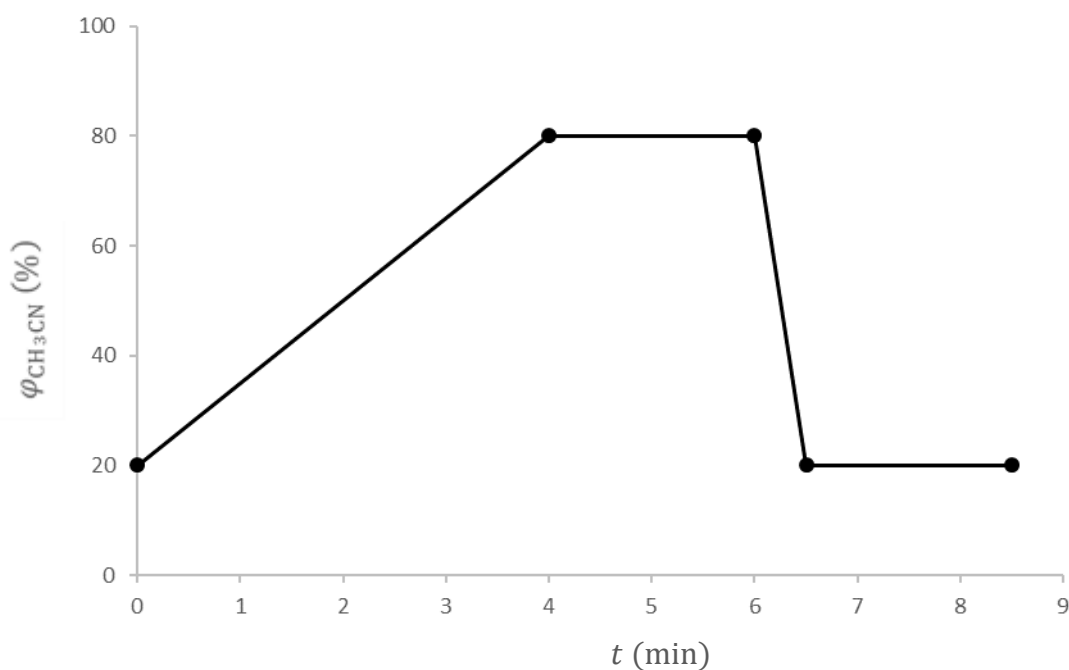
Nejprve byla testována izokratická eluce mobilní fází složenou z 50 % (obj.) acetonitrilu a z 50 % (obj.) deionizované vody. Retenční čas tikagreloru při této separaci byl 2,41 min. Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro separaci oxidačních degradačních produktů tikagreloru. Tyto produkty by se podle H. S. Yaye a spol. měly na koloně vylučovat dříve než účinná látka. Při takto krátkém retenčním čase hrozí koeluce tikagreloru s oxidačními produkty. Z těchto důvodů byla vyzkoušena gradientová eluce, která by měla oddálit vylučování tikagreloru na koloně.

Pro mobilní fází složenou z acetonitrilu a deionizované vody byl nastaven gradient (0-3 min: 50→90 % A; 3-5 min: 90 % A; 5-6 min: 90→50 % A; 6-8,5 min: 50 % A), kde A označuje procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. V případě retenčního času tikagreloru nebyla sledována výrazná změna. Z toho důvodu byl nastaven gradient (0-5 min: 20→80 % A; 5-7 min: 80 % A; 7-7,5 min: 80→20 % A; 7,5-9,5 min: 20 % A). Retenční čas tikagreloru se v tomto případě téměř zdvojnásobil.

