

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Monika Zouzalová

POROVNÁNÍ METOD PRO STANOVENÍ ANTIMYKOTIKA
KLOTRIMAZOLU V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH

Comparison of methods for
the determination of the antifungal drug
clotrimazole in medicinal preparations

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze 11. května 2022.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vybrané analytické metody pro stanovení obsahu klotrimazolu v lékových formách z hlediska jejich pravdivosti, preciznosti, finanční a časové náročnosti. Ke stanovení klotrimazolu byly zvoleny tři metody: molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti, molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Vybrané léčivé přípravky byly krém Clotrimazol AL, krém Canesten, sprej Candibene a vaginální tablety Clotrimazol AL. Nejvíce precizní výsledky poskytlo stanovení klotrimazolu ve spreji Candibene pomocí metody HPLC. Naopak nejméně precizní hodnoty byly naměřeny metodou HPLC při analýze krému Canesten. Spektrometrické stanovení ve VIS oblasti ve spreji Candibene a stanovení klotrimazolu v krému Clotrimazol AL pomocí metody HPLC nelze považovat za pravdivé, jelikož se neshodují s deklarovanou hodnotou. Z hlediska finanční náročnosti byla nejvýhodnější molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti, naopak nejnákladnější metoda byla molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti. Nejvíce časově náročnou metodou byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti a VIS oblasti byly časově stejně náročné.

Klíčová slova: klotrimazol, molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti, molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Abstract

The aim of this bachelor's thesis was to compare selected analytical methods for the determination of clotrimazole in dosage forms in terms of its truthfulness, precision, financial and time requirements. The three methods were chosen: UV molecular absorption spectrometry, VIS molecular absorption spectrometry, and high-performance liquid chromatography. The amount of clotrimazole was determined in four pharmaceuticals: cream Clotrimazol AL, cream Canesten, spray Candibene, and vaginal tablets Clotrimazol AL. The determination of clotrimazole in Candibene spray by HPLC gave the most precise results. On the contrary, the least precise values were measured by HPLC in Canesten cream analysis. The VIS spectrometric determination in Candibene spray and the determination of clotrimazole in Clotrimazole AL cream by HPLC cannot be considered true, as it does not agree with the declared value. UV molecular absorption spectrometry was the least expensive method, while the most expensive method was VIS molecular absorption spectrometry. The most time-consuming method was high performance liquid chromatography. UV and VIS molecular absorption spectrometry were equally time-consuming.

Key words: clotrimazole, UV molecular absorption spectrometry, VIS molecular absorption spectrometry, high performance liquid chromatography

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce panu RNDr. Karlu Nesměrákovi Ph.D. za cenné rady, odbornou pomoc a připomínky, které mi velice pomohly při vypracování této bakalářské práce.

Obsah

1	Cíl bakalářské práce	9
2	Teoretická část	10
2.1	Klotrimazol a jeho vlastnosti	10
2.2	Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti klotrimazolu	11
2.3	Syntéza klotrimazolu	12
2.4	Farmakologické vlastnosti klotrimazolu	13
2.5	Dostupné léčivé formy klotrimazolu	14
2.5.1	Krém	15
2.5.2	Vaginální tablety	15
2.5.3	Kožní sprej	16
2.6	Metody pro stanovení klotrimazolu	16
2.7	Principy vybraných metod pro stanovení klotrimazolu	17
2.7.1	Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti	18
2.7.2	Molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti	18
2.7.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	18
2.8	Preciznost a pravdivost analytických měření	19
3	Experimentální část	20
3.1	Analyzované léčivé přípravky	20
3.2	Použité chemikálie	20
3.3	Pracovní postupy použitých metod	21
3.3.1	Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti	21
3.3.2	Molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti	23
3.3.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	26
3.3.4	Statistické zpracování naměřených dat	28

4	Výsledky a diskuze	29
4.1	Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti.....	29
4.1.1	Metoda kalibrační závislosti.....	29
4.1.2	Metoda přidavku standardu.....	30
4.2	Molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti	30
4.2.1	Metoda přidavku standardu.....	30
4.3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	32
4.4	Vyhodnocení pravdivosti a preciznosti vybraných metod	35
4.5	Vyhodnocení finanční a časové náročnosti vybraných metod	37
5	Závěr	38

Seznam použitých zkratek a symbolů

a	směrnice lineární regrese kalibrační závislosti
A	absorbance
A	plocha chromatografického píku [mAU min^{-1}]
b	úsek lineární regrese kalibrační závislosti
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
l	tloušťka absorbujícího prostředí [cm]
m	hmotnost [g]
M	molární hmotnost [g mol^{-1}]
$\text{p}K_{\text{a}}$	disociační konstanta kyseliny
V	objem [ml]
w	obsah složky ve vzorku [hmotnostní %]
ε	molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$]
λ	vlnová délka [nm]

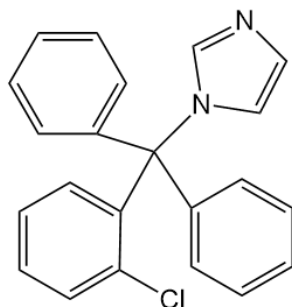
1 Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je porovnat vybrané analytické metody (molekulovou absorpční spektrometrii v UV oblasti, molekulovou absorpční spektrometrii ve VIS oblasti založenou na vzniku barevného produktu a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií) pro stanovení obsahu klotrimazolu ve třech různých lékových formách (krém, sprej a vaginální tablety) z hlediska jejich pravdivosti, preciznosti, finanční a časové náročnosti.

2 Teoretická část

2.1 Klotrimazol a jeho vlastnosti

Klotrimazol je širokospektrální lokální antimykotikum patřící do skupiny azolů, jež tvoří nejrozšířenější skupinu antimykotik. Na základě chemické struktury lze azoly rozdělit na triazoly a imidazoly. Klotrimazol, jehož struktura je znázorněna na obr. 2.1, spadá do podtřídy imidazolů. Jeho účinky byly objeveny koncem 60. let 20. století, což následně způsobilo průlom v léčbě kožních a vaginálních mykóz [1, 2].



Obr. 2.1 Strukturní vzorec klotrimazolu

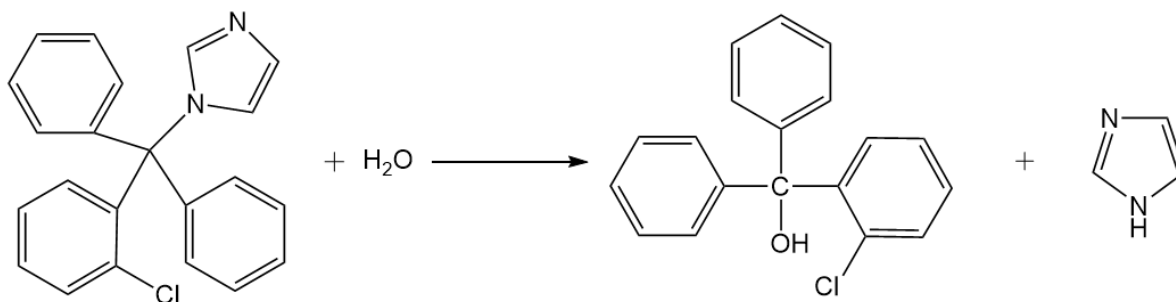
Klotrimazol účinkuje fungistaticky, ve vyšších koncentracích až fungicidně na proliferující kvasinky, houby a plísně. Nejnižší koncentrace klotrimazolu, která inhibuje viditelný růst plísní při optimálních podmínkách, se pohybuje v rozsahu 0,068–8,0 mg dm⁻³ [3]. Jeho rozsáhlé antifungální spektrum zahrnuje kandidy, dermatofyty a aspergily [4]. Nepůsobí pouze jako antimykotikum, ale je také používán ke zmírnění symptomů při trichomoniáze [1]. Trichomonacidně působí klotrimazol v koncentracích od 0,5–10 mg dm⁻³ [3]. Též působí bakteriostaticky na nokardie, gramnegativní bakterie a majoritní část grampozitivních bakterií, především na streptokoky a stafylokoky. Vývoj primární rezistence je velmi vzácný, sekundární rezistence se vyskytuje ojediněle [4]. Rezistence na látku

klotrimazol je pozorována u imunokompromitované populace pacientů, kteří trpí orofaryngeální kandidózou, což je oportunní infekce sliznice dutiny ústní a hltanu [5, 6].

Klotrimazol je celosvětově distribuován různými společnostmi, jako aktivní složka generického léku [1, 2]. Je předpokládáno, že se na evropský trh dostane až 25 tun klotrimazolu ročně, především díky společnosti Bayer. Vysoké užívání lékových forem obsahující klotrimazol má za následek výskyt klotrimazolu v životním prostředí, do kterého se dostává především z komunálních čistíren odpadních vod. Odhaduje se, že látka není biologicky odbouratelná a její poločas rozpadu v přírodě je více než 60 dní, proto podle evropských kritérií spadá klotrimazol do skupiny perzistentních látek. Klotrimazol dále podle REACH splňuje i kritérium toxicity, ovšem v současnosti neexistuje žádné riziko pro mořské nebo sladkovodní organismy. Avšak je pravděpodobné, že vysoká akumulace klotrimazolu v přírodě bude mít za následek nežádoucí účinky na plodnost, sexuální chování a vývoj reprodukčních orgánů u ryb. Poločasy fotodegradace klotrimazolu ve vodě jsou v širokém rozmezí 3–310 dnů v závislosti na síle slunečních paprsků [7].

2.2 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti klotrimazolu

Klotrimazol je krystalický prášek bílého nebo žlutého zbarvení, jehož sumární vzorec je $C_{22}H_{17}ClN_2$. Systematický název látky je 1-[(2-chlorfenyl)difenylmethyl]-1*H*-imidazol [8]. Klotrimazol hydrolyzuje na dva produkty, jež jsou imidazol a (2-chlorfenyl)difenylmethanol znázorněné na obr. 2.2 [9, 10]. V alkalickém prostředí je klotrimazol stabilní a po chemické stránce se jedná o slabou bázi s $pK_b = 8.79$ a s molární hmotností $344,84 \text{ g mol}^{-1}$ [1, 7]. Dle Českého lékopisu 2017 je klotrimazol prakticky nerozpustný ve vodě, avšak dobře rozpustný v 96% lihu či v dichlormethanu [8]. Jeho rozpustnost ve vodě je uváděna $0,49 \text{ mg dm}^{-3}$. Při teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$ se jeho rozpustnost zvyšuje na $3\text{--}8 \text{ mg dm}^{-3}$ [7].

