

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**Vývoj a validace UHPLC metody pro stanovení terbinafinu
a jeho nečistot**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Michaela Firleyová

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

V Opavě 20. 4. 2018

Michaela Firleyová

Chtěla bych vyslovit velké poděkování doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. a Mgr. Kateřině Kučerové za odborné vedení, pomoc, cenné rady, připomínky, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi při tvorbě diplomové práce věnovaly.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Michaela Firleyová

Školitel: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a validace UHPLC metody pro stanovení terbinafinu a jeho nečistot

Pro stanovení terbinafinu a jeho tří degradačních produktů – konkrétně β -terbinafinu, Z-terbinafinu a 4-methylterbinafinu – byla vytvořena nová analytická metoda za použití ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Nejlepší separace analyzovaných látek bylo dosaženo při použití kolony KinetexTM 1,7 μ m - Bifenyl 100A (50 x 2,1 mm). Zvolená mobilní fáze byla složena z pufru o pH 5, tvořeného citrátovým a fosfátovým tlumivým roztokem, a methanolu v celkovém poměru 25:75. Vnitřní standard propylparaben byl detekován při 254 nm, zatímco terbinafin a jeho tři degradační produkty při 222 nm. Retenční čas terbinafinu byl 4,2 min, celková délka analýzy se pohybovala do 6 minut.

Po nalezení optimálních podmínek byla metoda validována.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Michaela Firleyová

Supervisor: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Development and validation of UHPLC method for determination of terbinafine and its impurities

A new analytical method for the determination of terbinafine and its degradation products – β -terbinafine, Z-terbinafine and 4-methylterbinafine – was developed by using ultra-high performance liquid chromatography.

The best separation of the analytes was achieved with a KinetexTM 1.7 μ m - Biphenyl 100A column (50 mm x 2.1 mm). The selected mobile phase was composed of the buffer pH 5.0, made up of the citrate and the phosphate buffer, and methanol (25:75, v/v). Propylparaben as the internal standard was detected at the wavelength of 254 nm, whereas the terbinafine and its three degradation products at 222 nm. The retention time of the terbinafine was 4.2 min, the total analysis time was within 6 minutes.

After finding the optimal conditions the method was validated.

Seznam zkratek

4-mTER	4-methylterbinafin
ACN	Acetonitril
AUC	Plocha pod koncentrační křivkou; Area under the curve
C ₃ H ₈ O	Isopropylalkohol
C ₄ H ₈ O	Tetrahydrofuran
C ₆ H ₁₅ NO ₃	Triethanolamin
CF ₃ COOH	Kyselina trifluoroctová
c _{max}	Maximální koncentrace léčiva
CYP1A2	Cytochrom P450, izoenzym 1A2
CYP2C19	Cytochrom P450, izoenzym 2C19
CYP2C8	Cytochrom P450, izoenzym 2C8
CYP2C9	Cytochrom P450, izoenzym 2C9
CYP3A4	Cytochrom P450, izoenzym 3A4
H ₂ O	Voda
H ₃ PO ₄	Kyselina ortofosforečná
HETP, H	Výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie; High Performance Liquid Chromatography
IS	Vnitřní standard
MeOH	Methanol
PP	Propylparaben

RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SSRI	Inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TCA	Tricyklická antidepresiva
TER	Terbinafin
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie; Ultra-High Performance Liquid Chromatography
Z-TER	Z-terbinafin
β -TER	β -terbinafin

Obsah

1	ÚVOD.....	10
2	CÍL.....	11
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1	Antimykotika.....	12
3.2	Terbinafin.....	13
3.3	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
3.3.1	Kolony používané v UHPLC.....	19
3.3.1.1.	Kolony opatřené ethylenovými můstky.....	19
3.3.1.2	Kolony s porézním povrchem	19
3.3.2	Inovace v UHPLC systémech.....	21
3.3.3	Použití UHPLC	21
3.3.4	Nexera UHPLC Scouting metoda.....	22
3.4	Metody popisující stanovení terbinafinu.....	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
4.1	Použité chemikálie	27
4.2	Přístrojové vybavení a pomůcky.....	28
4.3	Příprava roztoků	29
4.3.1	Tlumivý octanový roztok.....	29
4.3.2	Tlumivý citrátový pufr (0,01 mol/l).....	29
4.3.3	Tlumivý fosfátový roztok	29
4.3.4	Mobilní fáze.....	29
4.3.5	Zásobní roztoky standardů.....	30

4.3.6	Pracovní roztoky standardů	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	31
5.1	Optimalizace chromatografické metody	31
5.1.1	Vlnová délka detekce.....	31
5.1.2	Vnitřní standard	32
5.1.3	Složení mobilní fáze, hodnota pH.....	33
5.1.4	Analytická kolona	36
5.2	Souhrn optimálních chromatografických podmínek.....	37
5.3	Validace analytické metody	38
5.3.1	Test způsobilosti systému	38
5.3.1.1	Opakovatelnost.....	39
5.3.1.2	Zdánlivý počet teoretických pater	41
5.3.1.3	Faktor symetrie A_s	42
5.3.1.4	Rozlišení R_s	42
5.3.2	Validace analytické metody.....	44
5.3.2.1	Detekční a kvantitativní limit.....	44
5.3.2.2	Linearita	45
5.3.2.3	Přesnost (preciznost)	48
5.3.2.4	Správnost (přesnost).....	48
5.3.2.5	Robustnost.....	49
5.3.2.6	Selektivita (specifita)	50
6	ZÁVĚR.....	53
7	LITERATURA	55

1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá stanovením terbinafinu a jeho tří degradačních produktů – β -terbinafinu, Z-terbinafinu a 4-methylterbinafinu pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie, UHPLC. Použití takového typu chromatografie přináší řadu výhod, ať už hovoříme o rychlosti dané analýzy, její ekonomické náročnosti či citlivosti.

Terbinafin, vyskytující se v léčivých přípravcích ve formě soli *terbinafini hydrochloridum*, je antifungální léčivá látka patřící do skupiny allylaminů, tedy látek účinných zejména na dermatofyty. Je využíván především pro systémovou léčbu mykotických infekcí kůže a nehtů, jako jsou např. onychomykózy, tinea pedis, tinea corporis, tinea cruris či tinea capitis. Kromě systémového účinku vykazuje terbinafin i účinek lokální, který je ovšem ve srovnání se systémovým využíván méně.

Biologická dostupnost terbinafinu je po perorálním podání vyšší než po topickém. Plazmatická koncentrace této látky se pohybuje v řádech mg/ml. Při jejím stanovení je proto výhodné využívat chromatografické metody, které jsou vysoce selektivní, citlivé a jsou schopny poskytnout velmi přesné výsledky.

2 Cíl

Cílem práce bylo vytvořit takovou analytickou metodu, která by pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie dokázala separovat terbinafin a jeho tři rozkladné produkty, tedy β -terbinafin, Z-terbinafin a 4-methylterbinafin. Uvedené rozkladné produkty mají velmi podobnou chemickou strukturu jako výchozí léčivá látka terbinafin. Proto bylo nutné nalézt specifické podmínky separace, za kterých se všechny čtyři látky spolehlivě rozdělí.

Dalším krokem byla validace vytvořené analytické metody, aby bylo prokázáno, že je daná analytická metoda kvalitní, za uvedených podmínek platná a vhodná pro účel, pro který byla vypracována.

3 Teoretická část

3.1 Antimykotika

Antimykotika jsou látky, které svým specifickým mechanismem účinku působí na houbové organismy, jako jsou vláknité houby, kvasinky, kvasinkové organismy. Tyto organismy se od bakterií a savčích buněk odlišují v několika směrech. Jedná se především o rozdíl ve složení jejich buněčné stěny, která se vyznačuje tím, že je chitinózní a obsahuje β -glukany. Součástí buněčné membrány je pak ergosterol, což je klíčová látka pro správnou funkci buňky.

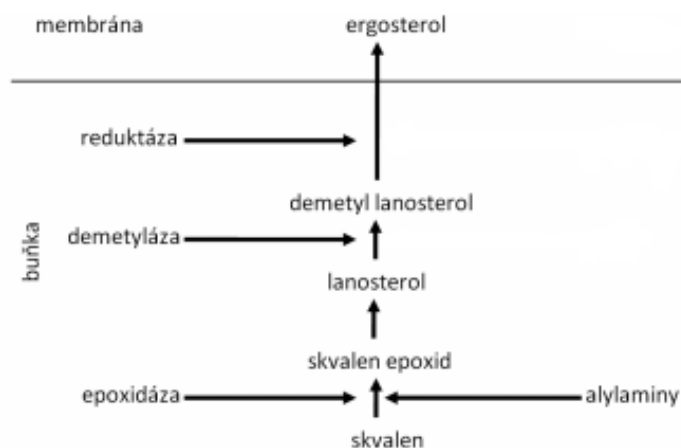
Patogeny mohou svého hostitele poškozovat buď přímo, anebo nepřímo. U přímého působení může dojít např. k napadení cílové tkáně nebo k produkování toxických látek v těle postiženého. Houbové organismy mohou také vyvolat např. alergii, v tomto případě se jedná o působení nepřímé.

Antifungální látky se mohou rozdělit do několika skupin na základě různých kritérií, jako je jejich původ, místo působení či chemická struktura ^{[1][4][5]}.

Allylaminy

Tato skupina antimykotických látek obsahuje synteticky připravené deriváty, mezi které se řadí dva zástupci, a to vývojově starší naftifin a mladší terbinafin.

Jejich mechanismus účinku spočívá v zamezení biosyntézy ergosterolu, nezbytné součásti buněčné membrány houbových organismů, a to prostřednictvím inhibice enzymu skvalenepoxidázy. Tento enzym se nachází v mykotické buněčné membráně a není vázán na cytochrom P450. Výsledkem blokace zmíněného enzymu se v buňkách začne hromadit skvalen, prekurzor ergosterolu. Za buněčnou smrt je pak zodpovědná především zvýšená permeabilita membrány, způsobená zejména hromaděním skvalenu, nikoliv deficitem ergosterolu ^{[2][3][6]}.



Obr. 1: Místo působení allylaminů ^[4]

3.2 Terbinafin

Terbinafin je antimykotikum určené jak k lokální, tak systémové aplikaci. V České republice je dostupný v následujících léčivých přípravcích:

- ✓ topická aplikace
 - LAMISIL (10MG/G CRM 15G I) ^[9]
 - TERBISTAD 1% KRÉM
(10MG/G CRM 1X7,5G; 10MG/G CRM 1X15G) ^{[11][12]}
- ✓ systémová aplikace
 - LAMISIL 250 MG (250MG TBL NOB 14) ^[8]
 - TERFIMED 250 (250MG TBL NOB 14 II;
250MG TBL NOB 28 II) ^{[13][14]}
 - TERBINAFIN ACTAVIS 250 MG (250MG TBL NOB 28) ^[10] –
pozn. od 15. 7. 2017 bylo uvádění léčivého přípravku na trh přerušeno

Ve všech těchto přípravcích se terbinafin vyskytuje ve formě soli terbinafini hydrochloridum. Léková forma přípravků je buď krém, nebo tableta.

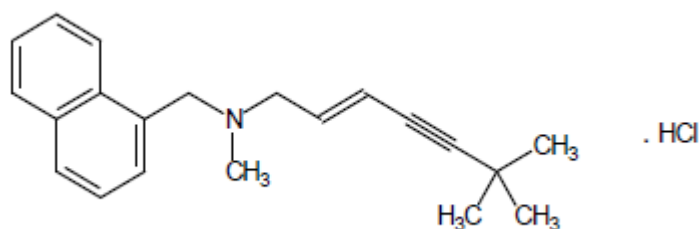
Definice ^[15]

Chemicky je terbinafin-hydrochlorid (2E)-N,6,6-trimethyl-N-(naftalen-1-ylmethyl)hept-2-en-4-yn-1-amin-hydrochlorid.

