

**+UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie**



**Ověření vlastností HPLC metody indikujících stabilitu rivaroxabanu  
pro účely farmaceutické analýzy**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:

Miroslava Hlistová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Olomouc 2015

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

*podpis*

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala Ing. Pavlovi Štverkovi za poskytnutí tématu k řešení a umožnění provést práci v analytické laboratoři výzkumu a vývoje firmy Teva. Dále děkuji Ing. Petrovi Zelíkovi za jeho čas, trpělivost a poskytnuté informace ohledně postupu ověřování stability indikujících metod a také ostatním členům validačního týmu za vytvoření přátelského prostředí. Zároveň děkuji vedoucímu mé práce doc. RNDr. Petrovi Fryčákovi, Ph.D. za čas a pomoc při měření na hmotnostním spektrometru a cenné rady při zpracování diplomové práce. Můj dík patří také mé rodině za podporu při studiu a při sepisování této práce.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

**Jméno a příjmení autora:** Miroslava Hlistová

**Název práce:** Ověření vlastností HPLC metody indikujících stabilitu rivaroxabanu pro účely farmaceutické analýzy

**Typ práce:** Diplomová

**Pracoviště:** Katedra analytické chemie

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2015

### Abstrakt:

Hlavním cílem této diplomové práce bylo ověření, zda je metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení rivaroxabanu schopná indikovat jeho stabilitu. Podle standardního operačního postupu byly nalezeny vhodné stresové podmínky pro studium stability rivaroxabanu. Stresované vzorky byly následně analyzovány třemi HPLC-UV/DAD metodami: 1) pro zjištění obsahu známých nečistot a degradačních produktů a hodnocení čistoty píku, 2) pro zjištění obsahu hlavní látky a 3) pro sledování možné racemizace rivaroxabanu. Byla prokázána schopnost HPLC metody pro obsah nečistot indikovat stabilitu, neboť nebyl nalezen žádný důkaz pro koeluci píku hlavní látky s některou nečistotou, všechny píky rivaroxabanu byly zhodnoceny jako spektrálně čisté. Zároveň byla popsána vysoká citlivost rivaroxabanu vůči bazickým podmínkám, citlivost vůči kyselým podmínkám, oxidaci peroxidem vodíku a UV záření v roztoku. Rivaroxaban byl stabilní při zahřívání v roztoku, při působení oxidu manganického a také při působení UV záření a tepla na léčivou látku v pevné fázi. Ověření HPLC metody bylo provedeno ve farmaceutické společnosti Teva Czech Industries s.r.o. Na závěr byl pokus o objasnění struktury degradačních produktů. Za tímto účelem byly stresované vzorky podrobeny analýze metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (UPLC-HRMS).

**Klíčová slova:** HPLC, HPLC-HRMS, stabilitu indikující metoda, stabilita léčivých látek, stresové podmínky, rivaroxaban

**Počet stran:** 78

**Jazyk:** Český

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

**Author's first name and surname:** Miroslava Hlistová

**Title:** Validation of stability indicating properties of an HPLC method for rivaroxaban for the purpose of pharmaceutical analysis

**Type of thesis:** Master

**Department:** Department of Analytical Chemistry

**Supervisor:** doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

**The year of presentation:** 2015

### Abstract:

The main aim of this thesis was to validate the ability of a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of rivaroxaban to indicate its stability. According to the standard operating procedure, appropriate stress conditions for stability studies of rivaroxaban were found. Stressed samples were analyzed by three HPLC-UV/DAD methods for: 1) Determination of the content of known impurities and degradation products and evaluation of the peak purity 2) Determination of the content of the main compound, and 3) Monitoring the possible racemization of rivaroxaban. No evidence for peak co-elution was observed, all peaks of rivaroxaban were considered to be pure and therefore the ability of HPLC impurity method to indicate stability was demonstrated. Rivaroxaban was very sensitive to basic conditions, sensitive to acid conditions, to oxidation by hydrogen peroxide and to irradiation in solution. Rivaroxaban was resistant to heat in solution, to the effect of manganese dioxide and to the effect of heat and UV irradiation on the drug substance in solid state. Validation of HPLC method was performed in pharmaceutical company Teva Czech Industries s.r.o. Finally, elucidation of the structure of degradation products was attempted. Stressed samples were analyzed by ultra performance liquid chromatography method coupled with high resolution mass spectrometry.

**Keywords:** HPLC, HPLC-HRMS, stability-indicating method, stability of drug substance, stress conditions, rivaroxaban

**Number of pages:** 78

**Language:** Czech

## **PROFIL SPOLEČNOSTI TEVA**

Společnost Teva Czech Industries s.r.o., dříve známá jako Galena, je významným farmaceutickým výrobcem s velmi dlouhou historií. Její sídlo se nachází na severovýchodě České republiky v Opavě, Komárově. Ve svém širokém portfoliu má generické léčivé přípravky – především antiastmatika, cytostatika, imunosupresiva, hypolipidemika, antihypertenziva aj. - v podobě tablet, tobolek a kapalných lékových forem, dále také volně prodejné léky (OTC), účinné farmaceutické látky (API) a rostlinné extrakty. Produkty splňují uznávané standardy kvality a jsou exportovány do řady zemí celého světa, včetně USA a západní Evropy. Na úspěších společnosti a plnění náročných cílů se podílí více než 1500 zaměstnanců. V r. 2006 se společnost stala součástí nadnárodní skupiny Teva. Společnost je rozdělena na dvě divize, z nichž jedna se zabývá výrobou generických léčivých přípravků (Pharma) a druhá vývojem a výrobou účinných farmaceutických látek (TAPI). Pod divizi TAPI spadají útvary výzkum a vývoj, registrace, jištění a kontrola kvality a výroba.<sup>1</sup>

### **Výzkum a vývoj**

Útvar výzkumu a vývoje se zaměřuje především na:

- metody separace účinných látek
- metody syntézy účinných látek
- analytické metody a jejich validace
- nalezení nových polymorfů a jejich charakterizaci.
- vývoj vysoce účinných aktivních farmaceutických látek (HAPI).<sup>1</sup>

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	Stabilita léčivých látek a léčivých přípravků.....	2
2.2	Testování stability.....	3
2.2.1	Stresové testy (zátěžové zkoušky, stress testing).....	3
2.2.2	Zrychlené testy (accelerated testing).....	4
2.2.3	Dlouhodobé testy (long-term studies).....	5
2.2.4	Následné stabilitní zkoušky.....	6
2.2.5	Typy rozkladných reakcí.....	7
2.2.6	Nečistoty v léčivých látkách a léčivých přípravcích.....	8
2.2.7	Obecné testy pro kontrolu kvality léčiv.....	9
2.3	Analytické metody hodnotící testy stability.....	9
2.3.1	Nejnovější stabilitu indikující metody.....	11
2.4	Rivaroxaban.....	13
2.4.1	Vlastnosti.....	13
2.4.2	Stabilita rivaroxabanu.....	15
2.4.3	Výroba a typické zkoušky.....	18
2.4.4	Metabolismus.....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1	Vzorky a standardy.....	23
3.2	Chemikálie.....	23
3.3	Instrumentální vybavení.....	24
3.4	Experimentální podmínky použitých instrumentálních metod.....	25
3.4.1	Metody pro nečistotní profil (LC1182) a obsah hlavní látky (LC1183) ...	25
3.4.2	Metoda pro stanovení enantiomerní čistoty (LC1184).....	25

3.4.3	Metoda LC-MS (Thermo LTQ XL)	25
3.4.4	Metoda LC-HRMS (Synapt G2-S)	26
3.5	Příprava roztoků a postup měření pro ověření parametrů SIM HPLC	26
3.5.1	Stresové testování	26
3.5.2	Metoda LC1182	28
3.5.3	Metoda LC1183	30
3.5.4	Metoda LC1184	31
3.5.5	Hodnocení čistoty píku (Peak purity)	32
3.6	Příprava roztoků a postup měření pro metody LC-MS	36
4	Výsledky a diskuze	37
4.1	Výsledky hodnocení čistoty píku	37
4.2	Nestresovaný vzorek RVB šarže MV110502/02/01	37
4.3	Roztok vzorku RVB vystavený kyselému prostředí (HCl)	39
4.4	Roztok vzorku RVB vystavený bazickému prostředí (NaOH)	42
4.5	Roztok vzorku RVB vystavený oxidaci (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	45
4.6	Roztok vzorku RVB vystavený oxidaci (MnO <sub>2</sub> )	49
4.7	Roztok vzorku RVB vystavený UV záření	50
4.8	Roztok vzorku RVB vystavený zahřívání	52
4.9	Nestresovaný vzorek šarže 76191000312 pro stresy v pevném stavu	53
4.10	Vzorek RVB v pevném stavu vystavený UV záření	54
4.11	Vzorek RVB v pevném stavu vystavený teple	54
5	Závěr	56
6	Seznam literatury	57
7	Seznam tabulek	59
8	Seznam obrázků	60
9	Přílohy	63



# 1 Úvod

Farmaceutické společnosti dnes garantují výrobu kvalitních, bezpečných a účinných léků. O zachování těchto vlastností během doby použitelnosti léku rozhoduje stabilita účinných látek obsažených v léčivém přípravku, na kterou se proto klade čím dál větší důraz.

Stabilita léčivých látek a léčivých přípravků se stanovuje pomocí stabilitních zkoušek. Tyto zkoušky různými způsoby simulují buď extrémní podmínky, které by mohly nastat při nesprávném skladování a krátkodobé odchylce od předepsaných podmínek nebo simulují předepsané podmínky skladování léčiva po dobu několika let. Vzorky léčivých látek a konečných přípravků, které byly vystaveny stabilitním zkouškám jsou následně kontrolovány pomocí speciálních analytických metod nazývaných stabilitu indikující metody. Možné degradační produkty mají obvykle strukturu velmi podobnou struktuře studované látky, proto musí být dané metody schopné tyto látky separovat, detekovat a určit jejich obsah. Je také nutné prokazovat, že nedochází ke koeluci některého degradačního produktu s hlavní látkou.

V dnešní době je známo velké množství léčivých látek a jsou vyvíjeny stále nové. Toto sebou nese nároky na potřebu kontrolních metod pro tyto látky. V posledních desetiletích byl vyvinut nespočet metod pro indikaci stability léčiv. Nejčastěji jsou využívány HPLC metody s UV detekcí za použití detektoru diodového pole, avšak rychle roste počet metod s detekcí hmotnostní spektrometrií, která navíc nabízí možnost objasnění struktury degradačních produktů.

Cílem této práce bylo zjistit, zda je HPLC metoda pro léčivou látku rivaroxaban schopná indikovat její stabilitu. Tohoto bylo dosaženo analýzou vzorků rivaroxabanu vystavených stresovým podmínkám, při kterých docházelo k degradaci látky a byl sledován obsah hlavní látky, degradačních produktů i enantiomerní čistota. Používaná UV detekce však nedovolovala určit strukturu degradačních produktů, proto byla k získání informací o struktuře použita hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Stabilita léčivých látek a léčivých přípravků

Léčivé přípravky nejsou neomezeně stálé soustavy, ale časem se mění jejich fyzikální a chemické vlastnosti, probíhají v nich rozkladné procesy a klesá také biologická účinnost. Lék podávaný pacientovi musí být kvalitní, bezpečný a účinný, proto je třeba sledovat stabilitu léčivých látek a léčivých přípravků jak při výzkumu a vývoji, tak při průmyslové výrobě včetně následné distribuce.<sup>2</sup>

Stabilita léčivé látky a léčivého přípravku je definována jako vlastnost zachovat si ve stanovených mezích po určitou dobu a za stanovených podmínek uchování určené jakostní znaky. Mírou stability je doba použitelnosti.<sup>2,3</sup>

Stabilitu léčivé látky hodnotíme pomocí stabilitních studií, kdy jsou pomocí různých testů posuzovány změny jakosti (např. změna obsahu účinné látky) v určitých časových intervalech. Sledují se také rozkladné reakce a jejich kinetika, speciálně při vývoji léčivých přípravků se sleduje i kompatibilita (snášlivost) jednotlivých složek léčiva.<sup>2</sup>

Důsledkem nestability léčiva může být: snížení obsahu nebo zvýšení koncentrace léčiva, změna biologické dostupnosti nebo ztráta mikrobiologické nezávadnosti, vznik rozkladných produktů či změna vzhledu lékové formy.<sup>3</sup>

Výsledky stabilitních zkoušek jsou nezbytnou součástí registrační dokumentace předkládané příslušným regulačním orgánům, v ČR je to Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). Ten přejímá pokyny k testování stability léčivých látek a konečných přípravků - Harmonised Tripartite Guideline vydávané organizací ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use).

Nadnárodní společnosti distribuují vyrobené léky do mnoha zemí světa, proto je snahou sjednotit požadavky na laboratorní postupy, kvalitu a obaly přípravků do mezinárodních předpisů. ICH usiluje o harmonizaci požadavků regulačních orgánů ve státech Evropy, USA a Japonsku vydáváním skupin pokynů (ICH Guidelines). Skupiny pokynů se týkají kvality (Q), bezpečnosti (S) a účinnosti (E) léčiv a pokyny v multidisciplinární skupině (M) nelze zařadit do žádné z předchozích. Testování stability léčivých látek a léčivých produktů je popsáno pokyny označenými Q1A-Q1F, validací se zabývá pokyn Q2, nečistoty řeší pokyny Q3A-Q3D a specifikaci Q6A a Q6B.<sup>4</sup>

Sledování kvality léčivých přípravků v průběhu doby použitelnosti začala být věnována pozornost začátkem roku 1970, kdy se objevily obavy, že léčivé přípravky nesplňují požadavky na kvalitu v průběhu doby použitelnosti. V roce 1975 bylo do amerického lékopisu doplněno ustanovení o expirační době léčiv. US Food and Drug Administration (FDA) připravila první pokyn o stabilitě v roce 1984, o tři roky později pak pokyn pro podávání informací o stabilitě. Mezinárodní konference o harmonizaci (ICH) vytvořila v roce 1993 Q1A pokyn o harmonizaci požadavků na stabilitu nových léčivých látek a léčivých produktů. Později byl vytvořen také pokyn o stabilitě léčiv od světové zdravotnické organizace (WHO).<sup>5</sup>

## **2.2 Testování stability**

Cílem testování stability je popsat změny kvality léčivých látek nebo přípravků v čase vlivem různých faktorů prostředí, jako je teplota, vlhkost a světlo, ustanovit časové intervaly testování (dobu reatestace) léčivých látek a doporučit skladovací podmínky a dobu použitelnosti léčivých látek nebo přípravků.<sup>6</sup> Stabilitní studie se zakládají za účelem zavádění nového léku do výroby, při změně technologie výroby, vnitřního obalu nebo specifikace.<sup>3</sup>

Testy stability ale mohou být užitečné už při vývoji lékové formy, kdy technolog potřebuje nejprve zjistit vlastnosti nové léčivé látky a sledovat její snášenlivost s pomocnými látkami a případně s dalšími léčivými látkami.<sup>2</sup>

Stabilitu lze zkoumat pomocí zátěžových, zrychlených nebo dlouhodobých stabilitních zkoušek.

### **2.2.1 Stresové testy (zátěžové zkoušky, stress testing)**

Zátěžové stabilitní zkoušky jsou prováděny za stresových podmínek, kdy dochází k urychlení chemických a fyzikálních změn léčivé látky.<sup>2</sup> Tyto testy mohou pomoci identifikovat možné rozkladné (degradační) produkty, což může dopomoci k objasnění mechanismu degradace a ke zjištění vnitřní stability molekuly léčivé látky. Pomocí stresových testů se také ověřuje schopnost používané analytické metody indikovat stabilitu sledované léčivé látky.<sup>6</sup>

K zátěžovým zkouškám postačí jedna šarže léčivé látky, která je v rámci testování podrobena různým podmínkám a je hodnocena její odolnost vůči následujícím vlivům:

- vliv vlhkosti (např. 75 % relativní vzdušné vlhkosti-RV nebo více), je-li to vhodné
- vliv hydrolyzy v širokém spektru hodnot pH – kyseliny a báze přidané k roztoku působí nejdříve za laboratorní teploty. Pokud degradace neprobíhá, zvýšíme teplotu.<sup>7</sup>
- vliv oxidace
- vliv zvýšené teploty – testuje se na léčivou látku v roztoku i v pevném stavu. Sledují se přírůstky po 10 °C od teploty používané při zrychlené stabilitní studii (např. 50 °C, 60 °C atd.).
- vliv světla – testuje se, zda-li léčivá látka podléhá fotolýze v roztoku a v pevném stavu. Vzorek se ozařuje definovaným způsobem, např. xenonovou lampou.<sup>6,7</sup>

Testování fotostability by mělo být nedílnou součástí stresových testů. Standardní podmínky testování fotostability jsou popsány ve speciálním pokynu ICH Q1B. Testování fotostability se provádí za účelem získání informací o citlivosti látky na působení světla. Pokud se prokáže, že je látka citlivá na světlo, je nutné přijmout speciální opatření ke skladování a balení léčivých látek. Jako zdroje světla je možné používat zdroje, které vydávají záření od UV po viditelnou oblast podobné emisním standardům pro umělé venkovní a vnitřní světlo. Po skončení expozice by měly být vzorky vizuálně hodnoceny, zda nedošlo ke změně vzhledu nebo barvy roztoku či pevné látky.<sup>8</sup>

### **2.2.2 Zrychlené testy (accelerated testing)**

Zrychlené a dlouhodobé testy by měly probíhat alespoň na třech základních šaržích léčivé látky, které jsou vyrobené procesem simulujícím výrobu. K testování vlastností léčivých látek by měly být použity pouze validované stabilitu indikující metody. Podmínky zkoušení zrychlených a dalších testů jsou uvedeny v Tab. 1(cit. <sup>6</sup>).

Při zrychlených podmínkách testování jsou doporučeny minimálně tři časové body, kdy se kontroluje stabilita léčiva. Včetně počátečního a konečného časového bodu je to obvykle 0,

3 a 6 měsíců. Testování za zrychlených a přechodných podmínek se využívá k hodnocení vlivu krátkodobé změny podmínek, která může nastat například během přepravy.<sup>9</sup>

Vzrůst teploty skladování při testu o 10 °C, zvyšuje rychlost reakce dvakrát, tzn. 1 rok při 30 °C odpovídá 3 týdnům při 70 °C, takže stabilitu na dva roky dopředu můžeme určit stabilitním testem při vystavení vzorku teplotě 70°C po dobu 6 týdnů.<sup>7</sup>

### 2.2.3 Dlouhodobé testy (long-term studies)

Dlouhodobé stabilitní zkoušky jsou prováděny za předepsaných podmínek uchovávání. Tyto podmínky jsou na různých místech na Zemi odlišné vlivem klimatických pásem. Horní hranice podmínek uchovávání většiny léčiv pro podnebí naší republiky a velké části Evropy je teplota 25 °C a relativní vzdušná vlhkost (RV) 60% viz Tab. 1. Doba zkoušení by měla být stejná jako doba použitelnosti léčiva, přičemž se vzorky podrobené testům hodnotí na začátku testování a pak po 3, 6, 12, 18 a 24 měsících a dále v ročních intervalech.<sup>6</sup>

Vzorky pro zrychlené a dlouhodobé stabilitní testy jsou po dobu trvání testů skladovány ve speciálních klimatizovaných skříních s odchylkami teploty  $\pm 2$  °C a vlhkosti  $\pm 5$  %.cit.<sup>2</sup>

**Tab. 1: Typy stabilitních studií, aplikované podmínky a doba testování**

Typ stabilitní studie	Skladovací podmínky	Minimální doba při podání žádosti o registraci
Dlouhodobá* (long-term)	25 °C $\pm$ 2 °C / 60% RV $\pm$ 5% RV nebo 30 °C $\pm$ 2 °C / 65% RV $\pm$ 5% RV	12 měsíců 6 měsíců **
Přechodná (intermediate)	30 °C $\pm$ 2 °C / 65% RV $\pm$ 5% RV	6 měsíců
Zrychlená (accelerated)	40 °C $\pm$ 2 °C / 75% RV $\pm$ 5% RV	6 měsíců

\* Záleží na uvážení žadatele o registraci, zda bude provádět dlouhodobé stabilitní studie při teplotě 25  $\pm$  2°C / 60% RV  $\pm$  5% RV nebo 30 ° C  $\pm$  2 ° C / 65% RV  $\pm$  5% RV.<sup>6,9</sup>

\*\* U známé léčivé látky při podání žádosti o registraci je i pro pilotní šarže minimální doba trvání testu 6 měsíců.<sup>9</sup>

U dlouhodobých studií, by měly být frekvence testování dostatečné pro stanovení stabilitního profilu léčivé látky. U léčivých látek s navrhovaným reatestačním obdobím nejméně 12 měsíců by měla být četnost zkoušek při podmínkách dlouhodobého skladování obvykle každé 3 měsíce v průběhu prvního roku, každých 6 měsíců od druhého roku, a poté každoročně v rámci navrhnutého reatestačního období.<sup>6</sup>

Dlouhodobé studie potvrzují výsledky zrychlených testů, stanovení času použitelnosti a poskytují nejpřesnější informace o stabilitě. Léčiva se testují v prodejním obalu. Při podání žádosti o registraci musí být výsledky dlouhodobé a zrychlené stresové studie doloženy v délce nejméně 6 měsíců, přičemž se žadatel zaváže, že výsledky dlouhodobé studie doloží dodatečně.<sup>9</sup>

Záznamy o stabilitních zkouškách se uvádějí do protokolu o stabilitě, který je součástí registrační dokumentace. Tento protokol obsahuje informace o názvu výrobku, výrobci, datu a místě výroby, o čísle, velikosti a složení zkoušených šarží. Uvádějí se do něj limity platné během doby použitelnosti a použité zkušební metody. Výsledky zkoušek jsou uváděny přehledně do tabulek pro každou šarží, kde se zaznamenají počáteční hodnoty, výsledky získané během stabilitních zkoušek a příslušné limity jednotlivých zkoušek.<sup>9</sup>

#### 2.2.4 Následné stabilitní zkoušky

Tyto zkoušky jsou dlouhodobě prováděny výrobcem léčivých látek na minimálně jedné šarži za rok skladované při předepsaných podmínkách uchovávání. Mají za úkol sledovat kvalitu a stabilitu léčivých látek a předkládají se k žádostem o prodloužení registrace.<sup>10</sup>

Testování stability obecně by se mělo týkat fyzikálních, chemických, biologických a mikrobiologických vlastností viz tab. 2. K testování by měly být používány pouze analytické metody pro ověření stability indukujících vlastností metody. Četnost provádění reatestace závisí na výsledcích z validačních studií.

**Tab. 2: Hodnocení stability léčivých přípravků<sup>3</sup>**

Typ testů	Sledovaná vlastnost
Organoleptické	Vzhled, zápach, barva, chuť, čírost,
Fyzikální	Čírost, sedimentace, disoluční profil, viskozita, polymorfismus, velikost částic, vlhkost, mechanická odolnost
Chemické	Vznik rozkladných produktů, obsah účinné látky
Biologické a mikrobiologické	Mikrobiologická nezávadnost, sterilita, nepřítomnost pyrogenů, biologická účinnost

### 2.2.5 Typy rozkladných reakcí

Pokud je léčivo nestabilní při stabilitních zkouškách, dochází v jeho molekule k různým rozkladným reakcím za vzniku degradačních produktů. Rozlišujeme následující typy rozkladných reakcí:

#### *Hydrolyza*

Hydrolyticky se nejčastěji rozkládají léčiva esterového typu, amidy, anilidy, karbamáty, také laktony, laktamy, thioestery, imidy a další. Jako konkrétní příklady látek, jež podléhají hydrolyze, lze uvést kyselinu acetylsalicylovou, amoxicilin, diazepam a ergotamin.

#### *Oxidace*

Oxidací rozumíme chemickou reakci, při které atom nebo molekula ztrácí elektrony a přijímá kyslík nebo se odštěpí vodík. Snadno se oxidují látky obsahující násobné vazby, molekuly typu etherů, aldehydů, hydroxymethylketony, fenoly a terciární aminy. Dodáním energie mohou probíhat také radikálové reakce, při kterých následnými reakcemi vznikají ketony, dioly, karboxylové kyseliny, epoxidy nebo další látky podle typu výchozí substance. Oxidaci podléhají například chlorpromazin, morfin a captopril.

#### *Fotochemický rozklad*

Působení ultrafialového nebo viditelného záření na léčivo může způsobit rozklad – fotolýzu. Z účinných látek podléhajících fotodegradaci můžeme jmenovat fluorosemid, nifedipin, promethazin, ergotamin a jiné.

#### *Změny v optické aktivitě*

Opticky aktivní látky mohou racemizovat a vytvořit směs enantiomerů. Optické antipody mívají odlišné farmakodynamické vlastnosti a dochází tak ke ztrátě účinku. Případy stabilitní racemizace však nejsou časté.

#### *Dekarboxylace*

Probíhá jako odštěpení oxidu uhličitého z karboxylové skupiny. Objevuje se při rozkladech léčiv spíše jako reakce následná po hydrolyze nebo oxidaci. Málo časté jsou také reakce *polymerační a redukce*.<sup>2</sup>

## 2.2.6 Nečistoty v léčivých látkách a léčivých přípravcích

Za nečistotu je považována každá složka léčivé látky, která není chemickou entitou definovanou jako léčivá látka. V případě léčivého přípravku je to každá látka, která není chemickou entitou definovanou jako účinná nebo pomocná látka obsažena v přípravku.

*Klasifikace nečistot:*

- Organické nečistoty
- Anorganické nečistoty
- Zbytková rozpouštědla

Organické nečistoty mohou vznikat v průběhu výrobního procesu nebo díky způsobu skladování léčivé látky. Mezi organické nečistoty se řadí výchozí suroviny, vedlejší produkty, meziprodukty, degradační produkty a reakční činidla.<sup>11</sup> Degradační produkty jsou definovány jako molekuly vyplývající z chemické změny molekuly léku vznikající v průběhu času nebo vlivem světla, teploty, pH, vody nebo reakcí s pomocnou látkou.<sup>12</sup>

Anorganické nečistoty mohou být důsledkem výrobního procesu a jsou obvykle známé a identifikované. Zahrnují reakční činidla, ligandy a katalyzátory, těžké kovy nebo jiné zbytkové kovy, anorganické soli a ostatní materiály.

Rozpouštědla jsou anorganické nebo organické kapaliny používané jako prostředky pro přípravu roztoků nebo suspenzí při syntéze léčivých látek.

