

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA ROŽMARIN

**VREDNOTENJE STABILNOSTI KLINDAMICINA V  
VODNIH RAZTOPINAH Z METODO TEKOČINSKE  
KROMATOGRFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI**

**EVALUATION OF STABILITY OF CLINDAMYCIN  
IN AQUEOUS SOLUTIONS BY HIGH  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom izr.prof.dr. Roberta Roškarja.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju izr.prof.dr. Robertu Roškarju za vse napotke, strokovno pomoč in pomoč pri pisanju diplomske naloge. Hvala tudi vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko za nasvete in pomoč ter Lekarni San Simon, Izola za donirani material. Posebno hvala tudi moji družini za vso podporo pri študiju.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja izr.prof.dr. Roberta Roškarja.

Mateja Rožmarin

Ljubljana, maj 2015

# VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	<b>III</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 KLINDAMICIN.....	1
1.2 DELOVANJE .....	2
1.2.1 MEHANIZEM DELOVANJA .....	2
1.2.2 SPEKTER DELOVANJA .....	2
1.2.3 ODPORNOST .....	3
1.3 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI .....	3
1.3.1 ABSORPCIJA .....	3
1.3.2 PORAZDELITEV .....	4
1.3.3 PRESNOVA IN IZLOČANJE .....	5
1.4 KLINIČNA UPORABA.....	5
1.5 NEŽELENI UČINKI.....	8
1.6 INTERAKCIJE Z DRUGIMI ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI .....	10
1.7 PRIPRAVKI IN ODMERJANJE .....	10
1.8 STABILNOST KLINDAMICINA.....	11
1.9 ANALITIKA KLINDAMICINA .....	13
1.9.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	13
1.9.2 Kapilarna elektroforeza (CE).....	14
1.9.3 Micelarna elektrokinetična kromatografija (MEKC).....	14
1.9.4 Spektrofotometrija .....	14
1.9.5 Kemiluminescenca (CL).....	14
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>15</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1 MATERIALI.....	16
3.1.1 REAGENTI, RAZTOPINE, SUBSTANCE .....	16
3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR.....	17
3.2 ANALIZNE METODE .....	18
3.2.1 Pogoji HPLC metode za vrednotenje klindamicinijevega klorida .....	18
3.2.2 Pogoji LC-MS metode za identifikacijo klindamicinijevega klorida in razpadnih produktov .....	18
3.3 VZORCI.....	19
3.3.1 Priprava pufra za mobilno fazo.....	19
3.3.2 Priprava osnovne raztopine klindamicinijevega klorida .....	19
3.3.3 Priprava raztopin klindamicinijevega klorida za validacijo .....	19
3.3.4 Priprava pufrih raztopin z enako ionsko močjo za uporabo v stabilnostni študiji .....	20
3.3.5 Priprava vodnih vzorcev za stabilnostno študijo .....	20
3.3.6 Priprava raztopine 1% KK v etanolu (galenski pripravek) .....	21
3.3.7 Priprava pufrirane raztopine 1% KK v etanolu (galenski pripravek) .....	21
3.4 VREDNOTENJE HPLC ANALIZNE METODE .....	22
3.4.1 Selektivnost .....	22
3.4.2 Linearnost .....	22
3.4.3 Ponovljivost .....	22
3.4.4 Točnost .....	23
3.4.5 Meja zaznavnosti .....	23
3.4.6 Meja določitve .....	23

3.4.7	Stabilnost vzorcev za validacijo .....	23
3.5	STABILNOSTNA ŠTUDIJA.....	24
3.5.1	Vodne raztopine KK.....	24
3.5.1.1	Vpliv medija .....	24
3.5.1.2	Vpliv koncentracije KK.....	24
3.5.1.3	Vpliv pH .....	24
3.5.1.4	Vpliv temperature .....	24
3.5.2	Galenski pripravki .....	25
3.5.3	Galenski pripravki z različnimi roki uporabnosti .....	25
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>26</b>
4.1	ANALIZNA METODA .....	26
4.1.1	RAZVOJ ANALIZNE METODE .....	26
4.1.2	POTRDITEV METODE Z LC-MS .....	27
4.1.3	VREDNOTENJE HPLC METODE .....	27
4.1.3.1	Selektivnost.....	27
4.1.3.2	Linearnost .....	28
4.1.3.3	Dnevna točnost in ponovljivost .....	29
4.1.3.4	Meddnevna točnost in ponovljivost .....	30
4.1.3.5	Ponovljivost injiciranja .....	30
4.1.3.6	Meja zaznavnosti .....	30
4.1.3.7	Meja določitve .....	31
4.1.3.8	Stabilnost vzorcev .....	31
4.1.4	ČISTOST STANDARDA .....	31
4.2	IDENTIFIKACIJA NEČISTOT IN RAZPADNIH PRODUKTOV.....	32
4.3	STABILNOSTNA ŠTUDIJA.....	34
4.3.1	STABILNOST KLINDAMICINIJEVEGA KLOORIDA V VODNIH RAZTOPINAH.....	34
4.3.1.1	Vpliv medija .....	34
4.3.1.2	Vpliv koncentracije klindamicinijevega klorida .....	38
4.3.1.3	Vpliv pH .....	39
4.3.1.4	Vpliv temperature .....	41
4.3.2	STABILNOST KK V GALENSKIH PRIPRAVKIH.....	45
4.3.3	STABILNOST KK V GALENSKIH PRIPRAVKIH Z RAZLIČNIM ROKOM UPORABNOSTI .....	47
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČEK.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>51</b>

# POVZETEK

Klindamicin je sintezni antibiotik, ki deluje baktericidno in bakteriostatično, saj zavira rast bakterij. Uporablja se za zdravljenje aken ter okužb v ginekologiji, obzobnih tkiv, respiratornega trakta, kože in mehkih tkiv.

Namen naše naloge je bil proučevanje stabilnosti klindamicinijevega klorida v vodnem mediju pod vplivom različnih dejavnikov in v pripravkih, ki se uporabljajo dermalno na koži za zdravljenje aken ter preverjanje roka uporabnosti galenskih pripravkov s klindamicinijevim kloridom. S pomočjo priporočene literaturne metode smo razvili primerno HPLC metodo za proučevanje stabilnosti klindamicinijevega klorida v raztopini. S postopkom validacije smo nato potrdili, da je metoda ustrezna za določanje klindamicinijevega klorida in nam daje zanesljive rezultate. Z metodo masne spektrometrije smo dodatno identificirali hidrolitične razpadne produkte klindamicinijevega klorida ter prisotne sorodne snovi.

V okviru stabilnostne študije smo proučevali vpliv različnih dejavnikov na stabilnost klindamicinijevega klorida, saj je v literaturi najdeno zelo malo tovrstnih podatkov. Ugotovili smo, da stabilnost pada z naraščanjem temperature, katera ima največji vpliv na stabilnost klindamicinijevega klorida. Na razpad vpliva tudi pH vrednost medija, v katerem je raztopljen. Najbolj stabilen je v pH območju 3 do 5, stabilnost bolj izrazito pada z naraščanjem pH vrednosti medija. Ugotovili smo tudi, da je stabilnost boljša pri višjih koncentracijah klindamicinijevega klorida.

Proučevali smo tudi stabilnost klindamicinijevega klorida v galenskih pripravkih. Ugotovili smo, da je klindamicinjev klorid dobro stabilen v pripravkih shranjenih pri sobni temperaturi in, da je stabilnost primerljiva s stabilnostjo v vodnih raztopinah. Preverili smo tudi ustreznost teh farmacevtskih izdelkov, med katerimi so bili nekateri s pretečenim 6 mesečnim rokom uporabnosti. Na podlagi rezultatov analize predlagamo podaljšanje roka uporabnosti galenskih pripravkov z 1% raztopino klindamicinijevega klorida na eno leto.

# SEZNAM OKRAJŠAV

CE: kapilarna elektroforeza

CL: kemiluminescenca

HCl: klorovodikova kislina

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

ICH: Mednarodna konferenca o harmonizaciji

KK: klindamicinijev klorid

LC-MS: tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

MeOH: metanol

NaOH: natrijev hidroksid

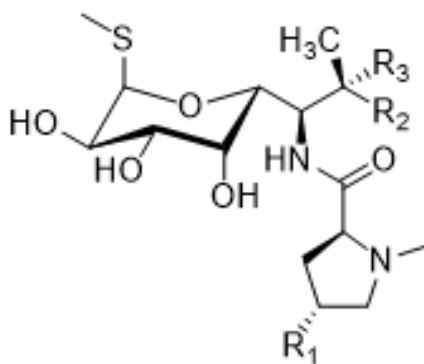
RSD: relativni standardni odklon

SD: standardni odklon

# 1 UVOD

## 1.1 KLINDAMICIN

Klindamicin (Slika 1) je antibiotik, ki spada v skupino linkozamidov (1). Zraven klindamicina spada v to skupino tudi linkomicin. Linkozamidi se uporabljajo za sistemsko zdravljenje infekcij (2). Klindamicin je bil prvič sintetiziran v Švici leta 1968 (3). Sintetizira se s kemijsko reakcijo linkomicina s tionil kloridom, pri čemer pride na poziciji 7 do zamenjave –OH skupine z –Cl. S tem se poveča reaktivnost samega klindamicina. Pri sami sintezi nastanejo številne nečistote (Slika 1): klindamicin B, 7-epiklindamicin, linkomicin, 7-epilinkomicin in linkomicin B (1,4).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
linkomicin	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	OH	H
linkomicin B	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -	OH	H
7-epilinkomicin	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	H	OH
klindamicin	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	H	Cl
klindamicin B	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -	H	Cl
7-epiklindamicin	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Cl	H

Slika 1: Klindamicin in sorodne spojine, prirejeno po (4)

Nahaja se v različnih oblikah:

- **KLINDAMICINIJEV KLORID**

Nahaja se v obliki kristaliničnega praška, ki je bele barve. Dobro se topi v vodi, metanolu in dimetilformamidu, slabša topnost je v etanolu in kloroformu, v acetonu ni topen.

- **KLINDAMICINIJEV PALMITAT HIDROKLORID**

Je v obliki belega ali brezbarvnega praška, ki je dobro topen v vodi, etanolu, kloroformu in etru. Topnost pri 25°C je odvisna od pH medija in sicer se zmanjšuje z naraščanjem pH.

- **KLINDAMICINFOSFAT**

Je higroskopna snov v obliki belega kristaliničnega praška, ki izkazuje polimorfne lastnosti. Dobro se raztoplja v vodi, slabše v acetonu in alkoholu, v kloroformu, etru in diklorometanu se praktično ne raztoplja (5,6).

V zdravilih se klindamicin nahaja v vseh treh oblikah. V obliki klindamicinijevega klorida ga najdemo v kapsulah in dermalni raztopini, v obliki klindamicinfosfata pa v raztopinah in kremi. V obliki klindamicinijevega palmitat hidroklorida se je včasih nahajal v granulah, katere niso več prisotne na tržišču (5,7).

## **1.2 DELOVANJE**

### **1.2.1 MEHANIZEM DELOVANJA**

Klindamicin deluje pretežno bakteriostatično. Pripisujejo mu tudi baktericidno delovanje, kar je odvisno od koncentracije učinkovine na mestu okužbe in od samega povzročitelja (8). Deluje tako, da se veže na 50S podenoto bakterijskega ribosoma in zavira tvorbo peptidne vezi oziroma sintezo bakterijskih proteinov. Na enak način delujeta tudi eritromicin in kloramfenikol, zato odsvetujejo sočasno uporabo teh antibiotikov (9,10). Klindamicin ne vpliva samo na sintezo proteinov, ampak tudi pospešuje opsonizacijo, vezavo komplementa, fagocitozo in znotrajcelično uničevanje bakterij (11).

### **1.2.2 SPEKTER DELOVANJA**

Deluje proti grampozitivnim aerobom ter gramnegativnim in grampozitivnim anaerobnim bakterijam. Zlasti dobro učinkovit je za zdravljenje okužb povzročenih z *Bacteroides fragilis* (4). Klindamicin deluje proti večini po gramu pozitivnim kokom, kot so pnevmokoki,  $\beta$ -hemolitični streptokoki skupine A in B in stafilokoki. Deluje tudi na seve stafilokoka, ki izločajo betalaktamaze, ni pa učinkovit proti meticilin odpornemu *Staphylococcus aureus* – MRSA (3,12).

Drugi grampozitivni organizmi na katere deluje so: *Bacillus cereus*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc* in *Actinomyces species*. Učinkovit je tudi proti *Corynebacterium diphtheriae*, ne učinkuje proti *Corynebacterium jeikeum* (13). Klindamicin ne deluje proti gramnegativnim aerobnim bakterijam in enterokokom (9). Manj učinkovit je tudi proti



gramnegativnim kokom in kokobacilom, kot sta *Neisseria spp.* in *Haemophilus influenzae*. Je pa učinkovit proti *Chlamydii trachomatis*.

Grampozitivni anaerobi, ki so občutljivi na klindamicin so: *Fusobacterium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Propionibacterium acnes* in *Clostridium perfringers*. (13). *Clostridium difficile*, bakterija ki lahko povzroči psevdomembranski kolitis, je rezistentna na klindamicin (9). Ni aktiven tudi proti bakterijam iz rodu *Ureaplasma* in *Mycoplasma* (13). V kombinaciji z drugimi protimikrobnimi učinkovinami (naprimer primakinom) deluje tudi proti nekaterim praživalim, kot so *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium species*, *Babesia microti* in *Pneumocystis carinii* (11,13).

### 1.2.3 ODPORNOST

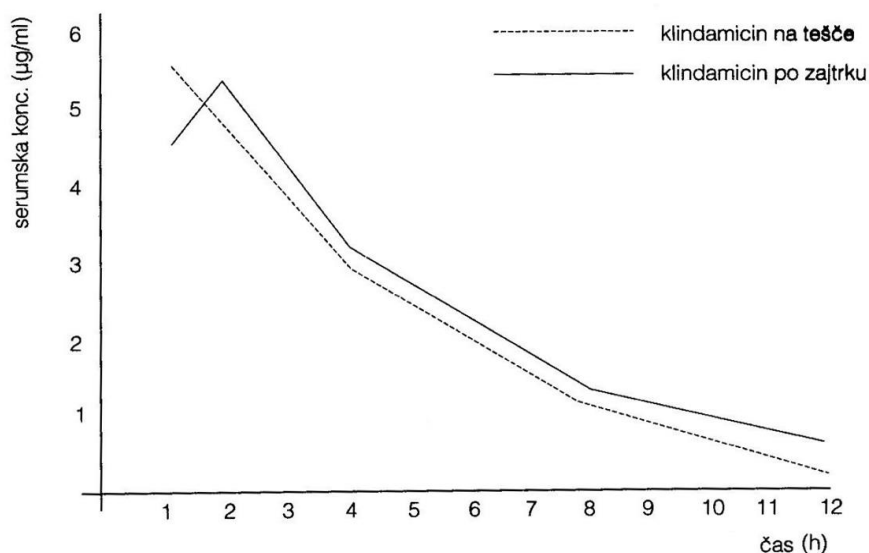
Večina streptokokov je občutljivih na klindamicin. Sevi streptokokov, ki nosijo gen *erm*, zaradi spremembe vezavnega mesta na ribosomih razvijejo odpornost na klindamicin kot tudi na makrolide. Ta odpornost je lahko inducibilna ali konstitutivna. Pri betahemolitičnih streptokokih so prisotni trije fenotipi odpornosti: inducibilni fenotip (iMLS<sub>B</sub>), konstitutivni fenotip (cMLS<sub>B</sub>) in M-fenotip. Vzrok za odpornost pri iMLS<sub>B</sub> in cMLS<sub>B</sub> fenotipu je gen *erm*, ki kodira nastanek encimov. Ti encimi metilirajo ribosomalno RNA bakterije, s tem se spremeni vezavno mesto za antibiotik in le-tem onemogoči vezavo. Gen *erm* je pri iMLS<sub>B</sub> fenotipu prisoten, vendar se ne izraža spontano. Klindamicin *in vitro* ne inducira tega gena, zato je bakterija nanj občutljiva, medtem ko eritromicin aktivira ta gen, posledično je bakterija nanj odporna. To še ne pomeni, da ne more razviti odpornosti do klindamicina, saj že majhna mutacija v genu povzroči, da se gen začne izražati in tako nastane konstitutivna oblika odpornosti. Pri cMLB<sub>B</sub> fenotipu indukcija gena ni potrebna, saj se gen *erm* vedno izraža. Posledica je odpornost proti linkozamidom in vsem makrolidom. M-fenotip je odporen na 14- in 15-členske makrolide, občutljiv je na klindamicin in 16-členske makrolide. Do tega pride zaradi prisotnosti gena *mef*, ki kodira transportni mehanizem za črpanje 14- in 15- členskih makrolidov iz bakterijske celice (14).

## 1.3 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

### 1.3.1 ABSORPCIJA

Klindamicin je na voljo v več farmacevtskih oblikah, ki jih lahko apliciramo peroralno, intravensko, intramuskularno ali dermalno. Pripravki za peroralno aplikacijo so na voljo v

obliki kapsul, ki vsebujejo klindamicinijev klorid ali kot suspenzija za uporabo v pediatriji, ki vsebuje klindamicin palmitat hidroklorid (13,15). Po peroralni aplikaciji se dobro in hitro absorbira iz prebavil. Biološka uporabnost je 90%. Hrana v želodcu nima bistvenega vpliva na absorpcijo, lahko jo malo upočasni, vendar je ne zmanjša (Slika 2)(13,16).



Slika 2: Vpliv hrane na absorpcijo klindamicina, prirejeno po (16)

Pri enkratnem peroralnem odmerku 300 mg doseže najvišjo serumsko koncentracijo 3,6 mg/l. Fosfatni ester klindamicina se uporablja v pripravkih namenjenim za intravensko ali intramuskularno aplikacijo. Najvišjo serumsko koncentracijo 14 mg/l doseže po enkratnem odmerku 900 mg (13). Ester palmitata in fosfata v krvi hitro hidrolizira do biološko aktivnega klindamicina, ki prodre v večina telesnih tkiv in tekočin (15). Tudi po topikalni aplikaciji je absorpcija klindamicina dobra ter doseže koncentracije, ki so potrebne za doseg sistema učinka. Apliciramo ga lahko v obliki gela, kreme ali losijona (17).

