

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Optimalizace HPLC stanovení klotrimazolu

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2008

Bc. Petra Žáková

Děkuji PharmDr. H. Sklenářové Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále bych jí také ráda poděkovala za motivaci k dalšímu studiu.

Mé poděkování patří také dalším členům katedry analytické chemie zejména PharmDr. L. Matysové Ph.D., RNDr. D. Šatínskému Ph.D. a Mgr. L. Havlíkové Ph.D. za mnohé rady, pomoc při seznámení s praktickou činností v laboratoři a pomoc při odborných problémech.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové dne 15.4.2008

# Obsah

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
1.1. Úvod a cíl práce.....	11
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 HPLC</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Úvod.....	13
2.1.2 Základní pojmy v chromatografii [2].....	13
2.1.3 Princip separace látek [4].....	13
2.1.4 Kapalinový chromatograf .....	14
2.1.4.1 Čerpací systémy [3] .....	14
2.1.4.2 Dávkovací zařízení [3].....	15
2.1.4.3 Stacionární fáze [3].....	15
2.1.4.4 Chromatografické kolony pro kapalinovou chromatografii .....	16
2.1.4.4.1 Discovery HS F5.....	17
2.1.4.4.2 Chromolith® Performance, RP-18e.....	18
2.1.4.4.3 ZIC® HILIC .....	19
2.1.4.4.4 XTerra® RP 18.....	19
2.1.4.4.5 Discovery RP Amide C 16.....	20
2.1.4.4.6 Zorbax Extend- C18.....	21
2.1.4.4.7 Discovery ZR - PBD.....	21
2.1.4.5 Mobilní fáze [3] .....	22
2.1.4.6 Detektory v HPLC [5].....	23
<b>2.2 Robustnost</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 Definice robustnosti [14] .....	24
<b>2.3 Klotrimazol</b> .....	<b>24</b>
2.3.1 Chemická a fyzikálně-chemická charakteristika .....	24
2.3.2 Terapeutické užití .....	25
<b>2.4 Metody hodnocení klotrimazolu</b> .....	<b>25</b>
2.4.1 Lékopisné stanovení (ČL 2005).....	25
2.4.1.1 Zkoušky totožnosti.....	25
2.4.1.2 Stanovení obsahu – nevodná titrace.....	26
2.4.2 HPLC metody uváděné v literatuře .....	27
2.4.3 Ostatní metody .....	30
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1 Přístrojové vybavení</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2 Chemikálie</b> .....	<b>33</b>
3.2.1 Příprava zásobních roztoků.....	33
3.2.2 Příprava mobilní fáze.....	34
<b>3.3 Úprava chromatografických podmínek - optimalizace metody</b> .....	<b>35</b>

3.3.1. Původní chromatografické podmínky.....	35
3.3.2. Výběr vhodné chromatografické kolony .....	36
3.3.2.1 Discovery HS F5.....	37
3.3.2.2 Chromolith® Performance, RP-18e.....	37
3.3.2.3 ZIC® HILIC .....	37
3.3.2.4 XTerra® RP 18.....	37
3.3.2.5 Discovery RP Amide C 16.....	37
3.3.2.6 Zorbax Extend-C18.....	38
3.3.2.7 Discovery ZR-PBD.....	38
3.3.3 Výběr vhodného vnitřního standardu .....	38
3.3.3.1 Testované látky .....	39
<b>3.4 Testování robustnosti .....</b>	<b>44</b>
3.4.1 Vliv pH mobilní fáze .....	44
3.4.2 Vliv teploty .....	44
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Výběr vhodné chromatografické kolony .....</b>	<b>46</b>
4.1.1 Discovery HS F5.....	46
4.1.2 Chromolith® Performance, RP-18e.....	47
4.1.3 ZIC® HILIC .....	50
4.1.4 XTerra® RP 18.....	51
4.1.5 Discovery RP Amide C 16.....	52
4.1.6 Zorbax Extend-C18.....	53
4.1.7 Discovery ZR-PBD.....	55
<b>4.2 Nové chromatografické podmínky .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3 Výsledky výběru vnitřního standardu .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Testování robustnosti .....</b>	<b>58</b>
4.4.1. Vliv pH mobilní fáze .....	58
4.4.1.1 Roztok standardů – vnitřní standard ibuprofen.....	58
4.4.1.2 Roztok standardů – vnitřní standard verapamil .....	61
4.4.2 Vliv teploty .....	64
4.4.2.1 Roztok standardů – vnitřní standard ibuprofen.....	64
<b>5 ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>69</b>

# Abstrakt

Byla vypracována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení obsahu účinné látky klotrimazolu a příslušných nečistot (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a imidazolu v přípravku Clotrimazol spray 1 %.

Předložená práce byla zaměřena na výběr vhodné chromatografické kolony, složení mobilní fáze, jejího pH a vnitřního standardu pro analýzu léčivého přípravku obsahujícího lokálně užívané antimykotikum klotrimazol. Celkem bylo testováno 7 chromatografických kolon.

Testované kolony: Discovery HS F5 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm); Chromolith® Performance, RP-18e (100 x 3 mm); ZIC® HILIC (3,5  $\mu\text{m}$ , 50 x 2,1 mm); XTerra® RP 18 (5  $\mu\text{m}$ , 100 x 3 mm); Discovery RP Amide C 16 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 3 mm); Zorbax Extend-C18 (3,5  $\mu\text{m}$ , 75 x 4,6 mm); Discovery ZR-PBD (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm).

Jako optimální kolona byla zvolena Discovery ZR-PBD (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm). Tato kolona je na bázi oxidu zirkoničitého, který je potažen vrstvou polybutadienu. Oxid zirkoničitý je stabilní v celém rozsahu pH při vysokém tlaku a teplotě až do 200 °C.

Byla použita spektrofotometrická detekce při 210 nm. Jako optimální mobilní fáze byla vybrána směs acetonitrilu a vody (pH 9,7) v poměru 50:50. pH vodné fáze bylo upraveno roztokem  $\text{NH}_4\text{OH}$  25 % na hodnotu 9,7. Výsledný roztok byl přefiltrován přes membránový filtr 0,45  $\mu\text{m}$ .

Jako optimální množství nastříkovaného vzorku byl zvolen objem 3  $\mu\text{l}$  a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Pro zvolení vhodného vnitřního standardu byla testována robustnost metody. Jako vnitřní standard byl použit ibuprofen. Čas analýzy je kratší než 4,5 min.

**Klíčová slova:** Klotrimazol, (2-chlorfenyl)difenylmethanol, imidazol, HPLC

## Abstract

High-performance liquid chromatographic technique for the determination of clotrimazole and its degradation products (2-chlorophenyl)-diphenyl methanol and imidazole in the formulation Clotrimazol spray 1 % was developed.

The presented thesis was focused to the selection of optimal column, composition of mobile phase, its pH and internal standard for the analysis of pharmaceutical formulation based on topically applied antifungal agent clotrimazole. Seven column were tested in detail.

The tested columns were: Discovery HS F5 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm); Chromolith® Performance, RP-18e (100 x 3 mm); ZIC® HILIC (3.5  $\mu\text{m}$ , 50 x 2.1 mm); XTerra® RP 18 (5  $\mu\text{m}$ , 100 x 3 mm); Discovery RP Amide C 16 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 3 mm); Zorbax Extend-C18 (3.5  $\mu\text{m}$ , 75 x 4.6 mm); Discovery ZR-PBD (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm).

HPLC was carried out using Discovery ZR- PBD column [5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm]. This column is based on polybutadiene-coated zirconium oxide. A zirconium oxide is stable in the whole pH range with the high pressure and temperature up to 200°C.

Spectrophotometric detection at 210 nm was performed. The optimal mobile phase was a mixture of acetonitrile and water (pH 9.7) in the ratio of 50:50. The pH of the water component was finally adjusted to 9.7 with NH<sub>4</sub>OH 25 %. The aqueous solution was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore membrane filters.

The optimal injection volume was 3  $\mu\text{l}$  and the optimal flow was 1 ml/min. Robustness of the method for correct internal standard selection was tested. Then ibuprofen was used as the internal standard. Analysis time was less than 4.5 min..

Keywords: Clotrimazole, (2-chlorophenyl)-diphenyl methanol, imidazole, HPLC



## SEZNAM ZKRATEK

ACN - acetonitril

CDM - (2-chlorfenyl)difenylmethanol

CLO - klotrimazol

CRL - chemická referenční látka

CZE - kapilární zónová elektroforéza

ČL 2005 - Český Lékopis 2005

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

Kys. - kyselina

KZ – ketokonazol

LOD – detekční limit (Limit of Detection)

LOQ – kvantifikační limit (Limit of Quantification)

MF – mobilní fáze

Obs. – obsahuje

Ph. Eur. 5 - Evropský Lékopis 5

R - zkoumadlo

Rec - výtěžnost (recovery)

RP - obrácené fáze, reverzní fáze (reversed phase)

RS - roztok zkoumadla

RSD - relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)

SFE - superkritická fluidní extrakce (supercritical fluid extraction)

UV - ultrafialová oblast spektra

VS - odměrný roztok

# 1 Úvod

## 1.1. Úvod a cíl práce

Cílem této diplomové práce je upravit chromatografické podmínky HPLC metody pro stanovení obsahu klotrimazolu a příslušných nečistot (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a imidazolu v přípravku CLOTRIMAZOL spray 1 %. Tato metoda již existuje, ale je příliš závislá na pH mobilní fáze.

Práce byla zaměřena na výběr vhodné chromatografické kolony, složení mobilní fáze, jejího pH a vnitřního standardu.

Validace analytické metody nebyla cílem práce, a proto není zahrnuta. Výjimkou je pouze robustnost metody.

## **2 Teoretická část**

## 2.1 HPLC

### 2.1.1 Úvod

HPLC je vysoce instrumentálně pokročilá technika kapalinové chromatografie. Vysoké účinnosti separačního procesu je dosaženo použitím kolon plněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je potřeba aplikovat tlak jednotek až desítek MPa. [1]

### 2.1.2 Základní pojmy v chromatografii [2]

- Mobilní fáze = pohyblivá (plyn nebo kapalina)
- Stacionární fáze = nepohyblivá, může nabývat nejrůznějších forem. Někdy to jsou částičky pevné hmoty, jindy je to tenká vrstvička kapaliny nanesená na pevných částicích, nebo to může být tenký film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry.
- Sorbent = jakákoliv forma fáze stacionární. Je to náplň kolony, přes kterou postupuje fáze mobilní.
- Vzorek = směs látek, která má být dělena
- Chromatograf = přístroj, na němž se separace provádí
- Chromatogram = záznam chromatografické separace
- Retenční čas = vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce ( $t_R$ ) [3]
- Vnitřní standard = látka, která není přítomna v původním vzorku a eluuje se v blízkosti stanovované složky [12]

### 2.1.3 Princip separace látek [4]

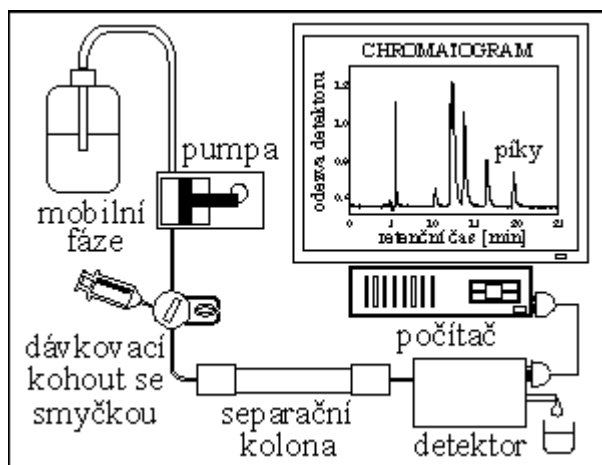
Dělení látek nastává mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Protože k dělení látek lze přitom využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna), je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech.

- **Gelová permeační chromatografie (GPC)** využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.
- **Rozdělovací chromatografie (LLC)** využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.
- **Adsorpční chromatografie (LSC)** využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry.
- **Iontově výměnná chromatografie (IEC)** využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

## 2.1.4 Kapalinový chromatograf

Základní součásti kapalinového chromatografu: zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, detektor a (zapisovací zařízení), počítač. [1]

Obr. 1: Schéma kapalinového chromatografu [4]



### 2.1.4.1 Čerpací systémy [3]

Čerpací systémy jsou potřebné pro přivádění mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí. Kolísání tlaku má být co nejmenší, čehož se dosahuje např. průchodem tlakovaného rozpouštědla zařízením na tlumení pulzů. Hadičky a všechny spoje musí být schopny odolat tlaku vyvinutému čerpacím systémem. Čerpací systémy mohou být vybaveny zařízením pro odstranění uvolněných bublin vzduchu. Systémy ovládané

mikroprocesory jsou schopny přesně přivádět mobilní fázi buď s konstantním složením (izokratická eluce), nebo se složením, které se mění podle předem daného programu (gradientová eluce). V případě gradientové eluce se používají čerpací systémy, které dodávají rozpouštědlo či rozpouštědla z více zásobníků a mísení rozpouštědel se dosahuje buď před natlakováním, nebo v tlakované části čerpadla nebo čerpadel.

#### **2.1.4.2 Dávkovací zařízení [3]**

Roztok vzorku se dávkuje do protékající mobilní fáze před kolonou nebo předklonkou pomocí dávkovacího zařízení, které je schopno pracovat při vysokém tlaku. Používají se zařízení s dávkovací smyčkou o konstantním nebo proměnném objemu pro ruční nebo automatické dávkovače. Ruční dávkování s částečně naplněnou smyčkou může způsobit horší přesnost nastříkovaného objemu.