Žadatel o registraci by měl shrnout skutečné a potenciální nečistoty na základě průběhu syntézy, čištění a skladování léčivé látky a na základě možných chemických reakcí. Uvádět se má každá specifikovaná identifikovaná nečistota, specifikovaná neidentifikovaná, nespecifikovaná nečistota a celkový obsah nečistot. Identifikovaná nečistota je taková, u níž byla popsána struktura. Specifikovaná nečistota je pak identifikovaná nebo neidentifikovaná nečistota, která je zařazena do specifikace léčivé látky nebo přípravku a je sledována za účele zajištění kvality léčivého přípravku. Více informací o sledování nečistot a stanovená kritéria přijatelnosti obsahu nečistot lze nalézt v ICH předpisu Q3A.<sup>11</sup>



### 2.2.7 Obecné testy pro kontrolu kvality léčiv

- **Popis:** provádí se kvalitativní prohlášení o stavu (např. pevné, kapalné) a barvě léčivé látky. Pokud se některá z těchto charakteristik v průběhu skladování mění, měla by být tato změna zkoumána.
- **Identifikace:** metoda by měla být schopna rozlišovat mezi sloučeninami úzce související stavby. Identifikace na základě jediné charakteristiky (např. jen retenčního času) se nepovažuje za specifickou. Nicméně použití postupu, kde je separace založena na 2 principech, je obecně přijatelné. Jde například o spojení HPLC s UV a detektorem diodového pole, HPLC-MS a GC-MS. Opticky aktivní účinné látky mohou vyžadovat speciální identifikační testování nebo výkon chirálního testu. U léčivých látek vyvinutých jako jediný enantiomer by kontrola druhého enantiomeru měla být posuzována jako by šlo o klasickou nečistotu.
- **Obsah:** specifická stabilitu indikující metoda by se měla používat pro stanovení obsahu léčivé látky. V mnoha případech lze použít jedinou metodu (např. HPLC) pro stanovení obsahu léčivé látky a zároveň pro kvantifikaci nečistot.
- **Nečistoty:** o organických a anorganických nečistotách a zbytkových rozpouštědlech pojednává předpis ICH Q3.cit. <sup>12</sup>

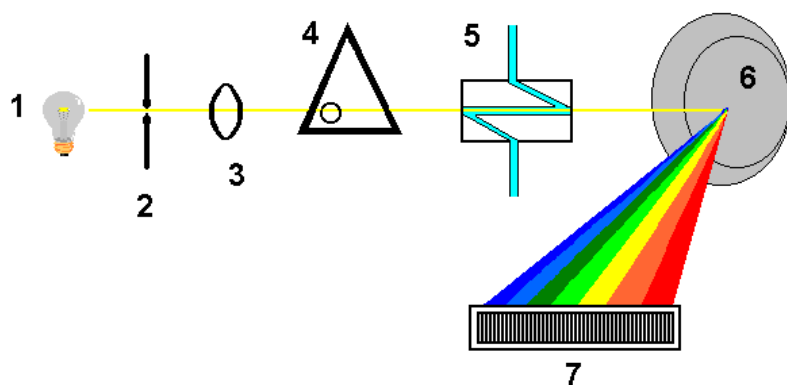
### 2.3 Analytické metody hodnotící testy stability

Ve farmaceutickém průmyslu je regulačním požadavkem poskytovat informace o stabilitě léčivých látek a léčivých přípravků. Pro splnění tohoto požadavku musí být vyvíjeny a validovány stabilitu indikující metody (SIM) pro separaci a kvantifikaci účinné látky a jejích příbuzných sloučenin (procesní nečistoty a degradační produkty).<sup>5</sup>

Při vývoji stabilitu indikující metody je vhodné postupovat po krocích, kdy prvním krokem je pochopení chemických a fyzikálně-chemických vlastností léčivé látky a předvídaní jejích rozkladných produktů. Na vnitřních vlastnostech léčivé látky závisí například výběr diluentu, způsob přípravy vzorku, volba kolony a detekční techniky. Dalším krokem je vývoj procesu separace, kdy nejčastěji používanou separační technikou ve farmaceutickém průmyslu

je LC s reverzní fází. Nejběžnějším typem detekce u SIM je UV detekce, ale stále častěji se používá hmotnostní spektrometrie, která je výhodnější pro určení identity neznámých látek. Použití detektoru diodového pole je výhodné k získání spektrálních informací (vlnové délky absorpčního maxima a čistoty píku) o mateřské sloučenině a každé oddělené nečistotě.<sup>5</sup>

Detektory diodového pole (PDA, DAD) snímají celé spektrum v reálném čase během chromatografické separace, uspořádání takového detektoru můžeme vidět na Obr. 1. Záření ze zdroje (1) po průchodu štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4) a měrnou celou detektoru (5) se spektrálně rozkládá na holografické mřížkou (6), takže na každou fotodiodu (7) dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Fotoelektrický proud každé fotodiody vybijí kondenzátor a je úměrný intenzitě dopadajícího záření. Takto se zaznamenávají údaje o absorbanci při každé vlnové délce v každém okamžiku. Tyto detektory umožňují ve spolupráci s řídicí jednotkou (počítačem) detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, umožňují porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter a vypočítat čistotu píku (identifikace látky).<sup>13</sup> Spektrální rozdíly však lze pozorovat pouze u sloučenin, které poskytují rozdílná UV spektra ve vybrané oblasti.<sup>5</sup>



*Obr. 1: Schéma PDA detektoru<sup>13</sup>*

Provádění degradace za stresových podmínek je primárním způsobem, jak získat odpovídající vzorek obsahující potencionální produkty rozkladu. LC-MS je velmi silným nástrojem v procesu identifikace neznámých degradačních produktů ve farmacii, je výhodné svou citlivostí, selektivitou, rychlostí a schopností identifikovat stopová množství analytu v komplexních vzorcích. LC-MS je ideální pro stabilitu indikující metody. Ionizační techniky je vhodné vybírat na základě polaritativy analyzovaných látek. Pro nepolární látky se používá fotochemická ionizace za atmosférického tlaku (APPI), pro molekuly s nízkou polaritou až po iontové se používá ionizace elektrosprejem (ESI). Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) se používá na málo až středně polární látky. Pro objasnění struktury degradačních produktů se používají spektrometry měřící přesné hmoty např. TOF a iontová past při vícestupňové fragmentaci.<sup>5</sup>

Vyvinutou metodu je nutné validovat, při validaci je užitečný předpis ICH Q2. Validace zpravidla zahrnuje specifitu, linearitu, správnost, přesnost, intermediární přesnost, limit kvantifikace a robustnost. Pokud chceme vyvinout specifickou SIM, je důležité prokázat oddělení všech procesních nečistot a degradačních produktů. Zatímco čistota píku je užitečným nástrojem pro hodnocení velkých píků, totéž neplatí pro píky blízko limitu kvantifikace. Při takto nízkých koncentračních úrovních může šum základní linie rušit výpočet čistoty píku.<sup>5</sup>

### 2.3.1 Nejnovější stabilitu indikující metody

V současné době vychází ve vědeckých časopisech každý měsíc několik prací o vývoji a validaci stabilitu indikujících metod. Výrazně převažují HPLC metody na reverzní fázi s UV detekcí, občas se vyskytují HPLC-MS, vysokoúčinná tenkovrstevná chromatografie (HP-TLC) nebo plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Výběr nejnovějších chromatografických stabilitu indikujících metod je uveden v Tab. 3. Existují práce, kde byly jako stabilitu indikující metody použity spektrofotometrie<sup>14</sup> nebo micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)<sup>15</sup>.

**Tab. 3: Přehled vybraných stabilitu indikujících chromatografických metod**

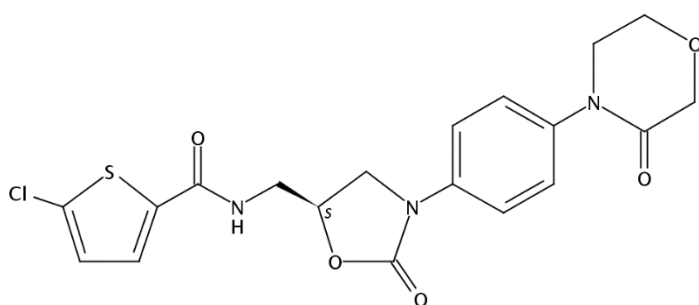
Stresové podmínky	Analyzované léčivo	Typ SIM	citace
Kyselá a bazická hydrolýza, oxidace, fotolýza	Ribavirin	HPLC	16
Hydrolýza, oxidace, fotolýza, teplo	Maprotilin	HPLC	17
Kyselá a bazická hydrolýza, oxidace, fotolýza	Gemcitabin	HPLC	18
Hydrolýza, oxidace, fotolýza, teplo	Halobetasol propionát	HPLC	19
Kyselá a bazická hydrolýza, fotolýza, teplo	Celecoxib	HPLC	20
Hydrolýza, oxidace, fotolýza, teplo	Hydrokortizon acetát	HPLC	21
Kyselá a bazická hydrolýza UV, oxidace	Trandolapril	HPLC	22
*	Aminexil, Minoxidil	HPLC	23
*	Perindopril terc-butylamin	HPLC	24
*	Prednisolon	HPLC	25
Bazická hydrolýza, oxidace, fotolýza, teplo	Pitavastin calcium	HP-TLC	26
Kyselá a bazická hydrolýza Oxidace, teplo, fotolýza	Saxagliptin	HPLC-MS	27
Kyselá a bazická hydrolýza, oxidace, teplo	Irbesartan, Amlidipin Besylát	HPLC-MS	28
*	Trimetazidin dihydrochlorid	GC-MS	29

\* stresové testy nebyly prováděny, vzorky byly pouze spikovány nečistotami

## 2.4 Rivaroxaban

### 2.4.1 Vlastnosti

Chemický název rivaroxabanu je 5-chlor-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinyl)fenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)-2-thiofen-karboxamid (Obr. 2) a molekulová hmotnost 435,89 g/mol. 1,3-oxazolidinový kruh má v poloze 5 chirální uhlíkový atom s (S) konfigurací. Konfigurace molekuly se potvrzuje rentgenovou strukturní analýzou monokrystalu.<sup>30</sup>



**Obr. 2: Molekula rivaroxabanu<sup>31</sup>**

Rivaroxaban je bílý až nažloutlý prášek pouze mírně rozpustný v organických rozpouštědlech (aceton, polyethylenglykol 400) a prakticky nerozpustný ve vodě a vodných roztocích s pH 1-9 (rozpustnost v závislosti na pH je pouze 5-7 mg/l při teplotě 25 °C). Rivaroxaban krystaluje ve třech formách, z nichž pouze forma označená jako polymorf I je termodynamicky stabilní a je tedy používána k výrobě tablet. Identita polymorfu I se ověřuje Ramanovou spektroskopií.<sup>30</sup>

Jako léčivá látka se rivaroxaban řadí mezi antitrombotika a působí jako vysoce selektivní přímý inhibitor faktoru Xa biologicky dostupný při perorálním podání. Aktivovaný serin-proteázový faktor Xa hraje významnou roli při srážení krve tím, že katalyzuje přeměnu protrombinu na trombin. Inhibicí faktoru Xa dosáhneme snížení koagulace aktivované trombinem, proto je tato cesta považována za účinnou strategii pro prevenci jak arteriální tak venózní trombózy.<sup>30</sup>

Rivaroxaban byl vyvinut kolem roku 2005 německou společností Bayer HealthCare AG<sup>32</sup>, kterou byl registrován jako první ze skupiny přímých perorálních inhibitorů faktoru Xa jako léčivý přípravek ve formě tablet s názvem (Obr. 3).<sup>33</sup>



**Obr. 3: Balení tablet Xarelto obsahujících rivaroxaban jako účinnou látku<sup>35</sup>**

Používá se k prevenci žilní tromboembolie (VTE, tvorbu sraženiny v žilách) u dospělých, kteří podstupují operaci náhrady kyčelního nebo kolenního kloubu.<sup>30,33</sup>

Lidé trpící fibrilací síní musí také užívat antikoagulanty, protože fibrilace zvyšuje riziko vzniku krevních sraženin v srdci, které mohou cestovat do mozku a způsobit mrtvici. Antikoagulanty jsou známy již mnoho let, ale jejich nevýhodou je, že obvykle zabraňují srážení krve i v případech, kdy je srážení žádoucí a dochází tak k nežádoucímu krvácení.<sup>34</sup>

Do nedávné doby byl jediným lékem pro prevenci cévní mozkové příhody u pacientů s fibrilací síní warfarin. Ten má ale velkou nevýhodu v nutnosti pečlivého sledování dávkování periodickými krevními testy. V posledních letech FDA schválila tři nové antikoagulační léky – Pradaxa (dabigatran), Xarelto (rivaroxaban) a Eliquis (apixaban). Na základě klinických studií, které zahrnovaly více než 50 000 pacientů z celého světa došla FDA k závěru, že všechny tři léky byly buď ekvivalentní nebo účinnější než warfarin s přijatelným rizikem krvácení. Tyto tři léky mají některé výhody včetně menší interakce s jídlem a dalšími léky a rychlý nástup účinku zcela bez nutnosti monitorování krve. Navíc účinky po vysazení těchto léků rychle odeznívají, účinky warfarinu přetrvávají mnoho dní po ukončení užívání.<sup>34</sup>

## **Farmakodynamika**

U člověka byla zjištěna inhibice faktoru Xa přímo úměrná dávce.<sup>30</sup>

## **Farmakokinetika**

Perorální absorpce rivaroxabanu je rychlá, téměř kompletní, biologická dostupnost dosahuje 80 – 100 % a maximální koncentrace je dosaženo po 2 – 4 hodinách od užití tablety. Rivaroxaban se váže z 92-95 % na plazmatické proteiny, hlavně na sérový albumin.<sup>30</sup> Metabolismus je blíže popsán v kapitole 2.4.4. Úprava dávky podle pohlaví, věku (vyjma dětí do 18 let, kde nebyla stanovena bezpečnost), tělesné hmotnosti ani etnika pacientů není nutná.<sup>30</sup>

### **2.4.2 Stabilita rivaroxabanu**

Tři šarže rivaroxabanu v pevné formě byly podrobeny stabilitní studii, kdy byly vystaveny teplotě 25 °C a 60% relativní vzdušné vlhkosti po dobu 18 měsíců a také 40 °C a vlhkosti 75 % (zrychlené podmínky skladování) po dobu 6 měsíců. Léčivá látka byla určena jako velmi stabilní, neboť nebyly zjištěny žádné významné změny ani při zrychlených podmínkách skladování. Studovanými parametry byly vzhled (materiál, barva), barva roztoku, polymorfie, velikost částic, enantiomerní čistota, organické nečistoty, obsah hlavní látky a obsah vody. Tyto parametry byly sledovány pomocí analytických zkušebních metod, které prokázaly stabilitu indikující vlastnosti. Ve všech případech výsledky splňovaly definované podmínky kvality nastavené v době testování. Nedošlo k degradaci nebo zvýšení obsahu vody a nebyly zjištěny žádné trendy. Doplnkové stabilitní studie byly prováděny za stresových podmínek. Výsledky ukázaly, že rivaroxaban je stabilní za zvýšené teploty i při působení světla a dostatečně odolný vůči hydrolyze, proto nejsou nutné žádné speciální obaly.<sup>30</sup>

V květnu 2014 autoři Ramissetti a Kuntamukkala nejspíš zatím jako jediní publikovali práci zaměřenou na vývoj a validaci stabilitu indikující LC-PDA-MS/MS metody pro separaci, identifikaci a charakterizaci procesních nečistot a degradačních produktů rivaroxabanu. Degradační produkty oddělili pomocí semipreparativní HPLC a podrobili měření na nukleární magnetické rezonanci (NMR). LC-PDA metodu validovali klasickým způsobem. Zásobní roztok Rivaroxabanu o koncentraci 2 mg/ml připravovali rozpuštěním prášku v minimu dimethylsulfoxidu a doplněním na objem diluentem (60% acetonitril). Stresován byl roztok o koncentraci 1 mg/ml RVB, který byl před analýzou ještě 5× zředěn. Jako mobilní fázi používali

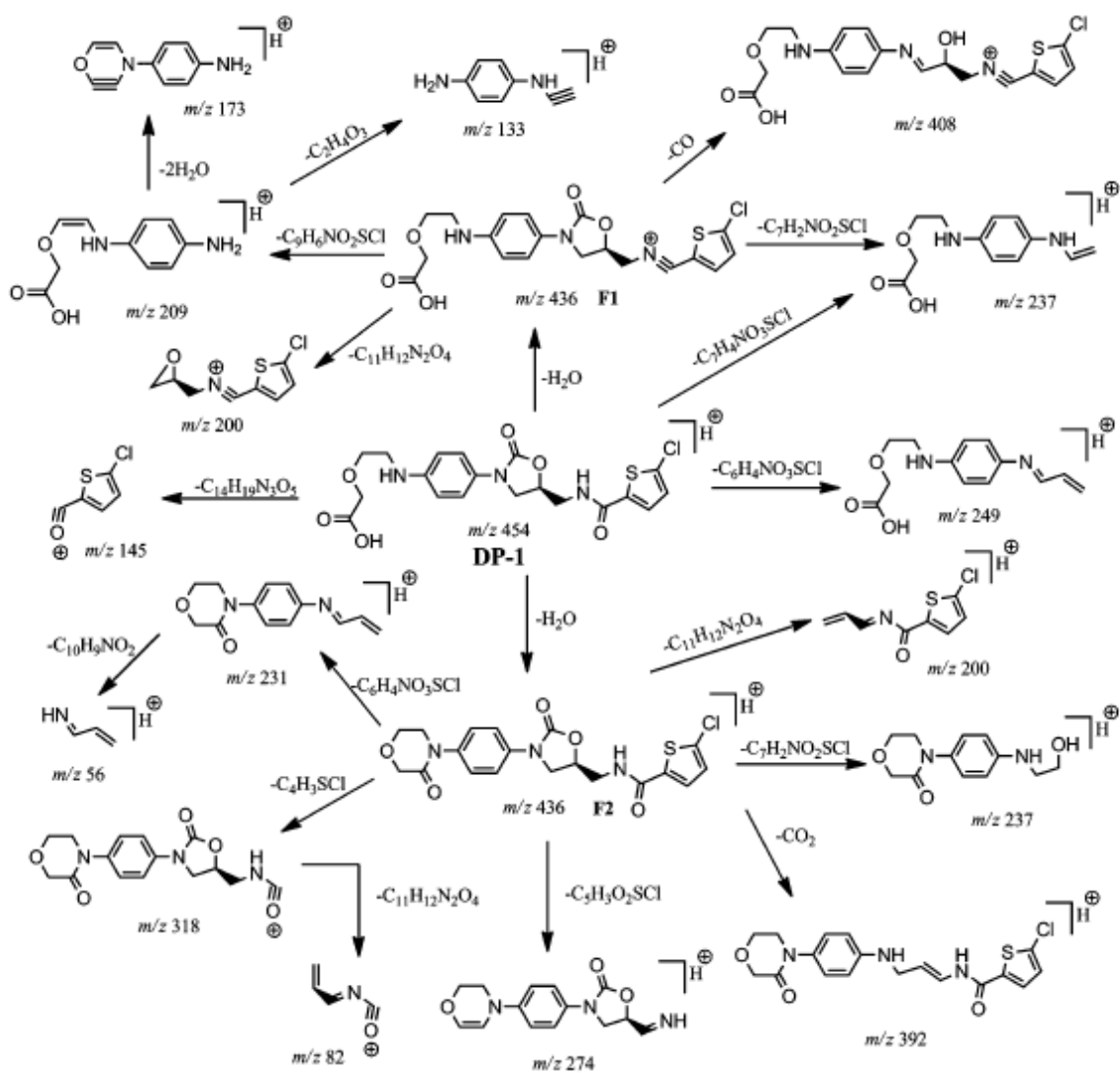
20 mM octan amonný a acetonitril (65 : 35), separace probíhala na koloně Kinetex C<sub>18</sub> o rozměrech 150×4,6mm s velikostí částic 5µm a při teplotě 30 °C. Průtok byl 1ml/min a detekce při 254 nm. Výsledky a podmínky stresových testů jsou uvedeny v Tab. 4.(cit.<sup>35</sup>)

**Tab. 4: Stresové podmínky a výsledky stresování rivaroxabanu<sup>35</sup>**

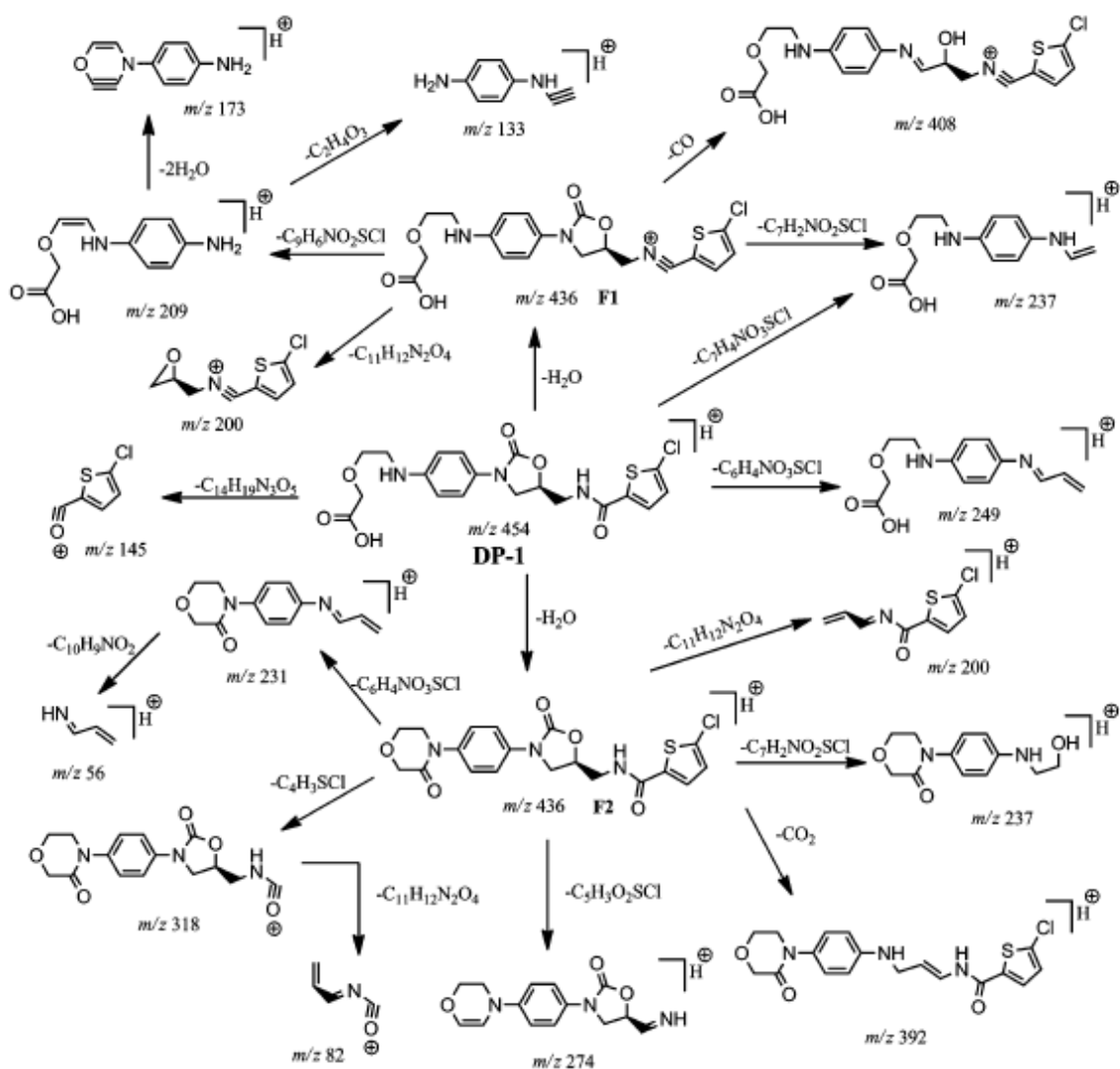
Degradace	Podmínky	Obsah RVB (% w/w)	Celkové nečistoty (% w/w)	Počet DP
HCl	1M, 1h	93,5	6,1	1
NaOH	1M, 1h	80,8	18,4	3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 24h	99,7	-	0
Hydrolyza teplem	8h, 60°C	99,9	-	0
Teplo v pevném stavu	7 dní, 60 °C	99,5	-	0
UV v pevném stavu	7 dní, 254 nm	99,7	-	0

Autoři také navrhli na základě hmotnostních spekter fragmentační cesty rivaroxabanu (Obr. 4) a jeho degradačního produktu hydrolyzy (Obr. 5). V nestresovaném vzorku RVB našli procesní nečistotu v mých výsledcích označenou jako RVBM04. Při stresu v kyselém prostředí pozorovali produkt hydrolyzy, který byl pozorován také při stresu v bazickém prostředí. Při tomto stresu poté pozorovali další dva degradační produkty, z nichž jeden zůstal neionizován ve zdroji ESI a nebyl tudíž objasněn. Struktura druhého degradačního produktu byla objasněna. Ve své experimentální práci jsem dospěla k podobným výsledkům při stresu v kyselém prostředí.





