

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA DEBERNARDI

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA DEBERNARDI

**DOLOČITEV VSEBNOSTI, STABILNOSTI TER
SPROŠČANJA DEKSPANTENOLA IN KLOORHEKSIDINA IZ
NOVEGA POLTRDNEGA GALENSKEGA PRIPRAVKA**

**DETERMINATION OF CONTENT, STABILITY AND
RELEASE OF DEXPANTHENOL AND CHLORHEXIDINE
FROM A NEW SEMI-SOLID GALENIC PRODUCT**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Zahvala

Najprej bi se rada zahvalila svojemu mentorju Juriju Trontlju, za vso prijaznost, potrpežljivost in dostopnost v času izdelave magistrske naloge. Zahvalila bi se tudi vsem svojim prijateljem, ki so mi polepšali študentska leta. Največja zahvala pa gre mojim staršem, ki so mi omogočili študij in so me vsa ta leta brez pogojno podpirali ter moji sestri ki mi je s svojo podporo in nasveti olajšala in polepšala študentska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja.

Ljubljana, 2016

Tina Debernardi

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Članica komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

VSEBINA

POVZETEK	IV
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
UVOD	1
1.1. Poltrdne dermalne farmacevtske oblike	1
1.1.1. Geli	1
1.1.2. Mazila	2
1.1.3. Kreme	2
1.1.4. Paste	2
1.2. Dekspantenol	3
1.2.1. Uporaba	3
1.2.2. Stabilnost in topnost	3
1.3. Klorheksidin	4
1.3.1. Soli klorheksidina in njihova topnost	4
1.3.2. Delovanje klorheksidina	5
1.3.3. Stabilnost in reaktivnost klorheksidina	5
1.3.4. Razpadni produkti in nečistote	6
1.4. Testi za poltrdne dermalne farmacevtske oblike in vsebovane učinkovine	6
1.4.1. Farmakopejski testi za poltrdne dermalne farmacevtske oblike	6
1.4.1.1. Test sterilnosti	6
1.4.2. Testi za dekspantenol	6
1.4.2.1. Identifikacija	7
1.4.2.2. Vsebnost	7
1.4.2.3. Ostali testi	7
1.4.3. Testi za klorheksidin	8
1.4.3.1. Identifikacija	8
1.4.3.2. Vsebnost	8
1.4.3.3. Ostali testi	8
1.4.4. In vitro sproščanje	9
1.4.4.1. Izbor difuzijske celice	9
1.4.4.2. Izbor membrane	9
1.4.4.3. Izbor akceptorskega medija	10
1.4.4.4. Ostali parametri	10
1.4.4.5. Sestava Franzove celice	10
1.5. Kromatografija	11
1.5.1. Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (»HPLC«)	11
1.6. Galenski izdelki	12
2. NAMEN DELA	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1. Materiali	15
3.1.1. Reagenti	15
3.1.2. Mobilne faze	15

3.1.3.	Standardi in vzorci	15
3.2.	Aparature in laboratorijski material	16
3.3.	Metode	17
3.3.1.	Priprava mobilne faze, standardov ter vzorcev za analizo	17
3.3.1.1.	0,05% H ₃ PO ₄	17
3.3.1.2.	Acetonitril	17
3.3.1.3.	Priprava osnovnega standarda dekspantenola	17
3.3.1.4.	Priprava osnovnega standarda klorheksidina	17
3.3.1.5.	Priprava vzorcev za določanje linearnosti in točnosti metode v gelu	18
3.3.1.6.	Priprava vzorcev za določanje linearnosti in točnosti metode v kremi Bepanthen plus	18
3.3.1.7.	Priprava vzorcev gela za analizo vsebnosti	19
3.3.1.8.	Priprava vzorcev kreme Bepanthen plus za analizo vsebnosti	19
3.3.1.9.	Priprava vzorcev gela za stresne teste	20
3.3.1.10.	Priprava vzorcev kreme Bepanthen plus za stresne teste	20
3.3.2.	Analiza vzorcev s HPLC	20
3.3.3.	Obdelava rezultatov	21
3.4.	Validacija analizne metode	22
3.4.1.	Ponovljivost analizne metode	22
3.4.2.	Linearnost analizne metode	22
3.4.3.	Točnost analizne metode	23
3.4.4.	Specifičnost analizne metode	23
3.4.5.	Robustnost analizne metode	23
3.5.	Stabilnost	23
3.6.	Sproščanje	24
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1.	Identifikacija	25
4.1.1.	Identifikacija dekspantenola	25
4.1.2.	Identifikacija klorheksidina	26
4.2.	Vsebnost	29
4.2.1.	Vsebnost dekspantenola	30
4.2.2.	Vsebnost klorheksidina	32
4.3.	Validacija	32
4.3.1.	Linearnost metode	32
4.3.2.	Ponovljivost metode	37
4.3.3.	Točnost metode	39
4.3.4.	Specifičnost metode	42
4.3.5.	Robustnost metode	43
4.3.6.	Stabilnost	48
4.3.6.1.	Stabilnost pri različnih temperaturah	48
4.3.6.2.	Stabilnost ob dodatku stresnih raztopin	51
4.4.	Sproščanje	62
4.5.	Pomanjkljivosti in predlogi za nadaljnje delo	67
5.	SKLEP	68
6.	LITERATURA	69

POVZETEK

V farmaciji se poltrdne dermalne farmacevtske oblike velikokrat uporablja za lokalno in sistemsko dostavo učinkovin. V to skupino spadajo tudi geli, ki so sestavljeni iz tekoče faze ujete znotraj tridimenzionalne polimerne strukture. V galenskem laboratoriju Obalnih lekarn so izdelali gel na vodni osnovi z ogrođjem iz karbomera, namenjen za nego s soncem opečene kože. Vsebuje dve učinkovini, in sicer dekspantenol in klorheksidin. Lokalno uporabljen dekspantenol zaradi svoje higroskopičnosti vlaži kožo, pospešuje celjenje ran ter deluje protivnetno, hitro prodira v kožo, kjer se pretvori v pantotensko kislino. Klorheksidin pa deluje protibakterijsko, zato ga uporabljamo kot antiseptik.

V okviru razvoja novega izdelka potrebujemo analizno metodo za določitev vsebnosti, ki je pomembna tako z vidika kontrole kakovosti kot tudi stabilnosti. Ker imamo prisotni dve učinkovini, smo izbrali HPLC metodo, ki načeloma omogoča dobro separacijo in ločeno kvantifikacijo več komponent v vzorcu. Zaradi velike razlike v hidro- in lipofilnosti obeh učinkovin smo razvili reverzno fazno kromatografsko metodo z gradientnim izpiranjem kolone. Metodo smo validirali z določanjem točnosti, ponovljivosti, specifičnosti, izkoristka in stabilnosti. Med testiranjem pa smo ugotovili, da analizirani gel ne vsebuje klorheksidina, ampak vsebuje neznano sorodno snov, ki pa je v okviru naše magistrske naloge nismo uspeli identificirati.

Za preučevanje stabilnosti novega izdelka smo ga izpostavili različnim stresnim dejavnikom, kot so raztopina vodikovega peroksida, kisline, baze, UV sevanje, povišana temperatura. Stabilnost novega izdelka smo primerjali s stabilnostjo podobnega pripravka, ki je že na tržišču, t.j. s kremo Bepanthen plus. Ugotovili smo, da sta obe učinkovini tudi v kremi stabilni pri vseh testiranih temperaturah (-20°C, 25°C, 40°C) in občutljivi na bazo, razlika je le v tem, da v kremi razpad obeh učinkovin poteka počasneje v primerjavi z gelom.

Določali smo tudi sproščanje dekspantenola iz gela s pomočjo Franzovih difuzijskih celic. Za primerjavo smo izvedli enak test s kremo Bepanthen plus in ugotovili, da se pri naših eksperimentalnih pogojih dekspantenol hitreje sprošča iz gela kakor iz kreme. Podatkov o sproščanju klorheksidina iz gela nimamo, ker ga gel ne vsebuje, saj je prisoten namesto tega le neznani transformacijski produkt, čigar sproščanje smo sicer spremljali; iz kreme Bepanthen plus pa se klorheksidin pri testiranih eksperimentalnih pogojih ni sproščal.

Zaključimo lahko, da smo uspešno razvili in uporabili analizni metodi za določanje vsebnosti ter sproščanje dekspantenola iz poltrdnih farmacevtskih oblikah ter ju aplicirali na novo formulacijo slovenskega galenskega laboratorija.

Ključne besede: gel, dekspantenol, klorheksidin, HPLC, validacija metode, stabilnost, sproščanje učinkovine

ABSTRACT

In the field of pharmacy dermal semisolid products are often used for local and systemic substance application. Gels, which consist of a liquid phase in a three dimensional polymeric structure, also belong to this group of products. In the Galenic Laboratory of Obalne lekarne a water-based gel was formulated, which has a carbomer matrix and is intended for sunburn treatment. It contains two active pharmaceutical ingredients (API), dexpanthenol and chlorhexidine. Dexpanthenol, when used locally, keeps the skin moist, increases wound healing, it has an anti-inflammatory effect, it penetrates quickly through the skin where it undergoes transformation to pantothenic acid. Chlorhexidine, on the other hand, has an antibacterial effect and is used as an antiseptic.

In the development of the new product an analytical method of content determination is needed, which is important for both quality and stability control. Since two API's are present, we selected the HPLC method (High-performance Liquid Chromatography) which enables good separation and quantification of each of the components in one sample. Due to a great difference in hydrophilicity and lipophilicity of both substances, we developed a method of reversed phase chromatography with gradient elution. We validated the method for accuracy, repeatability, specificity, efficiency and stability. During the testing we found out that the analyzed gel does not contain chlorhexidine. Instead, it contains a similar substance, which could not be identified in this master thesis.

In order to study the stability of the new product, we exposed it to various stress factors, such as the hydrogen peroxide solution, acid and base solutions, ultraviolet radiation, and decreased and elevated temperatures. The stability was then compared to the stability of a similar product, the cream Bepanthen plus, which is already introduced to the market. The results showed that both API's, found in the cream as well, under the tested temperature

conditions show stability and are sensitive to the base; the only difference is in degradation rate which is much slower in cream compared to gel formulation.

The release of dexpanthenol from the gel was also determined; this was carried out with Franz diffusion cells. To make a comparison, the same test was performed with Bepanthen plus and the result showed that under our experimental conditions, the dexpanthenol release was much faster from the gel than from cream. The release of chlorhexidine could not be determined due to its absence in the gel formulation. Instead, we monitored the release of the unknown chlorhexidine-related substance. There was no measurable chlorhexidine release in the cream under the tested experimental conditions.

Conclusion: we managed to successfully develop the analytical methods for content and dissolution tests for dexpanthenol gel preparations and we applied those methods to test the newly developed gel formulated by the Slovene Galenic Laboratory Obalne Lekarne.

Key words: gel, dexpanthenol, chlorhexidine, TLC method, method validation, stability, substance release.

SEZNAM OKRAJŠAV

A – površina pod kromatografskim vrhom

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

RSD – relativna standardna deviacija

SD – standardna deviacija

P – vodikov peroksid

B – baza

K – kislina

T - temperatura

1. UVOD

1.1. Poltrdne farmacevtske oblike

Poltrdne dermalne farmacevtske oblike predstavljajo velik delež farmacevtskih oblik. Njihova prednost je enostavna aplikacija ter možnost topikalne dostave raznolikih učinkovin (1). Namenjene so lokalni ali transdermalni dostavi učinkovin ter pomirjanju in zaščiti kože. Sterilne morajo biti takrat, ko jih nanesemo na večje odprte rane ali na obsežno poškodovano kožo. Biti morajo enakomerne konsistence, tako da ko jih namažemo na kožo, na njej ne ostanejo trdi delci (2).

Poltrdne dermalne farmacevtske oblike so sestavljene iz podlage, v kateri je lahko raztopljena ali enakomerno razpršena ena ali več učinkovin. Podlaga, ki je lahko enofazna ali večfazna, vsebuje poleg učinkovine tudi ustrezne pomožne snovi, kot so emulgatorji, stabilizatorji, zgoščevala, konzervansi, protimikrobna sredstva, antioksidanti ter izboljševalci penetracije. Glede na sestavo podlage ločimo hidrofilne in hidrofobne oblike (3). Podlaga ne sme kože dražiti ali povečati njene občutljivosti ter ne sme podaljšati njenega celjenja. Mora biti lahko mazljiva, inertna, brez vonja, fizikalno in kemično stabilna ter kompatibilna s kožo in z ostalimi sestavinami. Fizikalna nestabilnost se kaže v vidno spremenjeni konsistenci, tvorbi aglomeratov, spremembi barve, tvorbi kristalov ali v vidni prisotnosti mikroorganizmov (2).

Pod poltrdne dermalne farmacevtske oblike spadajo: geli, kreme, mazila, paste, vroči obkladki (kataplazme) ter zdravilni in dermalni obliži.

1.1.1. Geli

Geli so poltrdne dermalne farmacevtske oblike, sestavljene iz tekoče faze, ki je ujeta znotraj tridimenzionalne polimerne strukture. Njihova viskoznost je odvisna od vrste uporabljenega polimera. Ločimo hidrogelne in oleogelne oz. lipofilne gele (2). Poznamo pa tudi tiksotropne gele (9).

Hidrogeli so farmacevtske oblike, ki imajo za osnovo vodo, glicerol ali propilen glikol, gelirane pa so s primernim tvorilcem gela, kot so škrob, derivati celuloze, karbomeri in aluminijevi - magnezijevi silikati. Njihova sposobnost absorpcije vode izhaja iz hidrofilnih skupin vezanih na polimerno verigo, medtem ko jim vezava med posameznimi

polimernimi verigami (»cross-link«) omogoča, da se ne raztapljajo. Dodane imajo tudi konzervanse, ki vzdržujejo mikrobiološko stabilnost hidrogelov (3).

Oleogeli so farmacevtske oblike, ki imajo za osnovo tekoči parafin s polietilenom ali maščobna olja, gelirani so s tvorilcem gela, kot so koloidni silicijev dioksid, aluminijevi in cinkovi ioni (3).

Izraz tiksotropnost pomeni zmožnost tekočine, da prehaja iz sol v gel stanje z mešanjem. Tiksotropni gel se ob mešanju utekočini; vezi v takem gelu so šibke, zato se prekinejo, če gel mešamo (9).

V okviru naše naloge bomo razvili analizno metodo, s katero bomo lahko hkrati določali vsebnost, sproščanje in stabilnost dekspantenola in klorheksidina, ki jih vsebuje na novo razviti hidrogel. Osnova hidrogela je voda, ki je v tem primeru gelirana s karbomerom, ki služi kot tridimenzionalna struktura gela. Namen tega novega pripravka je pomirjanje in zdravljenje s soncem opečene kože.

1.1.2. Mazila

Mazila so enofazne poltrdne dermalne farmacevtske oblike, v katerih so lahko dispergirane tekoče ali trdne snovi. Glede na tip podlage jih delimo na hidrofilna, hidrofobna in vodo-emulgirajoča mazila (3). Po aplikaciji na kožo ali sluznico se njihova sestava zmežča, vendar se ne raztopi. Primarno se uporabljajo za topikalno dostavo učinkovin, vendar jih uporabljajo tudi za zaščito in mehčanje kože (1).

1.1.3. Kreme

Kreme so dvofazne poltrdne dermalne farmacevtske oblike, pri katerih je ena faza lipofilna, druga faza pa hidrofilna. Glede na sestavo zunanje faze jih ločimo na hidrofilne in hidrofobne kreme (3). V naši nalogi bomo analizirali hidrofobno kremo Bepanthen plus, ki je že na tržišču in je po vsebnosti učinkovin in namenu uporabe podobna naši testni formulaciji.

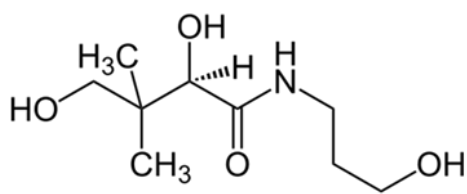
1.1.4. Paste

Paste so poltrdne dermalne farmacevtske oblike, ki vsebujejo velik delež (več kot 20 %) trdnih delcev enakomerno dispergiranih v podlagi, katera je lahko hidrofilna ali lipofilna

(2). Njihove lastnosti so odvisne od vrste trdnih delcev in podlage. Uporablja se jih lokalno za zaščito in pomirjanje kože, v kožo pa ne penetrirajo (10).

1.2. Dekspantenol

Dekspantenol (slika 1) je biološko aktiven D izomer pantenola. Je stabilen alkoholni derivat pantotenske kisline, poznan tudi kot provitamin B5. Po izgledu je brezbarvna oziroma rahlo rumenkasta viskozna in higroskopska tekočina. Zaradi njegovih fizikalno-kemijskih lastnosti lahko penetrira globoko v kožo in veže vodo (4). Po penetraciji se pretvori v pantotensko kislino, ki je prekursor v sintezi koencima A. V obliki kisline ima pomembno vlogo v Krebsovem ciklu in v celičnih procesih (8). Raziskave so pokazale, da dekspantenol izboljša aktivnost mitohondrijev (celično regeneracijo), pospešuje epitelizacijo in granulacijo pri opeklinah, ekcemih, radioterapiji in plastični kirurgiji, izboljša simptome vnetja, olajša srbenje ter stimulira pigmentacijo (4).



Slika 1: Dekspantenol

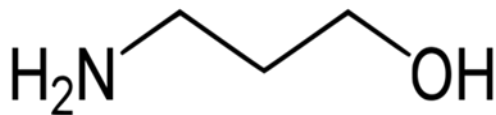
1.2.1. Uporaba

Lokalno ga uporabljamo pri opeklinah za pospešitev epitelizacije, pri iritacijah, vnetjih in poškodbah mukoze ter pri onkološki radioterapiji. Sistematsko ga uporabljamo kot preventivo in profilakso v primerih, ko pride do resnega pomanjkanja vitaminov, katerega ne moremo odpraviti z normalno prehrano: malabsorpcija, slaba prebava, slabo prehranjevanje, kronična dializa, rizična nosečnost (4).

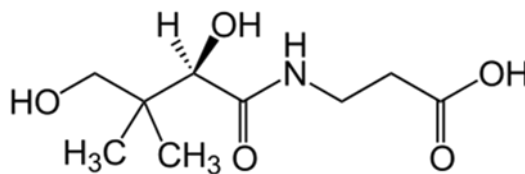
1.2.2. Stabilnost in topnost

Dekspantenol je stabilen pri sobni temperaturi, na svetlobi in zraku, ampak ni stabilen pri visokih temperaturah. Pri temperaturah nad 70°C lahko pride do racemizacije in razpada na 3-aminopropan-1-ol (slika 2) in se pretvarja v pantotensko kislino (slika 3). Stabilen je v nevtralnih in rahlo kislih vodnih raztopinah (pH 4-6), nestabilen pa je v kislih in bazičnih vodnih raztopinah (hidrolitični razpad). Priporočljiv pH za dekspantenol je med 4-8 (4).

Dekspantenol je dobro topen v vodi in alkoholih (etanol, metanol), zmerno topen v glicerolu, malo topen v etru in netopen v rastlinskih in mineralnih oljih ter v maščobah (4).



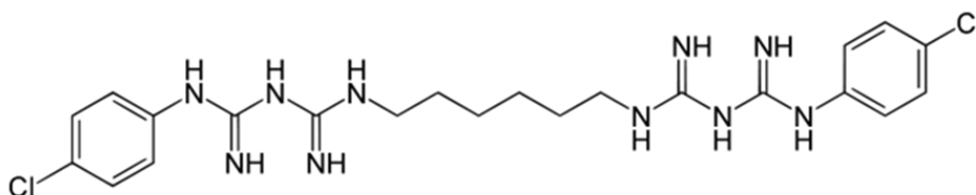
Slika 2: 3-aminopropan-1-ol



Slika 3: Pantotenska kislina

1.3. Klorheksidin

Klorheksidin ali 1,1'-heksametilenbis[5-(4-klorofenil)bigvanid] (slika 4) je bigvanid, ki deluje baktericidno in protivirusno. Uporablja se ga kot kožno razkužilo, konzervans in v zobozdravstvu kot sredstvo proti zobnim oblogam. Zaradi njegove strukture se hitro absorbira skozi zunanjo bakterijsko celično steno, kar povzroči ireverzibilne poškodbe na bakterijski membrani, pokanje citoplazme in inhibicijo encimov (5). Pri ljudeh povzroča draženje kože in očesa v koncentracijah višjih kot 2% (predvsem klorheksidin diacetat).

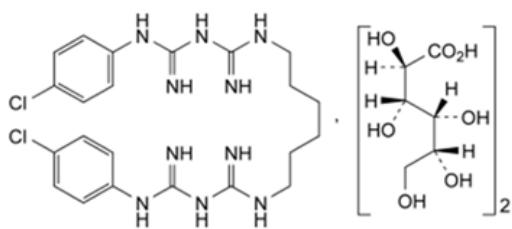


Slika 4: Klorheksidin

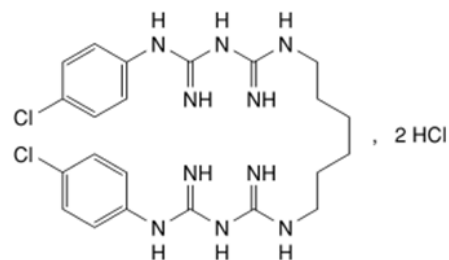
1.3.1. Soli klorheksidina in njihova topnost

Sam klorheksidin je močna baza, ki je v vodi netopna (6). S kislinami tvori soli, ki se med seboj razlikujejo predvsem v topnosti v vodnih in lipofilnih medijih. Poznamo ga v obliki diglukonata (slika 5), diklorida (slika 6) in diacetata. Klorheksidin diglukonat je najbolj topen v vodi in najbolj uporabljen v pripravkih za dermalno uporabo in v kozmetiki (5). Najdemo ga le v obliki 20% m/v vodne raztopine (pri višjih koncentracijah je preveč viskozen za uporabo), saj v trdnem stanju ga ni mogoče izolirati (6). Je brezbarvna ali rahlo rumenkasta raztopina, ki se lahko ob prisotnosti alkohola obori. Diacetat je bel ali umazano bel mikrokristalni prah, ki se slabo topi v vodi in dobro topi v alkoholih. Topnost

diacetata v vodi je 1,8% m/v. Diklorid je bel ali umazano bel kristalni prah, ki je slabo topen v vodi in alkoholih (3).



