

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra analytické chemie



**Monitorování liberačních testů**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2019

Marek Beran

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

Dne 9. 9. 2019 v Hradci Králové

.....  
Podpis

Tímto bych chtěl poděkovat své školitelce Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. Především děkuji za její nekonečnou trpělivost. Dále děkuji za celkový přístup, rady a připomínky, díky čemuž tato práce vůbec mohla vzniknout. Také musím poděkovat celé katedře analytické chemie za příjemnou atmosféru a ochotu kdykoli mi pomoci.

*Uvedená práce byla finančně podpořena projektem specifického výzkumu  
SVV/260412/2018.*

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Marek Beran

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Daniela Šmejkalová, Ph.D

Název diplomové práce: Monitorování liberačních testů.

Diplomová práce je zaměřena na vývoj automatizované metody pro monitorování disolučního profilu klotrimazolu z topických lékových forem. Je zde porovnáván disoluční profil přípravků obsahujících antimykotikum klotrimazol. A to komerčně dostupných léčivých přípravků Canesten a Clotrimazol AL ve formě krémů, které jsou porovnávány s novou formulací od firmy Contipro a.s. zvanou Delcore, obsahující komplexní matici.

V teoretické části práce je pojednáno o mykotických infekcích se zaměřením na povrchové mykózy a o přípravcích, dostupných na Českém trhu, určených pro léčbu těchto infekcí. Dále se v práci nachází popis vybraných neseparačních průtokových analytických metod.

Analýza probíhala v systému sekvenční injekční analýzy, se třemi připojenými Franzovými disolučními celami s membránou, na níž byla nanесena látka, u které byl sledován disoluční profil. Franzovy cely byly umístěny do vodní lázně o teplotě 32 °C. Jako disoluční prostředí byl zvolen fosfátový pufr s pH 7,4 pro částečnou imitaci lidského prostředí. Detekce byla provedena UV detektorem při vlnové délce 210 nm. Dále práce obsahuje úpravu systému přidáním monolitické kolony a možný způsob separace tokoferolu a klotrimazolu obsažené v přípravku Delcore přímo v systému.

Disoluce byla u každého z přípravků sledována nejdříve z jedné cely pro získání přesného profilu a následně ze 3 paralelních cel pro zjištění opakovatelnosti disolučního profilu. Komerčně dostupné krémy byly na membránu nanесeny bez úpravy ve formě krémů, formulace Delcore byla před nanесením na membránu rozpuštěna v definovaném množství pufru před nanесením na membránu. Metoda se ukázala jako vhodná pro HVLP krémy, méně však pro přípravek Delcore s komplexní maticí ve formě roztoku s nízkou viskozitou.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Marek Beran

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Consultant: Ing. Daniela Šmejkalová, Ph.D

Title of Diploma Thesis: Monitoring of liberation tests

The diploma thesis is focused on the development of an automated method for the monitoring of the dissolution profile of clotrimazole from topical dosage forms. The dissolution profile of formulations containing the antifungal agent clotrimazole are compared. Commercially available formulations Canesten and Clotrimazol AL in the form of creams, are compared with a new formulation called Delcore from Contipro a.s., which contains a complex matrix.

Theoretical part addresses mycotic infections with focus on superficial mycoses and products available on the Czech market for the treatment of those infections. Furthermore, there is a description of selected non-separation flow methods.

The analysis was carried out in a sequential injection analysis system coupled with three attached Franz dissolution cells with a membrane on which the sample was applied. The Franz cells were placed in a water bath at 32 °C. Phosphate buffer with pH 7.4 was chosen as the dissolution medium as it partially imitates the conditions of the human environment. Detection was performed with a UV detector at wavelength of 210 nm. Furthermore, the thesis contains a modification of the system with added monolithic column for a possible separation of tocopherol and clotrimazole present in Delcore formulation directly in the system.

Dissolution was monitored for each of the formulations, first from one cell only to obtain an accurate profile and then from 3 parallel cells to determine the repeatability of the dissolution profile. The commercially available creams were applied directly on the membrane, the Delcore formulation was dissolved in a defined amount of phosphate buffer before being applied on the membrane. This method has been found to be suitable for mass produced creams, but less applicable for Delcore solution with its low viscosity and complex matrix.

# Obsah

1	Použité zkratky.....	1
2	Úvod.....	2
3	Cíl a zadání práce.....	3
4	Teoretická část.....	4
4.1	Mykotické infekce a jejich terapie.....	4
4.1.1	Povrchové Mykózy.....	4
4.1.2	Terapie mykóz.....	5
4.2	Lékopisné stanovení uvolňování léčivých látek z transdermálních přípravků.....	9
4.2.2	Metoda s extrakční celou.....	10
4.2.3	Metoda rotujícího válce.....	10
4.2.4	Japonský lékopis.....	10
4.3	Neseparační průtokové metody.....	11
4.3.1	Princip průtokových metod.....	11
4.3.2	Charakterizace jednotlivých průtokových metod.....	12
4.3.3	Trendy ve vývoji automatizovaných průtokových technik.....	16
5	Experimentální část.....	17
5.1	Přístroje, zařízení a pomůcky.....	17
5.2	Chemikálie.....	19
5.3	Analyzované vzorky.....	19
5.4	Pracovní postup.....	20
5.4.1	Příprava systému pro měření.....	20
5.4.2	Příprava standardu klotrimazolu.....	20
5.4.3	Příprava vzorku HVLP krému.....	20
5.4.4	Příprava vzorku DELCORE.....	21
5.4.5	Korekce koncentrace pro naředění nosného proudu.....	21
6	Výsledky a diskuze.....	22

6.1	Kalibrační křivka roztoku klotrimazolu .....	22
6.2	Stanovení limitu detekce a kvantifikace.....	24
6.3	Separace tokoferolu a klotrimazolu.....	24
6.4	Profil uvolňování klotrimazolu z HVLP krémů.....	28
6.4.1	Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Canesten® .....	28
6.4.2	Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL®.....	31
6.5	Profil uvolňování klotrimazolu z formulace Delcore® .....	34
6.6	Celkový souhrn .....	36
6.7	Diskuze.....	36
7	Závěr .....	38
8	Obrázky a tabulky .....	39
8.1	Seznam obrázků .....	39
8.2	Seznam tabulek .....	40
9	Seznam použité literatury.....	41

## 1 Použité zkratky

API - léčivá látka přípravku (Active Pharmaceutical Ingredient)

CFA - kontinuální průtoková analýza (Continuous Flow Analysis).

FEP - fluorovaný Ethylen Propylenu (Fluorinated Ethylene Propylene)

FI - průtokové metody (Flow Injection)

FIA - průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis).

HVLP - hromadně vyráběný léčivý přípravek

LOD - limit detekce (Limit of Detection)

LOQ - limit kvantifikace (Limit of Quantification)

LP – léčivý přípravek

HPLC - vysoko účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

PBS - fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)

PTFE – Teflon<sup>®</sup> (Polytetrafluoroethylene)

RP - chromatografie na reverzní fázi (Reverse Phase chromatography)

SFA – segmentovaná průtoková analýza (Segmented Flow Analysis)

SIA - sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)

SIC - sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography),



## 2 Úvod

Mikroskopické houby jsou rozšířené organismy, které v určitých případech mohou způsobit infekční onemocnění člověka - mykózy. Tato onemocnění se nejčastěji projevují u oslabených pacientů, u kterých mohou nastat vážné komplikace spojené se systémovým mykotickým onemocněním (1).

Pro léčbu mykotických onemocnění jsou užívána antimykotika. Tato terapie je často dlouhodobá a to především při léčbě povrchových mykóz, kde je nutný dostatečně dlouhý kontakt topicky podaného léčiva s nakaženou kůží, což klade velké nároky na trpělivost a svědomitost pacienta při aplikaci léčiv (2).

Český lékopis u disoluce léčivých přípravků vyžaduje pouze několik bodů, které nám napomáhají zjistit pouze počáteční a koncový stav disoluce. Pro podrobnější monitorování a získání detailního profilu koncentrace léčivé látky v čase je zapotřebí častější měření. V tomto případě je žádoucí celý proces automatizovat neboť ruční odběr vzorků by byl neúměrně náročný a hrozilo by zde velké riziko lidské chyby (2) (1).

Monitorování disoluce topických léčivých přípravků není příliš dobře popsáno. Polotuhé topické léčivé přípravky například v platném lékopise Čl 2017 nemají vlastní článek pro disoluci léčivé látky (3).

### 3 Cíl a zadání práce

Cílem experimentální části této práce je vývoj automatizované analytické metody pro sledování liberace imidazolového antimykotika klotrimazolu a vytvoření podrobného profilu liberace účinné látky u komerčně dostupných léčivých přípravků Canesten a Clotrimazol AL a jeho porovnání s profilem uvolňování klotrimazolu z nově vyvíjené formulace navržené firmou Contipro a. s.

Liberace proběhne v termostatovaných Franzových celách, odebírání vzorků a stanovení klotrimazolu bude automatizováno pomocí jedné z neseparačních průtokových metod - systému sekvenční injekční analýzy a koncentrace klotrimazolu bude stanovena spektrofotometricky v UV oblasti. Analýza proběhne za použití fosfátového (PBS) pufru jako disperzního prostředí.

## 4 Teoretická část

### 4.1 Mykotické infekce a jejich terapie

Mykotické kožní infekce jsou spolu s akné nejčastějšími důvody návštěvy u dermatovenerologa. Léčebnou metodou první volby je, u nekomplikovaných povrchových mykóz, aplikace lokálních antifungálních léčiv, neboť jsou vysoce účinná a nevedou k systémovým nežádoucím reakcím. Systémová léčba v dermatologii je indikována u závažných hlubokých či recidivujících infekcí. Je zde nutný laboratorní průkaz etiologického agens (2).

#### 4.1.1 Povrchové Mykózy

Povrchové mykózy dělíme podle vyvolávajícího činitele na dermatofytózy, kandidózy a infekce vyvolané rodem kvasinek *Malassezia* (4).

Dermatofytózy (neboli tinea) se třídí podle lokalizace na *T. capitis*, *T. corporis*, *T. Cruris*, *T. Manus*, *T. pedis*, *T. unguium*. Nejčastější z těchto mykóz je *Tinea pedis*, postihující plosku a mezprsty dolních končetin a *Tinea unguinum* (též známá jako *Onychomykóza*), postihující nehty, často je však spojena s již probíhající *Tineou pedis*, přímá infekce nehtu je vzácná. V jejich etiologii dominuje *Trichophyton rubrum*, dále také *Epidermophyton* a *Microsporum*. Tyto mykózy se vyznačují patologickými změnami keratinových struktur (vlasů, nehtů, epidermis) a jejich poškozením, které může být nevratné. Tento patologický proces pak může být dále komplikován bakteriální superinfekcí či ekzematizací. Interdigitální mykóza dále představuje vstupní bránu pro erysipel dolní končetiny, který může vést až k nekróze či sepsi (5). Léčba těchto mykóz je dlouhodobá a obtížná. Lokální přípravky mají problém proniknout k myceliu, celková léčba je pak nákladná s rizikem výskytu závažných nežádoucích účinků (1) (6) (7).

Kandidózy jsou nejčastěji vyvolané kvasinkou *Candida albicans* (7), běžně kolonizující trávicí či pohlavní trakt, aniž by vyvolávala patologické projevy. K jejímu pomnožení a vzniku zánětu zpravidla dochází při oslabení obranyschopnosti hostitele (4). Mezi faktory podporující vznik kandidózy patří endokrinopatie (diabetes mellitus, Addisonova choroba, poruchy štítné žlázy), léčba antibiotiky, kortikoidy a cytostatiky, těhotenství a užívání hormonální antikoncepce. Ke vzniku kandidózy jsou nejvíce náchylné oblasti kůže se zvýšenou vlhkostí zejména pak orificiální sliznice (1). U osob s normální imunitou se kožní kandidóza obvykle léčí lokálně. Rezistentní nebo rozsáhlé případy vyžadují léčbu celkovou (7).

Pityriasis versicolor (*Tinea versicolor*) vyvolávají rody kvasinek *Malassezia* - *Malassezia globosa*, a *Malassezia furfur* (8). Postihují především dospělé osoby, a to v oblastech s nejvyšším výskytem mazových žláz – hrud' a záda. Předpokladem vzniku onemocnění je např. silné pocení (hyperhidróza), zvýšená tvorba kožního mazu a nedostatečné odpařování kůže způsobené nošením oděvů ze syntetických vláken. Vzhled infekce se může měnit, proto versicolor – různobarevný (9), na nepigmentované kůži jde o světle hnědé makuly, na pigmentované kůži naopak o bílé makuly. Pravděpodobně tato kvasinka interferuje s tvorbou melaninu (7). Jde o nemoc často recidivující, nutná je celotělová léčba, neboť jedním z rezervoárů těchto kvasinek je kštice (*pytirisias capitis*).

#### 4.1.2 Terapie mykóz

Antimykotika lze dělit podle mechanismu účinku, a to na specifická, zasahující na definovaném místě metabolismu houby, a nespecifická s obecným toxickým účinkem na mikromycety (denaturace bílkovin, permeabilita membrány buněk). Specifická antimykotika se dle struktury dělí na polyenová, azolová (mezi něž patří i klotrimazol), allylaminová a další, svou strukturou nezařaditelné. Do nespecifických antimykotik se řadí látky rozličných chemických struktur. V magistraliter přípravě se často uplatňují např: keratolytická Unguentum Whitfield obsahující kyseliny salicylovou a benzoovou či masti s Pix Lithantracis (Kamenouhelným dehtem) často opomíjeným antimykotikem, který má však účinnost srovnatelnou s ketokonazolem (10) (11).

##### 4.1.2.1 Polyenová antimykotika

Polyenová antimykotika inhibují tvorbu buněčné membrány vazbou na ergosterol, čímž dochází ke vzniku pórů v této membráně a zvýšení její permeability pro monovalentní kationty. Jejich účinek je fungistatický, až fungicidní. V Česku jsou v současnosti registrovány přípravky s natamycinem a s nystatinem.

Natamycin, izolovaný ze *Streptomyces natalensis* a nystatin, izolovaný ze *Streptomyces noursei* se využívají při léčbě kožních a vulvovaginálních kandidóz. Natamycin je k dispozici ve formě krému samostatně (*Pimafucin*<sup>®</sup>), případně v kombinaci s hydrokortizonem (*Pimafucort*<sup>®</sup>). Oba přípravky jsou vázány na lékařský předpis.

Nystatin je k dispozici jako volně prodejný krém (*Fungicidin*<sup>®</sup>), případně ho lze užít v magistraliter přípravě (zde je ale nutný lékařský předpis). Dávkování těchto přípravků je nejčastěji dvakrát denně na postižené místo s přesahem cca. 2 centimetry do okolní kůže. Délka terapie by měla být nejméně 14 dnů (10) (11) (12).

