مقاله تحقیقی

معتبرسازی روش اندازه گیری مقدار کلیندامایسین در فرمولاسیون لیپوزومی

مطهره مقدسی پور [۱]، رابعه خوشنویس زاده [۲،*]، فاطمه نوربخش [۳]

۱. گروه بیوتکنولوژی میکروبی ، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران
۲. گروه بیوشیمی و بیوفیزیک ، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران
۳. گروه میکروب شناسی ، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: r.khoshnevis@iauvaramin.ac.ir, biologybiophysics@gmail.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۸/۵

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۳- شماره ۲- تابستان ۱۳۹۷

چکیده

کلیندامایسین برای درمان انواع عفونت های باکتریایی تجویز می شود که بعلت وجود مکانیسم های مختلف مقاومتی در باکتری ها در برخی موارد اثر درمانی ندارد. یکی از راه های مقابله با مقاومت باکتری ها بهره گیری از فرمولاسیون لیپوزومی است. در ساخت هر فرمولاسیون لیپوزومی نیاز به اندازه گیری مقدار داروی وارد شده به ساختار لیپوزومی است که از طریق یک روش معتبر انجام می شود. در این تحقیق روشی جهت اندازه‌گیری مقدار کلیندامایسین در فرمولاسیون لیپوزومی آن بیان شده است. معیارهای معتبرسازی بر طبق پروتکل ICH Q2B شامل میزان خطی بودن، صحت، دقت، انتخابی بودن، حساسیت حد تشخیصی و حساسیت حد تعیین مقدار بدست آمد. در این مطالعه نمونه ها در محلول متانول و سود ۰/۱ مولار با نسبت حجمی ۸ به ۱ حل شده و با کمک تکنیک UV اسپکتروفتومتری شدت جذب آن‌ها در طول موج ۲۰۱ نانومتر اندازه گیری شد. با این روش امکان رسم نمودار کالیبراسیون کلیندامایسین در دامنه غلظتی ۰/۲ تا ۱/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ضریب همبستگی ۰/۹۹۹ فراهم شد. این مطالعه نشان داد که فرمولاسیون لیپوزومی تهیه شده از فسفولیپید (۲/۶٪)، کلسترول (۰/۸٪) و کلیندامایسین (۱٪) (وزنی بر حجمی) که ۵۰ بار با متانول رقیق شده هیچ جذبی در ۲۰۱ نانومتر نداشته و می‌توان غلظت کلیندامایسین را بدون دخالت مولکول‌های تشکیل دهنده لیپوزوم اندازه‌گیری کرد. درصد قابلیت تولید مجدد۸۰ و ۸۳ درصد به ترتیب برای ۸۰٪ و ۱۲۰٪ غلظت کلیندامایسین حاصل شد. انحراف معیار استاندارد برای اندازه گیری پارامتر دقت در یک روز و دقت بین روزها کمتر از ۴٪ بوده و حد تشخیصی و حد تعیین مقدار به ترتیب ۰/۰۴۳ و ۰/۱۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست امد. این نتایج نشان داد که این روش ساده و در دسترس می تواند برای اندازه گیری مقدار کلیندامایسین در فرمولاسیون لیپوزومی مناسب باشد.

واژگان کلیدی: کلیندامایسین، لیپوزوم، اسپکتروفتومتری، معتبرسازی

مقدمه

کلیندامایسین آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیکی است که با اتصال به زیرواحد 50S مولکول RNA ریبوزومی، موجب مهار سنتز پروتئین در باکتری می‌شود (۲). اشکال مختلف کلیندامایسین شامل خوراکی، تزریقی و ژل موضعی است؛ که در درمان عفونت های واژینوز باکتریایی، توکسوپلاسموز (مغزی یا چشمی)، پنومونی پنوموسیستیس کارینی، عفونت شدید گوش میانی، عفونت شدید سینوسی

