

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE

A KONTROLY LÉČIV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Analytické hodnocení léčiv s využitím chromatografických metod I.

(Nalezení podmínek pro současné stanovení klotrimazolu a benzylalkoholu)

Hradec Králové 2007

Michal Hladík

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, RNDr. Milanu Mokrému, za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracovávání i sepsování této diplomové práce. Poděkování dále patří i celému kolektivu Katedry Farmaceutické chemie a Kontroly léčiv za vstřícnost a ochotu pomoci i mimo rámec své vlastní práce.

OBSAH

1.ÚVOD	5
2.TEORETICKÁ ČÁST	7
<u>2.1. Definice a rozdělení chromatografických metod</u>	8
<u>2.2. Obecná teorie chromatografického děje</u>	11
<i>2.2.1. Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu</i>	15
<u>2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie</u>	16
<u>2.3.1. Instrumentace v HPLC</u>	17
2.3.1.1. Zásobníky mobilní fáze	17
2.3.1.2. Čerpadla mobilní fáze	18
2.3.1.3. Dávkovací zařízení	18
2.3.1.4. Chromatografické kolony a jejich náplně	18
2.3.1.5. Detektory	19
2.3.1.6. Zařízení pro zpracování dat	22
<u>2.4. Validace analytických metod</u>	23
<u>2.5. Benzylalkohol a jeho vlastnosti</u>	26
<u>2.6. Klotrimazol a jeho vlastnosti</u>	28
<i>2.6.1. Farmakologické vlastnosti klotrimazolu</i>	29
<i>2.6.2. Indikace a kontraindikace klotrimazolu</i>	29
<i>2.6.3. Interakce klotrimazolu</i>	30
<i>2.6.4. Nežádoucí účinky klotrimazolu</i>	30
<i>2.6.5. Přehled některých prací zabývajících se analýzou klotrimazolu</i>	30
3.CÍL PRÁCE	32
4.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
<u>4.1. Použitý chromatografický materiál, pomůcky, přístroje a chemikálie</u>	35
<u>4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro současné stanovení klotrimazolu a benzylalkoholu pomocí HPLC s UV detekcí</u>	37
<u>4.3. Sestrojení kalibrační křivky</u>	40

5.VÝSLEDKY A DISKUZE	41
<u>5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro současnou HPLC analýzu nezlalkoholu a klotrimazolu</u>	42
<u>5.2. Kalibrační křivka</u>	44
6. ZÁVĚR	52
7. LITERATURA	54

1. ÚVOD

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography) – je dnes široce užívaná separační metoda a stále prochází rychlým rozvojem. Umožňuje rychlou, selektivní analýzu i malého množství vzorku, a jeho kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení.

Benzylalkohol je pomocná látka s vlastním antiseptickým, konzervačním a lokálně anestetickým účinkem.

Klotrimazol je lokální azolové antimykotikum, s nízkou perkutánní resorpcí a přitom dostatečně účinné v místě podání, navíc s malým výskytem resistance- je proto s oblibou používán v různých antifungálních přípravcích.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Definice a rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, umožňující oddělení jednotlivých složek analyzované směsi a zároveň jejich kvalitativní i kvantitativní hodnocení. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít. Jelikož veškeré technické produkty a velká většina přírodních látek jsou složité směsi, mají chromatografické metody analýzy prvořadý význam.⁽¹⁾

Základním obecným principem chromatografických metod je nestejněměrné rozdělování složek směsi mezi stacionární a mobilní fázi, přičemž mobilní fáze postupně jednotlivé složky směsi vymývá (eluuje) z fáze stacionární. Předpokladem nestejněměrného rozdělení je různá afinita jednotlivých složek k uvedeným fázím nebo jejich nestejná schopnost difundovat do nich.⁽²⁾

Chromatografické metody lze dělit podle:

- podstaty separačního procesu
- použité techniky
- způsobu vyvíjení (uspořádání kolony)
- skupenství nepohyblivé a pohyblivé fáze⁽¹⁾

Dělení podle podstaty separačního procesu

Jedná se o nejstarší dělení chromatografických metod, protože však jsou ve skutečnosti velmi časté přechodné typy, jde spíše o seznámení s jednotlivými mechanismy dělení nežli o přísnou a přesnou taxonomii.

Adsorpční chromatografie

K separaci dochází na základě rozdílné adsorpce. Stacionární fáze sorbuje na svůj povrch s různou afinitou látky z fáze mobilní, čímž dochází k jejich vzájemnému dělení. Mobilní fáze může být kapalná nebo plynná, stacionární fáze pak nejčastěji pevná, mnohem vzácněji kapalná- systém plyn-kapalina (pěnová analýza) nemá velký praktický význam a u systému kapalina-kapalina se mnohem více uplatňuje mechanismus rozdělovací chromatografie.^(1,3)

Rozdělovací chromatografie

Látky rozpuštěné v soustavě dvou kapalin navzájem nemísitelných, nebo mísitelných pouze omezeně, se mezi ně dělí podle své rozpustnosti v jednotlivých složkách. Toto rozdělení lze vyjádřit rozdělovací konstantou K_D – poměrem rovnovážných koncentrací těžší látky v mobilní a stacionární fázi (abychom totiž dosáhli vzájemného pohybu fází a tedy chromatografického dělení, musí být jedna z nich pevně zakotvena na vhodném nosiči). Vlastní separace konkrétních látek závisí na rozdílu jejich rozdělovacích konstant.

Zpravidla se užívá dvojfázový systém, kdy jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu, přičemž zakotvena může být fáze vodná, kdy fáze organická je mobilní, i naopak- nasytit hydrofobně impregnovaný nosič organickou fází a fází vodnou volit jako mobilní – v takovém případě hovoříme o systému reversed phase (RP, obrácených fází) . Po vnesení roztoku dělené směsi dochází k jejich opakovanému rozdělování mezi stacionární a mobilní fází.

Rozdělovací chromatografii též lze uskutečnit mezi plynnou (mobilní) a kapalnou (stacionární) fází, je-li opět kapalina zakotvena na vhodném nosiči.^(1,4)

Iontově výměnná chromatografie

Na povrchu stacionární fáze (iontoměniče) dochází k elektrostatickým interakcím iontů dělených látek s ionogenními skupinami měniče a výměně iontů. Rychlost výměny závisí na mocenství náboje, velikosti a disociační konstantě iontů.^(1,5)

Gelová chromatografie

Stacionární fáze je pevná, ale pórovitá (nejčastěji je tvořena nabobtnalým gelem), a tyto póry jsou naplněny mobilní fází. K dělení molekul dochází na základě jejich rozdílné velikosti a tvaru- a to sestupně podle molekulové hmotnosti. Největší molekuly se eluují jako první- nevstupují do gelu, vyskytují se tedy pouze v mobilní fázi a jsou jí nejrychleji vymývány. Jako poslední vystupují malé molekuly, které mohou volně pronikat póry do gelu a tak se zpomalovat.^(1,6,7)

Afinitní chromatografie

Jde o selektivní analýzu, kdy využíváme velmi specifických interakcí (protilátka- antigen, enzym – substrát). Zatímco ostatní sloučeniny projdou kolonou, reagující látka je zachycena na koloně a lze ji následně izolovat. Tato metoda se používá k izolaci biologicky aktivních látek. ⁽²⁾

Dělení podle pracovní techniky

Frontální chromatografie

Technika spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi na kolonu, a to až do ukončení chromatografického procesu. Lze ji využít ke kvalitativnímu (vzdálenost píku) i kvantitativnímu (z derivační křivky) hodnocení. Nevýhodami jsou neschopnost izolovat čisté složky (s výjimkou části první složky) i nutnost složitějšího měřicího zařízení. Metoda má dnes význam již spíše historický, byla vyvinuta pro analytické účely. ⁽²⁾

Vytěšňovací chromatografie

Vzorek se na kolonu vnese jednorázově, poté se kontinuálně, až do konce celého procesu, přivádí roztok látky s vyšší afinitou k stacionární fázi nežli mají jednotlivé dělené složky. Dochází tedy k vytěšňování složek vzorku a tyto vycházejí z kolony seřazené vzestupně podle afinity, jako poslední vytéká čisté vytěšňovadlo. Při této metodě opět nedochází k úplnému rozdělení jednotlivých složek směsi. Využití metody je spíše preparativní a poloproduční nežli analytické. ⁽²⁾

Eluční chromatografie

Na kolonu se vnese malá část směsi a kolona se kontinuálně promývá mobilní fází, která má k fázi stacionární menší afinitu než kterákoliv ze složek směsi. Dochází k opakovanému ustalování rovnováhy a pohybu složek kolonou. Jednotlivé složky směsi se vymývají vzestupně podle afinity ke stacionární fázi a mohou od sebe být oddělené, což je velikou výhodou pro analytické použití metody- jak kvalitativní, tak kvantitativní. Nevýhodou je vyšší spotřeba rozpouštědel a menší kapacita kolony.

Nejjednodušší variantou eluční chromatografie je prostá (izokratická) eluce- od začátku do konce chromatografie se používá stále stejná mobilní fáze. Tato metoda je vhodná, jestliže se dělené látky příliš neliší v afinitě ke stacionární fázi. Při gradientové eluci se plynule mění složení mobilní fáze tak, aby se zvyšovala jeho eluční síla a tak se zkrátila doba analýzy a zvýšila ostrost píku u látek s vyšší afinitou. ^(1,2)

Podle fází

Kapalinová – mobilní fáze je kapalina a stacionární fáze nemísitelná kapalina, nebo pevná látka

Plynová – mobilní fáze je plyn, stacionární fáze kapalina nebo pevná látka ^(1,7)

Podle uspořádání aparatury

Sloupcová (kolonová)

V plošném uspořádání - papírová

- tenkovrstevná ^(1,7)

2.2. Obecná teorie chromatografického děje

Chromatografie je proces, při kterém se chromatografovaná látka pohybuje systémem dvou fází- stacionární a mobilní. Chromatografovaná látka je stále rozdělena mezi obě fáze, takže s mobilní fází se pohybuje vždy jen část jejího celkového množství. Vzhledem k toku mobilní fáze probíhá neustálé ustavování rovnováhy. V zóně výskytu dané látky tak lze rozlišit tři oblasti. V přední části zóny je koncentrace látky v mobilní fází vyšší než rovnovážná a dochází k sorpci látky na fázi stacionární. Uprostřed je stav blízký rovnováze a v zadní části zóny dochází k desorpci látky (vzhledem k její vyšší koncentraci ve stacionární fází) a následně jejímu pohybu s mobilní fází, až dosáhne přední části zóny, kde se opět sorbuje. Takto se látka pohybuje kolonou. ⁽²⁾

V daném chromatografickém procesu má každá látka svůj specifický retenční (eluční) čas t_R nebo retenční objem V_R . Retenční čas je doba od nástřiku vzorku do maxima píku, retenční objem je pak objem mobilní fáze, který proteče kolonou od nástřiku vzorku do eluce maxima píku. Vzájemný vztah lze vyjádřit vztahem

$$V_R = t_R \cdot v$$

kde v je průtoková rychlost mobilní fáze.

