

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Pavlína Kvapilová

Oxidační degradace ticagreloru
Oxidative degradation of ticagrelor

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Anna Kubíčková, 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, 11. 6. 2020

Pavλίna Kvapilová

Poděkování

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala vedoucí této práce RNDr. Anně Kubíčkové, Ph.D. za odborné vedení práce, vstřícnost, trpělivost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za pomoc a rady v oblasti elektrochemie. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala doc. RNDr. Karlovi Nesměrákovi, Ph.D. za možnost využití jeho laboratoře.

Velké poděkování také patří mé rodině a nejbližším za podporu a trpělivost během studia.

Abstrakt

Tato práce se věnuje oxidační degradaci účinné farmaceutické látky ticagrelor, která je používána spolu s kyselinou acetylsalicylovou jako prevence proti aterotrombotickým příhodám u dospělých pacientů. V rámci této práce byla oxidace studována, jak tradiční cestou pomocí peroxidu vodíku, tak nově elektrochemickým přístupem. Oxidace byla prováděna 3% roztokem peroxidu vodíku při 50 °C v různých rozpouštědlech. V rámci práce byla dále vyvinuta elektrochemická metoda na oxidaci ticagreloru. Tato metoda byla poté optimalizována, aby bylo dosaženo, co nejvyšší účinnosti oxidace. V práci byl také zkoumán vliv excipientů na rychlost oxidace. Degradací produkty byly vyhodnocovány pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Struktury všech vzniklých degradačních produktů byly identifikovány pomocí QDA hmotnostního detektoru.

Klíčová slova: *UHPLC, elektrolyza, degradační studie, léčiva*

Abstract

This thesis deals with the oxidative degradation of the active pharmaceutical substance ticagrelor, which is used together with acetylsalicylic acid as a prevention against atherothrombotic events in adult patients. In this thesis, oxidation was studied both in the traditional way using hydrogen peroxide and the new electrochemical approach. The oxidation was performed with a 3% solution of hydrogen peroxide at 50 °C in various solvents. An electrochemical method for the oxidation of ticagrelor was developed as part of the thesis. This method was then optimized to achieve the highest possible oxidation efficiency. The thesis also investigated the effect of excipients on the oxidation rate. Degradation products were evaluated using the ultra-high performance liquid chromatography. The structures of all the degradation products formed were identified using a QDA mass detector.

Key words: *UPLC, electrolysis, degradation studies, pharmaceuticals*

Obsah

1.	Teoretický úvod.....	9
1.1	Ticagrelor.....	9
1.2	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	11
1.3	Coulometrie	12
1.4	Degradační studie léčiv	14
1.5	Oxidační degradace	16
1.6	Stabilita ticagreloru a oxidační degradace peroxidem vodíku.....	17
1.7	Elektrochemické stanovení ticagreloru	21
2.	Cíl práce.....	23
3.	Experimentální část.....	24
3.1	Použité chemikálie a přístroje.....	24
3.2	Příprava vzorků.....	25
3.3	Podmínky chromatografických měření	27
3.4	Cyklická voltametrie	27
3.5	Podmínky elektrolytických měření	28
4.	Výsledky a diskuze	30
4.1	Oxidace ticagreloru peroxidem vodíku	30
4.2	Elektrochemická oxidace ticagreloru	39
4.3	Identifikace degradačních produktů	45
5.	Závěr	47
6.	Seznam literatury	49

Seznam použitých zkratek a symbolů

Použité zkratky

AIBN	azobisisobutyronitril
ADP	adenosindifosfát
API	účinná farmaceutická látka (z ang. Active Pharmaceutical Ingredient)
BR pufr	Britton – Robinsonův pufr
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z ang. Food and Drug Administration)
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (z ang. Fourier transform infrared spectroscopy)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z ang. high-performance liquid chromatography)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (z ang. liquid chromatography-mass spectrometry)
NMR	nukleární magnetická rezonance (z ang. nuclear magnetic resonance)
PDA	detektor s diodovým polem (z ang. photodiode array detector)
PEEK	polyetheretherketon
QDA	hmotnostní detektor s monokvadrupólem (Waters)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi (z ang. reverse phase HPLC)
SIM	metoda indikující stabilitu (z ang. stability indicating method)
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z ang. ultra-high performance liquid chromatography)
UV	ultrafialový

Použité symboly

A	plocha elektrody
c	koncentrace látky
δ	tloušťka difúzní vrstvy
E	redoxní potenciál

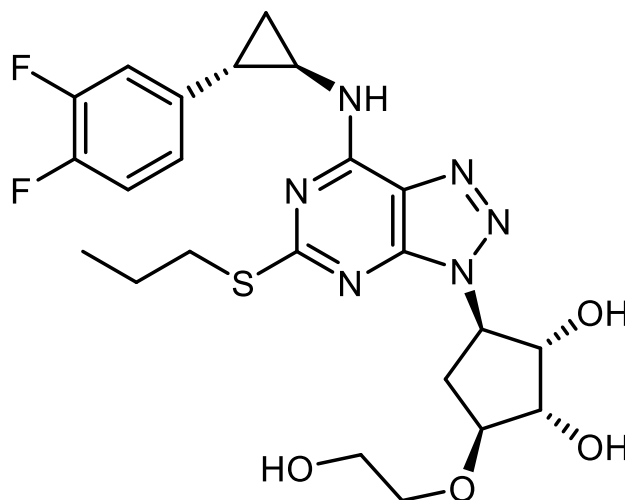
F	Faradayova konstanta
I	elektrický proud
k	koeficient přenosu hmoty
Q	elektrický náboj
t	čas
t_r	retenční čas
V	objem

1. Teoretický úvod

1.1 Ticagrelor

Ticagrelor je bílý až světle narůžovělý prášek, která má molekulovou hmotnost 522,57 g mol⁻¹. Molekulový vzorec této látky je C₂₃H₂₈F₂N₆O₄S.¹ Název sloučeniny dle IUPAC je (1*S*,2*S*,3*R*,5*S*)-3-[7-[[*(1R,2S)*-2-(3,4-difluorophenyl)cyclopropyl]amino]-5-propylsulfanyltriazolo[4,5-*d*]pyrimidin-3-yl]-5-(2-hydroxyethoxy)cyclopentane-1,2-diol.²

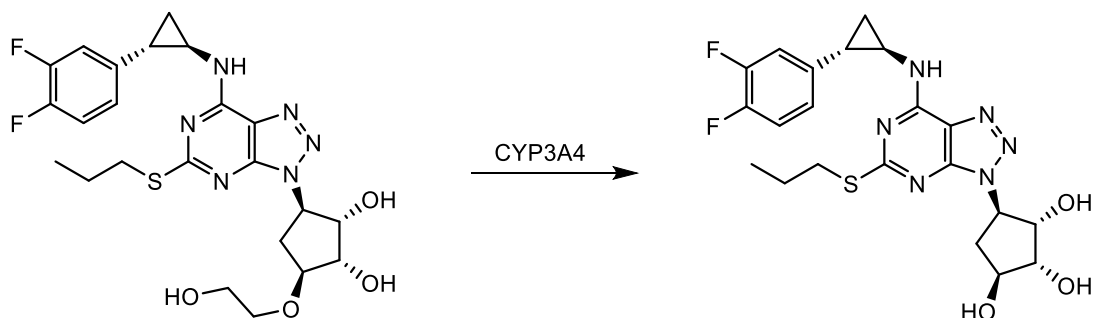
Patří do chemické skupiny cyklopentyltriazolopyrimidinů. Ticagrelor je používán jako protideštičkové léčivo, které podáváno pacientům perorálním způsobem.³ Tato účinná farmaceutická látka (API) je součástí léčivého přípravku, který se prodává pod názvem Brilique v Evropské unii a pod názvem Brilinta ve Spojených státech amerických ve formě potahovaných tablet.⁴ Rozpustnost ticagreloru ve vodě při laboratorní teplotě je 10 µg ml⁻¹. Dále je ticagrelor rozpustný v organických rozpouštědlech jako je ethanol, DMSO a DMF.⁵ Hodnoty pK_a byly vypočteny jako 12,94 (nejsilnější kyselina) a 2,93 (nejsilnější báze).⁶ Na obrázku 1 je znázorněna struktura ticagreloru.



Obrázek 1: Struktura ticagreloru

Ticagrelor je první z nové třídy protideštičkových látek, cyklopentyltriazolopyrimidinů. Podobně jako thienopyridiny je ticagrelor perorální antagonistou P2Y₁₂ receptoru, který vykazuje protideštičkové účinky blokováním ADP. Na rozdíl od jiných protideštičkových léčiv má ticagrelor vazebné místo odlišné od ADP, což z něj činí allosterického antagonistu a blok je reverzibilní.⁷ Ticagrelor nevyžaduje

metabolickou aktivaci a tím pádem má rychlejší nastup účinku.⁸ Maximální plazmatické koncentrace bylo dosaženo již po hodině a půl.⁹ Je rychle absorbován ze střev a jeho hlavní metabolit je tvořen pomocí enzymu cytochromu P450 typu 3A4 (CYP3A4), a to dehydroxylací v poloze 5 cyklopentanového kruhu.¹⁰ Tato metabolická přeměna je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2: Hlavní metabolická cesta ticagreloru (převzato a upraveno z [10])

Přípravek Brilique je podáván spolu s kyselinou acetylsalicylovou jako prevence proti aterotrombotickým příhodám u dospělých pacientů, kteří mají v anamnéze akutní koronární syndrom nebo infarkt myokardu nebo u pacientů, u kterých je velké riziko vývoje aterotrombotických příhod.¹¹ Složení tablety Brilique je uvedeno v tabulce 1.

Akutní koronární syndrom patří do skupiny onemocnění, kam řadíme například němou ischemii myokardu, nestabilní anginu pectoris nebo srdeční selhání. Akutní koronární syndrom je zdravotní komplikací, která je označována jako akutní forma ischemické choroby srdeční, po které dochází k náhlé změně stavu pacienta. Při této formě ischemie, dojde k prasknutí aterosklerotického plátu (tj. vrstvy tuků, které se dlouhé roky usazují na stěnách cévy) a následně dojde k ucpání krevního řečiště. Tyto akutní formy způsobují kolem třetiny úmrtí v České republice.^{12,13}

Léčba ve většině případů probíhá farmakologicky a ve vážnějších případech se přistupuje k instrumentálnímu zprůchodnění věnčité tepny. Poslední možností, jak řešit akutní koronární syndrom, je formou bypassu.¹²

Tabulka 1: Složení léčivého přípravku Brilique

Části tablety	Chemická látka	Hmotnost (mg)
Účinná látka:	Ticagrelor	60
Jádro tablety:	Mannitol	84
	Dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého	42

	Stearan hořečnatý	2
	Sodná sůl karboxymethylškrobu (typ A)	6
	Hydroxypropylcelulóza	6
Potah tablety:	Oxid titaničitý	2,2
	Polyethylenglykol	0,4
	Hydroxypropylmethylcelulóza	4,4

1.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC, z anglického Ultra-High Performance Liquid Chromatography) je poměrně mladá chromatografická metoda poskytující nové možnosti v kapalinové chromatografii. První komerční přístroj představila firma Waters v roce 2004. Ultra-vysokotlaký systém umožňuje použití kolon, které obsahují stacionární fázi tvořenou malými částicemi, průměr částic se pohybuje od 1,5 μm do 2 μm . Kolony jsou dlouhé 50 až 150 mm a vnitřní průměr mají většinou 2,1 mm. Přístroje umožňují pracovat s vysokými tlaky až do 120 MPa. Oproti klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC, z anglického High Performance Liquid Chromatography) má řadu výhod jako je zvýšení separační účinnosti, zkrácení doby analýzy, zvýšení citlivosti, snížení meze detekce a snížení nákladů z důvodu menší spotřeby rozpouštědel.¹⁴

Jak již bylo zmíněno výše, UHPLC funguje na stejném principu jako HPLC, ovšem instrumentace musela být přizpůsobena tlaku, kterého se v systému dosahuje. Výkonné pumpy zajišťují v systému dostatečně vysoký tlak. Tomuto tlaku musí být uzpůsobeny spojovací materiály, které jsou vyráběny z vysoce odolných materiálů (odolávají taktéž vysokým teplotám) jako například ocel, pozlacená ocel, kombinace ocel-PEEK (polyetheretherketon) nebo vysoce odolný PEEK.¹⁵

V UHPLC se používají stejné sorbenty jako v HPLC, tedy především silikagel nebo sorbenty na polymerním základě. Silikagel je mechanicky odolný a vysoce účinný, ale mezi jeho nevýhody patří limitovaný rozsah pH mobilní fáze, chvostování bazických solutů a jeho chemická nestabilita. V případě využití polymeru lze pracovat v široké oblasti pH, polymer je chemicky stabilní a nedochází na něm k iontovým interakcím. Mezi jeho nevýhody patří menší mechanická odolnost. O spojení obou typů sorbentů, a tak získání optimálních vlastností se pokouší technologie Hybrid Particle Technology.¹⁴

V praxi existuje mnoho UHPLC kolon ovšem nejvíce jsou používané tyto stacionární fáze: C8, C8 se zabudovanou polární skupinou (karbamátem), C18 a fenylová kolona.¹⁴

Detekce je stejná jako u HPLC nejčastěji se používá UV-VIS, fluorimetrický, hmotnostní detektor a další.¹⁶ V této práci byl použit PDA detektor, který patří do skupiny UV-VIS detektorů a snímá celé spektrum vlnových délek v reálném čase.¹⁷ Dále byl použit QDA detektor jako hmotnostní detektor.

UHPLC je vhodná technika pro rutinní analýzy v laboratořích, kde se zpracovávají velká množství vzorků. UHPLC má velké uplatnění ve farmaceutických oborech, při analýzách v potravinových matricích a environmentálních analýzách. V případě, že chceme stanovit stopové koncentrace například léčiv, které se vyskytují v životním prostředí nebo potravinách je možné využít spojení UHPLC spojené s moderním citlivým hmotnostním spektrometrem.¹⁸

1.3 Coulometrie

Coulometrie je elektroanalytická absolutní metoda založená na úplné elektrolýze. Dochází při ní ke kvantitativní přeměně stanovované látky v roztoku důsledkem elektrolýzy, která probíhá na pracovní elektrodě. V coulometrii je pro nás analytickou informací elektrický náboj, který je potřebný k úplné přeměně stanovované látky v roztoku. Pomocí coulometrie je možné stanovit malá množství látek s vysokou přesností při splnění těchto podmínek:

- 1) Zajištění 100% proudové účinnosti, což znamená, že veškerý elektrický náboj, který projde roztokem musí být spotřebován na elektrochemickou přeměnu analytu. K tomu, aby došlo k úplné přeměně analytu přispívá oddělení prostoru pomocné a pracovní elektrody, volba základního elektrolytu a použití vhodného materiálu pracovní elektrody. Mezi používané elektrodové materiály se řadí platina, rtuť a v této době jsou oblíbené různé formy uhlíku.¹⁹
- 2) Konec coulometrického stanovení by měl být přesně určený, což znamená, že by měl být určen okamžik, kdy je veškerá stanovovaná látka kvantitativně přeměněna. Konec elektrolýzy je možný u potenciostatické coulometrie zjistit z hodnoty elektrického proudu, kdy se tato hodnota blíží nule. U galvanostatické coulometrie je potřeba určit bod ekvivalence.