باکتریایی، مننژیت ایجاد شده با باکتری استرپتوکوک، بیماری التهاب لگن (PID) و آکنه مورد استفاده قرار می-گیرد. در کنار درمان عفونت های نامبرده در سالیان اخیر شاهد شکل گیری مقاومت های باکتریایی از طریق مکانیسم‌های مختلف در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها هستیم. از جمله مکانیسم های مقاومت باکتری ها کاهش نفوذپذیری غشا آنها در برابر ورود دارو به فضای درونی باکتری است که برای غلبه بر این استراتژی باکتری می توان از سامانه دارورسان لیپوزومی که با فرایند فیوژن غشایی نفوذپذیری دارو را افزایش می دهد بهره برد (۶-۳).

برای ارزیابی ویژگی های بیوفیزیکی فرمولاسیون لیپوزوم حاوی آنتی بیوتیک باید بتوان مقدار داروی محصور شده در فضای لیپوزومی را که به درصد انکپسولاسیون[1] مشهور است، اندازه گیری کرد. روش های متنوعی جهت غلظت سنجی هر داوریی با توجه به ماتریکسی که دارو در آن قرار گرفته است ابداع شده است از این رو فارماکوپه برای اندازه‌گیری غلظت کلیندامایسین در فرم دارویی، روش HPLC را پیشنهاد می‌کند که روشی دقیق اما گران قیمت است (۷). طراحی روشی که با تکنیک های ساده تر بتوان غلظت دارو را بدست آورد منشا شکل گیری تحقیقاتی شده که از طریق UV اسپکتروفتومتری در طول موج ها و حلال های متفاوت به بررسی غلظت کلیندامایسین در فرم دارویی پرداخته اند (۸). در این تحقیق برای اولین بار، روشی ساده و سریع برای اندازه گیری و معتبرسازی غلظت کلیندامایسین در فرمولاسیون لیپوزومی طبق پرتکل های بین المللی طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

فسفولیپید ۸۰ جی (فسفاتیدیل کولین) از شرکت لیپویید، کلسترول، بافر فسفات، کلروفرم و متانول (گرید آزمایشگاهی) از شرکت مرک خریداری شد.

تجهیزات

از دستگاه UV اسپکتروفتومتری ساخت شرکت Shimadzu مدل 1601PC برای اندازه‌گیری مقدار کلیندامایسین، و در تهیه لیپوزوم از روتاری تبخیرکننده ساخت شرکت BUSCHI مدل R-210 جهت حذف حلال آلی استفاده شد. اندازه‌گیری وزن همه مواد بوسیله ترازوی KERN آلمان با دقت ۰/۱ میلی‌گرم صورت گرفت.

تهیه لیپوزوم کلیندامایسین

پس از حل کردن فسفولیپید ۸۰ جی (۲/۶ ٪) و کلسترول (۰/۸ ٪) (وزنی بر حجمی) در ۱۰ میلی لیتر محلول کلروفرم مستقر در بالن ۱۰۰ میلی لیتری ته گرد از روتاری جهت حذف حلال و تهیه فیلم خشک فسفولیپیدی استفاده شد. ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار در ۷ pH حاوی ۱۰۰ میلی گرم کلیندامایسین، کم کم به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه و پس از ۳۰ دقیقه ورتکس، فرمولاسیون لیپوزومی کلیندامایسین شکل گرفت.

تهیه لیپوزوم بدون کلیندامایسین

پس از حل کردن فسفولیپید ۸۰ جی (۲/۶ ٪) و کلسترول (۰/۸ ٪) (وزنی بر حجمی) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول کلروفرم در بالون۱۰۰ میلی‌لیتری از روتاری جهت حذف حلال و تهیه فیلم خشک فسفولیپیدی استفاده شد. ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار در ۷ pH کم کم به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه شده و پس از ورتکس فرمولاسیون لیپوزومی خالی تهیه شد.