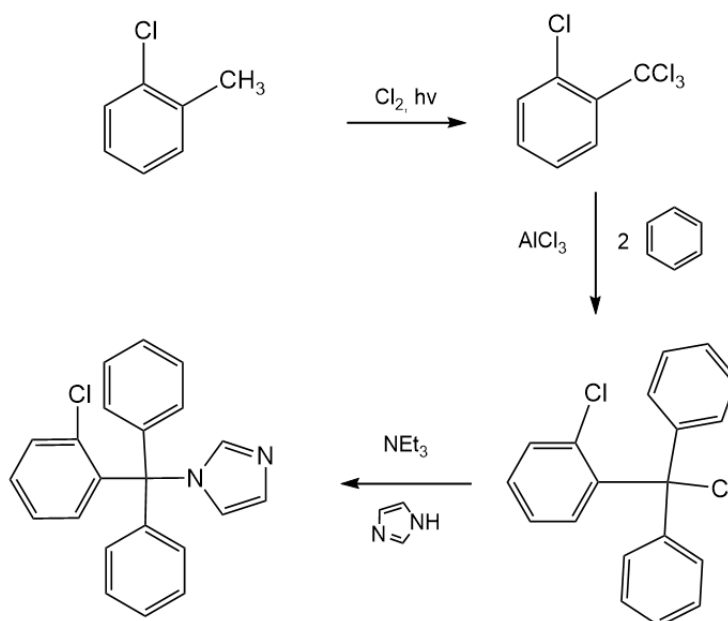


Obr. 2.2 Hydrolyza klotrimazolu na imidazol a (2-chlorfenyl)difenylmethanol (upraveno podle [9]).

Chemická struktura klotrimazolu je velmi zajímavá. Na obr. 2.1 je patrné, že obsahuje čtyři aromatické kruhy, které jsou vázané na tetraedrický atom uhlíku. Heterocyklická sloučenina s pětičlenným kruhem, která má ve své struktuře dva atomy dusíku, se nazývá imidazol a je známo, že zprostředkovává reakce přenosu elektronů v biologických systémech. Jeden ze zbývajících aromatických kruhů, který tvoří trifenylmethylový systém, obsahuje substituovaný chlor v poloze C2. Achirální molekulu tvoří dva fenylové kruhy, které jsou enantiotopické [1]. Kvantově-chemické modelování poskytlo informaci, že existují čtyři stabilní konformery klotrimazolu, avšak žádný z nich nezahrnuje ve stejné rovině dva aromatické kruhy. Autoři této studie došli k závěru, že klotrimazol neobsahuje koplanární konformer, jelikož jeho struktura by byla velmi nestabilní [3]. Pomocí svého nesubstituovaného dusíku klotrimazol účinně reaguje s kyselými či elektrofilními druhy, které se nachází v biologicky cílových molekulách [1].

2.3 Syntéza klotrimazolu

Klotrimazol byl poprvé syntetizován v roce 1969 a je možné ho připravit několika způsoby založenými především na reakci imidazolu s triethylaminem [7, 11]. Syntéza klotrimazolu může být prováděna v několika krocích znázorněných na obr. 2.3. Při přípravě klotrimazolu nejprve dochází k radikálové chloraci *o*-chlortoluenu, následně k reakci s benzenem v přítomnosti bezvodého chloridu hlinitého. Po dvojnásobné Friedelově-Craftsově alkylaci vzniká derivát tritylchloridu, který v přítomnosti triethylaminu alkyluje imidazol za vzniku klotrimazolu [11].



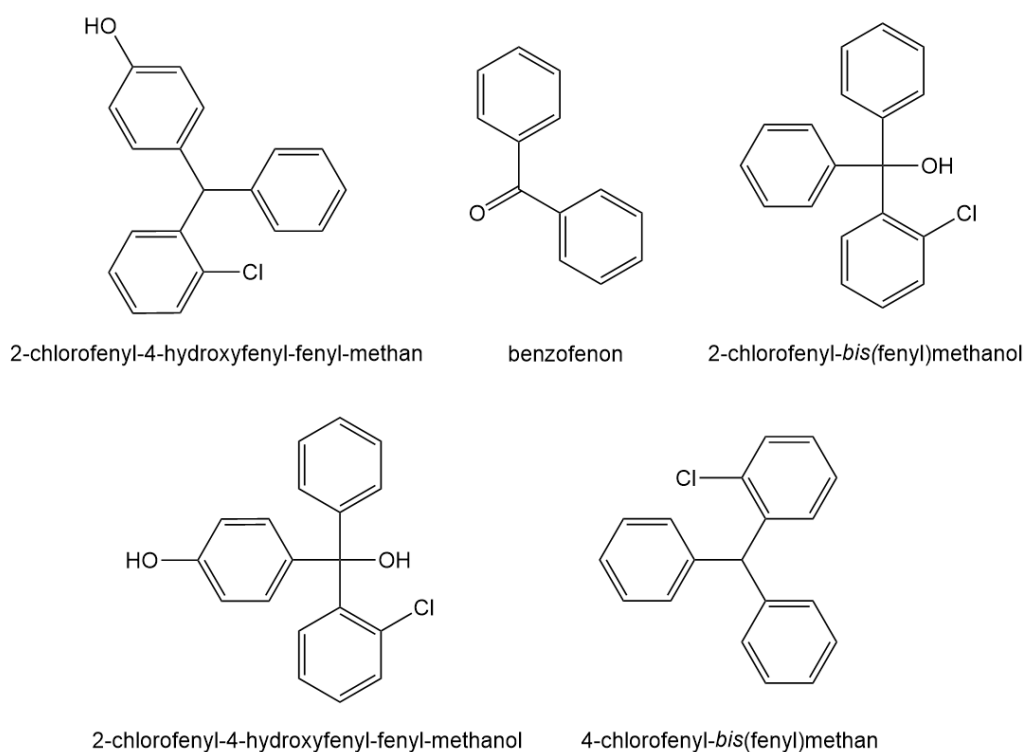
Obr. 2.3 Schéma syntézy klotrimazolu (upraveno podle [11]).

2.4 Farmakologické vlastnosti klotrimazolu

Všechna azolová antimykotika včetně klotrimazolu interferují s biosyntézou esenciálního ergosterolu, který je hlavní látkou obsaženou v buněčných membránách nižších eukaryot, a to především u hub a kvasinek [1, 12]. Vazba klotrimazolu na cytochrom P450 inhibuje přeměnu lanosterolu na ergosterol a tím narušuje normální propustnost a fluiditu membrány, což vede k lýze buňky. Klotrimazolem blokováná syntéza ergosterolu spočívá v inhibici enzymu 14α -demethylasy (cytochrom P450 monooxygenasy), který je nezbytnou součástí při biosyntéze ergosterolu [1]. Klotrimazol také reaguje s mitochondriálními a peroxizomálními enzymy, což má za následek zvyšující koncentraci peroxidu vodíku, který pravděpodobně napomáhá k zániku buňky (autodigesce peroxidem vodíku) [12, 13]. Hlavní způsob působení klotrimazolu je tedy strukturální a funkční poškození cytoplazmatické membrány, které vede k úniku intracelulárních sloučenin fosforu a zároveň dochází k rozkladu nukleových kyselin a k efluxi draslíku [7].

Po absorpci, která při dermální a vaginální aplikaci dosahuje hodnoty menší než 2 %, je klotrimazol metabolizován oxidací a degradací imidazolového kruhu (deaminací a *O*-dealkylací) na neúčinné metabolity. Mezi hlavní metabolity se řadí 2-chlorofenyl-4-hydroxyfenyl-fenylomethan znázorněný na obr. 2.4 spolu s dalšími metabolity klotrimazolu. Inaktivní metabolity se vážou na plazmatické bílkoviny a po 2–6 hodinách je dosaženo jejich

maximální koncentrace v plazmě, která činí $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ [14]. Většina inaktivní formy je vylučována do žluče a odchází z těla stolicí. Tato primární cesta eliminace zahrnuje 60 % metabolitů, 2–15 % inaktivní formy klotrimazolu je vylučováno močí a pouze 1 % je z těla vyloučeno v nezměněné formě [2, 14]. Díky rychlé biotransformaci klotrimazolu dochází po 48 hodinách k jeho úplné eliminaci [3].



Obr. 2.4 Strukturní vzorce hlavních metabolitů klotrimazolu (upraveno podle [7])

2.5 Dostupné lékové formy klotrimazolu

V České republice se účinná látka klotrimazol vyskytuje v mnoha lékových formách pod různými obchodními jmény. Běžně k dostání je ve formě krému, vaginálních tablet či spreje. V jiných státech, především v USA, jsou dostupné i orální tablety proti orofaryngeální kandidóze, které ovšem vykazují řadu nežádoucích účinků [1].

2.5.1 Krém

Klotrimazol ve formě bílého homogenního krému je volně prodejný léčivý přípravek, který lze koupit pod obchodními názvy, jako jsou Canesten, Candibane či Jenamazol. Obsah účinné látky v krému činí 10 mg g⁻¹ [13–15]. Terapeutická indikace zahrnuje mykotické infekce kůže způsobené kvasinkami, dermatofyty a plísněmi, jež se následně mohou projevit jako mykotická onemocnění kůže (např. *Pityriasis versicolor*, *Tinea cruris*), kožních záhybů a nohou [16]. Dále lze použít krém jako doplňkovou léčbu při mykóze nehtů. Velké využití má v léčbě gynekologických infekcí u žen i u mužů vyvolané nejčastěji plísněmi rodu *Candida*. Mezi nejčastější infekce vyvolané kvasinkou *Candida albicans* se řadí vulvovaginální kandidóza [18, 19]. Kromě zánětů též účinkuje proti infekcím pochvy způsobené především streptokoky a stafylokoky, které řadíme mezi grampozitivní mikroby. Opakující infekce mohou indukovat jiná závažná onemocnění, včetně HIV infekce [14, 15].