3) Prošlý náboj Q musí být přesně určen z rovnice 1:

$$Q = \int_0^{\infty} I_t dt \quad (1)$$

kde Q je náboj a I_t je proud v daném čase. Při potenciostatické coulometrii se k zjištění náboje používají například elektronické integrátory. Pokud se provádí galvanostatická coulometrie je potřeba měřit čas elektrolýzy a náboj lze pak zjistit z rovnice 2:

$$Q = It \quad (2)$$

kde Q je náboj, I je proud a t je čas.

1.3.1 Potenciostatická coulometrie

V této práci byla použita potenciostatická coulometrie, při které je na pracovní elektrodě udržován konstantní potenciál. Elektrolytický proud exponenciálně klesá s časem, což je v souladu s ubývajícím množstvím stanovované látky v roztoku. Elektrolýza je ukončena, když je hodnota proudu téměř nulová. Platí následující rovnice:

$$I = I_{t=0} e^{-kt} \quad (3)$$

kde I je proud [A], I_t je proud v daném čase [A], k je koeficient přenosu hmoty [s^{-1}] a t je čas [s].

Zvýšit rychlost elektrolýzy lze zvýšením teploty nebo hodnoty k . Ke zvýšení hodnoty k dojde při zvětšení plochy elektrody a snížení tloušťky difúzní vrstvy, což v praxi znamená intenzivnější míchání a také zmenšení objemu elektrolyzovaného vzorku. Vše shrnuje následující rovnice:

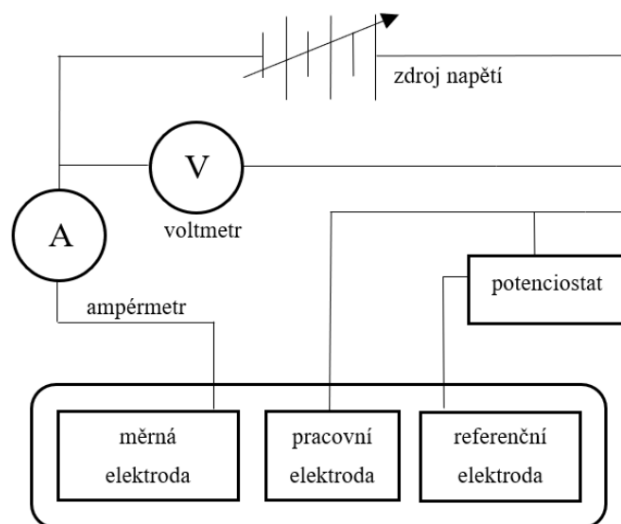
$$I_t = \frac{nFADc}{\delta} \exp\left(-\frac{DA}{V\delta}t\right) \quad (4)$$

kde n je počet vyměněných elektronů, F je Faradayova konstanta ($F = 96458,31 \text{ C mol}^{-1}$), A je plocha elektrody [m^2], D je difúzní koeficient [$m^2 s^{-1}$], c je koncentrace stanovované látky v roztoku před začátkem elektrolýzy [mol dm^{-3}], δ je tloušťka difúzní vrstvy [m], V je objem analyzovaného vzorku [m^3] a t je čas [s].

Elektrolýza za konstantního proudu je neúčinnějším způsobem, jak provést úplnou elektrolýzu, jelikož elektrolytický proud je maximální, a za zvolených experimentálních podmínek (aktuální koncentrace stanovované látky, míchání) rovný limitnímu proudu.

Přístroj pro potenciostatickou coulometrii je složen z elektrolytické cely, potenciostatu, který udržuje konstantní potenciál na pracovní elektrodě a elektronického integrátoru zapojeného v obvodu v sérii s ampérmetrem.²⁰ Pro potenciostatickou

coulmetrii se používá tříelektrodové uspořádání. Schéma zapojení potenciostatické coulometrie je znázorněno na obrázku 3. Pracovní elektrodou je v tomto případě velkoplošná elektroda, pomocná elektroda je oddělena solným můstkem a jako referenční se používá elektroda druhého druhu (s konstantním potenciálem), například argentschloridová. Roztok základního elektrolytu je po celou dobu měření promícháván.



Obrázek 3: Schéma zapojení potenciostatické coulometrie (převzato a upraveno z [21])

1.4 Degradční studie léčiv

Degradční studie léčiv, která je často také označována jako stresové testování léčiv, je hlavním nástrojem používaném k předpovídání problémů se stabilitou léčiv. Zahrnuje vývoj analytických metod a identifikování degradačních produktů či jednotlivých degradačních drah.²² Změny ve stabilitě léčiva mohou ohrozit bezpečnost pacienta vytvořením toxického degradačního produktu nebo může být pacientovi dodána nižší dávka než která je očekávána. Proto je nezbytné znát profil čistoty a chování léčivé látky za různých podmínek prostředí.²³

Provedení studií stability nové skupiny léků se stalo povinností před registrací samotného léčiva. Stabilitní studie se skládají ze stresové testování, zrychlených testů a dlouhodobých testů. Do stresového testování patří zkoušky, při kterých se léčivý přípravek či účinná látka podrobí extrémní chemické a fyzikální zátěži a tím dojde k urychlení chemického rozkladu dané látky. Toto testování se taktéž využívá pro optimalizaci analytických metod sledujících stabilitu léčiva. Tyto metody pomáhají rozlišit sledované látky a jejich degradační produkty a stanovit jejich obsah v produktu.²⁴

Léčivo je vystaveno různým stresovým podmínkám v různých časových intervalech. Mezi stresové podmínky se řadí teplo, vlhkost, světlo, hydrolyza vlivem kyseliny či báze nebo oxidace, případně kombinace těchto podmínek. Optimální degradace sledované API během stresové studie by měla být mezi 5 % až 20 %.²⁵ Vyšší úroveň degradace je mimo rozsah požadavků na stabilitu.²³ Degradace API zahrnuje vytvoření nebo zánik kovalentních vazeb v chemických procesech jako je oxidace, redukce, termolýza a hydrolytické reakce.²⁶ Stresové testování trvá nejvýše tři měsíce.²⁷ V tabulce 2 jsou znázorněny typické stresové podmínky a způsob jejich provedení.

Tabulka 2: Typické stresové podmínky pro API a léčivý přípravek (převzato a upraveno z [22,23]).

stresová podmínka	způsob provedení	API		Léčivý přípravek	
		pevný	roztok/ suspenze	pevný	roztok/ suspenze
Kyselina	0,1 – 1 mol dm ⁻³ HCl	–	+	–	+
Báze	0,1 – 1 mol dm ⁻³ NaOH	–	+	–	+
Oxidace	0,3% H ₂ O ₂	–	+	–	+
Světlo	1200 Lux h	+	+	+	+
Teplota	10 – 70 °C	+	+	+	+
Vlhkost	60 – 90 r.h.	+	–	–	+

Metoda indikující stabilitu (SIM) je analytický postup, který se používá ke kvantitativnímu snížení množství účinné farmaceutické složky (API) v léčivém produktu v důsledku degradace. Podle pokynů FDA je metoda indikující stabilitu validovaným kvantitativním analytickým postupem, který lze použít k detekci toho, jak se stabilita léčivých látek a léčivých produktů mění v čase. SIM přesně měří změny koncentrace účinných látek bez interference z jiných produktů rozkladu, nečistot a pomocných látek. Nejrozšířenějším analytickým nástrojem pro separaci a kvantifikaci nečistot je RP-HPLC nejčastěji v spojení s UV detektorem.²⁵

Kromě stresového testování léčiv se v rámci studií stability provádí zrychlené a dlouhodobé testy. Při zrychlených testech je léčivo či léčivý přípravek krátkodobě skladován při extrémních skladovacích podmínkách mimo optimální rozsah. Tyto testy jsou prováděny za účelem urychlení chemického rozkladu nebo fyzikální změny léčiva nebo léčivého přípravku.²⁷ Extrémními podmínkami jsou při těchto testech teplota

a vlhkost. Na látky se nejčastěji působí teplotou 40 °C při 75% relativní vlhkosti, a to po dobu minimálně šesti měsíců. Maximální doba trvání zrychlených testů je jeden rok. Výsledky zrychleného testu lze použít k ověření stability, kdy přípravek je krátkodobě skladován mimo navržené podmínky, což může být například při přepravě. Informace získané při zrychlených testech lze následně použít ke stanovení optimálních podmínek skladování.^{24,27}

Dlouhodobé testy se provádí za účelem zjištění doby použitelnosti léčiva. Přípravek je testován v originálním uzavřeném obalu za doporučených podmínek skladování. Podmínky, za kterých se přípravek bude skladovat závisí na typu klimatického pásma. Česká republika spadá do I. klimatického pásma, testy jsou prováděny při teplotě 25 °C a 60% relativní vlhkosti a to nejdéle po dobu až pěti let.²⁷ Tento test by měl zachytit předpokládané změny během skladování, které by mohly ovlivnit účinnost, kvalitu a bezpečnost léčivého přípravku.²⁴

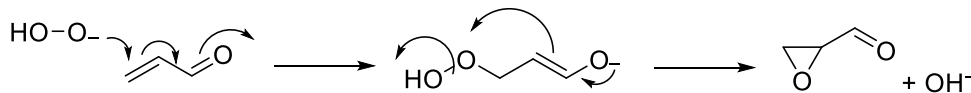
Léčivou látku lze považovat za stabilní, pokud vyhovuje specifikaci za podmínek uchovávání 40 °C/75% RV po dobu šesti měsíců a za podmínek uchovávání 25°C/60 % RV po dobu dvou let.²⁸

1.5 Oxidační degradace

Oxidační degradace je jedním ze dvou nejčastějších mechanismů degradace léčiva. Jsou známy tři hlavní oxidační cesty pro degradaci a to radikálově iniciovaná oxidace, též známá jako autooxidace, peroxidem vodíku zprostředkovaná oxidace a oxidace zprostředkovaná elektronovým přenosem.²² Peroxid vodíku je nejvíce používán pro oxidaci léčivých látek, ale mohou být použita i jiná oxidační činidla jako jsou ionty kovů, kyslík a iniciátory radikálů (např. azobisisobutyronitril).²⁵ Klasický test oxidativního stresu spočívá ve vystavení léčivých látek peroxidům, rozpuštěním léčiva ve zředěném vodném peroxidu vodíku (např. 0,3–3% peroxidu vodíku).²²

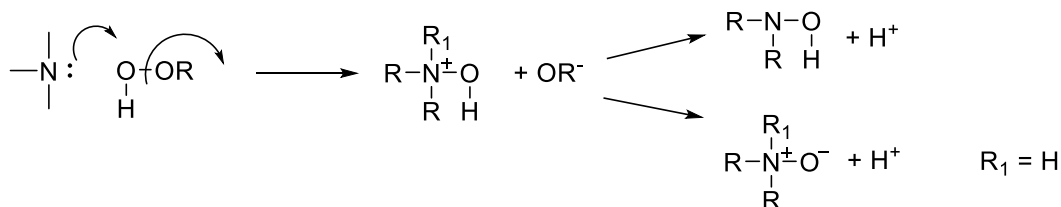
Oxidace léčiv může být také způsobena expozicí peroxidům, které lze nalézt v různých hladinách v některých pomocných látkách (např. polysorbáty, polyethylenglykol a hydroxypropylcelulóza). Hladiny se mohou postupem času v důsledku autooxidačních procesů zvyšovat. Peroxidové nečistoty v pomocných látkách, jako je například povidon mají při skladování tendenci se zvyšovat. To může omezit přínos použití pomocné látky s nízkou počáteční koncentrací peroxidu a je závislé na podmínkách skladování.²⁹ Peroxidy mohou podléhat třem typům oxidačních chemických reakcí s léčivými látkami:

První možností je nukleofilní adiční reakce, pokud se hydroperoxid nachází v zásaditém prostředí, pak se může peroxidový anion chovat jako nukleofil, který lze adovat na léčivou látku. Například Michaelova adice na α,β -nenasycený keton následována ztrátou peroxidu, kdy vzniká epoxid (viz obrázek 4).



Obrázek 4: Michaelova adice na α,β -nenasycený keton

Druhou možností může být elektrofilní vytěšňovací reakce (viz. obrázek 5). S léčivými látky, které mají dobrá nukleofilní centra, jako jsou aminy nebo thioley, můžou hydroperoxydy působit jako elektrofil. Produktem je nakonec amin-N-oxid (pro terciární aminy), hydroxylamin (pro primární a sekundární aminy) nebo sulfoxid.



Obrázek 5: Mechanismus elektrofilní vytěšňovací reakce

Poslední možností může být radikálová reakce. Peroxid může být redukován na více reaktivní hydroxylový radikál v přítomnosti kovů.³⁰

1.6 Stabilita ticagreloru a oxidační degradace peroxidem vodíku

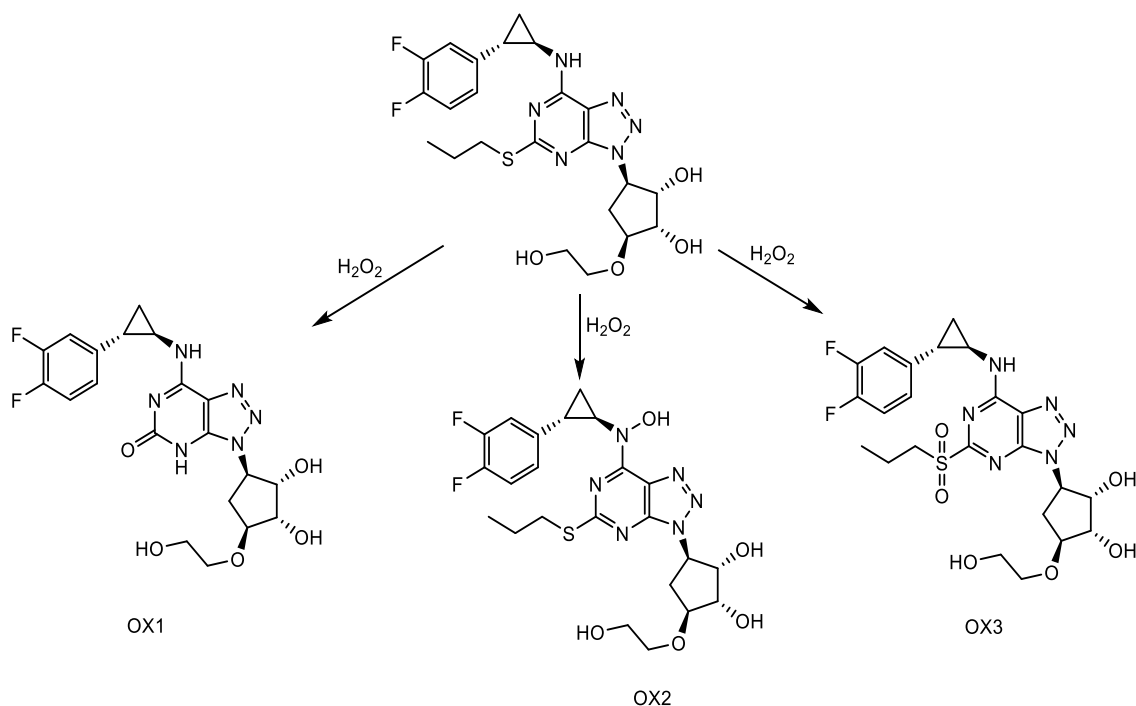
Bylo publikováno několik prací, které se zabývaly degradačními studii ticagreloru. Doposud se ovšem pouze dvě práce zabývali oxidační degradací ticagreloru a jen jedna z nich objasňuje struktury degradačních produktů, a to v práci H. S. Yaye a kol.³¹ Pro práci byl použit léčivý přípravek Brilique obsahující ticagrelor. Léčivý přípravek byl rozpuštěn ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v). Roztok ticagreloru byl podroben hydrolyze v octanu amonném v rozmezí pH 4,0 – 9,0. Při těchto podmínkách se ukázal ticagrelor jako stabilní a nevznikaly žádné degradační produkty.