#### 4.1.2.2 *Allylaminová antimykotika*

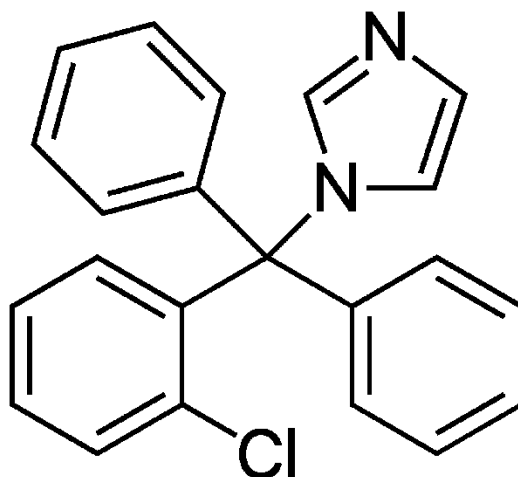
Allylaminová antimykotika inhibují skvalenepoxidázu. Důsledkem inhibice tohoto enzymu dochází k hromadění skvalenu, narušení syntézy ergosterolu, což vede k porušení funkce buněčné stěny a následnému odumření buňky. Jsou nejúčinnější na dermatofyty a aspergily (2), na které působí fungicidně. Na ostatní druhy parazitických mikromycet působí spíše fungistaticky. Působí i na některé aerobní bakterie.

Naftifin je indikován na dermatomykózy (dermatofytózy, pityriasis versicolor i kandidózy) a smíšené (mykotické a bakteriální) infekce kůže. U závažné onychomykózy je podáván jako doplněk systémové terapie. Aplikuje se 1x denně po dobu jednoho týdne u dermatofytóz, po dobu 2-4 týdnů při léčbě pityriasis versicolor či kandidóz. Léčba onychomykóz je pak dlouhodobá (13). Přípravky s naftifinem jsou volně prodejné pod značkou Exoderil® jako 1% krém a kožní roztok o stejné koncentraci.

Terbinafin je indikován při léčbě dermatofytóz (ne však onychomykóz), Pityriasis versicolor a kandidóz dospělých a dětí od 12 let. Aplikuje se x denně po dobu 1 týdne, při léčbě Pityriasis versicolor a kandidóz po dobu 1-2 týdnů. V ČR jsou na trhu volně prodejné přípravky obsahující 1% terbinafinu a to krém Terbistad® a Lamisil®, ten je ve formě krému, kožního spreje a roztoku v akrylamidovém kopolymeru, tvořící na postiženém místě okluzní vodou smývateľný film (indikován na Tineu pedis) (2).

#### 4.1.2.3 *Azolová antimykotika*

Azolová antimykotika inhibují 14 $\alpha$ -demethylázu. Tento enzym je závislý na cytochromu P450. Azolová antimykotika jsou inhibitory tohoto enzymu, což vede k možným lékovým interakcím. Azolová antimykotika mají však větší afinitu k mykotické variantě tohoto cytochromu, než k savčí variantě. To předurčuje jejich selektivní toxicitu k mykotickým buňkám (14). Tím dojde k narušení syntézy ergosterolu, ke vzniku toxických sterolů v membráně a lýze buňky. Mají široké antifungální spektrum, avšak působí většinou jen fungistaticky. Dále jsou účinné proti některým stafylokokům, streptokokům a dalším bakteriím. Dělí se dle struktury na imidazolová a triazolová. Triazolová antimykotika jsou určena především k systémové terapii, v ČR již nejsou dostupné přípravky obsahující triazolová antimykotika pro lokální použití (2) (13) (15).



*Obr. č. 1 vzorec klotrimazolu (16)*

Klotrimazol (vzorec viz obr. 1) je indikován k léčbě mykóz zahrnující dermatofytózy (u těžké onychomykózy jako doplňková léčba), kandidózy, Pityriasis versicolor. Dále je indikován na seboroickou dermatitidu, acne vulgaris, rosaceu, smíšené kožní infekce, perorální dermatitidu a erytrazmu. Pasty se dávkuje 2x denně po dobu 2-6 týdnů, při léčbě akné, rosacey a periorální dermatitidy dlouhodobě. Ostatní lékové formy se dávkuje 2-3x denně po dobu 2-6 týdnů, u onychomykóz je podávání dlouhodobější a je doporučováno krátké stříhání nehtu a jeho zdrsnění pilníčkem. V Česku je registrováno velké množství volně prodejných přípravků obsahující 1% klotrimazolu, a to krémy: Candibene<sup>®</sup>, Canesten<sup>®</sup>, Clotrimazol AL<sup>®</sup>, Clotrimazol HBF<sup>®</sup>; pasty: Aknecolor<sup>®</sup>, Aknecolor light (obarvené z estetických důvodů – Vhodný k dlouhodobé aplikaci do oblasti obličeje, avšak k datu 1. 5. 2019 nejsou na českém trhu obchodovány), Imazol<sup>®</sup>; kožní roztoky: Candibene spray<sup>®</sup>, Canifug-Lösung<sup>®</sup>, Clotrimazol AL Spray<sup>®</sup>. Dále jsou k dispozici kombinované přípravky ve formě krémů, a to: Imacort<sup>®</sup> s prednizolonem, vázaný na lékařský předpis a volně prodejný Imazol plus<sup>®</sup> s hexamidinem (2) (13).

Bifonazol je imidazolové antimykotikum s podobnými indikacemi a vlastnostmi jako klotrimazol. Liší se od něj schopností pronikat hlouběji do epidermis, kde vytváří depa, schopná přetrvat i déle než den po aplikaci (2). Díky tomu ho postačí dávkovat jen 1x denně. Délka terapie přípravků s bifonazolem je obvykle 2-3 týdny, u kandidóz do 4 týdnů. Při terapii onychomykózy je léčba delší, minimálně 4-týdenní. V Česku jsou na trhu volně prodejné léčivé přípravky registrované pod názvem Canespor<sup>®</sup> obsahující 1% bifonazolu a to ve formě krému a kožního roztoku. Dále je k dispozici léčivý přípravek Canespor 1x denně sada na nehty<sup>®</sup> též volně prodejný. Tento přípravek kromě bifonazolu obsahuje 40% ury. Je indikován k terapii onychomykózy, během terapie se před každým nanesení přípravku odstraní předchozí

přípravek spolu s nehtem rozvolněným keratolytickým působením močoviny pomocí speciální škrabky. Nehet se překryje okluzní náplastí a tento cyklus se opakuje, dokud není nehet odstraněn. Poté se pokračuje v terapii monokomponentními přípravky (13).

Ekonazol je imidazolové antimykotikum se širokým antifungálním působením podobně jako klotrimazol, dále je účinný na nokardie. Indikace jsou obdobné jako u klotrimazolu. Dávkuje se 2x denně po dobu 2-6 týdnů, u onychomykózy 3-6 měsíců. V ČR je registrován jediný přípravek s obsahem ekonazolu a to volně prodejný krém Pevaryl® obsahující 1% léčivé látky (13).

Flutrimazol je indikován k léčbě kandidóz, pytiriasis versicolor, dermatofytům a některým vláknitým houbám. Podání je kontraindikované pacientům ve věku do 10 let. V české republice je registrován pod značkou Micetal® a to ve formě volně prodejného gelu, určeném pro podání do vlasů, krému a spreje. Jejich vydání je vázáno na lékařský předpis (2).

Ketokonazol je další z imidazolových antimykotik s účinností vůči kvasinkám (včetně *M. furfur*), dermatofytům a *aspergilum*. Indikován je k léčbě pityriasis versicolor, pytiriasis capitis a seboroické dermatitidy. Přípravky v ČR obchodované jsou ve formě šamponu určeny k podání do vlasů a to 2x týdně po dobu 2-4 týdnů. Registrovaná léčiva obsahující 2% ketokonazolu, Ketokonazol Dr.Max® a Nizoral® jsou volně prodejná (13).

Oxikonazol má velmi široké spektrum účinku, kromě dermatofytů zahrnuje i *aspergily*, streptokoky a stafylokoky. Indikován je v podobných případech jako klotrimazol či bifonazol. Dávkuje se 1x denně, nejlépe večer po dobu 2-6 týdnů, při léčbě onychomykózy dlouhodobě. V Česku je volně dostupný jako 1% báze v krému Myfungar® (13).

#### 4.1.2.4 *Ostatní antimykotika se specifickým účinkem*

Amorolfín je morfolinové fungistatické až fungicidní antimykotikum. Brání tvorbě ergosterolu inhibicí enzymů  $\Delta^{14}$ -reduktázy a  $\Delta^{7,8}$ -izomerázy. Jeho spektrum účinnosti je poměrně široké, zahrnuje téměř všechny dermatofyty. Velmi dobře proniká nehtovou ploténkou, proto je indikován k léčbě onychomykózy. V ČR je registrován jediný přípravek obsahující amorolfín, a to Loceryl® lak na nehty, obsahující 5% amorolfínu. Jeho vydání je vázané na lékařský předpis (13) (17).

Ciklopirox je pyridinové antimykotikum s fungistatickým až fungicidním účinkem. Ciklopirox ve formě solaminu (ethanolaminu) má široké antifungální spektrum, působí na kvasinky i dermatofyty, některé streptokoky a stafylokoky. V ČR jsou dostupné přípravky

Batrafen®, obsahující 1% cicklopiroxolaminu a to ve formě krému a roztoku. Tyto přípravky jsou vázány na lékařský předpis. Dávkuje se 2x denně po dobu 2-4 týdnů. Dále je dostupný ciklopirox registrovaný pod značkou Polinail® jako 8% lak na nehty určený pro léčbu onychomykózy. Tento, na recept vázaný přípravek, se aplikuje 1x denně po dobu 9-12 měsíců. V některých studiích je však rozporována jeho reálná účinnost v porovnání s amorolfinem (13) (18).

#### 4.1.2.5 Antimykotika s nespecifickým účinkem

Nespecifická antimykotika mají fungistatický účinek daný obecným toxickým působením na mikromycety. Mezi nespecifická antimykotika patří kyseliny (kyselina salicylová, kys. benzoová, kys. undecylenová), jejich deriváty (tridecanamini undecylenas), aldehydy (formaldehydum), organická barviva (Brilantová zeleň - viride nitrens, genciánová violeť- methylosanili chloridum, Castellanův roztok), deriváty fenolu (resorcinol, hexachlorofen), deriváty 8-chinolu (kloroxin), sloučeniny jódu, sloučeniny síry. Dále jsou účinné již zmiňované dehty a další příbuzné látky (chrysaromin, dithranol). Na dermatomykózy je indikována volně prodejná mast Mykoseptin® obsahující kyselinu undecylenovou. Mnoho volně prodejných širokospektrých antiseptik lze též využít k léčbě mykóz kůže například Betadine® obsahující jod-povidon (4).

## 4.2 Lékopisné stanovení uvolňování léčivých látek z transdermálních přípravků

Lékopisná zkouška disoluce z transdermálních přípravků uvedená v Českém lékopise je určena především pro disoluce účinné látky z transdermálních náplastí, nikoli z topických přípravků, na která je však převeditelná. Český lékopis připouští 3 metody: Diskovou metodu, Metodu s extrakční celou a Metodu rotujícího válce (3).

Přípravek vyhovuje, jestliže množství léčivé látky (látek) uvolněné z náplasti v určeném čase, vyjádřené jako množství na jednotku plochy povrchu náplasti za jednotku času, je v požadovaném rozmezí (3).

### 4.2.1.1 Disková metoda

V diskové metodě se využívá zařízení obdobné zkoušce na disoluci pevných perorálních přípravků, skládající se z nádoby ze skla nebo z jiného inertního průhledného materiálu, která má být zakrytá víkem pro omezení odpařování, motoru, a hřídeli s lopatkovým míchadlem. Nádoba je poté naplněna disolučním médiem. Lékopis poté uvádí další parametry pro tento přístroj, jak jsou jeho přesné rozměry a další vlastnosti, jako je maximální odstředivá výchylka hřídele v provozu, přesnost nastavení rychlosti otáčení a další. Oproti zkoušce na disoluci



pevných perorálních přípravků je v nádobě navíc disk z nerezové oceli přidržující u dna zkoušený přípravek. Teplota aparatury je udržována na  $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Může být vhodné náplast zmenšit v případě homogenity obsažené látky. Toto je vhodné zejména k zamezení rizika nasycení roztoku léčiviny a tím falešné podhodnocení výsledku. Z média je odebírán vzorek v daných intervalech a je v něm vhodnou analytickou metodou stanoven obsah účinné látky (3).

#### 4.2.2 Metoda s extrakční celou

Je zde použit stejný přístroj s míchadlem jako v předchozí metodě obohacený navíc o extrakční celu. Extrakční cela se skládá z nosiče, víka a případně membrány. Extrakční cela má lékopisem pevně dané rozměry. Existují extrakční cely s odlišnými plochami vnitřních otvorů pro různé velikosti náplastí. Povrch uvolňování léčivého přípravku je umístěn směrem nahoru.

Z média je odebírán vzorek v daných intervalech a je v něm vhodnou analytickou metodou stanoven obsah účinné látky. Vzorek je odebírán z oblasti mezi hladinou disolučního média a horní hranou míchadla (3).

#### 4.2.3 Metoda rotujícího válce

Je zde použit podobný přístroj jako v předchozí metodách. List míchadla a hřídel jsou zde nahrazeny rotujícím válcem z nerezové oceli. Náplast je přilepena na adhezivní porézní membránu a přilepena na vnější povrch válce neadhezivní stranou. Povrch, ze kterého se uvolňuje přípravek je tedy obrácen směrem do disolučního média.

Z média je odebírán vzorek v daných intervalech a je v něm vhodnou analytickou metodou stanoven obsah účinné látky. Vzorek je odebírán z oblasti mezi hladinou disolučního média a horní částí rotujícího válce (3).

#### 4.2.4 Japonský lékopis

Naproti tomu například japonský lékopis JP XVI přímo specifikuje Test disoluce z přípravků určených pro aplikaci na kůži. Zmiňuje též 3 metody, a to metodu míchadla nad diskem, válcovou metodu a metodu vertikální difuze.

Jako vhodné disoluční médium je uveden pufr o pH 5-7 které však v případě nutnosti může být změněno. Může být přidán vhodný surfaktant, ethanol, organická rozpouštědla atd., pokud neovlivní uvolňování aktivní látky ze vzorku.

Kritéria přijatelnosti jsou zde specifikována. Specifikace je ve 3 úrovních L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub>. Začíná se na úrovni L<sub>1</sub> ve které se měří 6 vzorků, stejně jako v Českém lékopise 6 vzorků, které musí

vyhovovat specifikaci. Pokud tomu tak není, použije se úroveň  $L_2$  ve které se změří dalších 6 přípravků. Ze všech 12 výsledků ( $L_1+L_2$ ) se vypočítá průměr, který musí vyhovovat specifikaci a žádný výsledek nesmí vykazovat odchylku větší než 10%. Pokud nevyhovuje ani  $L_2$ , přejde se k poslední úrovni  $L_3$  kde je změřeno dalších 12 vzorků. Průměr všech 24 výsledků musí odpovídat specifikaci a nejvíce 2 vzorky smí vykazovat odchylku větší než 10%. Žádný ze vzorků nesmí vykazovat odchylku větší než 20% (3) (19).