Slika 5: Klorheksidin diglukonat



Slika 6: Klorheksidin diklorid

1.3.2. Delovanje klorheksidina

V fiziološkem pH-ju klorheksidinske soli razpadejo in sprostijo pozitivno nabit klorheksidinijev kation. Njegovo baktericidno delovanje je povezano z vezavo kationa na negativno nabito bakterijsko celično steno. V nizkih koncentracijah deluje bakteriostatično, v višjih koncentracijah pa baktericidno (7).

1.3.3. Stabilnost in reaktivnost klorheksidina

Vodne raztopine klorheksidina so najbolj stabilne v pH območju 5-8. V bazičnem območju nad 8 pride do obarjanja klorheksidina in verjetno hidrolize oz. nestabilnosti, v kislem območju pod 5 pa pride do zmanjšanja njegovega delovanja, zaradi njegove nestabilnosti. Pod vplivom hidrolize razpade klorheksidin na parakloroanilin. Razpad poteka pri temperaturi 100°C, prisotnost baze pa razpad pospeši. Klorheksidin je pozitivno nabita molekula (kation), ki je običajno kompatibilna z drugimi kationskimi molekulami. Lahko pa se zgodi, da vstopa v interakcije s protiionom (anionom) na sicer kationski molekuli, kar vodi v tvorbo manj topne soli in posledično do tvorbe oborin. Z anorganskimi anioni, organskimi anioni (mila, natrijev lavril sulfat, natrij karboksimetil celuloza, alginati) ter z mnogimi barvili pa je klorheksidin nekompatibilen (5).

1.3.4. Razpadni produkti in nečistote

V enem izmed člankov je bilo objavljeno, da naj bi klorheksidin diglukonat imel 11 razpadnih produktov oziroma nečistot. Nekateri naj bi nastali šele po stresnih testih (direktna izpostavljenost svetlobi, visoka temperatura ter dodatek 6M HCl), nekateri naj bi bili že prisotni v sami raztopini klorheksidina diglukonata (13). Njegov glavni razpadni

produkt je parakloroanilin, ki je toksičen, če je inhaliran, pogoltnjen ali absorbiran skozi kožo. Deluje kot humani kancerogen in če pride v stik s kožo, lahko povzroči alergijske reakcije (5).

1.4. Testi za poltrdne dermalne farmacevtske oblike in vsebovane učinkovine

1.4.1. Farmakopejski testi za poltrdne dermalne farmacevtske oblike

V naši nalogi bomo razvili metodo za določanje vsebnosti, stabilnosti in sproščanja učinkovin v novem poltrdnem galenskem izdelku. Priprava galenskih izdelkov v galenskih laboratorijih mora biti v skladu z dobro proizvodno in laboratorijsko prakso ter izdelani morajo biti v skladu z zahtevami evropske farmakopeje. V Evropski farmakopeji sta za poltrdne dermalne farmacevtske oblike predpisana dva testa, in sicer »test for deliverable mass or volume of liquid and semi-solid preparations« in test sterilnosti. Farmakopeja navaja še dva neobvezna testa, in sicer test viskoznosti in meritev konsistence s penetrometrom.

1.4.1.1. Test sterilnosti

Test sterilnosti izvajamo zato, da preverimo, če izdelek, za katerega je predpisano, da mora biti steril, vsebuje katerikoli mikroorganizem. Potekati mora v aseptičnih pogojih, katere zagotovimo s primernimi aparaturami in kontrolami delovnega okolja, kot jih navaja dobra proizvodna praksa. Če rezultati testa nakazujejo na rast mikroorganizma, testiran izdelek ne ustreza testu sterilnosti (3).

1.4.2. Testi za dekspantenol

Najbolj pomembni testi za dekspantenol so testi identifikacije in testi določanja vsebnosti. V farmakopejah pa najdemo še druge teste, katerim mora testirani dekspantenol ustrezati.

1.4.2.1. Identifikacija

Evropska farmakopeja navaja za dekspantenol več testov identifikacije. Ločimo jih na teste prve identifikacije, kateri so visoko specifični in vedno uporabni ter na teste druge identifikacije, kateri so manj specifični. Pod prve identifikacije spada test optične sučnosti in infrardeča absorpcijska spektrofotometrija. Pri obeh dobljene rezultate primerjamo z referenčno vrednostjo, ki je podana v Farmakopeji. Pod druge identifikacije spadajo optična sučnost, določanje razpadnega produkta 3-amino-1-propanola ter kolorimetrično

določanje. Pri določanju 3-amino-1-propanola izvedemo test s tankoplastno kromatografijo ter primerjamo potovanje spojin v testni raztopini in referenčni spojini. Pri kolorimetričnem določanju pa dekspantenolu dodamo raztopino natrijevega hidroksida, ki povzroči hidrolitični razpad na primarne amine in barvilo (bakrov sulfat), ki obarva razpadni produkt (3). V literaturi zasledimo več različnih kolorimetričnih metod identifikacije dekspantenola po hidrolizi na primarne amine, pri katerih so uporabljena različna barvila (jod, hidroksilamin, vanilin) (11).

1.4.2.2. Vsebnost

V Evropski farmakopeji (8. izdaja) je kot test za določanje vsebnosti dekspantenola predpisana nevtralizacijska titracija v nevodnem mediju. Pri tem testu preko določanja ekvivalentne točke in iz porabe titracijskega medija izračunamo vsebnost dekspantenola v različnih pripravkih (3). Objavljenih je bilo tudi več znanstvenih člankov, v katerih so opisane metode za določanje vsebnosti dekspantenola. Najbolj pogosto uporabljeni metodi sta plinska in tekočinska kromatografija, in sicer uporabljajo se reverznofazna izokratska HPLC metoda in metoda superkritične tekočinske kromatografije z masnim detektorjem, katera omogoči ločevanje in kvantitativno določanje enantiomerov pantenola. Omenjeni sta tudi metoda ^1H NMR spektroskopije, spektrofotometrična metoda ter diferencialna pulzna polarografija.

1.4.2.3. Ostali testi

V Evropski farmakopeji so poleg testov za identifikacijo in vsebnost predpisani tudi drugi testi za dekspantenol. Raztopina dekspantenola mora ustrezati glede izgleda, pH-ja ter specifične rotacije. Ustrezati mora tudi testom vsebnosti težkih kovin, sulfatnega pepela ter vode.

1.4.3. Testi za klorheksidin

Klorheksidin se pojavlja v različnih preparatih v obliki soli, zato so tudi testi za identifikacijo in določanja vsebnosti razdeljeni glede na obliko soli. V farmakopeji so opisane vse tri soli, vendar za nas sta pomembni obliki diglukonat in diklorid.

1.4.3.1. Identifikacija

Evropska farmakopeja za sol klorheksidin diglukonat predpisuje teste prve in druge identifikacije. Pod teste prve identifikacije spadata infrardeča absorpcijska spektrofotometrija, kjer raztopino soli oborimo, da jo lahko analiziramo ter tankoplastna kromatografija, kjer primerjamo potovanje spojin pri testni in referenčni raztopini. Pod teste druge identifikacije pa spadajo tankoplastna kromatografija, določanje tališča ter kolorimetrično določanje. Za klorheksidin diklorid evropska farmakopeja predpisuje kot teste prve identifikacije infrardečo absorpcijsko spektrofotometrijo ter reakcijo na kloride. Kot teste druge identifikacije pa predpisuje določanje tališča, kolorimetrično določanje ter reakcijo na kloride (3).

1.4.3.2. Vsebnost

Za obe soli predpisuje Evropska farmakopeja kot test vsebnosti potenciometrično titracijo. Pri tej metodi merimo spremembo potenciala med indikatorsko in referenčno elektrodo ob dodatku reagenta znane koncentracije. Objavljenih je tudi veliko člankov, kateri opisujejo metode določanja klorheksidina. Najbolj pogosto uporabljena metoda je tekočinska kromatografija, in sicer uporabljajo se reverznofazna HPLC metoda tako gradientna kot izokratska ter ionsko izmenjevalna reverznofazna HPLC. Te metode se uporabljajo za določitev klorheksidina tudi, v urinu, serumu, slini, kremah ali suspenzijah (12). Omenjena je tudi uporaba metode tekočinske kromatografije z ESI-MS detektorjem ter plinske kromatografije z masnim detektorjem. V večini metod so uporabljene C18, amidne ali fenilne kromatografske kolone ter različne mobilne faze. Poleg kromatografije sta omenjeni še dve metodi, in sicer fluorimetrija ter direktna UV spektroskopija, vendar zaradi slabe občutljivosti in možnosti interferenc se ju ne uporablja pogosto (5).

1.4.3.3. Ostali testi

Poleg testov za identifikacijo in vsebnost, Evropska farmakopeja predpisuje za obe soli klorheksidina še druge teste, katerim morata ustrezati. Klorheksidin diglukonat mora ustrezati glede relativne gostote, pH-ja ter testom za vsebnost kloroanilina in sorodnih snovi, medtem ko mora klorheksidin diklorid ustrezati testom vsebnosti kloroanilina, sorodnih snovi, izgube pri sušenju ter sulfatnega pepela (3).

1.4.4. *In vitro* sproščanje

In vitro test sproščanja je eden izmed pomembnih testov za ugotavljanje sproščanja učinkovin iz transdermalnih oblik, lahko se ga pa uporablja tudi za testiranje sproščanja učinkovin iz dermalnih oblik namenjenih za lokalno uporabo. Takšen test je uporaben za razvijanje nove formulacije ter za določanje kakovosti in toksičnosti končnega izdelka (14). Za uspešen poskus sproščanja moramo zagotoviti prenos učinkovine iz testiranega materiala preko membrane v akceptorski medij, zato so pri ugotavljanju optimalnih eksperimentalnih pogojev ključne fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine ter izbor ustrezne membrane, akceptorskega medija in intervala vzorčevanja (15).

1.4.4.1. Izbor difuzijske celice

Prvi korak pri sestavi optimalnega *in vitro* sistema je izbor difuzijske celice. Poznamo dve vrsti celic, in sicer celice s statičnim tokom in celice z neprekinjenim tokom. Pod celice s statičnim tokom spadajo vertikalne (Franzove celice) in navpične (»side by side«) celice, medtem ko pod celice z neprekinjenim tokom spadajo »in-line« celice. Razlike med njimi so, da »in-line« celice imajo neprekinjen tok medija, kateri povzroči turbulence v celici z medijem in posledično povzroči mešanje medija. Poleg tega je pretok medija v takih celicah nastavljen, imajo pa tudi možnost avtomatskega vzorčevanja. Celice s statičnim tokom pa imajo magnetno mešalo, katero omogoča mešanje medija (16).

1.4.4.2. Izbor membrane

Izbrana membrana mora biti inertna površina, katera omogoči učinkovini, da se brez težav širi iz pripravka v izbrani akceptorski medij. Potrjeno mora biti, da ne prihaja do fizikalnih ali kemičnih interakcij med membrano in formulacijo, saj pomožne snovi v formulaciji lahko vplivajo na celovitost membrane in učinkovina v formulaciji se lahko veže na membrano (17). Membrane so lahko iz človeškega tkiva, živalskega tkiva ali sintetičnega izvora. Faktorji, ki vplivajo na izbor, so kompatibilnost materiala, razpoložljivost, cena ter cilj eksperimenta. Sintetične membrane se razlikujejo po velikosti por, debelini in hidrofilnosti. Glede na to, da večina poltrdnih dermalnih oblik vsebuje predvsem vodo, so najbolj pogosto uporabljene hidrofilne sintetične membrane (15). Poleg tega so sintetične membrane lažje dobavljive, cenejše in imajo enostavno strukturo (14).

1.4.4.3. Izbor akceptorskega medija

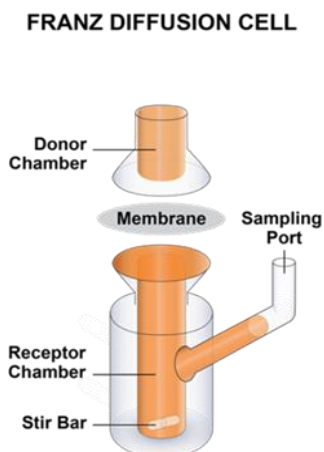
Izbor akceptorskega medija je odvisen od vrste učinkovine in od izbrane difuzijske celice (16). Zaželeno je izbrati medij, ki je podoben fiziološkemu stanju kože. To pa ni vedno mogoče, saj moramo pri izboru upoštevati tudi topnost učinkovine oz. porazdelitveni koeficient med donorskim delom, membrano ter akceptorskim medijem (17). Vodni mediji so pogosto uporabljeni za hidrofilne in zmerno lipofilne učinkovine. Fosfatni pufer (PBS, pH=7,4) se uporablja za ionizirane spojine, medtem ko za neionizirane spojine mediju dodamo snovi, ki izboljšajo njegovo topnost. Za lipofilne spojine ali spojine z nizko topnostjo v vodi, mediju lahko dodamo tudi površinsko aktivne snovi npr. Tween 80, poloksamer, Na-lavrilsulfat, proteine (albumin) ali organska topila v zmesi z vodo (etanol, izopropanol, dioksan). Zaradi možnosti vpliva omenjenih spojin na membrano jih dodamo v minimalno delujočih koncentracijah (16).

1.4.4.4. Ostali parametri

Pod ostale parametre spada izbira temperature, pri kateri bo potekal naš test sproščanja. Najbolj pogosto se izvajajo testi pri 32°C, lahko pa tudi pri sobni temperaturi, v primeru vaginalnih pripravkov pa tudi pri 37°C (17). Izbrati moramo tudi primeren čas vzorčevanja, katerega izberemo glede na čas sproščanja učinkovine in glede na »burst« efekt. Pojav, ko se na začetku testiranja sprosti velika količina učinkovine, imenujemo »burst« efekt. Najbolj pogosto uporabljen čas vzorčevanja je: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ur. Glede na vrsto difuzijske celice izberemo še ostale parametre, in sicer premer membrane, količino formulacije za nanos in volumen vzorca, ki ga bomo jemali iz celice (15).

1.4.4.5. Sestava Franzove celice

Franzove celice so sestavljene iz donorskega predela (»donor chamber«), v katerega nanesemo testiran poltrdno dermalno obliko in iz akceptorskega predela (»receptor chamber«), kateri vsebuje akceptorski medij ter mešalo. Akceptorski predel ima še podaljšek (»sampling port«), preko katerega vnesemo medij v celico ter jemljemo vzorce iz celice vzorec po določenem časovnem obdobju. Med tema dvema predeloma se nahaja membrana, skozi katero učinkovina prehaja iz donorskega predela v akceptorski predel (slika 7).



Slika 7: Sestava Franzove celice



Slika 8: Franzova celica uporabljena v eksperimentu

1.5. Kromatografija

1.5.1. Tekočinska kromatografija visoke zmogljivost (»HPLC«)

V našem delu bomo uporabili HPLC metodo za ločevanje komponent v vzorcih. Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti je analitska metoda uporabna za ločevanje spojin, identifikacijo in za kvantifikacijo spojin v vzorcu. Ločimo med normalno fazno in reverzno fazno kromatografijo. Pri normalno fazni kromatografiji je stacionarna faza polarna, med tem ko mobilna faza je nepolarna (18).

Pogosteje je uporabljena reverzno fazna kromatografija, kjer je stacionarna faza nepolarna, mobilna faza pa je polarna. Stacionarna faza je sestavljena iz hidrofobnih alkilnih verig, ki reagirajo z analitom. Najbolj pogosto uporabljene so verige C4, C8 in C18, kjer C4 uporabljamo za proteine, med tem ko C8 in C18 za peptide in majhne molekule. Mobilna faza je sestavljena iz A in B topila. A topilo je večinoma voda z dodatkom pufra, ki omogoča zaželeno in konstantno vrednost naboja analita. B topilo pa je večinoma polarno organsko topilo. Najpogosteje so uporabljeni acetonitril, metanol ali izopropanol (19).

Ločimo dve vrsti spiranja kolone, in sicer izokratsko in gradientno spiranje. Pri izokratskem načinu spiranja je sestava mobilne faze skozi celoten postopek konstantna. Pri gradientnem načinu spiranja pa se sestava mobilne faze skozi postopek spreminja. Ločba je tako lahko hitrejša kot pri izokratskem načinu. Spiranje najprej začnemo z visokim deležem vodnega dela mobilne faze, s čimer dosežemo kar se da močne interakcije polarnih in hidrofilnih analitov s stacionarno fazo, nato pa povečujemo delež organskega

topila v mobilni fazi, s čimer dosežemo v sorazmerno kratkem času še elucijo bolj lipofilnih analitov, ki se močneje retenirajo na nepolarni stacionarni fazi (19).

Kot detektor je najbolj pogosto uporabljen UV-VIS absorpcijski detektor, katerega odziv je odvisen od prisotnosti strukturnih elementov, npr. fenilnih obročev, konjugiranih sistemov v spojini, katere absorbirajo svetlobo. Kot posebna vrsta tega detektorja se uporablja detektor z nizom diod (»diode array«), ki omogoča sočasno merjenje absorbance pri različnih valovnih dolžinah ter fluorescenčni detektor. Včasih se uporablja tudi masni detektor, ki lahko spojino tudi fragmentira in s tem doseže večjo selektivnost in občutljivost, ker izboljša razmerje signal/šum ter hkrati omogoča še dodatno potrditev identitete (20).

Pri naši nalogi bo izziv razviti ustrezno HPLC metodo, saj gel vsebuje dekspantenol in klorheksidin, ki imata ravno zelo različne fizikalno kemične lastnosti v smislu hidro/lipofilnosti.. Dekspantenol je hidrofilna učinkovina, med tem ko je klorheksidin lipofilna učinkovina. Izziv bo zagotoviti ustrezno ločbo obeh učinkovin od ozadja v sprejemljivo kratkem času, da bo metoda uporabna za ustrezno kvantifikacijo.

1.6. Galenski izdelki

Galenski izdelek je zdravilo, ki ga izdelujejo v galenskih laboratorijih lekarn v skladu z veljavnimi farmakopejami in je namenjen za prodajo v zadevni lekarni (6. člen, Zakon o zdravilih). Izdelan mora biti v skladu z zahtevami dobre proizvodne, skladiščne in laboratorijske prakse in kot vsako zdravilo mora biti kakovosten, varen in učinkovit (21). Galenske izdelke ureja zakonodaja o Lekarniški dejavnosti. V skladu z zakonom o lekarniški dejavnosti lahko lekarna poleg lekarniške dejavnosti opravlja tudi druge dejavnosti, kot so izdelovanje in preverjanje kakovosti zdravil in pomožnih zdravilnih sredstev (2. člen, Zakon o lekarniški dejavnosti). Pogoje, ki pa jih mora galenski laboratorij izpolnjevati, pa ureja pravilnik o pogojih za opravljanje lekarniške dejavnosti.

2. NAMEN DELA

Za dermalne gele, ki vsebujejo dekspantenol in klorheksidin, ni ustrezne analizne metode, s katero bi lahko istočasno določali vsebnost obeh učinkovin in stabilnost samega izdelka. V literaturi najdemo metode, s katerimi določamo dekspantenol ali klorheksidin, ne najdemo pa nobene metode, s katero bi lahko istočasno določali vsebnost obeh učinkovin.

Namen našega dela bo razviti novo HPLC metodo za določanje vsebnosti dekspantenola in klorheksidina v gelu ter jo validirati, s čimer bomo dokazali, da bo dajala zanesljive podatke o vsebnosti učinkovin in s katero bomo lahko potrdili pravilno vsebnost v testirani dermalni obliki. Metoda bo morala biti tudi stabilnostno indikativna, torej da loči preiskovano spojino od razgradnih produktov.

Prvi korak bo razvoj analizne metode, kjer pričakujemo analitski izziv, saj je dekspantenol izredno hidrofilna spojina, ki se slabo zadrži na reverznofaznih kolonah. Po drugi strani pa je klorheksidin dokaj lipofilna učinkovina, ki potrebuje velik delež organskega topila, da se sploh izpere s kolone. Ugotavljali bomo, kakšni kromatografski parametri so za naš cilj najoptimalnejši. Cilj tega dela je doseči učinkovito ločbo v čim krajšem času analize. Po razvoju bo sledila validacija metode, kjer bomo izračunali ustrezne parametre, s katerimi bomo lahko potrdili ustreznost analizne metode.

V drugem delu magistrske naloge bomo razvili test za sproščanje obeh učinkovin iz testirane formulacije, pri čemer bomo morali zaradi pričakovanih nižjih koncentracij analitov razviti še bolj občutljivo HPLC metodo. Poleg testa sproščanja iz gela s pomočjo Franzovih celic bomo izvedli še test sproščanja dekspantenola iz kreme Bepanthen plus. S tem želimo primerjati sproščanje dekspantenola v dveh različnih poltrdnih farmacevtskih oblikah.