### 1.3.2 PORAZDELITEV

Po absorpciji se približno 90% klindamicina veže na beljakovine (18). Najvišjo koncentracijo v serumu doseže po 35-60 minutah (19). Dobro prehaja v večina telesnih tkiv, tekočin (sinovialno tekočino v sklepih, plevralno in peritonealno tekočino) in v kosti. Ne prehaja v možgane in cerebrospinalno tekočino, niti ob prisotnosti vnetja možganske ovojnice, zato ni primeren za zdravljenje meningitisa. (15,18). V slini in tkivni tekočini gingive je koncentracija klindamicina podobna tisti v serumu, v sluznici želodca in želodčnem soku je 2-krat večja, v žolču pa je koncentracija 2 do 3-krat večja kot v serumu

(11). Prehaja skozi placento, v majhni količini se izloča tudi v materino mleko. Koncentracija v serumu plodu je 50% serumske koncentracije v materi (1). Visoke koncentracije doseže tudi v granulocitih (polimorfonuklearnih levkocitih) in makrofagih, kar je posledica aktivnega transporta v celice (15).

### 1.3.3 PRESNOVA IN IZLOČANJE

Nekaj klindamicina se izloči v nespremenjeni obliki z urinom (10-15%) in z blatom (3-4%). Približno 85% se ga metabolizira v jetrih do manj aktivnega klindamicin sulfoksida in N-dimetil klindamicina z antimikrobnim učinkom večjim od izhodne spojine. V tej obliki se večinoma izloča preko žolča, z urinom in blatom. V blatu je prisoten še 2 tedna po zaključku terapije, kar je posledica enterohepatične cirkulacije (13,15).

Razpolovni čas klindamicina pri odraslih je 2 do 3 ure (19). Bolniki, ki trpijo za zmerno do hudo jetrno ali ledvično okvaro imajo podaljšan razpolovni čas. Pri bolnikih z ledvično odpovedjo ali zmanjšanim delovanjem ledvic se razpolovni čas lahko podaljša na 6 ur. Odmerka ni potrebno spreminjati, če je jetrna funkcija normalna, saj se večina izloča preko jeter. Pri hemodializi in peritonealni dializi se učinkovina ne izloča iz telesa. Pri bolnikih z zmerno ali hudo jetrno okvaro se razpolovni čas poveča, pride pa tudi do kopičenja učinkovine v telesu (poveča se koncentracija klindamicina v serumu). Za te bolnike je potrebna prilagoditev odmerka, potrebno ga je zmanjšati (13,15).

## 1.4 KLINIČNA UPORABA

Uporablja se v glavnem za zdravljenje infekcij, povzročenih z anaerobi (predvsem z *Bacteroides fragilis*), kot tudi polimikrobnih infekcij ter infekcij povzročenih s paraziti (9,20). Veliko se uporablja v kombinaciji z drugimi antibiotiki (13). Kljub dobri učinkovitosti antibiotika, ni zdravilo 1. izbora, pogosto se uporablja kot alternativa  $\beta$ -laktamskim antibiotikom (20). Bolezenska stanja, za katere se uporablja klindamicin:

- **OKUŽBE V GINEKOLOGIJI**

Za zdravljenje bakterijske vaginoze se uporablja klindamicin fosfat v obliki 2% vaginalne kreme ali globul. Je alternativa metronidazolu, saj so raziskave na živalih pokazale, da je metronidazol kancerogen, zato uporaba le tega ni priporočena pri nosečnicah (3).

Klindamicin se lahko uporablja za zdravljenje žensk, ki niso noseče in tudi v nosečnosti (naj bi bil varen celo v prvem trimesečju), saj nima škodljivih vplivov na plod (21,22).

Za zdravljenje medenične vnetne bolezni se klindamicin uporablja v kombinaciji z aminoglikozidi, običajno z gentamicinom (23). Uporablja se tudi pri novorojenčkih za zdravljenje okužb povzročenih s streptokoki B (20).

- **AKNE**

Za zdravljenje srednjih do zmerno hudih oblik aken se uporablja 1% klindamicin v obliki pripravkov, kot so geli, losjoni in raztopine (20,24). Ni zdravilo prvega izbora, lokalna uporaba antibiotikov je primerna takrat, ko zdravljenje z benzoil peroksidom, azealinsko kislino ali lokalnimi retinoidi ni učinkovito (25). Lahko se uporablja samostojno ali v kombinaciji z benzoil peroksidom ali topikalnimi retinoidi (26). Za zdravljenje zmernih do hudih oblik aken se uporablja v obliki peroralnih pripravkov, vendar je uporaba omejena zaradi hudih neželenih učinkov (24). Ugotavljali so tudi kakšne so prednosti 1% raztopine klindamicina vgrajenega v liposome pred 1% raztopino klindamicin. Klindamicin vgrajen v liposome bolj hitro učinkuje in ima manj neželenih učinkov (27).

- **OKUŽBE OBZOBNIH TKIV**

Uporablja se za zdravljenje parodontitisa, in sicer takrat, ko mehansko zdravljenje (luščenje in glajenje korenin) ne zadostuje. Možna je lokalna ali sistemska aplikacija antibiotika, vendar ima sistemsko dovajanje številne prednosti, saj lahko prodre v obzobna tkiva in tako doseže mikroorganizme na mestih, kjer jih z mehansko obdelavo in lokalno terapijo ne moremo doseči. Ustrezen antibiotik izberemo glede na mikrobiološko analizo vzorca iz okuženega mesta (amoksicilin, metronidazol, tetraciklin, klindamicin) (28).

Primeren je za zdravljenje odontogenih abscesov kot dopolnilna terapija, kadar kirurško zdravljenje ne zadošča. Uporablja se tudi pred specifičnimi posegi v ustni votlini kot zaščita za preprečevanje infekcijskega endokarditisa. Je alternativa penicilinu, za bolnike alergične na penicilin (29,30).

- **OKUŽBE RESPIRATORNEGA TRAKTA**

Klindamicin se uporablja za zdravljenje okužb zgornjih (tonzilitis, faringitis, sinuzitis, vnetje srednjega ušesa, škrlatinka) in spodnjih dihal (bronhitis, pljučnica, pljučni absces,

empiem) (11). Pri otrocih se uporablja ob ponavljajočih vnetjih srednjega ušesa, ko drugi antibiotiki niso učinkoviti (31).

Je možna izbira za terapijo pnevmokokne (kombinacija klindamicin/ciprofloksacin), aspiracijske (klindamicin ali kombinacija klindamicin/penicilin) in nekrotizirajoče pljučnice (kombinacija klindamicin/vankomicin) (20,22,32).

- **OKUŽBE KOŽE IN MEHKIH TKIV**

Klindamicin je indiciran za okužbe, kot so impetigo, celulitis, šen, folikulitis, furunkel, karbunkel, abscesi kože in podkožja ter živalske in človeške ugriznine. (11,33).

Primeren je tudi za zdravljenje hudih infekcij, kot sta nekrotizirajoči fasciitis in okužbe diabetičnega stopala. Priporočena terapija za zdravljenje nekrotizirajočega fasciitisa je kombinacija klindamicina in penicilina. V primeru okužb diabetičnega stopala predstavlja alternativo za zdravljenje blagih okužb. Pri zmernih okužbah ga je potrebno kombinirati z drugim antibiotikom, običajno z ciprofloksacinom, pri hudih pa z aminoglikozidom (22).

- **OSTEOMIELITIS IN SEPTIČNI ARTRITIS**

Osteomielitis je gnojno vnetje kosti, ki ga povzroča bakterija *S. aureus* (22,34). Zdravi se ga z antibiotično terapijo in kirurško odstranitvijo dela kosti. Klindamicin se uporablja zaradi dobre penetracije v kosti (34). Klindamicin predstavlja alternativo za penicilinske in cefalosporinske antibiotike. Lahko se uporabi sam ali v kombinaciji z aminoglikozidi ali fluorokinoloni (20,22).

Septični artritis je tako kot osteomielitis posledica okužbe s *S. aureus*, pri čemer pride do vnetja sklepov. Kljub odpornosti *S. aureus* na meticilin, je še veliko sevov občutljivih na klindamicin ali cefalosporine 1. generacije (35).

- **BAKTERIEMIJA IN SEPSA**

Glavni povzročitelj bakteriemije, ki lahko vodi do razvoja sepse je *S. aureus*. V primeru odpornosti na peniciline in cefalosporine, je možna terapija z klindamicinom (36).

- **INTRAABDOMINALNE OKUŽBE**

Za zdravljenje intraabdominalnih okužb se uporablja klindamicin v kombinaciji z aminoglikozidom, ki deluje proti gramnegativnim bakterijam (22).

- **PLJUČNICA POVZROČENA S *Pneumocystis jiroveci***

Klindamicin se uporablja v kombinaciji z primakinom za zdravljenje pljučnice povzročene s *P. jiroveci* pri bolnikih z okužbo HIV (11).

- **CEREBRALNA TOKSOPLAZMOZA**

Za terapijo pri bolnikih z virusom HIV je primerna kombinacija klindamicina in pirimetamina (20).

- **MALARIJA**

Malaria je obolenje, ki jo povzroča parazit *Plasmodium falciparum* ali *Plasmodium vivax*. Klindamicin je učinkovit v primeru okužb z *P. falciparum*, proti *P. vivax* ni aktiven. Monoterapija z klindamicinom ni priporočljiva, zaradi počasnega začetka delovanja. Primernejši je v kombinaciji s hitro delujočim antimalarikom, kot je kinin (37).

- **BABEZIOZA**

Okužba, povzročena s protozami *Babesia microti* in *Babesia divergens*, se zdravi s klindamicinom skupaj s kininom (20).

## 1.5 NEŽELENI UČINKI

Najpogostejši neželeni učinek, ki ga povzroča klindamicin je driska. Opazimo ga pri 20% bolnikov, kot posledico porušanja normalne črevesne flore zaradi uporabe antibiotikov (13). Druge prebavne motnje, ki so tudi lahko prisotne so bolečine v trebuhu, slabost in bruhanje (11). Pri približno 10% bolnikov so lahko prisotne preobčutljivostne reakcije v obliki izpuščajev na koži (koprivnica, izpuščaji podobni ošpicam), katere pogosteje opazimo pri bolnikih z virusom HIV (15,17). Zapleti imunskega sistema, ki se občasno pojavijo so povišana telesna temperatura, multiformni eritem, Stevens–Johnsonov sindrom in anafilaktične reakcije (11).

Pogosto je opazno tudi povišanje serumskih transaminaz, ki je reverzibilno (15). Privede lahko tudi do poškodbe jetrne funkcije, katero spremlja zlatenica ali ne (9). Krvna slika včasih vključuje nevtropenijo, levkopenijo, eozinofilijo ali trombocitopenijo vendar se te bolezni pojavijo zelo redko (11).

Hitra infuzija lahko pripelje do razvoja hipotenzije in odpovedi srčno-žilnega sistema. Da to preprečimo, proizvajalci navajajo čas infundiranja zdravilne učinkovine 10 do 60 minut (15). Eden redkih neželenih učinkov je tudi živčno-mišična blokada, do katere privede aplikacija visokega odmerka klindamicina. Pozorni moramo biti pri bolnikih, ki uživajo zdravila za nevromuskulatorno blokado, saj sočasna aplikacija obeh potencira ta učinek (18).

Pripravki za aplikacijo lahko povzročijo spremembe na koži, kot so luščenje, srbečica, rdečica, pekoč občutek in suha koža (26).

Uporaba klindamicina je omejena zaradi možnosti nastanka psevdomembranskega kolitisa. Pojavi se pri 0,01-10% bolnikov in se lahko konča s smrtnim izidom (18). Pogosteje se pojavi pri peroralni ali parenteralni aplikaciji klindamicina, pri lokalni aplikaciji se absorbira majhni delež učinkovine v sistemski krvni obtok, zato se redko pojavi (38). Razvoj kolitisa je 4-krat bolj verjeten pri peroralni aplikaciji kot pri intravenski (15). Klinični znaki po katerih prepoznamo z antibiotikom povzročeni kolitis so huda driska, povišana telesna temperatura, bolečine v trebuhu ter sledi sluzi in krvi v blatu (18). Kolitis ni povezan samo s klindamicinom, ampak tudi z drugimi antibiotiki (npr.  $\beta$ -laktamski antibiotiki), saj le-ti porušijo normalno črevesno floro in omogočijo razrast klostridijev, ki so del te flore. Vzrok za nastanek psevdomembranskega kolitisa je toksin, ki ga proizvaja *Clostridium difficile* v kolonu (13,38). Simptomi se lahko pojavijo v roku enega tedna od začetka terapije ali 4-6 tednov po prejemu zadnjega odmerka učinkovine (15). Če se pojavi huda driska, je potrebno takoj ukiniti terapijo s klindamicinom ter postaviti ustrezno diagnozo. Blage oblike se lahko same pozdravijo, s tem ko prenehamo z jemanjem antibiotika (11). Hude oblike zdravimo z vankomicinom v odmerku 125 mg vsakih 6 ur ali metronidazolom v odmerku 250 mg peroralno na 6 ur. Čas zdravljenja je 7 do 10 dni, včasih je potrebno bolnika hospitalizirati (15). Za zdravljenje blagih oblik sta učinkovita tudi holestiramin in kolestipol, ki spadata med smole, saj vežeta toksin, katerega izloča *C. difficile*. Poleg toksina vežeta tudi vankomicin, zato je potrebna posebna previdnost ob uživanju obeh, potreben je vsaj 2-urni razmak (39).

## 1.6 INTERAKCIJE Z DRUGIMI ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI

Klindamicin ojača učinek živčno-mišičnih blokatorjev (pankuronij, tubokurarin), kar lahko privede do respiratorne depresije. Takšni bolniki morajo biti pod strogim nadzorom, s prilagojenim načinom odmerjanja (11,17,20).

Sočasna uporaba klindamicina in makrolidov ali kloramfenikola ni priporočena, zaradi antagonističnega učinka, saj se vežejo na isto mesto na ribosomu (11). Zaradi istega razloga se odsvetuje tudi sočasna aplikacija s parasimpatomimetiki, kot sta neostigmin in piridostigmin (40).

Če ga apliciramo hkrati z opiaty (kodein, hidrokodon, oksikodon) ali atropinom se poveča verjetnost za razvoj psevdomembranskega kolitisa. Te učinkovine zmanjšajo mobilnost črevesja in s tem se poveča absorpcija toksina, ki ga proizvaja *C. difficile* (11,41).

Pripisujejo mu sinergizem s primakinom, kininom in pirimetaminom. Sočasna uporaba estrogenov in klindamicina lahko zmanjša učinek kontraceptivov, zato je potrebna dodatna zaščita za preprečitev zanositve (11).

Kombinacija kaolin/pektin zmanjša absorpcijo klindamicina, zato svetujejo uporabo 2 uri pred ali 3-4 ure po aplikaciji klindamicina (42).

## 1.7 PRIPRAVKI IN ODMERJANJE

V Sloveniji je registriranih več različnih pripravkov, ki vsebujejo klindamicin v obliki klindamicinijevega klorida ali klindamicinfosfata. Registrirani so kot zdravila, ki se izdajajo na recept. V Preglednici I so predstavljena zdravila, ki so trenutno prisotna na slovenskem trgu (7).



Preglednica I: Pripravki s klindamicinom

<b>PRIPRAVKI</b>	<b>FARMACEVTSKA OBLIKA</b>	<b>OBLIKA KLINDAMICINA</b>
Dalacin 10 mg/ml	dermalna raztopina	klindamicinfosfat
Dalacin 20 mg/g	vaginalna krema	klindamicinfosfat
Klimicin 150 mg	trde kapsule	klindamicinijev klorid
Klimicin 300 mg	trde kapsule	klindamicinijev klorid
Klimicin 150 mg/ml	raztopina za injiciranje	klindamicinfosfat
Klindamicin 1%	dermalna raztopina (galenski pripravek)	klindamicinijev klorid

Priporočeni dnevni odmerki:

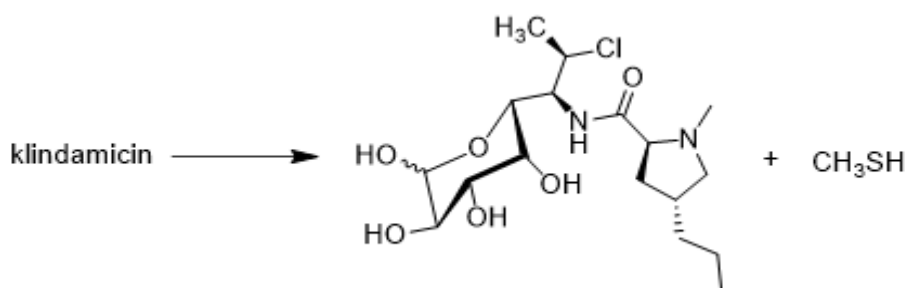
- ODRASLI: priporočeni dnevni odmerek je 150-450 mg peroralno ali 300-900 mg intravensko na 6 do 8 ur
- OTROCI: priporočeni dnevni odmerek je 8-20 mg/kg na dan, ki ga apliciramo peroralno ali intravensko v 3 ali 4 enakih odmerkih
- BOLNIKI Z JETRNO OKVARO: bolnikom z zmerno ali hudo jetrno okvaro je treba znižati odmerek klindamicina ali podaljšati interval odmerjanja (43)

## 1.8 STABILNOST KLINDAMICINA

Klindamicin ima v različnih pripravkih predpisane različne roke uporabnosti. Kapsule, ki vsebujejo klindamicin imajo predvideni rok uporabnosti 3 leta. Manj stabilen je v raztopinah in gelih, katerih predvideni rok uporabnosti je 18 do 24 mesecev. Magistralni pripravki, ki vsebujejo klindamicin v raztopini, bi naj bili uporabni samo 1 mesec (7). Na stabilnost klindamicina ima največji vpliv pH, zrak in svetloba nimata nobenega vpliva na razgradnjo učinkovine. Večina raziskav stabilnosti klindamicinijevega klorida in klindamicinfosfata je bilo izvedenih na tekočih pripravkih, ki se uporabljajo za topikalno aplikacijo. Ugotovili so, da je stabilnost največja v pripravkih, ki vsebujejo alkohol in polisorbit 20 (44). Razgradnjo klindamicina so ugotavljali v pufiranih vodnih raztopinah

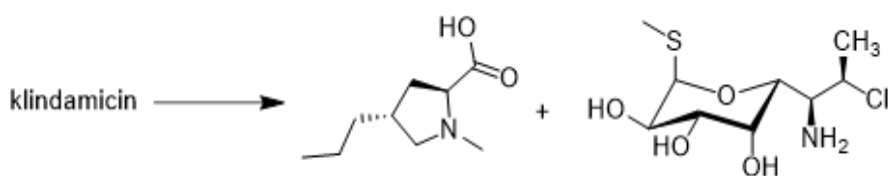
pri različnih pH vrednostih. Razpadal bi naj po kinetiki 1. reda. Najbolj stabilen je pri pH 4. Če ga shranjujemo v pH območju od 1 do 6,5 in pri temperaturi 25°C, razpade v 2 letih maksimalno 10% učinkovine.

