

Obsah

1. Úvod	7
1.1. Úvod a cíl práce	8
2. Teoretická část	9
2.1. Clotrimazol	10
2.1.1. Farmakologické charakteristiky	10
2.1.2. Chemické a fyzikálně-chemické charakteristiky.....	10
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	11
2.2.1. Princip metody	12
2.2.2. Kapalinový chromatograf.....	12
2.2.2.1. Kolony pro HPLC.....	15
2.2.3. Využití ve farmaceutické analýze	16
2.3. Validace a validační parametry	17
2.3.1. Problematika validací	17
2.3.2. Testování vhodnosti chromatografického systému	18
2.3.2.1. Účinnost kolony.....	18
2.3.2.2. Asymetrie chromatografických píků	19
2.3.2.3. Rozlišení chromatografických píků	19
2.3.2.4. Opakovatelnost analýzy.....	20
2.3.3. Validační parametry	20
2.3.3.1. Přesnost.....	20
2.3.3.2. Správnost	20
2.3.3.3. Rozsah.....	21
2.3.3.4. Linearita	21
2.3.3.5. Selektivita	21
2.3.3.6. Robustnost	22
2.3.3.7. Detekční a kvantifikační limit	22
2.4. Metody hodnocení clotrimazolu	22
2.4.1. Lékopisné metody hodnocení clotrimazolu	23
2.4.2. HPLC metody uváděné v literatuře	24
2.4.3. Ostatní metody	26
2.4.4. Zhodnocení rešerše.....	28
3. Experimentální část	29
3.1. Přístrové vybavení	30
3.2. Chemikálie	30
3.2.1. Příprava zásobních a pracovních roztoků.....	30
3.3. Příprava vzorku	34
3.4. Vývoj metody - optimalizace chromatografických podmínek	34
3.4.1. Vlnová délka detektoru	34
3.4.2. Složení mobilní fáze.....	35
3.4.3. Hledání vhodné kolony	37
3.4.4. Hledání vnitřního standardu	38
3.4.5. PH mobilní fáze.....	39
3.4.6. Souhrn nalezených optimálních chromatografických podmínek	40
3.5. Stanovení obsahu účinné látky	40
3.6. Stanovení obsahu nečistot	41
3.6.1. Celkový obsah nečistot.....	41
4. Výsledky a diskuze	43
4.1. Validace metody	44

4.1.1. Testování vhodnosti chromatografického systému	44
4.1.1.1. Účinnost kolony	44
4.1.1.2. Asymetrie chromatografických píků	44
4.1.1.3. Rozlišení chromatografických píků	45
4.1.1.4. Opakovatelnost analýzy	46
4.1.2. Testování validačních parametrů	48
4.1.2.1. Přesnost	48
4.1.2.2. Správnost	50
4.1.2.3. Linearita	52
4.1.2.4. Selektivita	54
4.1.2.5. Robustnost	56
4.1.2.5.1. Vliv složení mobilní fáze	57
4.1.2.5.2. Stabilita roztoků	60
4.1.2.6. Detekční limit (LOD) a kvantifikační limit (LOQ)	61
5. Závěr	63
6. Literatura	66

SEZNAM ZKRATEK

CE – kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)

CL - clotrimazol

CV – variační koeficient (coefficient of variation)

CZE - kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)

DDQ – 2,3-dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

ICH – International Conference on Harmonization

IR – spektrofotometrie v infračervené oblasti

IS – vnitřní standard (internal standard)

lin - linearita

LOD – detekční limit (Limit of Detection)

LOQ – kvantifikační limit (Limit of Quantification)

MF – mometason fluorát

NMR – nukleární magnetická rezonance

rec – výtěžnost (recovery)

RP – reverzní fáze (reversed phase)

RSD – relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)

SD – směrodatná odchylka (standard deviation)

SFC – superkritická fluidní chromatografie

SST – testování vhodnosti chromatografického systému (System Suitability Testing)

TLC – tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)

USP – United States Pharmacopoeia

UV/VIS – spektrofotometrie v ultrafialové/viditelné oblasti

1. Úvod

1.1. Úvod a cíl práce

Jeden ze základních cílů farmacie je zajistit pacientovi v požadovaném čase a množství kvalitní, účinný a bezpečný léčivý přípravek. Hodnocení kvality, účinnosti a bezpečnosti je většinou založeno na různých analytických metodách.

Velmi často používanou analytickou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid chromatography, HPLC). Léčivé přípravky jsou tvořeny různě složitými směsmi chemických látek, proto pro jejich hodnocení je velmi výhodné využití především HPLC, umožňující separaci jednotlivých složek směsi se současnou identifikací a kvantifikací.

Cílem této práce je vyvinout a zvalidovat HPLC metodu pro stanovení obsahu clotrimazolu a příslušných nečistot (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a imidazolu v přípravku **CLOTRIMAZOL spray 1 %**. Metoda bude využívána při výstupní kontrole, při hodnocení homogenity jednotlivých šarží a hodnocení stability tohoto léčivého přípravku.

2. Teoretická část

2.1. Clotrimazol

2.1.1. Farmakologické charakteristiky

Clotrimazol je lokální azolové antimykotikum. Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy ergosterolu vazbou na cytochrom P450 a ovlivňuje tak permeabilitu buněčné stěny citlivých mikroorganismů [1]. Působí fungistaticky až fungicidně na kvasinky (*Pityrosporum* spp.), dermatofyty, *Aspergillus* spp. a dimorfní houby, některé gram pozitivní mikroorganismy (streptokoky, stafylokoky, nokardie, *Propionibacterium acnes*) a gram negativní (*Bacteroides* spp., *Gardenela vaginalis*).

Clotrimazol se používá na dermatomykózy (kožní kandidózy, tinea corporis, tinea penis, pityriasis versicolor), seborrhoickou dermatitidu, acné vulgaris, acné rosacea, periorální dermatitidu, mykotické infekce zevních genitálií, erytrasma, jako doplněk perorální terapie onychomykóz a terapie vulvovaginálních mykóz. Podává se lokálně (krémy, vaginální tablety, globule, roztoky a spreje) vzhledem k nízké percutánní absorpci a transformaci v játrech resorbovaného množství na neúčinné hydroxyderiváty. [2]

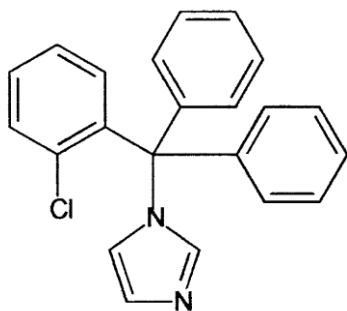
Clotrimazol tvoří v rohové vrstvě depot s koncentrací, která mnohonásobně převyšuje antifungální a antibakteriální minimální inhibiční koncentraci v přítomnosti bílkoviny. V dostatečně účinné dávce proniká do nejnížší vrstvy epidermis. [1]

Mezi vedlejší účinky patří ojediněle pálení, svědění, zarudnutí v místě aplikace, vzácně alergické kožní reakce. [2]

2.1.2. Chemické a fyzikálně-chemické charakteristiky

Clotrimazol je 1-[(2-chlorfenyl)difenylmethyl]-1H-imidazol. Je to bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek.

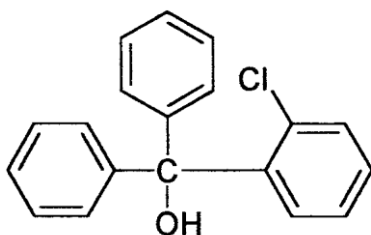
Obr. 1: Chemická struktura clotrimazolu



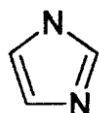
Nečistoty

Český lékopis uvádí celkem 2 nečistoty (2-chlorfenyl)difenylmethanol a imidazol.

Obr. 2: Chemická struktura (2-chlorfenyl)difenylmethanolu



Obr. 3: Chemická struktura imidazolu



Fyzikálně-chemické vlastnosti

Clotrimazol je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96 % a v dichlormethanu, těžce rozpustný v etheru. [3]

2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je analytická separační metoda. Slouží k rozdělení analyzovaných složek směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze. Veškeré technické produkty a většina přírodních látek jsou složité směsi. Proto mají

chromatografické metody analýzy prvořadý význam, protože je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech. [4]

2.2.1. Princip metody

Základním mechanismem chromatografického dělení je mnohonásobné ustalování dynamické rovnováhy součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi, to znamená mezi vratnou sorbcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Stacionární (nepohyblivá) fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi, mobilní (pohyblivá) pak eluuje jednotlivé součásti směsi ze stacionární fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení.

U HPLC je stacionární fáze ve formě malých stejnoměrných částic (řádově v μm) umístěných v koloně. Čím menší a stejnoměrnější jsou jednotlivé částice, tím větší je účinná plocha a separační účinnost. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je však zapotřebí ji protlačit kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem. [4]

2.2.2. Kapalinový chromatograf

Při HPLC analýze je mobilní fáze čerpána **vysokotlakým čerpadlem**, které musí umožňovat konstantní bezpulzní tok mobilní fáze o malé rychlosti (0,1-10 ml/min) za vysokého tlaku až 40 Mpa [4]. Součástí čerpadla je programovací jednotka, pomocí které se nastavuje požadované složení mobilní fáze. [5]

Při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší se používá izokratická eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění. U některých směsí látek, jejichž eluční parametry se významně liší, s výhodou se k jejich dělení využívá gradientové eluce, při které se k jedné mobilní fázi přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient mobilní fáze. Obdobně lze pro eluci využít gradient pH. [4]

Dávkovací zařízení umožňuje nadávkovat roztok vzorku na kolonu [5]. To je prováděno buď speciální injekční mikrostříkačkou nebo dávkovacím kohoutem. Jehlou stříkačky se probodne septum ze speciální pryže a lze dávkovat různé objemy, kohoutem lze dávkovat pevně daný objem roztoku avšak mnohem přesněji. [4]

Detektor indikuje průtok separované složky detekční celou a přenáší vhodně upravený signál do **počítače**, který ho zpracuje, umožní výstup na **tiskárnu** a mimoto řídí chod celého chromatografu. [5]

Na detektory HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- vysoká citlivost – detekce látek v roztoku v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$
- reprodukovatelnost a linearita odezvy
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- univerzálnost – detekce všech oddělených složek vzorku

Tab. 1: Přehled nejpoužívanějších detektorů

Detektor	Selektivita	Citlivost (g/ml)	Gradientová eluce možná
infračervený	selektivní	10^{-6}	ano
refraktometrický	neselektivní	$5 \cdot 10^{-7}$	ne
konduktometrický	selektivní	10^{-8}	ne
ultrafialový	selektivní	$5 \cdot 10^{-10}$	ano
fluorimetrický	selektivní	10^{-10}	ano
amperometrický	selektivní	10^{-10}	-
hmotnostní spektrometrie	selektivní	10^{-10}	-

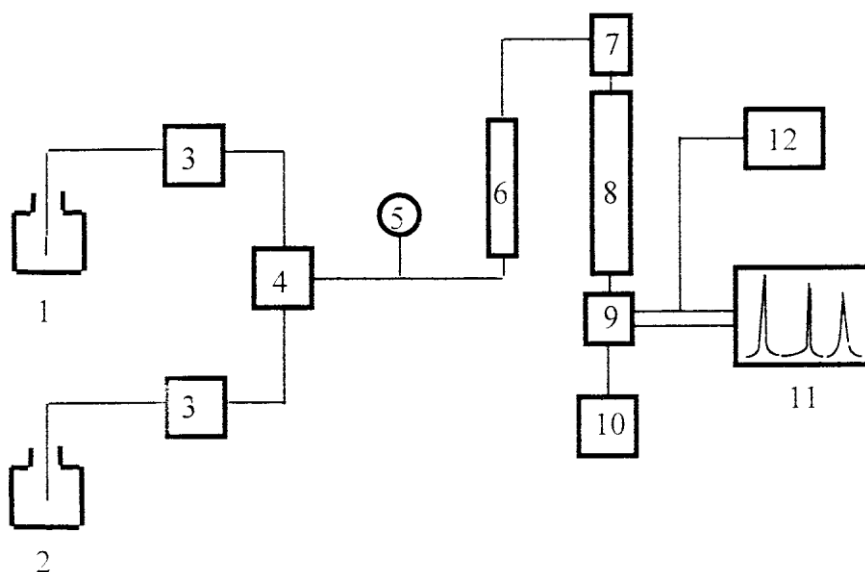
Refraktometrický detektor registruje změny indexu lomu eluátu. Je sice univerzální, ale málo citlivý a vyžaduje oproti ostatním pečlivé termostatování. [4]

Vysoce citlivé a selektivní jsou **elektrochemické detektory**, které zaznamenávají děje související s elektrochemickou reakcí probíhající na rozhraní elektroda-eluent. Proměřují elektrochemickou veličinu, jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Schopnosti léčiv se redukovat a oxidovat využívá voltmetrický, amperometrický a polarografický detektor. Citlivost se pohybuje $10^{-9} - 10^{-12}$ g/ml.