#### **2.1.4.3 Stacionární fáze [3]**

Používá se mnoho typů stacionárních fází, jako jsou:

- oxid křemičitý, oxid hlinitý nebo porézní grafit, používané v chromatografii s normálními fázemi, kde je separace založena na rozdílech v adsorpci a/nebo rozdělování;
- pryskyřice nebo polymery s kyselými nebo zásaditými skupinami používané v iontovýměnné chromatografii, kde je separace založena na konkurenci iontů, které mají být odděleny a iontů, které jsou obsaženy v mobilní fázi;
- porézní oxid křemičitý nebo polymery používané ve vylučovací chromatografii, kde je separace založena na rozdílech v objemech molekul, odpovídající sterickému vylučování;
- různé druhy chemicky modifikovaných nosičů připravených z polymerů, oxidu křemičitého nebo porézního grafitu, používané v chromatografii s obrácenými fázemi, kde je separace založena hlavně na rozdělování molekul mezi mobilní a stacionární fázi;
- speciální chemicky modifikované stacionární fáze, např. deriváty celulosy nebo amylosy, bílkoviny nebo peptidy, cyklodextriny atd., používané pro separaci enantiomerů (chirální chromatografie).

Většina separací je založena na mechanismu rozdělování a využívá chemicky modifikovaný oxid křemičitý jako stacionární fázi a polární rozpouštědla jako mobilní fázi. Povrch nosiče, např. silanolové skupiny oxidu křemičitého, se upravuje reakcí

s různými silylačními činidly za vzniku kovalentně vázaných silylovaných derivátů, které pokrývají proměnlivé množství aktivních míst na povrchu nosiče. Povaha vázané fáze je důležitým parametrem pro stanovení separačních vlastností chromatografického systému.

Běžně užívané vázané fáze jsou uvedeny níže:

oktyl =  $\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$  C8

oktadecyl =  $\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$  C18

fenyl =  $\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}_6\text{H}_5)$  C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

kyanopropyl =  $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$  CN

aminopropyl =  $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$  NH<sub>2</sub>

diol =  $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$

Pokud není výrobcem uvedeno jinak, předpokládá se, že kolony pro chromatografii s obrácenými fázemi s náplní na bázi silikagelu jsou stabilní v mobilních fázích o zdánlivém pH 2,0 až 8,0. Kolony plněné porézním grafitem nebo částicemi polymerních materiálů, jako je styrendivinybenzen-kopolymer, jsou stabilní v širším rozsahu pH.

V některých případech je vhodná chromatografie s normálními fázemi, která využívá jako stacionární fázi nemodifikovaný oxid křemičitý, porézní grafit nebo polárními skupinami chemicky modifikovaný silikagel, např. se skupinami kyanopropylolyými nebo diolovými, v kombinaci s nepolární mobilní fází.

Pro analytické separace se běžně používají stacionární fáze, které mají velikost částic 3  $\mu\text{m}$  až 10  $\mu\text{m}$ . Částice mohou mít kulovitý nebo nepravidelný tvar, různou porozitu a specifický povrch. Tyto parametry přispívají k chromatografickému chování jednotlivých stacionárních fází. V případě obrácených fází jsou doplňujícími charakteristikami stacionární fáze její druh, stupeň navázání vyjádřený např. jako obsah vázaného uhlíku, údaj o případném odstranění povrchových silanolových skupin. Jestliže stacionární fáze obsahuje zbytkové povrchové silanolové skupiny, mohou analyzované látky, zejména bazické, vykazovat chvostování píků.

#### **2.1.4.4 Chromatografické kolony pro kapalinovou chromatografii**

Kolony se používají pouze náplňové. Mnoho rozličných aplikací kapalinové chromatografie podmiňuje existenci velkého množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně.



Pro většinu rutinních analýz jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli. Kolony pro analytické využití jsou poměrně krátké (zpravidla 10, 15 nebo 25 cm). Vnitřní průměr je 4,6 nebo 5 mm. Běžný průtok eluentu je 1-2 ml za minutu. Pro rychlé separace, stačí-li účinnost do 4000 teoretických pater, jsou vhodné krátké analytické kolony délky 3-5 cm. Jsou levnější a spotřebují malé množství mobilní fáze. Objemový průtok eluentu je 4 ml za minutu. Náplňový materiál pro analytické kolony má průměr 3-10  $\mu\text{m}$  (kratší kolony jsou plněny jemnější náplní).

Kolony s velmi malým vnitřním průměrem mají vnitřní průměr 1-2 mm a délku 25-50 cm. Mají vysokou účinnost a spotřebují málo rozpouštědla (10-100  $\mu\text{l}$  za minutu).

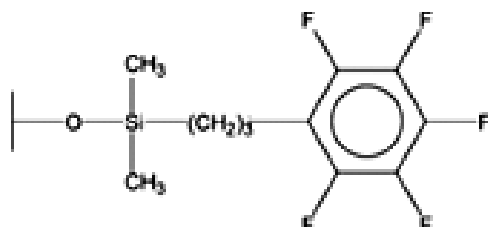
Jako ochrana hlavní kolony jsou hojně používány předkolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Způsobují jen malé rozšíření píků a chrání kolonu před nečistotami z matrice a nerozpustnými materiály. [5]

#### 2.1.4.4.1 Discovery HS F5

##### Vlastnosti:

- ❖ Výrobce: Sigma-Aldrich s.r.o.
- ❖ Délka/průměr: 150 x 4,6 mm
- ❖ Velikost částic: 5  $\mu\text{m}$
- ❖ Sorbent: Silikagel
- ❖ Navázaná fáze: Pentafluorophenylpropyl
- ❖ pH: 2-8

Obr. 2: Chemická struktura částic [6]



##### Charakteristika:

Pentafluorophenyl RP kolony jsou unikátní svou retencí a selektivitou zejména pro bazické a halogenované komponenty.

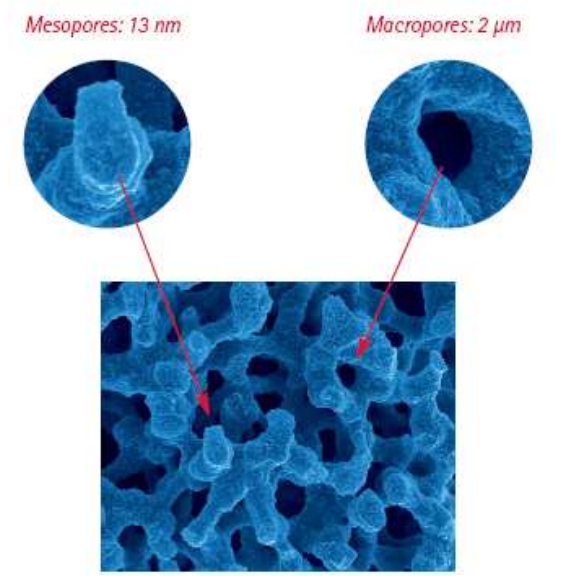
Navázaná fáze na této koloně poskytuje separaci na obrácených fázích, která je zpravidla odlišná od separace na C18. Nicméně retenční časy jsou většinou stejné. Obecně jsou bazické látky zadržované na HS F5 déle než na C18. Výsledky separace ostatních sloučenin jsou velmi proměnlivé. [6]

#### **2.1.4.4.2 Chromolith® Performance, RP-18e**

##### **Vlastnosti:**

- ❖ Výrobce: Merck
- ❖ Délka/průměr: 100 x 3 mm
- ❖ Velikost částic: mesopóry: 13 nm, makropóry: 2  $\mu\text{m}$
- ❖ Sorbent: Monolitický oxid křemičitý (pokrytý n-alkylovými řetězci)
- ❖ pH: 2-7,5

Obr. 3: Příčný řez monolitem oxidu křemičitého [7]



##### **Charakteristika:**

Tato kolona není plněná tradičními částicemi oxidu křemičitého. Je tvořena z jednoho kusu oxidu křemičitého, který je pokrytý n-alkylovými řetězci. Pórovitost je větší než 80%. Makropóry snižují zpětný tlak kolony, tím dovolují použít vyšší průtok, a proto značně klesá doba analýzy. Mesopóry tvoří pórovitou strukturu a poskytují velkou aktivní plochu pro efektivní separaci.

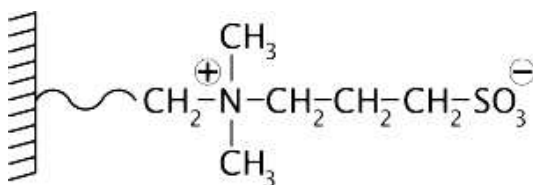
Chromolitová kolona má ve srovnání s kolonami o velikosti částic 5 $\mu$ m a stejné délce čtyřikrát nižší zpětný tlak. Rozlišení píků zůstává prakticky nezměněné. [7]

#### 2.1.4.4.3 ZIC® HILIC

##### Vlastnosti:

- ❖ Výrobce: SeQuant
- ❖ Délka/průměr: 50 x 2,1 mm
- ❖ Velikost částic: 3,5  $\mu$ m
- ❖ Sorbent: Silikagel
- ❖ Navázaná fáze: zwitterionic ZIC®-HILIC
- ❖ pH: 2-8

Obr. 4: Chemická struktura částic [8]



##### Charakteristika:

ZIC®-HILIC kolona je ideální volba pro separaci polárních a hydrofilních sloučenin. Analyty jako aminokyseliny, peptidy, sacharidy, rostlinné extrakty a různé polární sloučeniny mají obecně silnou retenci na této kolonce. Stacionární fáze je pevně zakotvená na pórovitém oxidu křemičitém. Separace je dosaženo pomocí hydrofilního dělicího mechanismu znásobeného slabými elektrostatickými interakcemi. Typická mobilní fáze obsahuje vysoký poměr organických rozpouštědel (např. acetonitril) smísených s pufrem. [8]

#### 2.1.4.4.4 XTerra® RP 18

##### Vlastnosti:

- ❖ Výrobce: Waters
- ❖ Délka/průměr: 100 x 3 mm
- ❖ Velikost částic: 5  $\mu$ m

- ❖ Sorbent: organicko/anorganický hybrid
- ❖ pH: 1-12

**Charakteristika:**

Tato kolona byla připravena díky nové revoluční technologii Hybrid Particle Technology. Hlavním principem této technologie je syntéza organického/anorganického hybridu, což je materiál obsahující jak anorganické (např. silikagel), tak organické (např. organosiloxany) elementy, a tím pádem poskytuje výhody obou těchto materiálů. Výsledkem je sorbent s minimálně o 1/3 nižším obsahem volných silanolových skupin. Silně zredukovaný obsah volných silanolů zaručuje symetrické píky bazických sloučenin.

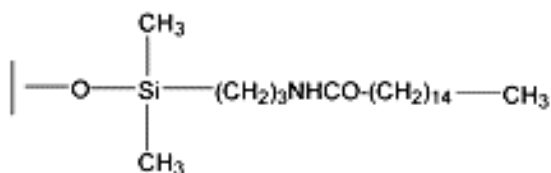
Je možné dlouhodobě pracovat při pH 1 – 12. [9]

**2.1.4.4.5 Discovery RP Amide C 16**

**Vlastnosti:**

- ❖ Výrobce: Sigma-Aldrich s.r.o.
- ❖ Délka/průměr: 250 x 3 mm
- ❖ Velikost částic: 5 μm
- ❖ Sorbent: Silikagel
- ❖ Navázaná fáze: Palmitamidopropylsilan
- ❖ pH: 2-8

Obr. 5: Chemická struktura částic [10]



**Charakteristika:**

Polární amidová skupina poskytuje menší retenci a vyšší selektivitu oproti koloně C18. Stacionární fáze je méně hydrofobní než klasické C18 fáze.

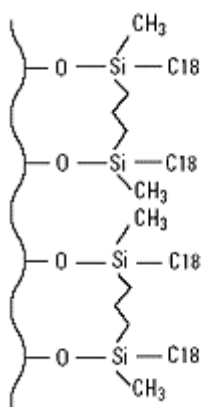
Kolona Discovery RP Amide C 16 vyniká velmi dobrou selektivitou, reprodukovatelností, excelentní retencí a rozlišením pro polární analyty, i dlouhou životností. [10]

#### 2.1.4.4.6 Zorbax Extend- C18

##### Vlastnosti:

- ❖ Výrobce: Agilent Technologies
- ❖ Délka/průměr: 75 x 4,6 mm
- ❖ Velikost částic: 3,5 μm
- ❖ Sorbent: Silikagel
- ❖ pH: 2-11,5

Obr. 6: Chemická struktura částic [11]



##### Charakteristika:

Kolony ZORBAX Extend-C18 jsou unikátní díky bonding technologii s dvojitým můstkem mezi skupinami C18. Tento typ sorbentu umožňuje práci i při velmi vysokém pH, protože bazické sloučeniny nemohou interagovat se silikagelem. Mobilní fáze při vyšším pH zpravidla obsahují např. triethylamin, pyrrolidin, glycin nebo hydroxid amonný.

Kolony jsou vhodné pro bazické sloučeniny, jsou účinnější než některé polymerní kolony, vykazují lepší tvar píků bazických látek. [11]

#### 2.1.4.4.7 Discovery ZR - PBD

##### Vlastnosti:

- ❖ Výrobce: Sigma-Aldrich s.r.o.

- ❖ Délka/průměr: 150 x 4,6 mm
- ❖ Velikost částic: 5  $\mu\text{m}$
- ❖ Sorbent: Oxid zirkoničitý
- ❖ Navázaná fáze: Polybutadien
- ❖ pH: 1-13

### **Charakteristika:**

Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic. Takto připravené kolony vykazují srovnatelnou účinnost s kolonami silikagelovými. Největší výhodou oxidu zirkoničitého je jeho chemická a tepelná stabilita. Oxid zirkoničitý je stabilní v celém rozsahu pH při vysokém tlaku a teplotě až do 200 °C. Extrémní stabilita oxidu zirkoničitého má za následek to, že HPLC kolony mohou být použity za extrémních podmínek (např. čištění kolony) a prodlužuje se životnost kolony. Tím se také snižuje cena za analýzu a rozšiřují se možnosti použití různých chromatografických podmínek. Povrch oxidu zirkoničitého se modifikuje tenkou vrstvou polybutadienu. [12]

Principem je separace na obrácených fázích a iontovýměnná chromatografie. Je možné využít širokého rozmezí pH od 1 do 13. Významný rozdíl mezi Discovery Zr-PBD a C18 kolonou je ten, že na zirkoniové koloně může být použito základní pH mobilní fáze a zvýšené teploty; za těchto podmínek mají bazické sloučeniny lepší tvar píků (ostré a symetrické píky). [13]

#### **2.1.4.5 Mobilní fáze [3]**

V chromatografii s normálními fázemi se používají méně polární rozpouštědla. Aby se dosáhlo reprodukovatelných výsledků, je nutné přísně kontrolovat přítomnost vody v mobilní fázi. V chromatografii s obrácenými fázemi se používají vodné mobilní fáze, jak s organickým rozpouštědlem, tak bez něj. Složky mobilní fáze se obvykle filtrují, aby z nich byly odstraněny částice větší než 0,45  $\mu\text{m}$ .