Obr. 4: Navrhované fragmentační cesty molekulárního iontu RVB.<sup>35</sup>



Obr. 5: Navrhované fragmentační cesty molekulárního iontu produktu hydrolyzy ozn. DP-1. (cit. <sup>35</sup>)

### 2.4.3 Výroba a typické zkoušky

Rivaroxaban se vyrábí pětikrokovou syntézou s použitím 4-(4-nitrofenyl)-3-morfolinonu jako výchozího materiálu. Dále musí být syntetizovány tři klíčové meziproducty, které jsou pak použity v reakci za vzniku účinné látky. Po rekrystalizaci surového rivaroxabanu je materiál mikronizován.<sup>30</sup>

*Specifikace účinné látky (API) zahrnuje zkoušky na:*

- barvu roztoku
- identifikaci (IR, HPLC)
- obsah (HPLC)
- enantiomerní čistotu
- polymorf I (Ramanova spektroskopie)
- velikost částic (laserová difrakce)
- příbuzné (related) nečistoty (HPLC)
- zbytková rozpouštědla (GC)
- obsah vody (metoda podle Karl-Fischer)
- Síranový popel (Ph. Eur)
- těžké kovy (Ph. Eur)
- mikrobiální čistota (Ph. Eur)<sup>35</sup>

*Specifikace finálního produktu zahrnuje zkoušky na:*

- Vzhled
- identifikace (TLC, NIR a HPLC)
- obsah (HPLC)
- disoluce (Ph. Eur. lopatkový přístroj)
- stejnoměrnost dávky (Ph. Eur)
- nečistoty a mikrobiální čistota (Ph. Eur)<sup>35</sup>

#### **2.4.4 Metabolismus**

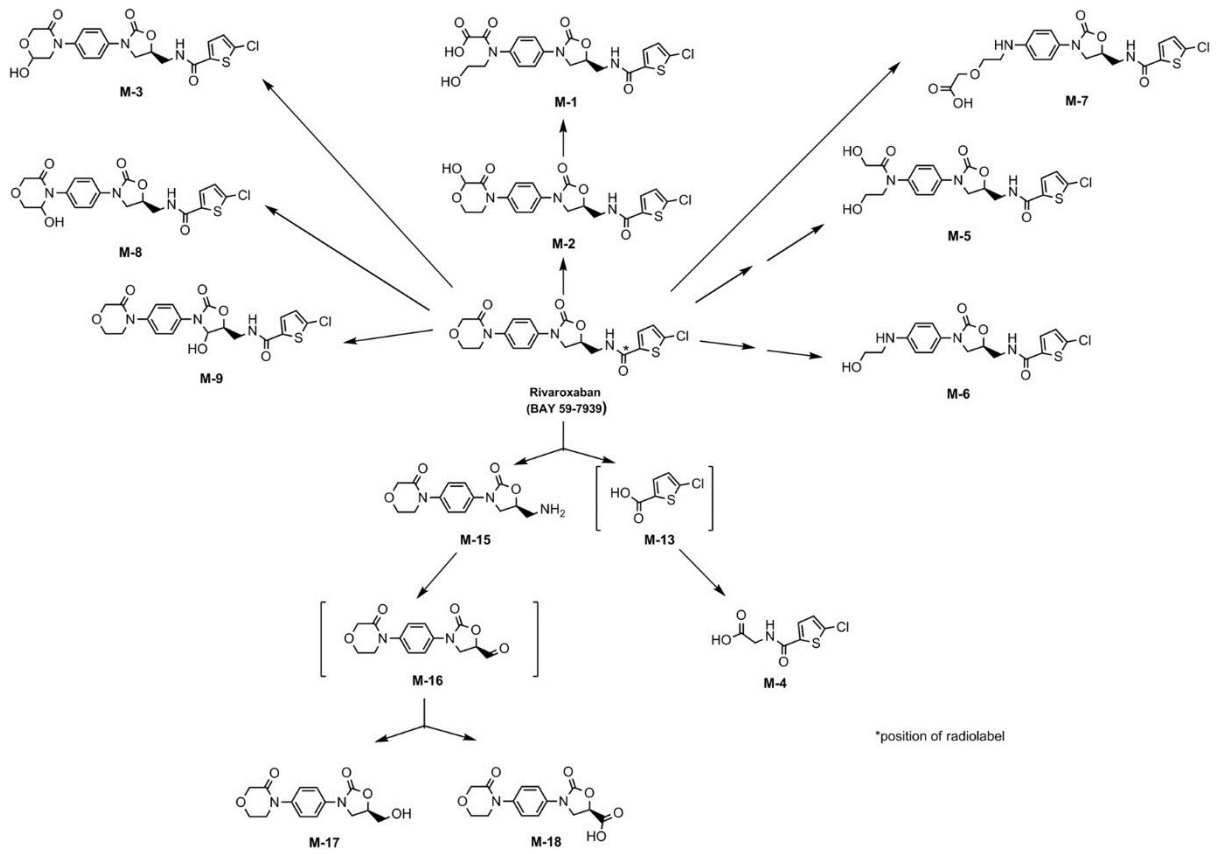
Rivaroxaban je předmětem oxidativního metabolismu v játrech. Metabolické dráhy rivaroxabanu u člověka jsou podobné drahám u zvířat (potkanů a psů), které byly zaznamenány ve studii in vitro pomocí jaterních mikrosomů a hepatocytů.<sup>37</sup>

Vylučování dochází především prostřednictvím ledvin (66%) a v menší míře výkaly a žlučí (28%), přičemž 36% rivaroxabanu je vylučováno v nezměněné formě močí a 7% se vylučuje v nezměněné formě exkrementy. Eliminační poločas perorálně podaného

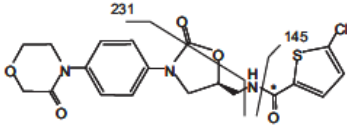
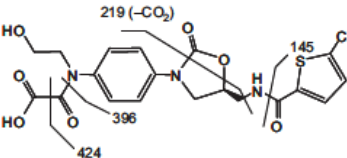
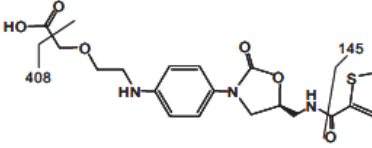
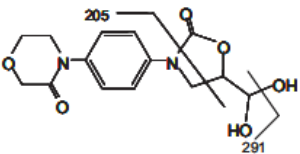
rivaroxabanu je 5-9 hodin u zdravých jedinců ve věku 20 - 45 let. U lidí neexistuje žádný náznak možné metabolické konverze S-rivaroxabanu na R-enantiomer.<sup>30</sup>

Navrhovaný systém pro metabolismus rivaroxabanu, založený na strukturách všech známých metabolitů je na Obr.6. Celkem bylo identifikováno 18 metabolitů. M-1 byl identifikován jako hlavní metabolit v lidských exkrementech a byl vylučován ledvinami a žlučí. Metabolity M-2, M-4 a M-7 byly identifikovány jako méně se vyskytující metabolity. M-4 byl vylučován výhradně ledvinami, zatímco M-2 a M-7 byly vylučovány ledvinami i exkrementy. Metabolitní profily v moči a exkrementech u potkanů a psů byly kvalitativně podobné jako u lidí, i když M-4 byl hlavním metabolitem v moči psů (spíše než M-1) a M-7 nebyl nalezen u potkanů. M-1 byl formován oxidační degradací morfolinonové části molekuly rivaroxabanu. Kromě toho méně významné metabolity M-5 a M-6 jsou také produkty oxidační degradace morfolinonového kruhu. Metabolit M-4 vznikl hydrolýzou amidové vazby rivaroxabanu, s následnou konjugací 5-chlor-2-thiofen-karboxylové kyseliny s glycinem. Metabolit M-7 byl výsledkem hydrolytického štěpení laktamu amidové vazby v morfolinonové části. Je možno učinit závěr, že metabolismus rivaroxabanu se probíhá dvěma hlavními cestami: oxidační degradací morfolinonové části a hydrolýza různých amidových vazeb.<sup>36</sup>

Struktury metabolitů byly identifikovány metodou HPLC-MS a potvrzeny měřením na nukleární magnetické rezonanci ve studii pana Langa.<sup>37</sup> Na Obr. 7 jsou uvedené struktury několika metabolitů, které souvisí s mými výsledky.



**Obr. 6: Metabolismus RVB in vitro<sup>37</sup>**

Assignment	$^{12}\text{C}$ -Mass [M + H] <sup>+</sup> (m/z)	Proposed Structure	Important MS Fragments (m/z)	$^1\text{H}$ -NMR ( $\delta$ )
Rivaroxaban	436		231, 145	7.59 (ps-d, 2H), 7.51 (d, 1H), 7.37 (ps-d, 2H), 7.05 (d, 1H), 7.18 (d, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.27 (s, 2H), 4.20 (t, 1H), 4.03 (ps-t, 2H), 3.90 (dd, 1H), 3.73 (ps-t, 2H), 3.72 (d, 2H)
M-1	468		424, 406, 396, 362, 262, 219, 145	7.53 (ps-d, 2H), 7.52 (d, 1H), 7.40 (ps-d, 2H), 7.06 (d, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.22 (t, 1H), 3.9 (overlapping with residual solvent signal, 1H), 3.78 (t, 2H), 3.64 (t, 2H), 3.74 (dd, 1H), 3.68 (dd, 1H)
M-7	454		408, 378, 145	7.53 (d, 1H), 7.23 (ps-d, 2H), 7.06 (d, 1H), 6.74 (ps-d, 2H), 4.85 (m, 1H), 4.22 (t, 1H), 3.9 (axial) (t and dd, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.69 (d, 2H), 3.65 (t, 2H), 3.23 (t, 2H)
M-16 (hydrate)	309		291, 205	(hydrate in DMSO-d <sub>6</sub> ): 7.58 (d, 2H); 7.38 (d, 2H); 5.4 (bs, ca, 2H); 4.95 (s, 1H); 4.45 (m, 1H); 4.19 (s, 2H); 3.78-4.08 (m, 4H); 3.70 (m, 2H)

**Obr. 7: Struktury vybraných metabolitů navrhnuté na základě MS a NMR**

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Stabilitu indikující vlastnosti HPLC metody označené AM-AQC-LC1182 (dále jen **LC1182**) pro rivaroxaban byly ověřovány na základě sledování nečistotních profilů stresovaných vzorků. Zároveň byl sledován obsah hlavní látky metodou označenou AM-AQC-LC1183 (dále jen **LC1183**) a možná racemizace byla sledována metodou označenou AM-AQC-LC1184 (dále jen **LC1184**). Při analýzách těmito metodami se sledovalo, zda hodnoty naměřených parametrů vyhovují kritériím stanoveným ve validačním protokolu. Degradční produkty vznikající vlivem stresových podmínek byly na závěr podrobeny analýze LC-MS za účelem pokusu o objasnění jejich struktury.

#### 3.1 Vzorky a standardy

- Rivaroxaban (RVB), vzorek šarže MV110502/02/01 a šarže 76191000317
  - Rivaroxaban, S-enantiomer (S-RVB) standard, kontrolní č. RD060A, 99,7%
  - Rivaroxaban, R-enantiomer (R-RVB) standard, kontrolní č. RD499I, 98,8%
  - RVB test mixture (testovací směs nečistot RVBM06, RVBM04, RVBN11 a rivaroxabanu), kontrolní č. RD501I-3
  - RVBM04 standard, kontrolní č. RD476I, 100%
- (všechny standardy a vzorky byly vyrobeny ve společnosti Teva)

#### 3.2 Chemikálie

- Acetonitril (MeCN) Chromasolv Plus for HPLC  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda připravená pomocí systému Milli-Q Gradient A10 (Millipore, USA)
- Methanol (MeOH) supragradient HPLC grade (Scharlab, Španělsko)
- Dichlormethan (DCM) Chromasolv for HPLC  $\geq 99,8\%$  (Sigma-Aldrich, Německo)
- *Terc*-butyl(methyl)ether (TBME) Chromasolv HPLC  $\geq 99,8\%$  (Sigma-Aldrich, Německo)
- Triethylamin (TEA) p.a.,  $\geq 99,5\%$  (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina trifluoroctová (TFA) Reagent Plus, 99% (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) 35-38% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný (NaOH) Standard solution 1M (Fluka, Švýcarsko)
- Peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nestabilizovaný 30% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

- Kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH) 100% (Riedel-de Haen, Německo)
- Oxid mangančitý (MnO<sub>2</sub>) ReagentPlus ≥ 99% (Sigma-Aldrich, Německo)
- Acetonitril (MeCN) Chromasolv LC-MS grade (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina mravenčí (HCOOH) reagent grade ≥ 95 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Water HPLC/voda HPLC (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

### 3.3 Instrumentální vybavení

- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf **Infinity 1290** s PDA detektorem (Agilent, USA), chromatografická kolona Kinetex C18 (rozměr 150×3 mm, velikost částic 2,6 μm), Part No. 00F-4462-Y0 (Phenomenex, Německo)
- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf **Alliance 2695** s PDA a UV detektorem (Waters, USA), kolona ChiralPak IB-3 (250×4,6 mm, velikost částic 3 μm), výrobce: Chiral Technologies Europe, Francie
- Hmotnostní spektrometr **Thermo LTQ XL** s chemickou ionizací za atmosférického tlaku a lineární iontovou pastí, LC pumpou Accela a PDA detektorem (Thermo Scientific, USA)
- Ultra-účinný kapalinový chromatograf **Acquity** (Waters, USA), chromatografická kolona Kinetex XB-C18 (rozměr 50×2,1 mm, velikost částic 2,6 μm), Part No. 00B-4496-AN (Phenomenex, Německo)
- Hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením **Synapt G2-S** s ionizací elektrosprejem a hybridním QqTOF analyzátozem (Waters)
- Zařízení pro degradaci UV zářením **SunTest CPS/CPS+** (Atlas, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic S30 (Elma Ultrasonic, Německo)
- Analytické váhy XP26 (Mettler Toledo, USA)
- Vodní lázeň HAAKE DC10 (Thermo Scientific, USA)
- Vakuová sušárna



### 3.4 Experimentální podmínky použitých instrumentálních metod

#### 3.4.1 Metody pro nečistotní profil (LC1182) a obsah hlavní látky (LC1183)

HPLC systém Agilent Infinity 1290; kolona: 150 x 3 mm Kinetex C18; 2,6 µm

Mobilní fáze A: 1 ml/l TFA ve vodě; B: MeCN

Průtok 0,8 ml/min, teplota kolony 45 °C, teplota vzorku 25 °C, detekce UV 244 nm, nástřik 0,4 µl pro LC1182 a 5 µl pro LC1183.

*Tab. 5: Průběh gradientu mobilní fáze*

Čas (min)	0	1,2	3,5	9,0	11,0	13,0	13,1	16,0
A (%)	95	95	77	68	50	20	95	95
B (%)	5	5	23	32	50	80	5	5

#### 3.4.2 Metoda pro stanovení enantiomerní čistoty (LC1184)

HPLC systém Waters Alliance 2695, kolona Chiralpak IB-3, 250 × 4,6 mm, 3 µm

Mobilní fáze: DCM + TBME + MeCN + TEA (40:40:20:0,1; v/v/v/v)

Průtok 1 ml/min, teplota kolony 30 °C, detekce UV 260 nm, dávkovaný objem 5 µl, teplota autosampleru 20°C.

#### 3.4.3 Metoda LC-MS (Thermo LTQ XL)

**LC:** Pro separaci byly použity chromatografické podmínky z metody LC1182 viz 3.4.1.

**MS:** Hmotnostní spektrometr Thermo LTQ XL, APCI<sup>+</sup> mód, full-scan MS 50-1000, data dependent scan MS<sup>2-3</sup>.

*Tab. 6: Parametry nastavené pro hmotnostní spektrometrii*

Parametr	Hodnota
Napětí na kapiláře	40 V
Teplota kapiláry	220 °C
Vaporizer Temp	350 °C
Spray Current	2,5 µA
Sheath Gas Flow Rate	50 l/h
Aux Gas Flow Rate	20 l/h
Tube Lens	90 V

Hmotnostní spektra jsou uvedena v Příloze 9 – 15.

### 3.4.4 Metoda LC-HRMS (Synapt G2-S)

**LC:** UPLC systém Waters Acquity

Kolona: Kinetex XB-C18 (rozměr 50 × 2,1 mm, velikost částic 2,6 μm)

Mobilní fáze A: 1 ml/l HCOOH ve vodě; B: MeCN

Průtok 0,6 ml/min, teplota kolony 45 °C, detekce 244 nm, nástřik 10 μl

*Tab. 7: Průběh gradientu mobilní fáze*

Čas (min)	0	1,0	4,5	6,0	7,0
A (%)	95	95	70	20	95
B (%)	5	5	30	80	5

**MS:** Hmotnostní spektrometr Synapt G2-S, ESI<sup>+</sup> mód, hmotnostní škála byla nakalibrována na klastry mravenčanu, k průběžné korekci naměřených hodnot m/z byl používán „Lockspray“ s referenční látkou leucin-enkefalin.

*Tab. 8: Parametry nastavené pro hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením*

Parametr	Hodnota
Napětí na sprejovací kapiláře	3 kV
Teplota desolvatace	500 °C
Průtok desolvatačního plynu	800 l/h
Kolizní energie	20 V
Cone gas	0 l/h
Sampling one	40
Source offset	80
Teplota zdroje	100 °C
Nebuliser	6 bar
LM Resolution	4 nebo 15

## 3.5 Příprava roztoků a postup měření pro ověření parametrů SIM HPLC

### 3.5.1 Stresové testování

Vzorek Rivaroxabanu byl stresován v roztoku, za kyselých, bazických a neutrálních podmínek. Byl také vystaven oxidaci, světlu a zahřívání, přičemž poslední dva zmiňované byly provedeny také se vzorkem v pevném stavu podle standardního operačního postupu.

Podmínky stresování byly voleny (optimalizací doby expozice stresovým podmínkám nebo koncentrace stresového činidla) tak, aby míra degradace nepřesahovala 20 %, to znamená,

že obsah stresované látky (RVB) nesmí klesnout pod 80 %. Toto bylo hodnoceno metodou LC1183 pro obsah hlavní látky v hmotnostních procentech, kdy obsah RVB byl vyhodnocen metodou externího standardu.

Jako diluent byl používán 80% roztok acetonitrilu ve vodě. Roztok pro **test způsobilosti** o koncentraci 2 mg/ml byl připraven navážením asi 2 mg standardu směsi nečistot (RVB test mixture) přímo do vialky a přidáním 1 ml diluentu (rozpuštění 3 min v ultrazvuku). Směs nečistot obsahovala tři procesní nečistoty označené RVBM06 (struktura viz příloha 4), RVBM04 (struktura viz příloha 5) a také samotný S-RVB. Dále byl do sekvence zařazen **test citlivosti**, který byl připraven ředěním zásobního roztoku procesní nečistoty RVBM04 diluentem. Zásobní roztok RVBM04 byl připraven navážením 10,0 mg standardu RVBM04 do 10ml odměrné baňky, rozpuštěním tohoto množství v čistém acetonitrilu a doplněním po rysku acetonitrilem. 40  $\mu$ l takto připraveného roztoku bylo přeneseno do 50ml odměrné baňky a doplněno diluentem po rysku.

Vzorky pro stresování v roztoku byly připravovány ředěním zásobního roztoku vzorku RVB (šarže MV110502/02/01) o koncentraci 4 mg/ml. Ten byl připraven navážením 400,00 mg vzorku s přesností na dvě desetinná místa do 100ml odměrné baňky, navážka byla rozpuštěna v diluentu (3 min v ultrazvuku) a po vytemperování na 20 °C byla odměrná baňka doplněna diluentem po rysku. Pro stresování bylo odebráno vždy 10 ml zásobního roztoku a odpipetováno do 20 ml odměrné baňky. Jedna odměrná baňka byla doplněna po rysku diluentem, tento nestresovaný roztok byl analyzován. 8 ml tohoto roztoku bylo odpipetováno do křemenné kyvety pro stres UV zářením, kdy působící záření bylo v rozmezí vlnových délek 300 – 800 nm. V ostatních případech bylo k 10 ml zásobního roztoku v 20ml odměrných baňkách přidáno stresové činidlo nebo se na něj působilo teplem (podmínky uvedeny v tab. 9).

**Tab. 9: Konečné stresové podmínky**

Prostředí	Stresový činitel	Přidané množství	Doba expozice	Teplota
Kyselé (0,9M HCl)	10M HCl	1 ml	20 min	70 °C
Bazické (0,06M NaOH)	0,3M NaOH	2,5 ml	1 hod	laboratorní
Oxidační (5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (10 mg)	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 ml	4 hod	70 °C
	pevný MnO <sub>2</sub>	10 mg	16 hod	laboratorní
RVB v roztoku	UV záření	750 W/m <sup>2</sup>	30 min	35 °C
	Teplo	-	16 hod	70 °C
RVB v pevném stavu	UV záření	750 W/m <sup>2</sup>	7 hod	35 °C
	Teplo	-	16 hod	130 °C

Po době působení byl stres ukončen v případě HCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a stresů teplem pouhým ochlazením roztoku ve vodní lázni na 20 °C (bylo prokázáno, že při dané koncentraci HCl a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> působící na RVB, degradace za laboratorní teploty neprobíhá), v případě UV záření byl stres ukončen vypnutím přístroje SunTest. V případě NaOH bylo nutné zneutralizovat roztok přikapáváním 10% CH<sub>3</sub>COOH na pH ~ 7. Po ukončení stresu byly baňky temperovány na 20°C a doplněny po rysku diluentem. Takto byly připraveny tyto roztoky RVB k analýze nečistot metodou LC1182: nestresovaný roztok RVB, roztok RVB stresovaný s HCl, roztok s NaOH, roztok s MnO<sub>2</sub>, stres teplem v roztoku a roztok s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Pro stresy v pevném stavu bylo naváženo zhruba 220 mg vzorku RVB šarže 76191000312 do kyvety z křemenného skla pro stres UV zářením a do nádoby z obyčejného skla bylo naváženo stejné množství pro stres zahříváním. Navážka se v obou případech rozptýlila do zhruba 3 mm rovnoměrné vrstvy. Po ukončení stresů bylo naváženo přesně 50 mg stresované látky do 25ml odměrné baňky a toto množství bylo rozpuštěno a doplněno opět při 20 °C diluentem. Výsledná koncentrace všech roztoků RVB připravených k analýze nečistot (LC 1182) byla tedy 2 mg/ml.

Blanky pro stresované roztoky byly připraveny stejným postupem, pouze místo zásobního roztoku RVB byl vždy použit diluent, byla přidána stresová činidla (MnO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCl, NaOH), ale bez působení UV a tepla.

### **3.5.2 Metoda LC1182**

Tato metoda sloužila pro stanovení obsahů nečistot a degradačních produktů ve stresovaných vzorcích Rivaroxabanu. Hlavní degradační produkty byly popsány na základě jejich retenčních časů a zaznamenaných UV spekter. K potvrzení, že nedochází ke koeluci žádného píku degradačního produktu s hlavním píkem RVB, byla hodnocena čistota hlavního píku (Peak Purity) viz kapitoly 3.5.5 a 4.1.

Stresované vzorky rivaroxabanu připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.5.1 byly analyzovány metodou na nečistotní profil. Postup analýz byl následující:

- nástřik diluentu – ekvilibrace
- nástřik diluentu - blank
- nástřik roztoku testu citlivosti
- nástřik roztoku testu způsobilosti
- 6× nástřik roztoku standardu 1 \*
- nástřik roztoku standardu 2 \*
- nástřik roztoku standardu 1 na 80% koncentrační úrovni
- nástřik roztoku standardu 1 na 50% koncentrační úrovni
- nástřik roztoku standardu 1 na 25% koncentrační úrovni
- jednotlivé nástřiky testovaných vzorků

\* postup přípravy těchto roztoků standardů je uveden v následující kapitole.

### Hodnocení testu způsobilosti

Chromatogramy testu citlivosti a testu způsobilosti jsou uvedeny v příloze 1 a příloze 2.

**Blank:** Na chromatogramu blanku na pozici specifikovaných nečistot nesmí být žádný pík, jehož odezva by byla větší než trojnásobek šumu ( $s/n > 3$ ).

→ žádný takový pík nebyl nalezen.

**Tab. 10: Hodnocení kritérií testu způsobilosti**

Parametr	Kritérium	Nalezeno	Zhodnocení
s/n (RVBM04) v testu citlivosti	$\geq 10$	17,2	Vyhovuje
Retenční čas (RVB)	7-10 min	9	Vyhovuje
Tailing (RVB)	$\leq 1,3$	0,8	Vyhovuje
Rozlišení (RVB/RVBN11)	$\geq 2,5$	10,8	Vyhovuje

### Testované roztoky:

- a) Pod píkem RVB nesmí být žádný skrytý pík po vystavení jakémukoliv stresu.  
→ Pík RVB byl vyhodnocen jako čistý viz kapitola 4.1, tedy nebyl nalezen důkaz pro koeluci s jiným píkem.

- b) Hlavní degradační produkty nesmí koeluovat se specifikovanými nečistotami. Toto bylo kontrolováno srovnáním UV spekter píků degradačních produktů s UV spektry standardů nečistot. → Koeluace nebyla na základě srovnání UV spekter zjištěna.

### 3.5.3 Metoda LC1183

Pro zjištění obsahu rivaroxabanu v hmotnostních procentech ve vzorcích po degradaci byla použita metoda LC1183. Výsledky hodnocení čistoty píku byly přežaty z metody LC1182 díky stejným analyzovaným vzorkům a stejným chromatografickým podmínkám.

Roztoky pro analýzu byly připraveny naředěním stresovaných roztoků připravených podle postupu uvedeného v 3.5.1. 5 ml každého roztoku bylo za teploty 20 °C odpipetováno do 200ml odměrných baněk a tyto baňky byly doplněny 40% acetonitrilem po rysku (dostaneme 40× zředěné roztoky oproti roztokům pro metodu LC1182).

Dále byl připraven roztok standardu S-RVB, který byl následně použit v hodnocení obsahu RVB jako externí standard. Asi 50,00 mg standardu RVB bylo naváženo s přesností na dvě desetinná místa do 50ml odměrné baňky a rozpuštěno v diluentu (3 min v ultrazvuku). Po vytemperování na 20 °C byla odměrná baňka doplněna diluentem po rysku. 5 ml tohoto roztoku bylo dále ředěno do 100ml odměrné baňky doplněním po rysku 40% MeCN. Tímto postupem byly ze dvou navážek připraveny roztoky označené standard 1 a standard 2. Postup analýzy:

- nástřik 40% MeCN – ekvilibrace
- nástřik 40% MeCN - blank
- nástřik roztoku testu způsobilosti (v tomto případě nástřik pouze 0,4 µl)
- 3× nástřik roztoku standardu 1
- 3× nástřik roztoku standardu 1 z jiné vialky
- 3× nástřik roztoku standardu 2
- jednotlivé nástřiky testovaných vzorků
- nástřik jednoho ze standardů nejpozději po 6 analýzách testovaných vzorků (kontrolní vzorek)

#### Hodnocení testu způsobilosti

**Blank:** Na chromatogramu blanku na pozici RVB nesmí být žádný pík, jehož odezva by byla větší než 0,2 % průměrné plochy hlavního píku při analýzách standardů. → Na pozici RVB nebyl nalezen žádný takový pík.

Tab. 11: Hodnocení kritérií testu způsobilosti

Parametr	Kritérium	Nalezeno	Zhodnocení
Tailing (RVB)	$\leq 1,3$	0,8	Vyhovuje
Rozlišení (RVB/RVBN11)	$\geq 2,5$	10,7	Vyhovuje

#### Standardy:

- RSD ploch píků 6 nástřiků standardu 1 nesmí překročit 0,85 %. → RSD = 0,15%, vyhovuje
- RSD odezvových faktorů hlavního píku při kalibrační analýze (druhá trojice nástřiků standardu 1 a trojice nástřiků standardu 2) nesmí překročit 2,0 %, → RSD = 0,13%, vyhovuje
- Při analýzách kontrolních vzorků (nástřiky standardu mezi testovanými vzorky) musí být nalezená koncentrace RVB v rozmezí 98,0 – 102,0 %. → tento požadavek byl splněn

#### 3.5.4 Metoda LC1184

Tato metoda sloužila ke kontrole obsahu R-rivaroxabanu, jenž je nežádoucím enantiomerem produktu Rivaroxabanu (S-izomer). Metoda byla provedena v nevodném prostředí za chromatografických podmínek uvedených v 3.4.2.

Jako diluent byl v této metodě používán dichlormethan. Roztoky vzorků pro analýzu touto metodou byly připraveny odebráním 250  $\mu$ l z každého vzorku připraveného podle postupu uvedeného v části 3.5.1. 250  $\mu$ l vzorku bylo převedeno do vialky a odpařeno při 40 °C proudem dusíku. Odparek byl následně znovu rozpuštěn v 1,0 ml diluentu. Dále byl připraven **roztok testu rozlišení**, který byl smíchán ze zásobních roztoků S-RVB a R-RVB o koncentracích 0,5 mg/ml. Do 20ml odměrné baňky s roztokem S-RVB doplněným po rysku bylo přidáno 30  $\mu$ l roztoku R-RVB. Výsledný obsah R-RVB byl přibližně 0,15 %. **Roztok testu citlivosti** byl připraven přidáním 30  $\mu$ l roztoku R-RVB do 20ml odměrné baňky s diluentem a doplněním po rysku. Pro hodnocení možné koeluce některého degradačního produktu s píkem R-RVB byly připraveny čtyři roztoky S-RVB s koncentracemi R-RVB 0,5; 1,0; 5,0 a 10,0% a zaznamenána jejich UV spektra.

Po ekvilibraci systému byly provedeny tyto analýzy:

- 1× nástřik DCM – blank
- 1× nástřik testu citlivosti
- 1× nástřik testu rozlišení
- 1× nástřik každého testovaného vzorku
- 1× nástřik testu rozlišení
- 1× nástřik R-RVB na 0,5% koncentrační úrovni
- 1× nástřik R-RVB na 1,0% koncentrační úrovni
- 1× nástřik R-RVB na 5,0% koncentrační úrovni
- 1× nástřik R-RVB na 10,0% koncentrační úrovni

### Hodnocení testu způsobilosti

#### Blank:

- a) na chromatogramu blanku na pozici R-RVB nesmí být žádný pík, jehož odezva by byla větší než trojnásobek šumu ( $s/n > 3$ ). → Nebyl nalezen žádný takový pík.
- b) možná koeluce píku s hlavní látkou S-RVB může mít plochu odpovídající maximu 0,2 % hlavního píku v chromatogramu roztoku testu rozlišení. → koeluce nebyla pozorována.

