

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**ZJEDNODUŠENÍ HPLC ANALÝZY TERBINAFINU  
VE VZORCÍCH NA BÁZI BIODEGRADABILNÍCH  
POLYESTERŮ**

**SIMPLIFICATION OF TERBINAFINE HPLC ANALYSIS  
OF SAMPLES BASED ON BIODEGRADABLE  
POLYESTERS**

**Vedoucí diplomové práce: Ing. Martin Drastík, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2016**

**Andrea Malovaná**

Ráda bych poděkovala Ing. Martinu Drastíkovi, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc, trpělivost a poskytnuté rady při vypracování diplomové práce. Taktéž bych ráda poděkovala Katedře farmaceutické technologie za přípravu a poskytnutí vzorků k analýze.

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

Andrea Malovaná

## **ABSTRAKT**

Byla optimalizována a validována HPLC metoda pro stanovení terbinafinu ve vzorcích tvořených kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové. Vývoj metody spočíval v nalezení vhodných chromatografických podmínek pro separaci terbinafinu. Byla použita core-shell kolona Ascentis Express ES-CN, 15 cm × 4,6 mm; 2,7 μm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs citrát fosfátového pufru o pH 4 a acetonitrilu v poměru 40:60 (v/v). Celá chromatografická analýza probíhala při průtoku mobilní fáze 1,4 ml/min a teplotě 30 °C. Dávkovaný objem vzorku terbinafinu byl 5 μl. Optimalizovaná metoda využívala UV detekci při vlnové délce 226 nm. Retenční čas terbinafinu byl 3,3 minuty. Celkový čas analýzy byl 4 minuty. Validaci metody se potvrdila její spolehlivost při opakovaném použití. Byla testována: účinnost kolony, faktor symetrie, LOD, LOQ, linearita, opakovatelnost a robustnost.

**Klíčová slova:** terbinafin, HPLC, core-shell kolona, PLGA

## **ABSTRACT**

A HPLC method for determination of terbinafine in samples consisting of copolymers of lactic and glycolic acid was optimized and validated. The development of the method was based on the finding of suitable chromatographic conditions for separation of terbinafine. The separation was performed on the Ascentis Express ES-CN, 15 cm × 4.6 mm; 2.7 μm core-shell column. The mixture of the citrate phosphate buffer pH 4 and acetonitrile in ratio 40:60 (v/v) was chosen as the mobile phase. The mobile phase flow rate was set to 1.4 ml/min and the temperature to 30 °C. The injection volume of samples containing terbinafine was 5 μl. The UV detection at 226 nm was employed. The retention time of terbinafine was 3.3 min. The whole analysis was completed within 4 min. The method was validated, following parameters were tested: column efficiency, factor of symmetry, LOD, LOQ, linearity, repeatability and robustness.

**Keywords:** terbinafine, HPLC, core-shell column, PLGA

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	8
<b>2. ZADÁNÍ - CÍL PRÁCE</b> .....	9
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	10
<b>3.1 Terbinafin</b> .....	10
3.1.1    Základní charakteristika .....	10
3.1.2    Mechanismus účinku.....	10
3.1.3    Farmakokinetika.....	11
3.1.4    Indikace .....	11
3.1.5    Nežádoucí účinky a lékové interakce.....	12
<b>3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC</b> .....	12
3.2.1    Princip separace .....	12
3.2.2    Základní parametry chromatografického procesu.....	14
3.2.3    Instrumentace v HPLC .....	18
3.2.4    Validace.....	24
<b>3.3 Core-shell kolony</b> .....	26
3.3.1    Složení core-shell kolon .....	26
3.3.2    Účinnost povrchově porézních částic v core-shell kolonách .....	27
3.3.3    Výhody a nevýhody použití povrchově porézních částic .....	28
<b>3.4 Biodegradabilní polymery - PLGA</b> .....	29
3.4.1    Struktura PLGA .....	30
3.4.2    Syntéza .....	30
3.4.3    Degradace.....	31
3.4.4    Plastifikace .....	32
<b>3.5 Stanovení a separace terbinafinu</b> .....	33
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	35
<b>4.1 Použité chemikálie</b> .....	35
<b>4.2 Přístrojové vybavení</b> .....	35
<b>4.3 Pracovní postupy přípravy roztoků</b> .....	36

4.3.1	Příprava citrát fosfátového tlumivého roztoku o pH 4.....	36
4.3.2	Příprava mobilní fáze .....	36
4.3.3	Příprava zásobního roztoku standardu terbinafinu.....	36
4.3.4	Příprava kalibračních roztoků terbinafinu.....	36
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Vývoj chromatografické metody .....</b>	<b>37</b>
5.1.1	Vliv složení mobilní fáze a její optimalizace.....	38
5.1.2	Souhrn nalezených chromatografických podmínek .....	42
<b>5.2</b>	<b>Validace metody .....</b>	<b>43</b>
5.2.1	Účinnost chromatografické kolony .....	43
5.2.2	Faktor symetrie.....	44
5.2.3	Detekční limit a kvantifikační limit .....	45
5.2.4	Linearita .....	46
5.2.5	Opakovatelnost.....	47
5.2.6	Robustnost.....	49
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>55</b>
<b>10.</b>	<b>POUŽITÉ ZDROJE .....</b>	<b>56</b>

# 1. ÚVOD

Terbinafin patří mezi allylaminová antimykotika. Blokuje aktivitu enzymu skvalenepoxidázy, čímž zabraňuje biosyntézu ergosterolu – základní komponenty buněčné membrány hub. Působí na dermatofyty, kvasinky, plísně, dimorfní houby a dokonce i parazity. V závislosti na druhu patogenu je jeho efekt fungistatický až fungicidní. Terbinafin je významnou látkou zejména v léčbě tinea pedis a onychomykóz. Na rozdíl od azolových antimykotik, která ovlivňují cytochrom P450, terbinafin na této úrovni nezasahuje a neinterferuje tedy s jaterním metabolismem. (1); (2); (3)

V současné době dochází k rozvoji celé řady nových biodegradabilních polymerů speciálně určených k biomedicínským aplikacím. Hnací silou vývoje je jejich široké využití nejen v chirurgii, ortopedii a tkáňovém inženýrství, ale i při formulaci léčivých přípravků. Mezi tyto polymery patří také sloučeniny kyseliny mléčné a glykolové. K výhodám těchto látek řadíme dobré mechanické vlastnosti, dále pak čírost a dobrou zpracovatelnost, nevýhodou však může být jejich křehkost. Za účelem zlepšení vlastností se modifikují vhodnými plastifikátory nebo se mísí s jinými polymery, čímž získáme nosiče s různou rychlostí a průběhem uvolňování inkorporovaných léčiv. (4); (5)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. K hlavním přednostem patří vysoká selektivita, citlivost a rychlost analýzy. Celou metodu lze plně automatizovat a obvykle je potřeba pouze malé množství vzorku. HPLC je s oblibou používána ve všech oblastech výzkumu, vývoje i výroby léčiv a léčivých přípravků a uplatnění také nachází i po zavedení léčivého přípravku na trh. (6); (7); (8)

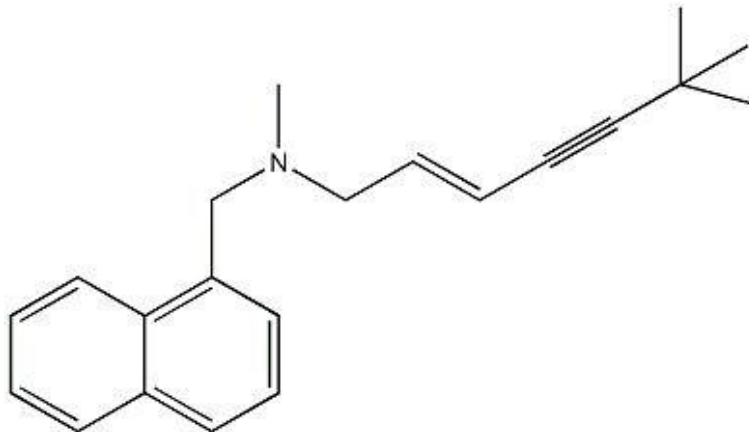


## **2. ZADÁNÍ - CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je vyvinout, optimalizovat a validovat HPLC metodu pro stanovení terbinafinu ve vzorcích na bázi biodegradabilních kopolymerů kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. Budou využity tzv. core-shell kolony, které disponují výhodnými vlastnostmi a měly by výrazně ulehčit vývoj HPLC metody. V průběhu optimalizace bude vybrána vhodná mobilní fáze, průtok, teplota a tlak. Následně bude provedena validace metody s reálnými vzorky připravenými Katedrou farmaceutické technologie. Hlavní předností metody by měla být její jednoduchost a rychlost, se kterou bude aplikována na větší množství vzorků.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 *Terbinafin*



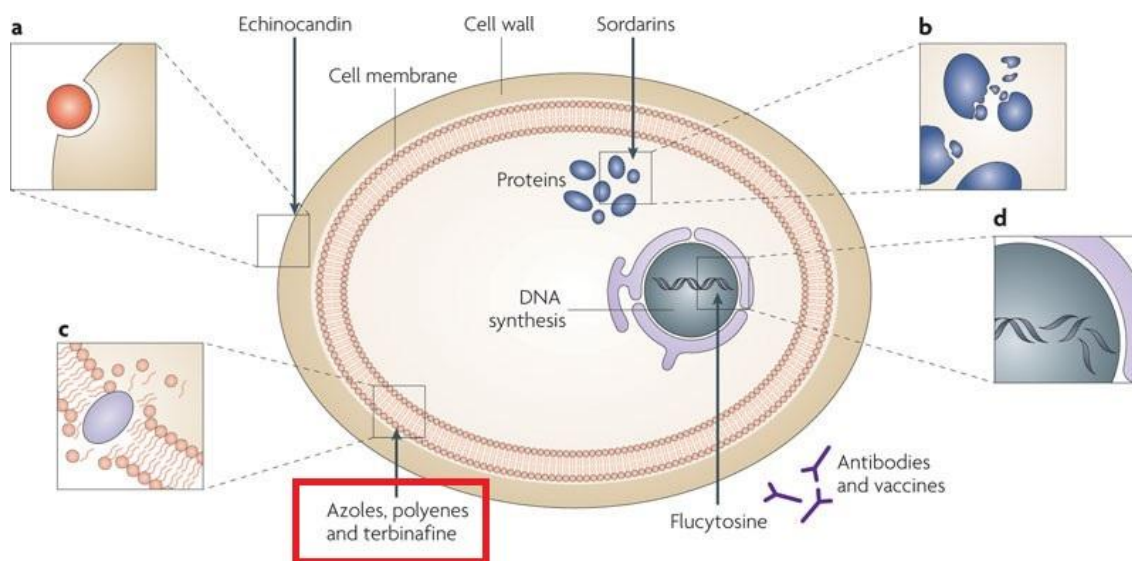
Obr. 1: Vzorec terbinafinu (9)

#### 3.1.1 **Základní charakteristika**

V posledních letech vzrůstá široká nabídka účinných antifungálních preparátů. Jedním z nich je také allylaminový derivát terbinafin (Obr. 1), který představuje lék volby v léčbě dermatofytóz, zejména onychomýkóz. Lze jej použít ve formě kožního roztoku, spreje, krému či gelu, ale i perorálně ve formě tablet. Je vhodný jak pro léčbu dospělých, tak i dětí. Má relativně málo nežádoucích účinků a lékových interakcí. (2); (10); (11); (12)

#### 3.1.2 **Mechanismus účinku**

Terbinafin zasahuje do syntézy ergosterolu buněčné membrány prostřednictvím inhibice enzymu skvalenepoxidázy. V tomto kroku dochází k intracelulární akumulaci skvalenu, který je toxický pro buňky hub, což způsobí jejich rychlý zánik. Mechanismus účinku různých antimykotik, včetně terbinafinu, ilustruje (Obr. 2). (11); (13)



Nature Reviews | Drug Discovery

Obr. 2: Mechanismus účinku antimykotik (14)

### 3.1.3 Farmakokinetika

Z hlediska perorálního podání se terbinafin dobře vstřebává. S jídlem se jeho absorpční vlastnosti nemění, tudíž nemusí být podáván nalačno. Maximální koncentrace v plazmě dosáhne za 2 hodiny. Silně se váže na plazmatické bílkoviny. (1); (13)

Jedná se o vysoce lipofilní a keratofilní látku, která se akumuluje v tukové tkáni, kůži a jejích adnexech (např. vlasový folikul), v nehtové ploténce a sebu, nikoli však v potu. Jeho eliminace z tkání probíhá v rozsahu 4–5 dní, přičemž fungicidní účinek může přetrvávat až 3 týdny po léčbě. (1); (13)

Biotransformace probíhá v játrech za využití jiných enzymatických systémů než cytochromu P450 (pouze 5 % sloučenin využívá tento cytochrom). Vznikají různé typy metabolitů jako např. karboxyterbinafin, desmethylhydroxyterbinafin či n-desmethylterbinafin, které jsou z větší části vylučovány močí, méně stolicí. (13); (15)

Terbinafin se kumuluje v mateřském mléku, proto by neměl být podáván kojícím ženám. (16)

### 3.1.4 Indikace

Nejčastější indikací terbinafinu je léčba tineí (tinea corporis, tinea cruris a tinea pedis) a kvasinkových infekcí vyvolaných rodem *Candida* (např. *Candida albicans*), ačkoli v tomto případě může být efekt variabilní v závislosti na druhu. Účinný je také v léčbě onychomykóz, houbových infekcí nehtů, způsobených dermatofyty.