Nežádoucí reakce na krémy s účinnou látkou klotrimazol se vyskytují ojediněle a zahrnují převážně podráždění kůže. U pacientů se může vyskytnout přechodné zarudnutí, pocit píchání nebo pálení v místě aplikace. U přípravku Canesten Gyn zahrnují nežádoucí účinky dysurii či bolest břicha [13]. Při léčbě gynekologických problémů byla zaznamenána alergická reakce u pacientek přecitlivělých na látky cetylstearylalkohol a benzylalkohol. Další pomocné látky jsou sorbitan-stearát, polysorbát 60, cetyl-palmitát a oktyldodekanol, umělá vorvaňovina a čišťená voda. U pacientů léčených klotrimazolem je pozorována nižší účinnost amfotericinu a dalších polyenových antibiotik (nystatin, natamycin) [13–15].

2.5.2 Vaginální tablety

Léčba krémem při gynekologických problémech je ve většině případů doprovázena aplikací vaginálních tablet, které mají totožnou terapeutickou indikaci. Mezi časté infekce způsobené kvasinkou *Candida albicans* se řadí vulvovaginální kandidóza postihující alespoň jednou za život 70 % ženské populace [17, 18]. Bílá podlouhlá bikonvexní vaginální tableta s obsahem účinné látky 100, 200 nebo 500 mg má obdobnou indikaci jako krém.

Indikace zahrnují přecitlivost na účinnou látku klotrimazol nebo na další složky přípravku, se projevují lokálními alergickými reakcemi [20]. V ojedinělých případech se může u pacientky projevit edém sliznice pochvy. Vaginální tablety nejsou doporučovány těhotným ženám v prvním trimestru těhotenství z důvodu nebezpečí spontánního potratu. Toto podezření plyne ze studie publikované v roce 1987, avšak výsledky dosud nebyly

náležitě potvrzeny [21]. Opakující aplikace vaginálních tablet má za následek změnu vaginální mikroflóry [17]. Vedle účinné látky obsahují vaginální tablety kukuřičný škrob, adipovou kyselinu, hydrogenuhličitan sodný, polyvinylpyrrolidon, stearát hořečnatý, koloidní bezvodý oxid křemičitý, polysorbát 80 a monohydrát laktosy [12, 21].

2.5.3 Kožní sprej

Bezbarvý až slabě nahnědlý roztok s obsahem účinné látky klotrimazolu 10 mg cm^{-3} má široké terapeutické uplatnění. Je využíván pro léčbu *Pityriasis versicolor*, povrchových kandidóz a kožních mykóz způsobené kvasinkami, plísněmi či dermatofyty. Pomocné látky jsou oktyldodekanol, benzylalkohol, makrogol 400, propylenglykol, dihydrát natriumcitrátu, čistěná voda a izopropylalkohol, který zapříčiňuje charakteristický zápach kožního spreje. Hypersenzitivita se může projevit na kteroukoli pomocnou látku, avšak nejčastější příčina je propylenglykol, jehož koncentrace činí 546 g dm^{-3} [22].

2.6 Metody pro stanovení klotrimazolu

Pro stanovení obsahu klotrimazolu v různých lékových formách bylo navrženo mnoho analytických metod. Mezi hlavní metody stanovení obsahu klotrimazolu patří převážně vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Stanovení azolových antimykotik včetně klotrimazolu metodou HPLC ve farmaceutických přípravcích se zabývá práce autorů Abdal-Moety a kol. [23]. Autoři v této studii použili reverzní stacionární fázi C18, kde jako mobilní fázi sloužila směs obsahující acetonitril a 25mM trishydroxymethylaminomethan ve fosfátovém pufru při $\text{pH} = 7,00$ (55:45). Detekce UV probíhala při vlnové délce 260 nm a limit detekce klotrimazolu činil $10,00 \text{ g dm}^{-3}$ [23]. Chou a kol. [24] publikovali práci, kde ke stanovení klotrimazolu v kosmetických a farmaceutických přípravcích, použili nejdříve extrakci superkritickou tekutinou a následně vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na koloně C18 za použití izokratické eluce s mobilní fází methanol, voda, diethylamin a octová kyselina v poměru 80:20:0,3:0,2 při $\text{pH} = 7$. Detekce probíhala při vlnové délce 224 nm za využití detektoru s diodovým polem. Nejnižší relevantní detekovatelné množství klotrimazolu touto metodou je $0,42 \text{ g dm}^{-3}$. Pro stanovení klotrimazolu v komerčně dostupných léčivech využil Cakar a kol. [25] tenkovrstvou chromatografií s denzitometrickou kvantifikací za použití mobilní fáze obsahující směs ethylacetátu, heptanu a methanoldiethylaminu, kde limit detekce činil $0,03 \text{ g dm}^{-3}$.

Ke stanovení klotrimazolu lze vedle chromatografických metod využít též elektromigrační metody, mezi nimiž dominují CZE a MEKC. Kapilární zónovou elektroforézu využili Adela Arranz a kol. [26] pro současné stanovení směsi tří imidazolových léčiv včetně klotrimazolu v prostředí octové kyseliny-Tris pufru při pH = 5,18 za UV detekce. Nejnižší množství klotrimazolu, jež lze touto metodou relevantně detekovat, je 159,00 g dm⁻³.

S využitím metody CZE autoři Wienen a kol. [27] detegovali klotrimazol v plazmě s limitem detekce 0,30 g dm⁻³. V této analýze sloužil jako vnitřní standard ketokonazol. Micerální elektroforetickou chromatografií použili Lin a Wu [9], kteří pro separaci klotrimazolu použili dodecylsulfát sodný, acetonitril a butanol při pH = 7.20. Nejnižší relevantní detekovatelné množství klotrimazolu touto metodou je 13,00 g dm⁻³.

Podle Českého lékopisu 2017 lze klotrimazol jako čistou substanci stanovit titračně [8]. Vzorek o hmotnosti 0,300 g se rozpustí v octové kyselině a následně se titruje 0,1M kyselinou chloristou. Titrace je prováděna do okamžiku, kdy vizuální indikátor naftolbenzein změní barvu z hnědožluté na zelenou.

Kromě již zmíněných metod lze k detekci klotrimazolu využít například diferenční pulsní polarografii. Pereira a kol. [28] zjistili, že klotrimazol v pufru Britton-Robinson při pH = 2,00 reaguje s reaktivním barvivem. Touto metodou lze nepřímo stanovit klotrimazol v přítomnosti přebytku barviva, jelikož produkt reakce vykazuje diferenciální pulsní polarografický pík při - 0,38 V proti visící rtuťové elektrodě. Nejnižší množství klotrimazolu, jež lze touto metodou relevantně detekovat, je 2,60 mg dm⁻³.

Pro stanovení obsahu klotrimazolu lze použít i fotoakustickou spektroskopii, kterou využili autoři Schendzielorz a kol. [29].

2.7 Principy vybraných metod pro stanovení klotrimazolu

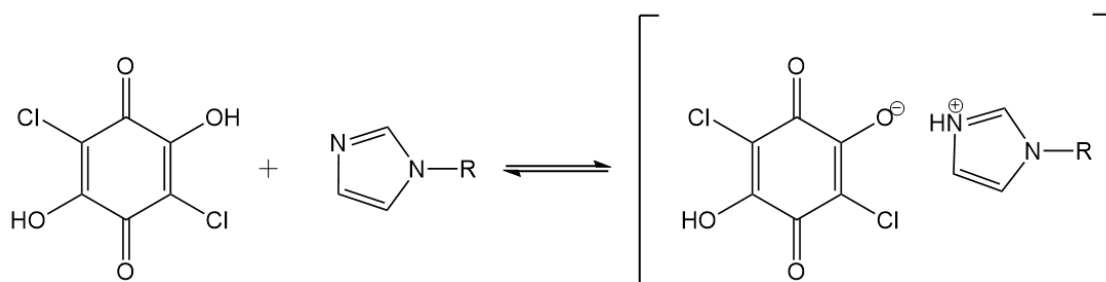
V této bakalářské práci jsou využity tři metody stanovení klotrimazolu v různých lékových formách (vaginální tablety, krém a sprej). První vybranou metodou byla molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti, při níž byla využita metoda kalibrační závislosti a také metoda přídatku standardu. Druhou vybranou metodou byla molekulová absorpční spektroskopie ve viditelné oblasti, při níž byl klotrimazol převeden na barevný komplex. Poslední použitá metoda byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi.

2.7.1 Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti

V této bakalářské práci je využita metoda podle Hoogerheida a Wyka [30], která popisuje stanovení obsahu klotrimazolu pomocí molekulové absorpční spektrometrie v UV oblasti v prostředí methanolu při vlnové délce 259 nm.

2.7.2 Molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti

Pro stanovení klotrimazolu ve farmaceutických výrobcích bylo navrženo několik spektrometrických metod ve VIS oblasti. V této bakalářské práci byla vybrána metoda podle Khashaba a kol. [31] založená na vzniku barevného komplexu mezi *p*-chloranilovou kyselinou a imidazolovou částí klotrimazolu v prostředí acetonitrilu, znázorněná na obr. 2.4. V této studii autoři měřili absorbanci při vlnové délce 520 nm proti slepému pokusu.



Obr. 2.4 Vznik barevného komplexu mezi *p*-chloranilovou kyselinou a imidazolovou jednotkou klotrimazolu (upraveno podle [31])

2.7.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Dle Evropského lékopisu 2019 [32] lze stanovit klotrimazol pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie za využití kolony C-18 (150×4,5 mm; 5 μm), která je temperovaná na teplotu 40 °C. Mobilní fáze je složena z acetonitrilu a z roztoku připraveného rozpuštěním 1,0 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 0,5 g tetrabutylammonium hydrogensulfátu ve vodě a zředěného vodou na 1000 ml. Obsah klotrimazolu je stanovován pomocí gradientové eluce při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Konečná UV detekce probíhá při vlnové délce 210 nm a zjištěný retenční čas klotrimazolu činí 12 minut.