V odvisnosti od pH poteče več različnih hidrolitičnih reakcij. Pri pH vrednostih pod 4 poteče hidroliza tioglikozidne skupine, pri tem nastane 1-demetil-1-hidroksi klindamicin in metil merkaptan (Slika 3). Hitrost razpada učinkovine se povečuje z zniževanjem pH vrednosti od 4,0 do 0,4.



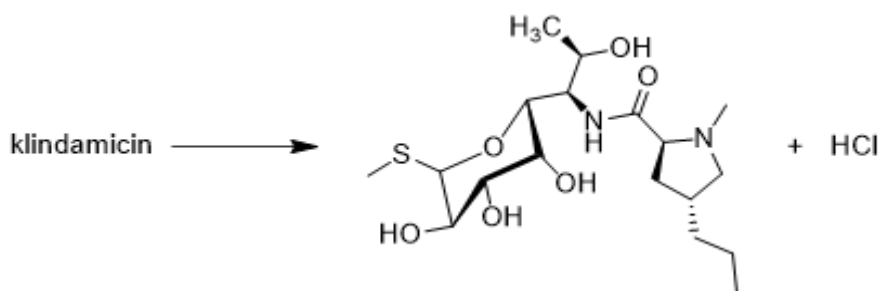
Slika 3: Hidroliza tioglikozidne skupine, prirejeno po (44)

Hidroliza amidne vezi lahko poteče skozi celoten pH profil, najpogosteje se pojavi pri zelo visokem ali nizkem pH-ju (Slika 4).



Slika 4: Hidroliza amidne vezi, prirejeno po (44)

Pretvorba klindamicina do linkomicina oziroma hidroliza 7-kloro skupine klindamicina poteče v pH območju 5,0-9,0 (Slika 5). Hitrost pretvorbe narašča sorazmerno z višanjem pH (5,44).



Slika 5: Hidroliza klindamicina do linkomicina, prirejeno po (44)

## 1.9 ANALITIKA KLINDAMICINA

Analitske metode, ki so primerne za določanje klindamicina kot učinkovine, v pripravkih in bioloških tekočinah so zlasti separacijske metode: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), plinska kromatografija, kapilarna elektroforeza in micelarna elektrokinetična kromatografija. Uporabljajo pa se tudi druge metode: kemiluminescenca, mikrobiološki in radio imunološki testi (1,45).

### 1.9.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

HPLC metoda je ena izmed glavnih metod za analizo zdravil, saj je občutljiva, natančna, enostavna in široko dostopna. Za analizo klindamicina se največ uporablja reverzno-fazna kolona C18 z uporabo UV-VIS detektorja. Za detekcijo se lahko uporablja tudi detektor na refrakcijski indeks ali masni spektrometer, vendar sta manj v uporabi. Mobilna faza je sestavljena iz vodne (ponavadi fosfatni pufer) in organske faze (acetonitril ali metanol). Kljub temu, da je acetonitril dražji in toksičen, je njegova uporaba pogostejša, saj povzroča nižji tlak v koloni. HPLC metoda izkazuje številne prednosti v primerjavi z drugimi metodami. Je ponovljiva, enostavna za uporabo, dostopna skoraj v vsakem laboratoriju, med analizo se porabi majhna količina organskega topila. Prednost je tudi ta, da je čas analize klindamicina zelo kratek (manj kot 10 minut), kar omogoča analizo večjega števila vzorcev. Za identifikacijo klindamicina in razpadnih produktov je primerna HPLC metoda sklopljena z masnim spektrometrom. Metoda je primerna za določanje klindamicina kot učinkovine, v farmacevtskih izdelkih in bioloških tekočinah (1,46).

### **1.9.2 Kapilarna elektroforeza (CE)**

CE je analizna metoda, pri kateri se nabite molekule ločijo glede na hitrost potovanja skozi kapilarno pod vplivom električnega polja. Velja kot dobra alternativa HPLC metodi zaradi dobre ločljivosti ter majhne količine porabljenega vzorca za analizo. Združitev z drugimi tehnikami (masna spektrometrija, fluorescenca, elektrokemiluminescenca) je prinesla veliko pozitivnih rezultatov, boljšo občutljivost, selektivnost, učinkovitost ter nižje stroške. Za najboljše se je izkazala kombinacija CE z elektrokemiluminescenco. Primerna je za detekcijo klindamicina v farmacevtskih izdelkih in bioloških vzorcih ter za kvantitativno določanje klindamicina (47).

### **1.9.3 Micelarna elektrokinetična kromatografija (MEKC)**

Micelarna elektrokinetična kromatografija je primerna za analizo nabitih in nevtrálnih molekul, pri čemer mehanizem ločevanja spojin temelji na interakciji z miceli (48). Za analizo klindamicina se uporablja mešani micelarni sistem, ki izkazuje dobro selektivnost. Sistem je sestavljen iz anionskega natrijevega dodecilsulfata in neionskega Brij 35. Uporablja se za določanje klindamicina kot učinkovine (49).

### **1.9.4 Spektrofotometrija**

Spektrofotometrija je v primerjavi s HPLC metodo hitra in enostavna, saj ni potrebne predhodne priprave vzorca, meritev pa traja nekaj sekund. Glavno omejitev predstavljajo potencialne interference iz vzorca, kar je še posebej izrazito pri nizkih valovnih dolžinah. Absorbanca se meri z UV-VIS spektrometrom pri valovni dolžini 210 nm. Metoda je primerna za določanje klindamicina v standardu in farmacevtskih izdelkih. (50).

### **1.9.5 Kemiluminescenca (CL)**

Metoda temelji na zaviranju kemiluminescenčne reakcije med luminolom in mioglobinom. Za merjenje intenzitete svetlobe, ki jo med oksidacijo oddaja luminol, se uporablja luminometer. Za določanje koncentracije klindamicina je potrebno izmeriti intenziteto svetlobe v vzorcu brez in z prisotnim klindamicinom. Intenziteta svetlobe je v linearni povezavi z logaritmom koncentracije klindamicina. Celoten analitski postopek je končan v 0,5 minute pri pretoku 2,0 ml/min. Prednosti CL so: dobra občutljivost, hitrost analize in enostavnost. CL se uporablja za določanje klindamicina v farmacevtskih izdelkih in urinu (45,51).

## 2 NAMEN DELA

V literaturi ni prisotnih podatkov o dolgoročni stabilnosti galenskih pripravkov Raztopin 1% klindamicinijevega klorida v etanolu, katerih predvideni rok uporabe je 6 mesecev. Zato nas zanima ali so ti pripravki primerni za uporabo skozi daljše časovno obdobje oz. je obdobje 6 mesecev najvišja smiselna postavljena meja. Namen naše naloge bo spremljanje stabilnosti klindamicinijevega klorida v vodnih raztopinah ter v galenskih pripravkih z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. V ta namen bomo najprej razvili stabilnostno indikativno metodo za vrednotenje klindamicina. Metodo bomo validirali, s čimer bomo dokazali, da daje ustrezne rezultate. Ustreznost metode bomo še dodatno ovrednotili z metodo tekočinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo. Z LC-MS metodo bomo tudi kvalitativno ovrednotili razpadne produkte klindamicinijevega klorida v različnih stresnih vzorcih (0,1M HCl, 0,1M NaOH).

Validirano metodo bomo najprej uporabili za proučevanje stabilnosti vodnih raztopin klindamicina. Spremljali bomo vpliv temperature, medija, koncentracije učinkovine in pH vrednosti na stabilnost klindamicina. Iz literaturnih podatkov je namreč razvidno, da je klindamicin relativno stabilna učinkovina.

Na koncu bomo izvedli stabilnostno študijo v časovnem obdobju 2 mesecev, s katero želimo potrditi stabilnost klindamicina v galenskih pripravkih, kateri so bili izpostavljeni različnim temperaturnim pogojem. Galenske pripravke bomo pripravili po predpisani recepturi. Polovici pripravkov bomo na koncu uravnali pH na optimalno vrednost glede stabilnosti, s čimer želimo ugotoviti ali pufriranje vpliva na stabilnost pripravkov. Analizirali bomo tudi galenske pripravke različnih serij, med katerimi so nekateri s pretečenim rokom uporabnosti, z namenom preverjanja ustreznosti samih pripravkov ter s tem posledično redefiniranja roka uporabnosti.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 REAGENTI, RAZTOPINE, SUBSTANCE

- $C_2H_3N$  (acetonitril), Chromasolv<sup>®</sup>, gradient grade, for HPLC; Mr = 41,05 g/mol; Sigma-Aldrich, Nemčija
- $CH_3OH$  (metanol), Chromasolv<sup>®</sup>, for HPLC; Mr = 32,04 g/mol; Sigma-Aldrich, Nemčija
- $KH_2PO_4$  (kalijev dihidrogenfosfat); Mr = 136,08 g/mol;  $\geq 99,5\%$ ; Merck, Nemčija
- $H_3PO_4$  (ortofosforjeva kislina, 85%); Mr = 98,00 g/mol; 1L = 1,71 kg; Merck, Nemčija
- $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$  (dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat); Mr = 177,99 g/mol; min. 99,5%; Merck, Nemčija
- KCl (kalijev klorid); Mr = 74,55 g/mol; min. 99,5%; Carlo Erba, Italija
- HCl (klorovodikova kislina), Titrisol<sup>®</sup>, za 1M raztopino, Merck, Nemčija
- NaOH (natrijev hidroksid), Titrisol<sup>®</sup>, za 1M raztopino, Merck, Nemčija
- pufrne raztopine:
  - pH 3; CertiPUR<sup>®</sup>; Merck, Nemčija
  - pH 4; Gram-mol, Zagreb
  - pH 7; Panreac, Španija
- Mili Q voda, Fakulteta za farmacijo
- $C_2H_5OH$  (brezvodni etanol); Mr = 46,07 g/mol; min. 99,8%; Panreac, Španija
- $C_3H_8O_2$  (propilen glikol); Mr = 76,09 g/mol; Lex; LX0521-120015, Slovenija
- $C_2H_5OH$  (etanol 96%); Mr = 46,07 g/mol; Lex; LX0267-120014, Slovenija
- Voda za injekcije; Braun; 123768002, Nemčija
- $HCOOH$  (mravljična kislina) 98 - 100%, Suprapur<sup>®</sup>, Merck, Nemčija
- **Clindamycin chloride**,  $C_{18}H_{31}ClN_2O_5 \times HCl$ ; Mr = 461,4 g/mol; Sigma-Aldrich, Nemčija
- Clindamycin chloride 1 (KK 1),  $C_{18}H_{31}ClN_2O_5 \times HCl$ ; Mr = 461,4 g/mol; 95,8%; Zhejiang Hisoar Pharmaceutical Co., Ltd., Kitajska

- Clindamycin chloride 2 (KK 2),  $C_{18}H_{35}ClN_2O_5 \times HCl$ ;  $M_r = 461,4 \text{ g/mol}$ ; 99,3%; Zhejiang Tiantai Pharmaceutical Co., Ltd., Kitajska
- Raztopine 1% klindamicinijevega klorida v etanolu (galenski pripravki dobljeni iz Lekarne San Simon, Izola, Preglednica II)

Preglednica II: Seznam galenskih pripravkov

PRIPRAVKI	ROK UPORABE	SERIJSKA ŠTEVILKA
1	07 / 2013	100113
2	06 / 2013	1771712
3	06 / 2013	1751112
4	04 / 2013	1621012
5	03 / 2013	1470912
6	02 / 2013	1190712
7	01 / 2013	1020712
8	11 / 2012	720412
9	10 / 2012	490312
10	09 / 2012	300212

### 3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR

- digitalne tehtnice: Exacta 300 EB, Slovenija; AG 245 in XP 105 DeltaRange<sup>®</sup>, Mettler Toledo, Švica
- sistem za pripravo MiliQ, Millipore, ZDA
- pH meter: Iskra MA 5750, Slovenija in MP 220 Mettler Toledo, Švica
- magnetno mešalo HI 190M, Hanna Instruments, Portugalska
- sistem za filtriranje, Sartorius, Nemčija
- celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,2  $\mu\text{m}$ , Sartorius, Nemčija
- ultrazvočni čistilec Bandelin Sonorex, Nemčija
- vodna kopel WB 13, Kambič, Slovenija
- klimatska komora VC 4034, Vötsch, Nemčija
- avtomatske pipete: 20-200  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$ , Eppendorf, Nemčija

- stekleni inventar: čaše, merilne bučke, tehtiči, polnilne pipete, vialo
- ostalo: spatula, kapalke, Parafilm M<sup>®</sup>,
- HPLC sistem, Agilent Technologies 1100/1200 Series, ZDA:
  - kvarterna črpalka
  - avtomatski vzorčevalnik
  - termostat za kolono
  - UV-VIS detektor
  - programska oprema ChemStation
- analitski sistem LC-MS/MS, Agilent Technologies, ZDA:
  - Agilent 1290 Infinity LC (binarna črpalka, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono)
  - Agilent 6460 Triple Quad LC/MS (ESI ionski izvor)
  - programski sistem za obdelavo podatkov MassHunter Workstation software B.04.01

## 3.2 ANALIZNE METODE

### 3.2.1 Pogoji HPLC metode za vrednotenje klindamicinijevega klorida

- kolona: Luna C18(2), 5  $\mu\text{m}$ , 100 $\times$ 4,6 mm s 4 $\times$ 3 mm C18(2) predkolono, Phenomenex, ZDA
- temperatura kolone: 40  $^{\circ}\text{C}$
- mobilna faza: fosfatni pufer pH 3 : acetonitril = 80 : 20
- pretok: 1 ml/min
- volumen injiciranja: 20  $\mu\text{l}$
- temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 25 $^{\circ}\text{C}$
- valovna dolžina UV detektorja: 210 nm
- čas analize: 9 min

### 3.2.2 Pogoji LC-MS metode za identifikacijo klindamicinijevega klorida in razpadnih produktov

- kolona: Kinetex C18, 2,7  $\mu\text{m}$ , 50 $\times$ 2,1 mm, Phenomenex, ZDA



- temperatura kolone: 40°C
- mobilna faza: 0,1% mravljična kislina in acetonitril, gradientna elucija
- pretok: 0,5 ml/min
- volumen injiciranja: 1 µl
- MS detekcija: skeniranje v območju m/z 150 - 600

### 3.3 VZORCI

#### 3.3.1 Priprava pufra za mobilno fazo

Pripravili smo raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s koncentracijo 25 mmol/l. Zatehtali smo 3,4025 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ga prenesli v 1 l merilno bučko, ga raztopili v MiliQ vodi, dopolnili do oznake in dobro premešali. Raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  smo umerili na pH vrednost 3 z dodajanjem 85% fosforne kisline. Predhodno smo umerili pH meter s standardno pufrno raztopino pH 3 na vrednost 3. Pufer smo nato filtrirali s pomočjo vakuumskega filtrnega sistema preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,2 µm. Na koncu smo pufer dali za 10 minut na ultrazvočno kadičko.

#### 3.3.2 Priprava osnovne raztopine klindamicinijevega klorida

Približno natančno 1 mg klindamicinijevega klorida smo zatehtali v epico ter raztopili v 1 ml MeOH, koncentracija nastale raztopine je približno 1 mg/ml.

#### 3.3.3 Priprava raztopin klindamicinijevega klorida za validacijo

Za pripravo vzorcev na osnovi katerih smo izdelali umeritveno premico, smo uporabili osnovno raztopino KH v MeOH in jo ustrezno redčili z destilirano vodo. Za vrednotenje linearnosti smo pripravili raztopine s koncentracijami 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 ter 0,5 mg/ml.

Za vrednotenje točnosti in ponovljivosti smo si pripravili raztopine s koncentracijami 0,015; 0,09 ter 0,45 mg/ml. Pripravili smo jih z ustreznim redčenjem iz osnovne raztopine klindamicinijevega klorida s koncentracijo 1 mg/ml. Tri dni zapored smo za vsako koncentracijo na novo pripravili pet paralelk.

### 3.3.4 Priprava pufrnih raztopin z enako ionsko močjo za uporabo v stabilnostni študiji

Pripravili smo raztopini 0,05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ter 0,05M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ . Raztopini smo pripravili tako, da smo 3,4025 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  oziroma 4,450 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  raztopili v 0,5 l destilirane vode. Oba pufra smo mešali v različnem razmerju, kot je prikazano v Preglednici III ter dodali KCl, da smo dobili raztopine z enako ionsko močjo. S pH metrom, katerega smo predhodno umerili s standardnimi pufrnimi raztopinami na vrednosti 3, 4 in 7, smo izmerili pH vrednosti raztopin. Raztopinam smo uravnali pH z dodajanjem 85% fosforne kisline, katero smo pred uporabo redčili z destilirano vodo.

*Preglednica III: Sestava pufrnih raztopin*

pH	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (ml)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (ml)	KCl (g)
2	/	50	0,3612
3	/	50	0,3620
4	/	50	0,3615
5	0,95	99,05	0,7159
6	12,10	87,90	0,6332
7	61,20	38,80	0,2674
8	96,90	3,10	/

### 3.3.5 Priprava vodnih vzorcev za stabilnostno študijo

Za pripravo vzorcev smo uporabili osnovno raztopino klindamicinijevega klorida ter ji dodali ustrezno topilo (Preglednica IV). Tako smo pripravili 12 vzorcev, ki smo jih izpostavili različnim pogojem.

Preglednica IV: Priprava vzorcev za stabilnostno študijo

	OSNOVNA RAZTOPINA	TOPILO
Vzorec št. 1	100 µl	900 µl destilirane vode
Vzorec št. 2	100 µl	900 µl puфра s pH=2
Vzorec št. 3	100 µl	900 µl puфра s pH=3
Vzorec št. 4	100 µl	900 µl puфра s pH=4
Vzorec št. 5	100 µl	900 µl puфра s pH=5
Vzorec št. 6	100 µl	900 µl puфра s pH=6
Vzorec št. 7	100 µl	900 µl puфра s pH=7
Vzorec št. 8	100 µl	900 µl puфра s pH=8
Vzorec št. 9	100 µl	900 µl 0,01M NaOH
Vzorec št. 10	100 µl	900 µl 0,1M NaOH
Vzorec št. 11	100 µl	900 µl 0,01M HCl
Vzorec št. 12	100 µl	900 µl 0,1M HCl

Za vrednotenje vpliva koncentracije klindamicinijevega klorida na stabilnost smo si pripravili vzorce z večjo koncentracijo klindamicinijevega klorida in sicer 10 mg/ml ter 1 mg/ml klindamicinijevega klorida v destilirani vodi. Pripravili smo si tudi vzorce z enako koncentracijo klindamicinijevega klorida raztopljenega v 0,01M NaOH.