V rámci studia termolytického rozkladu byla na pracovní roztoky aplikována teplota 80 °C. Po 21 dnech bylo v roztoku nalezeno 45 % ticagreloru a poločas rozpadu

byl vypočítán jako 1125 hodin. Ticagrelor lze tudíž považovat za stabilní i vůči termolýze. Vzniká jeden degradační produkt.

Při fotolýze ticagreloru byly pracovní roztoky vystaveny působení světla o vlnové délce 300 – 800 nm. Při vystavení světlu byl poločas rozpadu pouze 1,92 hodin. V tomto případě docházelo ke vzniku čtyř degradačních produktů. Z toho jeden produkt byl stejný jako v případě, kdy ticagrelor byl vystaven termolytickým podmínkám.

V případě oxidační degradace ticagreloru, kdy jako oxidační činidlo byl použit peroxid vodíku o koncentraci v roztoku 0,03 % (obj.) a oxidace probíhala čtyři hodiny při laboratorní teplotě, došlo ke vzniku tří degradačních produktů. Poločas rozpadu byl 7,45 h. Ticagrelor není stabilní vůči oxidaci. Jednotlivé navržené degradační cesty jsou zobrazeny na obrázku 6.



Obrázek 6: Vzniklé oxidační degradační produkty ticagreloru ((převzato a upraveno z Yaye a kol.³¹).

Jednotlivé degradční produkty byly identifikovány pomocí LC-MS/MS. Degradační produkty eluovaly před ticagrelorem, což naznačuje, že mohou být více hydrofilní než samotný ticagrelor. První oxidační produkt, který eluoval nejdříve a jeho protonizovaný ion poskytl přesnou hmotnost 465,1698 Da odpovídá elementárnímu složení C₂₀H₂₃F₂N₆O₅⁺. S-dealkylací došlo k odštěpení propylenové

skupiny z atomu síry, která je navázána na adenin. Následně došlo k vytěsnění atomu síry kyslíku. Druhý oxidační produkt odpovídá vzorci $C_{23}H_{29}F_2N_6O_5S^+$. V porovnání s ticagrelorom obsahuje elementární vzorec další atom kyslíku. Došlo k hydroxylaci na necyklickém dusíku, který je navázán na adenin, a tak vzniká derivát hydroxylaminu. Třetí oxidační produkt poskytl protonovaný iont o m/z 555,1819, který odhalil přítomnost dalších dvou atomů kyslíku. Tento produkt je derivát arylsulfonu, který vznikl navázáním dvou atomů kyslíku na atom síry. Molekulární vzorce jednotlivých oxidačních produktů spolu s hodnotami m/z jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3: Naměřené m/z hodnoty oxidačních degradačních produktů a jejich molekulární vzorce

Degradační produkt	t_R (min)	m/z	Molekulární vzorec
OX1	2,5	465,1698	$C_{20}H_{23}F_2N_6O_5^+$
OX2	3,5	539,1888	$C_{23}H_{29}F_2N_6O_5S^+$
OX3	4,2	555,1819	$C_{23}H_{29}F_2N_6O_6S^+$

Druhá práce, která se věnuje oxidační degradaci ticagreloru, je od C. Gobetti a kol.³² Pro práci byl rovněž použitý léčivý přípravek Brilique od firmy AstraZeneca. Ticagrelor byl rozpuštěn v methanolu. K oxidační degradaci byl použit 3% (obj.) peroxid vodíku a roztok byl oxidován dvě hodiny ve tmě. Po dvou hodinách byl všechn ticagrelor zoxidován a vznikl jeden degradační produkt.

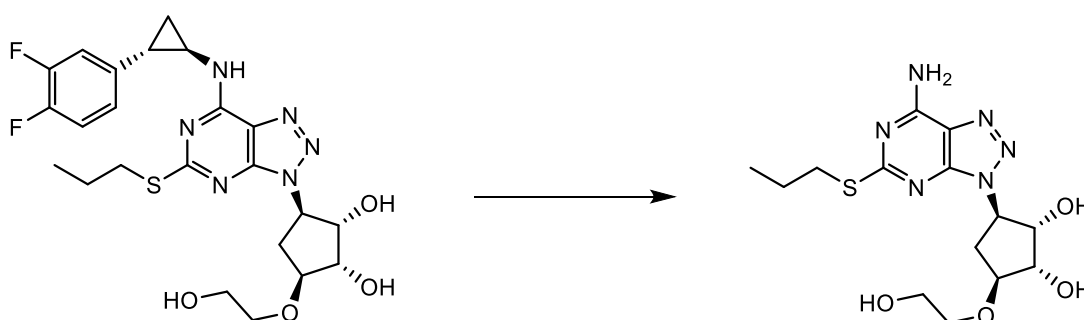
Dále byl vzorek vystaven kyselé hydrolyze za použití kyseliny chlorovodíkové ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$) a bazické za použití hydroxidu sodného ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$). Vzorek ticagreloru byl hydrolyzován po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Ticagrelor byl zhydrolyzován skoro z 60 % a vznikl jeden degradační produkt.

V rámci fotolýzy byl ticagrelor vystaven UVA a UVC lampě po dobu dvou hodin. Při použití UVA lampy nebyl pozorován degradační produkt, ticagrelor je tedy vůči těmto podmínkám stabilní. Při použití UVC lampy byly pozorovány tři degradační produkty.

Poslední stresovou podmínkou, která byla testována je teplota. Ticagrelor byl vystaven teplotě 60 °C po dobu dvou hodin. Tyto podmínky nezpůsobily žádnou degradaci. V této práci nebyly identifikovány jednotlivé degradační produkty.

V práci R. B. Kakdeho a kol.³³ byla provedena degradace za kyselých podmínek. Ticagrelor byl smíchán s kyselinou chlorovodíkovou v methanolu. Roztok se refluxoval dvě hodiny při 70 °C následně byl roztok zředěn methanolem a neutralizován pomocí hydroxidu sodného.

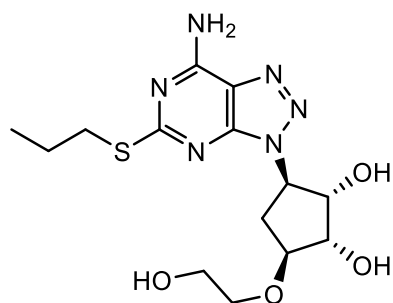
Ve studii byl pozorován jeden degradační produkt a jeho struktura byla potvrzena pomocí spektroskopických technik (NMR, LC-MS a FT-IR). Elementární složení degradačního produktu bylo stanoveno jako C₁₄H₂₂N₆O₄S a jeho hmota byla vypočtena na 370,15 Da. Na základě FT-IR bylo vyhodnoceno, že všechny skupiny jsou v ticagreloru přítomné s výjimkou C-F. Vznik kyselého degradačního produktu je znázorněn na obrázku 7.



Obrázek 7: Vzniklý kyselý degradační produkt (převzato a upraveno z Kakde a kol.³³).

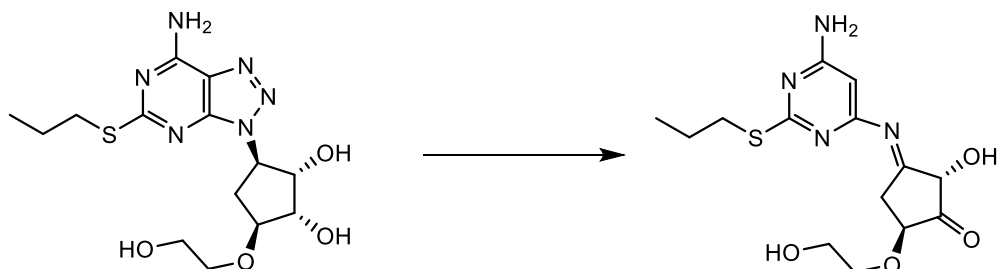
Fotodegradaci léčivého přípravku Brilinta[®] se zabýval L. M. Bueno a kol.³⁴ Je známo, že fotolýza je faktorem, který hraje důležitou roli ve stabilitě léčiv, zejména během farmaceutického skladování, a proto je důležité objasnit produkty fotodegradace. Vzorek byl podroben degradaci působením UVC záření. Vznikly dva degradační produkty.

Na základě hmotnostní spektrometrie byly určeny struktury degradačních produktů. První degradační produkt vznikl N-dealkylací s přímým štěpením N-C vazby na 3,4-difluorfenylcyklopropylové skupině, hmota protonovaného produktu je 371,2573. Tento produkt je stejný jako degradační produkt, který vznikl za kyselých podmínek, struktura je znázorněna na obrázku 8.



Obrázek 8: První fotodegradační produkt (převzato a upraveno z L. M. Bueno a kol.³⁴)

Druhý degradační produkt vychází z prvního zmíněného degradačního produktu, kdy dochází ke štěpení molekuly v jejím triazolopyrimidinovém kruhu se ztrátou N_2 a autooxidací. Produkt odpovídá vzorci $C_{14}H_{20}F_2N_4O_4S^+$ a hmotě 341,2674. Vznik druhého degradačního produktu je znázorněn na obrázku 9.



Obrázek 9: Vznik druhého degradačního produktu (převzato a upraveno z L. M. Bueno a kol.³⁴).

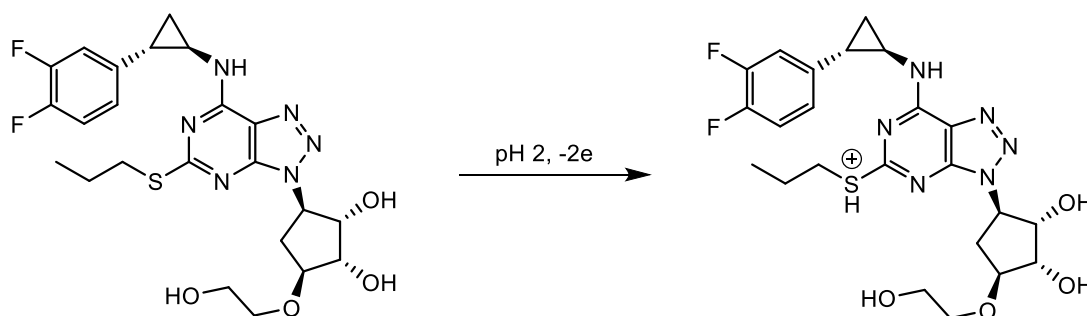
1.7 Elektrochemické stanovení ticagreloru

Elektrochemickým stanovením ticagreloru se dosud zabýval pouze M. Rizka a kol.³⁵, který vyvinul citlivou a přesnou square wave voltametrickou metodu pro stanovení ticagreloru. Hlavním cílem této práce bylo studium elektrochemického chování ticagreloru pomocí cyklické voltametrie a chronoamperometrické techniky pro charakterizaci elektrochemických vlastností léčiva. Ticagrelor byl stanoven, jak v podobě roztoku čisté API v ethanolu, tak v reálném vzorku plazmy.

Elektrochemické chování ticagreloru bylo dále zkoumáno pomocí cyklické voltametrie. Cyklický voltamogram ticagreloru vykazoval jediný anodický pík při potenciálu 0,97 V. Při zpětném skenování nebyl pozorován katodický pík, což ukazuje nevratnou povahu elektrodové reakce. V rámci optimalizace byl zkoumán vliv pH a typ pufru. Prvním pufrem, který byl vyzkoušen, byl Britton – Robinsonův pufr (BR pufr), který byl použit v rozmezí $pH = 2,0 - 6,0$. Potenciál se posunoval k negativním hodnotám při zvyšující se hodnotě pH, což ukazuje, že oxidace ticagreloru závisí na pH. Závislost

potenciálu na pH naznačuje, že na procesu přenosu náboje se podílí protonace či deprotonace. Anodický pík získaný v rozsahu pH = 2,0 – 6,0 začínal mizet, jakmile se médium začalo stávat neutrálním až alkalickým. To lze připsat snadné protonaci thioesterové skupiny v kyselém médiu. Jako optimální hodnota pH byla zvolena hodnota pH = 2.

Jako další podpůrné roztoky elektrolytu byly použity kyselina chlorovodíková a kyselý ftalátový pufr o pH = 2. Bylo zjištěno, že BR pufr vykazoval nejvyšší anodický proud. V rámci tohoto článku byl navrhnout mechanismus elektrochemické oxidace ticagreloru, který je znázorněn na obrázku 10.



Obrázek 10: Navrhnutý mechanismus elektrochemické oxidace (převzato a upraveno z M. Rizk a kol.³⁵)

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo studium oxidační degradace ticagreloru. Tento obecný cíl zahrnuje tyto dílčí cíle:

- 1) Studium vlivu použitého rozpouštědla na oxidační degradaci ticagreloru pomocí peroxidu vodíku.
- 2) Vyvinutí spolehlivé elektrochemické metody pro studium oxidační degradace ticagreloru.
- 3) Identifikace vzniklých degradačních produktů.
- 4) Srovnání tradiční a elektrochemické oxidace ticagreloru na základě vzniklých degradačních produktů.

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Acetonitril CHROMASOLV[®], pro HPLC, gradient grade $\geq 99,9\%$ (Honeywell, Francie)

Deionizovaná voda MiliQ (Millipore, USA)

Dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého (Zentiva, Česká republika)

Dusičnan stříbrný, 99,8% p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid amonný, 28% p.a., LiChropur[®] pro LC-MS (Merck, Německo)

Hydroxid sodný, 98% p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxypropylcelulóza (Zentiva, Česká republika)

Hydroxypropylmethylcelulóza (Zentiva, Česká republika)

Isopropanol CHROMASOLV[®], pro HPLC, gradient grade $\geq 99,9\%$ (Honeywell, Francie)

Kyselina boritá, 99,5% p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina octová, 99% p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina trihydrogenfosforečná, 85% p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

Mannitol (Zentiva, Česká republika)

Methanol CHROMASOLV[®], pro HPLC, gradient grade $\geq 99,9\%$ (Honeywell, Francie)

Octan amonný LiChropur[®] pro LC-MS (Merck, Německo)

Oxid titaničitý (Zentiva, Česká republika)

Peroxid vodíku, 30% (Lach-Ner, Česká republika)

Polyethylenglykol (Zentiva, Česká republika)

Sodná sůl karboxymethylškrobu, typ A (Zentiva, Česká republika)

Stearan hořečnatý (Zentiva, Česká republika)

Ticagrelor (Zentiva, Česká republika)

3.1.2 Instrumentace a další laboratorní materiál

Kapalinový chromatograf Waters Acquity H-Class UPLC (Waters, USA)

Chromatografická kolona Kinetex C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μm), (Phenomenex, USA)

Analytické váhy 262 SMA-FR (Sartorius, Švýcarsko)

Ultrazvukový sonikátor ELMA S15 (Elmasonic, Německo)

Degradační komora Memmert Humidity Chamber HCP 108 (Memmert, Německo)

pH metr Jenway 3540 (Bibby Scientific, Velká Británie)

Mikrocentrifuga Minispin plus (Eppendorf, Německo)
Magnetická míchačka (Thermo Scientific, USA)
Elektroda ze skelného uhlíku (Metrohm, Švýcarsko)
Platinová elektroda (Elektrochemické detektory, Turnov)
Argentchloridová elektroda (Elektrochemické detektory, Turnov).
Potenciostat/galvanostat model 273 EG&G (Princeton Applied Research, USA)

3.2 Příprava vzorků

3.2.1 Oxidace ticagreloru peroxidem vodíku

Vzorek ticagreloru ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$) pro oxidační degradaci pomocí peroxidu vodíku byl připraven navážením přesného množství ticagreloru a rozpuštěním ve směsi organického rozpouštědla (acetonitril, isopropanol nebo methanol) s vodou. Vzorek byl následně 10 minut sonikován. Poté byl ke vzorku přidán peroxid vodíku, a to takové množství, aby ho v celém roztoku bylo 0,3 % (obj.). Poměr organického rozpouštědla a vody byl ve vzorku 50/50, v/v. Následně byl takto připravený vzorek ticagreloru vložen do stresové komory, kde byla nastavena teplota 50 °C. Časové intervaly pro odběr vzorku byly tyto: 0 h; 0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 3 h; 4 h; 5 h; 7 h a 24 h. Pro UHPLC analýzu bylo vždy odebráno 0,7 ml kapaliny.