Vícesložkové mobilní fáze se připravují odměřením požadovaných objemů (pokud nejsou předepsány hmotnosti) jednotlivých složek a jejich smísením. Jinou možností je přivádět rozpouštědla pomocí jednotlivých čerpadel ovládaných ventily, které umožňují mísení složek v požadovaném poměru. Rozpouštědla jsou před čerpáním do systému obvykle odplyňována probubláváním heliem,

v ultrazvukové lázni nebo se používají membránová či vakuová zařízení zařazená přímo do systému, která zabraňují tvorbě bublin.

#### 2.1.4.6 Detektory v HPLC [5]

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční.

Fotometrické detektory patří k nejběžnějším detektorům. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru musí být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné květy, jíž prochází paprsek. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti (např. 254 nm - rtuťová výbojka), složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru.

Nejdokonalejší jsou schopny pomocí diodového pole (Diode Array Detector - DAD) proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti. Detekční limit je až  $10^{-10}$  g/ml. Citlivost je pro různé látky různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu látky.

Refraktometrický detektor (Refractive Index detector - RI) měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se výchylka. Tento typ detektoru sice není příliš citlivý (detekční limit  $10^{-7}$  g/ml), ale je velmi univerzální. Při jeho použití je třeba přísně udržovat konstantní teplotu.

Fluorescenční detektor je založen na principu fluorescence - schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Detektor má detekční limit až  $10^{-12}$  g/ml analytu. Je vysoce selektivní. Vhodně lze kombinovat s fotometrickým detektorem.

Elektrochemické detektory jako vodivostní nebo voltametrické lze použít tam, kde jsou v roztocích obsaženy ionty, respektive složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizovatelné elektrodě.

Hmotnostní spektrometr jako detektor je použitelný nejen v plynové, ale i kapalinové chromatografii.

## 2.2 Robustnost

### 2.2.1 Definice robustnosti [14]

Robustnost analytického postupu je míra jeho kapacity zůstat neovlivněný malou, ale úmyslnou změnou parametrů metody, a poskytnout údaj o jeho spolehlivosti během jeho normálního používání.

Pokud je měření snadno ovlivnitelné změnami analytických podmínek, měly by analytické podmínky být vhodně kontrolované, anebo by preventivní příkaz měl být uveden v analytickém postupu. Výsledkem vyhodnocení robustnosti by měla být série parametrů (např. rozlišovací test), které jsou stanovené pro to, aby zajistily platnost analytického postupu, kdykoliv je používán. Extrakční čas a stabilita připravených roztoků jsou typickým příkladem jednotlivých kroků analýzy náchylných ke změnám a kolísání. Příklady typických parametrů pro hodnocení robustnosti v kapalinové chromatografii jsou: změny pH mobilní fáze, složení mobilní fáze, rozdílné kolony (odlišné částice, nebo dodavatelé), teplota a průtok mobilní fáze.

## 2.3 Klotrimazol

Latinský název ČL 2005: Clotrimazolum

Anglický název Ph. Eur. 5: Clotrimazole

Český název ČL 2005: Klotrimazol

### 2.3.1 Chemická a fyzikálně-chemická charakteristika

Je to 1-[(2-chlorfenyl)difenylmethyl]-1H-imidazol.

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny  $C_{22}H_{17}ClN_2$  [3].

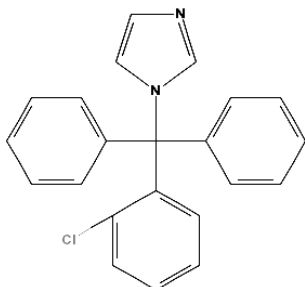
Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu 96% a v dichlormethanu [3].

Sumární vzorec:  $C_{22}H_{17}ClN_2$



Strukturní vzorec:

Obr. 7: Strukturní vzorec klotrimazolu [15]



Molekulová hmotnost: Mr 344,84

### 2.3.2 Terapeutické užití

Klotrimazol je imidazolový derivát s terapeutickým účinkem na nižší houby určený k místnímu použití. Působí na patogenní a podmíněně patogenní houby rodu *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Aspergillus*, *Nocardia* a některé další mikromycety. [16]

## 2.4 Metody hodnocení klotrimazolu

### 2.4.1 Lékopisné stanovení (ČL 2005)

#### 2.4.1.1 Zkoušky totožnosti

- A. Teplota tání (kapilární metoda): 141 °C až 145 °C.
- B. Infračervené absorpční spektrum zkoušené látky odpovídá spektru klotrimazolu CRL.
- C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce (2-Chlorfenyl)difenylmethanol v ultrafialovém světle při 254 nm před postřikáním. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) polohou a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).
- D. Asi 10 mg se rozpustí ve 3 ml kyseliny sírové R; roztok je světle žlutý. Přidá se 10 mg oxidu rtuťnatého R a 20 mg dusitanu sodného R a nechá se stát za občasného protřepání; vzniká oranžové zbarvení, které přechází na oranžově hnědé.

#### **2.4.1.2 Stanovení obsahu – nevodná titrace**

0,300 g se rozpustí v 80 ml kyseliny octové bezvodé R a titruje se kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS za použití 0,3 ml naftolbenzeinu RS jako indikátoru do změny zbarvení roztoku

z hnědožlutého na zelené.

1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS odpovídá 34,48 mg  $C_{22}H_{17}ClN_2$ . [3]

## 2.4.2 HPLC metody uváděné v literatuře

Tab. 1 uvádí výsledky rešerše článků týkajících se hodnocení klotrimazolu HPLC metodami v různých materiálech (včetně biologického materiálu).

**Tab. 1: Příklady HPLC metod pro hodnocení klotrimazolu (výsledky literární rešerše)**

Hodnocené látky	Přípravek (materiál)	Stacionární fáze Kolona	Mobilní fáze	Detekce UV [nm]	Průtok [ml/min]	Vnitřní standard	Citace
Methylparaben, propylparaben, klotrimazol,	Topický krém	5 µm LiChro- CART Purospher RP-18e  (125 x 4 mm)	Acetonitril : voda 70 : 30	210	0,5		[17]
Imidazol, (2-chlorofenyl) difenylmethanol		Předkolona: LiChroCART Purospher RP-18e (4 x 4 mm)	Acetonitril : voda 75 : 25 pH 2,7		0,8		

Klotrimazol, ketokonazol, flukonazol	Antimykotické přípravky	Bondapak™ C18 10 µm (250 x 4,6 mm)	Acetonitril : 25 mM trihydroxymethyl aminomethan ve fosfátovém pufru (pH 7) 55 : 45	260	2 1,5	KZ (pro CLO)  Klotrimazol (pro KZ)	[18]
Metronidazol, klotrimazol, chlorhexidine acetate	čípky	Kromasil C18 5 µm (150 x 4,6 mm)	Methanol : pufr (obs. 3 g heptansulfonátu sodného a 2,5 ml triethylaminu, pH 2,5)  65 : 35	315 260 260	1		[19]
Klotrimazol	roztok	Symmetry C18 5 µm (250 x 4,6 mm)	Methanol : voda : triethylamin 64 : 36 : 0,5 pH 3,2	260	1		[20]

Ketokonazol, tokonazol, econazol, mikonazol, itrakonazol, klotrimazol	Kosmetické přípravky proti lupům (šampón, roztok)	RP- Amide C16 (Sulpeco) 5 μm (150 x 4,6 mm)	Acetonitril/Voda (obs. 10 <sup>-3</sup> M NaClO <sub>4</sub> ) : chloristá kys. 15 : 85 (pH 3)	220	1		[21]
Klotrimazol, (2-chlorfenyl)difenylmethanol, imidazol	sprej	Zorbax SB-Phenyl 3,5 μm (75 x 4,6 mm)	Acetonitril: voda 65 : 35 (pH 3,5)	210	0,5	Ibuprofen	[22]

KZ – ketokonazol, CLO – klotrimazol

Pozn.: Starší práce byly citovány v diplomové práci Petry Švecové.

### 2.4.3 Ostatní metody

Tab. 2: Příklady ostatních metod pro hodnocení klotrimazolu (výsledky literární rešerše)

Metoda	Hodnocené látky	Materiál	Detekce UV [nm]	Validační data	Citace
SFE/spektrometrie	mikonazol, ekonazol, klotrimazol, bifonazol	Topické krémy	284 283,2 237,2 281,2	Koncentrace(%) : RSD(%) 97,3 (2,15) - 98,8 (2,25) 98,6 (2,80)	[23]
CZE	ketokonazol, klotrimazol ekonazol	Antimykotické přípravky	196	Rec: 98,00; 99,96; 99,58 %	[24]
SPE/CZE	klotrimazol ketokonazol, verapamil, itrakonazol, flukonazol, vorikonazol	Lidské jaterní mikrozómy	198	Opakovatelnost  LOD = 0,5 µg/ml	[25]

CZE	ketokonazol, klotrimazol, itrakonazol, flukonazol, vorikonazol, terbinafin	Antimykotické přípravky	210	Účinnost kolony :  LOD = 0,12 µg/ml LOQ = 0,40 µg/ml	[26]
spektrofotometrie	promazin thioridazin klotrimazol	tablety	252 263 209	Detekční limit: 0,16; 1,27; 0,20 µg  Linearita: 5 - 40, 5 - 60, 2 - 10 µg/ml	[27]

# **3 Experimentální část**



### 3.1 Přístrojové vybavení

Kapalinový chromatograf:	Waters 1525 Binary HPLC Pump Waters 2487 Dual $\lambda$ Absorbance Detector Waters 717 Plus Autosampler
Laboratorní pH metr:	Hanna instruments, pH 212, Microprocessor pH meter
Analytické váhy:	Sartorius 2004 MP

### 3.2 Chemikálie

- **Clotrimazol**, VV 249/04, Amoli Organics Ltd, Mumbai Ltd, India, pracovní standard, číslo šarže CLT/0207/020, atest č. CL 0085/0904/526 (obsah 100,12 %)
- **O-(chlorophenyl)diphenylmethanol**, Amoli Organics Ltd, B.NO. CLT-OH/06DP/002, Gty 100 mg
- **Imidazol ACS reagent**, š.č. 076K00941, Sigma-Aldrich, Germany, pracovní standard
- **Ibuprofen 98% GC**, 026H1368, Sigma Aldrich Chemie, SRN
- **Kyselina fosforečná**, 85% p.a., Merck
- **Amoniak - vodný roztok 25%**, Lachema, Neratovice
- **Ultračistá voda**, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)
- **Acetonitrile for chromatography**, CHROMASOLV, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany

#### 3.2.1 Příprava zásobních roztoků

K přípravě všech roztoků byly použity výše uvedené chemikálie.

##### Zásobní roztok klotrimazolu (c = 50 mg/100ml)

Byl připraven rozpuštěním 12,44 mg klotrimazolu v acetonitrilu a doplněním na 25,00 ml.

**Standardní roztok č. 1 (50 mg klotrimazolu; 0,5 mg nečistot; 10 mg vnitřního standardu)**

Byl připraven rozpuštěním 50,02 mg klotrimazolu; 10,00 ml zásobního roztoku nečistot a 2,00 ml zásobního roztoku vnitřního standardu v acetonitrilu a doplněním na 100,00 ml.

**Standardní roztok č. 2 (50 mg klotrimazolu; 5 mg nečistot; 20 mg ibuprofenu)**

Byl připraven rozpuštěním 50,17 mg klotrimazolu; 5,17 mg (2-chlorfenyl)difenylmethanolu; 5,28 mg imidazolu a 20,53 mg ibuprofenu a doplněním acetonitrilem na 100,00 ml.

**Standardní roztok č. 3 (50 mg klotrimazolu; 5 mg nečistot; 20 mg verapamilu)**

Byl připraven rozpuštěním 50,16 mg klotrimazolu; 5,03 mg (2-chlorfenyl)difenylmethanolu; 5,28 mg imidazolu a 20,03 mg verapamilu a doplněním acetonitrilem na 100,00 ml.

**Zásobní roztok vnitřního standardu (c = 500 mg/100 ml)**

Byl připraven rozpuštěním 499,47 mg ibuprofenu v acetonitrilu a doplněním na 100,00 ml.

**Zásobní roztok nečistot (c = 5 mg/100ml)**

Byl připraven rozpuštěním 5,03 mg (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a 5,02 mg imidazolu v acetonitrilu a doplněním na 100,00 ml.

**Zásobní roztok imidazolu (c = 10 mg/100ml)**

Byl připraven rozpuštěním 5,10 mg imidazolu v acetonitrilu a doplněním na 50,00 ml.

### **3.2.2 Příprava mobilní fáze**

**Mobilní fáze**

Byla připravena z ultračisté vody. pH vodné složky bylo upravováno na požadovanou hodnotu kyselinou fosforečnou 5%, nebo NH<sub>4</sub>OH 25%. Výsledný roztok byl přefiltrován přes filtr 0,45 μm. Byla použita polární rozpouštědla acetonitril a metanol, která mají

vysokou čistotu a jsou určeny pro chromatografii. Mísení požadovaného poměru vodné a organické složky bylo nastaveno při programování HPLC pumpy.

### **Mobilní fáze pro ZIC® HILIC kolonu**

*Mobilní fáze na promývání kolony:* ACN/0,5 mM kyselina octová (pH 6,8) 80:20

Byla připravena odměřením 28,6 µl kyseliny octové (100%) do 100,00 ml odměrné baňky a doplněním ultračistou vodou po rysku. Z tohoto zásobního roztoku 5 mM kyseliny bylo odebráno 20,00 ml a doplněno v 200,00 ml odměrné baňce po rysku. Tím byl získán 10 x zředěný roztok.

Získaný roztok 0,5 mM kyseliny octové byl upraven pomocí zředěného amoniaku na požadované pH 6,8.

*Mobilní fáze pro analýzu:* ACN/0,5 mM kyselina octová 80:20

Byla připravena stejným způsobem jako MF na promývání. pH bylo upravováno pomocí zředěného amoniaku na požadovanou hodnotu.