V *in vitro* studiích se rovněž potvrdila aktivita terbinafinu proti grampozitivním (*Staphylococcus sp.*) a gramnegativním (*Pseudomonas aeruginosa*) bakteriím. (2)

Výhodou je i schopnost dlouhodobé depozice v keratinizovaných tkáních, což se významnou měrou podílí na snížení frekvence relapsů a zvýšení pravděpodobnosti vyléčení. (2)

### 3.1.5 Nežádoucí účinky a lékové interakce

K nežádoucím účinkům terbinafinu se řadí dyspeptické potíže a to konkrétně nevolnost, průjem, nechutenství či bolest břicha. Dále se může objevit polékový kožní exantém typu erythema exsudativum multiforme, erythema nodosum a psoriasiformní. Pacienti se mohou setkat až se ztrátou pocitu chuti, nicméně se jedná o velice nevšední a méně častý nežádoucí účinek. Čas od času lze zaznamenat zvýšené hodnoty jaterních enzymů. (1); (17)

Některé sloučeniny terbinafinu inhibují cytochrom P450 – isoformu 2D6. Z tohoto důvodu se terbinafin podílí na metabolismu některých léků, jimiž mohou být např. tricyklická antidepresiva (TCA), selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), beta-blokátory (BB) nebo inhibitory monoaminoxidázy typu B (I-MAO B). (11)

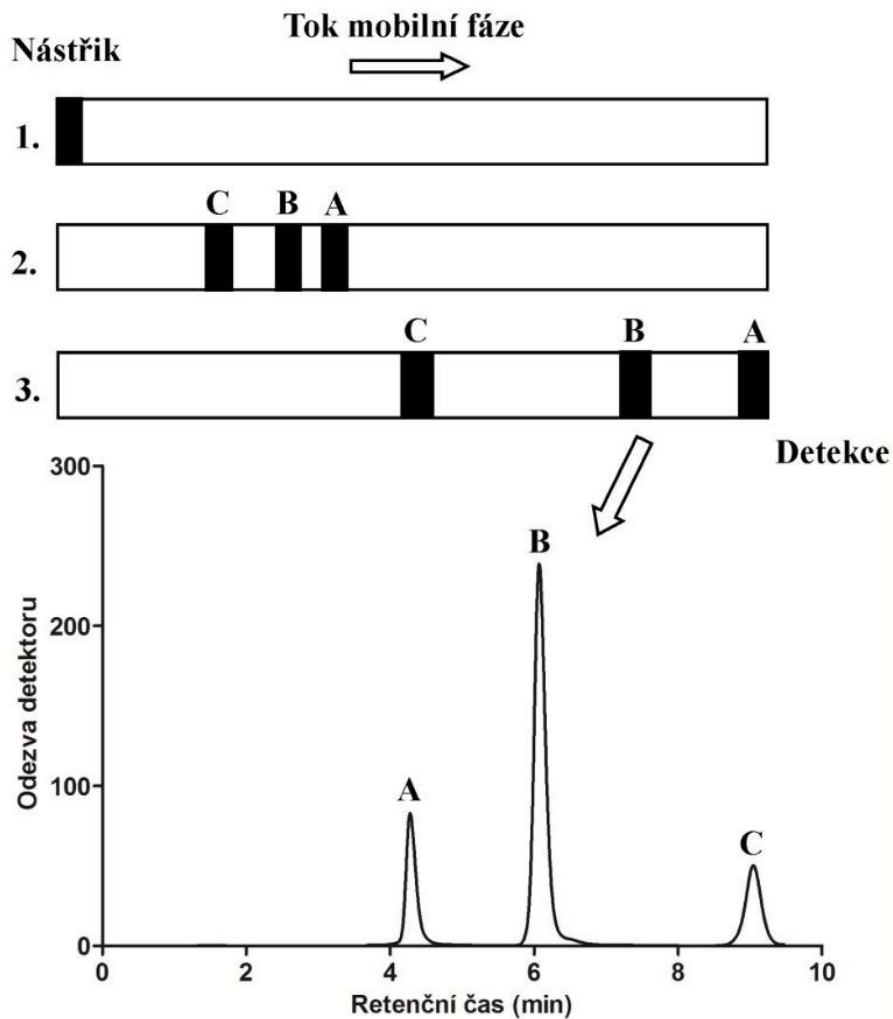
Samotná hladina terbinafinu může být zvýšena při současném podání cimetidinu a snížena rifampicinem. (16)

## 3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC

### 3.2.1 Princip separace

Principem chromatografické separace jsou rozdílné interakce jednotlivých složek analyzované směsi se stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Vzorek je unášen proudem mobilní fáze, která prochází kolonou naplněnou sorbentem o specifickém povrchu. K dělení solutů dochází v různých časových intervalech, což způsobuje odlišná retence látek na koloně. Podle míry retence klasifikujeme látky se slabšími interakcemi se stacionární fází, které jsou eluovány v krátkém čase, a látky, které jsou zadržovány silněji, čímž dochází k pozdějšímu vymytí z kolony. (8); (18)

Je-li složení mobilní fáze během chromatografického procesu konstantní, jedná se o isokratickou eluci. Jestliže se však složení mobilní fáze v průběhu analýzy programově mění, využívá se tzv. gradientová eluce. Pro látky s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi nachází uplatnění isokratická eluce, gradientovou eluci naopak volíme u látek s rozdílnými fyzikálně-chemickými parametry. (6); (19)



Obr. 3: Princip separace (20)

Záznamem průběhu chromatografické analýzy je chromatogram neboli závislost odezvy detektoru na čase. Jednotlivé složky analyzované směsi jsou reprezentovány křivkami gaussovského tvaru, které jsou nazývány píky (eluční křivky). Průběh separace lze vidět na Obr. 3. (19)

Pík může být charakterizován plochou píku ( $A$ ), dále také výškou píku ( $h$ ) a šířkou píku v poloviční výšce ( $w_h$ ), nebo výškou píku ( $h$ ) a šířkou píku mezi body inflexe ( $w_i$ ). Gaussovské píky jsou definovány vzorcem (21):

$$w_h = 1,18 \cdot w_i$$

## 3.2.2 Základní parametry chromatografického procesu

### 3.2.2.1 Distribuční konstanta $K_D$

V průběhu chromatografické analýzy dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Předpokladem pro distribuci složek vzorku je existence fázového rozhraní mezi těmito fázemi. Rozdělení jednotlivých komponent separované směsi lze popsat pomocí distribuční (rozdělovací) konstanty  $K_D$ . (19); (22)

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Distribuční konstanta vyjadřuje poměr rovnovážné koncentrace složky ve stacionární ( $c_s$ ) a mobilní ( $c_m$ ) fázi. Hodnota distribuční konstanty odráží dobu setrvání molekuly ve stacionární fázi. Čím je tato hodnota vyšší, tím větší je retence molekuly na koloně. (19); (22)

### 3.2.2.2 Retenční čas $t_R$

Nejpoužívanější kvalitativní veličinou popisující chování analytu je retenční čas ( $t_R$ ). Lze jej definovat jako dobu od nástřiku vzorku na kolonu, za kterou dosáhne eluční křivka svého maxima. Výhodou je snadná měřitelnost, kterou však na druhé straně komplikuje jeho závislost na průtoku mobilní fáze systémem, což jej činí méně univerzálním. Analyt, který není zadržován na chromatografické koloně a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze, vykazuje mrtvý retenční čas ( $t_0$ ). Pokud odečteme mrtvý retenční čas ( $t_0$ ) od retenčního času analytu dostaneme tzv. redukovaný retenční čas ( $t'_R$ ), který udává dobu interakce látky se stacionární fází. Je-li prokázána shoda retenčních časů píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu, hovoříme o důkazu totožnosti dané látky. (6); (8); (19)

### 3.2.2.3 Retenční objem $V_R$

Univerzálnější veličinou sloužící k demonstraci chromatografického procesu je retenční objem ( $V_R$ ). Definuje vzájemný vztah mezi retenčním časem ( $t_R$ ) a objemovým průtokem mobilní fáze obvykle vyjádřeným v ml/min ( $F_m$ ). Pro retenční objem platí vztah (19):

$$V_R = F_m \cdot t_R$$

### 3.2.2.4 Retenční faktor $k$

Retenční faktor  $k$  (kapacitní faktor  $k'$ , hmotnostní distribuční poměr  $D_m$ ) charakterizuje míru retence analytu. Jeho hodnota nezávisí na rychlosti průtoku mobilní fáze a rozměrech chromatografické kolony. Retenční faktor představuje bezrozměrné číslo, které je tím větší, čím více je analyt v koloně zadržován a tedy eluován později.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0},$$

kde  $V_R$  je retenční objem,  $V_0$  mrtvý objem,  $t_R$  retenční čas,  $t_0$  mrtvý retenční čas.

V mnohých případech se retenční faktor pohybuje v rozmezí 1–20, což vypovídá o dostatečné schopnosti analytu interagovat se stacionární fází. Jestliže však hodnota  $k$  přesáhne 20, citlivost měření se snižuje a doba analýzy se prodlužuje. (8); (23); (24)

### 3.2.2.5 Selektivita $\alpha$

Selektivitu neboli citlivost ( $\alpha$ ) definujeme jako schopnost chromatografického systému rozlišit dva rozdílné analyty. Taktéž bývá vyjadřována jako poměr retenčních faktorů dvou píků ( $k_1, k_2$ ), pro jejichž dostatečnou separaci musí být  $\alpha > 1$ . (8); (24)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Citlivost závisí na povaze stacionární fáze a na poměrech mobilní fáze. Může být ovlivněna také analytem a jeho interakcí s povrchem stacionární fáze. Obvykle nebývá závislá na složení eluentu či teplotě, pokud však tyto parametry přímo neovlivňují povahu analytu. (8); (24)

### 3.2.2.6 Účinnost kolony

Mírou kvality chromatografické separace je účinnost. Během vývoje metody HPLC se snažíme o co nejlepší rozdělení látek v nejkratším čase. Analyt vstříkneme na kolonu ve formě zóny, která se posunem kolonou postupně rozšiřuje. Na chromatogramu můžeme pozorovat závislost šířky píku na retenčním čase. Čím delší retenční čas ( $t_R$ ), tím větší šířka píku ( $w$ ). Na utváření píku má vliv skupina rozšiřujících efektů působících uvnitř kolony. Účinnost kolony pak lze uvést jako míru těchto efektů. (8); (19); (24)

Účinnost kolony taktéž závisí na kinetických faktorech chromatografického systému, jako jsou např. molekulární difúze, vlastnosti kolony nebo rychlost průtoku mobilní fáze. Čím je náplň kolony homogennější a její částice menší, tím je účinnost vyšší. (8)

Míru účinnosti kolony vyjadřuje bezrozměrná veličina  $N$ , která je nazývána **počet teoretických pater**:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2,$$

kde  $t_R$  je retenční čas a  $w_h$  šířka píku v polovině jeho výšky. (19)

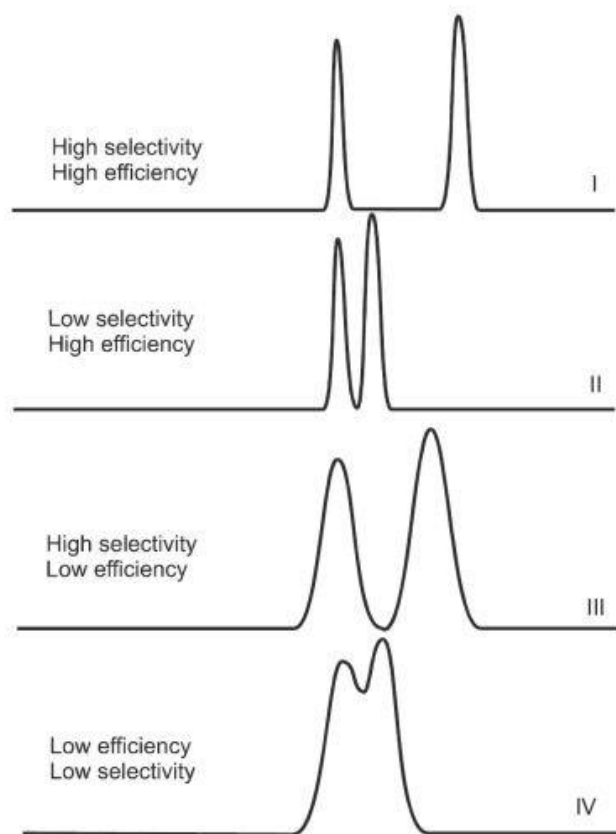
Čím vyšší je počet teoretických pater  $N$ , tím má analytická kolona větší účinnost. (19)

Počet teoretických pater ovlivňuje řada chromatografických parametrů, jako jsou např. (19):

- délka kolony ( $L$ )
- retenční faktor  $k$  (resp. retenční čas  $t_R$ )
- rychlost průtoku mobilní fáze ( $u$ )
- průměr částic v chromatografické koloně ( $d_p$ )
- teplota ( $T$ )
- viskozita mobilní fáze ( $\eta$ )

Vhodnou optimalizací selektivity a účinnosti lze dosáhnout dostatečné separace jednotlivých složek analytu. Kombinací těchto parametrů docílíme celkové charakterizace separace konkrétního chromatografického systému (Obr. 4). (8)





Obr. 4: Vliv citlivosti a účinnosti na separaci. (8)

### 3.2.2.7 Rozlišení $R_S$

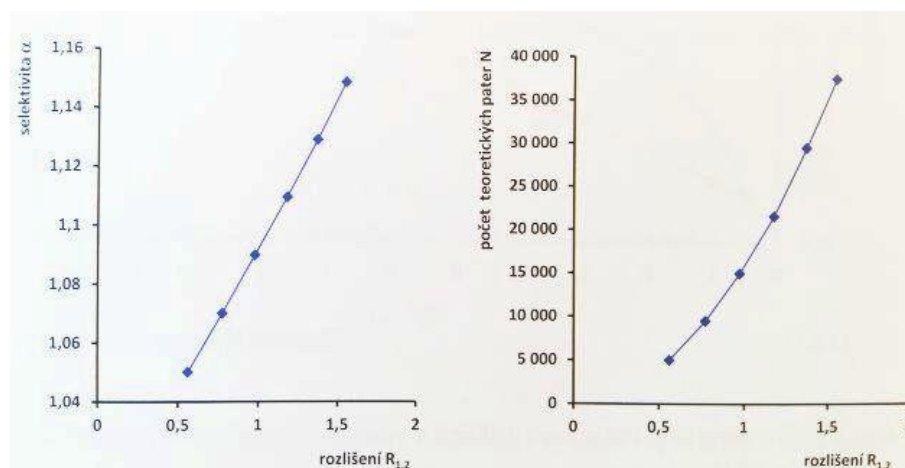
Rozlišení popisuje míru separace dvou píků podobně jako selektivita. V porovnání s ní jde o objektivnější charakteristiku, protože bere v úvahu také účinnost vyjádřenou pomocí šířky píku. Rozlišení je možno zlepšit zvýšením účinnosti, případně úpravou selektivity. (8)

Lze vypočítat dle vzorce:

$$R_S = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}},$$

kde  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy či vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků, přičemž platí, že  $t_{R2} > t_{R1}$ ,  $w_{h1}$  a  $w_{h2}$  uvádí šířky píků v poloviční výšce. (21)

Nejdůležitějším parametrem, který ovlivňuje hodnotu rozlišení, je selektivita. V porovnání s účinností stačí pouhé mírné zvýšení selektivity (1,05 → 1,15) k tomu, abychom dosáhli výrazné změny rozlišení (0,5 → 1,5). Účinnost by v tomto případě musela být zvýšena téměř 8x. Zvýšením selektivity navíc zkrátíme dobu analýzy, jelikož lze zvolit kolony s kratší délkou o nižší účinnosti (Obr. 5). (19)



Obr. 5: Vliv selektivity a účinnosti na rozlišení (19)

### 3.2.2.8 Faktor symetrie $A_s$

Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) nebo též faktor chvostování (*tailing factor*  $T_f$ ) určuje do jaké míry je konkrétní pík asymetrický. (24)

Lze jej vyjádřit podle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d},$$

v němž  $w_{0,05}$  značí šířku píku ve dvacetině jeho výšky a  $d$  vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku ve dvacetině jeho výšky. (21)

Za ideálních podmínek jsou píky dokonale symetrické a mají gaussovský tvar. Ve skutečnosti však řada píků podléhá tzv. frontování nebo chvostování. Faktor symetrie může nabývat různých hodnot. U většiny píků se jeho hodnoty pohybují v rozmezí 0,9–1,4. (24)

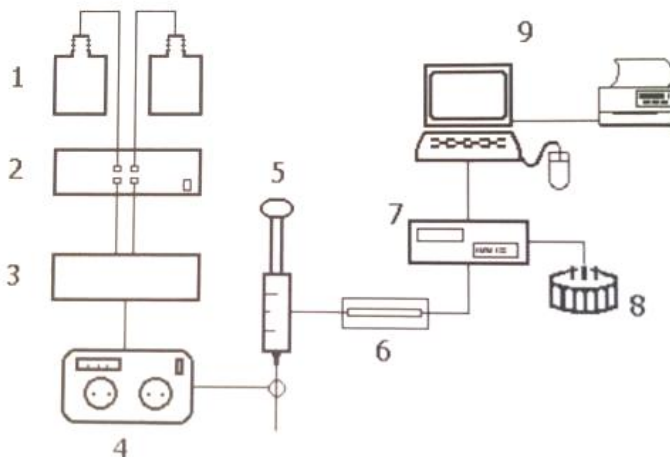
Je-li hodnota faktoru symetrie rovna jedné, hovoříme o úplné (ideální) symetrii píku. Pokud faktor symetrie dosahuje hodnot větších než jedna, nazýváme tento jev tailingem. Tailing píku může být způsoben adsorpcí nebo jinými silnými interakcemi analytu se stacionární fází. Jedná-li se o fronting, hodnota faktoru symetrie je menší než jedna. Fronting píku naopak může být důsledkem přesycení (přetížení) kolony, chemickou reakcí či izomerizací během chromatografického procesu. (24)