آماده‌سازی محلول‌های استاندارد کلیندامایسین

برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم کلیندامایسین توزین شده و در بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری با آب به حجم رسانده شد تا محلول استوک کلیندامایسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فراهم شود، سپس با کمک بالن ژوژه‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری مقادیر ۲، ۴، ۶ و ۱۸ میلی-لیتر از استوک کلیندامایسین به بالن ژوژه‌ها منتقل شد و با محلول متانول/ سود (۱:۸ حجمی/حجمی) به حجم رسید تا به ترتیب غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۱/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول استاندارد کلیندامایسین تهیه شود، آن‌گاه اسپکتروم هر محلول در برابر بلانک متانول به دست آمد. از هر غلظت ۳ نمونه تهیه شد.

برای بررسی پارامتر دقت، نمونه استاندارد کلیندامایسین با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روزهای مختلف تهیه و جذب آن‌ها در برابر بلانک متانول،

[1] Encapsulation

در طول موج ۲۰۱ نانومتر اندازه‌گیری شده و درصد انحراف معیار استاندارد هر جذب محاسبه گشت.

آماده سازی نمونه های لیپوزومی کلینداماسین

یک میلی‌لیتر از محلول لیپوزومی کلینداماسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۴ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و سپس ۳ میلی‌لیتر از آن با محلول متانول/سود (۱:۸ حجمی/حجمی) به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شود.

روش معتبرسازی

از پروتکل های ارائه شده توسط کنفرانس بین المللی هماهنگ سازی (۹) و راهنمای بین المللی (۱۰) برای معتبرسازی استفاده شد که پارامترهای آن در ادامه آمده است.

خطی بودن (Linearity)

این پارامتر به رابطه بین غلظت و شدت جذب ۴ غلظت مختلف نمونه های استاندارد کلینداماسین (۰/۲ تا ۱/۸ میلی گرم بر میلی لیتر) از طریق رسم نمودار کالیبراسیون و محاسبه مربع رگرسیون گیری پرداخته و همچنین مقدار RSD حاصل از ۳ تکرار در هر غلظت را بررسی کرده است.

دقت (Precision)

محاسبه دقت به وسیله معیار تکرارپذیری پاسخ ها در یک روز و سه روز محاسبه شد. برای این منظور شدت جذب ۶ نمونه استاندارد کلینداماسین با غلظت ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر در یک روز و سه نمونه در سه روز متوالی اندازه گیری شد و درصد انحراف معیار استاندارد هر جذب اندازه گیری شد.

صحت (Accuracy)

یک میلی‌لیتر از محلول لیپوزومی کلینداماسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۴ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و سپس ۳ میلی‌لیتر از آن با محلول متانول/سود (۱:۸ حجمی/حجمی) به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شود. سپس یک حجم از محلول لیپوزومی (۰/۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر) و یک حجم از نمونه‌های استاندارد کلینداماسین با غلظت-های ۳/۶ و ۲/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برداشته تا به ترتیب غلظت‌های ۰/۴۸ و ۰/۷۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلینداماسین به همراه لیپوزوم فراهم شود. هر نمونه ۳ بار تهیه و در برابر بلانک متانول شدت جذب آن‌ها در ۲۰۱ نانو متر اندازه‌گیری و مقدار بازیابی غلظت محاسبه شد.

ویژه بودن روش (Specificity)

جهت ارزیابی این پارامتر نمونه هایی تهیه شد که حاوی همه مواد موجود در لیپوزوم بوده، اما فاقد کلینداماسین بودند تا تداخل جذب ماتریکس لیپوزومی در ناحیه ای که کلینداماسین بیشترین جذب را دارد معلوم شود. بدین منظور نمونه لیپوزوم بدون کلینداماسین (placebo) ۵۰ برابر توسط متانول/سود (۱:۸ حجمی/حجمی) رقیق و اسپکتروم آن بررسی شد (۱).

