

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

BAKALAŘSKÁ PRÁCE

Stanovení obsahu terbinafinu a jeho rozkladných produktů pomocí
chromatografických metod (rešeršní práce)

ANETA VAŠKOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: doc. PhamDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové

2021

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného kvalifikačního titulu.“

Datum:

Podpis:

Tímto bych chtěla vyslovit velké poděkování doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, rady, připomínky, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi při tvorbě mé bakalářské práce věnovala.

Obsah

1. Cíl bakalářské práce	9
1.1. Cíl bakalářské práce	9
2. Terbinafin hydrochlorid	10
2.1. Obecné informace a vlastnosti	10
2.2. Farmakokinetické vlastnosti a biotransformace	11
2.3. Mechanismus účinku.....	11
2.4. Deriváty terbinafinu	14
2.5. Nečistoty terbinafinu.....	15
2.6. Toxicita.....	15
2.7. Stanovení terbinafinu	16
3. HPLC	17
3.1. Základní schéma HPLC	17
3.2. Instrumentace	18
3.2.1. Cesta mobilní fáze.....	18
3.2.2. Dávkování vzorku	18
3.2.3. Kolony	19
3.2.4. Stacionární fáze.....	19
3.2.4. Detekční systém	21
3.3. Typy elucí.....	22
3.4. Chromatografické systémy.....	23
3.4.1. NP-HPLC.....	23
3.4.2. RP-HPLC.....	23
3.4.3. UHPLC	24
3.4.4. RP-UHPLC	24
3.5. Vyhodnocování výsledků v HPLC	25
3.5.1. Kvalitativní hodnocení	25
3.5.2. Kvantitativní hodnocení	25
4. Validace v HPLC	27
4.1. Správnost metody (accuracy)	27
4.2. Přesnost metody (precision)	27
4.3. Linearita a rozsah metody.....	28
4.4. Mez detekce a mez stanovitelnosti	29

4.5.	Selektivita metody	29
4.6.	Robustnost metody	29
5.	Stanovení terbinafinu hydrochloridu	31
5.1.	Použité metody pro stanovení terbinafinu	31
5.2.	Použité metody pro stanovení rozkladných produktů	34
5.3.	Použité metody pro stanovení rozkladných produktů	36
5.4.	Stanovení terbinafinu a rozkladných produktů pomocí UHPLC	37
6.	Souhrn a Závěr	38
7.	Citovaná literatura	39
	Příloha č. 1. Znečišťující složky terbinafinu	I
	Terbinafine - API	I
	Terbinafine - Impurity A	I
	Terbinafine - Impurity A (Freebase)	I
	Terbinafine - Impurity B	II
	Terbinafine (Freebase)	II
	Terbinafine - Impurity C	II
	Terbinafine - Impurity D	III
	Terbinafine - Impurity E	III
	Terbinafine - Impurity F	III
	N-Demethylterbinafine Hydrochloride	IV
	Tegaserod Maleate	IV
	1-Chloro-6,6-dimethyl hept-2-ene-4-yne	V
	Terbinafine N-oxide	V
	N-Methyl-1-(naphthalen-2-yl)methanamine	V
	(E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-ynal	VI
	Carboxy Terbinafine-d7	VI
	N-Desmethylcarboxy Terbinafine-d7	VI
	N-Desmethylcarboxy Terbinafine-d7 Methyl Ester	VII
	N-Desmethyl Terbinafine-d7	VII
	N-[(2E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-yn-1-yl]-N-methyl-2-naphthalenemethanamine-d3 Hydrochloride	VII
	N-[(2E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-yn-1-yl]-N,4-dimethyl-1-naphthalenemethanamine-d3 Hydrochloride	VIII
	N-(E)-3-Tributyltinallyl-1-naphthalene-d7-methylamine	VIII

6,6-Dimethylhept-4-ynal.....	VIII
6,6-Dimethylhept-2-en-4-yn-1-ol	VIII
1-(Chloromethyl)-4-methylnaphthalene.....	IX
Methyl(4-methylnaphthalen-1-ylmethyl)amine	IX
Terbinafine - Impurity E (Freebase)	IX
Terbinafine - Impurity F (Freebase)	X
N-Methyl-N-(1-naphthalenylmethyl)-1-naphthalenemethanamine	X
di-tert-Butyl (E)-pent-2-enedioate	XI
4,4-Dimethyl-2-pentynal.....	XI
di-tert-Butyl (2E,4E)-4-(4,4-dimethylpent-2-yn-1-ylidene)pent-2-enedioate ...	XI
(2E,4E)-4-(4,4-Dimethyl-2-pentyn-1-ylidene)-2-pentenedioic Acid 1,5-Dimethyl Ester	XII
(2E,4E)-4-(4,4-Dimethyl-2-pentyn-1-ylidene)-2-pentene-1,5-diol.....	XII
(2E,4E)-1-Chloro-4-(chloromethyl)-8,8-dimethylnona-2,4-dien-6-yne	XIII
Terbinafine-d3 HCl (N-methyl-d3).....	XIII
1-(tert-Butyl) 5-isopropyl (E)-pent-2-enedioate	XIV

Seznam zkratk

HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CYP1A2	Cytochrom P450 čeleď 1, podčeleď A, člen 2
CYP2C19	Cytochrom P450 čeleď 2, podčeleď C, člen 19
CYP2C8	Cytochrom P450 čeleď 2, podčeleď C, člen 8
CYP2C9	Cytochrom P450 čeleď 2, podčeleď C, člen 9
CYP2D6	Cytochrom P450 čeleď 2, podčeleď D, člen 6
CYP3A4	Cytochrom P450 čeleď 3, podčeleď A, člen 4
EDQM	Evropské ředitelství pro kvalitu léčivých přípravků
EMA	Evropská léková agentura
ERG1	Skvalen epoxidáza
ERG10	Acetoacetyl-CoA thiolasa
ERG11	CYP450 lanosterol 14a-demetylaza
ERG12	Mevalonát kináza
ERG13	HMG-CoA syntáza
ERG19	Difosfomevalonát kináza
ERG2	C-8 sterol isomeráza
ERG20	Polyprenyl syntetáza
ERG24	Sterol C-14 reduktáza
ERG25	C-4 metyl sterol oxidáza
ERG26	Sterol C-4 dekarboxyláza
ERG27	3-keto-steroid reduktáza
ERG3	C-5 sterol desaturáza
ERG4	C24 (28) sterol reduktáza
ERG5	C-22 stero desaturáza
ERG6	C-24 sterol metyltransferáza
ERG7	Lanosterol cykláza/syntéza
ERG8	Fosfomevalonát kináza
ERG9	Skvalen syntetáza
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HMG1	HMG-CoA reduktáza
HMG2	HMG-CoA reduktáza

HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-CoA
IDII	Isopentenyl difosfát isomeráza
ICH	Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčivých přípravků
IP-RP-UHPLC	Iontověpárová ultra-vysoko účinná chromatografie s reverzní fází
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LLOQ	Spodní hranice kvantifikace
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Spektroskopie nukleární magnetické rezonance
NP-HPLC	Normální fáze
PDA, DAD	Detektory s diodovým polem
RP-HPLC	Vysokoučinná chromatografie s reverzními fázemi
RP-UHPLC	Ultra-vysokoučinná chromatografie s reverzními fázemi
UHPLC	Ultra-vysokoučinná chromatografie
ULOQ	Horní mez kvantifikace
UV	Ultrafialové záření

1. Cíl bakalářské práce

1.1. Cíl bakalářské práce

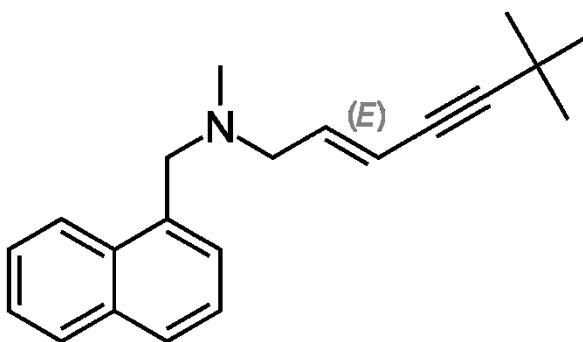
Cílem mé bakalářské práce je vytvořit přehled použitých metod pro stanovení terbinafinu hydrochloridu a jeho rozkladných produktů, dále také vybrané metody a jejich postupy porovnat. Stanovení samostatného terbinafinu má delší historii než stanovení jeho degradačních produktů. Při stanovení terbinafinu a jeho degradačních produktů jsem se opírala jen o několik nalezených článků popisující postupy, jak stanovit terbinafin i s vybranými degradačními produkty. Je mnoho nečistot, které vznikají při syntéze terbinafinu a nebyly ještě stanoveny žádným způsobem, ani za pomoci systému HPLC. Tyto nečistoty a rozkladné produkty mají mnoho podobných vlastností, a proto je obtížné dosáhnout jejich dobré a účinné separace.

Dále jsem porovnála některá vybraná validační data, která slouží ke zjištění statistické spolehlivosti a přesnosti analytické metody. Jedná se o proces, který je důležitý pro výběr vhodného analytického systému a také zaručuje vhodnost metody pro dané použití.

2. Terbinafin hydrochlorid

2.1. Obecné informace a vlastnosti

Léčivá látka terbinafin hydrochlorid je syntetický krystalický prášek bílé až šedobílé barvy, který vzniká derivatizací alylamínu. Sumární název sloučeniny je (2E)-N,6,6-Trimetyl-N-(naftalen-1-yl metyl) hept-2-en-4-yn-1-aminhydrochlorid. Molekulová hmotnost je 326,9299 g/mol. Z chemických a fyzikálních vlastností terbinafinu hydrochloridu můžeme zmínit například teplotu tání, která se pohybuje v rozmezí 204 °C až 208 °C a rozpustnost v metanolu, dichlormetanu a bezvodném etanolu, dále pak částečnou rozpustnost ve vodě a acetonu [1].



Obrázek č. 1. Vzorec terbinafinu [2].

Ve farmacii se terbinafin používá jako hlavní aktivní složka antimykotických léčiv. Je možné jej podávat ve formě tablet, polotuhých mastí, gelů nebo roztoků. Léčivé přípravky s obsahem terbinafinu, které najdeme na českém trhu, se mohou lišit od přípravků, které najdeme na celosvětovém trhu.

Níže jsou uvedeny preparáty s obsahem terbinafinu, které najdeme v českých lékárnách [3].

- Topická aplikace (masti, gely)
 - Lamisil 250 mg
 - Terbistad 1 % krém
- Systémová aplikace (pevné tablety)
 - Lamisil 250 mg
 - Terfimed 250 mg
 - Terbinafin Actavis 250 mg

Hlavní účinek terbinafinu je inhibice biosyntézy ergosterolu, který se nachází v buněčné membráně houbových organismů. Lékové formy tedy mají široké spektrum účinku proti povrchovým kožním infekcím. Především se jedná o mykózy (plísňové onemocnění) a onychomykózy (plísňové onemocnění nehtů). Fungicidní účinek vykazuje především proti *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea pedis*, *Tinea capitis* [4, 5, 6, 7].

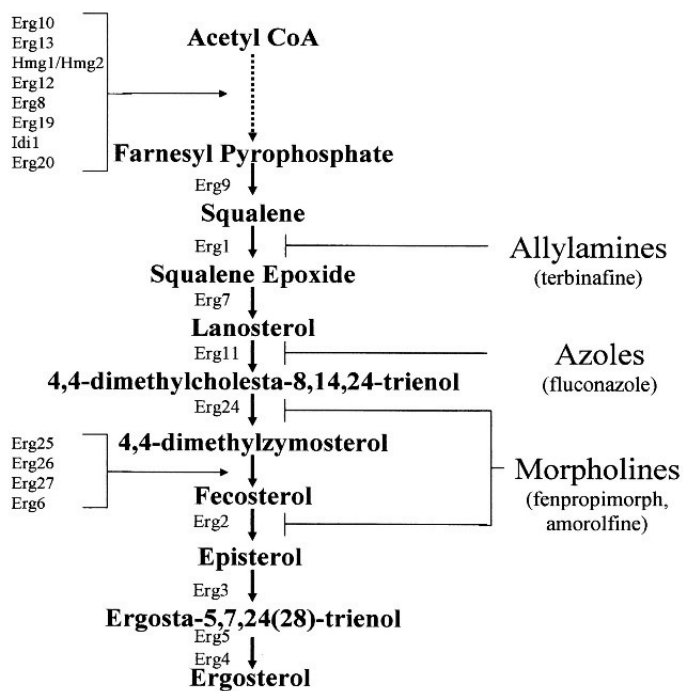
2.2. Farmakokinetické vlastnosti a biotransformace

Po topickém i perorálním podání se aktivní látka distribuuje v kůži, v lipofilní vrstvě *stratum corneum*. Díky vazbě na plazmatické bílkoviny (v 99 %) dosáhneme nejvyšší plazmatické koncentrace 0,97 µg/ml po dvou hodinách od podání tablety, s obsahem 250 mg terbinafinu. Odstraňování terbinafinu z těla probíhá za pomoci mazu tvořeného v mazových žlázách. Vysoké koncentrace terbinafinu naměříme na části těla, kde se vyskytují tyto žlázy ve velkém počtu (vlasové folikuly) [1].