## **3.3 Úprava chromatografických podmínek - optimalizace metody**

Cílem tohoto procesu bylo upravit chromatografické podmínky již existující HPLC metody.

### **3.3.1. Původní chromatografické podmínky**

<b>Mobilní fáze:</b>	ACN - voda (65:35), pH vodné fáze upraveno kys. fosforečnou 5% na 3,45
<b>Kolona:</b>	ZORBAX® SB-PHENYL, 3,5 µm, 4,6 x 75 mm
<b>Průtok Fm:</b>	0,5 ml/min
<b>Vlnová délka λ:</b>	210 nm
<b>Vnitřní standard:</b>	ibuprofen
<b>Dávkovaný objem:</b>	5 µl
<b>Teplota:</b>	laboratorní

### 3.3.2. Výběr vhodné chromatografické kolony

Cílem hledání bylo najít takovou kolonu, na níž dochází k úplnému rozdělení složek směsi v přijatelném čase analýzy. Důraz byl také kladen na robustnost metody.

Tab. 3: Přehled všech zkušných chromatografických kolon, jejich vlastnosti a výrobce

Název kolony	Výrobce	Délka/průměr	Velikost částic	Sorbent	Navázaná fáze	pH
Discovery HS F5	Sigma-Aldrich s.r.o.	150 x 4,6 mm	5 µm	Silikagel	Pentafluorophenylpropyl	2-8
Chromolith® Performance, RP-18e	Merck	100 x 3 mm	-	Monolitický oxid křemičitý		2-7,5
ZIC® HILIC	SeQuant	50 x 2,1 mm	3,5 µm	Silikagel		2-8
XTerra® RP 18	Waters	100 x 3 mm	5 µm	organicko/anorganický hybrid		1-12
Discovery RP Amide C 16	Sigma-Aldrich s.r.o.	250 x 3 mm	5 µm	Silikagel	Palmitamidopropylsilan	2-8
Zorbax Extend-C18	Agilent Technologies	75 x 4,6 mm	3,5 µm	Silikagel		2-11,5
Discovery ZR-PBD	Sigma-Aldrich s.r.o.	150 x 4,6 mm	5 µm	Oxid zirkoničitý	Polybutadien	1-13

Pozn.: V diplomové práci Petry Švecové byly testovány tyto kolony: ZORBAX® TMS, 5 µm, 4,6 x 250 mm; SUPELCO Discovery ZR-PBD, 5 µm, 4,6 x 150 mm; SUPELCO Discovery Cyano, 5 µm, 4,0 x 100 mm; ZORBAX® SB-PHENYL, 3,5 µm, 4,6 x 75 mm; LiChroCARD RP-18e, 5 µm, 4,0 x 125 mm.

### **3.3.2.1 Discovery HS F5**

#### **Podmínky stanovení:**

Mobilní fáze: ACN/Voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3; 3,4 kys. fosforečnou 5%)

Průtok: 0,5 a 1 ml/min

### **3.3.2.2 Chromolith® Performance, RP-18e**

#### **Podmínky stanovení:**

Mobilní fáze: ACN/Voda, Met/Voda

pH: 2,5-6 (pH vodné složky upraveno kys. fosforečnou 5%)

6,8 a 7,25 (pH vodné složky upraveno triethylaminem a kys. mravenčí 1%)

Průtok: 2; 2,5 a 3 ml/min

### **3.3.2.3 ZIC® HILIC**

#### **Podmínky stanovení:**

Mobilní fáze: ACN/ octanový pufr (0,5 mM kys. octová upravená amoniakem 25%)

Poměr MF: 80:20, 60:40, 50:50 a 40:60

pH: 4,0; 5,0; 6,8

Průtok: 0,1 a 0,3 ml/min

### **3.3.2.4 XTerra® RP 18**

#### **Podmínky stanovení:**

Mobilní fáze: ACN/Voda (pH vodné složky upraveno kys. fosforečnou 5%, nebo amoniakem 25%)

Poměr MF: 65:35, 50:50

pH: 3,2; 5,0; 6,0; 7,25; 9,0; 9,27 a 11,0

Průtok: 1 ml/min

### **3.3.2.5 Discovery RP Amide C 16**

#### **Podmínky stanovení:**

Mobilní fáze: ACN/Voda (pH vodné složky upraveno kys. fosforečnou 5%, nebo amoniakem 25%)

Poměr MF: 65:35, 60:40, 55:45

pH: 3,0; 3,5; 3,8; 5,0, 7,5

Průtok: 1 ml/min

### **3.3.2.6 Zorbax Extend-C18**

#### **Podmínky stanovení:**

Mobilní fáze: ACN/Voda (pH vodné složky upraveno kys. fosforečnou 5%, nebo amoniakem 25%)

Poměr MF: 65:35, 50:50

pH: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 7,0; 9,0 a 11,0

Průtok: 1 ml/min

### **3.3.2.7 Discovery ZR-PBD**

#### **Podmínky stanovení:**

Mobilní fáze: ACN/Voda (pH vodné složky upraveno kys. fosforečnou 5%, nebo amoniakem 25%)

Poměr MF: 65:35, 60:40, 50:50, 40:60

pH: 3,0; 3,5; 5,0; 9,0; 9,5; 10,0 a 11,0

Průtok: 1 ml/min

Teplota: 25, 40 a 60 °C

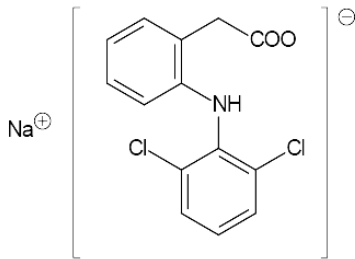
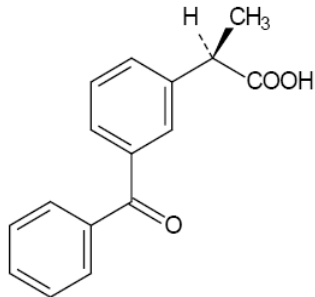
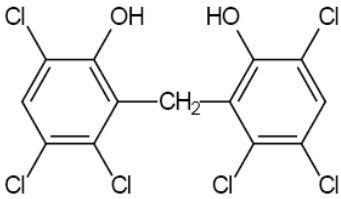
### **3.3.3 Výběr vhodného vnitřního standardu**

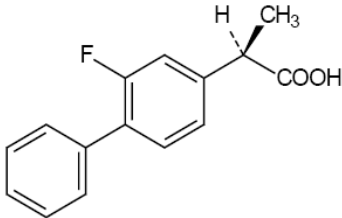
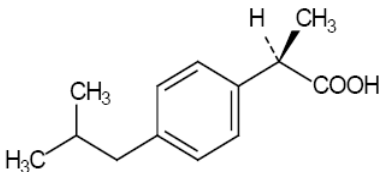
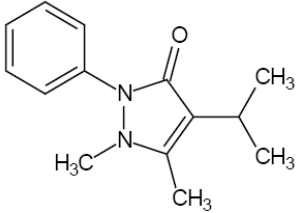
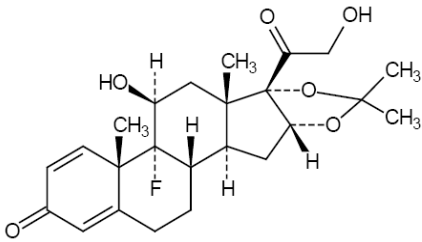
Testování probíhalo na koloně Discovery ZR-PBD za použití mobilní fáze acetonitril/voda 50:50 (pH vodné složky upraveno na 9,5 a 10 amoniakem 25%), při průtoku mobilní fáze 1 ml/min.

### 3.3.3.1 Testované látky

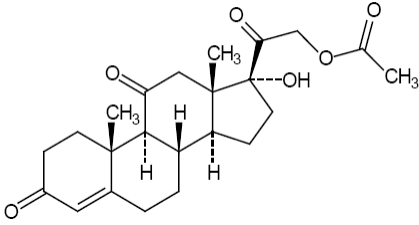
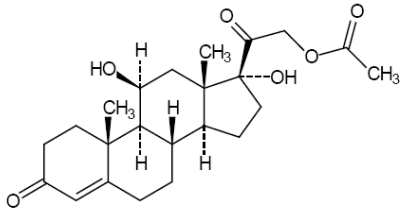
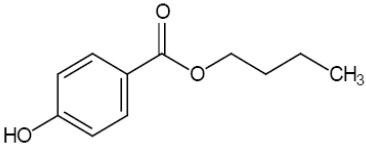
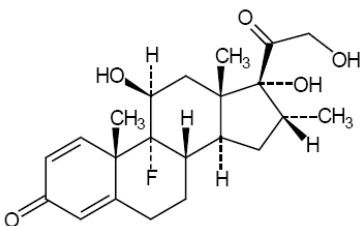
V Tab. 4 jsou v přehledu uvedené testované látky, jejich strukturní vzorce a retenční časy.

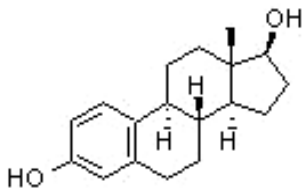
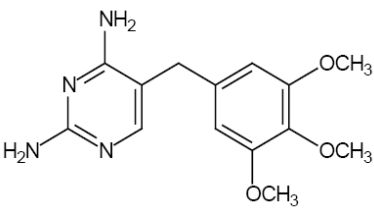
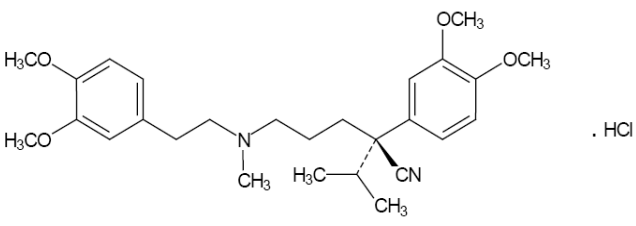
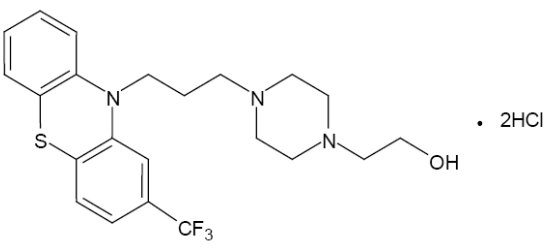
Tab. 4: Přehled testovaných látek

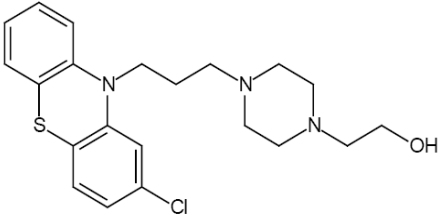
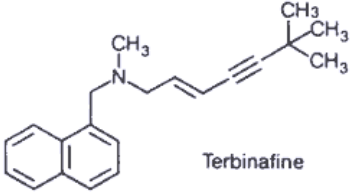
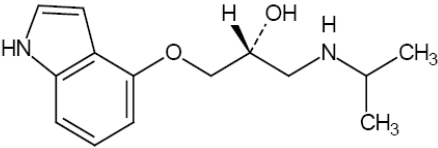
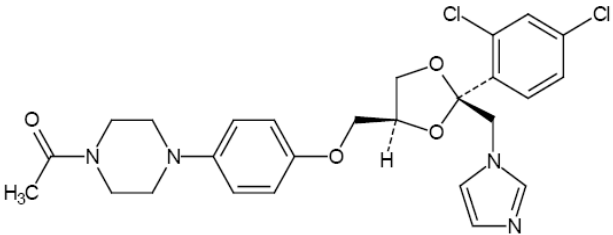
Diklofenak sodný	Obr. 8: Strukturní vzorec diklofenaku sodného [3]
RT: 1,196 min	
Ketoprofen	Obr. 9: Strukturní vzorec ketoprofenu [3]
RT: 1,196 min	
Hexachlorofen	Obr. 10: Strukturní vzorec hexachlorofenu [3]
RT: 1,201 min	

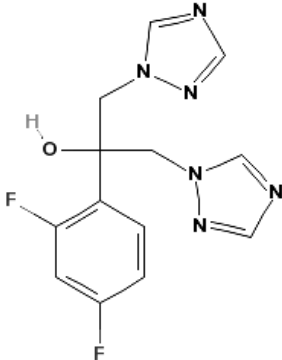
Flurbiprofen	Obr. 11: Strukturní vzorec flurbiprofenu [3]
RT: 1,205 min	 <p>The structure shows a central benzene ring with a fluorine atom at the 3-position and a phenyl group at the 4-position. At the 1-position, there is a chiral center bonded to a hydrogen atom (dashed), a methyl group (wedged), and a carboxylic acid group (COOH).</p>
Ibuprofen	Obr. 12: Strukturní vzorec ibuprofenu [3]
RT: 1,228 min	 <p>The structure shows a central benzene ring with a propyl chain at the 1-position and a chiral center at the 4-position. The chiral center is bonded to a hydrogen atom (dashed), a methyl group (wedged), and a carboxylic acid group (COOH). The propyl chain has a methyl group at the 2-position.</p>
Propyphenazon	Obr. 13: Strukturní vzorec propyphenazonu [3]
RT: 1,776 min	 <p>The structure shows a five-membered imidazole ring with a phenyl group at the 2-position, a methyl group at the 4-position, and a propyl chain at the 5-position. The propyl chain has a methyl group at the 2-position.</p>
Triamcinolon- acetonid	Obr. 14: Strukturní vzorec triamcinolon-acetonidu [3]
RT: 1,794 min	 <p>The structure shows a complex steroid nucleus with a ketone group at C-3, a double bond between C-4 and C-5, and a fluorine atom at C-6. It features multiple methyl groups, hydroxyl groups, and an acetonide ring system at C-17.</p>