حساسیت، حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ)

کمترین غلظتی از داروی مورد نظر که در یک ماتریکس معین قابل تشخیص بوده، اما غلظت آن به دقت قابل اندازه گیری نیست حد تشخیص روش نامیده می شود و کمترین غلظتی که با دقت و صحت می توان اندازه گیری کرد، حد تعیین مقدار روش است. برای تعیین این دو پارامتر از نسبت سیگنال به نویز استفاده شد. نسبت ۱ به ۳ برای LOD و ۱ به ۱۰ برای LOQ بکار برده شد (۱۱). مقدار سیگنال از شیب خط نمودار کایبراسیون و نویز از انحراف معیار بارها اندازه گیری های بلانک بدست آمد.

نتایج

مقدار خطی بودن (Linearity)

پس از بدست آمدن اسپکتروم (شکل ۱) نمونه های استاندارد کلینداماسین در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۱/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، نمودار کالیبراسیون بر اساس شدت جذب نمونه ها در بیشترین طول موج جذبی کلینداماسین،۲۰۱ نانومتر، رسم شده (نمودار ۱) و معادله شدت جذب و ضریب همبستگی آن به ترتیب $y= 0.91x + 0.38$ و ۰/۹۹۹ بدست آمد.

با استفاده از این معادله، غلظت معادل با جذب های بدست آمده از هر نمونه استاندارد را محاسبه کرده و مقدار RSD نیزحاصل شد (جدول ۱).

دقت (Precision)

نمونه استاندارد کلیندامایسین با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۶ بار اندازه گیری شدت جذب نمونه ها در یک روز مقدار انحراف معیار استاندارد ۳/۷۱ درصد و در چند روز ۳/۵۵ درصد بدست آمد (جدول ۲).

صحت (Accuracy)

با اندازه‌گیری غلظت‌هایی که ۸۰ و ۱۲۰ درصد غلظت هدف (۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بودند بر اساس معادله کالیبراسیون غلظت مربوط به هر جذب محاسبه و نسبت به غلظت اصلی سنجیده شد که به ترتیب ۸۰ و ۸۳ درصد بوده است (جدول ۳).

ویژه بودن(Specificity)

اسپکتروم های رقت ۵۰ از لیپوزوم بدون کلیندامایسین و نمونه لیپوزوم کلیندامایسین در شکل ۳ مشاهده می شود. با روی هم قرار دادن دو اسپکتروم نمونه لیپوزومی فاقد کلیندامایسین و نمونه لیپوزومی کلیندامایسین در غلظت ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر معلوم شد در ناحیه ۲۰۱ نانومتر تداخل جذبی مشاهده نمی‌شود (شکل۳).

حساسیت، حد تشخیص(LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ)

با استفاده از سه جذب بلانک (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و۰/۰۰۰۵) انحراف معیار یا SD را محاسبه و در فرمول جایگزین (δ) نموده و محدودیت تشخیص یا کمترین غلظت آشکار با شیب منحنی کالیبراسیون ۰/۹۱ محاسبه گردید.

$$\mathrm{LOD} \rightarrow 3/3 \times \frac{0/012}{0/91} = 0/043\ \mathrm{mg/ml}$$

با ۳ بار اندازه‌گیری جذب بلانک (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و۰/۰۰۰۵) و شیب منحنی کالیبراسیون ۰/۹۱ محاسبه و LOQ به دست آمد.

$$\mathrm{LOQ} \rightarrow 10 \times \frac{0/012}{0/91} = 0/131\ \mathrm{mg/ml}$$

مقدار LOD و LOQ به ترتیب ۰/۰۴۳ و ۰/۱۳۱ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد.

بحث

برای ارزیابی درصد انکپسولاسیون بعد از جداسازی داروی آزاد، باید از روش و تکنیکی استفاده کرد که بطور اختصاصی و در دامنه غلظتی مورد استفاده بتواند مقدار دارو را با دقت مناسب گزارش دهد. از این رو می‌بایست طبق پروتکل‌های بین‌المللی اندازه‌گیری غلظت دارو در محیط‌های مختلف چند ویژگی مورد آزمایش قرار گیرد که در اصطلاح به آن معتبرسازی (validation) گویند (۹) (۱۲).