### 3.2.3 Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf je zařízení, které se skládá z následujících základních součástí (8):

- zásobníky mobilní fáze

- odplyňovač (*degaser*)
- vysokotlaké čerpadlo
- dávkovač vzorků
- chromatografická kolona
- detektor
- datová stanice (počítač)



Obr. 6: Schéma kapalinového chromatografu

[1] Zásobníky mobilních fází, [2] odplyňovač (*degaser*), [3] směšovač, [4] vysokotlaké čerpadlo, [5] dávkovač vzorku, [6] chromatografická kolona, [7] detektor, [8] sběrač frakcí, [9] datová stanice. (19)

Uspořádání kapalinového chromatografu (Obr. 6) může mít řadu obměn. Některé součásti lze přidat, vyřadit nebo změnit pořadí zapojení. V případě isokratické eluce je mobilní fáze transportována ze zásobníku mobilní fáze do vysokotlakého čerpadla. Pro gradientovou eluci je typický přívod mobilních fází ze dvou nebo více zásobníků a jejich mísení podle zvoleného programu ve směšovači. V dalším kroku je provedeno odplynění mobilní fáze, které probíhá v odplyňovači (*degaser*). Mobilní fáze dále směřuje přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony. Poté následuje detektor a nakonec datová stanice, kde dochází ke zpracování a vyhodnocení signálu chromatografickým softwarem. (19)

### 3.2.3.1 Zásobníky mobilních fází

Pro kontinuální provoz celého systému je nutné, aby zásobníky obsahovaly dostatečné množství rozpouštědel. Mohou být vybaveny systémem pro odplynění a speciálními filtry zhotovenými z kovu nebo teflonu s porozitou 0,20  $\mu\text{m}$ . Filtry slouží

k zachycení nežádoucích tuhých částic, které by se mohly dostat do HPLC systému. Je důležité pravidelně kontrolovat, zdali jsou zásobníky dobře uzavřeny z důvodu kontaminace okolním prostředím nebo vzhledem k možnému riziku unikání par. (8); (19)

### **3.2.3.2 Odplyňovač (degaser)**

System pro odplynění slouží k velice efektivnímu odstranění bublinek rozpuštěných plynů z mobilní fáze. Pomocí odplynění můžeme eliminovat následující problémy (19); (24):

- nestabilita základní linie
- ztráta citlivosti detekce
- neopakovatelnost retenčních časů
- nesprávná opakovatelnost dávkování vzorku
- nestabilita chodu čerpadel

Využíváme dva způsoby odplynění mobilní fáze – probublávání heliem nebo vakuový degaser. V současné době se však více uplatňuje použití vakuového degaseru, jelikož se jedná o rychlejší, účinnější a úspornější alternativu. Mobilní fáze prochází semipermeabilními kapilárami, jejichž stěny jsou propustné pouze pro plyny. Vlivem gradientu tlaků vně a uvnitř kapiláry dochází k přechodu plynů do vakuové komory. Volbou zásobníku a jeho umístěním ovlivňujeme zavzdušnění mobilní fáze. Poloha zásobníku mobilní fáze musí být vždy výše než chromatografické čerpadlo, aby docházelo k vyrovnávání tlaků. Citlivá na odplynění jsou zejména čerpadla využívající nízkotlaký mísící systém. (19);(24)

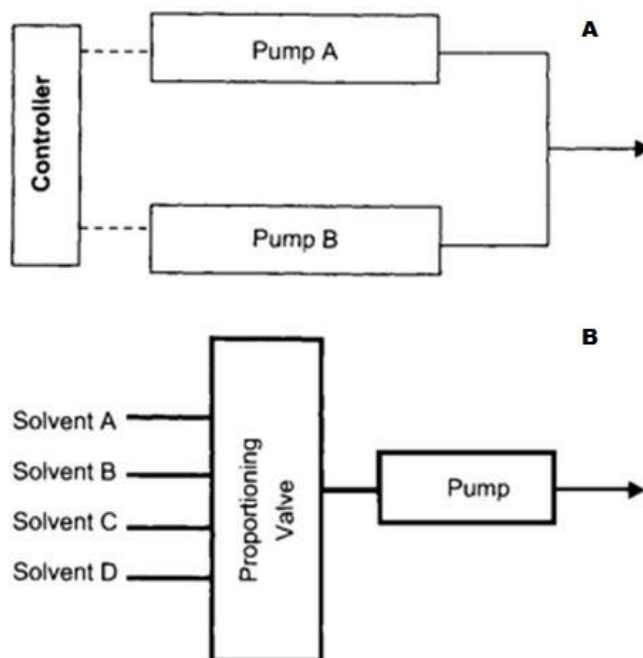
### **3.2.3.3 Vysokotlaké čerpadlo**

K zajištění stálého a nepřetržitého toku mobilní fáze chromatografickým systémem slouží vysokotlaké čerpadlo (pumpa). Na čerpadla jsou kladeny poměrně vysoké nároky (8); (19):

- výstupní tlaky na čerpadlech v rozmezí 1 až 100 MPa
- široce nastavitelný průtok v rozmezí 0,1 až 10,0 ml
- správnost a přesnost průtoku do 1 %
- odolnost materiálu vůči korozi i při použití agresivních mobilních fází
- nízký vnitřní objem čerpadla k umožnění rychlé výměny mobilní fáze

Čerpadla lze klasifikovat několika způsoby: podle rozsahu průtoku, podle hnacího mechanismu nebo podle metody mísení. (24)

Nejnovější čerpadla umožňují míchání rozpouštědel z různých zásobníků nízkotlakým nebo vysokotlakým mísícím systémem. Nízkotlaký mísící systém využívá pouze jedno čerpadlo. Složky mobilní fáze jsou míseny ještě před vstupem do čerpadla pomocí proporčního ventilu. Oproti tomu při použití vysokotlakého mísícího systému má každá složka mobilní fáze své čerpadlo. Mísení probíhá až za čerpadly, za vysokého tlaku. Součástí tohoto systému je i kontrolní jednotka, která upravuje průtok jednotlivých čerpadel (Obr. 7). Nevýhodou vysokotlakého mísícího systému jsou jeho vysoké pořizovací náklady a údržba. (24)



Obr. 7: Schéma vysokotlakého [A] a nízkotlakého [B] mísícího systému. (24)

#### 3.2.3.4 Dávkovač vzorků

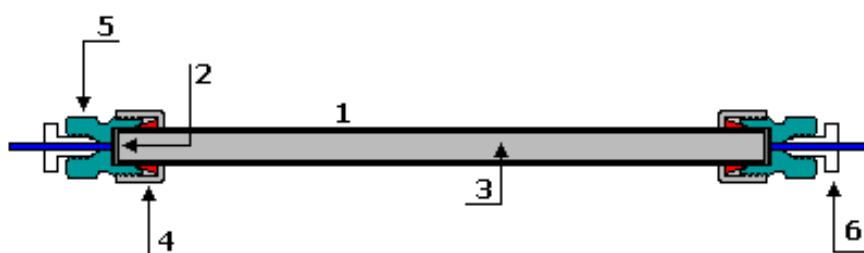
Dávkovač vzorků (injektor) umožňuje nastříknutí přesného množství analytu na chromatografickou kolonu bez přerušení toku mobilní fáze. Injektory lze dělit na manuální smyčkové, fungující na principu přepínacích ventilů, nebo automatizované (tzv. autosamplery), jejichž použití v dnešní době nezadržitelně roste. Vzhledem ke zvyšujícím se požadavkům na automatizaci dávkovacího procesu a na odolnost proti tlaku se manuální dávkovače využívají už jen zřídka. Automatické dávkovače různé konstrukce nacházejí uplatnění zejména v rutinních laboratořích zpracovávajících velké množství vzorků. (8); (19); (24)

Automatické dávkovače se vyznačují spojením injekční stříkačky se zásobníkem vzorků. K uchování vzorků slouží mikronádoby (tzv. vialky), které jsou uzavřené pryžovým septem či perforovanou zátkou z polypropylenu. Jedná se o nádoby různých objemů (nejčastěji 2 ml) zhotovené ze skla či plastu. V případě malého množství vzorku se do vialek umísťují tzv. inserty, které mají objem pouze několik set  $\mu\text{l}$ . Vialky se vkládají do zásobníku. Jednotlivé autosamplery se od sebe liší konstrukcí a principem dávkování. Jejich použití umožňuje snížit náklady a zvýšit produktivitu a přesnost. Výhodou automatických dávkovačů je možnost naprogramování a schopnost použít i malé množství vzorku. (19); (24)

### 3.2.3.5 Chromatografická kolona

Kolona je srdcem celého chromatografického procesu. Právě zde totiž dochází k separaci jednotlivých složek analyzované směsi. Kolona je místem, kde se dostává do kontaktu mobilní fáze s fází stacionární. Měla by být dostatečně účinná a selektivní, dále také odolná vůči vysokým tlakům a chemickým látkám obsaženým v mobilních fázích. Kromě toho by se měla vyznačovat dlouhou životností. (8); (23)

Každá kolona je konstruována ze dvou částí. Jednak to je vlastní tělo kolony, což je v podstatě trubice či kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází, jednak koncovka kolony, která zabezpečuje těsnost chromatografického systému v oblasti tlaků používaných v HPLC, umožňuje plynulou distribuci mobilní fáze a analytu a zadržuje náplň kolony. Těsnost kolony je velice důležitým parametrem. Pokud není dostatečná, může docházet k podtékání v systému a krystalizaci použitých solí a pufrů. Vlastní HPLC kolona se skládá z kovového pláště, nejčastěji z nerezové oceli, který je uzavřen porézní kovovou fritou. Frita brání uvolňování stacionární fáze z kolony a zároveň přispívá k plynulému toku mobilní fáze. Na koncích kolony se nacházejí ochranné kroužky s koncovou hlavicí, v níž je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (Obr. 8). (19); (23)



Obr. 8: Konstrukce chromatografické kolony.

[1] Plášť kolony, [2] kovová fritra, [3] stacionární fáze, [4] ochranný kroužek, [5] koncová hlavice, [6] vstup pro kapiláru se šroubem. (23)

V HPLC analýze se nejčastěji využívají konvenční analytické kolony o délce 1 až 30 cm s vnitřním průměrem v rozmezí 2 až 5 mm. Náplň kolony je tvořena částicemi o rozměru 1 až 10  $\mu\text{m}$ . (19)

Kolonu lze chránit před poškozením či znečištěním ze vzorku použitím předkolony. Jedná se o kratší kolonu, která se uplatňuje především při analýze složitých směsí (např. biologický materiál). Je možné je umístit rovněž mezi zásobníky mobilní fáze a dávkovací zařízení, kde chrání kolonu před kontaminantem z mobilní fáze. (25)

K zajištění rovnoměrné distribuce teploty v prostoru se používá termostat. Termostatování kolon je důležité zejména v případě, kdy chceme zabránit teplotním fluktuacím na koloně, což se následně projevuje v průběhu monitorování základní linie. Dále pak u solutů, u nichž má teplota velký vliv na kapacitní poměry. V HPLC se při zvýšení teploty o 1  $^{\circ}\text{C}$  kapacitní poměr zmenšuje o 1 %. Termostaty dělíme na dva typy: kapalinové a teplovzdušné. (19); (23)

### 3.2.3.6 Detektor

Další významnou součástí chromatografického systému je detektor. Toto zařízení umožňuje nepřetržitý záznam HPLC analýzy. Detektor se nachází za chromatografickou kolonou a snímá rozdíl odezvy při průchodu čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Na měřený signál má vliv objemová rychlost průtoku mobilní fáze, teplota, kontaminanty mobilní fáze apod. Optimální detekční zařízení by se mělo vyznačovat univerzálností, vysokou citlivostí, linearitou, spolehlivostí, snadnou manipulací a přiměřenou cenou. Podstatná je taktéž odolnost detektoru vůči změnám tlaku, teploty a složení mobilní fáze. Výběr detektoru se odvíjí od výše uvedených vlastností. Detektory klasifikujeme na koncentrační a hmotnostní. Lze je také dělit na

destrukční a nedestrukční podle toho, zda v nich dochází k chemické změně detekované komponenty. (8); (19); (23)

Jednoznačně převládající detekční technikou byly UV-VIS spektrofotometry a spektrofotometry s diodovým polem (*diode-array detector*, DAD). Následovaly detektory fluorimetrické, elektrochemické, refraktometrické, vodivostní a další. V současné době se však dostává stále více do popředí hmotnostní spektrometrie. (19)

Přehled používaných detektorů je uveden v Tab. 1.

	<b>SPEKTROFOTOMETRICKÝ</b>	<b>FLUORIMETRICKÝ</b>	<b>REFRAKTOMETRICKÝ</b>	<b>ELEKTROCHEMICKÝ</b>	<b>VODIVOSTNÍ</b>
<b>TYP DETEKTORU</b>	nedestruktivní	nedestruktivní	nedestruktivní	destruktivní	nedestruktivní
<b>ODEZVA</b>	selektivní	selektivní	univerzální	selektivní	selektivní
<b>MĚŘENÁ VELIČINA</b>	absorbance	intenzita fluorescence	index lomu	el. proud	vodivost
<b>CITLIVOST (hmotnost/ml)</b>	ng	pg	μg	pg	ng
<b>LINEÁRNÍ ROZSAH</b>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
<b>ZÁVISLOST ODEZVY NA PRŮTOKU</b>	ne	ne	ano	ano	ano
<b>TEPLOTNÍ ZÁVISLOST</b>	nízká	nízká	vysoká	vysoká	vysoká
<b>GRADIENTOVÁ ELUCE</b>	ano	ano	ne	ne	ano

Tab. 1: Přehled používaných detektorů. (23)

### 3.2.4 Validace

Validace je proces, který si klade za cíl stanovit podmínky, při nichž je vypracovaná metoda aplikovatelná. Zároveň zajišťuje stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i v různých laboratořích. Provádí se vždy při vývoji nové metody, při změně metody, při přenesení metody do jiné laboratoře nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod. Validací parametry se zapisují do validačního



protokolu doplněného o příslušnou dokumentaci (např. chromatogramy). Jejich výběr se stává základním kritériem pro posouzení způsobilosti metody či systému. Smyslem validace je demonstrovat vypracovanou metodu jako vhodnou pro daný účel. (6)

- **Správnost (accuracy)**

Správnost vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. (6)

- **Přesnost (precision)**

Přesnost definuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Rozlišují se tři úrovně přesnosti: opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost. (6)

- **Selektivita, specifita (specificity)**

Selektivita je vlastnost změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných látek, které lze předpokládat. Může se jednat o účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty či zbytková rozpouštědla. (6)

- **Detekční limit (LOD)**

Detekční limit je podobně jako kvantitativní limit parametrem citlivosti metody. LOD je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, která není stanovena kvantitativně. (6)

- **Kvantitativní limit (LOQ)**

Limit kvantifikace vyjadřuje nejnižší koncentraci látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. (6)

- **Linearita (linearity)**

Linearita definuje schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. (6)