Obsah klotrimazolu podle Amerického lékopisu 2020 [33] lze stanovit za použití kolony C-18 (250×4,5 mm; 5 μm), jenž je temperovaná na teplotu 40 °C. Mobilní fáze obsahuje acetonitril a vodný roztok 0,43 % hydrogenfosforečnanu draselného v poměru 3:1. Dle této metody je při isokratické eluci průtok mobilní fáze 1,5 ml/min a retenční čas klotrimazolu 12 minut.

Podle Britského lékopisu 2020 [34] lze klotrimazol stanovit pomocí kolony C-18 (200×4,6 mm; 5 μm). Během měření je kolona temperována na laboratorní teplotu. Mobilní fáze je složena z kyseliny fosforečné o koncentraci 1,96 g dm⁻³ a methanolu. Konečná UV detekce probíhá při vlnové délce 215 nm a zjištěný retenční čas klotrimazolu činí 12 minut.

2.8 Preciznost a pravdivost analytických měření

Vzájemnou shodu výsledků získaných měření totožného vzorku přesně stejným postupem popisuje preciznost. Preciznost bývá definována směrodatnou odchylkou, rozptylem, rozpětím a variačním koeficientem [35]. Pravdivost vyjadřuje těsnost shody mezi referenční hodnotou veličiny a aritmetickým průměrem získaného z nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny [36].

3 Experimentální část

3.1 Analyzované léčivé přípravky

Pro stanovení obsahu klotrimazolu byly použity následující léčivé přípravky:

1. Krém Clotrimazol AL 10 mg g⁻¹, STADA AG (Německo), číslo šarže 01291, použitelné do 05/2023.
2. Krém Canesten 10 mg g⁻¹, Bayer (Německo), číslo šarže GP023B2, použitelné do 12/2023.
3. Vaginální tablety Clotrimazol AL 100 mg v jedné tabletě, STADA AG (Německo), číslo šarže 03018, použitelné do 07/2025.
4. Sprej Candibene 10 mg ml⁻¹, Teva Pharmaceutical Industries (Izrael), číslo šarže X07999A, použitelné do 04/2023.

3.2 Použité chemikálie

- Acetonitril, HPLC Supra-Gradient (Biosolve Chimie, Francie)
- Deionizovaná voda o měrné vodivosti < 0,05 μS cm⁻¹, získaná přístrojem Milli-Q (Millipore, USA).
- Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., (Lachema, ČR)
- Methanol, HPLC Supra-Gradient (Biosolve Chimie, Francie)
- *p*-chloranilová kyselina, ≤ 98 % (Sigma-Aldrich)

3.3 Pracovní postupy použitých metod

3.3.1 Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti

Příprava roztoků

1. Zásobní roztok klotrimazolu byl připraven odvážením 0,0172 g standardu klotrimazolu, který byl kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Baňka byla následně doplněna po rysku methanolem. Koncentrace klotrimazolu v tomto zásobním roztoku činila $0,35 \text{ g dm}^{-3}$.

Měření

Ke spektrometrickému měření v UV oblasti byl použit jednopaprskový spektrometr HP 8453 s diodovým polem firmy Hewlett Packard. Měření probíhalo v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm. Absorpční spektrum bylo měřeno od 200 do 400 nm. Pro stanovení obsahu klotrimazolu v analyzovaných lékových formách (krém, vaginální tablety a sprej) byla použita metoda kalibrační závislosti a metoda přídatku standardu.

Metoda kalibrační závislosti

Pro metodu kalibrační závislosti byly z prvního standardního roztoku klotrimazolu připraveno šest roztoků o koncentracích 0,17 až $0,35 \text{ g dm}^{-3}$. Do 10,00 ml odměrných baněk bylo odpipetováno 0,50 ml, 1,00 ml, 2,50 ml, 5,00 ml, 7,50 ml a 10,00 ml roztoku standardu klotrimazolu. Všechny baňky byly následně doplněny po rysku methanolem a poté bylo změřeno jejich spektrum. Byla určena maximální vlnová délka, která činila 261 nm a následně ze změřených spekter byla vytvořena kalibrační závislost.

Na analytických vahách bylo naváženo 0,500 g krému Canesten, který byl kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky a doplněn po rysku methanolem. Navážka krému byla rozpuštěna pomocí ultrazvukové lázně po dobu pěti minut a následně byla změřena absorbance při vlnové délce 261 nm.

Vyhodnocení

Pro stanovení obsahu klotrimazolu v léku Canesten metodou kalibrační závislosti byl použit následující vztah

$$w_{Clo} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{A_{260} - b}{a} \cdot M_{Clo} \cdot V_{MeOH} \cdot 100 \quad (3.1)$$

kde w_{Clo} je obsah klotrimazolu ve vzorku [%], m_{nalez} je hmotnost klotrimazolu [g], A_{260} je naměřená absorbance, b je úsek lineární regrese kalibrační závislosti, a je směrnice lineární regrese kalibrační závislosti [$\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$], M_{Clo} je molární hmotnost klotrimazolu [$344,84 \text{ g mol}^{-1}$], V_{MeOH} je objem připraveného roztoku [$0,05 \text{ dm}^3$] a m_{deklar} hmotnostní obsah klotrimazolu deklarovaný výrobcem [g].

Metoda přidavku standardu

Ke stanovení klotrimazolu pomocí metody přidavku standardu v UV oblasti byla připravena sada šesti roztoků o odlišných koncentracích klotrimazolu. Nejprve bylo do všech 10,00 odměrných baněk odpipetováno stejné množství roztoku vzorku. Vzorek byl připraven totožným postupem jako při metodě kalibrační závislosti. Navážka 0,500 g vzorku byla rozpuštěna v 50,00 ml odměrné baňce v methanolu pomocí ultrazvukové lázně po dobu pěti minut. Po odpipetování 5,00 ml roztoku vzorku do každé baňky bylo pomocí skleněné pipety přidáno 0,00, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 a 5,00 ml standardu klotrimazolu a všechny odměrné baňky byly doplněny po rysku methanolem. Opět byla u všech vzorků změřena absorbance proti slepému vzorku při vlnové délce 261 nm.

Vyhodnocení

Pro stanovení obsahu klotrimazolu v krému Canesten metodou přidavku standardu byl použit následující vztah

$$w_{Clo} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{b}{a} \cdot M_{Clo} \cdot V_{MeOH} \cdot 100 \quad (3.2)$$

kde w_{CLO} je obsah klotrimazolu ve vzorku [%], m_{nalez} je hmotnost klotrimazolu [g], b je úsek lineární regrese kalibrační závislosti, M_{CLO} je molární hmotnost klotrimazolu [344,84 g mol⁻¹], a je směrnice lineární regrese kalibrační závislosti [mol⁻¹ dm³], V_{MeOH} je objem připraveného roztoku [0,05 dm³] a m_{deklar} hmotnostní obsah klotrimazolu deklarovaný výrobcem [g].

3.3.2 Molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti

Příprava roztoků

1. Zásobní roztok klotrimazolu byl připraven odvážením 0,0201 g standardu klotrimazolu do 100,00 ml odměrné baňky. Baňka byla poté doplněna po rysku acetonitrilem. Koncentrace klotrimazolu v tomto zásobním roztoku byla 0,2 g dm⁻³.
2. Zásobní roztok *p*-chloranilové kyseliny byl připraven navážením 0,3500 g *p*-chloranilové kyseliny, která byla kvantitativně převedena do 100,00 ml baňky a rozpouštěna v acetonitrilu. Rozpouštění bylo urychleno vložením 100,00 ml baňky do ultrazvuku po dobu 10 minut. Koncentrace *p*-chloranilové kyseliny byla 3,5 g dm⁻³.

Měření

Ke spektrometrickému stanovení ve VIS oblasti byl použit jednopaprskový spektrometr HP 8453 s diodovým polem firmy Hewlett Packard. Měření probíhalo v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm. Absorpční spektrum bylo měřeno od 400 do 800 nm. Pro stanovení obsahu klotrimazolu v analyzovaných lékových formách (krém, vaginální tablety a sprej) byla použita metoda přidavku standardu.

Metoda přidavku standardu

Pro stanovení obsahu klotrimazolu ve všech vybraných lékových formách byla použita metoda přidavku standardu ve VIS oblasti. Při stanovení klotrimazolu ve spreji Candibene byla třikrát připravena sada sedmi roztoků o odlišné koncentraci klotrimazolu. Nejprve byl 1,00 ml spreje odpipetován do 25,00 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku

acetonitrilem. Do sedmi 10,00 ml odměrných baněk byl pipetován 1,00 ml zásobního roztoku chloranilové kyseliny. Následně bylo přidáno do první baňky 0,00 ml a do následujících šesti odměrných baněk 1,00 ml roztoku vzorku. Pomocí skleněné pipety bylo do všech baněk pipetován standard o objemu 0,00, 0,00, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 a 5,00 ml. Po uplynutí sedmi minut byly odměrné baňky doplněny po rysku acetonitrilem a u všech byla změřena absorbance při vlnové délce 517 nm.

Při stanovení obsahu klotrimazolu ve dvou různých krémech značky Canesten a Clotrimazol Al se postupovalo totožně. Nejprve byla přesná navážka okolo 1,00 g krému kvantitativně převedena do 25,00 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku acetonitrilem. Baňka s obsahem krému 1,00 g byla vložena v kádince s teplou vodou do ultrazvuku a byla zde ponechána po dobu 30 minut. Po uplynutí určené doby byla 25,00 ml odměrná baňka zchlazena v lednici a ponechána stát při laboratorní teplotě z důvodu usazení nerozpuštěného krémového základu. Pro úplné oddělení byla následně horní fáze roztoku přesunuta do polyethylenových mikrozkušavek typ Eppendorf, které byly vloženy do centrifugy po dobu 10 minut. Pro metodu přídatku standardu byla třikrát připravena sada sedmi roztoků o koncentracích 0–100 mg dm⁻³ standardu klotrimazolu a bylo postupováno stejným způsobem jako při stanovení obsahu klotrimazolu ve spreji. Taktéž bylo do všech 10,00 ml odměrných baněk napipetován 1,00 ml zásobního roztoku chloranilové kyseliny, standard o objemu 0,00, 0,00, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 a 5,00 ml. Následně bylo přidáno do první baňky 0,00 ml a do následujících šesti odměrných baněk 1,00 ml roztoku vzorku. Po uplynutí sedmi minut byly všechny baňky doplněny po rysku acetonitrilem a byla změřena jejich absorbance proti slepému vzorku při vlnové délce 500 nm.

