

## OPTIMALIZACE HPLC STANOVENÍ KLOTRIMAZOLU

PETRA ŽÁKOVÁ\*, HANA SKLENÁŘOVÁ,  
LUCIE HAVLÍKOVÁ, LUDMILA MATYSOVÁ  
a DALIBOR ŠATÍNSKÝ

Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta,  
Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec  
Králové

Petra.Zakova@faf.cuni.cz

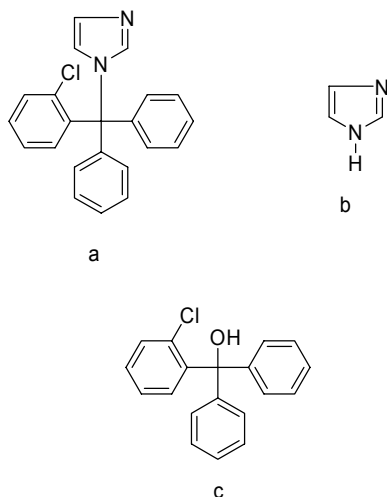
Došlo 28.4.08, přijato 18.12.08.

Klíčová slova: klotrimazol, (2-chlorofenyl)difenylmethanol,  
imidazol, HPLC

### Úvod

Klotrimazol je imidazolový derivát s terapeutickým účinkem při mykózách, určený k místnímu použití. Působí na patogenní a podmíněně patogenní houby rodu *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Aspergillus*, *Nocardia* a některé další mikromycety<sup>1</sup>.

Na jeho stanovení byla vyvinuta celá řada analytických postupů. Nejjednodušší je přímá spektrofotometrie v UV oblasti<sup>2</sup>. Další užívanou metodou je kapilární zónová



Obr. 1. Strukturní vzorec (a) klotrimazolu, (b) imidazolu a (c) (2-chlorofenyl)difenylmethanolu<sup>6</sup>

elektroforéza (CZE) s UV detekcí<sup>3–5</sup>. Nejčastěji používanou technikou pro stanovení klotrimazolu, jeho nečistot, ale i pro současné stanovení více léčiv, je HPLC s UV detekcí<sup>6–9</sup>.

Cílem této práce bylo upravit podmínky HPLC pro současné stanovení obsahu klotrimazolu a jeho degradačních produktů – (2-chlorofenyl)difenylmethanolu a imidazolu – v přípravku Clotrimazol spray 1 %. Uvedené látky (obr. 1) mají výrazně odlišné hodnoty  $pK_a$ , imidazol se svým bazickým charakterem odlišuje od účinné látky.

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

### Experimentální část

#### Přístrojové vybavení

Měření byla prováděna na HPLC sestavě Breeze, která se skládala z gradientové pumpy Waters 1525, automatického dávkovače vzorků Waters 717 Plus a dvoukanalového detektoru UV/VIS Waters 2487. Celý systém byl řízen softwarem Breeze (Waters Corp., USA).

K vývoji metody pro separaci analyzovaných látek byly použity tyto kolony: Discovery HS F5, 150 × 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich); Chromolith<sup>®</sup> Performance, RP-18e, 100 × 3 mm (Merck); ZIC<sup>®</sup> HILIC, 50 × 2,1 mm, velikost částic 3,5  $\mu\text{m}$  (SeQuant); XTerra<sup>®</sup> RP 18, 100 × 3 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (Waters); Discovery RP Amide C 16, 250 × 3 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich); Zorbax Extend-C18, 75 × 4,6 mm, velikost částic 3,5  $\mu\text{m}$  (Agilent Techn.); Discovery ZR-PBD, 150 × 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich).

#### Použité chemikálie

Pro přípravu roztoku standardů byly použity tyto chemikálie: klotrimazol, Amoli Organics Ltd, Mumbai, Indie (obsah 100,12 %); (2-chlorofenyl)difenylmethanol, téhož výrobce; imidazol ACS reagent, Sigma-Aldrich, Německo, pracovní standard; ibuprofen 98 % (GC), Sigma-Aldrich, Německo.

Pro přípravu mobilní fáze byly použity tyto chemikálie: ultračistá voda, Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA); acetonitril pro chromatografii, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo a methanol pro chromatografii, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo.