- **Rozsah (range)**

Obvykle je odvozován z linearity metody. Rozsahem rozumíme koncentrační rozmezí, v kterých může být metoda aplikována. (6)

- **Robustnost (robustness)**

Robustnost je míra vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Hlavním cílem je určit podmínky, které by mohly ovlivnit získané výsledky.(6)

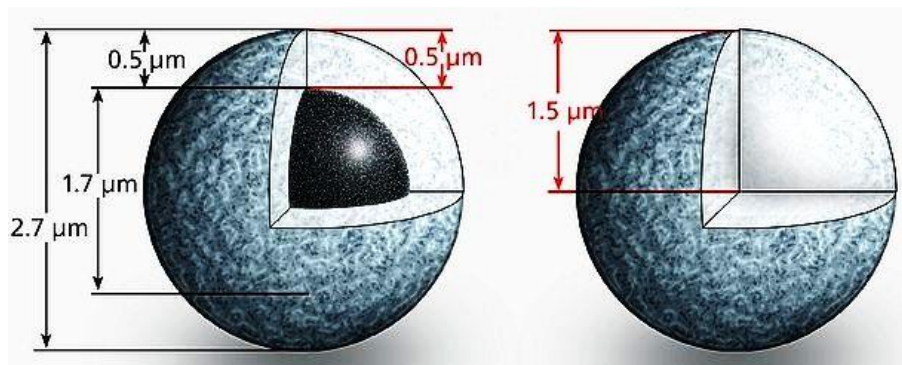
Součástí validace analytické metody je rovněž test způsobilosti (*system suitability test*, SST). Test způsobilosti zajišťuje přiměřenou účinnost chromatografického systému. Definuje určité předepsané parametry, které musí být splněny a dodržovány. Mezi tyto parametry patří: účinnost kolony, kapacitní faktor, rozlišení, faktor symetrie či relativní retence. Pokud některý z parametrů neodpovídá, upraví se chromatografické podmínky tak, aby byla splněna kritéria způsobilosti chromatografického systému a zároveň aby nedošlo k výraznému pozměnění metody. Rozmezí povolených změn se uvádí v příslušných lékopisných monografiích. Při splnění požadovaných kritérií testu způsobilosti se očekává, že dříve provedená validace je platná. (6)

### **3.3 Core-shell kolony**

V současné době nacházejí uplatnění kolony naplněné povrchově porézními částicemi. V porovnání s konvenčními plně porézními částicemi jejich použití roste a stávají se novým trendem v analýze biologických, toxikologických i jiných farmaceuticky významných sloučenin. Jejich hlavní teoretické aspekty jsou zodpovědné za překvapivě dobré chromatografické chování a představují jednu z vedoucích linií ve vývoji kapalinové chromatografie. (26)

#### **3.3.1 Složení core-shell kolon**

Účinnost a rychlost chromatografického procesu lze ovlivnit použitím kolon naplněných povrchově porézními částicemi (*porous shell particles, fused core particles, superficially porous particles*). Koncept této struktury byl popsán již v 60. letech, kdy byla poprvé připravena částice s pevným jádrem potaženým porézním pláštěm. V pozdějších letech proběhlo zdokonalení postupu výroby těchto částic, které byly dostupné pod označením HALO částice. Částice jsou tvořeny tuhým neporézním jádrem o průměru 1,7  $\mu\text{m}$  a vrstvou porézního obalu o šířce 0,5  $\mu\text{m}$ . Povrchová vrstva zaujímá asi 75 % celkového objemu částice a obsahuje póry o rozměru 9 nm. Povrchově porézní částice jsou k dispozici o celkovém průměru 1,6  $\mu\text{m}$ , 2,6 nebo 2,7  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  (Obr. 9). (19); (26)



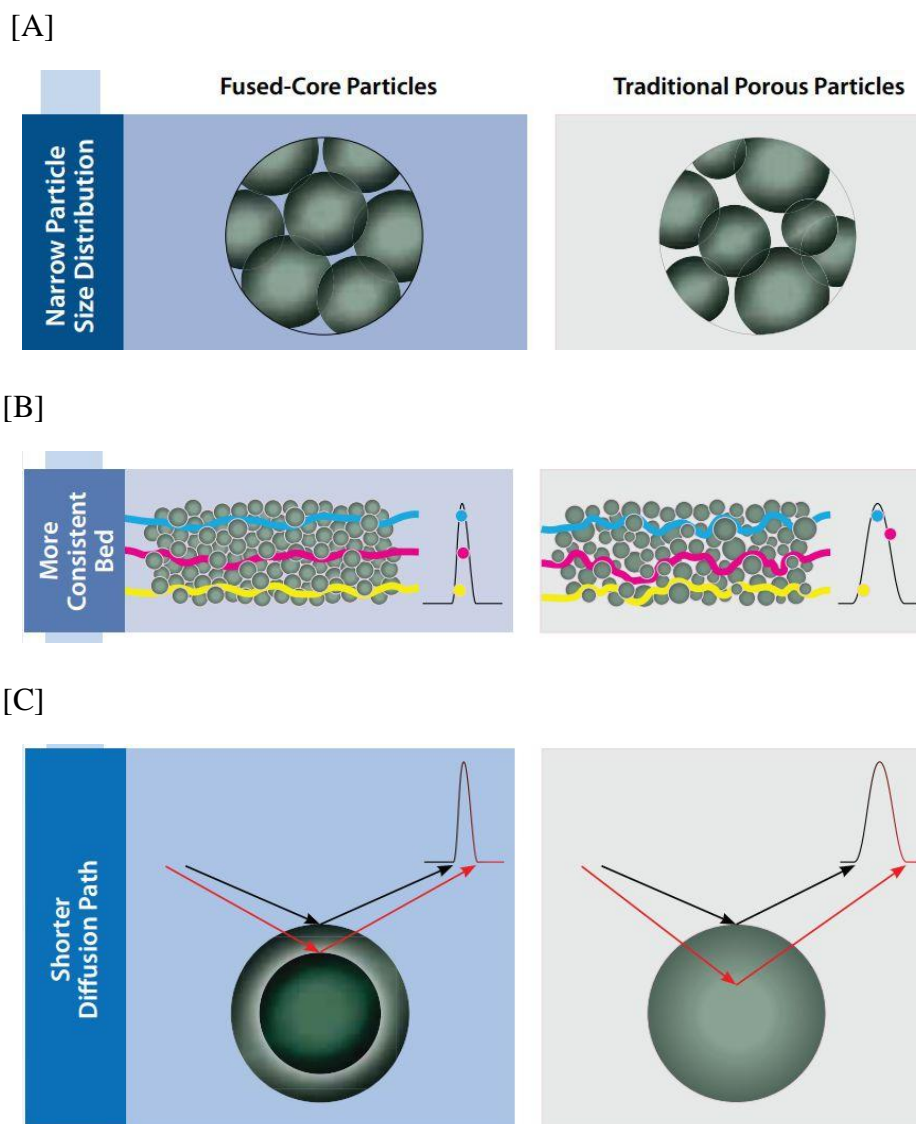
Obr. 9: Struktura plně porézní (vpravo) a core-shell částice (vlevo). Difúzní cesta oběma částicemi je znázorněna červeně. (27)

Velikost core-shell částic je jedním z nejdůležitějších parametrů. Zahrnuje průměr jádra, tloušťku vnější vrstvy, celkový průměr částic, stupeň nerovnosti povrchu, průměrný objem a také relativní směrodatné odchylky těchto vlastností. Jednotlivé core-shell částice se navzájem liší svým tvarem a zrnitostí povrchu. (28)

### 3.3.2 Účinnost povrchově porézních částic v core-shell kolonách

Přítomnost specifických povrchově porézních částic významně zlepšuje účinnost chromatografické separace. Nepochopitelné pevné jádro pro analyt způsobuje zkrácení difúzní dráhy. Důsledkem je zvýšení účinnosti kolony, tj. snížení výškového ekvivalentu teoretického patra. (19)

Vyšší účinnost povrchově porézních částic se odvíjí od několika faktorů, mezi něž patří relativně malý průměr částic, výskyt porézního obalu a ve srovnání s celkově porézními částicemi také velmi úzká velikostní distribuce částic. Pravidelnější distribuce částic přispívá k dosažení optimální hustoty naplnění chromatografické kolony. To má za následek zkrácení difúzní dráhy a zrychlení doby analýzy. Vzdálenost, kterou musí analyt překonat, je pouze šířka porézní vrstvy (Obr. 10). (19); (29)



Obr. 10: Porovnání vlastností core-shell částic s plně porézními částicemi. (29)

Vlivem zkrácení difúzní dráhy se snižuje schopnost retence. Může se lišit v závislosti na obsahu uhlíku, průměru pórů, povaze endcappingu a zvoleným postupem při výrobě kolon. (30)

### 3.3.3 Výhody a nevýhody použití povrchově porézních částic

Výhodou použití povrchově porézních částic je zejména značná rychlost analýzy a výborná účinnost. Tímto se core-shell kolony zdají být přesvědčivou alternativou ke konvenčním kolonám. V porovnání s kolonami, které obsahují částice menší než 2  $\mu\text{m}$ , core-shell kolony dosahují přibližně o 6–33 % nižší účinnosti, nicméně za vzniku přibližně o polovinu nižšího zpětného tlaku, což umožňuje využít standardní HPLC separaci. (26); (31)

Oproti tomu velkou nevýhodou jejich použití je skutečnost, že základem všech stacionárních fází kolon s povrchově porézními částicemi je silikagel. To vede ke značnému omezení chemické stability s pH v rozmezí 2 až 8 a zároveň teplotní stability, kdy teplota většinou nesmí přesáhnout 60 °C. Spektrum dostupných modifikací stacionárních fází je však relativně široké a zčásti zahrnuje i separace na reverzní fázi a HILIC. (19)

V souvislosti s redukcí průměru částic splňují kolony s povrchově porézními částicemi požadavky na potřebnou výkonnost a separaci s vysokým rozlišením, zatímco šířka porézní vrstvy zajišťuje dostatečnou retenci i kapacitu vzorků. Kromě toho nízká spotřeba rozpouštědel zlepšuje ekonomiku procesu. (30); (31)

### **3.4 Biodegradabilní polymery - PLGA**

V posledních letech se dostávají do popředí látky povahy biodegradabilních polymerů. Jedná se o odbouratelné polymerní biomateriály se specifickými vlastnostmi, díky nimž našly uplatnění v chirurgii, ortopedii, tkáňovém inženýrství a při formulaci léčivých přípravků. (5)

Na rozdíl od stabilních biomateriálů mají příznivější vliv na regeneraci poškozené tkáně, a proto se hojně využívají pro biomedicínskou aplikaci. (5)

Základním předpokladem pro kvalifikaci biomateriálu je jeho biokompatibilita, která popisuje snášenlivost látek v biologickém prostředí. Závisí na nesčetných faktorech materiálu počínaje chemickými, fyzikálními a biologickými vlastnostmi až po tvar a strukturu materiálu. (5)

Mezi další důležité rysy biomateriálů patří (5):

- minimální pravděpodobnost vyvolání trvalé zánětlivé či toxické reakce po implantaci v těle
- přijatelná životnost
- degradační čas odpovídající době hojení či procesu regenerace
- nezávadnost degradačních produktů a jejich schopnost se metabolizovat a opustit tělo
- vhodná propustnost a zpracovatelnost pro zamýšlenou aplikaci

V současné době neexistuje pouze jediný polymerní systém, který bychom mohli považovat za ideální biomateriál. Vzhledem ke složitosti a rozsahu aplikací je nutné neustále vyvíjet širokou škálu biologicky rozložitelných materiálů odpovídajícím konkrétním a jedinečným požadavkům lékařské aplikace. (5)

### 3.4.1 Struktura PLGA

Kopolymery kyseliny D, L-mléčné a kyseliny glykolové se označují jako poly(laktidy-*co*-glykolidy). V praxi se zpravidla setkáváme se zkratkou PLGA. Jedná se o produkty reakce dvou  $\alpha$ -hydroxykyselin vzniklé kondenzací a následnou polymerací. Polymer kyseliny mléčné (PLA) může existovat v opticky aktivní formě (L-PLA) a opticky neaktivní racemické formě (D,L-PLA). Použití D,L-PLA je upřednostňováno před L-PLA, jelikož umožňuje větší homogenní disperzi léčiva v polymerní matici. Kyselina mléčná je více hydrofobní než kyselina glykolová, proto kopolymery s převahou laktidů jsou méně hydrofilní a degradují pomaleji. (4); (32)

### 3.4.2 Syntéza

Polyestery (PES) mohou být syntetizovány různými způsoby. Mezi nejčastější patří přímá polykondenzace za použití katalyzátoru a sníženého tlaku, azeotropická polykondenzace, polymerace v pevném stavu či polymerace za otevření kruhu. (4)

Přímou kondenzací se polymeruje kyselina mléčná za přítomnosti katalyzátoru a sníženého tlaku. Touto cestou lze získat PLA o nízké molární hmotnosti ( $M_w$ ). Příčinou je obtížné odstranění molekul vody z vysoce viskózní reakční směsi. V průběhu syntézy není možné kontrolovat stereoregularitu, proto má výsledný PES horší mechanické vlastnosti. Tato metoda je použitelná zejména v případě, pokud požadujeme polymer s nízkou  $M_w$ . Polymery o vyšší  $M_w$  můžeme připravit za použití prepolymerů. (4); (33)

Azeotropická kondenzační polymerace představuje vhodnou cestu pro syntézu vysokomolekulárních PES. Během reakce se využívá vysoce účinného katalyzátoru a nízkovroucího organického rozpouštědla. V závěru syntézy se odstraní voda, jakožto vedlejší produkt, a rozpouštědlo se suší a recykluje zpět do reakce. Vzhledem k možnému riziku depolymerizace a racemizace se volí reakční teplota tak, aby nepřesáhla teplotu tání polymeru. Tímto způsobem lze připravit vysoce čistou PLA. (4); (33)

Polymerace v pevném stavu (*solid state polymerisation* – SSP) představuje proces, který zahrnuje zahřátí semi-krystalického, pevného prepolymeru o relativně nízké  $M_w$  nad teplotu skelného přechodu a pod teplotu tání za současného odstranění vedlejších produktů z povrchu materiálu. Samotná reakce se uskutečňuje na reaktivních koncových skupinách nacházejících se v amorfních oblastech polymeru. Reakční teplota je v tomto případě klíčovým parametrem. Její hodnota by měla být dostatečně vysoká pro nárůst řetězce polymeru, ale zároveň dostatečně nízká, z důvodu možných vedlejších reakcí jako jsou např. cyklizace či tepelná, hydrolytická a oxidativní

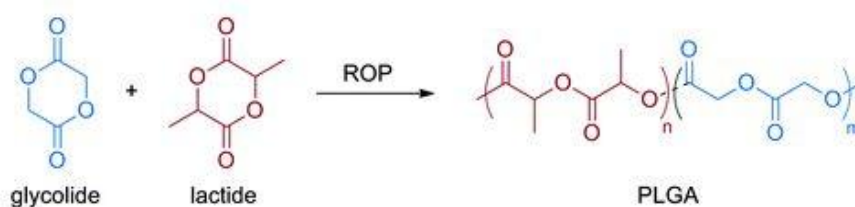
degradace polymeru. K výhodám polymerace v pevném stavu patří především nízká frekvence vedlejších reakcí a prakticky žádné znečištění životního prostředí vzhledem k minimálnímu použití organických rozpouštědel. (4); (33); (34)