3.2.2 Oxidace ticagreloru s excipienty peroxidem vodíku

Bylo připraveno 10 g excipientů ve stejném procentuálním složení jako v tabletě prodávané pod názvem Brilinta®. Procentuální zastoupení a jednotlivé navážky excipientů jsou znázorněny v tabulce 4. Jednotlivé excipienty byly společně zhomogenizovány.

Tabulka 4: Procentuální zastoupení a navážky jednotlivých excipientů na 10 g směsi

Excipient	Zastoupení (%)	Hmotnost (g)
Mannitol	40,58	5,714
Dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého	20,29	2,857
Stearan hořečnatý	0,970	0,1360
Sodná sůl karboxymethylškrobu (typ A)	2,898	0,4081
Hydroxypropylcelulóza	2,898	0,4081
Oxid titaničitý	1,060	0,1496

Polyethylenglykol	0,193	0,0272
Hydroxypropylmethylcelulóza	2,125	0,2993

Obsah ticagreloru v tabletě Brilinta[®] byl 28,98 % zbytek tablety jsou již zmíněné excipienty.

Vzorek ticagreloru ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$) s excipienty pro oxidační degradaci pomocí peroxidu vodíku byl připraven navážením přesného množství ticagreloru a dle procentuálního zastoupení byly k ticagreloru navázeny excipienty. Vzorek byl rozpuštěn ve směsi organického rozpouštědla (acetonitril, isopropanol nebo methanol) s vodou. Vzorek byl následně 10 minut sonikován. Poté byl ke vzorku přidán peroxid vodíku, a to takové množství, aby ho v celém roztoku bylo 0,3 % (obj.). Poměr organického rozpouštědla a vody byl ve vzorku 50/50, v/v. Následně byl takto připravený vzorek ticagreloru s excipienty vložen do stresové komory, kde byla nastavena teplota 50 °C. Časové intervaly pro odběr vzorku byly tyto: 0 h; 0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 3 h; 4 h; 5 h; 15 h a 24 h. Po těchto intervalech byl odebrán 1 ml vzorek, který byl vložen do centrifugy na 10 minut. Na UHPLC analýzu bylo vždy odebráno 0,7 ml kapaliny.

3.2.3 Příprava roztoků pro elektrochemickou oxidaci

Elektrochemická oxidace probíhala v prostředí octanu amonného. Zásobní roztoky octanu amonného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH = 4,0; 7,0 a 9,0 byly připraveny rozpuštěním vypočteného množství octanu amonného v deionizované vodě. Pro úpravu pH byl použit hydroxid amonný (28%) nebo kyselina octová (99%). Pufr byl přefiltrován na filtrační aparatuře přes filtr Nylon 66 Membranes o velikosti pórů 0,2 μm . Dále byl v práci použit BR pufr, kdy jeho kyselá část byla připravena smícháním kyseliny trihydrogenfosforečné, kyseliny octové a kyseliny borité, každá z kyselin měla koncentraci $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$. Přidáním hydroxidu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ bylo dosaženo požadovaných hodnot pH = 2,0; 7,0 a 9,0.

Vzorek ticagreloru pro elektrochemickou oxidaci byl připraven navážením ticagreloru a to, v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 1 mmol dm^{-3} . K ticagreloru byl přidán octan amonný o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ v takovém množství, aby jeho konečná koncentrace v roztoku byla 50 mmol dm^{-3} . Vzorek ticagreloru byl rozpuštěn ve směsi organického rozpouštědla (acetonitril,

isopropanol nebo methanol) s vodou, aby výsledná koncentrace odpovídala poměru 50/50, v/v. Vzorek byl vložen k sonikaci do ultrazvukové lázně na 10 minut.

3.3 Podmínky chromatografických měření

Stanovení ticagreloru pomocí UHPLC bylo provedeno metodou vyvinutou Bc. Barborou Tonnerovou v rámci její bakalářské práce.³⁶ Jako mobilní fáze byla použita směs organické a vodné složky. Organickou složku (složka A) v tomto případě tvořil acetonitril a vodnou složkou (složka B) byl vodný roztok octanu amonného o koncentraci 20 mmol dm^{-3} a $\text{pH} = 8,0$. Zastoupení jednotlivých složek se měnilo podle zvoleného gradientového programu (viz tabulka 5).

Tabulka 5: Zastoupení acetonitrilu a octanu amonného ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$) v gradientovém programu

t (min)	ϕ_A (%)	ϕ_B (%)
0	20	80
4	80	20
6	80	20
6,5	20	80
8,5	20	80

Měření bylo prováděno na koloně Kinetex C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μm) od firmy Phenomenex, průtok mobilní fáze byl $0,25 \text{ ml min}^{-1}$, dávkovací objem vzorku 1 μl , teplota kolony byla $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota autosampleru $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Byl použit detektor s diodovým polem a jako vhodná vlnová délka byla zvolena 255 nm. Délka jedné analýzy byla 9 minut.

Vzniklé degradační produkty byly identifikovány pomocí QDA detektoru. Měření probíhalo v pozitivním módu. Hmotnostní rozsah byl nastaven od 300,00 do 750,00 Da. Hmotnostní spektrum bylo zaznamenáváno od 2 do 6 minut. Napětí kuželu bylo nastaveno na 15 V, teplota sondy na $600 \text{ }^\circ\text{C}$ a kladné a záporné napětí na kapiláře bylo nastaveno na 0,8 kV.

3.4 Cyklická voltametrie

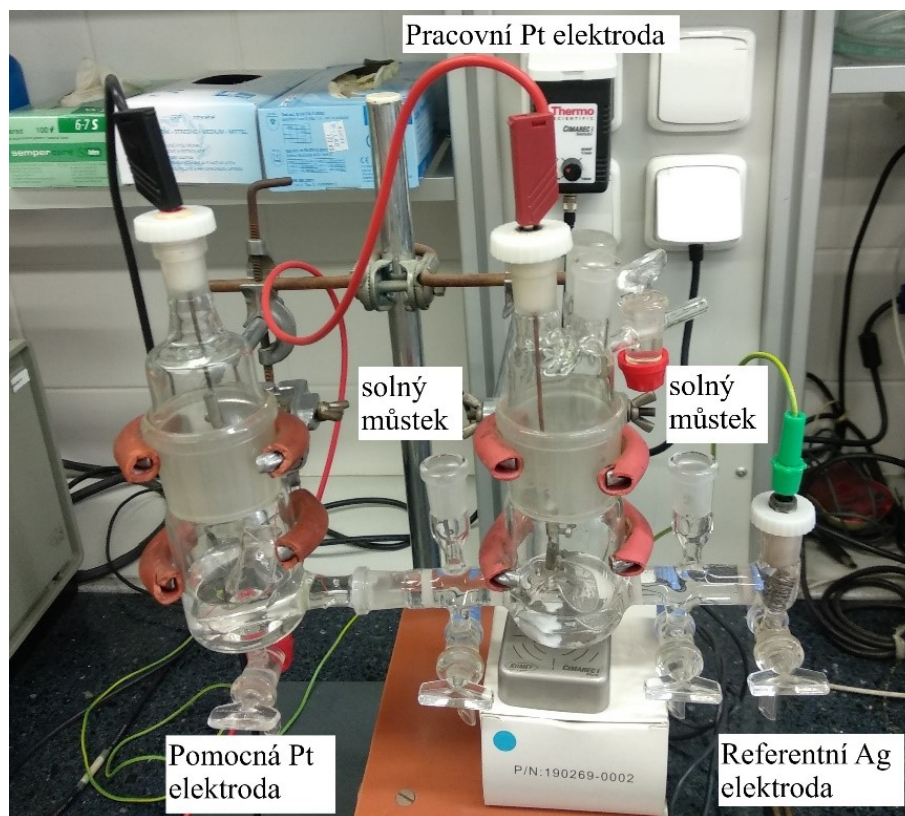
Cyklický voltamogram byl měřen v tříelektrodovém zapojení. Elektroda ze skelného uhlíku byla zvolena jako pracovní, pomocnou elektrodou byla platinová a jako referentní byla zvolena argenticchloridová elektroda s KCl ($c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$).

Jako rychlost polarizace byla zvolena 100 mV s^{-1} a potenciálové okno mělo rozsah 0-1600 mV. Proměřen byl BR pufr o $\text{pH} = 7,0$ a roztok ticagreloru ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$) v desetkrát zředěném BR pufru.

3.5 Podmínky elektrolytických měření

Elektrochemická oxidace byla prováděna v tříelektrodevém zapojení. Jako pracovní elektroda byla zvolena platinová síťka, která měla upravený tvar tak, aby byla během měření celá ponořená do roztoku. Pracovní elektroda byla před každým měřením vyžihána v horním redukčním plamenu kahanu. Pomocnou elektrodou byla také platinová síťka, která byla ponořena ve 40 ml octanu amonného ($c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$). Stříbrná elektroda prvního druhu byla zvolena jako referentní a byla ponořena v roztoku octanu amonného ($c = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$) a dusičnanu stříbrného ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$). Jednotlivé prostory elektrod byly odděleny solnými můstky, které byly naplněny octanem amonným o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Aparatura pro elektrochemickou oxidaci je znázorněna na obrázku 11.

Měření byla prováděna v roztoku o objemu 25 ml, který obsahoval ticagrelor ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) a octan amonný ($c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) ve směsi organického rozpouštědla (acetonitril, isopropanol nebo methanol) s vodou (50/50, v/v). Měření byla prováděna při konstantním potenciálu. Byly testovány tyto potenciály: 0,5 V; 0,7 V; 0,9 V; 1 V; 1,1 V; 1,2 V; 1,3 V a 1,5 V. Roztok ticagreloru byl míchán po celou dobu experimentu pomocí magnetické míchačky. Vždy po uplynutí dané doby elektrolýzy byl zaznamenáván prošlý náboj a následně proveden odběr vzorku (0,7 ml resp. 0,2 ml). Vzorky poté byly analyzovány pomocí UHPLC.



Obrázek 11: Aparatura pro elektrochemickou oxidaci ticagreloru

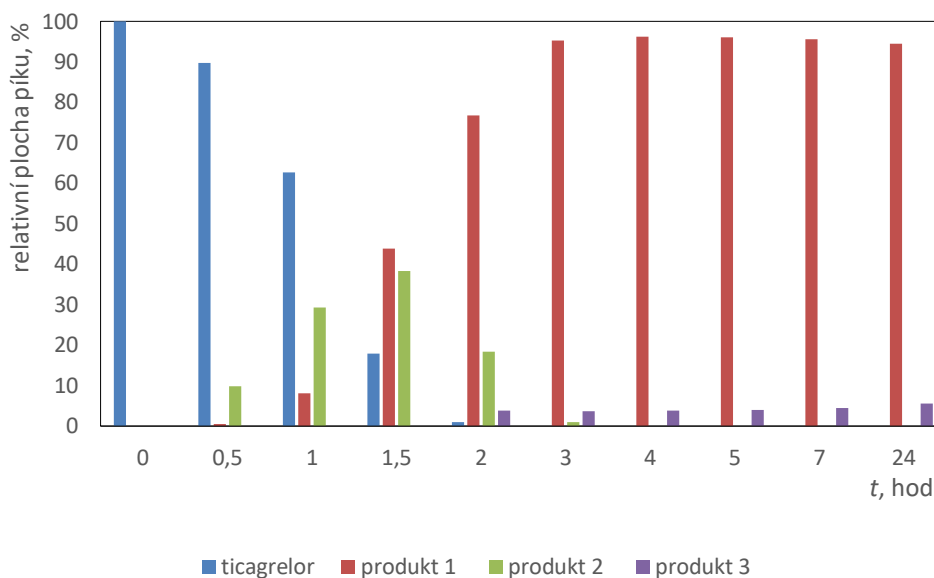
4. Výsledky a diskuze

4.1 Oxidace ticagreloru peroxidem vodíku

Ticagrelor je látka špatně rozpustná v čisté vodě a je nutné ji rozpouštět ve směsi vody a organického rozpouštědla.⁵ Je známo, že rozpouštědlo ovlivňuje průběh oxidace peroxidem. V práci H. S. Yaye³¹ byl použit 50% (obj.) acetonitril a v bakalářské práci Bc. Tonnerové³⁶ byl používán 50% (obj.) methanol. Tato dvě rozpouštědla byla použita i v této práci. Jako třetí rozpouštědlo pro studium vlivu rozpouštědla na průběh oxidace byl zvolen isopropanol, který je dokonale mísitelný s vodou a s peroxidem vodíku netvoří výbušné směsi.