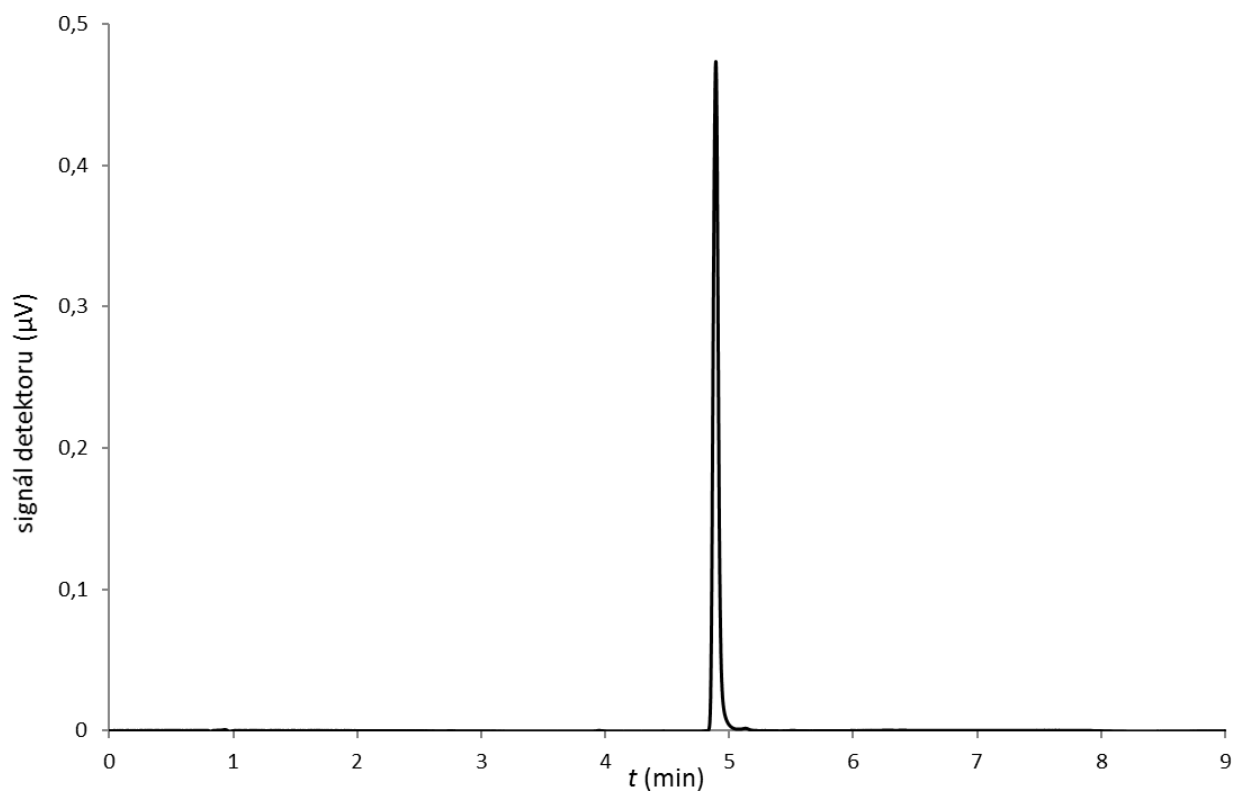
Pík tikagreloru byl úzký, nebyl rozmytý ani rozdvojený. Následně bylo testováno, zda je možné zkrátit dobu trvání jednotlivé separace.

Nejlepší separace bylo dosaženo nastavením gradientu (0-4 min: 20→80 % A; 4-6 min: 80 % A; 6-6,5 min: 80→20 % A; 6,5-8,5 min: 20 % A). Tento gradient je podrobně popsán na obrázku 3.2.

Následně byl vyzkoušen vliv pufrčního roztoku octanu amonného o koncentraci 20 mmol·dm⁻³ a pH 6,5 na separaci tikagreloru. Pufrční roztok nahradil deionizovanou vodu v mobilní fázi. Gradientová eluce probíhala za stejných podmínek jako na obrázku 3.2. Výsledný pík tikagreloru byl lehce asymetrický. Vzhledem k bazické povaze tikagreloru by bylo nejvhodnější použít pufr o nejvyšším možném pH. Kolona v této práci umožňuje použití gradientu pouze do pH 8,5 [17], proto byl připraven pufr o pH 8,0. Výsledný chromatogram tikagreloru analyzovaného za výše uvedených podmínek je uveden na obrázku 3.3.