Nejvíce používané jsou detektory **spektrofotometrické** registrující absorpční eluátu protékající celou detektorem. V praxi se nejvíce uplatňují UV detektory, eventuelně UV-VIS detektory.

- UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina látek)
- UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou
- scanning UV detektor (snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnocených látek)
- diode array detektor (řízený počítačem, trojrozměrná projekce, snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách, porovnává poměry absorpční) [5]

Na *Obr. 4* jsou znázorněny jednotlivé části kapalinového chromatografu.



Obr. 4: Schéma kapalinového chromatografu

1,2 – zásobníky mobilní fáze; 3 – vysokotlaká čerpadla; 4 směšovač;
 5 – manometr; 6 – dávkovací zařízení; 7 - předkolona; 8 – kolona;
 9 – detektor; 10 – sběrač frakcí, 11 - tiskárna; 12 – počítač [4]

2.2.2.1. Kolony pro HPLC

Na chromatografické koloně dochází k rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny mobilní fází do detektoru. [5]

Kolony jsou ocelové nebo skleněné trubice 5-30 cm dlouhé o vnitřním průměru 2-8 mm naplněné stacionární fází. Spoje mezi kolonou, dávkovacím zařízením jsou kapilární (vnitřní průměr 0,5 mm), nejčastěji z nerez oceli.

Náplň kolony hraje důležitou roli pro účinné dělení látek, a to kvalita sorbentu, jeho velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, porozita a struktura. Náplň musí být naprosto homogenní a rovnoměrná. Používají se nemodifikované částice nebo chemicky modifikované mikročástice silikagelu (velikosti 3,5 nebo 10 μm), kdy na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrněk jsou vhodnou chemickou reakcí (silylací) navázány různé radikály. Dále se využívají částice oxidu hlinitého [4], titaničitého, zirkoničitého a částice na bázi styren-divinylbenzenových kopolymerů. [6]

- uhlovodíkové řetězce obsahující zpravidla 18 uhlíkových atomů. Jde o nepolární chemicky vázané fáze.

- radikál obsahující tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami $-NH_2$, $-CN$ aj. Jde o středně polární fáze. [5]
- pro dělení látek iontového charakteru rozpustných ve vodě jsou určeny stacionární fáze ve formě iontoměničů.
- chirální stacionární fáze umožňují separaci a stanovení optických izomerů. [4]
- stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého mají vynikající stabilitu při pH až do 14 a vysokou tlakovou i tepelnou odolnost. Lze je využít i pro rychlé separace při vysokých teplotách (i nad $100^\circ C$)
- Stacionární fáze na bázi styren-divinylbenzenových kopolymerů mají vynikající mechanickou, teplotní i chemickou stabilitu. Mají však nižší účinnost (cca 1/3 teoretických pater) než kolony na bázi silikagelu. [6]

Přednosti HPLC jsou:

- Jedná se o separační metodu, která umožňuje kvalitativní a kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi.
- Výhodná je rychlost analýzy a citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru).
- Pro analýzu stačí minimální množství vzorku.
- Možnost automatizace (autosamplery).
- Na rozdíl od plynové chromatografie má ve farmacii širší možnosti využití, protože většina léčiv není těkavá. [5]

2.2.3. Využití ve farmaceutické analýze

V současné době je HPLC jednou z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích.

Oblasti využití HPLC v analýze:

- kontrolně analytická problematika směrem k identifikaci léčiv, stanovení obsahu a čistoty (je to možné provést v jediném kroku)
- hodnocení stability léčiv, HPLC tak umožňuje sledovat průběh rozkladného procesu a současně kvalitativně i kvantitativně hodnotit vznikající rozkladné produkty

- analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu
- terapeutické monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách [5]

2.3. Validace a validační parametry

2.3.1. Problematika validací

Validace je definována jako potvrzení následným poskytnutím objektivního důkazu o splnění požadavků pro specifikované zamýšlené použití [7]. Jinými slovy je to proces ujištění, že analytická metoda je vhodná pro zamýšlený účel [8] - právná, specifická, reprodukovatelná a stálá v daném rozsahu, který pokrývá oblast očekávaných koncentrací analytu. [9]

Metodika validací je zpracována dvěma významnými autoritami a to ICH (International Conference on Harmonization) [10] a USP 28 (United States Pharmacopoeia) [8], které se snaží o terminologickou a metodologickou koordinaci.

- **ICH** uvádí v článku „Text on Validation of Analytical Procedures“ [10] tabulku specifických charakteristik užívaných při validaci analytických metod.

Tab. 2: Typické validační charakteristiky dle ICH

Správnost
Přesnost
Specifita
Detekční limit
Kvantifikační limit
Linearita
Rozsah

ICH dále upozorňuje na robustnost, která není uvedena v Tab. 2. Avšak měla být zařazena ve vhodné fázi vývoje analytické metody. V článku „Validation of Analytical Procedures: Methodology“ [10] popisuje ICH jednotlivé charakteristiky uvedené v Tab. 2. Dále však

uvádí popis dalších dvou charakteristik jako robustnost a testování vhodnosti systému. V článku „Text on Validation of Analytical Procedures“ [10] se ICH nezmiňuje o testování vhodnosti systému. Takže není zcela jasné, zda jsou tyto charakteristiky robustnost a testování vhodnosti systému součástí validace nebo zda jde o samostatné kroky.

- **USP 28** [8] obsahuje stejnou tabulku typických charakteristik jako ICH. Podobně jako ICH uvádí popis položek v tabulce a kromě toho uvádí popis dalších charakteristik jako odolnost (Ruggedness), robustnost a test vhodnosti systému. Stejně jako u ICH není zcela jasné, jestli jsou zmiňované charakteristiky neuvedené v tabulce součástí validace nebo jde o samostatné kroky.

V této práci je validace pojata jako soubor procedur zahrnujících testování vhodnosti chromatografického systému a testování vybraných validačních charakteristik včetně robustnosti.

2.3.2. Testování vhodnosti chromatografického systému

Testování vhodnosti chromatografického systému (System Suitability Testing, SST) je operace tvořící neoddělitelnou součást analytických procedur. Je založeno na konceptu, že vybavení, elektronika, analytické operace a analyzované vzorky tvoří jednotný systém, který by měl být hodnocen jako celek.

Základní parametry sledované během SST jsou rozlišení, účinnost kolony, opakovatelnost a symetrie píku [8]. Někdy jsou sledovány další parametry (kapacitní faktor, poměr signálu k šumu). [11]

SST by mělo předcházet analytické proceduře a mělo by být prováděno i během analýzy. Ověření se provádí pomocí „vzorku“ pro SST (směs standardů). V případě, že analýza byla provedena v době, kdy systém nespĺňoval požadavky SST, nejsou výsledky analýzy akceptovatelné. [8]

2.3.2.1. Účinnost kolony

Vyjadřuje se jako počet teoretických pater kolony N . Měří se ostrost píku, která je důležitá pro detekci stopových množství látek.

Výpočet se provádí podle vzorce:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2$$

t_R = retenční čas (min)

W = šířka píku v polovině výšky (min)

2.3.2.2. Asymetrie chromatografických píků

Faktor asymetrie (tailing factor, T) vyjadřuje míru symetrie píku. S rostoucí asymetrií se snižuje věrohodnost integrace, a tudíž i přesnost.

Výpočet se provádí podle vzorce:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

$W_{0,05}$ = šířka píku v 5% jeho výšky (min)

f = menší část úsečky $W_{0,05}$, která vznikne protnutím úsečky kolmicí spuštěnou z vrcholu píku (min)

2.3.2.3. Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení chromatografických píků (resolution, R) je funkcí účinnosti kolony. Slouží k ujištění, že blízko sebe eluované sloučeniny jsou navzájem oddělené. [8]

Pro výpočet se používá vzorec:

$$R_{ij} = \frac{2|t_{Ri} - t_{Rj}|}{(W_i + W_j)}$$

t_R = retenční čas složek (min)

W = šířka píku na základně

2.3.2.4. Opakovatelnost analýzy

Opakovatelnost analýzy vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu [7]. Vyjadřuje se jako směrodatná odchylka s_R získaná z výsledků šesti měření. [8]

2.3.3. Validací parametry

2.3.3.1. Přesnost

Přesnost je definována jako těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušky získanými za předem dohodnutých podmínek. [7]

Přesnost by měla být testována za použití homogenního, autentického vzorku. V případě, že takový vzorek není k dispozici, je možné testovat přesnost i pomocí roztoku standardů. Přesnost může být vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka. [8, 10]

Mezinárodní autority definují tři úrovně přesnosti:

Opakovatelnost (repeatability) vyjadřuje přesnost za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu.

„Intralaboratorní“ přesnost (intermediate precision) vyjadřuje variace v rámci laboratoře jako odlišné dny, odlišné vybavení nebo jiný pracovník.

Reprodukovatelnost (reproducibility) charakterizuje mezilaboratorní přesnost pomocí mezilaboratorních studií. Reprodukovatelnost je vyžadována při standardizaci analytické procedury, např. při začleňování do lékopisu. [10]

2.3.3.2. Správnost

Správnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi nalezenou hodnotou a hodnotou, která je akceptována jako dohodnutá pravdivá hodnota, případně akceptovanou porovnávací hodnotou.

U léčivých přípravků je možno správnost vyhodnotit pomocí vzorků, ke kterým bylo přidáno známé množství analytu nebo porovnáním výsledků

s výsledky dosaženými jinou nezávislou, dobře charakterizovanou metodou, u níž už byla správnost ověřena.

Testování správnosti se doporučuje provádět trojnásobným nástřikem tří úrovní koncentrací pokrývajících oblast očekávané koncentrace analytu.

Správnost je možno vyjádřit jako procento výtěžku nebo jako rozdíl mezi získanými výsledky a akceptovanou pravdivou hodnotou. [10]

2.3.3.3. Rozsah

Rozsah analytické metody je interval mezi horní a dolní koncentrací analytu ve vzorku, ve kterém jsou získány akceptovatelné výsledky přesnosti, správnosti a linearity.

Pro léčivé přípravky je doporučováno testovat rozsah v rozmezí 80 - 120 % koncentrace analytu [10]. Bývá i 75 - 125 %, záleží na zdroji informací.

2.3.3.4. Linearita

Definuje schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné koncentraci (obsahu) analytu. [7]

Testování linearity by mělo probíhat v oblasti koncentrací pokrývajících rozsah pomocí kalibračních roztoků. Je doporučováno použít minimálně pět koncentrací doporučené rozmezí je 80 – 120 % koncentrace analytu. [10]

Výsledky mohou být vyjádřeny pomocí korelačního koeficientu proložené křivky, průsečíku s osou y a směrnici kalibrační křivky.

2.3.3.5. Selektivita

Selektivita (nazývaná též specifita) je schopnost jednoznačně stanovit analyt v přítomnosti komponent, jejichž přítomnost lze očekávat. [10]

Selektivita může být prokázána separací chemicky příbuzných látek nebo je možno selektivitu prokázat porovnáním výsledku analýzy bez analytu, která má poskytnout negativní výsledek, s výsledkem analýzy s obsahem analytu, která dává pozitivní výsledek. [8]

2.3.3.6. Robustnost

Robustnost analytického postupu je mírou jeho schopnosti chovat se netečně vůči malým, ale promyšleným změnám parametrů metody. Udává jeho spolehlivost při běžném používání. [7]

Typickými variacemi jsou např. stabilita roztoků, vliv na pH mobilní fáze, vliv složení mobilní fáze, odlišné kolony, odlišná teplota nebo průtok. [10]

2.3.3.7. Detekční a kvantifikační limit

Tyto charakteristiky se určují hlavně u látek, které lze očekávat ve velmi malých množstvích (nečistoty, degradační produkty). [10]

Detekční limit je definován jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, nikoliv však nezbytně stanoveno jako exaktní hodnota.

Kvantifikační limit je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být stanovena s přijatelnou přesností (opakovatelností) a správností za uvedených podmínek zkoušky. [7]

Existují různé přístupy ke stanovení těchto charakteristik založené nejčastěji na výpočtu z poměru signálu k šumu (S/N ratio, limit detekce je nejčastěji počítán jako trojnásobek této hodnoty, limit kvantifikace jako desetinásobek hodnoty S/N).