Kortison-acetát	Obr. 15: Strukturní vzorec kortison-acetátu [3]
RT: 1,797 min	 <p>The structure shows the cortisone skeleton with an acetyl group attached to the 21-hydroxyl group. The acetyl group is represented as -O-C(=O)-CH<sub>3</sub>. The steroid nucleus has methyl groups at C-10 and C-13, and a ketone group at C-20. The hydroxyl groups at C-11 and C-17 are in the alpha position.</p>
Hydrokortison-acetát	Obr. 16: Strukturní vzorec hydrokortison-acetátu [3]
RT: 1,803 min	 <p>The structure is similar to cortisone acetate but includes a hydroxyl group at C-11. The acetyl group is attached to the 21-hydroxyl group. The steroid nucleus has methyl groups at C-10 and C-13, and a ketone group at C-20. The hydroxyl groups at C-11 and C-17 are in the alpha position.</p>
Butyl-4-hydroxybenzoát	Obr. 17: Strukturní vzorec butylparabenu [3]
RT: 1,838 min	 <p>The structure shows a benzene ring with a hydroxyl group at the para position and a butyl ester group at the other para position. The butyl group is represented as -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>.</p>
Dexamethason	Obr. 18: Strukturní vzorec dexamethasonu [3]
RT: 1,867 min	 <p>The structure shows the dexamethasone skeleton with a fluorine atom at C-13 and a hydroxyl group at C-21. The steroid nucleus has methyl groups at C-10 and C-13, and a ketone group at C-20. The hydroxyl groups at C-11 and C-17 are in the alpha position.</p>

β- estradiol	Obr. 19: Strukturní vzorec estradiolu [3]
RT: 1,921 min	
Trimethoprim	Obr. 20: Strukturní vzorec trimetoprimu [3]
RT: 1,930 min	
Verapamil-hydrochlorid	Obr. 21: Strukturní vzorec verapamil-hydrochloridu [3]
RT: 5,541 min	
Flufenazin-dihydrochlorid	Obr. 22: Strukturní vzorec flufenazin-dihydrochloridu [3]
RT: 9,081 min	

Perfenazin	Obr. 23: Strukturní vzorec perfenazinu [3]
RT: 11,731 min	
Terbinafin	Obr. 24: Strukturní vzorec terbinafinu [28]
RT: 14,999 min	 <p style="text-align: center;">Terbinafine</p>
Pindolol	Obr. 25: Strukturní vzorec pindololu [3]
RT: 24 min	
Ketokonazol	Obr. 26: Strukturní vzorec ketokonazolu[3]
RT: 1,739 min	

Flukonazol	Obr. 27: Strukturní vzorec flukonazolu [29]
RT: 2,313 min	

### 3.4 Testování robustnosti

Robustnost byla testována na koloně Discovery ZR-PBD (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm) při poměru mobilní fáze acetonitril/voda 50:50. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a dávkovaný objem měl hodnotu 3  $\mu$ l.

Byl testován standardní roztok č. 2 (50 mg klotrimazolu; 5 mg nečistot; 20 mg ibuprofenu) a standardní roztok č. 3 (50 mg klotrimazolu; 5 mg nečistot; 20 mg verapamilu).

#### 3.4.1 Vliv pH mobilní fáze

Byly testovány mobilní fáze s pH vodné složky upraveným na následující hodnoty: 9,2; 9,5; 9,7 a 10 a 11.

#### 3.4.2 Vliv teploty

Byla testována pracovní teplota při vlastním HPLC měření nastavená ve třech úrovních 25, 40 a 60  $^{\circ}$ C při poměru fází acetonitril/ voda 50:50 (pH vodné složky 11).

## **4 Výsledky a diskuse**

## 4.1 Výběr vhodné chromatografické kolony

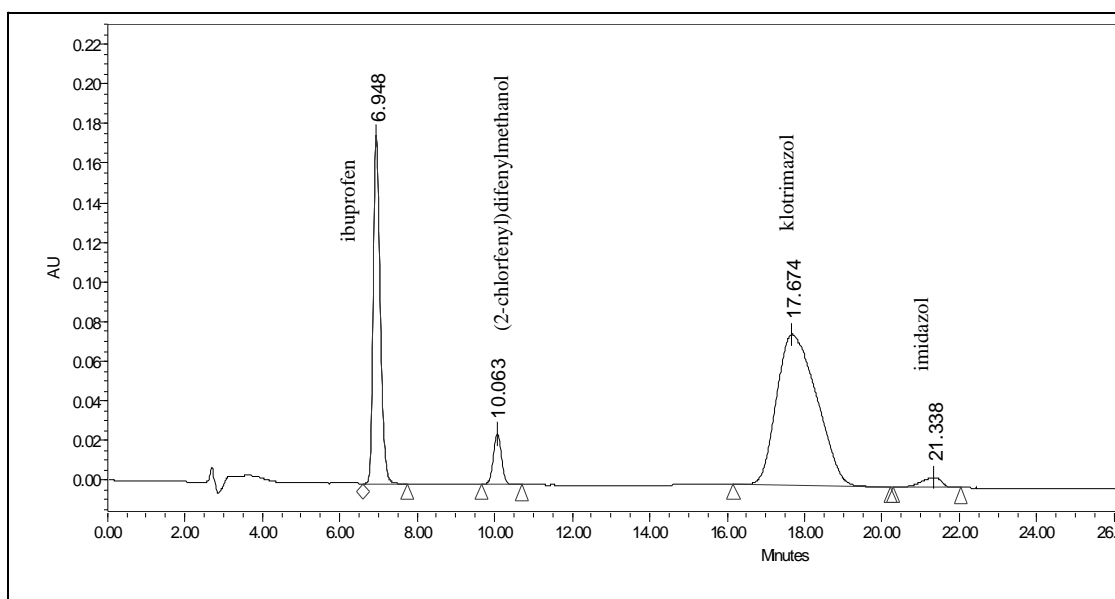
### 4.1.1 Discovery HS F5

#### Výsledky stanovení:

Analýza při použití mobilní fáze o pH 3,45 (vodná fáze) proběhla do 23 minut při průtoku 0,5 ml/min a do 11 minut při průtoku 1 ml/min; podmínky viz. 3.3.2.1. Při analýze docházelo k pevnému zadržení klotrimazolu na koloně. Tato kolona za uvedených podmínek není vhodná pro separaci klotrimazolu od ostatních analyzovaných látek. Při průtoku 0,5 ml/min se ibuprofen eluoval v 7. minutě, (2-chlorfenyl)difenylmethanol v 10. minutě a imidazol ve 22. minutě.

Na obr. 28 je záznam při první analýze, kdy se ještě klotrimazol nezadržoval na koloně. Při další analýze se klotrimazol na koloně zadržoval, a proto v dalších záznamech již není. Při měření se projevovала špatná reprodukovatelnost výsledků.

Obr. 28: Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,45 kys. fosforečnou 5%), při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, Discovery HS F5 (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm).



## 4.1.2 Chromolith® Performance, RP-18e

### Výsledky stanovení:

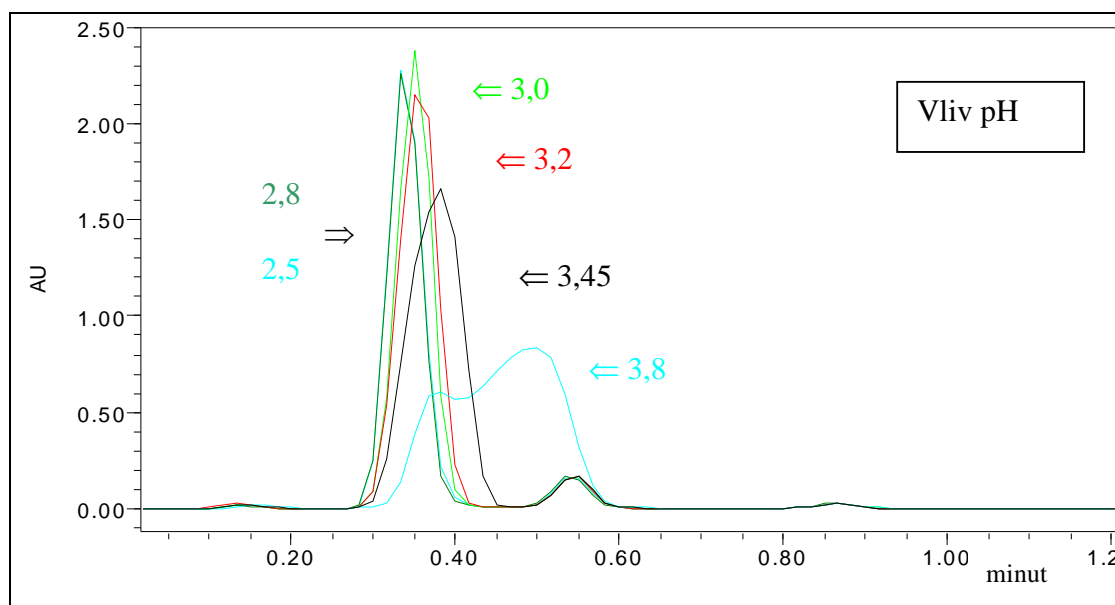
#### □ ACN/Voda

Bylo proměřeno pH (vodné fáze) 2,5; 2,8, 3; 3,2; 3,45; 3,8 a 5 a poměr mobilní fáze ACN/voda 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 45:55 a 40:60.

- Klotrimazol: změna pH výrazně neovlivňuje retenční čas, ani tvar píku  
změna poměru MF výrazně neovlivňuje čas, ani tvar píku
- Imidazol: změna pH výrazně neovlivňuje retenční čas, ani tvar píku  
změna poměru MF výrazně neovlivňuje čas, ani tvar píku
- CDM: změna pH výrazně neovlivňuje retenční čas, ani tvar píku  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času
- Ibuprofen: při pH 3,8 a vyšším (MF 65:35) dochází k vyšší ionizaci ibuprofenu,  
zkrácení retenčního času a k jeho přesunu před klotrimazol  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času

Analýza proběhla do 2 minut při všech zkoušených průtocích MF. Záznamy při užití uvedené HPLC kolony vykazovaly symetrické a úzké píky analyzovaných látek, analýza do pH 3,45 nebyla výrazně závislá na změnách pH, ale imidazol měl velmi krátký retenční čas, při kterém by mohlo docházet k interferencím s mrtvým objemem kolony a následnému ovlivnění výsledků analýz přítomností složek matrice vzorku.

Obr. 29: Chromatogram standardních roztoků při použití mobilní fáze acetonitril – voda (různé pH vodné složky) 65:35, při průtoku mobilní fáze 2,5 ml/min, Chromolith® Performance, RP-18e (100 x 3 mm), pořadí píků: imidazol, klotrimazol, ibuprofen a (2-chlorfenyl)difenylmetanol.



#### □ Met/Voda

Bylo proměřeno pH (vodné fáze) 2,5; 2,8, 3; 3,2; 3,5; 3,8; 5, 6; 6,8 a 7,25 a poměr mobilní fáze Met/voda 70:30, 65:35, 60:40, 50:50.

- Klotrimazol: pH 2,5-3,8 retenční čas 0,5-1 minuta  
pH 5-7,25 retenční čas 2 minuty  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k mírnému prodloužení retenčního času
- Imidazol: změna pH výrazně neovlivňuje retenční čas, ani tvar píku  
změna poměru MF výrazně neovlivňuje čas, ani tvar píku  
na rozdíl od MF ACN/Voda dochází k mírnému prodloužení retenčního času a k výraznějšímu oddělení od klotrimazolu
- CDM: změna pH výrazně neovlivňuje retenční čas, ani tvar píku, ale při pH 5 a vyšším dochází k překrytí píku klotrimazolem

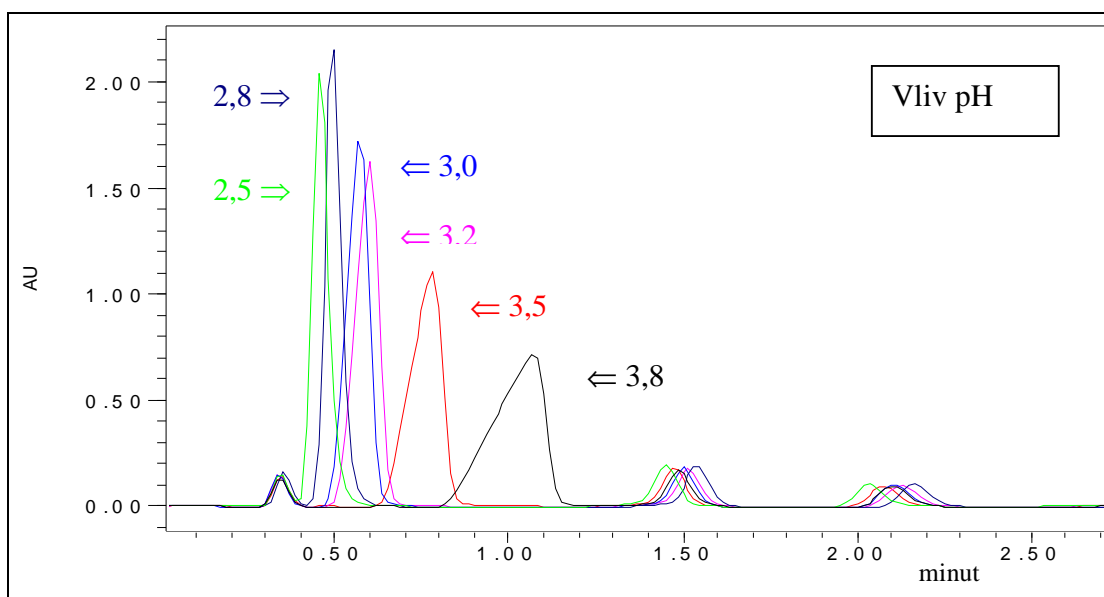


při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času

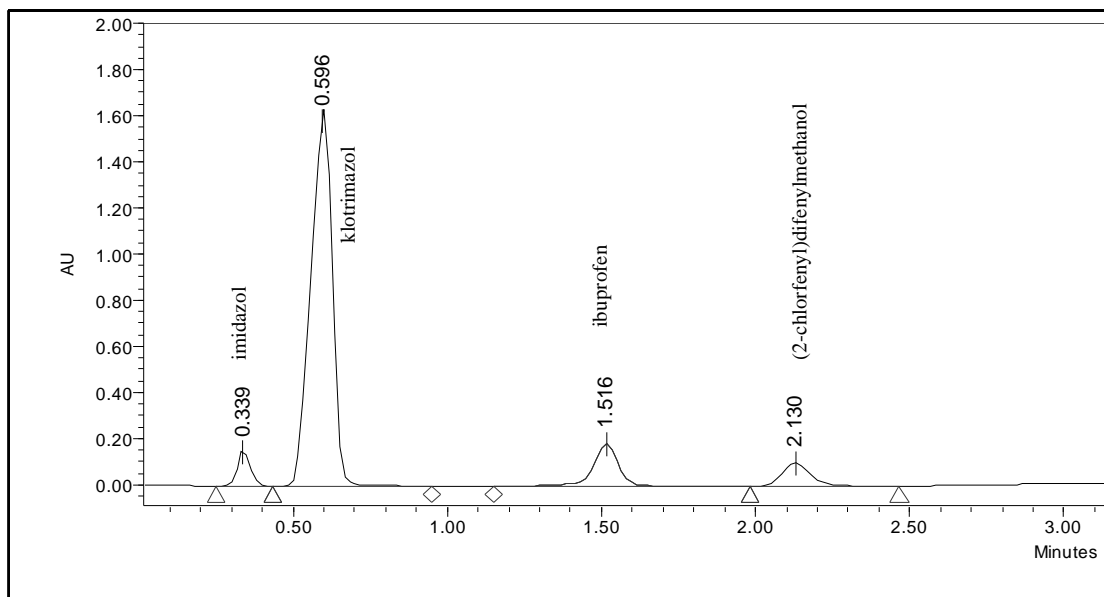
- Ibuprofen: při pH 5 a vyšším (MF 65:35) dochází k vyšší ionizaci ibuprofenu, zkrácení retenčního času a k jeho přesunu před klotrimazol  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času