در این مطالعه از ساده‌ترین تکنیک، اسپکتروفتومتری استفاده شد. در گام اول پس از اسکن‌های متوالی کلیندامایسین خالص در انواع حلال‌ها، محلول متانول/سود با نسبت ۸ به ۱ (حجمی/حجمی) بعنوان حلال و متانول بعنوان بلانک انتخاب و اسپکتروم آن با داشتن یک پیک در ۲۰۱ نانومتر، مناسب ادامه کار در نظر گرفته شد. برای پیدا کردن رابطه‌ای بین غلظت و شدت جذب، انواع غلظت‌های کلیندامایسین در محلول متانول/سود تهیه و شدت جذب آن‌ها در ۲۰۱ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمودار کالیبراسیون نشان‌دهنده رفتار خطی بین غلظت و شدت جذب با درجه رگرسیون ۰/۹۹۹ در دامنه غلظتی ۰/۲ تا ۱/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلیندامایسین بود. برای ارزیابی نزدیکی پاسخ ها به یکدیگر میزان RSD محاسبه شد که نشان داد در غلظت های بالاتر کاهش یافته یعنی پاسخ ها بهم نزدیکتر شده اند. جهت آنکه میزان تکرارپذیری پاسخ‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد چندین نمونه با غلظت ۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و در روزهای مختلف غلظت آن‌ها با کمک معادله کالیبراسیون اندازه‌گیری شد مقدار RSD بدست آمده کمتر از ۴درصد بوده که گویای تکرارپذیری خوب این روش است. برای ارزیابی ویژگی صحت به نمونه‌های لیپوزومی کلیندامایسین، مقادیری از نمونه‌های استاندارد کلیندامایسین اضافه شد که غلظت نهایی ۸۰ تا ۱۲۰ درصد غلظت هدف (۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود و با کمک معادله نمودار کالیبراسیون غلظت ها بازیابی شده و

جدول ۱ - محاسبه غلظت های استاندارد ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۱/۸ میلی گرم بر میلی لیتر.

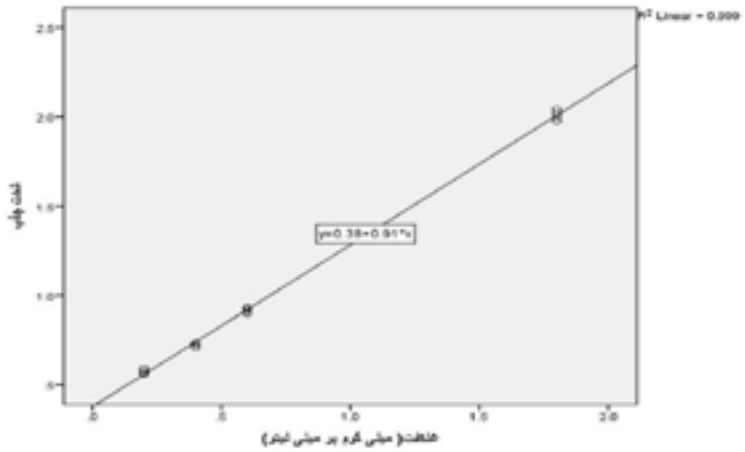
RSD[2]	غلظت های به دست آمده براساس معادله			معادله	شدت جذب			غلظت کلیندامایسین استاندارد (mg/ml)
٪۹.۹۶	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۱۴	$y = 0.91x + 0.38$ $R^2 = 0.999$	۰/۵۷	۰/۵۹	۰/۵۶	۰/۲
٪۳.۸۱	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۲۹		۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۷۱	۰/۴
٪۳.۰۸	۰/۴۸	۰/۵۱	۰/۵۰		۰/۹	۰/۹۳	۰/۹۲	۰/۶
٪۱.۸۹	۱/۶۲	۱/۵۹	۱/۵۶		۲/۰۴	۲/۰۱	۱/۹۸	۱/۸

جدول ۲ - تکرارپذیری نمونه‌های استاندارد کلیندامایسین با غلظت ۶/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روزهای مختلف.