Dále je možné počítat limity ze standardní odchylky signálu a směrnice kalibrační křivky (limit detekce je trojnásobkem poměru standardní odchylky signálu a směrnice, limit kvantifikace pak desetinásobkem tohoto poměru). [10]

2.4. Metody hodnocení clotrimazolu

Byla vypracována rešerše analytických metod hodnocení clotrimazolu. *Tab. 3* uvádí lékopisné metody stanovení clotrimazolu, *Tab. 4* HPLC metody a *Tab. 5* ostatní analytické metody.

2.4.1. Lékopisné metody hodnocení clotrimazolu

Lékopisné přístupy k hodnocení čistoty clotrimazolu uvádí *Tab. 3*. Stanovení čistoty je ve všech třech monografiích je prováděno pomocí TLC.

Tab. 3: Výsledky rešerše na HPLC hodnocení clotrimazolu - lékopisné zdroje

Zdroj	British Pharmacopoeia 2004	USP 28 2005
Mobilní fáze	kyselina fosforečná : methanol 30:70, pH upraveno na hodnotu 7,5 10% (v/v) roztokem triethylaminu v methanolu	methanol : bazický fosforečnan draselný 70:30, pH 6,0
Stacionární fáze	C 18, 5 µm	předkolona L7 (C 8), 10 µm kolona L1 (C 18), 10 µm
Kolona	200 x 4,6 mm	2,1 x 60 mm 3,9 x 300 mm
Průtok Fm (ml/min)	1,5	1,0
Detekce λ (nm)	215	254
Hodnocené látky	clotrimazol 2-chlorotritanol	clotrimazol clotrimazolu příbuzné složení A
Vnitřní standard	není použit	testosteron propionát
Citace	[12]	[8]

2.4.2. HPLC metody uváděné v literatuře

Tab. 4 uvádí výsledky rešerše článků týkajících se hodnocení clotrimazolu HPLC metodami v různých materiálech (včetně biologického materiálu).

Tab. 4: Příklady HPLC metod pro hodnocení clotrimazolu (výsledky literární rešerše)

Hodnocené látky	Materiál	Způsob detekce	Validační data	Citace
clotrimazol, ekonazol	plazma	UV 254 nm	lin = 0,2 – 25 µg/ml rec = 93,4 - 100,6 % opakovatelnost: RSD = 0,202 - 0,927 % intermediální přesnost: RSD = 0,211 - 0,977 % správnost: 1 µg/ml: rec = 99,1 % 10 µg/ml: rec = 99,0 %	[13]
clotrimazol	čistá látka krém vaginální tablety roztok	UV 260 nm	lin = 20 – 750 µg/ml CV = 0,40 % rec = 99,83 % CV = 0,38 % rec = 101,15 % CV = 0,32 % rec = 99,35 % CV = 0,46 % rec = 100,29 %	[14]
clotrimazol, mometason fluorát	léčivé přípravky	UV 237 nm (CL) UV 247 nm (MF)	LOQ = 0,05 % rec = 97,6 – 101 % opakovatelnost: RSD = 0,07 - 0,58 %	[15]

<p>clotrimazol, imidazol, chlorotritanol methanol betamethason dipropionát, betamethason, betamethason-21- propionát</p>	<p>lékové dávkovací formy</p>	<p>UV 254 nm</p>	<p>lin = 0,4 - 2,0 mg/ml (CL) opakovatelnost: RSD = 1,1 % (CL) intermediální přesnost: 98,3%: RSD = 0,7 % (CL) LOD = 0,5 µg/ml (CL)</p>	<p>[16]</p>
<p>clotrimazol, dexamethason</p>	<p>krém</p>	<p>UV 230 nm</p>	<p>lin = 0,021 - 0,105 mg/ml (CL) rec = 98,80 - 101,3 % opakovatelnost: RSD = 0,40 - 0,60 % reprodukovatelnost: RSD = 1,05 - 1,80%</p>	<p>[17]</p>

2.4.3. Ostatní metody

Tab. 5: Jsou uvedeny metody, jimiž je možné také hodnotit clotrimazol.

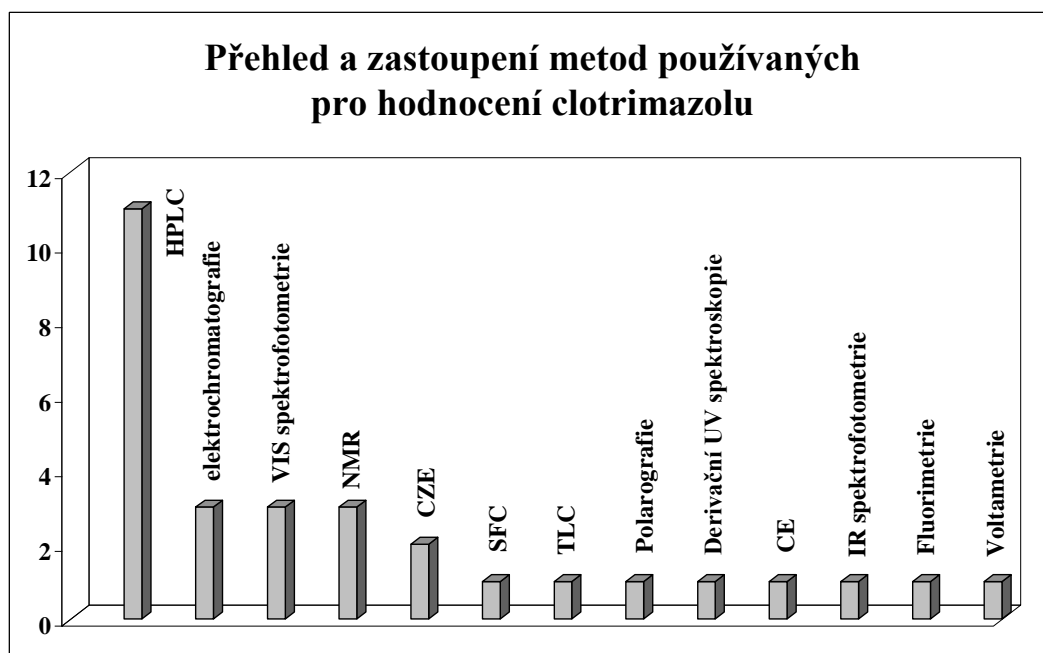
Tab. 5: Přehled využití dalších analytických metod při hodnocení clotrimazolu

Metoda	CE	CZE	VIS spektrofotometrie	TLC - denzitometrie
Hodnocené látky	clotrimazol	clotrimazol, ketokonazol, flukonazol, itraconazol, vorikonazol, terbinafin	clotrimazol, mikonazol, ekonazol nitrát	clotrimazol
Materiál	plazma	léčivé přípravky	vaginální tablety, pudr, krém, topický roztok	vaginální tablety, krém, roztok
Způsob detekce	UV 196 nm	UV 210 nm	VIS 460 nm	UV 260 nm
Validační data	lin = 0,5 - 10 µg/ml opakovatelnost: 0,5 µg/ml: RSD = 0,4 % 10 µg/ml: RSD = 0,6 % intermediální přesnost: 0,5 µg/ml: RSD = 5,0 % 10 µg/ml: RSD = 2,6 % LOD = 0,3 µg/ml LOQ = 0,5 µg/ml	lin = 0,5 - 15 µg/ml opakovatelnost: RSD = 1,4 - 3,4 % reprodukovatelnost: RSD = 1,4 - 4,3 % s kyselinou mravenčí LOD = 0,22 µg/ml, LOQ = 0,72 µg/ml s fosforečnanovým pufrům LOD = 0,12 µg/ml, LOQ = 0,40 µg/ml	pro clotrimazol (s DDQ): lin = 292 - 1800 µg/ml rec = 96,30 %, SD = 0,52 % rec = 97,21 %, SD = 0,67 % rec = 97,06 %, SD = 0,64 % rec = 101,28 %, SD = 0,30 %	lin = 5 - 25 µg/skvrnu rec = 100,33 % rec = 100,89 % rec = 100,94 % CV = 0,45 % CV = 0,31 % CV = 0,62 %
Čítace	[18]	[19]	[20]	[14]

Kompletní přehled používaných analytických metod pro hodnocení clotrimazolu (včetně HPLC) uvádí *Tab. 6* a graf. Přehled obsahuje práce publikované v odborných časopisech v období od roku 1972 do března 2006. Byl vypracován na základě rešerše v databázi Sciencedirect.

Tab. 6: Přehled a zastoupení metod používaných pro hodnocení clotrimazolu

HPLC	11
Elektrochromatografie	3
VIS spektrofotometrie	3
NMR	3
CZE	2
Superkritická fluidní chromatografie	1
TLC	1
Polarografie	1
Derivační UV spektroskopie	1
CE	1
IR spektrofotometrie	1
fluorimetrie	1
voltametrie	1



2.4.4. Zhodnocení rešerše

Z údajů z *Tab. 6* vyplývá, že nejpoužívanějšími metodami pro hodnocení clotrimazolu jsou separační metody, z nichž nejpoužívanější je HPLC. Z toho vyplývá, že většina vzorků, v nichž je clotrimazol, jsou složité směsi.

V případě HPLC jsou nejvíce využívanými stacionárními fázemi reverzní fáze. Co se týče mobilní fáze, používají se různé směsi vody, polárních organických rozpouštědel (methanol, acetonitril) a pufrů neutrální nebo slabě zásadité oblasti.

Nejčastější způsob detekce je pomocí UV spektrofotometrie. Nejčastěji používaná vlnová délka při hodnocení clotrimazolu je 254 nm.

3. Experimentální část

3.1. Přístrové vybavení

Kapalinový chromatograf

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., Japonsko
Kolona: ZORBAX[®] SB-PHENYL, Agilent Technologies,
kondicionovaná mobilní fáze; délka 75 mm, vnitřní průměr
4,6 mm, velikost částic 3,5 μm
Vyhodnocení: chromatografická stanice Class VP, verze 6.12, Shimadzu

Laboratorní pH metr: Radelkis OP 211/1, Maďarsko

Analytické váhy: Sartorius GENIUS, SRN

3.2. Chemikálie

Clotrimazol, VV 249/04, Amoli Organics Ltd, Mumbai Ltd, India, pracovní standard, číslo šarže CLT/0207/020, atest č. CL 0085/0904/526 (obsah 100,12 %)

(2-Chlorfenyl)difenylmethanol, CLT-OH/2KD/001, Amoli Organics Ltd, Mumbai, India, pracovní standard, navázání na (2-chlorfenyl)difenylmethanol CRS, Council of Europe, European Pharmacopoeia Strasbourg

Imidazol, 345618/1 895, Amoli Organics Ltd, Mumbai, India, pracovní standard

Clotrimazol HBF spray 1%, Herbacos-bofarma s.r.o., Pardubice

Ibuprofen 98% GC, 026H1368, Sigma Aldrich Chemie, SRN

Kyselina fosforečná 85% p.a., Merck

Acetonitril for liquid chromatography, CHROMASOLV, Sigma-Aldrich GmbH, SRN

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

3.2.1. Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní i pracovní roztoky byly připravovány z výše uvedených surovin. Roztoky byly uchovány v temnu a v lednici při 4°C

Zásobní roztoky

- **Zásobní roztoky nečistot** o koncentraci 5,00 mg/100 ml byly připraveny rozpuštěním 5,06 mg (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a 5,00 mg imidazolu v acetonitrilu a doplněním na 100,00 ml.
- **Zásobní roztok clotrimazolu** o koncentraci 500,00 mg/100 ml byl připraven rozpuštěním 249,48 mg clotrimazolu v acetonitrilu a doplněním na 50,00 ml.
- **Zásobní roztok pro kalibraci A** o koncentraci 50,00 mg/100 ml byl připraven z 5,00 ml **zásobního roztoku clotrimazolu** a doplněním na 50,00 ml.
- **Zásobní roztok pro kalibraci B** o koncentraci 100,00 mg/100 ml byl připraven z 20,00 ml **zásobního roztoku clotrimazolu** a doplněním na 100,00 ml
- **Zásobní roztok vnitřního standardu** o koncentraci 100,00 mg/100 ml byl připraven rozpuštěním 100,16 mg ibuprofenu v acetonitrilu a doplněním na 100,00 ml.

Pracovní roztoky

- **Pracovní roztok pro opakovatelnost** o koncentraci clotrimazolu 50,000 mg/100 ml, ibuprofenu 10,000 mg/100 ml a nečistot 0,500 mg/100 ml byl připraven z 10,00 ml **zásobního roztoku clotrimazolu, ibuprofenu a nečistot** doplněním acetonitrilu na 100,00 ml.
- **Pracovní roztok pro robustnost** byl použit **pracovní roztok pro opakovatelnost**.
- **Pracovní roztok pro kalibraci clotrimazolu 1** o koncentraci 25,00 mg/100 ml byl připraven z 10,00 ml **zásobního roztoku pro**

kalibraci A a 2,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 20,00 ml.