Stechiometrický vzorec: C₂₁H₂₆ClN

Molekulová hmotnost: 327,90

Strukturní vzorec:



Obr. 2: Strukturní vzorec sloučeniny terbinafin hydrochlorid ^[15]

Farmakokinetické vlastnosti

Absorpce terbinafinu po perorálním podání je velmi dobrá a přesahuje 70 %. V důsledku prvního průchodu játry – tzv. first-pass efektu – se biologická dostupnost pohybuje okolo 40-50 %. Může se mírně zlepšit při současném podání s potravou – AUC (plocha pod koncentrační křivkou) se zvýší o méně než 20 %, úprava dávkování však vyžadována není. Maximální plazmatické koncentrace 1 µg/ml je dosaženo zhruba po dvou hodinách po podání.

V plazmě je terbinafin vázán z více než 99 % na plazmatické bílkoviny. Je distribuován do kůže, konkrétně do stratum corneum, kde se kumuluje. Současně se vyskytuje v kožním mazu, a nachází se tak i na místech, jako jsou vlasy a jejich váčky či kůže bohatá na mazové žlázy. Díky relativně dlouhému biologickému poločasu (efektivní poločas okolo 36 hodin, terminální poločas 200 – 400 hodin) se na uvedených místech nachází až po dobu tří týdnů po ukončení léčby. Užití terbinafinu je možné i na infekce nehtových plotének, do kterých tato léčivá látka vstupuje během prvních týdnů léčby.

Metabolismus probíhá prostřednictvím cytochromu P450, konkrétně jeho nejméně sedmi izoenzymy, mezi které se řadí např. CYP2C9, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C8, CYP2C19. Přibližně 70 % metabolitů vzniklých tímto procesem je vylučováno močí, žádný z nich však nevykazuje aktivitu srovnatelnou s terbinafinem [6][8][13].

Terapeutické indikace

Terbinafin je širokospektré antimykotikum působící v nízkých koncentracích fungicidně, a to zejména na dermatofyty – př. *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*; dále na dimorfní houby a plísňe. Účinnost terbinafinu byla prokázána i na kvasinky (*Candida albicans*), na které působí fungistaticky či fungicidně.

Topicky aplikovaný terbinafin se používá na infekce kůže vyvolané dermatofyty, např. tinea pedis, tinea corporis, tinea cruris, dále na kožní kvasinkové infekce a léčbu pityriasis versicolor. Systémově podávaný terbinafin se pak užívá na systémovou či kombinovanou léčbu onychomykóz (př. kombinace terbinafinu s 5 % amorolfinem), léčbu tinea capitis nebo kožní infekce způsobené dermatofyty [6][9][13].

Vybrané interakce systémové formy terbinafinu

Terbinafin je inhibitorem cytochromu P450 izoenzymu CYP2D6, z čehož vyplývají možné interakce s léčivy touto izoformou metabolizované. Řadí se sem např. tato léčiva:

- ✓ betablokátory – př. metoprolol, karvedilol
- ✓ tricyklická antidepresiva (TCA) – př. imipramin, klomipramin, amitriptylin
- ✓ antipsychotika – př. haloperidol, risperidon
- ✓ inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) – př. paroxetin
- ✓ centrální antitusika – kodein, dextromethorfan
- ✓ oxykodon
- ✓ tramadol

- ✓ antiarytmika – př. třída 1C – propafenon
- ✓ inhibitory monoaminoxidázy typu B

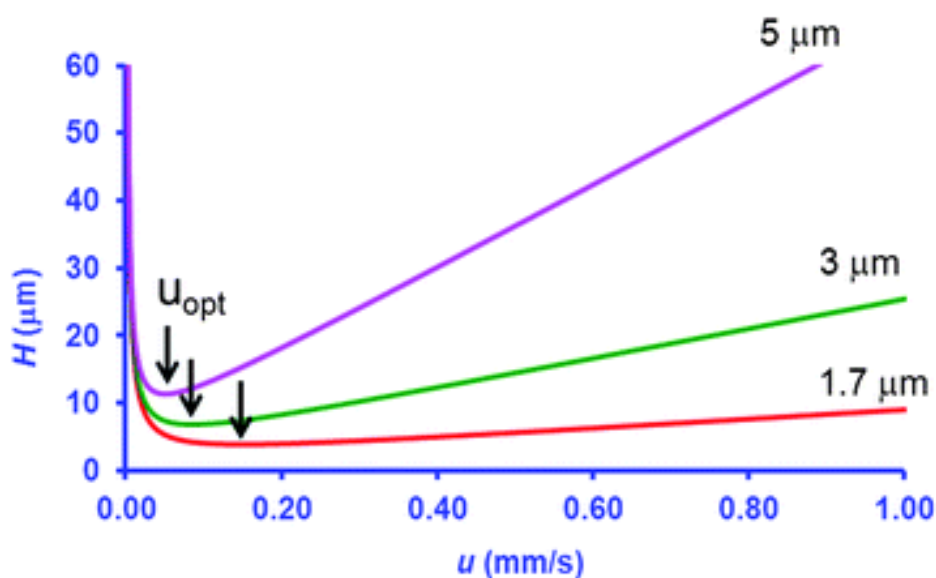
Jak bylo řečeno dříve, terbinafin je metabolizován pomocí cytochromu P450. Současní inhibitoři CYP2C9 a CYP3A4 mohou zvyšovat maximální koncentraci léčiva (c_{\max}) a AUC. Řadí se sem např. flukonazol, ketokonazol či amiodaron.

Dále může terbinafin interagovat např. se známým enzymovým induktorem rifampicinem, jenž zvyšuje jeho clearance, nebo naopak s enzymovým inhibitorem cimetidinem, který naopak clearance terbinafinu snižuje ^{[6][7][8][16]}.

3.3 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (též UHPLC, Ultra-High Performance Liquid Chromatography) je separační technika sloužící k rozdělení jednotlivých složek ve směsi. Tento druh chromatografie, který je na trhu více než 10 let, nabízí množství výhod oproti klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografii, a stává se tak stále častěji používanou instrumentální metodou.

Díky chromatografickým kolonám, které jsou schopné pracovat s částicemi menšími než $2\ \mu\text{m}$, je u UHPLC zajištěna vyšší účinnost separace. Ta je nepřímo úměrná velikosti částic. Použití menších částic tedy jednak zajišťuje vyšší účinnost separace, zároveň je umožněno dosažení nižšího výškového ekvivalentu teoretického patra (HETP nebo H). Tento parametr je důležitý pro stanovení délky separace. Jeho závislost na rychlosti lineárního průtoku mobilní fáze (u) popisuje Van Deemterova křivka. Pokud se poměr těchto dvou veličin (tedy HETP/ u) sníží, je možné dosáhnout kratšího času nutného pro analýzu. Zmíněná Van Deemterova křivka má pro částice s malým průměrem téměř plochý tvar, z čehož vyplývá možnost použití různých průtoků mobilní fáze za současného zachování účinnosti separace ^{[18][20][21][24]}.



Obr. 3: Van Deemterovy křivky pro částice o velikosti $5\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m}$ a $1,7\ \mu\text{m}$ ^[17]

Čas potřebný k analýze je také závislý na délce použité kolony, jejím vnitřním průměru či na průtoku mobilní fáze. Čím má daná kolona kratší délku a menší vnitřní průměr, tím je analýza rychlejší. Rovněž se zvýšením rychlosti průtoku mobilní fáze se i výsledná analýza zkrátí.

Použití menších částic v UHPLC systémech má za následek zvýšení tlaku na koloně, který je nepřímo úměrný velikosti částic. Jeho hodnota se pohybuje okolo 100 MPa, což vede opět ke zrychlení celé separace.

Kromě již zmíněné rychlejší separace a vyšší účinnosti nabízí použití UHPLC systému i další výhody, mezi které se řadí např. vyšší rozlišení, menší ekonomická náročnost, zvýšení citlivosti ^{[18][21][24]}. Vybrané rozdíly mezi HPLC a UHPLC shrnuje následující tabulka.

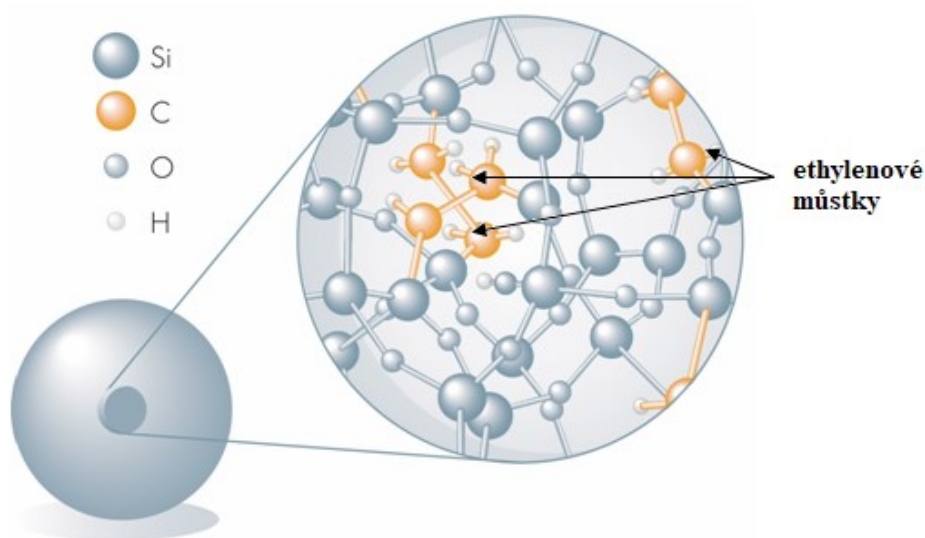
Tabulka 1: Rozdíly mezi HPLC a UHPLC

	HPLC	UHPLC
Tlak čerpadla	40 MPa	100 MPa
Velikost částic	2,5 – 5 μm	< 2 μm
Délka kolony	5 – 25 cm	3 – 5 cm

3.3.1 Kolony používané v UHPLC

3.3.1.1. Kolony opatřené ethylenovými můstky

První kolony, které byly na trhu dostupné pro UHPLC, měly délku 5 nebo 10 cm a obsahovaly plně porézní částice o velikosti 1,7 μm . Tyto sorbenty, připravené technologií „Hybrid Particle Technology“, představovaly spojení silikagelu a polymerních sorbentů pomocí ethylenových můstků. Díky této modifikaci získaly mnohem výhodnější vlastnosti, než při použití jednotlivých sorbentů zvláště. Za zmínku stojí především schopnost odolávat mechanickým vlivům ^{[19][21]}.











Obr. 4: Matrice silikagelového nosiče se zobrazenými ethylenovými můstky ^[21]

UHPLC kolony jsou v dnešní době schopné rozdělit částice, jako jsou polymery nebo biopolymery, a to až do velikosti 2 MDa. Vnitřní průměry kolon se pohybují okolo 0,075 – 4,6 mm ^[19].

3.3.1.2 Kolony s porézním povrchem

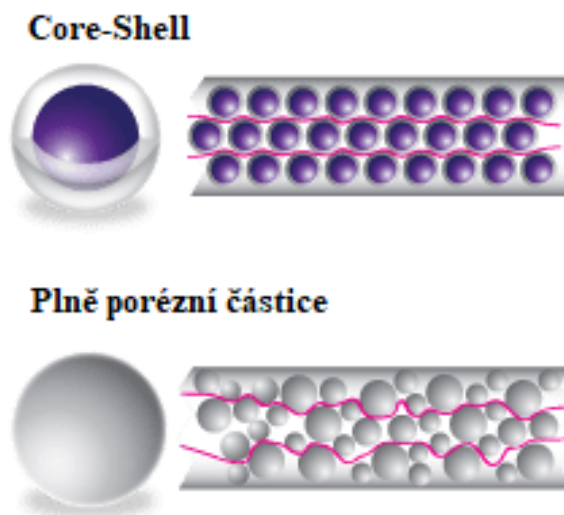
Druhým typem kolon, které se používají mnohem více než kolony představené výše, jsou kolony s porézním povrchem a pevným jádrem tvořeným nejčastěji oxidem křemičitým, známé též pod názvem „core-shell“. Hlavní předností tohoto typu povrchu je snížení rozmývání píků a rychlejší přenos hmoty ^[19].

plně porézní částice		core-shell částice	průměrný přírůstek účinnosti s core-shell
	vs		90 %
	vs		85 %
	vs		20 %
	vs		50 %

Obr. 5: Srovnání účinnosti plně porézních částic a core-shell částic ^[22]

První dostupné z této skupiny obsahovaly částice o velikosti 2,7 μm . Ty se vyskytovaly hlavně v kolonách s vnitřním průměrem kolem 4,5 mm, určených primárně pro HPLC systémy. Pro UHPLC to byla spíše alternativa.