Všechny analýzy byly měřeny při průtoku 2,5 ml/min. Nejkratší čas analýzy byl dosažen při poměru mobilní fáze 70:30 a to okolo 2 minut. Nejdelší čas analýzy byl při poměru fází 50:50 a to asi 15 minut. Analýza v rozmezí pH 2,5-3,5 nebyla výrazně závislá na pH, vycházely symetrické tvary píků. Ve srovnání s předešlou mobilní fází ACN/Voda se podařilo nepatrně prodloužit retenční čas imidazolu a oddělit ho od klotrimazolu, ale bohužel ne natolik, aby se ho podařilo úplně oddělit od mrtvého objemu. Mrtvý objem kolonky byl identifikován pomocí KI.

Obr. 30: Chromatogram standardních roztoků při použití mobilní fáze methanol – voda (různé pH vodné složky) 65:35 při průtoku mobilní fáze 2,5 ml/min, Chromolith® Performance, RP-18e (100 x 3 mm), pořadí píků: imidazol, klotrimazol, ibuprofen a (2-chlorfenyl)difenylmetanol.



Obr. 31: Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze methanol – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,2 kys. fosforečnou 5%), při průtoku mobilní fáze 2,5 ml/min, Chromolith® Performance, RP-18e (100 x 3 mm).

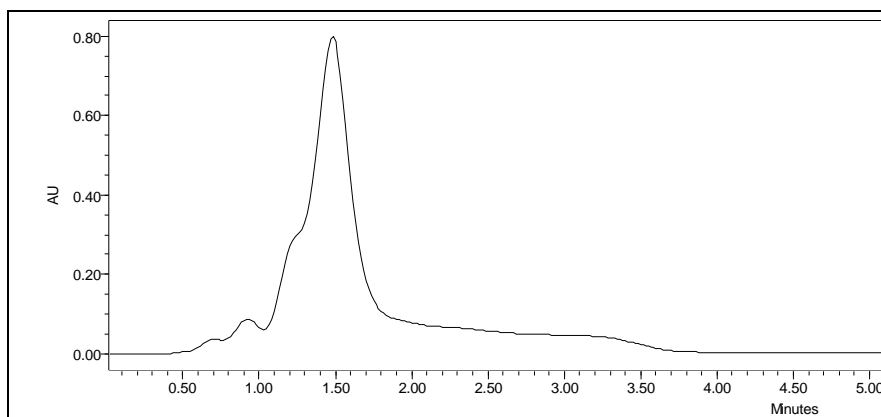


#### 4.1.3 ZIC® HILIC

##### Výsledky stanovení:

Byla proměřena různá pH a různé poměry mobilních fází viz. 3.3.2.3, ale v žádném z uvedených případů nedošlo k rozdělení směsi.

Obr. 32: Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – kys. octová 0,5mM 40:60 (pH 3,96), při průtoku mobilní fáze 0,3 ml/min.



Pozn.: Z důvodu nedokonalého rozdělení složek směsi, nebyly identifikovány jednotlivé látky.

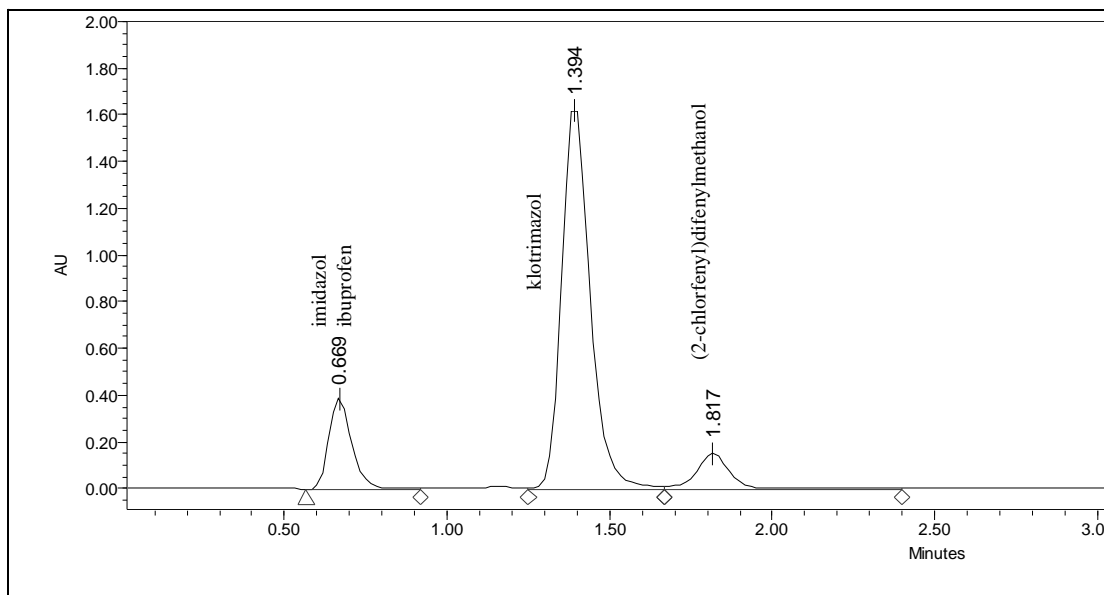
#### 4.1.4 XTerra® RP 18

##### Výsledky stanovení:

- Klotrimazol: při zvyšování pH došlo k mírnému prodloužení retenčního času  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k mírnému prodloužení  
retenčního času a k mírnému rozšíření píků
- Imidazol: změna pH výrazně neovlivňuje retenční čas, ani tvar píku  
změna poměru MF výrazně neovlivňuje čas, ani tvar píku
- CDM: změna pH výrazně neovlivňuje retenční čas  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času  
a k rozmývání píků
- Ibuprofen: při pH 5 a vyšším (MF 65:35) dochází k vyšší ionizaci ibuprofenu,  
zkrácení retenčního času a k jeho přesunu před klotrimazol, který se  
eluuje ve stejném čase jako imidazol  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k mírnému prodloužení  
retenčního času

Čas analýzy byl při poměru mobilních fází 65:35 do 2 minut, při poměru fází 50:50 dosahoval 6 minut; podmínky viz. 3.3.2.4. Pro mobilní fázi o pH 7,25 a poměru organické (acetonitril) a vodné složky 65:35 byly získány symetrické tvary píků. Analýza trvala 2 minuty, ale ve stejném retenčním čase eluoval imidazol, ibuprofen a KI, který identifikuje mrtvý objem kolony. Při použití mobilní fáze o pH 11 a poměru organické a vodné složky 65:35 se podařilo rozdělit pík ibuprofenu a imidazolu. KI mělo stejný retenční čas jako ibuprofen a tím bylo potvrzeno oddělení imidazolu od mrtvého objemu. Došlo k přiblížení klotrimazolu k (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, což zhoršilo rozlišení obou píků. Oba píky měly rozšířenější tvar.

Obr. 33: Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 7,25 kys. fosforečnou 5%), při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, XTerra® RP 18 (5 µm, 100 x 3 mm).



#### 4.1.5 Discovery RP Amide C 16

##### Výsledky stanovení:

- Klotrimazol: při zvyšování pH došlo k prodloužení retenčního času a k rozšíření píků  
změna poměru MF výrazně neovlivňuje čas, ani tvar píku
- Imidazol: při pH 5 a vyšším se nepatrně prodlužuje retenční čas a dochází k rozšíření píků  
změna poměru MF výrazně neovlivňuje čas, ani tvar píku
- CDM: změna pH neovlivňuje retenční čas  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času a k rozšiřování píků
- Ibuprofen: při zvyšování pH dochází k mírnému prodloužení retenčního času  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času

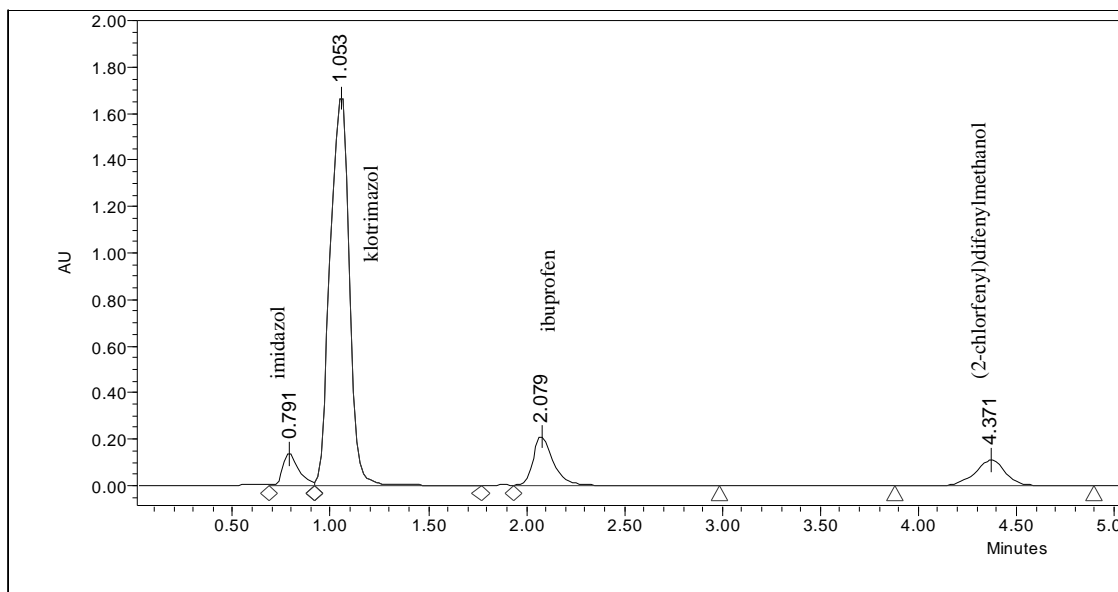


při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času a k rozšiřování píků

- Ibuprofen: při zvyšování pH dochází k vyšší ionizaci ibuprofenu, zkrácení retenčního času a k jeho přesunu před klotrimazol, který se eluuje ve stejném čase jako imidazol  
při pH 3 a zvýšeném poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času

Čas analýzy byl při poměru mobilních fází 65:35 do 4,5 minut a při poměru fází 50:50 trvala analýza 15 minut; podmínky viz. 3.3.2.6. Při použití mobilní fáze o pH 3 a 3,5 a poměru organické a vodné složky 65:35 nedocházelo k úplnému rozlišení píků imidazolu a klotrimazolu. Při použití mobilní fáze o pH 4 a vyšším docházelo k vyšší ionizaci ibuprofenu a ke zkrácení retenčního času, který byl stejný jako retenční čas imidazolu. Ani při použití mobilní fáze o pH 11 se nepodařilo imidazol oddělit. Imidazol eluoval v nízkém retenčním čase, při kterém může docházet k interferencím s mrtvým objemem kolony.

Obr. 35: Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,5 kys. fosforečnou 5%), při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, Zorbax Extend-C18 (3,5  $\mu$ m, 75 x 4,6 mm).



#### 4.1.7 Discovery ZR-PBD

##### Výsledky stanovení:

- Klotrimazol: při zvyšování pH do 5 se prodlužuje retenční čas, od pH 9 klesá při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času
- Imidazol: při zvyšování pH dochází ke zvýšené ionizaci, a proto se zkracuje retenční čas  
změna poměru MF výrazně neovlivňuje čas, ani tvar píku
- CDM: při zvyšování pH dochází ke zvýšené ionizaci, a proto se zkracuje retenční čas  
při zvýšení poměru vodné fáze dochází k prodloužení retenčního času a k rozšiřování píků
- Ibuprofen: při zvyšování pH do 5 se prodlužuje retenční čas, od pH 9 klesá změna poměru MF výrazně neovlivňuje čas, ani tvar píku

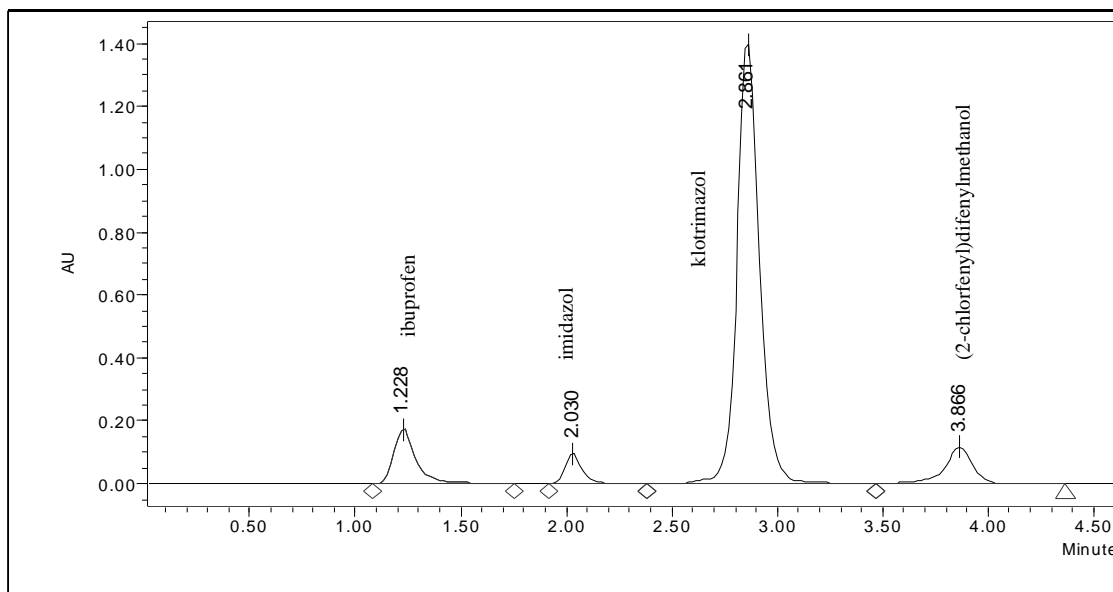
Čas analýzy byl při poměru mobilních fází 60:40 do 2,5 minut, při poměru fází 50:50 trvala analýza 4 minuty a při poměru fází 40:60 9 minut; podmínky viz. 3.3.2.7. Byla proměřena pracovní teplota 25, 40 a 60°C při poměru fází 50:50 a pH 11(vodná fáze). Při teplotě 60°C trvala analýza do 3,5 minut, při 40°C do 3,8 minut a při laboratorní teplotě do 4 minut.