Terbinafin se metabolizuje uvnitř buňky, v mikrozomech, které vznikají při degradaci endoplazmatického retikula. Jedná se o malé váčky, které jsou postupně uvolňovány do cytoplazmy. Váčky obsahují lytické enzymy, meziprodukty a produkty metabolismu buněk. Mikrozomy obsahují i izoenzymy systému cytochromu P450, který se podílí na odbourávání terbinafinu. Přesně se jedná o enzymy CYP2C9, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C8, CYP2C19 [4, 8, 7].

2.3. Mechanismus účinku

Hlavní steroidní složkou buněčné membrány nižších eukaryot, zejména hub a kvasinek je ergosterol. Jeho funkce v buněčné membráně se stahuje na permeabilitu (propustnost) membrány a aktivitu membránových enzymů. Svou strukturou je z velké části podobný cholesterolu, který se vyskytuje v buněčné membráně savců a podílí se také na permeabilitě membrány a zajišťuje správnou funkci membránových enzymů. Ergosterol a cholesterol se liší pouze v přítomnosti methylové skupiny vázané na uhlíku C24 a dvou dvojných vazeb mezi uhlíky 7, 8 a 22, 23. Hydrolýzou cholesterolu v alkalickém prostředí však nevzniká ve vodě rozpustná látka [9].



Obrázek č. 2. Účinek terbinafinu [10].

Tabulka č. 1. Seznam enzymů potřebných k vzniku ergosterolu [11].

Zkratka	Třída EC	Funkce
Biosyntéza mevalonátu		
ERG10	EC: 2.3.1.9	Acetoacetyl-CoA thiolasa
ERG13	EC: 2.3.3.10	HMG-CoA syntáza
HMG1	EC: 1.1.1.34	HMG-CoA reduktáza
HMG2	EC: 1.1.1.34	HMG-CoA reduktáza
Biosyntéza farnesyl-PP		
ERG12	EC: 2.7.1.36	Mevalonát kináza
ERG8	EC: 2.7.4.2	Fosfomevalonát kináza
ERG19	EC: 4.1.1.33	Difosfomevalonát kináza
IDII	EC: 5.3.3.2	Isopentenyl difosfát isomeráza
ERG20	EC: 2.5.1.10	Polyprenyl syntetáza
Biosyntéza ergosterolu		

ERG9	EC: 2.5.1.21	Skvalen syntetáza
ERG1	EC: 1.14.13.132	Skvalen epoxidáza
ERG7	EC: 5.4.99.7	Lanosterol cykláza/syntéza
ERG11	EC: 1.14.13.70	CYP450 lanosterol 14a- demetylaza
ERG24	EC: 1.3.1.70	Sterol C-14 reduktáza
ERG25	EC: 1.14.13.72	C-4 metyl sterol oxidáza
ERG26	EC: 1.1.1.170	Sterol C-4 dekarboxyláza
ERG27	EC: 1.1.1.270	3-keto-steroid reduktáza
ERG6	EC: 2.1.1.41	C-24 sterol metyltransferáza
ERG2	EC: 5.3.3.5	C-8 sterol isomeráza
ERG3	EC: 1.3.3.-	C-5 sterol desaturáza
ERG5	EC: 1.14.-.-	C-22 stero desaturáza
ERG4	EC: 1.2.1.71	C24 (28) sterol reduktáza

Biosyntéza ergosterolu je komplexní proces, do kterého se začleňuje mnoho enzymů. Proces vzniku ergosterolu můžeme rozdělit na tři části. Syntéza mevalonátu, farnesyly pyrofosfátu a biosyntézu ergosterolu.

Prvním krokem syntézy je kondenzace dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Tento krok je katalyzován enzymem acetoacetyl-CoA thiolázou. Kondenzací třetího acetyl-CoA s acetoacylem-CoA vzniká hydroxymethylglutaryl-CoA (dále HMG-CoA) za pomoci enzymu hydroxymethylglutaryl – CoA syntetázy. Enzymem HMG-CoA reduktázy (HMG1 a HMG2) je HMG-CoA redukováno na mevalonát [11].

Druhý krok vede k syntéze farnesyly pyrofosfátu z mevalonátu. Vznik mevalonátu zahrnuje celkem šest postupných reakcí, které jsou katalyzovány enzymy ERG12, ERG8, ERG19, ERG20. Farnesyl pyrofosfát vzniká z mevalonátu přes meziprodukty mevalonát-5-fosfát, mevalonát-5-pyrofosfát, isopentenyl pyrofosfát, dimethylalyl pyrofosfát a geranyl pyrofosfát [11].

Poslední část syntézy zahrnuje patnáct mezikroků od farnesyly pyrofosfátu k ergosterolu. První kroky vedou k syntéze skvalenu, kdy ze dvou molekul farnesyly pyrofosfátu vzniká jedna molekula skvalenu za pomoci enzymu ERG9. V biosyntéze ergosterolu se poprvé setkáváme se sterolovou strukturou u skvalenu. Poté následuje syntéza lanosterolu přes epoxid skvalenu přes enzymy ERG1 a ERG7. Dále jsou využity enzymy ERG 11, ERG24, ERG 25-27, ERG6, ERG2 a ERG 3-5 [11, 12].

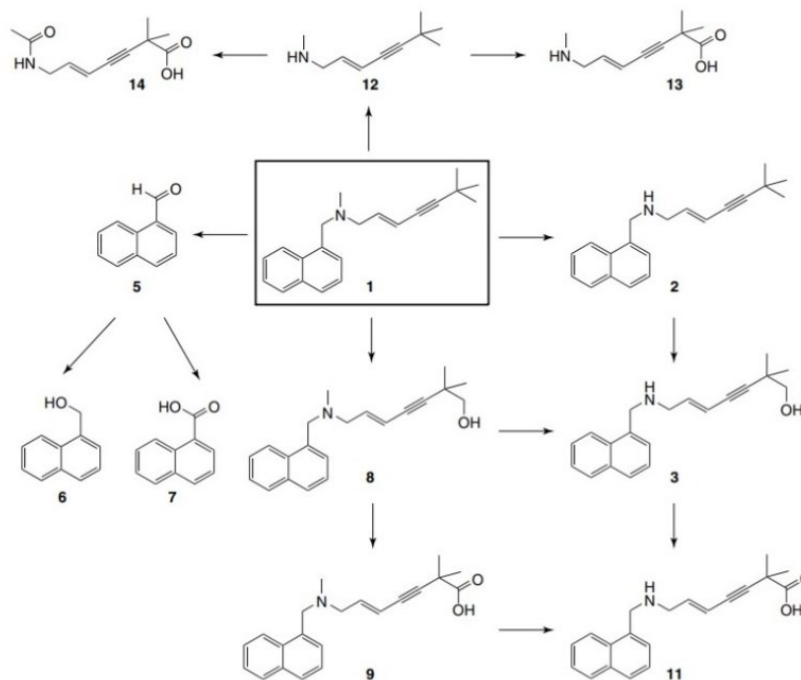
Biosyntézu ergosterolu potlačuje terbinafin inhibicí houbového enzymu skvalen epoxidázy (ERG1). Díky tomuto kroku se akumuluje skvalen v buněčné membráně, nedochází k syntéze ergosterolu, není zajištěna úplná funkčnost membrány, a to způsobuje smrt buňky. Terbinafin hydrochlorid působí pouze na skvalen epoxidázu. Na jiné enzymy ergosterolové biosyntetické dráhy nepůsobí [1, 11, 12].

2.4. Deriváty terbinafinu

Biotransformací terbinafinu vzniká asi patnáct různých metabolitů a je obecně způsobena změnou následujících pozic:

- a. N-demetylace centrálního atomu dusíku
- b. Oxidace postranního řetězce alkylu, například oxidace jedné ze tří metylových skupin.
- c. Hydrolýza epoxid vedoucí k odpovídajícímu dihydrodiolu

Současné stanovení terbinafinu a jeho metabolitů překáží velký rozdíl v hydrofobních vlastnostech mezi sloučeninami [13, 14].



Obrázek č. 3. Deriváty terbinafinu [13].

Produkty biotransformace jsou dále oxidovány na karboxylové kyseliny, nebo jsou konjugovány a extrahovány močí [13, 14].

2.5. Nečistoty terbinafinu

Podle způsobu syntézy terbinafinu hydrochloridu může vznikat mnoho nečistot. U některých vzniklých nečistot dochází k podezření na mutagenезi (proces, při kterém dochází k poškození DNA), proto se vyžaduje kontrola procesu výroby léčiva, aby bylo jisté, že je přítomna nečistota v nejnižší možné míře. Pokud při syntéze vystavíme terbinafin vysokým teplotám, vzniká produkt s vysokým obsahem nečistot. Při využití vakuové destilace dochází k přečištění všech kapalinových meziproductů, pomocí které lze předejít znečištění koncového derivátu. Seznam nečistot, které mohou vznikat při syntéze terbinafinu, je uveden v příloze číslo 1. [15, 16].

2.6. Toxicita

Nežádoucí účinky léku se projevují především u pacientů s chronickým nebo akutním poškozením jater. Tyto účinky mohou vést až k selhání orgánu a jeho pozdější transplantaci. U lidí s poškozenou funkcí jater nedochází k odbourávání terbinafinu v dostatečné míře a dochází tak ke kumulaci látky v plazmě.

Terbinafin je silný inhibitor izoenzymu CYP2D6, který inhibuje zhruba čtvrtinu používaných léků. Je tedy důležité vzít v úvahu tuto informaci, kdy kombinujeme terbinafin s jinými léky, které jsou metabolizovány tímto izoenzymem, a mohlo by docházet také k jejich kumulaci [4].

Nepříznivé dopady účinku terbinafinu můžeme zmírnit díky preventivním jaterním testům, které se dělají po měsíci léčby. Pokud je zaznamenaná snížená funkce jater, léčba je pozastavena. Funkce jater se obnovuje po 2 měsících až 1 roce po vysazení léků.

Doposud neexistují prediktivní přístupy pro identifikaci rizikových pacientů kvůli nedostatečné znalosti základního mechanismu a faktorů ovlivňujících toxicitu terbinafinu [4, 8].

2.7. Stanovení terbinafinu

Terbinafin hydrochlorid je oficiálně registrován v zemích Evropy a Spojených státech amerických. V Evropském lékopise (European Pharmacopoeia, EDQM, 2011) je stanovení terbinafinu hydrochloridu popsáno za pomoci titrační metody. Terbinafin (250 mg) je rozpuštěn v 96 % etanolu (50 ml). Do směsi se přidá kyselina chlorovodíková (5 ml o molární koncentraci 0,01 mol/l) a nezreagovaná kyselina chlorovodíková se titruje hydroxidem sodným (o koncentraci 0,1 mol/l). Bod ekvivalence je stanoven potenciometricky. Objem přidaného hydroxidu sodného mezi dvěma inflexními body odpovídá množství terbinafinu hydrochloridu [17].

Lékopis Spojených států amerických (United States Pharmacopoeia, 2012) popisuje stanovení terbinafinu hydrochloridu metodou HPLC. Pro detekci odezvy signálu je používán detektor spektrofotometrický v oblasti ultrafialového záření. Jiné metody pro detekci množství terbinafinu a jeho degradačních produktů mohou být spektrofotometrické, elektrochemické, elektroforetické [17].