Retenční objem je dán součtem:

$$V_R = V'_R + V_0$$

kde V'_R je skutečný retenční objem a V_0 (mrtvý objem) odpovídá celkovému objemu mobilní fáze od nástřiku až po detektor. U většiny dobře sestrojených přístrojů lze tento objem zanedbat.

Analogický vztah platí i pro retenční čas:

$$t_R = t'_R + t_0$$

kde t'_R je skutečný retenční čas a t_0 je mrtvý čas kolony, tj. čas látky, která se v koloně vůbec nezadržuje.

K charakteristice retence se používá kapacitní faktor k' (též retenční faktor k , hmotnostní distribuční poměr D_m), pro který platí vztahy:

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{V'_R}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

Kapacitní faktor vyjadřuje poměr mezi celkovým množstvím chromatografované látky ve stacionární fázi k celkovému množství této látky ve fázi mobilní. Je přímo úměrný rovnovážnému distribučnímu koeficientu K_C (též distribuční konstanta), který je vyjádřením poměru koncentrací chromatografované látky v obou fázích.

$$k = K_C \frac{V_S}{V_0}$$

kde V_S je objem stacionární fáze a V_M objem mobilní fáze. Kapacitní faktor dovoluje odhadnout eluci látek z kolony v přijatelném čase a retenčním objemu. Za optimální se považuje hodnota k v rozmezí 2 až 5. Hodnotu k lze ovlivnit mnoha způsoby (množstvím stacionární fáze, velikostí pórů, složením mobilní fáze aj.).

K popisu účinnosti separace látek se používá rozlišení R_S . Rozlišením se rozumí rozdíl vzdálenosti dvou píků separovaných látek a platí pro ně vztah:

$$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (t_2 > t_1)$$

kde $t_{1,2}$ jsou retenční časy píků a $w_{1,2}$ jsou šířky píků v poloviční výšce. Dokonalého rozlišení až na základní linii se dosáhne při hodnotě $R = 1,5$. Rozlišení souvisí s kapacitním poměrem, distribuční konstantou a účinností.

K popisu separační účinnosti kolony se používá počet teoretických pater N , pro který platí :

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

kde se při výpočtu množství teoretických pater se používá retenční čas testované látky t_R a šířka píku v polovině jeho výšky w_h . Zdánlivý počet teoretických pater se mění podle stanovované látky, kolony a retenčního času.

Abychom mohli srovnat účinnost různých kolon, používá se výškový ekvivalent patra H dle vztahu:

$$H = \frac{L}{N}$$

kde L je délka kolony v metrech a N počet teoretických pater.

Výškový ekvivalent teoretického patra závisí na řadě parametrů, důležitá je například průtoková rychlost U , mimokolonový mrtvý objem a objem analyzovaného vzorku. Pro dosažení účinné separace je nutné, aby hodnota ekvivalentu teoretického patra činila 0.01 – 1.00 mm.

Dalším důležitým parametrem je selektivita kolony, tedy míra relativní separace dvou složek směsi.

$$\alpha = \frac{t'_{R2} - t_0}{t'_{R1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1}$$

kde t'_{R1} a t'_{R2} jsou retenční časy těchto složek a t_0 mrtvý retenční čas.

Selektivitu v kapalinové chromatografii lze ovlivnit změnou složení nebo pH mobilní fáze, teplotou a také náplní kolony. ^(8, 9)

Další parametr, důležitý hlavně pro kvantitativní stanovení, je poměr signálu k šumu:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

kde H je výška píku odpovídajícího dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku.

h značí absolutní hodnotu největší výchylky signálu šumu od základní linie na chromatogramu kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce a sledovaného v rozsahu úměrném 20 –ti násobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku pozorovaného v místě rovnoměrně situovaného okolo místa, kde by se tento pík nacházel. ^(4,10, 11)

2.2.1. Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu

K analýze chromatografického záznamu slouží chromatografická křivka. Základní *kvalitativní* charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , tedy čas od nástřiku vzorku do systému po maximum příslušného chromatografického píku. Důkazem totožnosti je shoda t_R chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s t_R píku standardu. Stanovení léčiv za pomoci HPLC může být spojeno se zkouškami na čistotu. Plocha píku, případně jeho výška, je úměrná koncentraci dané látky. Samotné určení obsahu látky ve vzorku se provádí z ploch píků vzorku a standardu. Lze použít se metodu vnitřního nebo vnějšího standardu.^(12,17)

Metoda vnějšího standardu

V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku, v druhém pak vnější standard, a poté porovnááme oba chromatogramy. Jako vnější standard se používá chemická referenční látka- nejčastěji některá z analyzovaných složek. Koncentrace jednotlivých stanovovaných látek směsi se pak vypočítá z poměru plochy (příp. výšky) píku této látky a plochy píku vnějšího standardu.⁽¹⁷⁾

Metoda vnitřního standardu

Zakladem je přidavek přesně známého množství standardu (jiné látky s podobnou chemickou strukturou a podobnými fyz-chem. vlastnostmi) do analyzované směsi před vlastní analýzou. Po důkladném zhomogenizování se vzorek nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných složek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda je méně časově náročná a zároveň přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti hodnocených píků, musí mít podobnou koncentraci jako hodnocené látky a musí být chemicky inertní. Po vyhodnocení ploch píků vypočítáme poměr ploch a sestrojíme kalibrační křivku jako závislost poměru ploch na koncentraci (linearitu odezvy).⁽¹⁷⁾

2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography – HPLC) je velmi progresivní a oblíbená metoda užívaná ve všech oblastech analýzy, včetně analýzy léčiv. Užívá se ve všech lékopisných monografiích a na rozdíl od plynové chromatografie (gas chromatography – GC) umožňuje snazší analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek.

Stručná historie

Pojem chromatografie a chromatogram použil jako první na přelomu 19. a 20. století ruský chemik a botanik Cvet, když pomocí skleněné kolonky naplněné uhlíčitánem vápenatým dokázal rozdělit pigmenty chloroplastů (proto chromatografie). Z jeho prací vychází celý obor chromatografie. Přesto k dalšímu využití jeho poznatků došlo až v třicátých letech a v letech čtyřicátých se kapalinová chromatografie rozvinula ve své klasické podobě- Tiselius a Claesson tehdy také rozdělili chromatografické postupy dle provedení na 1) frontální 2) vytěšňovací a 3) eluční chromatografii.

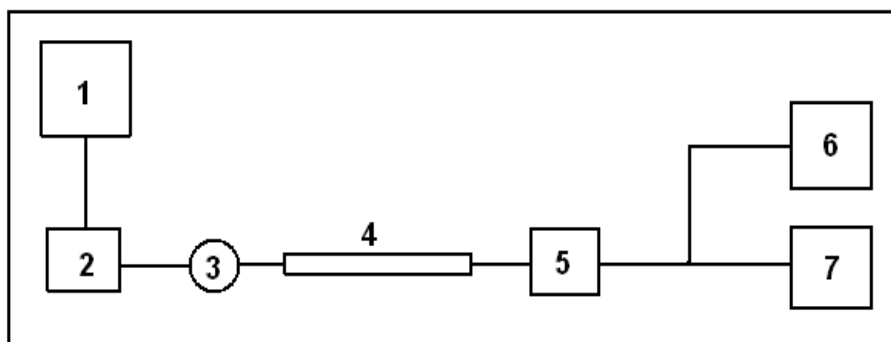
V té době Martin a Synge sestrojili extrakční přístroj pro dělení acetylovaných aminokyselin na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodnou a chloroformovou fází, ale ještě toho roku jej nahradili opravdovou chromatografickou kolonou, naplněnou zrnky silikagelu se zakotvenou vodnou fází. Takto vzniká rozdělovací chromatografie, za jejíž objev obdrželi oba v roce 1952 Nobelovu cenu.

Roku 1952 byla též zavedena gradientová eluce, výrazně rozšiřující možnosti všech kolonových chromatografických metod, roku 1959 je navržena gelová chromatografie, která přichází do praktického užití v šedesátých letech. Dále se rozvíjí instrumentace, na přelomu šedesátých a sedmdesátých let se objevují přístroje pracující s vyššími tlaky, přesnější detektory, v sedmdesátých letech se výrazně zvyšuje účinnost kolon díky plnění mikroparticulárními sorbenty (velikost částic 5 – 10 μm).

