

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2023

Martin Hána

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Antikoagulanty – možnosti fotochemické degradace

Bakalářská práce

Martin Hána

Školitelka: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

Školitelka – specialistka: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice

2023

Hána, M., 2023: Antikoagulanty – možnosti fotochemické degradace. [Anticoagulants – possibilities of photochemical degradation Bc. Thesis, in Czech] – 36 pp, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The thesis is focused on the group of drugs used as anticoagulants, mainly on two representatives of the group, warfarin, and dabigatran.

In the theoretical section, the following parts are presented: history of the anticoagulants, characteristics of warfarin and dabigatran, HPLC methods used for the determination of warfarin and dabigatran, concentrations of the drugs in natural surface waters, and possibilities of their photochemical degradation.

The experimental part contains first the introduction of the HPLC methods for warfarin and dabigatran and second tests of photochemical degradation of the drugs under the light conditions relevant to natural low-wavelength solar radiation conditions.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 14.3.2023

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc., za odborné vedení a konzultace při vypracovávání mé bakalářské práce, za přístup, ochotu, věnovaný čas, trpělivost a za pohodovou atmosféru. Dále bych rád poděkovala Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D., za odbornou pomoc při zavádění HPLC metody, za přístup, ochotu a věnovaný čas.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Využití a vývoj antikoagulantů	1
1.2 Charakteristika warfarinu	3
1.3 Charakteristika dabigatranu	4
1.4 HPLC stanovení warfarinu	5
1.5 HPLC stanovení dabigatranu	9
1.6 Základní veličiny pro popis chromatografické separace	11
1.7 Koncentrace antikoagulantů v přírodních vodách	13
1.8 Možnost fotochemické degradace	15
2. Materiály a metody	17
3. Výsledky a diskuze	19
3.1 Vývoj a optimalizace metody pro preparát warfarin	19
3.2 Vývoj a optimalizace metody pro preparát dabigatran	20
3.3 Fotochemická degradace warfarinu	23
3.4 Fotochemická degradace dabigatranu	26
4. Závěr	28
5. Seznam použité literatury	29

Seznam použitých zkratek

- ACN – acetonitril
- ČOV – čistička odpadních vod
- HPLC – (High Performance Liquid Chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- IUPAC – (International Union of Pure and Applied Chemistry) – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
- LMWH – (Low Molecular Weight Heparins) – nízkomolekulární hepariny
- MF – mobilní fáze
- MFA – mobilní fáze A
- MFB – mobilní fáze B
- NOACs – (Novel Oral Anticoagulants) – nové perorální antikoagulanty
- UHPLC – (Ultra High-Performance Liquid Chromatography) – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Cíl práce

Cílem práce bylo provést rešerši na téma antikoagulanty, jejich funkce, výskyt v přírodních vodách a možnosti jejich fotochemické degradace, zavést HPLC metodu pro stanovení warfarinu a dabigatranu a otestovat možnost fotochemické degradace warfarinu a dabigatranu při ozařování za podmínek relevantních přírodním vodám.

1. Úvod

1.1 Využití a vývoj antikoagulantů

Antikoagulační léčba se poprvé objevila na začátku 20. století (Weitz1 & Harenberg, 2017). Jejím hlavním cílem je prevence a léčba tromboembolické nemoci, která stále patří mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí v průmyslově rozvinutých zemích (Novotný, 2006). Uvádí se, že srdeční infarkt a mrtvice mají na svědomí jedno ze čtyř úmrtí na celém světě, proto vývoj v oblasti trombózy je stále prioritní (Weitz1 & Harenberg, 2017).

Jako první přípravek k zamezení srážení krve byl požíván nefrakcionovaný standardní heparin (Kvasnička, 2012). Nefrakcionovaný standardní heparin je směs mukopolysacharidových řetězců, které svou vazbou na koagulační faktory způsobují inhibici koagulační kaskády (Malý, 2004). Molekulární hmotnost nefrakcionovaných heparinů je v rozmezí 3000 až 40000 daltonů (Malý, 2004). Využití nefrakcionovaného heparinu bylo efektivní, ale musel být podáván nitrožilně a vyžadoval přísný monitoring koagulace, což neumožňovalo terapii mimo nemocnici (Weitz1 & Harenberg, 2017). Později se přešlo k použití nízkomolekulárních heparinů (LMWH) a přípravku fondaparinux, což je syntetický pentasacharid, který obsahuje specifické úseky molekul heparinu a působí stejným mechanismem jako heparin, tedy vazbou a inhibicí faktoru Xa (Kvasnička, 2012). Faktor Xa má výsadní postavení v katalýze konverze protrombinu na trombin. Aktivace faktoru Xa je společným uzlem „vnitřní“ i „vnější“ cesty koagulační kaskády (Kvasnička, 2012).

Fondaparinux a LMWH lze podávat subkutánně a jejich dávku lze upravovat dle hmotnosti (Weitz1 & Harenberg, 2017). Léčba pomocí těchto přípravků nevyžaduje nemocniční terapii. Další výhodou je snížení rizika trombocytopenie (Weitz1 & Harenberg, 2017).

Pro dlouhodobé používání bylo nutností vyvinout přípravek, který se bude naproti dříve zmíněným přípravkům užívat perorálně. Byl objeven wafrarin, který působí jako antagonist vitamínu K. Warfarin vstupuje do cyklu vitamínu K, kde dochází k jeho inhibici. To má za následek zvýšenou jaterní produkci karboxylovaných a dekarboxylovaných proteinů se sníženou antikoagulační funkcí (Hirsh et al., 2001). Warfarin je v současné době nejvíce předepisovaný antikoagulant. Dlouho dobou byl také jediným schváleným přípravkem pro dlouhodobou léčbu (Melnikova et al., 2009). Používání warfarinu mělo značné úspěchy, u pacientů s fibrilací síní snižuje výskyt mrtvice o 64 % (Melnikova et al., 2009).

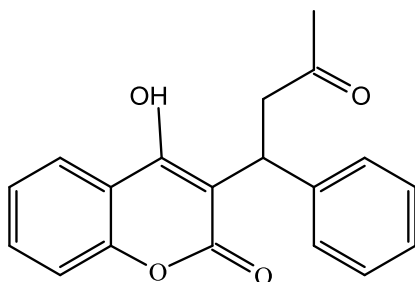
Problémem je však jeho pomalý nástup a rychlé odeznění účinku. Warfarin vyžaduje individuální dávkování, které je závislé na metabolismu, na rozdílném příjmu vitamínu K v potravě a na genetické variabilitě pacienta (Weitz1 & Harenberg, 2017).

Tyto nedostatky podnítily vznik nových perorálních antikoagulací (NOACs), které cíleně působí na koagulační enzymy. Tyto přípravky byly získány z hematofágních organismů (tedy organismů využívajících krev jako zdroj potravy) aplikací rekombinátních DNA (Hirsh et al., 2005). Na dnešním trhu lze tedy nalézt mnoho bezpečných a efektivních léčiv. NOACs postupně nahrazují klasické přípravky. Hlavní výhodou je absence vedlejších účinků, jako je například indukovaná trombocytopenie či osteoporóza (Novotný, 2006).

Další uplatnění antikoagulanty nacházejí jako biocidy. Používají se k hubení hlodavců, kteří jsou významní přenašeči zvířecích a lidských chorob, například leptosporózy, trichinelózy a salmonelózy. Ke kontrole hlodavců dochází v zemědělství, v domácí aplikaci a v městské a kanalizační infrastruktuře. V současné době se používá osm antikoagulačních přípravků na hubení hlodavců (Gómez et al., 2014 A). Do první generace antikoagulancií řadíme látky s maximálními přípustnými koncentracemi aktivní složky v návnadách 0,079 % (warfarin), 0,0375 % (coumatetralyl) a 0,005 % (chlorofacinon). Do druhé generace přípravků řadíme látky s maximálními přípustnými koncentracemi aktivní složky v návnadách 0,0075 % (difenacoum), 0,005 % (bromadiolon, brodifacoum, flokumafen) a 0,0025 % (difethialon) (Regnery et al., 2019).

1.2 Charakteristika warfarinu

Molekula warfarinu má sumární vzorec $C_{19}H_{16}O_4$ se systematickým názvem 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)chromen-2-one dle IUPAC (PubChem, 2023). Jeho struktura je znázorněna na Obr. 1. Warfarin je antagonist vitamínu K, který hraje zásadní roli v karboxylaci kyseliny glutamové. Jeho inhibice vede k produkci proteinů se sníženou koagulační funkcí (Hirsh et al., 2001).



Obr. 1: Strukturní vzorec warfarinu.

Valente et al. (1977) objevil přítomnost tří vzájemně přeměňujících se tautomerních struktur v roztoku. V roztoku jsou přítomny dvě diastereomerní cyklické formy (S a R enantiomery). Třetí složku tvoří necyklická otevřená forma, která je však zastoupena minoritně (Valente et al., 1977). V krystalické formě se objevují pouze cyklické formy.

Warfarin je klinicky podáván jako racemická směs jeho dvou opticky aktivních izomerů (Holford et al., 1986). S-warfarin je pětikrát účinnější jako antagonist vitamínu K než R-izomer (Hirsh et al., 2001). Podává se perorálně, je rychle vstřebáván v trávicím traktu. Maximální koncentraci v krvi dosahuje během 90 minut po použití (Hirsh et al., 2001). V krvi se váže na proteiny krevní plazmy, nejvíce se váže na albumin. Spektroskopické měření naznačuje, že se warfarin na albumin váže jako ionizovaná forma tautomeru s otevřeným řetězcem (Porter et al., 2010). Warfarin má biologický poločas 36-42 hodin (Hirsh et al. 2001).

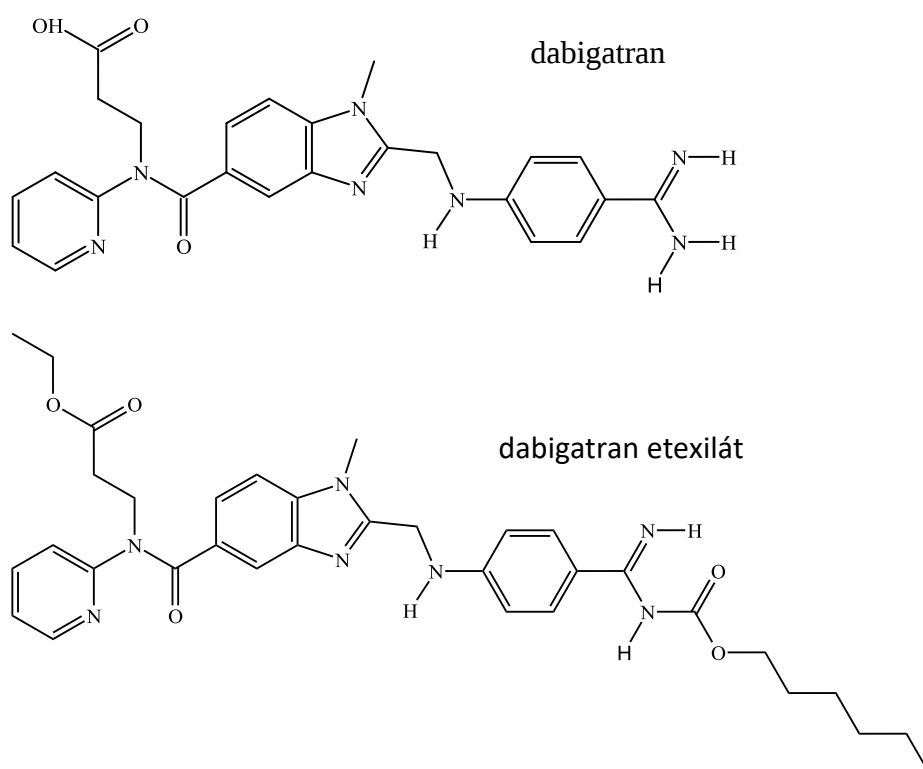
Oba enantiomery jsou metabolizovány v játrech pomocí cytochromu P-450. Cytochrom P-450 obsahuje různé izoenzymy, které mají různou citlivost pro každý z enantiomerů warfarinu (Porter et al., 2010). K eliminování warfarinu dochází pomocí

jaterního metabolismu s malou clearance¹ (0,2 l/h/70 kg) (Holford et al., 1986). V moči se vyskytuje pouze stopové množství.