Pro spektrofotometrickou detekci se vzorek rozpouští v metanolu, 0,1 molární kyselině chlorovodíkové nebo vodě. Detekuje se v oblasti ultrafialového nebo viditelného záření. Při ultrafialovém záření se využívá hodnota vlnové délky 222 nm, 223 nm, 282 nm, 297 nm nebo 298 nm. Při použití spektrofotometrie ve viditelné oblasti se využívá vlnové délky 422 nm, 425 nm, 500 nm, 512 nm, 540 nm nebo 620 nm [17, 18].

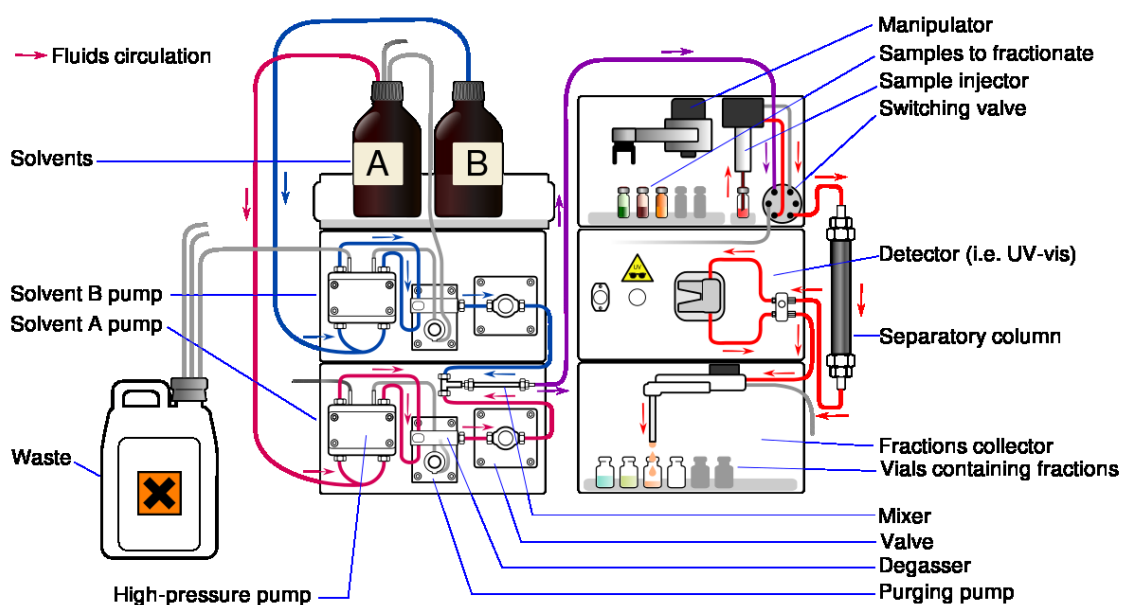
3. HPLC

3.1. Základní schéma HPLC

HPLC je analytická metoda, která se řadí mezi separační chemické metody využívající rozdílnou distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různá nemísitelná prostředí neboli mezi dvě fáze. Rozlišujeme fázi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou), kdy mobilní fázi zastupuje většinou nějaká kapalina a stacionární fázi zastupuje tuhá látka, nebo kapalina upevněná na pevném nosiči.

Hlavní úkolem vysokoúčinné kapalinové chromatografie je separace jednotlivých látek v přijatelném čase. Výběr chromatografické metody je ovlivňován řadou různých faktorů (teplota, pH, úprava vzorku, výběr mobilní fáze, výběr kolony atd.).

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto hlavních částí: zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, autosampler, chromatografická kolona, detektor, počítač a software. K tomuto základu lze některé komponenty přidat nebo naopak některé lze vyřadit [19].



Obrázek č. 4. Schéma HPLC systému [20].

3.2. Instrumentace

3.2.1. Cesta mobilní fáze

Mobilní fáze je umístěna v zásobníku, který obsahuje speciální filtr pro zachycení pevných částic před vstupem do kolony. Tento filtr zvyšuje životnost kolony a odstraňuje látky, které mohou negativně ovlivnit pozdější detekci.

Ze zásobníků mobilní fáze nesmí unikat výpary do okolního prostředí a zároveň mobilní fáze nesmí být kontaminována okolním prostředím [19].

Před vstupem do kolony musí být mobilní fáze odplyněna, aby nedocházelo ke vzniku bublinek v koloně, které mohou ovlivnit průběh separace. V současné době se pro odplynění používá principu probublávání heliem nebo vakuový degaser. Mobilní fáze po odplynění může přecházet přes tlumič tlakových pulzů [19].

Pomocí vysokotlakého čerpadla je mobilní fáze čerpána do dalších částí chromatografu. Čerpadla zajišťují stabilní průtok mobilní fáze systémem. Čerpadla můžou být rozdělena do dvou skupin, a to podle toho, zda pracují za konstantního tlaku, nebo objemového průtoku. Podle potřeby můžeme vybírat z těchto typů vysokotlakých čerpadel: pneumatické čerpadlo, čerpadlo injekčního typu, pístové čerpadlo, membránové čerpadlo, dvou-pístové čerpadlo zapojené do série [19].

3.2.2. Dávkování vzorku

Vzorek (analyt) je dávkován především pomocí injekční stříkačky automatického dávkovače, tzv. autosampleru, nebo nyní méně používaného vysokotlakého dávkovacího ventilu. Tyto dávkovače jsou spojeny se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny malé nádobky (vialky). Nejčastěji o objemu 2 mililitry. Při omezeném množství vzorku můžeme do vialky vložit tzv. inserty, které mají ještě menší objem a zmenšují nám potřebný objem analytu pro vstřík do systému HPLC [19].

Propojení mezi stříkačkou dávkovače a vzorku může být několika způsoby:

- Injekční stříkačka dávkovače je fixní a pohybuje se zásobník se vzorky
- Zásobník vzorků je fixní, a naopak se pohybuje injekční stříkačka
- Zásobník i injekční stříkačka jsou fixní, vialka je roboticky dopravena k jehle stříkačky

3.2.3. Kolony

Chromatografickou kolonu si můžeme představit jako trubku nebo kapiláru rovnoměrně vyplněnou stacionární fází. Na výrobu pláště kolony je především využívána nerezová ocel, plast nebo sklo. Materiál, z kterého je kolona vyrobena, závisí na vlastnostech používané mobilní fáze. Nesmí docházet k reakci mezi mobilní fází a materiálem stěny kolony. Dále musí kolona odolávat vysokým tlakům a vnitřní povrch by měl být dokonale hladký [19].

Samotná kolona se skládá ze dvou částí, a to z těla kolony a koncovek kolony, které musí zajistit velmi dobré těsnění, aby nedocházelo k podtékání kolony. Pro nynější analytické metody se běžně používají kolony a průměru 2,1 až 5 mm, délce 10 až 300 mm a plnění částicemi o velikosti 1 až 10 μm .

Veličina, která charakterizuje dobu, po kterou zůstává vzorek v koloně, se nazývá retenční čas. Veličina, která charakterizuje množství mobilní fáze, jež proteče za retenční čas kolonou, se nazývá retenční objem. Kvalitativní charakteristiku látky představuje retenční čas a kvantitativní charakteristika je pak plocha pod píkem nebo výška píku [19].

4.2.4 Stacionární fáze

Obsah kolony vyplňuje nepohyblivá složka chromatografického systému tzv. stacionární fáze, kterou může tvořit pevná látka nebo kapalina uchycená na pevné matrici (nosiči). Nejstarší členění stacionárních fází, které se dnes již nepoužívá, je podle skupenství, tedy na kapalné a tuhé stacionární fáze. Následujícím dělením můžeme stacionární fáze rozdělit podle typu vazby, a to na polární, nepolární a amfoterní. Tohle rozdělení stacionárních fází se také nepoužívá, protože nejsou některé fáze zařazeny.

Nejčastěji se používá dělení dle chemického složení na:

- Anorganické oxidy (silikagel, oxid zirkoničitý, hlinitý, titaničitý)
- Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu
- Polymerní
- Hybridní
- Fáze na založené na grafitovém uhlíku

Na každou stacionární fázi jsou kladeny obecné požadavky, jako například chemická a teplotní stabilita, stálost při styku s mobilní fází. Nesmí docházet k reakci, ani k rozpuštění stacionární fáze v mobilní. Nesmí docházet k vymývání stacionární fáze.

Základním polárním anorganickým sorbentem se složením $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ je silikagel, který má mnoho výhodných vlastností. Je ideálním chemickým nosičem a po navázání ligandů je vhodný pro separace na reverzních fázích. Má vysokou mechanickou odolnost. Při použití organických rozpouštědel se nesráží, ani nebobtná. Aktivní centra silikagelu jsou silanové skupiny. Tyto skupiny mají několik typů, které jsou různě rozmístěny na povrchu silikagelu a vykazují rozdílnou kyselost. Díky silanovým skupinám má povrch polární charakter. Různou modifikací silikagelu, můžeme upravovat vlastností stacionární fáze.

Pro zlepšení kvality separace, dochází k neustálému vývoji. Omezená stabilita v bazickém a silně kyselém prostředí posouvá vývoj silikagelu, a dochází tedy k modifikaci. Zlepšení stability silikagelu v kyselém prostředí vede k použití tzv. stericky chráněných silanů. Tyto silany jsou tvořeny alkylem nebo fenylem, dvěma isopropyllovými nebo isobutyllovými skupinami a reaktivní funkční skupinou (např. Cl). Tyto jednotky jsou vázány na křemíkový atom. Metodou endkappingu („endcapping“) může být dosaženo lepších vlastností silikagelu v alkalickém prostředí. Metoda endkappingu redukuje počet volných silanových skupin na nepolární fázi pomocí reakce s trialkylchlorsilanem, trimethylchlorsilanem nebo hexamethyldisilazanem. Menší rozměry reagujících činidel lépe proniknou k povrchu silikagelu a dochází ke zreagování stericky bráněných volných silanových skupin.

Monolitické stacionární fáze, na rozdíl od silikagelu, nemají interpartikulární prostory. Tyto fáze tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela vyplňuje vnitřní část kolony. Monolitické kolony obsahují dva druhy pórů (makropóry a mesopóry). Makropóry zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází a mesopóry poskytují dostatečně velký povrch monolitu a tím i vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje separaci při vyšších rychlostech mobilní fáze bez zvýšení tlaku a neztrácí separační účinnost.

Stacionární fáze na bázi kovových oxidů se řadí mezi polární anorganické sorbenty. Pro lepší chemickou stabilitu se začaly používat kovové oxidy. V HPLC především najdeme uplatnění pro tyto tři oxidy: oxid zirkoničitý, hlinitý a titaničitý. Srovnání jednotlivých oxidů ukázalo, že oxid zirkoničitý a titaničitý jsou stabilnější než oxid hlinitý. Díky vysoké stabilitě oxidů se můžou tyto stacionární fáze používat v celém rozsahu pH i při vysokých teplotách (do 200 °C). Chemický povrch stacionární fáze tvořený na bázi kovových oxidů je mnohem složitější než povrch silikagelu. Tato vlastnost nám umožňuje získat odlišnou selektivitu a možnost modifikací separačních podmínek [19, 21].

3.2.4. Detekční systém

Po chromatografické koloně následují detektory, které zaznamenávají rozdílné signály mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující vzorek. Využití jednotlivých detektorů v systému HPLC se odvíjí od principu daného detektoru a citlivosti. Nejčastější detekční techniky používané v chromatografických metodách jsou například spektrofotometrický detektor, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor, vodivostní detektor, refraktometrický detektor, hmotnostní detektor, aerosolové detektory.

Spektrofotometrické měření je založeno na absorpci záření v oblasti vlnových délek od 190 nm do 800 nm. Hodnocení podléhá Lambert-Beerovu zákonu, vyjadřující vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací složky (c), absorpční (A) a absorpční konstantou (ϵ). Paprsek světelného zdroje prochází detekční celou a intenzita prošlého paprsku je měřena fotonásobičem [18,20].

Detektor podobný spektrofotometrickému je detektor s diodovým polem. Tento detektor je založen na záření, které prochází štěrbinou, čočkou, clonou a měrnou celou detektoru. Paprsek záření, které projde tímto systémem, se rozkládá na holografické mřížce. Rozložené světlo dopadá na každou fotodiodu o určité vlnové délce, absorpcí zeslabenou v celé detektoru. Fotodiody jsou napojeny na kondenzátory, které jsou nabitě na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu, vybíjí kondenzátor. Následně měříme proud, který je potřebný k dobití kondenzátoru. Vybití kondenzátoru je přímo úměrné k intenzitě dopadajícímu záření [19, 21].