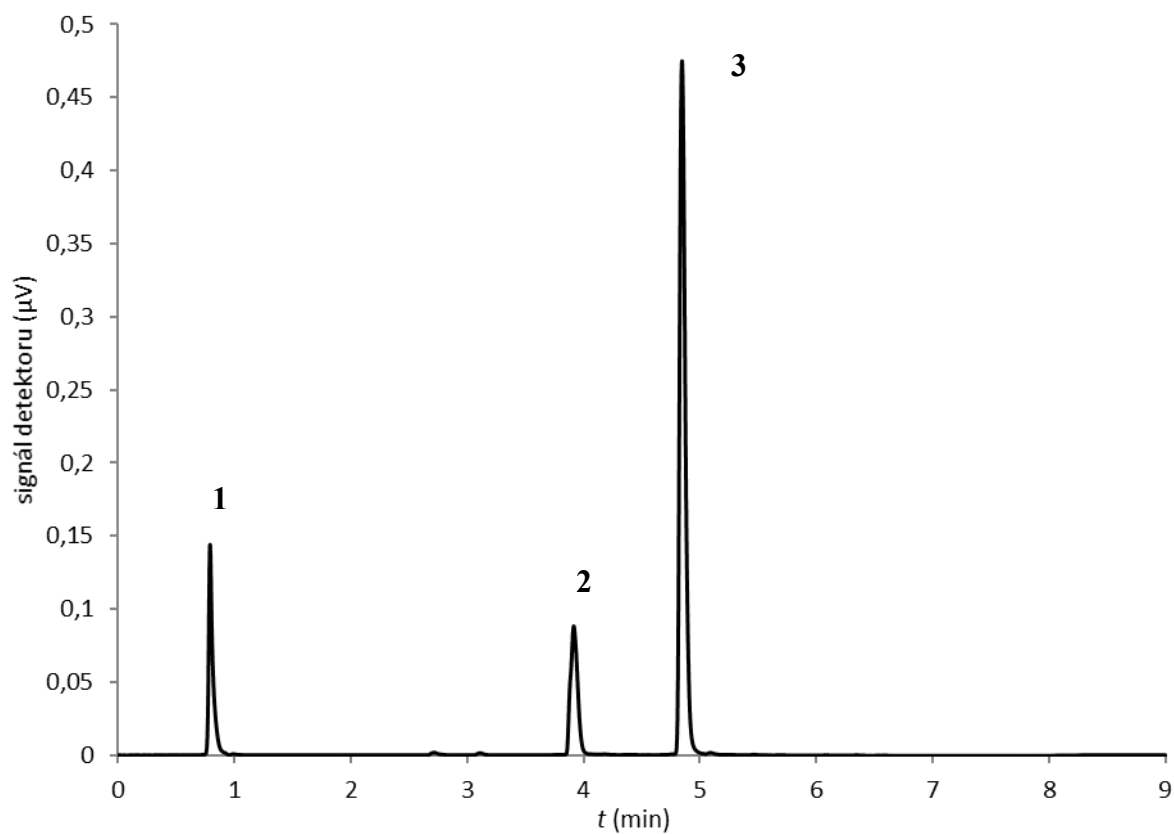


Obrázek 3.2: Průběh gradientového programu tikagreloru.



Obrázek 3.3: Chromatogram tikagreloru. Měřeno optimální metodou (viz. experimentální část).

Degradační produkt byl pozorován po vystavení roztoku tikagreloru o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ působení 3% (obj.) peroxidu vodíku. Oxidace probíhala v tepelné komoře při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 hodin. Výsledný vzorek byl separován gradientovou elucí, uvedenou na obrázku 3.2, za použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a octanu amonného o pH 8,0 a koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Oxidační produkt, který je viditelný na obrázku 3.4 eluoval v čase 3,95 min.