2.3.1. Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z mnoha částí, které můžeme rozdělit dle jejich funkce na části zajišťující: a-složení a pohyb mobilní fáze (zásobník(y) mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, zařízení tvořící gradient v mobilní fázi), b-dávkování vzorku (dávkovač manuální či automatický), c-separaci látek (vlastní chromatografická kolona), d-detekci látek, registraci signálu a vyhodnocení chromatografického záznamu (historicky zapisovač, integrátor, dnes počítač s tiskárnou).^(7,8,9)

Obr.1: Blokové schéma kapalinového chromatografu



1-zásobník(y) mobilní fáze; 2-vysokotlaké čerpadlo; 3-dávkovací zařízení;
4-kolona; 5-detektor; 6,7-registrační a vyhodnocovací zařízení

2.3.1.1. Zásobníky mobilní fáze

Mobilní fáze může být vedena buď z jednoho zásobníku rovnou do vysokotlakého čerpadla, nebo lze použít mobilní fáze z více zásobníků, které se mísí ve směšovacím zařízení buď před, nebo až za čerpadlem. Zásobníků jsou vyráběny nejčastěji ze skla, plastu (polyethylen, polytetrafluorethylen, polypropylen), nebo nerezové oceli. Mohou být uzavřené víčkem se dvěma vývody- jeden pro přívod helia nebo jiného inertního plynu, druhý pro připojení na vakuovou linku. K vzájemnému propojení chromatografických systémů se používají nejčastěji plastové kapiláry (polyethylen, teflon).^(8,16)

2.3.1.2. Čerpadla mobilní fáze

Kolísání průtoku mobilní fáze významně ovlivňuje přesnost retenčních dat i ploch píků, proto je důležité, aby čerpadlo poskytovalo stabilní, bezpulzní tok mobilní fáze. Měla by být schopna pracovat v relativně širokém rozmezí tlaku i průtokové rychlosti (výstupní tlak na čerpadlech od 1 do 60 MPa, průtoková rychlost v rozmezí 0,1 až 10 ml/min). Důležitá je i reprodukovatelnost průtoku s vysokou přesností. Nejčastěji se používají dvou nebo tří pístová čerpadla využívající princip zpětné vazby- měří se okamžitý tlak a podle něj je regulována frekvence impulzů řídicích chod elektromotoru pumpy. Pro zajištění co nejmenšího kolísání tlaku je zapotřebí dokonalé odplynění mobilní fáze. K tomu se používá probublávání mobilní fáze inertním plynem (heliem nebo dusíkem), vakuum za stálého míchání nebo ultrazvuk. ^(8,16)

2.3.1.3. Dávkovací zařízení

Přesnost celé analýzy je mimo jiné závislá na správném dávkování vzorku. Dávkovač je umístěn před vstupem mobilní fáze do kolony. Starší dávkovací zařízení s nástřikem injekční stříkačkou přes septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze (tzv. stop-flow dávkovače) se již téměř nepoužívají. U moderních přístrojů nalezneme buď smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů, nebo dávkovače automatické. Základem je pevné pouzdro s otočným jádrem a teflonovými kroužky. Injekční stříkačkou se naplní dávkovací kapilára bez přerušení průtoku mobilní fáze a otočením jádra se zařadí do průtoku. Vzorek je vytlačen proudící mobilní fází na chromatografickou kolonu. Dávkovací smyčky umožňují vpravení konstantního objemu do kolony, a tak není nutné odměřovat přesné množství vzorku. ^(8,16)

2.3.1.4. Chromatografické kolony a jejich náplně

Chromatografická kolona je trubice (převážně z antikorózní oceli s leštěným vnitřním povrchem) naplněná sorbentem. Do tlaků kolem 20 MPa lze použít i kolony ze speciálně tvrzeného skla, vložených z bezpečnostních důvodů do kovového pouzdra. ⁽¹⁹⁾

Pro analytické účely se používají kolony v délce 5 – 30 cm s vnitřním průměrem 3 – 5 mm. Částice náplně mají velikost 3 – 10 μm . Díky tomuto zrnění dosahují tyto kolony hodnoty až 5.000 nebo 10.000 teoretických pater na 10 cm délky. Sorbenty lze rozdělit podle jejich polarit. Základním sorbentem je polární silikagel. Je vhodný pro většinu látek mimo silně bazických, které chemicky reagují s jeho slabě kyselým centrem. Modifikací jeho hydroxylových skupin méně polárními skupinami lze získat sorbety s nižší polaritou. Středně polární fázi představuje silikagel modifikovaný tříuhlíkatým řetězcem obsahujícím skupinu $-\text{CN}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$. Nepolárním sorbentem je pak silikagel modifikovaný alifatickým řetězcem s 8 nebo 18 uhlíky. Jedná se o tzv. reverzní fáze. Mezi sorbety nevycházející ze silikagelu patří oxid hlinitý (vhodný pro dělení nepříliš polárních látek lišících se stericí) a polární oxid hořečnatý.^(7, 8, 9, 16)

Někdy se používá tzv. předklonka (krátká kolona, často plněná stejným sorbentem jako hlavní kolona). Zapojuje se do systému před hlavní kolonu a slouží k zachycení větší části nečistot při analýze vzorků, kde je velké riziko zanesení kolony nečistotami (např. z neúplně přečištěného biologického materiálu), a prodlužuje tak životnost kolony.

Moderní přístroje umožňují použít při dělení látek i několik kolon najednou. Jde o techniku přepínání sprážených kolon (column switching). Kolony jsou řazeny za sebou a mohou se navzájem lišit náplní i délkou atd. Výhodou je lepší separace látek a zkrácení času analýzy.⁽¹⁹⁾

2.3.1.5. Detektory

Detektory slouží k identifikaci a případně kvantifikaci látek vycházejících z kolony. Volba detektoru významně ovlivní selektivitu i citlivost stanovení, a proto jsou na detektory kladeny velké nároky:

- vysoká citlivost (dle definice změna signálu detektoru při jednotkové změně koncentrace analytu)
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- reprodukovatelnost a linearita odezvy
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci

-dobré dynamické vlastnosti (signál detektoru by měl být věrným obrazem časové funkce koncentrace analytu ve vzorku, protože zkreslení koncentračního profilu, rozšíření a deformace zón zhoršují citlivost a spolehlivost měření a rozdělení látek, které bylo dosaženo na koloně)

-malá citlivost ke změnám tlaku a rychlosti průtoku mobilní fáze^(1, 4, 19)

Detektory lze rozdělit na selektivní a univerzální. U selektivních je signál úměrný koncentraci samotné detekované látky v fluátu, u univerzálních pak některé celkové vlastnosti eluátu, a to jak detekované látky, tak i složek mobilní fáze.⁽¹⁹⁾

Nejpoužívanějšími jsou fotometrické detektory pracující v ultrafialové nebo viditelné oblasti světelného záření, méně pak detektory fluorimetrické, elektrochemické a refraktometrické, stále častější jsou velmi citlivé, ale drahé a na obsluhu náročné detektory hmotnostní.⁽¹⁹⁾

2.3.1.5.1. Fotometrické detektory

Poskytují vysokou selektivitu i citlivost. Nejčastěji se využívá absorpce v UV spektru. Ve viditelné oblasti většina látek neabsorbuje, čehož lze využít pro specifické měření barevných látek nebo látek, jež po přidání činidla selektivně tvoří barevné produkty. Patří sem detektory:

-s jednou pevně nastavenou vlnovou délkou (nejčastěji 254 nebo 280 nm, při kterých absorbuje většina léčiv). Mají dvoupaprskové uspořádání a měří rozdíl absorbance mezi měrnou a srovnávací celou. Zdrojem záření bývá nízkotlaká rtuťová výbojka.

-s několika předem nastavenými vlnovými délkami

-s deuteriovou výbojkou (zdrojem polychromatického záření) a monochromátorem. Umožňují pro detekci volit libovolnou vlnovou délku záření (nejčastěji 190 až 400 nm)

-spektrofotometrické detektory s rychlým záznamem spektra bez přerušování chromatografické separace (tzv. photodiode-array detektory). Současným měřením signálu velkým počtem miniaturních fotodiód lze detekovat při několika vlnových délkách najednou, tedy i při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu každé stanovované látky, čímž se zlepšuje selektivita i citlivost detekce.

(1,17,19)

Spektrofotometrické detektory jsou nejpoužívanější metodou detekce v HPLC. Jejich výhodou je vysoká selektivita, citlivost (detekční limit je 10^{-8} až 10^{-10} g/ml), široké rozmezí linearit odezvy a také umožňují volit jako mobilní fázi mnoho různých rozpouštědel, která neabsorbují záření při použité vlnové délce. Při vhodné volbě rozpouštědel umožňují i gradientovou eluci. ^(1, 17)

2.3.1.5.2. Fluorimetrické detektory

Fluoreskující látka absorbuje UV záření (zdrojem je v detektoru rtuťová výbojka) a přitom vydává fluorescenční záření o vyšší vlnové délce, než má záření excitační. Toto emitované záření dopadá na elektrický fotonásobič a přemění se na elektrický signál, jehož velikost je úměrná koncentraci látky. U látek bez přirozené fluorescence lze připravit fluoreskující deriváty vhodnou derivatizací. Tyto detektory jsou vysoce selektivní s mezí detekce 10^{-9} až 10^{-15} g/ml. ^(7, 16, 19)

2.3.1.5.3. Elektrochemické detektory

Slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce, tj. oxidačně - redukčních změn, jež probíhají na fázovém rozhraní roztok – elektroda. Ampérometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky průtokovou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím. Používá se dvuelektrodoových nebo častěji tříelektrodoových systémů (skládající se z měrné, srovnávací a pomocné elektrody).

Měrné elektrody ampérometrických detektorů bývají zhotoveny nejčastěji ze skelného uhlíku, grafitových vláken, grafitové pasty nebo kovů. Nevýhodou těchto materiálů je zanášení a postupná dezaktivace jejich povrchu produkty oxidace a redukce a nečistotami z mobilní fáze, což vyžaduje častou recalibraci detektoru při kvantitativní analýze.

Polarografické detektory pracují se rtuťovou kapkovou elektrodou, u níž se pravidelným odkapáváním obnovuje povrch.

Elektrochemické detektory se vyznačují velmi vysokou citlivostí (detekční limit 10^{-9} až 10^{-11} g/ml), důležité je však důkladné odplynění mobilní fáze, abychom dosáhli stabilní základní linie a měli tak reprodukovatelné výsledky. I samotná mobilní fáze musí být vodivá, takže tyto detektory nelze použít při chromatografii v systémech s normálními fázemi.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukcii celkového množství látky při průtoku měrnou celou. Umožňují dosáhnout větší citlivosti detekce než ampérometrické detektory.^(16,19)

2.3.1.5.4. Refraktometrické detektory

Patří mezi nejčastěji užívané nespecifické detektory. Odezva je zde úměrná rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (samotná mobilní fáze) v referenční cele. Nevýhodou je závislost indexu lomu na teplotě, nižší citlivost (detekční limit 10^{-6} g/ml) a nemožnost použití při gradientové eluci. Užití nalezne nejvíce tehdy, jestliže vzorek neabsorbuje v UV oblasti nebo v této oblasti vykazuje velkou absorbanční mobilní fáze.^(16, 17, 19)

2.3.1.5.5. Hmotnostní detektor

Stále častější je využití spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). Před samotnou detekcí je nejprve zapotřebí odstranit z eluentu mobilní fázi, molekuly léčiva v plynném stavu jsou pak v hmotnostním spektrometru ionizovány (nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací). Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) se v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separují podle hmotnosti a náboje a záznam tvoří hmotnostní spektrum (četnost iontů vztahovaná k poměru hmotnost/počet nábojů). Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, citlivé a poskytuje řadu údajů i pro identifikaci léčiv. Nevýhodou je bohužel hlavně finanční náročnost.⁽⁷⁾

2.3.1.6. Zařízení pro zpracování dat

Dříve se používaly jedno nebo vícekanálové integrátory vybavené mikroprocesorem. Dnes se k vyhodnocování a dalšímu zpracování chromatografických dat používají v naprosté většině případů počítače vybavené speciálním softwarem. Ten navíc přímo ovládá i pracovní parametry chromatografu (složení a průtok mobilní fáze, teplota na koloně, nastavení detektoru apod.).⁽¹⁹⁾

2.4. Validace analytických metod

Validace je proces, při kterém se experimentálně zjišťuje a dokládá vhodnost, přesnost a spolehlivost dané analytické metody. Validace a revalidace se provádí u každé analytické metody před jejím uvedením do praxe a při každé změně podmínek nebo postupu dané metodiky. Základním cílem je definovat rozsah, ve kterém bude metoda spolehlivá při dodržení validačních charakteristik. Obecně se stanovují tyto parametry:

- správnost
- přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- selektivita
- detekční a kvantitativní limit
- rozsah a linearita
- robustnost

přičemž není potřeba u každé metody stanovovat všechny parametry. Budou se lišit postupy validace limitních zkoušek, metod pro stanovení hlavní složky přípravku či třeba zkoušky lékové formy.