- **Pracovní roztok pro kalibraci clotrimazolu 2** o koncentraci 40,00 mg/100 ml byl připraven ze 2,00 ml **zásobního roztoku clotrimazolu** a 5,00 ml **pracovního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 25,00 ml.
- **Pracovní roztok pro kalibraci clotrimazolu 3** o koncentraci 50,00 mg/100 ml byl připraven z 5,00 ml **zásobního roztoku clotrimazolu** a 5,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 50,00 ml.
- **Pracovní roztok pro kalibraci clotrimazolu 4** o koncentraci 60,00 mg/100 ml byl připraven z 15,00 ml **zásobního roztoku pro kalibraci B** a 5,00 ml **pracovního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 25,00 ml.
- **Pracovní roztok pro kalibraci clotrimazolu 5** o koncentraci 70,00 mg/100 ml byl připraven z 15,00 ml **zásobního roztoku pro kalibraci B** a 2,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 20,00 ml.
- **Pracovní roztok pro kalibraci clotrimazolu 6** o koncentraci 80,00 mg/100 ml byl připraven ze 40,00 ml **zásobního roztoku pro kalibraci B** a 5,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 50,00 ml.
- **Pracovní roztoky pro kalibraci nečistot 1** o koncentraci 0,05 mg/100 ml byly připraveny ze 2,00 ml **pracovních roztoků nečistot** a 2,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 20,00 ml.

- **Pracovní roztoky pro kalibraci nečistot 2** o koncentraci 0,100 mg/100 ml byly připraveny z 1,00 ml **zásobních roztoků nečistot** a 5,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 50,00 ml.
- **Pracovní roztoky pro kalibraci nečistot 3** o koncentraci 0,200 mg/100 ml byly připraveny ze 2,00 ml **zásobních roztoků nečistot** a 5,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 50,00 ml.
- **Pracovní roztoky pro kalibraci nečistot 4** o koncentraci 0,250 mg/100 ml byly připraveny z 1,00 ml **zásobních roztoků nečistot** a 2,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 20,00 ml.
- **Pracovní roztoky pro kalibraci nečistot 5** o koncentraci 0,400 mg/100 ml byly připraveny ze 2,00 ml **zásobních roztoků nečistot** a 5,00 ml **pracovního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 25,00 ml.
- **Pracovní roztoky pro kalibraci nečistot 6** o koncentraci 0,500 mg/100 ml byly připraveny ze 2,00 ml **zásobních roztoků nečistot** a 2,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 20,00 ml.
- **Pracovní roztoky nečistot** o koncentraci 0,100 mg/100 ml byly připraveny ze 2,00 ml **zásobních roztoků nečistot** (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a imidazolu doplněním acetonitrilu do 100,00 ml.
- **Pracovní roztok vnitřního standardu** o koncentraci 5,00 mg/100 ml byl připraven z 50,00 ml **zásobního roztoku vnitřního standardu** doplněním acetonitrilu do 100,00 ml.

3.3. Příprava vzorku

Byl hodnocen přípravek Clotrimazol spray, který je ve formě 1% roztoku clotrimazolu (1 ml obsahuje 0,01 g clotrimazolu). Do 20,00 ml odměrné baňky byl odvážen 1,00 g roztoku vzorku, k němu byly přidány 2,00 ml vnitřního standardu ibuprofenu v acetonitrilu o koncentraci 100,00 mg/ml a doplněn do 20,00 ml acetonitrilem.

3.4. Vývoj metody - optimalizace chromatografických podmínek

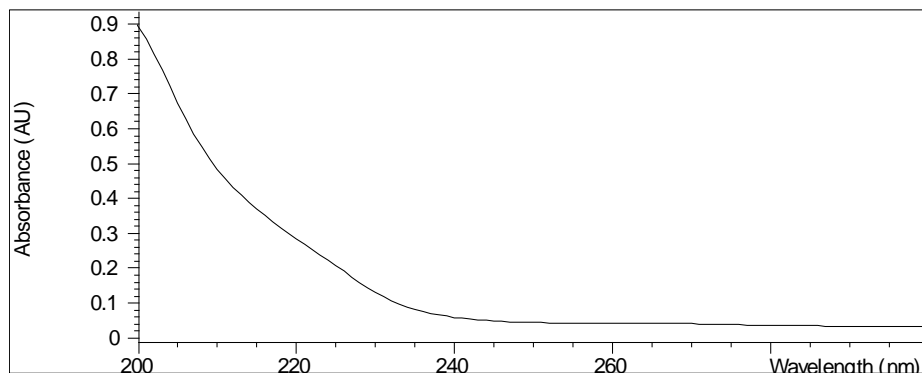
Cílem procesu optimalizace bylo nalézt takové podmínky provádění analýzy, za kterých bude možné metodu validovat.

3.4.1. Vlnová délka detektoru

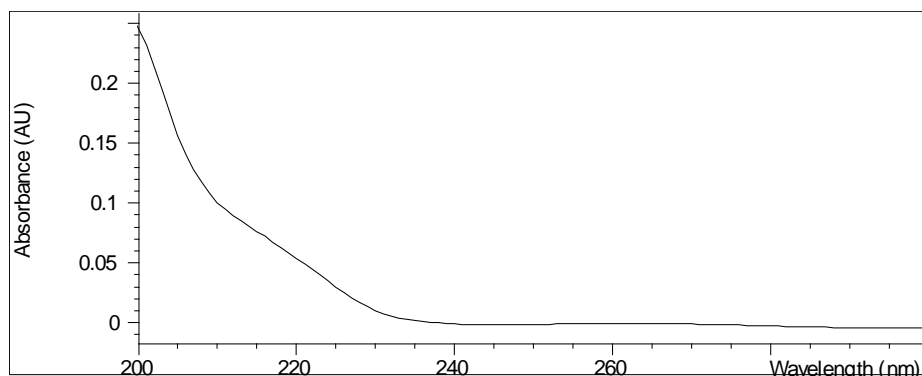
Při hledání optimální vlnové délky pro detekci stanovovaných látek se vycházelo ze změření příslušných UV spekter v roztocích standardů daných látek (clotrimazolu, (2-chlorfenyl)difenylmethanolu – nečistota) v acetonitrilu (*Obr. 5 a Obr. 6*). Koncentrace daných roztoků není známa, protože pro daný účel to nebylo nutné.

Na základě polohy maxim a minim uvedených spekter a s ohledem na literaturu byla jako vlnová délka zvolena hodnota $\lambda = 210$ nm. Při této vlnové délce bylo dosaženo dostačující citlivosti pro detekci účinné látky a téměř maximální pro nečistotu (2-chlorfenyl)difenylmethanol, které se předpokládá velmi malé množství. Spektrum imidazolu změřeno nebylo, protože požadavek na jeho stanovení byl zadán až v průběhu vypracovávání metodiky HPLC měření. Přesto bylo dokázáno, že je stanovitelné s potřebnou citlivostí při zvolené vlnové délce.

Obr. 5: UV spektrum clotrimazolu



Obr. 6: UV spektrum (2-chlorfenyl)difenylmethanolu



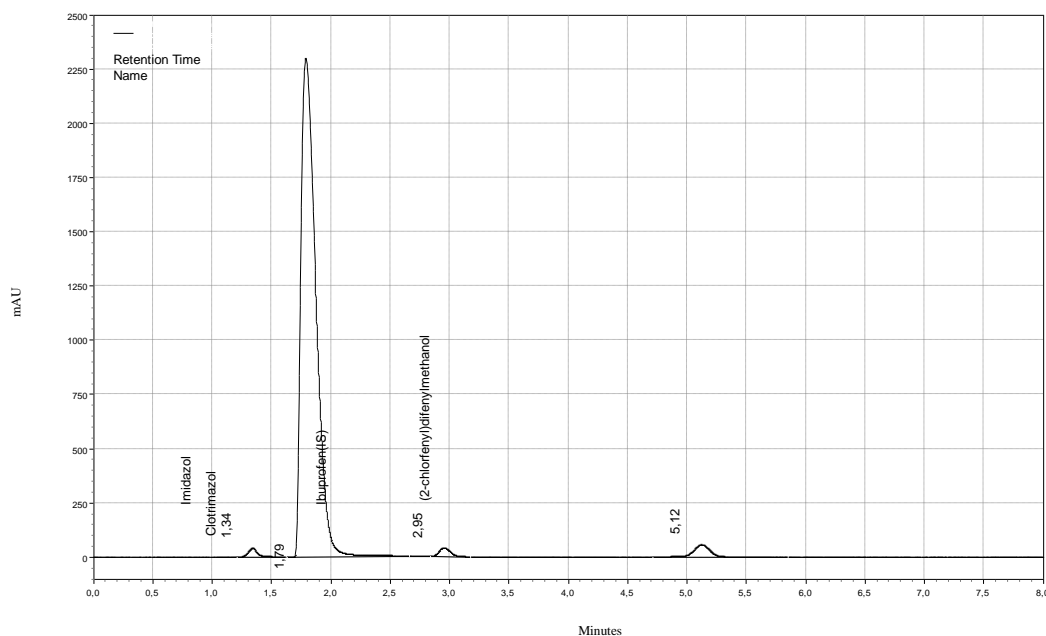
3.4.2. Složení mobilní fáze

Byla testována mobilní fáze acetonitril - voda (75:25) upravená 85% kyselinou fosforečnou na pH 2,7, která byla použita při validaci metody pro stanovení obsahu nečistot v přípravku Clotrimazol krém 1 % na koloně LiChroCARD RP-18e, 5 μm , 4,0 x 125 mm. Došlo k rozdělení složek zkoušeného roztoku standardu až na základní linii. Čas analýzy nepřesáhl 14 minut.

Po úpravě složení na acetonitril – voda (65:35) pH 2,7 byla tato mobilní fáze zkoušena na koloně ZORBAX[®] SB-PHENYL, 3,5 μm , 4,6 x 75 mm, na níž byl rozdělen zkoušený roztok standardů na jednotlivé složky. Se stoupajícím podílem vody se snižuje eluční síla mobilní fáze. Čas analýzy nepřekročil 6 minut.

Chromatogram směsi standardů při použití mobilní fáze acetonitril – voda (65:35) upravené na pH 2,7 ukazuje Obr. 7.

Obr. 7: Chromatogram směsi standardů při použití mobilní fáze acetonitril - voda (65:35) okyselené 85% kyselinou fosforečnou na pH 2,7

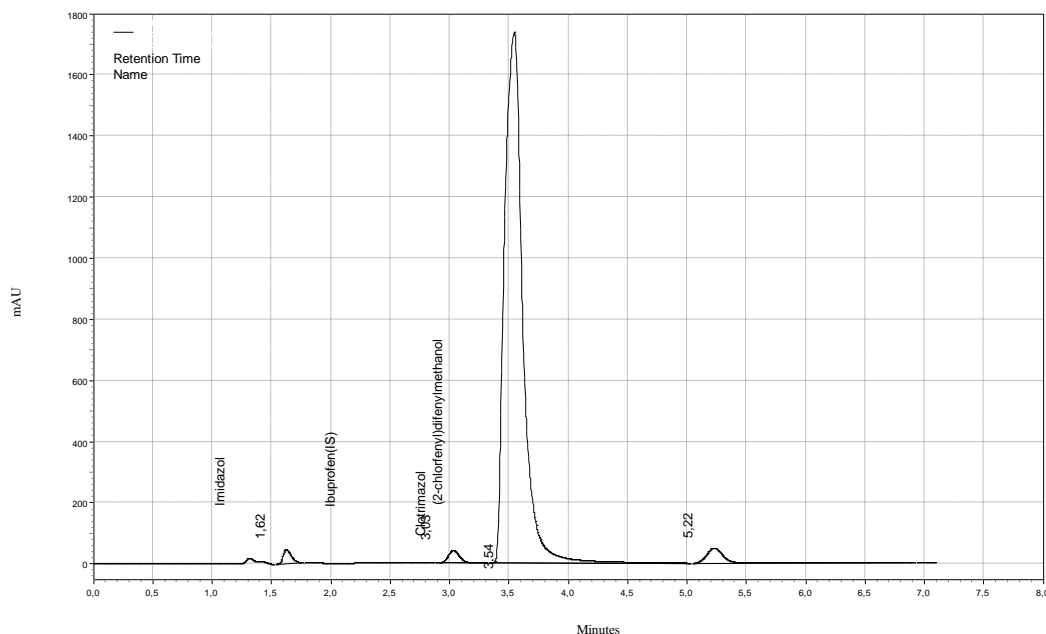


Po úpravě mobilní fáze na pH 3,5 došlo ke zvýšení ionizace ibuprofenu a snížení u clotrimazolu a imidazolu. V důsledku toho došlo k záměně pozice píků clotrimazolu a ibuprofenu, posunu píků imidazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu k vyššímu retenčnímu času.