Polymerace za otevření kruhu (*ring-opening polymerisation – ROP*) je metoda, která se využívá pro syntézu vysokomolekulárních polymerů s vysokým stupněm stereoregularity. Reakce vychází z nízkomolekulárních oligomerů, které se za vysoké teploty a nízkého tlaku v přítomnosti katalyzátorů transformují v cyklické dimery kyseliny mléčné – laktidy. Laktid je šestičlenný cyklický dimer vyskytující se ve třech stereoisomerních formách (Obr. 11). (4); (33)



Obr. 11: Různé stereoisomerní formy laktidu (33)

Krystalický laktid musí být vysoce čištěný, jelikož v surovém stavu obsahuje nečistoty, které by mohly negativně ovlivnit průběh polymerace. Dle použitého reakčního mechanismu a iniciátoru rozlišujeme aniontovou, kationovou a koordinačně-insertní polymeraci za otevření kruhu. Obecné schéma ilustruje Obr. 12. (4); (33)



Obr. 12: Schéma polymerace za otevření kruhu alifatických  $\alpha$ -hydroxykyselin (35)

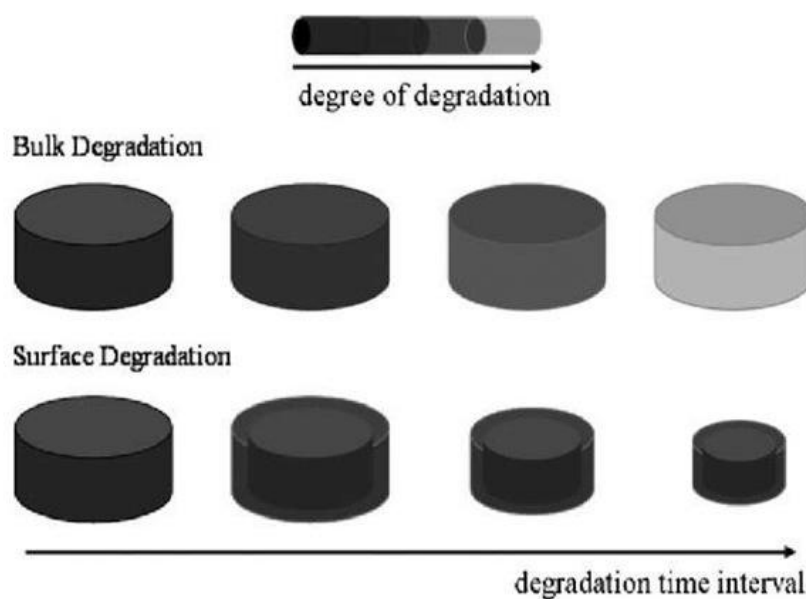
Jako nosiče léčiv se nejvíce využívají větvené polymery o nižší  $M_w$ . Vyznačují se krátkou dobou degradace v řádu několika hodin až dnů. Lze je syntetizovat stupňovou kopolymerací ternárního systému, který je složen z ekvimolární směsi kyseliny glykolové a kyseliny D,L-mléčné. Tento systém doplňuje větvicí složka různého typu a koncentrace. Nejčastěji se takto uplatňují vícesytné alkoholy a cukry, jako je např. mannitol, pentaerythritol, glukosa nebo polyvinylalkohol. (4)

### 3.4.3 Degradace

Pro bioresorbovatelné alifatické PES odvozené od kyseliny mléčné a kyseliny glykolové je nejdůležitějším degradačním mechanismem hydrolýza. V důsledku

pronikající vody do polymeru dochází ke štěpení řetězců a následnému snížení  $M_w$ . V případě PES o vysoké  $M_w$  zatím není hmotnost polymerního tělesa ovlivněna. Následující fáze, nazývaná eroze, se vyznačuje výrazným snížením hmotnosti tělesa a tvorbou ve vodě rozpustných oligomerů a monomerů. Tyto pak difundují k povrchu tělesa. (4); (36)

Degradační proces může být homogenní nebo heterogenní. Nosiče léčiv na bázi homopolymerů a kopolymerů kyseliny mléčné a glykolové se rozkládají prostřednictvím homogenní degradace. Při homogenní degradaci (*bulk degradation*) probíhají změny v celém objemu polymerního tělesa a rychlost pronikající vody do tělesa dosahuje stejných nebo vyšších hodnot než rychlost difuze rozpustných degradačních produktů z tělesa. Jedná-li se o heterogenní degradaci (*surface degradation*), rychlost pronikající vody je pomalejší než tvorba a difuze rozpustných degradačních produktů. Probíhající změny při homogenní a heterogenní degradaci ilustruje Obr. 13. (4); (37)



Obr. 13: Schéma homogenní a heterogenní degradace (38)

### 3.4.4 Plastifikace

Plastifikátory představují složku polymerního systému, jejichž správný výběr a koncentrace koreluje s průběhem a dobou degradace polymerního nosiče a uvolňováním inkorporovaného léčiva. Chemický průmysl nabízí nepřehledné množství různých plastifikátorů, avšak pouze některé jsou schválené pro farmaceutické použití. Plastifikátory snižují křehkost, zvyšují mechanickou odolnost a ovlivňují taktéž zpracovatelnost polymeru. Jejich použitím dochází k solvataci celé molekuly a následnému zvětšení vzdáleností mezi molekulami. Tím se oslabují intermolekulární



síly a klesá reaktivita polymeru. V praxi nacházejí uplatnění plastifikátory s polymerem mísitelné či nemísitelné, hydrofilní nebo lipofilní, nízkomolekulární či vysokomolekulární. Z bezpečnostního hlediska by neměly být příliš těkavé, aby nedocházelo k jejich vyprcháání při zvýšené teplotě během zpracování nebo při uchovávání. (4); (39); (40)

### **3.5 Stanovení a separace terbinafinu**

Český lékopis využívá pro stanovení terbinafinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Byla vybrána analytická kolona C<sub>18</sub> o rozměrech 150 mm × 3 mm a zvolena teplota 40 °C. Pro přípravu mobilní fáze je nutné vyrobit tlumivý roztok a rozpouštěcí směs. Samotná mobilní fáze je pak směsí objemových dílů tlumivého roztoku a rozpouštěcí směsi v poměru 30:70 nebo 5:95. Detekce probíhá spektrofotometricky za použití vlnové délky 280nm. Průtoková rychlost činí 0,8ml/min a objemu nástřiku je 20 µl. (21)

Jako další způsob stanovení terbinafinu se jeví použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie za těchto podmínek: analytická kolona Vertical® RP-C<sub>18</sub> o rozměrech 250 mm × 4.6 mm a velikosti částic 5 µm, mobilní fáze ve složení methanol a voda (95:5), rychlost průtoku 1,2 ml/min, detekce při 254nm. Retenční čas terbinafinu se pohybuje okolo 6 minut. Použití této metody je účinné. Byla ověřena její správnost, přesnost, robustnost a linearita v celém analytickém rozsahu. Je specifická pro stanovení a kvantifikaci terbinafinu jak v roztoku či tabletách, tak ve vzorcích pro disoluční testy. (41)

Další HPLC metoda byla vyvinuta pro stabilitu indikující testy. Analýza probíhala na koloně ZORBAX Eclips XDB C<sub>18</sub> o rozměrech 150 mm × 4,6 mm s velikostí částic 3,5 µm, při teplotě 30 °C a UV detekci při 222nm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs pufru, isopropylalkoholu a methanolu v poměru 40:12:48. Pufr byl připraven smícháním 1000 ml vody s 2 ml triethylaminu za současné úpravy pH kyselinou trifluoroctovou na hodnotu 3,4. Průtoková rychlost byla 1 ml/min. Navržená metoda byla s úspěchem aplikována pro stanovení terbinafinu ve formě tablet. Tento způsob stanovení poskytl výsledky, které byly v souladu s výsledky získanými referenční metodou. K prokázání stability byla daná látka v souladu s příslušnými pokyny podrobena degradačním procesům. Ukázalo se, že v průběhu oxidace se terbinafin mírně degradoval, zatímco za jiných stresových podmínek zůstal stabilní. (42)

Pro stanovení terbinafinu, jeho nečistot a tří degradačních produktů byla optimalizována a validována RP HPLC metoda s využitím propylparabenu jako vnitřního standartu. Analýza probíhala na kapalinovém chromatografu Schimadzu LC-

2010 C se zabudovaným UV-VIS detektorem. Teplota byla nastavena na hodnotu 25 °C. Byla použita analytická kolona NUCLEOSIL 100-5-CN o rozměrech 250 mm × 4,6 mm a částicemi o velikosti 5 μm. Pro separaci byla zvolena mobilní fáze složená z tetrahydrofuranu, acetonitrilu a citrátového pufru o pH 4,5 v poměru 10:20:70. Detekce byla provedena při vlnové délce 226 nm, optimální průtok činil 0,8 ml/min a objem nástřiku byl 2 μl. Metodu lze aplikovat pro běžné stanovení terbinafinu a všech jeho nečistot podobné struktury s uspokojující přesností, správností a selektivitou. Doba analýzy byla kratší než 32 minut. (43)

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

- Purifikovaná voda: MilliQ, Millipore
- Acetonitril (ACN): Sigma Aldrich
- Terbinafin baze: KFT, FaF UK
- Kyselina citronová: Sigma Aldrich
- Hydrogenfosforečnan sodný: Sigma Aldrich

### 4.2 Přístrojové vybavení

- Degasér: Shimadzu GT-154
- Pumpa: Shimadzu LC-10AD VP
- Směšovací jednotka: Shimadzu FCV-10AL VP
- Termostat: Shimadzu CTO-10ACVP
- Kolona: Ascentis Express ES-CN; 15 cm × 4,6 mm; 2,7 μm
- Předkolona: Ascentis Express ES-CN; 0,5 cm × 4,6 mm; 2,7 μm
- UV/VIS detektor: Shimadzu SPD-20A
- Počítačový software: Clarity version 5.0.0.323
- Analytické váhy: Sartorius GMBH (typ: A200S)
- Magnetická míchačka: MrHei – Mix S
- pH konduktometr: InoLab pH / Cond 720
- Vakuové čerpadlo: Vace-space 20
- Stříkačkový filtr: MS Nylon; 0,22 μm
- Ultrazvuková lázeň: Bandelin Sonorex

### **4.3 Pracovní postupy přípravy roztoků**

#### **4.3.1 Příprava citrát fosfátového tlumivého roztoku o pH 4**

K přípravě citrát fosfátového pufru byla použita kyselina citronová o koncentraci 0,01 mol/l ( $M_w = 192,12$  g/mol) a hydrogenfosforečnan sodný o koncentraci 0,02 mol/l ( $M_w = 141,96$  g/mol). Navážka 0,96 g kyseliny citronové byla převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněna purifikovanou vodou po rysku. Zásobní roztok hydrogenfosforečnanu sodného byl připraven v odměrné baňce rozpuštěním 0,71 g soli v 250 ml purifikované vody. Příslušné roztoky byly smíchány v kádince v poměru 2:3. U výsledného roztoku byla pomocí pH konduktometru stanovena hodnota pH. Případné odchylky od požadovaného pH byly upraveny přidáním roztoku kyseliny nebo soli.

#### **4.3.2 Příprava mobilní fáze**

Jako mobilní fáze byla zvolena směs citrát fosfátového pufru a ACN. Nejprve byl připraven citrát fosfátový pufru o pH 4 a ten byl následně smíchán s ACN v poměru 40:60. Směs byla dále zfiltrována za použití podtlaku 0,4 bar přes membránový filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### **4.3.3 Příprava zásobního roztoku standardu terbinafinu**

Zásobní roztok terbinafinu o koncentraci 2,5 g/l byl připraven navážením 0,0625 g standardu terbinafinu, který byl následně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn ACN po rysku. Vzniklý roztok byl použit jako standard terbinafinu při ředění kalibračních roztoků s nižší koncentrací terbinafinu. Zásobní roztok byl uchováván v chladničce při teplotě okolo 3 °C

#### **4.3.4 Příprava kalibračních roztoků terbinafinu**

Kalibrační roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku terbinafinu o koncentraci 2,5 g/l. Při tvorbě kalibrační řady byly zvoleny koncentrace 0,1 g/l, 0,075 g/l, 0,05 g/l, 0,025 g/l, 0,01 g/l a 0,0025 g/l. Kalibrační roztoky byly následně ředěny směsí pufr:ACN v poměru 40:60 a poté zfiltrovány pomocí injekční stříkačky přes filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  do vialek.

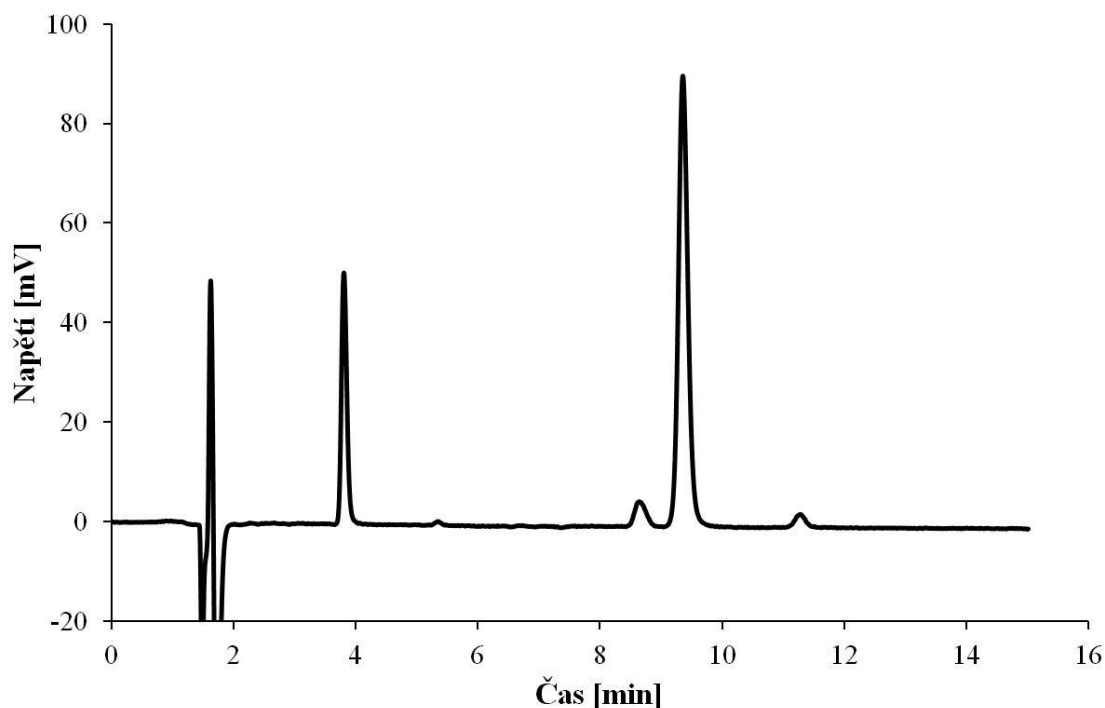
## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Vývoj chromatografické metody

Při optimalizaci HPLC metody pro stanovení terbinafinu se vycházelo z metody vyvinuté Mgr. Zahálkou (KACH) a mírně poupravené dr. Drastíkem (KBFCH):

- Mobilní fáze: citrát fosfátový pufr:ACN 60:40 (v/v)
- pH tlumivého roztoku: 4,5
- Průtok: 0,9 ml/min
- Teplota: 60 °C
- Vlnová délka detekce: 226 nm
- Dávkovaný objem: 5  $\mu$ l
- Retenční čas terbinafinu: 9,3 min.
- Celková doba analýzy: 12 min.