Metoda míchadla nad diskem je obdobou diskové metody z Čl. Kromě disku však připouští i jiné metody pro potopení přípravku ke dnu za předpokladu, že bude v protokolu uvedena specifikace tohoto zařízení.

Válcová metoda je obdobná válcové metodě z Českého lékopisu včetně téměř identických rozměrů válce.

Metoda vertikální difuze je nejvíce odlišná od metod uvedených v Čl. Přístroj se skládá ze 2 kompartmentů – donorového a receptorového. Do receptorového kompartmentu je napuštěn daný objem disolučního média (obvykle 7 ml). Může být použita porézní membrána, jejíž specifikace musí být uvedeny v protokolu. Do donorového kompartmentu je rovnoměrně umístěn vzorek. Do receptorového kompartmentu se během analýzy nesmí dostat vzduchové bubliny (3) (20).

#### 4.3 Neseparační průtokové metody

Moderní analytická chemie vyžaduje analýzu velkého množství farmaceutických, přírodních, chemických či potravinových vzorků. K tomuto je vhodné proces analýzy automatizovat. Dalším současným trendem je miniaturizace analytických systémů z důvodu snížení spotřeby vzorku, reagensů a množství tvořeného odpadu. Snaha tyto požadavky splnit vedla k vývoji průtokových metod, (flow injection) (21), neboť průtokové metody všechny výše uvedené požadavky splňují (22). Mimoto také průtokové metody vykazují další žádoucí vlastnosti, jako je krátký čas nutný pro analýzu, on-line separace matrice, zakoncentrování analytu, či možnost provedení derivatizačních reakcí pro přeměnu analytů na produkty stanovitelné zvoleným detektorem (23).

##### 4.3.1 Princip průtokových metod

Průtokové metody (FI) zabraňují kontaminaci vzorku během jeho manipulace. Díky nim je možné docílit reprodukovatelné (RSD obvykle mezi 1% a 5%) mísení vzorku a případných reagensů před průchodem detektorem. FI metody jsou v principu robustní, kompaktní a spolehlivé. Zařízení pro FI se skládá z PTFE hadiček a spojovacích částí o úzkém průměru

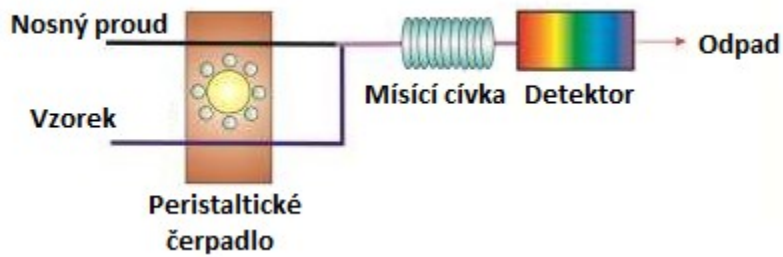
(0,5 – 0,8 mm), peristaltického čerpadla, ventilu pro dávkování vzorku, průtokové cely a vhodného detektoru.

Průtokové metody jsou tedy plně automatizovatelné a umožňují on-line úpravy vzorku (například zapojení krátké extrakční kolony pro prekoncentraci analytu a odstranění matrice). Dávkování přesně definovaného objemu vzorku do laminárního nosného proudu umožňuje reprodukovatelnou disperzi vzorku. Pro základní FI je typická detekce produktu reakce, jehož množství není v rovnováze kvůli jeho krátkému kontaktu s činidlem. Disperze vzniká nejvíce konvekcí, dále pak vlivem molekulární difuze. Disperze může být ovlivněna rychlostí průtoku, geometrií přístroje a nejvíce objemem vzorku. Disperzi popisuje takzvaný disperzní koeficient  $D$ . Při použití FI metod je spotřebováno malé množství vzorku, obvykle v objemech 5 – 500  $\mu\text{l}$ . Tato nízká spotřeba je velmi výhodná v analýzách, které jsou limitovány malým množstvím vzorku.

Jedna z cest vývoje průtokových metod se od 80. let 20. století zaměřuje na úpravu systému tak, aby byl použitelný pro analýzu více různých vzorků bez nutnosti radikální přestavby systému pro každý jednotlivý analyt, jako je tomu u prvních FI metod. Byl zde přidán vícecestný ventil umožňující postupné nasátí daných objemů vzorku a činidel do mísící cívky. Po jejich nasátí je tok obrácen a směs analytu a produktu je odeslána do detektoru. Tohoto využívá například systém sekvenční injekční analýzy (SIA), jak bude níže uvedeno. Pro kontrolu vícecestného ventilu byly vyvinuty sofistikované programy umožňující další automatizaci a optimalizaci. Při změně měřeného vzorku tedy není nutné výrazně upravovat „hardware“ přístroje. Optimalizace stanovení pro daný analyt a danou metodu probíhá primárně změnou softwaru – programu řídicího daný přístroj (23).

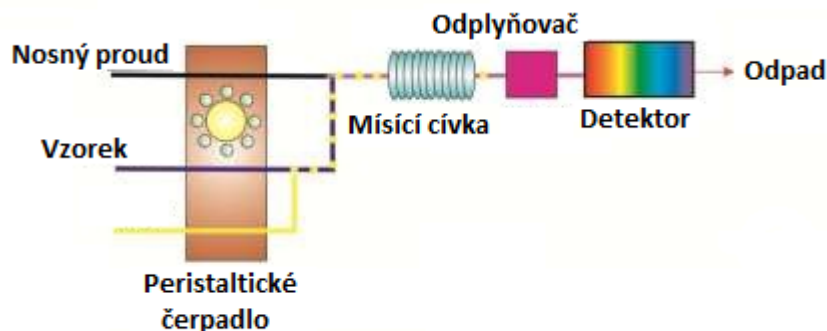
#### 4.3.2 Charakterizace jednotlivých průtokových metod

První vyvinutou průtokovou metodou je kontinuální průtoková analýza, CFA (continuous flow analysis). V CFA jsou do systému kontinuálně nasávány vzorky v kapalném skupenství. Vzorky jsou v CFA míseny s činidly v takzvané mísící cívce pomocí konvekce a difuze. Tato směs je kontinuálně posílána do detektoru. Hlavní nevýhody této metody spočívají ve větší spotřebě činidel (a větším množství následného odpadu), a v relativně dlouhém času nutném pro analýzu, protože produkt použité chemické reakce je detekován až v rovnovážném stavu reakce (22).



*Obr. č. 2 schéma CFA systému (22), přeloženo*

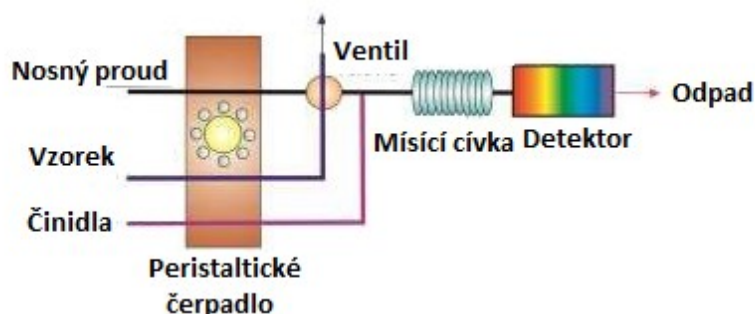
Odlíšnou možnost přístupu k průtokovým metodám je zabránění disperze zón, ke které dochází ve výše zmiňovaných průtokových metodách. První z těchto metod se nazývá SFA (segmented flow analysis). V této metodě je vzorek rozdělen pomocí bublinek plynu (vzduchu či dusíku), a následně smíšen s činidly v mísicí cívce. Poté jsou analyty odeslány do detektoru, před kterým je ještě směs odplyněna. Bubliny ve směsi tvoří turbulentní proudění, díky němuž dochází k lepší homogenizaci směsi. Tímto je také částečně eliminována disperze, díky čemuž je odezva analytu na detektoru ostřejší, a maximální odezva je pak dosažena po delší dobu. Měření reakční směsi zde obvykle probíhá v rovnováze (pokud je reakce pomalá, je možno proud zpomalit či zahřát) (22) (24).



*Obr. č. 3 Schéma SFA systému (22), přeloženo*

Další průtokovou metodou je průtoková injekční analýza, FIA (flow injection analysis). Jedna z prvních odborných prací, zabývající se FIA průtokovými metodami byla publikována v roce 1975 Růžičkou a Hansenem (21). FIA spočívá v průběžném dávkování určeného objemu vzorku do laminárního kontinuálního nosného proudu pomocí injekčního ventilu. Mísení vzorku a činidel probíhá v mísicí cele difúzí a konvekcí. Měření obvykle neprobíhá v rovnováze, čímž může být snížena citlivost metody, ale je výrazně zvýšena rychlost analýzy. Ve vhodných případech může být pro zvýšení citlivosti metody využit režim „stop–flow“, kde

je čerpadlo pohánějící nosný proud po aspiraci vzorku na danou dobu zastaveno a je ponechán delší čas pro proběhnutí reakce (25). Další úpravou FIA systému, kde jsou činidla přidávána v daném objemu k nosnému proudu obsahující analyt, je docíleno významného snížení spotřeby těchto činidel (22).



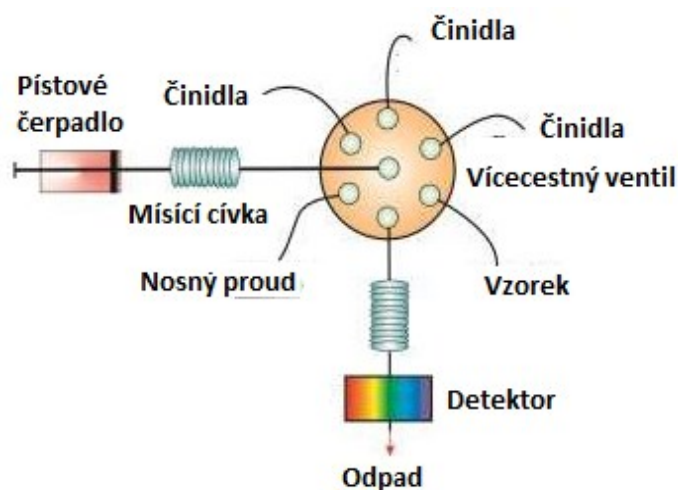
**Obr. č. 4** Schéma FIA systému (22), přeloženo

Další průtoková metoda umožňující snížení spotřeby činidel se nazývá AIA (all injection analysis). V AIA jsou všechny činidla a vzorek odeslány do uzavřené mísící cívky, kde cirkulují po určený čas. Po uplynutí tohoto času jsou odeslány do detektoru. Díky spotřebě chemikálií jen během odeslání vzorku do detektoru je množství vytvořeného odpadu velmi nízké (22) (26).

Další snížení spotřeby činidel může být docíleno jejich regenerací a následným opětovným použitím (27). Všechny tyto metody (CFA, FIA i AIA) mají ovšem nevýhodu v nutnosti přestavět celý systém pro odlišné analyty a jednotlivá měření (22). Jak již bylo uvedeno v úvodu do problematiky průtokových metod, nastal z důvodu neflexibility výše vyjmenovaných metod při analýze rozdílných vzorků vývoj univerzálnějšího systému pro analýzu různých vzorků na jednom přístroji (23) (22) (28).

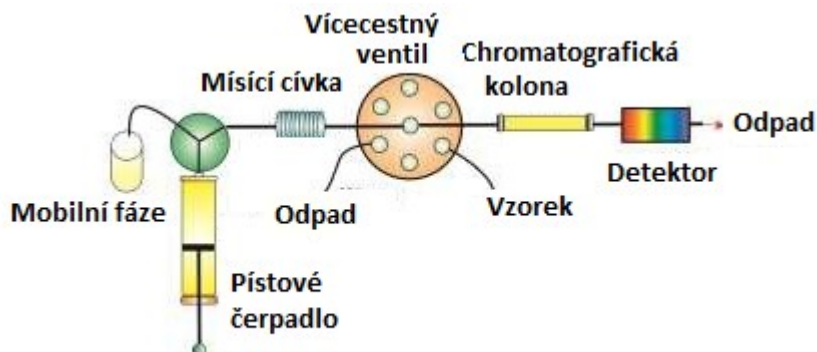
Jako první z těchto univerzálních metod byla vyvinuta SIA (sequential injection analysis) (22). SIA systém obsahuje vícecestný ventil, mísící celou, pístové čerpadlo. V SIA je postupně (sekvenčně) nasát přesný objem vzorku, nosného proudu a činidel do mísící cívky. Poté je proud obrácen a směs analytů je odeslána do detektoru. Tímto je vytvořen koncentrační gradient a dochází k částečnému mísení zón vzorku a činidel [obr. č. 5]. Zóna překryvu ovlivňuje signál analytu v detektoru a je závislá na geometrii systému (objem analytů, rychlost průtoku, délka a průměr hadiček, stavba detektoru) a vlastnostech nosného proudu (viskozita, difuzní koeficient). V SIA je opět, v porovnání s FIA či CFA, snížena spotřeba činidel a tím

i tvorba odpadu. Nejpokročilejší forma SIA v tomto ohledu je SIA-LOV (SIA lab-on-valve). V SIA-LOV je celý systém miniaturizován a kanály integrovány na vícecestný ventil, čímž je opět snížena spotřeba všech použitých roztoků. Kromě SIA-LOV vznikly další systémy snažící se o miniaturizaci, například SIA-LAV (SIA Lab at valve) (23) (22) (29) (30).



**Obr. č. 5** Schéma SIA systému (22), přeloženo

Další možností úpravy SIA systému je sekvenční injekční chromatografie SIC (sequential injection chromatography), ve které je do systému přidána chromatografická kolona. Kolony užívané v SIC jsou krátké monolitické s vysokou porozitou. Tento typ kolon poskytuje kvalitní separaci analytů v systému, kde je nutný nízký zpětný tlak. SIC může být provedena v uspořádání: chromatografie na reverzní fázi (nejčastěji), iontově výměnná chromatografie či afinitní chromatografie (31). V porovnání s HPLC je zde výhoda nižší spotřeby chemikálií a možnost on-line derivatizace analytu nebo úpravy vzorku v rámci jedné analýzy (22) (32).



**Obr. č. 6** Schéma SIC systému (22), přeloženo

Existuje velké množství dalších průtokových metod, které však přesahují rámec tohoto krátkého pojednání (22) (33) (34).

#### 4.3.3 Trendy ve vývoji automatizovaných průtokových technik

Snaha o takzvanou „zelenou chemii“ podporuje metody s nízkou spotřebou činidel, probíhající v uzavřeném systému a tvořící minimum odpadu. Mezi metody splňující tyto podmínky patří i průtoková analýza. Díky zvýšenému povědomí o dopadech chemikálií na životní prostředí a stále se zpřísnující legislativě zabývající se ochranou přírody je zde impuls ke zvýšenému využívání FI metod a metod na FI založených v monitorování průmyslových procesů a minimalizování úniku potenciálně škodlivých látek do životního prostředí.