Na základě výše uvedených výsledků byla jako optimální zvolena mobilní fáze, složení acetonitril – voda (65:35) okyselená 85 % kyselinou fosforečnou na pH 3,5. Všechny složky byly separovány až na základní linii a čas analýzy nepřesáhl 6 minut.

Chromatogram směsi standardů při stejném složení mobilní fáze upravené na pH 3,5 ukazuje Obr. 8.

Obr. 8: Chromatogram směsi standardů při použití mobilní fáze acetonitril - voda (65:35) okyselené 85% kyselinou fosforečnou na pH 3,5



3.4.3. Hledání vhodné kolony

Cílem hledání je najít takovou kolonu, na níž dochází k rozdělení složek směsi a v přijatelném čase analýzy.

Byly testovány kolony: ZORBAX[®] TMS, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

SUPELCO Discovery ZR-PBD, 5 μ m, 4,6 x 150 mm

SUPELCO Discovery Cyano, 5 μ m, 4,0 x 100 mm

ZORBAX[®] SB-PHENYL, 3,5 μ m, 4,6 x 75 mm

LiChroCARD RP-18e, 5 μ m, 4,0 x 125 mm

- Při zkoušení kolony ZORBAX[®] TMS, 5 μ m, 4,6 x 250 mm by analýza trvala více jak 60 minut.
- Na koloně SUPELCO Discovery ZR-PBD, 5 μ m, 4,6 x 150 mm nebyla úplně rozdělena analyzovaná směs standardů na jednotlivé složky. Čas analýzy byl okolo 45 minut.
- Na koloně SUPELCO Discovery Cyano, 5 μ m, 4,0 x 100 mm nedošlo k rozdělení složek směsi.

- Na koloně ZORBAX[®] SB-PHENYL, 3,5 µm, 4,6 x 75 mm došlo k úplnému rozdělení všech složek analyzované směsi v relativně krátkém čase analýzy, který nepřekročil 6 minut.
- Na koloně LiChroCARD RP-18e, 5 µm, 4,0 x 125 mm, došlo k úplnému rozdělení všech složek analyzované směsi a to v čase analýzy nepřekračující 14 minut.

Ze zkoušení kolon vyplývá, že separace směsi standardů na jednotlivé složky závisí na charakteru stacionární fáze kolony viz kap. 2.2.2.1 a zároveň s délkou kolony se prodlužuje čas trvání analýzy. Nejkratší doba analýzy byla na koloně ZORBAX[®] SB-PHENYL, 3,5 µm, 4,6 x 75 mm a nejdelší na koloně ZORBAX[®] TMS, 5 µm, 4,6 x 250 mm.

Vhledem ke krátkému času analýzy a dobré separaci složek byla vybrána kolona **ZORBAX[®] SB-PHENYL, 3,5 µm, 4,6 x 75 mm.**

3.4.4. Hledání vnitřního standardu

Vnitřní standard je sloučenina, která se přidává ke známému objemu roztoku vzorku v definovaném množství. Musí být eluován v blízkosti píků, musí mít podobnou koncentraci jako stanovované složky a být chemicky inertní [21]. Jako vnitřní standardy byly testovány **ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, terbinafin, hexachlorofen** na koloně LiChroCARD RP-18e a za použití mobilní fáze acetonitril – voda (65:35) okyselené 85 % kyselinou fosforečnou na pH 2,7.

- Pík **hexachlofenu** vykazoval retenční čas 19,10 min. a zbytečně by se tak prodlužoval čas analýzy.
- Pík **ketoprofenu** s retenčním časem 3,33 min. se překrýval s píkem clotrimazolu.
- Pík **flurbiprofenu** eluován v retenčním čase 4,43 min. byl nedostatečně oddělený od píku clotrimazolu.
- Pík **terbinafinu** s retenčním časem 3,71 min. se překrýval s píkem clotrimazolu.
- Pík **ibuprofenu** s retenčním časem 5,75 min. se nacházel mezi píky clotrimazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, od nichž byl dobře

separován. Pík ibuprofenu neinterferoval s žádnou ze složek stanovované směsi a zároveň neprodlužoval čas analýzy.

Ibuprofen byl použit jako vnitřní standard.

3.4.5. PH mobilní fáze

PH mobilní fáze ovlivňuje retenční čas a tvar jednotlivých píků v důsledku změn ionizace jednotlivých složek směsi. Na základě získaných výsledků z testování mobilních fází, složení acetonitril – voda (65:35) různého pH, bylo jako optimální zvoleno **pH 3,5**; kdy byla směs standardů dokonale rozdělena na jednotlivé složky (*Obr. 7*) v přijatelných retenčních časech a za poměrně optimálních tvarů píků pro hodnocení jednotlivých látek. Čas analýzy nepřekročil 6 min.

Při zvýšení pH na 3,7 mobilní fáze došlo již k překryvu píků clotrimazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu. Při pH 3,8 byl pík (2-chlorfenyl)difenylmethanolu eluován před píkem clotrimazolu, ale píky obou látek nebyly od sebe dokonale odděleny. Zároveň byl ovlivněn tvar píku clotrimazolu a při pH 4,0 byly píky (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a clotrimazolu dokonale oddělené. Se stoupajícím pH se měnily retenční časy jednotlivých píků v závislosti na vlivu pH na snížení ionizace imidazolu a clotrimazolu, jejichž píky se posouvaly směrem dozadu a zvýšení ionizace ibuprofenu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, jejichž píky se naopak posouvaly dopředu. Nejvíce byl ovlivněn tvar píku clotrimazolu a prodlužoval se čas analýzy.

Při testování mobilní fáze pH 2,7 (*Obr. 8*) byl roztok standardů rozdělen na jednotlivé složky, ale tato mobilní fáze nebyla vybrána z důvodu obav interference píku imidazolu, který byl eluován v retenčním čase 1,34 min. v důsledku vysoké ionizace imidazolu, se složkami obsaženými v placebu.

3.4.6. Souhrn nalezených optimálních chromatografických podmínek

Mobilní fáze:	acetonitril - voda (65:35), pH upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 3,5
Kolona:	ZORBAX [®] SB-PHENYL, 3,5 μm, 4,6 x 75 mm
Průtok Fm (ml/min):	0,5
Vlnová délka λ (nm):	210 nm
Vnitřní standard:	ibuprofen
Dávkovaný objem:	5 μl
Teplota:	laboratorní

3.5. Stanovení obsahu účinné látky

- Připraví se roztoky standardů v acetonitrilu s obsahem 50 mg/ml clotrimazolu a 10 mg/ml ibuprofenu (IS) ze dvou samostatných navážek. Každý roztok se změří třikrát.
- Provedou se 2 nezávislé analýzy vzorku. Úprava vzorku se provede podle postupu uvedeného v kap. 3.3. Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku se změří třikrát.
- Výpočet obsahu clotrimazolu (v %) se provede podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_V / A_{IS} \cdot m_S \cdot F \cdot 100}{A_S / A_{IS} \cdot m_V \cdot Z}$$

Kde: c_i = obsah stanovované složky v %

A_V / A_{IS} = poměr ploch píků vzorku a vnitřního standardu ibuprofenu

A_S / A_{IS} = poměr píků standardu a vnitřního standardu ibuprofenu

m_S = navážka standardu v g

m = navážka vzorku v g

F = faktor korekce na obsah retenční látky

Z = faktor zředění ($Z = 5$)

3.6. Stanovení obsahu nečistot

- Připraví se roztoky standardů v acetonitrilu s obsahem 0,5 mg/ml jednotlivých nečistot a 10 mg/ml ibuprofenu (IS) ze dvou samostatných navážek. Každý roztok se změří třikrát.
- Provedou se 2 nezávislé analýzy vzorku. Úprava vzorku se provede podle postupu uvedeného v kap. 3.3. Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku se změří třikrát.
- Výpočet obsahu nečistot (mg/g) roztoku spreje se provede podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_V/A_{IS} \cdot m_S \cdot F \cdot 1000}{A_S/A_{IS} \cdot m_V \cdot Z}$$

- Kde: c_i = obsah stanovované složky v mg/g roztoku vzorku
 A_V/A_{IS} = poměr ploch píků vzorku a vnitřního standardu ibuprofenu
 A_S/A_{IS} = poměr píků standardu a vnitřního standardu ibuprofenu
 m_S = navážka standardu v g
 m = navážka vzorku v g
 F = faktor korekce na obsah retenční látky
 Z = faktor zředění ($Z = 5$)

3.6.1. Celkový obsah nečistot

- Připraví se porovnávací roztok standardů v acetonitrilu s obsahem 50 mg/100 ml clotrimazolu (A_s), 1,00 ml tohoto roztoku se zředí acetonitrem na 100,00 ml. Roztok se změří třikrát.
- Vyhodnotí se chromatogramy získané proměřením zkoušeného roztoku vzorku (viz kap. 3.6) a porovnávacího roztoku standardů (viz kap. 3.6.1).

Zaznamená se analýza zkoušeného roztoku vzorku po dobu odpovídající 2 násobku retenčního času clotrimazolu.

Plocha píku **jakékoliv nečistoty** (kromě definované), nesmí být větší, než 0,8 násobek hlavní plochy porovnávacího roztoku standardů (viz kap. 3.6.1) (0,2 %).

Obsah nedefinovaných nečistot (%) se vypočte podle vzorce:

$$\% = \frac{A_V}{A_S \cdot m_V \cdot 2}$$

A_V = součet ploch všech píků (kromě píku clotrimazolu a nečistot (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a imidazolu) zkoušeného roztoku vzorku (viz kap. 3.6)

A_S = plocha píku clotrimazolu v porovnávacím roztoku (viz kap. 3.6.1)

m_V = navážka vzorku v g (viz kap. 3.3)

Celkový procentuální obsah nečistot (%) se vypočte podle vzorce:

$$\% = \frac{A_V}{A_{S1} \cdot m_{V1} \cdot 2}$$

A_{V1} = součet ploch všech píků (kromě píku clotrimazolu) zkoušeného roztoku vzorku (viz kap. 3.6)

A_{S1} = plocha píku clotrimazolu v porovnávacím roztoku (viz kap. 3.6.1.)

m_V = navážka vzorku v g (viz kap. 3.3)

4. Výsledky a diskuze

4.1. Validace metody

4.1.1. Testování vhodnosti chromatografického systému

4.1.1.1. Účinnost kolony

Účinnost kolony byla testována pomocí standardního **pracovního roztoku pro opakovatelnost**. Pro výpočet byly brány údaje získané jako průměr ze tří měření. Účinnost kolony N byla vypočtena podle vzorce v kap. 2.3.2.1

Tab. 7: Účinnost kolony

Analyzovaná látka	t_R (min)	$W_{0,5}$ (min)	N
Clotrimazol	3,61	0,31	1046
(2-chlorfenyl)difenylmethanol	4,92	0,15	5641
Imidazol	1,78	0,10	1535

Účinnost kolony vyjádřená jako počet teoretických pater N byla nejnižší u clotrimazolu, kde činila **1046** a nejvyšší u nečistoty (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, kde činila **5641** teoretických pater.

Požadavku $N > 900$ kolona vyhovuje u všech stanovovaných látek.

4.1.1.2. Asymetrie chromatografických píků

Asymetrie chromatografických píků byla odečtena z chromatogramů získaných nástřikem **pracovního roztoku pro opakovatelnost**. Hodnoty uvedené v Tab. 8 jsou průměrem ze tří hodnot. Výpočet hodnoty T byl proveden podle vzorce uvedeného v kap. 2.3.2.2

Tab. 8: Asymetrie chromatografických píkú

Sloučenina	$W_{0,05}$ (min)	f (min)	Asymetrie (T)
Clotrimazol	0,69	0,30	1,14
(2-chlorfenyl)difenylmethanol	0,35	0,17	1,05
Imidazol	0,25	0,12	1,03

Asymetrie píkú hodnocených látek se pohybovala v rozmezí **T 1,03 – 1,14**. Požadavku **T < 2** metoda vyhovuje u všech stanovovaných látek.

4.1.1.3. Rozlišení chromatografických píkú

Testování rozlišení píkú bylo prováděno nástřikem **pracovního roztoku pro opakovatelnost**. Byla brána průměrná hodnota ze tří měření. Rozlišení R_{ij} bylo vypočteno dle vzorce uvedeného v kap. 2.3.2.3.