### 3.3.6 Priprava raztopine 1% KK v etanolu (galenski pripravek)

Raztopino smo pripravili po recepturi, posredovani iz Lekarne San Simon, za izdelavo galenskih pripravkov. Zatehtali smo 2,0 g klindamicinijevega klorida in ga raztopili v 38,0 g vode za injekcije. Nato smo dodali še 20,0 g propilenglikola in 140,0 g 90% etanola ter vse skupaj dobro premešali. Dermalno raztopino smo polnili v plastične vsebnike ter jih izpostavili različnim temperaturnim pogojem.

### 3.3.7 Priprava pufrirane raztopine 1% KK v etanolu (galenski pripravek)

Raztopino smo pripravili po postopku, kot je opisan pod točko 3.3.6. Raztopini smo uravnali pH vrednost na 4,0 in sicer z dodajanjem 0,1M NaOH, ki smo jo predhodno redčili z destilirano vodo. Raztopino smo polnili v plastične vsebnike, ki smo jih izpostavili različnim temperaturnim pogojem.

### 3.4 VREDNOTENJE HPLC ANALIZNE METODE

Postopek validacije je zaključni korak pri razvoju analizne metode, s katerim potrdimo, da je metoda primerna za določeno analitsko uporabo. HPLC metodo smo vrednotili v skladu z ICH smernicami (52). Obravnavali smo naslednje kriterije: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, meja zaznavnosti, meja detekcije in stabilnost vzorcev. Validacijo smo izvajali v treh zaporednih dnevih.

#### 3.4.1 Selektivnost

Metoda je selektivna takrat, kadar so kromatografski vrhovi na kromatogramu analiziranih komponent vzorca jasno ločeni od kromatografskega vrha obravnavanega analita (52,53). Za vrednotenje selektivnosti smo analizirali raztopine medija v katerem smo pripravljali naš vzorec (MeOH, destilirana voda, 0,1M HCl in 0,1M NaOH) in raztopino standarda KK.

#### 3.4.2 Linearnost

Linearnost se nanaša na sposobnost analizne metode, da znotraj določenega območja daje rezultate, ki so neposredno ali z definiranimi matematičnimi pretvorbami proporcionalni koncentraciji analita v vzorcu. Določimo jo s pomočjo grafa odzivov vzorca v odvisnosti od koncentracije. Z metodo najmanjših kvadratov določimo regresijsko premico ter pripadajočo enačbo umeritvene premice in determinacijski koeficient ( $R^2$ ), ki podaja korelacijo med odzivom in koncentracijo. Za dokaz linearosti mora vrednost korelacijskega koeficienta znašati več kot 0,99, v idealnem primeru pa 1 (52,53). Linearnost smo določili tako, da smo pripravili 7 raztopin KK različnih koncentracij (0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 ter 0,5 mg/ml), kot je opisano v poglavju 3.3.3 Priprava raztopin klindamicinijevega klorida za validacijo. Vsak vzorec smo injicirali dvakrat ter določili povprečje odzivov. Na podlagi meritev smo izdelali graf odzivov v odvisnosti od koncentracije ter določili enačbo umeritvene premice in determinacijski koeficient ( $R^2$ ). Sprejemljiv kriterij, ki smo ga postavili za linearnost je  $R^2 > 0,999$ .

#### 3.4.3 Ponovljivost

Ponovljivost ali natančnost je definirana kot stopnja ujemanja rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Podamo jo kot standardni odmik (SD) ali relativni standardni odmik (RSD) (52,53). Vrednotili smo dnevno in meddnevno ponovljivost ter ponovljivost injiciranja. V skladu s postopkom 3.3.3 Priprava raztopin

klindamicinijevega klorida za validacijo smo pripravili raztopine KK s koncentracijami 0,015; 0,09 in 0,45 mg/ml, vsako po pet paralelek. Za vrednotenje dnevne ponovljivosti smo vsak vzorec injicirali dvakrat, za vrednotenje ponovljivosti injiciranja pa smo eno paralelko od vsake koncentracije injicirali šestkrat. Postavili smo zgornjo mejo za RSD, ki je še sprejemljiv in ne sme presegati 5%.

Meddnevno ponovljivost smo določili tako, da smo postopek za določanje ponovljivosti ponovili še drugi in tretji dan ter primerjali stopnjo ujemanja rezultatov med dnevi.

#### 3.4.4 Točnost

Točnost analizne metode izraža ujemanje dobljene vrednosti s pravo vrednostjo (52,53). Za določanje točnosti smo uporabili iste vzorce kot pri določanju ponovljivosti. Iz enačbe umeritvene premice smo s pomočjo izmerjenega odziva izračunali koncentracije KK v vzorcu. Točnost smo izračunali po Enačbi 1 (52). Podali smo jo v procentih ter postavili kriterij sprejemljivosti znotraj intervala [95% - 105%].

$$\text{Točnost (\%)} = \text{določena vrednost} / \text{dejanska vrednost} \times 100 \quad (\text{Enačba 1})$$

#### 3.4.5 Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko pod določenimi eksperimentalnimi pogoji zaznamo, ne pa tudi nujno kvantitativno določimo. Izračunali smo jo s pomočjo Enačbe 2, pri čemer je  $\sigma$  standardni odklon vrednosti odsekov premic na ordinati in  $S$  povprečna vrednost naklonov umeritvenih premic (52,53).

$$\text{LOD} = (3,3 \times \sigma) / S \quad (\text{Enačba 2})$$

#### 3.4.6 Meja določitve

Meja določitve je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko v predpisanih eksperimentalnih pogojih kvantitativno določimo z ustrezno točnostjo in natančnostjo. Obstajajo različni načini določanja (52,53). Določili smo jo na osnovi ustrezne točnosti [95% - 105%] in ponovljivosti (<5%).

#### 3.4.7 Stabilnost vzorcev za validacijo

Stabilnost vzorcev smo vrednotili tri dni zaporedoma. Pripravili smo tri iste vzorce kot za ponovljivost, s koncentracijami 0,015; 0,09 in 0,45 mg/ml ter jih analizirali ob času 0, 24 ur in 48 ur. Vsak vzorec smo injicirali dvakrat, za izračun stabilnosti pa smo uporabili

povprečno vrednost. Ugotavljali smo porast ali upad KK po 24 in 48 urah glede na rezultate ob času 0. Postavili smo kriterij, da rezultati ne smejo odstopati za več kot 5% od začetne vrednosti.

## **3.5 STABILNOSTNA ŠTUDIJA**

### **3.5.1 Vodne raztopine KK**

Stabilnost KK smo spremljali pri različnih pogojih:

#### **3.5.1.1 Vpliv medija**

Pripravili smo raztopine KK v različnih medijih (destilirani vodi, 0,01M NaOH, 0,1M NaOH in 0,1M HCl) kot je opisano v postopku 3.3.5 Priprava vodnih vzorcev za stabilnostno študijo. Analizirali smo jih ob času 0 in 3 ure ter 1, 2, 3, 7, 10 in 14 dni. Vzorce smo med posamezno analizo shranjevali pri temperaturi 25, 40, 45, 50 in 60°C.

#### **3.5.1.2 Vpliv koncentracije KK**

Za ugotavljanje vpliva različnih koncentracij KK na stabilnost smo pripravili raztopine KK v destilirani vodi s koncentracijami 0,1, 1 in 10 mg/ml. Vzorce smo shranjevali v vodni kopeli na 40°C. Analizo smo izvedli v časovni točki 0 in 3 ure ter 1, 2, 3, 7, 10, 14 in 35 dni. Na enak način smo pri vseh treh koncentracijah preverili tudi stabilnost KK v 0,1M NaOH.

#### **3.5.1.3 Vpliv pH**

Po postopku 3.3.4 Priprava pufrnih raztopin z enako ionsko močjo smo pripravili sedem pufrnih raztopin z enako ionsko močjo, s pH vrednostmi 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 8. S pufrnimi raztopinami smo redčili osnovno raztopino KK, kot je opisano v poglavju 3.3.5 Priprava vodnih vzorcev za stabilnostno študijo. Vzorce smo shranjevali v vialah pri temperaturi 25, 40, 45, 50 in 60°C. Stabilnost smo spremljali v časovnih točkah 0 in 3 ure ter 1, 2, 3, 7, 10 in 14 dni.

#### **3.5.1.4 Vpliv temperature**

Pripravili smo raztopino KK v destilirani vodi s koncentracijo 0,1 mg/ml. Vzorce smo v vialah shranili na želeno temperaturo, v komori na 25°C ter vodnih kopelih na 40, 45, 50 in 60°C. Analizo smo izvajali ob času 0 in 3 ure ter 2, 3, 7, 10 in 14 dni. Pri enakih pogojih

shranjevanja ter enakih časovnih točkah smo spremljali tudi vpliv temperature na stabilnost KK raztopljenega v 0,01M NaOH in 0,1M NaOH.

### **3.5.2 Galenski pripravki**

Galenske pripravke smo pripravili v skladu s postopkoma 3.3.6 Priprava raztopine 1% klindamicinijevega klorida v etanolu in 3.3.7 Priprava pufrirane raztopine 1% klindamicinijevega klorida v etanolu. Tako pripravljene raztopine smo polnili v plastične vsebnike. Za analizo smo odpipetirali 2-krat 500  $\mu$ l vsake raztopine v posamezno vialo ter vzorec injicirali dvakrat. V kolono smo injicirali 1  $\mu$ l vzorca, brez predhodnega redčenja. Analizirali smo jih ob času 0 ter po 1, 2, 7, 10, 21, 28 in 60 dneh. Med posameznimi analizami smo vzorce shranjevali na sobni temperaturi, v komori na 25°C in v vodni kopeli s temperaturo 40°C.

### **3.5.3 Galenski pripravki z različnimi roki uporabnosti**

Na razpolago smo imeli 10 že pripravljenih galenskih pripravkov, ki so nam jih poslali iz Lekarne San Simon, Izola, z različnimi roki uporabnosti (Preglednica II). Za določanje vsebnosti KK v pripravkih smo analizirali neredčene vzorce, zato smo prilagodili volumen injiciranja na 1  $\mu$ l.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru diplomske naloge smo želeli preveriti rok uporabe galenskih pripravkov s KK, ki je bil do sedaj definiran 6 mesecev. Zanimalo nas je ali so morda ti pripravki uporabni tudi skozi daljše časovno obdobje. Vendar je bilo potrebno predhodno razviti ustrezno analizno metodo za določanje vsebnosti KK v raztopinah in jo ustrezno validirati, da smo jo uporabili za stabilnostno študijo. Ker je na razpolago malo literaturnih podatkov o stabilnosti klindamicina, smo sprva raziskovali vpliv pH-ja, temperature, koncentracije in medija na stabilnost KK v vodnih raztopinah. Nato pa smo preverili stabilnost KK v galenskih pripravkih, namenjenih za zdravljenje aken.

### 4.1 ANALIZNA METODA

#### 4.1.1 RAZVOJ ANALIZNE METODE

Pri razvoju optimalne analizne metode, s katero bi lahko izvedli stabilnostno študijo KK, smo izhajali iz predhodno že uporabljene analizne metode pri določanju klindamicina kot učinkovine in prisotnih nečistot. Ta metoda predlaga uporabo reverzno – fazne C18 kolone (YMC-PACK ODS-A) vzdrževane pri temperaturi 25°C ter mobilne faze acetonitril in fosfatni pufer pH 7,5 v volumskem razmerju 50 : 50. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 210 nm (1).

Ker te kolone nismo imeli na razpolago, smo kot najbolj primerno za uporabo izbrali reverzno – fazno kolono Luna C18(2). Temperaturo kolone smo konstantno vzdrževali pri 40°C. Mobilno fazo je predstavljal fosfatni pufer s pH 3 (vodna faza) in acetonitril (organska faza) v razmerju 70 : 30. Retencijski čas KK je bil 1,9 minute. Pri tej metodi kromatografski vrhovi KK in topila niso ustrezno ločeni med seboj. Izboljšanje retencije in selektivnosti kromatografskega sistema smo poskusili doseči s spremembo sestave mobilne faze. Znižali smo delež organske faze, tako da je bilo razmerje med fosfatnim pufrom in acetonitrilom 80 : 20. Dosegli smo ustrezno ločljivost med kromatografskimi vrhovi topila, KK in njegovimi razpadnimi produkti ter nečistotami. Čas zadrževanja učinkovine na koloni se je povečal, retencijski čas KK je bil okrog 7,6 minute. Kromatografskih pogojev metode nismo nič spreminjali (podpoglavje 3.2.1).



#### 4.1.2 POTRDITEV METODE Z LC-MS

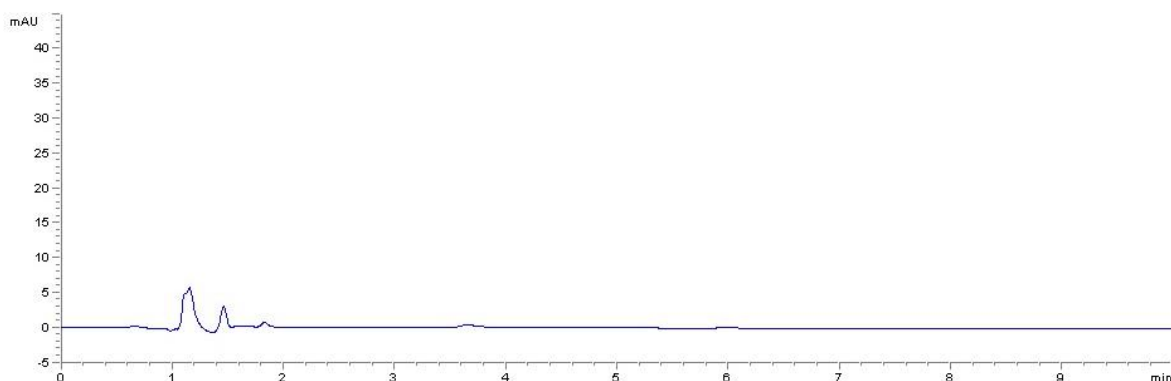
S tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo smo želeli preveriti ali je razvita HPLC metoda primerna za vrednotenje KK v vzorcih. V ta namen smo pripravili 3 vzorce, v destilirani vodi, kjer ne pričakujemo procesa nestabilnosti in pri obeh ekstremnih pH vrednostih, kar je podrobneje predstavljeno v poglavju 4.2 Identifikacija nečistot in razpadnih produktov KK. Z analizo različnih raztopin KK z metodo LC-MS smo potrdili stabilnostno indikativnost metode. Pri tej metodi ima KK krajši retencijski čas, ki je 1,7 minute, vendar je kljub temu kromatografski vrh KK ločen od ostalih prisotnih nečistot in razpadnih produktov.

#### 4.1.3 VREDNOTENJE HPLC METODE

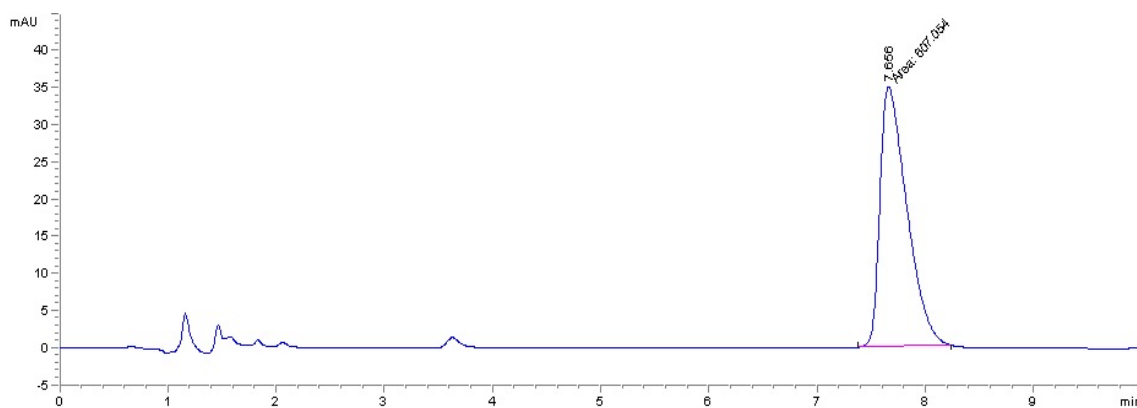
Analizno metodo smo nato ustrezno validirali. Z validacijo smo želeli potrditi, da je naša metoda primerna za analizo KK in nam daje ustrezne rezultate. Ovrednotili smo naslednje kriterije: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, meja zaznavnosti, meja določitve in stabilnost vzorcev.

##### 4.1.3.1 Selektivnost

Selektivnost smo določili v skladu z metodo 3.4.1. Analizirali smo vzorce medijev (MeOH in destilirana voda v razmerju 1 : 9, 0,1M NaOH ter 0,1M HCl) in osnovno raztopino KK. Iz Slike 7 je razvidno, da ima KK retencijski čas 7,6 minute. S primerjavo kromatogramov smo ugotovili, da se pri tem retencijskem času ne eluira nobena druga komponenta ter, da so za primer topila MeOH in voda vsi kromatografski vrhovi med seboj jasno ločeni (Slika 6 in Slika 7). Pri ostalih medijih prav tako ni bilo nobenih interferenc. S tem smo potrdili selektivnost, ki je eden ključnih parametrov stabilnostno indikativne metode.