Mnohem větší význam měly kolony s částicemi o velikosti do 2 μm , určené výhradně pro UHPLC. U částic velikosti 1,7 μm bylo zjištěno, že na účinnost separace má vliv i tloušťka porézního povrchu. Čím je tenčí, tím je analýza účinnější a retenční čas kratší. Částice velikosti 1,3 μm byly vyvinuty v roce 2013. Jejich hlavní nevýhodou byl fakt, že způsobovaly až dvojnásobně větší tlak na koloně než předchozí zmíněné. Ve stejném roce se na trhu objevily i sorbenty o velikosti 1,6 μm charakterizované větší pórovitostí a užší distribucí velikostí částic. Díky tomu vyvolávaly na koloně tlak podobný částicím 1,7 μm ^[19].



Obr. 6: Srovnání core-shell částic a plně porézních částic ^[22]

3.3.2 Inovace v UHPLC systémech

V dnešní době je na trhu velký výběr UHPLC systémů, které umožňují při analýze pracovat s tlaky až do výše 1300 bar (130 MPa). Dostupné jsou i technologie spojující vysokotlaké binární a nízkotlaké směšování. Vysokotlaká binární čerpadla se skládají z pumpy A a z pumpy B, které na sobě nejsou závislé. Současně mohou pracovat se dvěma rozpouštědly mísícími se ve směšovači. Tento typ čerpadel má nižší mrtvý objem systému (hodnota dwell) a je vhodnější pro nižší průtoky. Nízkotlaká čerpadla jsou vhodnější pro práci s více než dvěma rozpouštědly či pufry ^[19].

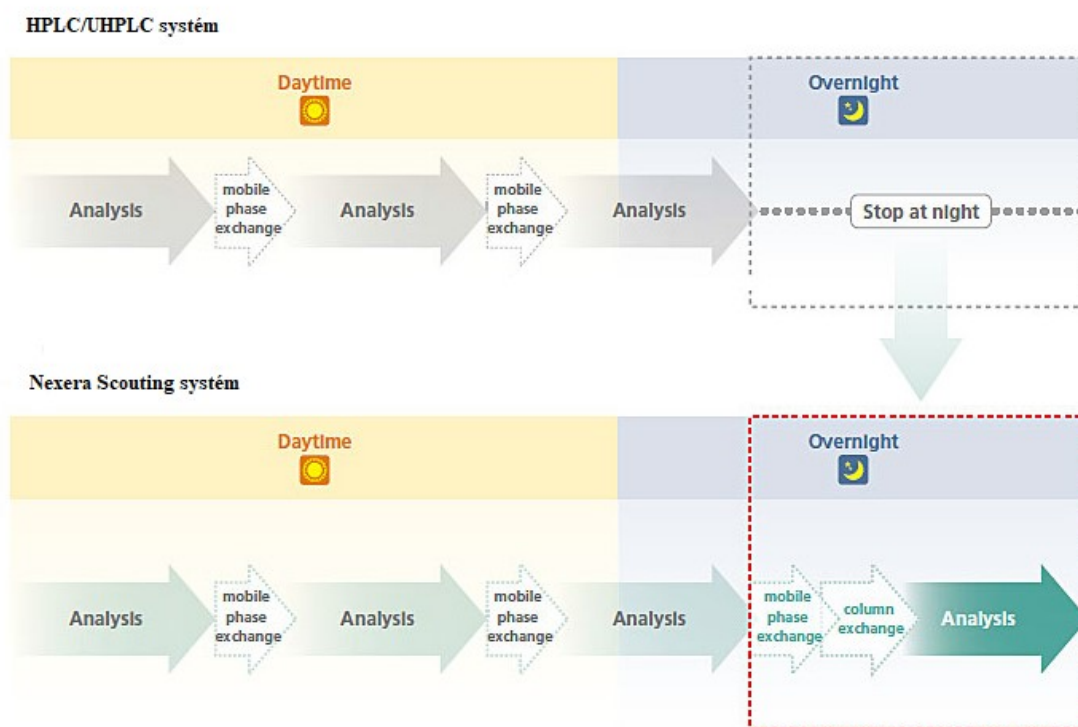
3.3.3 Použití UHPLC

UHPLC systémy mají uplatnění v mnoha oborech, ať už farmaceutických či lékařských. Jsou široce využívány při výzkumech a vývoji nových látek, při kontrolách jakosti nebo stanovování čistoty látek. Umožňují analýzu, separaci a identifikaci jednotlivých složek dané sloučeniny ^{[20][23]}.

3.3.4 Nexera UHPLC Scouting metoda

Scouting metoda slouží k nalezení optimálních podmínek pro separaci jednotlivých složek vzorku za pomoci většího množství rozdílných mobilních i stacionárních fází najednou. Pracuje se speciálním softwarem a rezistentním vysokotlakým přepínacím systémem umožňujícím automatickou výměnu používaných kolon a mobilních fází během analýzy. Byla vyvinuta především pro zjednodušení a zefektivnění procesu vývoje analytických metod.

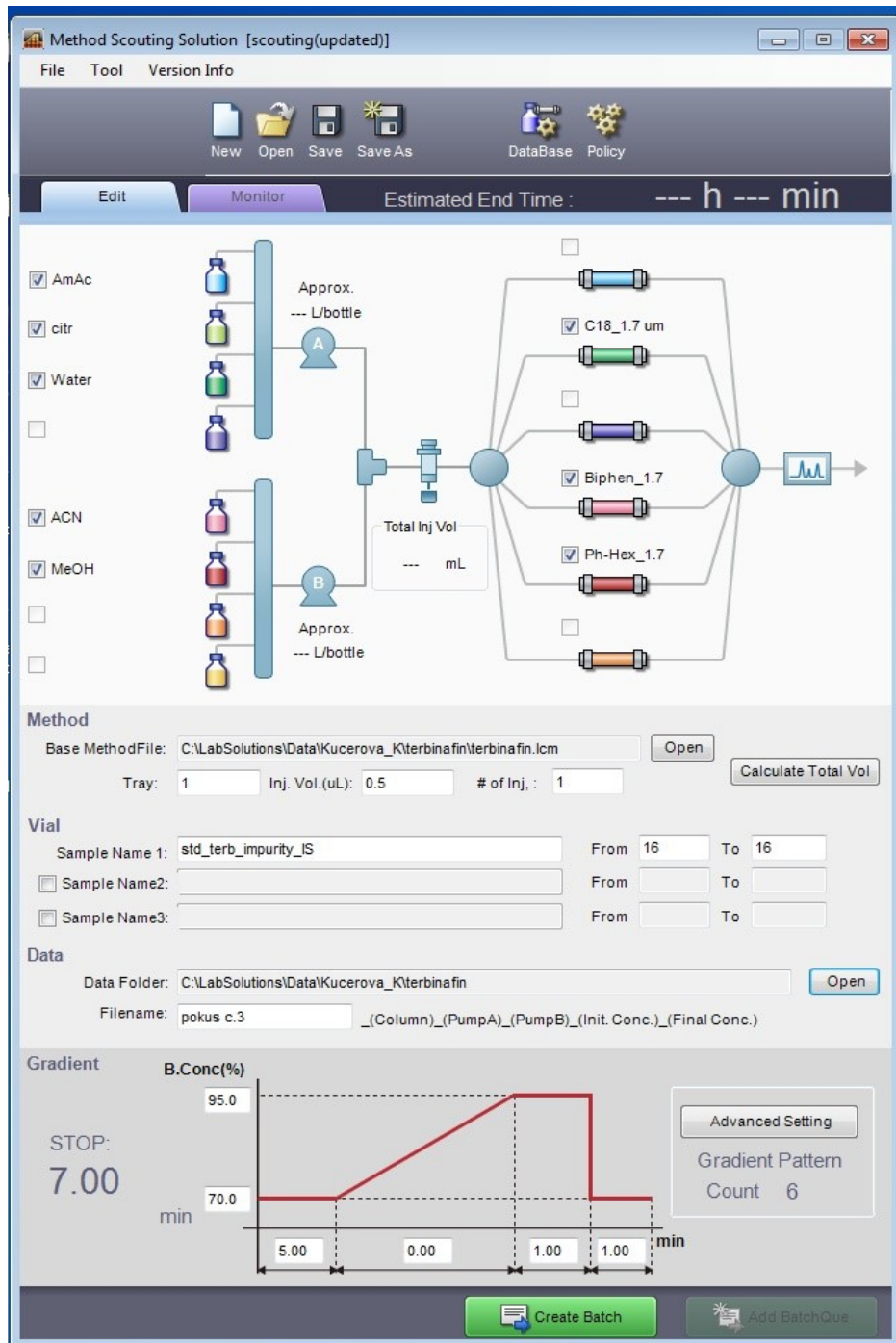
Systém je schopen najednou vytvořit téměř sto rozdílných kombinací mobilních fází a kolon, se kterými následně pracuje. Veškerá získaná data pak shromažďuje. V průběhu analýzy nevyžaduje žádný manuální zásah, a proto se celý proces výrazně urychluje. Následující obrázek porovnává délky analýz při použití různých systémů. U HPLC či UHPLC je doba procesu prodlužována mimo jiné nutností manuální výměny kolon nebo mobilních fází. Scouting systém je plně automatizovaný, a umožňuje tak získávat potřebná data bez nutnosti zásahu pověřené osoby [25][26][27].



Obr. 7: Porovnání délky analýzy při použití HPLC/UHPLC systému a Scouting systému [25]

Jak bylo řečeno výše, Scouting systém umožňuje použít různé mobilní fáze i kolony. Aby se zabránilo náhlému nedostatku množství vzorku nebo mobilní fáze,

s předstihem vypočítá jejich pravděpodobnou spotřebu. Důležitým úkolem je taktéž neustálá kontrola tlaku v kolonách. Před analýzou uvede odhadovanou délku celého procesu zahrnující i čas nutný pro ekvilibraci kolon a „auto-purging“ mobilních fází [27].



Obr. 8: Scouting metoda

3.4 Metody popisující stanovení terbinafinu

Následující text obsahuje Tabulku 2 a 3 shrnující již existující metody pro stanovení terbinafinu. Pro porovnání byly vybrány jak HPLC, tak i UHPLC metody.

Nejčastější lékovou formou pro stanovení terbinafinu byly tablety. Délka kolon se u HPLC pohybovala od 150 do 250 mm, u UHPLC od 50 do 100 mm. Mobilní fáze byla zpravidla zastoupena acetonitrem či methanolem v kombinaci s vodou (pufry) v různých poměrech.

Celková délka analýzy se pohybovala do 10 minut – nutno ale dodat, že žádná z těchto analýz nepracovala se strukturně podobnými látkami. Pouze jedna HPLC metoda se zabývala stanovením terbinafinu a jeho rozkladných produktů^[31], nicméně čas potřebný k analýze přesahoval 30 minut, což je pro praxi velmi dlouhá doba.

Tabulka 2: Příklady stanovení terbinafinu I

Metoda	Materiál	Stacionární fáze (rozměry kolony; velikost částic)	Mobilní fáze	Chromatografické podmínky (režim, průtok, nástřik, vlnová délka)			
				Režim	Průtok	Nástřik	Vlnová délka
UHPLC ^[28]	Moč	Poroshell 120 EC-C18 (100 x 3 mm; 2,7 μm)	ACN : CF ₃ COOH (95:5) : H ₂ O	Gradientový	0,5 – 1 ml/min	-	226 nm
HPLC ^[29]	Tablety, krém	Shim-pack CLS-ODS (250 x 4 mm; 5 μm)	MeOH : H ₂ O (95:5)	Izokratický	1 ml/min	-	254 nm
UHPLC ^[30]	Moč, plazma	Hypersil GOLD C18e (50 x 2,1 mm; 1,7 μm)	0,1 % HCOOH v H ₂ O : ACN	Gradientový	0,7 – 1,5 ml/min	5 μl	224 nm
HPLC ^[31]	Krém	NUCLEOSIL 100-5-CN (250 x 4,6 mm; 5 μm)	C ₄ H ₈ O : ACN : citrátový pufr (10:20:70)	Izokratický	0,8 ml/min	-	226 nm
HPLC ^[32]	Nehty	Luna C18 100A (150 x 2 mm; 5 μm)	H ₃ PO ₄ + triethylaminový pufr : ACN (60:40)	Izokratický	0,3 ml/min	10 μl	224 nm
HPLC ^[33]	Tablety	RP-C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)	MeOH : H ₂ O (95:5)	Izokratický	1,2 ml/min	-	254 nm

Tabulka 3: Příklady stanovení terbinafinu II.