Vývoj v analytických metodách se také ubírá směrem plné automatizovatelnosti všech analytických procesů. Modularita průtokových systémů tuto automatizovatelnost umožňuje. Především pak jde o přípravu a úpravu vzorku před samotnou analýzou. Jsou vyvíjeny různé metody pro extrakci, separaci a prekoncentraci analytu. Jsou také kombinovány různé metody průtokové analýzy s rozličnými separačními technikami (35).

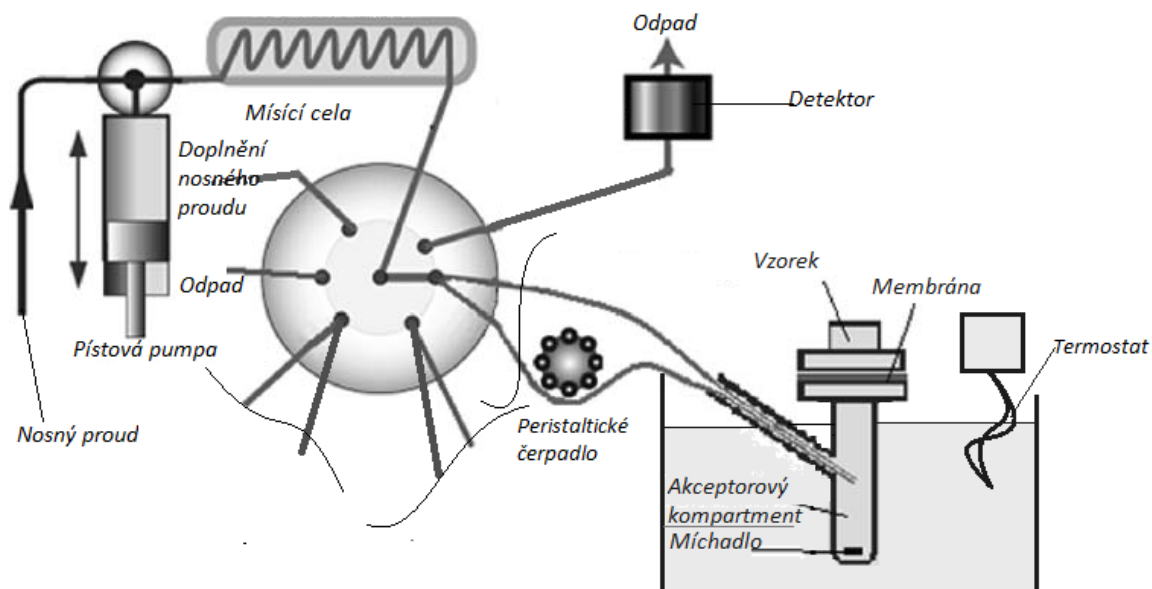
Do budoucna se předpokládá použití detektorů s nízkými nároky na spotřebu energie. Probíhá vývoj stále sofistikovanějších a pro uživatele přizpůsobitelnějších programů pro ovládání systémů. Toto spolu s miniaturizací přístrojů umožňuje, aby byly FI metody použity pro *in-situ* monitorování díky své přenosnosti. Monitorování *in-situ* pak umožní další snížení nákladů zjednodušením a vyšší efektivitou logistiky.

Průtokové metody jsou tedy vhodné pro analýzu velké škály vzorků díky možnosti upravit metodu pro daný analyt/vzorek. Jsou ekonomické v porovnání s jinými analytickými metodami vzhledem k nízké spotřebě chemikálií a nižší ceně přístrojů. Manipulace s chemikáliemi probíhá v uzavřeném systému, což je výhodné především pro analýzy s použitím toxických látek, kde tento systém snižuje riziko kontaktu obsluhy s těmito látkami. Další výhodou těchto systémů je pak možnost plné automatizace rozličných analytických procesů, dosud prováděných manuálně či poloautomaticky, čímž se lze vyvarovat lidských chyb při jednotlivých měřeních a je tak zvýšena reprodukovatelnost a opakovatelnost analytické metody.

## 5 Experimentální část

### 5.1 Přístroje, zařízení a pomůcky

Ke stanovení množství klotrimazolu uvolňovaného z matrice byla vybrána metoda SIA a sestaven vhodný systém (viz následující obrázek). Pro porovnání liberace účinné látky klotrimazolu z nově vyvíjeného přípravku Delcore od společnosti Contipro byly použity 2 volně prodejné krémy s obsahem Klotrimazolu – Canesten a Klotrimazol AL.



**Obr. č. 7** SIA systém pro automatizaci odebírání vzorků a on-line stanovení klotrimazolu: (36)  
*upraveno a přeloženo*

Systém pro automatizaci odběru a on-line stanovení klotrimazolu byl založen na sestavě: MicroSIA, FIALab® instruments, USA, s použitím 5 ml pístového čerpadla a 6-cestného selekčního ventilu. Hadičky propojující jednotlivé části systému jsou z PTFE o průměru 0,75 mm. Do systému je zapojeno 8-kanálové peristaltické čerpadlo Gilson pro mísení obsahu jednotlivých dávkovacích smyček. Detekce probíhá UV detektorem, jehož parametry jsou uvedeny v Tabulce č. 1.



**Tabulka č. 1** Parametry detektoru

UV detektor	USB4000, FIALab <sup>®</sup> instruments, USA
vlnová délka 210 nm	210 nm
integrační čas	50 ms
zdroj UV záření	D-2000, (Ocean Optics, USA)
detekční cela	10 mm PTFE průtoková Z-cela
optická vlákna	průměr 600 μm (Ocean Optics, USA)

Objem dávkovaného vzorku byl experimentálně optimalizován na 50 μl a rychlost jeho průtoku detektorem na 10 μl/s.

Frekvence odebrání vzorků z liberačního testu byla při použití jedné cely 4 minuty a při použití 3 tří paralelních cel 12 minut. Tyto doby byly zvoleny s přihlédnutím k časům analýzy. Následně bylo časování analýzy upraveno přidáním krátké pauzy tak, aby měření trvalo přesně definovanou dobu v min. Za jednu hodinu tak proběhne 15 měření z jedné cely, respektive 5 měření ze 3 paralelních cel. Stanovení proběhlo v duplikátu s vyhodnocením průměrné hodnoty výšky signálu.

Teplota vodní lázně byla nastavena na 32°C, což je teplota kůže zdravého člověka (37).

Franzova cela, parametry viz tabulka č. 2

Použitá membrána pro měření separace je hydrofilní polykarbonátová membrána o parametrech uvedených Tabulce číslo 2 (38).

**Tabulka č. 2** Parametry membrány

název	Isopore HTTP03700
materiál	hydrofilní polykarbonátová membrána
pórovitost	10-20%
velikost pórů	0,4 μm
průměr filtru	37 mm
tloušťka filtru	10 μm
maximální operační teplota	140 °C
průtok vody (při 10 psi = 1333,2 Pa)	≥ 50 mL/min/cm <sup>2</sup>

Dále byl přidáním krátké separační kolony před detektor systém upraven na SIC (Sekvenční Injekční Chromatografie) a na tomto systému byla vyvinuta jednoduchá metoda pro separaci klotrimazolu a tokoferolu obsažených v přípravku Delcore. Tyto látky byly v systému separovány pomocí 5 mm monolitní C18 kolony.

Pro přípravu vzorků byly použity analytické váhy, mikropipety s nastavitelným objemem, laboratorní centrifuga a stříkačkové filtry PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ .

## 5.2 Chemikálie

PBS tlumivý roztok (Phosphate-buffered saline) o pH 7,4

přesné složení v 1 litru: 0,2 g KCl, 8 g NaCl, 2,85 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
doplněno vodou v odměrné baňce do 1 litru, roztok byl odplyněn v ultrazvukové lázni

Acetonitril  $\geq 99,95\%$ , VWR International s.r.o., Stříbrná Skalice, ČR

Ethanol Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný  $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Hydrogenfosforečnan sodný 99-101%, Fluka –Honeywell, Bukurešť, Rumunsko

Chlorid draselný  $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Chlorid sodný čistý, Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Praha, ČR

Superčistá voda připravená systémem Millipore, Merck, ČR

Klotrimazol 99-101%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Tokoferol  $\alpha$ -acetát, Sigma-Aldrich, Praha, ČR

## 5.3 Analyzované vzorky

Analyzované HVLP

CANESTEN 10MG/G CRM 20G (Kern Pharma S.L., SPA) (39)

CLOTTRIMAZOL AL 1% 0,01G/G CRM 20G (ALIUD PHARMA GmbH, GER) (40)

Analyzované vzorky Delcore dodané firmou Contipro a. s. Dolní Dobrouč CZE (41)

Vzorek Delcore s klotrimazolem a tokoferolem, s obsahem klotrimazolu 7,7%  
a tokoferolu 11,3%

Vzorek Delcore o s obsahem 3,3% klotrimazolu

Vzorek Delcore matrice

## 5.4 Pracovní postup

### 5.4.1 Příprava systému pro měření

Po každém restartování systému byl přeměřen vzorek o koncentraci 0,0050 mg/ml pro ověření reprodukovatelnosti výsledků systému. Pokud byl dosažen výsledek ve stanovené mezi: 95,0% - 105,0%, měření probíhalo bez dalších úprav. Když byla odchylka větší, byl systém opět restartován a stejný kalibrační vzorek přeměřen ještě dvakrát. Pokud v tomto případě průměr těchto 3 odchylek vešel do meze 95,0% - 105,0%, měření probíhalo bez dalších úprav. Pokud se však ani tentokrát odchylka nevešla do stanoveného rozmezí, byl změřen další vzorek o jiné koncentraci. Pokud i ten vykazoval stejnou odchylku, byl výsledek relativně upraven. Mimo reprodukovatelnosti systému byla tímto také ověřena funkčnost systému – nepřítomnost vzduchových bublin v systému, či odstranění mechanických závad (netěsnost, poškozené hadičky...). Tyto potíže se projevovaly vysokou odchylkou v hodnotě absorbance klotrimazolu, či vysokým šumem a nemožností odečíst signál detektoru. V případě, že k některé z těchto situací došlo, byl systém pročištěn ethanolem a bubliny ze systému mechanicky odstraněny. Po pročištění bylo toto ethanolové prostředí odstraněno a do systému byl opět zaveden PBS a vzorek o koncentraci 0,0050 mg/ml byl opět přeměřen.

### 5.4.2 Příprava standardu klotrimazolu

Pevný klotrimazol o hmotnosti 400 mg byl rozpuštěn v ethanolu a kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 20 ml. Následně byl ethanolem doplněn po rysku za vzniku zásobního roztoku o koncentraci 20 mg/ml. Tento roztok byl v případě potřeby pro snazší manipulaci naředěn v poměru 1:10 ethanolem na koncentraci 2 mg/ml. Ředěním tohoto roztoku PBS v odměrných baňkách byly následně připraveny roztoky pro kalibrační křivku a standardní roztoky.

### 5.4.3 Příprava vzorku HVLP krému

Na polykarbonátovou membránu byl nanesen vzorek krému o hmotnosti přibližně 50 mg, ne však více než právě 50 mg. Pokud by tato hmotnost byla výrazněji překročena, dojde k nasycení liberačního média a tím k falešnému snížení získaných výsledků. Krém s klotrimazolem byl v tenké vrstvě rozetřen co nejrovnoměrněji po povrchu membrány v tenké vrstvě simulující nanesení krému na pokožku tak, aby se nedostal do zábrusu ve Franzově cele. (Analyt ze vzorku v zábrusu by nebyl schopený prostoupit do akceptorového

kompartimentu a množství uvolněného klotrimazolu by tedy bylo nesprávně nižší.) Membrána s naneseným vzorkem byla pak umístěna do Franzovy cely. Umístění membrány do Franzovy cely bylo načasováno tak, aby při rychlosti průtoku liberačního média peristaltickým čerpadlem 1,3 ml/min dosáhlo čelo média se vzorkem detekční celu právě v čase, kdy je poprvé odeslán vzorek do detektoru a stanoven obsah klotrimazolu. Tento čas byl stanoven výpočtem a experimentálně.

#### 5.4.4 Příprava vzorku DELCORE

Vzorek ve formě lyofilizátu obsahující klotrimazol byl navážen na analytických vahách a rozpuštěn v odpovídajícím objemu roztoku PBS (5 mg vzorku bylo rozpuštěno 1 ml PBS v mikrozkuhavce lehkým manuálním zatřepáním, bez použití třepačky či jiných metod urychlující rozpouštění (požadavek výrobce). Tento vzorek byl pak dávkován mikropipetou v objemu 300 µl na membránu. Dávkování bylo provedeno ve stejné fázi měření, jako u vzorku ve formě krému.

#### 5.4.5 Korekce koncentrace pro naředění nosného proudu

Při každém měření je část liberačního média odeslána do odpadu. Tento objem je nutný po každém měření nahradit novým médiem ze zásobního roztoku PBS. Jinak by hrozil pokles hladiny kapaliny v akceptorovém kompartmentu Franzovy cely a tím oddělení akceptorové kapaliny od membrány. Tím by byla disoluce API přes membránu zastavena, čímž by došlo k falešnému snížení celkové koncentrace uvolněného klotrimazolu. Doplněný objem nesmí být ani vyšší, než reálný úbytek média, neboť pokud by objem kapaliny v akceptorovém kompartmentu rostl, docházelo by ke změně geometrie membrány a také k úniku média raménkem Franzovy cely, což by opět ovlivnilo výslednou koncentraci klotrimazolu. Objem, nutný po každém měření doplnit do jednotlivých cel byl experimentálně určen jako 320 µl. Po doplnění tohoto objemu nedochází k výrazným změnám objemu kapaliny v akceptorovém kompartmentu ani při dlouhodobějším měření.