Při použití mobilní fáze o pH 3 a 3,5 se nepodařilo oddělit pík klotrimazolu od píků nečistot. Při pH 5 došlo k rozšíření píků klotrimazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu. Při použití mobilní fáze o pH 9 došlo k oddělení píku (2-chlorfenyl)difenylmethanolu od píku klotrimazolu a k částečnému oddělení píku imidazolu. Při pH 11 již došlo k dokonalé separaci všech píků, ale pík imidazolu již měl takový retenční čas, při kterém by mohlo docházet k interferencím s mrtvým objemem kolony.

Při pH 9,5 se podařilo imidazol oddělit od mrtvého objemu kolony, což bylo dokázáno nástřikem metanolu.

Byla vyzkoušena změna úpravy vodné fáze. Na úpravu byl použit triethylamin a kys. mravenčí, ale tvar píků se nezlepšil a retenční čas zůstal téměř stejný.

Obr. 36: Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 50:50 (pH vodné složky upraveno na 9,5 amoniakem 25%), při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, Discovery ZR-PBD (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm).



## 4.2 Nové chromatografické podmínky

<b>Mobilní fáze:</b>	acetonitril - voda (50:50), pH vodné složky upraveno na 9,7 amoniakem 25%
<b>Kolona:</b>	Discovery ZR-PBD, 5 $\mu$ m, 150 x 4,6 mm
<b>Průtok Fm:</b>	1 ml/min
<b>Vlnová délka <math>\lambda</math>:</b>	210 nm
<b>Dávkovaný objem:</b>	3 $\mu$ l
<b>Teplota:</b>	laboratorní



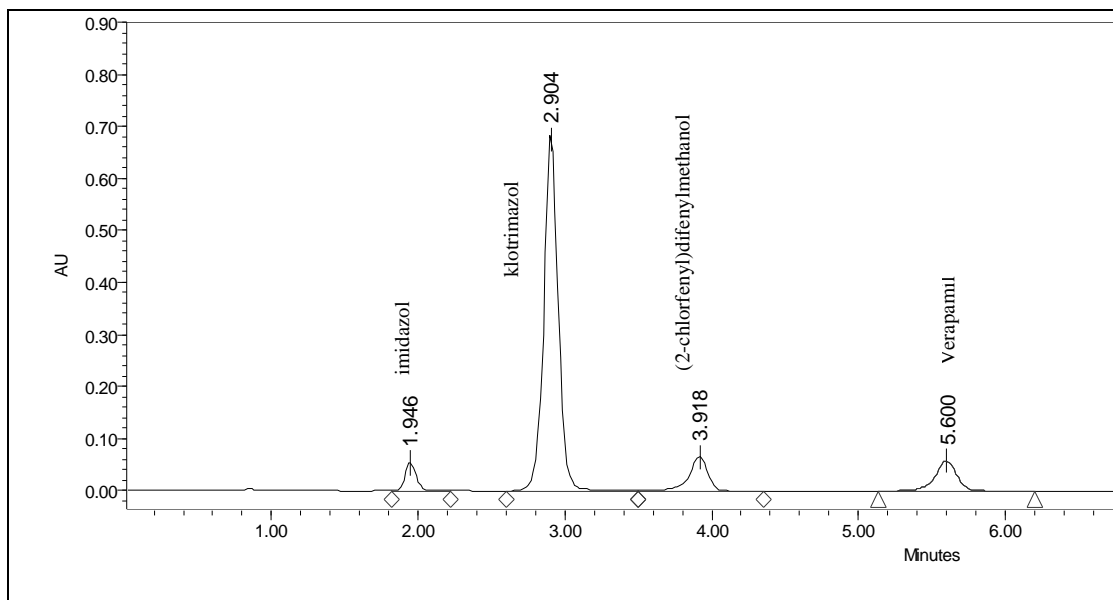
### 4.3 Výsledky výběru vnitřního standardu

Cílem bylo nalézt takové léčivo, které se bude eluovat v retenčním čase mezi imidazolem a klotrimazolem, nebo klotrimazolem a (2-chlorfenyl)difenylmethanolem. Z výše uvedeného přehledu, viz. 3.3.3.2, je patrné, že ani jedna látka nespĺnila přesně tento požadavek. Většina látek eluovala ve stejném, nebo podobném retenčním čase jako ibuprofen. Některé látky měly retenční čas příliš dlouhý a to bylo nežádoucí z důvodu prodloužení celkového času analýzy.

Jediné léčivo, které mělo delší retenční čas než klotrimazol, ale neprodlužovalo tolik čas analýzy, byl verapamil. Jeho retenční čas měl hodnotu 5,541 min. Analýza proběhla v tomto případě do 6 minut.

**Dále byly testovány látky verapamil a ibuprofen.**

Obr. 37: Chromatogram standardního roztoku, který obsahuje jako vnitřní standard verapamil, při použití mobilní fáze acetonitril – voda 50:50 (pH vodné složky upraveno na 10 amoniakem 25%), při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, Discovery ZR-PBD (5 µm, 150 x 4,6 mm).



## 4.4 Testování robustnosti

### 4.4.1. Vliv pH mobilní fáze

#### 4.4.1.1 Roztok standardů – vnitřní standard ibuprofen

❖ *Vliv na plochu píku*

Vliv na plochu chromatografického píku je vyjádřen v procentech. Výpočet byl proveden podle vzorce:

$$A_R = 100 \cdot A_i / A_{pH9,7}$$

$A_i$  = plocha píku ;  $A_{pH9,7}$  = plocha píku při optimálním pH mobilní fáze

**Výsledky stanovení:** Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5, Tab. 6 a Tab.7. Při pH 9,2 nedošlo k optimálnímu rozlišení píku klotrimazolu a píku imidazolu, a proto nebyly hodnoceny plochy píků obou látek při tomto pH. Relativní plocha píku klotrimazolu vztažená na plochu píku při optimálním pH mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 91,53 % až 102,13 %. Relativní plocha píku nečistot vztažená na plochu píku při optimálním pH mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 91,38 % až 101,08 % pro imidazol a 91,04 % až 104,49 % pro (2-chlorfenyl)difenylmetanol. Relativní plocha píku ibuprofenu vztažená na plochu píku při optimálním pH mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 99,65% až 101,12%.

Tab. 5: Vliv pH mobilní fáze na plochu píku klotrimazolu

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	KLOTRIMAZOL	
	$A_i$	$A_r$ (%)
9,2	-	-
9,5	10480193	100,55
9,7	10423062	100,00
10	10645298	102,13
11	9540242	91,53

Tab. 6: Vliv pH mobilní fáze na plochu píku nečistot

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	IMIDAZOL		(2-CHLORFENYL)DIFENYL METANOL	
	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)
9,2	-	-	1120984	104,49
9,5	574297	100,11	1093184	101,90
9,7	573685	100,00	1072807	100,00
10	579854	101,08	1102865	102,80
11	524214	91,38	976707	91,04

Tab. 7: Vliv pH mobilní fáze na plochu píku ibuprofenu (vnitřní standard)

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	IBUPROFEN	
	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)
9,2	1347100	100,20
9,5	1343172	99,91
9,7	1344447	100,00
10	1359495	101,12
11	1339778	99,65

❖ *Vliv na retenční čas*

**Výsledky stanovení:** Výsledky jsou uvedeny v *Tab. 8, Tab. 9 a Tab. 10*. Retenční čas klotrimazolu se pohyboval v rozmezí 2,67 min až 2,95 min, imidazolu v rozmezí 1,73 min až 2,74 min, (2-chlorfenyl)difenylmetanolu v rozmezí 3,63 min až 3,91 min a ibuprofenu 1,15 min až 1,37 min. Se stoupajícím pH mobilní fáze (v uvedené oblasti) se snižovaly retenční časy všech píků v důsledku zvýšené ionizace.

Tab. 8: Vliv pH mobilní fáze na retenční čas klotrimazolu

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	KLOTTRIMAZOL
	t <sub>R</sub> (min)
9,2	2,95
9,5	2,86
9,7	2,83
10	2,81
11	2,67

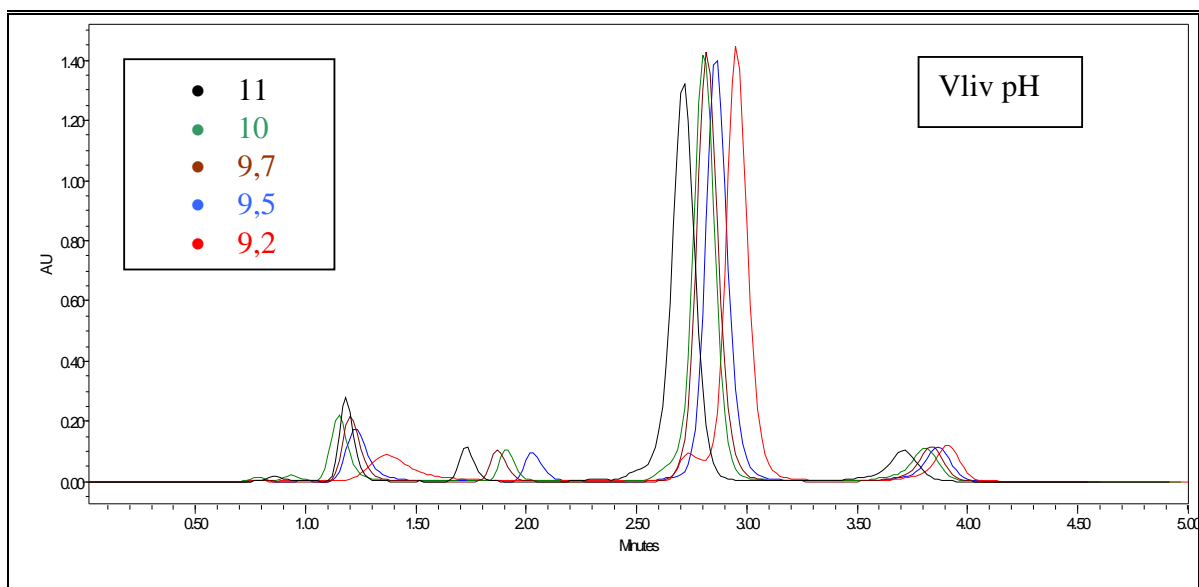
Tab. 9: Vliv pH mobilní fáze na retenční časy nečistot

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	IMIDAZOL	(2-CHLORFENYL)DIFENYL METANOL
	t <sub>R</sub> (min)	t <sub>R</sub> (min)
9,2	2,74	3,91
9,5	2,02	3,87
9,7	1,95	3,84
10	1,91	3,81
11	1,73	3,63

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

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	IBUPROFEN
	t <sub>R</sub> (min)
9,2	1,37
9,5	1,23
9,7	1,22
10	1,15
11	1,18

Obr. 38: Chromatogram standardních roztoků při použití mobilní fáze acetonitril – voda (různé pH vodné složky) 50:50 při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, Discovery ZR-PBD (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm), pořadí píků: ibuprofen, imidazol, klotrimazol a (2-chlorfenyl)difenylmetanol.



#### 4.4.1.2 Roztok standardů – vnitřní standard verapamil

##### ❖ *Vliv na plochu píku*

**Výsledky stanovení:** Výsledky jsou uvedeny v *Tab. 11*, *Tab. 12* a *Tab. 13*. Relativní plocha píku klotrimazolu vztažená na plochu píku při optimálním pH mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 97,70 % až 100,00 %. Relativní plocha píku nečistot vztažená na plochu píku při optimálním pH mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 99,41 % až 100,25 % pro imidazol a 96,49 % až 100,22 % pro (2-chlorfenyl)difenylmetanol. Relativní plocha píku verapamilu vztažená na plochu píku při optimálním pH mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 93,27 % až 100,31 %.

Tab. 11: Vliv pH mobilní fáze na plochu píku klotrimazolu

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	KLOTRIMAZOL	
	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)
9,5	10421368	99,90
9,7	10431973	100,00
10	10374986	99,45
11	10191708	97,70

Tab. 12: Vliv pH mobilní fáze na plochu píku nečistot

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	IMIDAZOL		(2-CHLORFENYL)DIFENYL METANOL	
	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)
9,5	608908	99,41	1121525	100,22
9,7	612552	100,00	1119107	100,00
10	614090	100,25	1097624	98,08
11	611872	99,89	1079808	96,49

Tab. 13: Vliv pH mobilní fáze na plochu píku verapamilu (vnitřní standard)

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	VERAPAMIL	
	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)
9,5	2292520	100,31
9,7	2285369	100,00
10	2261905	98,97
11	2131669	93,27

❖ *Vliv na retenční čas*

**Výsledky stanovení:** Výsledky jsou uvedeny v *Tab. 14, Tab. 15 a Tab.16*. Retenční čas klotrimazolu se pohyboval v rozmezí 2,78 min až 2,92 min. Se stoupajícím pH mobilní fáze se snižoval retenční čas píku klotrimazolu v důsledku zvýšené ionizace. Retenční čas imidazolu se pohyboval v rozmezí 1,75 min až 2,23 min. Se stoupajícím pH mobilní fáze se snižoval retenční čas píku imidazolu v důsledku zvýšené ionizace. Retenční čas (2-chlorfenyl)difenylmetanolu se pohyboval v rozmezí 3,78 min až 3,89 min. Se stoupajícím pH mobilní fáze se snižoval retenční čas píku (2-chlorfenyl)difenylmetanolu v důsledku zvýšené ionizace. Retenční čas verapamilu se pohyboval v rozmezí 2,27 min až 11,44 min. Se stoupajícím pH mobilní fáze se výrazně snižoval retenční čas píku verapamilu, v důsledku zvýšené ionizace.