Dávka warfarinu vyžaduje neustálé sledování a přizpůsobování z důvodu jeho interakce s jinými léčivy a v závislosti na množství vitamínu K v potravě (Hirsh et al., 2001). Dávka také reflektuje genetické odlišnosti jedince.

1.3 Charakteristika dabigatranu

Molekula dabigatranu má sumární vzorec $C_{25}H_{25}N_7O_3$ se systematickým názvem 3-[[2-[(4-carbamimidoylanilino)methyl]-1-methylbenzimidazole-5-carbonyl]-pyridin-2-ylamino]propanol acid dle IUPAC (PubChem, 2023). Strukturní vzorec dabigatranu a dabigatran etexilátu je zobrazen na Obr. 2. (PubChem, 2023). Dabigatran je přímý inhibitor trombinu, používaný pro prevenci hluboké žilní trombózy u pacientů, kteří podstoupili náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu (Ebner et al., 2010).



Obr. 2: Porovnání struktur dabigatranu a dabigatran etexilátu.

¹ Clearance je množství plazmy, které se očistí ledvinami od určité látky za jednotku času.

Dabigatran je polární sloučenina, která není vhodná pro perorální aplikaci (distribuční koeficient² při pH=7,4 je 0,6) (Ebner et al., 2010). Dabigatran se podává ve formě fyziologicky neaktivního dabigatran etexilátu a to buď v roztoku s kyselinou vinnou nebo ve formě tablet, kde jsou mikropolety s kyselinou vinnou a dabigatran etexilátem. Tak je vytvořeno kyselé mikroprostředí, které podporuje rozpouštění a absorpci dabigatran etexilátu a absorpci činí nezávislou na různých hodnotách pH v trávicím traktu (Stangier, 2008). Proto se dabigatran podává ve formě proléčiva (dabigatran etexilát), který je v organismu pomocí esteráz rychle hydrolyzován na dabigatran (Ebner et al., 2010). Po perorální podání dabigatran etexilátu dochází k hydrolyze (hydrolyza ethylesteru a hexyloxykarbonylové skupiny) za vzniku dabigatranu prostřednictvím dvou meziproduktů (Blech et al., 2008). Maximální koncentrace v plazmě dosáhne cca 1,5 hodiny po požití.

Oxidace dabigatranu pomocí cytochromu P-450 nehraje zásadní roli. Hlavním metabolickou dráhou dabigatranu u člověka je konjugace s kyselinou D-glukuronovou za vzniku acylglukuronid karboxylové funkční skupiny (Ebner et al., 2010). Ke glukuronidaci dochází ve střevních a jaterních mikrosomech přibližně u 20 % dabigatranu. Ebner et al. (2010) objevili výskyt čtyř izomerních acylglukuronidů dabigatranu. Byly objeveny 1-O-acylglukuronid (β anomer) a 2-O-, 3-O- a 4-O-acylglukuronidy (α a β anomery) (Ebner et al., 2010).

Proléčivo dabigatran etexilát se podává perorálně. Veškeré množství dabigatran etexilátu je katalyticky přeměno na dabigatran, pouze stopové množství dabigatran etexilátu se objevuje v moči ale nikoli ve stolici (Blech et al., 2008). Ke glukuronidaci dochází přibližně u 20 % dabigatranu za vzniku farmakologicky aktivních metabolitů (Ebner et al., 2010). Ostatních 80 % dabigatranu je vylučováno v nezměněné podobě pomocí ledvin (Saffian et al., 2015). Biologická dostupnost dabigatranu byla stanovena na 7,2 %. Biologický poločas byl průměrně 8 hodin (Blech et al., 2008).

1.4 HPLC stanovení warfarinu

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejpoužívanějších metod ke stanovení warfarinu. Nejčastěji se využívá při stanovení warfarinu ve vzorcích krevní plazmy (Lomonaco et al., 2013), (Boppana et al., 2002), (Sun et al., 2006).

² Distribuční koeficient (LogD) je hodnota udávající lipofilitu ionizovatelných sloučenin. Lipofilita je důležitou vlastností léčiv, hraje roli v rozpustnosti, absorpci, odbourávání.

Pomocí HPLC lze také stanovit množství warfarinu v odpadní vodě (Gómez et al., 2014 B) nebo ve vzorcích půdy (Medvedovici et al., 1997). Při HPLC analýze vzorků s obsahem warfarinu byla nejčastěji použita chromatografická kolona se stacionární fází C18 (Medvedovici et al., 1997), (Gómez et al., 2014 B), (Lomonaco et al., 2013). Byla použita také kolona s náplní C8 (Lombardi et al., 2003). Velice variabilní byla délka kolony, která reflektovala záměr analýz. Jako mobilní fáze (MF) byl použit vodný roztok fosforečnanu draselného, mravenčanu amonného, kyseliny octové, popřípadě voda okyselená kyselinou fosforečnou a z organických rozpouštědel se používal methanol nebo acetonitril. Lišil se také způsob detekce, pomocí UV detekce byl warfarin stanovován při vlnových délkách 280 nm (Chua et al., 2018). Objevila se také detekce pomocí fluorescence (Boppana et al. 2002), elektrochemická detekce (Wang & Bonakdar, 1987), hmotnostní spektrometrie (Gómez et al., 2014 B). Přehled možností HPLC separace warfarinu je znázorněn v Tab. I.

V práci Wang a Bonakdara (1987) byla použita kolona Biophase ODS (4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$) na stanovení warfarinu v moči. Mobilní fáze byl 1,5% roztok kyseliny octové (pH=4,7 úprava koncentrovaným hydroxidem amonným)-acetonitril (60/40, v/v). Detekce byla provedena pomocí elektrochemického detektoru.

Medvedovici et al. (1997) vyvinul metodu na stanovení skupiny rodenticidů warfarin, difenadion a chlorophacinon spolu s fenyльмоčovinovými herbicidy isoproturon a diuron v půdních vzorcích. Analýza byla provedena na chromatografické koloně Hypersil, Hewlett-Packard ODS ($4,6 \times 200$ mm, $5 \mu\text{m}$). V této práci bylo testováno různé složení mobilních fází. Jako optimální MF byl zvolen 0,5% roztok kyseliny fosforečné ve vodě (MFA) a 0,5% roztok kyseliny fosforečné v acetonitrilu (MFB). Byl zvolen gradientový režim s průtokem 1 ml/min. UV detekční vlnová délka byla nastavena na 310 nm.

Boppana et al. (2002) navrhl metodu na separaci R a S enantiomerů warfarinu v lidské plazmě. Metoda zahrnovala předkolonou precipitaci proteinu a chromatografickou separaci na chirální koloně. Jako mobilní fáze byl použit 0,05M roztok octanu amonného ve vodě (pH=4,7) a acetonitril (90/10, v/v). Byl použit fluorescenční detektor, excitační a emisní vlnové délky byly 313 nm, respektive 400 nm.

Lombardi et al. (2003) vyvinuli snadnou metodu na stanovení warfarinu v krevní plazmě, za účelem stanovení vhodné dávky a sledování antikoagulačního účinku v závislosti na interakci s potravou a ostatními léky pro klinické účely. Analýza byla provedena na koloně Waters RP8 ($3,9 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$), probíhala v isokratickém režimu s průtokem MF 1 ml/min. Elučním činidlem byl 25mM roztok fosforečnanu draselného (pH=7) v methanolu (55/45, v/v). UV detekční vlnová délka byla nastavena na 280 nm.

Sun et al. (2006) vyvinuli citlivou metodu na stanovení warfarinu v krevní plazmě pacientů. K analýze byla použita kolona Phenomenex C18 ($4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$). Jako MF byl použit 50 mmol/l roztok pufru octanu amonného (pH=3,74) a methanolu (67/33, v/v). UV detekční vlnová délka byla nastavena na 308 nm.

Lomonaco et al. (2013) vyvinuli metodu na stanovení warfarinu a warfarinových alkoholů v krevní plazmě. Analýza byla provedena na koloně Agilent TC-C18 ($4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$), probíhala v isokratickém režimu s průtokem MF 1,2 ml/min. Elučním činidlem byl 25mM roztok fosfátového pufru (pH=7), methanol a acetonitril (70/25/5, v/v/v). Fluorescenční detekce byla provedena excitační a emisní vlnové délce byly 310 nm, respektive 390 nm.

Cílem práce Gómeze et al. (2014 B) byla charakterizace rodenticidů v odpadních vodách kapalinovou chromatografií spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií. K analýze byla použita kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 ($2,1 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$). Jako MF byl zvolen 5mM roztok mravenčanu amonného ve vodě a 5mM roztok mravenčanu amonného v methanolu. Separace probíhala v gradientovém režimu. Detekce byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie.

V práci Mahmoud a Elhag (2021) byla použita kolona kolona C18 (4×150 mm, $3 \mu\text{m}$) ke stanovení warfarinu v krevní plazmě. Analýza probíhala v isokratickém režimu separace s průtokem 1 ml/min. Elučním činidlem byl 0,1 %roztok kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitril (40/60, v/v). Detekce byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie.

Tab. I. Přehled možností HPLC separace warfarinu.