Metoda	Materiál	Stacionární fáze (rozměry kolony; velikost částic)	Mobilní fáze	Chromatografické podmínky (režim, průtok, nástřik, vlnová délka)			
HPLC ^[33]	-	RP- μ -Bondapak C18 (250 x 4,6 mm; 10 μ m)	H ₂ O : MeOH (20:80)	Izokratický	-	-	284 nm
HPLC ^[33]	Tablety, krémy	Shimpack CLC-ODS (250 x 4 mm; 5 μ m)	H ₂ O : MeOH (5:95)	Izokratický	1 ml/min	-	254 nm
HPLC ^[33]	Tablety	NeoSphere C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m)	MeOH : 0,5 % C ₆ H ₁₅ NO ₃	Izokratický	1,2 ml/min	-	250 nm
HPLC ^[33]	Tablety	ZORBAX Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm; 3,5 μ m)	Pufr : C ₃ H ₈ O : MeOH (40:12:48)	Izokratický	1 ml/min	-	222 nm

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- ✓ 4-methylterbinafin hydrochlorid, číslo šarže: YI-141-IX-69 (50 mg), Chemagis Ltd., Izrael
- ✓ Acetonitril (HPLC grade), Sigma Aldrich, Česká republika
- ✓ Buthyl 4-hydroxybenzoát (99 %), Sigma Aldrich, Česká republika
- ✓ Flurbiprofen, Sigma Aldrich, Česká republika
- ✓ Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý, Merck, Německo
- ✓ Hydroxid sodný (p.a.), Penta, Česká republika
- ✓ Ketoprofen (99 %), Sigma Aldrich, Česká republika
- ✓ Kyselina citronová monohydrát (p.a.), Penta, Česká republika
- ✓ Kyselina fosforečná, Fluka analytical, Sigma Aldrich, Česká republika
- ✓ Kyselina octová (99 % p.a.), Penta, Česká republika
- ✓ Methanol (HPLC grade), Sigma Aldrich, Česká republika
- ✓ Octan amonný čistý, Chemapol, Česká republika
- ✓ Propyl 4-hydroxybenzoát, Fluka analytical, Sigma Aldrich, Česká republika
- ✓ Terbinafin hydrochlorid (referenční standard), číslo šarže: MI-83-3 (0,5 g), Chemagis Ltd., Izrael
- ✓ Ultračistá voda (čištěná systémem Milli-Q RG, Millipore, USA)
- ✓ Z-terbinafin oxalát, číslo šarže: YI-79-VI-48 (50 mg), Chemagis Ltd., Izrael
- ✓ β -terbinafin hydrochlorid (referenční standard), číslo šarže: TF-280, Chemagis Ltd., Izrael

4.2 Přístrojové vybavení a pomůcky

Chromatografické kolony

- ✓ Kinetex™ 1,7 µm – C18 100A, 50 x 2,1 mm, Phenomenex, USA
- ✓ Kinetex™ 1,7 µm – Bifenyl 100A, 50 x 2,1 mm, Phenomenex, USA
- ✓ Kinetex™ 1,7 µm – Phenyl-Hexyl, 50 x 2,1 mm, Phenomenex, USA

Přístroje a pomůcky

- ✓ UHPLC systém Liquid Chromatograph – Nexera X2 – Shimadzu, Japonsko
 - Vysokotlaké pumpy LC-30 AD
 - Autosampler SIL-30 AC
 - Degasser DGU-20 A 5R
 - Detektor – detektor s diodovým polem SPD-M30 A
 - Komunikační jednotka s počítačem CBM-20 A (software LC Solution)
 - Kolonový termostat (rozsah 10 – 85°C) CTO-20 AC
 - Přepínací ventil
- ✓ Analytické váhy Sartorius ME 5 – OCE, Německo
- ✓ Automatické pipety Transferpette S, Brand, Německo
- ✓ pH metr SCHOTT, Česká republika
- ✓ Předkolony – Security Guard ULTRA Cartidges, UHPLC C18, Bifenyl, Phenyl-Hexyl; 2,1 mm, Phenomenex, USA

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Tlumivý octanový roztok

Množství potřebné pro navážku octanu amonného čistého, jenž byl následně použit pro přípravu octanového pufru, bylo zjištěno pomocí rovnice:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{M \cdot V} \rightarrow m = c \times V \times M$$

kde m je potřebné množství dané látky [g], c je molární koncentrace [mol/l], M je molární hmotnost [g/mol].

Požadovaná koncentrace octanového pufru byla 0,01 mol/l. Navážka 0,1547 g byla převedena do 200 ml odměrné baňky a rozpuštěna v ultračisté vodě. Následně bylo kyselinou octovou upraveno pH na požadovanou hodnotu 4,55. Roztok byl v odměrné baňce doplněn po značku ultračistou vodou.

4.3.2 Tlumivý citrátový pufr (0,01 mol/l)

Navážka 0,4297 g kyseliny citronové monohydrátu, jež byla zjištěna z výše uvedeného vztahu, byla převedena do 200 ml odměrné baňky a rozpuštěna v ultračisté vodě. Pomocí hydroxidu sodného bylo pH upraveno na hodnotu 4,5. Roztok byl v odměrné baňce doplněn po značku ultračistou vodou.

4.3.3 Tlumivý fosfátový roztok

Na přípravu fosfátového pufru byla použita navážka 0,5662 g hydrogenfosforečnanu disodného bezvodého, která byla rovněž převedena do 200 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky v ultračisté vodě byl roztok v odměrné baňce doplněn ultračistou vodou po značku. Požadovaná koncentrace byla 0,02 mol/l.

4.3.4 Mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smísením roztoku pufru a methanolu.

Roztok pufru byl tvořen citrátovým a fosfátovým pufrem v poměru 1:1; pH takto připraveného roztoku mělo hodnotu 5 a dále se již neupravovalo. Před každým měřením bylo pH vždy kontrolováno pH metrem.

Výsledný poměr 25:75 (v/v) vodné fáze a organického modifikátoru byl po vyzkoušení různých kombinací vyhodnocen jako nejvhodnější.

4.3.5 Zásobní roztoky standardů

Nejprve byl připraven zásobní roztok standardu terbinafinu s vnitřním standardem propylparabenem. Navážka 6,25 mg terbinafinu a 6,25 mg propylparabenu byla převedena do 25 ml odměrné baňky a doplněna methanolem po rysku. Koncentrace roztoku byla 25 mg/100 ml. Tento roztok se poté uchovával v lednici při teplotě 4 - 8 °C.

Rovněž byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých rozkladných produktů. Jejich požadovaná koncentrace byla 5 mg/100 ml. Methylterbinafin, β -terbinafin a Z-terbinafin byly každý zvlášť naváženy v množství 5 mg, převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku. Tyto roztoky byly taktéž uchovávány v lednici za stejných podmínek jako roztok terbinafinu s propylparabenem.

4.3.6 Pracovní roztoky standardů

Pracovní roztok terbinafinu spolu s vnitřním standardem propylparabenem a třemi rozkladnými produkty byl připraven následujícím způsobem. Navážka 6,25 mg terbinafinu a 6,25 mg propylparabenu byla převedena do 25 ml odměrné baňky. Poté byly přidány zásobní roztoky jednotlivých rozkladných produktů. Z těchto zásobních roztoků bylo postupně odměřeno 3,5 ml β -terbinafinu, 3,5 ml Z-terbinafinu a 3 ml methylterbinafinu a následně přidáno do baňky k terbinafinu a propylparabenu. Roztok byl doplněn methanolem po rysku. Koncentrace β -terbinafinu a Z-terbinanafinu byla 0,7 mg/100 ml, u methylterbinafinu pak 0,6 mg/100 ml.

5 Výsledky a diskuze

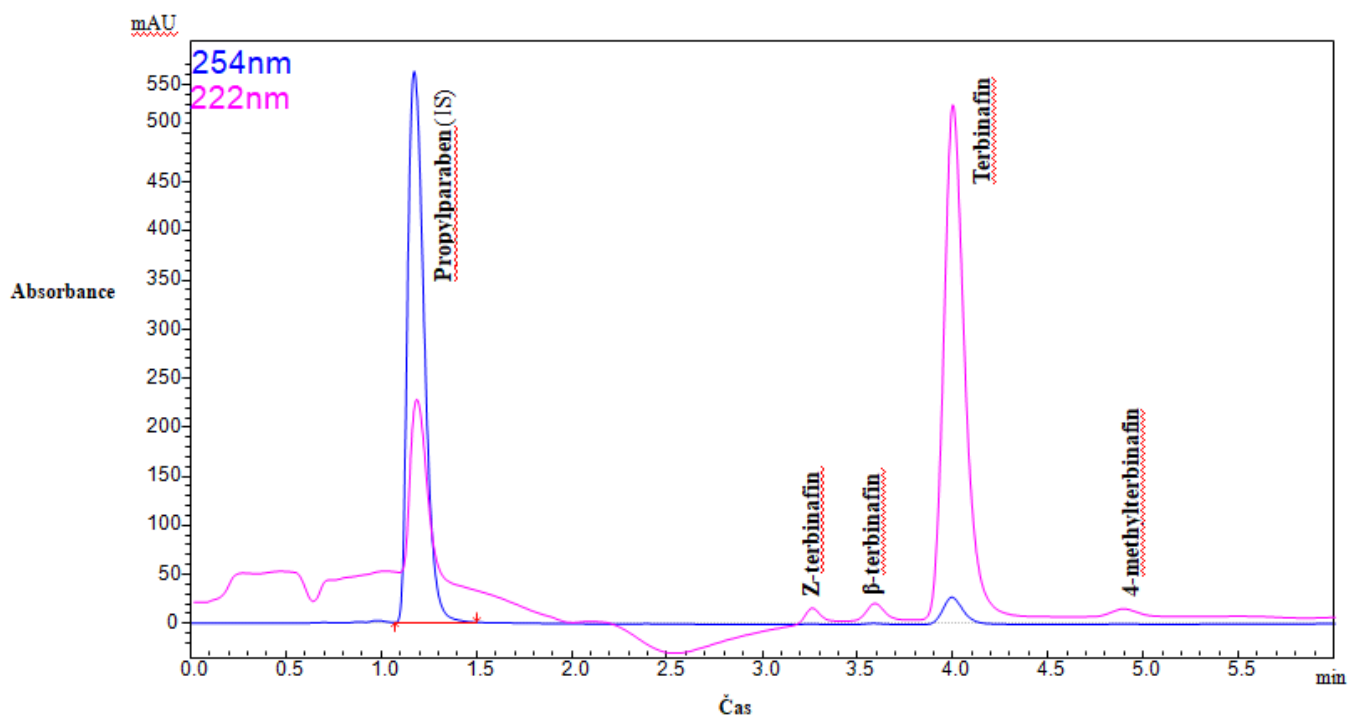
5.1 Optimalizace chromatografické metody

Při optimalizaci chromatografické metody se vycházelo jednak z informací nalezených v člancích týkajících se stanovení terbinafinu, informace byly rovněž čerpány z Českého lékopisu 2009 nebo z internetových databází. Nalézt vhodné chromatografické podmínky pro stanovení terbinafinu a jeho tří strukturně velmi podobných rozkladných produktů zahrnovalo několik kroků, které budou popsány níže.

5.1.1 Vlnová délka detekce

Při zjišťování hodnoty vlnové délky použitelné pro měření terbinafinu a jeho tří nečistot se vycházelo z informací nalezených v člancích popisujících stanovení těchto látek pomocí UHPLC systému ^{[28][30]}. Autoři těchto textů využívali při měření terbinafinu hodnoty 224 nm a 226 nm, druhá zmíněná hodnota představuje jeho absorpční maximum. Nalezena byla i data týkající se zmíněných nečistot: β -terbinafin podle autorů vykazoval absorpční maximum při 225 nm, Z-terbinafin při 224 nm a 4-methylterbinafin při 228 nm. Spektra těchto látek byla proměřena a porovnána s nalezenými informacemi. Zvolená vlnová délka měla hodnotu 222 nm.