Slika 6: Kromatogram medija (metanol in voda)



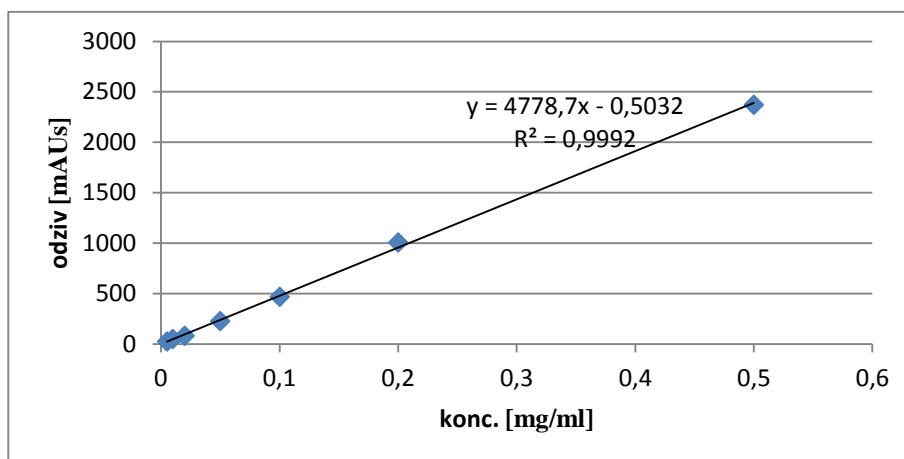
Slika 7: Kromatogram standarda KK v mediju (0,1 mg/ml), retencijski čas KK je 7,656 minut

#### 4.1.3.2 Linearnost

Na osnovi sedmih kalibracijskih vzorcev, pridobljenih v skladu z metodo 3.4.2, smo določili umeritvene premice ter determinacijski koeficient za vsak dan posebej, tri dni zapored (Preglednica V). Na Sliki 8 je prikazana umeritvena premica s pripadajočo enačbo premice in koeficientom korelacije za KK tretji dan validacije. Meritve smo izvajali v koncentracijskem območju 0,005 do 0,5 mg/ml. Izračunani koeficient korelacije je v vseh primerih večji od 0,999. Metoda se je izkazala kot linearna skozi celotno koncentracijsko območje, ki je hkrati tudi delovno območje metode.

*Preglednica V: Enačbe umeritvenih premic za klindamicinijev klorid s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti ( $R^2$ )*

DAN	ENAČBA PREMICE	$R^2$
1	$y = 4483,1x + 1,9642$	1,000
2	$y = 4715,2x + 10,392$	0,9994
3	$y = 4778,7x + 0,5032$	0,9992



Slika 8: Umeritvena premica za KK, tretji dan validacije

#### 4.1.3.3 Dnevna točnost in ponovljivost

V skladu z metodo 3.4.3 in 3.4.4 smo določili dnevno točnost in ponovljivost. Analizirali smo vzorce s koncentracijami 0,015, 0,09 in 0,45 mg/ml ter tako pokrili celotno delovno območje analizne metode. Ponovljivost izražena kot RSD je pri vseh treh koncentracijah nižja od 5% (Preglednica VI), ki predstavlja zgornjo postavljeno mejo. Na podlagi tega lahko potrdimo ponovljivost naše metode. Metoda je tudi točna (Preglednica VI), saj je bila povprečna vrednost, ki je znašala  $96,76 \pm 1,44\%$ , kot tudi vsaka posamezna vrednost, znotraj dovoljenega intervala [95% - 105%].

Preglednica VI: Dnevna točnost in ponovljivost HPLC metode

dejanska konc. (mg/ml)	povprečje odzivov	izračunana konc. (mg/ml)	točnost (%)	RSD (%)
<b>0,015</b>	69,70	0,015	97,94	1,64
<b>0,090</b>	409,45	0,086	95,32	1,08
<b>0,450</b>	2085,91	0,437	97,02	0,92
<b>povprečna vrednost</b>			<b>96,76±1,44</b>	<b>1,21±0,43</b>

#### 4.1.3.4 Meddnevna točnost in ponovljivost

Meddnevno točnost in ponovljivost smo določili v skladu z metodo 3.4.3 in 3.4.4 (Preglednica VII), pri čemer smo vzorce analizirali tri dni zapored. RSD v nobenem primeru ne presega zgornje postavljene meje sprejemljivosti 5%, zato lahko potrdimo tudi meddnevno ponovljivost metode. Povprečna meddnevna točnost preko celotnega koncentracijskega območja je znašala  $97,78 \pm 0,70\%$ , kar je znotraj postavljenih kriterijev sprejemljivosti [ $100 \pm 5\%$ ].

*Preglednica VII: Meddnevna točnost in ponovljivost HPLC metode*

dejanska konc. (mg/ml)	povprečje odzivov	izračunana konc. (mg/ml)	točnost (%)	RSD (%)
<b>0,015</b>	69,30	0,015	97,38	0,86
<b>0,09</b>	418,72	0,088	97,48	1,92
<b>0,45</b>	2117,16	0,443	98,48	2,44
<b>povprečna vrednost</b>			<b>97,78±0,70</b>	<b>1,74±0,88</b>

#### 4.1.3.5 Ponovljivost injiciranja

Ponovljivost injiciranja smo določili v skladu z metodo, kot je opisano v poglavju 3.4.3 ter jo izrazili z RSD. Na osnovi dobljenih rezultatov vidimo, da je ponovljivost injiciranja zelo dobra, saj je RSD pri vseh koncentracijah nižji od 0,2% (Preglednica VIII).

*Preglednica VIII: Ponovljivost injiciranja HPLC metode*

koncentracija (mg/ml)	povprečje odzivov	RSD (%)
<b>0,015</b>	69,88	0,11
<b>0,09</b>	429,62	0,06
<b>0,45</b>	2187,20	0,04
<b>povprečna vrednost</b>		<b>0,07±0,04</b>

#### 4.1.3.6 Meja zaznavnosti

Za izračun meje zaznavnosti smo uporabili enačbe umeritvenih premic, ki so prikazane v Preglednici V. V skladu s postopkom 3.4.5 smo izračunali povprečno vrednost naklonov premic (S) ter standardni odklon iz povprečja odsekov na ordinati ( $\sigma$ ).

$$S = 4659,0$$

$$\sigma = 5,3378$$

$$\text{LOD} = (3,3 \times \sigma) / S = 0,0038 \text{ mg/ml}$$

Meja zaznavnosti klindamicinijevega klorida pri izbranih pogojih analizne metode je 0,0038 mg/ml.

#### 4.1.3.7 Meja določitve

Mejo določitve smo določili na osnovi zadovoljive točnosti in ponovljivosti. Območje metode je primerno od koncentracije 0,005 mg/ml, kar je tudi pričakovana spodnja meja koncentracije v stabilnostnih študijah. Pri tej koncentraciji znaša RSD, ki je merilo ponovljivosti, 0,60% ter točnost 100,46%. Rezultati pri 0,005 mg/ml potrjujejo mejo določitve, saj so znotraj postavljenega kriterija sprejemljivosti za točnost [95% - 105%] in ponovljivost (<5%).

#### 4.1.3.8 Stabilnost vzorcev

Stabilnost vzorcev smo določili zato, ker nekatere učinkovine razpadajo že med samo pripravo vzorca ali med analizo. V Preglednici IX je prikazana porast oziroma upad koncentracije klindamicinijevega klorida znotraj treh dnevov glede na začetno stanje. Stabilnost vzorcev je ustrezna, saj je upad oziroma porast analita v vzorcih po dveh dneh manjši od postavljenega kriterija 5%.

*Preglednica IX: Stabilnost vzorcev*

<b>vzorec</b>	<b>KK ob času 0 (%)</b>	<b>KK ob času 24 ur (%)</b>	<b>KK ob času 48 ur (%)</b>
<b>0,015</b>	100,00	99,57	98,35
<b>0,09</b>	100,00	100,21	98,29
<b>0,45</b>	100,00	100,53	100,35

Ker so vsi parametri validacije znotraj predpisanih kriterijev, lahko potrdimo primernost HPLC metode za spremljanje stabilnosti KK v raztopinah in v pripravkih.

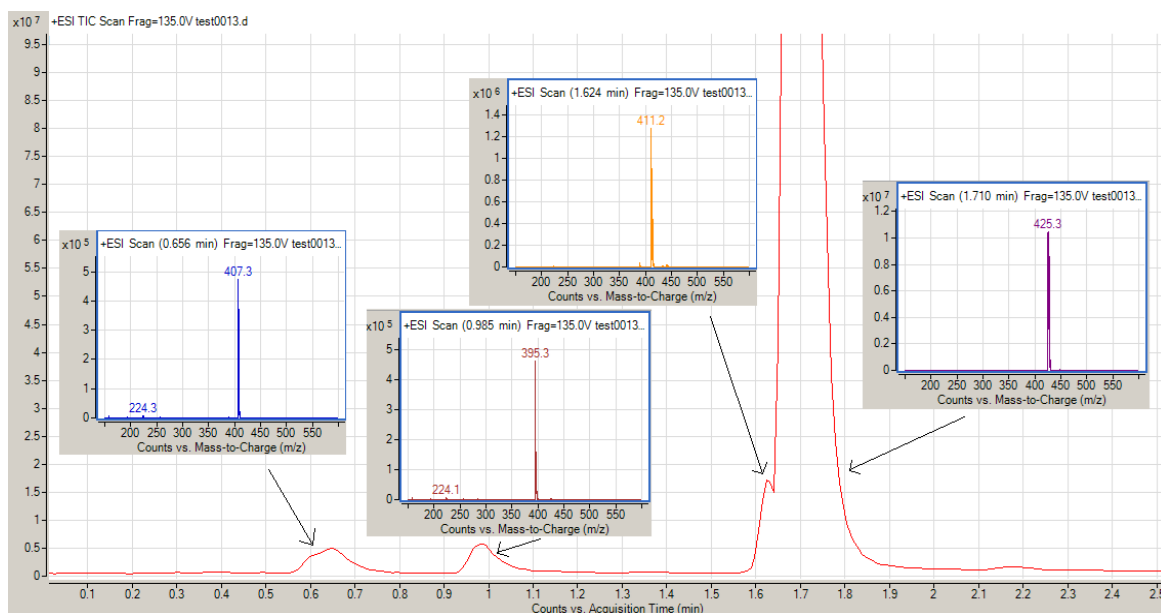
#### 4.1.4 ČISTOST STANDARDA

Analizna metoda omogoča tudi določitev ustreznosti standarda KK, ki smo ga uporabili za izdelavo galenskih pripravkov. Preverili smo, ali se naši rezultati ujemajo z deklariranimi vrednostmi, ki so podane na analiznem izvidu, ki je priložen vsakemu standardu posebej.

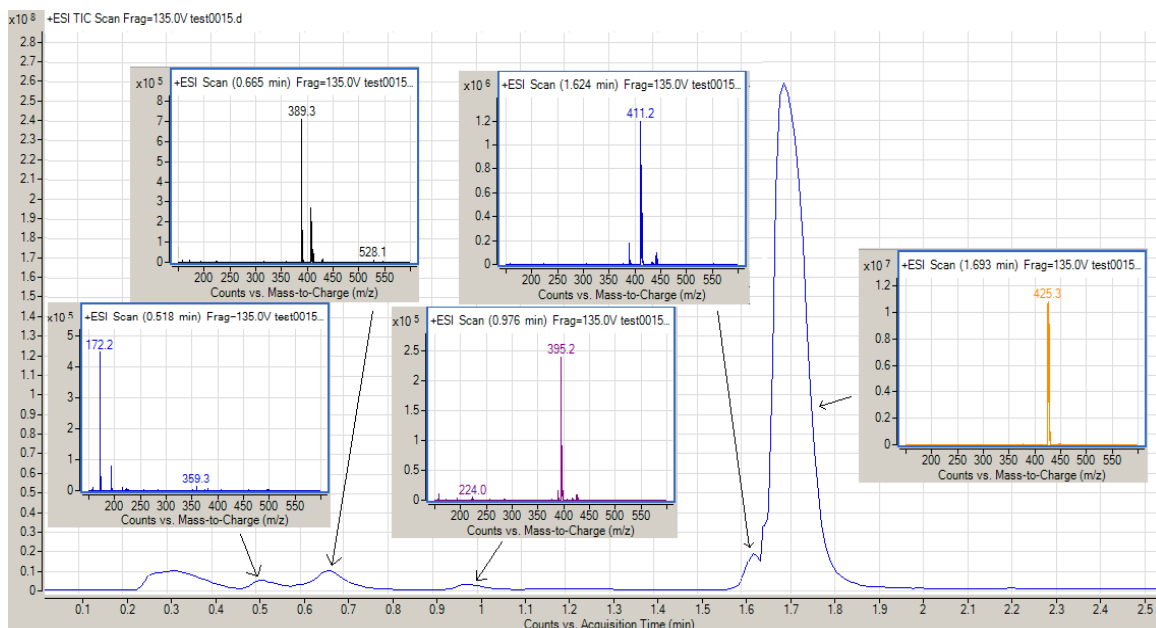
Čistost oziroma vsebnost smo preverili pri dveh standardih KK. Meritev pri KK 1, katerega rezultat na analiznem izvidu je bil 95,8%, je pokazala 99,6%. Vsebnost na analiznem izvidu KK 2 je bila 99,3%, nam pa je meritev pokazala 99,8%. Naše meritve se zelo ujemajo z deklarirano vsebnostjo. Za pripravo galenskih pripravkov smo zaradi boljše čistosti raje uporabili standard KK 2.

## 4.2 IDENTIFIKACIJA NEČISTOT IN RAZPADNIH PRODUKTOV

Z LC-MS metodo smo identificirali razpadne produkte KK ter morebitne prisotne nečistote v vodnem vzorcu (Slika 9) in v vzorcih, kjer smo pričakovali njegov razpad (0,1M NaOH in 0,1M HCl) (Slika 10). Z masnim spektrometrom analiziramo ione, ki nastanejo iz osnovne molekule, glede na razmerje med maso in nabojem, kar je osnova za določitev molekulske mase obravnavanih spojin. Pri interpretaciji rezultatov so nam bili v pomoč literaturni podatki predstavljeni v Preglednici X, katere smo primerjali z dobljenimi rezultati za lažje okarakteriziranje razpadnih produktov in nečistot v raztopini (1,54).



Slika 9: Razpadni produkti in nečistote KK zaznani v destilirani vodi z LC-MS metodo



Slika 10: Razpadni produkti in nečistote KK zaznani v 0,1M NaOH z LC-MS metodo

Preglednica X: Masni vrhovi ( $m/z$ ) nečistot in sorodnih snovi KK

empirična formula	$m/z$	sprememba glede na KK
<b><math>C_{18}H_{34}O_5N_2S_1Cl</math> (klindamicin)</b>	425.2	/
<b><math>C_{18}H_{32}O_4N_2S_1Cl</math></b>	407.2	- $H_2O$
<b><math>C_{18}H_{33}O_5N_2S_1</math></b>	389.2	- $HCl$
<b><math>C_{17}H_{30}O_5N_2Cl</math></b>	377.2	- $HSCH_3$
<b><math>C_{15}H_{28}O_4N_2Cl</math></b>	335.2	- $CHOHCHSCH_3$
<b><math>C_{18}H_{35}O_6N_2S</math> (linkomicin)</b>	407.2	/
<b><math>C_{17}H_{32}O_5N_2S_1Cl</math> (klindamicin B)</b>	411.2	/

Masni kromatogram KK v vodnem mediju prikazuje prisotnost ionov pri  $m/z$  395, 407, 411 in 425. Fragment pri vrednosti 425 pripada osnovni molekuli KK, pri 411 pa molekuli klindamicina B. Ion pri  $m/z$  407 ustreza eliminaciji  $H_2O$  molekule oziroma molekuli linkomicina. Linkomicin nastane pri hidrolizi klindamicina, običajno v pH območju 5 - 9, lahko je prisoten v samem standardu kot nečistota, ker se uporablja kot izhodni material pri sintezi klindamicina. Ion pri  $m/z$  395 ustreza 1-detiometil-1-hidroksilinkomicinu, ki nastane pri hidrolizi tioglikozidne vezi. V vodnem vzorcu so prisotne nečistote iz standarda, kar je tudi v skladu s pričakovanji, saj ne pričakujemo procesa nestabilnosti v večjem obsegu. Drugače je s KK v 0,1M NaOH. Masni kromatogram prikazuje več vrhov

kot kromatogram KK v vodnem mediju, kar smo tudi pričakovali, zaradi dodatnih razpadnih produktov. Tukaj opazimo zraven masnih vrhov pri vrednosti  $m/z$  395, 411 in 425, katerih spojine so nam že znane, tudi komponente pri vrednosti  $m/z$  172 in 389. Molekula z molsko maso 172 ustreza empirični formuli  $C_9H_{18}NO_2$ , spojina nastane pri hidrolizi amidne vezi, ki običajno poteče v raztopini z visokim ali nizkim pH. Ion pri vrednosti  $m/z$  389 nastane kot posledica eliminacije HCl iz molekule klindamicina. Masni kromatogram KK raztopljenega v 0,1M HCl daje enake rezultate kot spekter KK v vodnem mediju in nakazuje na stabilnost KK v tem mediju.

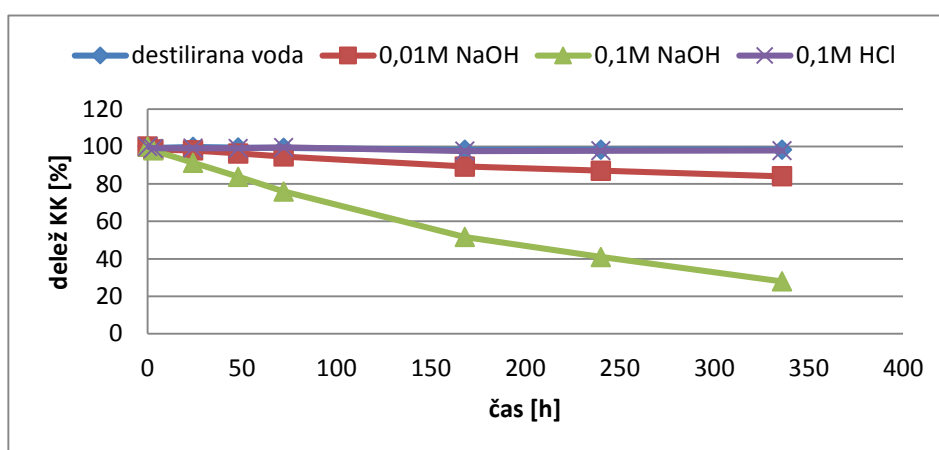
## 4.3 STABILNOSTNA ŠTUDIJA

### 4.3.1 STABILNOST KLINDAMICINIJEVEGA KLORIDA V VODNIH RAZTOPINAH

Na standardu KK smo želeli preveriti stabilnost v vodnih raztopinah pri različnih pogojih (temperatura, medij, koncentracija, pH). To nam bo omogočilo, da bomo v nadaljevanju lažje razumeli obnašanje KK v pripravku.