Kolona	Rozměry kolony	MF	Citace
Biophase ODS	4,6 × 250 mm, 5 μm	1,5% kyselina octová (pH=4,7)/acetonitril (60/40, v/v).	Wanga & Bonakdara, (1987)
Hypersil, Hewlett-Packard ODS	4,6 × 200 mm, 5 μm	0,5% kyselina fosforečná /0,5% kyselina fosforečná v acetonitrilu	Medvedovici et al., (1997)
Chirální kolona	-	0,05M octan amonný (pH=4,7)/acetonitril (90/10, v/v)	Boppana et al., (2002)
Waters RP8	3,9 × 150 mm, 5 μm	25mM fosforečnan draselný (pH=7)/methanol (55/45, v/v)	Lombardi et al., (2003)
Phenomenex C18	4,6 × 150 mm, 5 μm	50 mmol/l octan amonný (pH=3,74)/methanol (67/33, v/v)	Sun et al., (2006)
Agilent TC-C18	4,6 × 150 mm, 5 μm	25mM fosfátový pufr (pH=7)/metanol/acetonitril (70/25/5, v/v/v)	Lomonaco et al., (2013)
Zorbax Eclipse XDB-C18	2,1 × 150 mm, 5 μm	5mM mravenčan amonný /5mM mravenčan amonný v methanolu (gradient)	Gómeze et al., (2014 B)
C18	4 × 150 mm, 3 μm	0,1% kyselina mravenčí/acetonitril (40/60, v/v)	Mahmoud & Elhag, (2021)

1.5 HPLC stanovení dabigatranu

Ke stanovení dabigatranu v biologických vzorcích či v odpadních vodách lze využít HPLC. Používá se k analýze vzorků krevní plasmy (Gouveia et al., 2020), (Kozlov et al., 2019), další využití lze nalézt v analýze odpadních vod (Yassine et al., 2017), či ke kontrole stability v kapslích (Bernardi et al., 2013), (Nagadeep et al., 2019). Ve většině případů byla používána kolona s C18 stacionární fází (Gouveia et al., 2020), (Bernardi et al., 2013), (Schwertnera et al., 2016). Byla rovněž použita kolona C8 (Damle & Bagwe, 2014). V jednom případě byla použita kolona s CN (alkylnitrilovou) náplní, za účelem zvýšení rozlišovací schopnosti (Kozlov et al., 2019). Rozdíl mezi publikovanými metodami je rovněž ve složení MF. Jako MF byl použit vodný roztok kyseliny mravenčí, mravenčanu amonného, z organických rozpouštědel se používal methanol nebo acetonitril. Při analýze byla použita UV detekce (Bernardi et al., 2013), (Damle & Bagwe, 2014), fluorescence (Schwertnera et al., 2016) či hmotnostní spektrometrie (Yassine et al., 2017), (Kozlov et al., 2019). Přehled možností HPLC separace dabigatranu je znázorněn v Tab. II.

Bernardi et al. (2013) vyvinuli metodu na stanovení dabigatran etexilátu v kapslích. Analýza byla provedena na koloně Zorbax C18 ($4,6 \times 250$ mm) v isokratickém režimu separace. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a 0,1% roztoku triethylaminu (pH=6,0 upraveno kyselinou fosforečnou) v poměru 65/35 (v/v). UV detekční vlnová délka byla nastavena na 225 nm.

Damle & Bagwe (2014) vyvinuli metodu, za účelem studie stability dabigatran etexilátu. K rozdělování analytu docházelo na koloně Neosphere C8 ($4,6 \times 150$ mm). Mobilní fáze se skládala z methanolu a fosfátového pufru (0,01 M, pH = 3) v poměru 60/40. UV detekční vlnová délka byla nastavena na 225 nm.

V práci Schwertnera et al. (2016) byla provedena HPLC a UHPLC analýza dabigatranu a dabigatran etexilátu. HPLC analýza byla provedena na koloně Waters C18 ($4,6 \times 250$ mm, 10 μ m). Jako mobilní fáze byl použit methanol (MFA) a voda (MFB). V isokratickém režimu separace s poměrem 2/1 (MFA/MFB). Detekce byla prováděna pomocí fluorescence. Excitační maxima činila 310 nm pro dabigatran a 335 nm dabigatran etexilát. Emisní maxima byla 375 nm pro dabigatran a 400 nm pro dabigatran etexilát.

Yassine et al. (2017) provedli analýzu dabigatranu a jeho fotodegradačních produktů v povrchových vodách. Studie zahrnovala fotodegradaci a analýzu dalších NOACs. Analýza byla provedena na koloně Nucleosil® C18 Nautilus (4,6 × 250 mm, 5 μm) v isokratickém režimu. Jako mobilní fáze byly zvoleny methanol a voda v poměru 60/40 (v/v). UV detekční vlnové délky byly nastaveny na 248, 277, 303 nm. Metoda byla doplněna hmotnostní spektrometrií.

Kozlov et al. (2019) ve své práci vyvinuli nový protokol extrakce vzorků krve pro farmakokinetické studie dabigatranu. Vzorky byly analyzovány HPLC s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. Analýza byla provedena na koloně Agilent Zorbax SB-CN (4,6 × 150 mm, 5 μm). Separace bylo dosaženo pomocí 0,1% roztoku kyseliny mravenčí ve vodě (MFA) a acetonitrilu (MFB). Poměr byl 80/20 (MFA/MFB).

Nagadeep et al. (2019) vyvinuli metodu na stanovení dabigatran etexilátu v kapslích. Analýza byla provedena na koloně Inertsil ODS-3V (4,6 × 250 mm, 5 μm), v gradientovém režimu separace. Jako mobilní fáze byl použit 20mM roztok mravenčanu amonného s 0,1 % triethylaminu (pH=5,0, upraveno kyselinou mravenčí) a acetonitril. UV detekční vlnová délka byla 255 nm. Metoda byla doplněna hmotnostní spektrometrií.

Gouveia et al. (2020) vyvinuli metodu pro současnou analýzu apixabanu, dabigatranu, edoxabanu, rivaroxabanu v lidské plazmě. Separace probíhala v gradientovém režimu na koloně LiChroCART® Purospher® Star C18 (4 × 55 mm, 3 μm). Jako MF byl použit 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitril. UV detekční vlnová délka byla 300 nm.

Tab. II. Přehled možností HPLC separace dabigatranu.

Kolona	Rozměry kolony	MF	Citace
Zorbax C18	4,6 × 250 mm	Acetonitril/0,1% triethylamin (pH=6,0) (65/35, v/v)	Bernardi et al., (2013)
Neosphere C8	4,6 × 150 mm	Methanolu/0,01M fosfátový pufr (pH = 3) (60/40, v/v)	Damle & Bagwe, (2014)
Waters C-18	4,6 × 250 mm, 10 µm	Methanol/voda (2/1, v/v)	Schwertnera et al., (2016)
Nucleosil® C18 Nautilus	4,6 × 250 mm, 5 µm	Methanol/voda (60/40, v/v)	Yassine et al., (2017)
Agilent Zorbax SB-CN	4,6 × 150 mm, 5 µm	0,1% kyselina mravenčí/acetonitril (80/20, v/v)	Kozlov et al., (2019)
Inertsil ODS-3V	4,6 × 250 mm, 5 µm	20mM mravenčan amonný s 0,1 % triethylaminu (pH=5,0)/acetonitril.	Nagadeep et al., (2019)
LiChroCART® Purospher® Star C18	4 × 55 mm, 3 µm	0,1% kyselina mravenčí/acetonitril.	Gouveia et al. (2020)

1.6 Základní veličiny pro popis chromatografické separace

Při správné separaci by měl být chromatografický pík symetrický, dokonale oddělený a měl by mít ostře ohraničené zóny. Základním kritériem při hodnocení píku analytu je jeho symetrie. Tvar a symetrii píku lze popsat faktorem chvostování T_f a faktor asymetrie A .

Faktor chvostování – T_f je vyjádřen jako šířka píku v 5 % výšky ($w_{0,05}$) ku dvojnásobku šířky píku vzestupné části (f). Faktor chvostování se vypočte dle rovnice 1:

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (1)$$

Faktor asymetrie A je vyjádřen jako poměr šířky sestupné části píku k vzestupné části píku, nejčastěji je popsán v 5 nebo 10 % výšky píku. Faktor asymetrie se vypočte podle rovnice 2:

$$A = \frac{t}{f} \quad (2)$$

kde t je šířka sestupné části píku a f je šířka píku vzestupné části (Nováková et al., 2021). Faktor asymetrie by měl nabývat hodnot 0,8 – 1,50. Kvantitativní charakteristikou píku je plocha pod píkem, kvalitativní charakteristikou je retenční čas t_R .

Retenční faktor k udává míru retence látek. Je to poměr rozdílu retenčního času a mrtvého retenčního času k mrtvému retenčnímu času. Lze vypočítat podle rovnice 3:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3)$$

kde t_R je retenční čas a t_0 je mrtvý retenční čas (čas složky, která není na koloně zadržována). Rychlost pohybu této složky odpovídá rychlosti pohybu MF v koloně (Nováková et al., 2021).

1.7 Koncentrace antikoagulantů v přírodních vodách

Antikoagulanty se dostávají do odpadních vod vylučováním močí nebo rozpouštěním návnad, ty pak putují do čističek odpadních vod, ČOV (Gómez et al., 2014). V ČOV může docházet k jejich biodegradaci mikroorganismy v aktivovaném kalu (Gómez et al., 2014 A). Neodstraněné zbytky se mohou dostat do řek a rybníků.

Gómez et al. (2014 A) ve své práci zkoumali koncentraci jedenácti antikoagulantů včetně warfarinu v devíti ČOV v Katalánsku ve Španělsku. Odběr vzorků byl prováděn od září až do října roku 2012. V každé ČOV byl odebírán vzorek z přítoku, z čištění aktivovaného kalu a z odpadní vody. Celkově množství antikoagulantů se pohybovalo v rozmezí od 6,80 do 180 ng/l v přítoku. Warfarin byl ve všech případech nejvíce zastoupená sloučenina. Množství jednotlivých látek se lišilo podle okolní charakteristiky průmyslu. Ve výtoku se množství antikoagulantů pohybovalo v rozmezí od 0,89 do 72,0 ng/l. Warfarin byl mezi nejvíce zastoupenými látkami. Gómez et al. (2014 B) odebrali vzorky z různých odpadních vod kolem Katalánska ve Španělsku v roce 2012. Warfarin se vyskytoval ve všech vzorcích v koncentraci mezi 8 a 156 ng/l.

Regnery et al. (2019) se ve své práci zaměřili na analýzu antikoagulantů v játrech kaprovité ryby *Cyprinus carpio*. Vzorky pocházely z 25 rybníků v Bavorsku v Německu. Tyto rybníky byly napájeny terciárně čištěnými odpadními vodami. Správa bavorského životního prostředí rovněž poskytla vzorky tkání ryb ze sedmi toků a dvou jezer, do kterých nebyla vypouštěna odpadní voda. Ve vzorcích z 12 rybníků nebyla zjištěna žádná zásadní bioakumulace antikoagulantů. Nebyla pozorována žádná zřetelná korelace mezi koncentrací v rybách a kapacitou čištění ČOV. Koncentrace antikoagulantů ve vypouštěných odpadních vodách bylo v rozmezí 2-10 mg/l. Ve vzorcích z řek byla rezidua detekována u 83,3 % vzorků. Ve vzorcích z jezer nebyla nalezena žádná rezidua. Nejvyšší koncentrace reziduí v rybnících byla stanovena na 4,6 µg/kg jater v řece 9,1 µg/kg jater. Warfarin se vyskytoval v játrech *C. carpio* pouze ve stopovém množství 0,05 µg/kg jater.

Práce Top et al. (2020) byla věnována odstraňování mikro a makro zničujících látek v nemocniční odpadní vodě. Vzorky byly odebrány z odpadní vody z nemocnice Sisli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital (Istanbul, Turecko) s kapacitou 780 lůžek. Koncentrace warfarinu v odpadní vodě se nacházela v rozmezí 0,03 – 3,45 µg/l. Voda byla čištěna pomocí oxidace superkritickou vodou při 450 °C po dobu 60 s s přídavkem H₂O₂. Superkritickou vodou je voda, která překračuje teplotu 374 °C a tlak 22,1 MPa a používá k rozkladu toxických organických sloučenin a k výrobě jemných částic

(Zychová et al., 2013). Warfarin byl nejméně odstraňován, 72 % bylo odstraněno. Čistění vody tímto způsobem bylo hodnoceno jako dostatečné.