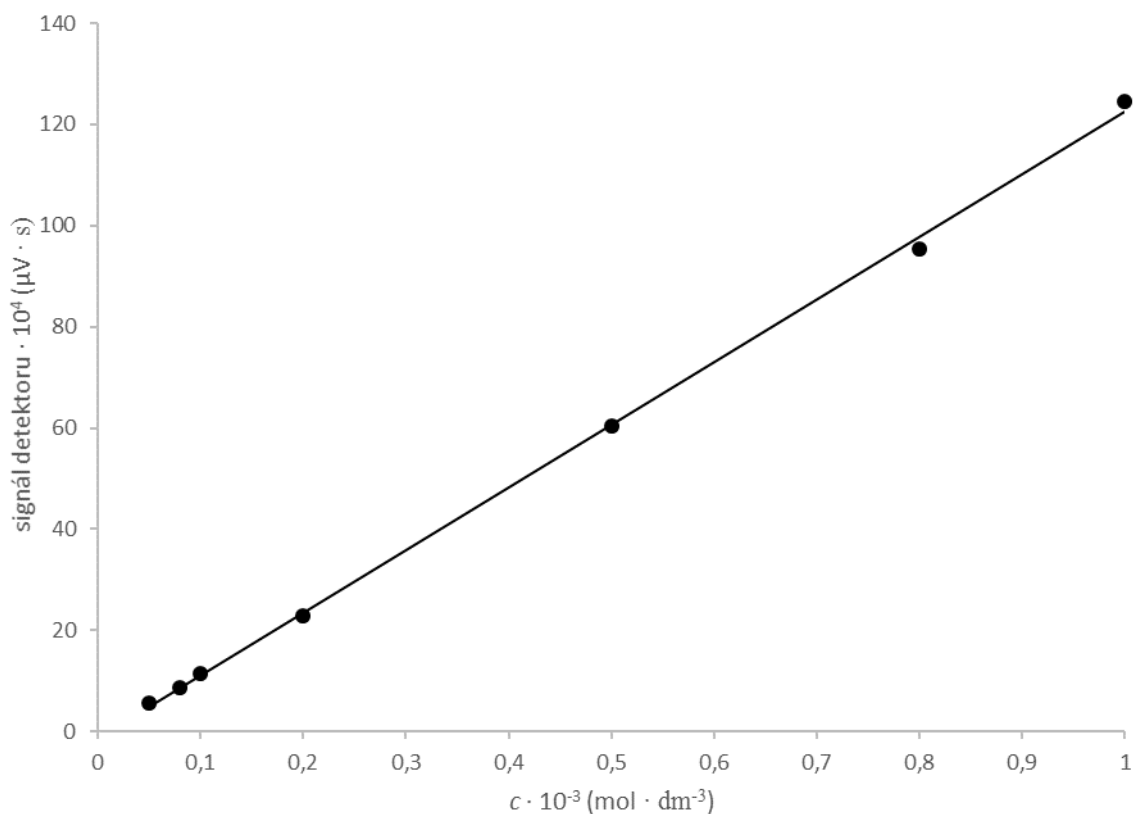


Obrázek 3.4: Chromatogram oxidovaného tikagreloru o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. 1 – peroxid vodíku, 2 – oxidační produkt, 3 – tikagrelor.

3.3. Validace metody

3.3.1. Linearita

Vyvinutá metoda byla validována. Nejprve byla změřena kalibrační křivka o sedmi koncentračních hladinách tikagreloru: $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,08 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,80 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Každá koncentrační hladina byla měřena třikrát. Výsledná kalibrační křivka, uvedena na obrázku 3.5, vyjadřuje závislost mediánu naměřených ploch píku tikagreloru na příslušných koncentracích. Výsledné body byly proloženy lineární regresní rovnicí. Tak byl získán korelační koeficient 0,9996. Vzhledem k tomu, že je vyšší než 0,9990 lze vyvinutou metodu považovat za lineární.



Obrázek 3.5: Kalibrační křivka tikagreloru popisující závislost plochy píku na koncentraci.

3.3.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Hodnota šumu základní linie byla odečtena z chromatogramu oxidovaného tikagreloru a stanovena na 110,4 μV . Podle rovnic 2.1 a 2.2 (strana 20) byla spočítána mez detekce a mez stanovitelnosti. Směrnice kalibrační přímky závislosti koncentrace na výšce píku, m , odpovídá hodnotě 430838 $\mu\text{V}\cdot\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Mez detekce byla stanovena na $7,68 \cdot 10^{-4}$ $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti na $2,56 \cdot 10^{-3}$ $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

3.3.3. Opakovatelnost

Opakovatelnost vyvinuté metody byla testována na vzorcích tikagreloru o koncentraci 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Každá koncentrace byla měřena desetkrát. Na základě naměřených dat byla, podle rovnic 2.1 a 2.2 (strana 20), vypočítána relativní směrodatná odchylka, s_r , retenčních časů, výšky píku a plochy píku, jak je uvedeno v tabulce 3.1. Nejlépe opakovatelné byly retenční časy, neboť se lišily u obou koncentračních hladin pouze o 0,03 %. Plochy píku se v případě nižší koncentrace lišily o 0,22 %, u koncentrace 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ o 1,41 %. Výška píku je nejméně stabilní parametr, v případě vyšší koncentrace se lišila o 1,93 %, u koncentrace 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pouze o 0,99 %. Vzhledem k malým odchylkám lze metodu považovat za opakovatelnou.

Tabulka 3.1: Opakovatelnost UHPLC metody pro stanovení tikagreloru.