Správnost

Jde o shodu naměřených výsledků a skutečných hodnot. Tuto je možné zjistit pomocí nezávislé (referenční) metody, analýzou vzorku se známým obsahem nebo metodou standardního přídatku. Lze ji vyjádřit jako rozdíl naměřené a správné hodnoty, nebo jako tzv. výtěžnost:

$$\frac{\text{Naměřená hodnota} \times 100}{\text{skutečná hodnota}}$$

Přesnost

Přesnost metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky, získanými opakovaným měřením homogenního vzorku. Podle podmínek rozeznáváme opakovatelnost a reprodukovatelnost. *Opakovatelnost* je prováděna jedním analytikem, na jednom přístroji, se stejnými činidly a na jednom homogenním vzorku. *Reprodukovatelnost* (mezilaboratorní zkoušení) je pak měření v různých

laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a za použití různých šarží činidel.

Přesnost se stanoví jako relativní směrodatná odchylka minimálně 9 stanovení v rozsahu metody (např. 3 paralelní stanovení 3 koncentrací vzorku) nebo 6 stanovení jedné koncentrace. Vyjadřuje se chyba celého analytického postupu, tedy každé stanovení se provádí včetně samostatné přípravy vzorku (nestačí tedy stanovit pouze jeden vzorek šesti nástřiky).

Selektivita

Je schopnost správně a specificky změřit stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek- ostatních účinných složek u kombinovaných přípravků, nečistot z výroby, rozkladných produkty nebo jiných, neznámých látek.

Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot (pouze stanovované látky) a vzorku s přidanými rozkladnými produkty nebo různými nečistotami. Jsou-li nečistoty nebo rozkladné produkty neznámé nebo nedostupné, je možné selektivitu prokázat jako výtěžnost standardního přídatku čisté látky k materiálu, obsahujícímu stále množství jiných látek.

Detekční a kvantitativní limit (citlivost metody)

Jedná se o parametry potřebné pro stanovení nečistot. *Detekční limit* se používá pro limitní testy, tj. testy zjišťující, zda je látka nad nebo pod určitou hranicí. Jde o nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, nikoliv o stanovení množství látky. *Kvantitativní limit* je pro kvantitativní stanovení obsahu nečistot. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Stanovení obou limitů pak závisí na tom, zda jde o metodu instrumentální (limity se zjišťují na základě šumu) nebo neinstrumentální (limity se hledají experimentálně).

Rozsah a linearita

Rozsah je interval mezi dvěma hladinami koncentrace stanovované látky (včetně nich), v němž lze látku stanovit s takovou přesností, správností a linearitou, jak dokládají výsledky validace. Linearita je pak schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Tento rozsah se

ověřuje experimentálně, a to ověřením přesnosti, správnosti a linearity pro krajní hodnoty i uvnitř intervalu.

Závislost u každé metody nemusí být lineární, může být vyjádřena jinou matematickou funkcí. Pak je ale nutné při každém použití metody vyhodnocovat výsledky z celé kalibrační křivky.

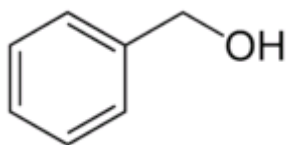
Linearitu analytické metody lze doložit graficky, jako závislost výsledků na koncentraci stanovované látky, nebo matematicky, pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Uvádí se korelační faktor (míra linearity), směrnice (míra citlivosti), y-úsek (míra vedlejších vlivů) a chyby stanovení všech těchto hodnot.

Robustnost

Jde o schopnost metody dávat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým nutně dochází při provádění metody jiným pracovníkem v jiné laboratoři apod., i když popsaný postup zůstává zachován. Znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky.⁽¹⁵⁾

2. 5. Benzylalkohol a jeho vlastnosti

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: C₇H₈O

Chemický název: Benzylalkohol

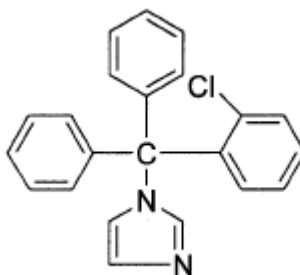
M_R: 108,13⁽²⁶⁾

2.5.1. Vlastnosti benzylalkoholu

Benzylalkohol je dobře rozpustný v lihu 95 % a olejích. V parenterálních přípravcích se používá v množství 4 % na snížení viskozity olejových roztoků. Má vlastní antiseptický, konzervační a lokálně anestetický účinek. Ulehčuje rozpouštění steroidních hormonů v olejích. Spolehlivě nedráždivé je množství do 2 %, nad 5 % je jednoznačně dráždivý. ⁽²⁵⁾

2. 6. Klotrimazol a jeho vlastnosti

Strukturální vzorec:



Sumární vzorec: $C_{22}H_{17}ClN_2$

Chemický název: [1-[(2-chlorfenyl)difenyl]methyl]-1H-imidazol

M_R : 344,84⁽²⁶⁾

2.6.1. Farmakologické vlastnosti klotrimazolu

Klotrimazol je lokální azolové antimykotikum, působící fungistaticky až fungicidně na proliferující houby, kvasinky a plísně. Nepůsobí na spóry (konidie). Účinkuje též bakteriostaticky na většinu grampozitivních bakterií, primárně rezistentní kmeny jsou vzácné, sekundární rezistence se vyvíjí velmi pomalu.

Klotrimazol, podobně jako ostatní azolová antimykotika, blokuje syntézu ergosterolu vazbou na cytochrom P450 a ovlivňuje tak permeabilitu buněčné stěny citlivých mikroorganismů. V buňce jsou narušeny enzymatické pochody a dochází k akumulaci toxických peroxidů.

Klotrimazol tvoří v rohové vrstvě epidermis depot s koncentrací, která mnohonásobně převyšuje antifungální i antibakteriální minimální inhibiční koncentraci v přítomnosti bílkoviny. V dostatečně účinné dávce proniká do nejnižší vrstvy epidermis, percutánní resorpce je však nízká. Po resorpci se mění v játrech na neúčinné hydroxyderiváty. Vylučuje se v neúčinné formě ze 2 až 15 % močí a z více než 60% stolicí.⁽¹³⁾

2.6.2. Indikace a kontraindikace klotrimazolu

Indikacemi klotrimazolu jsou dermatofytózy, kandidózy a keratomykózy (pityriasis versicolor), interdigitální mykózy, paronychie, balanitidy a vulvitidy. Nanáší se v intervalu 8 až 12 hodin na postižená místa, u vaginálních tablet se aplikuje 1 tableta večer hluboko do pochvy. V léčbě je třeba pokračovat i po vymizení klinických příznaků a subjektivních potíží, aby se zabránilo recidivám. Průměrná doba léčby u povrchových plísňových onemocnění je 2 až 4 týdny, hyperkeratotické dermafytózy dolních končetin vyžadují až devítitýdenní aplikaci antimykotika. U poševních zánětů obvykle postačí aplikace 3-6 dní, v případě potřeby je možné délku zdvojnásobit.^(13, 20)

Klotrimazol se nemá používat v těhotenství (obzvláště v 1. trimestru), u kojících matek nemá být aplikován v prsní krajině.⁽²⁰⁾

2.6.3. Interakce klotrimazolu

Klotrimazol snižuje účinnost amfotericinu i dalších polyenových antibiotik (nyasin, natamycin).⁽²⁰⁾

2.6.4. Nežádoucí účinky klotrimazolu

Ojediněle se mohou objevit kožní reakce. Nejsou zprávy o možnosti předávkování klotrimazolem.⁽²⁰⁾

2.6.5. Přehled některých prací zabývajících se analýzou klotrimazolu

1. Pro stanovení klotrimazolu v přítomnosti jeho degradačních produktů použili Abdel-Moety a spol. reverzní stacionární fázi C18, mobilní fází byla směs acetonitril + 25 mM trishydroxymethyl aminomethanu ve fosfátovém pufru (pH=7) 55:45 (v/v), s detekcí v UV při 260 nm.⁽²¹⁾

2. Stanovení klotrimazolu v krému společně s dalšími látkami se zabývá práce autorů Solich a spol. Použili reverzní stacionární fázi C-18. Pro stanovení klotrimazolu společně s konzervačními látkami (methylparaben a propylparaben) použili jako mobilní fázi směs acetonitrilu a vody 70:30 (v/v). Pro stanovení klotrimazolu v přítomnosti jeho degradačních produktů (imidazol a (2-chlorfenyl)difenylmethanol) se mobilní fáze skládala z acetonitrilu a vody 75:25 (v/v) o pH=2,7.⁽²²⁾

3. Mei Lin a Nian Wu ve své studii použili k stanovení klotrimazolu kolonu C8 s předklonkou, mobilní fáze byla methanol a fosfátový pufr (fosforečnan draselný, 25 mM a upravený kyselinou fosforečnou na pH=7) v poměru 9:5. Průtoková rychlost 1,2 ml/min a detekce v UV při 254 nm.⁽²³⁾

4. Pro současné stanovení klotrimazolu a tinidazolu použili Tendolkar a spol. stacionární fázi C18 a jako mobilní fázi acetonitril a pufr (0.1 % triethylamin v destilované vodě a kyselinou fosforečnou upravený na pH=3.5). Jako vnitřní standard byl použit tromethamin, při průtokové rychlosti 1 ml/min a s detekcí v UV při 225 nm.⁽²⁴⁾