Jelikož je do odpadu odesíláno médium obsahující analyty a nahrazováno novým médiem ze zásobního roztoku, dochází při každém měření k naředění systému a tedy k postupnému poklesu koncentrace analytu. Tento pokles koncentrace je nutný do výsledku zohlednit a reálnou koncentraci dopočítat dle následujícího vzorce.

$$C_{n,korigovaná} = C_{n,naměřená} + \frac{\text{objem vzorku}}{\text{objem systému}} \times \{c_1 + c_2 + \dots + c_{n-1}\}$$

**Obr. č. 8** Vzorec pro výpočet korigované koncentrace (42)

## 6 Výsledky a diskuze

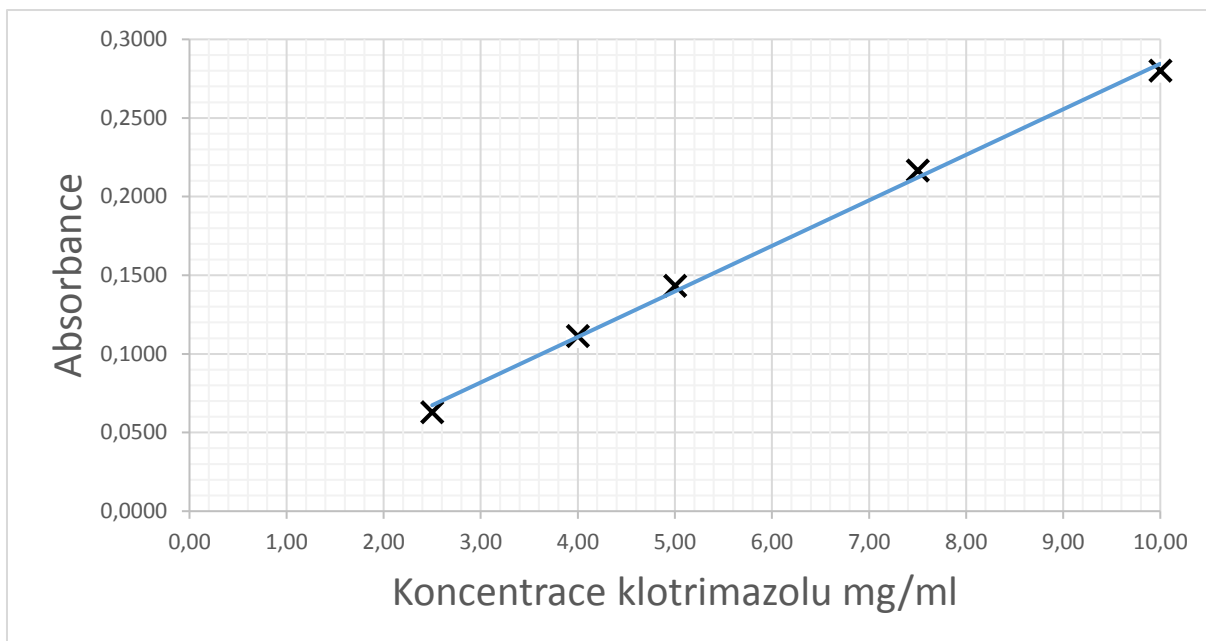
### 6.1 Kalibrační křivka roztoku klotrimazolu

Linearitu metody popisuje kalibrační křivka klotrimazolu v PBS (viz. Obr. č. 9). Pro její změření byly použity roztoky klotrimazolu v PBS o koncentračním rozmezí 0,0025-0,01 mg/ml. Při měření vyšších koncentrací klotrimazolu již nebyly výsledky lineární. U koncentrace 0,02 mg/ml a vyšších bylo zpozorován bílý zákal a tedy vysrážení klotrimazolu v hydrofilním prostředí pufru (43). Tyto kalibrační roztoky byly připraveny zředěním zásobního ethanolického roztoku klotrimazolu o koncentraci 2 mg/ml PBS. Každý vzorek byl měřen třikrát a do grafu byl vnesen průměr těchto tří měření. Měření probíhalo při vlnové délce 210 nm. Objem dávkovaného vzorku byl 50  $\mu$ l. Dávkován byl spolu s 400  $\mu$ l nosného proudu (ultračistá voda) a do detektoru byl odeslán rychlostí 10  $\mu$ l/s.

Linearitu nám určuje korelační koeficient křivky. V tomto případě má pro rovnici přímky  $y = 28,947x - 0,005$  hodnotu 0,9976 což je pro dané měření dostačující. (viz tabulka č. 4)

**Tabulka č. 3** data pro kalibraci

Koncentrace [mg/l]	1. měření	2. měření	3. měření	Ø měření 1-3	Směrodatná odchylka
2,50	0,060	0,069	0,060	0,063	0,002
4,00	0,116	0,119	0,099	0,111	0,005
5,00	0,156	0,165	0,109	0,143	0,012
7,50	0,198	0,219	0,233	0,217	0,007
10,00	0,266	0,281	0,294	0,280	0,006



**Obr. č. 9** Kalibrační křivka klotrimazolu

**Tabulka č. 4** Statistické parametry kalibrační křivky

Statistické parametry pro regresi: $Y = kx + q$	
Počet bodů (n)	5
Směrnice (k)	28,947
Absolutní člen (q)	-0,005
Korelační koeficient (r)	0,9976

## 6.2 Stanovení limitu detekce a kvantifikace

Ke stanovení limitu detekce byl použit roztok klotrimazolu o koncentraci 0,0050 mg/ml u kterého byl změřen šum základní linie. Limit detekce (LOD) odpovídá koncentraci, představující trojnásobek absorbance šumu základní linie, limit kvantifikace poté desetinásobku tohoto šumu. Tyto limity byly vypočítány za použití rovnice přímky  $y = 28,947x - 0,005$ . Všechny body kalibrační křivky jsou tedy vyšší, než je limit detekce i limit kvantifikace.

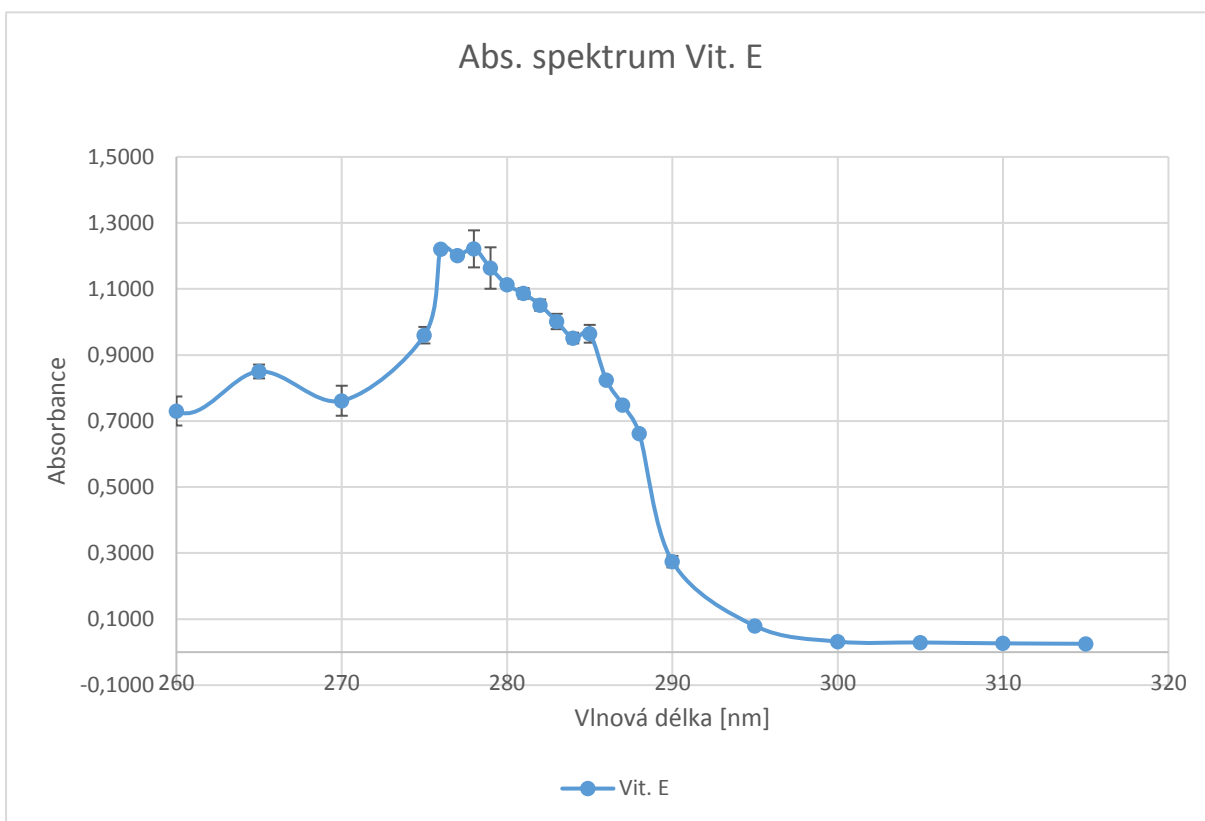
**Tabulka č. 5** Parametry LOD a LOQ

	absorbance	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Šum zákl. linie	0,006	
LOD	0,018	0,795
LOQ	0,060	2,245

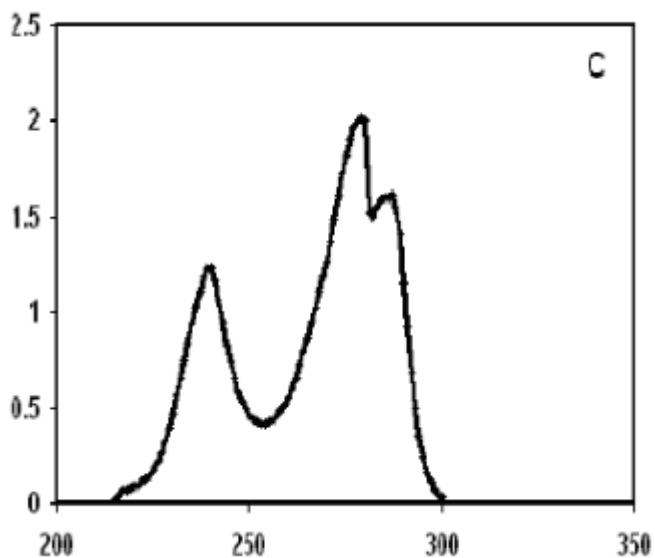
## 6.3 Separace tokoferolu a klotrimazolu

**Tabulka č. 7** Podmínky separace tokoferolu a klotrimazolu

Použité vlnové délky	254 nm, 278 nm
Rychlost průtoku	10 $\mu\text{l/s}$
Koncentrace klotrimazolu (v acetonitrilu)	0,01 mg/ml
Koncentrace tokoferolu (v acetonitrilu)	0,01 mg/ml
Objem vzorku	50 $\mu\text{l}$
Separáčn <span>í</span> kolona	5 x 4,6 mm Chromolith
Stacionární fáze	C18
Mobilní fáze	90% acetonitril a 10% voda pro HPLC
Uspořádan <span>í</span> systému	RP, Izokratická eluce
Rychlost průtoku	10 $\mu\text{l/s}$
Délka separace	200 s (s nutným promytím systému 420 s)



**Obr. č. 10** Naměřené absorpční spektrum tokoferolu



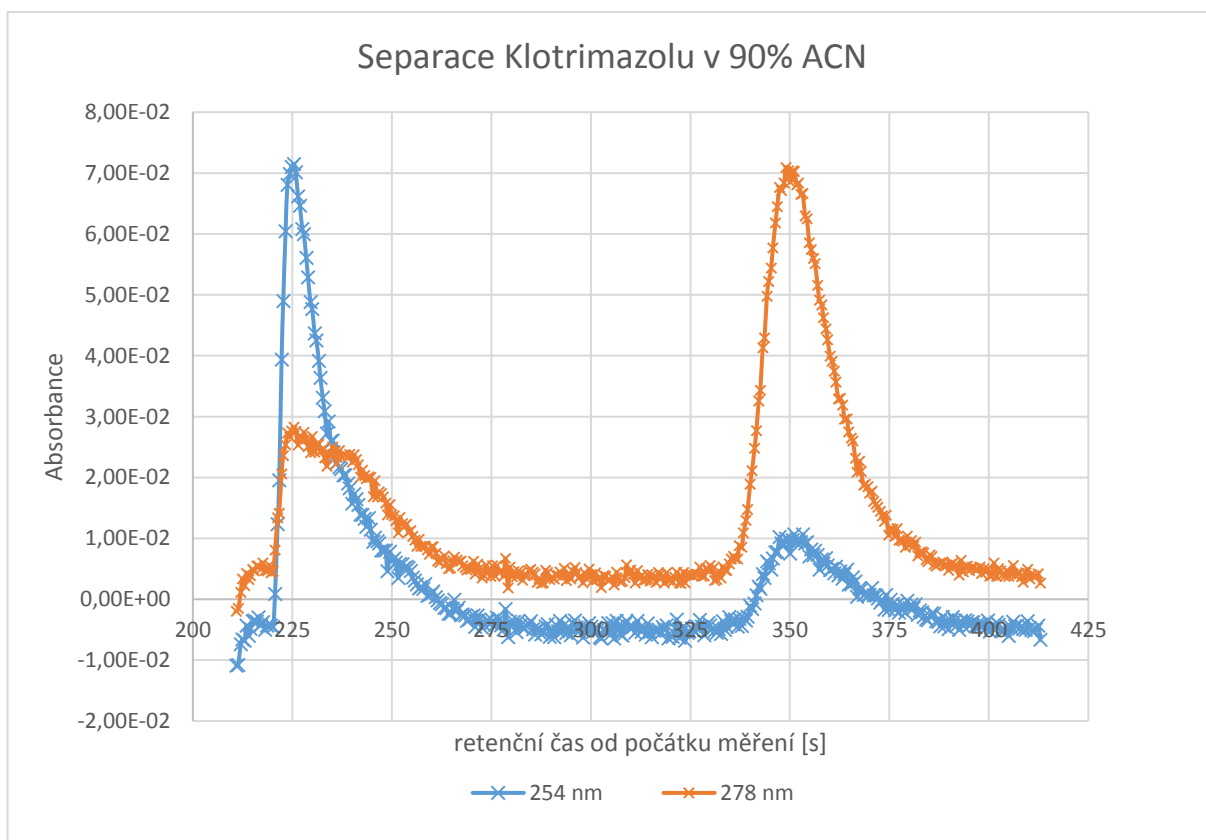
**Obr. č. 11** Absorpční spektrum tokoferolu (44)

Pro separaci byly zvoleny vlnové délky 254 nm a 278 nm. Vlnová délka 254 nm byla vybrána z literatury zabývající se stanovením klotrimazolu ve zdravotnickém materiálu (45). S výhodou lze tuto vlnovou délku použít i z důvodu, že  $\alpha$ -tokoferol acetát vykazuje při této



vlnové délce absorpční minimum (obr. č. 11). Absorpční spektrum roztoku  $\alpha$ -tokoferol acetátu v acetonitrilu o koncentraci 0,01 mg/ml bylo poté přeměřeno spektrometrem v oblasti vlnových délek 270-290 nm (viz. obr. č. 10). Jako vhodná vlnová délka pro separaci byla zvolena 278 nm (44). Při této vlnové délce poté klotrimazol vykazuje již výrazně nižší absorbanci (19).

Je zde předpoklad, že tokoferol, díky své vyšší lipofilitě (XLogP=10,8) bude zadržován na koloně déle než méně lipofilní klotrimazol (XLogP=5) (43).



**Obr. č. 12** Separace tokoferolu a klotrimazolu[tok2]

Jak je vidět z chromatogramu, lze za použití jednoduché monolitické předkolony tyto dvě látky separovat na základní linii. Je možné tedy touto metodou monitorovat disoluční profil přípravku obsahující obě tyto API, a to za předpokladu, že ostatní přítomné látky nebudou s touto analýzou interferovat. Výhoda je možnost zapojení této kolony do již zmiňovaného SIA systému pro automatizaci měření této disoluce do jednoho systému, čímž je redukována lidská chyba při přenosu vzorků, dojde také k ušetření prostoru nutného pro provedení analýzy a v neposlední řadě je také výhodou tohoto systému nižší ekonomická a ekologická zátěž.