Práce Santos et al. (2013) se věnovala analýze 78 léčiv v nemocničních odpadních vodách. Odběr vzorků byl prováděn z několika ČOV v oblasti Coimbra v Portugalsku. Koncentrace warfarinu byla v rozmezí 1,42 a 6,17 ng/l. Bylo zjištěno celkové hmotnostní zatížení způsobené léčivy v rozmezí mezi 5 a 14 g/den/1000 obyvatel v odpadních vodách vytékajících z ČOV. Některá léčiva představují vysoká rizika pro životní prostředí (antibiotika sulfonamidy).

Hernández et al. (2013) se ve své práci věnovali analytické metodě pro stanovení devíti antikoagulačních rodenticidů (chlorofacinon, bromadiolon, pindon, diphacinon, warfarin, coumatetralyl, brodifacoum, floucomafen a difenacoum) rezidua ve vzorcích vody a půdy. Vzorky byly odebrány v provinciích Valladolid a Palencia ve Španělsku, v těchto oblastech probíhalo hubení *Microtus arvalis* pomocí chlorofacinonu a bromadiolonu. Ve stopovém množství byly nalezeny chlorofacinon a bromadiolon.

Lacorte et al. (2018) se ve své práci věnovali koncentraci léčiv v odpadních vodách a řekách. Studie probíhala v pěti zdravotnických zařízeních v Portugalsku, Španělsku a Francii. Dabigatran etexilát byl předepisován v jednom zdravotnickém zařízení s 81 lůžky. Jeho denní spotřeba činila 463 mg/den. Jeho koncentrace ve výtoku ze zařízení byla vypočtena na 16,7 µg/l. Vypočtená předpokládaná koncentrace v kanalizačním systému byla 0,167 µg/l a předpokládaná koncentrace v řece byla menší než 0,001 µg/l.

Pracoviště firmy Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. ve své zprávě Center for drug evaluation and research (2010) na základě výsledků ekotoxikologických testů na třech organismech (řase *Scenedesmus subspicatus*, vodním korýši *Daphnia magna* a rybě *Brachydanio rerio*) vyhodnotilo, že se neočekává, že by zbytky dabigatranu v životním prostředí představovaly environmentální riziko.

1.8 Možnost fotochemické degradace

Fotochemická degradace warfarinu v přítomnosti polovodičových katalyzátorů byla studována v práci autorů Vadaei a Faghihian (2018). Warfarin byl ozařován středotlakou Hg lampou (60W, Philips) emitující záření v rozmezí vlnových délek 254 nm až 436 nm v přítomnosti syntetizovaných fotokatalyzátorů (SnTe a SnTe@SBA-15 (5 %)) po dobu 90 minut. Po ozaření došlo k významnému úbytku warfarinu, rozloženo bylo 49.89 % warfarinu v přítomnosti SnTe katalyzátoru. V přítomnosti SnTe@SBA-15 (5 %) bylo rozloženo 89,99 % warfarinu.

Další prací zaměřenou na fotodegradaci warfarinu je studie autorů Murgolo et al. (2017), kde se věnovali vývoji nového katalyzátoru pro fotodegradaci warfarinu. Byl připraven katalyzátor skládající se z nanostrukturovaného filmu TiO_2 naneseného na nerezové oceli (nano TiO_2 -SS). Ozařování probíhalo v průtokovém reaktoru o objemu 0,5 l vybaveném nízkotlakou rtuťovou lampou emitující záření o vlnové délce 254 nm s výkonem 40 W. Byla získána kinetická konstanta prvního řádu pro fotolýzu warfarinu, která činila $0,03 \text{ min}^{-1}$. Fotokatalýza byla čtyřikrát účinnější než fotolýza. Při použití nano TiO_2 -SS a UV záření byl objeven jeden degradační produkt warfarinu s kratším retenčním časem.

Fotochemická degradace warfarinu byla studována v práci autorů Guerra-Rodríguez et al. (2021), kde se věnovali odstraňování mikropolutantů pomocí ozařování UV-A světlem za přítomnosti peroxymonosulfátu. Reaktivními částicemi jsou hydroxylové radikály, vznikající spolu se sulfátovým radikálem. Ozařování probíhalo pomocí čtyř LED lamp emitující záření v oblasti UV-A ($\lambda_{\text{max}} = 385 \text{ nm}$). Ozařováno bylo po dobu 60 minut. Vzorky měly koncentraci $100 \mu\text{g/l}$. Pouze ozařováním UV-A došlo k degradaci 5 % warfarinu, přidáním 0,1 mM peroxymonosulfátu vedlo k významnému nárůstu degradace (90 % původního množství bylo odbouráno).

Další prací věnovanou fotodegradaci warfarinu je práce Patterson et al. (2020), kde se věnovali odstraňování léčiv pomocí fotodegradace na TiO_2 . TiO_2 bylo modifikováno rostlinnými barvivy, aby byl zlepšen světelný rozsah systému. Ozařování probíhalo pomocí slunečního záření (od 11-14:00) ve státě Florida (USA). Nejúčinnější modifikací pro fotodegradaci warfarinu bylo využití barviva z rostliny *Begonia burkillii*. Bez přítomnosti barviva došlo k degradaci 14,4 % warfarinu, s přítomností barviva vzrostla fotodegradace až na 31,6 %.

Fotochemická degradace dabigatranu v závislosti na množství dusičnanových a hydrogenuhličitanových iontů byla studována v práci Yassine et al. (2012). Fotochemické odbourávání dabigatranu bylo studováno v ultračisté MilliQ[®] vodě, v mineralizované vodě s obsahem 7,2 mg/l dusičnanů a 74 mg/l uhličitanů a v říční vodě, která obsahovala 7,7 mg/l dusičnanů a 140 – 200 mg/l uhličitanů. Nebyla pozorována závislost na obsahu uhličitanů, obsah dusičnanů měl mírně pozitivní vliv na odbourávání, poločas reakce byl v ultračisté vodě 19,9 hod, v mineralizované vodě 7,4 hod a v říční vodě 24,1 hod, což je připisováno odstraňování vzniklých radikálů jejich interakcí s rozpuštěnými organickými látkami přítomnými v říční vodě.

2. Materiály a metody

V práci byly použity následující chemikálie: warfarin-sodná sůl, farmaceutický sekundární standard (Sigma Aldrich), dabigatran etexilát mesylát (Selleckchem), chlorid železitý hexahydrát čistý (Penta), methanol pro HPLC (Merck), acetonitril pro HPLC (Merck), mravenčan amonný $\geq 99,0\%$ (Fluka), kyselina mravenčí 98-100% (Emsure), 1,10-fenantrolin (Lach-ner), milli-Q[®] voda.

UV-VIS spektra byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-1601 s použitím softwaru UV Probe.

Pro HPLC byl použit chromatograf Dionex UltiMate 3000 Thermo Scientific. Detekce byla prováděna pomocí spektrofotometrického detektoru s diodovým polem DAD-3000 RS a fluorescenčního detektoru FLD-3400RS. Data byla zpracována pomocí programu Chromeleon.

V případě warfarinu byla použita kolona Chromservis Arion plus C18 HPLC s rozměry 150 mm $\times$ 3 mm a velikostí částic náplně kolony 5 μ m. Chromatografická soustava byla termostaticky udržována na teplotě 30 °C. Jako mobilní fáze A byl použit 5mM roztok mravenčanu amonného ve vodě o čistotě pro HPLC. Mobilní fází B byl 5mM roztok mravenčanu amonného v methanolu (Gómez et al., 2014 B). Analýza probíhala v gradientovém režimu. Nástřik 20 μ l byl proveden do 20 % MFB. Během 5,5 minuty rostl podíl MFB na 75 %. Následně došlo během 1 minuty k poklesu zpět na 20 % MFB a 5,5 minut probíhala stabilizace kolony před další analýzou. UV detekční vlnové délky byly nastaveny na 197, 286, 308 nm. Pro fluorescenční detekci bylo s využitím absorpčního maxima 308 nm změřeno emisní spektrum v rozsahu emisních vlnových délek 330-650 nm. Získaná emisní vlnová délka 393 nm byla využita při měření excitačního spektra, které bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 200-370 nm. Byla naměřena excitační maxima 231 nm, 243 nm, 297 nm, pro další měření byla zvolena hodnota 297 nm a vlnová délka emisního filtru 370 nm.

Dabigatran byl nejprve stanovován na koloně Phenomenex Luna C18 s rozměry 250 mm $\times$ 4,6 mm a s velikostí částic náplně kolony 5 μ m. Na této koloně nebyly získány uspokojivé hodnoty, proto byla použita kolona Chromservis Arion plus C18 HPLC s rozměry 150 mm $\times$ 3 mm a velikostí částic náplně kolony 5 μ m. Kolonový prostor byl udržován na hodnotě teploty 30 °C. Jako mobilní fáze A byl použit 0,1% roztok kyseliny

mravenčí. Mobilní fázi B byl acetonitril (Gouveira et al., 2020). Analýza probíhala v gradientovém režimu. Nástřik 20 μ l byl proveden do 5 % MFB. Během 6 minut došlo ke změně složení směsi MF z 5 % MFB na 60 % MFB. V čase 6–6,5 minuty od začátku separace opět klesl poměr na 5 % MFB. Tento stav byl udržován dalších 6,5 minuty, kdy docházelo ke stabilizaci kolony. Celková doba analýzy byla 13 minut. Byla použita UV detekce, detekční vlnové délky byly nastaveny dle absorpčního spektra na 197, 286, 308 nm.

Ozařování probíhalo v reaktoru Rayonet RPR 100, který obsahoval 14 lamp RPR 3000 Å, s rozsahem záření o vlnových délkách 250–350 nm, vlnové délky kratší než 300 nm byly odfiltrovány použitím optického skla (vzorky byly při ozařování ve skleněných kyvetách s víčkem).

3. Výsledky a diskuze

3.1 Vývoj a optimalizace metody pro preparát warfarin

Na základě literární rešerše byla pro zavedení metody stanovení warfarinu ve vodném roztoku zvolena kolona Chromservis Arion plus C18 HPLC. Separace probíhala při teplotě 30 °C. Jako MFA byl použit 5 mM roztok mravenčanu amonného ve vodě. MFB byl 5mM roztok mravenčanu amonného v methanolu (Gómez et al., 2014 B). Zkušební analýza s nástřikem analytu 20 µl probíhala v gradientovém režimu separace při průtoku 1 ml/min. UV detekční vlnové délky byly nastaveny na 197 nm, 280 nm (Lombardi et al., 2003), 310 nm (Medvedovici et al., 1996). Retenční čas píku analytu byl 9,1 minut, faktor asymetrie píku byl 0,72.

Další snahou bylo upravit metodu do izokratické podoby z důvodu úspory MF a zkrácení času analýzy. Analýza při izokratických podmínkách vyžadovala 40 až 50 % MFB, vysoký podíl organické mobilní fáze vedl k širokému a nesymetrickému píku analytu v chromatogramu. Tyto podmínky by bylo možné využít pro vzorky v rozpouštědle se srovnatelným podílem methanolu jako v MFB. Zadáním této práce bylo však zavést metodu pro analýzu warfarinu a jeho fotodegradačních produktů ve vodném roztoku.