RSD							
٪۳.۷۱	۰/۵۶	۰/۵۸	۰/۵۹	۰/۶۱	۰/۵۸	۰/۶۱	Intraday
٪۳.۵۵				۰/۵۸	۰/۶۱	۰/۵۷	Intraday

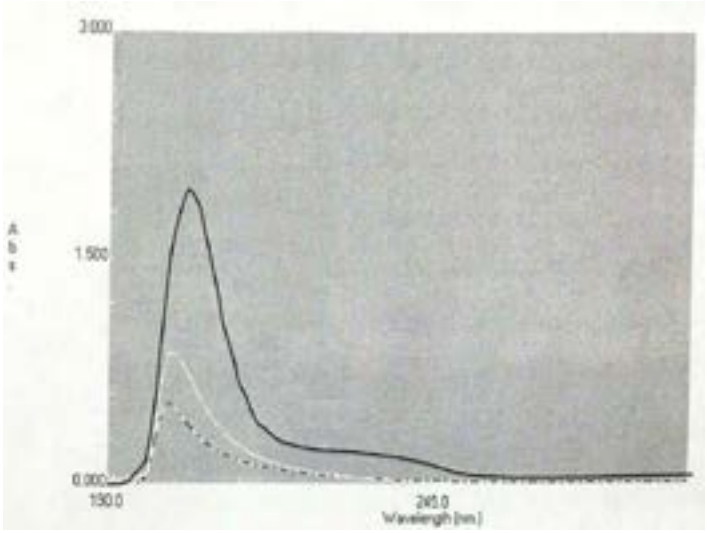
جدول ۳ - نتایج ارزیابی صحت روش بر اساس بازیافت (Recovery).

درصد بازیابی	غلظت محاسبه‌ای (mg/ml)			جذب			غلظت نهایی (mg/ml)	محلول استاندارد کلیندامایسن (mg/ml)	لیپوزوم حاوی دارو (mg/ml)
٪۸۰	۰/۳۷	۰/۳۹	۰/۴۰	۰/۷۹	۰/۸۱	۰/۸۲	۰/۴۸	۰/۳۶	۰/۶
٪۸۳	۰/۵۶	۰/۶۲	۰/۶۰	۰/۹۸	۱/۰۴	۱/۰۲	۰/۷۲	۰/۲۴	۰/۶

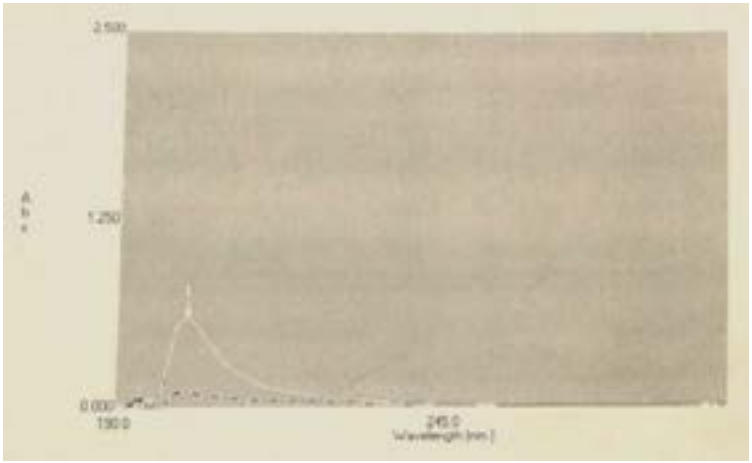


شکل۱:کالیبراسیون نمونه‌های استاندارد کلیندامایسین در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۱/۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر

[2] Relative Standard Deviation



شکل ۲ - اسپکتروم نمونه‌های استاندارد کلیندامایسین در غلظت‌های ۰/۲ (منحنی خط چین سیاه و سفید)، ۰/۶ (منحنی ممتد سفید) و ۱/۸ (منحنی ممتد سیاه) میلی گرم بر میلی‌لیتر.