Tab. 12: Hodnocení kritérií testu způsobilosti

Parametr	Kritérium	Nalezeno	Zhodnocení
s/n (R-RVB) pro test citlivosti	$\geq 25$	50	Vyhovuje
Tailing (S-RVB)	$\leq 2,5$	2,0	Vyhovuje
Rozlišení (S-RVB/R-RVB)	$\geq 2,0$	2,2	Vyhovuje

#### Vzorek:

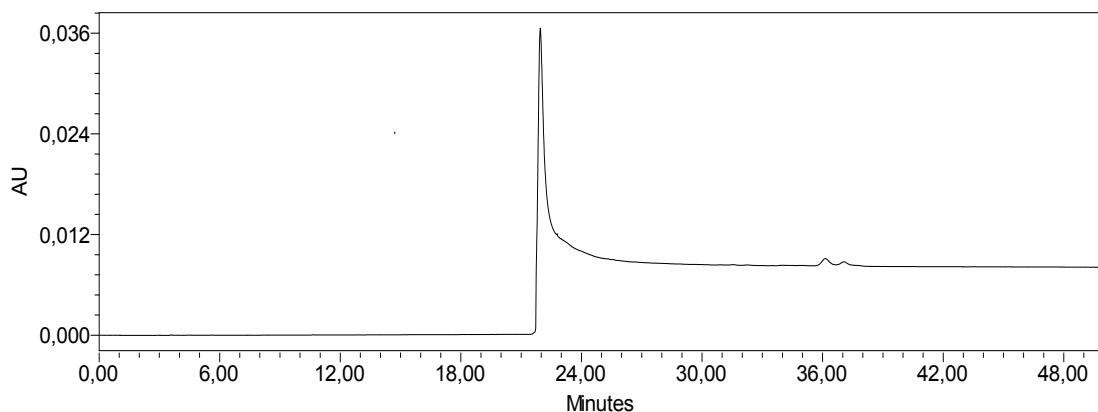
Žádný degradační produkt by neměl koelurovat s píkem R-RVB. Toto bylo hodnoceno srovnáním UV spekter píků se spektry standardů. → Srovnáním UV spekter nebyla prokázána žádná koeluce.

### 3.5.5 Hodnocení čistoty píku (Peak purity)

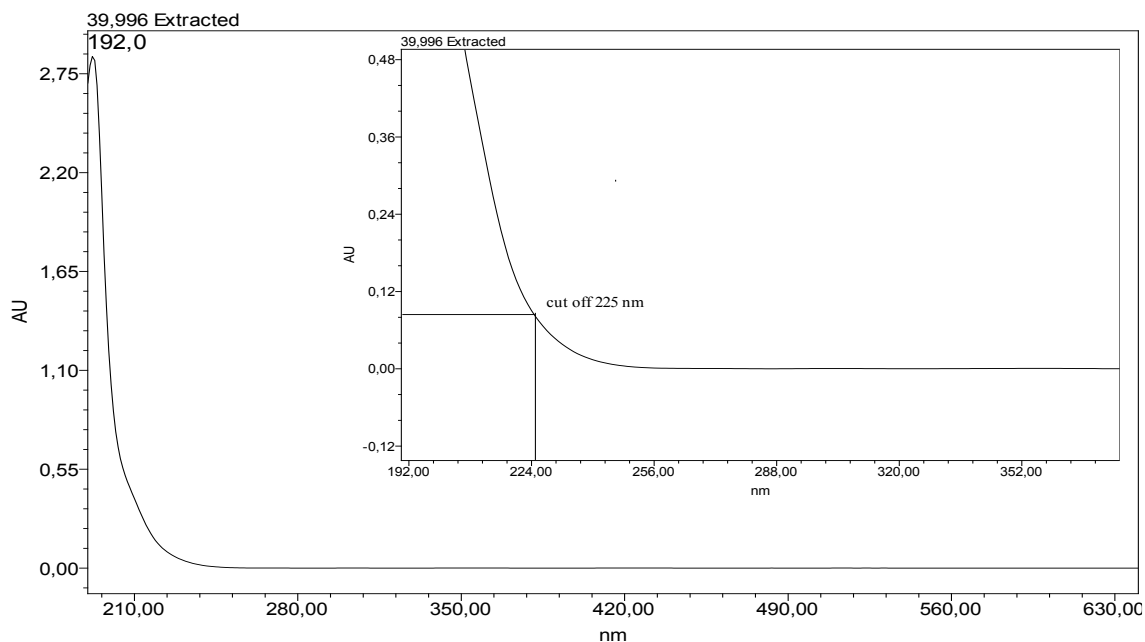
Dříve než mohla být hodnocena čistota píku a spektrální homogenita, bylo nutné stanovit rozmezí vlnových délek pro snímání UV spekter separovaných látek. Pokud studovaná látka neabsorbuje při vyšší vlnové délce, je maximální hodnota vlnové délky určena jako 350 nm. Nejnižší hodnota vlnové délky je určována jako cut-off hodnota mobilní fáze. Pro



metody LC1182 a LC1183 (měly stejné chromatografické podmínky) byl zaznamenán chromatogram (obr. 8), kde byl PDA detektor nejprve vynulován prouděním vody a poté byla voda vyměněna za mobilní fázi o složení MFA:MFB, 70:30, v/v, což odpovídalo složení mobilní fáze v detektoru v retenčním čase RVB. V bodě chromatogramu, kde byla již základní linie ustálená (např. 40 min), bylo vyextrahováno UV spektrum, ze kterého byla určena cut-off vlnová délka. Tu je doporučeno odečítat v blízkosti 0,1 AU (obr. 9). Vliv absorbance mobilní fáze je v tomto bodě minimální. Rozsah vlnových délek pro záznam UV spekter byl tedy určen od 225 nm do 350 nm.

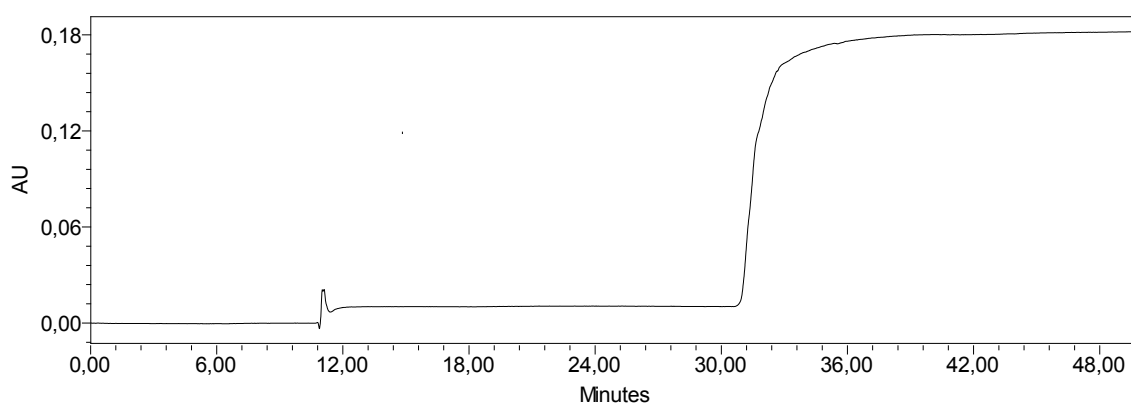


**Obr. 8: Chromatogram základní linie mobilní fáze pro metody LC1182 a LC1183**

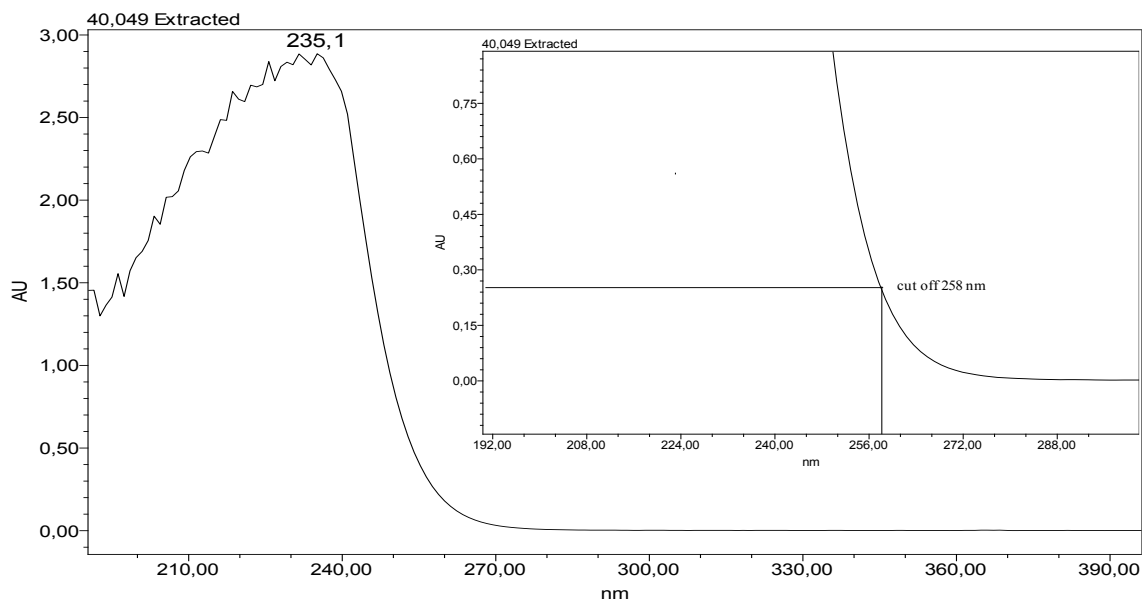


**Obr. 9: UV spektrum mobilní fáze pro metody LC1182 a LC1183 ve 40. minutě s vloženým detailem UV spektra s vyznačenou cut-off hodnotou**

Pro chirální metodu LC1184 byla hodnota cut-off určena obdobně jako v předchozím případě. Byl zaznamenán chromatogram (obr. 10), kdy byl nejprve detektor vynulován při průchodu vody, poté procházel isopropanol, kvůli přechodu na nevodnou mobilní fázi. Na závěr detektorem procházela mobilní fáze o složení DCM + TBME + MeCN + TEA (40:40:20:0,1). Z chromatogramu bylo vyextrahováno UV spektrum po ustálení linie ve 40. minutě (obr. 11). S ohledem na vysokou absorpci mobilní fáze a vlnovou délku 260 nm zakotvenou v metodě, byla zvolena cut-off hodnota 258 nm. Rozsah vlnových délek pro záznam UV spekter byl tedy určen od 258 nm do 350 nm.

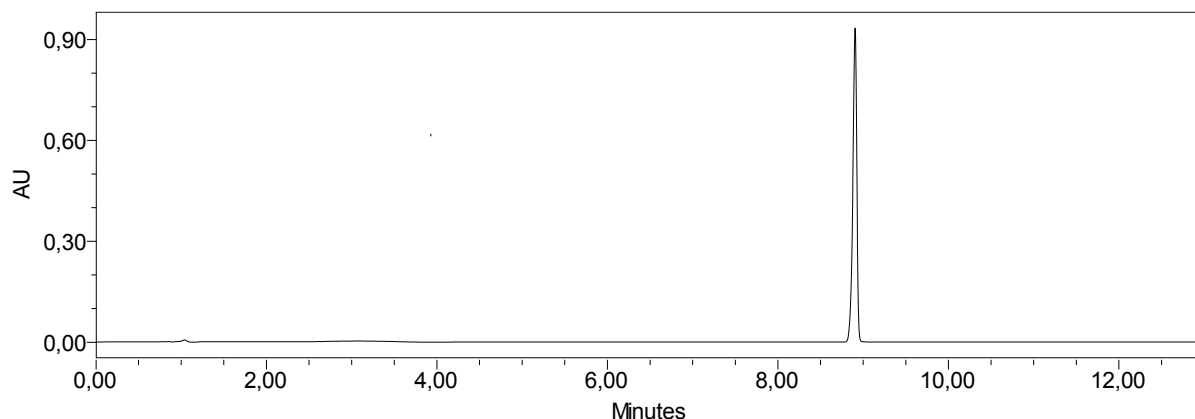


**Obr. 10: Chromatogram základní linie mobilní fáze pro metodu LC1184**



**Obr. 11: UV spektrum mobilní fáze pro metodu LC1184 ve 40. minutě s vloženým detailem UV spektra s vyznačenou cut-off hodnotou**

Dále bylo před hodnocením čistoty píku nutné ověřit, že maximální absorbance píku RVB na 100 % koncentrační úrovni není vyšší než 1 absorbanční jednotka (1 AU) v zobrazení maxplot. Maxplot zobrazuje chromatogram, kde každý bod je absorbančním maximem spektra v daném čase, pomocí něj zjistíme maximální odezvu při dané vlnové délce. Byl nastříknut roztok standardu. Toto kritérium bylo splněno, neboť maximální hodnota dosáhla 0,93 AU viz obr. 12.



**Obr. 12:** Chromatogram standardu RVB v zobrazení maxplot.

UV spektra píku RVB v roztocích standardů byla ukládána do knihoven a porovnávána programem se spektry píku RVB ve stresovaných vzorcích. Byly zjištěny maximální hodnoty Purity Angle a Match Angle. Purity Angle je mírou spektrální nehomogenity napříč píkem vypočítaný porovnáním všech spekter v integrovaných pících proti spektru ve vrcholu píku. Čím je nižší, tím menší je rozdíl mezi spektry napříč píkem. Match Angle je mírou rozdílu mezi spektrem ve vrcholu píku a referenčním spektrem. Nižší Match Angle znamená menší rozdíl mezi srovnávanými spektry. Purity Threshold je součtem Noise Angle a Solvent Angle. Jedná se o horní limit detekce tvarových diferencí mezi dvěma spektry. Noise Angle je mírou spektrální nehomogenity způsobné příspěvkem šumu systému k šumu napříč píkem. Solvent Angle je mírou spektrální nehomogenity způsobené příspěvkem šumu systému k šumu napříč píkem. Match Threshold je součtem Match Noise Angle a Match Solvent Angle (veličiny obdobné noise angle a solvent angle užívané v případě srovnávání spektra vrcholu píku s referenčním spektrem).

Hodnoty Purity Angle byly srovnávány s vypočtenými hodnotami Purity Threshold a pokud platilo, že  $Purity\ Angle \leq Purity\ Threshold$ , pík byl považován za spektrálně čistý, byla

vyloučena koeluce s jinou látkou. Homogenita píku RVB byla prokázána, pokud platilo, že  $\text{Match Angle} \leq \text{Match Threshold}$ .

### 3.6 Příprava roztoků a postup měření pro metody LC-MS

Nejprve byly LC-MS a LC-MS<sup>n</sup> záznamy degradujících vzorků z metody LC1182 pořízeny ve společnosti Teva. Chromatografická separace probíhala za stejných podmínek, jaké jsou definovány metodou LC1182, pouze TFA byla v mobilní fázi nahrazena HCOOH. K separaci byla použita stejná kolona. Hmotnostní spektrometr LTQ dovoľoval pracovat pouze s jednotkovým rozlišením a tudíž nebylo možné přesně určovat sumární vzorce degradačních produktů a jejich fragmentů.

Za účelem zjištění přesných hodnot  $m/z$  byly znovu připraveny vzorky za takových podmínek, při nichž probíhala degradace RVB (podle postupu v části 3.5.1, avšak v polovičním objemu), jednalo se o roztok nestresovaný, stresovaný v prostředí HCl, stresovaný v prostředí NaOH, stresovaný v prostředí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a stresovaný UV zářením v roztoku. Před analýzou LC-MS byly roztoky o koncentraci 2 mg/ml RVB ještě 100× zředěny směsí počátečního gradientu (95 % MFA a 5% MFB). Tyto vzorky byly poté měřeny na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů v Olomouci. Ovládání přístroje při měření a následné vyhodnocení výsledků bylo provedeno programem MassLynx verze 4.1. Struktury látek a jejich fragmentů byly navrhovány na základě porovnávání hodnot  $m/z$  experimentálně zjištěných s hodnotami teoreticky vypočítanými pro různé kombinace sumárních vzorců

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Výsledky hodnocení čistoty píku

Píky RVB u všech stresovaných vzorků mohly být považovány za čisté, protože hodnoty Purity Angle byly menší než hodnoty Purity Threshold. Zároveň se nenašel žádný spektroskopický důkaz pro koeluci píku a byla potvrzena homogenita hlavního píku u všech stresovaných vzorků (Match Angle byl vždy větší než Match Threshold). Detailní výsledky jsou uvedeny v tab. 13 a 14.

**Tab. 13: Výsledky hodnocení čistoty píku s použitím parametrů: A)....Purity Angle (0,090) a Match Angle (0,009); B).....Purity Angle (0,048) a Match Angle (0,010)**

Stres	Purity Angle	Purity Threshold	Match Angle	Match Threshold
Nestresovaný RVB <sup>A)</sup>	0.050	0.096	0.007	0.012
0,9M HCl (70°C, 15 min) <sup>A)</sup>	0.041	0.097	0.011	0.012
Světlo (750 W.m <sup>-2</sup> , 30 min) <sup>A)</sup>	0.043	0.096	0.010	0.012
0,06M NaOH (LT, 1 h) <sup>A)</sup>	0.042	0.098	0.010	0.013
MnO <sub>2</sub> (10 mg, LT, 16 h) <sup>A)</sup>	0.053	0.097	0.007	0.012
Teplo (75°C, 16 h) <sup>B)</sup>	0.047	0.053	0.006	0.011
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (70°C, 4 h) <sup>B)</sup>	0.046	0.057	0.010	0.012

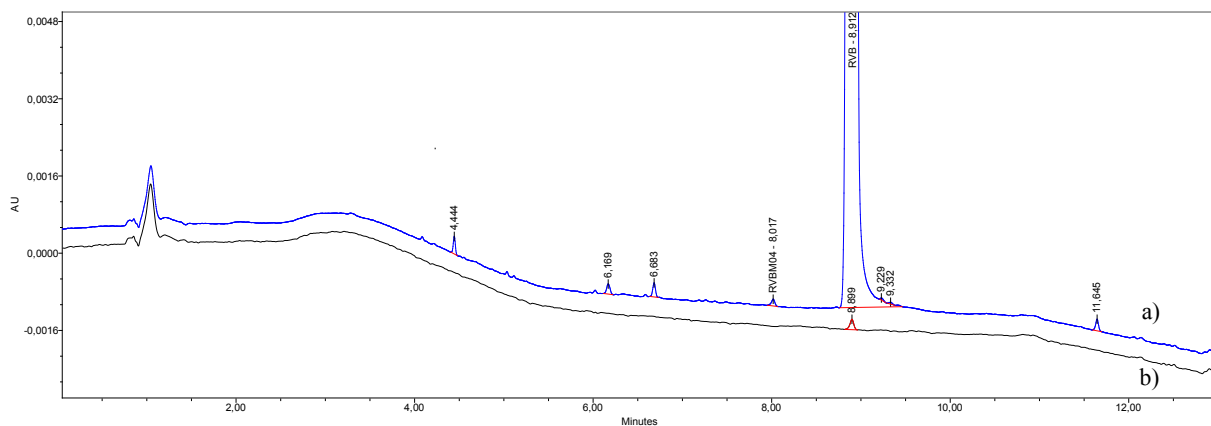
**Tab. 14: Výsledky hodnocení čistoty píku s použitím parametrů: Purity Angle (0,048) a Match Angle (0,008)**

Stres	Purity Angle	Purity Threshold	Match Angle	Match Threshold
Nestresovaný RVB	0.048	0.053	0.007	0.011
Teplo (130°C, 16 h)	0.044	0.052	0.006	0.011
Světlo (750 W.m <sup>-2</sup> , 7 h)	0.044	0.052	0.006	0.011

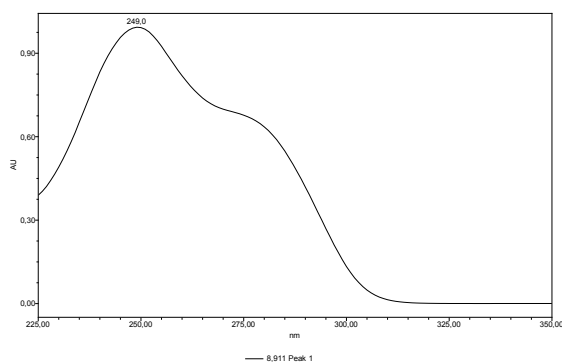
### 4.2 Nestresovaný vzorek RVB šarže MV110502/02/01

Tento vzorek byl použit jako srovnávací pro všechny stresové testy v roztoku. V nečistotním profilu nestresovaného vzorku (obr. 13) nebyla nalezena žádná nečistota s obsahem větším než 0,04 % (hodnota 0,04 plošných procent je stanovená jako tzv. reporting level – píky, které mají menší plochu než 0,04 % se nesledují). Obsah RVB byl v tomto případě 99,9 plošných procent a 100,1 hmotnostních procent. Z tohoto chromatogramu bylo také získáno UV spektrum RVB

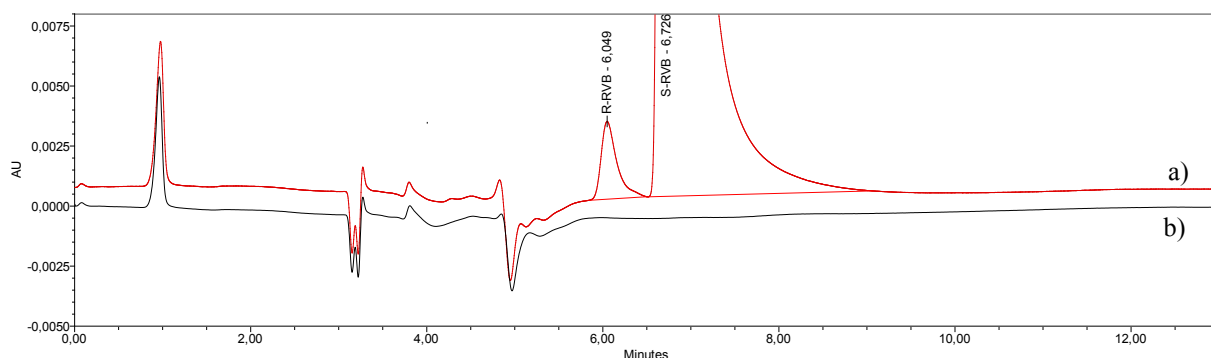
(obr. 14). Chromatogram zaznamenaný při chirální metodě je na obr. 14, obsah R-RVB zde činil 0,54 plošných procent.



**Obr. 13: Chromatogramy z metody LC1182 a) nestresovaný vzorek, b) blank**



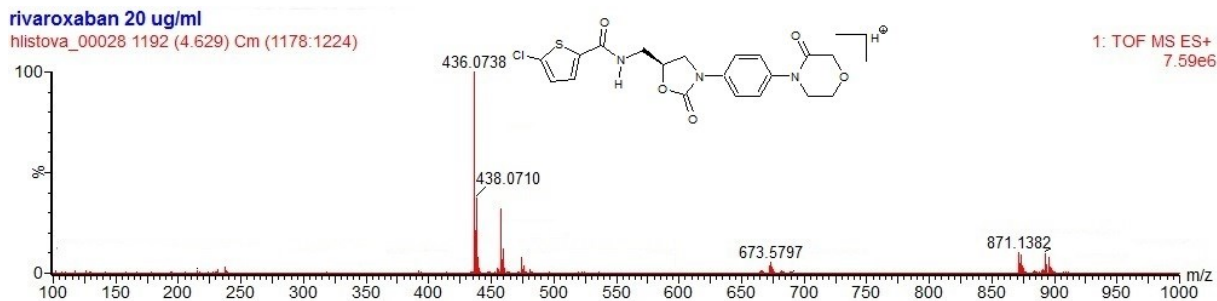
**Obr. 14: UV spektrum rivaroxabanu z metody LC1182**



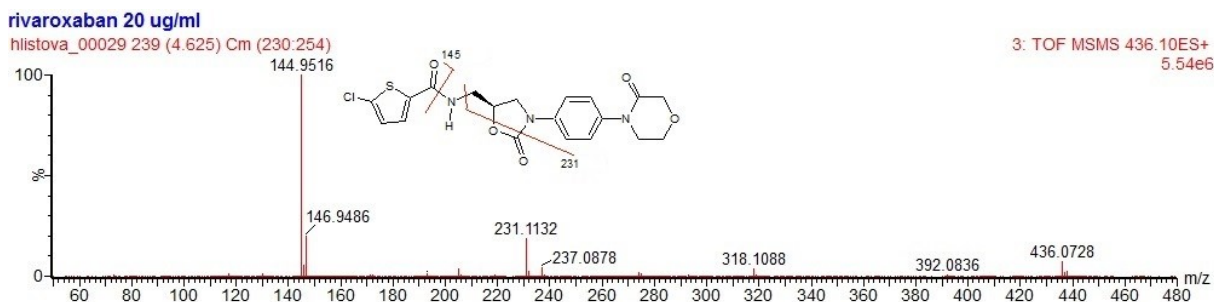
**Obr. 15: Chromatogramy z chirální metody LC1184 a) nestresovaný vzorek, b) blank**

V chromatogramech zaznamenaných metodou LC-HRMS eluoval RVB v retenčním čase 4,58 min (obr. 21). V zaznamenaných hmotnostních spektrech poskytoval RVB molekulový ion s hodnotou  $m/z$  436,0738 ( $C_{19}H_{19}N_3O_5SCl^+$ ) viz obr. 16. Vypočítaná hodnota  $m/z$  činila 436,0734 pro sumární vzorec  $C_{19}H_{19}N_3O_5SCl^+$ , chyba byla 0,9 ppm. Fragmentační spektrum

poskytovalo dva fragmenty  $m/z$  144,9516 ( $C_5H_2OSCl^+$ ; 0,7 ppm) a 231,1132 ( $C_{13}H_{15}N_2O_2^+$ ; 0,9 ppm) viz obr. 17.



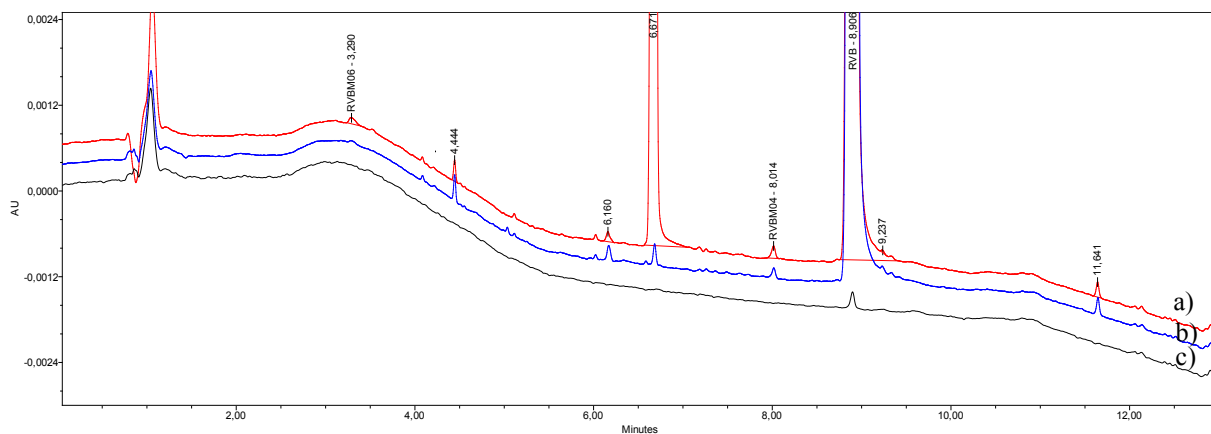
**Obr. 16:** MS spektrum z chromatografické separace nestresovaného vzorku RVB o koncentraci 20 µg/ml v retenčním čase 4,58 min.