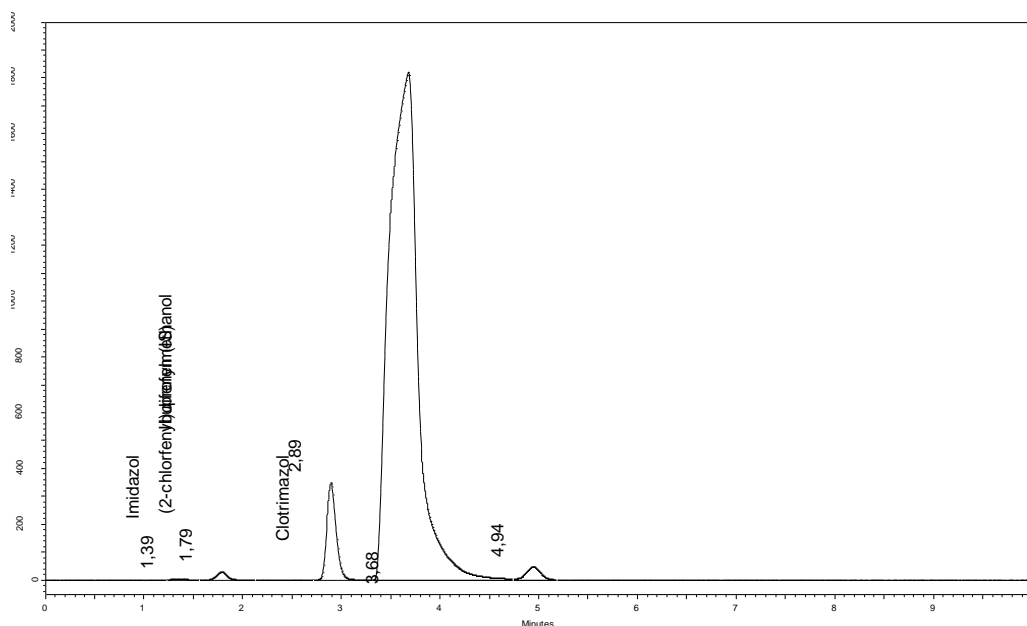
Tab. 9: Rozlišení chromatografických píkú

Hodnocené látky	R_{ij}
Mrtvý objem - imidazol	2,14
Imidazol – ibuprofen	6,09
Ibuprofen - clotrimazol	2,34
Clotrimazol - (2-chlorfenyl)difenylmethanol	3,68

Požadavku **$R_{ij} > 1,5$** metoda vyhovuje.

Rozlišení chromatografických píkú dokumentuje chromatogram na *Obr. 9*.

Obr. 9: Chromatogram standardů: imidazol, (2-chlorfenyl)difenylmethanol, clotrimazol s vnitřním standardem ibuprofenem



4.1.1.4. Opakovatelnost analýzy

Byl opakovaně dávkován **pracovní roztok pro opakovatelnost**. Výsledky byly získány z šesti nástřiků roztoku. Výpočet směrodatné odchylky byl proveden pomocí programu QC expert. Výsledky jsou uvedeny v *Tab. 10 - Tab. 12*.

Tab. 10: Opakovatelnost analýzy – clotrimazol

Clotrimazol		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas t_R (min)
1	36 611 887	3,68
2	36 644 111	3,63
3	36 627 121	3,60
4	36 626 738	3,59
5	36 612 775	3,59
6	36 586 150	3,58

n	6	6
\bar{x}	36 618 130	3,61
s	19597,55	0,0014
S_R (%)	0,05	0,04

Tab. 11: Opakovatelnost analýzy - imidazol

Imidazol		
Číslo pokusu	Plocha píku A	Retenční čas t_R (min)
1	204 385	1,79
2	205 561	1,78
3	205 050	1,77
4	205 111	1,77
5	205 360	1,77
6	204 967	1,77

n	6	6
\bar{x}	205 072	1,78
s	401,76	0,008367
s_R (%)	0,20	0,47

Tab. 12: Opakovatelnost analýzy - (2-chlorfenyl)difenylmethanol

(2-chlorfenyl)difenylmethanol		
Číslo pokusu	Plocha píku A	Retenční čas t_R (min)
1	474 802	4,94
2	477 936	4,93
3	477 678	4,91
4	476 781	4,91
5	474 945	4,90
6	475 564	4,90

n	6	6
\bar{x}	476 284	4,92
s	1373,10	0,01643
s_R (%)	0,29	0,33

Testování opakovatelnosti analýzy prokázalo, že při šestinásobném opakování nástřiku roztoku standardů činila směrodatná odchylka ploch píků i retenčních časů **méně než 1%**. Z toho vyplývá, že metoda vyhovuje požadavku $s_R < 1\%$.

4.1.2. Testování validačních parametrů

4.1.2.1. Přesnost

Byly analyzovány roztoky vzorku Clotrimazol HBF spray 1%, vzorek č. VV 087/05, výrobní šarže č. 13.4.2005. Navážky vzorku byly paralelně připravené samostatným postupem uvedeným v kap. 3.3 s tím rozdílem, že ke každé navážce byl přidán vzhledem k nepřítomnosti nečistot ve vzorku (k dispozici byly pouze čerstvě připravené vzorky) roztok standardů nečistot ((2-chlorfenyl)difenylmethanol $c = 0,501$ mg/100 ml, imidazol $c = 0,511$ mg/100 ml).

Z naměřených ploch píků (porovnáním s plochou píku standardu získaných při testování opakovatelnosti systému viz kap. 4.1.1.4) byl vypočítán obsah clotrimazolu ve spreji (roztoku) podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_v \cdot m_s \cdot F \cdot 100}{A_s \cdot m_v \cdot Z}$$

Kde: c_i = obsah stanovované složky v g

A_v = plocha píku vzorku

A_s = plocha píku standardu získaná z měření pracovního roztoku pro opakovatelnost

m_v = navážka vzorku v g

m_s = navážka standardu v g/100 ml

F = faktor korekce na obsah referenční látky

Z = faktor zředění ($Z = 5$)

Tab. 13: Přesnost stanovení obsahu účinné látky

Roztok č.	Plocha píku (m = 1,0000 g)
	Clotrimazol
1	31 990 022
2	32 335 397
3	32 204 509
4	32 237 176
5	32 079 764
6	31 813 808

n	6
\bar{x}	32 110 113
s	189 181
s_R (%)	0,59

Plochy píku jsou přepočtené na navážku 1,0000 g spreje.

Přesnost stanovení nečistot byla vzhledem k jejich nepřítomnosti ve vzorku hodnocena porovnáváním poměrů ploch píků nečistot a vnitřního standardu ibuprofenu naměřené v jednotlivých navážkách vzorku.

Tab. 14: Přesnost stanovení obsahu nečistot

Roztok č.	Poměr plochy píku nečistoty a vnitřního standardu	
	Imidazol	(2-chlorfenyl)difenylmethanol
1	0,0906	0,1880
2	0,0907	0,1883
3	0,0911	0,1870
4	0,0910	0,1879
5	0,0918	0,1884
6	0,0912	0,1875

n	6	6
\bar{x}	0,09107	0,1879
s	0,0004274	0,0005244
s_R (%)	0,47	0,28

Výsledky uvedené v Tab. 13 a Tab. 14 jsou průměrem ze tří měření. Výpočet relativní směrodatné odchylky s_R byl proveden pomocí programu QC expert.

Přesnost stanovení vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka s_R se pohybovala v rozmezí **0,28 – 0,59 %**.

S uvedeného vyplývá, že metoda vyhovuje požadavku s_R (%) < 5 %.

4.1.2.2. Správnost

Byl šestkrát změřen **pracovní roztok pro opakovatelnost**, kde byly z koncentrací $c_0 = 49,900$ mg/100 ml (clotrimazol), 0,506 mg/100 ml ((2-chlorfenyl)difenylmethanol), 0,500 mg/100ml (imidazol) získány plochy píků A_0 .

Byly šestkrát analyzovány modelové vzorky (placebo + pracovní roztok pro opakovatelnost), které byly paralelně připraveny samostatným postupem uvedeným v kap. 3.3. s přidavkem roztoku standardů o koncentraci složek c_0 .

Výsledek je vyjádřen jako výtěžnost R_i , která byla vypočtena podle vzorce:

$$R_i(\%) = 100 \cdot c_i / c_0$$

Kde: c_0 = koncentrace vložená

c_i = koncentrace stanovená HPLC

Tab. 15: Správnost-clotrimazol

Clotrimazol				
Vzorek č.	c_0 (mg/100 ml)	A_i	c_i (mg/100 ml)	R_i (%)
1	49,90 ($A_0 = 36\ 627\ 706$)	28 510 545	50,5057	101,21
2		35 818 100	49,2621	98,72
3		36 198 056	49,3069	98,81
4		35 622 283	49,2393	98,68
5		39 108 116	48,8788	97,95
6		35 347 639	49,5801	99,36

n	6
\bar{x}	99,12 %
s	1,1175
s_R (%)	1,13 %

Tab. 16: Správnost nečistoty - imidazol

Imidazol				
Vzorek č.	c_0 (mg/100 ml)	A_i/A_{IS}	c_i (mg/100 ml)	R_i (%)
1		0,0906	0,52	103,33
2		0,0907	0,52	103,42
3	0,500	0,0911	0,52	103,87
4	odpovídá A_o/A_{IS} :	0,0910	0,52	103,77
5	0,0877	0,0918	0,52	104,71
6		0,0912	0,52	104,02

n	6
\bar{x}	103,85 %
s	0,50
s_R (%)	0,48 %

Tab. 17: Správnost nečistoty - (2-chlorfenyl)difenylmethanol

(2-chlorfenyl)difenylmethanol				
Vzorek č.	c_0 (mg/100 ml)	A_i/A_{IS}	c_i (mg/100 ml)	R_i (%)
1		0,1880	0,51	100,69
2		0,1883	0,51	100,87
3	0,506	0,1870	0,51	100,18
4	odpovídá A_o/A_{IS} :	0,1879	0,51	100,62
5	0,1867	0,1884	0,51	100,89
6		0,1875	0,51	100,43

n	6
\bar{x}	100,61 %
s	0,28
s_R (%)	0,28 %

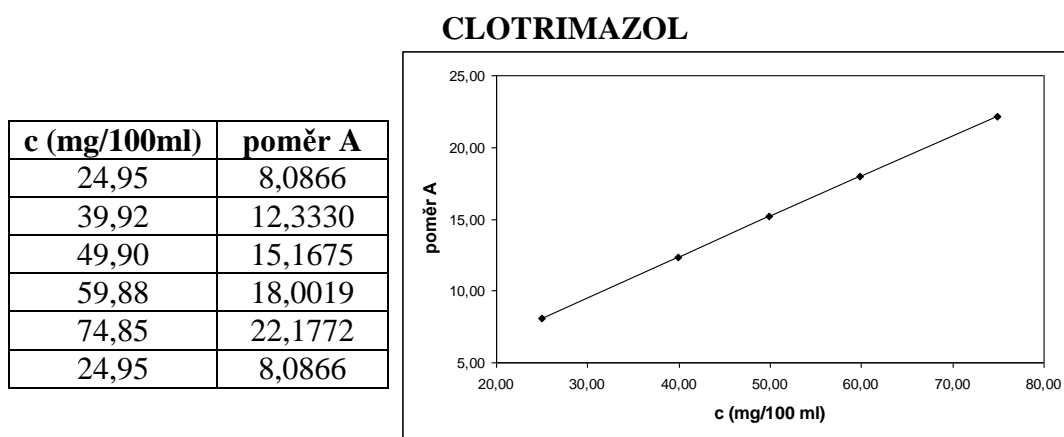
Správnost stanovení obsahu jednotlivých látek vyjádřená jako výtěžnost R_i se pohybovala v rozmezí **99,12 – 103,85 %**, směrodatné odchylky výtěžnosti potom v rozmezí **0,28 – 1,13 %**.

Metoda požadavkům **R v intervalu $100 \pm 5 \%$** a **$s_R < 5 \%$** vyhovuje.

4.1.2.3. Linearita

Byla použita metoda vnitřního standardu, jako vnitřní standard (IS) byl použit ibuprofen. Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků pracovních standardů clotrimazolu a nečistot (koncentrace jsou uvedeny v *Tab. 18 - Tab. 20*) přídavek IS byl 10 mg/100 ml. Plocha píku pro každou koncentraci je průměrem ze tří měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot. Závislost A ($A_{\text{vzorek}}/A_{\text{IS}}$) kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese v programu Microsoft Excel.