Propylparaben jako vnitřní standard vykazoval podle nalezených zdrojů maxima absorpce při 256 nm a 297 nm ^[34]. I jeho absorpční spektrum bylo proměřeno, vybraná vlnová délka pro měření měla hodnotu 254 nm. Nebyla použita stejná vlnová délka jako pro stanovení terbinafinu a jeho nečistot, poněvadž při hodnotě 222 nm nevykazoval dostatečnou absorpci.



Obr. 9: Chromatogram terbinafinu, jeho tři nečistot a propylparabenu. Kolona KinetexTM 1,7 μm – Bifenylyl 100A (50 x 2,1 mm), mobilní fáze citrátový:fosfátový pufr (1:1) : MeOH, poměr 25:75, pH 5. Nástřik 0,5 μl , eluce gradientová. Modrá barva představuje vlnovou délku 254 nm, růžová pak 222 nm.

5.1.2 Vnitřní standard

Při výběru vnitřního standardu je nutné brát v úvahu požadavky, které jsou na takovéto látky kladeny. V první řadě je zapotřebí myslet na strukturální podobnost se stanovovanou látkou a na fyzikálně-chemické vlastnosti, které by se rovněž neměly příliš lišit. Látka zvolená jako vnitřní standard by dále měla být dostatečně čistá, stabilní, neměla by interagovat s dalšími látkami ve směsi nebo jinak ovlivňovat průběh analýzy.

Nalézt látku, která by byla strukturně podobná terbinafinu, avšak nepředstavovala žádnou ze stanovovaných nečistot, bylo velmi obtížné. Proto byl jako vnitřní standard zvolen propylparaben, se kterým má Katedra analytické chemie, kde byla tato diplomová práce měřena, bohaté zkušenosti. Tato látka tedy nemá podobnou chemickou strukturu jako terbinafin, nicméně je dostatečně stabilní a poskytuje požadované výsledky při měření.

Z parabenů byl dále zkoušen i butylparaben, který ale rovněž nepřinesl výraznější změny ve srovnání s propylparabenem, a použit nebyl.

Další potencionální vnitřní standardy, které byly analyzovány, patřily do skupiny nesteroidních antiflogistik. Z této skupiny byli vybráni dva zástupci, a to konkrétně flurbiprofen a ketoprofen. Ani tyto látky nebyly ve srovnání s propylparabenem výhodnější.

I přes strukturní neshodu s hlavní účinnou látkou byl tedy jako vnitřní standard použit propylparaben. Ten byl ze všech zkoušených látek eluován jako první, neovlivňoval analýzu ani neinteragoval se žádnou ze složek směsi.

5.1.3 Složení mobilní fáze, hodnota pH

Při hledání optimálního složení mobilní fáze byly využity připravené roztoky pufrů spolu s dalšími látkami, konkrétně acetonitrilem (ACN) a methanolem (MeOH). Poměry jednotlivých látek shrnuje Tabulka 4.

Jako první byl testován octanový a citrátový pufr spolu s ACN. Tato volba nepřinesla žádné uspokojivé výsledky, nebylo dosaženo požadované separace strukturně podobných nečistot. Proto byl připraven nový pufr – fosfátový, který ale často v kombinaci s ACN tvoří sraženiny, jež by mohly způsobit ucpání UHPLC systému. Z tohoto důvodu musela být zvolena jiná látka, ve které by však byly rozpustné všechny komponenty směsi. Jako ideální se jevil methanol, jenž snadno rozpouští zmíněné složky.

Nově připravený fosfátový pufr byl nejprve naředěn v poměru 11:9 pufrům citrátovým, posléze byl používán jednodušší poměr 1:1. Takto připravený pufr byl zkoušen v různých koncentračních poměrech s methanolem. Bylo zjištěno, že se snižující se koncentrací pufru docházelo k postupnému oddělování píků jednotlivých nečistot a terbinafinu. Zároveň však docházelo k dřívější eluci propylparabenu, která se pohybovala blízko mrtvého retenčního času.

První zkoušené pH, které bylo v rámci vyvíjení metody použito, mělo hodnotu 4,5. Toto pH bylo vybráno na základě informací nalezených v příslušném článku ^[31]. Při poměru 11:9 – citrátový:fosfátový pufr bylo konečné pH rovno 4,5, a nemuselo se

tedy dále upravovat. Tato hodnota pH byla používána téměř při celém vývoji metody. Jak ale bylo zmíněno výše, se snižujícím se poměrem pufru v mobilní fázi byl vnitřní standard eluován velmi brzy. Proto byly zkoušeny i jiné hodnoty, a to pH 5 a 6.

Při pH 5 bylo zjištěno, že všechny píky měly mnohem vyšší intenzitu než při dříve používaném pH 4,5. Zároveň byl i prodloužen retenční čas všech komponent směsi, tedy i propylparabenu. Celkový čas analýzy se sice mírně prodloužil, nicméně bylo dosaženo požadovaných výsledků. Další výhodou byla příprava pufrůvácích systémů, která byla zjednodušena na finální poměr pufrůvácích složek 1:1.

Poslední zkoušené pH 6 nebylo pro analýzu vhodné, protože vůbec nedošlo k separování jednotlivých píků.

Konečné složení mobilní fáze bylo fosfátový a citrátový pufr (poměr 1:1) s methanolem v poměru pufr:MeOH – 25:75.

Ve zvoleném poměru dokázala mobilní fáze separovat všechny složky směsi, jejich píky byly dostatečně intenzivní. Celkový čas analýzy se pohyboval do 6 min.

Ze tří zkoušených hodnot pH byla nakonec vybrána hodnota 5, která sice analýzu mírně prodloužila, ale poskytla lepší výsledky.

Tabulka 4: Mobilní fáze a jejich složení

Rozpouštědlo	Mobilní fáze - poměr														
Octanový pufr	-	40	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrátový pufr	40	-	30	-	45	11	13,75	22	20,35	19,25	18,15	17,05	12,5	11,5	10,5
Fosfátový pufr	-	-	-	-	-	9	11,25	18	16,65	15,75	14,85	13,95	12,5	11,5	10,5
ACN	60	60	70	70	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH	-	-	-	-	-	80	75	60	63	65	67	69	75	77	79

pozn.: Číselné hodnoty v tabulce zbarvené modře představují poměr pufrů citrátový:fosfátový 11:9, červené hodnoty pak poměr 1:1

5.1.4 Analytická kolona

Při vývoji metody byly používány celkem tři analytické kolony, a to Kinetex™ 1,7 µm – C18 100A (50 x 2,1 mm), Kinetex™ 1,7 µm – Bifenyl 100A (50 x 2,1 mm) a Kinetex™ 1,7 µm – Phenyl-Hexyl (50 x 2,1 mm).

V první fázi zkoušení byly střídavě používány hned dvě kolony, konkrétně Kinetex™ C18 a Kinetex™ Phenyl-Hexyl. Z těchto dvou se jako lepší jevila kolona Kinetex™ Phenyl-Hexyl, a to z toho důvodu, že dokázala ve vybraných podmínkách separovat téměř všechny složky směsi. I přesto, že se měnily poměry jednotlivých složek mobilní fáze nebo pH pufrů, nebylo dosaženo úplné separace všech složek směsi a intenzita píků nebyla dostatečná. Použitý nástřik na těchto kolonách byl 0,5 µl s průtokovou rychlostí 0,6 ml/min.

Poslední testovanou kolonou byla kolona Kinetex™ Bifenyl. Dokázala separovat všechny látky ve směsi s dostatečnou intenzitou a za poměrně krátký čas. Celková délka separace byla necelých šest minut. Rovněž byly zkoušeny různé průtokové rychlosti, přičemž nástřik byl vždy stejný, tedy 0,5 µl. Kromě výše zmíněné průtokové rychlosti 0,6 ml/min byla vyzkoušena i eluce gradientová, která se posléze jevila jako nejúčinnější, poskytovala nejintenzivnější píky složek. Konečný průtokový gradient, který byl zvolen, shrnuje Tabulka 5.

Tabulka 5: Gradientová eluce

Čas [min]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,00 – 1,39	0,2
1,40 – 5,00	0,6
5,1 – 6,00	0,2

5.2 Souhrn optimálních chromatografických podmínek

Tabulka 6: Souhrn optimálních chromatografických podmínek

Analytická kolona	Kinetex™ 1,7 µm – Bifenyl 100A (50 x 2,1 mm)	
Mobilní fáze	pufr:methanol (25:75)	
Složení roztoku pufru	citrátový (0,01 M):fosfátový (0,02 M) pufr (1:1)	
Průtoková rychlost (gradient)	Čas [min]	Průtoková rychlost [ml/min]
	0,00 – 1,39	0,2
	1,40 – 5,0	0,6
	5,1 – 6,0	0,2
pH	5	
Vlnová délka	222 nm a 254 nm	
Vnitřní standard	propylparaben	
Nastříkovaný objem	0,5 µl	
Retenční čas terbinafinu	4,2 min	
Tlak	55 MPa	
Teplota	25 °C	
Celkový čas analýzy	do 6 min	

5.3 Validace analytické metody

Validace je proces, jehož cílem je prokázat, že je daná analytická metoda za uvedených podmínek platná, kvalitní a vhodná pro účel, pro který byla vypracována. Součástí validace je vypracování validačního protokolu, který obsahuje veškeré výsledky jednotlivých zkoušek, které je v rámci tohoto procesu nutné provést.

Validace se provádí při zkouškách:

- ✓ totožnosti
- ✓ limitních
- ✓ kvantitativních testujících obsah nečistot
- ✓ stanovujících obsah

V některých případech je nutné provést revalidaci analytické metody, jejíž stupeň závisí na rozsahu změn, které byly provedeny. Jedná se např. o změnu v syntéze látky, jež byla danou metodou stanovována, změny ve složení finálního produktu či změny v procesu analýzy.

U této metody popisující stanovení terbinafinu a jeho tří nečistot byl proveden test způsobilosti systému (system suitability test) a parametry validace metody ^{[21][35]}.

5.3.1 Test způsobilosti systému

Tento test je důležitou součástí mnoha analytických metod. Vymezuje podmínky, které musí být splněny před každým použitím dané metody. Pokud dojde k jejich splnění, je možné považovat dříve provedenou validaci za platnou. Díky tomuto testu tedy není nutné provádět celou validaci znovu. Mezi hodnotící parametry patří např. rozlišení chromatografických píků, opakovatelnost, faktor symetrie píků, zdánlivá účinnost ^{[15][35][36]}.

5.3.1.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody vyjadřuje shodu mezi několika navzájem nezávislými měřeními, které jsou v krátkém časovém úseku prováděny za stejných laboratorních podmínek stejným pracovníkem za použití identických zařízení, přístrojů a vzorků. Tento parametr je vyjadřován v procentech pomocí relativní směrodatné odchylky RSD ^{[15][21]}.

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

n ... počet jednotlivých hodnot

\bar{y} ... průměr jednotlivých hodnot

y_i ... jednotlivé naměřené hodnoty

Tabulka 7: Opakovatelnost nástřiku terbinafinu

Nástřík	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem
1.	3,998	3044077
2.	4,005	3043457
3.	3,993	3035195
4.	3,991	3033095
5.	3,999	3033127
6.	4,005	3031149
Průměr	3,999	3036683,3
SD	0,006	5637,7
RSD	0,15 %	0,19 %

Tabulka 8: Opakovatelnost nástřiku Z-terbinafinu, β -terbinafinu a 4-methylterbinafinu

Nástřik	Z-terbinafin		β -terbinafin		4-methylterbinafin	
	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem
1.	3,253	67207	3,588	85272	4,899	57718
2.	3,257	67897	3,592	85091	4,899	57644
3.	3,261	67334	3,583	86277	4,892	56721
4.	3,251	67805	3,581	85369	4,888	57489
5.	3,256	67874	3,587	85795	4,901	56801
6.	3,263	67249	3,593	86492	4,905	57703
Průměr	3,257	67561,0	3,587	85716,0	4,897	57346,0
SD	0,005	330,0	0,005	571,2	0,006	461,0
RSD	0,14 %	0,49 %	0,13 %	0,67 %	0,13 %	0,80 %

Tabulka 9: Opakovatelnost nástřiku propylparabenu

Nástřik	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem
1.	1,171	3305712
2.	1,171	3297590
3.	1,173	3290527
4.	1,174	3292541
5.	1,171	3290976
6.	1,177	3286193
Průměr	1,173	3293923,2
SD	0,002	6845,6
RSD	0,20 %	0,21 %

Hodnota relativní směrodatné odchylky pro parametr opakovatelnosti pro retenční čas i plochu pod píkem by měla být do 1 %. Hodnoty relativních směrodatných odchylek vyhovují u všech hodnocených substancí.