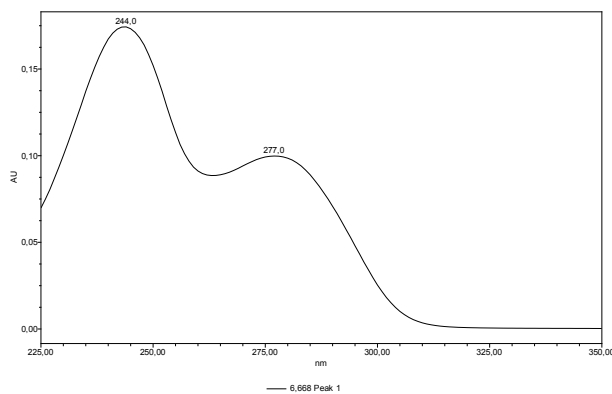
**Obr. 17:** MS/MS spektrum iontu  $m/z$  436

### 4.3 Roztok vzorku RVB vystavený kyselému prostředí (HCl)

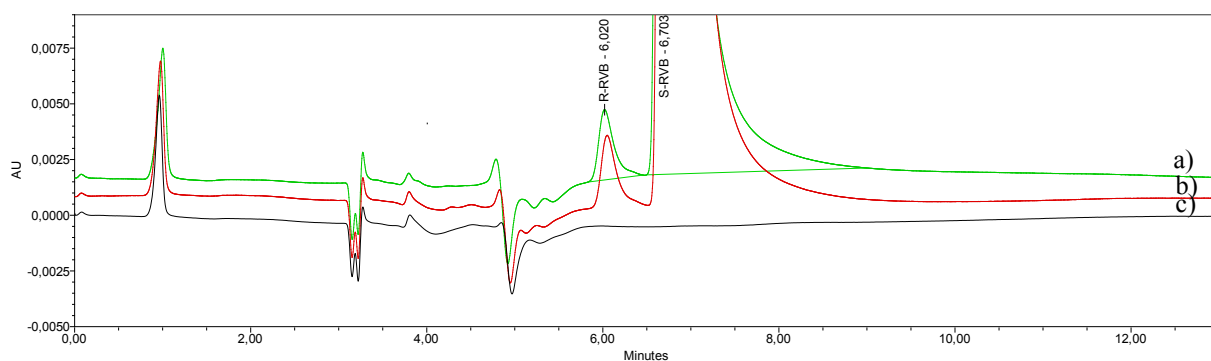
Vzorek byl vystaven po dobu 20 minut 0,9M HCl při teplotě 70 °C. V nečistotním profilu (obr. 18) byl nalezen jeden hlavní degradační produkt v retenčním čase 6,67 min, s obsahem 13,6 plošných procent (ozn. DP-1). Ostatní nečistoty měly obsah menší než 0,04 %. Obsah RVB byl v tomto případě 86,3 plošných procent a 94,0 hmotnostních procent. Z chromatogramu bylo také získáno UV spektrum neznámé nečistoty (obr. 19). Chromatogram zaznamenaný při použití chirální metody je na obr. 20. Obsah R-RVB ve stresovaném vzorku činil 0,55 plošných procent.



**Obr. 18 :** Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný HCl, b) nestresovaný vzorek, c) blank



**Obr. 19:** UV spektrum DP-1 s RT 6,67 min z metody LC1182



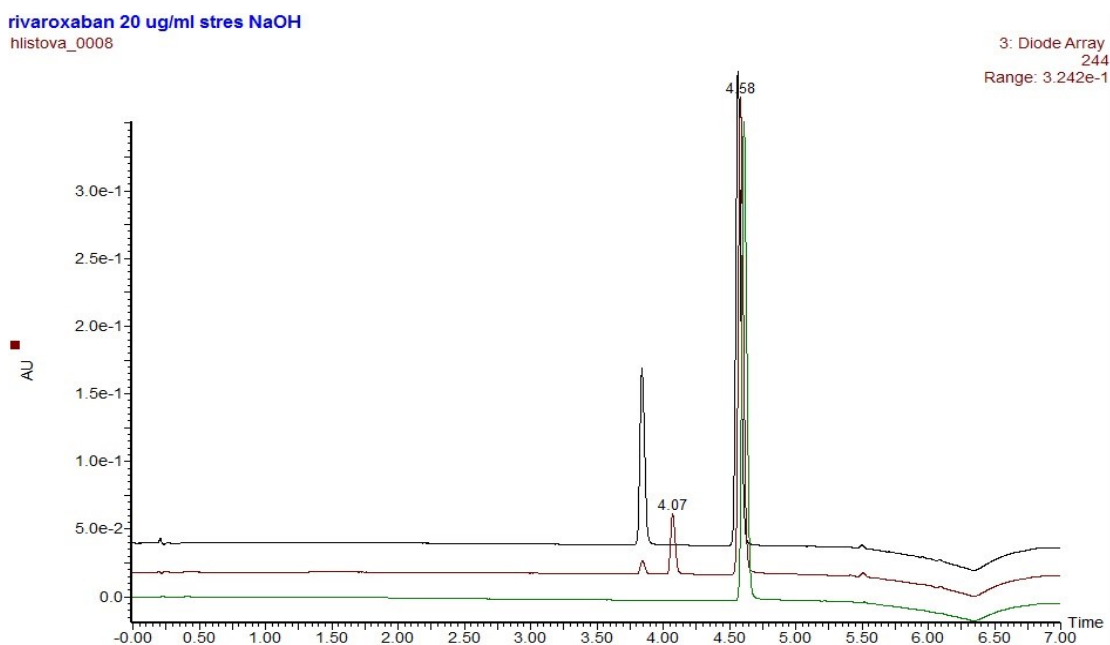
**Obr. 20:** Chromatogramy z chirální metody LC1184 a) vzorek stresovaný HCl, b) nestresovaný vzorek, c) blank



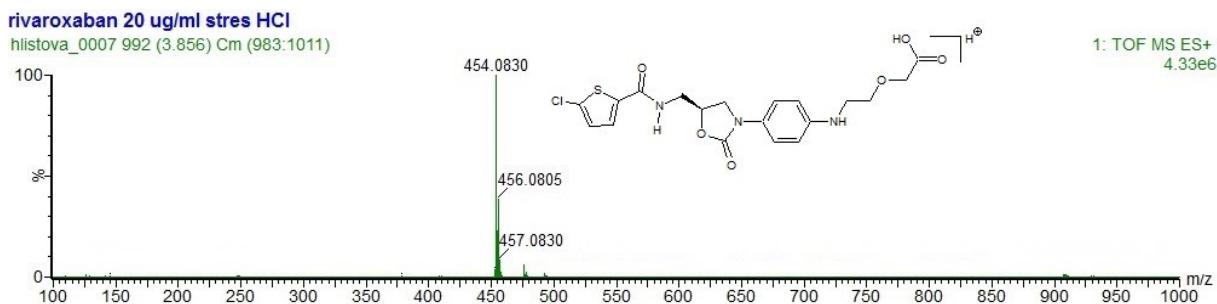
Jak je patrné z tab. 16 a obr. 20, obsah R-RVB se ve stresovaných vzorcích téměř neměnil, chromatogramy mají velmi podobný průběh u všech stresovaných vzorků, proto byly dále zařazeny pouze do přílohy 5.

V chromatogramu zaznamenaném metodou LC-HRMS (obr. 21) eluoval v retenčním čase 3,85 min degradační produkt (DP-1) kyselé hydrolyzy s hodnotou  $m/z$  454,0830 ( $C_{19}H_{21}N_3O_6SCl^+$ ; 2,2 ppm) viz obr. 22. Ve fragmentačním spektru byly pozorovány fragmenty  $m/z$  144,9516 ( $C_5H_2OSCl^+$ ; 0,7 ppm) a 209,0928 ( $C_{10}H_{13}N_2O_3^+$ ; 1,0 ppm) viz obr. 23.

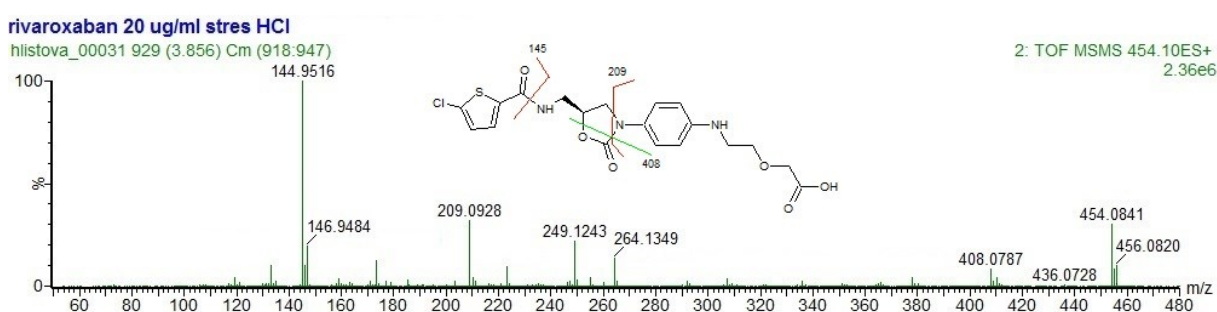
Z výsledků stresového testu plyne, že rivaroxaban podléhá hydrolyze v kyselém prostředí za vzniku jednoho degradačního produktu, který byl identifikován jako následek hydrolyzy morfolinonového kruhu (ozn. DP-1) uvedený v literatuře.<sup>35</sup>



**Obr. 21: Chromatogram zaznamenaný metodou LC-HRMS: a) vzorek stresovaný HCl, b) vzorek stresovaný NaOH, c) nestresovaný vzorek RVB**



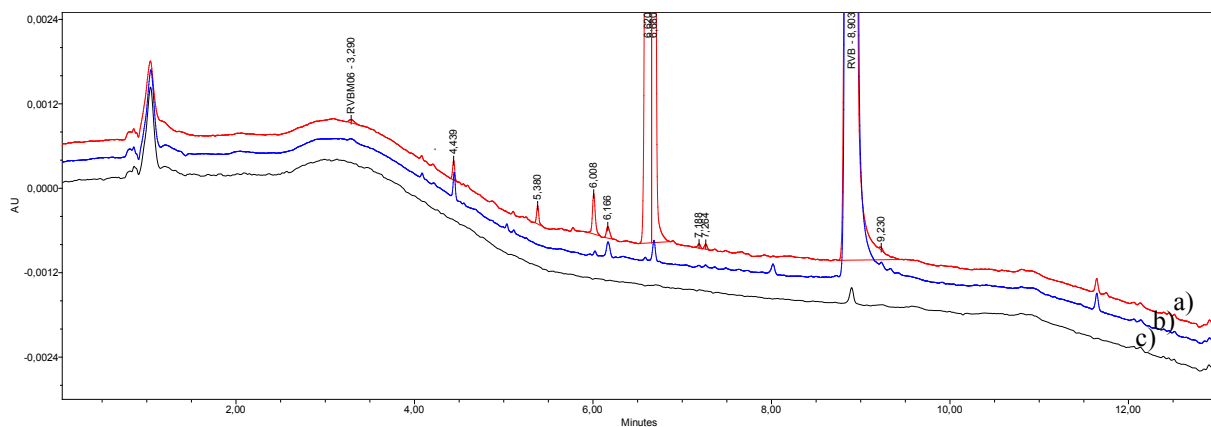
**Obr. 22: MS spektrum DP-1 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného HCl v retenčním čase 3,85 min.**



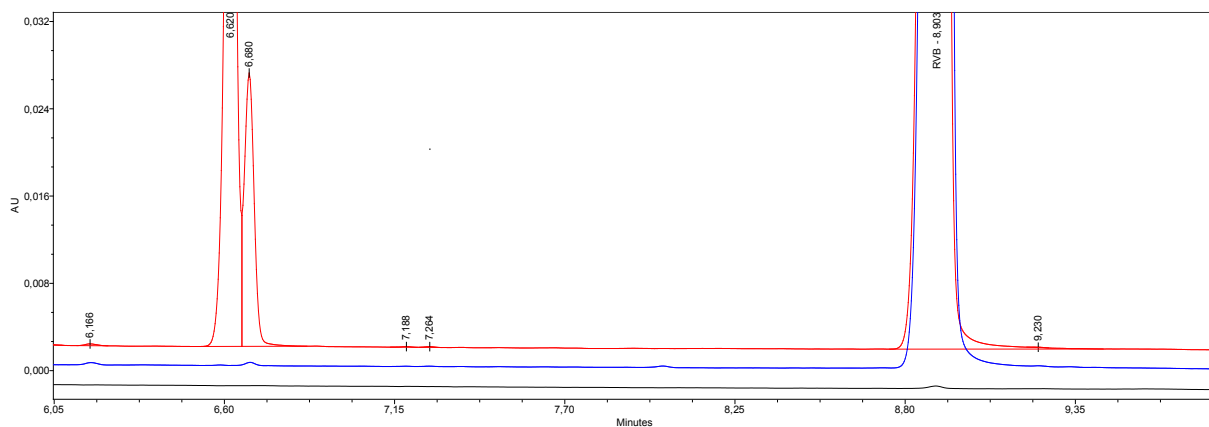
**Obr. 23: MS/MS spektrum iontu m/z 454 (DP-1)**

#### 4.4 Roztok vzorku RVB vystavený bazickému prostředí (NaOH)

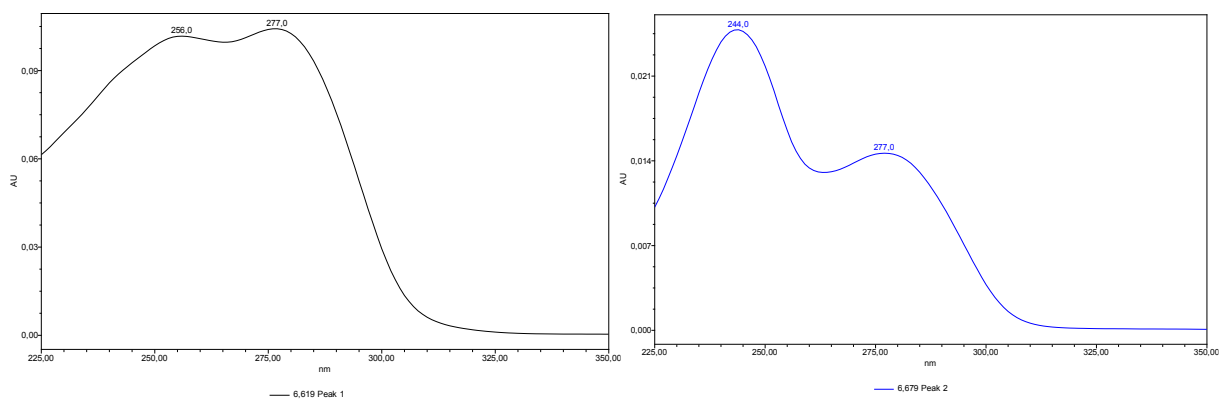
Vzorek byl vystaven po dobu 1 hod 0,06M NaOH při laboratorní teplotě, po uplynutí této doby byl zneutralizován roztokem kyseliny octové. V nečistotním profilu (obr. 24, 25) byly nalezeny dva hlavní degradační produkty v retenčních časech 6,62 (ozn. DP-2) a 6,68 min (DP-1), které nebyly úplně separovány. Pík v RT 6,62 min zaujímal 7,8 plošných procent a pík v RT 6,68 min zaujímal 2,0%. V retenčním čase 6,01 min byla pozorována nečistota s 0,05 plošnými procenty a ostatní nečistoty měly obsah menší než 0,04%. Obsah RVB byl v tomto případě 90,11 plošných procent a 84,4 hmotnostních procent. Z chromatogramu byla také získána UV spektra neznámých nečistot (obr. 26). Obsah R-RVB ve stresovaném vzorku činil 0,56 plošných procent.



**Obr. 24: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný NaOH, b) nestresovaný vzorek, c) blank**

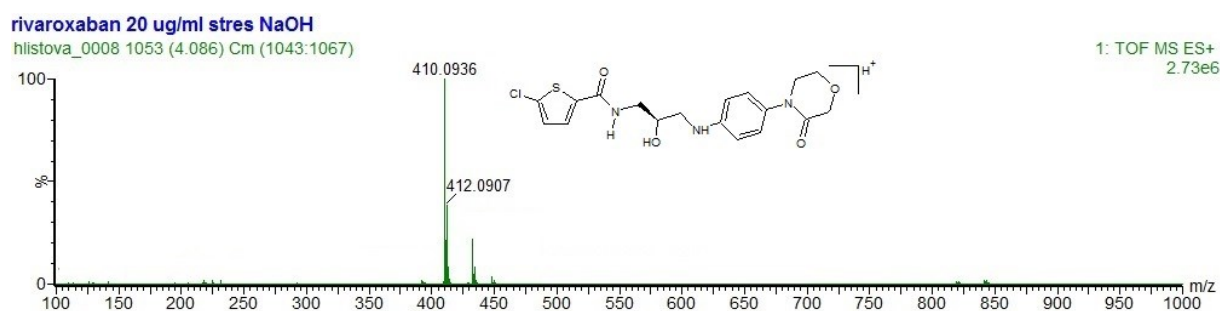


**Obr. 25: Detail píkú degradačních produktů DP-2 a DP-1 stresu v prostředí NaOH**

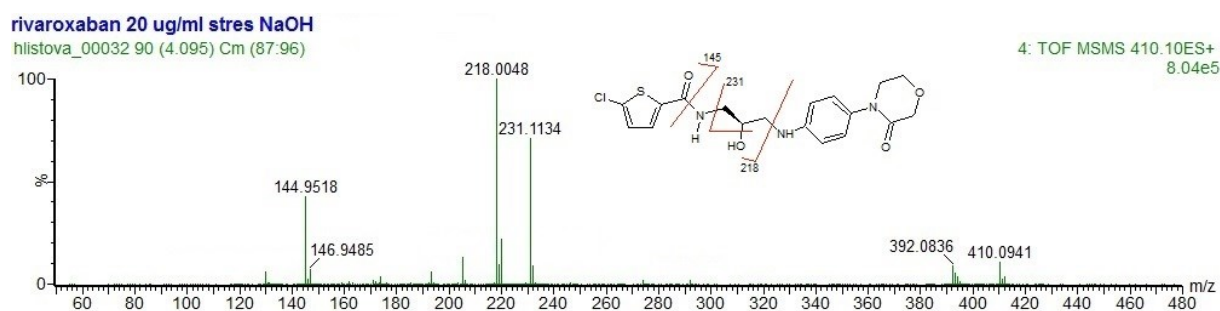


**Obr. 26: UV spektra degradačních produktů vlevo DP-2 s RT 6,62, vpravo DP-1 s RT 6,68 min z metody LC1182**

V chromatogramu zaznamenaném metodou LC-HRMS (obr. 21) eluoval v retenčním čase 3,85 min degradační produkt DP-1 bazické hydrolyzy s hodnotou  $m/z$  454,0825 ( $C_{19}H_{21}N_3O_6SCl^+$ ; 3,3 ppm), UV spektra, chromatogram i hmotnostní spektra ukázaly, že se jedná o látku totožnou s produktem kyselé hydrolyzy ( $C_{19}H_{21}N_3O_6SCl^+$ ; 3,3 ppm). Pík na chromatogramu v retenčním čase 4,07 min byl hlavní degradační produkt bazické hydrolyzy (DP-2) s hodnotou  $m/z$  410,0936 ( $C_{18}H_{21}N_3O_4SCl^+$ ; 1,2 ppm), obr. 27. Ve fragmentačním spektru DP-2 byly pozorovány fragmenty  $m/z$  144,9518 ( $C_5H_2OSCl$ ; 2,1 ppm), 218,0048 ( $C_8H_9NO_2SCl$ ; 2,3 ppm) a 231,1134 ( $C_{13}H_{15}N_2O_2$ ; 0 ppm) viz obr. 28. Z výsledků stresového testu plyne, že rivaroxaban je velmi citlivý k hydrolyze v bazickém prostředí, neboť degradace probíhá již v krátkém čase pouze za laboratorní teploty za vzniku dvou degradačních produktů. Jeden je strukturně totožný s produktem kyselé hydrolyzy a druhý vzniká hydrolyzou laktonové vazby s následnou okamžitou dekarboxylací vzniklé karbamové kyseliny.



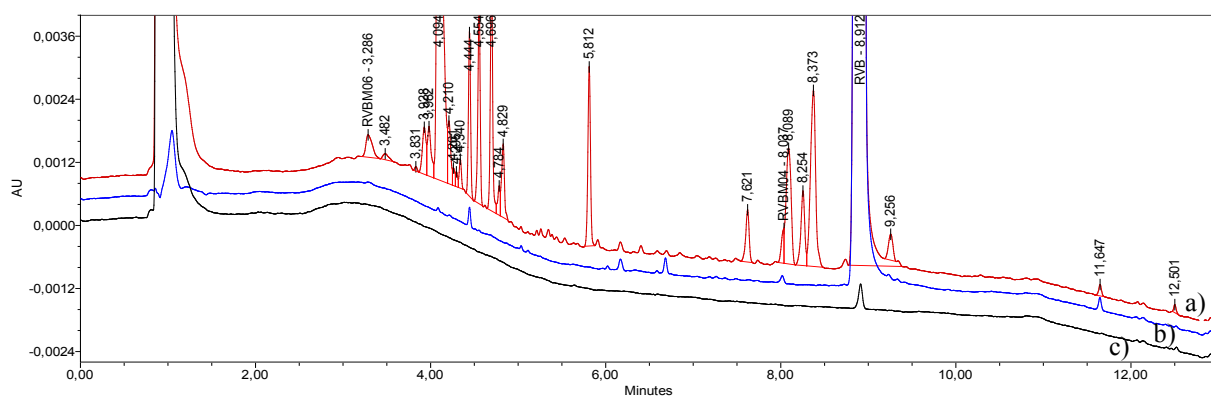
**Obr. 27:** MS spektrum DP-2 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného NaOH v retenčním čase 4,07 min.



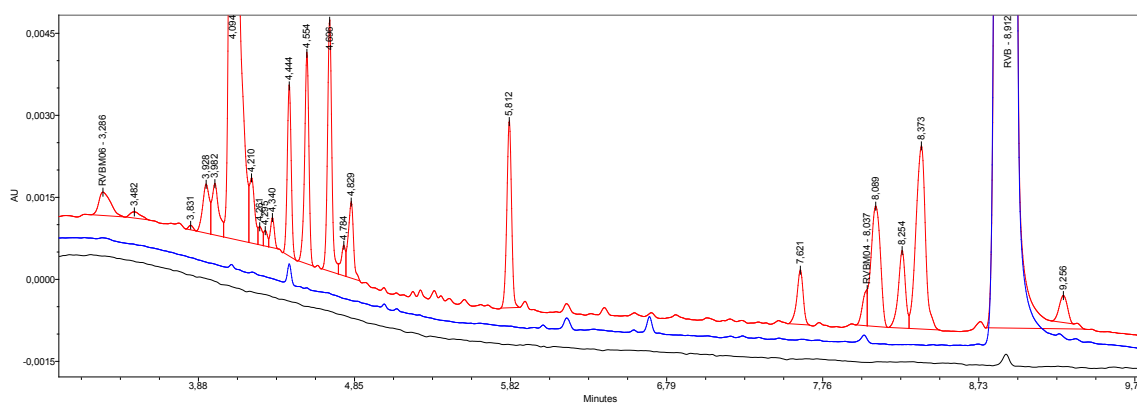
**Obr. 28:** MS/MS spektrum iontu  $m/z$  410 (DP-2)

#### 4.5 Roztok vzorku RVB vystavený oxidaci (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

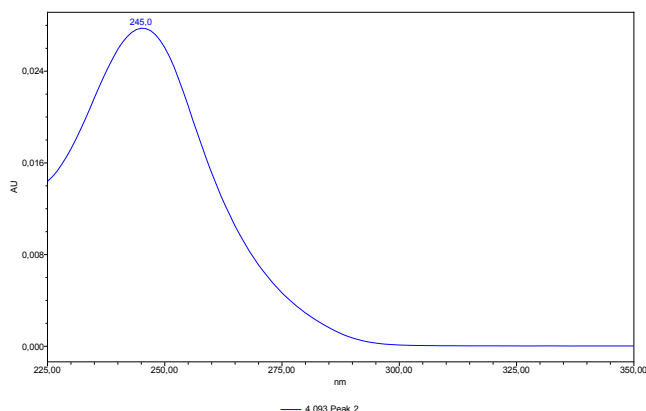
Vzorek byl vystaven po dobu 4 hod 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> při teplotě 70 °C. V nečistotním profilu (obr. 29) byl nalezen jeden hlavní degradační produkt v retenčním čase 4,09 min, který zaujímal 2,8 plošných procent. Dále bylo pozorováno devět degradačních produktů v rozmezí 0,5 až 0,1 plošných procent v různých retenčních časech a pět nečistot s obsahem v rozmezí 0,1 až 0,04 plošných procent. Obsah RVB byl v tomto případě 94,4 plošných procent a 91,8 hmotnostních procent. Z chromatogramu byla také získána UV spektra neznámých nečistot (obr. 31 a příloha 7). Obsah R-RVB ve stresovaném vzorku činil 0,59 plošných procent. UV spektra degradačních produktů s obsahem v rozmezí 0,1 až 0,5 plošných procent jsou uvedeny v příloze 7.