Je zde však nutné zohlednit čas potřebný pro separaci. Původní interval mezi měřeními z jedné Franzovy cely se prodlouží ze 4 na minimálně 7 minut, pokud však započítáme i čas na

úkony jako je doplnění rozpouštědla do Franzovy cely, bude čas jednoho cyklu ještě delší. Kvůli tomuto nebudeme schopni v našem systému získat tak detailní liberační profil, jako v případě měření bez separace. Při měření ze 3 paralelních cel by analýza byla v tomto systému již velmi náročná a příliš zdlouhavá pro získání podrobnějšího profilu (přes 25 minut).

## 6.4 Profil uvolňování klotrimazolu z HVLP krémů

### 6.4.1 Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Canesten®

**Tabulka č. 7:** Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Canesten®, dávkování po 4 min, 1. měření, navážka 0,0476g, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm

Doba měření [min]	Abs <sup>1</sup>	Abs <sup>2</sup>	Abs - průměr	Konc. klotr. ve vzorku [mg/l]	Suma předchozích měření <sup>3</sup>	Konc. korig o naředění [mg/l] <sup>3</sup>	Konc. korig. na navážku [mg/l]
0	0,003	0,002	0,003	0,26	0,00	0,26	0,24
4	0,220	0,302	0,261	9,19	0,26	9,19	8,46
8	0,464	0,510	0,487	17,00	9,45	17,19	15,81
12	0,549	0,590	0,570	19,85	26,44	20,38	18,75
16	0,566	0,669	0,618	21,50	46,29	22,43	20,64
20	0,622	0,664	0,643	22,39	67,80	23,74	21,85
24	0,639	0,686	0,663	23,06	90,18	24,86	22,88
28	0,652	0,682	0,667	23,21	113,24	25,48	23,45
32	0,662	0,704	0,683	23,77	136,46	26,50	24,38
36	0,648	0,692	0,670	23,32	160,22	26,52	24,41
40	0,641	0,683	0,662	23,04	183,54	26,71	24,58
44	0,626	0,673	0,650	22,61	206,58	26,74	24,61
48	0,617	0,660	0,639	22,23	229,19	26,81	24,67
52	0,619	0,665	0,642	22,35	251,43	27,38	25,19

**1:** Absorbance při první průchodu detektorem

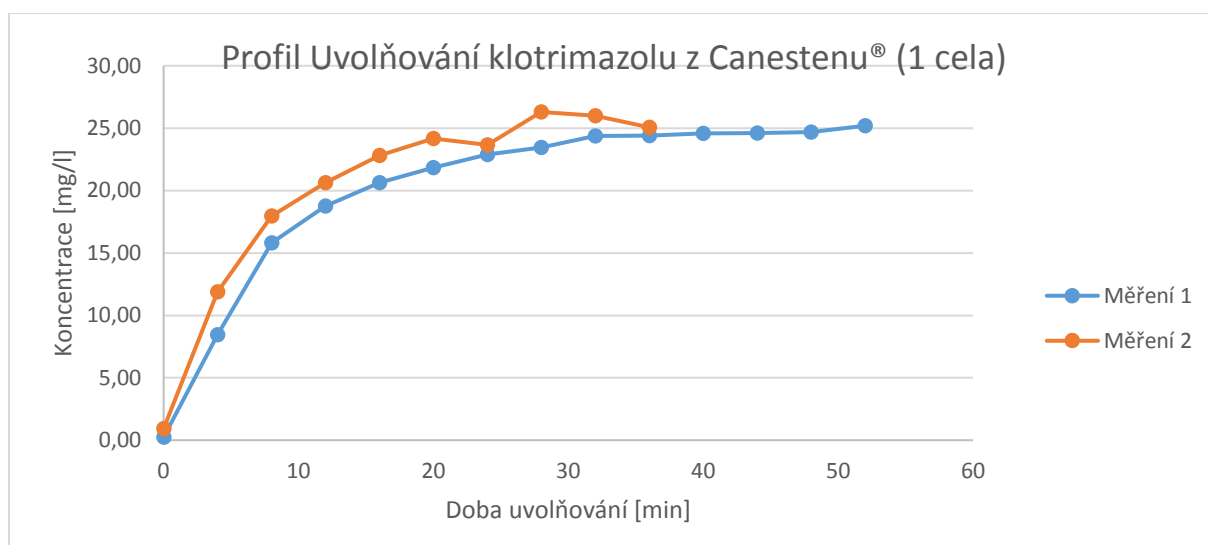
**2:** Absorbance při druhém průchodu detektorem

**3:** Výpočet viz obr. 8

**Tabulka č. 8:** Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Canesten<sup>®</sup>, dávkování po 4 min, 2. měření, navážka 0,0400g, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm

Doba měření [min]	Abs <sup>1</sup>	Abs <sup>2</sup>	Abs - průměr	Konc. klotr. ve vzorku [mg/l]	Suma předchozích měření <sup>3</sup>	Konc. korig o naředění [mg/l] <sup>3</sup>	Konc. korig. na navážku [mg/l]
0	0,019	0,020	0,020	0,85	0,00	0,85	0,93
4	0,285	0,332	0,309	10,83	0,85	10,85	11,88
8	0,450	0,476	0,463	16,17	11,68	16,40	17,96
12	0,504	0,545	0,525	18,29	27,84	18,85	20,64
16	0,548	0,594	0,571	19,90	46,14	20,82	22,80
20	0,566	0,625	0,596	20,74	66,03	22,07	24,16
24	0,546	0,595	0,571	19,88	86,78	21,62	23,67
28	0,608	0,649	0,629	21,88	106,66	24,02	26,30
32	0,579	0,636	0,608	21,16	128,55	23,73	25,98
36	0,548	0,594	0,571	19,90	149,70	22,89	25,07

- 1: Absorbance při první průchodu detektorem  
 2: Absorbance při druhém průchodu detektorem  
 3: Výpočet viz obr. 8



**Obr. č. 13** Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Canesten<sup>®</sup>, dávkování po 4 minutách.

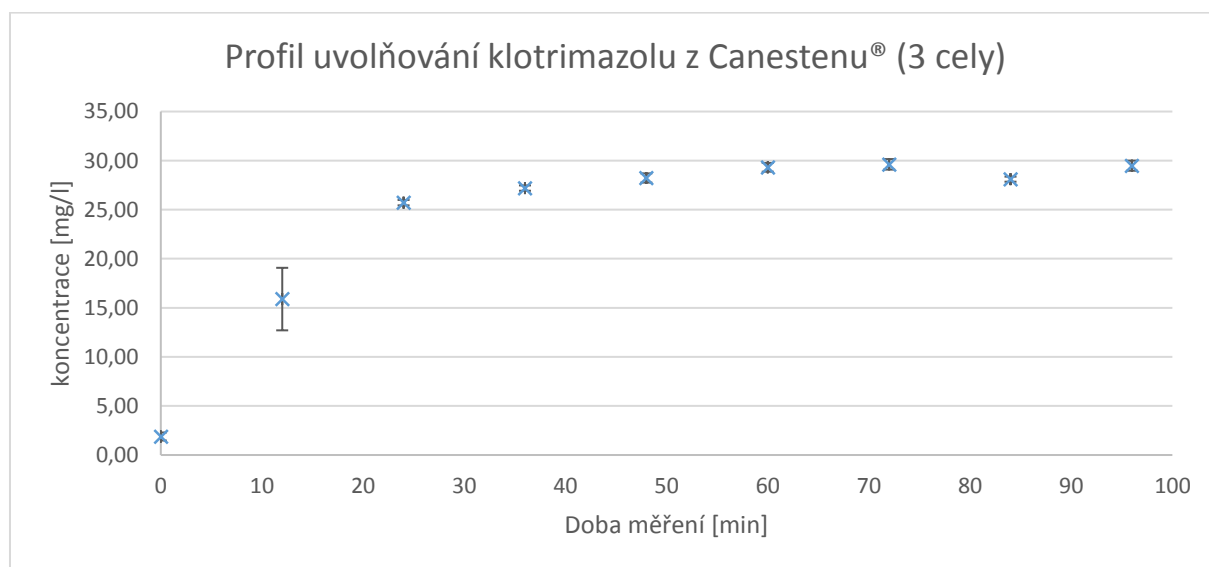
Jak je vidět z tohoto grafu, profil klotrimazolu uvolněného z léčivého přípravku Canesten<sup>®</sup> je poměrně pozvolný, a dobře reprodukovatelný. Nedochází zde k výraznému nárůstu koncentrace na počátku měření. Přibližně po 25 min nastává plató, kdy je uvolněno více než 90% přítomné účinné látky. Následná měření v delším časovém intervalu již nevykazují výrazně zvyšující se koncentraci uvolněné API. Doba testu je relativně krátká, nicméně stačí

pro uvolnění účinné látky z mast'ového základu a dobře odpovídá kinetice její liberace do příslušného média.

**Tabulka č. 9:** Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Canesten<sup>®</sup>, dávkování po 12 min, 2 měření, v každém měření paralelně 3 cely. absorbance měřena při vlnové délce 210 nm

čas měření [min]	koncentrace [mg/l]						průměr	směrodatná odchylka
	měření 1			měření 2				
	cela 1	cela 2	cela 3	cela 1	cela 2	cela 3		
0	2,01	2,04	3,49	0,96	1,18	1,65	1,89	0,409
12	10,09	9,71	8,82	21,59	22,30	22,83	15,89	3,185
24	25,78	25,46	25,98	24,96	25,38	26,73	25,71	0,277
36	27,12	26,45	27,89	26,92	26,88	27,93	27,20	0,271
48	28,84	28,13	29,48	26,70	27,42	28,80	28,23	0,469
60	28,85	30,54	29,31	28,53	28,24	30,41	29,31	0,442
72	30,30	30,45	28,11				29,62	0,536
84	27,40	28,30	28,62				28,11	0,258
96	28,17	29,59	30,69				29,48	0,515

1-6: Jednotlivé navážky [g],(v tomto pořadí): 0,046; 0,045; 0,038; 0,045; 0,043; 0,046



**Obr. č. 14:** Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Canesten<sup>®</sup>, ze 3 paralelních cel, dávkování po 12 minutách.

Jak je vidět z tohoto grafu, profil uvolněného klotrimazolu, měřeného ze 3 cel, je obdobný profilu naměřenému z 1 cely. Plató zde nastává v přibližně ve stejnou dobu, a to mezi dvacátou a třicátou minutou od počátku měření. Bylo provedeno 2x3, celkem tedy 6 měření. Toto množství bylo zvoleno z důvodu, že platný Český lékopis u stanovení liberace (disoluce) vyžaduje právě 6 měření (3) Z hodnot směrodatné odchylky lze vyčíst, že největší variabilita

mezi výsledky je na počátku liberace, v době, kdy koncentrace klotrimazolu v médiu rychle narůstá. Jakmile koncentrace dosáhne ustálených hodnot, opakovatelnost liberace se výrazně zvýší.

#### 6.4.2 Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL®

**Tabulka č. 10:** Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL®, dávkování po 4 min, 1. měření, navážka 0,0465g, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm

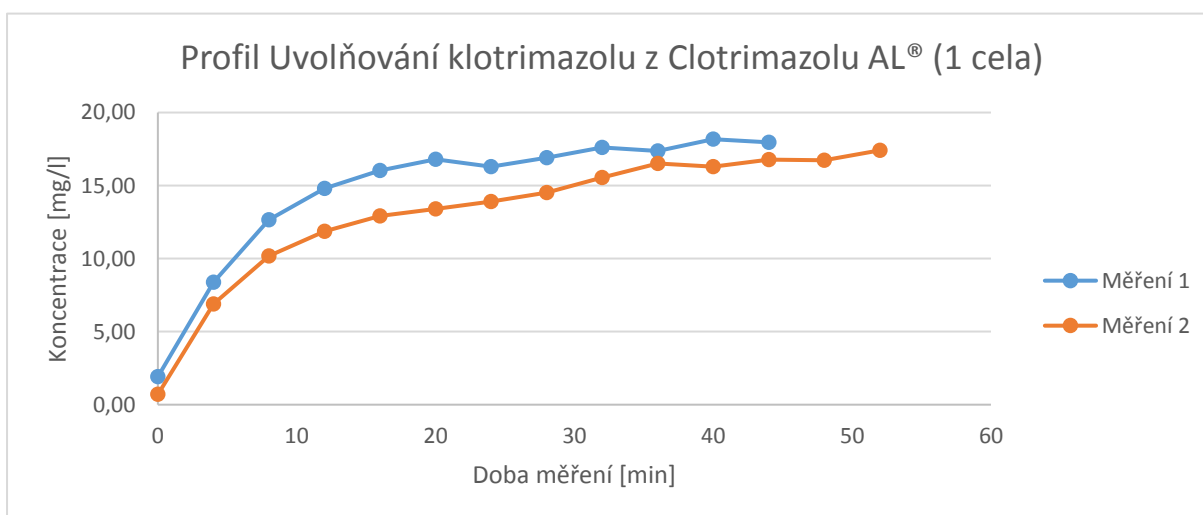
Doba měření [min]	Abs <sup>1</sup>	Abs <sup>2</sup>	Abs - průměr	Konc. klotr. ve vzorku [mg/l]	Suma předchozích měření <sup>3</sup>	Konc. korig o naředění [mg/l] <sup>3</sup>	Konc. korig. na navážku [mg/l]
0	0,056	0,049	0,053	1,99	0,00	1,99	1,91
4	0,218	0,274	0,246	8,67	1,99	8,71	8,38
8	0,344	0,395	0,370	12,94	10,66	13,15	12,66
12	0,409	0,444	0,427	14,91	23,59	15,38	14,80
16	0,445	0,465	0,455	15,89	38,50	16,66	16,03
20	0,457	0,481	0,469	16,37	54,39	17,46	16,81
24	0,432	0,456	0,444	15,51	70,77	16,93	16,29
28	0,437	0,470	0,454	15,84	86,28	17,56	16,90
32	0,451	0,480	0,466	16,25	102,12	18,30	17,61
36	0,430	0,468	0,449	15,68	118,37	18,05	17,37
40	0,447	0,481	0,464	16,20	134,06	18,88	18,17
44	0,416	0,481	0,449	15,67	150,26	18,67	17,97

- 1: Absorbance při první průchodu detektorem  
 2: Absorbance při druhém průchodu detektorem  
 3: Výpočet viz obr. 8

**Tabulka č. 11:** Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL<sup>®</sup>, dávkování po 4 min, 2. měření, navážka 0,0430g, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm

Doba měření [min]	Abs <sup>1</sup>	Abs <sup>2</sup>	Abs - průměr	Konc. klotr. ve vzorku [mg/l]	Suma předchozích měření <sup>3</sup>	Konc. korig o naředění [mg/l] <sup>3</sup>	Konc. korig. na navážku [mg/l]
0	0,014	0,015	0,015	0,67	0,00	0,67	0,70
4	0,165	0,208	0,187	6,62	0,67	6,63	6,90
8	0,263	0,285	0,274	9,64	7,29	9,78	10,18
12	0,301	0,329	0,315	11,05	16,93	11,39	11,86
16	0,320	0,356	0,338	11,85	27,98	12,41	12,91
20	0,323	0,366	0,345	12,07	39,83	12,87	13,39
24	0,327	0,376	0,352	12,32	51,91	13,35	13,90
28	0,348	0,375	0,362	12,66	64,22	13,95	14,51
32	0,364	0,402	0,383	13,40	76,88	14,94	15,55
36	0,389	0,415	0,402	14,06	90,29	15,87	16,51
40	0,359	0,417	0,388	13,58	104,35	15,66	16,30
44	0,370	0,417	0,394	13,77	117,92	16,12	16,78
48	0,362	0,407	0,385	13,46	131,02	16,08	16,73
52	0,389	0,410	0,400	13,97	137,86	16,73	17,41

- 1: Absorbance při první průchodu detektorem  
 2: Absorbance při druhém průchodu detektorem  
 3: Výpočet viz obr. 8



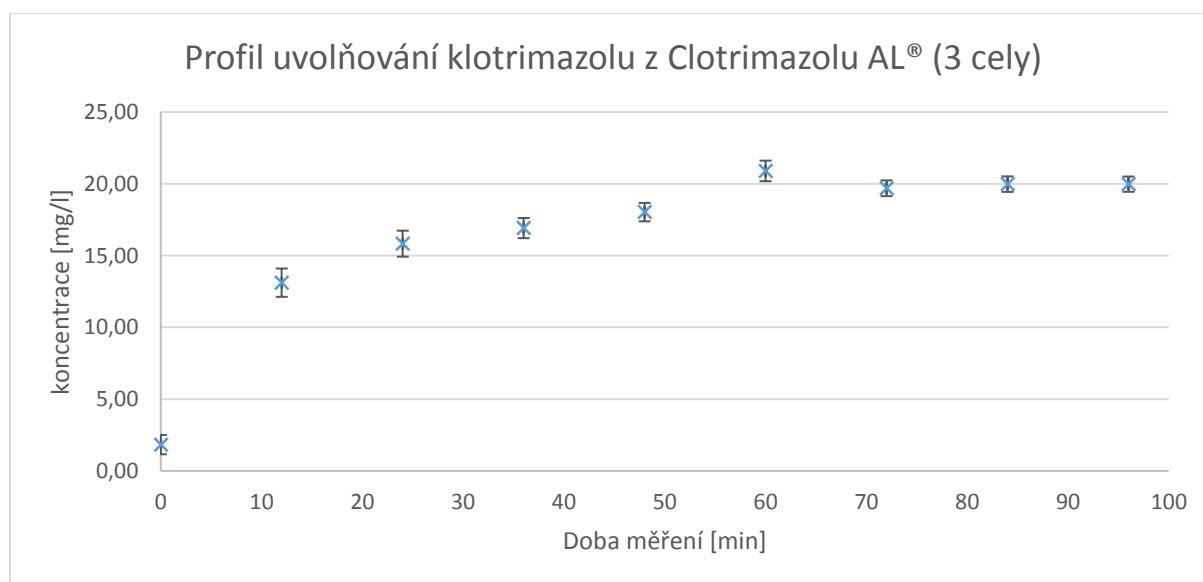
**Obr. č. 15:** Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL<sup>®</sup>, dávkování po 4 minutách.

Profil uvolňování klotrimazolu z léčivého přípravku Clotrimazol AL vykazuje v porovnání s profilem Canestenu® (obr. 13) pomalejší uvolňování léčivé látky. Plató zde nastává až po 30 minutě od počátku uvolňování. Následná měření již nevykazují zvyšující se koncentraci uvolněné API. Mírnější profil liberace tohoto LP (obr. 16) je pozorovaný i při liberaci ze 3 paralelních cel.

**Tabulka č. 12:** Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL®, dávkování po 12 min, 2 měření, v každém měřeny paralelně 3 cely, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm

čas měření [min]	koncentrace [mg/l]						průměr	směrodatná odchylka
	měření 1			měření 2				
	cela 1	cela 2	cela 3	cela 1	cela 2	cela 3		
0	0,95	1,08	1,04	1,71	4,78	1,41	1,83	0,67
12	15,49	15,38	13,34	10,70	10,52	13,25	13,11	0,99
24	17,38	17,95	16,57	13,91	12,93	16,24	15,83	0,91
36	18,46	18,42	17,37	15,11	14,99	17,14	16,92	0,70
48	19,05	19,34	17,13	15,94	17,41	19,29	18,03	0,64
60	21,63	20,01	18,26	21,17	21,54	22,79	20,90	0,72
72	20,38	20,55	18,14	20,89	22,38	22,48	19,69	0,55
84	21,06	20,37	18,51	20,67	22,56	23,00	19,98	0,54
96	20,87	20,57	18,49	21,55	23,70	23,77	19,98	0,53

**1-6:** Jednotlivé navážky [g],(v tomto pořadí): 0,0467; 0,0472; 0,0453; 0,0446; 0,0474; 0,0452



**Obr. č. 16:** Profíl uvolňování klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL®, ze 3 paralelních cel, dávkování po 12 minutách.



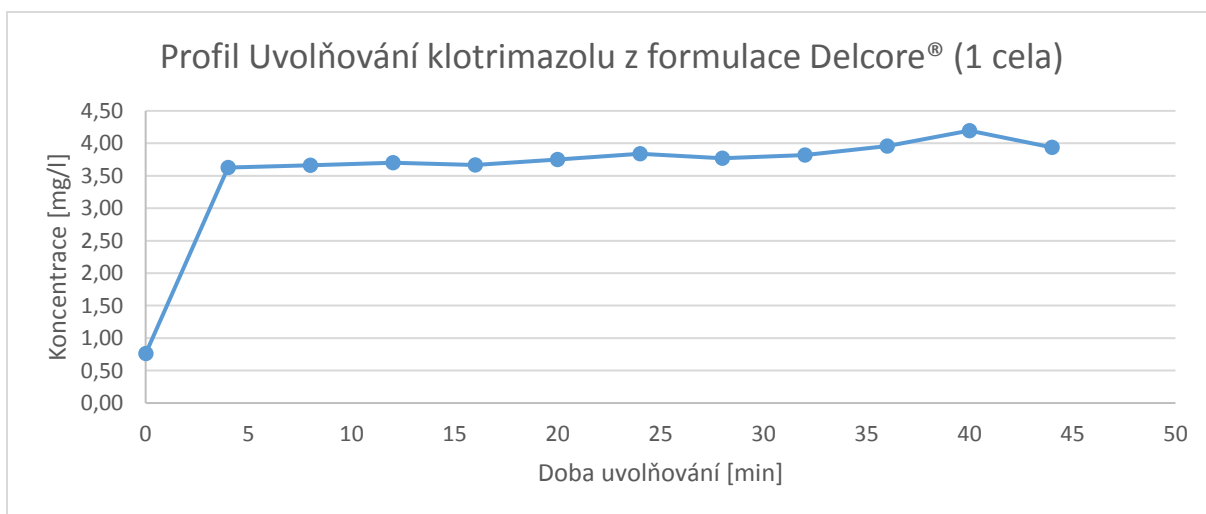
Profil liberace Clotrimazolu AL<sup>®</sup> vykazuje výrazně pomalejší nárůst koncentrace uvolněného léčiva do disolučního média než Canesten<sup>®</sup>. U tohoto měření při použití 2x3 paralelních cel nastává plató až přibližně po hodině od počátku měření. Směrodatná odchylka u tohoto měření poměrně stabilně mírně klesá s přibývajícím dobou měření. S delší dobou liberace se tedy její opakovatelnost zvyšuje.

### 6.5 Profil uvolňování klotrimazolu z formulace Delcore<sup>®</sup>

**Tabulka č. 13:** Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Delcore<sup>®</sup>, dávkování po 4 min, 1 měření, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm

Doba měření [min]	Abs <sup>1</sup>	Abs <sup>2</sup>	Abs - průměr	Konc. klotr. ve vzorku [mg/l]	Suma předchozích měření <sup>3</sup>	Konc. korig o naředění [mg/l] <sup>3</sup>
0	0	0,034	0,017	0,76	0,00	0,76
4	0,093	0,106	0,100	3,61	0,76	3,63
8	0,093	0,104	0,099	3,58	4,37	3,66
12	0,093	0,102	0,098	3,54	7,95	3,70
16	0,088	0,101	0,095	3,44	11,49	3,67
20	0,089	0,101	0,095	3,45	14,92	3,75
24	0,095	0,096	0,096	3,47	18,38	3,84
28	0,084	0,099	0,092	3,33	21,85	3,77
32	0,086	0,096	0,091	3,32	25,18	3,82
36	0,094	0,092	0,093	3,39	28,50	3,96
40	0,099	0,097	0,098	3,56	31,89	4,20
44	0,085	0,092	0,089	3,23	35,44	3,94

- 1: Absorbance při prvním průchodu detektorem  
 2: Absorbance při druhém průchodu detektorem  
 3: Výpočet viz obr. 8

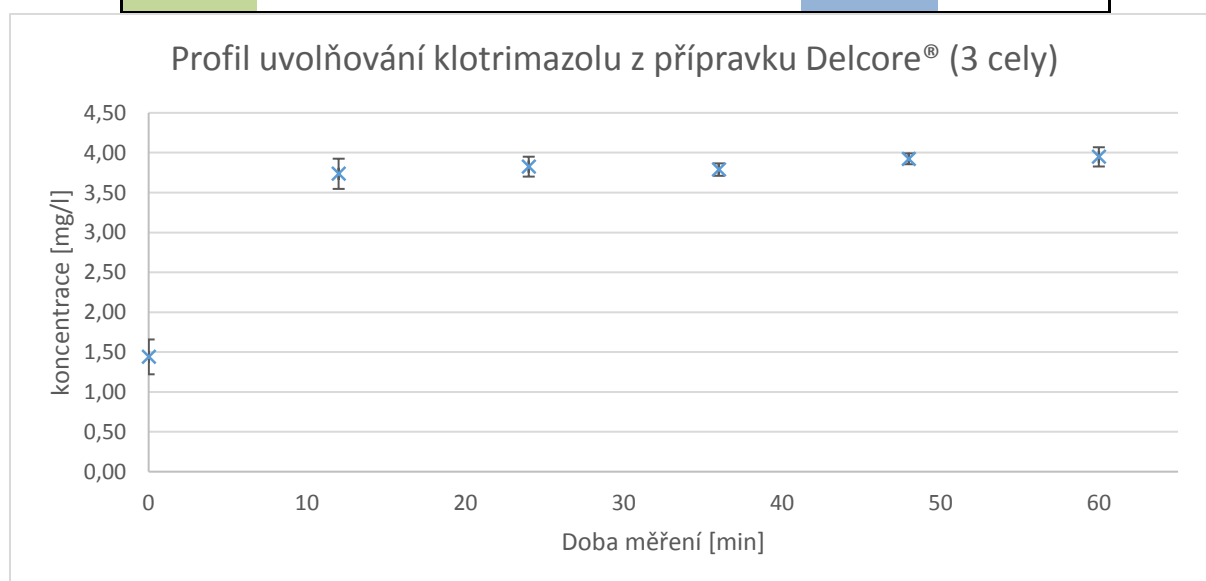


**Obr. č. 17:** Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Delcore<sup>®</sup>, dávkování po 4 minutách.

Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Delcore® vykazuje v porovnání s komerčně dostupnými přípravky velmi strmý nástup koncentrace API. Již při prvním měření po 4 minutách dosahuje koncentrace API maximálních hodnot a výrazně se po celou dobu liberace nemění. Bylo zde provedeno pouze jedno měření kvůli komplikacím daných formou tohoto přípravku (více viz diskuze).

**Tabulka č. 14:** Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Delcore®, dávkování po 12 min, 2 měření, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm

čas měření [min]	Koncentrace [mg/l]				průměr	Směrodatná odchylka
	měření 1		měření 2			
	cela 1	cela 2	cela 3	cela 1		
0	1,38	1,98	1,62	0,78	1,44	0,22
12	3,13	4,08	3,71	4,02	3,74	0,19
24	3,63	4,06	3,53	4,09	3,83	0,12
36	3,66	4,02	3,84	3,63	3,79	0,08
48	3,93	3,75	3,88	4,13	3,92	0,07
60	4,14	3,88	3,59	4,19	3,95	0,12



**Obr. č. 18:** Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Delcore®, ze 3 paralelních cel, dávkování po 12 minutách.

U přípravku Delcore<sup>®</sup> bylo cílem, stejně jako u komerčně dostupných přípravků obsahujících účinnou látku klotrimazol, změřit profil uvolňování klotrimazolu ze 3 paralelních cel při 2 měřeních. Stejně jako při měření uvolňování klotrimazolu z této formulace z jedné cely se toto ovšem ukázalo jako velmi komplikované, jak je níže popsáno v diskuzi. Nicméně z provedených měření se dá usoudit, že profil uvolňování API z přípravku Delcore při použití více paralelních cel odpovídá detailnímu profilu naměřeném při použití jedné cely. Nárůst koncentrace zde lze pozorovat již v čase 0, kdy dosáhne čelo nosného proudu poprvé detektor. Plató zde nastane při dalším měření, zde vzhledem k časování jednotlivých měření po 12 minutách.

## 6.6 Celkový souhrn

Profil uvolňování klotrimazolu se liší dle typu měřeného přípravku. U HPLC krémů vykazuje Clotrimazol AL<sup>®</sup> mírnější vzestup koncentrace než Canesten<sup>®</sup>. Profily obou přípravků jsou přesto srovnatelné.

Naproti tomu přípravek Delcore<sup>®</sup> vykazuje výrazně strmější nárůst koncentrace uvolněného klotrimazolu, kde již v prvním měření po 4 minutách dosahuje uvolněné množství klotrimazolu maximálních hodnot v rámci daného měření. Přesný profil uvolňování v těchto 4 minutách tedy nemůžeme pozorovat. Bohužel čas na jedno měření nelze již v rámci tohoto systému dále zkrátit bez ovlivnění výsledků. V rámci práce bylo experimentováno s vypuštěním některých kroků v programu měření, jako je například promytí systému po každém jednotlivém měření, či jeho výrazném zrychlení/zkrácení. Toto však ve všech případech vedlo k výraznému ovlivnění výsledků.

## 6.7 Diskuze

Experimentální část provázely 2 problémy

První z nich bylo použití PBS jakožto disperzního prostředí a také jakožto nosného proudu. Klotrimazol je lipofilní látka a jako taková se v tomto pufru při vyšších koncentracích poměrně snadno sráží. Zároveň je zde obava, aby byly zachovány tzv. „sink“ podmínky – objem disolučního média by měl být 5-10 násobně vyšší, než je objem rozpouštědla nutného pro rozpuštění daného množství látky za vzniku nasyceného roztoku. Fosfátový pufr sice simuluje hydrofilní lidské prostředí, zanedbává však komplexnost tělních tekutin (46).