Tab. 18: Testování linearity – clotrimazol



Regresní funkce : $y = kx + q$

počet bodů: $n = 5$ počet stupňů volnosti: $v = 3$

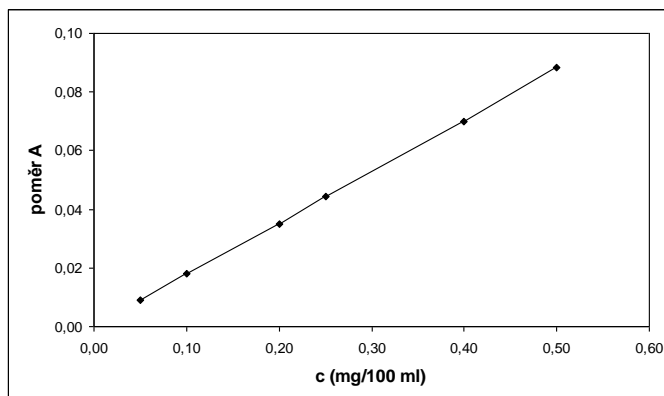
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
směrnice:	$k =$	0,28260	$\pm 0,00068$
absolutní člen:	$q =$	1,051	$\pm 0,036$
koeficient korelace:	$R =$	0,999991	
reziduální odchylka:	$S_{\text{rez}} =$	0,0257	

hodnota F-statistiky	$F =$	1,75E+5
Závislost y na x	byla prokázána se spolehlivostí	99.9 %

Tab. 19: Testování linearitý nečistoty imidazolu

IMIDAZOL

c (mg/100ml)	poměr A
0,050	0,0090
0,100	0,0179
0,200	0,0351
0,250	0,0443
0,400	0,0700
0,500	0,0883



Regresní funkce : $y = kx + q$

počet bodů: $n = 6$

počet stupňů volnosti: $v = 5$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice: $k = 0,17618 \pm 0,00044$

koeficient korelace: $R = 0,999945$

reziduální odchylka: $S_{rez} = 0,000318$

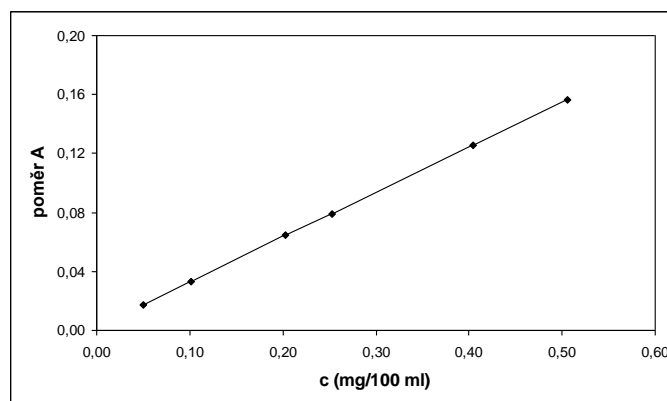
hodnota F-statistiky $F = 4,58E+4$

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9 %

Tab. 20: Testování linearitý nečistoty (2-chlorfenyl)difenylmethanolu

(2-CHLORFENYL)DIFENYLMETHANOL

c (mg/100ml)	poměr A
0,0506	0,0174
0,1012	0,0334
0,2024	0,0645
0,2530	0,0788
0,4048	0,1255
0,5060	0,1567



Regresní funkce : $y = kx + q$

počet bodů: n = 6	počet stupňů volnosti: v = 5
-------------------	------------------------------

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
směrnice:	k =	0,3112	± 0,0018

koeficient korelace:	R =	0,99968
reziduální odchylka:	s _{rez} =	0,00135

hodnota F-statistiky	F =	7,84E+3
Závislost y na x	byla prokázána se spolehlivostí	99.9 %

Kalibrační křivky pro účinnou látku jsou lineární ($R > 0,9999$) v rozsahu **24,95 - 74,95 mg/100 ml**.

Kalibrační křivky pro nečistoty jsou lineární ($R > 0,9996$) v rozsahu **0,0500 – 0,5060 mg/100 ml**.

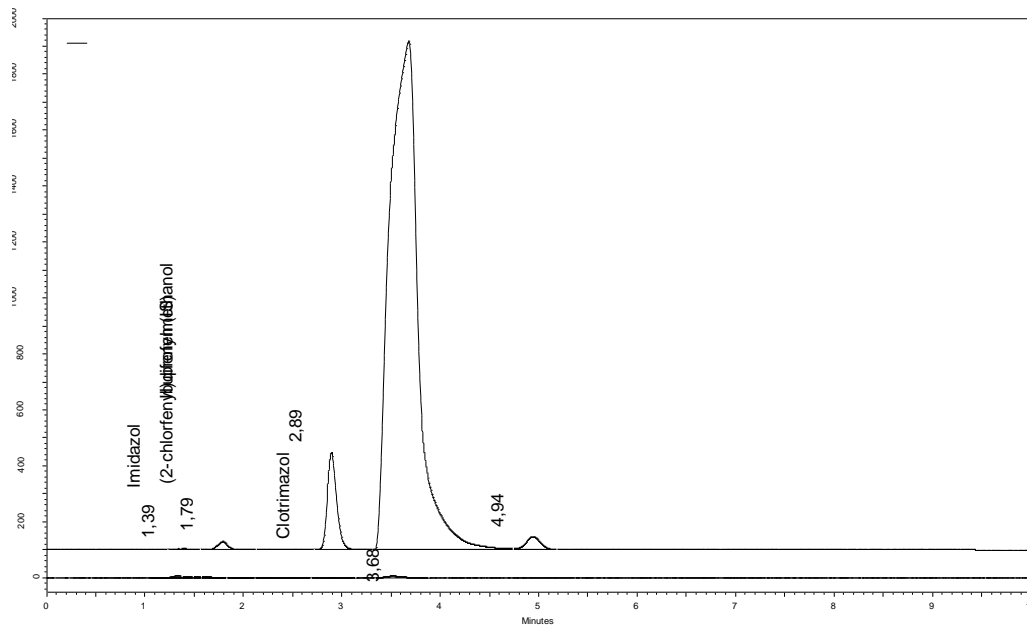
Nižší korelační koeficient u kalibračních křivek nečistot je způsoben tím, že linearita byla testována v rozmezí velmi nízkých koncentrací, čímž je negativně ovlivněna integrace ploch píků.

Z uvedeného vyplývá, že testované látky splňují požadavky linearity.

4.1.2.4. Selektivita

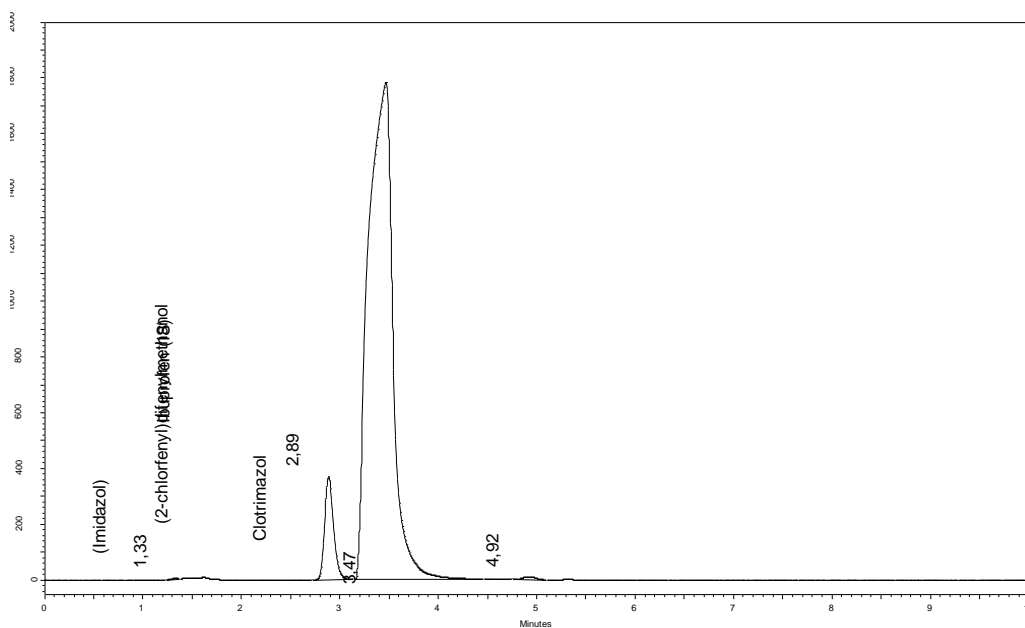
Separace standardních látek clotrimazolu ($c = 49,900$ mg/100 ml), imidazolu ($c = 0,500$ mg/100 ml) a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu ($c = 0,506$ mg/100 ml) je dokumentována na chromatogramu standardních látek (*Obr. 10*). Jako vnitřní standard je použit ibuprofen ($c = 9,990$ mg/100 ml). Píky jednotlivých látek mají odlišné retenční časy a rozlišení je dostatečné ($> 1,5$).

Obr. 10: Chromatogram standardních látek s přidavkem vnitřního standardu ibuprofenu dokumentující separaci látek, dolní chromatogram - placebo přípravku



Placebo a přípravek Clotrimazol byly zpracovány dle postupu v kap. 3.3. Na chromatogramu placebo (*Obr. 10*) je patrné, že v retenčních časech odpovídajících sledovaným látkám nejsou přítomny žádné píky interferujících látek.

Obr. 11: Chromatogram přípravku Clotrimazol HBF s přidavkem vnitřního standardu ibuprofenu



Na chromatogramu přípravku Clotrimazol HBF spray 1% (Obr. 11) je patrná dokonalá separace sledovaných látek i vnitřního standardu.

Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce clotrimazolu a nečistotám imidazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu.

4.1.2.5. Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo testováno pomocí **pracovního roztoku pro opakovatelnost** s obsahem účinné látky clotrimazolu ($c = 49,900 \text{ mg}/100 \text{ ml}$), nečistoty imidazolu ($0,500 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu ($c = 0,506 \text{ mg}/100 \text{ ml}$).

4.1.2.5.1. *Vliv složení mobilní fáze*

Vliv složení mobilní fáze bylo testováno při poměru acetonitril – voda (pH upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 3,5) (v/v) = **75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45.**

Vliv na plochu píku

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

$$A_R = 100 \cdot A_i / A_{65:35} \quad \text{kde} \quad A_i = \text{plocha píku}$$
$$A_{65:35} = \text{plocha píku při optimálním složení mobilní fáze}$$

- a) Byly získány výsledky uvedené v *Tab. 21 a Tab. 22*. Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 100,00 % až 106,27 %. Při poměru 75:25 a 55:45 nebylo možné hodnotit pík clotrimazolu, protože nebylo dosaženo jeho optimálního rozdělení od ostatních látek. Při poměru 70:30 byla plocha píku clotrimazolu větší a tato změna přesáhla 5 %. U poměru 60:40 změna v poměru složek mobilní fáze neovlivňuje stanovení clotrimazolu. Z hlediska změn plochy píku clotrimazolu je doporučeno použití mobilní fáze ACN - H₂O (65:35) pH 3,5.
- b) Relativní plocha píků nečistot vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 100,29 % až 144,48 % pro imidazol a 96,95 % až 104,32 % pro (2-chlorfenyl)difenylmethanol. Mobilní fáze připravená v poměru 75:25 nevyhovuje kvůli vysoké hodnotě A_R imidazolu. Mobilní fáze v poměru 70:30 neumožňuje dokonalé rozdělení píků (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a clotrimazolu. V rozmezí 65:35 až 55:45 změny v poměru složek mobilní fáze výrazněji neovlivňují stanovení nečistot.

Tab. 21: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku clotrimazolu

ACN – H ₂ O (pH 3,5)	Clotrimazol	
	A _i	A _R (%)
75:25	-	-
70:30	38783249	106,27
65:35	36494837	100,00
60:40	36835782	100,93
55:45	-	-

n = 3

Tab. 22: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku nečistot

ACN – H ₂ O (pH 3,5)	Imidazol		(2-chlorfenyl)difenylmethanol	
	A _i	A _R (%)	A _i	A _R (%)
75:25	298 631	144,48	441 470	100,29
70:30	222 970	107,87	-	-
65:35	206 694	100,00	440 201	100,00
60:40	212 051	102,59	459 218	104,32
55:45	207 219	100,25	426 758	96,95

n = 3

Vliv na retenční čas

- a) Vliv na retenční čas je ukázán v *Tab. 23*. V rozmezí 70:30 až 60:40 dochází k dokonalé separaci všech složek. Ani trvání analýzy není podstatněji ovlivněno.
- b) Vliv na retenční čas je ukázán v *Tab. 24*. Mobilní fáze připravená v poměru 70:30 neumožňuje rozdělení píků clotrimazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu. V ostatních případech dochází k dokonalé separaci nečistot, ale složení mobilní fáze ovlivňuje trvání analýzy. Z tohoto hlediska je doporučeno použití mobilní fáze ACN : voda (65:35) pH = 3,5. Na *Obr. 12* je znázorněn chromatogram při poměru ACN : voda (55:45) pH = 3,5 (krajní hranice testovacího rozmezí) a jak je zřejmé, separace obou nečistot je až k základní linii,

ale není dostatečně separován clotrimazol a vnitřní standard a dochází k prodloužení trvání analýzy.