Obr. 29: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, b) nestresovaný vzorek, c) blank



Obr. 30: Detail píků degradačních produktů stresu v prostředí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

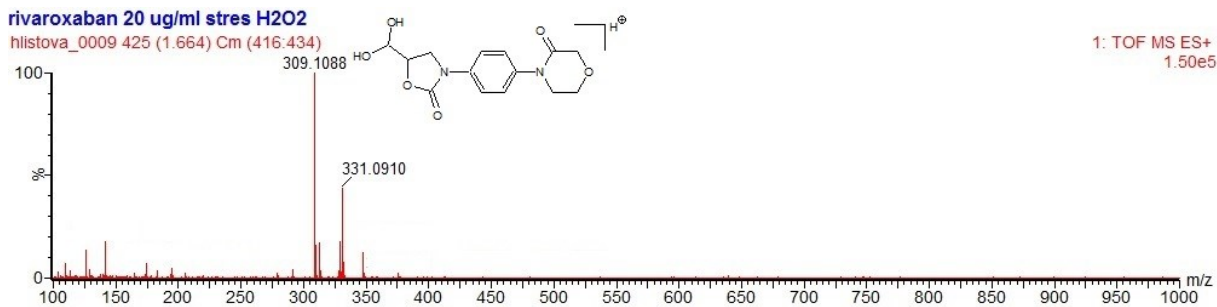


**Obr. 31: UV spektrum hlavního degradačního produktu v RT 4,09 min z metody LC1182**

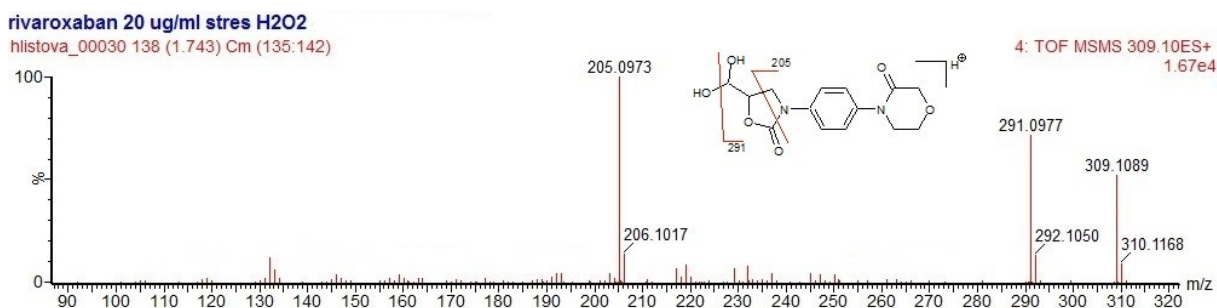
V chromatogramu zaznamenaného metodou LC-HRMS (obr. 38) eluovalo v různých retenčních časech sedm piků degradačních produktů viz tab. 15.

**Tab. 15: Zjištěné sumární vzorce degradačních produktů stresu peroxidem**

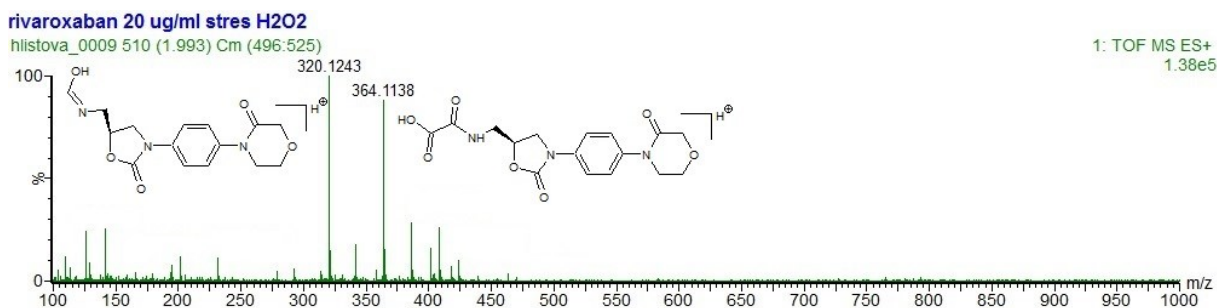
Retenční čas (min)	Hmota m/z	Vzorec; chyba (ppm)	Fragmenty	Vzorec; chyba (ppm)	Ozn. deg. produktu
1,64	309,1088	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ; 0,3	205,0973 291,0977	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 2,0 C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ; 1,4	DP-3
1,97	320,1243 364,1138	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> ; 0,9 C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ; 1,9	231,1133	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 0,4	DP-4
2,23	309,1087	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ; 0	219,0762	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ; 3,7	Neident.
2,35	306,1097	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> ; 2,3	245,1162	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ; 0,8	Neident.
3,07	261,0099	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl; ;0,8	144,9513	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> OSCl, 1,4	Neident.
4,33	468,0625	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> SCl; 1,5	144,9516 406,0641 434,0519	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> OSCl, 0,9 C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> SCl; 3,2 -	DP-5
4,44	468,0625	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> SCl; 1,5	144,9512 273,0872 406,0635	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> OSCl, 1,6 C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ; 1,1 C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> SCl; 1,7	DP-5



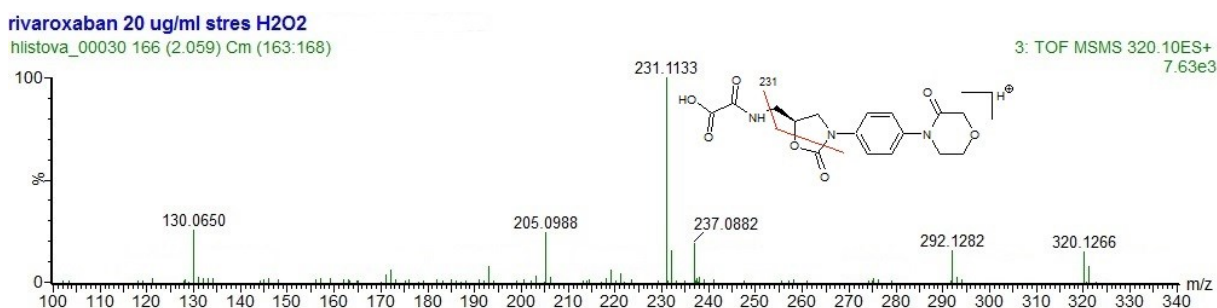
Obr. 32: MS spektrum DP-3 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v čase



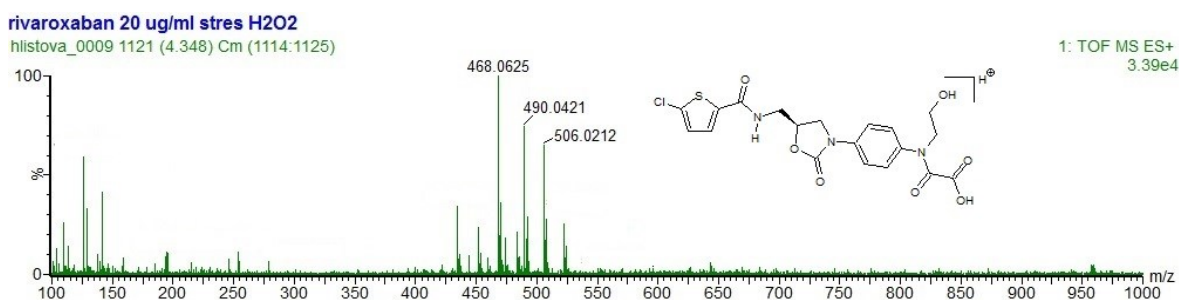
Obr. 33: MS/MS spektrum iontu m/z 309 (DP-3)



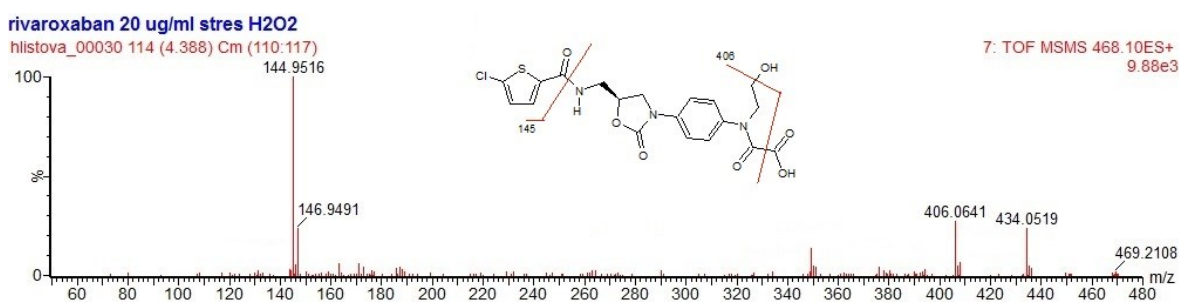
Obr. 34: MS spektrum DP-4 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Obr. 35: MS/MS spektrum iontu m/z 364 (DP-4)

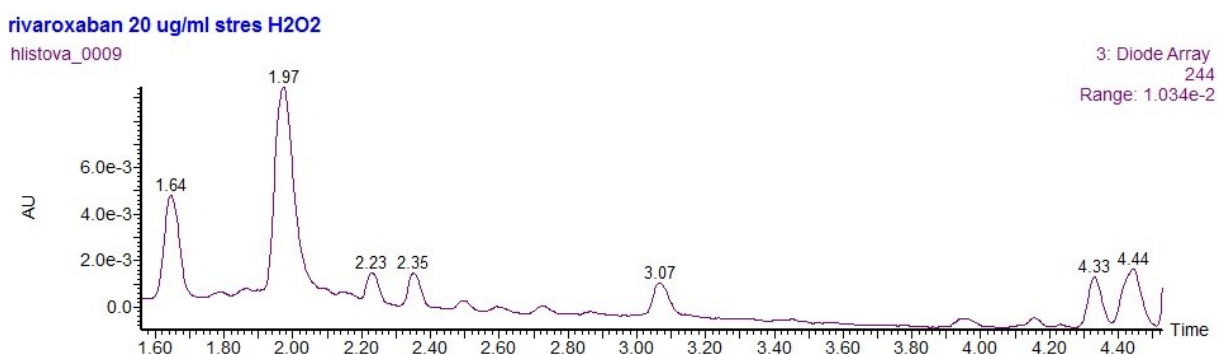


**Obr. 36: MS spektrum DP-5 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**



**Obr. 37: MS/MS spektrum iontu m/z 468 (DP-5)**

Degradační produkty DP-3 a DP-5 byly popsány při metabolismu RVB.<sup>37</sup> DP-4 vzniká dekarboxylací v iontovém zdroji. Rivaroxaban byl jen málo citlivý k oxidačním účinkům, jak ukázaly testy.



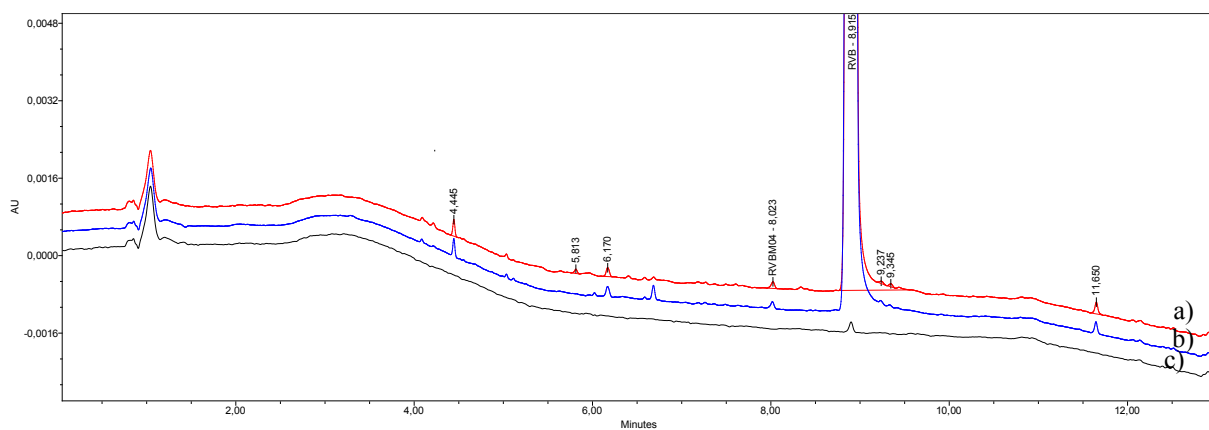
**Obr. 38: Chromatogram zaznamenaný metodou LC-HRMS**



#### 4.6 Roztok vzorku RVB vystavený oxidaci ( $\text{MnO}_2$ )

Vzorek byl vystaven po dobu 16 hod 10 mg  $\text{MnO}_2$  (nerozpouštěl se) při laboratorní teplotě. V nečistotním profilu (obr. 39) nebyla nalezena žádná nečistota s obsahem větším než 0,04 %. Obsah RVB byl v tomto případě 99,9 plošných procent a 99,7 hmotnostních procent. Obsah R-RVB ve stresovaném vzorku činil 0,54 plošných procent.

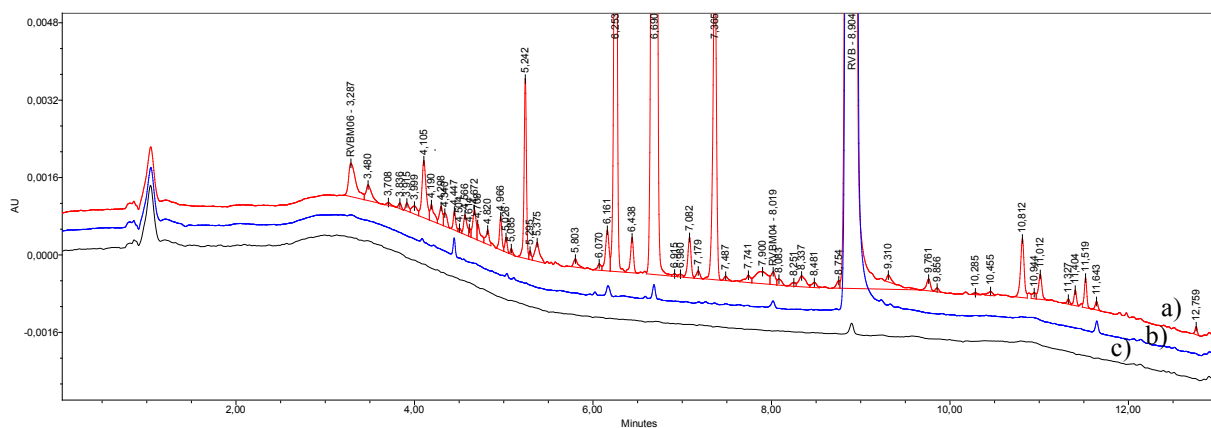
Z výsledků plyne, že vzorek rivaroxabanu nepodléhá oxidaci oxidem manganičitým.



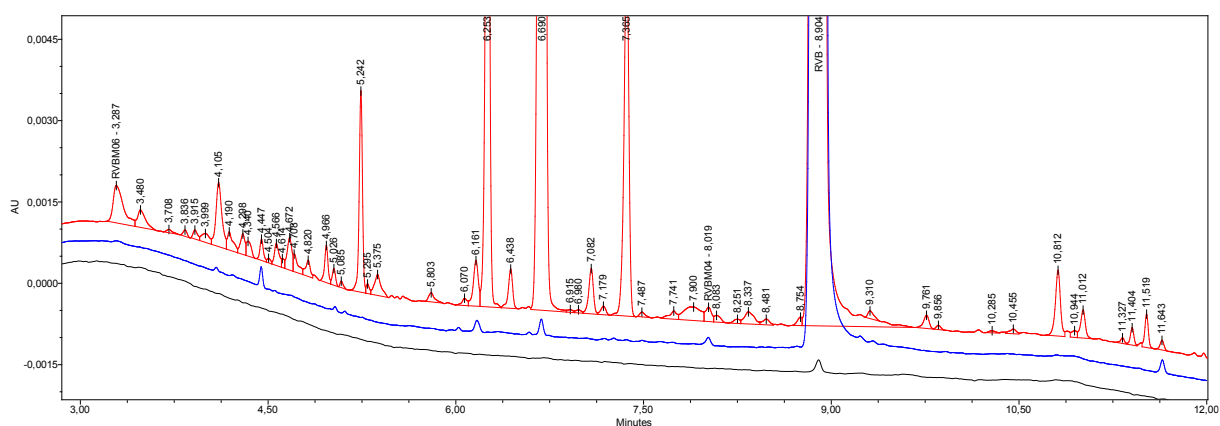
Obr. 39: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný  $\text{MnO}_2$ , b) nestresovaný vzorek, c) blank

#### 4.7 Roztok vzorku RVB vystavený UV záření

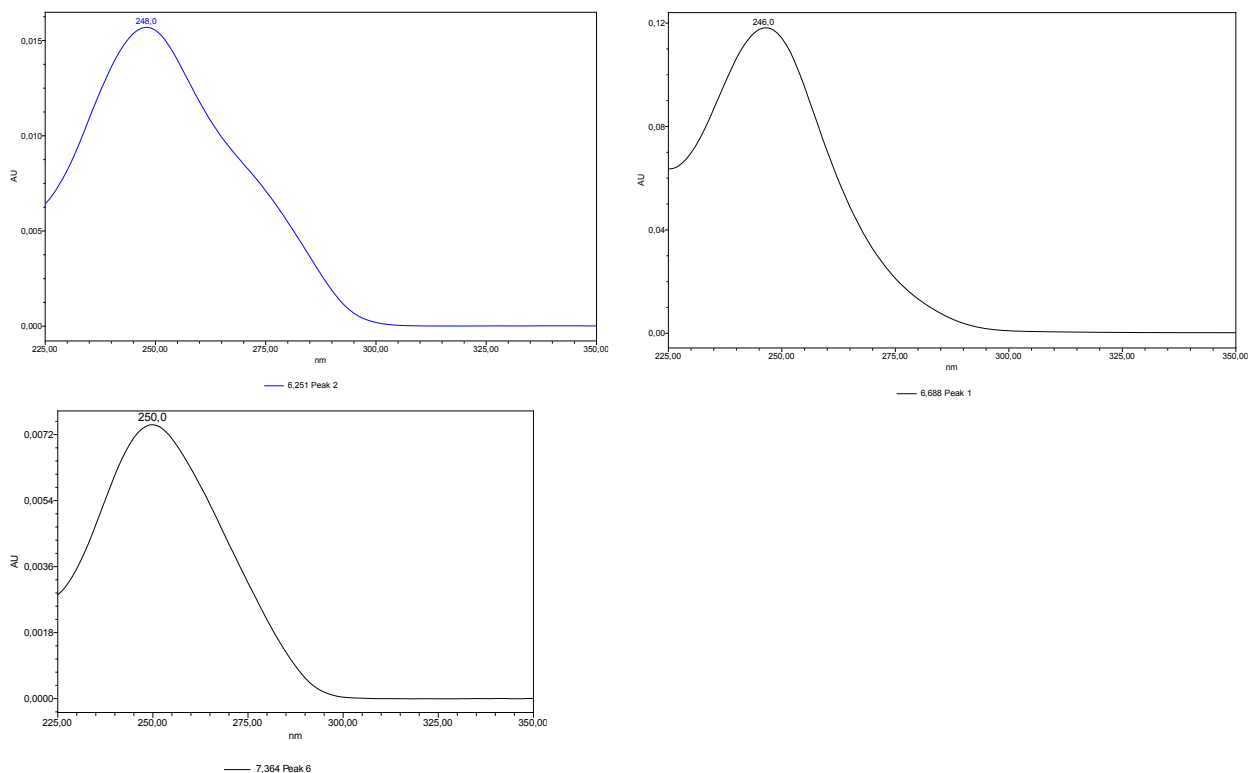
Vzorek byl vystaven po dobu 30 minut záření o energii  $750 \text{ W/m}^2$  při teplotě  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . V nečistotním profilu (obr. 40) byly nalezeny tři hlavní degradační produkty v retenčních časech 6,25 min (1,2 plošných procent, DP-7), 6,69 min (9,8 plošných procent, DP-8) a 7,37 min (0,7, DP-9). Dále byly pozorovány tři degradačních produkty v rozmezí 0,25 až 0,1 plošných procent a nárůst obsahu nečistoty RVBM06 z hodnot pod RL na 0,14 plošných procent. Dále bylo pozorováno jedenáct nečistot s obsahem v rozmezí 0,1 až 0,04 plošných procent v různých retenčních časech. Obsah RVB byl v tomto případě 86,4 plošných procent a 84,5 hmotnostních procent. Z chromatogramu byla také získána UV spektra neznámých nečistot (obr. 42. ). Obsah R-RVB ve stresovaném vzorku činil 0,55 plošných procent.



Obr. 40: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný UV zářením b) nestresovaný vzorek, c) blank



Obr. 41: Detail píků degradačních produktů při stresu UV zářením



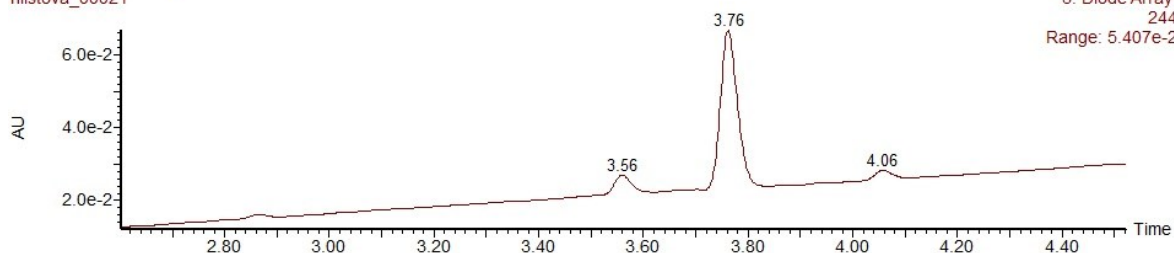
**Obr. 42: UV spektrum degradačních produktů vlevo s RT 6,25, vpravo s RT 6,69 min a dole s RT 7,37 min.**

UV spektra degradačních produktů s obsahem v rozmezí 0,1 až 0,7 plošných procent jsou uvedeny na obr. v příloze.

V chromatogramu zaznamenaného metodou LC-HRMS (obr. 43) eluovaly v různých retenčních časech tři degradační produkty. Degradační produkty v retenčních časech 3,76 min a 4,06 min (obr. 44) poskytovaly molekulový ion shodný s RVB a také fragmenty byly totožné, jednalo se tedy zřejmě o izomery rivaroxabanu. V retenčním čase 3,56 min eluovala látka s hodnotou  $m/z$  402,1122 ( $C_{19}H_{20}N_3O_5S$ ; 0,5 ppm), což ukazuje na odtržení chloru z molekuly RVB. Z výsledků tedy plyne, že RVB je citlivý na působení UV záření, pokud je v roztoku. Působením UV záření se odštěpuje chlor a pravděpodobně vznikají dva izomery.

rivaroxaban 20 ug/ml stres UV 90 min

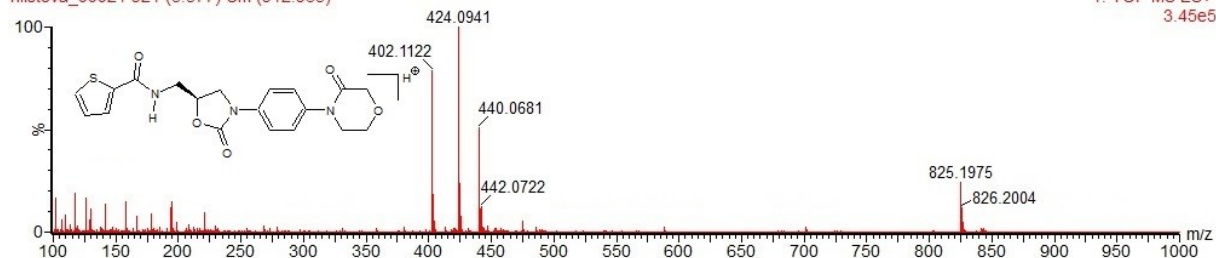
hlistova\_00021



Obr. 43: Detail chromatogramu zaznamenaného metodou HR-MS při stresu UV

rivaroxaban stres UV 90 min

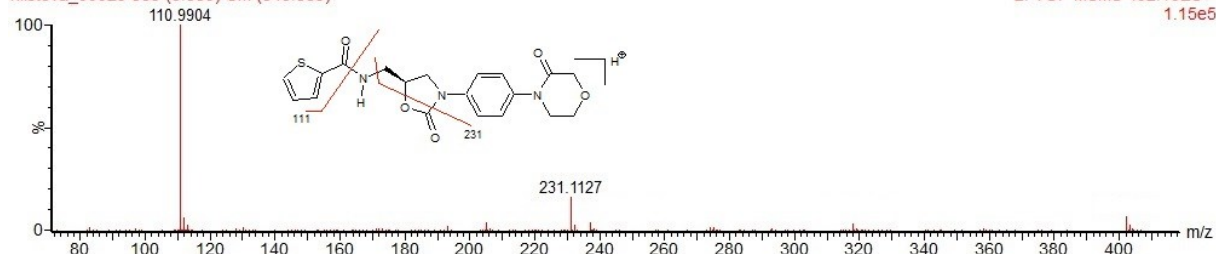
hlistova\_00021 921 (3.577) Cm (912:935)



Obr. 44: MS spektrum DP-7 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného UV

rivaroxaban 20 ug/ml stres UV 90 min

hlistova\_00029 859 (3.580) Cm (845:869)

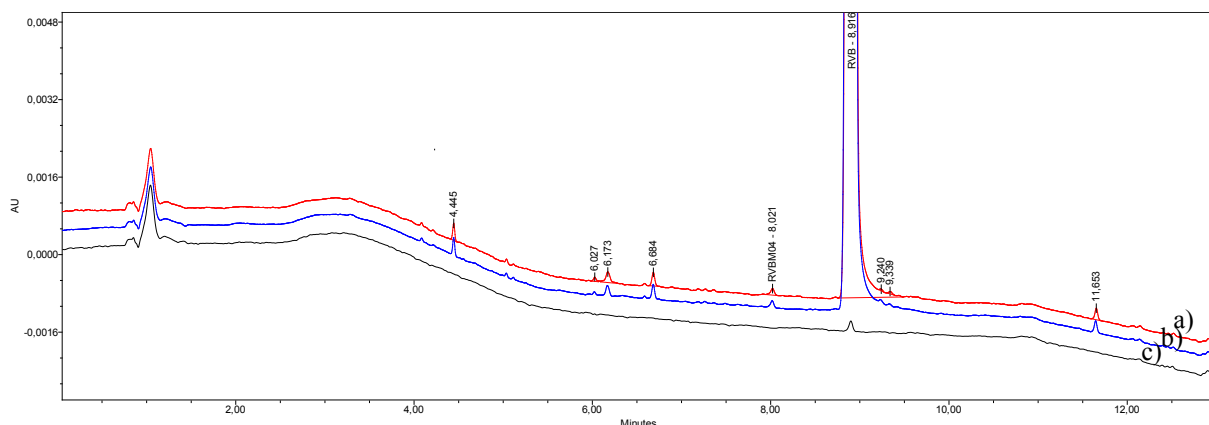


Obr. 45: MS/MS spektrum iontu m/z 402 (DP-7)

#### 4.8 Roztok vzorku RVB vystavený zahřívání

Vzorek byl vystaven po dobu 16 hod zahřívání při teplotě 70 °C. V nečistotním profilu (obr. 46) nebyla nalezena žádná nečistota s obsahem větším než 0,04 %. Obsah RVB byl v tomto případě 99,9 plošných procent a 100,5 hmotnostních procent. Obsah R-RVB ve stresovaném vzorku činil 0,52 plošných procent.

Z výsledků plyne, že vzorek rivaroxabanu v roztoku nepodléhá tepelné degradaci.