Druhý problém je pronikání bublinek vzduchu do systému. Vzhledem k delší povaze tohoto stanovení představuje každá vzduchová bublinka problém, neboť pokud se dostane do

detektoru, je takové měření znehodnoceno. Tento problém nebyl tak zjevný při monitorování profilu uvolňovaného klotrimazolu z HVLP, při měření profilu přípravku Delcore® se však bublinky vzduchu vyskytovaly v systému častěji a bylo velmi obtížné danou analýzu úspěšně dokončit. Byl zde nutný stálý dozor u aparatury a manuální odstranění bublinek ze systému, což popírá původní požadavek na automatizovatelnost systému.

Další problém stanovení profilu z přípravku Delcore® bylo časté zanesení detektoru, kde bylo nutné ukončit předčasně analýzu a detektor promýt ethanolem. Toto zanesení mohlo být způsobeno například samotnou komplexní maticí přípravku Delcore® či její interakcí s jednotlivými složkami fosfátového pufru.

Aplikace tohoto přípravku v tekuté formě na membránu se též neobešla bez potíží. Po rozpuštění matrice v pufru vzniká roztok o nízké viskozitě. Je zde nutné, aby Franzova cela byla umístěna vodorovně a byla naprostém klidu, co se týče vibrací a pohybu, jinak zde hrozí, že kapalina s účinnou látkou v cele nepokryje membránu rovnoměrně, což může ovlivnit získaný disoluční profil. Vzhledem k tomu, že metoda má simulovat aplikaci léčivého přípravku na lidskou kůži, je těžké si představit, jak by tato formulace měla být lokálně aplikována, aniž by došlo k okamžitému odtoku tohoto roztoku z postiženého místa. Možná by zde bylo vhodnější použít jinou lékovou formu, například náplast s léčivem, či zpracovat matici do polotuhé léčivé formy nebo ponechat tekutou lékovou formu, ale výrazně u ní zvýšit viskozitu.

Z výše zmíněných důvodů je proto u stanovení disolučního profilu přípravku Delcore® v této práci uvedeno menší počet měření než u HVLP přípravků. Většina měření byla totiž poznamenána jedním nebo více těchto problémů.

## 7 Závěr

Pomocí SIA metody s UV detekcí byly monitorovány liberační testy topických přípravků Canesten<sup>®</sup> a Clotrimazol AL<sup>®</sup> obsahujících antimykotikum klotrimazol. U každého z těchto přípravků byl nejdříve naměřen detailní profil s měřením po 4 minutách z jedné cely a následně profil, měřený každých 12 minut ze 3 paralelních cel, pro stanovení opakovatelnosti liberace.

Tyto profily byly následně porovnány s profilem přípravku Delcore<sup>®</sup>. Zatímco běžně dostupné přípravky vykazují plató kolem 30 minut, účinná látka přípravku Delcore prostupuje membránou výrazně rychleji a již při prvním měření je většina účinné látky uvolněna do disolučního média.

U přípravku Delcore<sup>®</sup> se také ukázalo, že po rozpuštění komplexní matrice ve fosfátovém pufru vzniká nízkoviskózní roztok, který není vhodný pro tento systém. Dále se prostředí tohoto hydrofilního pufru ukázalo jako nepříliš vhodné pro lipofilní klotrimazol. Pro lepší monitorování disoluce by bylo nutné užít lipofilnějšího disolučního prostředí nebo výrazně zvětšit objem akceptorového kompartmentu.

## 8 Obrázky a tabulky

### 8.1 Seznam obrázků

<b>Obr. č. 1</b> vzorec klotrimazolu (16) .....	7
<b>Obr. č. 2</b> schéma CFA systému (21), přeloženo .....	13
<b>Obr. č. 3</b> Schéma SFA systému (21), přeloženo .....	13
<b>Obr. č. 4</b> Schéma FIA systému (21), přeloženo .....	14
<b>Obr. č. 5</b> Schéma SIA systému (21), přeloženo .....	15
<b>Obr. č. 6</b> Schéma SIC systému (21), přeloženo .....	15
<b>Obr. č. 7</b> SIA systém pro automatizaci odebrání vzorků a on-line stanovení klotrimazolu: (35) upraveno a přeloženo .....	17
<b>Obr. č. 8</b> Vzorec pro výpočet korigované koncentrace (41).....	21
<b>Obr. č. 9</b> Kalibrační křivka klotrimazolu.....	23
<b>Obr. č. 10</b> Naměřené absorpční spektrum tokoferolu.....	25
..... <b>Obr. č. 11</b> Absorpční spektrum tokoferolu (43) .....	25
<b>Obr. č. 12</b> Separace tokoferolu a klotrimazolu[tok2] .....	26
<b>Obr. č. 13</b> Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Canesten <sup>®</sup> , dávkování po 4 minutách. .....	29
<b>Obr. č. 14:</b> Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Canesten <sup>®</sup> , ze 3 paralelních cel, dávkování po 12 minutách. ....	30
<b>Obr. č. 15:</b> Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL <sup>®</sup> , dávkování po 4 minutách. ....	32
<b>Obr. č. 16:</b> Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL <sup>®</sup> , ze 3 paralelních cel, dávkování po 12 minutách. ....	33
<b>Obr. č. 17:</b> Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Delcore <sup>®</sup> , dávkování po 4 minutách. .....	34
<b>Obr. č. 18:</b> Profil uvolňování klotrimazolu z přípravku Delcore <sup>®</sup> , ze 3 paralelních cel, dávkování po 12 minutách. ....	35

## 8.2 Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1</b> Parametry detektoru .....	18
<b>Tabulka č. 2</b> Parametry membrány .....	18
<b>Tabulka č. 4</b> Statistické parametry kalibrační křivky .....	23
<b>Tabulka č. 5</b> Parametry LOD a LOQ .....	24
<b>Tabulka č. 7</b> Podmínky separace tokoferolu a klotrimazolu.....	24
<b>Tabulka č. 7:</b> Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Canesten <sup>®</sup> , dávkování po 4 min, 1. měření, navážka 0,0476g, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm.....	28
<b>Tabulka č. 8:</b> Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Canesten <sup>®</sup> , dávkování po 4 min, 2. měření, navážka 0,0400g, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm.....	29
<b>Tabulka č. 9:</b> Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Canesten <sup>®</sup> , dávkování po 12 min, 2 měření, v každém měřeny paralelně 3 cely. absorbance měřena při vlnové délce 210 nm.....	30
<b>Tabulka č. 10:</b> Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL <sup>®</sup> , dávkování po 4 min, 1. měření, navážka 0,0465g, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm .....	31
<b>Tabulka č. 11:</b> Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL <sup>®</sup> , dávkování po 4 min, 2. měření, navážka 0,0430g, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm .....	32
<b>Tabulka č. 12:</b> Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Clotrimazol AL <sup>®</sup> , dávkování po 12 min, 2 měření, v každém měřeny paralelně 3 cely, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm .....	33
<b>Tabulka č. 13:</b> Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Delcore <sup>®</sup> , dávkování po 4 min, 1 měření, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm .....	34
<b>Tabulka č. 14:</b> Monitorování uvolnění klotrimazolu z přípravku Delcore <sup>®</sup> , dávkování po 12 min, 2 měření, absorbance měřena při vlnové délce 210 nm .....	35

## 9 Seznam použité literatury

1. Kuklová. Mykózy kůže a nehtů. *Med. praxi.* 2006, stránky 129-131.
2. Suchopár J., Valentová Š. et. al. *Remedia compendium.* Praha : Panax, 2018. stránky 951-956.
3. *Český lékopis 2017.* Praha : Grada Publishing, 2017. 859-404-924-045-6.
4. Hendrychová, Malý. Volně prodejná antimykotika. *Solen.* 2011, stránky 132-137.
5. Nesse Bratton R. E., L. St. Antony's fire: Diagnosis and management of erysipelas. *Am Family Phys.* 1995, stránky 401-404.
6. Skořepová M. Klinické obrazy dermatomykóz. *Interní med.* 2003, stránky 11-14.
7. Skořepová M. Kožní mykózy a onychomykózy. *Interní Med.* 2005,6, stránky 306 - 310.
8. Rapini R. P., Bologna, J. L. a Jorizzo, Joseph L. *Dermatology: 2-Volume Set,* 2012. Chapter 76. St Louis : Mosby. str. 1145. 1-4160-2999-0.
9. *Slovník Cizích slov.* [Online] [Citace: 03. 05 2019.] <https://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/versicolor>.
10. Ditrichová D.M.D. Návrat k dehtovým externům. *Dermatol. praxi.,* 2014, 8, stránky 138, 139.
11. Wright MC, Hevert E, Rozman T. In vitro comparison of antifungal effects of a coal tar gel and a ketoconazole gel on *Malassezia furfur*. *Mycoses.* 1993, 36, stránky 207-210.
12. Koptavý P. Přehled volně prodejných přípravků a potravních doplňků používaných při léčbě mykotických onemocnění. *Dermatol praxi.* 2010, 4, stránky 109-111.
13. Databáze registrovaných léčivých přípravků SÚKL . [Online] [Citace: 03. 04 2019.] <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
14. Heehan D. J., Hitchcock C. A., & Sibley, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical microbiology reviews.* 2009, 12. stránky 40–79.
15. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology.* 2010, 28, stránky 197-201.



16. Chemický vzorec klotrimazolu. *Wikimedia*. [Online] [Citace: 08. 09 2019.] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/be/Clotrimazole.svg>.
17. Aria M, Bryson H. M.. Amorolfine. *Drugs*. 1995, 49(1), stránky 103-120.
18. Crawford F., Hollyns S.. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2007, July 18 (3).
19. Japanese Pharmacopoeia, Stránky 163-166. *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*. [Online] 13. 08 2019. <https://www.pmda.go.jp/files/000217650.pdf>.
20. Japanese Pharmacopoeia 17th Edition, Spectra Stránky 2275. *Pharmaceutical and Medical Devices Agency*. [Online] [Citace: 09. 09 2019.] <https://www.pmda.go.jp/files/000217651.pdf>.
21. Hansen E. H., Ruzicka J. Flow injection analyses: I. A new concept of fast continuous-flow analysis. *Analytica Chimica Acta*. 1975, 78, stránky 145–157.
22. Vakh Ch., Falkova M., Timofeeva I., Moskvina A., Moskvina L., Bulatov A.. Flow 3. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2016, 46(5), stránky 374-388.
23. Weihong X., Sandford R. C., Worsfold P. J., Carlton A., Hanrahan G. Flow Injection Techniques in Aquatic Environmental Analysis: Recent Applications and Technological Advances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2005, 35(3), stránky 237-246.
24. Continuous Segmented Flow Instruments. *Seal analytical*. [Online] [Citace: 07. 05 2019.] <https://seal-analytical.com/Default.aspx?tabid=119>.
25. Růžička J., Hansen E. H. Stopped flow and merging zones — a new approach to enzymatic assay by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. 1979, 106, stránky 207-225.
26. Itabashi H., Kawamoto H., Kawashima T. A Novel Flow Injection Technique: All Injection Analysis. *Analytical Sciences*. 2001, 17(1), stránky 229-231.
27. Zenki M., Minamisawa K., Yokoyama T. Clean analytical methodology for the determination of lead with Arsenazo III by cyclic flow-injection analysis. *Talanta*. 2005, 68, stránky 281- 286.
28. Gubeli T., Christian G., Ruzicka J. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. *Anal. Chem.* 1991, 63, str. 2407.
29. Burakham R., Lapanantnoppakhun S., Jakmunee J., Grudpan K.. Exploiting sequential injection analysis with lab-at-valve (LAV) approach for on-line liquid–liquid micro-extraction spectrophotometry. *Talanta*. 2005, 68(2) stránky 416-421.

30. Scampavia L.D., Ruzicka J. Micro-sequential injection: a multipurpose lab-on-valve for advancement of bioanalytical assays. *Anal. Sci.* 2001, 17, stránky 429-431.
31. Sequential Injection Chromatography. *FIAlab*. [Online] [Citace: 07. 05 2019.] [https://www.flowinjection.com/images/Sequential\\_Injection\\_Chromatography.pdf](https://www.flowinjection.com/images/Sequential_Injection_Chromatography.pdf).
32. Chocholouš P., Solich P., Šatínský D. An overview of sequential injection chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2007, 600(1-2), stránky 129-135.
33. Scampavia L. D., J. Ruzicka. Micro-sequential injection: a multipurpose lab-on-valve for advancement of bioanalytical assays. *Anal. Sci.* 2001, 17, stránky 429-431.
34. Wattanasin P., Saetear P., Wilairat P., Nacapricha D., Teerasong S. Zone fluidics for measurement of octanol–water partition coefficient of drugs. *Analytica Chimica Acta*. 2015, 860, stránky 1-7.
35. Mesquita R.B.R, Fernandes,S.M.V. Rangel A.O.S.S. A flow system for the spectrophotometric determination of lead in different types of waters using ion-exchange for preconcentration and elimination of interferences. *Talanta*. 2004, 62, stránky 395-401.
36. Klimundova J., Satinsky D., Sklenarova H. Solich P. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. *Talanta*. 2006, 69(3) stránky 730-735.
37. Freitas R. A. Jr. 8.4 Functional Navigation. 8.4.1.1 Thermography of the Human Body. *Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities*, Landes Bioscience, Georgetown, TX, 1999, str. 320.
38. Isopore Membrane Filter. *Merckmillipore*. [Online] [Citace: 02. 01 2019.] [http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Isopore-Membrane-Filter,MM\\_NF-HTTP03700?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F](http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Isopore-Membrane-Filter,MM_NF-HTTP03700?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F).
39. Canesten. *SÚKL*. [Online] 2019. 01 04. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0013798> .
40. Clotrimazol AL. *SÚKL*. [Online] [Citace: 04. 01 2019.] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0065484>.
41. Kontaktní formulář. *Contipro*. [Online] 04. 01 2019. <https://www.contipro.cz/kontakt>.

42. Zelená L., Marques S. S., Segundo M. A., Miró M., Pávek P., Sklenářová H., Solich P.. Fully automatic flow-based device for monitoring of drug permeation across a cell monolayer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408(3), stránky 971-981.
43. COMPOUND SUMMARY. *PubChem*. [Online]  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clotrimazole#section=Chemical-and-Physical-Properties>.
44. Faramawy, Samaa & A Rizk, Rizk. Spectrophotometric Studies on Antioxidants-Doped Liposomes. *J Am Sci*. 2011, 7. stránky 363-370.
45. Usman S. A., Zulfiqar M., Shah J., Ramesh V., Sudhir S.. Modification and Validation of HPLC Analytical Method for Estimation of Clotrimazole in Health Care Products. 2017, 05(01), stránky 1-7.
46. Shear Rate & Sink Conditions. *Quality Lab Accesories*. [Online] [Citace: 05. 09 2019.]  
<https://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/shear-rate-sink-conditions.html>.