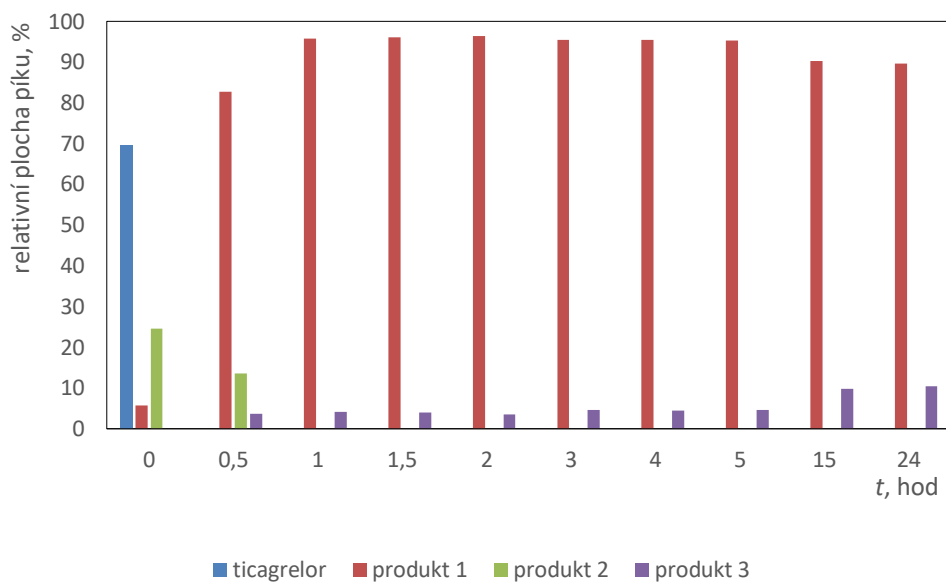
4.1.1 Oxidace ticagreloru ve směsi acetonitrilu s vodou

Oxidace ticagreloru ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v) probíhá rychle vzhledem k oxidacím v jiných rozpouštědlech, po dvou hodinách se ve vzorku nachází necelé jedno procento původního množství ticagreloru. Degradanční produkt **1** ($t_R = 4,2$ min) začíná vznikat po jedné hodině oxidace a s postupující dobou oxidace jeho množství roste. Po 24 hodinách je ve vzorku přítomno 95 % tohoto produktu, lze ho tedy považovat za hlavní degradanční produkt oxidace ticagreloru. Jedná se o procenta relativní plochy píku. Do ploch píků byl vždy započítán pík ticagreloru a jeho degradanční produkty, pík peroxidu vodíku nebyl zařazen do vyhodnocování. Degradanční produkt **2** ($t_R = 3,9$ min) vzniká relativně rychle – po půl hodině oxidace je ho ve vzorku necelých deset procent, nicméně po 4 hodinách oxidace zaniká, tudíž se s největší pravděpodobností jedná o meziprodukt oxidace. Degradanční produkt **3** ($t_R = 3,1$ min) začíná vznikat po dvou hodinách oxidace a po 24 hodinách je ho ve vzorku přítomno zhruba 5 %. Časový průběh procentuálního zastoupení jednotlivých degradančních produktů je znázorněn na obrázku 12.

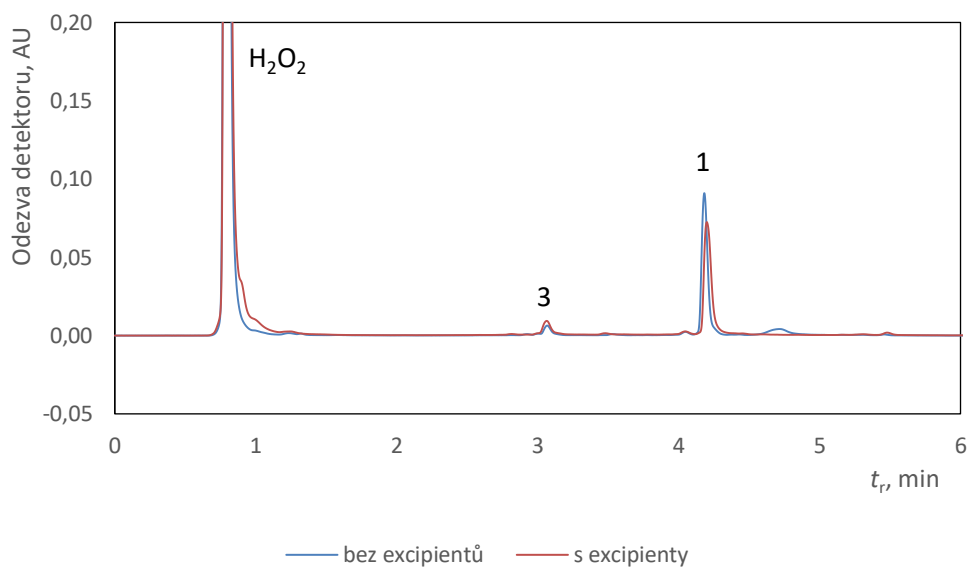


Obrázek 12: Časový průběh oxidační degradace ticagreloru ve směsi acetonitril/voda (50/50, v/v).

Dále byl studován vliv excipientů na rychlost oxidace ticagreloru. Po přidání peroxidu vodíku začíná ihned docházet k oxidaci a po provedení analýzy směsi je ve vzorku jen zhruba 70 % ticagreloru. Po půl hodině už zde není přítomen vůbec žádný ticagrelor. Degradční produkt 1 ($t_R = 4,2$ min) začíná vznikat také ihned po přidání peroxidu vodíku a po půl hodině je ho ve vzorku přítomno přes 80 %, stejně jako v předchozím případě i zde se jedná o hlavní degradační produkt. Degradční produkt 2 ($t_R = 3,9$ min), výše zmiňovaný jako meziprodukt zaniká již po jedné hodině oxidace. Degradční produkt 3 ($t_R = 3,1$ min) začíná vznikat také dříve než v předchozím případě, a to již po půl hodině, po 24 hodinách je tohoto produktu ve vzorku kolem 10 %, což je o polovinu více než u oxidace bez excipientů. Excipienty zvyšují rychlost oxidace, což je velmi atypické chování. Možným vysvětlením je v úvodu zmiňovaný vznik peroxoslučenin z některých excipientů.²⁹ Úbytek ticagreloru v časových intervalech je zobrazen ve sloupcovém grafu na obrázku 13. Překryté chromatogramy v přítomnosti excipientů a bez nich po 24 hodinách jsou znázorněny na obrázku 14.



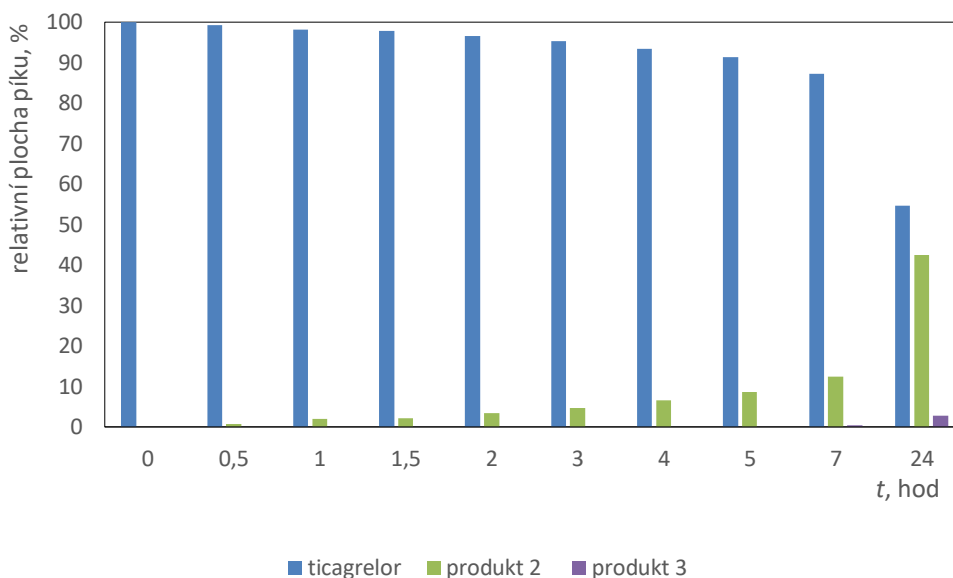
Obrázek 13: Časový průběh oxidační degradace ticagreloru v přítomnosti excipientů ve směsi acetonitril/voda (50/50, v/v).



Obrázek 14: Chromatogramy oxidace ticagreloru ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v) bez a s přítomností excipientů po 24 hodinách (3: degradační produkt 3, 1: degradační produkt 1).

4.1.2 Oxidace ticagreloru ve směsi methanolu s vodou

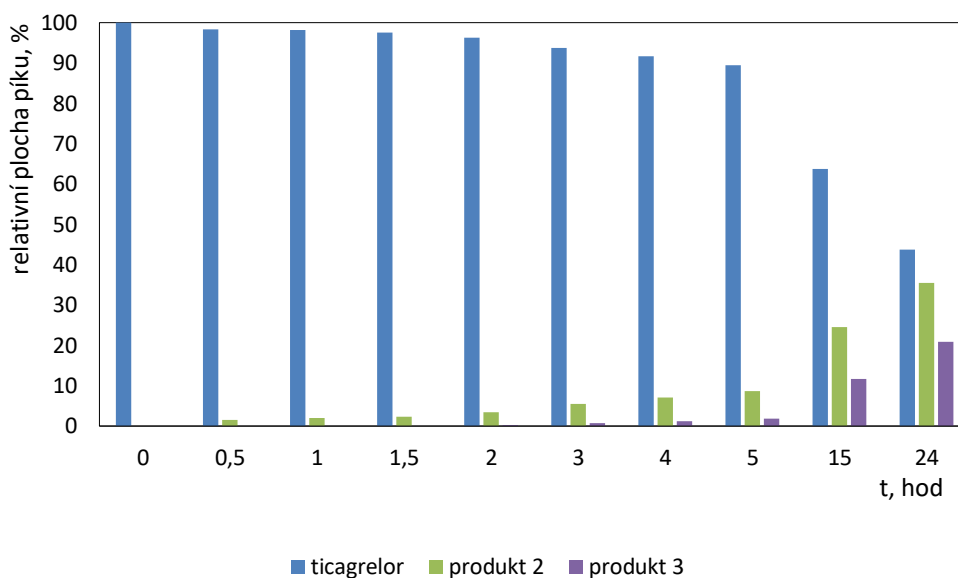
Oxidace ve směsi methanolu s vodou probíhá pomaleji než ve směsi acetonitrilu s vodou. Po 24 hodinách je ve vzorku přítomno stále přes 50 % ticagreloru. Nedochází zde vůbec ke vzniku degradačního produktu **1** s retenčním časem 4,2 minuty, který byl v případě použití acetonitrilu hlavním degradačním produktem. Degradační produkt **2** ($t_R = 3,9$ min), který byl v předchozím případě označen jako meziprodukt, je zde hlavním degradačním produktem. Začíná pomalu vznikat po půl hodině oxidace a po 24 hodinách ho ve vzorku je přítomno přes 40 %. Degradační produkt **3** ($t_R = 3,1$ min) začíná vznikat až po 7 hodinách oxidace ve velmi malém množství a po 24 hodinách je ve vzorku přítomno kolem 3 %. Na obrázku 15 je znázorněn časový průběh oxidační degradace ticagreloru, kdy můžeme sledovat nárůst jednotlivých oxidačních degradačních produktů v daných časových intervalech.



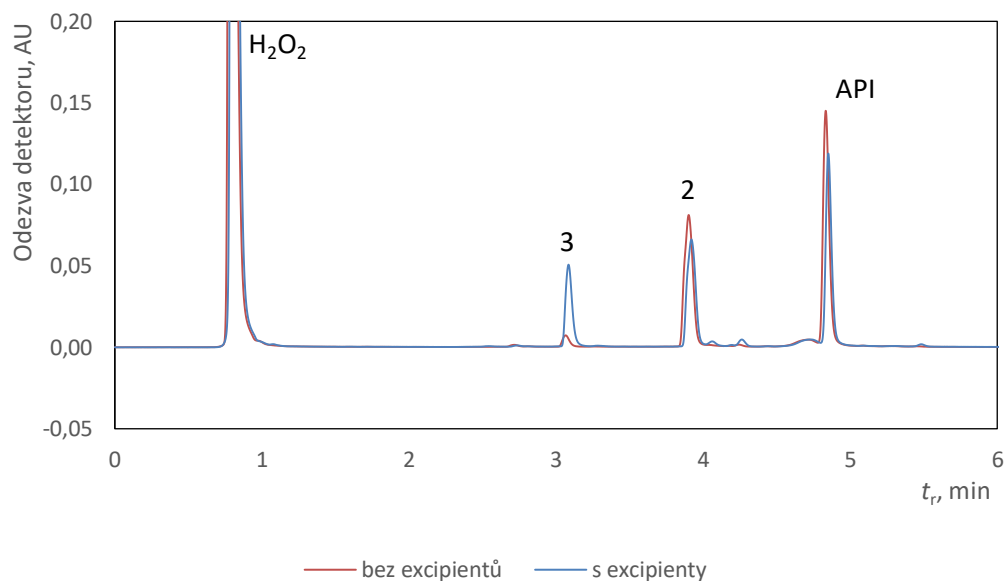
Obrázek 15: Časový průběh oxidační degradace ticagreloru ve směsi methanol/voda (50/50, v/v).

V přítomnosti excipientů probíhá oxidace rychleji stejně jako v případě použití směsi acetonitrilu s vodou. Po 24 hodinách je ve vzorku přítomno přes 40 % ticagreloru, čili o 10 % méně než při oxidaci bez excipientů. Degradační produkt **3** ($t_R = 3,1$ min) začíná vznikat již po dvou hodinách, o pět hodin dříve než v předchozím případě, po 24 hodinách je přítomno kolem 20 % tohoto produktu. Degradační produkt **2** ($t_R = 3,9$ min) začíná vznikat také po půl hodině jako v případě bez excipientů, po 24 hodinách je přítomno 35 % tohoto produktu, čili o trochu méně než v předchozím

případě. Důvodem může být vznik většího množství degradačního produktu **3** ($t_R = 3,1$ min). Na obrázku 17 je znázorněn chromatogram po 24hodinové oxidaci, kdy v přítomnosti excipientů vznikalo o 17 % více degradačního produktu **3**. Na obrázku 16 je znázorněn časový průběh oxidace ticagreloru ve směsi methanolu s vodou v přítomnosti excipientů, kde lze pozorovat nárůst jednotlivých degradačních produktů v daných časových intervalech.



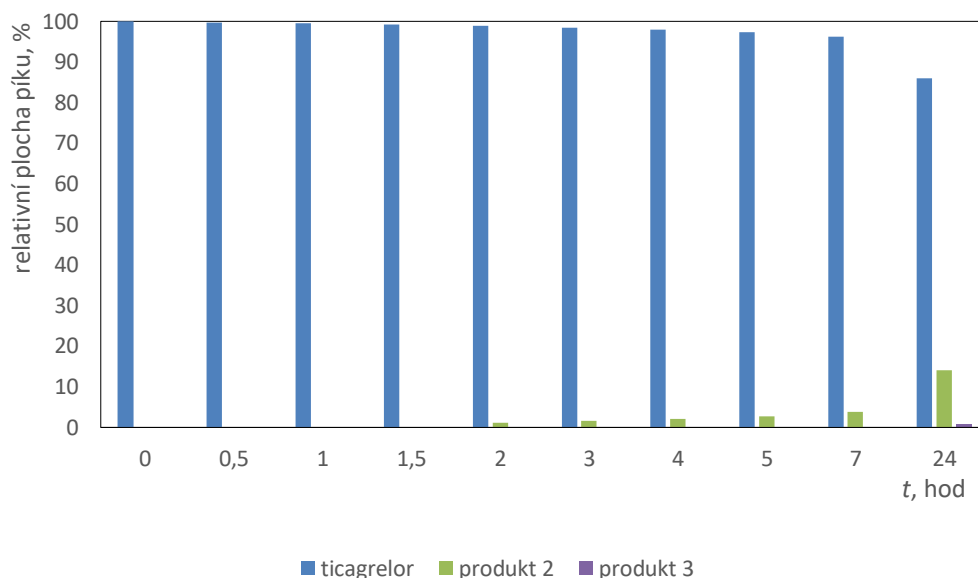
Obrázek 16: Časový průběh oxidační degradace ticagreloru v přítomnosti excipientů ve směsi methanol/voda (50/50, v/v).



Obrázek 17 Chromatogramy oxidace ticagreloru ve směsi methanolu s vodou (50/50, v/v) bez a s přítomností excipientů po 24 hodinách (3: degradační produkt 3, 2: degradační produkt 2, API: ticagrelor).