V tretjem delu magistrske naloge pa bomo izvedli še stabilnostno študijo, kjer bomo ugotavljali, kako različni stresni dejavniki (P- vodikov peroksid, K - kislina, B - baza, T - temperatura) vplivajo na stabilnost obeh učinkovin v novem farmacevtskem izdelku.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Reagenti

Acetonitril – C_2H_3N ChromasolV® (Sigma Aldrich CO, Steinheim, Nemčija) $\geq 99,9\%$

Ortofosforjeva kislina - H_3PO_4 (Panreac quimica S.A.U., Španija) $\geq 85,0\%$

Metanol – CH_3OH ChromasolV® (Sigma Aldrich CO, Steinheim, Nemčija) $\geq 99,9\%$

Tetrahidrofuran – C_4H_8O ChromasolV® (Sigma Aldrich CO, Steinheim, Nemčija) $99,9\%$

Mravljična kislina – CH_2O_2 Emprove® exp (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) $\geq 98,0\%$

Absolutni etanol – C_2H_6O (Gram – mol, Zagreb, Hrvaška) $\geq 99,9\%$

Ultračista voda – Milli-Q voda, pridobljena z aparaturom Milli-Q advantage A10 Ultrapure Water Purification System, Millipore

Klorovodikova kislina - pripravljena iz kompleta za pripravo raztopine HCl Titrisol® (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), $c(HCl)=1\text{ mol/L}$ (1N)

Natrijev hidroksid – pripravljena iz kompleta za pripravo raztopine NaOH Titrisol® (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), $c(NaOH)=1\text{ mol/L}$ (1N)

Vodikov peroksid – H_2O_2 30% (w/w) raztopina (Sigma Aldrich CO, Steinheim, Nemčija)

3.1.2. Mobilne faze

0,05% H_3PO_4 v Milli-Q vodi – vodni del mobilne faze pri tekočinski kromatografiji

0,05% $HCOOH$ v Milli-Q vodi – vodni del mobilne faze pri masni spektroskopiji

3.1.3. Standardi in vzorci

Dekspantenol - $C_9H_{19}NO_4$ (SIGMA ALDRICH CO, Steinheim, Nemčija)

3-amino-1-propanol- C_3H_9NO (SIGMA ALDRICH CO, MO, ZDA) 99%

Klorheksidin – $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ FLUKA (SIGMA ALDRICH CO, Steinheim, Nemčija) 99%

Nova formulacija gela z dekspantenolom in klorheksidinom (5% dekspantenola, 0,1% klorheksidina, eterično olje čajevca, eterično olje sivke, carbomer 940, trolamin, prečiščena voda, metil parahidroksibenzoat, citronska kislina) – Galenski laboratorij Obalnih lekarn (Kozina, Slovenija)

Krema Bepanthen plus (5% dekspantenola, 0,5% klorheksidina, beli vazelin, tekoči parafin, lanolin, polioxsil-40-stearat, cetilalkohol, stearilalkohol, DL-pantolakton, prečiščena voda) - GP Grenzach Produktions GmbH (Grenzach-Wyhlen, Nemčija)

Placebo gel (0,1% klorheksidina, eterično olje čajevca, eterično olje sivke, carbomer 940, trolamin, prečiščena voda, metil parahidroksibenzoat, citronska kislina) – Galenski laboratorij Obalnih lekarn (Kozina, Slovenija)

3.2. Aparature in laboratorijski material

HPLC sistem 1100 z binarno črpalko in DAD detektorjem (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija)

HPLC/MS- HPLC sistem 1290 Infinity (Agilent Technologies), MS detektor: 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)

Milli-Q advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), FFA Ljubljana

Ultrazvočna kopel: Bondelin Sonorex (Digitec, Berlin, Nemčija)

Ultrazvočna kopel: SONIS (Iskra PIO, d. o. o., Šentjernej, Slovenija)

Franzove celice – Šurlan, Medulin, Hrvaška

pH-meter Mettler Toledo MP 220, (Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica)

Pipete 2-20 µL, 2-200 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Hladilnik z zmrzovalnikom (-20°C), (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Tehtnica-analizna Mettler Toledo XP 105 (Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica)

Filtri: Minisart RC 0,20 µm, 0,45 µm (15 mm in 25 mm) (Sartorius, Göttingen, Nemčija)

Laboratorijski material: bučke, čaše, magnetno mešalo, plastične brizge, tehtalni čolnički, spatule, viala, plastične kapalke.

3.3. Metode

3.3.1. Priprava mobilne faze, standardov ter vzorcev za analizo

3.3.1.1. 0,05% H_3PO_4

0,05% H_3PO_4 smo pripravili tako, da smo 590,0 μL 85% ortofosforne kisline raztopili v 1000,0 mL miliq vode. Tako pripravljeno raztopino smo postavili za 15 minut v ultrazvočno kopel.

3.3.1.2. Acetonitril

Uporabili smo acetonitril za HPLC.

3.3.1.3. Priprava osnovnega standarda dekspantenola

Osnovni standard dekspantenola smo pripravili tako, da smo natehtali 250,0 mg standarda dekspantenola in ga kvantitativno prenesli v 25,0 mL bučko. Nato smo bučko z metanolom dopolnili do oznake ter premešali. Pripravili smo osnovni standard dekspantenola s koncentracijo 10000 mg/L.

3.3.1.4. Priprava osnovnega standarda klorheksidina

Osnovni standard klorheksidina diglukonata smo pripravili tako da smo odpipetirali 100 μL 20% (m/vol) raztopine klorheksidin diglukonata v 10 mL bučko, katero smo dopolnili do oznake s 5 mL metanola in 5 mL absolutnega etanola. Tako pripravljene raztopine smo dodali še 150 μL 1M HCl, kateri izboljša topnost klorheksidina. Osnovni standard klorheksidina diklorida pa smo pripravili tako, da smo natehtali 50 mg standarda in ga raztopili v 10 mL 50:50 (vol/vol) mešanice metanola in absolutnega etanola, temu pa smo dodali še 150 μL 1M HCl.

3.3.1.5. Priprava vzorcev za določanje linearnosti in točnosti metode v gelu

Za določanje linearnosti in točnosti metode smo najprej določili osem koncentracijskih točk, katere so predstavljale 0, 50, 75, 100, 125, 150, 200 in 225% dodanega dekspantenola ter 0, 50, 75, 100, 125 in 150 % dodanega klorheksidina diklorida glede na pričakovano vsebnost v izdelku. Vzorce smo pripravili tako, da smo najprej natehtali po 1,0 g placebo

gela (gel, ki vsebuje vse sestavine razen učinkovine), kateremu smo dodali ustrezno količino standarda dekspantenola in klorheksidina diklorida. Gel s standardi smo nato kvantitativno prenesli v 50,0 mL bučko, katero smo dopolnili do oznake z mobilno fazo. Tako pripravljeno disperzijo smo postavili v ultrazvočno kopel za 15 minut. Po preteklih 15 minutah smo preverili, če se je celoten gel homogeno dispergiral, v obratnem primeru pa smo pustili še dodatnih 10 min na ultrazvočni kopeli. Končna disperzija je bila motna, zato smo jo morali še filtrirati. Disperzijo smo filtrirali najprej skozi filter 0,45 μm v čašo, nato še skozi filter 0,22 μm v HPLC v vialo, katero smo zaprli in primerno označili.

Ker naj bi analiziran gel vseboval klorheksidin v obliki soli diglukonata, smo pripravili še tri koncentracijske točke, ki so predstavljale 100, 150 in 200% klorheksidina diglukonata v gelu. Vzorce smo pripravili tako, da smo najprej natehtali po 1,0 g placebo gela, kateremu smo dodali ustrezno količino standarda klorheksidina diglukonata. Gel s standardi smo nato kvantitativno prenesli v 50,0 mL bučko, katero smo dopolnili do oznake z mobilno fazo. Tako pripravljeno disperzijo smo postavili v ultrazvočno kopel za 15 minut. Po preteklih 15 minutah smo preverili, če se je celoten gel popolnoma dispergiral, v obratnem primeru pa smo pustili še dodatnih 10 min na ultrazvočni kopeli. Končna disperzija je bila motna, zato smo jo morali še filtrirati. Disperzijo smo filtrirali najprej skozi filter 0,45 μm v čašo, nato še skozi filter 0,22 μm v HPLC v vialo, katero smo zaprli in primerno označili.

3.3.1.6. Priprava vzorcev za določanje linearnosti in točnosti metode v kremi Bepanthen plus

Za določanje linearnosti in točnosti metode smo najprej določili štiri koncentracijske točke, katere so predstavljale 0, 25, 50 in 75 % dekspantenola in klorheksidina diklorida dodanih v kremo. Vzorce smo pripravili tako, da smo najprej natehtali po 1,0 g kreme, kateri smo dodali ustrezno količino standarda dekspantenola in klorheksidina diklorida. Kremo s standardi smo kvantitativno prenesli v 50,0 mL bučko, v katero smo dodali 5,0 mL (10% od celotnega volumna) metanola s temperaturo okoli 40°C in vse skupaj mešali približno 2 minuti, nato bučko dopolnili z mobilno fazo do oznake. Tako pripravljeno disperzijo smo postavili v ultrazvočno kopel za 25 minut. Vmes smo vzorce nekajkrat tudi premešali. Po preteklih 20 minutah smo preverili, če se je celotna krema dispergirala, v obratnem primeru pa smo pustili še dodatnih 10 minut na ultrazvočni kopeli. Končna disperzija je bila motna, zato smo jo morali še filtrirati. Disperzijo smo filtrirali najprej skozi filter 0,45

µm v čašo, nato še skozi filter 0,20 µm v HPLC v vialo, katero smo nato zaprli in primerno označili.

3.3.1.7. Priprava vzorcev gela za analizo vsebnosti

Vzorec gela za analizo smo pripravili tako, da smo natehtali 1,0 g gela in ga kvantitativno prenesli v 50,0 mL bučko ter dopolnili z mobilno fazo do oznake in vse skupaj dobro premešali. Tako pripravljeno disperzijo smo postavili v ultrazvočno kopel za 15 minut. Po preteklih 15 minutah smo preverili, če se je celoten gel popolnoma dispergirala, v obratnem primeru pa smo pustili še dodatnih 10 min na ultrazvočni kopeli. Končna disperzija je bila motna, zato smo jo morali še filtrirati. Disperzijo smo filtrirali najprej skozi filter 0,45 µm v čašo, nato še skozi filter 0,22 µm v HPLC v vialo, katero smo zaprli in primerno označili. Tak način priprave vzorca gela smo uporabili pri določanju vsebnosti in določenih testih validacije ter pri pripravi placebo gela.

3.3.1.8. Priprava vzorcev kreme Bepanthen plus za analizo

Vzorec kreme Bepanthen plus smo pripravili tako, da smo natehtali 1,0 g kreme in ga kvantitativno prenesli v 50,0 mL bučko. V bučko smo nato dodali 5,0 mL (5% celotnega volumna) metanola s temperaturo 40°C in vse skupaj mešali za par minut, nato smo bučko dopolnili z mobilno fazo do oznake. Tako pripravljeno disperzijo smo postavili v ultrazvočno kopel za 25 minut. Vmes smo vzorce nekajkrat tudi premešali. Po preteklih 20 minutah smo preverili, če se je celotna krema popolnoma dispergirala, v obratnem primeru smo pustili še dodatnih 10 minut na ultrazvočni kopeli. Končna disperzija je bila motna, zato smo jo morali še filtrirati. Disperzijo smo filtrirali najprej skozi filter 0,45 µm v čašo, nato še skozi filter 0,2 µm v HPLC v vialo, katero smo nato zaprli in primerno označili. Tako pripravo vzorca smo uporabili tudi pri pripravi vzorcev za stabilnostne teste.

3.3.1.9. Priprava vzorcev gela za stresne teste

Vzorce gela za stresne teste smo pripravili tako, da smo natehtali 2,0 g gela in ga kvantitativno prenesli v 100,0 mL bučko. Nato smo bučko dopolnili do oznake z mobilno fazo in vse skupaj dobro pretresli. Tako pripravljeno disperzijo smo postavili v ultrazvočno kopel za 15 minut. Po preteklih 15 minutah smo preverili, če se je celoten gel popolnoma dispergirala, v obratnem primeru smo pustili še dodatnih 10 minut na ultrazvočni kopeli. Nato smo pripravili štiri 25,0 mL bučke. V eno smo odpipetirali 2,5 mL 1M NaOH, v

drugo smo odpipetirali 2,5 mL 1M HCl, v tretjo smo odpipetirali 2,5 mL 30% H₂O₂ in v četrto smo odpipetirali 2,5 mL Milli-Q vode. Vsako bučko smo nato napolnili do oznake z našim prej pripravljenim vzorcem gela in vse skupaj dobro premešali.

3.3.1.10. Priprava vzorcev kreme Bepanthen plus za stresne teste

Vzorci kreme za stresne teste smo pripravili tako, da smo natehtali 2,0 g kreme in jo kvantitativno prenesli v 100,0 mL bučko. Najprej smo v bučko dodali 10 mL (10% od celotnega volumna) metanola in vse skupaj mešali za nekaj minut. Nato smo bučko dopolnili do oznake z mobilno fazo in ponovno vse skupaj dobro premešali. Tako pripravljeno disperzijo smo postavili v ultrazvočno kopel za 20 minut. Po preteklih 20 minutah smo preverili, če se je celotna krema popolnoma dispergirala, v obratnem primeru smo pustili še dodatnih 10 minut na ultrazvočni kopeli. Nato smo pripravili štiri 25,0 mL bučke. V eno smo odpipetirali 2,5 mL 1M NaOH, v drugo smo odpipetirali 2,5 mL 1M HCl, v tretjo smo odpipetirali 2,5 mL 30% H₂O₂ in v četrto smo odpipetirali 2,5 mL MilliQ vode. Vsako bučko smo nato napolnili do oznake z našim prej pripravljenim vzorcem kreme in vse skupaj dobro premešali.

3.3.2. Analiza vzorcev s HPLC

Za analizo naših vzorcev smo uporabili aparat HPLC z UV-VIS detektorjem z nizom diod (DAD). Po injiciranju so se analiti v vzorcu najprej na koloni HPLC ločili glede na interakcije s stacionarno fazo, nato pa smo jih s pomočjo detektorja, glede na njihov retencijski čas in spekter absorpcij ultravijolične svetlobe, identificirali. Izbrani detektor nam je omogočal sočasno merjenje absorpcije pri različnih valovnih dolžinah, tako da smo lahko izbrali optimalno valovno dolžino, pri kateri smo merili naše analite.

Za analizo vzorcev smo izbrali reverzno fazno HPLC kolono Gemini C18 100x3mm z velikostjo delcev 3 µm in velikostjo por 110 Å, ker smo z njo dobili najboljše retencije in oblike vrhov analitov. Kot mobilno fazo smo uporabili A: 0,05% H₃PO₄ v H₂O in B: 100% acetonitril. Vzorce smo spirali z gradientno metodo (v razpredelnici 1 je podan potek gradienta). Analiza je trajala 9,5 minute pri pretoku mobilne faze 1,4 mL/min, pri tlaku do 240 barov ter pri temperaturi 45⁰C. Volumen injiciranja je bil 5 µL. Po vsakem injiciranju se je vzorčevalna igla spirala s 65% CH₃CN v vodi. Vzorce smo merili pri dveh različnih valovnih dolžinah, in sicer od 1. do 5. minute smo merili pri 205 nm, od 5. do 9.5 minute

pa smo merili pri 252 nm, tako da je bila metoda popolnoma prenosljiva na HPLC z UV-VIS detektorjem z nastavljivo valovno dolžino.

Preglednica 1: Potek gradienta pri HPLC analizi

Čas	%A	%B
0	100	0
1,5	94	6
4,7	74	26
5,9	40	60
6,30	20	80
6,7	100	0

Čas celotne analize z reekvilibracijo: 11 min

3.3.3. Obdelava rezultatov

Za vsak vzorec smo posneli kromatogram, iz katerega smo s pomočjo programa Chemstation dobili podatke o površinah in retencijskih časih za vsak kromatografski vrh prisoten v vzorcu. V Microsoft Excelu smo nato izračunali koncentracije posameznih analitov v vzorcu.

3.4. Validacija analizne metode

Pri validaciji analizne metode za določanje vsebnosti smo določili parametre, ki so ključni za dokaz zanesljivosti in uporabnosti metode. Ti parametri so: ponovljivost, linearnost, točnost, delovno območje, specifičnost, robustnost in stabilnost.

3.4.1. Ponovljivost analizne metode

Ponovljivost izraža stopnjo ujemanja posameznih rezultatov pridobljenih med serijo analiz istega homogenega vzorca in odraža slučajno napako. Ponovljivost se lahko nanaša na celotno metodo (priprava vzorca in analiza), lahko pa tudi le na inštrumentalno metodo

(injiciranje iz iste vial). Za določitev ponovljivosti metode, mora analiza potekati pod enakimi delovnimi pogoji v kratkem časovnem obdobju, izvede pa jo ista oseba v istem laboratoriju in na istem instrumentu. Medtem ko je reproducibilnost natančnost pri različnih pogojih (drug človek, drug aparat,...). Ponovljivost določimo vsaj s petimi ponovitvami pri 100% koncentraciji vzorca. Iz pridobljenih rezultatov izračunamo povprečno vrednost ($\bar{y}$), standardni odmik (σ) in relativni standardni odmik (RSD), katerega izračunamo po enačbi: $RSD = (\sigma / \bar{y}) * 100$. Kriterij sprejemljivosti za ponovljivost se razlikuje glede na vrsto in namen analizne metode, vendar je pogosto zahtevan kriterij metod vsebnosti, enakomernost vsebnosti, ipd., da mora biti RSD nižji od 2% ($\leq 2\%$). S potrditvijo ponovljivosti potrdimo tudi natančnost metode.

3.4.2. Linearnost analizne metode

Linearnost analizne metode je sposobnost metode, da znotraj določenega koncentracijskega območja, daje odzive, ki so premo sorazmerni koncentraciji analita v vzorcu. Določimo jo z najmanj šestimi standardi različnih koncentracij, ki jih lahko pripravimo z redčenjem osnovne raztopine ali z natehtanjem ustrezne količine standarda. Linearnost potrdimo grafično, tako da izrišemo premico, ki podaja povezavo med koncentracijo in odzivom. Povezavo predstavimo z enačbo $y = kx + n$. Rezultate potrdimo z izračunom parametrov regresije, kateri so: Pearsonov korelacijski koeficient (r), odsek na y osi, naklon premice ter vsota kvadriranih naklonov. Za potrditev linearnosti HPLC mora biti vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta (r) $\geq 0,999$ za določeno koncentracijsko območje (FDA Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods CDER.).

3.4.3. Točnost analizne metode

Točnost analizne metode izraža ujemanje dobljenih rezultatov s pravo vrednostjo. Za metode za merjenje vsebnosti, določamo točnost običajno v koncentracijskem območju, ki obsega 50%-150% želene koncentracije. Točnost preverimo tako, da izračunamo odstopanje v procentih po enačbi: $((\text{izmerjena vrednost} - \text{pričakovana vrednost}) / \text{pričakovana vrednost}) * 100$.

3.4.4. Specifičnost analizne metode

Specifičnost analizne metode je sposobnost metode, da nedvoumno analizira analit ob prisotnosti drugih pričakovanih komponent prisotnih v vzorcu (pomožne snovi, nečistote, razpadni produkti). Določimo jo tako, da posnamemo kromatogram placebo vzorca, kateri vsebuje vse sestavine razen analita ter kromatogram osnovnega vzorca, kateri vsebuje vse sestavine, vključno z analitom. Prikažemo oba kromatograma in na območju vrha analita ne sme biti v placebo vzorcu nobenih motečih vrhov, ki bi lahko motile integracijo vrha analita.

3.4.5. Robustnost analizne metode

Robustnost analizne metode je sposobnost metode, da deluje zadovoljivo kljub majhnim spremembam pogojev analize. Preverjamo jo tako, da opazujemo, če metoda daje zadovoljive rezultate, kljub majhnim namernim spremembam v osnovnih parametrih metode. Pri določanju robustnosti spreminjamo sestavo in pH mobilne faze, temperaturo in pretok skozi kolono, valovno dolžino detekcije in spremljamo kvaliteto separacije ter odziv analita. Pomemben vidik robustnosti pa je tudi morebiten vpliv velikega števila injiciranj na kromatografski sistem, kar testiramo tako, da pripravljen (realni) vzorec večkrat injiciramo (do 100 in več krat). Robustnost nam daje delno potrditev o zanesljivosti metode med normalno uporabo.

3.5. Stabilnost

Stabilnost smo določali za gel in kremo Bepanthen plus pri različnih temperaturah in ob dodatku kisline, baze, peroksida. Hoteli smo ugotoviti, če pod vplivom različnih temperatur in ob dodatku stresnih raztopin, pride do razgradnje analita oziroma, na katere dejavnike je analit občutljiv. Za temperaturno stabilnost smo gel in kremo izpostavili trem različnim temperaturam, in sicer sobni temperaturi, 40°C in -21°C. Imeli smo tri časovne točke merjenja koncentracije analita, ob času 0, po dveh tednih in po štirih tednih. Pri stresnih testih smo gelu in kremi posamezno dodali bazo, kislino, vodikov peroksid in vodo. Imeli smo več časovnih točk merjenja koncentracije analita, ob času 0, po 3 urah, po 24 urah, po enem tednu, po dveh tednih in po štirih tednih.

3.6. Sproščanje učinkovin

Za izvedbo testa sproščanja smo izbrali Franz-ove celice, kot akceptorski medij pa fosfatni pufer (pH=7,4). Uporabili smo membrane SARTORIUS s premerom 25 mm, ki so iz celuloznega acetata in imajo velikost por $0,45\mu\text{m}$.

24 ur pred začetkom analize smo membrane dali namakati v izbrani pufer. Naslednji dan smo pripravili 5 celic, v katere smo nalili fosfatni pufer, in sicer 6,5 mL, nato smo nanj položili namočeno membrano. Vse skupaj smo pritrdili s ščipalko. Preko podaljška v akceptorskem predelu smo spustili mešalo v celico ter natehtali 500 mg vzorca. Na koncu smo še odstranili možne prisotne mehurčke. Takoj po tem smo vzeli vzorec ob času 0. Ven smo jemali po 500 μL vzorca in toliko tudi dodajali svežega medija nazaj notri. Čas vzorčevanja je bil 30 minut, merili smo pa do 240 minut.

Test sproščanja smo delali pri gelu in kremi Bepanthen plus, pri vsakem smo testirali po 5 vzorcev. Test je potekal 240 minut. Vsak odvzeti vzorec smo prenesli v vialo in zanj posneli kromatogram. S pomočjo programa Chemstation smo pridobili podatke o površini vrhov in v Excel-u smo izračunali koncentracijo dekspantenola. Ko smo imeli za posamezen vzorec podatke o koncentraciji za vsako časovno točko, smo narisali profil sproščanja za posamično celico.