Při zvolených výchozích podmínkách byla doba analýzy terbinafinu dlouhá (Obr. 14), vysoké koncentrace soli v pufru představují zvýšené riziko ucpání kolony a vysoká teplota snižuje životnost kolony. Z těchto důvodů byly analytické podmínky dále optimalizovány.

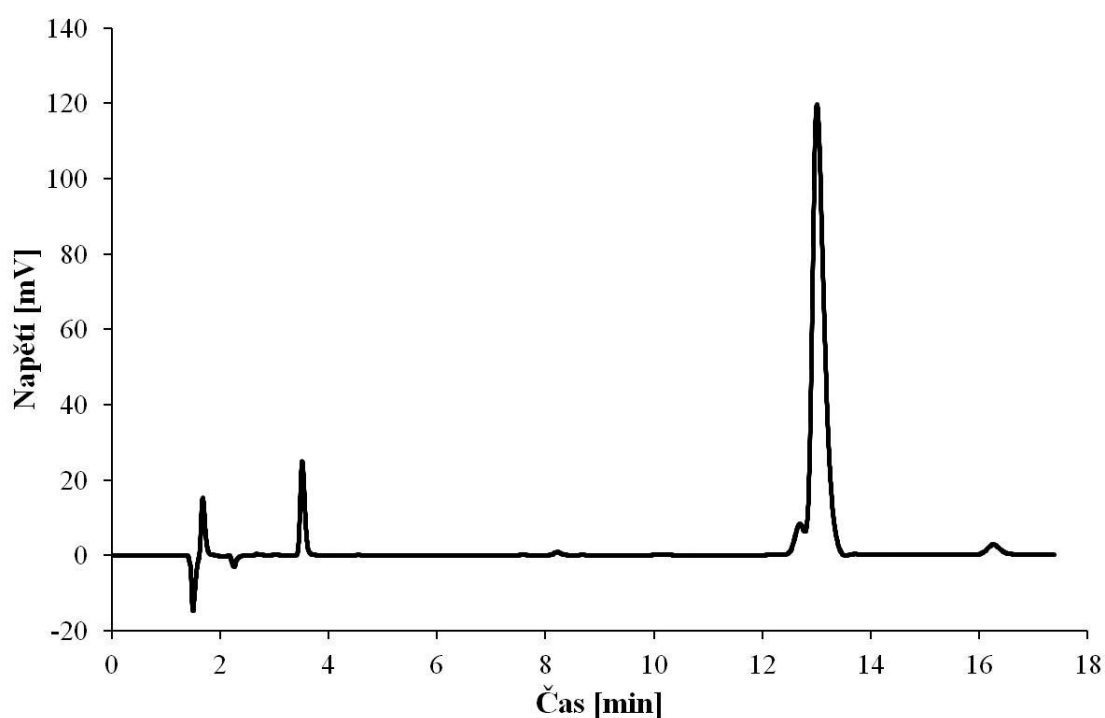


Obr. 14: Chromatogram roztoku standardu terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (60:40, v/v), pH 4,5, průtok 0,9 ml/min, teplota 60 °C, dávkovaný objem 5  $\mu$ l,  $t_{R(\text{terbinafin})}$  9,3 min

U testovaných směsí se zkoušelo měnit poměry jednotlivých komponent mobilní fáze, hodnoty pH, koncentrace složek pufrů, teplotu měření a průtok.

### 5.1.1 Vliv složení mobilní fáze a její optimalizace

Při chromatografické analýze terbinafinu se vycházelo z tlumivého roztoku složeného z kyseliny citronové o koncentraci 0,1 mol/l a hydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci 0,2 mol/l. V prvním kroku se koncentrace složek pufru snížily na hodnoty 0,01 mol/l a 0,02 mol/l. Vzhledem k výchozím podmínkám se doba analýzy prodloužila asi o 4 minuty a navíc došlo k nedostatečnému oddělení vymývaných nečistot od terbinafinu (Obr. 15).



Obr. 15: Chromatogram roztoku standardu terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (60:40, v/v), pH 4,5, průtok 0,9 ml/min, teplota 60 °C, dávkovaný objem 5  $\mu$ l,  $t_{R(\text{terbinafin})}$  13 min

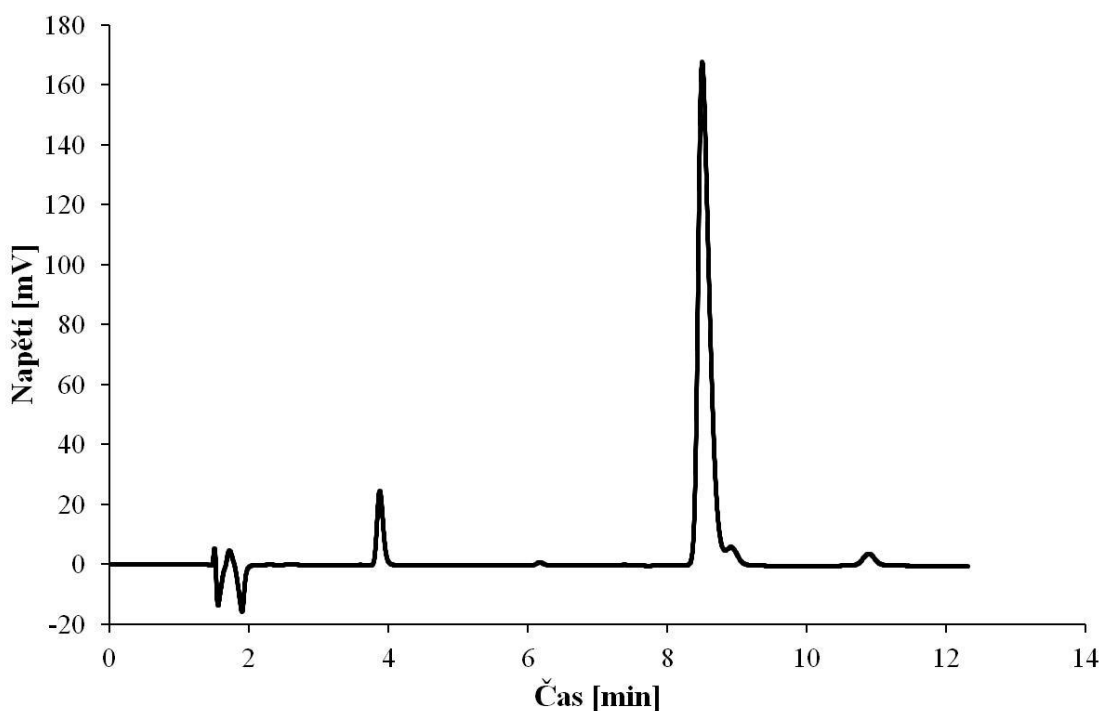
Následně byly jednotlivé komponenty pufru upravovány ředěním až na koncentraci kyseliny citronové 0,001 mol/l a koncentraci hydrogenfosforečnanu sodného 0,002 mol/l při současném zachování výchozích podmínek. Retenční čas terbinafinu byl v tomto případě 40 minut, což je pro požadavek krátké doby analýzy nepřijatelné.

Další uvažovanou možností byla změna pH zvoleného pufru. Hodnota pH byla upravována v rozmezí 3,6 až 5,5 přidáním kyseliny nebo soli do roztoku pufru. Vliv hodnoty pH na chromatografickou analýzu terbinafinu ilustruje Tab. 2.

	<b>0,01M kys. citronová + 0,02M hydrogenfosforečnan sodný</b>	<b>0,001M kys. citronová + 0,002M hydrogenfosforečnan sodný</b>
<b>pH = 3,6</b>	$t_{R(\text{terbinafin})} = 8,5$	$t_{R(\text{terbinafin})} = 12,1$
<b>pH = 4</b>	$t_{R(\text{terbinafin})} = 10,8$	$t_{R(\text{terbinafin})} = 18$
<b>pH = 4,5</b>	$t_{R(\text{terbinafin})} = 13,1$	$t_{R(\text{terbinafin})} = 40,2$
<b>pH = 5,5</b>	$t_{R(\text{terbinafin})} = 48,5$	$t_{R(\text{terbinafin})} = \text{není k dispozici}$

Tab. 2: Vliv hodnoty pH na chromatografickou analýzu terbinafinu

Z Tab. 2 je patrné, že s rostoucí hodnotou pH pufru dochází k prodloužení retenční doby terbinafinu. Kombinací 0,01M kys. citronové a 0,02M hydrogenfosforečnanu sodného a volbou pH 3,6 se terbinafin eluoval nejrychleji za dosažení nejnižší hodnoty retenčního času (Obr. 16).



Obr. 16: Chromatogram roztoku standardu terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (60:40, v/v), pH 3,6, průtok 0,9 ml/min, teplota 60 °C, dávkovaný objem 5  $\mu$ l,  $t_{R(\text{terbinafin})}$  8,5 min

Oproti tomu kombinací 0,001M kys. citronové a 0,002M hydrogenfosforečnanu sodného a výběrem pH 5,5 se eluce terbinafinu vůbec neuskutečnila ani po jedné hodině od nástřiku na kolonu a měření bylo zastaveno.

Z důvodu omezené stability stacionární fáze v kyselém prostředí a možného znehodnocení kolony bylo pro další měření zvoleno pH 4 s koncentrací kys. citronové 0,01 mol/l a koncentrací hydrogenfosforečnanu sodného 0,02 mol/l.

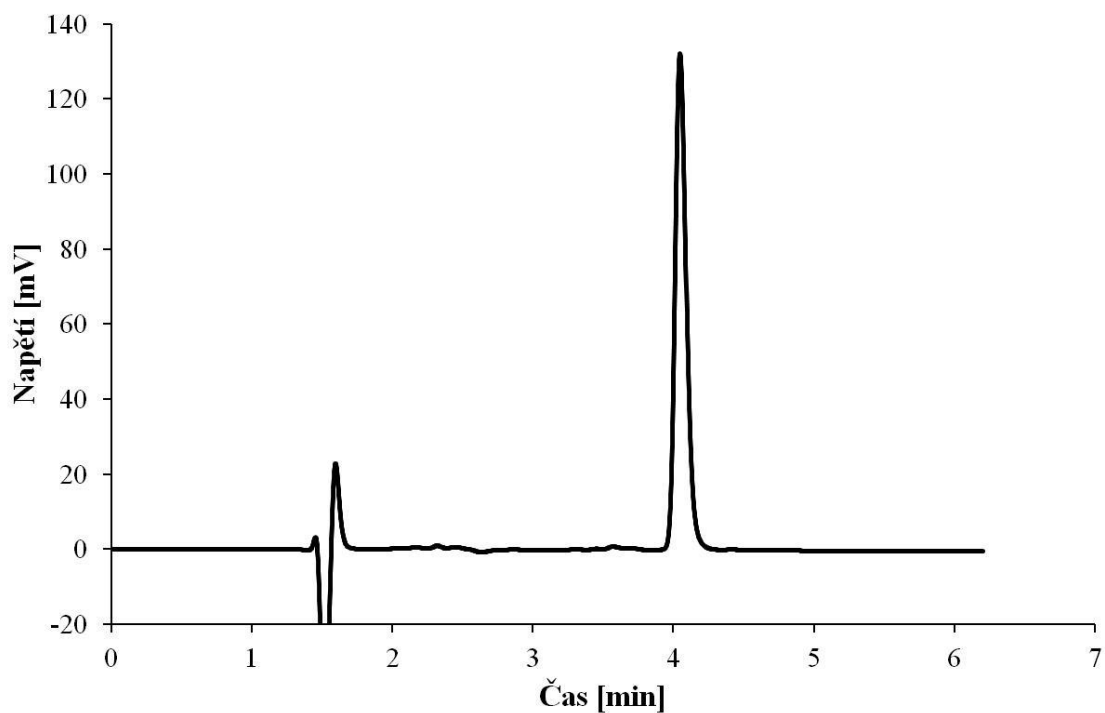
Dále byly zkoumány poměry pufru a ACN v mobilní fázi. Poměry složek mobilní fáze byly měněny vždy o 5 dílů v rozsahu od 35:65 až do 65:35. Jednotlivé retenční časy terbinafinu při použití různých poměrů mobilní fáze jsou shrnuty v Tab. 3.

<b>citrát fosfátový pufr:ACN</b>	<b>retenční čas <math>t_R</math> terbinafinu</b>
35:65	3,9
40:60	4
45:55	4,8
50:50	5,6
55:45	6,8
60:40	9,9
65:35	12,9

Tab. 3: Různé poměry citrát fosfátového pufru:ACN a retenční časy  $t_R$  terbinafinu

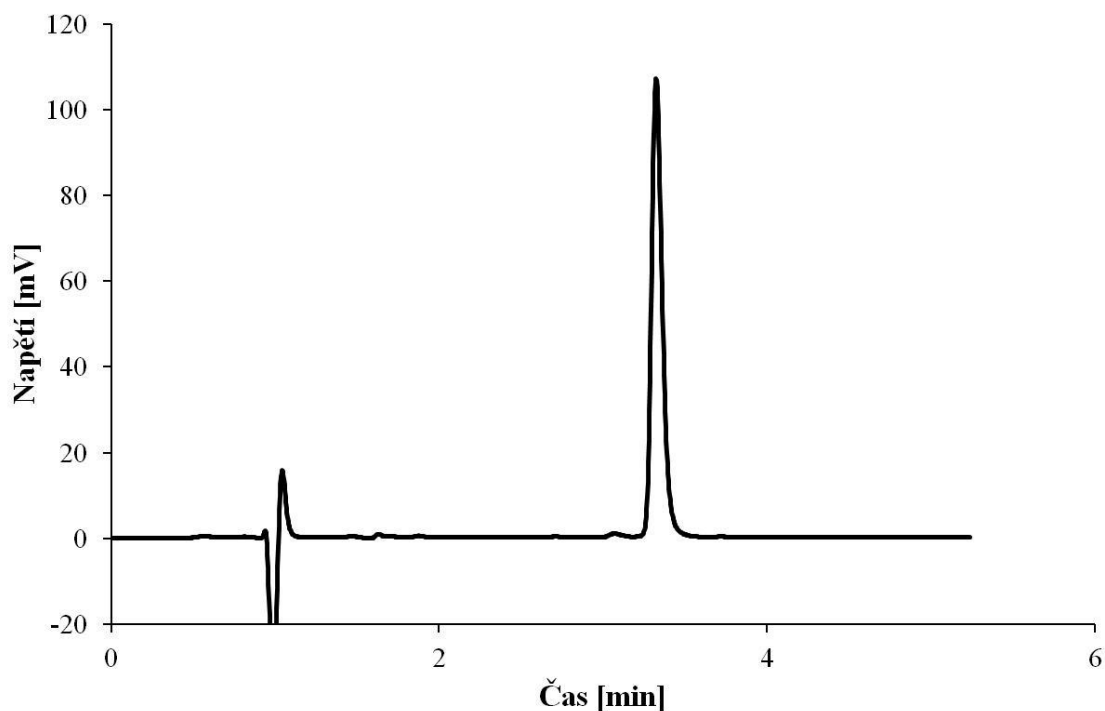
Vlivem zvyšování podílu organické složky (ACN) v mobilní fázi se retenční čas terbinafinu postupně zkracoval. Optimální byl poměr pufr:ACN (40:60), jelikož byly získány zřetelně oddělené píky terbinafinu a vymývaných nečistot. Kromě toho měly píky štíhlý, ostrý tvar a byly snadno integrovatelné (Obr. 17).