5. Pro stanovení klotrimazolu, methylparabenu a propylparabenu ve farmaceutických přípravcích byla v práci autorů Rafifa Hamoudová a spol., použita micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).⁽²⁷⁾

6. Ke stanovení klotrimazolu v polotuhých lékových formách využili autoři M. Cakar a spol. tenkovrstvou chromatografií s densitometrickou kvantifikací. ⁽²⁸⁾

7. Taktéž TLC s densitometrickým hodnocením použili pro separaci, identifikaci a stanovení klotrimazolu, mikonazolu a ketokonazolu Roychowdhury, U. a Das, S.K. ⁽³³⁾

8. Detekcí klotrimazolu v plazmě se zabývali autoři Frank Wienen, Stefanie Laug, Knut Baumann, Albrecht Schwab, Stefan Lust a Ulrike Holzgrabe. K analýze využili kapilární elektroforézu a jako vnitřní standard sloužil ketokonazol. ⁽²⁹⁾

9. Ke stanovení klotrimazolu využili F.C. Pereira a spol. diferenční pulsní polarografii poté, co nechali vzorek klotrimazolu reagovat s Procion Red HE-3B. ⁽³⁰⁾

10. Anja Schendzielorz a spol. využili klotrimazol jako stanovované léčivo pro zhodnocení potenciálního využití Step-scan FT-IR fotoakustické spektroskopie (PAS) k stanovení penetrace léčiv membránami. ⁽³¹⁾

11. Mei Lin a Nian Wu porovnávali selektivitu, přesnost a správnost stanovení betamethason propionátu, klotrimazolu a jejich derivátů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie ve srovnání s HPLC. ⁽³²⁾

12. Pro izolaci imidazolových antimykotik (mikonazol, ekonazol, klotrimazol, bifonazol) z krémů použili D. Bonazzi, a spol. superkritickou fluidní extrakci, k detekci a stanovení použili UV spektrofotometrii s předchozí derivatizací. ⁽³⁴⁾

13. Analýzou imidazolových antimykotik pomocí HPLC se zabývá práce autorů Di-Pietra a spol. Extrahovali látku pomocí SPE, jako stacionární fázi použili kolony Hypersil C18, Spherisorb CN a Chromospher B, s detekcí v UV spektru. ⁽³⁵⁾

14. Pro stanovení klotrimazolu a ketokonazolu byla autory Z. Fijaleka spol, vypracována polarografická metoda. ⁽³⁶⁾

15. Stanovením klotrimazolu spektrofotometrií o předchozí derivatizaci se zabývali M.M. Bedair a kolektiv. ⁽³⁷⁾

V dostupných zdrojích nebyla v době zpracovávání rešerše popsána HPLC metoda pro současné stanovení klotrimazolu a benzylalkoholu.

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo nalezení vhodných chromatografických podmínek pro současné stanovení klotrimazolu a benzylalkoholu v topickém léčivém přípravku a eventuelní validace metody.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý chromatografický materiál, pomůcky, přístroje a chemikálie

Chromatografický materiál:

- chromatografická kolona- 150×4 mm I.D. s náplní Separon SGX C-18, 7µm, Tessek, Praha, Česká Republika
- chromatografická kolona- 150×3 mm I.D. s náplní Separon SGX C8, 5µm, Tessek, Praha, Česká Republika
- chromatografická kolona- 150×4 mm I.D. s náplní Separon SGX CN, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika

Přístroje

- Acidimetr 333, Druopta, Praha, Česká Republika
Analytické váhy, Helago, Česká Republika
Ultrazvuková lázeň K10, Kraitex, Slovensko
Sušárna HS 61A, Chirana, Česká Republika
Magnetická míchačka, Laboratorní přístroje Praha, Česká Republika
Spektrofotometr UV-2401 PC, Shimadzu, Japonsko
Chromatografická sestava Hewlett Packard Series 1100 zahrnující:
- vysokotlaké čerpadlo
 - vakuový degaser
 - autosampler
 - UV detektor s proměnnou vlnovou délkou
 - počítač s chromatografickým softwarem
- Třepačka LT 2, Kavalier Sázava, Česká Republika

Pomůcky

- Mikrostřikačka- 100 µl, Hamilton, Švýcarsko
Membránový filtr (Nylon 46 membrane filter 0.45 µm)
Laboratorní sklo

Chemikálie

Benzylalkohol, Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo

Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema Brno, Česká Republika

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema Brno, Česká Republika

Kyselina fosforečná 85 % p.a., Lachema Brno, Česká Republika

Nitril kyseliny octové p.a., Balex, Pardubice, Česká Republika

Methylalkohol p.a., Penta, Chrudim, Česká Republika

Tetrabutylammonium bromid, Fluka-Chemie, Německo

Voda čištěná reverzní osmózou

Bromhexine, Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo

(-)-Sulpiride, Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo

Klotrimazol, Kraemer&Martin Pharma, Německo

Léčivý přípravek použitý pro analýzu

Jenamazol 2% krém, GLO Ostrava, Česká Republika

4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro současné stanovení klotrimazolu a benzylalkoholu pomocí HPLC s UV detekcí

Pro současné stanovení obou látek je zapotřebí nalézt vhodné chromatografické podmínky, tedy optimální vlnovou délku UV detekce, stacionární fázi, složení mobilní fáze, průtokovou rychlost a případně vnitřní standard.

Výběr stacionární a mobilní fáze:

Jako první byla použita chromatografická kolona C18 (Separon SGX C18 7 μ m 150 \times 4 mm I.D.) (č. 1). Poté byla použita kolona C8 (Separon SGX C8 5 μ m 150 \times 3 mm I.D.) (č. 2) a jako poslední kolona CN (Separon SGX CN 7 μ m 150 \times 4 mm I.D.) (č. 3).

Na jednotlivých kolonách byly zkoušené tyto mobilní fáze:

Kolona č. 1:

1. methanol : voda v poměru 60:40(v/v)
2. methanol : voda (pH=3.65, pH upraveno 10 % H₃PO₄) v poměru 60:40 (v/v)
3. methanol : vodný roztok K₂HPO₄ (0,05mol/l) v poměru 60:40 (v/v)
4. methanol : pufr (K₂HPO₄ 0,05mol/l, pH=4.5 upraveno 10 % H₃PO₄) v poměru 60:40 (v/v)
5. methanol : voda 70:30 (v/v)

Kolona č. 2:

6. acetonitril : vodný roztok K₂HPO₄ (0,05mol/l) v poměru 60:40 (v/v)
7. acetonitril : pufr (K₂HPO₄ 0,05mol/l, pH=5,5 upraveno KH₂PO₄) v poměru 60:40 (v/v)
8. acetonitril : pufr (K₂HPO₄ 0,05mol/l, pH=6.7 upraveno 10 % H₃PO₄) v poměru 70:30 (v/v)
9. acetonitril : pufr (K₂HPO₄ 0,05mol/l, pH=6.7 upraveno 10 % H₃PO₄ + tetrabutylammonium bromid 0,01 mol/l) v poměru 70:30 (v/v)

Kolona č. 3:

10. acetonitril : voda 70:30 (v/v)

11. acetonitril : pufr (K_2HPO_4 0,05mol/l, pH=5.5 upraveno 10 % H_3PO_4)
v poměru 60:40 (v/v)
12. acetonitril : pufr (K_2HPO_4 0,05mol/l, pH=4.0 upraveno 10 % H_3PO_4)
v poměru 60:40(v/v)
13. acetonitril : pufr (K_2HPO_4 0,05mol/l, pH=6.7 upraveno 10 % H_3PO_4)
v poměru 60:40(v/v)
14. methanol : voda 60:40(v/v)
15. methanol : pufr (K_2HPO_4 0,05mol/l, pH=6.7 upraveno 10 % H_3PO_4)
v poměru 60:40(v/v)
16. methanol : pufr (K_2HPO_4 0,05mol/l, pH=6.7 upraveno 10 % H_3PO_4)
v poměru 40:60(v/v)
17. acetonitril : pufr (K_2HPO_4 0,05mol/l, pH=7.5 upraveno 10 % H_3PO_4)
v poměru 60:40(v/v)
18. acetonitril : pufr (K_2HPO_4 0,07mol/l, pH=6.7 upraveno 10 % H_3PO_4)
v poměru 60:40(v/v)

Analýzy probíhaly při průtokových rychlostech 0,5 – 0,8 ml/min. Na základě změřených spekter benzylalkoholu a klotrimazolu byla použita detekce při 207 a 268 nm.

Příprava mobilní fáze:

Pro validaci metody byla používána mobilní fáze ve složení acetonitril : pufr (K_2HPO_4 0,05mol/l, pH=6.7 upraveno 10 % H_3PO_4) v poměru 60:40. Nejprve byl připraven vodný roztok fosforečnanu draselného (0,05 mol/l), po důkladném promíchání upraven na pH=6.7 pomocí 10%-ní kyseliny fosforečné za současného měření pH. Roztok byl následně zfiltrován přes membránový filtr (Nylon 46 membrane filter 0.45 μ m) a smíchán s acetonitrem ve výše uvedeném poměru.

Příprava roztoků:

Roztok klotrimazolu pro zkušební nástřiky při hledání optimálních chromatografických podmínek byl připraven jeho rozpuštěním v methanolu (či acetonitrilu nebo mobilní fázi), vždy v koncentraci 0,2 mg/ml- 10,0 mg substance

bylo rozpuštěno v malém množství příslušné kapaliny v 50 ml odměrné baňce a následně doplněno po rysku.

Roztok benzylalkoholu při hledání optimálních podmínek byl připraven diferenčním navážením 75,0 mg v mikrostříkačce a rozpuštěním opět v příslušném rozpouštědle (methanol, acetonitril nebo mobilní fáze) ve 100 ml odměrné baňce s následným doplněním po rysku.

Slepý vzorek krému byl připraven navážením 2,5 g placeba do zábrusové baňky 100 ml, po přidání 80 ml mobilní fáze byla směs protřepávána 5 minut na míchačce, 30 minut ponechána na ultrazvukové lázni, 15 minut chlazená v mrazáku, následně za studena rychle zfiltrována do odměrné baňky 100 ml a po vytemperování na pokojovou teplotu doplněna po značku mobilní fází.