شکل ۳ - اسپکتروم محلول لیپوزمی حاوی دارو با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر(منحنی سفید ممتد) و لیپوزوم بدون‌دارو ۵۰ برابر رقیق شده (منحنی خط‌چین سیاه و سفید).

نسبت به غلظت های اصلی مقایسه شدند که بالای ۸۰ درصد بوده است.

اما از آنجا که غلظت کلیندامایسین قرار بود در ماتریکس حاوی لیپوزوم اندازه‌گیری شود لازم بود جذب مولکول‌های شرکت‌کننده در ساختار لیپوزوم در طول موج ۲۰۱ نانومتر بررسی شود. رقیق سازی تا ۵۰ برابر نشان داد که جذب ماتریکس لیپوزومی در ۲۰۱ نانومتر حذف شده و تنها مولکول‌های کیلندامایسین جذب نشان می‌دهند. برای یافتن کمترین غلظتی که از طریق این روش قابل اندازه-گیری است و همچنین کمترین غلظتی که با کمک این تکنیک حضور کلیندامایسین در نمونه‌ها را نشان می‌دهد از فرمولی استفاده شد که در پروتکل‌های معتبرسازی ارائه شده بود و مقادیر ۰/۱۳۱ و ۰/۰۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب بدست آمد.

فارماکوپه برای اندازه‌گیری غلظت کلیندامایسین در فرم دارویی، روش HPLC را پیشنهاد می‌کند که روشی

دقیق اما گران قیمت است. ارائه روشی که بتوان آن را با تجهیزات متداول آزمایشگاه‌ها به انجام رساند می‌تواند بسیار کارآمد باشد. تحقیقات صورت گرفته برای اندازه‌گیری غلظت کلیندامایسین در فرم دارویی از طریق تکنیک اسپکتروفتومتر از سال ۱۹۹۳ با اندازه‌گیری شدت جذب محلولی که از اضافه کردن محلول یدات پتاسیم در محیط اسیدی و سیکلوهگزان به محلول استاندارد کلیندامایسین در دامنه غلظتی ۰/۱۲ تا ۰/۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر انجام شد آغاز گردید (۷).

در کار دیگری که برزگر و همکارانش در مجله DARU Journal of Pharmaceutical Sciences به ثبت رساندند از مشتق اول اسپکتروفتومتری کلیندامایسین محلول در متانول/سود (۵۰/۵۰) در طول موج‌های ۲۵۱ و ۲۳۹ استفاده کرده و کار معتبرسازی این روش را برای دامنه غلظتی ۰/۰۶ تا ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلیندامایسین به انجام رساندند قسمت قابل توجه این کار تحقیقاتی اندازه‌گیری همزمان کلیندامایسین و ترتینویین با روش ساده مشتق اسپکتروفتومتری بوده است (۸). Nataraj و همکارانش ادعا کردند که از طریق محلول سازی کلیندامایسین در فرم دارویی در بافر فسفات با pH ۶/۷۵ می‌توان در طول موج ۲۱۰ نانومتر، دامنه غلظتی ۰/۰۰۵ تا ۰/۰۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این دارو را اندازه گیری کرد (۱۳). Dedić و همکارانش در سال ۲۰۱۸ مقاله ای را به چاپ رسانده اند که برای اندازه‌گیری کلیندامایسین فرم دارویی در طول موج ۲۱۰ نانومتر و در دامنه غلظتی ۰/۰۵ تا ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر همانند کار تحقیقاتی ناتاراج و همکارانش از بافر فسفات بعنوان حلال استفاده کرده با این تفاوت که pH آن ۶/۲ بوده است (۱۴).