Při použití fluorescenčního detektoru měříme sekundární (emisní) záření. Molekuly po absorbování elektromagnetického záření přechází do různých hladin

excitovaného stavu. Po navrácení z excitovaného stavu do základního dochází k vyzaření fluorescenčního záření. Jednoduché fluorescenční detektory využívají jako zdroj excitačního záření rtuťovou výbojku [19, 21].

Elektrochemický detektor měří elektrickou veličinu (elektrodotový potenciál, proud, kapacita), která vzniká při průchodu oxidované nebo redukované látky měřící celou. Měření elektrický signál, měříme pomocí dvouelektrodotového nebo tříelektrodotového systému. U elektrochemických detektorů se sleduje závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované složky. Podle podmínek měření se metody rozdělují na potenciometrické, kdy měření probíhá při konstantním potenciálu elektrodoty a amperostatické, kdy je měření provedeno při konstantním proudu. Elektrochemické detektory dosahují především vysoké citlivosti [19, 21].

Refraktometrický detektor je založen na změně indexu lomu světla, které prochází přes měřící celou. Citlivost je přímo úměrná rozdílu indexu lomu vzorku a mobilní fáze. Refraktometrické měření je závislé na teplotě, proto je nutné detekční celou temperovat. Refraktometrické metody jsou jedny z nejdéle používaných detekcí s řadou nevýhod [19, 21].

Hmotnostně spektrometrický (MS) detektor detekuje ionty, které vznikají při ionizaci analytu. Následně dochází k rozdělení iontů podle hmotnosti a náboje. Na konci detekce iontů dochází k zesílení signálu. Signály detektoru jsou porovnávány s knihovnou spekter [19, 21].

3.3. Typy elucí

V analytické chemii je eluce proces extrakce, při které dochází k vymývání látek například ze sorbentu kolony. Eluce je proces odstraňování analytu ze sorbentu vhodným rozpouštědlem (eluentem) [19, 21].

V HPLC detekci rozlišujeme dva typy elucí - izokratickou a gradientovou. Jestliže zůstává během celé separace mobilní fáze konstantní, jedná se o separaci izokratickou. Izokratická metoda nese několik výhod. Některé z těchto výhod jsou: možnost míchání mobilní fáze před analýzou a nižší náročnost na instrumentaci. Touto metodou separujeme především látky s podobnými vlastnostmi. V analytické chemii je třeba separovat, mnohem složitější látky s různými chemickými vlastnostmi, například mléko, krev, moč a různé rostlinné extrakty. Pro složitější látky se používá gradientová eluce. V průběhu analýzy se

mění poměr složek v mobilní fázi. Měnit poměry mobilní fáze lze skokově nebo postupně [19, 21].

Na rozdíl od izokratické eluce, gradientová eluce vyžaduje směšovač mobilní fáze (nízkotlaký nebo vysokotlaký). Vysokotlaký směšovač se skládá ze dvou pump, typ gradientu nastavujeme poměrem průtoků. U směšování nízkotlakého se používá pouze jedna pumpa, která střídavě nasává ze zásobníku podle nastavení poměrů [19, 21, 22].

3.4. Chromatografické systémy

3.4.1. NP-HPLC

Pro separaci s normálními fázemi (NP) se používá polární stacionární fáze a mobilní fáze s nižší polaritou, než má stacionární fáze. Zadržovací mechanismus je založen na konkurenci mezi analytem a mobilní fází o adsorpční místa stacionární fáze (např. volné hydroxylové skupiny silikagelu) [19, 21].

Zadržování látek na koloně roste s rostoucí polaritou analytu a klesá s rostoucí koncentrací polárního rozpouštědla. Podle polarity funkčních skupin lze seřadit organické látky s jednou funkční skupinou podle rostoucí retence: alifatické uhlovodíky, aromatické uhlovodíky, halogensloučeniny, ethery, terciální aminy, nitrily, nitrosoučeniny, estery karboxylových kyselin, ketony, aldehydy, primární aminy, amidy, alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, sulfokyseliny [19, 21].

3.4.2. RP-HPLC

V systémech s reverzními fázemi je mobilní fáze polární a stacionární fáze má nepolární charakter. Mobilní fáze obvykle tvoří směs vody nebo vodné roztoky kyselin a bází s polárním organickým rozpouštědlem, které je mísitelné s vodou. Stacionární fáze je tvořena dlouhými uhlíkatými řetězci navázané na silikagel nebo jiný sorbet. Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou rozpouštědla [19, 21].

Reverzní stacionární fáze nemají aktivní adsorpční centra schopná interakcí. Stacionární fáze je schopná interagovat pouze slabými disperzními silami (nespecifickými mezimolekulovými interakcemi) [19, 21].

Separace pomocí reverzních fází je velmi univerzální, proto patří mezi nejpoužívanější metodu za posledních 48 let. Lze ji využít jak pro analýzu jednoduchých směsí, tak pro velmi komplikované směsi [19, 21].

3.4.3. UHPLC

Ultra-účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) využívá kolony s částicemi menšími než 2 mikrometry. Tyto kolony jsou navíc odolné vůči vysokému tlaku. Kombinace těchto dvou vlastností umožňuje extrémně rychlou separaci, citlivost a vysokou účinnost.

Účinnost separace roste s klesající velikostí částic, ale tím roste tlak na koloně. U kolon, které by byly stejně dlouhé jako u HPLC, by byl tlak na koloně extrémní, proto je nutné délku kolony zkrátit. [19, 21].

Instrumentace pro UHPLC je v principu stejná jako u klasické HPLC, i když vyšší pracovní tlak vyžaduje větší mechanickou odolnost komponent (např. čerpadla, dávkovače, ventily).

3.4.4. RP-UHPLC

Ultra-účinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích je modifikace UHPLC, která využívá separaci molekul na základě hydrofobních vlastností molekul za vysokého tlaku.

Kromě změny fází dochází k změně velikosti kolony. Kolona je kratší a obsahuje menší částice, do velikosti 2 mikrometrů [23, 24].

3.4.5. IP-RP-UHPLC

IP-RP-UHPLC je další používaná analýza pro separaci různých sloučenin. Mezi HPLC a IP-RP-UHPLC jsou malé rozdíly. Mechanismus HPLC závisí především na hydrofobních vlastnostech. IP-RP-HPLC dosáhneme přidáním iontových párů do chromatografického systému s reverzní fází. Účelem přidání fáze je ovlivnění retenčního času a selektivity sloučenin [23].

Tato separace je určena pro separaci látek nesoucí kladný nebo záporný náboj. Stacionární fázi tvoří tzv. ionexy, které se dělí na katexy a anexy. Katexy mají záporný náboj a vážou kationty. Anexy mají kladný náboj a vážou anionty [25].

3.5. Vyhodnocování výsledků v HPLC

3.5.1. Kvalitativní hodnocení

V kvalitativním hodnocení využíváme retenčního času nebo retenčního objemu. Tyto veličiny získáme integrací pomocí chromatografických vyhodnocovacích softwarů [19, 21, 26].

Kromě vyhodnocení za pomoci speciálních softwarů můžeme využít některé novější detektory například NMR, MS a PDA. Při použití specifických detektorů, můžeme dostat informace například o struktuře molekuly, molekulové hmotnosti, izotopické zastoupení.

V dalších případech můžeme dostat informace při porovnávání spekter, která dostaneme z PDA detektoru a získaná spektra porovnáme s knihovnou spekter [19, 21, 26].

3.5.2. Kvantitativní hodnocení

Pro základní kvantitativní hodnocení se využívá plocha nebo výška píku. Plocha píku se určuje opět pomocí specifického softwaru. Nejčastější chyby při určení plochy nebo výšky píku spočívají v nepřesném určení základní linie a určení začátku a konce píku na chromatogramu. Vztah mezi plochou či výškou píku a neznámou koncentrací stanovíme za pomoci vnějšího standardu. Neznámou koncentraci potom zjistíme porovnáním vzorku a daného standardu. K získání koncentrace neznámého vzorku jsou používány metody z okruhu instrumentální analýzy, a to pomocí metody vnějšího standardu, metody přídávku standardu, metody vnitřního standardu a metody vnitřní normalizace [19, 21, 26].

Metoda vnějšího standardu neboli metoda kalibrační křivky, je nejjednodušší způsob určení koncentrace neznámého vzorku. Základním principem této metody je analýza série standardů o známé různé koncentraci. Hledáme závislost mezi koncentrací a velikostí plochy nebo výškou píku.

Kalibrační křivku vytvoříme z 5 – 7 naměřených standardů. Z naměřených hodnot standardu vytvoříme přímku lineární regrese, pro kterou platí následující rovnice:

$$A = a + bc$$

V tomto vztahu A představuje plochu píku a je úsek na ose Y, směrnice kalibrační přímky označujeme písmeny b, c. Metodu vnějšího standardu používáme pouze

u méně složitých vzorků. Vzorky a standardy při této metodě musí být svými vlastnostmi shodné [19, 21, 26].

Metoda přidavku standardu porovnává analytický signál vzorku se signálem standardu po přidání známé koncentrace a objemu standardu. Standard musí být stejného druhu jako je analyzována látka. Metoda může probíhat několika způsoby: metoda přidavku jednoho standardu, metoda více přidavků standardu, metoda přidavku standardu za konstantního objemu [19, 21, 26].

Metoda vnitřního standardu se uskutečňuje v jednom nástřiku. Vnitřní standard je chemická látka, kterou lze dobře oddělit od všech ostatních analyzovaných látek, ale měla by být eluována poblíž stanovované složky. Principem metody je přidat roztok vnitřního standardu k analyzovanému vzorku i k roztoku standardu. Koncentrace vnitřního standardu musí být známá, přičemž stejný objem musí být přidán jak ke standardu, tak ke vzorku [19, 21, 26].

Základním faktorem další metody - metody vnitřní normalizace, je nutnost znát všechny odezvové faktory a identifikaci všech píků. Určí se procentuální obsah plochy jednotlivých píků z celkové plochy vynesných píků, s výjimkou rozpouštědel nebo přidaných reakčních činidel. Tato metoda se používá především u rutinních testů. Nedostatkem vnitřní normalizace je získání bezrozměrného čísla udávající pouze procentuální zastoupení jednotlivých složek [19, 21, 26, 27].

4. Validace v HPLC

Validace slouží k prokázání spolehlivosti analytické metody, kdy postup získávání experimentálních dat má vliv na konečný výsledek. Validace udává pravidla pro vhodné analytické metody a ustanovuje definovaná kritéria. Používá se při zavádění nové metody, při převodu validované metody, kontrole způsobilosti systému a při revalidaci metody [19, 21, 26].

Validační předpisy, směrnice a normy udává ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), FDA (Food and Drug Administration), EMA (EUROPEAN Medicines Agency), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) [19, 21, 26].

Mezi validační parametry řadíme: správnost metody, přesnost metody, linearitu a rozsah, mez detekce, selektivitu metody a robustnost metody [19, 21, 26].

4.1. Správnost metody (*accuracy*)

Správnost je těsnost shody mezi naměřeným výsledkem a přijatou referenční hodnotou. Rozdíl mezi těmito hodnotami je udáván jako chyba výsledku. Chyby, které zůstávají konstantní při více měřeních, nebo ty, které se dají předem předvídat, se nazývají systematické chyby výsledku. Chyby měnící se v průběhu mnoha měření nejsou předvídatelné a nazývají se náhodné chyby výsledku. Náhodné chyby není možné odstranit. Rozdíl mezi průměrem naměřených hodnot a přijatou referenční hodnotou se nazývá odchylka. Odchylka může nabývat záporných nebo kladných hodnot, charakterizuje systematickou chybu [19, 21, 26].

4.2. Přesnost metody (*precision*)

Jedná se o hodnotu udávající míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem daných podmínek. Míra přesnosti je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka. Míru přesnosti můžeme vyjádřit jako opakovatelnost metody, mezilehlou přesnost metody nebo reprodukovatelnost metody [19, 21, 26].

Opakovatelnost metody určuje míru shody mezi nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti. Musí být dodrženy podmínky, kdy výsledky jsou získávány použitím téže metody na identickém materiálu, v té samé laboratoři, stejnými pracovníky, přístroji a zařízeními v krátkém časovém rozmezí [21, 26].