Extrakt krému pro analýzu byl připraven navážením 2,5 g 2 % krému do zábrusové baňky 100 ml, přidáním 80 ml příslušné mobilní fáze, poté byl 5 minut roztřepáván na třepačce, 30 minut ponechán v ultrazvukové lázni, 15 minut chlazen v mrazáku, následně za studena rychle zfiltrován do odměrné baňky 100 ml, temperován na pokojovou teplotu a nakonec doplněn po značku mobilní fází.

Zásobní roztok benzylalkoholu pro přípravu kalibračních roztoků byl připraven smísením 200,0 mg benzylalkoholu a menšího množství mobilní fáze v odměrné baňce 100 ml a následným doplněním touto mobilní fází po rysku.

Zásobní roztok klotrimazolu pro přípravu kalibračních roztoků byl připraven rozpuštěním 400,0 mg substance v menším množství mobilní fáze v odměrné baňce 200 ml s následným doplněním touto mobilní fází po značku.

Zásobní roztok (-)-sulpiridu (vnitřního standardu) pro přípravu kalibračních roztoků byl připraven rozpuštěním 100,0 mg substance v menším množství mobilní fáze ve 100 ml odměrné baňce a následným doplněním po značku.

Výběr vnitřního standardu

Při výběru vnitřního standardu byly otestovány následující látky: acetanilid, ambroxol, bromhexin, 4-chloracetanilid, fenacetin a (-)-sulpirid.

4.3. Sestrojení kalibrační křivky

Pro stanovení klotrimazolu a benzylalkoholu byla sestavena kalibrační křivka a byla ověřena linearita závislosti odezvy detektoru (plochy píku) na koncentraci stanovované látky.

Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost poměru ploch píků benzylalkoholu a klotrimazolu na jejich koncentracích. Kalibrační roztoky byly připraveny podle následující tabulky:

Tab. 1: Množství zásobního roztoku jednotlivých standardů pro přípravu kalibračních roztoků

	Koncentrace benzylalkoholu (mg/ml)	Koncentrace klotrimazolu (mg/ml)	Koncentrace (-)- sulpiridu (mg/ml)
1. roztok	0,12	0,25	0,10
2.roztok	0,20	0,40	0,10
3.roztok	0,25	0,50	0,10
4.roztok	0,30	0,60	0,10
5. roztok	0,38	0,75	0,10

Kalibrační roztoky byly připraveny z příslušného množství zásobního roztoku benzylalkoholu v mobilní fázi o koncentraci 2 mg/ml, klotrimazolu v mobilní fázi o koncentraci 2 mg/ml a (-)-sulpiridu v mobilní fázi o koncentraci 1mg/ml a doplněním mobilní fází na 100 ml. U každé koncentrace vzorku bylo provedeno šest měření. Získané údaje byly vyhodnoceny, zpracovány do tabulky a na jejich základě byla sestrojena kalibrační křivka.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro současnou HPLC analýzu benzylalkoholu a klotrimazolu

Detekce

Při měření UV spekter měl klotrimazol dvě maxima (207,6 a 267,8 nm), benzylalkohol též prokazoval při obou vlnových dostatečnou absorpci. Jako výhodnější byla, vzhledem k menším interferencím matrice a vyšší selektivitě, vybrána vlnová délka 268 nm

Stacionární fáze

Při hledání optimálních podmínek pro současné hodnocení benzylalkoholu a klotrimazolu bylo použito několik stacionárních fází. Kolona Separon SGX C18 7 μm se neukázala vhodná, neboť docházelo k zadržování klotrimazolu na koloně z důvodu jeho vysoké afinity ke stacionární fázi, což se nezlepšilo ani s obměnami složení mobilní fáze. Taktéž kolona Separon SGX C8 5 μm neposkytovala uspokojivé výsledky. Naopak kolona Separon SGX CN 7 μm byla vybrána jako vhodná, neboť docházelo k eluci obou analyzovaných složek s přijatelným retenčním časem i přesností.

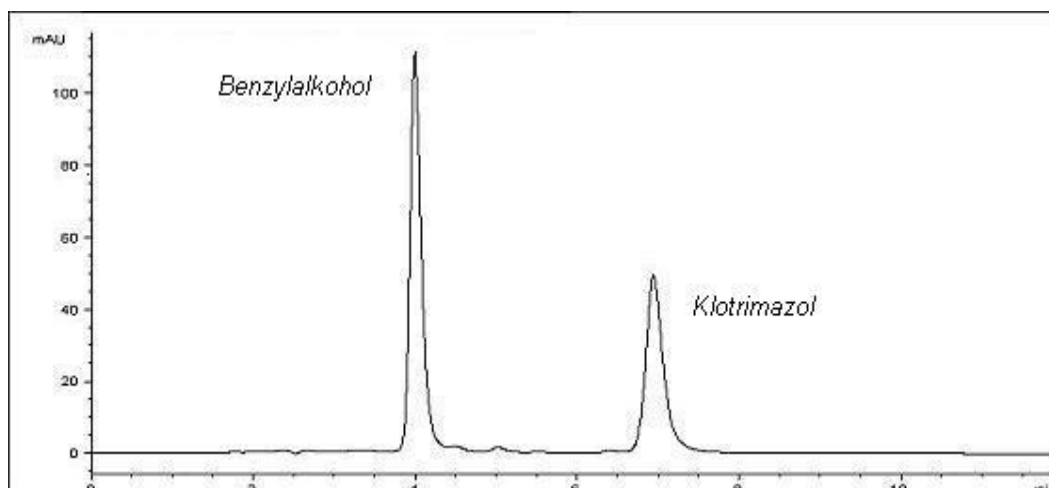
Mobilní fáze

Bylo potřeba najít takovou mobilní fázi, při které dochází k rozdělení píků obou látek tak, aby se eluovaly v přijatelném čase při zachování akceptovatelného tvaru píků. Směsi methanol : voda se prokázaly jako nevhodné, a to i po úpravě vodné fáze pufrém (K_2HPO_4 o koncentraci 0,05 mol/l, případně s úpravou pH pomocí H_3PO_4 nebo KH_2PO_4) i ion-párovým činidlem (tetrabutylamonium bromidem).

Při použití acetonitrilu jako organické fáze došlo ke zlepšení elučních vlastností, obzvláště při použití pufru. Bylo vyzkoušeno několik hodnot pH. Jako nejvhodnější tak byla vybrána směs acetonitril : vodný pufr (K_2HPO_4 0,05mol/l, pH=6,7 upravený 10% H_3PO_4) v poměru 60:40 (v/v).

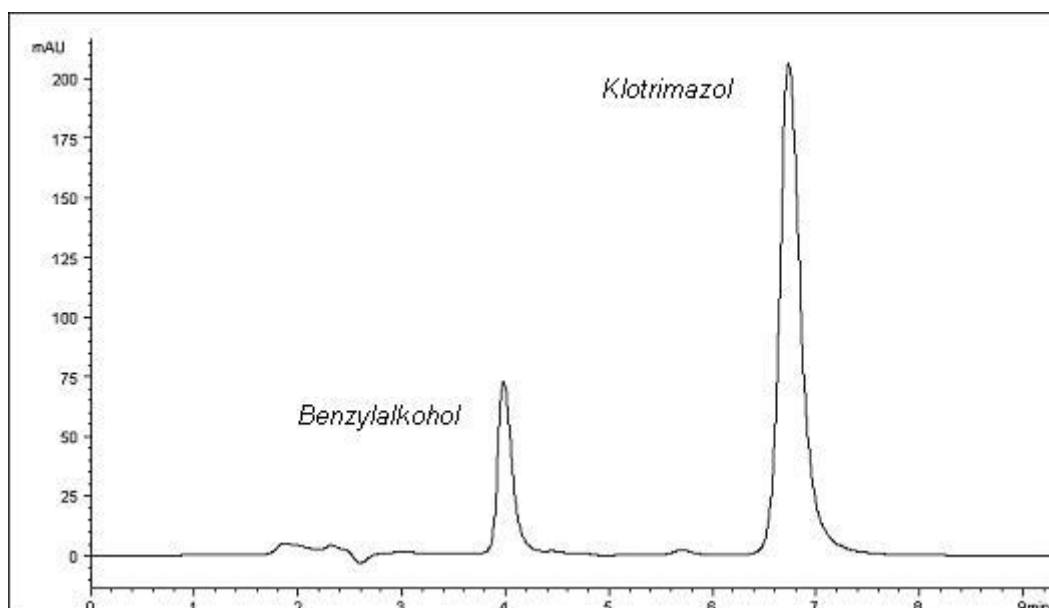
Průtoková rychlost byla zvolena 0,8 ml/min. Oproti nižším rychlostem zůstala zachována dobrá separace, zlepšil se tvar píků bez příliš vysokého tlaku v chromatografickém systému a zkrátila se tím doba analýzy.

Obr. 2: Chromatografický záznam standardních roztoků benzylalkoholu a klotrimazolu



Byl připraven i extrakt z placeba, abych bylo ověřeno, zda se některá analyzovaná látka neeluje v oblasti nečistot, pocházejících z lékové formy. A následně byla provedena i extrakce z plného krému k ověření, zda lze analýzu použít i u reálného vzorku.

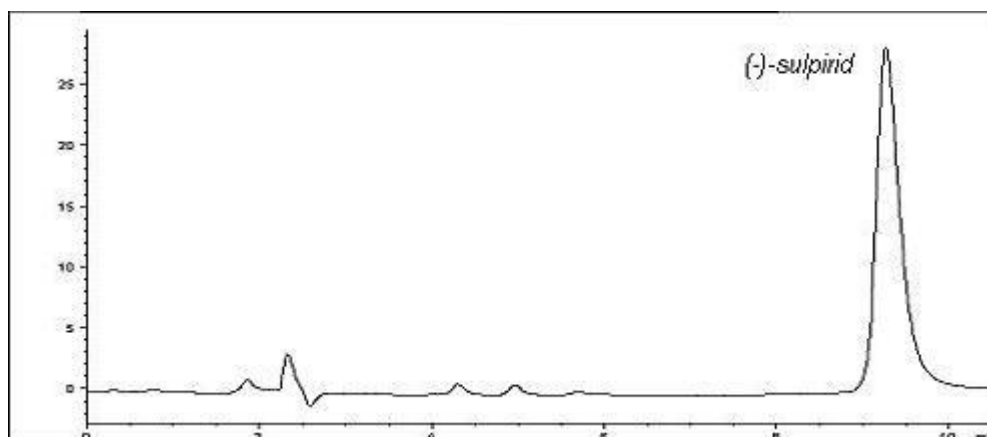
Obr. 3: Chromatografický záznam reálného krému



Vnitřní standard

Při výběru bylo sledováno, aby se daná látka eluovala v blízkosti obou studovaných píků, mimo oblast balastních látek ze slepého krému a při zachování rozdělení až na základní linii, což byl u vybraných látek nejčastější problém. Jako nejvhodnější byl nakonec vybrán (-)-sulpirid, který byl ze systému eluován jako poslední s dostatečným odstupem od obou analyzovaných látek.