$c/ \text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$s_r(S)/ \%$	$s_r(h)/ \%$	$s_r(t_r)/ \%$
1,0	1,41	1,93	0,03
0,1	0,22	0,99	0,03

3.3.4. Robustnost

Robustnost metody značí, zda je metoda opakovatelná při mírně změněných separačních podmínkách. Při validaci metody separace tikagreloru a jeho degradačních produktů byl pozorován vliv změny teploty kolony, pH octanu amonného a procentuálního zastoupení acetonitrilu ve složení mobilní fáze. Tyto podmínky působily na roztok tikagreloru o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, který byl vystaven působení 3% (obj.) peroxidu vodíku po dobu 5 hodin. Naměřené hodnoty při změněných podmínkách byly dány do poměru s hodnotami naměřenými za původních podmínek separace

$$x = \frac{\text{hodnota po změně podmínek}}{\text{hodnota při původních podmínkách}} \quad (3.1)$$

Výsledné poměry, x , jsou uvedeny pro tikagrelor a degradační produkt zvlášť v tabulkách 3.2 a 3.3. V případě tikagreloru byly největší odchylky od původních podmínek pozorovány při změně teploty. Rozdíl se pohybovaly do 14 %. Odlišné procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi způsobí odchylku od původního stavu maximálně o 8 %. Nejméně byly ovlivněny vzorky vystavené změně pH, v tomto případě se parametry změnily pouze o 4 %. Celkově nejstabilnějším parametrem za všech podmínek byla relativní plocha píku, faktor symetrie a retenční čas. Retenční čas se odlišoval pouze v případě změny procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi.

U degradačního produktu způsobily výkyvy teploty kolony změny oproti původním podmínkám maximálně do 13 %. Nejvíce je to viditelné na relativní ploše píku. Rozdíl v procentuálním zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi se projevil vůči původním podmínkám odchylkou 6 %. Změna pH, stejně jako v případě tikagreloru, vyvolala nejmenší odezvu, a to odlišnost o 4 % oproti původním podmínkám. Stejně jako v případě tikagreloru byly u degradačního produktu nejstabilnějšími parametry retenční čas a faktor symetrie. Relativní plocha píku je v tomto případě nejméně stabilní. Největší změny oproti původním podmínkám způsobilo rozdílné procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi, taktéž jako při stanovování tikagreloru.

Tabulka 3.2: Robustnost měřených hodnot pro vyvinutou metodu stanovení tikagreloru. Sledován byl vliv teploty kolony, pH octanu amonného a procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi na retenční čas, t_r , plochu píku, S , výšku píku, h , rozlišení, $R_{1,2}$, symetrii a faktor symetrie.

tikagrelor	t_r / min	$S/\mu\text{V} \cdot \text{sec}$	$h/\mu\text{V}$	$S_{\text{rel}}/\%$	symetrie	$R_{1,2}$	faktor symetrie
Původní podmínky	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
+5 °C	1,00	1,06	1,14	1,01	0,89	1,09	0,96
-5 °C	1,00	1,03	1,06	1,01	0,93	1,05	0,97
+2 % ACN	0,97	1,04	1,08	1,01	0,99	1,05	1,01
-2 % ACN	1,03	1,01	1,06	1,01	0,96	1,05	0,98
pH -0,5	1,00	1,01	1,04	1,00	1,00	1,04	1,00
pH 0,5	1,00	1,01	1,01	1,00	1,01	1,03	1,01

Tabulka 3.3: Robustnost vyvinuté separační metody pro stanovení degradačního produktu tikagreloru. Sledován byl vliv teploty kolony, pH octanu amonného a procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi na retenční čas, t_r , plochu píku, S , výšku píku, h , rozlišení, $R_{1,2}$, symetrii a faktor symetrie.

degradační produkt	t_r / min	$S/\mu\text{V} \cdot \text{sec}$	$h/\mu\text{V}$	$S_{\text{rel}}/\%$	symetrie	$R_{1,2}$
Původní podmínky	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
+5 °C	1,00	0,91	0,92	0,87	1,06	1,01
-5 °C	1,00	0,92	0,92	0,92	1,05	1,05
+2 % ACN	0,96	0,96	0,96	0,94	1,02	1,02
-2 % ACN	1,03	0,93	0,96	0,94	0,99	0,98
pH -0,5	1,00	0,96	0,96	0,96	0,99	0,99
pH 0,5	1,00	0,97	0,99	0,97	1,01	1,00