Na rozdíl od opakovatelnosti metody, mezilehlá přesnost metody udává míru shody v rámci jedné analytické laboratoře. Metodu provádí jiný analytik, na jiném zařízení, v jiný den. Udává rozdíl ve výsledcích způsobený například analytikem, rozdílnými nástroji, rozdílnými použitými látkami (od jiných dodavatelů) [21, 26].

Reprodukovatelnost metody se provádí za pomoci tzv. mezilaboratorních porovnávacích zkoušek a vyjadřuje míru shody mezi laboratořemi.

Z toho vyplývá, že reprodukovatelnost porovnává výsledky měření stejného analytu v různých laboratořích [21, 26].

4.3. Linearita a rozsah metody

Linearita představuje přímou závislost jedné veličiny na jiné, nezávisle proměnné. Jedná se především o přímkovou závislost. Tato lineární závislost je vyjádřena matematickým vztahem obecným vztahem:

$$y = a + bx$$

Veličina a představuje úsek na ose y , veličina b představuje směrnici přímky. Vzájemnou závislost dvou proměnných charakterizuje korelační koeficient R . Tento koeficient může nabývat hodnoty ± 1 . Čím více se blíží jedné, tím je závislost proměnných těsnější. Ve většině případů platí, že R musí být menší než jedna. Prakticky se linearita určuje přípravou nejméně pěti kalibračních roztoků o různé koncentraci pokrývající celý rozsah metody [21, 26].

Rozsah metody určuje interval naměřených hodnot dané veličiny ve vzorku. Validace potvrzuje, že je metoda aplikovatelná v daném rozsahu vzorku. Ohraničení rozsahu měření tvoří často na spodní hranici mez stanovitelnosti, nebo můžeme najít označení ULOQ a LLOQ, což reprezentuje horní a dolní mez stanovitelnosti [21, 26].

4.4. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce, nebo také nazývaný limit detekce, detekční limit je označován anglickou zkratkou LOD. Označuje analytický signál, který je statisticky významný a odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti, někdy také označovaná jako limit kvantifikace (LOQ), je koncentrace, která dovoluje kvantitativní vyhodnocení vzorku. Pro vyhodnocení LOD a LOQ je důležité znát postup výpočtu. Nejčastěji se používá pro výpočet poměr signálu a šumu ze směrodatné odchylky odezvy a ze směrnice kalibrační přímky, ze směrodatné odchylky odezvy blanku [21, 26].

V bioanalýze je LOQ definováno jako nejnižší zkoušená koncentrace, která dosahuje přijatelné hodnoty výtěžnosti s přijatelnou směrodatnou odchylkou. Hodnota LOQ musí být součástí lineárního rozsahu metody, často je prvním bodem kalibrační křivky [21, 26].

4.5. Selektivita metody

Selektivita metody poskytuje informaci o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku i v přítomnosti interferujících látek. Porovnává výsledky standardů s výsledky vzorků, tedy s reálnou maticí. Pokud je metoda dostatečně selektivní, je vliv potencionálních interferujících látek na výsledku zanedbatelný. Pro hodnocení selektivity je možné si vybrat mezi porovnáváním kalibračních přímek, porovnáváním výsledků se standardem nebo porovnáváním výsledků s měřením bez interferujících látek [21, 26].

Jestliže je dokázáno, že metoda není dostatečně selektivní, může být selektivita zvýšena změnou detekce. Například změna detektoru UV za fluorescenční, elektrochemický nebo MS detekci [21, 26, 28].

4.6. Robustnost metody

Robustnost metody má více definic. Můžeme ji definovat jako míru vlivu kolísání jednotlivých parametrů na celkový výsledek analytického stanovení. Další definice říká, že se jedná o shodu výsledku při reprodukovatelnosti metody za nepatrně změněných podmínek. Tato změna může nastat například při změně laboratoře, analytika, přístroje, teploty, koncentrace. K měření robustnosti

můžeme přistupovat pomocí jednorozměrné analýzy nebo vícerozměrné analýzy [21, 26].

O jednorozměrné analýze můžeme mluvit, když máme pouze jednu proměnnou. Ostatní proměnné zůstávají fixní a sledujeme ovlivnění výsledku. Experiment sleduje při pozorování jedné proměnné, poté opakujeme tentýž experiment a sledujeme jiný parametr. Nevýhodou tohoto přístupu je především časová náročnost a vzájemné interakce jednotlivých faktorů. I přes tyto nedostatky je prozatím nejpoužívanější metodou [21, 26].

Multivariační (vícerozměrná) analýza dat je založena na malých změnách v testování na základě plánovaných pokusů. Tyto pokusy mohou být zkrácené nebo úplné. Nejjednodušší příklad je sledování dvou proměnných, např. teplota a čas. Při experimentu zkoušíme různé kombinace změněných proměnných a jejich dopad na celkový výsledek analýzy [21, 26].

5. Stanovení terbinafinu hydrochloridu

Pro stanovení terbinafinu hydrochloridu je využíváno více různých metod, které se neustále zdokonalují a vyvíjí. Stanovit terbinafin můžeme pomocí titračních metod, spektrofotometrických metod, elektrochemických metod, elektroforetických metod nebo chromatografických metod. Každá metoda má charakteristickou rychlost, kvantitu a kvalitu.

Chromatografickými metodami lze stanovit látku kvantitativně i kvalitativně. Díky různým druhům kolon i používání různých mobilních fází (směsí v různém poměru) dochází k rychlejší elucím při zachování přesnosti a selektivity analýzy. Při změně poměru látek, které obsahují mobilní fáze, můžeme docílit přesnější separace, nejen dané látky, ale i degradačních produktů.

Pomocí vnitřního uspořádání kolony (délka, průměr, velikost částic, rychlost průtoku) a výběru vhodné mobilní fáze, můžeme pracovat s rychlostí a určitou kvalitou, jakou projde terbinafin hydrochlorid a jeho degradační produkty detekčním systémem. Vhodným výběrem můžeme ovlivnit retenční čas, mez stanovitelnosti a mez detekce, linearitu, rychlost detekce terbinafinu ve směsi a další.

5.1. Použité metody pro stanovení terbinafinu

Použité metody pro stanovení terbinafinu jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech (RP-HPLC), ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými iontovými páry (IP-RP-UHPLC), ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech (RP-UHPLC).

Seznam kolon, které byly při separačních metodách použity, najdeme v tabulce č. 2. Převážná většina kolon měla rozměry 250, 220, 150 nebo 50 milimetrů na délku, 4,6 milimetrů v průměru a velikost částic 5 a 10 mikrometrů.

Po průchodu separačním systémem byl terbinafin detekován pomocí detekčního systému s využitím absorpce ultrafialového záření. Detekce probíhala při vlnové délce 220 až 284 nanometrů.

Kombinací různých kapalin vznikly mobilní fáze. Mobilní fázi tvořilo aprotické polární rozpouštědlo, které rozpouští nepolární sloučeninu terbinafinu. V níže

uvedených metodách byly nejčastěji použity tyto látky: metanol, voda, acetonitril, kyselina fosforečná v různých koncentracích. Některé tyto látky byly naředěny a smíchány v různých poměrech.

Tabulka č. 2. Seznam použitých metod

	Metoda	Kolona	Velikost kolony (mm x mm x μm)	Vlnová délka detekce (nm)	Mobilní fáze	Poměr	Citace
1	RP-HPLC	Inertsil C18	50 x 4,6 x 5	220	dihydrogenfosforečnan draselný: acetonitril	65:35	[1]
2	RP-UFLC	Phenomenex C18	250 x 4,6 x 5	222	methanol, 25mM fosfátový pufr pH4	80:20	[5]
3	RP-HPLC	Cosmosil C18	250 x 4,6 x 5	244	metanol, voda	85:15	[6]
4	RP-HPLC	Zorbax ODS C18	150 x 4,6 x 3,5	242	acetonitril, kys. fosforečná (0,1%, pH3)	67:33	[29]
5	RP-HPLC	Inertsil C18	250 x 4,6 x 5	225	metanol, voda, dihydrogen fosforečnan amonný	60:15:25	[30]
6	RP-HPLC	Nucleosil	250 x 4,6 x 5	226	tetrahydrofuran, acetonitril, citrátový pufr pH 4,50	10:20:70	[31]
7	RP-HPLC	Neosphere C18	250 x 4,6 x 5	250	metanol, trietanolamin (0,5%)		[32]
8	RP-HPLC	RP-C18	250 x 4,6 x 5	282	metanol, voda	80:20	[33]
9	HPLC	Spheri-5 Phenyl	250 x 4,6 x 5	224		45:55	[34]
10	HPLC	Genesis C18	150 x 4,6 x 4		metanol, voda	50:50	[35]
11	HPLC	Zorbax Sb-Aq	150 x 4,6 x 5	224	50% kys. fosforečná, acetonitril	40:60	[36]
12	RP-UHPLC	Hypersil GOLD c-18	50 x 2,1 x 1,7	224	0,1% kyselina mravenčí, acetonitril		[37]
13	IP-RP.HPLC	Intersil 5 ODS 2	250 x 4,6 x 5	220	kyselina 1-heptansulfonová sodná sůl, acetonitril	60:40	[23]
14	RP-HPLC	Bondapak RP-C-18	250 x 4,6 x 10	220	pufr, acetonitril	65:35	[38]
15	RP-HPLC	Phenomenex C-18	250 x 4,6 x 5	282	voda, acetonitril, metanol	50:40:10	[39]
16	HPLC	Zorbax Eclips XDB C-18	150 x 4,6 x 5	222	0,2% metylamin pufr (pH 3,4 trifluorctová kys.), isopropyl, metanol	40:12:48	[40]
17	RP-HPLC	RP-Bondapak	250 x 4,6 x 10	284	voda, metanol	20:80	[41]
18	HPLC	MerckLichro CART	250 x 4,6 x 5	224	0,05% roztok kyselina trifluorctová, acetonitril, metanol		[42]
19	RP-HPLC	Dionex C-18	250 x 4,6 x 5	225	metanol, hydrogenfosforečnan draselný pH 8.0	60:40	[43]

5.2. Použité metody pro stanovení rozkladných produktů

V případě, kdy se mění mobilní fáze a eluční síla vzrůstá, mluvíme o gradientové eluci. Naopak, pokud poměr a složení mobilní fáze je celou dobu konstantní, mluvíme o izokratické eluci. Při separaci terbinafinu hydrochloridu lze použít izokratickou i gradientovou metodu. Všeobecně častěji se používá gradientová eluce, kdy dochází k účinnějšímu rozdělení látek.

Průtok mobilní fáze kolonou, ve které je rozpuštěná stanovovaná látka, závisí na velikosti částic, které vyplňují kolonu a interakce látek se stacionární fází. Na koloně Bondapak RP-C-18 byl využit nejvyšší průtok, tj. 1,8 ml/min. Naopak nejnižší průtok byl použit na koloně Genesis C18.

Kvalitativní hodnocení vzorku je založeno na porovnávání retenčních časů. Tento čas je doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima křivky (píku). Opět záleží na interakci hledané látky se stacionární fází. Retenční čas analytů u níže uvedených metod se pohyboval od 2,2 do 40 minut.

Nejnižší naměřený limit detekce, respektive kvantifikace v uvedených metodách, byl 0,005 µg/ml, respektive 0,000001 µg/ml.