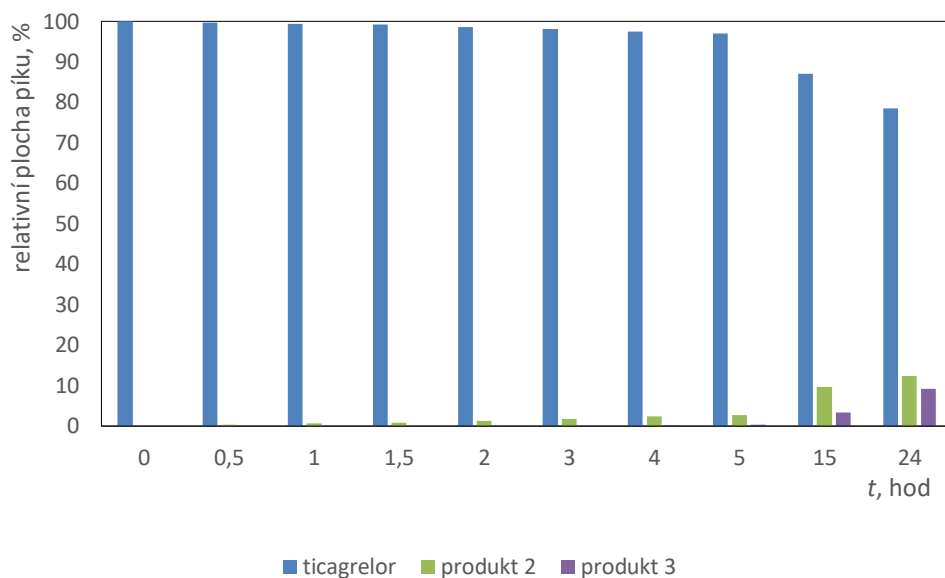
4.1.3 Oxidace ticagreloru ve směsi isopropanolu s vodou

Oxidace ve směsi isopropanolu s vodou má podobný průběh jako oxidace ve směsi methanolu s vodou, nicméně je pomalejší. Po 24 hodinách je ve vzorku kolem 85 % ticagreloru. Degradační produkt **3** ($t_R = 3,1$ min) začíná vznikat až po 24 hodinách, a to necelé 1 % (u methanolu kolem 3 %). Degradační produkt **2** ($t_R = 3,9$ min) začíná vznikat po dvou hodinách oxidace, čili o hodinu a půl později než v případě methanolu, po 24 hodinách je tohoto produktu přítomno kolem 14 % procent (u methanolu kolem 40 %). Chromatogram oxidace ticagreloru po 24 hodinách je znázorněn na obrázku 20 a časový průběh oxidační degradace ticagreloru na obrázku 18.

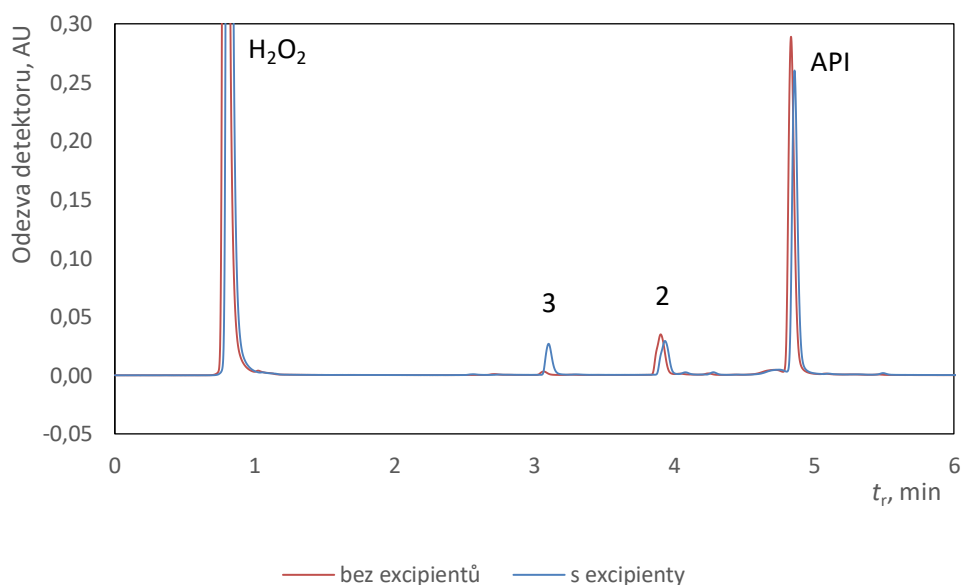


Obrázek 18: Časový průběh oxidační degradace ticagreloru ve směsi isopropanol/voda (50/50, v/v).

Opět platí, že oxidace v přítomnosti excipientů je rychlejší. Po 24 hodinách je ve vzorku přítomno kolem 78 % ticagreloru, což znamená, že došlo k degradaci jeho větší části než v případě bez přítomnosti excipientů. Degradací produkt 3 ($t_R = 3,1$ min) začíná vznikat po dvou hodinách v malém množství a po 24 hodinách je přítomno 9 % této látky (o 8 % více než v případě bez excipientů). Nárůst je znázorněn v chromatogramu po 24 hodinové oxidaci na Obrázku 16. Degradací produkt 2 ($t_R = 3,9$ min) začíná vznikat po půl hodině a po 24 h je ho přítomno kolem 12 % (méně o 2 % než methanolu). Opět to může být z toho důvodu, že vzniká více degradačního produktu 3. Jednotlivý nárůst těchto dvou degradačních produktů je znázorněn ve sloupcovém grafu na obrázku 19.



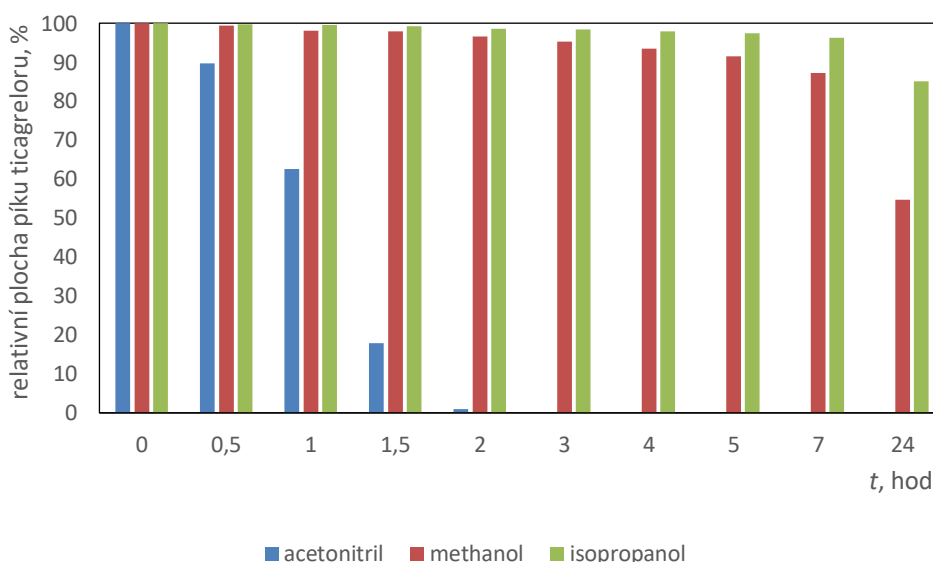
Obrázek 19: Časový průběh oxidační degradace ticagreloru v přítomnosti excipientů ve směsi isopropanol/voda (50/50, v/v).



Obrázek 20: Chromatogramy oxidace ticagreloru ve směsi isopropanolu s vodou (50/50, v/v) bez a s přítomností excipientů po 24 hodinách (3: degradační produkt 3, 2: degradační produkt 2, API: ticagrelor).

Na obrázku 21 je znázorněn graf porovnávající úbytek ticagreloru v jednotlivých rozpouštědlech. Oxidace probíhala nejrychleji ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v), kdy po třetí hodině nebyl v roztoku přítomen ticagrelor. V článku H. S. Yaye a kol.³¹ bylo použito stejné rozpouštědlo a po čtyřech hodinách došlo ke vzniku tří degradačních

produktů. V rámci této práce vznikaly také tři degradační produkty z toho jeden byl označen jako meziprodukt a oxidace probíhala rychleji než je uvedeno ve zmíněném článku. V případě použití směsi methanolu s vodou (50/50 v/v) bylo po 24 hodinách přítomno přes 50 % ticagreloru a vznikaly dva degradační produkty. V článku C. Gobetti a kol.³² bylo jako rozpouštědlo zvolen methanol a po dvou hodinách byl všechny ticagrelor zoxidován a vznikal pouze jeden degradační produkt. Nejpomaleji probíhala oxidace ve směsi isopropanolu s vodou (50/50, v/v), kdy zoxidovalo pouze kolem 15 % ticagreloru a vznikaly opět dva degradační produkty. V člancích nebylo toto rozpouštědlo zatím vůbec použito. Oxidace ve směsi methanolu či isopropanolu s vodou (50/50, v/v) probíhá velmi podobně, vznikají stejné dva degradační produkty, pouze rychlost oxidace v isopropanolu je mnohem nižší. Rozdílný průběh ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v) je daný pravděpodobně tím, že jde na rozdíl od methanolu a isopropanolu o aprotické rozpouštědlo.

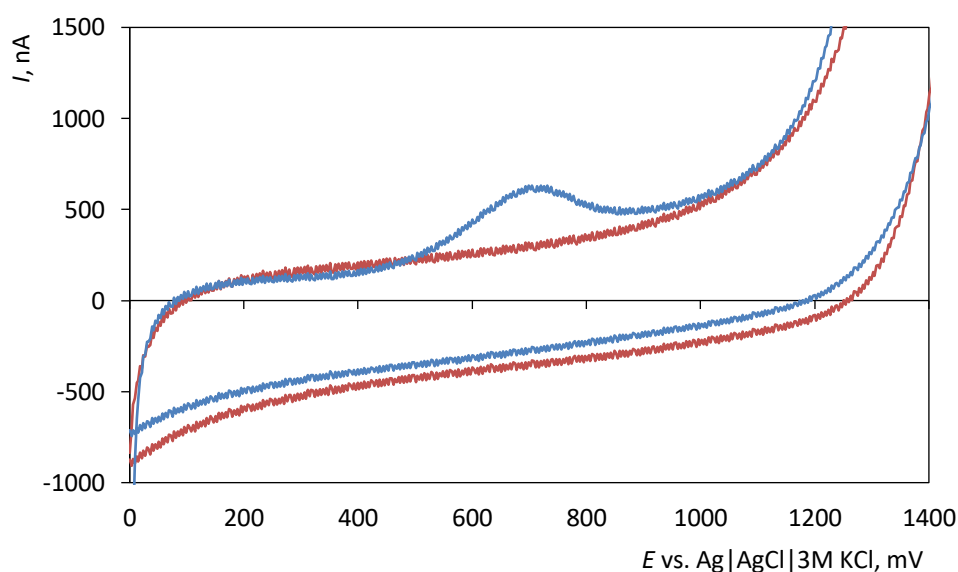


Obrázek 21: Časový průběh oxidační degradace ticagreloru v jednotlivých rozpouštědlech.

4.2 Elektrochemická oxidace ticagreloru

4.2.1 Cyklický voltamogram

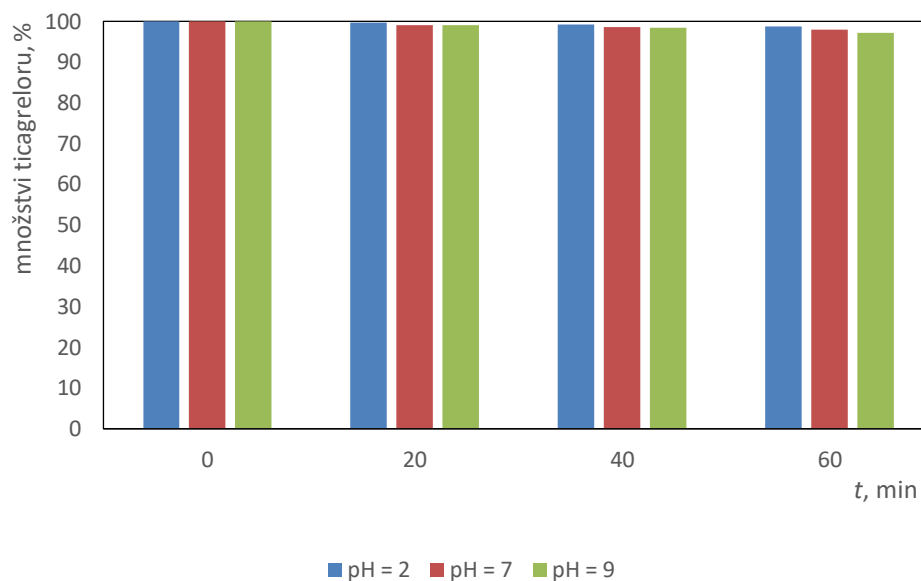
Cyklický voltamogram byl měřen z důvodu ověření elektrochemické oxidace ticagreloru. Na obrázku 22 je znázorněn naměřený cyklický voltamogram, kde můžeme pozorovat voltametrickou vlnu způsobenou oxidací ticagreloru v rozmezí 600-800 mV. Z obrázku je také patrné, že nedochází ke zpětné redukci ticagreloru. Samotný BR pufr nevykazuje žádnou oxidační vlnu, stejně jako octan amonný.³⁷



Obrázek 22: Cyklický voltamogram ticagreloru (modrá křivka) v BR pufru (červená křivka) měřené na elektrodě ze skelného uhlíku (rychlost skenu 100 mV s⁻¹, rozsah potenciálu 0-1600 mV)

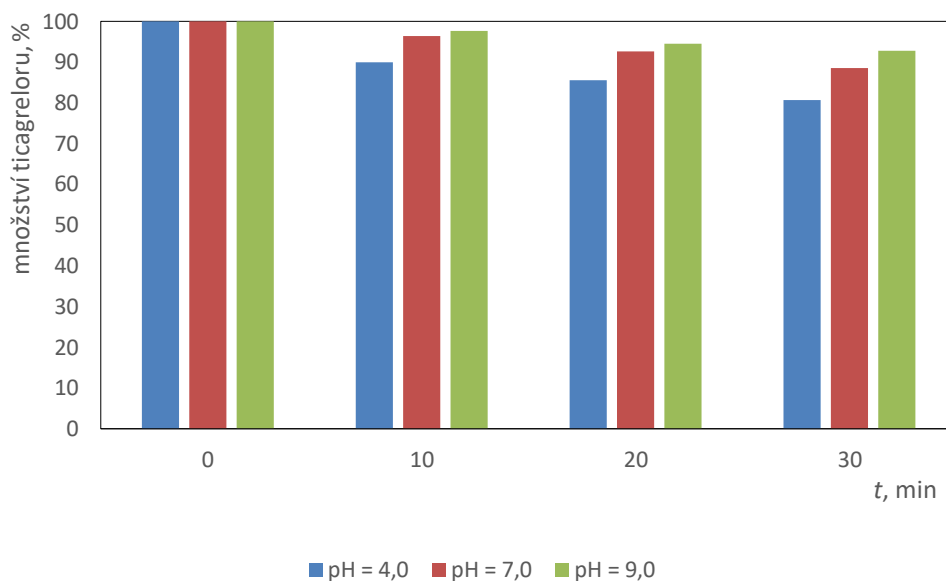
4.2.2 Volba optimálního pufru a pH

Na základě článku M. Rizka a kol.³⁵ byl nejprve testován BR pufr o hodnotách pH = 2,0; 7,0 a 9,0. V článku byla jako optimální pH BR pufru zvolena hodnota 2,0. Vzorky byly odebírány po 20, 40 a 60 minutách elektrolýzy. Měření probíhala při konstantním potenciálu 1,10 V. Nejvíce ticagreloru bylo zoxidováno při pH 9,0, přičemž se jednalo o necelá 3 % původního množství ticagreloru po 60 minutách elektrolýzy. Při pH 2,0 byla oxidace nejpomalejší a ticagreloru bylo zoxidováno jen něco málo přes 1 %. Vzhledem k tomu, že při všech testovaných hodnotách pH bylo zoxidováno jen velmi malé množství ticagreloru, a to i po relativně dlouhém čase, byl na základě předchozí dobré zkušenosti jako další pufr testován octan amonný.³⁷ Průběh oxidace ticagreloru v BR pufru je znázorněn ve sloupcovém grafu na obrázku 23.