5.3.1.2 Zdánlivý počet teoretických pater

Parametr zdánlivého počtu teoretických pater N se vypočítá pomocí vzorce [15]:

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

t_R ... retenční čas píku

W_h ... šířka píku v polovině jeho výšky

Tabulka 10: Zdánlivý počet teoretických pater terbinafinu a propylparabenu

Nástřík	Terbinafin			Propylparaben		
	t_R (min)	W_h	N	t_R (min)	W_h	N
1.	3,996	0,114	6807	1,179	0,08	1203
2.	3,999	0,114	6817	1,171	0,081	1159
3.	4,005	0,114	6838	1,177	0,081	1170
Průměr	4,00	0,11	6821	1,18	0,08	1177

Tabulka 11: Zdánlivý počet teoretických pater Z-terbinafinu, β -terbinafinu a 4-methylterbinafinu

Nástřík	Z-terbinafin			B-terbinafin			4-methylterbinafin		
	t_R (min)	W_h	N	t_R (min)	W_h	N	t_R (min)	W_h	N
1.	3,252	0,086	7922	3,583	0,101	6972	4,893	0,148	6055
2.	3,256	0,088	7584	3,587	0,1	7128	4,901	0,148	6075
3.	3,263	0,087	7793	3,593	0,1	7152	4,905	0,15	5924
Průměr	3,26	0,09	7763	3,59	0,10	7084	4,90	0,15	6018

Zdánlivý počet teoretických pater by měl mít hodnotu > 900 . Všechny složky směsi vyhovují stanoveným požadavkům.

5.3.1.3 Faktor symetrie A_S

Faktor symetrie píku se počítá pomocí vzorce ^[15]:

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

$W_{0,05}$... šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d ... vzdálenost mezi kolnicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Tabulka 12: Faktor symetrie u terbinafinu, propylparabenu, Z-terbinafinu, β -terbinafinu a 4-methylterbinafinu

Nástřík	TER		PP		β -TER		Z-TER		4-mTER	
	$W_{0,05}$	d	$W_{0,05}$	d	$W_{0,05}$	d	$W_{0,05}$	d	$W_{0,05}$	d
1.	1,292	0,50	1,456	0,50	1,162	0,50	1,103	0,50	1,094	0,50
2.	1,294		1,458		1,145		1,178		1,102	
3.	1,291		1,473		1,152		1,098		1,146	
A_S	1,29		1,46		1,15		1,13		1,11	

Požadavek pro hodnoty faktoru symetrie leží v rozmezí 0,8 až 1,5 ^[15]. Všechny složky směsi vyhovují stanoveným požadavkům.

5.3.1.4 Rozlišení R_S

Hodnota R_S kvantitativně vyjadřuje rozdělení dvou po sobě se elujících složek v analyzované směsi. Vypočítá se podle vzorce ^[15]:

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

t_{R1} , t_{R2} ... retenční časy píků

W_{h1} , W_{h2} ... šířky píků v polovině výšky

Tabulka 13: Hodnoty R_s pro složky analyzované směsi

	Nástřik			
	1.	2.	3.	Průměr
pík mrtvého objemu	2,52	2,52	2,54	2,53
Z-TER - β-TER	2,03	2,03	2,02	2,02
β-TER – TER	2,20	2,20	2,20	2,20
TER – 4-mTER	3,95	3,96	3,93	3,95

Požadované hodnoty R_s by měly být vyšší než 1,5, čemuž odpovídá rozdělení píků na základní linii. Tomuto požadavku vyhovují všechny složky analyzované směsi.

5.3.2 Validace analytické metody

5.3.2.1 Detekční a kvantitativní limit

Detekční limit (LOD) vyjadřuje nejnižší koncentraci látky, která je detekovatelná, tedy vyvolá odezvu měřicího systému. Tato odezva je větší, než je trojnásobek úrovně šumu pozadí [37][38].

Kvantitativní limit (LOQ) vyjadřuje nejnižší koncentraci látky, kterou lze s přijatelnou přesností a správností stanovit. Taková koncentrace látky je schopna vyvolat odezvu měřicího systému, která je větší, než je desetinásobek úrovně šumu pozadí [37][38].

Tabulka 14: LOD, LOQ

	terbinafin	β-terbinafin	Z-terbinafin	4-mTER
S_n	0,3	0,1	0,8	0,1
K	8,21	6,72	8,26	18,53
b₁	12517300	12404,86	10996,57	18951,83
LOD (ng/ml)	0,59	0,16	1,37	0,29
LOQ (ng/ml)	1,97	0,54	4,55	0,98

pozn.:

$$s_n = \frac{(\text{nejvyšší kladná amplituda šumu} - \text{záporná amplituda šumu})}{5}$$

$$K = \frac{\text{plocha píku}}{\text{výška píku}}$$

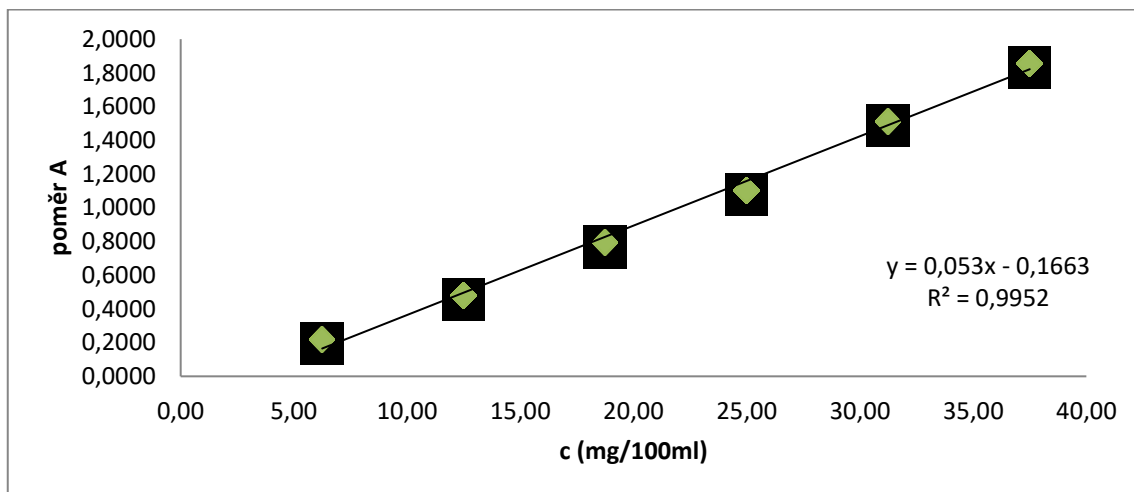
$$b_1 = \frac{\text{plocha píku}}{\text{koncentrace analytu}}$$

5.3.2.2 Linearita

Linearita analytického postupu je jeho schopnost poskytovat takové výsledky testů, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. K jejímu hodnocení se nejčastěji využívá korelační koeficient, který vyjadřuje těsnost vzájemné závislosti dvou proměnných. Čím více se jeho hodnota blíží k 1, tím více je daná závislost lineární [21][35][38].

Tabulka 15: Linearita terbinafinu

c (mg/100 ml)	Plocha pod píkem (TER)	Plocha IS	Poměr ploch (A)
37,50	4185862	2256247	1,8552
31,25	3642230	2407007	1,5132
25,00	2903967	2634283	1,1024
18,75	2225144	2814162	0,7907
12,50	1465233	3054274	0,4797
6,25	714399	3269394	0,2185

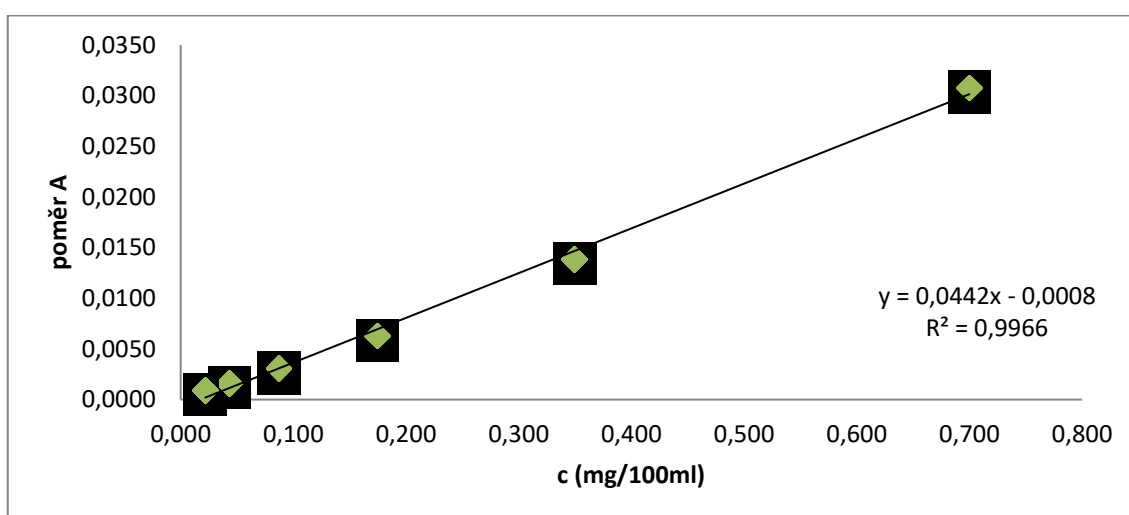


Obr. 10: Graf kalibrační křivky pro terbinafin

Hodnota korelačního koeficientu R^2 pro terbinafin je 0,995.

Tabulka 16: Linearita β -terbinafinu

c (mg/100 ml)	Plocha pod píkem (β -TER)	Plocha IS	Poměr ploch (A)
0,700	92827	3021190	0,0307
0,350	44727	3232225	0,0138
0,175	20853	3345082	0,0062
0,088	10337	3438767	0,0030
0,044	5487	3420408	0,0016
0,022	2930	3420894	0,0009

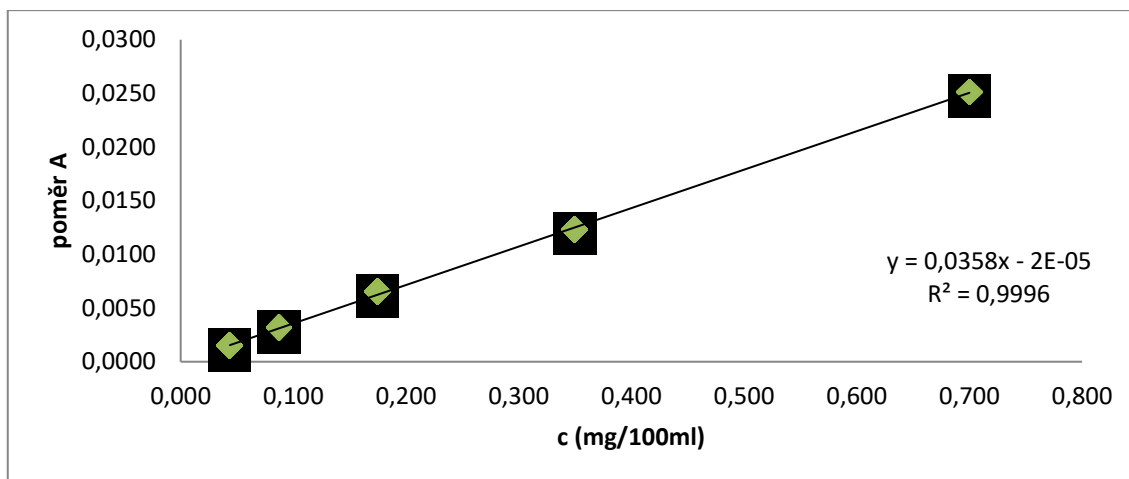


Obr. 11: Graf kalibrační křivky pro β -terbinafin

Hodnota korelačního koeficientu R^2 pro β -terbinafin je 0,996.