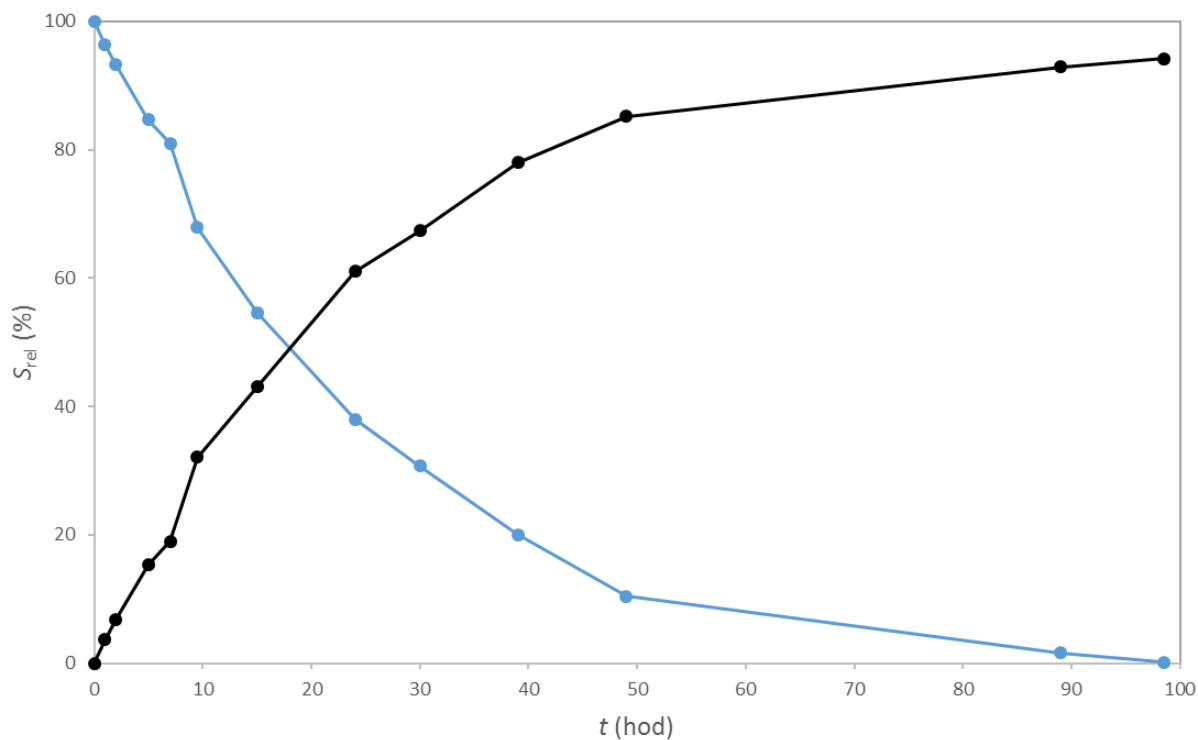
3.4. Studium oxidace tikagreloru

Rychlost oxidační degradace tikagreloru byla testována na vzorcích tikagreloru o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v 50% (obj.) methanolu, který byl vystaven působení 3% (obj.) peroxidu vodíku. Všechny vzorky byly oxidovány v tepelné komoře při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ v rozmezí od 1 do 110 hodin. První tři oxidované vzorky byly měřeny dvakrát a tím byla ověřena opakovatelnost výsledků. Díky prokázání bezproblémové spolehlivosti metody, nebylo už nutné opakovat měření následujících vzorků. Sledována byla relativní plocha píku tikagreloru a degradačních produktů.

Hlavní degradační produkt (OP3, $t_r = 3,95 \text{ min}$, poměr vůči tikagreloru 0,80) vznikal v menším množství už během první hodiny oxidace. Z 20 % byl tikagrelor oxidován po 7 hodinách a z 50 % se rozpadl za přibližně za 18 hodin. Dále byly pozorovány dva vedlejší degradační produkty. První, s retenčním časem 3,11 min, což odpovídá poměru 0,64 vůči tikagreloru, se začal objevovat po 15 hodinách oxidace. Druhý, jehož retenční čas byl 4,19 min a poměr 0,86 vůči tikagreloru, začal vznikat 49 hodin po začátku oxidace. Relativní plocha píků těchto degradačních produktů nepřekročila hranici 5 %. Grafické znázornění průběhu degradace tikagreloru, a s tím souvisejícího vzniku hlavního degradačního produktu, je uvedeno na obrázku 3.6.

Slepé vzorky, které byly v tepelné komoře při stejné teplotě i po stejnou dobu jako vzorky s peroxidem vodíku, neposkytly žádné degradační produkty. Lze říct, že tikagrelor je tepelně stálý při teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$ minimálně po dobu 110 hodin.