همه تحقیقات معتبرسازی به ثبت رسیده برای اندازه گیری غلظت کلیندامایسین در فرم دارویی بوده است اما در تحقیق حاضر سهم و حضور مولکول‌های سازنده لیپوزوم در فرمولاسیون کلیندامایسین زیاد بوده و با توجه به اینکه لاندا ماکزیمم در طول موج پایینی بوده است حذف جذب‌های مولکول‌های حاضر در ماتریکس لیپوزومی و همچنین پیدا کردن روش مناسبی که بتوان ساختار لیپوزوم را حل کرده و در کنار آن بر روی رفتار جذبی کلیندامایسین اثرگذار نباشد سخت بوده است بنابراین نکته مهم این روش نه فقط در سادگی بلکه در چگونگی رقیق سازی‌ها می‌باشد که قادر به ارائه روشی بر طبق پروتکل معتبرسازی برای اندازه گیری غلظت کلیندامایسین در حضور ماتریکس لیپوزومی بوده است.

تقدیر و تشکر

از کارشناسان آزمایشگاه های دانشگاه آزاد ورامین، خانم حسینی و آقای خزایی، که در انجام این پروژه همکاری داشته اند قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

۱. ابوالحسنی, ا. (۱۳۹۶). "بررسی بررسی مقایسه ای تشکیل بیوفیلم در سویه های گاردنرلا واژینالیس جدا شده از ترشحات واژینال در زنان مبتلا به واژینوز و غیرواژینوز باکتریایی." پایان نامه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا

2. Leclercq, R., 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clinical Infectious Diseases 34(4): 482-492.
3. Ghaffari, Azadeh, Ali Manafi, and Hamid Reza Moghimi .2015. "Clindamycin phosphate absorption from nanoliposomal formulations through third-degree burn eschar." World journal of plastic surgery. 4(2): 145-152
4. Ryan, M.D., Kenneth, J. 1999. Kistner's gynecology and women's health. Mosby; 7 edition.
5. Rao. V. S., Gholam, A., Khoobehi, A., Vangipuram, S., 1989. "Evaluation of liposome-encapsulated clindamycin in Staphylococcus aureaus endophthalmitis." International ophthalmology. 13(3): 181-185.
6. Škalko, Nataša, Mira Čajkovac, and Ivan Jalšenjak. 1992. "Liposomes with clindamycin hydrochloride in the therapy of acne vulgaris." International journal of pharmaceutics. 85(1-3): 97-101
7. El-Yazbi, F. A., Blaih, S.M. 1993. "Spectrophotometric and titrimetric determination of clindamycin hydrochloride in pharmaceutical preparations." Analyst 118(5): 577-579.
8. Tehrani, M., Barazandeh, M., Namadchian, M., Fadaye Vatan, S., Souri, E. 2013. "Derivative

ectrophotometric method for simultaneous
:termination of clindamycin phosphate and
:tinoin in pharmaceutical dosage
rms." DARU Journal of Pharmaceutical
:iences. 21(1): 29-41
ngh, J. 2015. "International conference on
ırmonization of technical requirements for
gistration of pharmaceuticals for human
e." Journal of pharmacology &
ıarmacotherapeutics. 6(3): 185-195
ssociation of Official Analytical Chemists
ternational, 1990. Official Methods of
nalytical Chemists of AOAC International.
(XVII).
andhimathi, R., Vijayaraj, S., Jyothirmaie, M.,
)12. Method development and validation of uv
ectroscopic method for estimation of
enapine maleate in bulk and tablet
rmulation. Int. J. Med. 15: 85-92.

12. Helrich, K., 1990. Official methods of analysis of the AOAC International, Arlington, US: Association of Official Analytical Chemists.

13. Nataraj, K. S., Raju, G. N. V., Anusha, B. Narasimha, S. 2013. "UV spectrophotometric method development for estimation of clindamycin phosphate in bulk and dosage form." Int. J. Pharm. Biol. Sci. 3(4): 164-167.

14. Dedić, M., Bečić, E., Imamović, B., Žiga, N. 2018. "Determination of clindamycin hydrochloride content in 1% clindamycin lotion. Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina.50: 49-54