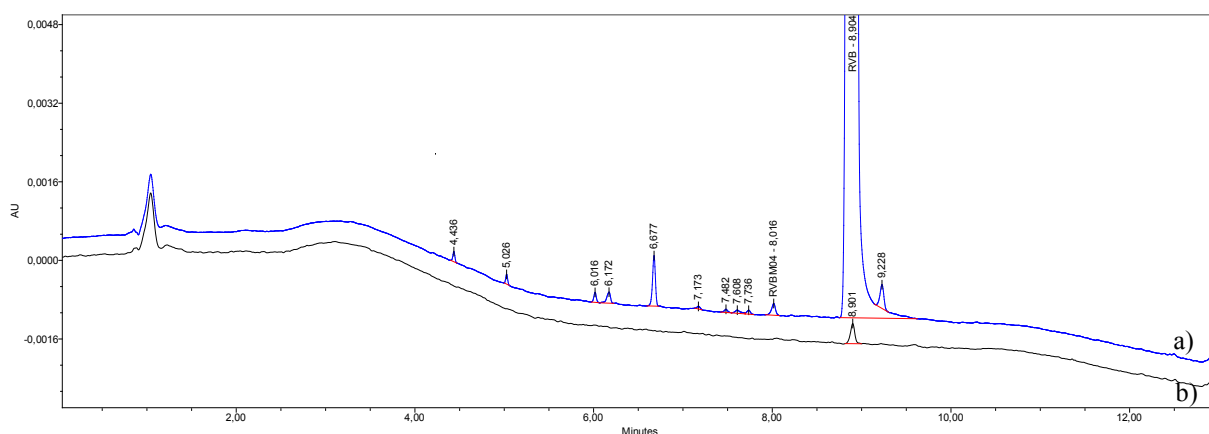


**Obr. 46: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný zahříváním v roztoku, b) nestresovaný vzorek, c) blank**

#### 4.9 Nestresovaný vzorek šarže 76191000312 pro stresy v pevném stavu

Pro stresování RVB v pevném stavu byl použit vzorek jiné šarže, protože v době provádění stresových testů nebyl dostupný oficiální vzorek z výroby. Studované byly proto pouze dvě šarže laboratorních vzorků.

Vzorek šarže 76191000312 byl použit jako srovnávací pro všechny stresy v pevném stavu. V jeho nečistotním profilu (obr. 47) byly nalezeny dvě nečistoty s obsahem větším než 0,04 plošných procent. První nečistota se nacházela v RT 6,68 min (0,08 %) a druhá v RT 9,23 min (0,05 %). Obsah RVB byl v tomto případě 99,8 plošných procent a 100,0 hmotnostních procent. Chromatogram z analýzy metodou na chirální metodu je v příloze6. Obsah R-RVB v nestresovaném vzorku činil 0,01 plošných procent.

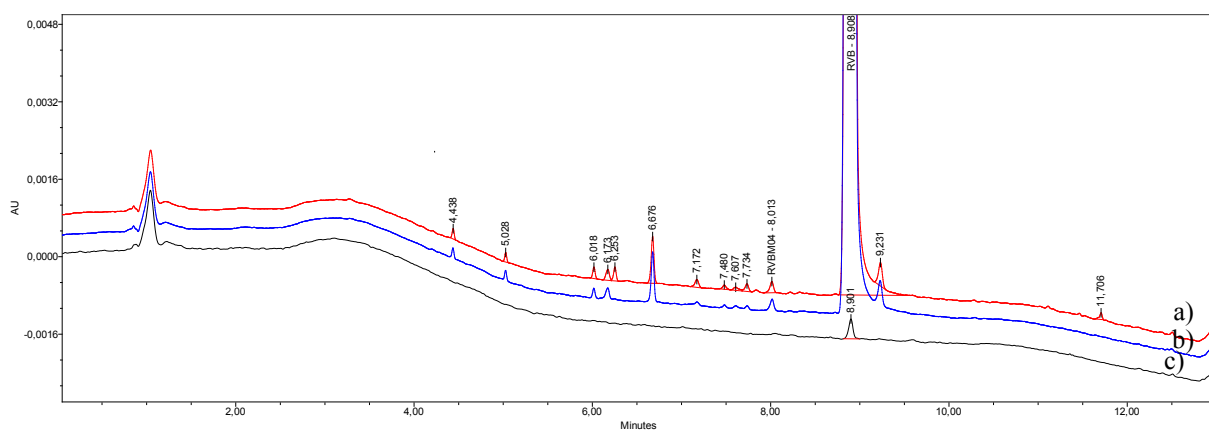


**Obr. 47: Chromatogramy z metody LC1182 a) nestresovaný vzorek, b) blank**

#### 4.10 Vzorek RVB v pevném stavu vystavený UV záření

Vzorek byl vystaven po dobu 7 hod záření o energii  $750 \text{ w/m}^2$  při teplotě  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . V nečistotním profilu (obr. 48) nebyla nalezena žádná nová nečistota s obsahem větším než 0,04 %. Obsah RVB byl v tomto případě 99,7 plošných procent a 99,4 hmotnostních procent. Obsah R-RVB ve stresovaném vzorku činil 0,009 plošných procent.

Z výsledků plyne, že vzorek rivaroxabanu v pevné fázi nepodléhá fotolýze. V průběhu stresu změnil vzorek barvu z původní bílé na světle žlutou.

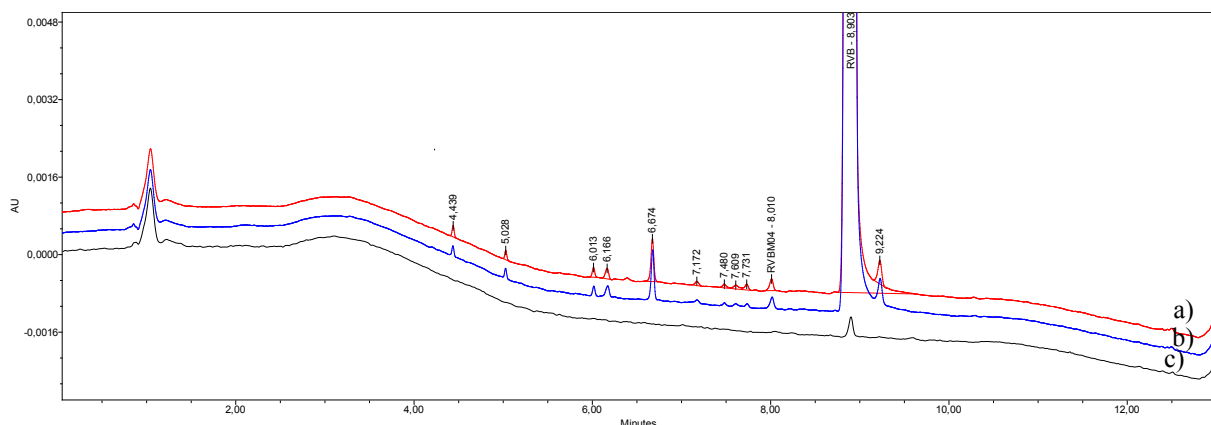


Obr. 48: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek v pevném stavu stresovaný UV zářením, b) nestresovaný vzorek, c) blank

#### 4.11 Vzorek RVB v pevném stavu vystavený teplu

Vzorek byl vystaven po dobu 16 hod zahřívání při teplotě  $130 \text{ }^\circ\text{C}$ . V nečistotním profilu (obr. 49) nebyla nalezena žádná nová nečistota s obsahem větším než 0,04 %. Obsah RVB byl v tomto případě 99,8 plošných procent a 98,9 hmotnostních procent. Obsah R-RVB ve stresovaném vzorku činil 0,004 plošných procent.

Z výsledků plyne, že vzorek rivaroxabanu nepodléhá tepelné degradaci ani v pevném stavu. Vzhled stresovaného vzorku se v průběhu stresu nezměnil.



**Obr. 49: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný teplem, b) nestresovaný vzorek, c) blank**

**Tab. 16: Celkové výsledky metod pro obsah RVB a jeho R-enantiomeru**

Vzorek stresovaný	LC1182	LC1183	LC1184
	Plocha (plošná %)	Plocha (hm. %)	R-RVB (plošná %)
NaOH	90,1	84,4	0,56
UV v roztoku	86,4	84,5	0,55
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	94,4	91,8	0,59
HCl	86,3	94,0	0,55
MnO <sub>2</sub>	99,9	99,7	0,54
Nestresovaný roztok	99,9	100,1	0,54
Teplo roztok	99,9	100,5	0,52
Teplem v pevném stavu	99,8	98,9	0,004
UV v pevném stavu	99,7	99,4	0,01
Nestresovaný pevný stav	99,8	100,0	0,01

**Tab. 17: Hlavní degradační produkty rivaroxabanu LC1182 (píky s plochou > 0,5 %)**

Vzorek stresovaný	RRT 0,46	RRT 0,70	RRT 0,74	RRT 0,75	RRT 0,83
NaOH			7,75	2,02	
UV v roztoku		1,16		9,84	0,66
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,81				
HCl				13,64	

RRT = relativní retenční čas

## 5 Závěr

Teoretická část této práce pojednávala o stabilitě léčivých látek a léčivých přípravků, o testování stability a analytických metodách používaných k jejímu hodnocení. Část teorie byla také věnována rivaroxabanu, který patří mezi nové antikoagulační léčiva do skupiny přímých perorálních inhibitorů aktivovaného Xa faktoru.

V rámci řešení experimentální části byly provedeny stresové testy s léčivou látkou rivaroxabanem. Nejprve byly zoptimalizovány stresové podmínky tak, aby po případné degradaci zůstalo alespoň 80% léčivé látky zachováno. Roztok rivaroxabanu byl vystaven různým extrémním podmínkám, jako je kyselé prostředí, bazické prostředí, oxidační podmínky, UV záření a zahřívání. Vzorek rivaroxabanu v pevném stavu byl vystaven UV záření a zahřívání. Následně byly stresované vzorky analyzovány předepsanou HPLC metodou, u které bylo vyhodnoceno, že je schopná identifikovat nečistoty a degradační produkty rivaroxabanu (je schopná indikovat jeho stabilitu). Rivaroxaban v pevném stavu byl odolný vůči UV záření i zahřívání. Roztok rivaroxabanu nedegradoval při zahřívání, ani v prostředí oxidu manganičitého. Nicméně byl velmi citlivý vůči bazickým podmínkám, kdy byly zformovány dva produkty hydrolyzy. Rivaroxaban hydrolyzoval také v kyselém prostředí za vzniku jednoho degradačního produktu, který byl pozorován také při bazické hydrolyze. Při oxidaci peroxidem vodíku byl pozorován jeden hlavní degradační produkt a devět degradačních produktů zastoupených v menším množství. Působení UV záření vyvolalo tvorbu tří degradačních produktů, z nichž dva byly identifikovány jako izomery rivaroxabanu. Struktury degradačních produktů byly navrhovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením.



## 6 Seznam literatury

- 1 <http://www.ivax.cz/web/structure/profil-firmy-9.html>, staženo 23. března 2015
- 2 Komárek P.; Rabišková M. et al. *Technologie léků. 3. vyd.* Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-423-7
- 3 Vetchý D. et al. Chem. Listy 100, 24 (2006).
- 4 <http://www.ich.org>, staženo 7. dubna 2015.
- 5 Roy A. et al. LC GC EUR 27, 1 (2014).
- 6 ICH Steering Committee: ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2): <http://www.ich.org>, staženo 5. května 2014.
- 7 AHUJA S.; SCYPINSKY S. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis: Volume 3 (Separation Science and Technology)*. Academic Press, USA 2005. ISBN 0-12-045555-2.
- 8 ICH Steering Committee: ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing: Photostability testing of New Drug Substances and Products Q1B: [www.ich.org](http://www.ich.org), staženo 5. května 2014.
- 9 Státní ústav pro kontrolu léčiv: Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci REG-83 (2005): [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz), staženo 20. března 2015.
- 10 Votrubová I.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec králové 2006.
- 11 ICH Steering Committee: ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug substances Q3A(R2): [www.ich.org](http://www.ich.org), staženo 10. března 2015.
- 12 ICH Steering Committee: ICH Harmonised Tripartite Guideline: Specifications – testt procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products Q6A: [www.ich.org](http://www.ich.org), staženo 10. března 2015.
- 13 [http://www.hplc.cz/Teorie/UV\\_VIS\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html), staženo 15. dubna 2015.
- 14 Mostafa, N. M., Abdel-Fattah L., Weshahy S. A., et al.: J AOAC Int 98, 35 (2015).
- 15 Doomkaew A., Prutthiwanasan B., Suntornsuk L.: J Pharmaceut BIOMED 102, 119 (2015).
- 16 Belal F., Sharaf M. K., Eid M. I. et al.: J Chromatogr Sci 53, 603 (2015).
- 17 Duric S. L., Naskovic D. C., Velickovic D. T. et al.: J Anal Chem 70, 225 (2015).
- 18 Singh R., Shakya A., Naik R., et al.: Int J Anal Chem, article number: 862592 (2015).

- 19 Nalwade S., Reddy V.R., Kulkarni D., et al.: J Chromatogr Sci 53, 127 (2015).
- 20 Bapatu H. R., Maram R. K., Murthy R. S.: J Chromatogr Sci 53, 144 (2015).
- 21 Ascaso M., Perez-Lozano P., Garcia M., et al.: J AOAC Int 98, 27 (2015).
- 22 Al-Hawash L. A., Shakya A. K., Saleem M. L.: Int J Anal Chem 2015, 820517 (2015).
- 23 Siddraju S., Sahithi M.: Annales pharmaceutiques francaises 73, 114 (2015).
- 24 Szabo Z. I., Reti Z. Z., Gagy L. et al.: J Chromatogr Sci 53, 424 (2015).
- 25 Marley A., Stalcup A. M., Connoly D.: J Pharmaceut BIOMED 102, 261 (2015).
- 26 Akabari A. H., Shah D. R., Shah S. A.: J LIQ Chromatogr R T 38, 521 (2015).
- 27 Abdel-Ghany M. F., Abdel-Aziz O., Ayad M. F. et al.: J Chromatogr Sci 53, 554 (2015).
- 28 Bodapati K., Vaidya J. R., Siddiraju S. et al.: J LIQ CHromatogr R T 38, 259 (2015).
- 29 Belal T. S., Awad T, Clark C. R.: J AOAC Int 97, 1514 (2014).
- 30 European Medicines Agency: CHMP Assessment Report for Xarelto (2008): [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), staženo 1.března 2015.
- 31 [www.scifinder.com](http://www.scifinder.com), staženo 15. března 2015.
- 32 Roehrig S., Straub A., Pohlman J. et al.: J. Med. Chem. 48, 5900 (2005).
- 33 Gavorník P.: Medikom 1, 20 (2012): [www.lekom.sk](http://www.lekom.sk), staženo 21. března 2015.
- 34 Unger E. F.: Atrial fibrillation and new oral anticoagulant drugs <http://www.fda.gov>, staženo 13. března 2015.
- 35 Ramisetti, N. R.; Kuntamukkala, R.: RSC Adv. 4, 23155 (2014).
- 36 Weinz C., Schwarz T., Kubitz D. et al.: DRUG METAB DISPOS 37, 1056 (2009).
- 37 Lang D., Freundberger C., Weinz C.: DRUG METAB DISPOS 37, 1046 (2009).
- 38 TEVA Standard Operating Procedure: Validation of HPLC Stability Indicating Method (DP-LA-01-017).

## 7 Seznam tabulek

Tab. 1: Typy stabilitních studií, aplikované podmínky a doba testování .....	5
Tab. 2: Hodnocení stability léčivých přípravků <sup>3</sup> .....	6
Tab. 3: Přehled vybraných stabilitu indikujících chromatografických metod.....	12
Tab. 4: Stresové podmínky a výsledky stresování rivaroxabanu <sup>35</sup> .....	16
Tab. 5: Průběh gradientu mobilní fáze .....	25
Tab. 6: Parametry nastavené pro hmotnostní spektrometrii .....	25
Tab. 7: Průběh gradientu mobilní fáze .....	26
Tab. 8: Parametry nastavené pro hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením.....	26
Tab. 9: Konečné stresové podmínky .....	27
Tab. 10: Hodnocení kritérií testu způsobilosti.....	29
Tab. 11: Hodnocení kritérií testu způsobilosti.....	31
Tab. 12: Hodnocení kritérií testu způsobilosti.....	32
Tab. 13: Výsledky hodnocení čistoty píku s použitím parametrů: A)....Purity Angle (0,090) a Match Angle (0,009); B)....Purity Angle (0,048) a Match Angle (0,010).....	37
Tab. 14: Výsledky hodnocení čistoty píku s použitím parametrů: Purity Angle (0,048) a Match Angle (0,008).....	37
Tab. 15: Zjištěné sumární vzorce degradačních produktů stresu peroxidem .....	46
Tab. 16: Celkové výsledky metod pro obsah RVB a jeho R-enantiomeru.....	55
Tab. 17: Hlavní degradační produkty rivaroxabanu LC1182 (píky s plochou > 0,5 %).....	55

## 8 Seznam obrázků

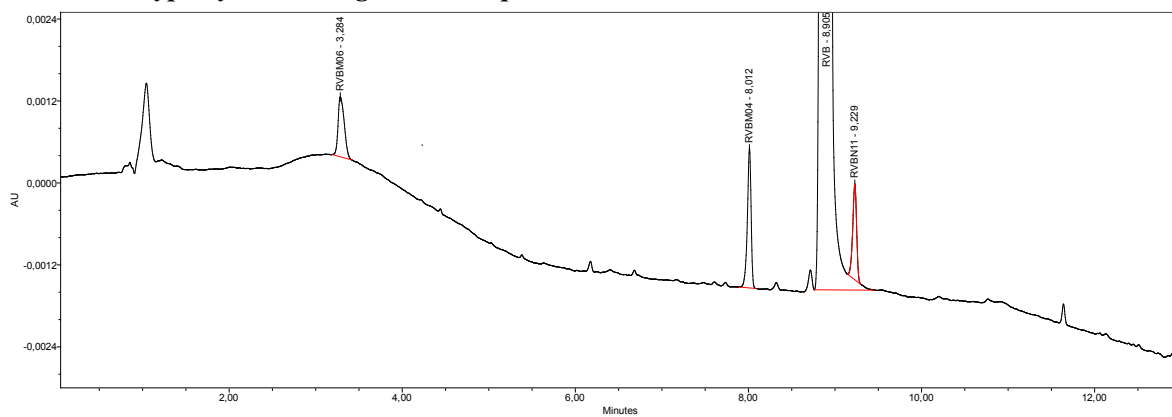
Obr. 1: Schéma PDA detektoru <sup>13</sup> .....	10
Obr. 2: Molekula rivaroxabanu <sup>31</sup> .....	13
Obr. 3: Balení tablet Xarelto obsahujících rivaroxaban jako účinnou látku <sup>35</sup> .....	14
Obr. 4: Navrhované fragmentační cesty molekulárního iontu RVB. <sup>35</sup> .....	17
Obr. 5: Navrhované fragmentační cesty molekulárního iontu produktu hydrolyzy ozn. DP-1.(cit. <sup>35</sup> ).....	18
Obr. 6: Metabolismus RVB in vitro <sup>37</sup> .....	21
Obr. 7: Struktury vybraných metabolitů navrhnuté na základě MS a NMR .....	22
Obr. 8: Chromatogram základní linie mobilní fáze pro metody LC1182 a LC1183.....	33
Obr. 9: UV spektrum mobilní fáze pro metody LC1182 a LC1183 ve 40. minutě s vloženým detailem UV spektra s vyznačenou cut-off hodnotou .....	33
Obr. 10: Chromatogram základní linie mobilní fáze pro metodu LC1184 .....	34
Obr. 11: UV spektrum mobilní fáze pro metodu LC1184 ve 40. minutě s vloženým detailem UV spektra s vyznačenou cut-off hodnotou .....	34
Obr. 12: Chromatogram standardu RVB v zobrazení maxplot. ....	35
Obr. 13: Chromatogramy z metody LC1182 a) nestresovaný vzorek, b) blank.....	38
Obr. 14: UV spektrum rivaroxabanu z metody LC1182 .....	38
Obr. 15: Chromatogramy z chirální metody LC1184 a) nestresovaný vzorek, b) blank .....	38
Obr. 16: MS spektrum z chromatografické separace nestresovaného vzorku RVB o koncentraci 20 µg/ml v retenčním čase 4,58 min. ....	39
Obr. 17: MS/MS spektrum iontu m/z 436 .....	39
Obr. 18 : Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný HCl, b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	40
Obr. 19: UV spektrum DP-1 s RT 6,67 min z metody LC1182 .....	40
Obr. 20: Chromatogramy z chirální metody LC1184 a) vzorek stresovaný HCl, b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	40
Obr. 21: Chromatogram zaznamenaný metodou LC-HRMS: a) vzorek stresovaný HCl, b) vzorek stresovaný NaOH, c) nestresovaný vzorek RVB.....	41
Obr. 22: MS spektrum DP-1 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného HCl v retenčním čase 3,85 min. ....	42

Obr. 23: MS/MS spektrum iontu m/z 454 (DP-1).....	42
Obr. 24: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný NaOH, b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	43
Obr. 25: Detail píků degradačních produktů DP-2 a DP-1 stresu v prostředí NaOH.....	43
Obr. 26: UV spektra degradačních produktů vlevo DP-2 s RT 6,62, vpravo DP-1 s RT 6,68 min z metody LC1182 .....	43
Obr. 27: MS spektrum DP-2 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného NaOH v retenčním čase 4,07 min. ....	44
Obr. 28: MS/MS spektrum iontu m/z 410 (DP-2).....	44
Obr. 29: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	45
Obr. 30: Detail píků degradačních produktů stresu v prostředí H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	45
Obr. 31: UV spektrum hlavního degradačního produktu v RT 4,09 min z metody LC1182 ...	46
Obr. 32: MS spektrum DP-3 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v čase .....	47
Obr. 33: MS/MS spektrum iontu m/z 309 (DP-3).....	47
Obr. 34: MS spektrum DP-4 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	47
Obr. 35: MS/MS spektrum iontu m/z 364 (DP-4).....	47
Obr. 36: MS spektrum DP-5 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	48
Obr. 37: MS/MS spektrum iontu m/z 468 (DP-5).....	48
Obr. 38: Chromatogram zaznamenaný metodou LC-HRMS .....	48
Obr. 39: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný MnO <sub>2</sub> , b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	49
Obr. 40: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný UV zářením b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	50
Obr. 41: Detail píků degradačních produktů při stresu UV zářením.....	50
Obr. 42: UV spektrum degradačních produktů vlevo s RT 6,25, vpravo s RT 6,69 min a dole s RT 7,37 min.....	51
Obr. 43: Detail chromatogramu zaznamenaného metodou HR-MS při stresu UV .....	52
Obr. 44: MS spektrum DP-7 z chromatografické separace vzorku RVB stresovaného UV ....	52
Obr. 45: MS/MS spektrum iontu m/z 402 (DP-7).....	52

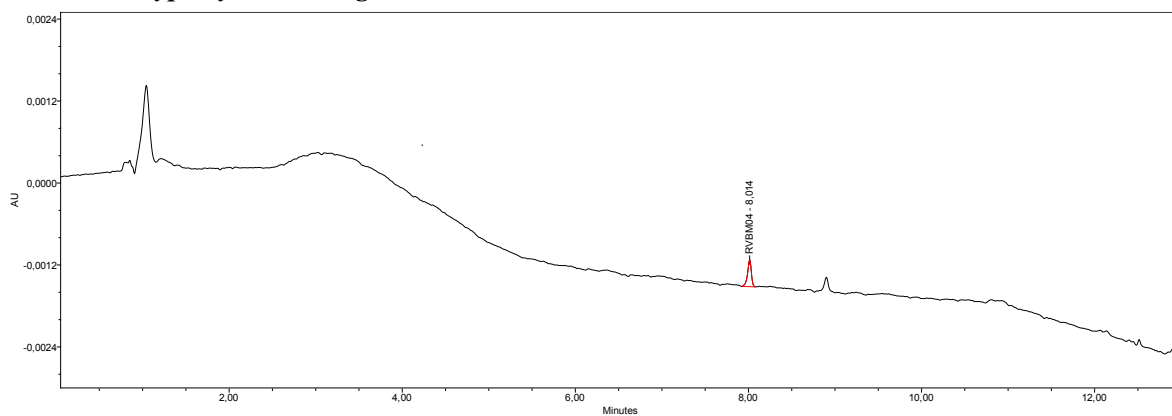
Obr. 46: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný zahříváním v roztoku, b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	53
Obr. 47: Chromatogramy z metody LC1182 a) nestresovaný vzorek, b) blank.....	53
Obr. 48: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek v pevném stavu stresovaný UV zářením, b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	54
Obr. 49: Chromatogramy z metody LC1182 a) vzorek stresovaný teplem, b) nestresovaný vzorek, c) blank .....	55

## 9 Přílohy

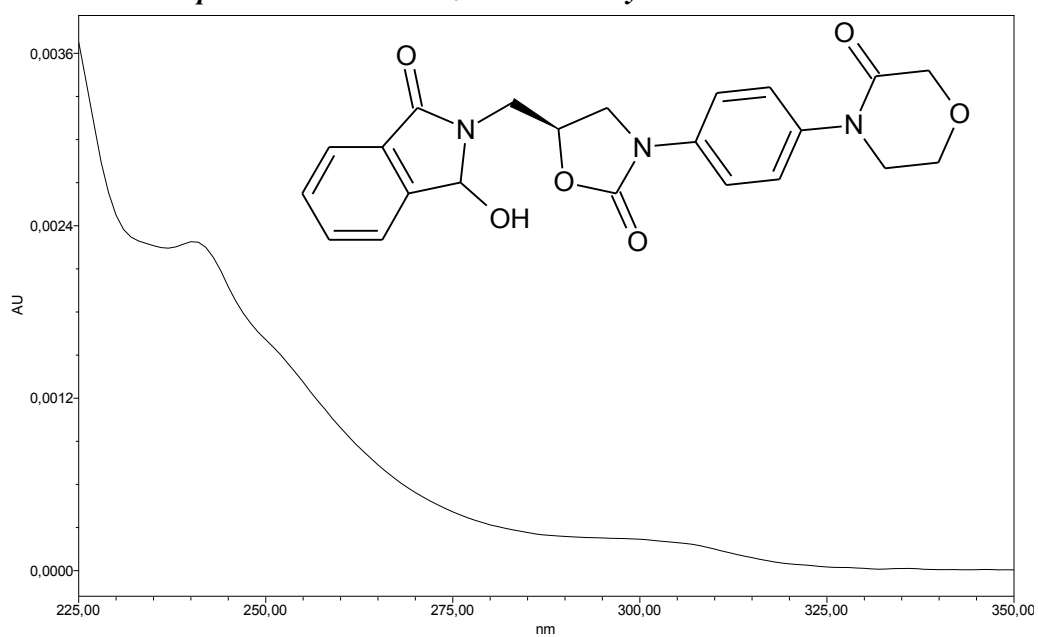
**Příloha 1: Typický chromatogram testu způsobilosti**



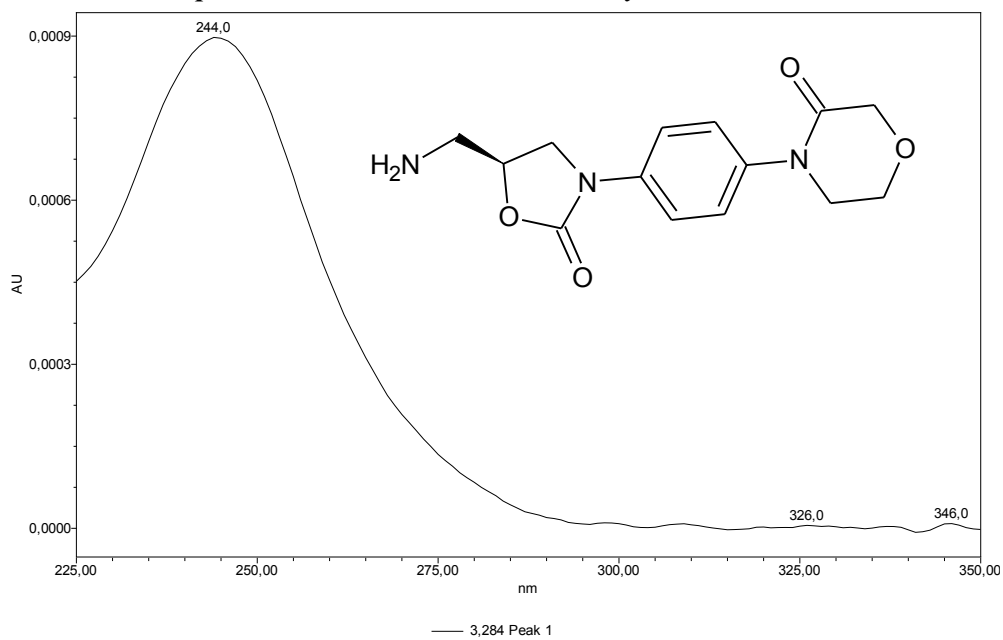
**Příloha 2: Typický chromatogram testu citlivosti**