Tabulka č. 3 Průtok, retenční časy, LOD, LOQ, linearita terbinafinu

	Druh eluce	Kolona	Velikost kolony (mm x mm x µm)	Průtok (ml/min)	Retenční čas (min)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Linearita (µg/ml)	Země	Citace
1	gradientová	Intersil C18	50 x 4,6 x 5	1,5	6,2	0,0585	0,195	50-150	Indie	[1]
2	izokratická	Phenomenex C18	250 x 4,6 x 5	1	4,50	0.005	0.005	10-500	Indie	[5]
3	gradientová	Cosmosil C18	250 x 4,6 x 5	0,8	3,753	0,1458	0,3416	–	Indie	[6]
4	–	Zorbax ODS C18	150 x 4,6 x 3,5	1	2,2	0,631	2,1	0,5-16	Indie	[29]
5	gradientová	Intersil C18	250 x 4,6 x 5	1	5,1	0,5	0,15	2-12	Indie	[30]
6	izokratická	Nucleosil	250 x 4,6 x 5	0,8	24,317	–	–	0,2-5	CZ	[31]
7	gradientová	Neosphere C18	250 x 4,6 x 5	1,2	4,14	0,22	0,66	2-12	Indie	[32]
8	–	RP-C18	250 x 4,6 x 5	1	5,84	0,204	0,62	80-160	Indie	[33]
9	izokratická	Spheri-5 Phenyl	250 x 4,6 x 5	–	30-40	–	–	0-2,5	Švýcarsko	[34]
10	gradientová	Genesis C18	150 x 4,6 x 4	0,5	2,8	–	0.000001	0,001-2	Brazílie	[35]
11	–	Zorbax Sb-Aq	150 x 4,6 x 5	0,8	17,43	–	0,0005	0,0005-2	Istanbul	[36]
12	gradientová	Hypersil GOLD C-18	50 x 2,1 x 1,7	1,5	2,746	0,01	0,03	0,03-20	Polsko	[37]
13	–	Intersil 5 ODS 2	250 x 4,6 x 5	1	21,541	1,21	3,67	8,54-59,8	Rumunsko	[23]
14	izokratická	Bondapak RP-C-18	250 x 4,6 x 10	1,8	14,95	–	–	0,02-1	Indie	[38]
15		Phenomenex C-18	250 x 4,6 x 5	1		0,1	0,2	5-50	Indie	[39]
16	izokratická	Zorbax Eclips XDB C-18	150 x 4,6 x 5	1	4,5	0,3	1	1-80	Indie	[40]
17	gradientová	MerckLichro CART	250 x 4,6 x 5	1,2	50,86	0,31	0,95	0,1-0,15	Indie	[42]
18	izokratická	Dionex C-18	250 x 4,6 x 5	1	4.18	0,883	1,945	10-40	Indie	[43]

5.3. Použité metody pro stanovení rozkladných produktů

V případě stanovení obsahu degradačních produktů zatím není známo tolik metod, jako při stanovení obsahu samotného terbinafinu.

Při stanovení nečistot došlo ke stanovení samotného „čistého“ terbinafinu, β -Terbinafinu, 4- Metyl-terbinafinu, Z- terbinafinu, 1-N-methylaminometylnaften za použití propylparabenu jako vnitřního standardu [31].

5.4. Stanovení terbinafinu a degradačních produktů pomocí RP-HPLC

U časově starší metody byla použita kolona NUCLEOSIL 100-5-CN s délkou kolony 250 milimetrů, průměrem 4,6 milimetrů a velikosti částic 5 mikrometrů. Mobilní fáze pro separaci terbinafinu i jeho rozkladných produktů byla směsí tetrahydrofuranu, acetonitrilu a citrátového pufru (pH 4,50) v poměru 10:20:70. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min. Detekce terbinafinu a nečistot byla provedena při vlnové délce 226 nm. Celkově analýza trvala 32 minut [31].

Tabulka č. 4. Stanovení terbinafinu a jeho nečistot na koloně NUCLEOSIL 100-5-CN

Látka	Retenční čas (min)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
1-N-methylaminometylnaften	6,958	0,023	0,078
Z-terbinafin	22,808	0,058	0,193
Terbinafin	24,317	–	–
β -terbinafin	26,683	0,098	0,327
4-methylterbinafin	28,917	0,083	0,278

5.4. Stanovení terbinafinu a rozkladných produktů pomocí UHPLC

Při stanovení terbinafinu a jeho nečistot byla v tomto případě použita kolona Kinetex 1,7 μm . Délka kolony je 50 mm a průměr kolony 2,1 mm.

Díky částicím, které jsou menší než 2 μm , se jedná o separaci pod vysokým tlakem. Mobilní fáze byla připravena z roztoku pufru (citrátový a fosfátový pufr v poměru 1:1 pH 5) a metanolu. Poměr pufru a metanolu byl 25:75. Retenční čas terbinafinu byl v průměru 3,999 min, Z-terbinafinu 3,257 min., β -terbinafinu 3,587 min., 4methylterbinafinu 4,897 min. Celkový čas analýzy se pohyboval okolo 6 minut [44].

Tabulka č. 5. Stanovení terbinafinu pomocí UHPLC

Látka	Retenční čas (min)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Z-terbinafin	3,257	1,37	4,55
Terbinafin	3,999	0,59	1,97
β -terbinafin	3,587	0,16	0,54
4-methylterbinafin	4,897	0,29	0,98

6. Souhrn a Závěr

Pro stanovení terbinafinu existuje více validovaných metod. Každá metoda je charakteristická použitou analytickou kolonou, mobilní fází a úpravou vzorku. Z uvedených metod docházelo k nejcitlivější a nejrychlejší analýze u systému UHPLC, kdy se zvyšuje tlak na koloně. Veškeré uvedené metody byly validovány.

Látek, které vznikají při syntéze terbinafinu a znečišťují ho, je mnoho. Díky podobným vlastnostem je těžké je od sebe rozdělit a identifikovat.

Pomocí RP-HPLC je možné separovat nečistoty i degradační produkty, ale doba trvání analýzy je příliš dlouhá. Při použití metody UHPLC se doba detekce snižuje a kvalita separace se zvyšuje.

Byl dohledán pouze jeden zdroj, kde bylo analyzováno pět látek stanovovaných spolu s terbinafinem hydrochloridem. Při syntéze terbinafinu může však vznikat mnoho dalších nečistot, ale doposud nebyly vyvinuty metody, které by odlišily tyto látky od ostatních.

Cílem mé bakalářské práce bylo najít a sepsat metody pro stanovení terbinafinu a jeho degradačních produktů za pomoci systému HPLC. Podařilo se mi vyhledat pouze některé metody a postupy. Několik metod nebylo vůbec v této práci zařazeno, a to z důvodu omezených informací uvedených v literatuře.

7. Citovaná literatura

1. SIREESHA, R., VIJAYAKAR, P. S., KUMAR, V. P., SIVAGAMI, B., SIKDAR P., BABU, M. N., RP-HPLC method development and validation for the estimation of antifungal drug terbinafine HCL in bulk and pharmaceutical dosage form. *International Journal of Research In Pharmaceutical Chemistry and Analysis* [online]. 2018, **1**(1), 8-12 [cit. 15.8. 2020]. ISSN 2582-1970. Dostupné z: doi:10.33974/ijrpca.v1i1.8
2. *Wikipedia* [online]. Poslední revize 22. duben 2020 [cit. 29. duben 2020]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Terbinafine>.
3. *Moje lékárna* [online]. Poslední revize 2009 [cit. 2. březen 2020]. Dostupné z: <https://www.mojelekarna.cz/leky/ucinne-latky/terbinafin.html>
4. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Poslední revize 12. července 2017 [cit. 10. září 2019]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC111013.pdf&type=spc&as=terbinafin-actavis-spc>.
5. NARAYANA REDDY K, V. V. S., KUMAR R, S., HEMNATH, E., SIDDHARTHA, V. T., YAMJALA, K., MALAYANDI, R., Development and validation of RP-UFLC method for the estimation of terbinafine HCL pharmaceutical nanoemulsion gel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 2014, **6**.
6. KHATIK, D. P., LAWRE, R. B., MANKAR. S. D., Simultaneous estimation and validation of terbinafine hydrochloride and mometasone furoate in bulk and pharmaceutical dosage form by using RP-HPLC. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. **8**(6), 1264-1274. ISSN 2278 – 4357. Dostupné z: doi:10.20959/wjpps20196-14041
7. MCCLELLAN, K. J., WISEMAN, L. R., MARKHAM, A., Terbinafine. *Drugs* [online]. 1999, **58**(1), 179-202 [cit. 2020-11-17]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-199958010-00018
8. BARNETTE, D. A., DAVIS, M. A., FLYNN, N., PIDUGU, A. S., SWAMIDASS, S. J., MILLER, G. P., Comprehensive kinetic and

- modeling analyses revealed CYP2C9 and 3A4 determine terbinafine metabolic clearance and bioactivation. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2019, **170** [cit. 14. 4. 2020]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2019.113661
9. DOHNAL, V., JEŽKOVÁ, A., SKLÁDANKA, J., Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt* [online]. 2009, **10**(2), 449-454 [cit. 14. 4. 2020]. ISSN 12124117. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2008.066
 10. ONYEWU, Ch., BLANKENSHIP, J. R., POETA, M. D., HEITMAN, J., Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Become Fungicidal when Combined with Calcineurin Inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2003, **47**(3), 956-964 [cit. 20. 4. 2020]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.47.3.956-964.2003
 11. HU, Z., HE, B., MA, L., SUN, Y., NIU, Y., ZENG, B., Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2017, **57**(3), 270-277 [cit. 20. 4. 2020]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-017-0657-1
 12. VOKURKA, M., HUGO, J., *Velký lékařský slovník*. 10. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, [2015]. Jessenius. ISBN 978-80-7345-456-2.
 13. JENSEN, J. C., Clinical pharmacokinetics of terbinafine (Lamisil). *Clinical and Experimental Dermatology* [online]. 1989, **14**(2), 110-113 [cit. 26. 4. 2020]. ISSN 0307-6938. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2230.1989.tb00904.x
 14. CREGO, A. L., GOMEZ, J., LAVANDERA, J. L., Fast separation of terbinafine and eight of its metabolites by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*. 2001 Dostupné z: doi:10.1002/1615-9314(20010401)24:43.0.CO;2-9
 15. *Synzeal* [online]. Poslední revize 2020 [cit. 30. 8. 2020]. Dostupné z: <https://www.synzeal.com/terbinafinedimer-impurity>
 16. PARSA, J., International application published under the patent cooperation treaty (PCT). *Patentimages*. [Online] 19.. Duben 2007. [cit. 30. 8. 2020.]

<https://patentimages.storage.googleapis.com/ed/3c/e1/9b3c729a6ae14b/WO2007044273A1.pdf>.

17. KANAKAPURA, B., PENMATSA, V. K., Analytical methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceuticals and biological materials. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, **6**(3), 137-149 [cit. 10. 5. 2020]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2016.01.003
18. *Google knihy* [online]. Poslední revize 2020 [cit. 30. 8. 2020]. Dostupné z :
<https://books.google.cz/books?id=in1iDwAAQBAJ&printsec=frontcover&key=AlzaSyDIPfI89JdFhWBVsMVsavVo6aNh057xITc#v=onepage&q=terbinafin&f=false>
19. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
20. *Wikipedie* [online]. Poslední revize 2018. [Cit. 29. 4. 2020]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative_HPLC.svg
21. DOUŠA, M., *HPLC* [online] poslední revize 2020 [cit. 6. březen 2020]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
22. CORRADINI, D., *Handbook of HPLC*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, c2010. ISBN 9781574445541.
23. FLOREA, M., ARAMA, C. C., MONCIU, C. M., Determination of terbinafine hydrochloride by ion-pair reversed phase liquid chromatography. *Farmacia*. 2009, Sv. LVII, 1.
24. SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L., *Practical HPLC Method Development* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 1997 [cit. 19. 5. 2020]. ISBN 9781118592014. Dostupné z: doi:10.1002/9781118592014
25. *HPLC* [online]. Poslední revize 3%. července 2020 [cit. 30. 8. 2020]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/ion_chromatography.html
26. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.