Obr. 4: Chromatografický záznam (-)-sulpiridu jako vnitřního standardu



5.2. Kalibrační křivka

Pro možnost využití metody ke stanovení obsahu klotrimazolu a benzylalkoholu byla sestrojena kalibrační křivka, k čemuž bylo použito pět různých koncentrací benzylalkoholu a klotrimazolu a neměnná koncentrace (-)-sulpiridu. Též byla ověřena linearita kalibrační křivky.

Tab. 2: Naměřené hodnoty benzylalkoholu

Koncentrace benzylalkoholu [mg/ml]	Měření č.	Plocha píku benzylalkoholu	Průměr ploch píků benzylalkoholu
0,11934	1	112,9	112,724
	2	113,749	
	3	111,542	
	4	112,808	
	5	112,812	
	6	112,535	
0,1989	1	185,644	184,759
	2	183,658	
	3	183,608	
	4	186,667	
	5	185,306	
	6	183,668	
0,248625	1	232,049	231,170
	2	229,63	
	3	231,327	
	4	232,982	
	5	228,722	
	6	232,309	
0,29835	1	270,439	271,419
	2	270,402	
	3	272,217	
	4	271,078	
	5	272,361	
	6	272,016	
0,37791	1	341,127	340,427
	2	339,874	
	3	340,565	
	4	341,79	
	5	341,186	
	6	338,021	

Tab. 3: Naměřené hodnoty klotrimazolu:

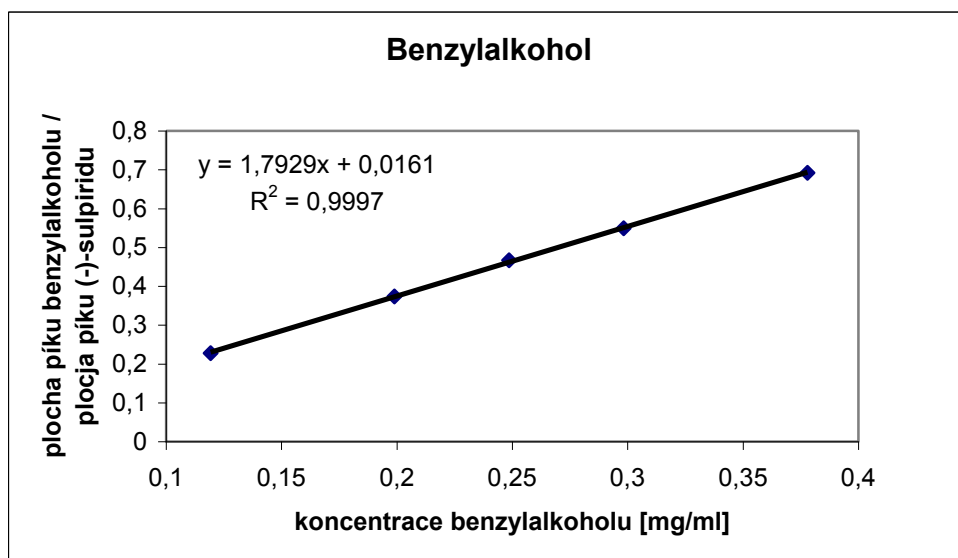
Koncentrace klotrimazolu [mg/ml]	Měření č.	Plocha píku klotrimazolu	Průměr ploch píků klotrimazolu
0,248875	1	582,693	581,933
	2	580,312	
	3	582,262	
	4	582,466	
	5	583,726	
	6	580,141	
0,3982	1	929,66	928,290
	2	928,724	
	3	926,512	
	4	929,185	
	5	929,069	
	6	926,589	
0,49775	1	1156,68	1156,762
	2	1156,07	
	3	1158,28	
	4	1156,44	
	5	1157,26	
	6	1155,84	
0,5973	1	1384,36	1385,063
	2	1385,29	
	3	1384,5	
	4	1386,09	
	5	1386,53	
	6	1383,61	
0,746625	1	1730,6	1727,680
	2	1729,41	
	3	1726,92	
	4	1731,91	
	5	1719,01	
	6	1728,23	

Tab. 4: Naměřené hodnoty (-)-sulpiridu

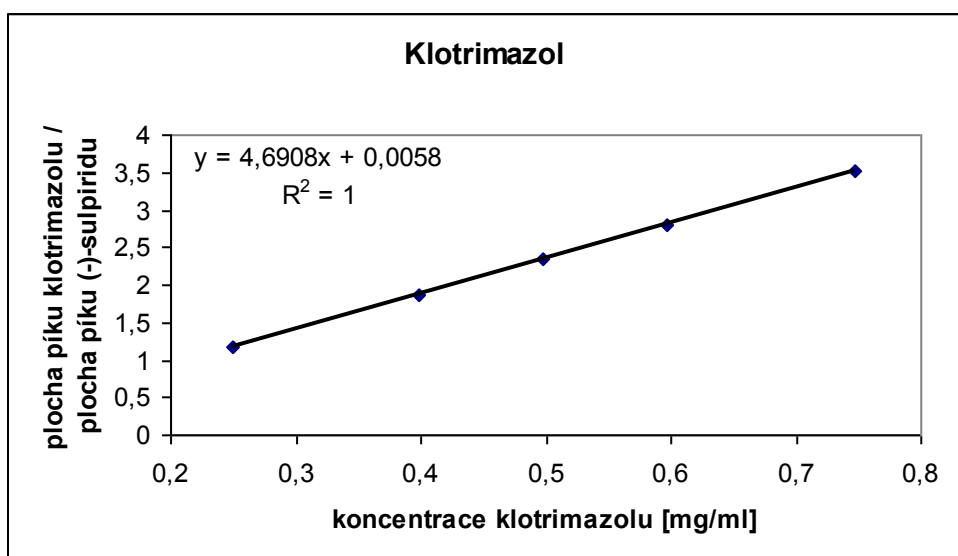
Koncentrace (-)-sulpiridu [mg/ml]	Měření č.	Plocha píku (-)-sulpiridu	Průměr ploch píků (-)-sulpiridu
0,0991	1	493,898	495,951
	2	496,994	
	3	498,424	
	4	493,545	
	5	497,228	
	6	495,614	
0,0991	1	494,735	494,380
	2	494,976	
	3	493,817	
	4	495,568	
	5	494,79	
	6	492,396	
0,0991	1	495,771	495,066
	2	496,91	
	3	494,949	
	4	495,603	
	5	492,537	
	6	494,628	
0,0991	1	494,771	493,896
	2	492,5	
	3	494,979	
	4	494,317	
	5	492,042	
	6	494,769	
0,0991	1	490,202	492,058
	2	490,953	
	3	493,185	
	4	489,818	
	5	496,014	
	6	492,173	

Po vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestrojena kalibrační křivka (závislost poměru ploch píku stanovované látky a ploch píku (-)-sulpiridu na rostoucí koncentraci stanovované látky), která je v rozmezí stanovovaných koncentrací lineární.

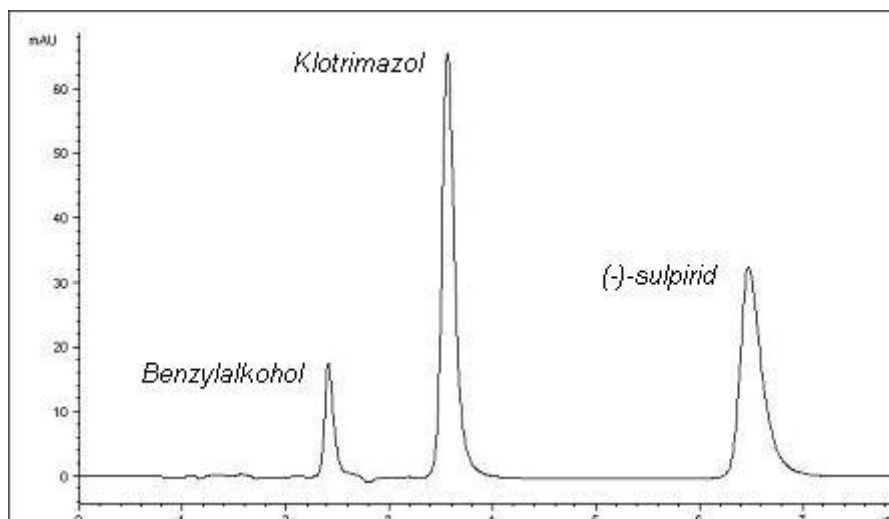
Obr. 5: Kalibrační křivka benzylalkoholu:



Obr. 6: Kalibrační křivku klotrimazolu:



Obr. 7: Chromatografický záznam směsi benzylalkoholu, klotrimazolu a (-)-sulpiridu



Pro ověření hodnot kalibrace byly ještě jednou připraveny roztoky benzylalkoholu ($c_1=0,1209$ mg/ml a $c_2=0,38285$ mg/ml) a klotrimazolu ($c_3=0,249875$ mg/ml a $c_4=0,749625$ mg/ml), zanalyzovány a s jejich pomocí byla sestrojena porovnávací kalibrační křivka, kde krajní body byly tyto nově naměřené hodnoty.