Tab. 14: Vliv pH mobilní fáze na retenční čas klotrimazolu

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	KLOTTRIMAZOL
	t <sub>R</sub> (min)
9,5	2,92
9,7	2,90
10	2,84
11	2,78

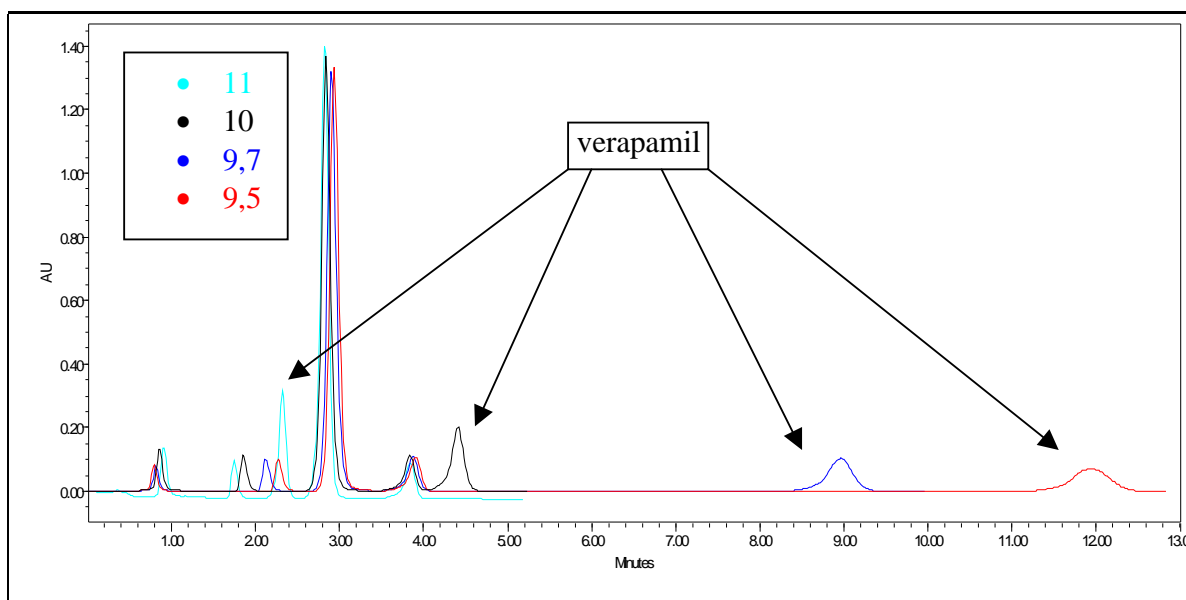
Tab. 15: Vliv pH mobilní fáze na retenční časy nečistot

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	IMIDAZOL	(2-CHLORFENYL)DIFENYL METANOL
	t <sub>R</sub> (min)	t <sub>R</sub> (min)
9,5	2,23	3,89
9,7	2,11	3,88
10	1,86	3,84
11	1,75	3,78

Tab. 16: Vliv pH mobilní fáze na retenční čas verapamilu (vnitřní standard)

ACN/H <sub>2</sub> O (50:50)	VERAPAMIL
	t <sub>R</sub> (min)
9,5	11,44
9,7	8,78
10	4,41
11	2,27

Obr. 39: Chromatogram standardních roztoků při použití mobilní fáze acetonitril – voda (různé pH vodné složky) 50:50 při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, Discovery ZR-PBD (5 μm, 150 x 4,6 mm)



## 4.4.2 Vliv teploty

### 4.4.2.1 Roztok standardů – vnitřní standard ibuprofen

#### ❖ Vliv na plochu píku

Vliv na plochu chromatografického píku je vyjádřen v procentech. Výpočet byl proveden podle vzorce:

$$A_R = 100 \cdot A_i / A_{t=25^{\circ}C}$$

$A_i$  = plocha píku;  $A_{t=25^{\circ}C}$  = plocha píku při optimální teplotě

**Výsledky stanovení:** Výsledky jsou uvedeny v *Tab. 17 a Tab. 18*. Relativní plocha píku klotrimazolu vztažená na plochu píku při optimálním pH mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 97,51 % až 100,00 %. Relativní plocha píku nečistot vztažená na plochu píku



při optimálním pH mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 99,76 % až 100,88 % pro imidazol a 96,24 % až 100,00 % pro (2-chlorfenyl)difenylmetanol.

Tab. 17: Vliv teploty na plochu píku klotrimazolu

t [°C]	KLOTTRIMAZOL	
	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)
25	10411787	100,00
40	10216254	98,12
60	10152908	97,51

Tab. 18: Vliv teploty na plochu píku nečistot

t [°C]	IMIDAZOL		(2-CHLORFENYL)DIFENYL METANOL	
	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)	A <sub>i</sub>	A <sub>r</sub> (%)
25	582176	100,00	1088398	100,0
40	580774	99,76	1066547	97,99
60	587319	100,88	1047505	96,24

❖ *Vliv na retenční čas*

**Výsledky stanovení:** Výsledky jsou uvedeny v Tab. 19 a Tab.20. Retenční čas klotrimazolu se pohyboval v rozmezí 2,44 min až 2,75 min. Retenční čas imidazolu se pohyboval v rozmezí 1,69 min až 1,73 min. Retenční čas (2-chlorfenyl)difenylmetanolu se pohyboval v rozmezí 3,25 min až 3,76 min. Při 60°C se všechny píky testovaných látek eluovaly v kratším čase než při 25°C.

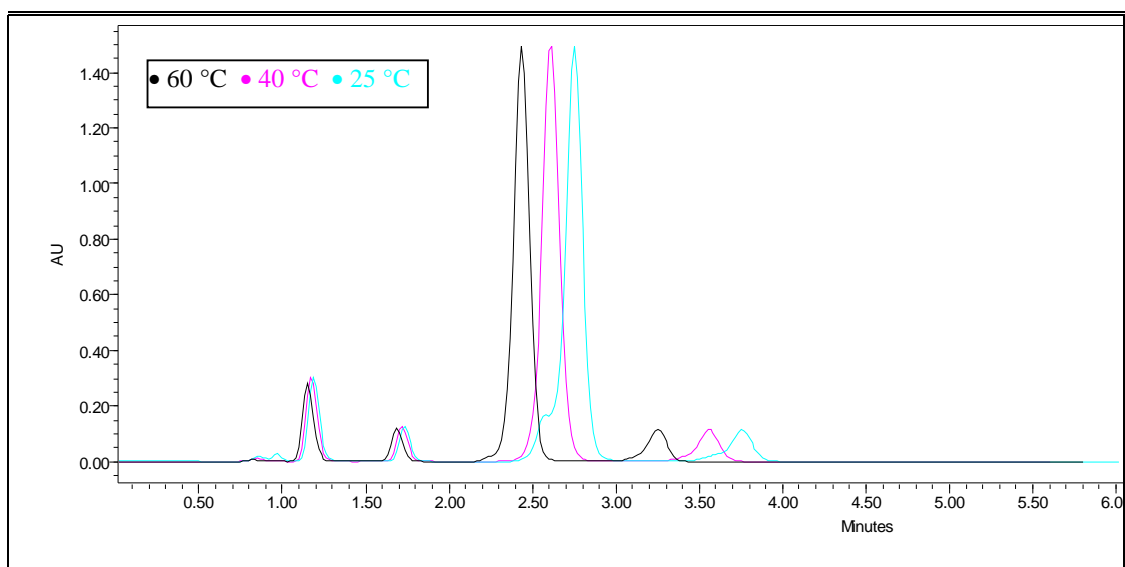
Tab. 19: Vliv teploty na retenční čas klotrimazolu

t [°C]	KLOTTRIMAZOL
	t <sub>R</sub> (min)
25	2,75
40	2,61
60	2,44

Tab. 20: Vliv teploty na retenční časy nečistot

t [°C]	IMIDAZOL	(2-CHLORFENYL)DIFENYL METANOL
	t <sub>R</sub> (min)	t <sub>R</sub> (min)
25	1,73	3,76
40	1,72	3,56
60	1,69	3,25

Obr. 40: Chromatogram standardních roztoků při použití mobilní fáze acetonitril – voda 50:50 (pH vodné složky upraveno na 11 amoniakem 25 %), při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Stanovení probíhá při různých teplotách.



# **5 Závěr**

- Byla provedena rešerše HPLC a ostatních metod pro hodnocení klotrimazolu.
- Byla vypracována HPLC metoda na hodnocení obsahu klotrimazolu a příslušných nečistot (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a imidazolu v přípravku CLOTRIMAZOL spray 1 %.
- Jako optimální mobilní fáze byla zvolena směs acetonitrilu a vody v poměru 50 : 50.
- Jako optimální pH vodné složky bylo zvoleno pH 9,7 upravené roztokem NH<sub>4</sub>OH 25 %.
- Jako optimální kolona byla zvolena Discovery ZR-PBD, 5 μm, 150 x 4,6 mm, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Jako optimální průtok byl zvolen 1 ml/min.
- Byla použita vlnová délka 210 nm.
- Jako optimální dávkovaný objem byl zvolen objem 3 μl.
- Jako optimální teplota byla zvolena laboratorní teplota.
- Bylo testováno 20 látek pro použití jako vnitřní standard.
- U ibuprofenu a verapamilu byla testována robustnost jejich užití.
- Požadované parametry splnil ibuprofen, a proto byl vybrán pro vlastní stanovení klotrimazolu a jeho nečistot.
- Vypracovaná metoda má ve srovnání s původní metodou podstatně lepší robustnost.
- Vypracovaná metoda má menší závislost dělení látek a jejich retenčních časů na malých změnách pH mobilní fáze než původní metoda.

# **6 Literatura**

- [1] [http://www.bf.jcu.cz/tix/sima/analyticka\\_chemie/separ\\_met\\_I.htm](http://www.bf.jcu.cz/tix/sima/analyticka_chemie/separ_met_I.htm) - 12/2005
- [2] Milan Popl, Jaroslav Kubát, Separace látek, SNTL-Nakladatelství technické literatury, Praha 1986.
- [3] ČESKÝ LÉKOPIS 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a.s., Praha, 2005
- [4] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> - 6/2007
- [5] Pavel Klouda, Moderní analytické metody, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [6] [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/HS\\_F5.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/HS_F5.html) - 11/2007
- [7] [www.chromatography.merck.de](http://www.chromatography.merck.de) - 11/2007
- [8] [http://www.sequant.com/sn/p\\_details.php?id=7](http://www.sequant.com/sn/p_details.php?id=7) - 11/2007
- [9] <http://www.waters.cz/ie/index.html> - 11/2007
- [10] [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/Discovery\\_RP\\_Amide\\_C16\\_HPLC\\_Columns.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/Discovery_RP_Amide_C16_HPLC_Columns.html) - 11/2007
- [11] <http://www.labicom.cz/default.aspx?server=1&article=293&section=23> - 11/2007
- [12] [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz) - 11/2007
- [13] [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/discovery\\_zr\\_pbd.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/discovery_zr_pbd.html) - 10/2007
- [14] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals of Human Use, *ICH official Website*, [www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf](http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf) - 07/2007
- [15] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=7847348> - 10/2007
- [16] [http://www.sukl.cz/\\_download/pil/PI64167.doc](http://www.sukl.cz/_download/pil/PI64167.doc) - 06/2007
- [17] P. Solich, R. Hajkova, M. Pospisilova, J. Sicha, *Chromatographia*, 55 (2002) 181 - 184.
- [18] E.M. Abdel-Moety, F.I. Khattab, K.M. Kelani, A.M. AbouAl-Alamein, *Farmaco*, 57 (2002) 931 – 938.
- [19] D.P. Huang, L.S. Wang, *Yaowu-Fenxi-Zazhi.*, 22(2) (2002) 129 – 131.

- (Abstrakt v angličtině přístupný v Analytical Abstracts 1980 - 2005/08)
- [20] J.Y. Huang, H.M. Wang, *Zhongguo-Yiyao-Gongye-Zazhi.*, 33(8) (2002) 405 - 416.
- (Abstrakt v angličtině přístupný v Analytical Abstracts 1980 - 2005/08)
- [21] L. Gagliardi, D. de-Orsi, P. Chimenti, R. Porra, D. Tonelli, *Anal. Sci.*, 19(8) (2003) 1195 - 1197.
- [22] R. Hájková, H. Sklenářová, L. Matysová, P. Švecová, P. Solich, *Talanta*, 73 (2007) 483-489.
- [23] D. Bonazzi, V. Cavrini, R. Gatti, E. Boselli, M. Caboni, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 235–240.
- [24] A. Arranz, C. Echevarria, J.M. Moreda, A. Cid, J.F. Arranz, *J. Chromatogr. A*, 871 (1-2) (2000), 399-402.
- [25] A.L. Crego, J. Gomez, M.L. Marina, J.L. Lavandera, *Electrophoresis*, 22 (2001) 2503 – 2511.
- [26] A.L. Crego, M.L. Marina, J.L. Lavandera, *J. Chromatogr. A*, 917 (1-2) (2001) 337 – 345.
- [27] J. Iliaszenko, M. Sokolowska, R. Paruszewski, *Acta Pol. Pharm.*, 58(6) (2001) 411 – 414.
- [28] <http://www.infektionsnetz.at/AntimykotikaTerbinafin.phtml> - 11/2007
- [29] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3365> - 3/2008