Tabulka 17: Linearita Z-terbinafinu

c (mg/100 ml)	Plocha pod píkem (Z-TER)	Plocha IS	Poměr ploch (A)
0,700	75898	3021486	0,0251
0,350	39778	3239008	0,0123
0,175	21946	3369209	0,0065
0,088	10665	3413085	0,0031
0,044	5035	3447358	0,0015

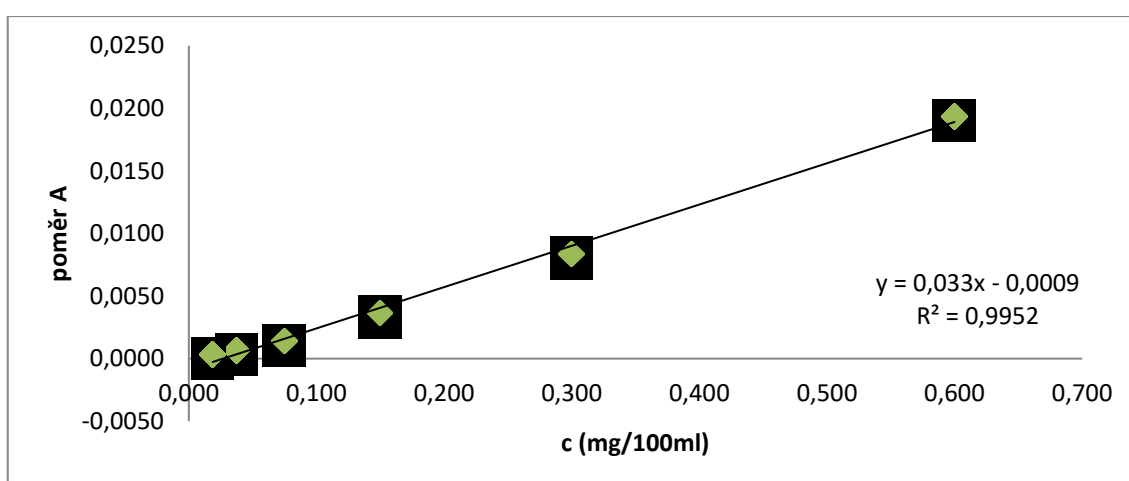


Obr. 12: Graf kalibrační křivky pro Z-terbinafin

Hodnota korelačního koeficientu R^2 pro Z-terbinafin je 0,999.

Tabulka 18: Linearita 4-methylterbinafinu

c (mg/100 ml)	Plocha pod píkem (4-mTER)	Plocha IS	Poměr ploch (A)
0,600	59692	3086279	0,0193
0,300	27274	3272291	0,0083
0,150	12199	3358483	0,0036
0,075	4707	3393572	0,0014
0,038	2173	3431855	0,0006
0,019	1104	3444698	0,0003



Obr. 19: Graf kalibrační křivky pro 4-methylterbinafin

Hodnota korelačního koeficientu R^2 pro 4-methylterbinafin je 0,995.

5.3.2.3 Přesnost (preciznost)

Míra shody mezi jednotlivými výsledky získanými při opakovaném proměřování jednoho homogenního vzorku je známá jako přesnost metody. Vzorek je obvykle analyzován šestkrát. Výsledek je následně vyjádřen pomocí relativní směrodatné odchylky RSD těchto šesti stanovení ^{[21][35][38]}.

Při měření parametru přesnosti metody bylo připraveno šest vzorků, u kterých byla sledována přesnost plochy pod píkem. Každý ze vzorků byl proměřen třikrát. Z těchto tří měření byla vypočítána průměrná hodnota, která je spolu s relativní směrodatnou odchylkou zaznačena v Tabulce 19.

Tabulka 19: Přesnost plochy pod píkem u terbinafinu a jeho nečistot

Vzorek č.	TER	β -TER	Z-TER	4-mTER
1.	3043309	82387	71076	118134
2.	3029297	83610	70844	119163
3.	2984410	80914	70607	118231
4.	3001414	80875	71424	114638
5.	2961760	81171	70462	117361
6.	3018057	84354	71400	108797
RSD (%)	1,00	1,81	0,57	3,34

Hodnota relativní směrodatné odchylky by měla být do 5 %. Tento požadavek vyhovuje u všech analytů.

5.3.2.4 Správnost (přesnost)

Správnost metody vyjadřuje shodu skutečné referenční hodnoty (c_0) a hodnoty získané (c_i). Může být vyjádřena jako výtěžnost či rozdíl referenční a získané hodnoty.

Výtěžnost R_i je poměr mezi množstvím analytu získaného analytickou metodou a jeho referenční hodnotou. Je vyjadřována jako desetinný zlomek nebo v procentech, kdy by se měla pohybovat v rozmezí 95 – 105 %. Požadavek na relativní směrodatnou odchylku je do 5 % ^{[15][21][38]}.

Pro měření bylo připraveno šest vzorků, z nichž každý byl proměřen třikrát. Výsledky měření terbinafinu jsou zaznamenány v Tabulce 20.

Tabulka 20: Správnost metody u terbinafinu

Vzorek č.	Terbinafin			
	c_0 (mg/100 ml)	c_i (mg/100 ml)	Plocha A_i	R_i (%)
1.	25,00	24,81	3056284	99,23
2.		24,64	3020596	98,54
3.		24,51	3036859	98,05
4.		24,70	3019249	98,81
5.		24,49	3031267	97,96
6.		24,80	3044742	99,19
			Průměr R_i (%)	98,63
			RSD (%)	0,56

Průměrná hodnota výtěžnosti terbinafinu byla 98,63 %, relativní směrodatná odchylka měla hodnotu 0,56 %.

5.3.2.5 Robustnost

Schopnost analytické metody poskytovat správné a přesné výsledky i v případě malé změny parametrů je definována jako robustnost. Cílem je poskytnout informace o spolehlivosti analytického postupu a upozornit na takové podmínky, které by mohly výsledky změnit. V případě kapalinové chromatografie mohou mít na robustnost vliv takové parametry, jako jsou např. pH a složení mobilní fáze, použitá kolona, rychlost průtoku, teplota v systému nebo stabilita analyzovaných vzorků ^{[15][21][35][38]}.

V rámci vývoje metody byl zkoušen vliv různých poměrů mobilní fáze na celkový průběh analýzy – jednotlivé poměry jsou shrnuty v Tabulce 4. Zároveň byly testovány různé hodnoty pH, z nichž se pouze jedna jevila jako nejideálnější. Mezi další

zkoušené parametry patřilo např. testování několika odlišných kolon, průtokových rychlostí či vlivu izokratické nebo gradientové eluce na výsledky analýzy.

Proměřováním parametru robustnosti bylo zjištěno, že k ideální separaci terbinafinu a jeho tří degradačních produktů dochází pouze za podmínek shrnutých v Tabulce 22. Výkyvy od těchto nalezených optimálních podmínek mohou významným způsobem ovlivnit průběh celé separace.

5.3.2.5.1 *Stabilita*

Součástí testu je parametr stability vzorků. Připravené vzorky byly skladovány při teplotách 3 °C a 20 °C a v časech 0 h, 24 h, 48 h a 72 h byly proměřeny. Výsledky jsou zaznamenány v Tabulce 21.

Tabulka 21: Robustnost metody u terbinafinu

Terbinafin				
t (h)	Plocha A při 3 °C	RSD (%)	Plocha A při 20 °C	RSD (%)
0	3155215	0,00	3155215	0,00
24	3160215	0,16	3179692	0,78
48	3011907	4,54	3206918	1,64
72	3253067	3,10	3169587	0,46

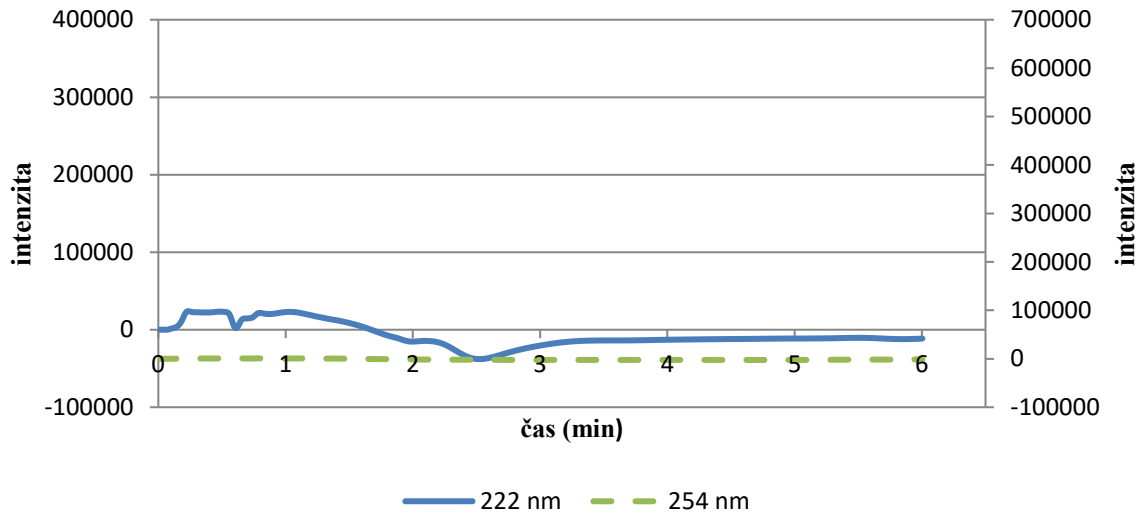
Relativní směrodatná odchylka by podle požadavků měla mít hodnotu pod 1 %. Z výsledků uvedených v Tabulce 21 je patrné, že se stabilita analyzovaného vzorku s časem mění. Proto je nutné vždy používat takové vzorky, které jsou čerstvě připravené.

5.3.2.6 *Selektivita (specifita)*

Selektivita metody je její schopnost jednoznačně analyzovat stanovovanou látku, a to i za přítomnosti dalších očekávaných látek ve směsi. Těmito látkami se rozumí např. pomocné látky, rozkladné produkty, nečistoty ^{[35][38]}.

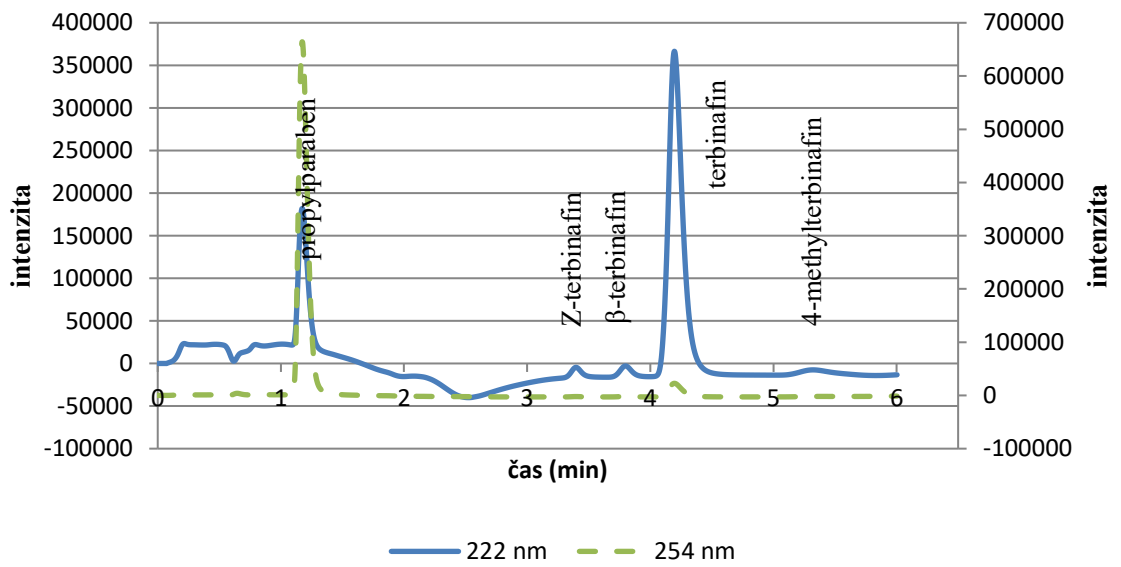
Obr. 20, 21 a 22 znázorňují chromatogramy placeba, roztoku standardu a vzorku. Ve všech případech došlo k úplnému rozdělení všech komponent směsi.