Obr. 17: Chromatogram roztoku vzorku terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (40:60, v/v), pH 4, průtok 0,9 ml/min, teplota 60 °C, dávkovaný objem 5  $\mu$ l,  $t_{R(\text{terbinafin})}$  4 min

Z důvodu urychlení celé analýzy byl zvyšován průtok mobilní fáze chromatografickým systémem. Rychlost průtoku mobilní fáze byla prozkoušena v rozmezí 0,9 ml/min až 1,4 ml/min. Velikost průtoku byla volena s ohledem na odolnost kolony tak, aby tlak v systému nepřekročil 25 MPa. V porovnání s původní hodnotou 0,9 ml/min způsobilo zvýšení průtoku na hodnotu 1,4 ml/min očekávané zkrácení retenčního času terbinafinu. Při průtokové rychlosti 1,4 ml/min trvala celá analýza 4 minuty. Společně s průtokem byla upravena také teplota, která byla snížena na 30 °C (Obr. 18), opět z důvodu snížení zátěže kolony, neboť vysoké teploty negativně ovlivňují její životnost.



Obr. 18: Chromatogram roztoku vzorku terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (40:60, v/v), pH 4, průtok 1,4 ml/min, teplota 30 °C, dávkovaný objem 5  $\mu$ l,  $t_{R(\text{terbinafin})}$  3,3 min

### 5.1.2 Souhrn nalezených chromatografických podmínek

Pro analýzu terbinafinu byla zvolena core-shell kolona Ascentis Express ES-CN o rozměrech: 15 cm  $\times$  4,6 mm; 2,7  $\mu$ m. Na základě provedených měření byly zjištěny tyto optimální podmínky:

- Mobilní fáze: citrát fosfátový pufr:ACN (40:60, v/v)
- pH tlumivého roztoku: 4,0
- Průtok: 1,4 ml/min
- Teplota: 30 °C
- Tlak: 19,2 MPa
- Vlnová délka detekce: 226 nm
- Dávkovaný objem: 5  $\mu$ l
- Retenční čas terbinafinu: 3,3 min.
- Celková doba analýzy: 4 min.

Nalezené eluční parametry umožnily získání výsledných chromatogramů v poměrně krátkém čase.

## 5.2 Validace metody

Validací metody rozumíme vhodnost použití daného systému. Cílem validace je potvrdit, že zvolený postup je opakovaně aplikovatelný pro získání relevantních výsledků. Pro ověření byl použit vzorek terbinafinu o koncentraci 0,1 g/l, který byl 6krát proměřen.

### 5.2.1 Účinnost chromatografické kolony

Účinnost chromatografické kolony lze vyjádřit jako zdánlivý počet teoretických pater (N) dle následujícího vzorce:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2,$$

v němž  $t_R$  značí retenční čas či vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku vzorku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce a  $w_h$  představuje šířku píku v polovině jeho výšky. (21)

Účinnost kolony roste s počtem teoretických pater. Počet teoretických pater závisí na stanovované složce, na koloně, teplotě kolony, mobilní fázi či nebo na retenčním čase. (21)

Jednotlivé hodnoty byly vyhodnocovány počítačovým systémem Clarity version 5.0.0.323. Tyto hodnoty uvádí Tab. 4.

n	počet pater N
1	10515
2	10515
3	9695
4	9580
5	9560
6	10431

Tab. 4: Účinnost chromatografické kolony

Počet měření: **n = 6**  
Aritmetický průměr jednotlivých hodnot: **10049,33**  
Požadavek ČL 2009: **N > 1500**

Z Tab. 4 vyplývá, že požadavek ČL 2009 na počet teoretických pater ( $N > 1500$ ) je splněn.

### 5.2.2 Faktor symetrie

Faktor symetrie píku  $A_S$  lze vyjádřit vztahem:

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d},$$

v němž  $w_{0,05}$  značí šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky a  $d$  vzdálenost mezi kolnicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. (21).

Pokud se hodnota  $A_S$  rovná 1,0, mluvíme o úplné (ideální) symetrii píku. Požadavek ČL 2009 je rozmezí **0,8-1,5**. (21)

Jednotlivé hodnoty byly vypočítány počítačovým softwarem Clarity version 5.0.0.323. Tyto hodnoty jsou shrnuty v Tab. 5.

n	$A_S$
1	1,489
2	1,512
3	1,519
4	1,487
5	1,519
6	1,489

Tab. 5: Faktor symetrie píku  $A_S$

Počet měření: **n = 6**

Aritmetický průměr jednotlivých hodnot: **1,503**

V porovnání s požadavkem ČL 2009 je hodnota  $A_S = 1,503$  hraniční.

Počítačovým softwarem Clarity version 5.0.0.323. byla rovněž vyhodnocena tzv. **asymetrie píku**. Faktor asymetrie píku  $A$  lze vyjádřit vztahem:

$$A = \frac{t}{f}$$

jako poměr šířky sestupné části píku  $t$  k vzestupné části píku  $f$  obvykle v 5 % nebo 10 % výšky píku. (19)

Aby pík splňoval požadavek na asymetrii, musí být hodnota faktoru asymetrie píku  $A$  v intervalu  $0 < A < 2$ . (44)

Hodnoty asymetrie píku lze shlédnout v Tab. 6.

n	A
1	1,750
2	1,933
3	1,867
4	1,867
5	1,933
6	1,750

Tab. 6: Faktor asymetrie píku A

Počet měření:  $n = 6$

Aritmetický průměr jednotlivých hodnot: **1,850**

Naměřená hodnota  $A=1,850$  odpovídá požadavku ( $0 < A < 2$ ).

### 5.2.3 Detekční limit a kvantifikační limit

Detekční limit (**LOD**) charakterizuje nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, kdy je analytický signál významně odlišný od šumu. (19)

Vypočítá se dle vzorce:

$$LOD = 3 \cdot \frac{\text{šum}}{b_1},$$

kde  $b_1$  je směrnice kalibrační přímky. (19)

$$LOD = 3 \cdot \frac{0,18}{9444}$$

Hodnota LOD vyšla  $5,72 \cdot 10^{-5}$  g/l.

Kvantifikační limit (**LOQ**) vyjadřuje nejnižší koncentraci látky stanovitelnou s dostatečnou přesností a správností dovolující kvantitativní hodnocení.

Vypočítá se dle vzorce:

$$LOQ = 10 \cdot \frac{\text{šum}}{b_1},$$

kde  $b_1$  je směrnice kalibrační přímky. (19)

$$LOQ = 10 \cdot \frac{0,18}{9444}$$

Hodnota LOQ činí  $19,06 \cdot 10^{-5}$  g/l.

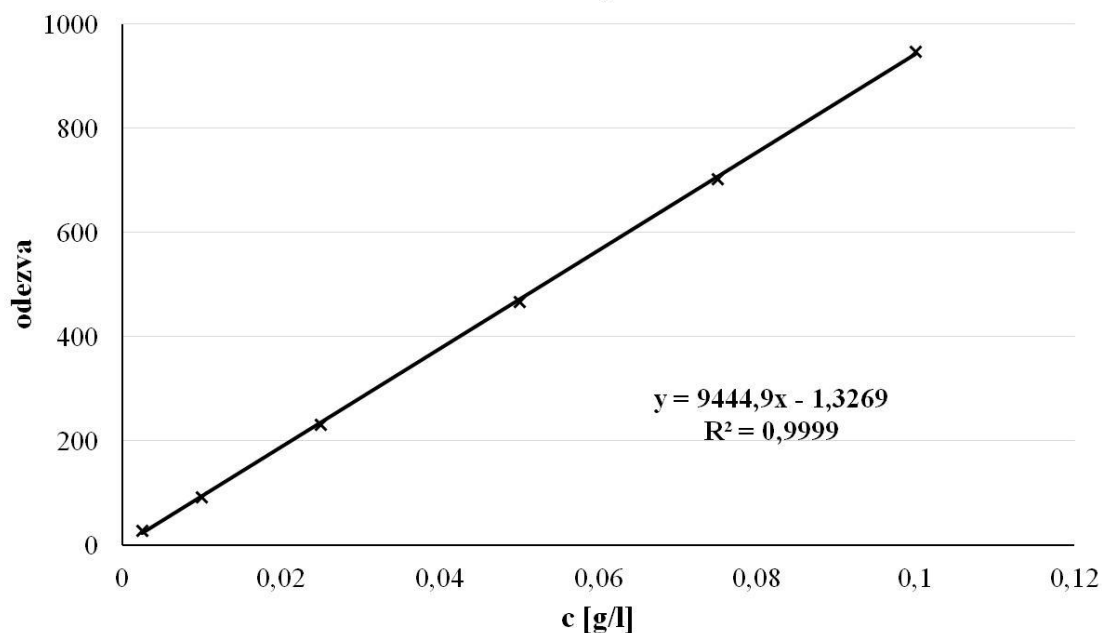
## 5.2.4 Linearita

Linearita je definována jako závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu ve vzorku. Pro hodnocení linearity bylo připraveno 6 kalibračních roztoků s různou koncentrací terbinafinu. Byly zvoleny tyto zaokrouhlené koncentrace: 0,1 g/l, 0,075 g/l, 0,05 g/l, 0,025 g/l, 0,01 g/l, 0,0025 g/l. Všechny kalibrační roztoky byly dávkovány na kolonu celkem 3krát. Lineární korelace mezi odezvou detektoru a koncentrací terbinafinu ve vzorku byla vyjádřena pomocí kalibrační přímky (Obr. 19). Kalibrační přímka umožňuje stanovit obsah terbinafinu v neznámých vzorcích. Naměřené hodnoty uvádí Tab. 7.

c (g/l)	odezva detektoru
0,1	948,11
0,075	702,98
0,05	467,17
0,025	232,33
0,01	91,46
0,0025	28,08

Tab. 7: Závislost odezvy detektoru na koncentraci

## Kalibrační přímka



Obr. 19: Odezva detektoru v závislosti na koncentraci

Rovnice kalibrační přímky:  $y = 9444,9x - 1,3269$

Směrnice kalibrační přímky:  $k = 9444,9$

Korelační koeficient:  $R^2 = 0,9999$

Počet bodů:  $n = 6$

Koeficient determinace  $R^2$  vyjadřuje těsnost vzájemné lineární závislosti dvou proměnných. Čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. (19)

V tomto případě nabývá hodnoty  $R^2 = 0,9999$ , což odpovídá téměř ideální lineární závislosti.

### 5.2.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy lze vyjádřit jako odhad relativní směrodatné odchylky  $RSD_{\%}$  v procentech pro řadu následujících měření porovnávacího roztoku. Opakovatelnost se hodnotí podle vzorce:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

kde  $y_i$  jsou jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu;  $\bar{y}$  značí průměr jednotlivých hodnot a  $n$  je počet jednotlivých hodnot. (21)

Naměřené hodnoty jsou shrnuty v Tab. 8.

<b>n</b>	<b>A</b>
1	1392
2	1395
3	1399
4	1401
5	1405
6	1397

Tab. 8: Opakovatelnost analýzy

Počet měření: **n = 6**

Aritmetický průměr jednotlivých hodnot:  **$\bar{y} = 1398$**

SD: **5**

RSD (%): **0,34**

Dle ČL 2009 se maximální povolená relativní směrodatná odchylka **RSD<sub>max</sub>** vyjádří dle následujícího vzorce:

$$RSD_{max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

kde znamená **K** konstantu (0,349) získanou ze vztahu  $K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \cdot \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$ , ve kterém  $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$  značí požadovanou **RSD%** pro **6** nástřiků a pro **B = 1**; **B** představuje horní limit obsahu uvedeného v jednotlivých lékopisných monografiích minus 100%; **n** značí počet opakovaných nástřiků ( $3 \leq n \leq 6$ ) a  $t_{90\%,n-1}$  je Studentův parametr **t** při 90% pravděpodobnosti pro **n-1** stupňů volnosti. (21)

Požadavek ČL 2009 pro 6 měření při **B = 1** je **RSD<sub>max</sub> = 0,42%**.

Relativní směrodatná odchylka je **RSD% = 0,34 %** a vyhovuje lékopisnému požadavku.



## 5.2.6 Robustnost

Robustnost metody je definována jako míra vlivu proměnných experimentálních podmínek na výsledek analytického stanovení. Taktéž může vyjadřovat schopnost metody dávat opakovaně shodné výsledky při nepatrné změně podmínek. (19)

Robustnost metody byla zkoumána změnou čtyř parametrů chromatografické analýzy. Vliv změn na chromatografickou analýzu byl vyjádřen při každém měření pomocí výpočtu relativního retenčního času látky  $t_{R\%}$  v procentech vztaženého na retenční čas  $t_R$  při optimálním složení mobilní fáze, průtoku a teplotě. Vztah lze matematicky vyjádřit následujícím vzorcem:

$$t_{R\%} = \frac{t_R}{t_{R(\text{optim.})}} \cdot 100$$

Každé měření bylo uskutečněno 3krát a z naměřených retenčních časů byla vypočítána průměrná hodnota.

Testované parametry:

- Změna složení mobilní fáze
- Změny pH mobilní fáze
- Změna průtoku mobilní fáze
- Změna teploty

### 5.2.6.1 Vliv složení mobilní fáze na retenční čas terbinafinu (Tab. 9)

Optimální složení mobilní fáze: **citrát fosfátový pufr:ACN 40:60**

Změna složení mobilní fáze: 1. 35:65  
2. 45:55

citrát fosfátový pufr:ACN	retenční čas terbinafinu $t_R$ (min.)	relativní retenční čas terbinafinu $t_{R\%}$ (%)
35:65	2,86	86,66%
40:60 (optim.)	3,30	100,00%
45:55	3,94	119,40%

Tab. 9: Vliv složení mobilní fáze na retenční čas terbinafinu

### 5.2.6.2 Vliv pH mobilní fáze na retenční čas terbinafinu (Tab. 10)

Optimální pH mobilní fáze: **pH = 4,0**

Změna pH mobilní fáze: 1. pH = 3,6  
2. pH = 4,4

pH mobilní fáze	retenční čas terbinafinu $t_R$ (min.)	relativní retenční čas terbinafinu $t_{R\%}$ (%)
3,6	2,80	84,84%
4,0 (optim.)	3,30	100,00%
4,4	3,99	120,91%

Tab. 10: Vliv pH mobilní fáze na retenční čas terbinafinu

### 5.2.6.3 Vliv změny průtoku mobilní fáze na retenční čas terbinafinu (Tab. 11)

Optimální průtok mobilní fáze: **1,4 ml/min**

Změna průtoku mobilní fáze: 1. 1,3 ml/min  
2. 1,5 ml/min

průtok mobilní fáze (ml/min)	retenční čas terbinafinu $t_R$ (min.)	relativní retenční čas terbinafinu $t_{R\%}$ (%)
1,3	3,55	107,58%
1,4 (optim.)	3,30	100,00%
1,5	3,09	93,64%

Tab. 11: Vliv změny průtoku mobilní fáze na retenční čas terbinafinu

#### 5.2.6.4 Vliv teploty na retenční čas terbinafinu (Tab. 12)

Optimální teplota:	30 °C
Změna teploty:	1. 25 °C
	2. 35 °C

teplota (°C)	retenční čas terbinafinu $t_R$ (min.)	relativní retenční čas terbinafinu $t_{R\%}$ (%)
25	3,48	105,45%
30 (optim.)	3,30	100,00%
35	3,18	96,36%

Tab. 12: Vliv teploty na retenční čas terbinafinu

Odchytky ve výsledcích relativního retenčního času terbinafinu nejsou nijak markantní. Drobné výchytky od složení mobilní fáze, pH, teploty či průtoku nemají velký vliv na separaci. Metoda je ve zvolených parametrech robustní.