Optimalizace metody spočívala v úpravě gradientu MF. Finální metoda gradientové separace probíhala při průtoku 1 ml/min a teplotě 30 °C. Nástřik 20 µl byl proveden do 20 % MFB. Během 5,5 minuty rostl podíl MFB na 75 %. Následně proběhla stabilizace kolony před další analýzou při 20 % MFB. UV detekční vlnové délky byly na základě změřeného absorpčního spektra analytu upraveny na 197, 286, 308 nm. Hodnoty se shodují s hodnotami nalezenými v literatuře 280 nm (Lombardi et al., 2003), 310 nm (Medvedovici et al., 1996). Retenční čas analytu byl 6,4 min, faktor asymetrie 1,00. O takovém píku se dá říci, že je dokonale symetrický (Nováková, 2021).

Po optimalizaci chromatografické separace bylo změřeno absorpční spektrum a vyhodnocena vlnová délka absorpčního maxima. Byly získány hodnoty 197, 286, 308 nm. Hodnoty se shodují s hodnotami nalezenými v literatuře 280 nm (Lombardi et al., 2003), 310 nm (Medvedovici et al., 1996).

Následně byla provedena optimalizace fluorescenční detekce. S využitím absorpčního maxima 308 nm bylo změřeno emisní spektrum v rozsahu emisních vlnových délek 330-650 nm. Získaná emisní vlnová délka 393 nm byla využita při měření excitačního

spektra, které bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 200-370 nm. Byla naměřena excitační maxima 231, 243, 297 nm, pro další měření byla zvolena hodnota 297 nm a vlnová délka emisního filtru 370 nm. Zvolené hodnoty excitační a emisní vlnové délky jsou srovnatelné s hodnotami excitační vlnové délky 313 nm a emisní vlnové délky 400 nm nalezenými v literatuře (Boppana et al., 2002). Retenční čas analytu byl 6,4 minuty a faktor asymetrie 0,99. Optimalizace metody je přehledně znázorněna v Tab. III.

Tab. III: Podmínky zavedené metody pro preparát warfarin.

Gradient MF	20 %→75 % MFB (5,5 min) →20 % MFB (1 min) →20 % MFB (5,5 min)
Kolona	Arion plus C18 (3 × 150 mm, 5 μm)
MF	5mM mravenčan amonný ve vodě (MFA) 5mM mravenčan amonný v methanolu (MFB)
Nástřik	20 μl
Teplota na koloně	30 °C
Parametry FLD	Excitační vlnová délka 297 nm
	Emisní vlnová délka 393 nm
	Vlnová délka emisního filtru 370 nm
Délka analýzy	12 minut
Retenční čas	6,4 minuty

3.2 Vývoj a optimalizace metody pro preparát dabigatran

První zkušební analýza na základě literární rešerše byla provedena na koloně Phenomenex Luna C18 s rozměry 4,6 mm × 250 mm a s velikostí částic náplně kolony 5 μm (Schwertner et al. 2016). Byl použit methanol jako mobilní fáze A (MFA) jako mobilní fáze B voda (MFB). Poměr obou mobilních fází byl nastaven na 70 %/30 % (MFA/MFB) (Schwertner et al., 2016). Vlnové délky UV detekce byly nastaveny na 225 nm a 300 nm (Gouveira et al., 2020). Teplota v kolonovém prostoru byla nastavena na 35 °C (Kozlov et al., 2019). Analýza probíhala v izokratickém režimu po dobu 30 minut s průtokem 1 ml/min a nástřikem 20 μl. Analyt byl příliš silně zadržován na koloně, methanol neměl dostatečně velkou eluční sílu, aby byl dabigatran eluován z kolony.

Za účelem ověření, že nedochází k eluci analytu v mrtvém retenčním čase, byla provedena analýza s poměrem 10 %/90 % (MFA/MFB). Dabigatran nebyl vymýván v mrtvém retenčním čase a byla potvrzena nedostatečná eluční síla metanolu.

Pro další postup byla zvolena kratší kolona Chromservis Arion plus C18 HPLC. Jako MFA byl použit 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě. MFB byl acetonitril (Gouveira et al., 2020). UV detekční vlnové délky byly nastaveny na 225 nm a 300 nm (Gouveira et al., 2020). Teplota v kolonovém prostoru byla nastavena na 30 °C (Gouveira et al., 2020). Analýza probíhala v izokratickém režimu po dobu 30 minut s nástřikem 20 µl. Poměr MFA/ MFB byl nastaven na 86 %/14 % (Gouveira et al., 2020). Analyt opět nebyl eluován z kolony. Dabigatran má příliš vysokou afinitu ke stacionární fázi a zvolená metoda nemá dostatečnou eluční sílu, aby byl dabigatran eluován z kolony ve vhodném retenčním čase, proto došlo k dalším úpravám složení mobilních fází.

V následujícím kroku byla provedena analýza při gradientové eluci za účelem zjištění vhodného poměru mobilních fází. Nástřik roztoku analytu byl proveden do 5 % MFB. Gradient byl nastaven z 5 % MFB na 95 % MFB během 30 minut. Bylo dosaženo eluce analytu v retenčním čase 5,3 minuty. Ze změřeného absorpčního spektra byla odečtena maxima vlnových délek 196, 222, 291 nm.

Další kroky vedly k úpravě poměru mobilních fází. Cílem bylo zavést metodu vhodnou pro analýzu vodných vzorků. Zkušební analýzy potvrdily, že není možné nástřikovat vodné vzorky do MF s větším obsahem ACN. Nástřik 20 µl byl tedy proveden do 5 % MFB. Během 4,5 minut se změnilo složení mobilních fází z 5 % MFB na 45 % MFB. V čase 4,5–5 minut od začátku separace se poměr vrátil na počáteční stav, tedy 5 % MFB. Od 5. až do 11. minuty probíhala stabilizace kolony. Při tomto nastavení gradientu neprobíhala analýza opakovatelně, docházelo k posunu retenčních časů analytu, proto byl gradient dále optimalizován. Došlo k nárůstu obsahu MFB, byl také prodloužen čas stabilizace kolony.

Finální metoda probíhala v gradientovém režimu separace. Kolonový prostor byl udržován na hodnotě 30 °C. Nástřik 20 µl byl proveden do 5 % MFB. Během 6 minut došlo ke změně složení směsi MF z 5 % MFB na 60 % MFB. V čase 6–6,5 minuty od začátku separace opět klesl obsah na 5 % MFB. Tento stav byl udržován dalších 6,5 minuty, kdy docházelo ke stabilizaci kolony. Celková doba analýzy byla 13 minut. Na základě změřeného absorpčního spektra analytu v rozsahu 190–800 nm byly vybrány vlnové délky maxim absorpční křivky. Vlnové délky pro UV detekci byly nastaveny na 196 a 222 nm.

Zjištěná hodnota UV detekce dabigatranu se shodovala s hodnotami z literatury 224 nm (Patel et al., 2014) 220 nm (Yassine et al., 2018) 225 nm (Damle & Bagwe, 2014). Faktor asymetrie píku byl stanoven na 1,2 s retenčním časem 5,2 minuty.

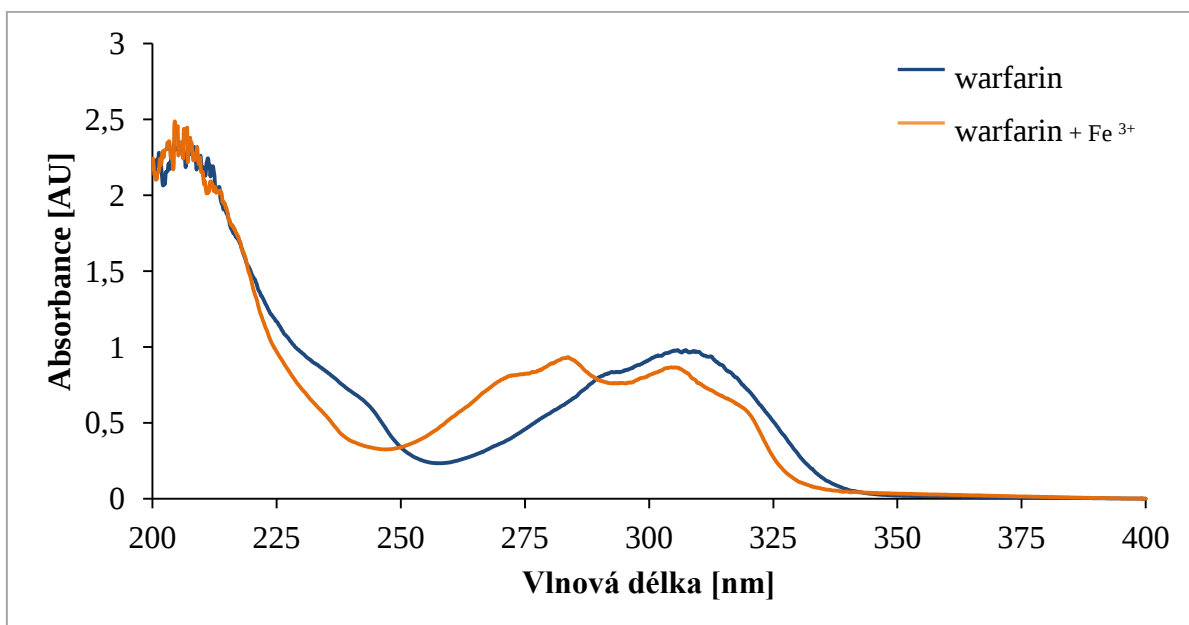
V Tab. IV. je přehledně znázorněn výsledek vývoje a optimalizace metody HPLC separace dabigatranu.

Tab. IV: Podmínky zavedené metody pro preparát dabigatran.

Gradient MF	5 %→60 % MFB (6 min) →5 % MFB (0,5 min) →5 % MFB (6,5 min)
Kolona	Arion plus C18 (3 × 150 mm, 5 μm)
MF	0,1% kyselina mravenčí ve vodě (MFA) Acetonitril (MFB)
Nástřik	20 μl
Teplota na koloně	30 °C
UV detekce	196 nm, 222 nm.
Délka analýzy	13 minut
Retenční čas	5,2 minut

3.3 Fotochemická degradace warfarinu

Absorpční spektrum warfarinu a warfarinu s přidavkem železitých iontů je znázorněno na Obr. 3.

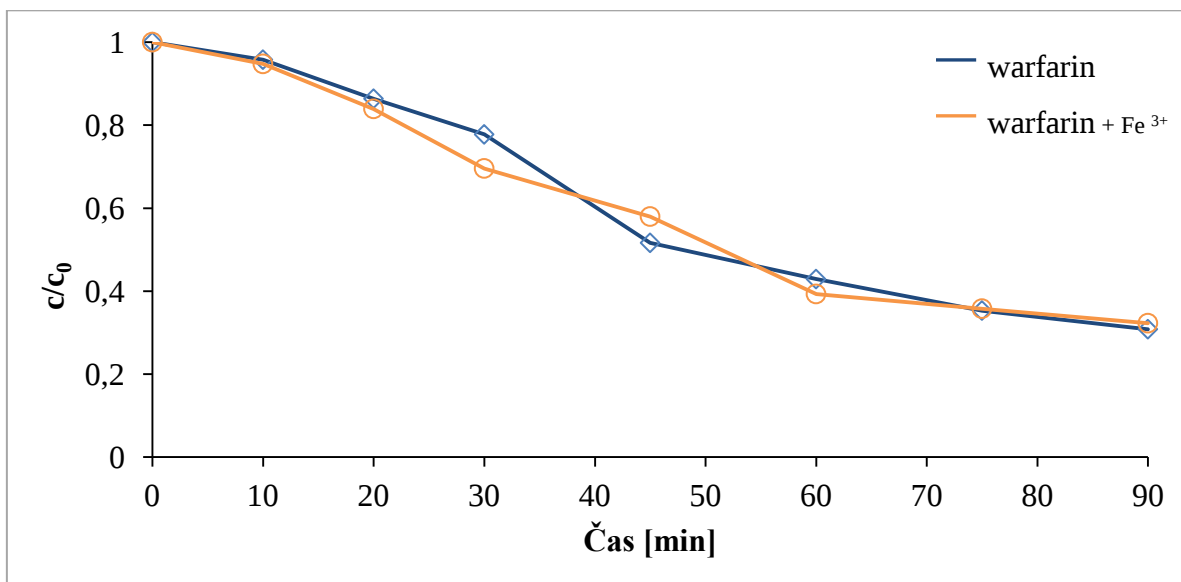


Obr. 3: Absorpční spektrum vodného roztoku warfarinu o koncentraci 25 mg/l a absorpční spektrum téhož roztoku s přidavkem železitých iontů (5 mg/l).