Na úpravu pH mobilní fáze byla použita kyselina fosforečná, 85% p.a., Merck a amoniak – vodný roztok

\* P. Žáková úspěšně prezentovala tuto práci v soutěži O cenu firmy Merck 2008.

25 %, Lachema, Neratovice.

Standardní roztok (50 mg klotrimazolu; 5 mg nečistot; 20 mg ibuprofenu) byl připraven rozpuštěním příslušného množství klotrimazolu, (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, imidazolu a ibuprofenu (vnitřní standard) a doplněním acetonitrem do 100,00 ml.

Mobilní fáze byla připravena z ultračisté vody, pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu 5% kyselinou fosforečnou, nebo 25% roztokem  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Výsledný roztok byl přefiltrován přes membránový filtr 0,45  $\mu\text{m}$ . Byla použita polární rozpouštědla acetonitril a methanol, která mají vysokou čistotu a jsou určené pro kapalinovou chromatografii. Mobilní fáze pro kolonu ZIC<sup>®</sup> HILIC byla připravena z roztoku kyseliny octové (acetonitril/0,5 mM kyselina octová 80:20), pH bylo upraveno vodným amoniakem. Poměr vodné a organické složky byl nastaven při programování HPLC pumpy.

#### Experimentální podmínky

Celkem bylo testováno 7 uvedených chromatografických kolon. Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě, s výjimkou testování robustnosti. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka 210 nm.

Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vody v různých poměrech a o různém pH. Výjimku tvořila pouze kolona ZIC<sup>®</sup> HILIC, u které se jako mobilní fáze používala směs acetonitrilu a 0,5 mM kyseliny octové.

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

## Výsledky a diskuse

### Výběr vhodné chromatografické kolony

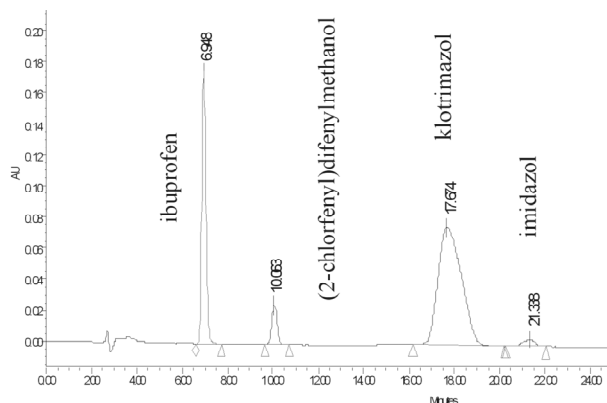
#### Discovery HS F5

Pentafluorfenylpropyl kolony jsou vhodné svou retencí a selektivitou zejména pro bazické a halogenované látky. Navázaná fáze na této koloně umožňuje separaci, která je zpravidla odlišná od separace na C18, nicméně retenční časy jsou většinou stejné. Obecně jsou bazické látky zadržovány na HS F5 více než na C18 (cit.<sup>10</sup>).

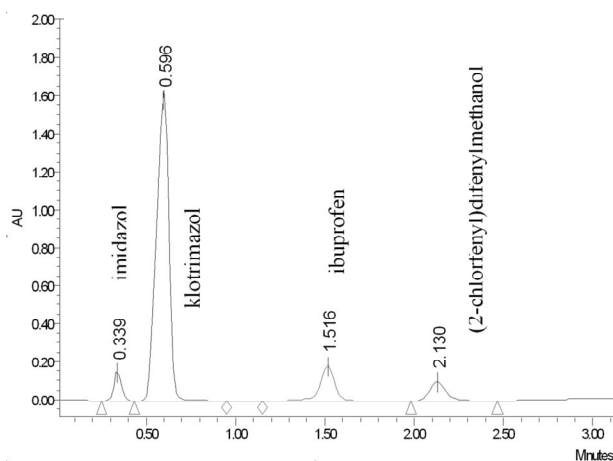
Při analýze byl klotrimazol zadržován na koloně, a proto tato kolona za uvedených podmínek (mobilní fáze: acetonitril – voda 65:35, pH 3,45) není vhodná pro separaci klotrimazolu od ostatních analyzovaných látek (obr. 2).