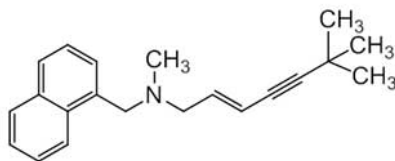
27. *Lékopis* [online]. Poslední revize 2001. [Citace: 12. 4. 2020]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_46.htm.
28. *EffiChem*. [Online] 2020. [Citace: 16. Duben 2020.] <https://www.effichem.cz/produkty/effivalidation-4-0/moduly/validace-metod/>
29. CHAUDHARY, M. M., HG, A., SREEDHAR, A., SRINIVAS, T. R., THAKUR, T. K., Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Terbinafine hydrochloride and Mometasone Furoate in Combined Dosage form. *Journal of Pharmacy Research* [online]. 2017, **2017**(11(4), 286-291 [cit. 18. 5. 2020]. ISSN 0974-6943. Dostupné z: <https://jpr solutions.info/files/final-file-590746579149c5.53431952.pdf>
30. RAJU, R. R., BABU, N. B., Simultaneous analysis of RPHPLC method development and validation of terbinafinu and bezafibrate drugs in pharmaceutical dosage form. *Pharmacophore* [online]. 2011, **2011**(2(4), 195-201 [cit. 25. 5. 2020]. ISSN 2229 – 5402. Dostupné z: <file:///C:/Users/Anet/Downloads/simultaneous-analysis-of-rphplc-method-development-and-validation-of-terbinafine-and-bezafibrate-d.pdf>
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]. 2006, **68**(3), 713-720 [cit. 11. 5. 2020]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2005.05.013
32. GOSWAMI, P. D., Stability-indicating RP-HPLC method for analysis of terbinafinu hydrochloride in bulk and in tablet dosage form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, 2013, **2013**(5(3) [cit. 20. 5. 2020]. ISSN 975-1491. Dostupné z: <https://innovareacademics.in/journal/ijpps/Vol5Suppl3/7388.pdf>
33. KRUPA, P. K., A validated RP-HPLC method for determination of terbinafinu hydrochloride in pharmaceutical solid dosage form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [online]. 2012, **2012**(4(3), 4663-4669 [cit. 25. 5. 2020]. ISSN

0975-766X. Dostupné z: <http://www.ijptonline.com/wp-content/uploads/2009/10/4663-4669.pdf>

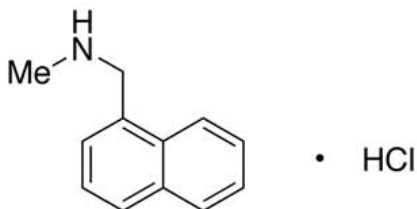
34. ZEHENDER, H., DENOUEËL, J., ROY, M., SAUX, L. L., SCHAUB, P., Simultaneous determination of terbinafine (Lamisil) and five metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography using on-line solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1995, **664**(2), 347-355 [cit. 25. 5. 2020]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(94)00483-L
35. DE OLIVEIRA, C. H., BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R. E., DE MORAES, M. O., BEZERRA, F. A., DE MORAES, M. E. A., DE NUCCI, G., Terbinafine Quantification in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry: Application to a Bioequivalence Study. *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2001, **23**(6), 709-716 [cit. 27. 5. 2020]. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/00007691-200112000-00019
36. ÜNAL, D.Ö., HPLC-UV method transfer for UPLC in bioanalytical analysis: Determination of terbinafine from human plasma. *Journal of Pharmacy of Istanbul University*. 2010.
37. 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. *Analytical Sciences* [online]. 2010, **26**(7), 755-759 [cit. 1. 6. 2020]. ISSN 0910-6340. Dostupné z: doi:10.2116/analsci.26.755
38. GOPAL, P. N. V., HEMAKUMAR, A. V., PADMA S. V. N., Reverse phase HPLC method for the analysis of terbinafine in pharmaceutical dosage forms. *Asian journal of chemistry* [online]. 2008, 20(1), 551-555 [cit. 1. 6. 2020]. Dostupné z: http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=20_1_84
39. DOMADIYA, V., SINGH, R., JAT, R. K., CHOKSHI, R., Method development and validation for assay of terbinafine HCL in cream by

- RP-HPLC method. *Journal of pharmacy research* [online]. 2017, **11**(4), 286-291 [cit. 27. 5. 2020]. ISSN 0974-6943. Dostupné z: <https://jprsolutions.info/files/final-file-590746579149c5.53431952.pdf>
40. PENMATSA, V. K., BASAVAI AH, K., Simple, sensitive and stability indicating high performance liquid chromatographic assay of terbinafine hydrochloride in dosage forms. *American Journal of Pharmtech research* [online]. 2014, **4**(2), [cit. 27. 5. 2020]. ISSN 2249-3387. Dostupné z: <http://ajptr.com/archive/volume-4/april-2014-issue-2>
41. ABDEL-MOETY, E. M., KELANI, K. O., AL-ALAMEIN, A. M., Chromatographic determination of terbinafine in presence of its photodegradation products. *Saudi pharmaceutical journal* [online]. 2003, **11**(1-2), 37-45 [cit. 27. 5. 2020]. ISSN 1319-0164. Dostupné z: https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:35071157
42. BARANOWSKA, I., MARKOWSKI, P., BARANOWSKI, J., Development and Validation of an HPLC Method for the Simultaneous Analysis of 23 Selected Drugs Belonging to Different Therapeutic Groups in Human Urine Samples. *Analytical Sciences* [online]. 2009, **25**(11), 1307-1313 [cit. 25. 5. 2020]. ISSN 0910-6340. Dostupné z: [doi:10.2116/analsci.25.1307](https://doi.org/10.2116/analsci.25.1307)
43. RAMYA P., VISAGAPERUMAL D., Development and Validation of RP-HPLC Method for the Determination of Terbinafine Hydrochloride in a Tablet Dosage Form. *Samyoga an academic journal*. 2016.
44. FIRLEYOVÁ, M., Vývoj a validace UHPLC metody pro stanovení terbinafinu. *Diplomová práce*. Hradec Králové, 2018.
45. *Wikipedie* [online] 29. Listopad 2018. [Citace: 30. 4. 2020]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC>
46. *Chromservis*. [online] [Citace: 31. 8. 2020.] Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/i/uhplc?lang=CZ>.

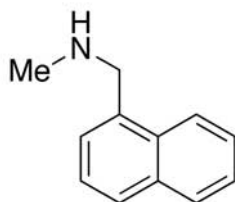
Příloha č. 1. Znečišťující složky terbinafinu



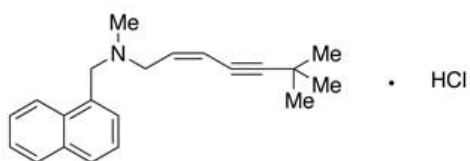
Terbinafine - API
Terbinafine



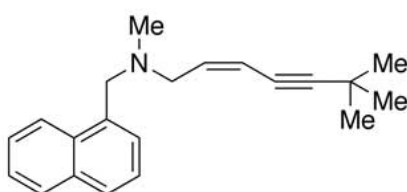
Terbinafine - Impurity A
N-Methyl-C-(naphthalen-1-yl)methanamine Hydrochloride



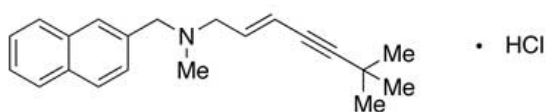
Terbinafine - Impurity A (Freebase)
N-Methyl-C-(naphthalen-1-yl)methanamine



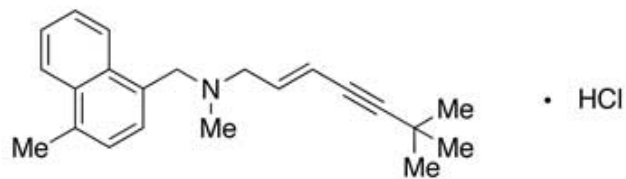
Terbinafine - Impurity B
(6,6-Dimethyl-hept-2-en-4-ynyl)-methyl-naphthalen-1-ylmethyl-amine
Hydrochloride



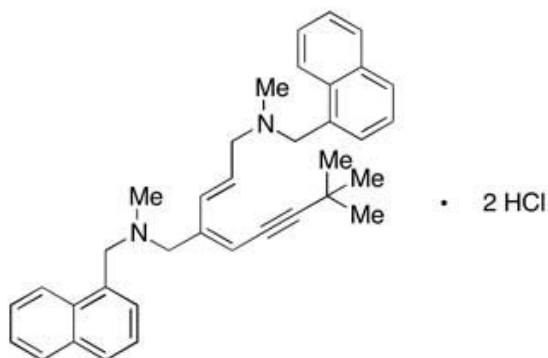
Terbinafine (Freebase)
(6,6-Dimethyl-hept-2-en-4-ynyl)-methyl-naphthalen-1-ylmethyl-amine



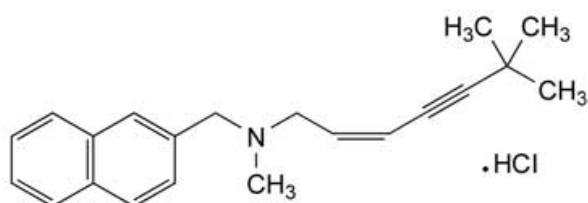
Terbinafine - Impurity C
(6,6-Dimethyl-hept-2-en-4-ynyl)-methyl-naphthalen-2-ylmethyl-amine
Hydrochloride



Terbinafine - Impurity D
 (2E)-N,6,6-Trimethyl-N-[(4-methylnaphthalen-1-yl)methyl]-hept-2-en-4-yn-1-amine Hydrochloride

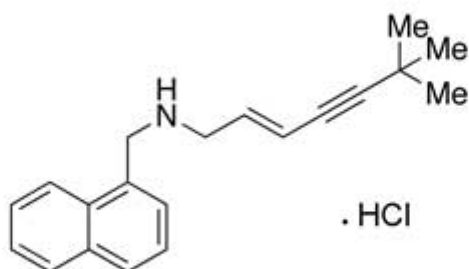


Terbinafine - Impurity E
 Terbinafine Dimer Impurity Dihydrochloride Salt

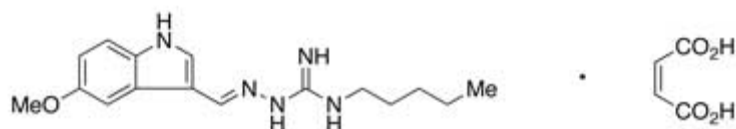


Terbinafine - Impurity F

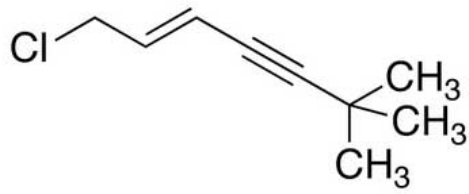
cis-Isoterbinafine Hydrochloride



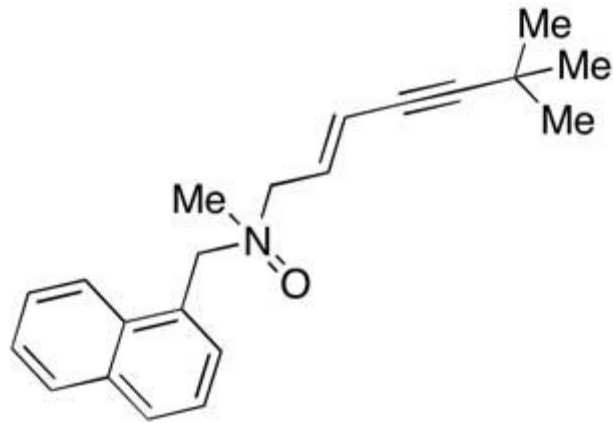
N-Demethylterbinafine Hydrochloride
N-Demethylterbinafine Hydrochloride



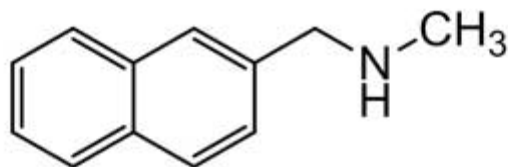
Tegaserod Maleate
Tegaserod Maleate



1-Chloro-6,6-dimethyl hept-2-ene-4-yne
1-Chloro-6,6-dimethyl hept-2-ene-4-yne

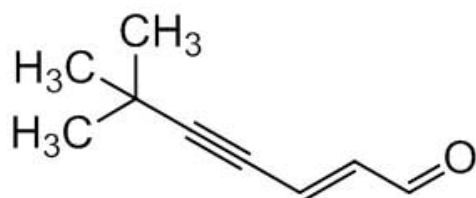


Terbinafine N-oxide
Terbinafine N-oxide

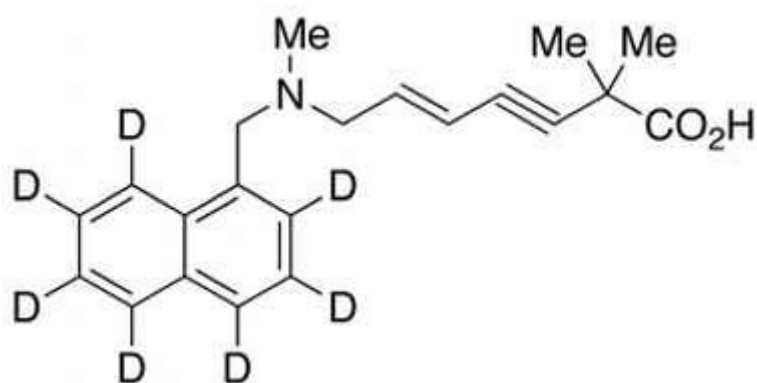


N-Methyl-1-(naphthalen-2-yl)methanamine

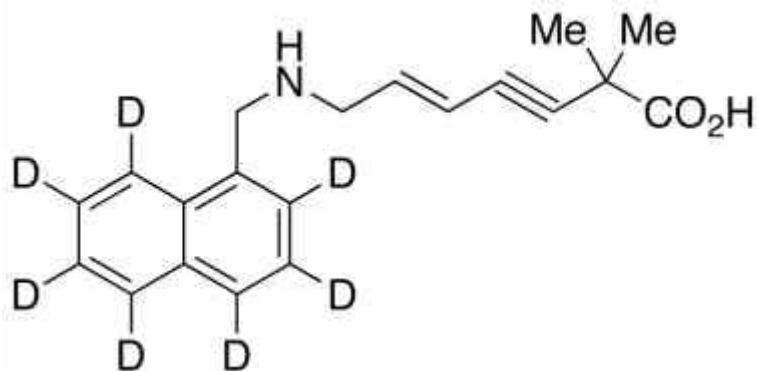
N-Methyl-1-(naphthalen-2-yl)methanamine



(E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-ynal
(E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-ynal