Jak je vidět z Obr. 3, absorbuje warfarin významně v oblasti o vlnových délkách větších než 300 nm. Přídavek železitých iontů vede k mírnému posunutí absorpčního maxima ke kratším vlnovým délkám.

Při ozařování warfarinu měl jeho úbytek stejný průběh bez přidavku železitých iontů i s přidavkem železitých iontů, jak ukazuje Obr. 4.

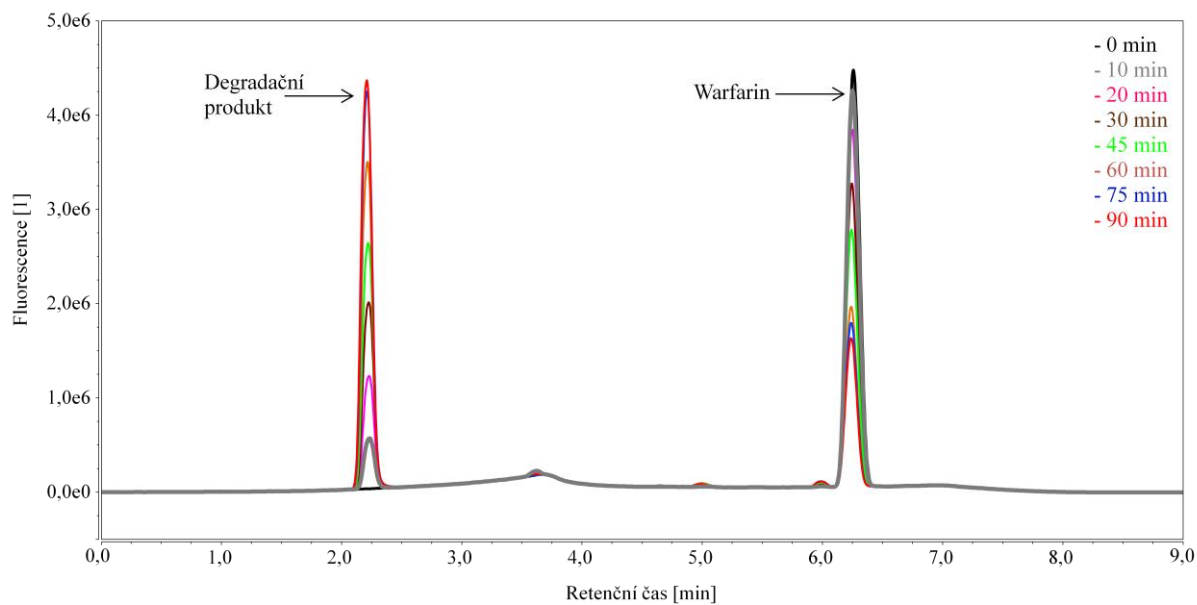
Z Obr. 4 je vidět, že po 90 minutách ozařování bylo odbouráno cca 69 % warfarinu přítomného ve vzorku. Přidáním Fe³⁺ do rakční směsi nedojde ke změně kinetiky. Warfarin se odbourá stejnou rychlostí jako v případě samotného vodného roztoku warfarinu. Úbytek warfarinu v prvních 30 minutách je pomalejší než mezi 30. a 45. minutou, nicméně i v prvních 30 minutách je vidět postupné mírné urychlování reakce. Od 45. minuty dochází opět ke zpomalení. Důvod pro postupné zrychlování v prvních fázích ozařování by mohl být v efektu autokatalýzy či autosensitizace, tedy tvorby látky (meziproduktu, produktu) urychlující odbourávání při vlastní degradaci warfarinu, což bylo pozorováno též např. při degradaci antiarytmika verapamilu (Klementová et al., 2017).



Obr. 4: Průběh fotochemické degradace roztoku Warfarinu (50 mg/l) bez přídavku Fe^{3+} iontů a s přídavkem Fe^{3+} iontů.

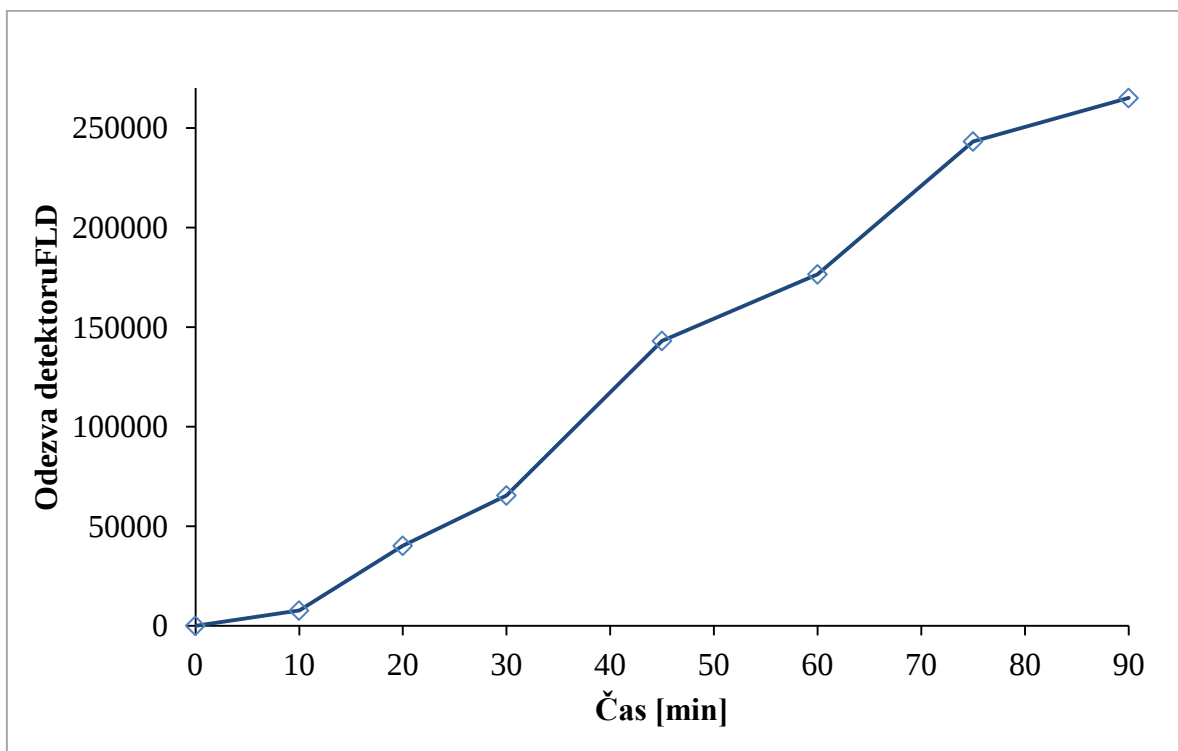
Při fotochemické degradaci warfarinu vznikl jeden hlavní degradační produkt s retenčním časem 2,31 minuty, jak je vidět na Obr. 5.

Chromatogram odbourávání warfarinu je znázorněn na Obr. 5.



Obr. 5: Chromatogram průběhu odbourávání warfarinu a přírůstků degradačního produktu.

Nárůst množství degradačního produktu je zobrazen na Obr. 6.



Obr. 6: Nárůst množství majoritního produktu v závislosti na době ozařování.

Z Obr. 6 je vidět, že po počáteční prodlevě v prvních 10 minutách množství detekovaného degradačního produktu roste s rostoucím časem ozařování a to prakticky lineárně po celou dobu ozařování.

Přestože odbourávání probíhalo stejně v přítomnosti i v nepřítomnosti železitých iontů, bylo otestováno, zda v reakční směsi dochází k fotochemické redukci železitých iontů na železnaté. Výsledek je shrnut v Tab. V.

Tab. V. Rychlost fotoredukce železitých iontů v roztoku warfarinu.

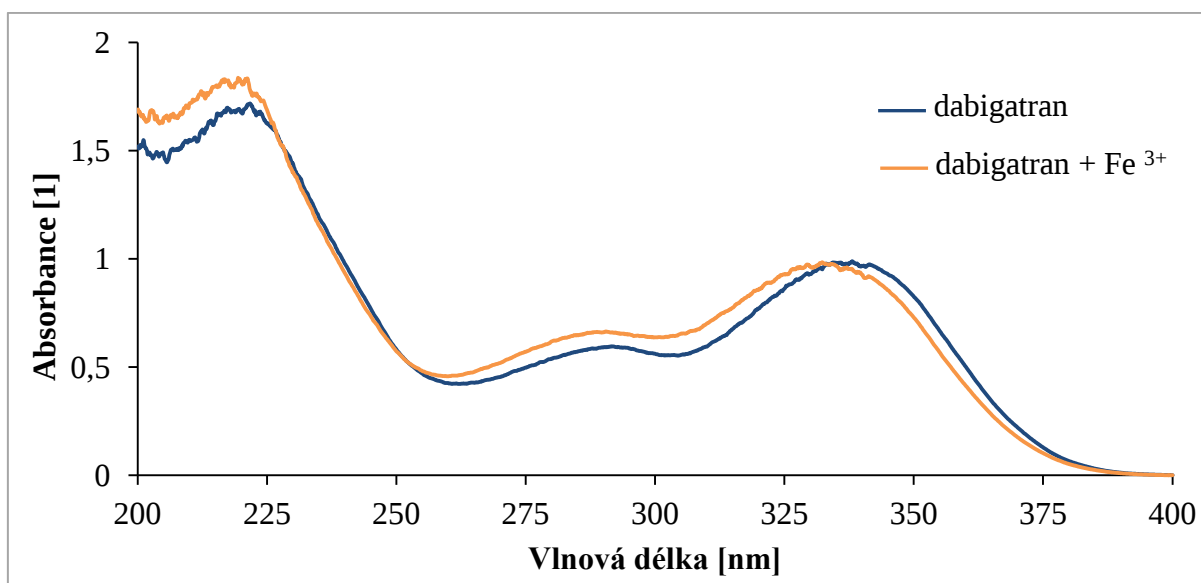
Doba ozařování [min]	Množství Fe^{2+} iontů (% z celkového přidaného Fe)
1	3,6 %
3	4,9 %
25	5,8 %

Při měření fotoredukce železitých iontů v reakční směsi warfarinu bylo zjištěno, že po jedné minutě ozařování je fotochemicky redukováno 3,6 % přidaných železitých iontů. Delším ozařováním se množství redukované formy nijak dramaticky nezvýší, po 25 minutách ozařování tvoří železnaté ionty 5,8 % z celkového množství přidaných železitých iontů.