Tab. 23: Vliv složení mobilní fáze na retenční čas clotrimazolu

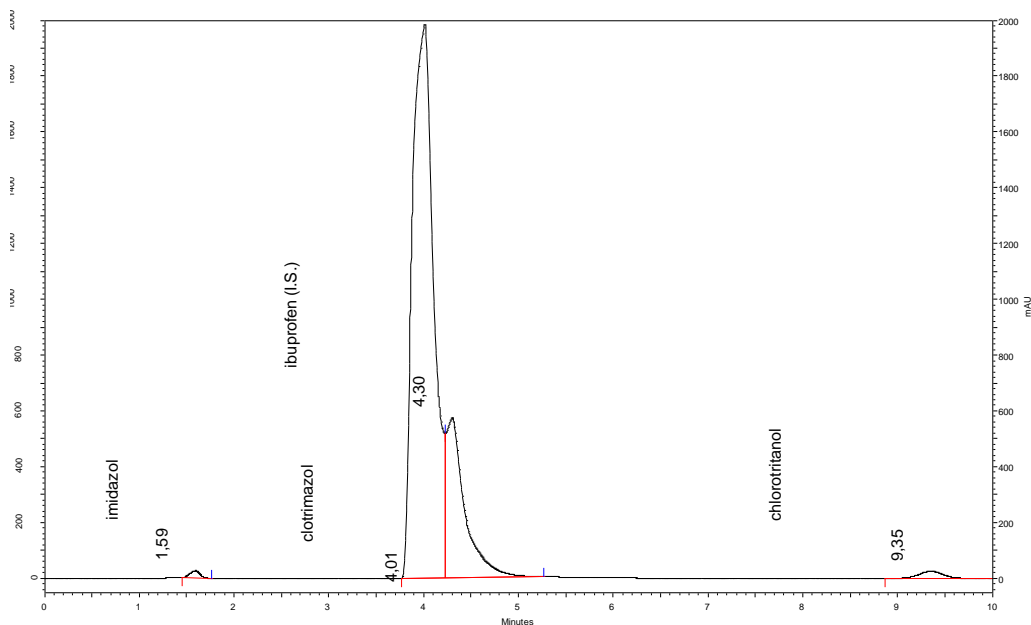
ACN – H ₂ O (pH 3,5)	Clotrimazol
	t _R (min)
75:25	-
70:30	4,22
65:35	3,45
60:40	4,04
55:45	-

n = 3

Tab. 24: Vliv složení mobilní fáze na retenční časy nečistot

ACN – H ₂ O (pH 3,5)	Imidazol	(2-chlorfenyl)difenylmethanol
	t _R (min)	t _R (min)
75:25	1,98	3,24
70:30	1,86	-
65:35	1,72	4,95
60:40	1,72	6,30
55:45	1,59	9,35

Obr. 12: Chromatogram separace látek při složení mobilní fáze acetonitril - voda 55:45 (pH 3,5)



4.1.2.5.2. Stabilita roztoků

Stabilita roztoků byla testována pomocí **pracovního roztoku pro opakovatelnost** za uchovávání:

- 1) za snížené teploty (5 °C), chráněné před světlem
- 2) za laboratorní teploty

Odchyłka vyjádřená v % byla vypočtena podle vzorce:

$$S_T(\%) = 100 \cdot |A_t - A_0| / A_0 \quad \text{kde} \quad \begin{aligned} A_t &= \text{plocha píku v čase } t \\ A_0 &= \text{plocha píku v čase } 0 \\ t &= \text{čas od přípravy roztoku} \end{aligned}$$

Tab. 25 : Stabilita látek v roztoku (acetonitril) v závislosti na době a způsobu uchovávání (S_T)

Clotrimazol				
t	$A_{st}/A_{I.S.} (5^\circ\text{C})$	$S_T (\%)$	$A_{st}/A_{I.S.} (\approx 20^\circ\text{C})$	$S_T (\%)$
0	15,3376	0,00	15,3376	0,00
24 h	15,4185	0,53	15,4226	0,55
48 h	15,4654	0,83	15,3997	0,40
72 h	15,4413	0,68	15,4224	0,55
Imidazol				
t	$A_{st}/A_{I.S.} (5^\circ\text{C})$	$S_T (\%)$	$A_{st}/A_{I.S.} (\approx 20^\circ\text{C})$	$S_T (\%)$
0	0,08702	0,00	0,08702	0,00
24 h	0,08754	0,60	0,08731	0,33
48 h	0,08758	0,65	0,08733	0,36
72 h	0,08761	0,69	0,08731	0,33
(2-chlorfenyl)difenylmethanol				
t	$A_{st}/A_{I.S.} (5^\circ\text{C})$	$S_T (\%)$	$A_{st}/A_{I.S.} (\approx 20^\circ\text{C})$	$S_T (\%)$
0	0,1883	0,00	0,1883	0,00
24 h	0,1909	1,36	0,1912	1,54
48 h	0,1899	0,84	0,1882	0,07
72 h	0,1878	0,29	0,1880	0,18

n = 3

$A_{st}/A_{I.S.}$ = poměr plochy píků clotrimazolu a vnitřního standardu, poměry ploch píků nečistot a vnitřního standardu.

Požadavek $S_T (\%) < 1 \%$ je splněn a roztok clotrimazolu a roztoky nečistot v acetonitrilu je možné používat při uchovávání za snížené teploty nebo laboratorní teploty po dobu 72 hod od jejich přípravy.

4.1.2.6. Detekční limit (LOD) a kvantifikační limit (LOQ)

- Bylo změřeno placebo a ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovovaných nečistot byla změřena největší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu; z tohoto rozpětí šumu byla odhadnuta jeho směrodatná odchylka:

$$s_n = (r^+ - r^-)/5$$

- Bylo změřeno placebo s přidavkem **pracovního roztoku nečistoty imidazolu** ($c = 0,500$ mg/ 100ml).
- Bylo změřeno placebo s přidavkem **pracovního roztoku nečistoty (2-chlorfenyl)difenylmethanolu** ($c = 0,506$ mg/ 100ml)

LOD byl vypočten podle vzorce: $3 s_n K / b_1$;

LOQ byl vypočten podle vzorce: $10 s_n K / b_1$

K = plocha píku/výška píku; b_1 = plocha píku/koncentrace analytu

Tab. 26: Detekční limit a kvantifikační limit

Imidazol	LOD	LOQ
$s_n = 0,225$ $K = 7043,38$ $b_1 = 3994187,90$	0,00119	0,00397
(2-chlorfenyl)difenylmethanol	LOD	LOQ
$s_n = 0,226$ $K = 10172,98$ $b_1 = 9468383,20$	0,00086	0,00286

Nejnižší detekovatelná koncentrace nečistoty imidazolu (LOD) za použití předkládané HPLC metody je **0,00119 mg.l⁻¹**, kvantitativní limit (LOQ) představuje koncentrace **0,00397 mg.l⁻¹**.

Nejnižší detekovatelná koncentrace nečistoty (2-chlorfenyl)difenylmethanolu (LOD) za použití předkládané HPLC metody je **0,00086 mg.l⁻¹**, kvantitativní limit (LOQ) představuje koncentrace **0,00286 mg.l⁻¹**.

5. Závěr

- Byla vypracována a zvalidována HPLC metoda na hodnocení obsahu clotrimazolu a příslušných nečistot (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a imidazolu v přípravku Clotrimazol spray 1 %.
- Byla provedena rešerše na HPLC a ostatní metody hodnocení clotrimazolu a validační postupy.
- Jako optimální vlnová délka pro detekci analytů byla vybrána $\lambda = 210$ nm.
- Optimální složení mobilní fáze pro analýzu přípravku Clotrimazol spray 1 % bylo zvoleno acetonitril - voda upravené 85 % kyselinou fosforečnou na pH 3,5 (v/v) 65:35.
- Kolona byla vybrána ZORBAX[®] SB-PHENYL, 3,5 μ m, 4,6 x 75 mm, Agilent Technologies.
- Jako optimální bylo zvoleno pH 3,5 mobilní fáze. Při snížení nebo zvýšení pH docházelo k záměně pozice píků, změně tvaru píků a měnil se čas analýzy v závislosti na změně ionizace jednotlivých látek vyvolanou změnou pH.
- Jako rychlost průtoku mobilní fáze byla zvolena 0,5 ml/min.
- Jako vnitřní standard byl použit ibuprofen.
- Bylo provedeno testování vhodnosti chromatografického systému. Účinnost kolony vyjádřená jako počet teoretických pater N byl > 900 . Faktor symetrie píku T byl $< 1,2$ a rozlišení chromatografických píků bylo $> 2,1$. Opakovatelnost analýzy vyjádřená jako relativní odchylka s_R byla < 1 %.
- Přesnost stanovení látek vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka s_R byla < 1 %.
- Správnost stanovení stanovení vyjádření jako výtěžnost R_i známého množství analytu přidaného k placebo. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 99,12 - 103,85 %.
- Linearita byla testována v rozmezí 50 - 150 % očekávaných koncentrací účinné látky (clotrimazolu) a 10 - 100 % očekávaných maximálních koncentrací nečistot (imidazolu, (2-chlorfenyl)difenylmethanolu).

Korelační koeficient R byl pro účinnou látku $> 0,9999$ a pro nečistoty $> 0,9996$.

- Selektivita byla dokumentací separace všech látek až na základní linii a negativním výsledkem placebo extrahovaného čistým rozpouštědlem.
- Kolísání složení mobilní fáze zvýšením podílu acetonitrilu negativně ovlivňuje separaci píků. Jsou-li píky odděleny není jejich plocha změnami podílu acetonitrilu ovlivněna. Naopak zvýšením podílu vody se prodlužuje čas analýzy.
- Roztoky standardů hodnocených látek jsou stabilní po 72 hodinách při skladování za snížené teploty, tak i při laboratorní teplotě.
- Detekční limit (LOD) pro imidazol je $0,00119 \text{ mg/l}$ a (2-chlorfenyl)difenylmethanol $0,00086 \text{ mg/l}$. Kvantifikační limit (LOQ) je pro imidazol $0,00397 \text{ mg/l}$ a (2-chlorfenyl)difenylmethanol $0,00286 \text{ mg/l}$.
- Metoda bude použita pro hodnocení účinné látky (clotrimazolu) a nečistot (imidazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu) v jednotlivých šaržích přípravku Clotrimazol HBF spray 1 %.

6. Literatura

1. Lincová D., Farghali H. a kol.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha 2002, 473-476
2. Kol. autorů: *Remedia kompendium*, 3. vydání, Panax, Praha 1999, 413, 599, 696
3. Kol. autorů: *Český lékopis 2002*, Grada, Praha 2001, 2088-2090
4. Karlíček R. a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha 2001, 267-281
5. Klimeš J. a kol.: *Kontrola léčiv I*, Karolinum, Praha 2002, 29-33
6. Pavel Jandera: www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc (září 2003)
7. Terminologická komise: *Chemické listy* 94, 2000, 439-444
8. American Pharmacopoeial Convention, Inc., United States Pharmacopoeia 28, Rockville 2005, 519-522, 2748-2751
9. Waters Corporation, *Waters Corporation Homepage*,
www.waters.com/watersdivision/contentd.asp?watersit=JDRS-5LT6WZ
10. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals of Human Use, *ICH official Website*,
www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf (listopad 2005)
11. P. Palermo, L. Wilson, K. Jakaitis, C. Davidson, J. Mc Williams: *Today's Chemist at Work* 10, September 2001, *American Chemical Society Publications Website*,
<http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/10/i09/html/09dong.html>
(září 2001)
12. British Pharmacopoeia Commission: *British Pharmacopoeia 2004*, HMSO, London 2004, 2299-2300

13. Rajesh Pandey, Zahoor Ahmad, Sadhna Sharma, G.K. Khuller:
I. J. Pharm. 301, 2005, 268-276
14. Abdel-Moety, F. I. Khattab, K. M. Kelani, A. M. AbouAl-Alamein:
Il Pharmaco 57, 2002, 931-938
15. Jie Zhu, Cora Coscolluella: J. Chromatogr. B 741, 2000, 55-65
16. Mei Lin, Nian Wu: J. Pharm. Biomed. Anal. 19, 1999, 945-954
17. M. Di Pietra, V. Andrisano, R. Gotti, V. Cavrini: J. Pharm. Biomed.
Anal. 14, 1996, 1191-1199
18. F. Wielen, S. Laug, K. Baumann, A. Schwab, S. Just, U. Holzgrabe:
J. Pharm. Biomed. Anal. 30, 2003, 1879-1887
19. L. Crego, M. L. Marina, J. L. Lavandera: J. Chromatogr. A 917, 2001,
337-345
20. P. Y. Khashaba, S. R. El-Shabouri, K. M. Emara and A. M. Mohamed:
J. Pharm. Biomed. Anal. 22, 2000, 363-376
21. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv II, Karolinum, Praha 2004, 73-74