#### Chromolith<sup>®</sup> Performance, RP-18e

Tato kolona není plněna tradičními částicemi oxidu křemičitého. Je tvořena blokem oxidu křemičitého, který je pokryt *n*-alkylovými řetězci. Pórovitost je větší než 80 %. Makropóry snižují zpětný tlak kolony, tím dovolují použít vyšší průtok, a proto značně klesá doba analýzy. Mesopóry tvoří pórovitou strukturu a poskytují velkou aktivní plochu



Obr. 2. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,45 5% kyselinou fosforečnou), při průtoku mobilní fáze 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ , kolona Discovery HS F5 (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4,6 mm)



Obr. 3. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze methanol – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,2 5% kyselinou fosforečnou). Průtok mobilní fáze 2,5 ml  $\text{min}^{-1}$ , Chromolith<sup>®</sup> Performance, RP-18e (100  $\times$  3 mm)

pro efektivní separaci. Monolitní kolona má ve srovnání s kolonami o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$  a stejné délce čtyřikrát nižší zpětný tlak. Rozlišení píků zůstává prakticky nezměněné<sup>11</sup>.

Chromatogramy vykazovaly symetrické a úzké píky analyzovaných látek, analýza do pH 3,45 nebyla výrazně závislá na změnách pH. Imidazol měl velmi krátký retenční čas, při kterém by mohlo docházet k interferencím s píkem odpovídajícím mrtvému času a následnému ovlivnění výsledků analýz složkami matrice vzorku (obr. 3).

Při použití mobilní fáze methanol – voda se mírně prodloužil retenční čas imidazolu, ale ne natolik, aby se ho podařilo úplně oddělit od mrtvého času.

**ZIC® HILIC**

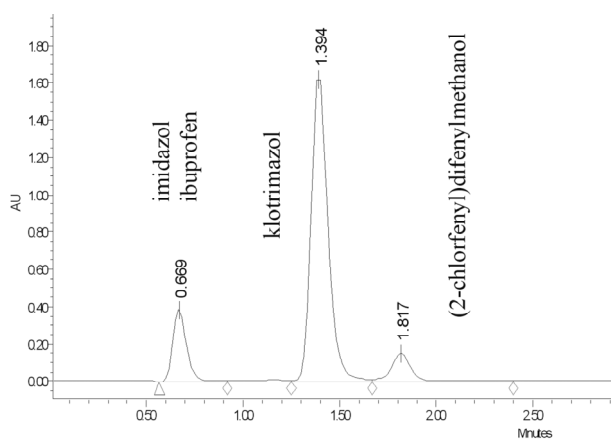
Kolona ZIC® HILIC je vhodná volba pro separaci polárních a hydrofilních sloučenin. Analyty jako aminokyseliny, peptidy, sacharidy, rostlinné extrakty a různé polární sloučeniny mají obecně silnou retenci na této koloně. Stacionární fáze je pevně zakotvená na pórovitém oxidu křemičitém. Separace je dosaženo hydrofilním dělicím mechanismem znásobeným slabými elektrostatickými interakcemi. Typická mobilní fáze obsahuje vysoký podíl organických rozpouštědel (např. acetonitril) smíšených s pufrem<sup>12</sup>.

Byla proměřena různá pH a různé poměry mobilních fází, ale ani na této koloně se nepodařilo směs rozdělit.

**XTerra® RP 18**

Tato kolona byla připravena novou metodou syntézy hybridu, který obsahuje jak anorganické (např. silikagel), tak organické (např. organosiloxany) elementy, a poskytuje tedy výhody obou těchto materiálů. Výsledkem je sorbent s minimálně o 1/3 nižším obsahem volných silanolových skupin. Tato skutečnost zaručuje symetrické píky bazických sloučenin. Sorbent je dlouhodobě použitelný při pH 1–12 (cit.<sup>13</sup>).

Při pH vodné složky 7,25 a poměru organické (acetonitril) a vodné složky 65:35 byly získány symetrické tvary píků (obr. 4). Analýza trvala 2 minuty, ale při stejném retenčním čase eluoval imidazol, ibuprofen a jodid draselný, který se používá k identifikaci mrtvého objemu kolony. Při použití mobilní fáze o pH vodné složky 11 a poměru organické a vodné složky 65:35 se podařilo rozdělit ibuprofen a imidazol, ale přiblížily se píky klotrimazolu k (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, což zhoršilo jejich rozlišení.