placebo polymer 5P

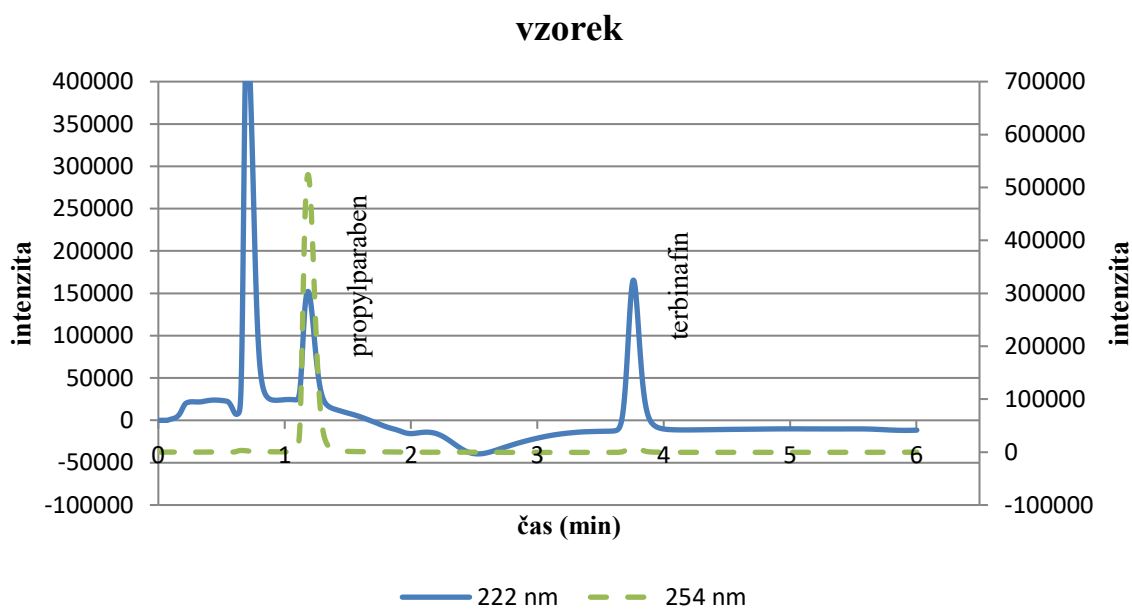


Obr. 20: Chromatogram placeba

standard



Obr. 21: Chromatogram roztoku standardu



Obr. 22: Chromatogram vzorku

6 Závěr

Pro stanovení terbinafinu a jeho tří rozkladných produktů, konkrétně β -terbinafinu, Z-terbinafinu a 4-methylterbinafinu, byla pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie vyvinuta metoda, která všechny čtyři strukturně podobné látky dokáže spolehlivě a bezpečně separovat. Její předností je především velmi zkrácená délka analýzy, která je do šesti minut. Optimální chromatografické podmínky jsou shrnuty v Tabulce 22.

U metody byl proveden test způsobilosti systému a následně i validace. Během validačního procesu byl hodnocen detekční a kvantifikační limit, dále pak linearita, správnost, přesnost, robustnost a selektivita. Požadovaným hodnotám vyhovovaly všechny naměřené výsledky.

Metoda byla použita pro stanovení množství terbinafinu, které se při disoluční zkoušce uvolnilo z tuhých disperzí. Tyto disperze kromě léčivé látky obsahovaly plastifikátor a nosič, jenž byl tvořen větveným polyesterem kyseliny mléčné a glykolové. Syntéza tohoto biodegradabilního nosiče byla provedena na Katedře farmaceutické technologie FaF UK.

Tabulka 22: Optimální chromatografické podmínky

Analytická kolona	Kinetex™ 1,7 µm – Bifenyl 100A (50 x 2,1 mm)	
Mobilní fáze	pufr:methanol (25:75)	
Složení roztoku pufru	citrátový (0,01 M):fosfátový (0,02 M) pufr (1:1)	
Průtoková rychlost (gradient)	Čas [min]	Průtoková rychlost [ml/min]
	0,00 – 1,39	0,2
	1,40 – 5,0	0,6
	5,1 – 6,0	0,2
pH	5	
Vlnová délka	222 nm a 254 nm	
Vnitřní standard	propylparaben	
Nastříkovaný objem	0,5 µl	
Retenční čas terbinafinu	4,2 min	
Tlak	55 MPa	
Teplota	25 °C	
Celková délka analýzy	do 6 min	

7 Literatura

- [1] ROZSYPAL H.. Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 1. 4. 2008, 40 – 44 s. [cit. 2017-10-20]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/01/09.pdf>
- [2] HERCOGOVÁ J.. Farmakoterapie onychomykóz. *Remedia* [online]. 5/2004, 415 – 418 s. [cit. 2017-10-20]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Mikrobiologie-a-infekcni-choroby/Farmakoterapie-onychomykoz/8-1c-cl.magarticle.aspx>
- [3] SKOŘEPOVÁ M.. Antimykotika z pohledu dermatologa. *Remedia* [online]. 1/2002, 51 – 54 s. [cit. 2017-10-20]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Antimykotika-z-pohledu-dermatologa/6-F-fg.magarticle.aspx>
- [4] DOHNAL V., JEŽKOVÁ A., SKLÁDANKA J.. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt* [online]. 2/2008, 449 – 454 s. [cit. 2017-10-20]. ISSN 1212-4117. Dostupné z: <http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/kontakt/administrace/clankyfile/20120504145335154666.pdf>
- [5] DOLEŽAL M., BUCHTA V.. Aktuální pohled na skupiny antimykotik. *Praktické lékárenství* [online]. 1/2006, 10 – 14 s. [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/01/02.pdf>
- [6] Terbinafine hydrochloride: SPC. *DAILYMED* [online]. 1. 7. 2017 [cit. 2017-10-25]. Dostupné z: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=c3832113-f517-4b4e-bf9c-31fce1a638e1#S12.4>
- [7] P450 Drug Interaction Table. *Indiana University – Department of Medicine* [online]. 2016 [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table>
- [8] Lamisil: SPC. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0001421>

- [9] Lamisil: SPC. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0218070>
- [10] Terbinafin Actavis: SPC. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0102518>
- [11] Terbistad 1% krém: SPC. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0101979>
- [12] Terbistad 1% krém: SPC. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0101978>
- [13] Terfimed 250: SPC. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0199685>
- [14] Terfimed 250: SPC. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0199684>
- [15] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. Český lékopis 2009. Praha: Grada, 2009 – doplněk 2013 (s. 122 – 127, 3773-3775, CD-ROM)
- [16] SKOŘEPOVÁ M.. Možnosti farmakoterapie kožních mykóz. *Remedia*. Praha: Panax, 3/2017, 226 – 230 s.
- [17] Obrázek ULIYANCHENKO E., VAN DER WAL S., SCHOENMAKERS P. J.. Challenges in polymer analysis by liquid chromatography. *Royal society of chemistry* [online]. 9. 7. 2012 [cit. 2017-12-03]. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/py/c2py20274c/unauth#!divAbstract>
- [18] Chromatografie/UHPLC. *Chromservis* [online]. [cit. 2017-12-03]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/g/uhplc?lang=CZ>
- [19] WALTER T. H., ANDREWS R. W.. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 10/2014, 14 – 20 s. [cit. 2017-12-03]. DOI 10.1016/j.trac.2014.07.016. ISSN 0165-9936. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993614001939>

- [20] Ultra High Performance Liquid Chromatography. *EAG Laboratories* [online]. 2017 [cit. 2017-12-03]. Dostupné z: <https://www.eag.com/ultra-high-performance-liquid-chromatography-uhplc/>
- [21] HPLC.cz [online]. 19. 6. 2016 [cit. 2017-12-06]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [22] Obrázek Core-Shell Technology. *phenomenex*[®] [online]. 2017 [cit. 2017-12-06]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>
- [23] What is the difference between UHPLC and UPLC? *Chromatography today* [online]. 4. 7. 2017 [cit. 2017-12-06]. Dostupné z: <https://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking-news/what-is-the-difference-between-uhplc-and-uplc/30754>
- [24] KOVAŘÍKOVÁ P., STARIAT J.. Rychlá chromatografie, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie. *MOODLE pro výuku 1, Univerzita Karlova* [online]. 2017 [cit. 2017-12-06]. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/466603/mod_resource/content/1/Lekce%205_UHPLC_uprava2017.pdf
- [25] Nexera Method Scouting System. *SHIMADZU – Excellence in Science* [online]. 2012 [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: https://www.shimadzu.com/an/hplc/method_scouting-1.html
- [26] Nexera UHPLC Method Scouting from Shimadzu. *labcompare* [online]. 2017 [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: <https://www.labcompare.com/59-High-Performance-Liquid-Chromatograph-HPLC-Instrument/4231629-Nexera-UHPLC-Method-Scouting/#companyinfo>
- [27] Nexera Method Scouting. *SHIMADZU – Excellence in Science* [online]. 2012 [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: https://www.shimadzu.eu/sites/default/files/Brochure_Nexera_Method_Scouting_C190E150A.pdf
- [28] MAGIERA S., HEJNIAK J., BARANOWSKI J.. Comparison of different sorbent materials for solid-phase extraction of selected drugs in human urine analyzed by UHPLC-UV. *Journal of chromatography B* [online]. 1. 5. 2014,

- 22 - 28 s. [cit. 2016-11-08]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.03.014.
ISSN 1579-0232. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023214001858>
- [29] CARDOSOAB S. G., SCHAPOVALB E. E. S.. High performance liquid chromatographic assai of terbinafine hydrochloride in tablets and creams. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 5/1999, 809 - 812 s. [cit. 2016-11-08]. DOI 10.1016/S0731-7085(98)00119-8. ISSN 0731-7085. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708598001198>
- [30] BARANOWSKA I., WILCZEK A., BARANOWSKI J.. Rapid UHPLC Method for Simultaneous Determination of Vancomycin, Terbinafine, Spironolactone, Furosemide and Their Metabolites: Application to Human Plasma and Urine. *J-STAGE – Analytical Sciences* [online]. 2010, 755 – 759 s. [cit. 2016-11-08]. DOI 10-2116/analsci.26.755. ISSN 0910-6340. Dostupné z:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/26/7/26_7_755/article
- [31] MATYSOVÁ L., SOLICH P., MAREK P., HAVLÍKOVÁ L., NOVÁKOVÁ L., ŠÍCHA J.. Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method. *Talanta* [online]. 15. 1. 2006, 713 -720 s. [cit. 2016-11-08]. DOI 10.1016/j.talanta.2005.05.013. ISSN 0039-9140. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914005003115>
- [32] McAULEY W. J., JONES S. A., TRAYNOR M. J., GUESNÉ S., MURDAN S., BROWN M. B.. An investigation of how fungal infection influences drug penetration through onychomycosis patient's nail plates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 5/2016, 178 – 184 s. [cit. 2017-12-21]. DOI 10.1016/j.ejpb.2016.03.008. ISSN 0939-6411. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641116300844>
- [33] KANAKAPURA B., PENMATSA V. K.. Analytical methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceuticals and biological materials. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 6/2016, 137 – 149 s.

[cit. 2017-12-28]. DOI 10.1016/j.jpha.2016.01.003. ISSN 2095-1779.

Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S209517791630003X>

- [34] Propylparaben. *Pubchem – Open chemistry database* [online]. [cit. 2016-11-08]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propyl_4-hydroxybenzoate#section=Top
- [35] Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *ICH – harmonisation for better health* [online]. 2018 [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
- [36] System suitability. *U. S. PHARMACOPEIA* [online]. 2018 [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c621s12.html
- [37] KOCOUREK V.. Kvalita v laboratorní a kontrolní praxi – Část: Validace analytických metod – vhodnost pro daný účel. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 2016 [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~kocourev/files/QA_validace-print.pdf
- [38] KLIMEŠ J. a kolektiv. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. 2. vydání. Hradec Králové: Jiří Klimeš, 2015. 251 – 254 s. ISBN 978-80-260-8175-3.