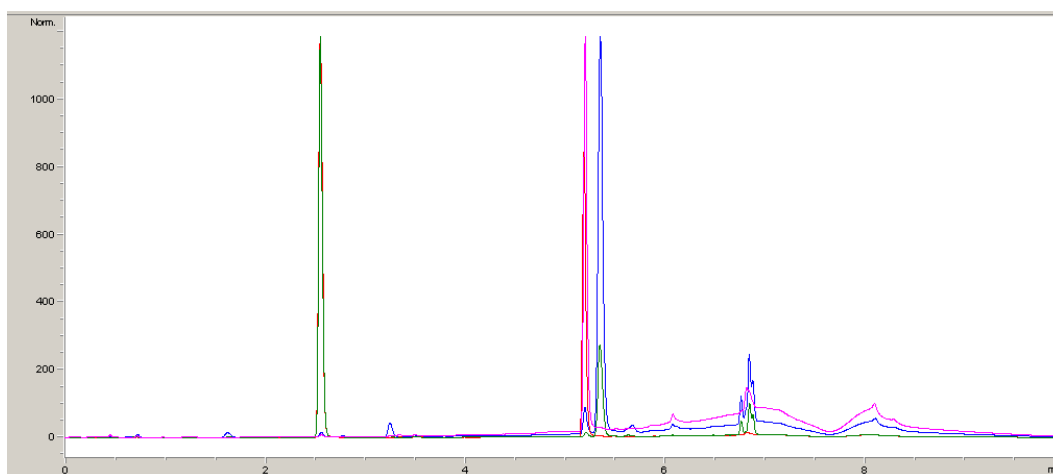
4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Identifikacija

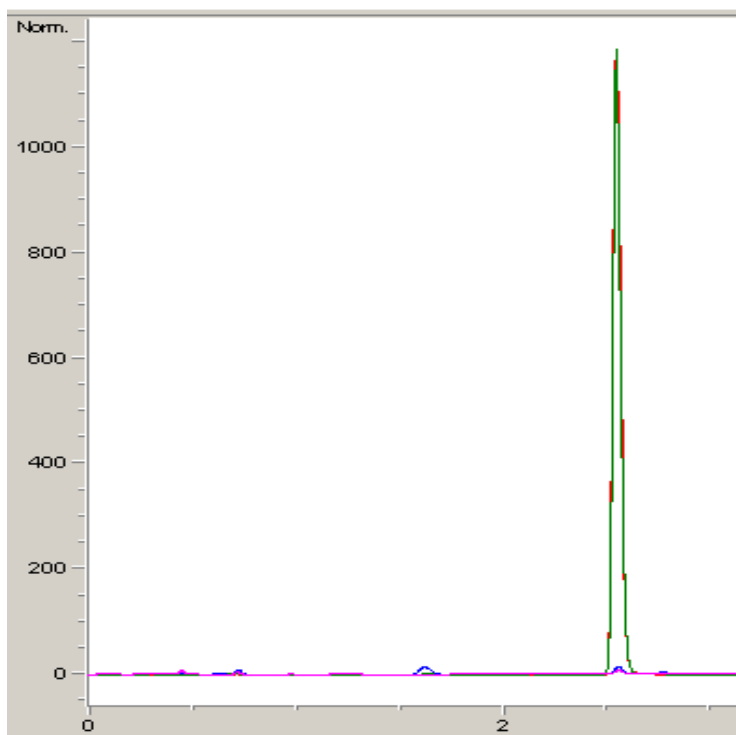
Pred začetkom testiranja gela smo preverili, da gel res vsebuje dekspantenol in klorheksidin diglukonat.

4.1.1. Identifikacija dekspantenola

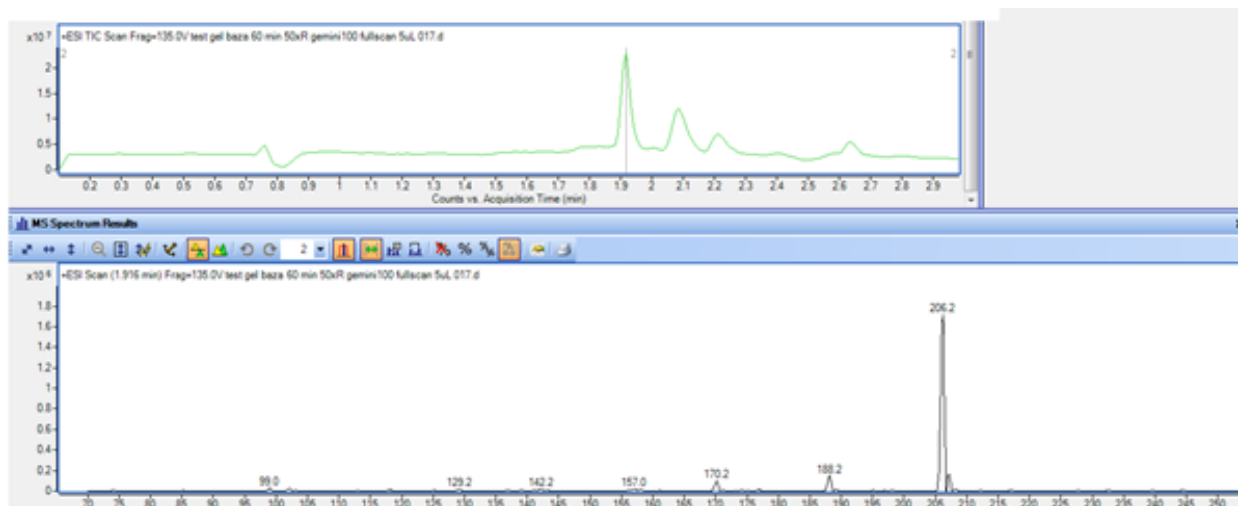
Za identifikacijo smo pripravili vzorec standarda dekspantenola s tako koncentracijo, ki naj bi jo imel v gelu in vzorec gela. Nato smo za vsak vzorec posneli kromatogram in ju prekrili, da smo lahko ugotovili, ali se kromatograma popolnoma prekrivata v retencijskem času in v obliki vrha. Retencijski čas dekspantenola je med 2,3-2,5 min. Na sliki 9b sta prekrita kromatograma standarda dekspantenola, ki koncentracijsko ustreza vsebnosti 100% in vzorca gela, iz katere vidimo, da se kromatograma popolnoma prekrivata, kar je ena od potrditev, da vzorec gela res vsebuje dekspantenol. Druga potrditev, ki smo jo izvedli, pa je, da smo na masnem detektorju za ta vrh dobili odziv pri m/z 206,2 $[M+H]^+$, ter vse pričakovane karakteristične vrhove po njegovi fragmentaciji (glej sliko 9c)



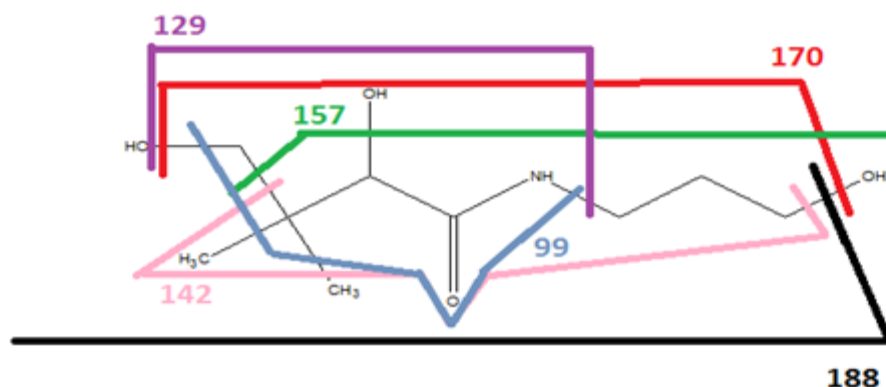
Slika 9a: Prekriti kromatogrami standarda dekspantenola (rdeča črta, $t_r=2,530$ min), gela (zelena črta), placebo gela (modra črta), standarda klorheksidin diglukonata (roza črta, $t_r=5,231$ min) ter standarda klorheksidin diklorida (rdeča črta, $t_r=5,229$ min). x os predstavlja čas v minutah, y os pa odziv v mAU*s.



Slika 9b: Izsek iz slike 9a, ki prikazuje prekrita kromatograma standarda dekspantenola (rdeča črta, $t_r=2,530$ min) in vzorca gela (zeleni rta). x os predstavlja čas v minutah, y os pa odziv v mAU*s.



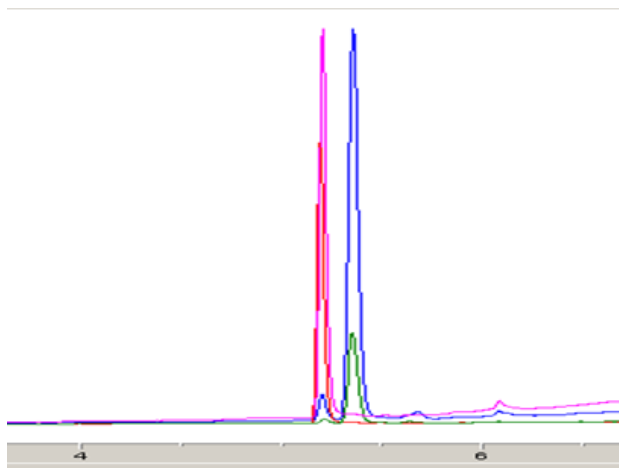
Slika 9c: Fragmentacijski MS/MS spekter kromatografskega vrha dekspantenola (kromatogram v sredini) iz vzorca gela.



Slika 9d: Razlaga fragmentacije zgornjega spektra (slika 9c).

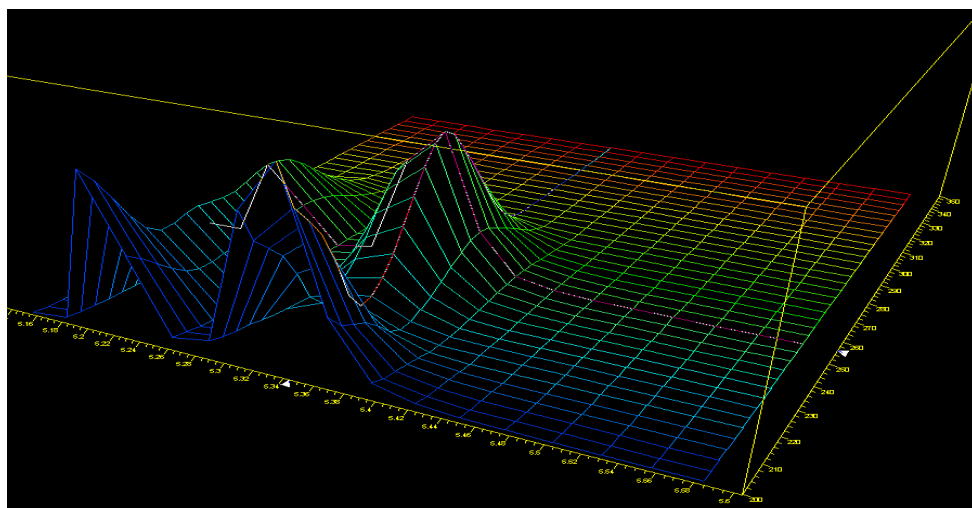
4.1.2. Identifikacija klorheksidina

Pri identifikaciji klorheksidina diglukonata v gelu pa smo imeli nekaj težav, saj smo na koncu ugotovili, da gel ne vsebuje klorheksidina diglukonata oziroma ga vsebuje v zelo majhnih koncentracijah glede na pričakovano vsebnost. Testiranja smo izvedli na dveh HPLC-jih ter na LC-MSu. Ugotovili smo, da na posnetih kromatogramih vzorcev placebo gela, ki naj bi sam po sebi že vseboval klorheksidin, če mu dodamo klorheksidin standard, da dobimo dejansko dva vrhova, ki sta zelo blizu po času elucije (slika 10). Prvi vrh je imel retencijski čas 5,1-5,2, drugi vrh pa 5,3-5,4. Placebo gel naj bi vseboval klorheksidin diglukonat in pričakovano je bilo, da bo z dodatki standarda klorheksidina diglukonata naraščajočih koncentracij vrh enakomerno naraščal, vendar namesto tega smo dobili dva različna vrha. Najprej smo pomislili, da morda placebo gel vsebuje drugo obliko oziroma sol klorheksidina - klorheksidin diklorid- in da ju HPLC loči med seboj. Zato smo pogledali za vsak vrh 3D kromatogram (s posnetimi UV spektri v vsaki časovni točki) in takrat smo ugotovili, da imata vrha standarda in placebo gela drugačne UV spektre. Pomislili smo, da morda imata različni soli klorheksidina različni 3D kromatogram, da bi to ugotovili, smo posneli kromatograma standarda diglukonata in diklorida. Po pregledu 3D kromatogramov obeh standardov in vzorca, smo ugotovili, da imata standarda klorheksidin diglukonata in diklorida res enak UV spekter in s tem enak 3D kromatogram in, da dodaten vrh v placebo vzorcu gela ne pripada klorheksidinu temveč neki sorodni snovi (slika 11 in 12).

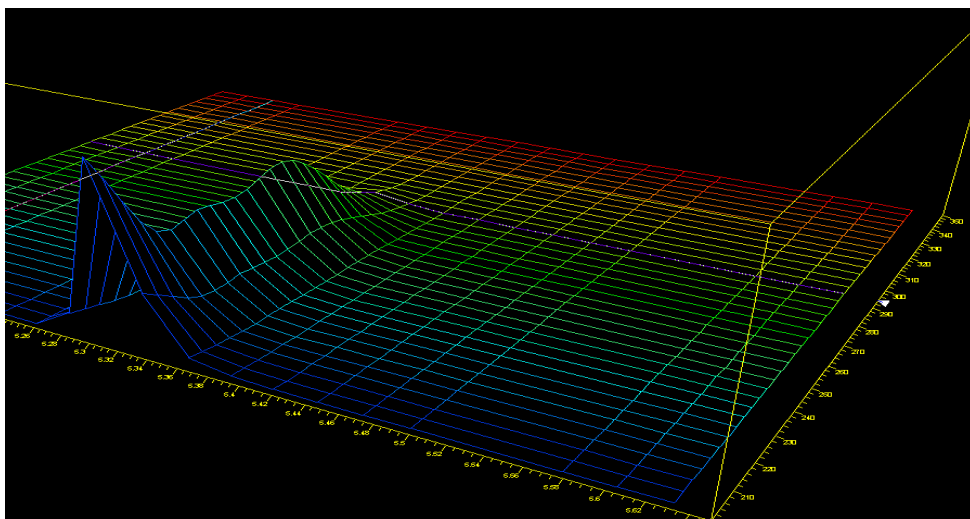


Slika 10: Izsek iz slike 9a, ki prikazuje prekrivne kromatograme placebo gela (modra črta), gela (zeleni črta), standarda klorheksidin diglukonata (roza črta, $t_r=5,231\text{min}$) ter standarda klorheksidin diklorida (rdeča črta, $t_r=5,229\text{ min}$). x os predstavlja čas v minutah, y os pa odziv v mAU*s.

Iz prekritih kromatogramov (slika 10) vidimo, da imata oba standarda klorheksidina (klorid in glukonat) enak retencijski čas in da drugi vrh iz vzroca placebo gela pripada neki drugi snovi. Vidimo tudi, da placebo gel vsebuje malo klorheksidina, gel pa še manj.



Slika 11: 3D kromatogram standarda klorheksidin diglukonata (levo) in neznane sorodne snovi (desno)

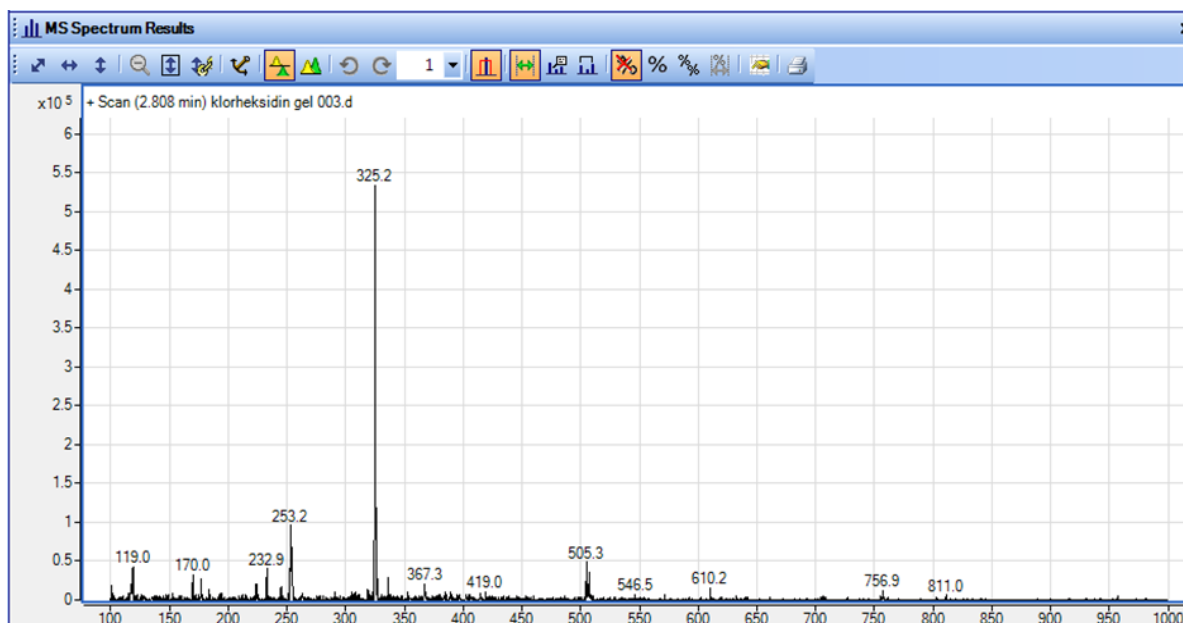


Slika 12: 3D kromatogram standarda klorheksidina diklorida

S slik 11 in 12 vidimo, da je oblika vrhov spektrov standardov klorheksidina enaka, medtem ko ima neznana snov drugačno obliko.

Da bi ugotovili izvor neznane snovi, smo injicirali v HPLC vzorec gela, ki vsebuje neznano snov in s pomočjo cevke smo v posebno vialo lovili le del eluata ob retencijskem času neznane snovi. Vzorec smo večkrat injicirali, zato da bi dobili v vialo večjo količino neznane snovi. Nato smo dobljeni vzorec analizirali s pomočjo masnega detektorja. Dobljen masni spekter (slika 13) smo primerjali z masami razgradnih produktov, ki so bili opisani v literaturi, ki obravnava različne razgradne produkte in nečistote klorheksidina diglukonata. Nobena izmed mas razgradnih produktov opisanih v literaturi ni bila najdena v masnem spektru neznane snovi. Glede na to sklepamo, da se je klorheksidin v gelu kemijsko modificiral po do sedaj še neopisani oz. neznani poti.

Razlog, zakaj je prišlo do tega, da v gelu ni klorheksidina oziroma je v zelo majhnih koncentracijah, ne znamo pojasniti. Očitno je, da je bil klorheksidin dodan v gel, kaj pa se je zgodilo po tem, ni znano.



Slika 13: Masni spekter zbranega vzorca z neznano snovjo

Masni vrh m/z 505.3 pripada klorheksidinu, kot vidimo, ga je v primerjavi z vrhom 325.2 zelo malo. Vrh 325.2. pripada neznani snovi, ki je prisotna v gelu. Nadaljnjih korakov za identifikacijo neznane snovi se v okviru magistrske naloge nismo lotili.

4.2. Vsebnost

Vsebnost dekspantenola in klorheksidina smo določali, ker smo želeli potrditi, da njuna vsebnost ustreza deklarirani vsebnosti v gelu. Poleg določanja vsebnosti v gelu smo določali tudi vsebnost dekspantenola in klorheksidina v kremi, saj smo želeli dokazati, da je naša metoda primerna za določanje dekspantenola in klorheksidina tudi v ostalih poltrdnih farmacevtskih oblikah in ne samo v preiskovanem gelu.

4.2.1. Vsebnost dekspantenola

Za določanje vsebnosti dekspantenola v gelu smo pripravili deset vzorcev za injiciranje iz enega vzorca gela za testiranje. Za vsak pripravljen vzorec smo posneli kromatogram, iz katerega smo s pomočjo programa Chemstation dobili podatke o površinah. V Microsoft Excelu smo nato iz površin izračunali koncentracije dekspantenola v vsakem vzorcu s pomočjo umeritvene krivulje ter vsebnost dekspantenola glede na natehtano količino gela. Podali smo tudi razmerje v % med dobljeno vsebnostjo in deklarirano vsebnostjo. V preglednici 2 so podani dobljeni rezultati.

Preglednica 2: Rezultati določanja vsebnosti dekspantenola v gelu

Vzorec	Površina pod vrhom dekspantenola	Koncentracija dekspantenola (mg/L)	Vsebnost (mg/g)	(Vsebnost/deklarirana vsebnost) [%]
1	3064,96	983,95	49,18	98,36
2	3126,51	1003,84	50,17	100,33
3	3127,09	1004,03	50,18	100,36
4	3139,13	1007,92	50,37	100,75
5	3135,51	1006,75	50,28	100,56
6	3134,91	1006,56	50,31	100,61
7	3136,58	1007,10	50,32	100,64
8	3124,53	1003,20	50,15	100,29
9	3146,26	1010,23	50,50	101,00
10	3113,83	999,74	49,98	99,97
Povprečje			50,14	100,29
SD			0,37	0,73
RSD [%]			0,73	

Rezultati potrjujejo, da vsebnost desetih testiranih vzorcev ustreza deklarirani vsebnosti dekspantenola v gelu, saj imajo vsi vzorci relativno zelo majhna odstopanja glede na deklarirano vsebnost ter da so vsi znotraj območja sprejemljive vsebnosti (90-110% glede na deklarirano vsebnost). Tudi relativna standardna deviacija nam nakazuje na majhno razpršenost vzorcev.

Za določanje vsebnosti dekspantenola v kremi Bepanthen plus smo pripravili le pet vzorcev, saj nam je bilo pomembno, da pokažemo, da je metoda primerna tudi za določanje vsebnosti v kremi. Tudi pri kremi smo za vsak vzorec posneli kromatogram, iz katerega smo s pomočjo programa Chemstation dobili podatke o površinah. V Microsoft Excelu smo nato iz površin izračunali koncentracije dekspantenola v vsakem vzorcu s pomočjo umeritvene krivulje ter vsebnost dekspantenola glede na natehtano količino kreme. Podali smo tudi razmerje v % med dobljeno vsebnostjo in deklarirano vsebnostjo. V preglednici 3 so podani dobljeni rezultati.

Preglednica 3 : Rezultati določanja vsebnosti dekspantenola v kremi Bepanthen plus

Vzorec	Površina pod vrhom dekspantenola	Koncentracija dekspantenola (mg/L)	Vsebnost (mg/g)	(vsebnost/deklarirana vsebnost) [%]
1	3292,25	1057,42	52,85	105,70
2	3269,15	1049,95	52,48	104,96
3	3248,71	1043,34	52,14	104,28
4	3234,37	1038,71	51,92	103,83
5	3295,67	1058,52	52,90	105,81
Povprečje			52,46	104,92
SD			0,43	0,86
RSD			0,82	

Iz rezultatov vidimo, da je bil odziv dekspantenola v kremi malenkost višji kot v gelu, vendar so še vedno vsi vzorci znotraj območja sprejemljive vsebnosti (90-110% od deklarirane vsebnosti). S tem smo tudi potrdili, da je metoda ustrezna za določevanje dekspantenola v kremi. Zakaj so odzivi malenkost večji, ne moremo popolnoma razložiti.