3.4 Fotochemická degradace dabigatranu

Absorpční spektrum dabigatranu je zobrazeno na Obr. 7.

Pomocí spektrofotometru bylo proměřeno absorpční spektrum, které je zobrazeno na Obr. 7.

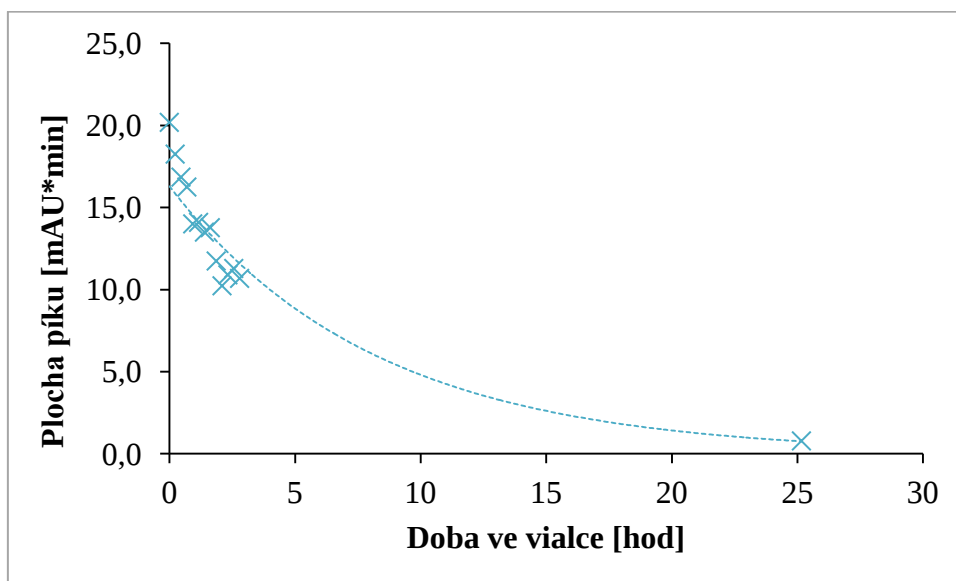


Obr. 7: Absorpční spektrum vodného roztoku dabigatranu o koncentraci 50 mg/l a absorpční spektrum téhož roztoku s přidavkem železitých iontů (5 mg/l).

Z absorpčního spektra je vidět, že dabigatran má intenzivní absorpci v UV oblasti, jedno jeho absorpční maximum leží u vlnové délky 330 nm, tedy význěmně delší než 300 nm. Přidáním železitých iontů nedochází k významnému posunu absorpčního spektra ani ke změně intenzity absorpce záření.

Vzorek dabigatranu a dabigatranu s přidavkem železitých iontů byl při testovacím pokusu ozařován po dobu 60 minut. Za tento časový úsek došlo v obou případech k degradaci veškerého množství dabigatranu. Bylo proto zvoleno ozařování v kratších časech, ale pík dabigatranu nebyl totožný s píkem z vývoje metody. Spektrofotometricky pak bylo prokázáno, že v zásobním roztoku dabigatranu došlo k jeho úbytku zhruba na polovinu po šesti týdnech od přípravy zásobního roztoku. Byl proto připraven nový roztok dabigatranu, který byl uchován ve tmě (zabalen v Al folii).

U vzorku z tohoto nově připraveného roztoku (ze stejné šarže komerčně dodané látky) bylo zjištěno, že dochází k významnému úbytku intenzity v průběhu několika po sobě jdoucích HPLC měření, jak ukazuje Obr. 8.



Obr. 8: Úbytek vodného roztoku dabigatranu ve vialce.

Důvod pro úbytek dabigatranu etexilátu ve vodném roztoku je nejasný. Z literatury je známo, že dabigatran etexilát podléhá snadno kyselé hydrolyze (Damle & Bagwe; 2014). Autoři Damle a Bagwe (2014) testovali též neutrální hydrolyzu, která ale byla významně menší. Roztok připravený rozpuštěním dabigatranu v ultračisté vodě v koncentraci 50 mg/l má pH=4,93, takže hydrolyzu nelze vyloučit. Navíc při vývoji metody byl roztok dabigatranu používán po dobu čtyřech dnů, aniž by u něj byla nestabilita pozorována. Oba roztoky (roztok pro vývoj metody a první testování fotochemického odbourávání i roztok pro opakování fotochemické degradace) byly připravovány stejným způsobem (rozpuštěním v ultračisté vodě), roztok pro opakování degradace byl navíc chráněn dokonaleji před případným vlivem světla, přesto byl významný úbytek pozorován v řádu hodin.

Vzhledem k této pozorované nestabilitě roztoku dabigatranu a nemožnosti dosáhnout stejné odezvy při chromatografii, jaká byla pozorována při vývoji metody, nebyla u dabigatranu dále fotochemická degradace studována.

4. Závěr

V teoretické části práce byl podán přehled účinku dvou zástupců antikoagulantů, warfarinu a dabigatranu, přehled prací o jejich výskytu v přírodních vodách a o fotochemických degradačních procesech.

Byly zavedeny HPLC metody na stanovení warfarinu a dabigatranu.

Bylo zjištěno, že se warfarin fotochemicky odbourává i jen ve vodném roztoku, přídavek katalyzátoru (železitých iontů) neměl na odbourávání vliv. Odbourávání warfarinu je pomalejší v prvních 30 minutách, pak následuje cca 15 minutová fáze rychlejšího odbourávání, poté se odbourávání opět zpomalí. Za 90 minut došlo k odbourání cca 2/3 původního množství.

Byl detekován jeden degradační produkt warfarinu s retenčním časem kratším než byl retenční čas warfarinu.

Fotochemická degradace dabigatranu nebyla proměřena, protože byla zjištěna nestabilita roztoku dabigatranu, která ovšem nebyla reprodukovatelná.

5. Seznam použité literatury

- Bernardi R. M., Fröhlich P. E., Bergold A. M. (2013): Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatography Method for the Determination of Dabigatran Etexilate in Capsules. *J. AOAC Int.* [online]. **96**(1), 37-41. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jaoac/article/96/1/37/5654941> [23.3.2023].
- Blech S., Ebner T., Ludwig-Schwellinger E. et al. (2008): The Metabolism and Disposition of the Oral Direct Thrombin Inhibitor, Dabigatran, in Humans: In Vitro Formation, Stability, and Pharmacological Activity. *Drug Metab. Dispos.* [online]. **36**(2), 1567-1575. ISSN 0090-9556. Dostupné z: <https://dmd.aspetjournals.org/content/36/2/386.long> [21.2.2023].
- Boppana V. K., Schaefer W. H., Cyronak M. J. et al. (2002): High-performance liquid-chromatographic determination of warfarin enantiomers in plasma with automated on-line sample enrichment: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection. *J. Biochem. Biophys. Methods* [online]. **54**(1-3), 315-326. ISSN 0165022X. Dostupné z: [High-performance liquid-chromatographic determination of warfarin enantiomers in plasma with automated on-line sample enrichment - ScienceDirect](#) [3.3.2023].
- Center for drug evaluation and research (2010): Environmental assessment application number: 22-512, Dabigatran Etexilate Capsules. Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Ridgefield, Connecticut, US. Dostupné z: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022512orig1s000ea.pdf [24.2.2023].
- Dale B. J., Chan N. C., Eikelboom J. W., Chung H., Kim K., Park S. B., Lee J. S., Park J. Y. (2016): Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants. *Br. J. Haematol.* [online]. **172**(3), 315-336. ISSN 00071048. Dostupné z: [Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants - Dale - 2016 - British Journal of Haematology - Wiley Online Library](#) [1.3.2023].
- Damle M., Bagwe R. (2014): Development and validation of stability-indicating rp-hplc method for estimation of dabigatran etexilate. *J. Adv. Sci. Res.* [online]. **5**(03), 39-44. ISSN 0976-9595. Dostupné z: <https://sciensage.info/index.php/JASR/article/view/200> [1.3.2023].

Ebner T., Wagner K., Wienen W. et al. (2010): Dabigatran Acylglucuronide, the Major Human Metabolite of Dabigatran: In Vitro Formation, Stability, and Pharmacological Activity. *Drug Metab. Dispos.* [online]. **38**(9), 1567-1575. ISSN 0090-9556. Dostupné z: <https://dmd.aspetjournals.org/content/38/9/1567.long> [21.2.2023].

Eikelboom J. W., Weitz J. I. (2010): New Anticoagulants. *Circulation* [online], **121**(13), 1523-1532. Dostupné z: [New Anticoagulants | Circulation \(ahajournals.org\)](https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958711) [21.2.2023].

Gómez-Canela C., Barata C., Lacorte S. et al. (2014) A: Occurrence, elimination, and risk of anticoagulant rodenticides and drugs during wastewater treatment: history, tautomerism and activity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* [online]. **21**(11), 7194-7203. ISSN 0944-1344. Dostupné z: [Occurrence, elimination, and risk of anticoagulant rodenticides and drugs during wastewater treatment | SpringerLink](https://www.springerlink.com/doi/10.1007/s11356-014-2888-1) [5.3.2023].

Gómez-Canela C., Vázquez-Chica A., Lacorte S. et al. (2014) B: Comprehensive characterization of rodenticides in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* [online]. **406**(1), 345-358. ISSN 1618-2642. Dostupné z: [Comprehensive characterization of rodenticides in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry | SpringerLink](https://www.springerlink.com/doi/10.1007/s00216-013-2188-1) [1.3.2023].

Gouveia F., Bicker J., Santos J., Rocha M., Alves G., Falcão A., Fortuna A. (2020): Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* [online]. **181**(9), 1648-1651. ISSN 07317085. Dostupné z: [Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma - ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/S0951875820301111) [8.3.2023].

Guerra-Rodríguez S., Lado Ribeiro A. R., Ribeiro R. S. et al. (2021): UV-A activation of peroxymonosulfate for the removal of micropollutants from secondary treated wastewater: history, tautomerism and activity. *Sci. Total Environ.* [online]. **770**(6-7), 553-573. ISSN 00489697. Dostupné z: [UV-A activation of peroxymonosulfate for the removal of micropollutants from secondary treated wastewater - ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/S0924646021004896) [5.3.2023].

Hernández A. M., Bernal J., Bernal J. L., Martín M. T., Caminero C., Nozal M. J., Conceição M., Montenegro B. S. M. (2013): Simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides in soil and water by LC-ESI-MS: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *J. Sep. Sci.* [online]. **36**(16), 2593-2601. ISSN 16159306. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/237017861_Simultaneous_determination_of_nine_anticoagulant_rodenticides_in_soil_and_water_by_LC-ESI-MS [8.3.2023].

Hirsh J., Dalen J. E., Anderson D. R., Poller L., Bussey H., Ansell J., Deykin D. (2001): Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. *Chest* [online]. **119**(1), 8S-21S. ISSN 00123692. Dostupné z: [Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range - CHEST \(chestnet.org\)](https://www.chestnet.org) [21.2.2023].

Hirsch J., O'Donnell M., Weitz J. I. (2005): New anticoagulants. *Blood* [online]. **105**(2), 453-463. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/105/2/453/20074/New-anticoagulants> [21.2.2023].