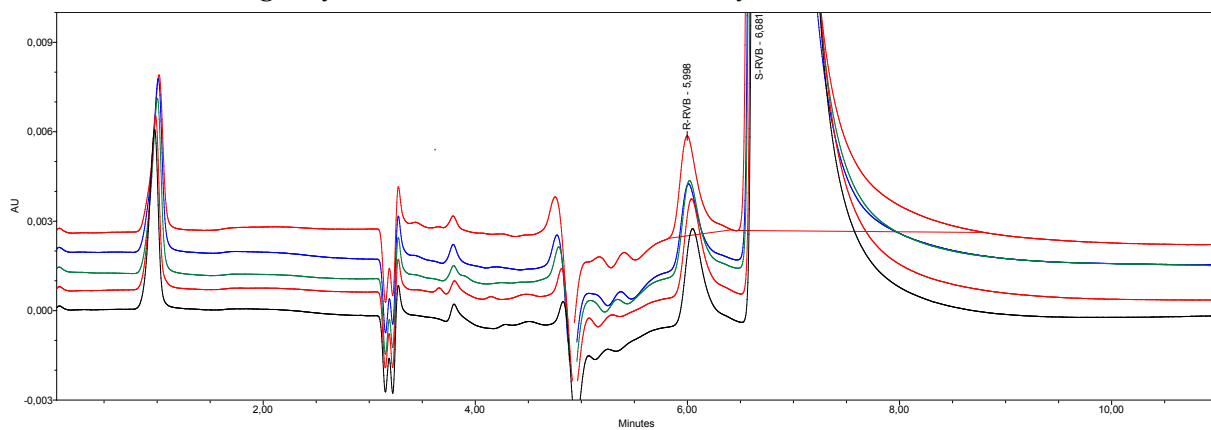
**Příloha 3: UV spektrum a struktura známé nečistoty RVBM04**



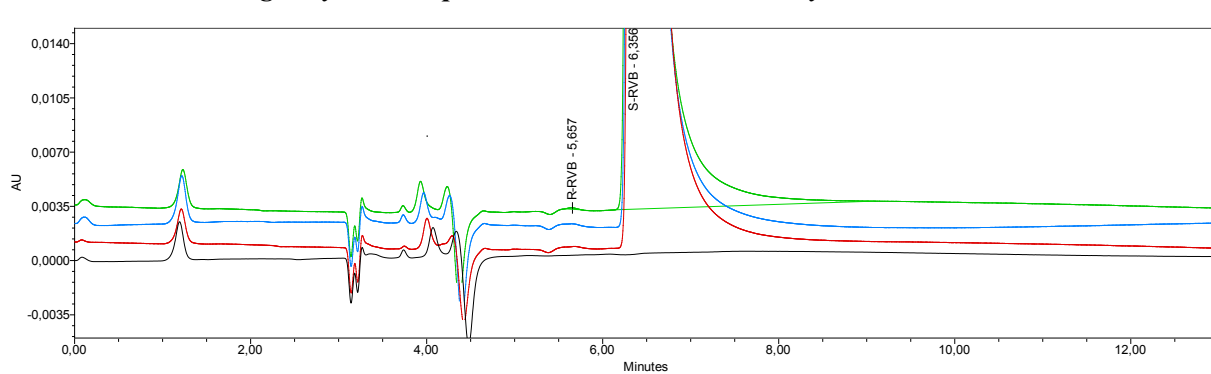
**Příloha 4: UV spektrum a struktura známé nečistoty RVBM06**



**Příloha 5: Chromatogramy stresů v roztoku z chirální metody LC1184**

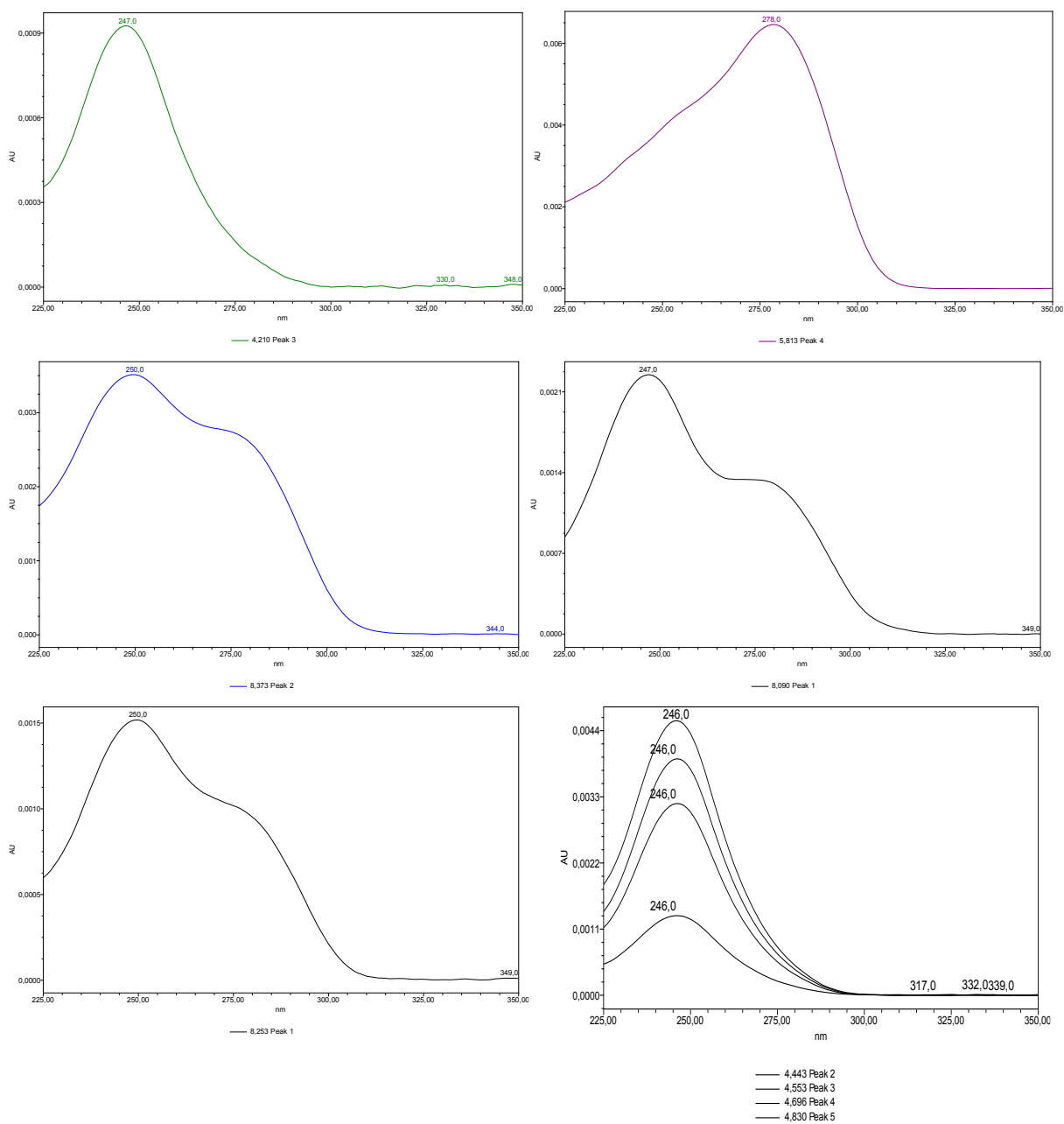


**Příloha 6: Chromatogramy stresů v pevném stavu z chirální metody LC1184**

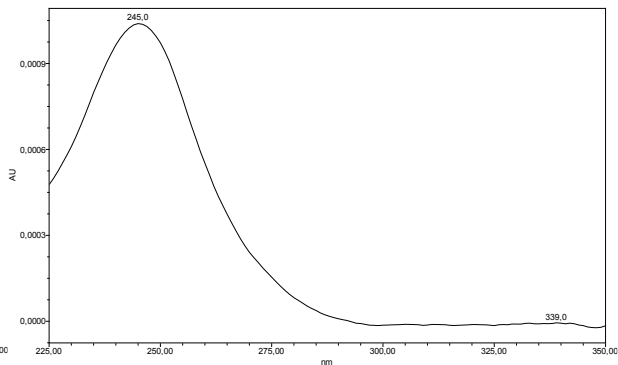
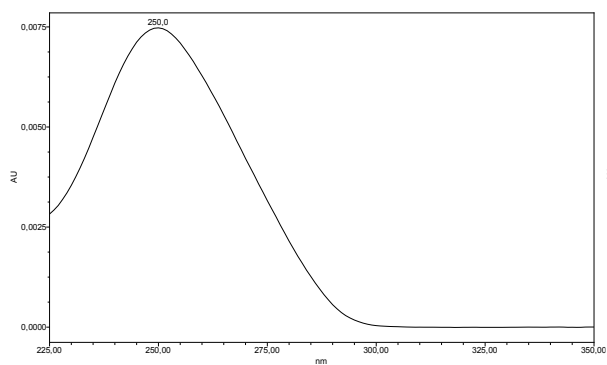




**Příloha 7: UV spektra degradačních produktů s obsahem v rozmezí 0,1 až 0,5 plošných procent ze stresu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

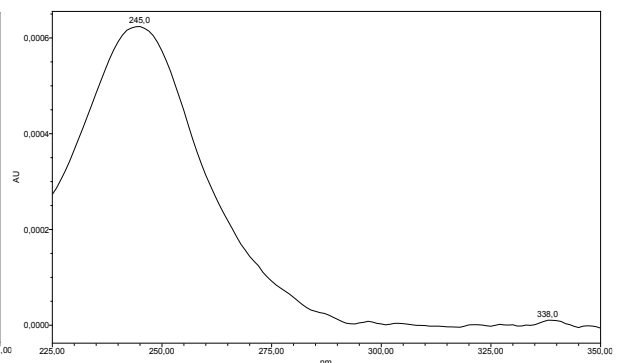
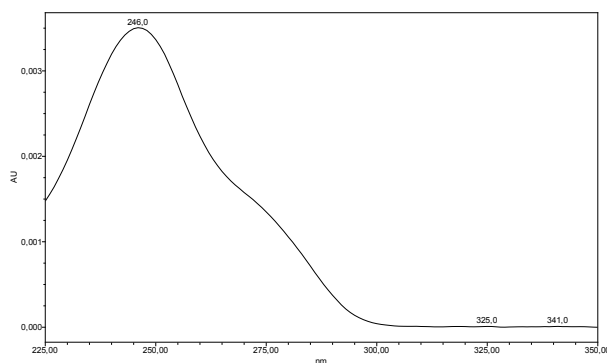


**Příloha 8: UV spektra degradačních produktů s obsahem v rozmezí 0,1 až 0,7 plošných procent ze stresu UV zářením**



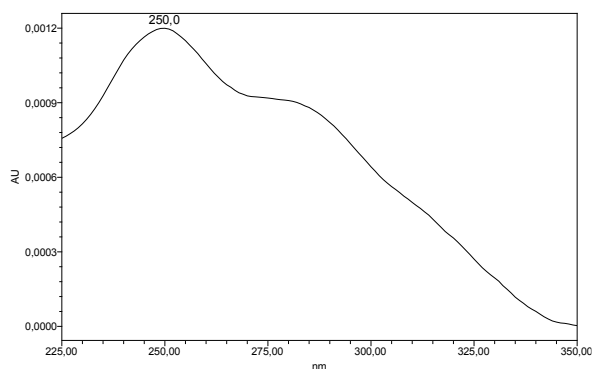
— 7,364 Peak 1

— 4,101 Peak 1



— 5,238 Peak 1

— 3,284 Peak 1



— 10,811 Peak 3

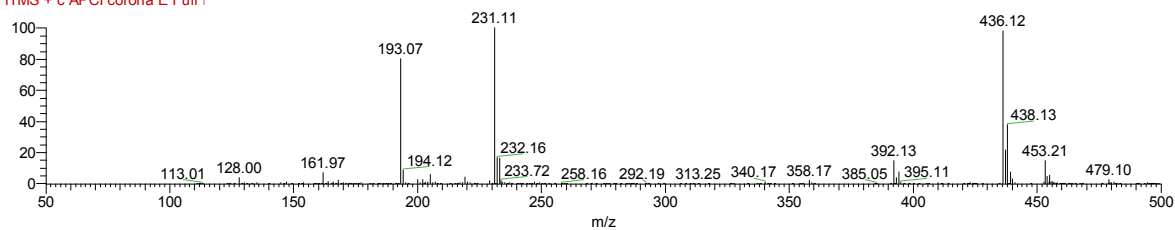
## Příloha 9: Hmotnostní spektra nestresovaného RVB

B:\Analytical department\...rvb\_file03  
in MeOH

26.8.2014 17:46:05

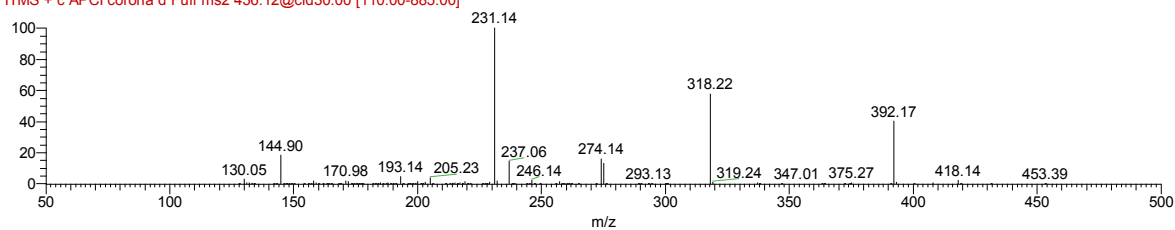
ABR

rvb\_file03 #498 RT: 9.65 AV: 1  
F: ITMS + c APCI corona E Full



rvb\_file03 #493 RT: 9.58 AV: 1 NL: 1.40E5

F: ITMS + c APCI corona d Full ms2 436.12@cid30.00 [110.00-885.00]



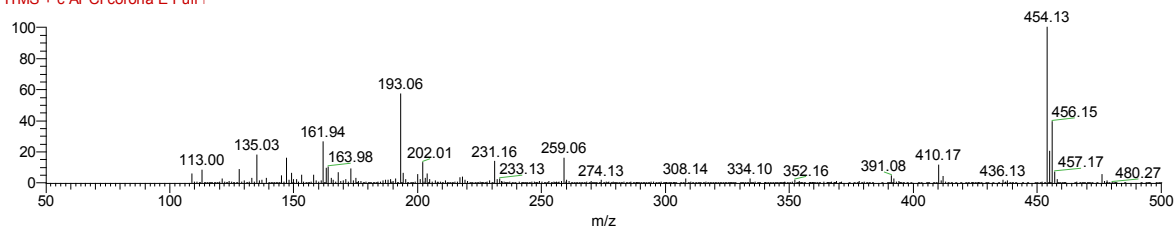
## Příloha 10: Hmotnostní spektra nečistoty při HCl stresu

B:\Analytical department\...rvb\_file03  
in MeOH

26.8.2014 17:46:05

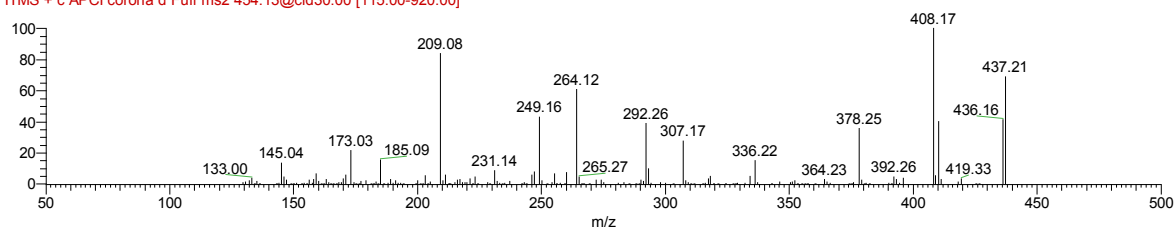
ABR

rvb\_file03 #417 RT: 8.07 AV: 1  
F: ITMS + c APCI corona E Full



rvb\_file03 #418 RT: 8.11 AV: 1 NL: 1.88E3

F: ITMS + c APCI corona d Full ms2 454.13@cid30.00 [115.00-920.00]



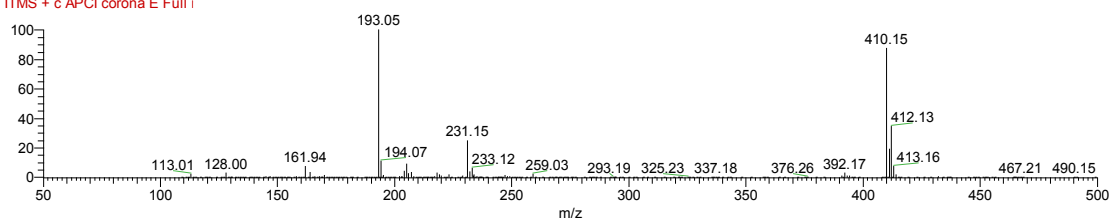
### Příloha 11: Hmotnostní spektra nečistoty při NaOH stresu - RT 6,62 min

B:\Analytical department\...rvb\_file04  
in MeOH

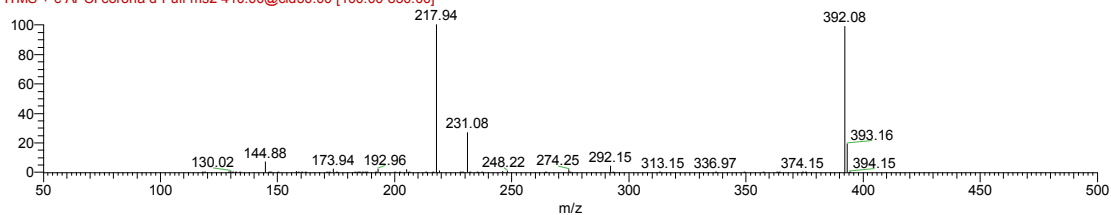
26.8.2014 18:02:47

ABR

rvb\_file04 #433 RT: 8.41 AV: 1  
F: ITMS + c APCI corona E Full



rvb\_file04\_2 #766 RT: 8.31 AV: 1 NL: 1.20E6  
F: ITMS + c APCI corona d Full ms2 410.00@cid30.00 [100.00-830.00]



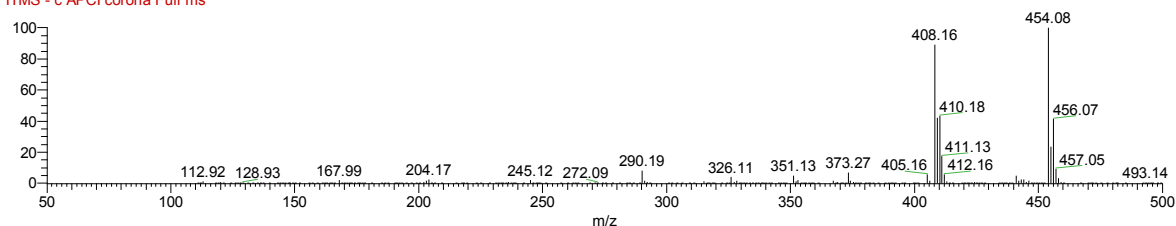
### Příloha 12: Hmotnostní spektra nečistoty při NaOH stresu - RT 6,68 min

B:\Analytical department\...rvb\_file04  
in MeOH

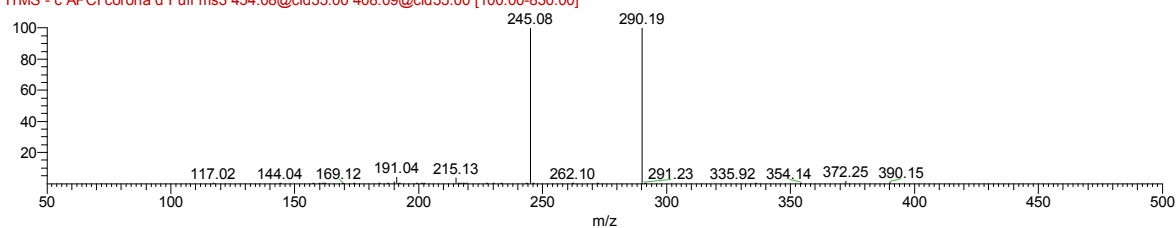
26.8.2014 18:02:47

ABR

rvb\_file04 #430 RT: 8.35 AV: 1  
F: ITMS - c APCI corona Full ms



rvb\_file04 #432 RT: 8.39 AV: 1 NL: 2.29E5  
F: ITMS - c APCI corona d Full ms3 454.08@cid35.00 408.09@cid35.00 [100.00-830.00]

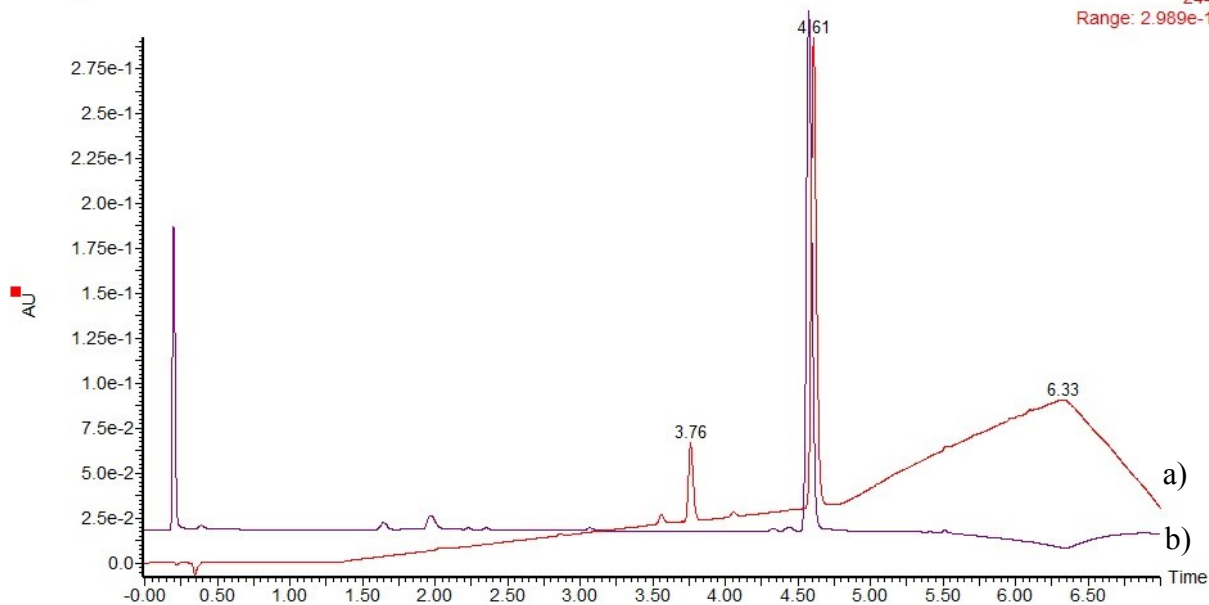


**Příloha 13: Hmotnostní spektra nečistot ze stresu peroxidem - Chromatogram stres UV (a) a H2O2 (b)**

rivaroxaban 20 ug/ml stres UV TEVA 90 min

hlistova\_00021

3: Diode Array  
244  
Range: 2.989e-1



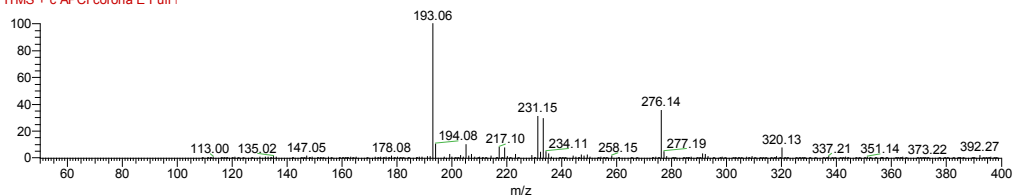
**Příloha 14: Hmotnostní spektra hlavní nečistoty stresu peroxidem**

B:\Analytical department\...rvb\_file01  
in MeOH

26.8.2014 17:12:39

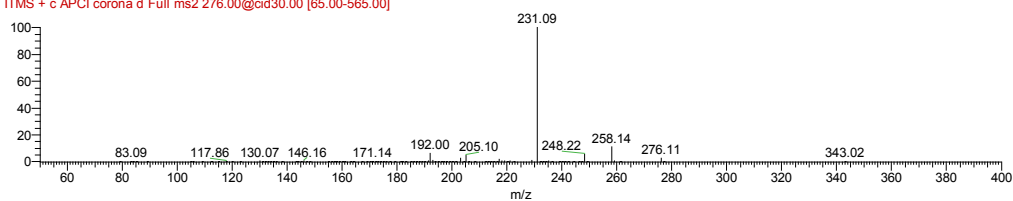
ABR

rvb\_file01 #206 RT: 3.93 AV: 1  
F: ITMS + c APCI corona E Full



rvb\_file01\_2 #339 RT: 3.92 AV: 1 NL: 3.63E4

F: ITMS + c APCI corona d Full ms2 276.00@cid30.00 [65.00-565.00]



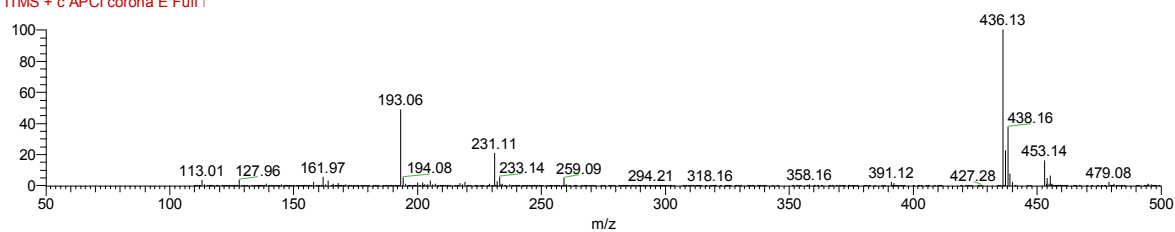
### Příloha 15: Hmotnostní spektra nečistoty ze stresu UV v roztoku

B:\Analytical department\...rvb\_file07  
in MeOH

26.8.2014 18:52:57

ABR

rvb\_file07 #359 RT: 7.06 AV: 1  
F: ITMS + c APCI corona E Full i



rvb\_file07 #360 RT: 7.10 AV: 1 NL: 1.08E6

F: ITMS + c APCI corona d Full ms2 436.13@cid30.00 [110.00-885.00]