4.2.2. Vsebnost klorheksidina

Klorheksidin naj bi bil v gelu v obliki klorheksidina diglukonata, vendar ker smo ugotovili, da gel ne vsebuje klorheksidina, nimamo rezultatov za njegovo vsebnost v gelu. Da bi potrdili, da je naša metoda ustrezna za določanje klorheksidina, smo določali njegovo vsebnost v kremi Bepanthen plus. Klorheksidin je v kremi v obliki diklorida. Za določanje njegove vsebnosti smo pripravili 5 vzorcev ter za vsak vzorec posneli kromatogram. Naprej smo postopali enako kot pri določanju vsebnosti dekspantenola v kremi. V preglednici 4 so podani dobljeni rezultati.

Preglednica 4: Rezultati določanja vsebnosti klorheksidina v kremi Bepanthen plus

Vzorec	Površina pod vrhom klorheksidina	Koncentracija klorheksidina (mg/L)	Vsebnost (mg/g)	(vsebnost/deklarirana vsebnost) [%]
1	1077,20	98,14	4,91	98,10
2	1098,92	100,11	5,00	100,07
3	1057,53	96,36	4,82	96,32
4	1038,28	94,62	4,73	94,59
5	1070,45	97,53	4,87	97,49
Povprečje			4,87	97,31
SD			0,10	2,04
RSD			2,10	

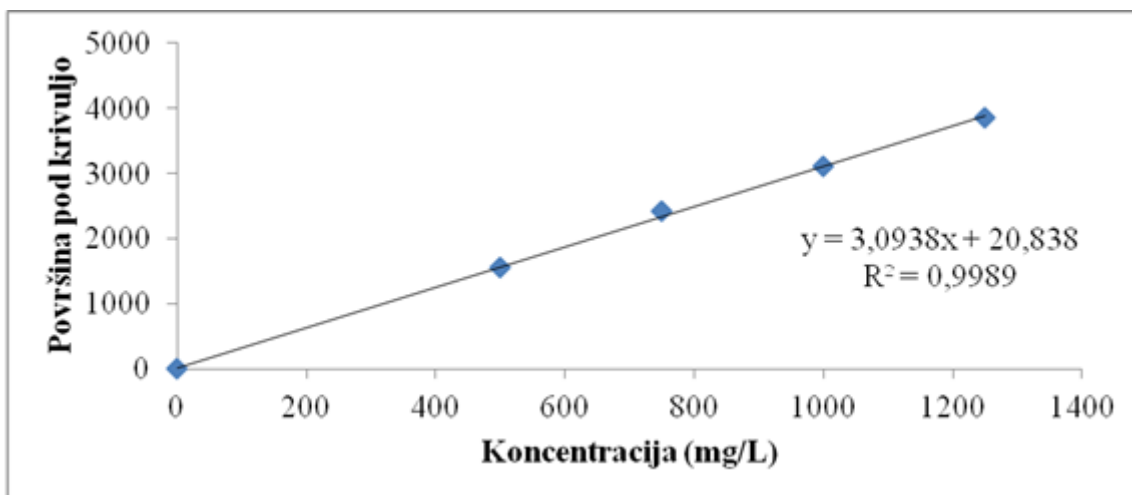
Dobljeni rezultati potrjujejo, da vsebnost klorheksidina diklorida ustreza, saj so vsi vzorci znotraj območja sprejemljive vsebnosti (90-110% od deklarirane vsebnosti) ter odstopanja od deklarirane vsebnosti niso velika. S tem smo tudi potrdili, da je metoda primerna za določanje klorheksidina v kremi.

4.3. Validacija

4.3.1. Linearnost metode

Linearnost metode smo določali tako, da smo pripravili osem standardov dekspantenola naraščajočih koncentracij na območju od 0 do 2250 mg/L. Za vsak vzorec smo posneli kromatogram in s programom Chemstation dobili podatke o površinah. V Excel-u smo nato iz dobljenih podatkov narisali grafe, kjer so x vrednosti koncentracije standardov in y vrednosti so dobljene površine standardov. Ker je bil razpon koncentracij standardov velik, smo naredili dva grafa (graf 1 in graf 2), in sicer enega za nižje (od 0 do 1000 mg/L), drugega pa za višje (od 1000 do 2250 mg/L) koncentracije dekspantenola. Nižje območje koncentracij uporabljamo za profile sproščanja gela, višje pa za vsebnostne in stabilnostne študije.

Graf 1: Umeritvena premica za nižje koncentracije dekspantenola



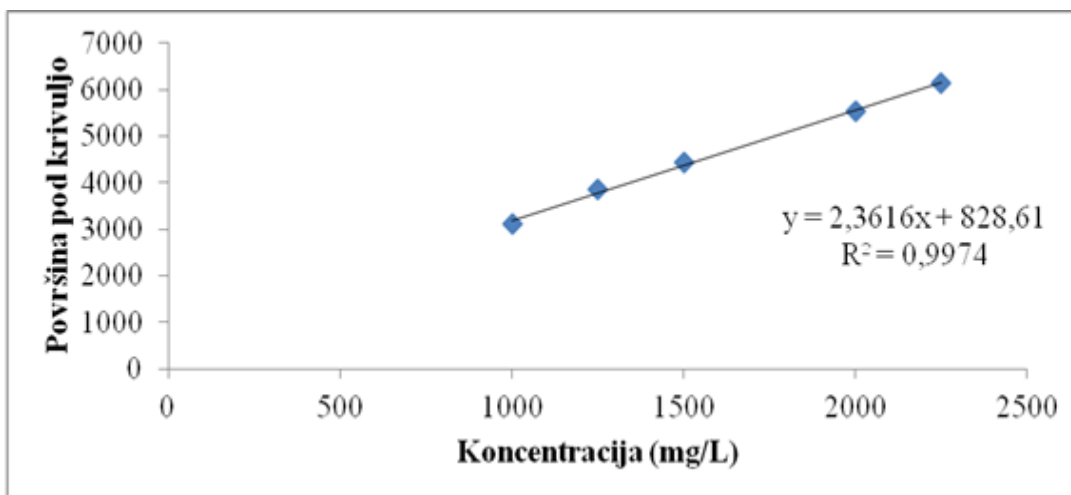
Da bi potrdili linearnost metode, smo izračunali parametre regresije (preglednica 5), in sicer Pearsonov korelacijski koeficient (r), odsek na y osi (n), naklon premice (k) ter vsoto kvadriranih odklonov (r^2). Za potrditev linearnosti mora biti vrednost korelacijskega koeficienta $r \geq 0,999$ za določeno koncentracijsko območje.

Preglednica 5: Izračunani parametri regresije za nižje koncentracije dekspantenola

Naklon (slope)	3,094
Odsek na y osi (intercept)	20,838
Korelacijski koeficient (pearson)	0,999

Korelacijski koeficient ustreza kriteriju sprejemljivosti $r \geq 0,999$ (glede na smernice za validacijo - FDA Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods CDER), kar je indikacija za dobro linearnost metode za nižje koncentracije dekspantenola.

Graf 2: Umeritvena premica za višje koncentracije dekspantenola



Tudi za višje koncentracije smo izračunali vse parametre regresije (preglednica 6). Za potrditev linearnosti mora biti korelacijski koeficient $r \geq 0,999$.

Preglednica 6: Izračunani parametri regresije za višje koncentracije dekspantenola

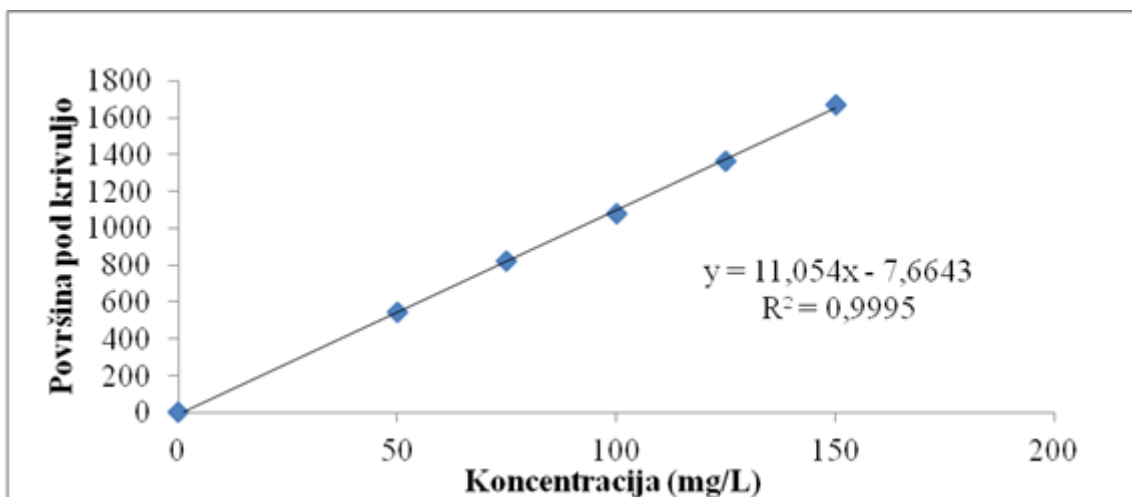
Naklon (slope)	2,362
Odsek na y osi (intercept)	828,615
Korelacijski koeficient (pearson)	0,999

Korelacijski koeficient ustreza kriteriju sprejemljivosti $r \geq 0,999$, kar je indikacija za dobro linearnost metode tudi za višje koncentracije dekspantenola.

Kljub temu, da gel ne vsebuje klorheksidina, smo želeli dokazati linearnost metode tudi za klorheksidin. Pripravili smo standarde tako klorheksidina diklorida kot klorheksidina diglukonata v takih koncentracijah, kot naj bi bili v kremi in gelu.

Za klorheksidin diklorid smo pripravili šest standardov naraščajočih koncentracij. Za vsak standard smo posneli kromatogram in s programom Chemstation smo pridobili podatek o površinah. V Excel-u smo iz pridobljenih podatkov narisali graf (graf 3), kjer x vrednosti predstavljajo koncentracijo standardov, medtem ko y vrednosti predstavljajo površine standardov.

Graf 3: Umeritvena premica za klorheksidin diklorid



Da bi lahko potrdili linearnost, smo izračunali parametre regresije (preglednica 7) ter preverili ustreznost kriterija sprejemljivosti $r \geq 0,999$.

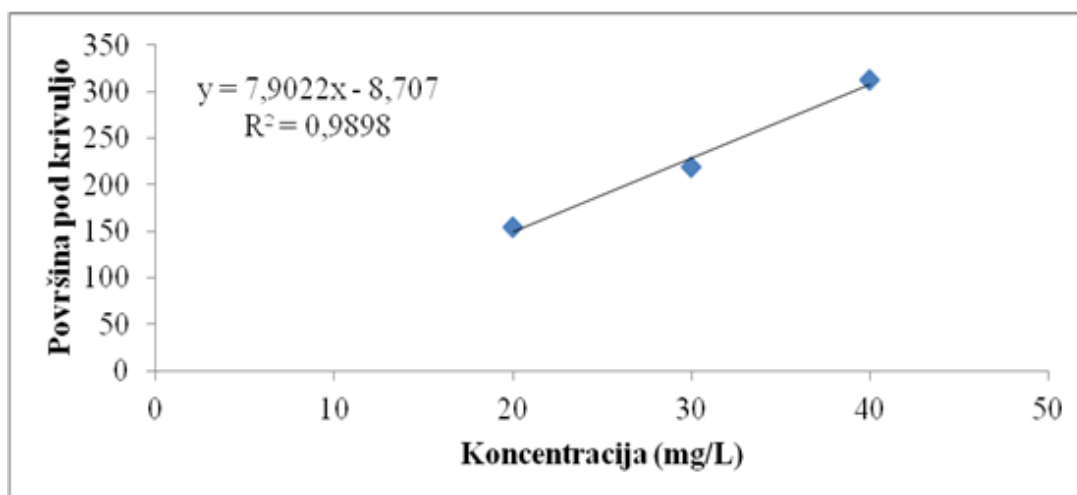
Preglednica 7: Izračunani parametri regresije za klorheksidin diklorid

Naklon (slope)	11,0538
Odsek na y osi (intercept)	-7,6643
Korelacijski koeficient (pearson)	0,9997

Korelacijski koeficient ustreza kriteriju sprejemljivosti $r \geq 0,999$, kar je indikacija za dobro linearnost metode za klorheksidin diklorid.

Obe obliki klorheksidina imata enak retencijski čas in površine so pri podobnih koncentracijah zelo podobne, zato lahko rečemo, da je metoda linearna tudi za klorheksidin diglukonat. Kljub temu smo želeli to dokazati s pripravo treh standardov naraščajočih koncentracij. Za vsak standard smo posneli kromatogram in s programom Chemstation smo dobili podatke o površinah. V Excel-u smo nato narisali graf (graf 4), kjer x vrednosti predstavljajo koncentracijo standardov in y vrednosti predstavljajo površine standardov. Tukaj pa zaradi nižjih koncentracij klorheksidina, nam ni bilo treba delati dveh premic za višje in nižje območje, saj smo ves čas v območju linearnosti UV detektorja.

Graf 4: Umeritvena premica za klorheksidin diglukonat



Izračunali smo parametre regresije (preglednica 8) za klorheksidin diglukonat in preverili ustreznost kriterija sprejemljivosti $r \geq 0,999$

Preglednica 8: Izračunani parametri regresije za klorheksidin diglukonat

Naklon (slope)	7,902
Odsek na y osi (intercept)	-8,707
Korelacijski koeficient (pearson)	0,995

Korelacijski koeficient je sicer malenkost nižji od 0.999, vendar zaradi majhne razlike je še vedno dobra indikacija za linearnost metode tudi za klorheksidin diglukonat.

Če pogledamo naklon pri obeh klorheksidinih, opazimo da sta različna (7,9 ter 11). Ta razlika je morda posledica različnih molekulskih mas in s tem različnim molarnim koncentracijam.

4.3.2. Ponovljivost metode

Ponovljivost metode smo določali tako, da smo pripravili 5 vzorcev gela in za vsak vzorec smo posneli kromatogram. V Excel-u smo iz umeritvene premice izračunali koncentracijo dekspantenola. Izračunali smo še povprečno vrednost ($\bar{y}$), standardno deviacijo (σ) ter relativno standardno deviacijo (preglednica 9). Kot kriterij sprejemljivosti smo določili $RSD \leq 2\%$.

Preglednica 9: Rezultati znotraj dnevnne ponovljivosti za dekspantenol

Vzorec	Površina pod vrhom dekspantenola	Izračunana koncentracija dekspantenola (mg/L)	Vsebnost (mg/g)
1	3064,96	983,95	49,18
2	3126,51	1003,84	50,17
3	3127,09	1004,03	50,18
4	3139,13	1007,92	50,37
5	3135,51	1006,75	50,28
Povprečje		1001,30	50,04
SD		9,86	0,49
RSD		0,98	0,97

Izračunani RSD je manjši od 2%, zato lahko potrdimo znotraj dnevno ponovljivost naše metode za dekspantenol.

Poleg znotraj dnevne ponovljivosti smo določali tudi med-dnevno ponovljivost. In sicer drugi dan smo pripravili še dodatnih 5 vzorcev, za katere smo posneli kromatograme in iz programa Chemstation dobili podatke o površinah. V Excel-u smo nato iz umeritvene krivulje izračunali koncentracijo dekspantenola. Nato smo dodali še vzorce iz prejšnjega dneva in za vseh 10 vzorcev izračunali povprečje ($\bar{y}$), standardno deviacijo (σ) ter relativno standardno deviacijo (preglednica 10). Kriterij sprejemljivosti je $RSD \leq 2\%$.

Preglednica 10: Rezultati med dnevne ponovljivosti za dekspantenol

Vzorec	Površina pod vrhom dekspantenola	Izračunana koncentracija dekspantenola (mg/l)	Vsebnost (mg/g)
1	3064,96	983,95	49,18
2	3126,51	1003,84	50,17
3	3127,09	1004,03	50,18
4	3139,13	1007,92	50,37
5	3135,51	1006,75	50,28
6	3134,91	1006,56	50,31
7	3136,58	1007,10	50,32
8	3124,53	1003,20	50,15

9	3146,26	1010,23	50,50
10	3113,83	999,74	49,98
Povprečje		1003,33	50,14
SD		7,41	0,37
RSD		0,74	0,73

RSD je tudi pri med dnevni ponovljivosti manjši od 2%, zato lahko potrdimo tudi med-dnevno ponovljivost naše metoda za deksantenol. S tem, ko smo potrdili ponovljivost, smo potrdili tudi natančnost metode.

Ker smo ugotovili, da gel ne vsebuje klorheksidina diglukonata, nismo mogli narediti še ponovljivosti za klorheksidin diglukonat. Da bi lahko vsaj potrdili, da metoda daje ponovljive rezultate za klorheksidin, smo pripravili pet vzorcev kreme Bepanthen plus, ki vsebuje klorheksidin diklorid. V Excel-u smo izračunali preko umeritvene krivulje še koncentracijo klorheksidina ter povprečno vrednost ($\bar{y}$), standardno deviacijo (σ) in relativno standardno deviacijo (preglednica 11). Kriterij sprejemljivosti je $RSD \leq 2\%$.

Preglednica 11: Rezultati ponovljivosti za klorheksidin diklorid v kremi Bepanthen plus

Vzorec	Površina pod vrhom klorheksidina	Koncentracija klorheksidina (mg/l)	Vsebnost (mg/g)
1	1077,20	98,14	4,91
2	1098,92	100,11	5,00
3	1057,53	96,36	4,82
4	1038,28	94,62	4,73
5	1070,45	97,53	4,87
Povprečje		97,35	4,87
SD		2,04	0,10
RSD		2,10	2,10

Izračunani RSD je 2,10%, kar je malenkost več kot 2%. Matematično gledano ne ustreza, toda, glede na to, da je odstop od sprejemljive vrednosti tako majhen, lahko v akademskem

okolju kljub takemu rezultatu za naše meritve vseeno rečemo, da so ustrezne za namen magistrske naloge, s tem da se zavedamo nekoliko večje variabilnosti rezultatov in vseh posledic, ki jih to prinaša. Je pa gotovo tukaj še prostor in možnost za nadaljnjo optimizacijo oz. izboljšave metode.

4.3.3. Točnost metode

Točnost metode smo določali za gel in tudi kremo Bepanthen plus, zato da bi potrdili, da je metoda točna tudi v ostalih poltrdnih dermalnih farmacevtskih oblikah. Najprej smo določali točnost za dekspantenol v gelu. Pripravili smo šest vzorcev gela z naraščajočimi koncentracijami dekspantenola ter za vsak vzorec posneli kromatogram. S programom Chemstation smo dobili podatke o površinah, v Excel-u pa smo izračunali koncentracijo dekspantenola ter odstopanje, ki smo ga izračunali po enačbi: $(\text{izmerjena vrednost} - \text{pričakovana vrednost}) / \text{pričakovana vrednost} * 100\%$ (preglednica 12).

Preglednica 12: Rezultati točnost metode v gelu

Dodana koncentracija dekspantenola (mg/L)	Površina pod vrhom dekspantenola	Izmerjena koncentracija dekspantenola (mg/L)	Pričakovana koncentracija (mg/L)	Odstopanje (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
500	1547,96	493,61	500,00	-1,28
750	2367,85	758,62	750,00	1,15
1000	3107,96	997,85	1000,00	-0,22
1250	3850,25	1237,78	1250,00	-0,98
1500	4424,60	1503,67	1500,00	0,24

Kriterij sprejemljivosti pri točnosti je, da mora biti odstopanje izmerjene vrednosti od pričakovane čim manjše (za metodo za vsebnost sme biti odstop do 2%). Izračunana odstopanja niso velika, kar nakazuje na dobro točnost metode. Da bi potrdili, da je naša metoda točna tudi v drugih poltrdnih dermalnih oblikah, smo pripravili še štiri vzorce kreme z naraščajočimi koncentracijami dekspantenola. V Excel-u smo izračunali

koncentracijo dekspantenola ter odstopanje, ki smo ga izračunali po enačbi: $(\text{izmerjena vrednost} - \text{pričakovana vrednost}) / \text{pričakovana vrednost} * 100\%$ (preglednica 13).

Preglednica 13: Rezultati točnosti za dekspantenol v kremi Bepanthen plus

Dodana koncentracija dekspantenola (mg/L)	Površina pod vrhom dekspantenola	Izmerjena koncentracija dekspantenola (mg/L)	Pričakovana koncentracija (mg/L)	Odstopanje (%)
1000	3233,19	1038,33	1000,00	3,83
1250	3837,98	1244,44	1250,00	-0,45
1500	4418,52	1500,99	1500,00	0,07
1750	4966,84	1743,30	1750,00	-0,38

Odstopanje izmerjene vrednosti od pričakovane mora biti čim nižje, da je točnost sprejemljiva. V našem primeru so odstopanja nizka z izjemo meritve pri koncentraciji 1000 mg/L, kar nakazuje na dobro točnost metode za dekspantenol tudi v kremi.

Določali smo tudi točnost za klorheksidin diklorid v gelu. Pripravili smo šest vzorcev placebo gela z naraščajočimi koncentracijami klorheksidina diklorida ter za vsak vzorec posneli kromatogram. S programom Chemstation smo pridobili podatke o površinah ter v Excel-u smo izračunali koncentracijo klorheksidina in odstopanje (preglednica 14).

Preglednica 14: Rezultati točnosti za klorheksidin diklorid v gelu

Dodana koncentracija klorheksidina diklorida (mg/L)	Površina pod vrhom klorheksidina	Izmerjena koncentracija klorheksidina diklorida (mg/L)	Pričakovana koncentracija (mg/L)	Odstopanje (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
50	544,80	49,98	50,00	-0,04
75	822,50	75,10	75,00	0,14
100	1076,90	98,12	100,00	-1,88
125	1367,20	124,38	125,00	-0,5

150	1669,50	151,73	150,00	1,15
-----	---------	--------	--------	------

Kriterij sprejemljivosti pri točnosti je da odstopanje izmerjene vrednosti od pričakovane je čim manjše (<2%). V našem primeru so odstopanja majhna, kar nakazuje na dobro točnost metode za klorheksidin diklorid v gelu.