Obr. 4. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 7,25 5% kyselinou fosforečnou). Průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>, XTerra® RP 18 (5 μm, 100 × 3 mm)

**Discovery RP Amide C 16**

Polární amidová skupina v stacionární fázi poskytuje menší retenci a vyšší selektivitu ve srovnání s kolonou C18, je totiž méně hydrofobní než klasické fáze C18. Kolona Discovery RP Amide C 16 vyniká velmi dobrou selektivitou, reprodukovatelností, dostatečnou retencí a rozlišením pro polární analyty i dlouhou životností<sup>14</sup>.

Při použití mobilní fáze o pH vodné složky 3 a 3,5 a poměru organické a vodné složky 65:35 se dělí imidazol a klotrimazol jen neúplně. Při pH 3,8 a vyšším se píky rozšiřují a deformují. Imidazol eluoval při nízkém retenčním čase, kdy je pravděpodobná interference s mrtvým objemem kolony.

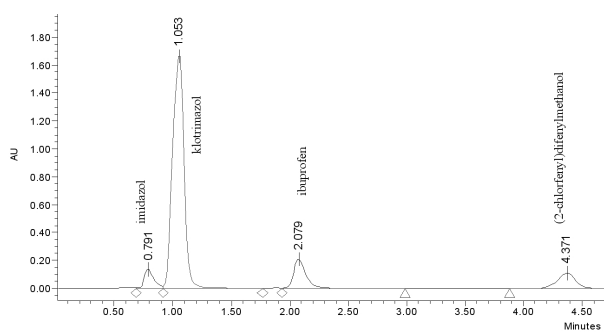
**Zorbax Extend-C18**

Kolony Zorbax Extend-C18 jsou vhodné díky dvojité vázanému můstku mezi skupinami C18. Tento typ sorbentu umožňuje práci i při velmi vysokém pH, protože bazické sloučeniny nemohou interagovat se silikagelem. Mobilní fáze při vyšším pH obsahují např. triethylamin, pyrrolidin, glycin nebo vodný amoniak. Kolony jsou vhodné pro bazické sloučeniny, jsou účinnější než některé polymerní kolony a vykazují lepší tvar píků<sup>15</sup>.

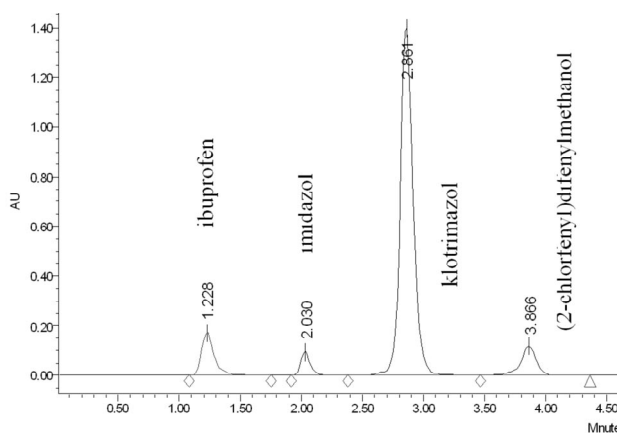
Při použití mobilní fáze o pH vodné složky 3 a 3,5 a poměru organické a vodné složky 65:35 se rozdělí imidazol a klotrimazol jen neúplně (obr. 5). Při pH 4 a vyšším ionizuje ibuprofen a zkracuje se retenční čas, který je stejný jako retenční čas imidazolu. Ani při pH 11 se nedaří oddělit imidazol. Imidazol eluuje při nízkém retenčním čase, kdy interferuje s mrtvým časem.

**Discovery ZR-PBD**

Oxid zirkoničitý lze získat i ve formě monodisperzních poréznych kulových částic. Kolony plněné touto fází vykazují srovnatelnou účinnost s kolonami silikagelovými. Největší výhodou oxidu zirkoničitého je jeho chemická a tepelná stabilita: je stálý v celém rozsahu pH při vysokém tlaku a teplotě až do 200 °C. HPLC kolony



Obr. 5. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,5 5% kyselinou fosforečnou). Průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>, Zorbax Extend-C18 (3,5 μm, 75 × 4,6 mm)



Obr. 6. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 50:50 (pH vodné složky upraveno na 9,5 vodným 25% amoniakem). Průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>, kolona Discovery ZR-PBD (5 μm, 150 × 4,6 mm)

s ZrO<sub>2</sub> mohou být použity za extrémních podmínek a mají delší životnost. Tím se také snižuje cena za analýzu a rozšiřují se možnosti použití různých chromatografických podmínek. Povrch oxidu zirkoničitého se modifikuje tenkou vrstvou polybutadienu<sup>16</sup>.