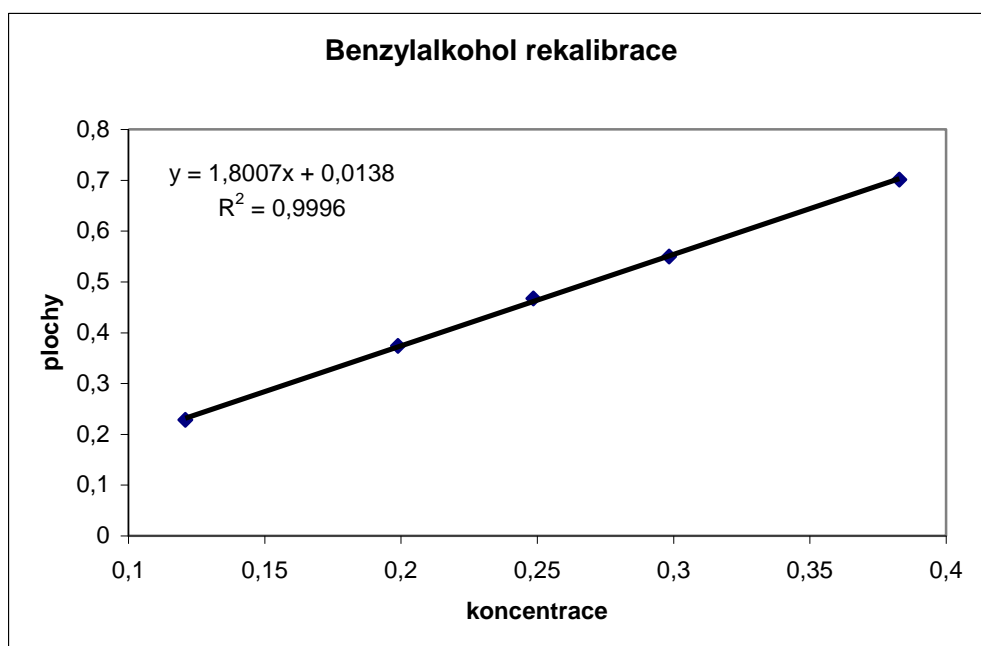
Tab. 5: Naměřené hodnoty benzylalkoholu

Koncentrace benzylalkoholu [mg/ml]	Měření č.	Plocha píku benzylalkoholu	Průměr ploch píků benzylalkoholu
0,1209	1	109,446	111,407
	2	110,682	
	3	110,128	
	4	110,953	
	5	113,539	
	6	113,691	
0,38285	1	341,674	342,388
	2	345,672	
	3	344,032	
	4	339,357	
	5	342,95	
	6	340,64	

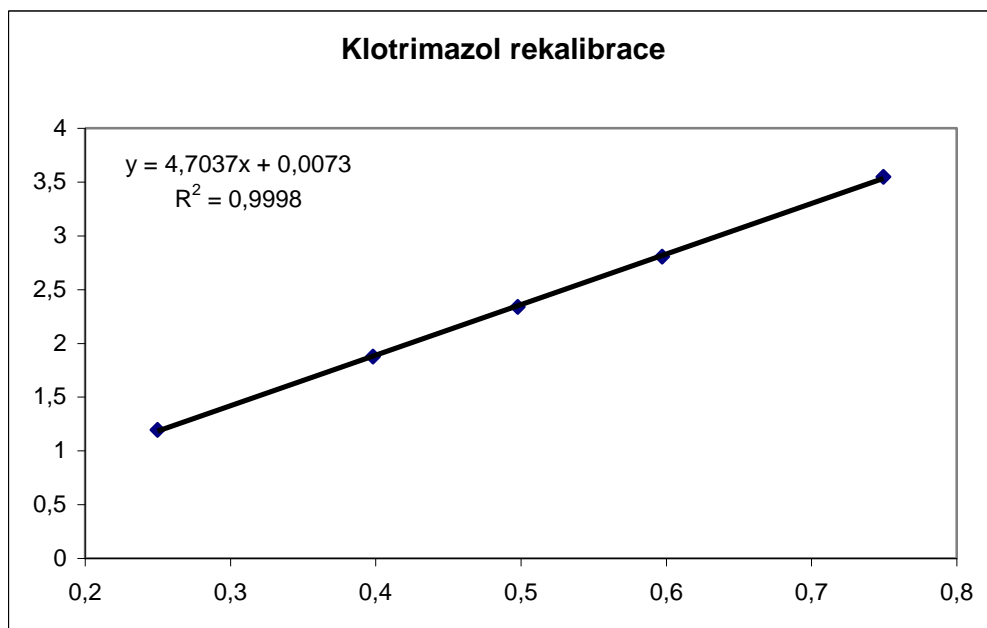
Tab. 6: Naměřené hodnoty klotrimazolu

Koncentrace klotrimazolu [mg/ml]	Měření č.	Plocha píku klotrimazolu	Průměr ploch píků klotrimazolu
0,249875	1	582,769	583,753
	2	584,771	
	3	586,249	
	4	583,434	
	5	583,002	
	6	582,294	
0,749625	1	1734	1733,287
	2	1727,75	
	3	1728,17	
	4	1736,58	
	5	1736,04	
	6	1737,18	

Obr. 8: Ověření kalibrační křivky benzylalkoholu



Obr. 9: Ověření kalibrační křivky klotrimazolu



6. ZÁVĚR

V diplomové práci byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro současnou HPLC analýzu klotrimazolu a benzylalkoholu v topickém léčivém přípravku (2% krém).

Nejlépe se jevila chromatografická kolona o rozměrech 150×4 mm I.D. s náplní Separon SGX CN, 7 μm, (výrobce: Tessek, Praha, Česká Republika). Jako mobilní fáze byla vybrána směs acetonitril : pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l, pH=6,7 upraveno pomocí 10 % H_3PO_4) v poměru 60:40 při průtokové rychlosti 0,8 ml/min. K detekci byl použit UV detektor s nastavenou vlnovou délkou 268 nm.

U metody byla ověřena linearita závislosti odezvy detektoru na koncentraci obou stanovovaných složek i robustnost vůči drobným odchylkám ve složení mobilní fáze.

Ve vypracování metody, včetně vyhodnocení nejvhodnějšího postupu extrakce látek z krému, bude pokračováno v rámci rigorózní práce.

7. LITERATURA

- 1) Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998
- 2) Mikeš, O.: Základní typy chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 3) Motl, O., Novotný, L.: Adsorpční a rozdělovací chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 4) Novák, J.: Teorie chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 5) Mikeš, O., Štamberg, J., Hejtmánek, M., Šebesta, K.: Iontově výměnná chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 6) Tomášek, V.: Gelová chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 7) Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- 8) Meloun, B.: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kapalinové chromatografii. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 9) Szepezi, G.: How to use reverse phase HPLC, VCH Publisher Inc., USA 1992
- 10) Český lékopis 2002 (ČL 2002), Grada, Praha 2002
- 11) Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada, Praha 2005

- 12) Beňo, P., Truplová, E., Ostrovská, V., Stankovičová, M.: Stabilita liečiv a liekov, VEDA, Bratislava 2003
- 13) Švihovec, J., Sechser, T., Fendrich, Z., Martínková, J.: Chemoterapie mikrobiálních, virových, parazitárních a nádorových onemocnění. Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galen, Praha 2002
- 14) Věstník SÚKL 1/94, Validace analytických metod v kontrole léčiv
- 15) Turková, J.: Afinitní chromatografie. Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 16) Churáček, J., Jandera, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie. SNTL, Praha 1984
- 17) Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- 18) Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2004
- 19) Jandera, P.: Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie. Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993
- 20) Souhrn SPC: 65484, AISLP WIN ČR, datum revize textu 4.05.2005 (č.j. 3288/05 a 3289/05) //2005/05/04/M
- 21) Abdel-Moety, E.M.; Khattab, F.I.; Kelani, K.M.; AbouAl-Alamein A.M.: Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations.: *Il Farmaco* 57, 931-938, 2002
- 22) Solich, P., Hájková, R., Pospíšilová, M., Sícha, J.: Determination of methylparaben, propylparaben, clotrimazole and its degradation products in topical cream by RP-HPLC.: *Chromatographia* 56(SUPPL.), 181-184, 2002

- 23) Mei Lin, Nian Wu: Comparison between micellar electrokinetic chromatography and HPLC for the determination of Betamethasone, Dipropionate, Clotrimazole and their related substances.: J. Pharm. Biomed. Anal 19, 945-954, 1999
- 24) Tendolkar, N.M., Densai, B.S., Hinde, V.M.: The simultaneous determination of tinidazole and clotrimazole from tablets by RP-HPLC.: Indian-Drugs. 31, 551-553, 1994
- 25) Chalabala, M. et al.: Technologie léků, GALEN, Praha 2001
- 26) Pharmaceutische Stoffliste 8. Auflage, ABDA, Frankfurt am Main, 1998
- 27) Hamoudová, R., Pospíšilová, M., Kavalířová, A., Solich, P., Šícha, J.: Separation and determination of clotrimazole, methylparaben and propylparaben in pharmaceutical preparation by micellar electrokinetic chromatography.: J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 215-219, 2006
- 28) Cakar, M., Popovic, G., Agbaba, D.: High-performance thin-layer chromatography determination of some antimycotic imidazole derivatives and preservatives in medicinal creams and gel.: J-AOAC-Int. 88, 1544-1548, 2005
- 29) Wienen, 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, 1879-1887, 2003
- 30) Pereira, F.C., Zanoni, M.V.B., Guaratini, C.C.I., Fogg, A.G.: Differential pulse polarographic determination of clotrimazole after derivatization with Procion Red HE-3B.: J. Pharm. Biomed. Anal. 27, 201-208, 2002

- 31) Schendzielorz, A., Hanh, B.D., Neubert, R.H.H., Wartwig, S.: Penetration studies of clotrimazole from semisolid formulation using step-scan FT-IR photoacoustic spectroscopy.: *Pharmaceutical research* 16(1), 42-45, 1999
- 32) Mei Lin, Nian Wu.: Comparison between micellar electrokinetic chromatography and HPLC for the determination of Betamethasone Dipropionate, Clotrimazole and their related substances.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 945-954, 1999
- 33) Roychowdhury, U., Das, S.K.: Rapid identification and quantitation of clotrimazole, miconazole and ketokonazole in pharmaceutical creams and ointments by thin-layer chromatography-densitometry.: *J-AOAC-Int*, 79(3). 656-659, 1996
- 34) Bonazzi, D., Cavrini, V., Gatti, R., Boselli, E., Caboni, M.: Determination of imidazole antimycotics in creams by supercritical fluid extraction and derivative by UV spectroscopy.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18, 235-240, 1998
- 35) Di-Pietra, A.M., Cavrini, V., Andrisano, V., Gatti, R.: HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 873-879, 1992
- 36) Fijalek, Z., Chodowski, J., Warowna, M.: Polarographic examination of drugs derived from imidazol. I. Clotrimazole and ketoconazole.: *Acta. Pol. Pharm.* 49, 1-5, 1992
- 37) Bedair, M.M., Korany, M.A., Elsayed, M.A., Fahmy, O.T.: Derivative spectrophotometric determination of clotrimazole in single formulations and in combination with other drugs.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, 432-435, 1989