Da bi potrdili, da je naša metoda točna za klorheksidin tudi v drugih poltrdnih dermalnih oblikah, smo pripravili še štiri vzorce kreme (Bepanthen plus) z naraščajočimi koncentracijami klorheksidina diklorida. Za vsak vzorec smo posneli kromatogram in s pomočjo programa Chemstation smo pridobili podatek o površinah. V Excel-u smo izračunali koncentracijo klorheksidina ter odstopanje izmerjene vrednosti od pričakovane (preglednica 15).

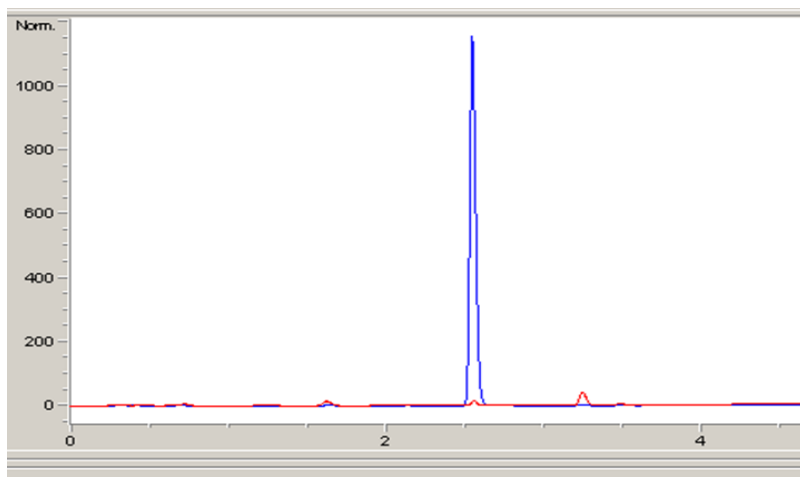
Preglednica 15: Rezultati točnosti za klorheksidin diklorid v kremi Bepanthen plus

Dodana koncentracija klorheksidina diklorida(mg/L)	Površina pod vrhom klorheksidina	Izmerjena koncentracija klorheksidina diklorida (mg/L)	Pričakovana koncentracija (mg/L)	Odstopanje (%)
100	1070,45	97,53	100,00	-2,47
125	1257,61	114,47	125,00	-8,43
150	1563,89	142,17	150,00	-5,22
175	1797,26	163,29	175,00	-6,69

Točnost metode določamo glede na odstopanje izmerjene vrednosti od pričakovane vrednosti. To odstopanje mora biti čim manjše. Dobljena odstopanja za klorheksidin so konkretno višja od dovoljenih, zato ne moremo potrditi ustrezne točnosti naše metode za določevanje klorheksidina v kremi.

4.3.4. Specifičnost metode

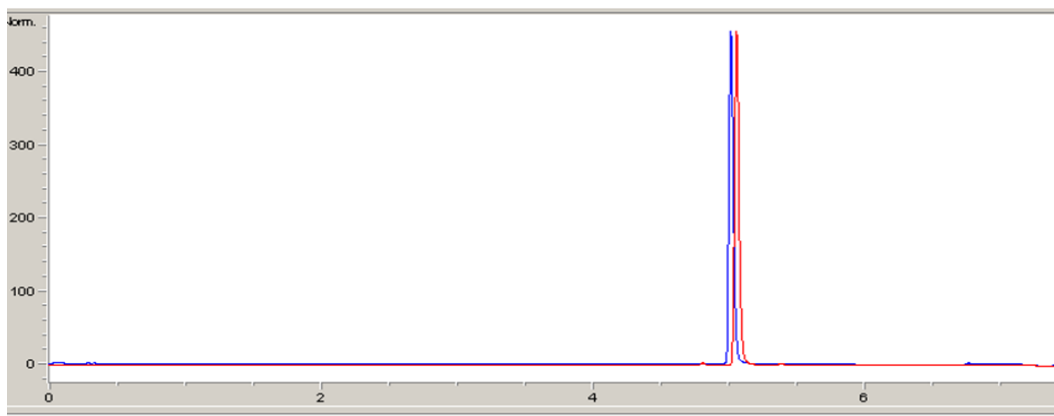
Specifičnost metode za dekspantenol smo določali tako, da smo posneli kromatogram vzorca iz placebo gela, kateri vsebuje vse sestavine razen dekspantenola in vzorec pripravljen iz gela, ki vsebuje vse sestavine vključno z dekspantenolom (slika 14).



Slika 14: Prekrita kromatograma vzorca placebo gela (rdeča črta) in vzorca gela (modra črta). x os predstavlja čas v minutah, y os pa odziv v mAU*s.

Metoda je specifična za dekspantenol, če pomeri dekspantenol ne glede na prisotnost ostalih sestavin v testiranem vzorcu. Torej pomožne snovi ne smejo motiti analize želenega analita. Iz prekritih kromatogramov vidimo, da ostale snovi v vzorcu, npr. pomožne snovi ne motijo analize dekspantenola, tako da lahko potrdimo, da je metoda specifična za dekspantenol.

Kljub temu, da gel ne vsebuje klorheksidina, smo želeli pokazati, da je metoda specifična tudi za klorheksidin. Zato smo posneli kromatogram vzorca pripravljenega iz kreme Bepanthen plus, katera vsebuje klorheksidin diklorid ter kromatogram standarda klorheksidina diklorida pri koncentraciji, ki ustreza 100% vsebnosti (slika 15). Žal nismo imeli na razpolago placebo kreme, vendar vsaj lahko prikažemo, da metoda točno in natančno pomeri klorheksidin kljub prisotnosti ostalih pomožnih snovi v kremi. Vpliv ostalih komponent vzorca na retencijski čas analita je tudi minimalen (ca. 0,03 min)



Slika 15: Prekrita kromatograma kreme Bepanthen plus (rdeča črta, $t_r=5,13$ min) in standarda klorheksidina diklorida (modra črta, $t_r=5,10$ min). x os predstavlja čas v minutah, y os pa odziv v mAU*s.

4.3.5. Robustnost metode

Da bi potrdili robustnost metode na večkratno injiciranje, smo najprej en vzorec pripravljen iz analiziranega gela, injicirali 50-krat pri nespremenjenih parametrih metode. Po vsakem desetem injiciranju smo injicirali en standardni vzorec. Za vsakih deset injiciranj vzorca smo v Excel-u izračunali RSD (preglednici 16 in 17).

Preglednica 16: Rezultati prvih treh sklopov injiciranj vzorca gela

Število injiciranj (prvih deset)	Površina pod vrhom dekspantenola	Število injiciranj (drugih deset)	Površina pod vrhom dekspantenola	Število injiciranj (tretjih deset)	Površina pod vrhom dekspante nola
1	3054,09	1	3053,35	1	3070,71
2	3052,74	2	3058,34	2	3065,53
3	3047,16	3	3057,62	3	3065,95
4	3052,63	4	3052,99	4	3061,80
5	3053,13	5	3052,17	5	3065,75
6	3059,93	6	3059,73	6	3070,38
7	3054,06	7	3053,68	7	3063,55
8	3047,96	8	3056,40	8	3070,97
9	3057,77	9	3052,72	9	3068,74
10	3054,77	10	3053,81	10	3068,68
Povprečje	3053,42	Povprečje	3055,08	Povprečje	3067,21
SD	3,86	SD	2,70	SD	3,17
RSD	0,13	RSD	0,09	RSD	0,10

Preglednica 17: Rezultati zadnjih dveh sklopov injiciranj vzorca gela

Število injiciranj (četrth deset)	Površina pod vrhom dekspantenola	Število injiciranj (petih deset)	Površina pod vrhom dekspantenola
1	3057,58	1	3062,38
2	3050,21	2	3059,04
3	3051,03	3	3057,42
4	3052,64	4	3061,86
5	3055,32	5	3060,24
6	3048,97	6	3064,50
7	3049,68	7	3065,27
8	3055,24	8	3071,38
9	3059,79	9	3065,26
10	3056,42	10	3061,77
Povprečje	3053,69	Povprečje	3062,91
SD	3,71	SD	3,95
RSD	0,12	RSD	0,13

Rezultati kažejo, da se površine med desetkrat injiciranimi vzorci ne spremenijo za veliko, to vidimo že po RSD-jih, kateri so zelo nizki. Na podlagi teh rezultatov lahko potrdimo, da je tudi po mnogokratnem injiciranju pripravljenega vzorca gela metoda robustna.

Pri drugem delu testiranja robustnosti metode smo spremenili sestavo mobilne faze. In sicer mobilna faza metode vsebuje 0,05% H_3PO_4 , pri testiranju smo pripravili eno mobilno fazo z 0,04% in eno z 0,06% H_3PO_4 . Pomerili smo dva različna vzorca s spremenjenima mobilnima fazama. Vsak vzorec smo injicirali dvakrat (preglednice 18,19 in 20).

Preglednica 18: Rezultati robustnosti pri spremenjeni sestavi mobilne faze (vzorci: standard dekspantenola in klorheksidina diklorida)

MF: 0,04% H_3PO_4

Vzorci	tr dekspantenola	Površina pod vrhom dekspantenola	tr klorheksidina	Površina pod vrhom klorheksidina
Standard DEX + KH K	2,539	3167,12	5,068	1160,87
Standard DEX + KH K	2,538	3173,20	5,075	1162,97
Povprečje		3170,16		1161,92
SD		4,30		1,49
RSD		0,14		0,13
MF: 0,06% H₃PO₄				
Vzorci	tr dekspantenola	Površina pod vrhom dekspantenola	tr klorheksidina	Površina pod vrhom klorheksidina
Standard DEX + KH K	2,526	3177,51	5,233	1173,07
Standard DEX + KH K	2,529	3170,96	5,232	1172,55
Povprečje		3174,23		1172,81
SD		4,63		0,37
RSD		0,15		0,03

Preglednica 19: Rezultati robustnosti pri spremenjeni sestavi mobilne faze (vzorci: standard dekspantenola in klorheksidina diglukonata)

MF: 0,04% H₃PO₄
--

Vzorci	tr dekspantenola	Površina pod vrhom dekspantenola	tr klorheksidina	Površina pod vrhom klorheksidina
Standard DEX + KH G	2,540	3114,61	5,085	228,92
Standard DEX + KH G	2,540	3112,05	5,085	228,55
Povprečje		3113,33		228,73
SD		1,81		0,26
RSD		0,06		0,11
MF: 0,06% H₃PO₄				
Vzorci	tr dekspantenola	Površina pod vrhom dekspantenola	tr klorheksidina	Površina pod vrhom klorheksidina
Standard DEX + KH G	2,531	3116,17	5,244	222,22
Standard DEX + KH G	2,529	3118,21	5,239	222,55
Povprečje		3117,19		222,39
SD		1,44		0,23
RSD		0,05		0,10

Preglednica 20: Rezultati standardov dekspantenola, klorheksidina diglukonata in klorheksidina diklorida pri normalnih pogojih

0,05% H₃PO₄				
Vzorci	tr dekspantenola	Površina po vrhom dekspantenola	tr klorheksidina	Površina pod vrhom klorheksidina

Standard DEX + KH K	2,530	3173,67	5,12	1147,98
Standard DEX + KH G	2,533	3076,80	5,231	225,87

Kljub spreminjanju sestave mobilne faze se površine vzorcev glede na površine pri nespremenjeni sestavi mobilne faze ne spreminjajo za veliko, zato lahko potrdimo, da je metoda robustna tudi ob spreminjanju sestave mobilne faze.

4.3.6. Stabilnost

Stabilnost smo določali za dekspantenol in klorheksidin v gelu in kremi Bepanthen plus pri različnih temperaturah in ob prisotnosti baze, kisline in peroksida. Želeli smo ugotoviti, na katere dejavnike sta občutljiva. Ker gel ne vsebuje klorheksidina, imamo podatke za stabilnost v gelu le za dekspantenol.

4.3.6.1. Stabilnost pri različnih temperaturah

Vzorci gela in kreme smo izpostavili trem različnim temperaturam: sobni temperaturi ($T=24^{\circ}\text{C}$), 40°C ter -22°C . Natehtali smo po tri vzorce gela in po tri vzorce kreme za vsako temperaturo. En vzorec gela in kreme od vsake temperature smo pripravili in pomerili ob času 0. Ostale pa smo pomerili po dveh tednih in po štirih tednih (preglednice 21,22,23). Za vsako temperaturo smo v Excel-u narisali graf, kjer x vrednost predstavlja čas, y vrednost pa koncentracijo analita.

Preglednica 21: Rezultati stabilnosti dekspantenola in neznane sorodne snovi v gelu pri 40°C

Čas (tedni)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom neznane sorodne snovi
0	3126,51	100,00	821,65
2	3129,20	100,09	884,13
4	3108,77	99,43	850,10

Razlika v koncentracijah dekspantenola skozi tedne ni velika, zato lahko potrdimo, da je dekspantenol stabilen pri temperaturi 40°C v testiranem časovnem obdobju. Podali smo tudi rezultate o površini neznane sorodne snovi, ki jo vsebuje gel. Glede na rezultate lahko sklepamo, da je tudi neznana sorodna snov stabilna pri temperaturi 40°C.

Preglednica 22: Rezultati stabilnosti dekspantenola in neznane sorodne snovi v gelu pri -22°C

Čas (tedni)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom neznane sorodne snovi
0	3126,51	100,00	821,65
2	3117,99	99,73	920,70
4	3126,99	100,02	853,17

Tudi pri temperaturi -22°C se koncentracije dekspantenola ne spreminjajo za veliko, zato lahko potrdimo, da je dekspantenol stabilen pri temperaturi -22°C. Pri rezultatih za neznano sorodno snov opazimo večja nihanja v površini.

Preglednica 23: Rezultati stabilnosti dekspantenola in neznane sorodne snovi v gelu pri sobni temperaturi

Čas (tedni)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom neznane sorodne snovi
0	3126,51	100,00	821,65
2	3139,70	100,42	915,40
4	3142,15	100,50	831,43

Dekspantenol je pri sobni temperaturi tudi stabilen, saj se njegova koncentracija skozi tedne ne spreminja za veliko. Med tem ko površina pod vrhom neznane sorodne snovi skozi tedne niha.

Poleg stabilnosti dekspantenola v gelu smo določali tudi stabilnost dekspantenola in klorheksidina v kremi. Površine dekspantenola in klorheksidina so pri kremi višje, saj smo vzorce pomerili na drugem HPLC-ju. Koncentracije so izračunane preko umeritvene krivulje, ki je bila pomerjena na istem HPLC-ju, kot vzorci, tako da lahko rezultate primerjamo med sabo (preglednice 24,25,26).

Preglednica 24: Rezultati stabilnosti dekspantenola in klorheksidina v kremi Bepanthen plus pri 40°C

Čas (dnevi)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom klorheksidin	Delež klorheksidina glede na koncentracijo ob času 0 (%)
0	8759,24	100,00	1078,78	100,00
14	9184,29	104,85	1527,99	141,64
28	9202,00	105,05	1689,26	156,59

Koncentraciji obeh analitov skozi tedne naraščata, za kar sklepamo, da je kriva visoka temperatura, saj krema vsebuje hlapne snovi, ki so verjetno skozi tedne izhlapevale. Če bi koncentracija obeh analitov padala, bi lahko posumili na nestabilnost, vendar v našem primeru narašča, zato sklepamo, da sta oba analita stabilna pri temperaturi 40°C.

Preglednica 25: Rezultati stabilnosti dekspantenola in klorheksidina v kremi Bepanthen plus pri -22°C

Čas (dnevi)	Površina pod vrhom	Delež dekspantenola glede na	Površina pod vrhom	Delež klorheksidina glede na
----------------	-----------------------	------------------------------------	-----------------------	------------------------------------

	dekspantenola	koncentracijo ob času 0 (%)	klorheksidin	koncentracijo ob času 0 (%)
0	8759,24	100,00	1078,78	100,00
14	9020,81	102,99	1140,25	105,70
28	9192,23	104,94	1035,37	95,98

Koncentracija obeh analitov skozi tedne nekoliko niha (do 5%), vendar večjega padca koncentracije nismo zaznali, zato lahko sklepamo, da sta oba analita stabilna pri temperaturi -22°C.

Preglednica 26: Rezultati stabilnosti dekspantenola in klorheksidina v kremi Bepanthen plus pri sobni temperaturi

Čas (dnevi)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom klorheksidin	Delež klorheksidina glede na koncentracijo ob času 0 (%)
0	8759,24	100,00	1078,78	100,00
14	9124,91	104,17	934,45	86,62
28	9049,33	103,31	1028,37	95,33

Koncentracija dekspantenola skozi tedne malenkost niha, vendar ni nobenega večjega padca koncentracije, zato lahko potrdimo, da je dekspantenol tudi v kremi stabilen pri sobni temperaturi. Večje nihanje gor-dol-gor pa opazimo pri klorheksidinu. Ker je predznak spremembe zaznati v obe smeri, sklepamo, da ne gre za težavo stabilnosti klorheksidina, temveč za težavo neponovljivega izkoristka priprave vzorca. To se tudi sklada z nekoliko slabšo točnostjo te metode (glejte preglednico 15).

Če primerjamo stabilnost dekspantenola v gelu in kremi, vidimo, da je v obeh dermalnih oblikah pri enakih temperaturah enako stabilen.

4.3.6.2. Stabilnost ob dodatku stresnih raztopin

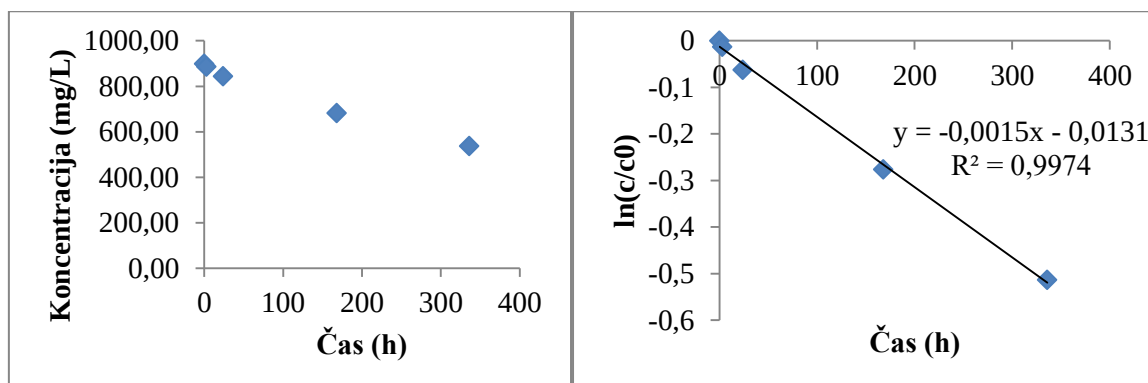
Vzorci gela in kreme smo izpostavili štirim različnim stresnim raztopinam: 1M NaOH, 1M HCl, 30% H₂O₂ ter vodi. Pripravili smo vzorce, ki smo jim dodali določene količine stresnih raztopin in jih analizirali v določenih časovnih obdobjih (preglednica 27, 28, 29, 30). Za vsako stresno raztopino smo v Excel-u narisali graf, kjer x vrednost predstavlja čas, y vrednost pa koncentracijo analita.

Preglednica 27: Rezultati stabilnosti dekspantenola in neznane sorodne snovi v gelu ob dodatku 1M HCl

Čas (h)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom neznane sorodne snovi	Delež neznane sorodne snovi glede na koncentracijo ob času 0 (%)
0	2799,94	100,00	678,87	100,00
3	2763,41	98,70	676,73	99,69
24	2631,31	93,98	695,93	102,51
168	2129,42	76,05	813,77	119,87
336	1683,76	60,14	768,83	113,25

Dekspantenol ob dodatku kisline počasi razpada. Po dveh tednih ga je razpadlo 40 %. Glede na rezultate lahko sklepamo, da je dekspantenol v gelu ob prisotnosti kisline na daljši rok nestabilen. Podali smo tudi rezultate za neznano sorodno snov prisotno v gelu. Glede na rezultate vidimo, da njena površina skozi čas narašča, kar govori v prid domnevi, da gre za razgradni produkt klorheksidina.

Graf 5: Stabilnost dekspantenola v gelu ob dodatku 1M HCl (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)

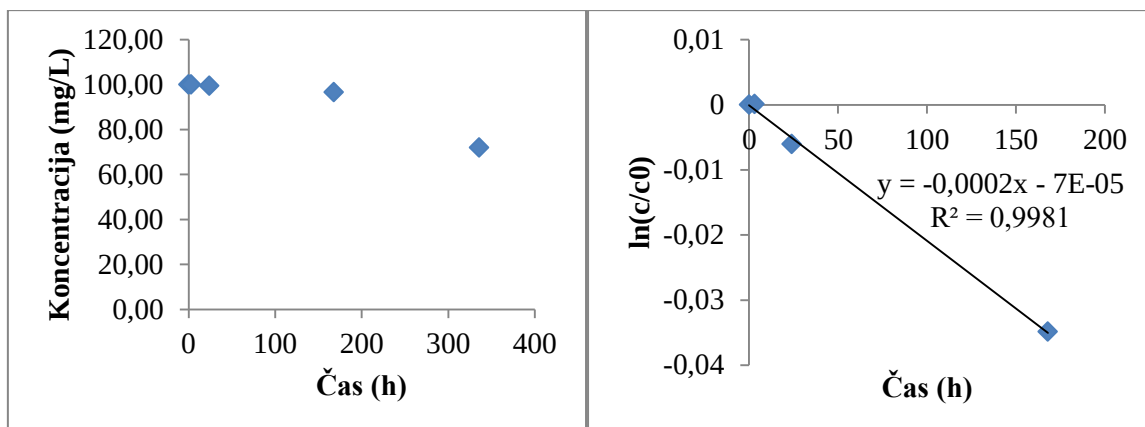


Preglednica 28: Rezultati stabilnosti dekspantenola in neznane sorodne snovi v gelu ob dodatku 30% H_2O_2

Čas (h)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom neznane sorodne snovi	Delež neznane sorodne snovi glede na koncentracijo ob času 0 (%)
0	2852,48	100,00	678,95	100
3	2852,76	100,01	677,42	99,78
24	2835,30	99,40	687,58	101,27
168	2754,72	96,57	679,67	100,11
336	2051,24	71,91	724,08	106,65

Dekspantenol ob dodatku 30% H_2O_2 počasi razpada, po dveh tednih ga je razpadlo 30%. Glede na rezultate lahko sklepamo, da je dekspantenol v gelu na daljši rok nestabilen ob prisotnosti H_2O_2 , ali morebitnih drugih oksidantov. Iz podatkov za neznano sorodno snov opazimo, da njegova površina skozi čas narašča, vendar ne toliko kot ob dodatku kisline.