Separace probíhá na obrácených fázích, jeho iontově-měnná chromatografie při pH od 1 do 13. Významný rozdíl mezi Discovery Zr-PBD a C18 kolonou je ten, že na koloně s ZrO<sub>2</sub> může být použito bazické mobilní fáze a zvýšené teploty. Za těchto podmínek mají bazické sloučeniny lepší tvar píků (jsou ostré a symetrické)<sup>17</sup>.

Při použití mobilní fáze o pH vodné složky 3 a 3,5 se nepodařilo oddělit pík klotrimazolu od píků nečistot. Při pH 5 se píky klotrimazolu a (2-chlorofenyl)difenylmethanolu rozšířily a při pH 9 pak rozdělily; pík imidazolu se částečně oddělil. Při pH 11 se již všechny píky dokonale rozdělily. Za těchto podmínek byla tedy provedena konečná validace metody (obr. 6).

#### Výběr vnitřního standardu

V rámci výběru vnitřního standardu bylo testováno 20 různých látek, většinou léčiv, ze kterých pouze dvě odpovídaly požadavkům analýzy – byly dokonale separovány od mrtvého objemu kolony a ostatních analyzovaných látek a jejich retenční časy příliš neprodlužovaly analýzu. Vybranými standardy byly verapamil a ibuprofen. Jejich praktické využití bylo otestováno validačním parametrem – robustností. Tímto postupem bylo zjištěno, že už malá změna pH mobilní fáze vede k velkému posunu retenčního času verapamilu, zatímco retenční časy ibuprofenu jsou stabilnější. Proto byl nakonec vybrán jako vnitřní standard ibuprofen. Hodnoty získané v testu robustnosti jsou uvedeny v následujícím oddíle.

Tabulka I

Nalezené optimální podmínky pro stanovení klotrimazolu s použitím ibuprofenu jako vnitřního standardu

Mobilní fáze	acetonitril-voda (50:50), pH vodné složky upraveno 25% amoniakem na 9,7
Kolona	Discovery ZR-PBD, 5 μm, 150 × 4,6 mm
Průtok Fm	1 ml min <sup>-1</sup>
Vlnová délka λ	210 nm
Dávkovaný objem	3 μl
Teplota	laboratorní
Vnitřní standard	Ibuprofen

#### Testování robustnosti

Robustnost byla testována pro roztok standardů s vnitřním standardem ibuprofenem. Byl sledován vliv změny pH mobilní fáze v oblasti 9,2–11.

Retenční čas ibuprofenu se pohyboval v rozmezí 1,37–1,15 min, imidazolu 2,74–1,73 min, klotrimazolu 2,95–2,67 min a (2-chlorofenyl)difenylmethanolu 3,91–3,63 min. Se stoupajícím pH vodné složky mobilní fáze (v uvedené oblasti) se snižovaly retenční časy všech píků v důsledku zvýšené ionizace. Dále byl testován vliv pH na plochu jednotlivých píků, změny se pohybovaly v rozmezí 91,04 až 104,49 %.

V posledním testu byl sledován vliv zvýšené pracovní teploty v rozmezí 25–60 °C, změna plochy píků stanovených látek se pohybovala od 96,24 do 100,00 %, ve srovnání s používanou laboratorní teplotou. Při zvýšené teplotě se analýzy zkracují. Změny v retenčních časech byly následující: 1,73–1,69 min pro imidazol, 2,75–2,44 min pro klotrimazol a 3,76–3,25 min pro (2-chlorofenyl)difenylmethanol.

Výsledky ukazují pouze malou změnu retenčních časů a ploch píků a tím prokazují vysokou robustnost prezentované metody, která je požadována při rutinním využití pro stanovení klotrimazolu v uvedeném přípravku.