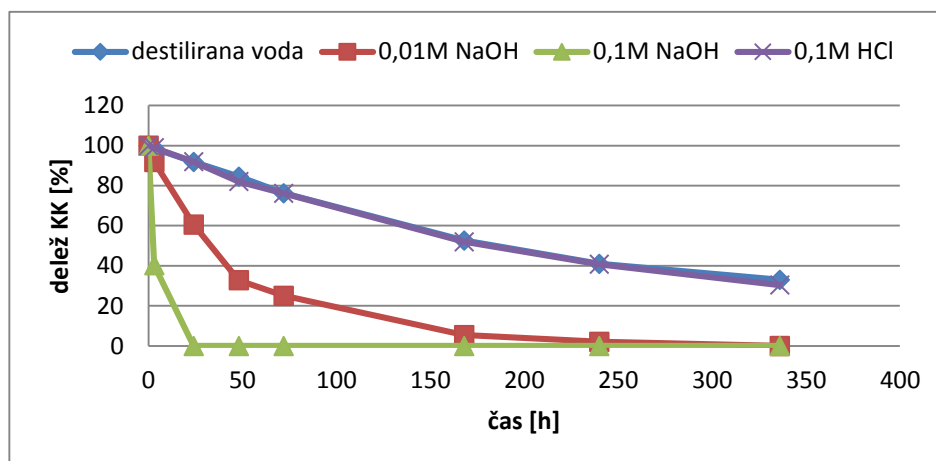
#### 4.3.1.1 Vpliv medija

V skladu s postopkom 3.3.5 smo pripravili in analizirali raztopine KK v destilirani vodi, 0,01M NaOH, 0,1M NaOH in 0,1M HCl. V nadaljevanju bodo predstavljeni rezultati vzorcev shranjenih pri temperaturi 25 in 60°C.



Slika 11: Stabilnost KK v različnih medijih pri 25°C





Slika 12: Stabilnost KK v različnih medijih pri 60°C

Preglednica XI: Delež KK v različnih medijih po štirinajstih dnevih glede na začetno vrednost

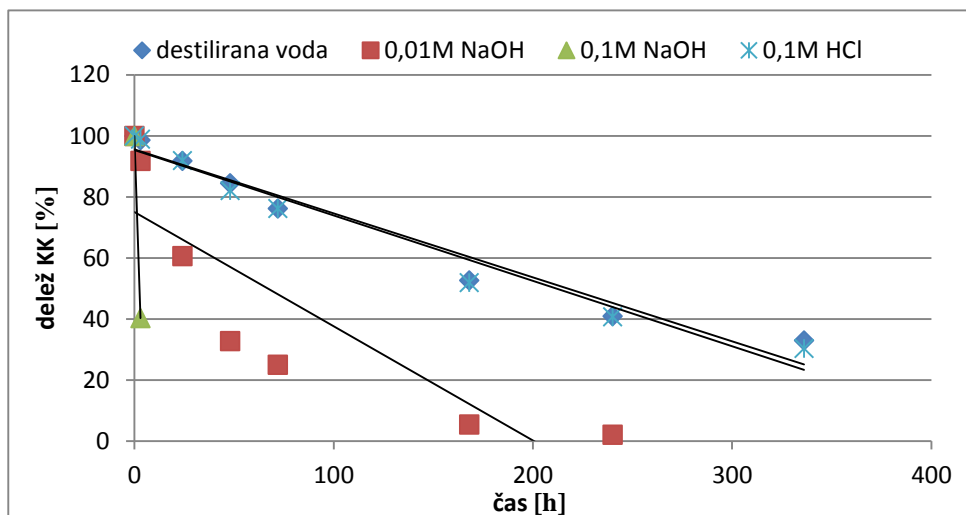
vzorec (pogoji shranjevanja)	KK v destilirani vodi (%)	KK v 0,01 M NaOH (%)	KK v 0,1 M NaOH (%)	KK v 0,1 M HCl (%)
25°C	98.42	84.11	27.96	97.91
40°C	92.52	31.21	0	91.70
45°C	91.22	20.19	0	88.79
50°C	77.73	16.38	0	67.23
60°C	33.00	0	0	30.41

Rezultati analize vzorcev shranjenih v komori pri 25°C so prikazani na Sliki 11. Iz rezultatov je razvidno, da je učinkovina stabilna v destilirani vodi in 0,1M HCl, saj po 14 dneh razpade manj kot 3% učinkovine. Upad vsebnosti je viden v 0,01M NaOH, v 0,1M NaOH pa je še bolj izrazit, kar je posledica višje pH vrednosti raztopine. V literarnih podatkih smo zasledili, da bi naj bila učinkovina manj stabilna pri visokih in nizkih pH vrednostih. Pri povišani temperaturi so procesi hitrejši in še bolj izrazito opazni (Slika 12). Iz Preglednice XI je razvidno, da je KK najbolj stabilen v destilirani vodi in 0,1M HCl, slabša stabilnost je v 0,01M NaOH, zelo nestabilen je pa v 0,1M NaOH. V 0,1M NaOH, pri temperaturi višji od 40°C, po 14 dneh razpade celoten KK. Če raztopino shranimo pri 60°C, vsa učinkovina razpade že po 24 urah (Slika 12).

Za kvantitativno ovrednotenje stabilnosti smo si pomagali s kemijsko kinetiko, ki opisuje hitrost kemijskih reakcij. Stabilnost učinkovine najboljše ponazorimo s pomočjo konstante

reakcijske hitrosti, ki jo določimo glede na ustrezen red reakcije. Na podlagi rezultatov, pridobljenih med analizo vzorca shranjenega pri 60°C, smo izračunali enačbe premic ter pripadajoče determinacijske koeficiente za reakcije 0. in 1. reda in ugotovili kateri red boljše opiše razpad KK.

Primer izračuna konstante reakcijske hitrosti za reakcije 0. reda (Slika 13, Preglednica XII):

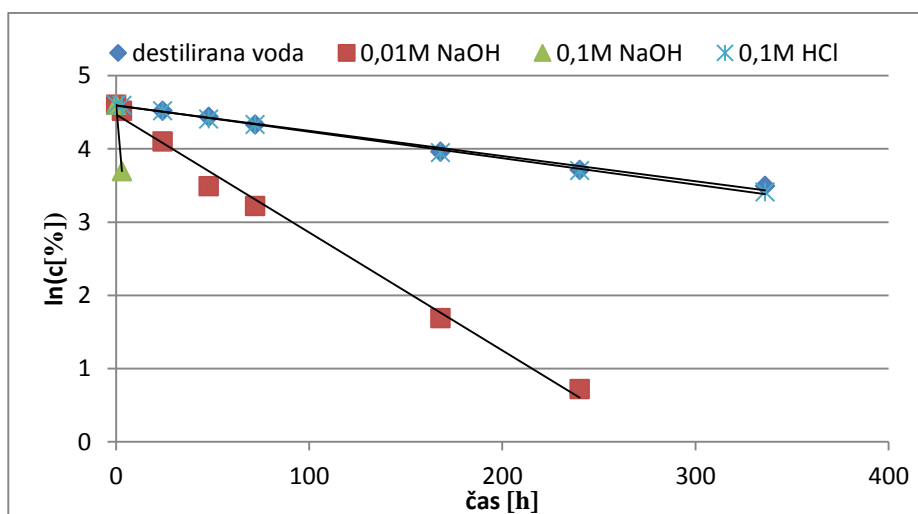


Slika 13: Delež KK v odvisnosti od časa v različnih medijih pri 60°C (premice za 0. red reakcije)

Preglednica XII: Enačbe premic z determinacijskim koeficientom in konstantami reakcijske hitrosti za primer reakcije 0. reda

medij	enačba premice	R <sup>2</sup>	k [%/h <sup>-1</sup> ]
destilirana voda	$y = -0,2096x + 95,568$	0,9606	0,2096
0,01M NaOH	$y = -0,3745x + 75,078$	0,7425	0,3745
0,1M NaOH	$y = -19,902x + 100$	1,000	19,902
0,1M HCl	$y = -0,2146x + 95,415$	0,9649	0,2146

Primer izračuna konstante reakcijske hitrosti za reakcije 1. reda (Slika 14, Preglednica XIII):



Slika 14: Naravni logaritem deleža KK v odvisnosti od časa v različnih medijih pri 60°C (premice za 1. red reakcije)

Preglednica XIII: Enačbe premic z determinacijskim koeficientom in konstantami reakcijske hitrosti za primer reakcije 1. reda

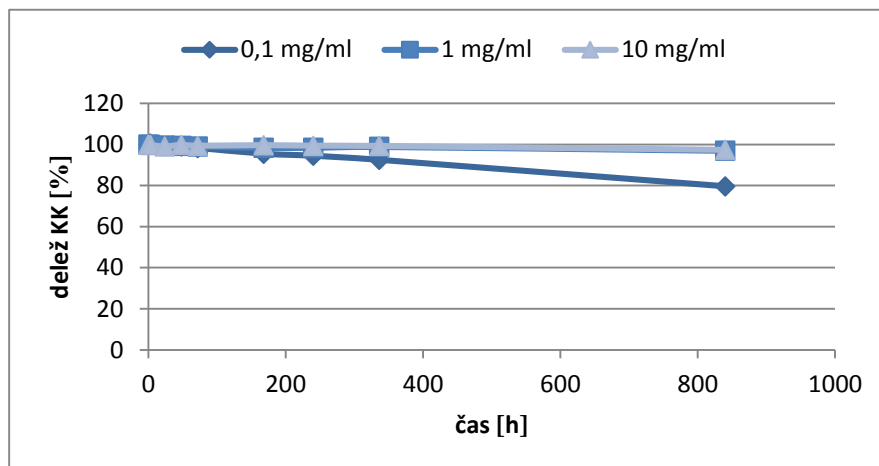
medij	enačba premice	R <sup>2</sup>	k [h <sup>-1</sup> ]
destilirana voda	$y = -0,0034x + 4,5904$	0,9925	0,0034
0.01M NaOH	$y = -0,0161x + 4,4701$	0,9924	0,0161
0.1M NaOH	$y = -0,303x + 4,6052$	1,000	0,303
0.1M HCl	$y = -0,0036x + 4,5936$	0,9975	0,0036

Glede na vrednosti determinacijskih koeficientov lahko sklepamo, da naša učinkovina razpada po kinetiki 1. reda, to pa zato, ker so vrednosti bližje 1 kot pri 0. redu.

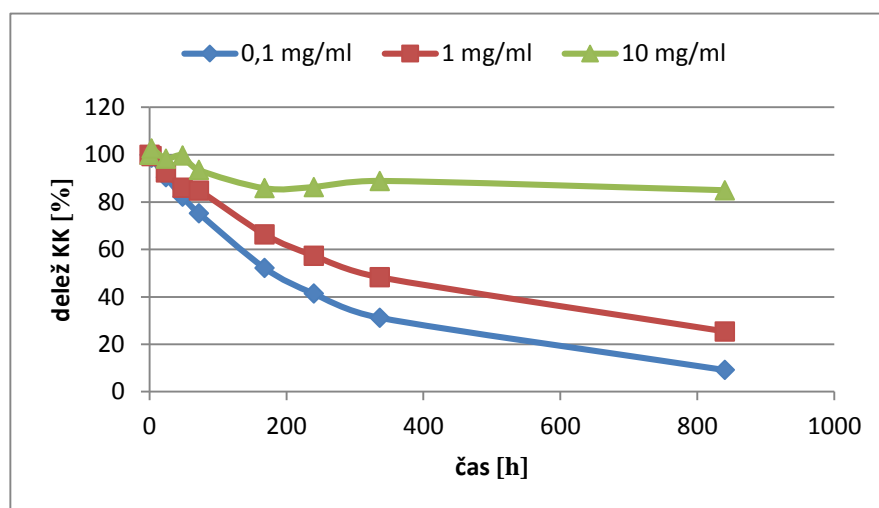
V skladu s kinetiko 1. reda smo določili konstante reakcijske hitrosti. Na podlagi konstant reakcijskih hitrosti lahko kvantitativno opredelimo stabilnost. Konstanti reakcijske hitrosti v destilirani vodi in 0,1M HCl sta skoraj enaki in 90-krat nižji kot v 0,1M NaOH, kar pomeni, da hidroliza KK veliko hitreje poteka v 0,1M NaOH (Preglednica XIII).

#### 4.3.1.2 Vpliv koncentracije klindamicinijevega klorida

Stabilnost je lahko povezana tudi z začetno koncentracijo učinkovine v raztopini. Običajno je stabilnost pri višji koncentraciji boljša kot pri nižji. Da bi preverili, če to velja tudi v tem primeru, smo pripravili raztopine KK s koncentracijami 0,1, 1 in 10 mg/ml v destilirani vodi ter 0,01M NaOH ter spremljali upad koncentracije KK.



Slika 15: Razpad KK v odvisnosti od koncentracije v destilirani vodi pri 40°C



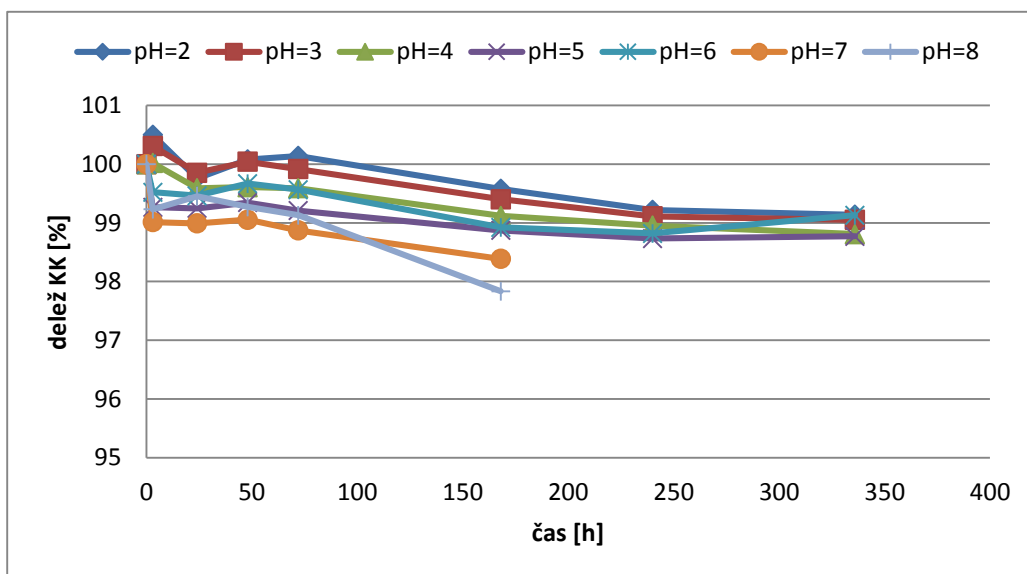
Slika 16: Razpad KK v odvisnosti od koncentracije v 0,01M NaOH pri 40°C

KK je v destilirani vodi dokaj stabilen. Pri začetni koncentraciji 0,1 mg/ml po 1 mesecu razpade 20% učinkovine, pri koncentraciji 1 in 10 mg/ml pa manj kot 4%. Slika 15 nam prikazuje, da se z nižanjem koncentracije učinkovine povečuje delež razpadle učinkovine. Hidroliza KK poteče bolj izrazito v raztopini 0,01M NaOH, kar nam prikazuje Slika 16.

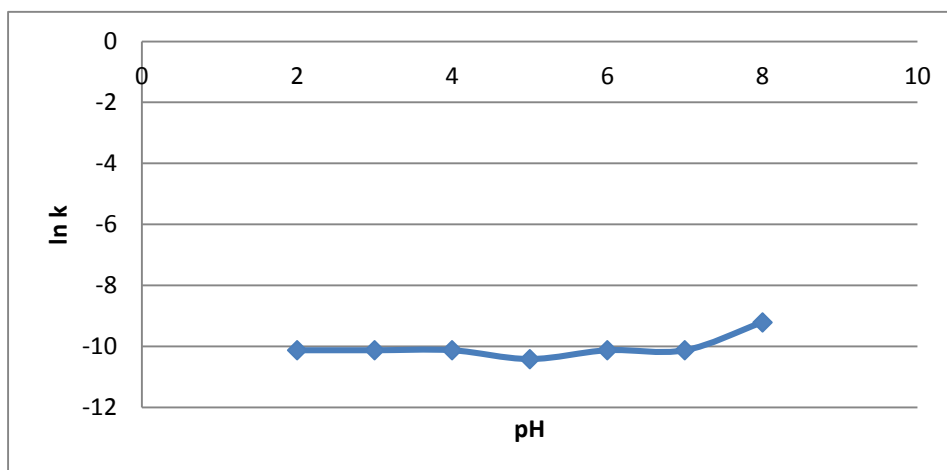
Pri koncentraciji 10 mg/ml po 1 mesecu razpade 14% učinkovine, pri koncentraciji 1 mg/ml 75%, največji delež in to kar 91% učinkovine pa razpade pri začetni koncentraciji KK 0,1 mg/ml. Pri teh pogojih je lepo ponazorjena povezava med koncentracijo izhodne spojine in deležem njenega razpada. Kot vidimo ima začetna koncentracija KK v raztopini velik vpliv na stabilnost. Z naraščanjem koncentracije KK se njegoa stabilnost v raztopini 0,01M NaOH povečuje. V destilirani vodi lahko rečemo, da koncentracija nima tako pomembnega vpliva na razpad učinkovine.

#### 4.3.1.3 Vpliv pH

Literaturni viri navajajo, da ima pH največji vpliv na stabilnost KK v raztopini. Najbolj stabilen bi naj bil pri pH vrednosti 4 (42,44). Zato smo proučevali stabilnost KK pri pH vrednostih od 2 do 8, pri tem smo uporabili pufre z isto ionsko močjo, saj le-ta tudi lahko vpliva na hitrost kemijske reakcije. V poglavju 3.3.4 in 3.3.5 je opisan postopek priprave vzorcev, katere smo izpostavili različnim temperaturnim pogojem. Podrobneje smo predstavili stabilnost pri 25°C in 60°C, izračunali konstante reakcijske hitrosti na podlagi 1. reda reakcije ter izdelali pH profil.