Graf 6: Stabilnost dekspantenola v gelu ob dodatku 30% H_2O_2 (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)

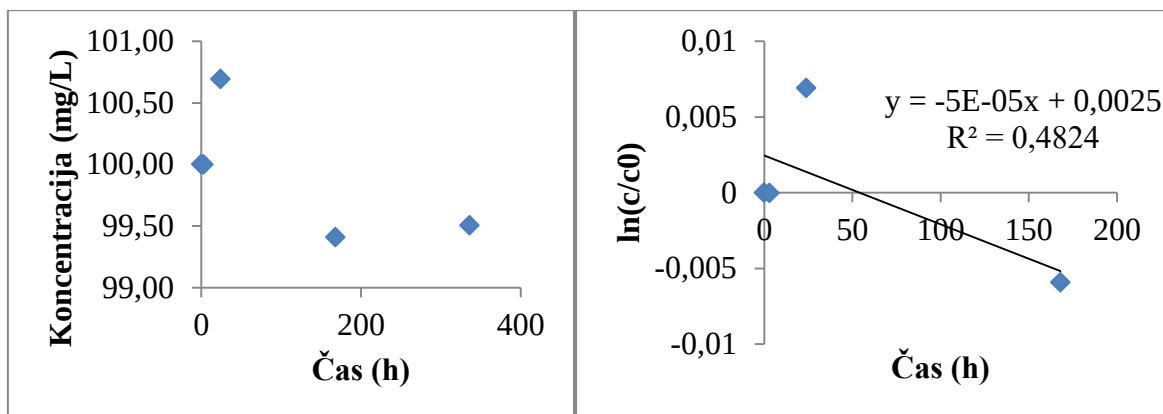


Preglednica 29: Rezultati stabilnosti dekspantenola in neznane sorodne snovi v gelu ob dodatku vode

Čas (h)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom neznane sorodne snovi	Delež neznane sorodne snovi glede na koncentracijo ob času 0 (%)
0	2808,67	100,00	680,10	100,00
3	2808,61	100,00	679,92	99,97
24	2828,11	100,69	699,79	102,90
168	2792,09	99,41	668,00	98,22
336	2794,75	99,50	780,60	114,78

Dekspantenol v gelu ob dodatku vode ne razpada. Skozi tedne se njegova koncentracija zelo malo spreminja, zato lahko potrdimo, da je dekspantenol v gelu ob prisotnosti vode stabilen. Tudi pri neznani sorodni snovi opazimo, da površina zelo malo niha.

Graf 7: Stabilnost dekspantenola v gelu ob dodatku vode (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)



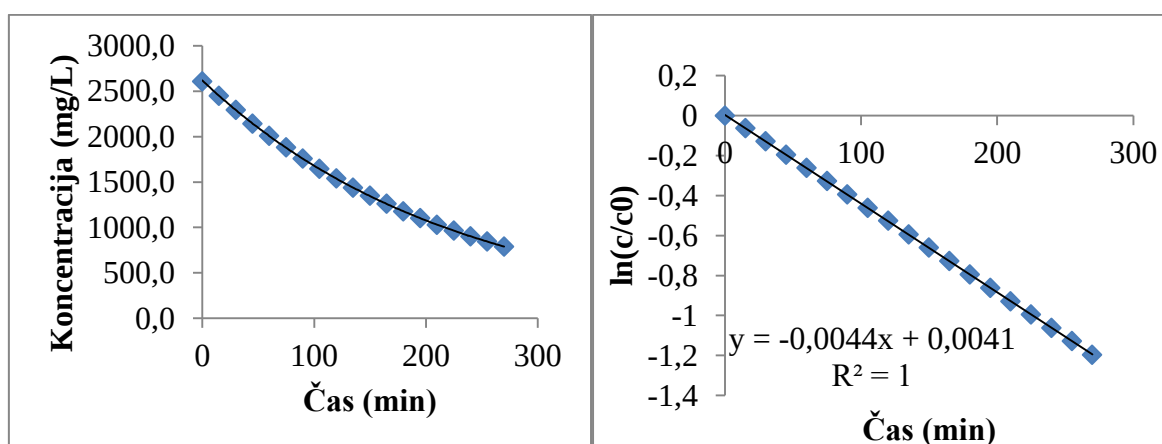
Preglednica 30: Rezultati stabilnosti dekspantenola in neznane sorodne snovi v gelu ob dodatku 1M NaOH

Čas (min)	Površina pod vrhom dekspantenola	Delež dekspantenola glede na koncentracijo ob času 0 (%)	Površina pod vrhom neznane sorodne snovi	Delež neznane sorodne snovi glede na koncentracijo ob času 0 (%)
0	2608,06	100,00	660,89	100,00
15	2448,15	93,87	629,05	95,18
30	2292,14	87,89	598,40	90,54
45	2143,19	82,18	569,03	86,10
60	2006,55	76,94	542,13	82,03
75	1881,57	72,14	515,80	78,05
90	1759,05	67,45	490,24	74,18
105	1643,75	63,03	466,77	70,63
120	1540,27	59,06	445,01	67,34
135	1438,29	55,15	423,69	64,11
150	1347,25	51,66	403,06	60,99

165	1259,66	48,30	384,51	58,18
180	1177,67	45,15	365,39	55,29
195	1101,07	42,22	348,41	52,72
210	1029,58	39,48	331,99	50,23
225	963,58	36,95	316,07	47,82
240	900,78	34,54	301,36	45,60
255	844,39	32,38	287,57	43,51
270	788,19	30,22	273,94	41,45

Dekspantenol v gelu ob dodatku baze zelo hitro razpade v primerjavi z ostalimi stresnimi raztopinami. V roku 4,5 ur ga razpade 70%, zato lahko potrdimo, da je dekspantenol v gelu zelo nestabilen ob prisotnosti baze. Tudi za neznano sorodno snov lahko sklepamo, da je občutljiva na bazo, saj jo razpade v roku 4,5 ur 60%.

Graf 8: Stabilnost dekspantenola v gelu ob dodatku 1M NaOH (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)

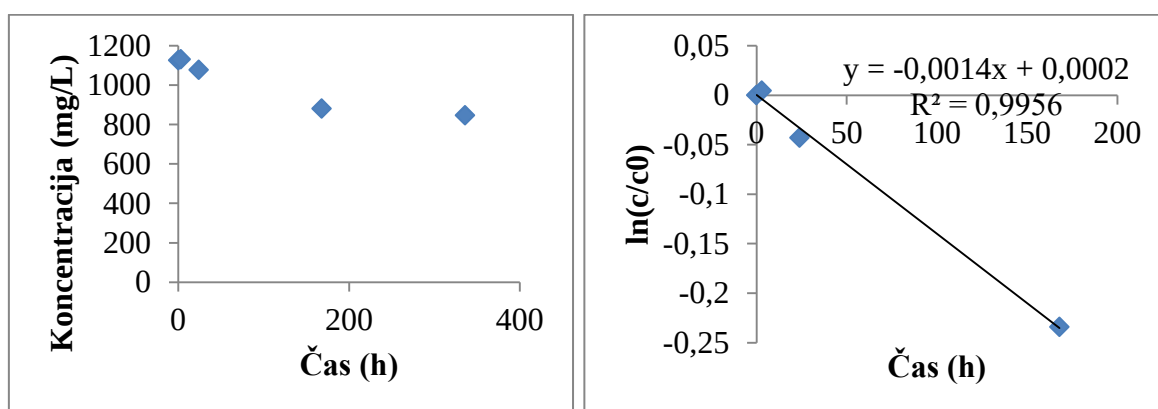


Preglednica 31: Rezultati stabilnosti dekspantenola in klorheksidina v kremi Bepanthen plus ob dodatku 1M HCl

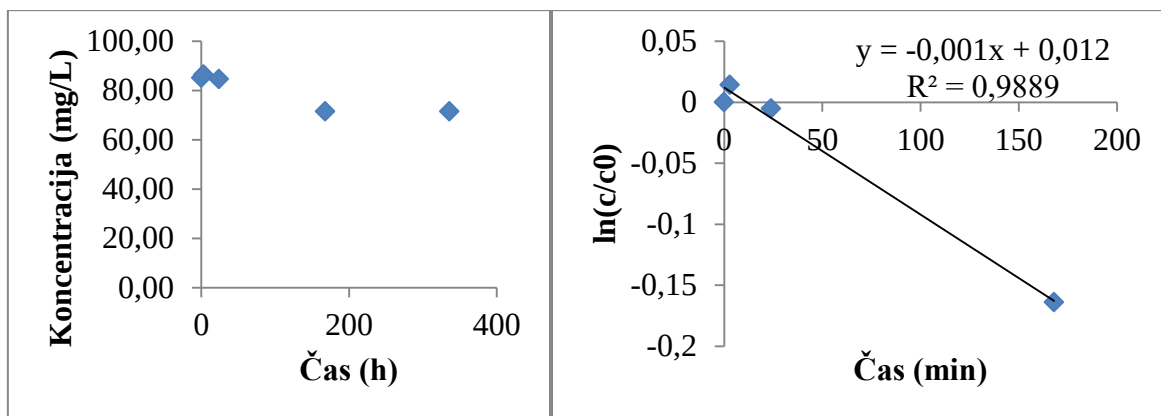
Čas (h)	Površina pod vrhom dekspantenola	Koncentracija dekspantenola (mg/l)	Površina pod vrhom klorheksidina	Koncentracija klorheksidina (mg/l)
0	9282,48	1126,34	1948,28	85,15
3	9324,39	1131,66	1976,35	86,44
24	8890,95	1076,68	1938,08	84,68
168	7345,93	880,70	1653,35	71,54
336	7077,68	846,67	1651,06	71,43

V primerjavi z dekspantenolom v gelu, vidimo, da je dekspantenol v kremi malo manj razpadel ob prisotnosti kisline. To razliko bi lahko pripisali razliki v sestavi samega gela in kreme. Saj morda sestava kreme vpliva na razpad dekspantenola. Klorheksidin po rezultatih sodeč ni zelo občutljiv na kislino, saj ga je v dveh tednih razpadlo le 16%.

Graf 9: Stabilnost dekspantenola v kremi ob dodatku 1M HCl (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)



Graf 10: Stabilnost klorheksidina v kremi ob dodatku 1M HCl (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)

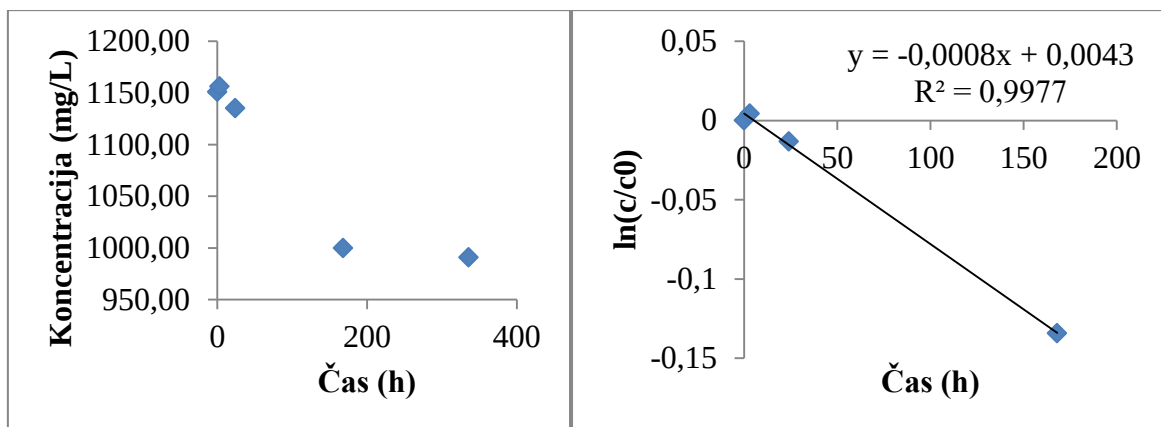


Preglednica 32: Rezultati stabilnosti dekspantenola in klorheksidina v kremi Bepanthen plus ob dodatku 30% H₂O₂

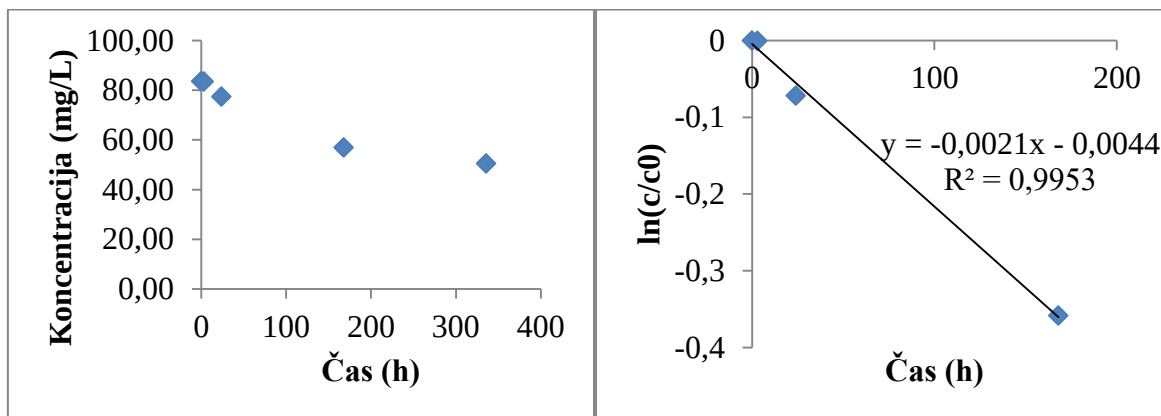
Čas (h)	Površina pod vrhom dekspantenola	Koncentracija dekspantenola (mg/l)	Površina pod vrhom klorheksidina	Koncentracija klorheksidina (mg/l)
0	9475,64	1150,84	1913,07	83,52
3	9516,65	1156,05	1911,87	83,47
24	9350,95	1135,03	1779,90	77,38
168	8284,41	999,74	1336,89	56,94
336	8215,45	990,99	1195,54	50,42

Dekspantenol v gelu je v primerjavi z dekspantenolom v kremi hitreje razpadal, saj ga je v kremi po dveh tednih razpadlo 14%, med tem ko v gelu pa 30%. Razliko v hitrosti razpada dekspantenola lahko pripišemo razliki v sestavi med gelom in kremo. Klorheksidin pa je v dveh tednih razpadel za 40%, glede na to lahko sklepamo, da je klorheksidin ob prisotnosti 30% H₂O₂ nestabilen po določenem času izpostavljenosti.

Graf 11: Stabilnost dekspantenola v kremi ob dodatku 30% H₂O₂ (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)



Graf 12: Stabilnost klorheksidina v kremi ob dodatku 30% H_2O_2 (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)

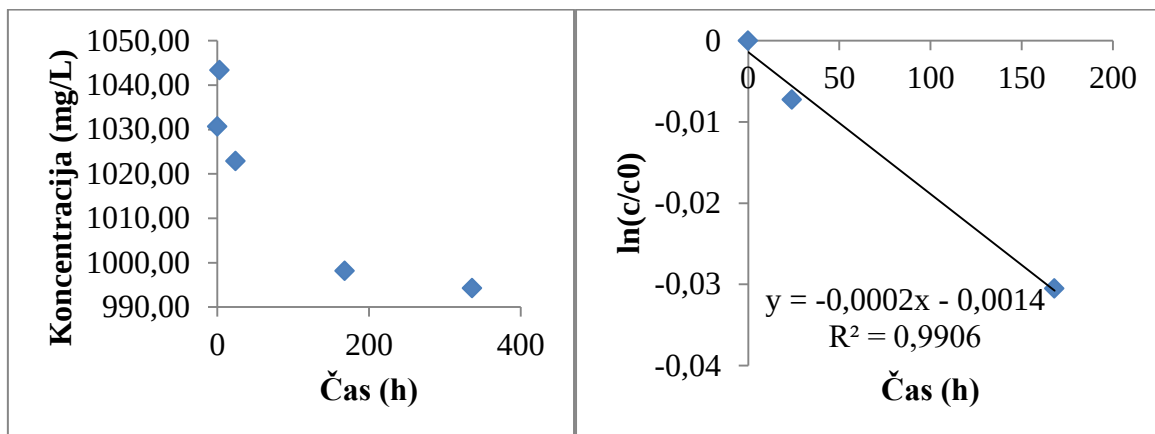


Preglednica 33: Rezultati stabilnosti dekspantenola in klorheksidina v kremi Bepanthen plus ob dodatku H_2O

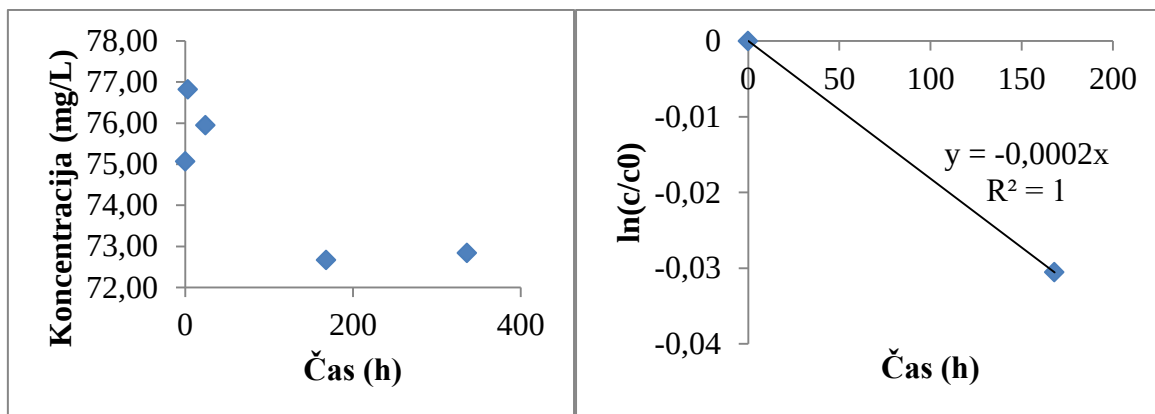
Čas (h)	Površina pod vrhom dekspantenola	Koncentracija dekspantenola (mg/l)	Površina pod vrhom klorheksidina	Koncentracija klorheksidina (mg/l)
0	8528,28	1030,67	1729,73	75,06
3	8627,90	1043,31	1767,86	76,82
24	8466,60	1022,85	1748,93	75,95
168	8271,93	998,16	1677,70	72,66
336	8241,29	994,27	1681,50	72,84

Dekspantenol v kremi tako kot dekspantenol v gelu ne razpada občutno ob prisotnosti vode, zato lahko potrdimo, da je dekspantenol stabilen ob prisotnosti vode. Enako lahko potrdimo za klorheksidin, saj ne razpada ob prisotnosti vode.

Graf 13: Stabilnost dekspantenola v kremi ob dodatku H₂O (levi graf prikazuje c(t), desni graf prikazuje ln(c/c₀))



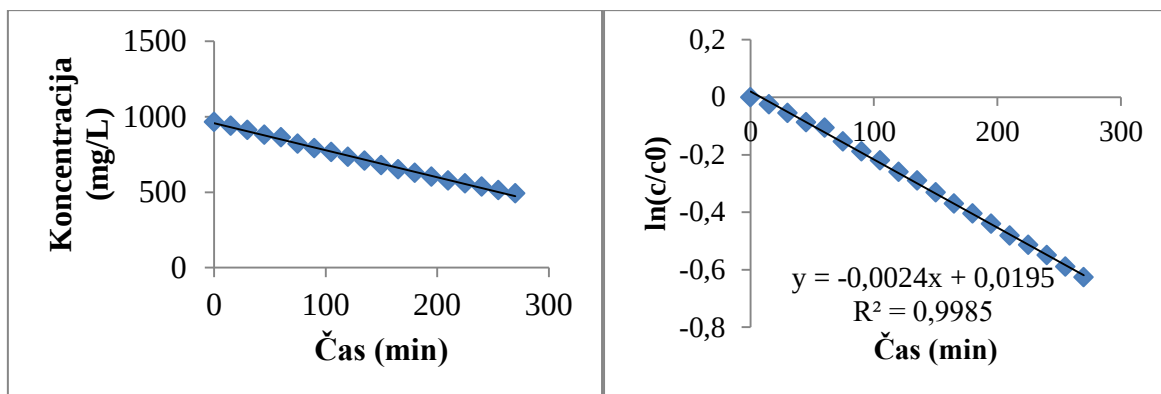
Graf 14: Stabilnost klorheksidina v kremi ob dodatku H₂O (levi graf prikazuje c(t), desni graf prikazuje ln(c/c₀))



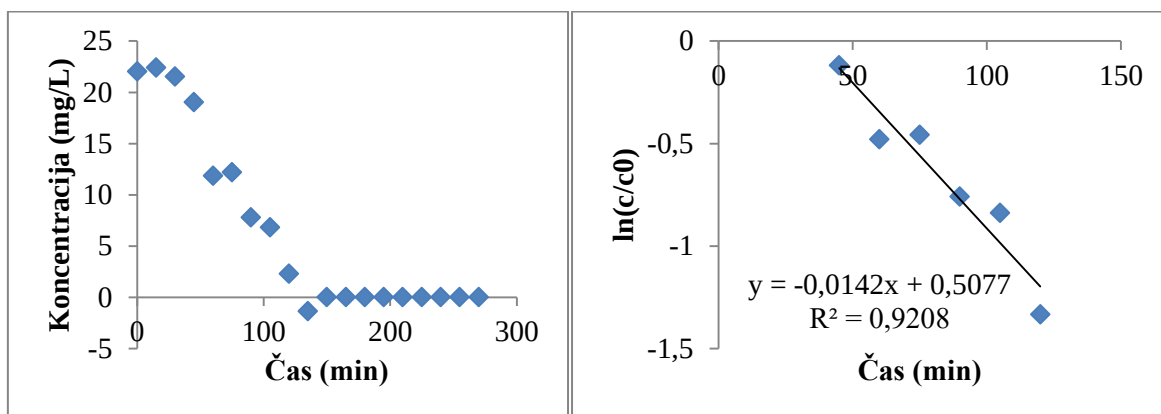
Preglednica 34: Rezultati stabilnosti dekspantenola in klorheksidina v kremi Bepanthen plus ob dodatku 1M NaOH

Čas (min)	Površina pod vrhom dekspantenola	Koncentracija dekspantenola (mg/l)	Površina pod vrhom klorheksidina	Koncentracija klorheksidina (mg/l)
0	8013,97	965,44	580,16	22,02
15	7814,86	940,18	588,71	22,42
30	7584,90	911,01	569,82	21,55
45	7341,87	880,18	515,10	19,02
60	7203,31	862,61	359,43	11,84
75	6872,37	820,63	367,30	12,20
90	6635,49	790,58	271,60	7,79
105	6432,00	764,77	250,75	6,82
120	6180,22	732,83	152,76	2,30
135	5993,10	709,09	73,41	0,00
150	5754,18	678,79	0,00	0,00
165	5532,55	650,68	0,00	0,00
180	5348,07	627,27	0,00	0,00
195	5156,88	603,02	0,00	0,00
210	4952,97	577,16	0,00	0,00
225	4791,13	556,63	0,00	0,00
240	4624,68	535,51	0,00	0,00
255	4442,03	512,35	0,00	0,00
270	4282,51	492,11	0,00	0,00

Graf 15: Stabilnost dekspantenola v kremi ob dodatku 1M NaOH (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)



Graf 16: Stabilnost klorheksidina v kremi ob dodatku 1M NaOH (levi graf prikazuje $c(t)$, desni graf prikazuje $\ln(c/c_0)$)



Kot smo že ugotovili, dekspantenol je občutljiv na prisotnost baze. V primerjavi z razpadom dekspantenola v gelu, je dekspantenol v kremi počasneje razpadel, vendar v primerjavi z ostalimi stresnimi raztopinami zelo hitro. Razpad klorheksidina je bil hiter, saj je celoten razpadel že v roku dveh ur. Tako da lahko potrdimo, da sta oba analita ob prisotnosti baze zelo nestabilna.