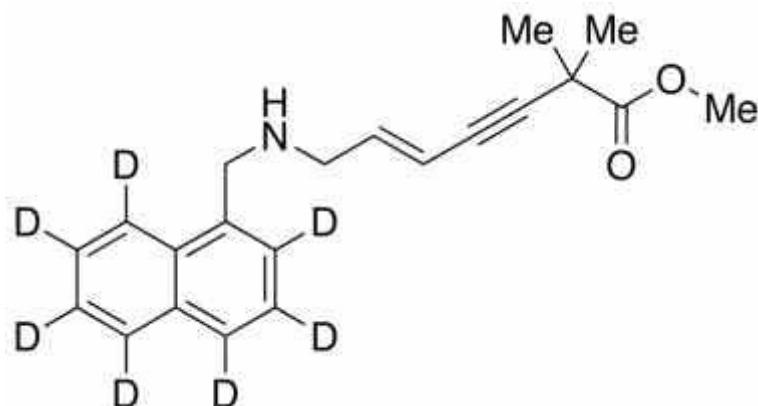


Carboxy Terbinafine-d7
Carboxy Terbinafine-d7

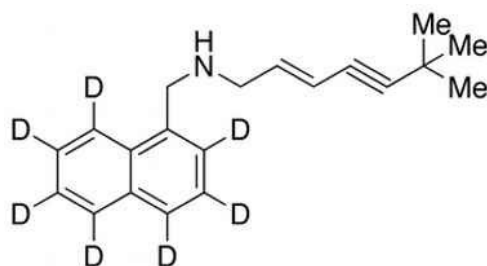


N-Desmethylcarboxy Terbinafine-d7

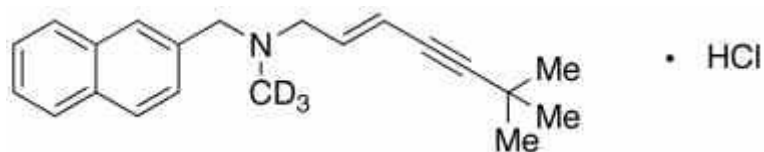
N-Desmethylcarboxy Terbinafine-d7



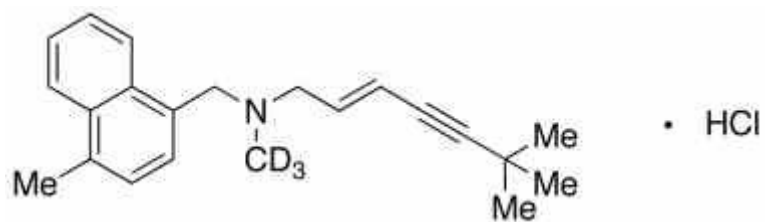
N-Desmethylcarboxy Terbinafine-d7 Methyl Ester
N-Desmethylcarboxy Terbinafine-d7 Methyl Ester



N-Desmethyl Terbinafine-d7
N-Desmethyl Terbinafine-d7

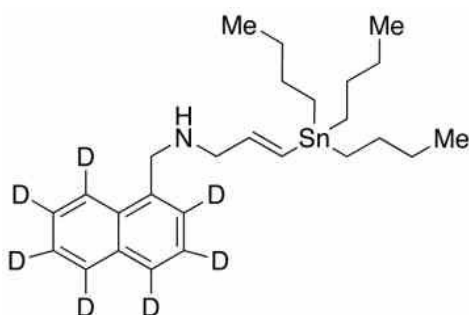


N-[(2E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-yn-1-yl]-N-methyl-2-naphthalenemethanamine-
d3 Hydrochloride
N-[(2E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-yn-1-yl]-N-methyl-2-
naphthalenemethanamine-d3 Hydrochloride



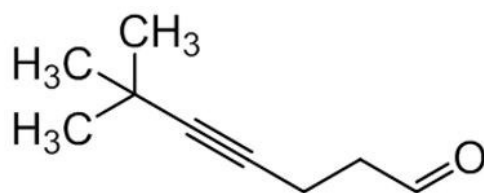
N-[(2E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-yn-1-yl]-N,4-dimethyl-1-naphthalenemethanamine-d3 Hydrochloride

N-[(2E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-yn-1-yl]-N,4-dimethyl-1-naphthalenemethanamine-d3 Hydrochloride



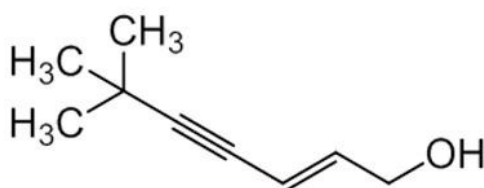
N-(E)-3-Tributyltinallyl-1-naphthalene-d7-methylamine

N-(E)-3-Tributyltinallyl-1-naphthalene-d7-methylamine



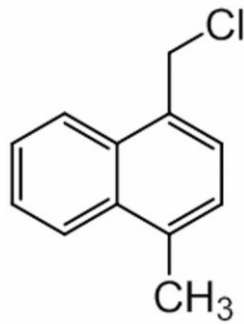
6,6-Dimethylhept-4-ynal

6,6-Dimethylhept-4-ynal

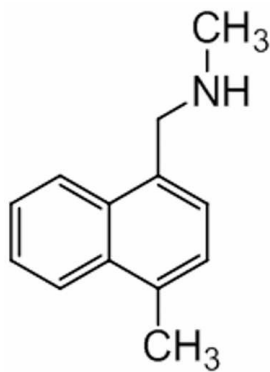


6,6-Dimethylhept-2-en-4-yn-1-ol

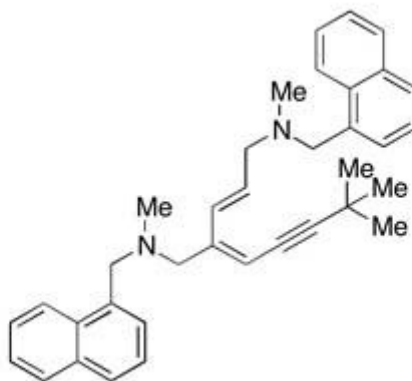
6,6-Dimethylhept-2-en-4-yn-1-ol



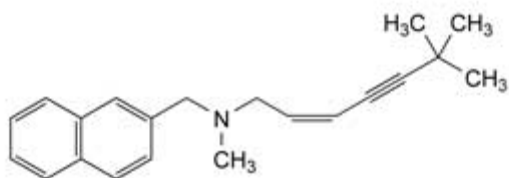
1-(Chloromethyl)-4-methylnaphthalene



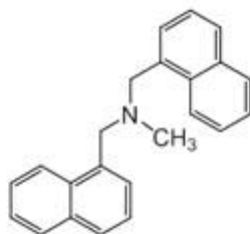
Methyl(4-methylnaphthalen-1-ylmethyl)amine



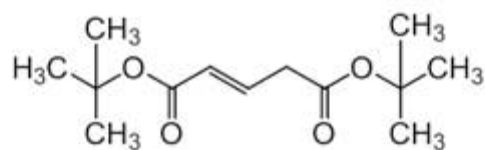
Terbinafine - Impurity E (Freebase)
(2E,4E)-4-(4,4-Dimethylpent-2-yn-1-ylidene)-N,N'-dimethyl-N,N'-bis(naphthalen-1-ylmethyl)pent-2-ene-1,5-diamine



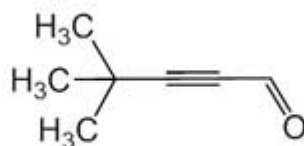
Terbinafine - Impurity F (Freebase)
(Z)-N,6,6-Trimethyl-N-(naphthalen-2-ylmethyl)hept-2-en-4-yn-1-amine



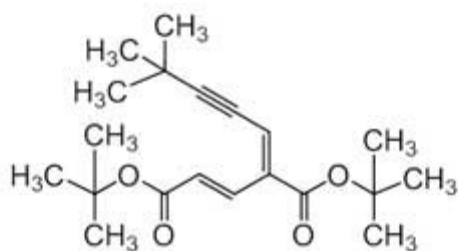
N-Methyl-N-(1-naphthalenylmethyl)-1-naphthalenemethanamine
N-Methyl-N-(1-naphthalenylmethyl)-1-naphthalenemethanamine



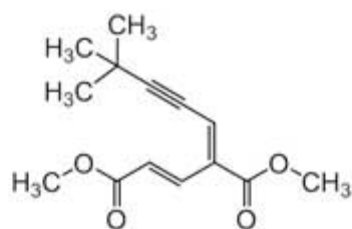
di-tert-Butyl (E)-pent-2-enedioate
 di-tert-Butyl (E)-pent-2-enedioate



4,4-Dimethyl-2-pentynal
 4,4-Dimethyl-2-pentynal

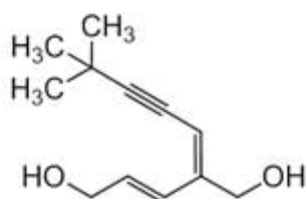


di-tert-Butyl (2E,4E)-4-(4,4-dimethylpent-2-yn-1-ylidene)pent-2-enedioate
 di-tert-Butyl (2E,4E)-4-(4,4-dimethylpent-2-yn-1-ylidene)pent-2-enedioate

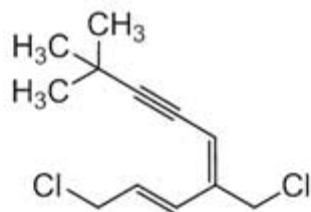


(2E,4E)-4-(4,4-Dimethyl-2-pentyn-1-ylidene)-2-pentenedioic Acid 1,5-Dimethyl
Ester

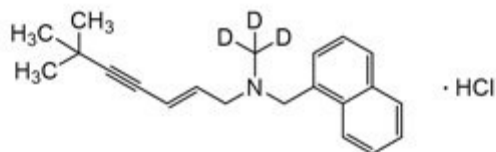
(2E,4E)-4-(4,4-Dimethyl-2-pentyn-1-ylidene)-2-pentenedioic Acid 1,5-
Dimethyl Ester



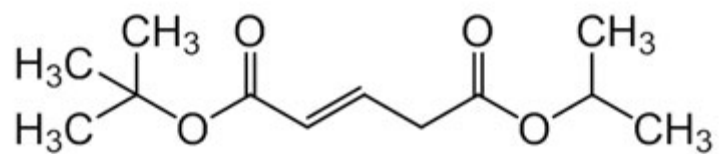
(2E,4E)-4-(4,4-Dimethyl-2-pentyn-1-ylidene)-2-pentene-1,5-diol
(2E,4E)-4-(4,4-Dimethyl-2-pentyn-1-ylidene)-2-pentene-1,5-diol



(2E,4E)-1-Chloro-4-(chloromethyl)-8,8-dimethylnona-2,4-dien-6-yne
 (2E,4E)-1-Chloro-4-(chloromethyl)-8,8-dimethylnona-2,4-dien-6-yne



Terbinafine-d3 HCl (N-methyl-d3)
 Terbinafine-d3 HCl (N-methyl-d3)



1-(tert-Butyl) 5-isopropyl (E)-pent-2-enedioate
1-(tert-Butyl) 5-isopropyl (E)-pent-2-enedioate