Hlavní degradační produkt byl identifikován na základě měření hmotnostního spektra tikagreloru, o koncentraci $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, oxidovaného 15 hodin. Degradační produkt měl m/z 539. Tento degradační produkt vznikl pravděpodobně hydroxylací 6-aminoadeninu na necyklickém dusíku. Výsledný degradační produkt odpovídá OP3, zjištěným H. S. Yaye a spol., který jsou uvedeny na obrázku 1.4 (strana 16), vznikl pravděpodobně stejným způsobem. Společným znakem s H. S. Yaye je také eluce před tikagrelorem. Rozdílem bylo použití desetkrát koncentrovanějšího roztoku peroxidu vodíku. Z toho důvodu je možné, že poločas rozpadu tikagreloru je v podle H. S. Yaye 7,45 h, zatímco v této práci byl stanoven na 18 h.



Obrázek 3.6: Závislost relativní plochy píků tikagreloru a hlavního degradačního produktu na době oxidace. Modrá křivka znázorňuje degradaci tikagreloru a černá vznik degradačního produktu.

4. ZÁVĚR

Byla vyvinuta UHPLC metoda stanovení tikagreloru. K separaci tikagreloru a degradačních produktů byla použita kolona Kinetex C18 100A (100 x 2,1 mm, 1,7 μm ; Phenomenex, USA). Mobilní fáze byla tvořena roztokem octanu amonného o koncentraci 20 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pH 8,0 a acetonitrilem. Gradientový program byl následující: (0-4 min: 20 \rightarrow 80 % A; 4-6 min: 80 % A; 6-6,5 min: 80 \rightarrow 20 % A; 6,5-8,5 min: 20 % A), kde A znázorňuje procentuální zastoupení acetonitrilu. Retenční čas tikagreloru byl 4,91 min. Retenční čas hlavního oxidačního produktu byl 3,95 min. Další dva vzniklé oxidační produkty měly retenční časy 3,11 min a 4,19 min. Separace probíhala při teplotě kolony 25 $^{\circ}\text{C}$ a teplotě dávkovacího zařízení 10 $^{\circ}\text{C}$. Látky vyloučené z kolony byly určovány PDA detektorem. Výsledné chromatogramy byly vyhodnocovány při vlnové délce 295 nm.

Vyvinutá metoda byla validována. Byla změřena kalibrační křivka o sedmi koncentračních úrovních. Korelační koeficient byl stanoven na 0,9996. Poté byla ověřena robustnost metody na základě změny teploty o ± 5 $^{\circ}\text{C}$, změny procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi o ± 2 % a změny pH roztoku octanu amonného o koncentraci 20 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ o $\pm 0,5$. Tyto podmínky v různé míře ovlivnily retenční čas, plochu píku, výšku píku, relativní plochu píku, symetrii píku, rozlišení a faktor symetrie. Veškeré parametry se změnilo o méně než 15 %. Opakovatelnost byla měřena u vzorku tikagreloru o koncentraci 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Relativní směrodatná odchylka byla maximálně 2 %. Mez detekce byla stanovena na $7,68 \cdot 10^{-4}$ $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti na $2,56 \cdot 10^{-3}$ $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Tikagrelor byl oxidován 3% (obj.) peroxidem vodíku v klimatické komoře při 50 $^{\circ}\text{C}$. Oxidace byla sledována na základě změn relativních ploch píků. Z 20 % byl tikagrelor oxidovaný po 7 hodinách. Polovina z jeho původního množství se rozpadla po 18 hodinách. Hlavní oxidační produkt, s retenčním časem 3,95 min, vznikl hydroxylací 6-aminoadeninu na necyklickém dusíku. Po 10 a 49 hodinách od počátku oxidace byly detekovány dva vedlejší oxidační produkty. Jejich relativní plochy píku nepřekročily 5 %.