U stanovení obsahu klotrimazolu ve vaginálních tabletách Clotrimazol AL se postupovalo analogicky jako u předchozích lékových formách. Vaginální tablety byly nejprve rozdrceny na jemný prášek. Na analytických vahách bylo naváženo 0,151 g rozdrcené tablety a navážka byla kvantitativně převedena do 25,00 ml odměrné baňky a doplněna acetonitrilem po rysku. Pro úplné rozpuštění jemného prášku byla odměrná baňka vložena po dobu 15 minut do ultrazvuku. Po uplynutí požadované doby byl vzorek pomocí centrifugy odstředěn. Následně byla v 10,00 ml odměrných baněk připravena sada sedmi vzorků o různé koncentraci klotrimazolu. Do všech odměrných baněk byl pipetován 1,00 ml *p*-chloranilové kyseliny. Pomocí skleněných pipet byl dále do všech baněk kromě první pipetován 1,00 ml roztoku vzorku a poté standard o objemu 0,00, 0,00, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 a 5,00 ml. Po uplynutí sedmi minut byly všechny 10,00 ml odměrné baňky doplněny acetonitrilem. Absorbance byla změřena při vlnové délce 500 nm u všech vzorků.

Vyhodnocení

Pro stanovení obsahu klotrimazolu ve vybraných lékových formách (krém, vaginální tablety, sprej) metodou přidavku standardu byl použitý následující vztahy:

a) pro krém Clotrimazol

$$w_{Clo} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{b}{a}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

b) pro krém Canesten

$$w_{Clo} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{b}{a}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.4)$$

c) pro sprej Candibene

$$w_{Clo} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{b}{a}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.5)$$

d) pro vaginální tablety Clotrimazol AL

$$w_{Clo} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{b}{a}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.6)$$

kde w_{CLO} je obsah klotrimazolu ve vzorku [%], m_{nalez} je nalezená hmotnost klotrimazolu ve vzorku [g], c_{nalez} je nalezená koncentrace klotrimazolu ve vzorku [mol dm^{-3}], b je úsek lineární regrese závislosti absorbance na koncentraci přidavku standardu, a je směrnice lineární regrese závislosti absorbance na koncentraci přidavku standardu [$\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$], M_{CLO} je molární hmotnost klotrimazolu [$344,8 \text{ g mol}^{-1}$], V_{MeOH} je objem připraveného roztoku [$0,01 \text{ dm}^3$], m_{deklar} hmotnostní obsah klotrimazolu deklarovaný výrobcem [g], c_{deklar} koncentrace klotrimazolu deklarovaná výrobcem [mol dm^{-3}].

3.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Příprava roztoků

1. Zásobní roztok klotrimazolu byl připraven odvážením 0,020 g standardu klotrimazolu. Navážka byla kvantitativně přesunuta do 100,00 ml odměrné baňky a doplněna po rysku acetonitrilem. Koncentrace klotrimazolu v zásobním roztoku činila $0,2 \text{ g dm}^{-3}$.
2. Roztok hydrogenfosforečnanu draselného byl připraven navážením 4,350 g K_2HPO_4 a rozpuštěním v Milli-Q vodě v 1000 ml odměrné baňce.

Měření

Stanovení obsahu klotrimazolu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí při 210 nm bylo realizováno na přístroji UHPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko) s detektorem s diodovým polem. Kolona Kinetex C-18 (100×3,5 mm; 2,6 μm) byla temperována na teplotu 30 °C. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a z vodného roztoku 0,43 % hydrogenfosforečnanu draselného v poměru 3:1. Průtok mobilní fáze při isokratické eluci činil 1 ml min^{-1} .

HPLC stanovení

Pro kalibrační závislost bylo vytvořeno sada sedmi roztoků o odlišné koncentraci standardu klotrimazolu. Do 10,00 ml odměrných baněk byl odpipetován standard klotrimazolu o objemu 0,25, 0,35, 0,50, 1,50, 2,50, 3,50 a 5,00 ml. Obsah všech baněk byl doplněn po rysku acetonitrilem. Pro stanovení obsahu klotrimazolu pomocí metody HPLC byl roztok vždy převeden do vialky a uzavřen víčkem se septem.

Při stanovení obsahu klotrimazolu ve spreji Candibene byl nejprve 1,00 ml spreje odpipetován do 25,00 ml odměrné baňky. Po doplnění obsahu baňky acetonitrilem byl roztok převeden do vialek, které byly poté uzavřeny víčkem se septem.

Při stanovení obsahu klotrimazolu ve dvou různých krémech značky Canesten a Clotrimazol Al se postupovalo opět totožně. Nejprve byla přesná navážka okolo 1,00 g kvantitativně převedena do 25,00 ml odměrné baňky a doplněna po rysku acetonitrilem. Následně byla 25,00 ml baňka vložena na 30 minut do ultrazvuku a po uplynutí této doby byl

roztok převeden do polyethylenových mikrozkušavek typu Eppendorf a následně byl odstředěn pomocí centrifugy. Vzorek o objemu 1,00 ml byl odpipetován do 10,00 ml odměrné baňky a doplněn po rysku acetonitrilem. Roztok byl převeden do vialky a uzavřen víčkem se septem.

Pro stanovení klotrimazolu ve vaginálních tabletách byla tableta nejprve důkladně rozdrčena. Navážka, která činila 0,151 g, byla kvantitativně převedena do 25,00 ml odměrné baňky a doplněna po rysku acetonitrilem. Pro rychlejší rozpouštění byla 25,00 ml odměrná baňka vložena do ultrazvuku po dobu 15 minut. Po uplynutí určené doby byl roztok v polyethylenových mikrozkušavek typu Eppendorf odstředěn. Vzorek o objemu 1,00 ml byl následně pomocí skleněné pipety odpipetován do 10,00 ml odměrné baňky a doplněn po rysku acetonitrilem. Výsledný vzorek byl převeden do vialky a uzavřen víčkem se septem.

Všechna stanovení byla provedena v tripletech.

Vyhodnocení

Pro stanovení obsahu klotrimazolu ve vybraných lékových formách (sprej, krém a vaginální tablety) byly použity tyto vztahy:

a) pro krém Clotrimazol

$$w_{Clo} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{A}{a}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.7)$$

b) pro krém Canesten

$$w_{Clo} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{A}{a}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.8)$$

c) pro sprej Candibene

$$w_{Clo} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{A}{a}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.9)$$

d) pro vaginální tablety Clotrimazol AL

$$w_{Clo} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{A}{a}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.10)$$

kde w_{CLO} je obsah klotrimazolu ve vzorku [%], c_{nalez} je nalezená koncentrace klotrimazolu ve vzorku [mol dm^{-3}], c_{deklar} koncentrace klotrimazolu deklarovaná výrobcem [mol dm^{-3}], a je směrnice lineární regrese závislosti plochy chromatografického píku na koncentraci klotrimazolu [$\text{mAU min}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{dm}^3$] a A je plocha píku [mAU min^{-1}]

3.3.4 Statistické zpracování naměřených dat

Statistické zpracování naměřených dat bylo provedeno obvyklými statistickými postupy na hladině významnosti 0,95 (cit. [37]). U hodnot získaných při stanovení obsahu klotrimazolu byl proveden Deanův-Dixonův test pro zjištění odlehlosti výsledků jednotlivých stanovení. Konečné výsledky jsou zapsány jako medián s intervalem spolehlivosti. Jednotlivé grafy a statistické výpočty byly provedeny pomocí softwarových programů Microsoft Excel 2022 (Microsoft Corporation, USA) a OriginPro 6.0 (Microcal Software, USA).

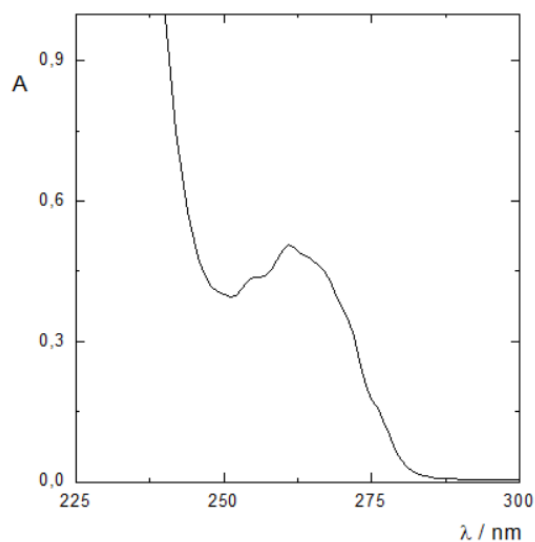
4 Výsledky a diskuze

4.1 Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti

4.1.1 Metoda kalibrační závislosti

Obrázek 4.1 znázorňuje absorpční spektrum standardu klotrimazolu v rozsahu vlnových délek 225–300 nm v prostředí methanolu. Z naměřeného spektra byla jako vhodná vlnová délka pro stanovení vybrána hodnota absorpčního maxima při 261 nm.

Nejprve byla pro stanovení použita metoda kalibrační závislosti, nicméně se ukázalo, že v důsledku interferencí excipientů z lékových forem neposkytuje tento přístup ani pravdivé ani přesné výsledky.



Obr. 4.1 Absorpční spektrum v UV oblasti standardu klotrimazolu o koncentraci $1,72 \text{ g dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (tloušťka absorbující vrstvy 1 cm).