Obrázek 23: Elektrochemická oxidace ticagreloru v BR pufru o pH = 2,0; 7,0 a 9,0.

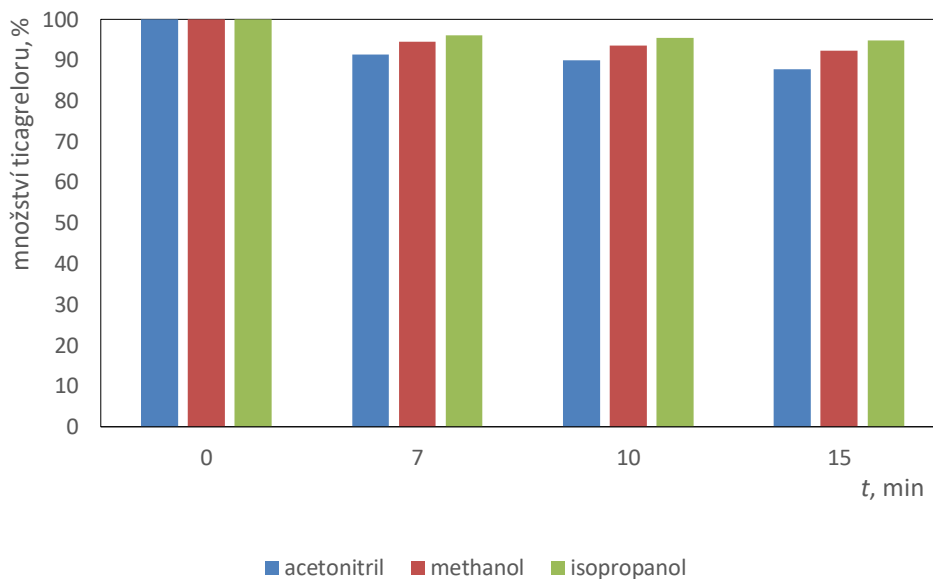
Jako další pufr byl otestován octan amonný o pH = 4,0; 7,0 a 9,0. Octan amonný byl vybrán na základě bakalářské práce Bc. Pražákové, kdy octan amonný byl dobrým pufrům při oxidaci abacaviru.³⁷ Na základě článku M. Rizka a kol.³⁵ se čekalo, že pH bude mít vliv na elektrochemickou oxidaci, a proto byly testovány různé hodnoty pH. Vliv pH byl testován na vzorku ticagreloru ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$) ve směsi acetonitrilu a octanu amonného (50/50, v/v), jehož přesná příprava je popsána v experimentální části (kap. 3.2.3., str. 26). Elektrochemická oxidace při použití octanu amonného probíhala asi dvakrát rychleji než při použití BR pufru. Vzorky byly odebírány po 10, 20 a 30 minutách. Měření probíhala při konstantním potenciálu 1,10 V. Po třiceti minutách při pH 4,0 došlo k oxidaci zhruba 20 % ticagreloru, což je horní hranice pro optimální degradaci.²⁵ Oxidace při tomto pH probíhala nejrychleji. Naopak nejpomaleji oxidace probíhala při pH 9,0, kdy po třiceti minutách bylo zoxidováno necelých 8 % ticagreloru. Jako optimální pufr byl zvolen octan amonný o pH 4,0. Srovnání množství zoxidovaného ticagreloru elektrochemickou oxidací v octanu amonném o různém pH je znázorněno na obrázku 24.



Obrázek 24: Elektrochemická oxidace ticagreloru v octanu amonném o pH = 4,0; 7,0 a 9,0.

4.2.3 Volba optimálního rozpouštědla

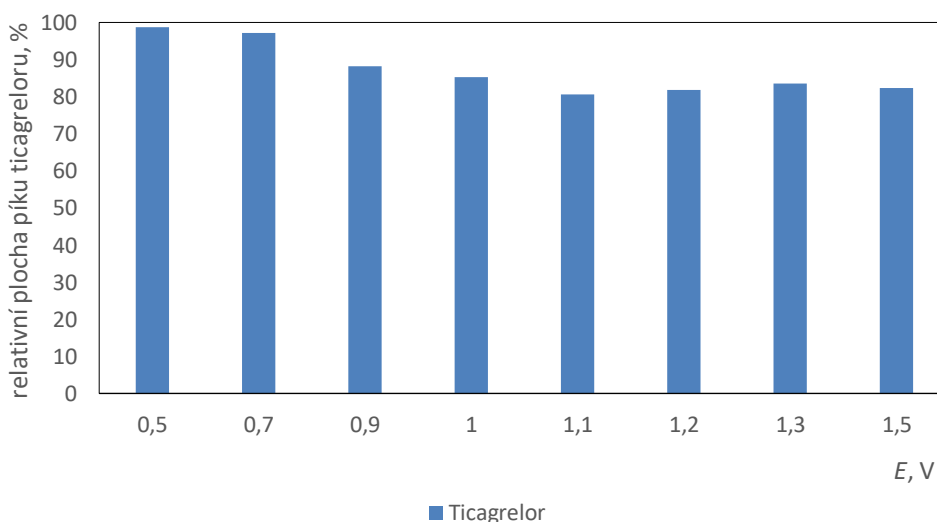
Při použití peroxidu vodíku rychlost oxidace závisela na použití rozpouštědla, proto v rámci elektrochemické oxidace byla testována stejná rozpouštědla. Byl použit acetonitril, isopropanol a methanol. Vzorek byl vždy odebrán před začátkem analýzy, dále v sedmé, desáté a patnácté minutě. Potenciál byl nastaven na hodnotu 1,10 V a byl po celou dobu měření konstantní. Potvrzuje se, že nejrychleji probíhá oxidace v acetonitrilu, kdy došlo během 15 minut k zoxidování zhruba 12 % ticagreloru. V případě methanolu došlo k zoxidování 8 % a nejpomaleji probíhala oxidace v isopropanolu, kdy došlo k oxidaci pouze 5 % ticagreloru. Jako optimální rozpouštědlo pro další zkoumání elektrochemické oxidace byl zvolen acetonitril. Úbytek ticagreloru během elektrochemické oxidace v jednotlivých rozpouštědlech je znázorněn na obrázku 25.



Obrázek 25: Vliv rozpouštědla na elektrochemickou oxidaci ticagreloru.

4.2.4 Volba optimálního potenciálu

Na základě předchozích výsledků bylo zvoleno jako optimální rozpouštědlo směs acetonitrilu s vodou (50/50, v/v) a jako optimální pufr byl použit roztok octanu amonného o pH = 4,0. Poslední parametr, který byl v této práci optimalizován byl aplikovaný potenciál. Byly vyzkoušeny potenciály v rozsahu od 0,50 V do 1,50 V. Jednotlivé vybrané potenciály jsou zobrazeny v grafu na obrázku 26. Měření bylo prováděno po dobu 30 minut. Poté bylo odebráno 0,7 ml zoxidovaného vzorku k UHPLC analýze. Vhodná hodnota potenciálu byla zvolena 1,10 V, kdy bylo zoxidováno 20 % ticagreloru. U vyšších hodnot probíhala oxidace pomaleji a hrozil by vznik nežádoucích produktů.

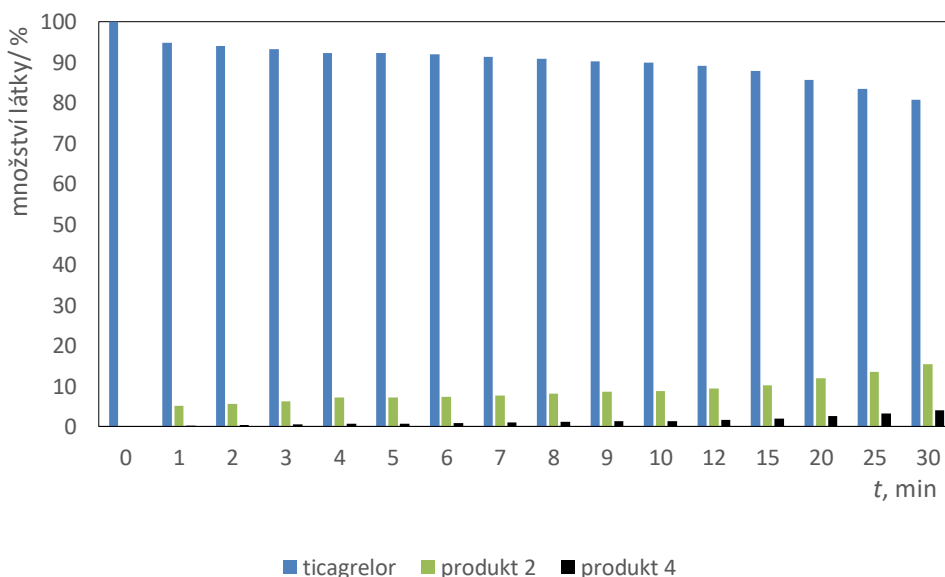


Obrázek 26: Vliv potenciálu na elektrochemickou oxidaci ticagreloru.

4.2.5 Rychlost elektrochemické oxidace

Za experimentálních podmínek, které byly vyhodnoceny jako optimální, byla sledována rychlost elektrochemické oxidace ticagreloru ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$). Oxidace probíhala ve směsi acetonitrilu s octanem amonným (50/50, v/v) o koncentraci $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 4,0$ při vhodně zvoleném potenciálu 1,1 V. Vzorky byly do desáté minuty odebírány po jedné minutě a dále už byl časový rozestup delší, poslední vzorek byl odebrán ve třicáté minutě. Vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC. Ticagrelor elektrochemickou oxidací poskytuje dva degradační produkty.

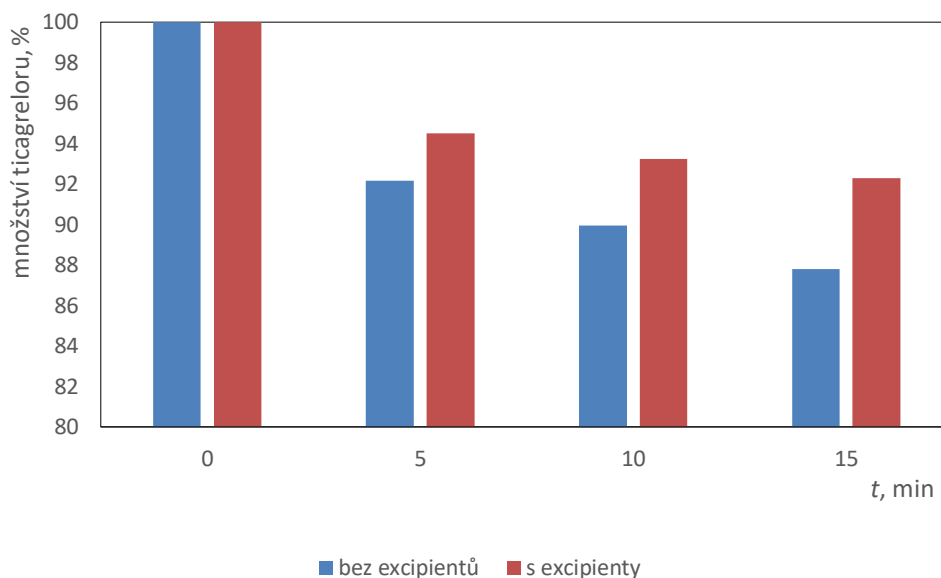
Degradační produkt 2 ($t_R = 3,9 \text{ min}$) bude pravděpodobně shodný s degradačním produktem získaným oxidací peroxidem vodíku. Po třiceti minutách oxidace je ho přítomno zhruba 15 %. Druhým je degradační produkt 4 ($t_R = 2,8 \text{ min}$), který při oxidacích peroxidem vodíku vůbec nevznikal. Vzniká v menším množství než degradační produkt 2, po třiceti minutách jsou ve vzorku přítomny zhruba 4 % tohoto produktu. Po 10 minutách bylo zoxidováno 10 % ticagreloru. K 20% degradaci ticagreloru došlo až po třiceti minutách. Rychlost elektrochemické oxidace a vznik dvou degradačních produktů je znázorněn na Obrázku 24. Oxidace ticagreloru peroxidem vodíku ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50 v/v) probíhala vyšší rychlostí než elektrochemická oxidace. Časový průběh elektrochemické oxidace je znázorněn na obrázku 27.



Obrázek 27: Časový průběh elektrochemické oxidace ticagreloru

4.2.6 Vliv excipientů na elektrochemickou oxidaci ticagreloru

V další části práce byl zkoumán vliv excipientů, které jsou součástí tablety Brilinta[®], na elektrochemickou oxidaci ticagreloru. Do roztoku ticagreloru v octanu amonném o pH = 4,0, který byl vyhodnocen jako optimální bylo přidáno adekvátní množství pomocných látek. Pro lepší rozpuštění excipientů byla směs sonikována po dobu 10 minut. Oxidace 25 ml roztoku ticagreloru probíhala za zvolených optimálních podmínek. Vzorčky oxidovaného roztoku byly odebírány po pěti minutách, centrifugovány a 0,7 ml supernatantu bylo odebráno pro UHPLC analýzu. Přítomnost excipientů zpomaluje elektrochemickou oxidaci. Po patnácti minutách je zoxidováno zhruba o 4 % ticagreloru méně než v roztoku bez excipientů. Degradací produkty, které vznikají, jsou stejné jako v případě bez excipientů. Porovnání elektrochemické oxidace ticagreloru v přítomnosti excipientů a bez nich je znázorněno na obrázku 28.



Obrázek 28: Porovnání elektrochemické oxidace ticagreloru bez excipientů a s excipienty

4.2.7 Opakovatelnost elektrochemické oxidace

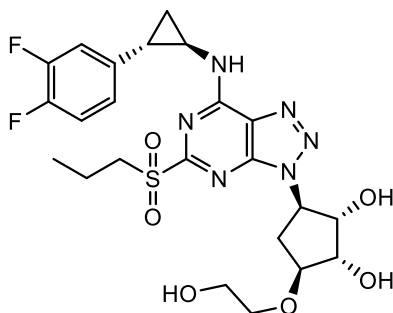
Pro měření opakovatelnosti elektrochemické oxidace byl zvolen opět roztok ticagreloru ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$) v octanu amonném o pH = 4,0. Jako vhodný čas pro posouzení opakovatelnosti elektrochemické oxidace bylo zvoleno deset minut, kdy za optimálních podmínek bylo zoxidováno vždy kolem 10 % ticagreloru. Oxidace byla provedena celkem pětkrát a vzorky následně analyzovány pomocí UHPLC.