Literatura

- [1] PubChem. *Ticagrelor* [online]. USA: U. S. National Library of Medicine, ©2006. 2019 [cit. 2.11.2019]. Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9871419>.
- [2] RIZK, Mohamed, TAHA, Elham Anwer, EL-ALAMIN, Maha Mahmoud Abou, HENDAWY, Hassan, SAYED, Jasmine Mohamed. Highly Sensitive Carbon Based Sensors Using Zinc Oxide Nanoparticles Immobilized Multiwalled Carbon Nanotubes for Simultaneous Determination of Desvenlafaxine Succinate and Clonazepam. *Journal of The Electrochemical Society*. 2018, **165**(7), H333-H341.
- [3] YAYE, Hassan Sadou, SECRÉTAN, Philippe-Henri, HENRIET, Théo, BERNARD, Mélisande, AMRANI, Fatma, AKROUT, Wiem, TILLEUL, Patrick, YAGOUBI, Najet, DO, Bernard. Identification of the Major Degradation Pathways of Ticagrelor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, **105**, 74-83.
- [4] ADAMSKI, Piotr, BUSZKO, Katarzyna, SIKORA, Joanna, NIEZGODA, Piotr, BARANSKA, Malvina, OSTROWSKA, Malgorzata, PACIOREK, Przemyslaw, NAVARESE, Eliano P., GOROG, Diana A., KUBICA, Jacek. Metabolism of ticagrelor in patients with acute coronary syndromes. *Scientific Reports*. 2018, **8**(11746).
- [5] TENG, Renli, OLIVER, Stuart, HAYES, Martin, A., BUTLER, Kathleen. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Ticagrelor in Healthy Subjects. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010, **38** (9), 1514-1521.
- [6] Sigma-Aldrich. *Ticagrelor*. [online]. Německo: Merck, ©2019. [cit. 3.11.2019] Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/cds023238?lang=en®ion=C>
- [7] Drugbank. *Ticagrelor*. [online]. Kanada: Drugbank, ©2011. 2019 [cit. 3.11.2019] Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08816>.

- [8] HUSTED, Steen, van GIEZEN, J.J.J. Ticagrelor: The First Reversibly Binding Oral P2Y₁₂ Receptor Antagonist. *Cardiovascular Therapeutics*. 2009, **27**, 259-274.
- [9] KNOT, Jiří, PĚNIČKA, Martin, ČURILA, Karol, WIDIMSKÝ, Petr. Akutní Koronární Syndrom. *Medicína pro praxi*. 2007, **4**, 153–155.
- [10] TENG, Renli, BUTLER, Kathleen. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist, in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2010, **66**(5), 487-496
- [11] SKOOG, Douglas A., WEST, Donald M., HOLLER, James F., CROUCH, Stanley R. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-0-495-55828-6. 833-849.
- [12] MÜLLERTZ, Anette, PERRIE, Yvonne, RADES, Thomas. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*. New York: Springer, 2016. ISBN 978-1-4939-4027. s. 413–439.
- [13] MOLDOVEANU, Serban, DAVID, Victor. *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3. s. 10-28
- [14] LAKE, Rick. *Chromatography /UHPLC*. [online] Praha: Chromservis. [cit. 24.9.2019] Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/g/uhplc>.
- [15] NAUSAD, Mu., KHAN, Mohammad Rizwan. *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*. Evaluation and application in food analysis. Boca Ranton, FL: CRC Press, 2014. ISBN 978-1-4665-9155-4. s. 1-16.
- [16] NOVÁKOVÁ, Lucie., DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi, I*. Praha, 2013. ISBN 9788026042433.
- [17] Waters. *Columns*. [online] [cit. 24.9.2019] Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_US/Columns-HPLC-UHPLC-UPLC-SFC-GPC-SEC-and-more/nav.htm?cid=134771861&locale=en_US

- [18] Kinetex. *Kinetex HPLC/UHPLC Columns Tips for Care and Use*. [online]. Phenomenex, ©2017. [cit. 3.11.2019] Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/kinetex-hplc-uhplc-columns-tips-for-care-and-use.pdf>.
- [19] WALTER, Thomas H., ANDREWS, Richard W. Recent inovations in UHPLC columns and instrumentation. *Trends in analytical chemistry*. 2014, **63**, 14-20.
- [20] NOVÁKOVÁ, Lucie, MATYSOVÁ, Ludmila, SOLICH, Petr. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. 2016, **68**, 906-918.
- [21] M., Blessy, PATEL, Ruchi. D., PRAJAPATI, Prajesh. N., AGRAWAL, Y. K. Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs - A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014, **4** (3), 159–165.
- [22] BRÜMMER, Hildegard. How to Approach a Forced Degradation Study. *Life science Technical bulletin*. 2011, **31**, 1-4.
- [23] SINGH, Ranjit, REHMAN, Zia. Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. *Indian journal of pharmaceutical education and research*. 2012, **3** (1), 54-63.
- [24] Katedra analytické chemie. *Pokročilé Praktikum z Analytické Chemie*. Univerzita Karlova. 2017, s. 36–38.
- [25] NOVÁKOVÁ, Lucie., DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi II*. Praha, 2013. ISBN 9788026042440.
- [26] HENDL, Jan. *Přehled statistických metod zpracování dat*. Praha, 2004. ISBN 80-7178-820-1.