4.1.2 Metoda přidavku standardu

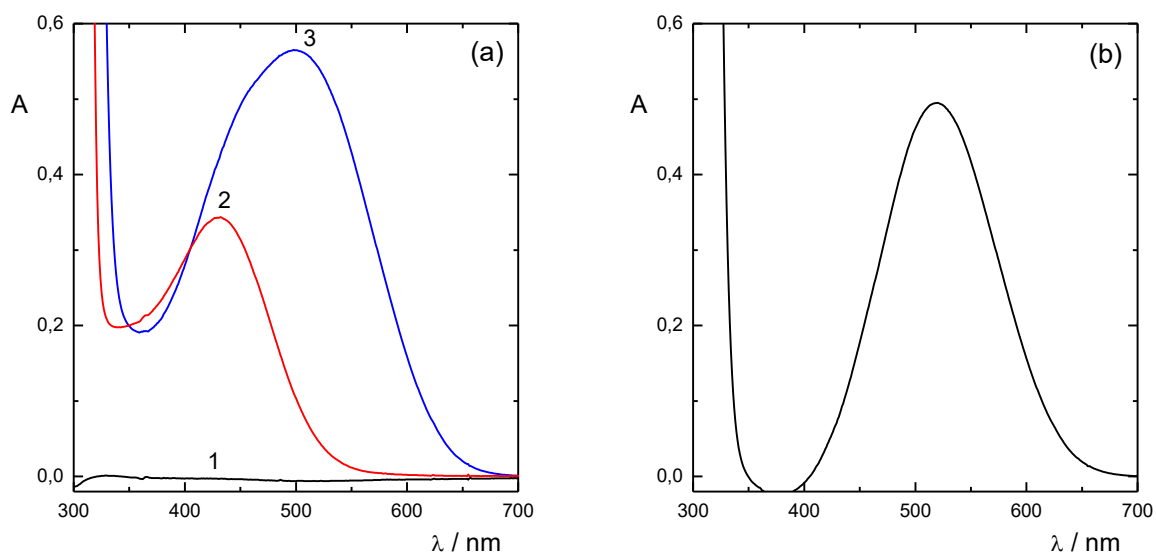
Druhým použitým přístupem pro stanovení klotrimazolu metodou molekulové absorpční spektrometrie v UV oblasti bylo využití metody přidavku standardu. Interference excipientů se projevila i při použití tohoto přístupu, tudíž i tuto metodu nelze použít pro stanovení obsahu klotrimazolu ve vybraných lékových formách jako je krém, vaginální tablety či sprej.

4.2 Molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti

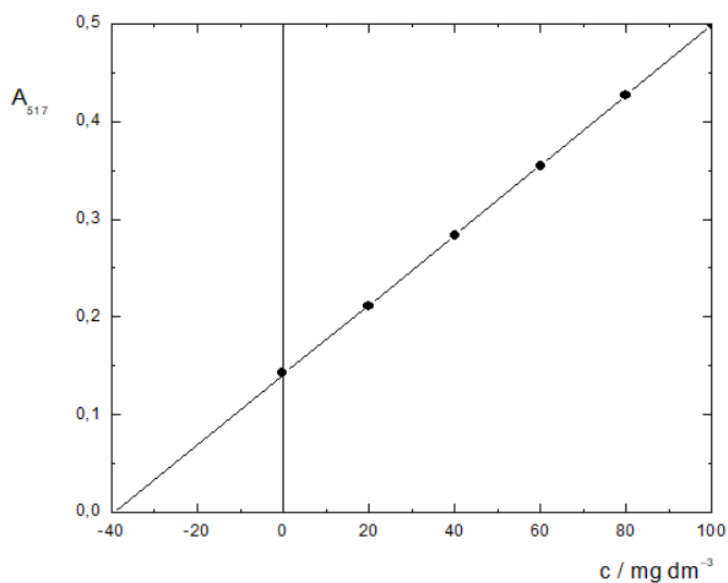
4.2.1 Metoda přidavku standardu

Metoda přidavku standardu ve VIS oblasti byla použita u všech vybraných lékových forem. Na obr. 4.2 (a) je znázorněn průběh absorpčních spekter ve VIS oblasti v prostředí acetonitrilu pro tři různé roztoky. Diferenční graf, který byl vytvořen odečtením spektra roztoku *p*-chloranilové kyseliny od spektra roztoku reakčního produktu standardu klotrimazolu s *p*-chloranilovou kyselinou je znázorněn na obr. 4.2 (b) a ukazuje, že vhodnou vlnovou délkou pro měření je 517 nm. Obrázek 4.3 zobrazuje závislost absorbance při vlnové délce 517 nm na koncentraci přidavku standardu klotrimazolu ve vaginálních tabletách Clotrimazol AL v prostředí acetonitrilu. Získané koncentrace klotrimazolu z lineární regrese závislosti absorbance na koncentraci přidavku standardu jsou zaznamenány v tab. 4. 1. V tabulce jsou zaznamenány koncentrace všech vybraných lékových forem a vypočítaný obsah klotrimazolu ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu. U stanovení obsahu klotrimazolu ve spreji Candibene nedošlo k úplné separaci pomocných látek od stanovované účinné látky, tudíž během měření docházelo k interferenci.

Deanův-Dixonův test neurčil žádný výsledek jako odlehlý. V analyzovaném vzorku krému Clotrimazol AL byl obsah klotrimazolu podle statistického zpracování dat stanoven na 101,3±3,9 %, v krému Canesten 100,3±3,9 %, ve spreji Candibene 110,7±9,36 % a ve vaginálních tabletách Clotrimazol AL 99,3±3,12 %.



Obr. 4.2 (a) Absorpční spektrum ve VIS oblasti v prostředí acetonitrilu (tloušťka absorbujícího prostředí 1 cm): (1) standard klotrimazolu ($c_{\text{CLO}} = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$), (2) *p*-chloranilová kyselina ($c_{\text{CA}} = 8,75 \text{ g dm}^{-3}$), (3) reakční produkt klotrimazolu s *p*-chloranilovou kyselinou ($c_{\text{CLO}} = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$, $c_{\text{CA}} = 8,75 \text{ g dm}^{-3}$). (b) Diferenční graf získaný odečtením spekter (2) a (3).



Obr. 4.3 Závislost absorbance při 517 nm na koncentraci přídatku standardu klotrimazolu při stanovení klotrimazolu ve vaginálních tabletách Clotrimazol AL v prostředí acetonitrilu (tloušťka absorbující vrstvy 1 cm).

Tabulka 4.1

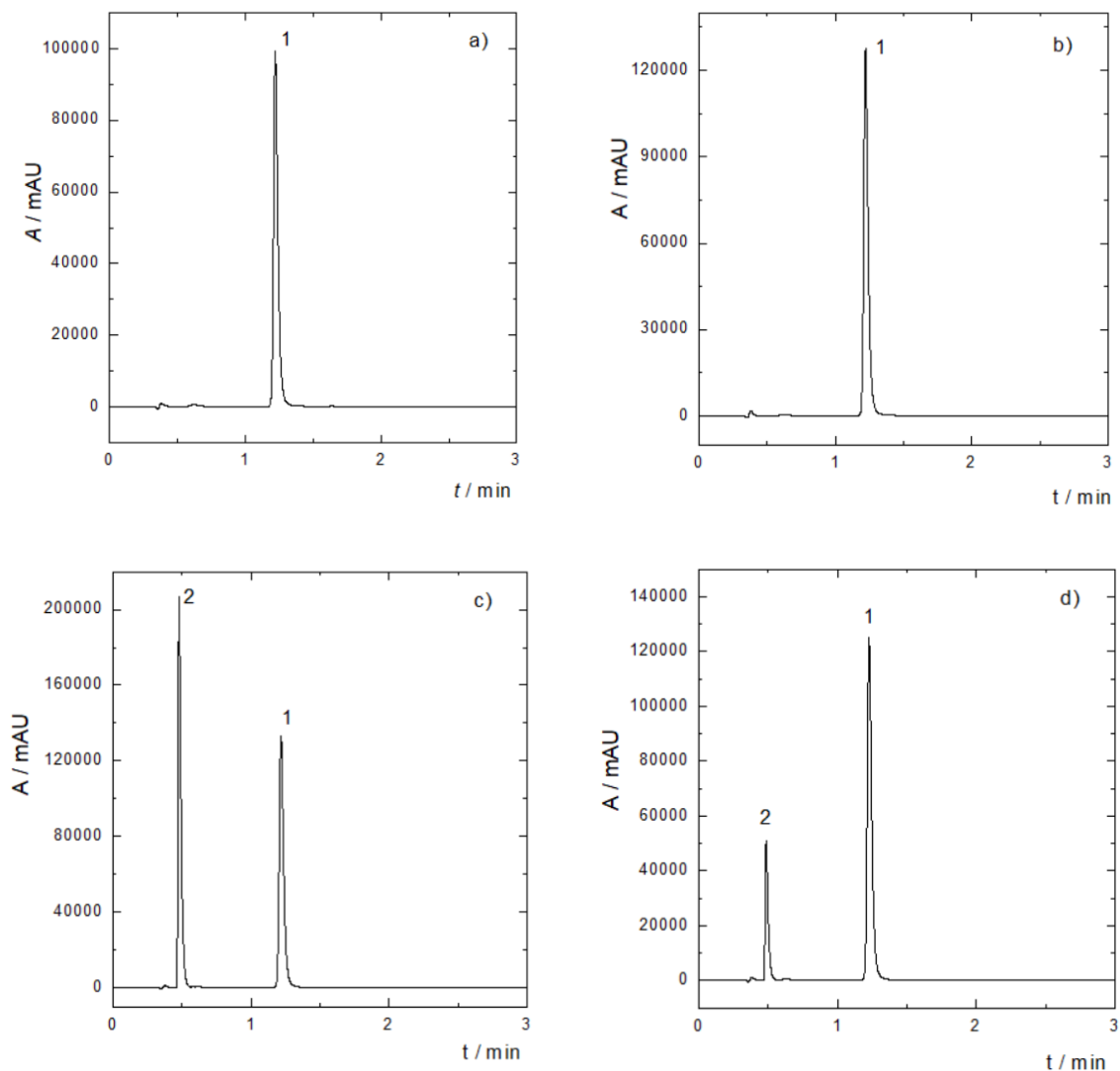
Výsledky stanovení obsahu klotrimazolu v léčivých přípravcích pomocí spektrometrie ve VIS oblasti. V tabulce je zaznamenána změřená koncentrace klotrimazolu pomocí metody přidavku standardu a obsah klotrimazolu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