Vyhodnocení opakovatelnosti bylo prováděno na základě směrodatné odchylky a její relativní hodnoty. Hodnoceny byly relativní plochy píku ticagreloru. Na jejich

základě byla vypočtena relativní směrodatná odchylka opakovaných elektrochemických oxidací ticagreloru. Relativní směrodatná odchylka byla vypočtena jako 1,5 %, což ukazuje na velmi dobrou opakovatelnost elektrochemické oxidace. Důležité dále je, že stanovená RSD má hodnotu pod 2 %, což je povolené maximum používané ve farmaceutických firmách. UHPLC metoda je dobře opakovatelná, relativní směrodatná odchylka retenčních časů, výšky píku a plochy píku byla pod 2 %.³⁶

4.3 Identifikace degradačních produktů

Degradační produkt **1** ($t_R = 4,2$ min) vznikal při oxidaci ticagreloru peroxidem vodíku ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v) jako hlavní degradační produkt. Po 24 hodinách bylo ve vzorku přítomno 95 % tohoto produktu. V dalších dvou zkoumaných rozpouštědlech (methanol, isopropanol) nedocházelo ke vzniku tohoto produktu. V hmotnostním spektru poskytoval signál o $m/z = 593,27$. Jedná se patrně o derivát arylsulfonu, který vznikl navázáním dvou atomů kyslíku na atom síry. Struktura degradačního produktu **1** je znázorněna na obrázku 29. Tento produkt vznikal i v článku H. S. Yaye a kolektivu.³¹

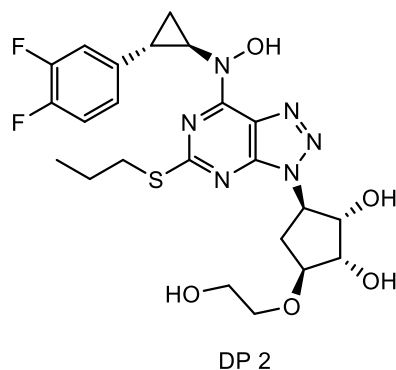


DP 1

Obrázek 29: Struktura degradačního produktu **1** (převzato a upraveno z [29]).

Degradační produkt **2** ($t_R = 3,9$ min) vznikal při oxidaci ticagreloru peroxidem vodíku ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v) jako meziprodukt. Nicméně vznikal jako hlavní degradační produkt při oxidaci ticagreloru peroxidem vodíku ve směsi methanolu či isopropanolu s vodou (50/50, v/v). V neposlední řadě byl také hlavním degradačním produktem při elektrochemické oxidaci ticagreloru. V hmotnostním spektru poskytoval signál o $m/z = 577,24$. Oproti ticagreloru tento produkt obsahuje další atom kyslíku. Dochází k hydroxylaci na necyklickém dusíku, který je navázán na adenin a vzniká derivát hydroxylaminu. Tento produkt vznikal také v článku H. S. Yaye

a kolektivu.³¹ Pravděpodobná struktura degradačního produktu **2** je znázorněna na obrázku 30.



Obrázek 30: Struktura degradačního produktu **2** (převzato a upraveno z [29]).

Degradační produkt **3** (DP 3) ($t_R = 3,1$ min) vznikal při oxidaci peroxidem vodíku ve všech použitých rozpouštědlech. Ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v) ho bylo po 24 hodinách přítomno 10 %, ve směsi methanolu s vodou (50/50, v/v) se jednalo o pouhá 3 % a ve směsi isopropanolu s vodou (50/50, v/v) se jedná o necelé procento. V hmotnostním spektru byl nejintenzivnější pík odpovídající $m/z = 679,64$. Tato hmota se neshoduje s žádným v literatuře zmíněným degradačním produktem.

Degradační produkt **4** (DP 4) ($t_R = 2,8$ min) vznikal při elektrochemické oxidaci ticagreloru. Při oxidaci peroxidem vodíku nevznikal vůbec. V hmotnostním spektru byl nejintenzivnější pík odpovídající $m/z = 717,64$. Tato hmota se neshoduje s žádným degradačním produktem z literatury. V tabulce 6 je znázorněn vznik jednotlivých degradačních produktů při různých typech oxidace a jejich relativní retenční časy.

Tabulka 6: Tabulka porovnávající vznik jednotlivých degradačních produktů při oxidaci peroxidem vodíku v použitých rozpouštědlech či elektrochemickou oxidací a jejich relativní retenční časy.

Typ oxidace		DP 1 ($t_{rel} = 0,88$)	DP 2 ($t_{rel} = 0,81$)	DP 3 ($t_{rel} = 0,65$)	DP 4 ($t_{rel} = 0,58$)
H ₂ O ₂	ACN/H ₂ O	+	+	+	–
	MeOH/H ₂ O	–	+	+	–
	Iso/H ₂ O	–	+	+	–
elektrochemická		–	+	–	+

5. Závěr

V první části diplomové práce byla studována oxidační degradace ticagreloru pomocí peroxidu vodíku v různých rozpouštědlech. Ticagrelor ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$) byl oxidován 3% peroxidem vodíku (obj.) ve stresové komoře při $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Jako rozpouštědla byla zvolena: acetonitril, methanol a isopropanol ve směsi s vodou (50/50, v/v). Oxidace byla vyhodnocována na základě relativních ploch píků.

Nejrychleji probíhala oxidační degradace ticagreloru ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v), kdy po dvou hodinách bylo ve vzorku přítomno necelé jedno procento ticagreloru. Dochází ke vzniku tří degradačních produktů (DP 1, DP 2 a DP 3), přičemž v případě degradačního produktu 2 se jedná o meziprodukt. Ve směsi methanolu s vodou (50/50, v/v) probíhá oxidace mnohem pomaleji. Po 24 hodinách je ve vzorku přítomno přes 50 % ticagreloru. Dochází ke vzniku pouze dvou degradačních produktů (DP 2 a DP 3). Jako nejpomalejší byla vyhodnocena oxidace ticagreloru ve směsi isopropanolu s vodou (50/50, v/v). Po 24 hodinách došlo k oxidaci pouze 15 % ticagreloru. Vznikají stejné degradační produkty jako při použití methanolu (DP 2 a DP 3). Tato oxidace pravděpodobně probíhá stejným mechanismem jako v methanolu akorát mnohem pomaleji.

Dále byl zkoumán vliv excipientů na rychlost oxidace ticagreloru peroxidem vodíku. V přítomnosti excipientů ve všech rozpouštědlech probíhala oxidace rychleji. Ve směsi acetonitrilu s vodou (50/50, v/v) není, již po půl hodině přítomen ticagrelor. Ve směsi methanolu s vodou (50/50, v/v) je po 24 hodinách zhruba o 10 % méně ticagreloru než v případě bez excipientů. Ve směsi isopropanolu s vodou (50/50, v/v) bylo ticagreloru zoxidováno zhruba o 7 % více. V přítomnosti excipientů vznikaly stejné oxidační degradační produkty jako bez nich, jen s vyšší rychlostí.

Dále v rámci této práce byla vyvinuta nová elektrochemická metoda k oxidaci léčivé látky ticagreloru. Jako metoda byla zvolena potenciostatická coulometrie. Tato metoda byla optimalizována tak, aby během krátkého časového intervalu došlo k zoxidování, co největšího množství léčivé látky. Nejprve byl vybrán pufr o vhodném pH, v tomto případě byl zvolen octan amonný o $\text{pH} = 4,0$. Jako optimální rozpouštědlo, kde oxidace probíhá nejrychleji byla zvolena směs acetonitrilu s vodou (50/50, v/v). Posledním parametrem, který byl optimalizován byl potenciál, kdy jako optimální hodnota byla zvolena hodnota 1,10 V. Za těchto optimálních podmínek byla sledována

rychlost elektrochemické oxidace. K 10% oxidační degradaci ticagreloru došlo po deseti minutách. K 20% oxidační degradaci, což je horní hranice pro optimální degradaci, došlo po třiceti minutách. V přítomnosti excipientů probíhá elektrochemická oxidace ticagreloru pomaleji zhruba o 4 %. Opakovatelnost elektrochemické oxidace byla měřena u pěti vzorků ticagreloru ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$). Relativní směrodatná odchylka byla vypočtena jako 1,5 %. Povolené maximum RSD ve farmaceutických firmách jsou 2 %. Elektrochemickou oxidací vznikaly dva degradační produkty (DP 2 a DP 4). Degradační produkt 2 vznikal i při oxidaci ticagreloru peroxidem vodíku.

6. Seznam literatury

- (1) Ticagrelor <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/cds023238> (accessed Mar 29, 2020).
- (2) PubChem. Ticagrelor <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9871419> (accessed Mar 30, 2020).
- (3) *Hematology*; Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-23355-9>.
- (4) Brilique <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/brilique> (accessed May 13, 2020).
- (5) Ticagrelor (CAS 274693-27-5) <https://www.caymanchem.com/product/15425> (accessed May 13, 2020).
- (6) Ticagrelor <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08816> (accessed Mar 30, 2020).
- (7) Royston, D. 45 - Anticoagulant and Antiplatelet Therapy. In *Pharmacology and Physiology for Anesthesia (Second Edition)*; Hemmings, H. C., Egan, T. D., Eds.; Elsevier: Philadelphia, 2019; pp 870–894. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48110-6.00045-4>.
- (8) Jaffer, I. H.; Weitz, J. I. Chapter 149 - Antithrombotic Drugs. In *Hematology (Seventh Edition)*; Hoffman, R., Benz, E. J., Silberstein, L. E., Heslop, H. E., Weitz, J. I., Anastasi, J., Salama, M. E., Abutalib, S. A., Eds.; Elsevier, 2018; pp 2168–2188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00149-9>.
- (9) Teng, R.; Oliver, S.; Hayes, M. A.; Butler, K. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Ticagrelor in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos* **2010**, *38* (9), 1514–1521. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.032250>.
- (10) Kelemen, H.; Hancu, G.; Papp, L. A. Analytical Methodologies for the Determination of Ticagrelor. *Biomedical Chromatography* **2019**, *33* (7), e4528. <https://doi.org/10.1002/bmc.4528>.
- (11) BRILIQUE, 90MG POR TBL DIS 56X1 II, Státní ústav pro kontrolu léčiv <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0222184&tab=texts> (accessed Mar 30, 2020).
- (12) Plšek, O. Akutní koronární syndrom | Kardiologie na Bulovce s.r.o. <http://www.kardiologie-sro.cz/resene-obtize/akutni-koronarni-syndrom/> (accessed Mar 31, 2020).
- (13) Knot, J.; Pěnička, M.; Čurila, K.; Widimský, P. Akutní Koronární Syndrom. *Medicína pro praxi* **2007**, *4* (4), 153–155.
- (14) Základy UPLC <http://www.hplc.cz/UPLC/> (accessed Mar 30, 2020).
- (15) Háková, E. Pokroky v moderních separačních metodách <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc/>.
- (16) Detectors for HPLC/UHPLC Systems :Waters https://www.waters.com/waters/en_CZ/Detectors-for-HPLC-UHPLC-Systems/nav.htm?locale=en_CZ&cid=514288 (accessed May 13, 2020).
- (17) UV/VIS HPLC detektory http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html (accessed May 13, 2020).
- (18) Benešová, K. VYUŽITÍ MODERNÍ SEPARAČNÍ TECHNIKY UPLC KE STANOVENÍ VITAMINU E V ZRNU JEČMENE. *Chem. Listy* **2012**, *5*.
- (19) Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z. *Základní Analytická Chemie*; Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum: Praha, 2003.
- (20) Barek, J.; Opekar, F.; Štulík, K. *Elektroanalytická Chemie*; Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum: Praha, 2005.

- (21) Bačová, V. Stanovení Kyseliny Askorbové a Fosforečnanů Coulometricky. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno, 2010.
- (22) Baertschi, S. W.; Alsante, K. M.; Reed, R. A. *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*; Informa Healthcare: London; New York, 2011.
- (23) SGS LSS Forced Degradation EN 11.pdf | Pharmaceutical Formulation | Assay <https://www.scribd.com/document/214788769/SGS-LSS-Forced-Degradation-en-11> (accessed May 13, 2020)
- (24) Vetchý, D.; Frýbortová, K.; Rabišková, M.; Häring, A. Stability Testing of Medicinal Preparations. *Chemické listy* **2006**, *100* (1).
- (25) Blessy, M.; Patel, R. D.; Prajapati, P. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>.
- (26) Ngwa, G. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. **2010**, *10* (5), 4.
- (27) Ph. D, P. et M. D. V. Stabilitní Testy ve Farmacii. *Praktické lékárenství* **2007**, *2* (6), 276–277.
- (28) REG-83, Státní ústav pro kontrolu léčiv <http://www.sukl.cz/leciva/reg-83> (accessed May 13, 2020).
- (29) Wu, Y.; Levons, J.; Narang, A. S.; Raghavan, K.; Rao, V. M. Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug–Excipient Incompatibility. *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12* (4), 1248–1263. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9677-z>.
- (30) Waterman, K. C.; Adami, R. C.; Alsante, K. M.; Hong, J.; Landis, M. S.; Lombardo, F.; Roberts, C. J. Stabilization of Pharmaceuticals to Oxidative Degradation. *Pharmaceutical Development and Technology* **2002**, *7* (1), 1–32. <https://doi.org/10.1081/PDT-120002237>.
- (31) Sadou Yaye, H.; Secrétan, P.-H.; Henriët, T.; Bernard, M.; Amrani, F.; Akrouit, W.; Tilleul, P.; Yagoubi, N.; Do, B. Identification of the Major Degradation Pathways of Ticagrelor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, *105*, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.046>.
- (32) Gobetti, C.; Pereira, R. L.; Garcia, A. S. L. M. and C. V. Determination of the New Antiplatelet Agent Ticagrelor in Tablets by Stability-Indicating HPLC Method <http://www.eurekaselect.com/122681/article> (accessed May 27, 2020).
- (33) Kakde, R. B.; Satone, D. D.; Dongare, G.; Chilbule, R.; Malkhede, Y. Method Development, Validation and Impurity Profiling of Ticagrelor by Acid Degradation Method. *IJPTR* **2017**, *10* (4), 225–236. <https://doi.org/10.20902/IJPTR.2017.10429>.
- (34) Bueno, L. M.; Manoel, J. W.; Giordani, C. F. A.; Mendez, A. S. L.; Volpato, N. M.; Schapoval, E. E. S.; Steppe, M.; Garcia, C. V. HPLC Method for Simultaneous Analysis of Ticagrelor and Its Organic Impurities and Identification of Two Major Photodegradation Products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**, *97*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.004>.
- (35) Rizk, M.; Sultan, M. A.; Taha, E. A.; Attia, A. K.; Abdallah, Y. M. Highly Sensitive Carbon Based Sensing Utilizing Titanium Dioxide Nanoparticles and Multiwalled Carbon Nanotubes for Determination of Ticagrelor: Pharmacokinetics Application. *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164* (12), H770. <https://doi.org/10.1149/2.0361712jes>.
- (36) Tonnerová, B. Studium Oxidační Degradace Tikagreloru. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, 2020.

- (37) Pražáková, L. Využití Elektrochemické Oxidace v Degradčních Studiích Abacaviru. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, 2020.