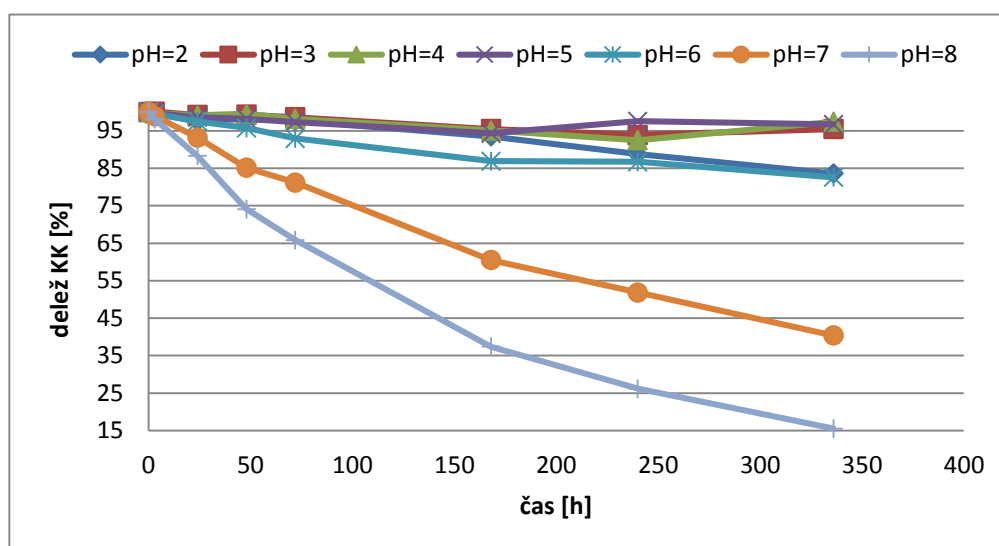


Slika 17: Vpliv pH na razpad KK pri 25°C

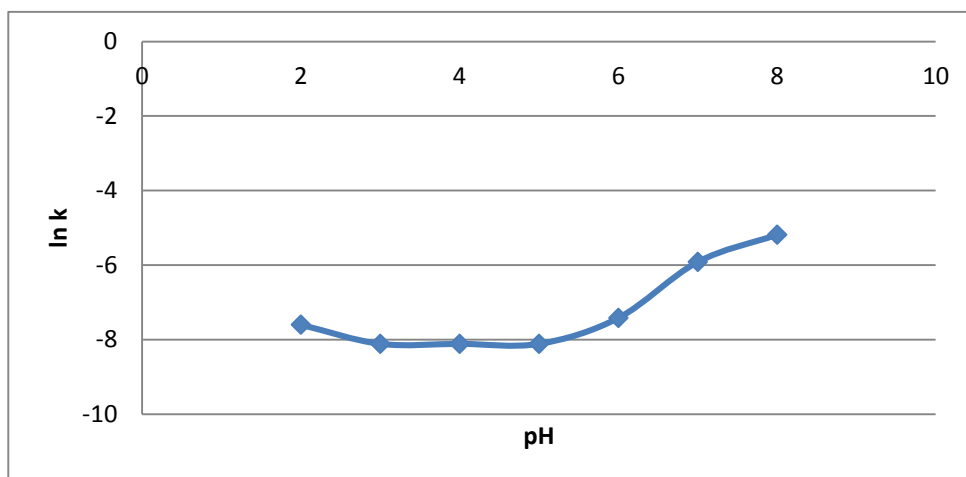


Slika 18: pH profil pri 25°C

Pri temperaturi 25°C pH vrednost raztopine ne vpliva na stabilnost KK, saj po 14 dneh razpade manj kot 2% učinkovine, ta nekoliko upade zgolj pri pH vrednosti 8 (Slika 17). pH vrednost raztopin torej ni ključni dejavnik za nestabilnost KK v vodnih raztopinah, ki jih shranjujemo pri sobni temperaturi.



Slika 19: Vpliv pH na razpad KK pri 60°C



Slika 20: pH profil pri 60°C

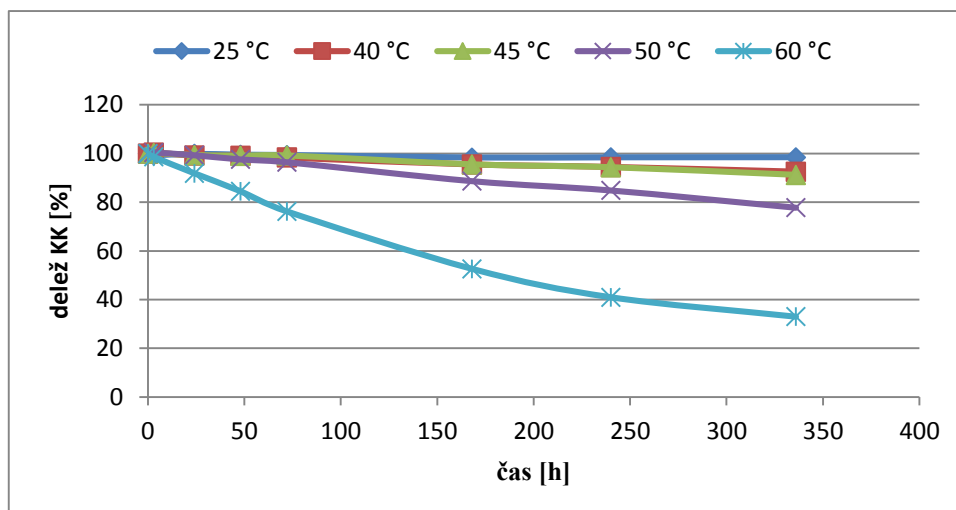
Reakcija hidrolize poteče hitreje in bolj izrazito pri povišani temperaturi, zato smo tudi preverili stabilnost KK v raztopinah z različnimi pH vrednostmi pri povišani temperaturi. Upad deleža KK v vzorcih, katere smo shranili v vodni kopeli s temperaturo 60°C, je prikazan na Sliki 19. Na podlagi analize smo ugotovili, da stabilnost pada z naraščanjem pH vrednosti. Na podlagi izračunanih konstant reakcijske hitrosti, ki so podane v pH profilu (Slika 20), smo stabilnost KK v raztopinah z različnimi pH vrednostmi tudi kvantitativno ovrednotili. KK je najbolj stabilen pri pH vrednosti 3 – 5, kot navajajo tudi literaturni podatki (5). Ugotovili smo, da z nižanjem pH vrednosti (pod pH 3) stabilnost KK pada, saj v kislem območju prevladuje hidroliza tioglikozidne vezi. Stabilnost se začne zmanjševati tudi pri pH vrednosti 6 in z naraščanjem pH še bolj pada.

Te ugotovitve lahko potrdimo tudi z LC-MS analizo identifikacije nečistot in razpadnih produktov, saj so v vzorcih, kjer smo KK raztopili v destilirani vodi in 0,1M HCl, razpadni produkti bili opazni v manjšini. Razpadne produkte smo opazili pri KK raztopljenem v 0,1M NaOH, kar pomeni da je stabilnost slabša v bazičnih raztopinah.

#### 4.3.1.4 Vpliv temperature

Eden od poglobitnih dejavnikov, ki na splošno vpliva na stabilnost učinkovine v raztopini, je temperatura. Ta je povezana s kinetično energijo delcev, reakcije hitreje potekajo pri višji temperaturi, kar je posledica hitrejšega gibanja delcev in večjega števila trkov med njimi (44). Da bi preverili vpliv temperature na stabilnost KK smo pripravili raztopine KK v destilirani vodi, 0,01M NaOH in 0,1M NaOH, ki smo jih izpostavili različnim

temperaturnim pogojem. Najpomembnejši temperaturi pri določanju stabilnosti pripravkov sta 25 in 40°C, saj se pri teh pogojih izvajajo testi stabilnosti.

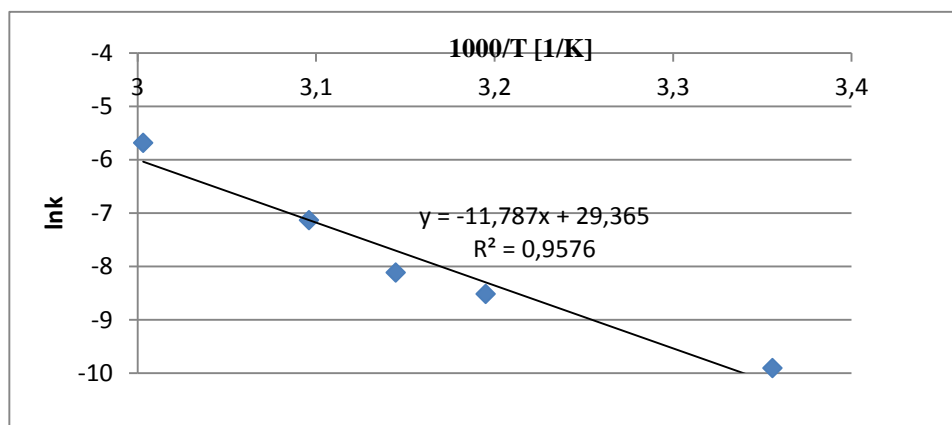


Slika 21: Vpliv temperature na razpad KK v destilirani vodi

Preglednica XIV: Podatki za Arrheniusovo premico  $\ln k$  v odvisnosti od  $1/T$

T (°C)	T (K)	enačba premice	k (min <sup>-1</sup> )	lnk
25	298	$y = -0,00005x + 4,6017$	0,00005	-9,903
40	313	$y = -0,0002x + 4,6056$	0,0002	-8,517
45	318	$y = -0,0003x + 4,6082$	0,0003	-8,112
50	323	$y = -0,0008x + 4,6141$	0,0008	-7,131
60	333	$y = -0,0034x + 4,5904$	0,0034	-5,684

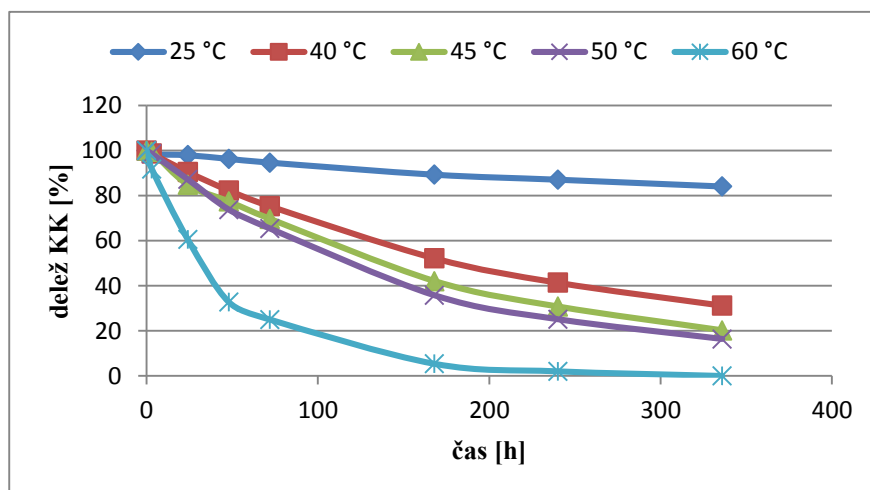




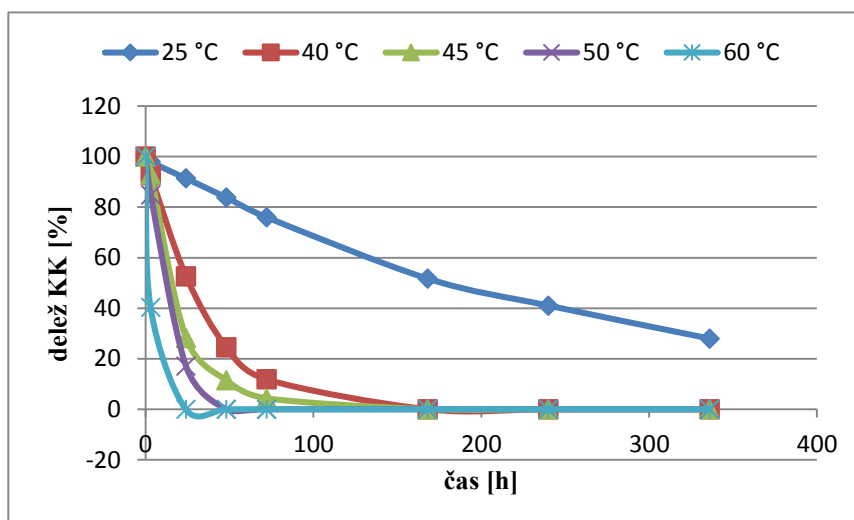
Slika 22: Arrheniusov graf vpliva temperature na hitrost reakcije razpada KK v destilirani vodi

Iz grafa (Slika 21) je razvidno, da stabilnost KK v destilirani vodi pada z naraščajočo temperaturo. Pri 25°C po 14 dneh razpade manj kot 2% učinkovine, kar pomeni, da je to primerna temperatura za shranjevanje pripravkov, ki vsebujejo KK. Tudi pri temperaturi 40 in 45°C je KK še dokaj stabilen, saj po 14 dneh upad koncentracije ni večji od 10%. V vzorcu, ki smo ga shranili v vodni kopeli segreti na 60°C se koncentracija po 14 dneh zniža za  $\frac{2}{3}$ .

Preverili smo tudi Arrheniusovo odvisnost hitrosti kemijske reakcije od temperature. Izračunali smo konstante reakcijske hitrosti za 1. red reakcije ter njihove naravne logaritme (Preglednica XIV). S pomočjo teh izračunov in recipročnih absolutnih temperatur smo izdelali Arrheniusovo premico (Slika 22). Aktivacijska energija za KK, ki smo jo določili iz naklona premice, znaša 98 kJ/mol. Glede na determinacijski koeficient, katerega vrednost je blizu 1, lahko potrdimo korelacijo med temperaturo in hitrostjo hidrolize KK. Kar nam omogoča izvedbo pospešenih testov klindamicina oziroma pripravkov s klindamicinom.



Slika 23: Vpliv temperature na razpad KK v 0,01M NaOH



Slika 24: Vpliv temperature na razpad KK v 0,1M NaOH

Preglednica XV: Enačbe Arrheniusove premice in pripadajoči  $R^2$ 

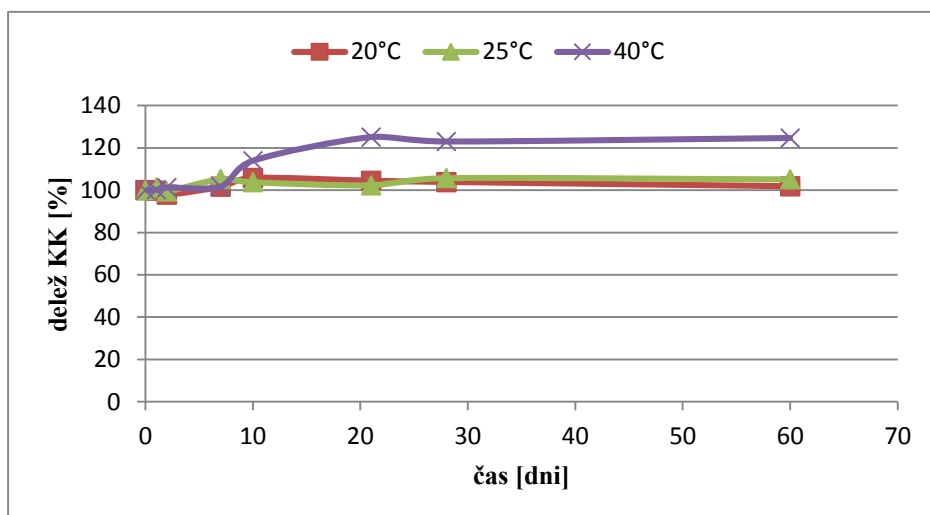
vzorec	enačba premice	$R^2$
voda	$y = -11787x + 29,365$	0,958
0,01M NaOH	$y = -16162x + 45,007$	0,898
0,1M NaOH	$y = -24567x + 73,538$	0,905

Stabilnost KK je najslabša v 0,01M NaOH. Pri temperaturi 25°C ga po 14 dneh razpade manj kot 20%, pri temperaturi nad 40°C pa več kot polovica. V 0,1M NaOH hidroliza KK poteče še hitreje. V vzorcu na sobni temperaturi je po 14 dneh manj kot 30% začetne koncentracije učinkovine. Pri temperaturi višji od 40°C po 1 tednu razpade celoten KK, pri 60°C pa ves razpade že tekom 1 dne. Tudi za te vzorce smo na enak način kot pri vzorcih v destilirani vodi preverili Arrheniusovo odvisnost hitrosti hidrolize od temperature. Izdelali smo Arrheniusovo premico ter pripadajoč koeficient korelacije (Preglednica XV). Rezultati kažejo, da v teh vzorcih ni tako dobre povezave med temperaturo in hitrostjo kemijske reakcije.

#### **4.3.2 STABILNOST KK V GALENSKIH PRIPRAVKIH**

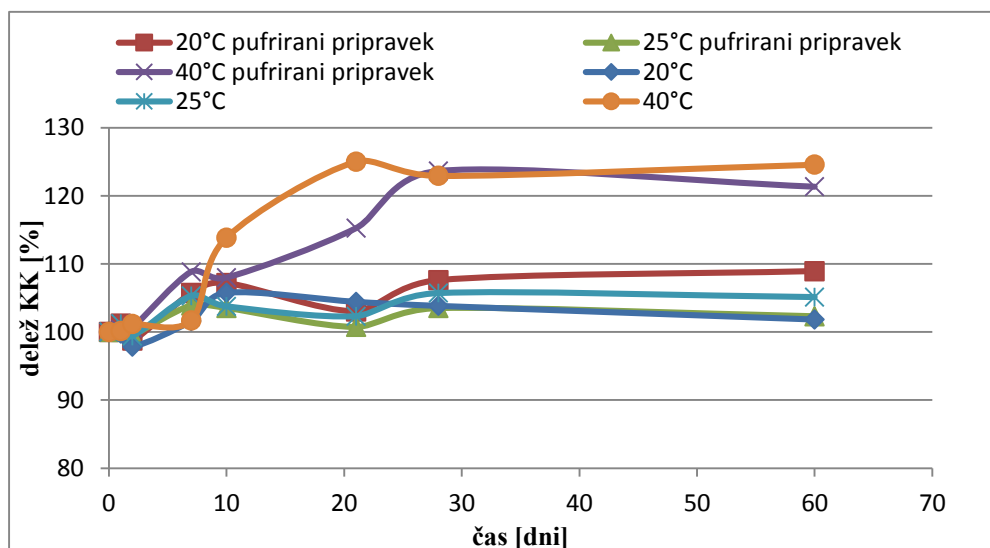
Klindamicinijev klorid najdemo v različnih farmacevtskih oblikah kot so trdne kapsule in raztopine. Problem stabilnosti se običajno pojavi v raztopinah, saj lahko pride do razgradnje učinkovine v prisotnosti topila. Zato imajo galenski pripravki deklarirani rok uporabe 6 mesecev. Mi smo želeli s stabilnostno študijo preveriti ali je pripravek uporaben tudi skozi daljše časovno obdobje, kar je eden od osnovnih ciljev naše diplome.