Analyzovaný přípravek, deklarovaný obsah	Stanovení	$c / \text{mg dm}^{-3}$	$w / \%$
Krém Clotrimazol AL, 10 mg g^{-1}	1	40,2	101,3
	2	41,3	103,0
	3	39,8	100,0
Krém Canesten, 10 mg g^{-1}	1	40,6	102,3
	2	39,4	99,3
	3	39,6	100,3
Sprej Candibene, 10 mg ml^{-1}	1	44,3	110,7
	2	43,3	108,2
	3	46,2	115,4
Vaginální tablety Clotrimazol AL, 100 mg/tbt.	1	40,1	100,4
	2	39,1	98,0
	3	37,5	99,3

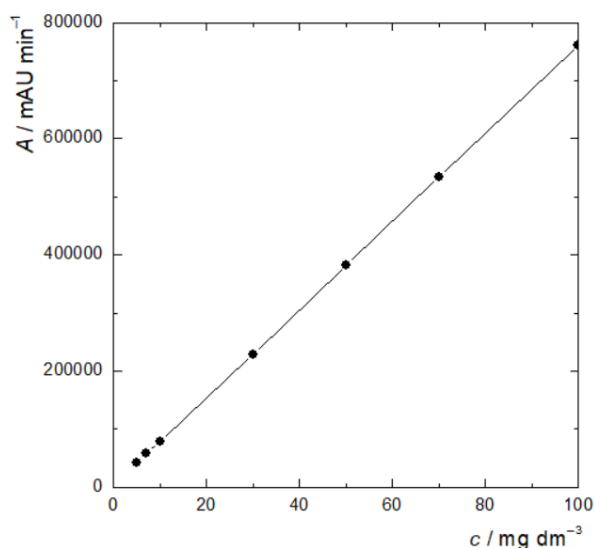
4.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinnou kapalinovou chromatografií bylo možné využít u všech vybraných lékových forem. Na obr. 4.4 jsou zobrazeny chromatogramy s UV detekcí při stanovení čtyř různých vzorků (standardu klotrimazolu, vaginálních tablet Clotrimazol AL, krému Canesten a spreji Candibene), kde pík jedna odpovídá klotrimazolu a pík dva pomocné látky obsažené v lékové formě. Na obr. 4.5 je znázorněna kalibrační závislost plochy chromatografického píku na koncentraci standardu klotrimazolu

V tab. 4.2 jsou zaznamenány naměřené plochy píků a z nich pomocí lineární regrese vypočítané koncentrace jednotlivých lékových forem včetně obsahu klotrimazolu ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu. Deanův-Dixonův test neurčil žádný výsledek jako odlehlý. V analyzovaném vzorku krému Clotrimazol AL byl obsah klotrimazolu podle statistického zpracování dat stanoven na $93,4 \pm 3,12 \%$, v krému Canesten $97,0 \pm 9,23 \%$, ve spreji Candibene $95,3 \pm 1,17 \%$ a ve vaginálních tabletách Clotrimazol AL $97,1 \pm 4,17 \%$.



Obr. 4.4 Chromatogramy s UV detekcí při stanovení klotrimazolu v různých vzorcích. (a) standard klotrimazolu ($c_{\text{clo}} = 30,0 \text{ mg dm}^{-3}$), (b) vaginální tablety Clotrimazol AL ($c_{\text{clo}} = 38,8 \text{ mg dm}^{-3}$), (c) krém Canesten ($c_{\text{clo}} = 39,9 \text{ mg dm}^{-3}$), (d) sprej Candibene ($c_{\text{clo}} = 37,8 \text{ mg dm}^{-3}$). Pík (1) odpovídá klotrimazolu, pík (2) pomocné látky obsažené v lékové formě. Podmínky při HPLC stanovení: kolona Kinetex C-18 (100×3,5 mm; 2,6 μm), teplota kolony 30 °C. Mobilní fáze: acetonitril a vodný roztok 0,43 % hydrogenfosforečnanu draselného (3:1), izokratická eluce, průtok 1 ml min⁻¹, nástřik vzorku 2 μl .



Obr. 4.5 Kalibrační závislost plochy chromatografického píku na koncentraci standardu klotrimazolu. Podmínky při HPLC stanovení: kolona Kinetex C-18 (100×3,5 mm; 2,6 μm), teplota kolony 30 °C. Mobilní fáze: acetonitril a vodný roztok 0,43 % hydrogenfosforečnanu draselného (3:1), isokratická eluce, průtok 1 ml min⁻¹, nástřik vzorku 2 μl.

Tabulka 4.2

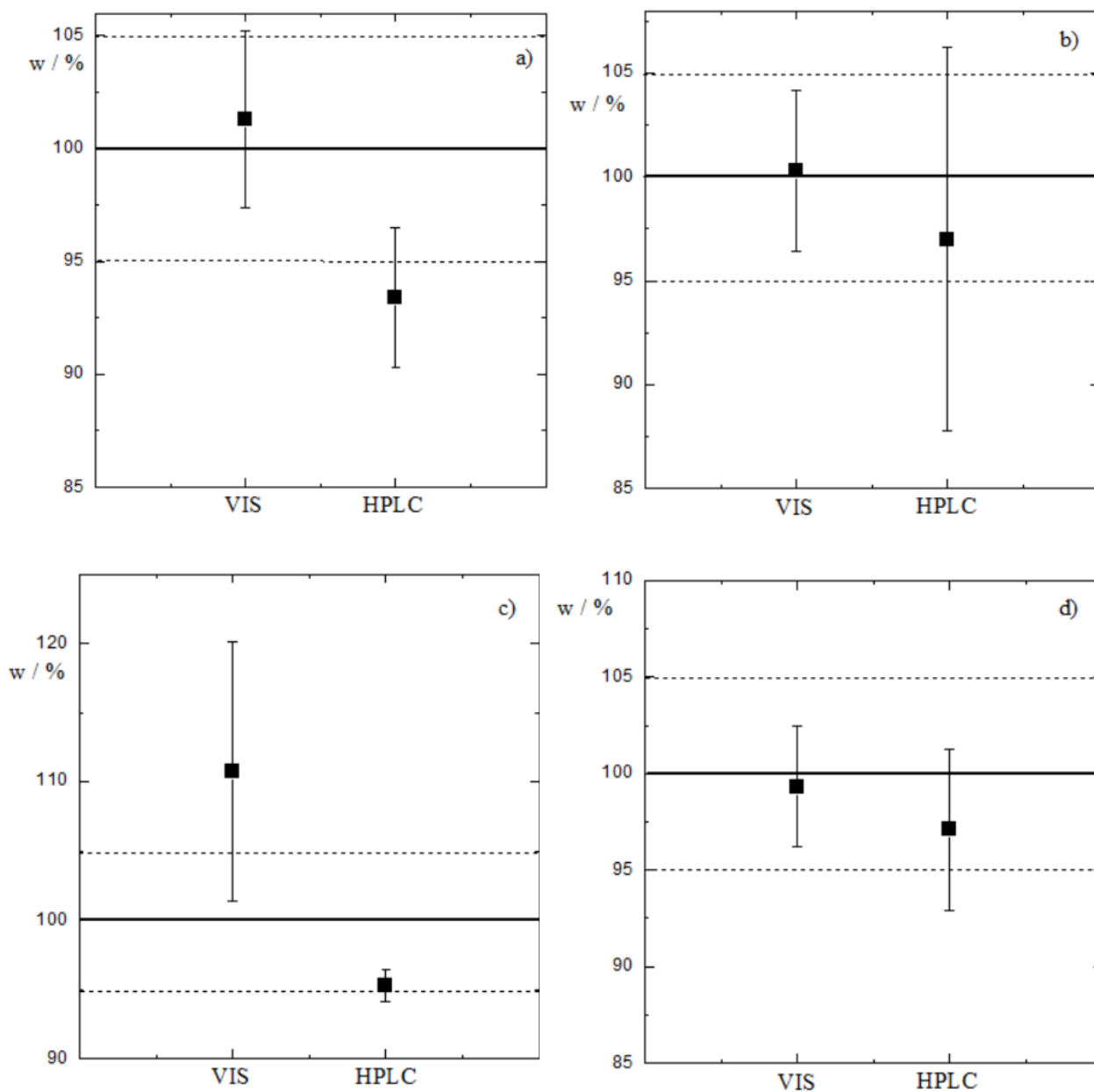
Výsledky stanovení obsahu klotrimazolu v léčivých přípravcích pomocí HPLC. V tabulce je zaznamenána plocha píku, vypočítaná koncentrace klotrimazolu a obsah klotrimazolu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

Analyzovaný přípravek, deklarovaný obsah	Stanovení	$A / \text{mAU min}^{-1}$	$c / \text{mg dm}^{-3}$	$w / \%$
Krém Clotrimazol AL, 10 mg g ⁻¹	1	281442	37,2	92,9
	2	282894	37,4	93,4
	3	288706	38,1	95,3
Krém Canesten, 10 mg g ⁻¹	1	280795	37,1	92,7
	2	293684	38,8	97,0
	3	302385	39,9	99,8
Sprej Candibene, 10 mg ml ⁻¹	1	288542	38,1	95,3
	2	286125	37,8	94,5
	3	289087	38,2	95,4
Vaginální tablety Clotrimazol AL, 100 mg/tbt.	1	283281	37,4	99,1
	2	293544	38,8	97,1
	3	287780	38,0	95,9

4.4 Vyhodnocení pravdivosti a preciznosti vybraných metod

Pravdivost a preciznost vybraných metod (spektrometrické stanovení ve VIS oblasti a HPLC) je graficky znázorněno na obr. 4.6. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián s intervalem spolehlivosti, kde je medián značen černým čtvercem a interval spolehlivosti chybovou úsečkou. Dle Českého lékopisu 2017 [8] se může obsah klotrimazolu v jednotlivých lékových formách (krém, sprej a vaginální tablety) pohybovat v rozmezí 95–105 %. Toto rozmezí je na obr. 4.6 vyobrazeno přerušovanými čarami, a pokud se medián jednotlivých měření zde vyskytuje, lze měření považovat za pravdivé. Z obr. 4.6 plyne, že stanovení klotrimazolu ve spreji Candibene spektrometrickou metodou ve VIS oblasti a stanovení klotrimazolu v krému Clotrimazol AL pomocí metody HPLC, nelze považovat za pravdivé.