#### Závěr

Byla vypracována metoda HPLC pro hodnocení obsahu klotrimazolu a jeho degradačních produktů (2-chlorofenyl)difenylmethanolu a imidazolu v přípravku Clotrimazol spray 1 %. Optimální podmínky jsou uvedeny v tab. I.

*Tento výzkum byl finančně podporován výzkumným záměrem MSM 0021620822.*

## LITERATURA

1. [http://www.sukl.cz/\\_download/pil/PI64167.doc](http://www.sukl.cz/_download/pil/PI64167.doc), staženo 18. 6. 2007.
2. Iliaszenko J., Sokolowska M., Paruszewski R.: *Acta Pol. Pharm.* 58, 411 (2001).
3. Arranz A., Echevarria C., Moreda J. M., Cid A., Arranz J. F.: *J. Chromatogr., A* 871, 399 (2000).
4. Crego A. L., Gomez J., Marina M. L., Lavandera J. L.: *Electrophoresis* 22, 2503 (2001).
5. Crego A. L., Marina M. L., Lavandera J. L.: *J. Chromatogr., A* 917, 337 (2001).
6. Solich P., Hájková R., Pospíšilová M., Šícha J.: *Chromatographia* 55, 181 (2002).
7. Abdel-Moety E. M., Khattab F. I., Kelani K. M., AbouAl-Alamein A. M.: *Farmaco*, 57, 931 (2002).
8. Gagliardi L., de-Orsi D., Chimenti P., Porra R., Tonelli D.: *Anal. Sci.* 19, 1195 (2003).
9. Hájková R., Sklenářová H., Matysová L., Švecová P., Solich P.: *Talanta* 73, 483 (2007).
10. [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/HS\\_F5.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/HS_F5.html), staženo 11/2007.
11. [www.chromatography.merck.de](http://www.chromatography.merck.de), staženo 11/2007.
12. [http://www.sequant.com/sn/p\\_details.php?id=7](http://www.sequant.com/sn/p_details.php?id=7), staženo 11/2007.
13. <http://www.waters.cz/ie/index.html>, staženo 11/2007.
14. [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/Discovery\\_RP\\_Amide\\_C16\\_HPLC\\_Columns.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/Discovery_RP_Amide_C16_HPLC_Columns.html), staženo 11/2007.
15. <http://www.labicom.cz/default.aspx?server=1&article=293&section=23>, staženo 11/2007.
16. [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz), staženo 11/2007.
17. [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/discovery\\_zr\\_pbd.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/discovery_zr_pbd.html), staženo 10/2007.

**P. Žáková, H. Sklenářová, L. Havlíková, L. Matysová, and D. Šatinský** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Optimization of HPLC Determination of Clotrimazole**

A HPLC method for the determination of clotrimazole and its degradation products. (2-chlorophenyl) diphenylmethanol and imidazole, in Clotrimazol spray 1 % was developed.

The development was focused on the selection of an optimal column, composition and pH of the mobile phase, and internal standard. A Discovery ZR-PBD column (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4.6 mm) and spectrophotometric detection at 210 nm were selected. The optimal mobile phase was aqueous acetonitrile 1:1 (pH 9.7). The optimal injection volume and flow-rate were 3  $\mu\text{l}$  and 1  $\text{ml min}^{-1}$ , respectively. On the basis of robustness tests, ibuprofen was used as the internal standard. The analysis time was less than 4.5 min.

---

## ERRATA NA VYŽÁDÁNÍ AUTORŮ

---

*Následující projekty byly vypracovány v rámci výzkumného záměru MŠMT ČR č. MSM 6046137308.*

Říhová Ambrožová J., Bezděková E., Loučková P., Nekořová J., Karásková M., Rakušan J., Černý J., Kořínková R.: Využití ftalocyaninových preparátů šetrných k prostředí k ochraně okruhů chladicích vod před růstem řas a sinic. *Chem. Listy* 101, 315 (2007).

Kujalová H., Sýkora V., Pitter P.: Látky s estrogením účinkem ve vodách. *Chem. Listy* 101, 706 (2007).

Švehla P., Jeníček P., Habart J., Hanč A., Černý J.: Využití akumulace dusitanů při biologickém čištění odpadních vod. *Chem. Listy* 101, 776 (2007).

Říhová Ambrožová J., Matulová T.: Biologické audity chladicích vod. *Chem. Listy* 101, 820 (2007).