Holford N. H. G., Dalle Carbonare L., Dusso A. et al. (1986): Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Warfarin: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. *Clin. Pharmacokinet.* [online]. **11**(6), 483-504. ISSN 0312-5963. Dostupné z: [Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Warfarin | SpringerLink](https://www.springerlink.com) [21.2.2023].

Chua Y. A., Abdullah W. Z., Gan S. H. et al. (2012): Development of a high-performance liquid chromatography method for warfarin detection in human plasma. *Turk. J. Med. Sci.* [online]. **42**(5), 930-941. ISSN 1303-6165. Dostupné z: <https://journals.tubitak.gov.tr/medical/vol42/iss5/26> [1.3.2023].

Klementová S., Kahoun D., Doubková L., Frejlichová K., Dušáková M., Zlámál M. (2017): Catalytic photodegradation of pharmaceuticals – homogenous and heterogeneous photocatalysis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **16**, 67-71. Dostupné z: [Catalytic photodegradation of pharmaceuticals–homogeneous and heterogeneous photocatalysis | SpringerLink](https://www.springerlink.com) [8.3.2023].

Kvasnička T. (2012): Nová antikoagulancia a jejich současné indikace. *Interni Med.* [online]. **9**(5), 230-232. ISSN 1212-7299. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2012/05/07.pdf> [8.3.2023].

Kozlov A. V., Ramenskaya G. V., Sychev D. A. et al. (2019): An improved extraction protocol for therapeutic dabigatran monitoring using HPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* [online]. **1130-1131**(3), 315-336. ISSN 15700232. Dostupné z: [An improved extraction protocol for therapeutic dabigatran monitoring using HPLC-MS/MS - ScienceDirect](#) [1.3.2023].

Lacorte S., Luis S., Gómez-Canela C. et al. (2018): Pharmaceuticals released from senior residences: occurrence and risk evaluation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* [online]. **25**(7), 6095-6106. ISSN 0944-1344. Dostupné z: [Pharmaceuticals released from senior residences: occurrence and risk evaluation | SpringerLink](#) [8.3.2023].

Lombardi R., Chantarangkul V., Cattaneo M. et al. (2003): Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio. *Thromb. Res.*[online]. **111**(4-5), 281-284. ISSN 00493848. Dostupné z: [Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography \(HPLC\) and its correlation with the international normalized ratio - Thrombosis Research](#) [1.3.2023].

Lomonaco T., Ghimenti S., Piga I., Onor M., Melai B., Fuoco R., Di Francesco F. (2013): Determination of total and unbound warfarin and warfarin alcohols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* [online]. **1314**, 54-62. ISSN 00219673. Dostupné z: [Determination of total and unbound warfarin and warfarin alcohols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection - ScienceDirect](#) [23.3.2023].

Mahmoud R. M. Z., Elhag E. D. (2021): Determination of warfarin in human plasma by using high performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS). *Global scientific journal* [online]. **9**(3), 1305-1313. ISSN 2320-9186. Dostupné z: <https://www.globalscientificjournal.com/researchpaper/DETERMINATION OF WARFARIN IN HUMAN PLASMA BY USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY HPLC MS .pdf> [23.3.2023].

Malý J. (2004): Nízkomolekulární hepariny. *Interní Med.* [online]. **6**(9), 442-449. ISSN 1803-5256. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200409-0005_Nizkomolekularni_hepariny.php [21.3.2023].

Medvedovici A., Vázquez-Chica A., Lacorte S. et al. (1997): Determination of the rodenticides warfarin, diphenadione and chlorophacinone in soil samples by HPLC-DAD: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection. *Talanta* [online]. **44**(9), 1633-1640. ISSN 00399140. Dostupné z: [Determination of the rodenticides warfarin, diphenadione and chlorophacinone in soil samples by HPLC-DAD - ScienceDirect](#) [1.3.2023].

Melnikova I., Dalen J. E., Anderson D. R., Poller L., Bussey H., Ansell J., Deykin D. (2009): The anticoagulants market: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. *Nat. Rev. Drug Discov.* [online]. **8**(5), 353-353. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrd2851> [21.2.2023].

Murgolo S., Yargeau V., Gerbasi R. et al. (2017): A new supported TiO₂ film deposited on stainless steel for the photocatalytic degradation of contaminants of emerging concern. *J. Chem. Eng.* [online]. **318**(8), 103-111. ISSN 13858947. Dostupné z: [A new supported TiO₂ film deposited on stainless steel for the photocatalytic degradation of contaminants of emerging concern | Request PDF \(researchgate.net\)](#) [3.3.2023].

Nováková, L., Douša, M., & Česla, P. (2021). Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek. ISBN 978-80-270-8559-0. [3.3.2023].

Novotný J. (2006): Nové antitrombotické léky. *Interni Med.* [online]. **8**(7–8), 327-329. ISSN 1212-7299. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2006/07/04.pdf> [8.3.2023].

Patel B., Ram P., Khatri T., Ram V., Dave P., Falcão A., Fortuna A. (2014): Study of Anticoagulant Dabigatran by Analytical Instrumentation: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection. *Int. lett. chem. phys. astron.* [online]. 2014, 30(9), 233-242 [cit. 2023-02-13]. ISSN 2299-3843. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/279743172_Study_of_Anticoagulant_Dabigatran_by_Analytical_Instrumentation [8.3.2023].

Patterson K., Howlett K. et al. (2020): Photodegradation of ibuprofen and four other pharmaceutical pollutants on natural pigments sensitized TiO₂ nanoparticles. *Water Environ. Res.* [online]. **92**(8), 1152-1161. ISSN 1061-4303. Dostupné z: [Photodegradation of ibuprofen and four other pharmaceutical pollutants on natural pigments sensitized TiO₂ nanoparticles - Patterson - 2020 - Water Environment Research - Wiley Online Library](#) [3.3.2023].

Porter W. R., Petronella F., Ciannarella R. et al. (2010): Warfarin: history, tautomerism and activity. *J. Comput. Aided Mol. Des.* [online]. **24**(6-7), 553-573. ISSN 0920-654X. Dostupné z: [Warfarin: history, tautomerism and activity | SpringerLink](#) [3.3.2023].

PubChem. (2023): Dabigatran. Dostupné z: [Dabigatran | C25H25N7O3 - PubChem \(nih.gov\)](#) [24.2.2023].

PubChem. (2023): Dabigatran etexilát. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dabigatran-etexilate#section=2D-Structure> [23.3.2023].

PubChem. (2023): Warfarin. Dostupné z: [Warfarin | C19H16O4 - PubChem \(nih.gov\)](#) [24.2.2023].

Regnery J., Parrhysius P., Schulz R. S. et al. (2019): Wastewater-borne exposure of limnic fish to anticoagulant rodenticides: history, tautomerism and activity. *Water Res.* [online]. **167**(11), 7194-7203. ISSN 00431354. Dostupné z: [Wastewater-borne exposure of limnic fish to anticoagulant rodenticides - ScienceDirect](#) [5.3.2023].

Saffian S. M., Zhang M., Leong Chin P. K., Jensen B. P. (2015): Quantification of dabigatran and indirect quantification of dabigatran acylglucuronides in human plasma by LC–MS/MS. *Bioanalysis* [online]. **7**(8), 957-966. ISSN 1757-6180. Dostupné z: [Quantification of dabigatran and indirect quantification of dabigatran acylglucuronides in human plasma by LC–MS/MS | Bioanalysis \(future-science.com\)](#) [1.3.2023].

Santos L. H. M. L. M., Gros M., Rodriguez-Mozaz S., Delerue-Matos C., Pena A., Barceló D., Conceição M. B. S. M. Montenegro. (2013): Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* [online]. **461-462**, 302-316. ISSN 00489697. Dostupné z: [Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals - ScienceDirect](#) [8.3.2023].

Scicchitano P., Tucci M., Bellino M. C. et al. (2021): The Impairment in Kidney Function in the Oral Anticoagulation Era. A Pathophysiological Insight: history, tautomerism and activity. *Cardiovasc. Drugs Ther.* [online]. **35**(3), 505-519. ISSN 0920-3206. Dostupné z: [The Impairment in Kidney Function in the Oral Anticoagulation Era. A Pathophysiological Insight | SpringerLink](#) [5.3.2023].

- Schwertner H. A., Stankus J. J., Sychev D. A. et al. (2016): Characterization of the Fluorescent Spectra and Intensity of Dabigatran and Dabigatran Etxilate: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection. *J. Chromatogr. Sci.* [online]. **54**(9), 1648-1651. ISSN 0021-9665. Dostupné z: [Characterization of the Fluorescent Spectra and Intensity of Dabigatran and Dabigatran Etxilate: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection† | Journal of Chromatographic Science | Oxford Academic \(oup.com\)](#) [1.3.2023].
- Stangier J. (2008): Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Oral Direct Thrombin Inhibitor Dabigatran Etxilate. *Clin. Pharmacokinet.* [online]. **47**(5), 285-295. ISSN 0312-5963. Dostupné z: [Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Oral Direct Thrombin Inhibitor Dabigatran Etxilate | SpringerLink](#) [7.4.2023].
- Sun S., Wang M., Su L., Li J., Li H., Gu D., Di Francesco F. (2006): Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio. *J. Pharm. Biomed. Anal.* [online]. **42**(2), 218-222. ISSN 07317085. Dostupné z: [Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio - ScienceDirect](#) [23.3.2023].
- Top S., Akgün M., Kipçak E. et al. (2020): Treatment of hospital wastewater by supercritical water oxidation process: history, tautomerism and activity. *Water Res.* [online]. **185**(1), 345-358. ISSN 00431354. [Treatment of hospital wastewater by supercritical water oxidation process - ScienceDirect](#) [8.3.2023].
- Vadaei S., Faghihian H., Cattaneo M. et al. (2018): Enhanced visible light photodegradation of pharmaceutical pollutant, warfarin by nano-sized SnTe, effect of supporting, catalyst dose, and scavengers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* [online]. **58**(4-5), 45-53. ISSN 13826689. Dostupné z: [Enhanced visible light photodegradation of pharmaceutical pollutant, warfarin by nano-sized SnTe, effect of supporting, catalyst dose, and scavengers - ScienceDirect](#) [3.3.2023].
- Valente E. J., Lingafelter E. C., Porter W. R., Trager W. F. (1977): Structure of warfarin in solution. *J. Med. Chem.* [online]. **20**(11), 1489-1493. ISSN 0022-2623. Dostupné z: [Structure of warfarin in solution | Journal of Medicinal Chemistry \(acs.org\)](#) [21.2.2023].

Wang J., Bonakdar M. (1987): Sensitive measurements of warfarin by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* [online]. **415**, 432-437. ISSN 03784347. Dostupné z: [Sensitive measurements of warfarin by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection \(fao.org\)](#) [3.3.2023].

Weitz J. I., Harenberg J. (2017): New developments in anticoagulants: Past, present and future. *J. Thromb. Haemost.* [online]. **117**(07), 1283-1288. Dostupné z: [Thieme E-Journals - Thrombosis and Haemostasis / Abstract \(thieme-connect.com\)](#) [21.2.2023].

Yassine M., Fuster L., Dévier M. H. et al. (2018): Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices. *Chemosphere* [online]. **193**, 329-336. ISSN 00456535. Dostupné z: [Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices - ScienceDirect](#) [1.3.2023].

Zychová M., Růžičková M., Macák J., Janda V. (2013): Vlastnosti a použití superkritické vody. *Chem. Listy* [online]. **107**, 126–135. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_02_126-135.pdf [23.3.2023].