Preglednica 35: Konstante hitrosti za dekspantenol in klorheksidin ob dodatku različnih stresnih raztopin

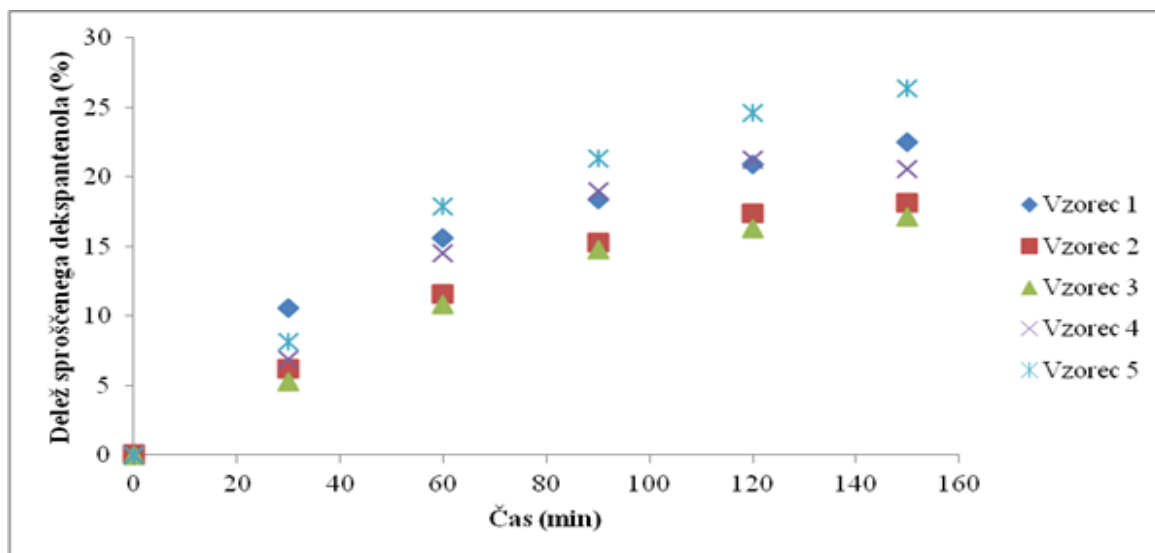
Gel – dekspantenol	
Stresna raztopina	Konstanta hitrosti (1/h)
1M HCl	0,0015
1M NaOH	0,0044

30% H ₂ O ₂	0,0002
H ₂ O	0,00005
Krema – dekspantenol	
1M HCl	0,0014
1M NaOH	0,0024
30% H ₂ O ₂	0,0008
H ₂ O	0,0002
Krema – klorheksidin	
1M HCl	0,001
1M NaOH	0,0142
30% H ₂ O ₂	0,0021
H ₂ O	0,0002

4.4. Sproščanje

Test sproščanja smo delali pri gelu in kremi Bepanthen plus, pri vsakem smo testirali po 5 vzorcev. Test je potekal 240 minut. Vsak odvzet vzorec smo prenesli v vialo in zanj posneli kromatogram. S pomočjo programa Chemstation smo pridobili podatke o površinah in v Excel-u smo izračunali koncentracijo dekspantenola. Ko smo imeli za posamezen vzorec podatke o koncentraciji za vsako časovno točko, smo narisali graf (številka 17).

Graf 17: Rezultati testa sproščanja za dekspantenol iz gela



Po pregledu podatkov smo ugotovili, da so do 150 minute rezultati najbolj enotni. Zato smo izbrali interval od 0 do 150 minute ter izračunali za vsako časovno točko povprečje deleža sproščenega deksamptenola iz vzorcev in relativni standardni odklon. Izračunali smo tudi hitrost difuzije iz naklonov premic (preglednica 36).

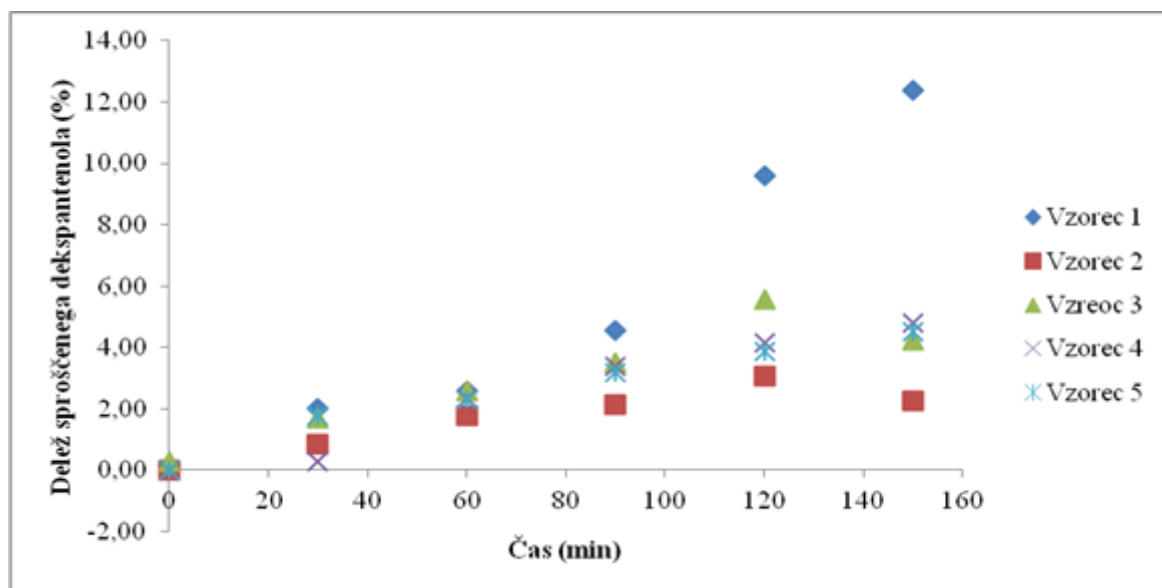
Preglednica 36: Rezultati testa sproščanja za deksamptenol iz gela

Vzorci	Delež sproščenega deksamptenola po 30 minutah (mg/L)	Delež sproščenega deksamptenola po 60 minutah (mg/L)	Delež sproščenega deksamptenola po 90 minutah (mg/L)	Delež sproščenega deksamptenola po 120 minutah (mg/L)	Delež sproščenega deksamptenola po 150 minutah (mg/L)	Hitrost difuzije (delež sproščenega deksamptenola/čas difuzije(1/min))
1	10,57	15,59	18,44	20,93	22,54	0,140
2	6,20	11,59	15,27	17,39	18,13	0,121
3	5,25	10,86	14,81	16,26	17,09	0,117
4	6,89	14,49	18,99	21,24	20,61	0,143

5	8,13	17,86	21,38	24,64	26,36	0,176
Povpre čje	7,41	14,08	17,78	20,09	20,95	0,139
SD	2,06	2,88	2,74	3,34	3,70	0,02
RSD	27,76	20,47	15,40	16,64	17,67	16,83

Za zadovoljive rezultate mora biti $RSD \leq 30\%$, glede na izkušnje ostalih raziskovalcev s podobnimi projekti s Franzovimi celicami. RSD vzorcev je pri vseh časovnih točkah manjši od 30%, tudi RSD za hitrosti difuzije je manjši od 30%, tako da lahko rečemo, da so rezultati s stališča ponovljivosti zadovoljivi.

Graf 18: Rezultati testa sproščanja za dekspantenol iz kreme



Po pregledu podatkov sproščanja dekspantenola iz kreme, smo ugotovili, da so rezultati najbolj enotni do 120 minute. Zato smo izbrali interval od 0 do 120 minute in v Excel-u izračunali povprečje deleža sproščenega dekspantenola iz vzorcev in relativni standardni odklon. Izračunali smo tudi hitrost difuzije iz naklonov premic (preglednica 37).

Preglednica 37: Rezultati testa sproščanja za dekspantenol iz Kreme Bepanthen plus

Vzorci	Delež sproščenega dekspantenola po 30 minutah (mg/L)	Delež sproščenega dekspantenola po 60 minutah (mg/L)	Delež sproščenega dekspantenola po 90 minutah (mg/L)	Delež sproščenega dekspantenola po 120 minutah (mg/L)	Hitrost difuzije (delež sproščenega dekspantenola/čas difuzije (1/min))
1	2,02	2,56	4,54	9,59	0,071
2	0,84	1,75	2,14	3,06	0,025
3	1,69	2,56	3,50	5,56	0,041
4	0,26	2,33	3,38	4,16	0,038
5	1,77	2,29	3,19	3,85	0,030
Povprečje	1,32	2,30	3,35	5,24	0,041
SD	0,74	0,33	0,85	2,59	0,018
RSD	56,14	14,31	25,52	49,38	43,678

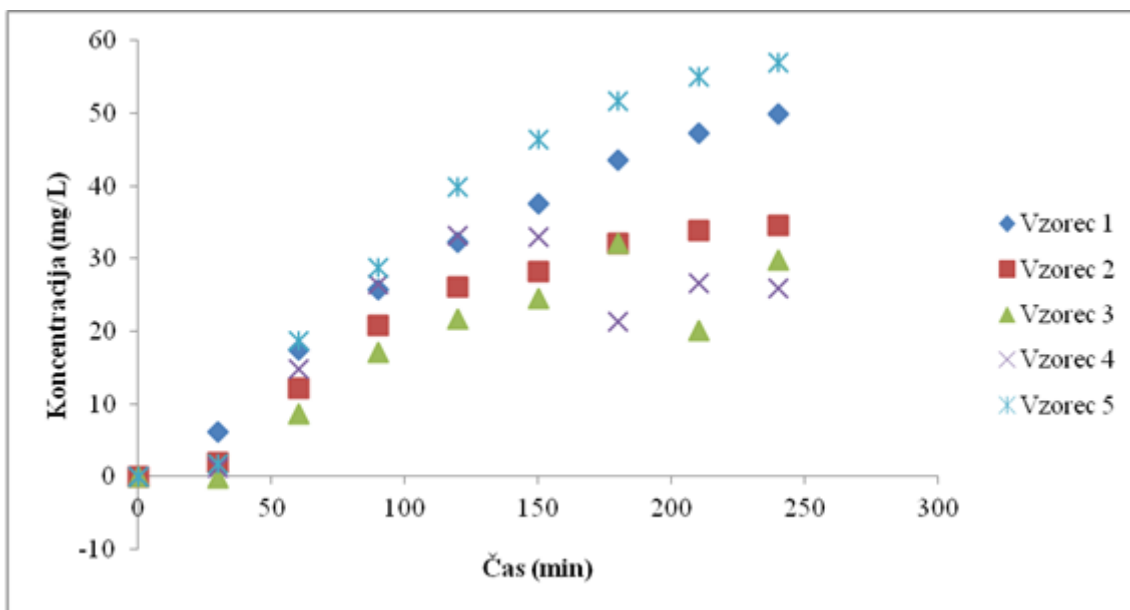
Objavljene ni nobene študije, ki bi obravnavala in vitro sproščanje dekspantenola iz poltrdnih dermalnih farmacevtskih oblik (iskalni ključ: »in vitro release of dexpanthenol from semi solid preparation«).

Če primerjamo rezultate sproščanja dekspantenola iz gela in dekspantenola iz kreme, ugotovimo, da se dekspantenol hitreje sprošča iz gela, kot iz kreme. Predpostavljamo, da je razlika v sproščanju posledica razlike v reoloških lastnostih obeh poltrdnih dermalnih oblik, saj začetna koncentracija in pogoji eksperimenta so bili pri obeh konstantni. Podobno študijo (podobni pogoji kot pri našem testu) so naredili za ketamin hidroklorid, kjer so primerjali sproščanje ketamina iz štirih različnih poltrdnih dermalnih oblik, med

njim sta bila tudi hidrogel in krema. Tudi tam se hidrofilni ketamin hitreje sprošča iz hidrogela kot pa iz kreme, to razliko so pripisali razliki v reoloških lastnostih med posameznimi dermalnimi oblikami (20). Objavljene so tudi študije, ki so pokazale, da na sproščanje učinkovine iz poltrdnih dermalnih oblik vpliva viskoznost izdelka. Večja je viskoznost, manjša je hitrost difuzije pri sproščanju. Mi sicer viskoznosti obeh pripravkov nismo merili, tako da ne moremo komentirati, če je pri nas tudi prisotna ta povezava. Določen doprinos k razliki v kinetiki sproščanja med gelom in kremo pa prinese gotovo tudi različno porazdeljevanje učinkovine med donorskim in akceptorskim prostorom. V primeru kreme je to porazdeljevanje gotovo močno zmanjšano za lipofilnejše učinkovine, saj imajo le-te večjo afiniteto do organske faze, kot do vodne faze v akceptorskem mediju. Kot potrditev za to hipotezo lahko vzamemo tudi naše rezultate za klorheksidin, ki so obravnavani kasneje v besedilu naloge.

Test sproščanja iz gela in kreme Bepanthen plus smo izvedli tudi za klorheksidin, vendar za gel imamo le podatke o sproščanju neznane sorodne snovi (graf 19), pri kremi pa se klorheksidin ni sproščal. Najverjetneje se klorheksidin iz kreme ni sproščal, ker je sam klorheksidin bolj lipofilen in se je zadržal v kremi, ki je bolj lipofilna kot akceptorski medij. Naša hipoteza je, da se klorheksidin ne porazdeljuje v zadovoljivem obsegu iz donorskega v akceptorski medij. Pri že zgoraj omejeni študiji so izvedli test sproščanja tudi za hidrofolbni piroksikam iz kreme. Količina sproščenega piroksikama po 6 urah iz kreme je bila zelo nizka, kar nakazuje na to, da naša predpostavka o klorheksidinu najverjetneje ni napačna. Težava je bila torej napačna oz. neposrečena izbira akceptorskega medija. Kot alternativo bi za medij lahko uporabili še npr. vodno raztopino (npr. zopet fosfatni pufer) z dodatkom površinsko aktivne snovi, npr. 0,5% Tween 80, 0,5% SDS, poloksamer, tudi organsko topilo. Ustreznost takega medija bi lahko preverili tako, da bi najprej v njem izvedli test topnosti klorheksidina, potrdili pa bi to lahko tako, da bi izvedli še ekstrakcijo analita v tak medij iz organske faze.

Graf 19: Sproščanje neznane sorodne snovi iz gela



4.5. Pomanjkljivosti naloge in predlogi za nadaljnje delo

Naša naloga ima določene pomanjkljivosti, katere bi se dalo še izboljšati. Poskusili bi lahko izboljšati izkoristek ekstrakcije klorheksidina iz kreme Bepanthen plus oziroma predvsem izboljšati njegovo ponovljivost. To bi storili tako, da bi testirali ekstrakcijo z več vrst topil (npr. DMSO, dioksan, dimetilformamid) in primerjali rezultate, da bi ugotovili, v katerem topilu je najboljša ekstrakcija. Izboljšali bi lahko tudi test sproščanja, in sicer izbrali bi lahko drugačen akceptorski medij, kot je bilo že navedeno zgoraj (npr. vključitev SDS- Natrijev lavril sulfat), tako da bi dosegli tudi sproščanje klorheksidina iz kreme Bepanthen plus. Kot dodaten test bi lahko izvedli test permeabilnosti skozi oz. v košček kože uhlja prašiča (dober model za človeško kožo). S tem testom bi lahko zaznali penetracijo sproščene učinkovine v plasti kože in določili, koliko učinkovine dejansko doseže določene plasti v koži. Lahko bi skušali tudi identificirati neznano sorodno snov v gelu, tako da bi izbrali druge analizne postopke (npr. preparativni HPLC, LC-high resolution MS, liofilizacija, NMR).

5. SKLEP

Cilj našega dela je izpolnjen, saj nam je uspelo razviti HPLC metodo, s katero lahko istočasno določamo vsebnost dekspantenola in klorheksidina v novem galenskem pripravku v obliki hidrogela, ki naj bi vseboval obe učinkovini. Metodo smo tudi uspešno validirali in jo uporabili na novi formulaciji. S tem smo potrdili, da razvita metoda ustreza svojemu namenu in da daje zanesljive rezultate. Metodo smo želeli preizkusiti tudi na kremi Bepanthen plus, a nam je to le deloma uspelo, ker smo imeli težave s prenizkim izkoristkom ekstrakcije klorheksidina pri postopku priprave vzorca.

S stabilnostnimi študijami smo ugotovili, da je dekspantenol v gelu stabilen pri testiranih temperaturah ter da je zelo nestabilen v prisotnosti baze. Ugotovili smo tudi, da je dekspantenol v kremi Bepanthen plus v primerjavi z dekspantenolom v gelu enako stabilen pri testiranih temperaturah in občutljiv na bazo, le da je razpad v kremi počasnejši, kar lahko pripišemo razliki v sestavi obeh poltrdnih farmacevtskih oblik. Skozi testiranja smo naleteli na težavo, in sicer ugotovili smo, da naš analizirani gel ne vsebuje klorheksidina, temveč neko drugo snov, ki nam je ni uspelo identificirati. Zato smo stabilnost klorheksidina določili le v kremi, kjer smo ugotovili, da je klorheksidin stabilen pri testiranih temperaturah in da je nestabilen ob prisotnosti baze. Z izvedbo testa sproščanja za dekspantenol iz gela in iz kreme Bepanthen plus smo ugotovili, da je sproščanje iz gela hitrejše kot tisto iz kreme. Do te razlike pride najverjetneje zaradi razlike v sestavi med gelom in kremo. Klorheksidin se iz kreme sploh ni sproščal v dovolj velikem obsegu najverjetneje zato, ker zanj nismo imeli primernega akceptorskega medija.

6. LITERATURA

1. Nwoko VE: Semi Solid dosage Forms Manufacturing: Tools, Critical Process Parameters, Strategies, Optimization and Validation. Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP) 2014; 3(2): 153-161
2. Ph.Int. 5th, International pharmacopeia
3. Ph.Eu.8th, European pharmacopeia
4. Kyowa Hakko Europe GmbH: D-Panthenol, publication, 2010
5. Kaloustian J., Nicolay A., Portugal H., Wolff E., Vergnes M-F: Rapid HPLC Method for Determination of Parachloroaniline in Chlorhexidine Antiseptic Agent in Mouthrinses, Ophthalmic and Skin Solution. American Journal of Analytical Chemistry, 2011; 2: 422-428
6. Seymour S.: Disinfection, Sterilization, and Preservation (5th ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000: 321–36
7. Deshmukh S., Gopalakrishnan, Kaur G., Nayyar A.S., Patil K.P., Singh A.: Clorhexidine: A Cationic Bisbiguanide, membrane active drug in periodontal medicine, structure – advantages and associated adverse effects, a brief communication. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 2015; 4: 370-392
8. Khater S., West C.; Development and validation of a supercritical fluid chromatography method for the direct determination of enantiomeric purity of provitamin B5 in cosmetic formulations with mass spectrometric detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 102, 2015; 321–325
9. Bhoyar N., Giri T.K., Tripathi D.K., Alexander A., Ajazuddin: Recent advances in novel drug delivery system through gels, review. Journal of Pharmacy and Allied Health Science 2, 2012; 21-39
10. Bakker P., Gooskens V., Naafs B., Wieringa N., Woerdenbag H., van der Kaaij R.: Dermatological preparations for the topics: A formulary of dermatological preparations and background information on therapeutic choices, production and dispensing. Beta Science Shop, University of Groningen, the Netherlands, 2012

11. Kulikov A.U., Zinchenko A.A.: Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of dexpanthenol in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 2007; 983–988
12. Havlíkov'a L., Matysov'a L., Nov'akov'a L., H'ajkov'a R., Solich P.; HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 2007; 1169–1173
13. Doub W.H., Harris M.H., Revelle L.K., Rutter A.M., Wilson R.T.: Identification and isolation of chlorhexidine digluconate impurities. *Pharma. Research*, 10, 1993; 1777-1784.
14. Shiow-Fern Ng, Rouse J.J., Sanderson F.D., Meidan V., Eccleston G.M.: Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech*, 11, 2010
15. Particle Sciences – Drug development services: Development and validation of in vitro release testing methods for semisolid formulations. *Technical Brief*, 10, 2009
16. <http://permegear.com/wp-content/uploads/2015/08/primer.pdf> (februar 2016)
17. Chern W.H., Thakker K.D.: Development and Validation of In Vitro Release Tests for Semisolid Dosage Forms - Case Study. *Dissolution Technologies*, 2003
18. http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_performance_liquid_chromatography (februar 2016)
19. Guzzeta A.: Reverse Phase HPLC Basics for LC/MS – Tutorial. Copyright © 2001-2002 IonSource, 2001
20. <http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-8/> (februar 2016)
21. <http://documents.tips/documents/galenski-izdelki.html> (maj 2016)