Preciznost jednotlivých metod je na obr. 4.6 vyobrazeno pomocí chybových úseček. Stanovení klotrimazolu ve vybraných metodách je více precizní, čím kratší je chybová úsečka. Z obr. 4.6 vyplývá, že nejvíce precizní bylo stanovení klotrimazolu ve spreji Candibene pomocí metody HPLC.



Obr. 4.6 Grafické porovnání výsledků vybraných analytických metod (spektrometrické stanovení ve VIS oblasti s přidavkem standardu a HPLC) pro stanovení klotrimazolu ve vybraných léčivých přípravcích (a) krém Clotrimazol AL, (b) krém Canesten, (c) sprej Candibene a (d) vaginální tablety Clotrimazol AL. Silná čára znázorňuje deklarovaný obsah klotrimazolu v jednotlivých léčivých formách. Dvě slabé přerušované čáry vyznačují dolní a horní mez obsahu klotrimazolu dle Českého lékopisu 2017 [8]. Výsledky jsou zaznamenány jako mediány s intervalem spolehlivosti.

4.5 Vyhodnocení finanční a časové náročnosti vybraných metod

Do finanční náročnosti jednotlivých analytických metod byly zahrnuty ceny chemikálií, které byly využity ke stanovení obsahu klotrimazolu v jednom vzorku. Konečná cena neobsahuje finance za instrumentaci a taktéž nezahrnuje ceny vybraných lékových forem včetně standardu. Ceny všech použitých chemikálií byly převzaty z ceníku firmy Sigma-Aldrich [39]. Z hlediska finanční náročnosti je nejvýhodnější spektrometrické stanovení v UV oblasti, kde byl do finanční náročnosti zahrnut pouze methanol. Naopak nejméně výhodné je spektrometrické stanovení ve VIS oblasti, kde celková cena zahrnuje acetonitril a *p*-chloranilovou kyselinu.

Časová náročnost použitých metod vyjadřuje průměrný čas potřebný k analýze jednoho vzorku. Výsledný čas nezahrnuje přípravu vzorku ani konečný výpočet obsahu klotrimazolu v lékové formě. Časová náročnost spektrometrického stanovení v UV a VIS oblasti je shodný a z časového hlediska nejvýhodnější, naopak časově nejméně výhodná je metoda HPLC.

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání vybraných analytických metod pro stanovení klotrimazolu v lékových formách (krém, sprej a vaginální tablety) z hlediska jejich pravdivosti, preciznosti a taktéž z hlediska finanční a časové náročnosti.

Pro stanovení obsahu klotrimazolu byly zvoleny tři analytické metody: molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti, molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Nejvíce precizní výsledky poskytlo stanovení klotrimazolu ve spreji Candibene pomocí metody HPLC. Naopak nejméně precizní hodnoty byly naměřeny metodou HPLC při analýze krému Canesten. Dle Českého lékopisu 2017 [8] nelze stanovení klotrimazolu ve spreji Candibene spektrometrickou metodou ve VIS oblasti a stanovení klotrimazolu v krému Clotrimazol AL metodou HPLC považovat za pravdivé.

Z hlediska finanční náročnosti byla nejvýhodnější molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti, naopak nejnákladnější metoda byla molekulová absorpční spektrometrie ve VIS oblasti. Nejvíce časově náročnou metodou byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti a VIS oblasti byly časově stejně náročné. Stanovení obsahu klotrimazolu v krému molekulovou absorpční spektrometrií bylo upraveno a zjednodušeno vynecháním extrakce, kterou vyžil Khashaba a kol. [32] ve své práci.

Použitá literatura

1. Crowley PD, Gallagher HC: Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* **117** (2014), 611–617.
2. Hašek J, Sklenář Z: Nové léčivé látky v magistraliter receptuře III – klotrimazol. *Prakt. Lékařem.* **6** (2010), 244–249.
3. Navas JM, Chana A, Herradón B, Segner H: Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound: Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives. *Life Sci.* **76** (2004), 699–714.
4. Lincová D, Farghali, H. a kol.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha, Galén 2002.
5. Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh TJ: Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. *J. Clin. Microbiol.* **38** (2000), 1563–1568.
6. Hašek J: Orafaryngeální kandidóza. *Prakt. Lékařem.* **11** (2015), 8–12.
7. OSPAR Commission: *Hazardous Substances Series: OSPAR background document on clotrimazole*. Dostupné: <https://www.ospar.org/documents?v=7317> (cit. 12.12.2021)
8. *Český lékopis 2017*. Praha, Grada 2017.
9. Lin M, Wu N: Comparison between micellar electrokinetic chromatography and HPLC for the determination of Betamethasone Dipropionate, Clotrimazole and their related substances. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19** (1999), 945–954.
10. Abdelmagheed OH, Khashaba PY: Spectrophotometric determination of clotrimazole in bulk drug and dosage forms. *Talanta* **40** (1993), 1289–1294.
11. Hampl F, Paleček J: *Farmakochemie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2002
12. Státní ústav pro kontrolu léčiv: CANDIBENE, 200MG VAG TBL NOB 3. Dostupné z <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0062863> (cit. 12.12.2021)
13. Státní ústav pro kontrolu léčiv: JENAMAZOL, 20MG/G VAG CRM 20G+APL. Dostupné z <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0100170> (cit. 12.12.2021)

14. Státní ústav pro kontrolu léčiv: CANDIBENE, 10MG/G CRM 20G. Dostupné <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0059185> (cit. 12.12.2021)
15. Státní ústav pro kontrolu léčiv: CANESTEN, 10MG/G CRM 20G. Dostupné <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0013798> (cit. 12.12.2021)
16. Zhao D, Chen B, Wang YT, Jiao CH: Topical clotrimazole cream for the treatment of tinea cruris: A retrospective study. *Medicine (Baltimore)* **99** (2020), e23189.
17. Ross RA, Lee ML, Onderdonk AB: Effect of *Candida albicans* infection and clotrimazole treatment on vaginal microflora in vitro. *Obstet. Gynecol.* **86** (1995), 925–930.
18. Košťálová M: Vulvovaginální kandidóza. *Dermatol. Praxi.* **6** (2012), 81–84.
19. Shabanian S, Khalili S, Lorigooini Z, Malekpour A, Heidari-Soureshjani S: The effect of vaginal cream containing ginger in users of clotrimazole vaginal cream on vaginal candidiasis. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **8** (2017), 80–84.
20. Zhou X, Li T, Fan S, Zhu Y, Liu X, Guo X, Liang Y: The efficacy and safety of clotrimazole vaginal tablet vs. oral fluconazole in treating severe vulvovaginal candidiasis. *Mycoses* **59** (2016), 419–428.
21. Státní ústav pro kontrolu léčiv: CLOTRIMAZOL AL, 100MG VAG TBL NOB 6. Dostupné z <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0058653> (cit. 12.12.2021).
22. Státní ústav pro kontrolu léčiv: CANIFUG LÖSUNG, 10 MG/ML DRM SPR SOL 1X30ML Dostupné z <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0071980> (cit. 12.12.2021).
23. Abdel-Moety EM, Khattab FI, Kelani KM, AbouAl-Alamein AM: Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. *Farmaco* **57** (2002), 931–938.
24. Chou W, Chang Ch, Liu H, Yang K, Wu CH: Supercritical fluid extraction of imidazole drugs from cosmetic and pharmaceutical products. *J. Food Drug.* **15** (2007), 25–32.
25. Cakar M, Popović G, Agbaba D: High-performance thin-layer chromatography determination of some antimycotic imidazole derivatives and preservatives in medicinal creams and a gel. *J. AOAC. Int.* **88** (2005), 1544–1548.
26. Arranz A, Echevarría C, Moreda JM, Cid A, Arranz JF. Capillary zone electrophoretic separation and determination of imidazolic antifungal drugs: *J. Chromatogr. A.* **871** (2000), 399–402.

27. Wiene F, Laug S, Baumann K, Schwab A, Just S, Holzgrabe U: Determination of clotrimazole in mice plasma by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30** (2003), 1879–1887.
28. Pereira FC, Zanoni MV, Guaratini CC, Fogg AG: Differential pulse polarographic determination of clotrimazole after derivatization with Procion Red HE-3B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27** (2002), 201–208.
29. Schendzielorz A, Hanh BD, Neubert RH, Wartewig S: Penetration studies of clotrimazole from semisolid formulation using step-scan FT-IR photoacoustic spectroscopy. *Pharm. Res.* **16** (1999), 42–45.
30. Hoogerheide J, Wyka B: Clotrimazole. *Anal. Profiles Drug Subst.* **11** (1982), 225–255.
31. Khashaba PY, El-Shabouri SR, Emara KM, Mohamed AM: Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22** (2000), 363–376.
32. Council of Europe: *The European Pharmacopoeia 10.0*. Strasbourg, Council of Europe 2019.
33. United States Pharmacopoeia Convention: *The United States Pharmacopoeia 44, National Formulary 39. United States Pharmacopoeia Convention*. Rockville 2021
34. *British Pharmacopoeia*. London, The Stationery Office 2020
35. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR: *Analytická chemie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2019.
36. Plzák Z, Milde D. Nomenklatura a terminologie. *Chem. Listy.* **106** (2012), 41–44
37. Harris D.C.: *Quantitative Chemical Analysis*. 8th Ed. New York, Freeman 2010.
38. <https://www.sigmaaldrich.com/> (cit. 01.05.2022)