Po predpisani recepturi, kot je opisano v poglavju 3.3.6 Priprava raztopine 1% klindamicinijevega klorida v etanolu, smo izdelali pripravke, kakor jih izdelujejo v lekarnah, namenjene za dermalno zdravljenje aken. Pripravkom smo izmerili pH vrednost, ki je bila okrog 3,4. Literaturni podatki navajajo, da je KK najbolj stabilen v raztopini s pH vrednostjo 4, zato smo se odločili, da pripravimo iste raztopine, katerim pH smo z dodajanjem 0,1M NaOH uravnali na 4,0. Postopek priprave je opisan v poglavju 3.3.7 Priprava pufrirane raztopine 1% klindamicinijevega klorida v etanolu. Zanimalo nas je, ali je potrebno posegati v pripravke ter jih dodatno pufrirati, ali so sploh kakšne razlike v stabilnosti KK. Tako pripravljene raztopine smo polnili v plastične vsebnike, ki so namenjeni enostavnemu nanosu na kožo. Pripravke smo shranili pri sobni temperaturi, v komori s temperaturo 25°C in vodni kopeli na 40°C.



Slika 25: Stabilnost KK v galenskih pripravkih

Slika 25 nam prikazuje stabilnost KK v galenskih pripravkih. Po 2 mesecih opazimo v vzorcih celo povišano vsebnost KK, kar je najverjetneje posledica izhlapevanja topila, ki ga v večji meri predstavlja etanol. Etanol, ki je brezbarvna lahko hlapna tekočina, predstavlja  $\frac{7}{10}$  topila, v katerem smo raztopili KK. Pri vzorcih shranjenih v vodni kopeli, kjer je temperatura 40°C, izhlapi več topila, saj se tukaj koncentracija poviša za 20%. Dopusčati moramo možnost, da v raztopini določen delež KK vseeno razpade, kar pa ni opazno zaradi izhlapevanja topila. Po pregledu rezultatov smo prišli do zaključka, da je omenjene pripravke ustrezno shranjevati pri temperaturi do 25°C. Je pa vprašljiva uporaba tovrstnih plastičnih vsebnikov, zaradi izhajanja topila. V bodoče bi bilo potrebno izvajati stabilnostno študijo KK v primernejših vsebnikih, da bi dobili bolj realne rezultate.



Slika 26: Stabilnost KK v pufiranih in nepufiranih pripravkih

Slika 26 prikazuje primerjavo stabilnosti KK v galenskih pripravkih narejenih po predpisani recepturi s stabilnostjo KK v pufiranih pripravkih. Med posameznimi pripravki, shranjenimi pri istih pogojih, ni bistvene razlike pri upadu oziroma porasti koncentracije KK. To pomeni, da ni potrebe po dodatnem delu (pufiranje) in nepotrebnemu poseganju v pripravek.

#### 4.3.3 STABILNOST KK V GALENSKIH PRIPRAVKIH Z RAZLIČNIM ROKOM UPORABNOSTI

Iz lekarne San Simon v Izoli so nam poslali galenske pripravke (Raztopina 1% klindamicinijevega klorida v etanolu), ki so bili izdelani ob različnih časih, a imajo predpisan rok uporabe 6 mesecev. Na podlagi vsebnosti klindamicina v raztopini, ki smo jo kvantitativno določili s HPLC metodo, smo potrdili rok uporabe pripravkov 6 mesecev ter preverili ali je uporaba možna tudi skozi daljše časovno obdobje. Na podlagi določanja stabilnosti KK v pripravkih, kateri so že različno dolgo na tržišču, nekateri z že pretečenim rokom uporabnosti v času analize, smo želeli posredno napovedati rok uporabnosti.

*Preglednica XVI: Primerjava deklarirane in dejanske koncentracije KK v galenskem pripravku, analizirano januarja 2013*

<b>pripravek</b>	<b>rok uporabe pripravka</b>	<b>deklarirana konc. [mg/ml]</b>	<b>dejanska konc. [mg/ml]</b>	<b>odstopanje (%)</b>
1	07 / 2013	1.000	0.982	- 1,8
2	06 / 2013	1.000	0.978	- 2,2
3	06 / 2013	1.000	1.022	+ 2,2
4	04 / 2013	1.000	0.965	- 3,5
5	03 / 2013	1.000	0.969	- 3,1
6	02 / 2013	1.000	0.991	- 0,9
7	01 / 2013	1.000	1.031	+ 3,1
8	11 / 2012	1.000	0.968	- 3,2
9	10 / 2012	1.000	0.998	- 0,2
10	09 / 2012	1.000	1.074	+ 7,4

Na osnovi umeritvene premice smo izračunali dejanske koncentracije KK v pripravkih ter njihova odstopanja od prave vrednosti. Rezultate smo podali v Preglednici XVI. Dejansko ni viden trend upada koncentracije KK s starostjo pripravka, ampak je le-ta naključen. V nekaterih primerih je koncentracija KK celo višja od predpisane, a je znotraj eksperimentalne napake analizne metode. Lahko je tudi posledica izhlapevanja topila. V nobenem primeru upad koncentracije KK v pripravku ni večji kot 4%. Glede na to, da so bili med analiziranimi pripravki nekateri s pretečenim rokom uporabnosti, najstarejši med njimi je bil izdelan skoraj leto dni pred izvedenimi meritvami, lahko zaključimo, da so ti pripravki uporabni več kot 6 mesecev oziroma vsaj eno leto.

## 5 ZAKLJUČEK

V okviru diplomske naloge smo razvili ustrezno HPLC metodo, ki je primerna za spremljanje stabilnosti klindamicinijevega klorida v vodnih raztopinah in pripravkih. Primernost metode smo zraven validacije še dodatno potrdili z LC-MS metodo. Dokazali smo, da je izbrana metoda selektivna, linearna v koncentracijskem območju 0,005 do 0,5 mg/ml ter nam daje točne in ponovljive rezultate znotraj dneva in med dnevi.

Z LC-MS metodo smo tudi identificirali razpadne produkte KK v raztopini in prisotne nečistote v standardu KK. V raztopini 0,1M NaOH je prisotnih več razpadnih produktov in nečistot kot v vodnem mediju in 0,1M HCl. V raztopinah smo identificirali klindamicinijev klorid ter razpadne produkte z empiričnimi formulami  $C_{18}H_{32}O_4N_2S$ ,  $C_{18}H_{33}O_5N_2S$ ,  $C_{17}H_{32}O_6N_2Cl$  in  $C_9H_{18}NO_2$ , ki ustrezajo eliminaciji  $H_2O$  in HCl iz molekule, hidrolizi tioglikozidne in amidne vezi. Kot nečistoti se v raztopini pojavita linkomicin in klindamicin B.

Z analizo metodo smo izvedli stabilnostno študijo KK v vodnih vzorcih in galenskih pripravkih. Ugotovili smo, da reakcijo najbolje opišemo v skladu s prvim redom. Na stabilnost KK vpliva medij v katerem je učinkovina raztopljen. Najboljšo izkazuje v vodnem mediju in 0,1M HCl. Stabilnost upade v 0,01M NaOH in se z naraščanjem koncentracije NaOH samo še znižuje.

Z analizo vzorcev različnih koncentracij smo ugotovili, da se z naraščanjem koncentracije KK v raztopini njegova stabilnost povečuje. To je najbolj opazno v 0,01M NaOH, v destilirani vodi koncentracija nima večjega vpliva na stabilnost KK.

S stabilnostno študijo smo dokazali, da pH vrednost medija vzorcev shranjenih na sobni temperaturi, nima večjega vpliva na stabilnost KK. Vpliv pH-ja je bolj opazen v vzorcih shranjenih v vodni kopeli s temperaturo 60°C. Povišana temperatura in bazični pogoji najbolj destabilizirajo KK. Najbolj je stabilen v pH območju od 3 do 5, z zniževanjem in višanjem pH vrednosti medija stabilnost KK pada.

Ugotovili smo, da ima zraven medija velik vpliv na stabilnost KK tudi temperatura. Najbolj je stabilen pri 25°C, ki pa se z naraščanjem temperature znižuje. Dokazali smo tudi dobro korelacijo med temperaturo in hitrostjo hidrolize KK v vodnem mediju.

Z dvomesečno stabilnostno študijo smo ugotovili, da je KK v pripravkih, narejenih po predpisani recepturi, zelo stabilen pri temperaturi do 25°C. Pri vzorcih, shranjenih pri temperaturi 40°C, pride do porasta koncentracije učinkovine, zaradi izhlapevanja topila oziroma etanola iz pripravka. Primerjava rezultatov pufiranih in nepufiranih pripravkov ni pokazala nobenih razlik v stabilnosti, kar pomeni da je kakršnokoli dodatno delo pri izdelavi pripravkov odveč. V prihodnje bi bilo boljše, za izvajanje stabilnostne študije KK, pripravke shranjevati v primernejših vsebnikih, da bi preprečili izhlapevanje topila.

Z analizo pripravkov, ki so bili izdelani ob različnih časih, smo ugotavljali njihovo ustreznost in posredno tudi njihovo podaljšanje roka uporabe. Ni bilo opaznega trenda zmanjševanja vsebnosti oziroma nestabilnosti v povezavi s starostjo pripravka. Upad koncentracije KK v pripravkih, med katerimi so bili nekateri s pretečenim rokom uporabnosti, ni bil nikjer večji kot 4%. Glede na dobljene vsebnosti KK v pripravkih lahko potrdimo njihovo uporabnost v obdobju 6 mesecev. Ta čas se lahko podaljša na vsaj eno leto.



## 6 LITERATURA

1. Zhou H, Zheng Z, Wu S, Tai Y, Cao X, Pan Y: Separation and characterization of clindamycin and related impurities in bulk drug by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41: 1116-1123
2. [www.draagle.com](http://www.draagle.com), dostopano april 2015
3. Holly A. S: Clindamycin. Elsevier Science Inc. 1997; 4: 251-253
4. Dehouck P, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J: Analysis of clindamycin by micellar electrokinetic chromatography with a mixed micellar system. *J Chromatogr A* 2001; 932: 145-152
5. Lund W: The Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics, 12th Edition, Pharmaceutical Press, 1994: 808-811
6. European Pharmacopeia 5th Edition (Ph. Eur. 5), Council of Europe, Strasbourg, 2004: 1319-1320
7. <http://www.cbz.si/>, dostopano maj 2014
8. Batzias C. G, Delis A. G, Athanasiou V. L: Clindamycin bioavailability and pharmacokinetics following oral administration of clindamycin hydrochloride capsules in dogs. *Vet J* 2005; 170: 339-345
9. Varagić M. V, Milošević P. M: Farmakologija, Šestnaesto izdanje, Elit – Medica, Beograd, 2001: 651-652
10. Liu C-M, Chen Y-K, Yang T-H, Hsien S-Y, Hung M-H, Lin E-T: High-performance liquid chromatographic determination of clindamycin in human plasma or serum: application to the bioequivalency study of clindamycin phosphate injections. *J Chromatogr B* 1997; 969: 298-302
11. Povzetek glavnih značilnosti (SmPC) zdravila Klimicin 150 mg trde kapsule
12. Čižman M, Jazbec J, Gubina M: Racionalna uporaba antibiotikov pri majhnem otroku, III. Kogojevi dnevi, Ljubljana, Zbornik predavanj 1993: 133-144
13. Gold S. H, Moellering C. R, Jr.: Macrolides and Clindamycin, *Clinical Infectious Diseases: A Practical Approach*, Oxford University Press, 1999: 294-297
14. Štrumbelj I, Seme K: Betahemolitični streptokoki skupin B in G iz Pomurja – značilnosti izolatov, odpornih proti antibiotikom. *Zdrav Vestn* 2003; 72: 283-286

15. Scholar M. E, Pratt B. W: The Antimicrobial Drug, Oxford University Press, 2000: 159-210
16. Gutnik M: Klindamicin – možnost več pri zdravljenju infekcij kože in mehkih tkiv, III. Kogojevi dnevi, Ljubljana, Zbornik predavanj 1993: 217-220
17. King L. T, Brucker C. M: Pharmacology for Women's Health, 2011: 249-309
18. Ouellette G. R, Joyce J: Pharmacology for Nurse Anesthesiology, 2011: 193-214
19. Stefanini M: Clindamycin as trigger of uroporphyrinuria. Int J Basic & Clin Pharmacol 2014; Vol 3: 225-226
20. Kluytmans J, Murk J L: Lincomycin and Clindamycin, Kuchers' the use of antibiotics 6th edition, 2010: 987-1007
21. Frey Tirri B: Antimicrobial Topical Agents Used in the Vagina. Topical Applications and the Mucosa, 2011: 36-47
22. Smieja M: Current indications for the use of clindamycin: A critical review. Can J Infection 1998; 9(1): 22-28
23. Kralj B: Vnetja in nekateri drugi vzroki za akutni abdomen v ginekologiji in porodništvu, Urgentna medicina, Izbrana poglavja 4, Portorož, 1998: 105-114
24. Baumgartner S, Bajramović N: Farmacevtski izdelki za zdravljenje aken in nege kože. Farm Vestn 2006: 84-92
25. Arzenšek J, Novak-Gosarič D: Zdravila v dermatovenerološki praksi, V. Dermatološki dnevi v Mariboru, Zbornik referentov, 2008: 11-31
26. Whitney M. K, Ditte M. C: Anti-Inflammatory Properties of Clindamycin: A Review of Its Use in the Treatment of Acne Vulgaris. Clinical Medicine Insights: Dermatology, 2011; 4: 27-41
27. Soldo-Belić A, Čajkovac V, Vujić-Podlipec D, Oremović L: Development of liposome encapsulated clindamycin for treatment of acne vulgaris. Life sciences conference, 1999: 10
28. Cvetko E, Skalerič U: Indikacije za sistemsko antibiotično zdravljenje parodontalne bolezni. Zobozdrav Vestn 2008; 63: 81-89
29. Sapundžiev D, Seme K, Ihan Hren N: Bakterijski povzročitelji odontogenih abscesov in flegmon ter njihova občutljivost na antibiotike *in vitro*. Zobozdrav Vestn 2012; 67: 66-73
30. Logar M, Lejko Zupanc T, Pikelj Pečnik A: Nova priporočila za preprečevanje infekcijskega endokarditisa. Glasilo zdravniške zbornice Slovenije 2009; 8/9: 54-55

31. Kester M, Vrana E. K, Karpa D. K: Elsevier's Integrated Review Pharmacology, 2nd edition, Saunders, 2012: 41-78
32. Piltaver-Vajdec I, Tretjak M, Slemenik-Pušnik C, Benko D, Fišer J, Tomič V: Staphylococcus aureus, nosilec gena za Panton-Valentine leukocidin, in letalna nekrotizirajoča pljučnica pri mladem imunokompetentnem bolniku. Zdrav Vestn 2006; 75: 829-832
33. Lah A: Ustrezna izbira antibiotičnega zdravljenja pri okužbah kože in mehkih tkiv. 5. Kokaljevi dnevi: Poškodbe v osnovnem zdravstvu, Kranjska Gora, 2005: 54-56
34. Bouazza N, Pestre V, Jullien V, Curis E, Urien S, Salmon D, Tréluyer J: Population pharmacokinetics of clindamycin orally and intravenously administered in patients with osteomyelitis. Brit J Clin Pharmacol 2012; 74: 971-977
35. Pääkkönen M, Peltola H: Treatment of Acute Septic Arthritis. Pediatr Infect Dis J 2013; 32: 684-685
36. Kotnik-Kevorkijan B, Lorenčič-Robnik S, Rejc-Marko J, Ekart-Koren K: Stafilokokna sepsa, Bedjaničev simpozij, Maribor, 2003: 91-102
37. Lell B, G. Kremsner P: Clindamycin as an Antimalarial Drug: Review of Clinical Trials. Antimicrob Agents Ch 2002: 2315-2320
38. Povzetek glavnih značilnosti (SmPC) zdravila Dalacin 20 mg/g vaginalna krema
39. Povzetek glavnih značilnosti (SmPC) zdravila Dalacin 10 mg/ml dermalna raztopina
40. Griffin P. J, D'arcy F. P: A Manual of Adverse Drug Interactions, 5th Edition, Elsevier, Netherlands, 1997: 379
41. Delaney M: The HIV Drug Book Revised, 2nd Edition, Pocked Books, New York, 1995: 54-57
42. Moser Woo T: Drugs Used in Treating Infectious Diseases, Pharmacotherapeutics for Nurse Practitioner Prescribers, 3rd Edition, 2011: 741-868
43. Mancano A. M, Gallagher C. J: Frequently Prescribed Medications: Drugs You Need to Know, 2nd Edition, 2014: 41
44. Connors A. K, Amidon L. G, Stella J. S: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, Wiley, New York, 1986: 365-370
45. Shao X, Xie X, Liu Y, Song R: Rapid determination of clindamycin in medicine with myoglobin-luminol chemiluminescence system. J Pharm Biomed Anal 41 2006: 667-670

46. Mifsud M, Vella J, Ferrito V, Serracino-Inglott A, Azzopardi M. L, Sammut Bartolo N, LaFerla G, Sammut C: A simple HPLC-UV method for the determination of clindamycin in human plasma. *J Chem Pharm Res* 2014; 6(1): 696-704
47. Wang J, Peng Z, Yang J, Wang X, Yang N: Detection of clindamycin by capillary electrophoresis with an end-column electroluminescence of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II). *Talanta* 75 2008: 817-823
48. Nedeljko P: Micelarna elektrokinetična kromatografija. seminarska naloga, 2011
49. Dehouck P, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J: Analysis of clindamycin by micellar electrokinetic chromatography with a mixed micellar system. *J Chromatogr A* 2001; 932: 145-152
50. Nataraj S. K, Surya.Narasimha Raju G.N.V, Anusha B: UV spektrofotometric method development for estimation of clindamycin phosphate in bulk and dosage form. *Int J Pharm Biol Sci* 2013; 3: 164-167
51. Wei G, Dang G, Li H: Ultrasensitive assay of clindamycin in medicine and bio-fluids with chemiluminescence detection. *Luminescence* november/december 2007; 22(6): 534-539
52. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005
53. Singh R: HPLC method development and validation – an overview. *J Pharm Educ Res* 2013; 4(1): 26-33
54. Wang S-M, Bu S-S, Liu H-M, Li H-Y, Liu W, Wang Y-D: Separation and characterization of clindamycin phosphate and related impurities in injection by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 2009; 23: 899-906