## 6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla optimalizována a validována HPLC metoda pro stanovení terbinafinu ve vzorcích tvořených biodegradabilními kopolymery kyseliny mléčné a glykolové.

Vypracovaná HPLC metoda byla aplikována na core-shell kolonu Ascentis Express ES-CN o rozměrech 15 cm × 4,6 mm a velikosti částic 2,7 μm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs citrát fosfátového pufru o pH 4 a acetonitrilu v poměru 40:60 (v/v). Měření probíhalo při teplotě 30 °C za použití UV detekce na vlnové délce 226 nm. Při zvoleném průtoku 1,4 ml/min trvala celá analýza 4 minuty, přičemž retenční čas terbinafinu byl 3,3 minuty. Dávkovaný objem vzorku terbinafinu byl 5 μl.

Za uvedených chromatografických podmínek docházelo k dostatečné separaci terbinafinu od ostatních nečistot. Na chromatogramech byly patrné ostré píky, které byly od sebe navzájem odděleny až na základní linii.

Během validačního procesu byly splněny některé podmínky vhodnosti chromatografického systému. Účinnost chromatografické kolony, vyjádřená jako zdánlivý počet teoretických pater, musí být dle požadavku ČL 2009 větší než 1500 a naměřená hodnota je 10049. V porovnání s rozmezím uvedeném v ČL 2009 ( $0,8 < A_S < 1,5$ ) vykazoval faktor symetrie píku  $A_S$  hraniční hodnotu ( $A_S = 1,503$ ). Byl také vyhodnocen faktor asymetrie píku  $A$  ( $A = 1,85$ ), který splňoval požadavek  $A < 2$  dle (44). Hodnota LOD za uvedených podmínek byla  $5,72 \cdot 10^{-5}$  g/l. LOQ vykazoval hodnotu  $19,06 \cdot 10^{-5}$  g/l. Linearita byla testována v rozsahu koncentrací 0,0025–0,1 g/l. U stanovené kalibrační přímky byl koeficient determinace  $R^2 = 0,9999$ , což odpovídá téměř ideální lineární závislosti. Relativní směrodatná odchylka, vyjadřující opakovatelnost odezvy, byla  $RSD_{\%} = 0,34 \%$ , což je méně než hodnota maximální dovolené relativní odchylky ( $RSD_{\max} = 0,42\%$ ) vypočtené dle ČL 2009. Robustnost metody byla testována změnou čtyř parametrů: složení mobilní fáze, pH mobilní fáze, průtoku mobilní fáze a teploty. Prokázalo se, že metoda je ve zvolených parametrech robustní.

## 7. SEZNAM ZKRATEK

<b>ACN</b>	acetonitril
<b>BB</b>	betablokátor
<b>C<sub>18</sub></b>	oktadecylový uhlíkový řetězec
<b>ČL</b>	Český lékopis
<b>DAD</b>	diode-array detektor
<b>HILIC</b>	hydrofilní interakční chromatografie
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>I-MAO B</b>	inhibitor monoaminoxidázy B
<b>LOD</b>	limit detekce
<b>LOQ</b>	limit kvantifikace
<b>PES</b>	polyester
<b>PLA</b>	polymer kyseliny mléčné
<b>PLGA</b>	poly(laktid- <i>co</i> -glykolid)
<b>ROP</b>	polymerace za otevření kruhu
<b>RP</b>	reverzní fáze
<b>SSP</b>	polymerace v pevném stavu
<b>SSRI</b>	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
<b>SST</b>	test způsobilosti systému
<b>TCA</b>	tricyklické antidepresivum
<b>UV-VIS</b>	ultrafialová/viditelná oblast světla

## 8. SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1:</b> Vzorec terbinafinu (9).....	10
<b>Obr. 2:</b> Mechanismus účinku antimykotik (14) .....	11
<b>Obr. 3:</b> Princip separace (20) .....	13
<b>Obr. 4:</b> Vliv citlivosti a účinnosti na separaci. (8) .....	17
<b>Obr. 5:</b> Vliv selektivity a účinnosti na rozlišení (19).....	18
<b>Obr. 6:</b> Schéma kapalinového chromatografu;.....	19
<b>Obr. 7:</b> Schéma vysokotlakého [A] a nízkotlakého [B] mísícího systému. (24).....	21
<b>Obr. 8:</b> Konstrukce chromatografické kolony.....	23
<b>Obr. 9:</b> Struktura plně porézní (vpravo) a core-shell částice (vlevo). Difúzní cesta oběma částicemi je znázorněna červeně. (27) .....	27
<b>Obr. 10:</b> Porovnání vlastností core-shell částic s plně porézními částicemi. (29) .....	28
<b>Obr. 11:</b> Různé stereoisomerní formy laktidu (33) .....	31
<b>Obr. 12:</b> Schéma polymerace za otevření kruhu alifatických $\alpha$ -hydroxykyselin (35) .....	31
<b>Obr. 13:</b> Schéma homogenní a heterogenní degradace (38) .....	32
<b>Obr. 14:</b> Chromatogram roztoku standardu terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (60:40, v/v), pH 4,5, průtok 0,9 ml/min, teplota 60 °C, dávkovaný objem 5 $\mu$ l, $t_{R(\text{terbinafin})}$ 9,3.....	37
<b>Obr. 15:</b> Chromatogram roztoku standardu terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (60:40, v/v), pH 4,5, průtok 0,9 ml/min, teplota 60 °C, dávkovaný objem 5 $\mu$ l, $t_{R(\text{terbinafin})}$ 13.....	38
<b>Obr. 16:</b> Chromatogram roztoku standardu terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (60:40, v/v), pH 3,6, průtok 0,9 ml/min, teplota 60 °C, dávkovaný objem 5 $\mu$ l, $t_{R(\text{terbinafin})}$ 8,5.....	39
<b>Obr. 17:</b> Chromatogram roztoku vzorku terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (40:60, v/v), pH 4, průtok 0,9 ml/min, teplota 60 °C, dávkovaný objem 5 $\mu$ l, $t_{R(\text{terbinafin})}$ 4 .....	41
<b>Obr. 18:</b> Chromatogram roztoku vzorku terbinafinu, citrát fosfátový pufr:ACN (40:60, v/v), pH 4, průtok 1,4 ml/min, teplota 30 °C, dávkovaný objem 5 $\mu$ l, $t_{R(\text{terbinafin})}$ 3,3 .....	42
<b>Obr. 19:</b> Odezva detektoru v závislosti na koncentraci.....	47

## 9. SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1:</b> Přehled používaných detektorů. (23) .....	24
<b>Tab. 2:</b> Vliv hodnoty pH na chromatografickou analýzu terbinafinu .....	39
<b>Tab. 3:</b> Různé poměry citrát fosfátového pufru : ACN a retenční časy $t_R$ terbinafinu .....	40
<b>Tab. 4:</b> Účinnost chromatografické kolony .....	43
<b>Tab. 5:</b> Faktor symetrie píku $A_s$ .....	44
<b>Tab. 6:</b> Faktor asymetrie píku $A$ .....	45
<b>Tab. 7:</b> Závislost odezvy detektoru na koncentraci .....	46
<b>Tab. 8:</b> Opakovatelnost analýzy .....	48
<b>Tab. 9:</b> Vliv složení mobilní fáze na retenční čas terbinafinu .....	49
<b>Tab. 10:</b> Vliv pH mobilní fáze na retenční čas terbinafinu .....	50
<b>Tab. 11:</b> Vliv změny průtoku mobilní fáze na retenční čas terbinafinu .....	50
<b>Tab. 12:</b> Vliv teploty na retenční čas terbinafinu .....	51

## 10. POUŽITÉ ZDROJE

1. **LINCOVÁ, Dagmar; FARGHALI, Hassan.** *Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, 2007. str. 513-514. ISBN 978-80-7262-373-0.
2. **HENDRYCHOVÁ, Tereza; MALÝ, Josef.** Volně prodejná antimykotika. *Praktické lékařství*, 2011; 7(3): str. 132–137.
3. **KATZUNG, Bertram G.** *Základní a klinická farmakologie.* 1. vyd. Praha: Nakladatelství a vydavatelství H & H, 1995, str. 706. ISBN 80-857-8735-0.
4. **ŠNEJDROVÁ, Eva; DITTRICH, Milan.** Poly( $\alpha$ -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chemické Listy*, 2011, 105.1: str. 27-33.
5. **NAIR, Lakshmi S.; LAURENCIN, Cato T.** Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 2007, 32.8: str. 762-798.
6. **KLIMEŠ, Jiří et al.** *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami.* Hradec Králové: Nucleus HK, 2011, ISBN 978-80-87009-29-1.
7. **KARLÍČEK, Rolf.** *Analytická chemie pro farmaceuty.* 2. vyd. Praha: Karolinum, 2001, str. 265-281. ISBN 80-246-0348-9.
8. **KAZAKEVICH, Yuri V.; LOBRUTTO, Rosario.** *HPLC for pharmaceutical scientists.* John Wiley & Sons, 2007. str. 3-36. ISBN 978-0-471-68162-5.
9. <http://www.abblis.com> [online]. [cit. 2015-04-26]. Dostupné z: [http://www.abblis.com/upload/api/Terbinafine%20\(Lamisil,%20Terbinex\)\\_cas91161-71-6\\_AB2000250.gif](http://www.abblis.com/upload/api/Terbinafine%20(Lamisil,%20Terbinex)_cas91161-71-6_AB2000250.gif).
10. **KRISHNAN-NATESAN, S.** Terbinafine: a pharmacological and clinical review. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2009, 10.16: str. 2723-2733.
11. **FELDSTEIN, Stephanie; TOTRI, Christine; FRIEDLANDER, Sheila Fallon.** Antifungal therapy for onychomycosis in children. *Clinics in Dermatology*, 2014, 33.3: str. 333-339.
12. **BUCHTA, Vladimír, et al.** Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Dermatologie pro praxi*, 2009, 3.3: str. 109-118.
13. **LEYDEN, James.** Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1998, 38.5: str. 42-47.



14. **OSTROSKY-ZEICHNER, Luis et al.** *Mechanisms of action of selected antifungals.* [online]. September 2010 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: [http://www.nature.com/nrd/journal/v9/n9/fig\\_tab/nrd3074\\_F2.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v9/n9/fig_tab/nrd3074_F2.html).
15. **KELLER, Krista A.** Therapeutic review: Terbinafine. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 2012, 21.2: str. 181-185.
16. *Lippincott's illustrated reviews: Pharmacology*. 5th ed. Editor: Michelle Alexia Clark. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2012, str. 437-438. ISBN 978-1-4511-43201.
17. **SKOŘEPOVÁ, Magdalena.** *Antimykotika z pohledu dermatologa* [online]. 2012 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Antimykotika-z-pohledu-dermatologa/6-F-fg.magarticle.aspx>.
18. **SNYDER, Lloyd R, J KIRKLAND a John W DOLAN.** *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2010, str. 20. ISBN 978-0-470-16754-0.
19. **NOVÁKOVÁ, Lucie; DOUŠA, Michal.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi, I. díl*. 1. vyd. Praha: Europrint a.s., 2013, ISBN 978-80-260-4243-3.
20. **KOVAŘÍKOVÁ, Petra; STARIAT, Ján.** HPLC - historie a základní principy. [online]. str. 1-7 [cit. 2015-04-30]. Dostupné z: [http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215462/mod\\_resource/content/7/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%201\\_HPLC%20-%20Historie%20a%20zakladni%20principy.pdf](http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215462/mod_resource/content/7/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%201_HPLC%20-%20Historie%20a%20zakladni%20principy.pdf).
21. **Kolektiv autorů.** *Český lékopis 2009 (ČL 2009)*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s. 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
22. **HANSEN, Steen; PEDERSEN-BJERGAARD, Stig; RASMUSSEN, Knut.** *Introduction to pharmaceutical chemical analysis*. Chichester: John Wiley & Sons, 2012. str.127-140. ISBN 978-0-470-66122-2 .
23. **DOUŠA, Michal.** [hplc.cz](http://www.hplc.cz) [online]. [cit. 2015-09-14]. Dostupné z: [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz).
24. **AHUJA, Satinder; DONG, Michael (ed.).** *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Elsevier, 2005. str. 22-60. ISBN 978-0-080-4551-81.
25. **DONG, Michael W.** *Modern HPLC for practicing scientists*. John Wiley & Sons, 2006. ISBN 978-0-471-97309-6.
26. **GONZÁLEZ-RUIZ, Víctor; OLIVES, Ana I.; MARTÍN, M. Antonia.** Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 64: str. 17-28.

27. <http://www.sigmaaldrich.com> [online]. [cit. 2015-11-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=21312879>.
28. **GRITTI, Fabrice, et al.** Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography: relationships between particle characteristics and column performance. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217.24: str. 3819-3843.
29. <http://www.labicom.cz> [online]. [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: [http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/Supel\\_Res\\_Guid\\_Ascen\\_Express.pdf](http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/Supel_Res_Guid_Ascen_Express.pdf).
30. **RUTA, Joséphine, et al.** Evaluation of columns packed with shell particles with compounds of pharmaceutical interest. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1228: str. 221-231.
31. **ALI, Imran; AL-OTHMAN, Zeid A.; AL-ZA'ABI, Mohammed.** Superficially porous particles columns for super fast HPLC separations. *Biomedical Chromatography*, 2012, 26.8: str. 1001-1008.
32. **JAIN, Rajeev A.** The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 2000, 21.23: str. 2475-2490.
33. **GUPTA, A. P.; KUMAR, Vimal.** New emerging trends in synthetic biodegradable polymers-Polylactide: A critique. *European polymer journal*, 2007, 43.10: str. 4053-4074.
34. **MOON, S. I., et al.** Melt/solid polycondensation of L-lactic acid: an alternative route to poly (L-lactic acid) with high molecular weight. *Polymer*, 2001, 42.11: str. 5059-5062.
35. <http://pubs.rsc.org> [online]. [cit. 2016-02-10]. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2013/CS/c2cs35265f/c2cs35265f-f7.gif>
36. **GRIZZI, Iisoto, et al.** Hydrolytic degradation of devices based on poly (DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials*, 1995, 16.4: str. 305-311.
37. **GÖPFERICH, Achim.** Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 1996, 17.2: str. 103-114.

38. <http://what-when-how.com> [online]. [cit. 2016-02-10]. Dostupné z: [http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2011/07/tmp16119\\_thumb.jpg](http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2011/07/tmp16119_thumb.jpg).
39. **LJUNGBERG, Nadia; WESSLEN, Bengt.** The effects of plasticizers on the dynamic mechanical and thermal properties of poly (lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 2002, 86.5: str. 1227-1234.
40. **WU, Chuanbin; MCGINITY, James W.** Non-traditional plasticization of polymeric films. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 177.1: str. 15-27.
41. **TAGLIARI, Monika P., et al.** Terbinafine: optimization of a LC method for quantitative analysis in pharmaceutical formulations and its application for a tablet dissolution test. *Química Nova*, 2010, 33.8: str. 1790-1793.
42. **PENMATSA, Vamsi Krishna; BASAVAIHAH, K.** Simple, sensitive and stability indicating high performance liquid chromatographic assay of terbinafine hydrochloride in dosage forms. *American Journal of PharmTech Research*, 2014, 4.2: str. 899-916.
43. **MATYSOVÁ, L., et al.** Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method. *Talanta*, 2006, 68.3: str. 713-720.
44. **PÁPAI, Zs; PAP, T. L.** Analysis of peak asymmetry in chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2002, 953.1: str. 31-38.