

***In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskih preparata za primenu na kožu**

**Gordana Vuleta, Anđelka Kovačević*,
Snežana Savić, Jela Milić**

Institut za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju,
Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450, Beograd

Kratak sadržaj

Metode za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih preparata za primenu na kožu (podloge/nosača) predstavljaju jednu od nekoliko standardnih metoda koje se mogu koristiti za karakterizaciju kremova, gela i masti i dobijanje podataka važnih za formulaciju i razvoj ovih farmaceutskih oblika. Studije oslobađanja našle su svoje mesto u regulatornim scale-up testovima (eng. *scale-up* - proporcionalno povećanje šarže sa laboratorijskog na industrijski nivo proizvodnje), kao i u ispitivanjima kojima se proverava da li je došlo do promena u kvalitetu ove vrste preparata nakon izmena u procesu proizvodnje. Međutim, *in vitro* test brzine oslobađanja, nije zamena za *in vivo* procenu biološke raspoloživosti i bioekvivalentnosti ove grupe lekova.

Najnovije farmakopeje (USP 30, Ph.Eur.5.0) ne propisuju metodu za ova ispitivanja, ali Američka uprava za hranu i lekove (eng. *Food and drug administration – FDA*) je predložila da se praćenje brzine oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata za primenu na koži izvodi korišćenjem vertikalne difuzione ćelije, poznate kao Franz-ova ćelija. Franz-ova difuziona ćelija se smatra najpovoljnijom aparaturom i za praćenje promena u brzini oslobađanja, koje mogu nastati nakon stavljanja u promet farmaceutskih oblika za primenu na koži. Ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz preparata za kožu predstavlja test za biofarmaceutsku karakterizaciju farmaceutskih oblika polučvrste konzistencije i koristan postupak kojim se potvrđuje kvalitet različitih serija istog farmaceutskog oblika leka unutar definisanog seta kriterijuma.

U radu su prikazani primeri rezultata *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja diklofenak-dietilamina (DDEA), tretinoina, uree, tokoferilacetata, lidokain-hidrohlorida i apigenina, iz različitih nosača/podloga korišćenjem Franz-ove ili Enhancer ćelije.

Ključne reči: dermofarmaceutski preparati, metode za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja, Franz-ova difuzionna ćelija, Enhancer ćelija, diklofenak-dietilamin, urea, tretinoin, tokoferilacetat, lidokain-hidrohlrid, apigenin

*Autor za korespondenciju: Andjelka Kovačević, e- mail:andjelkak@pharmacy.bg.ac.yu

Uvod

Primena lekovitih supstanci na kožu, aplikacijom različitih farmaceutskih oblika, najčešće tečne ili polučvrste konzistencije, sprovodi se u cilju lokalne terapije bolesti kože (lokalna isporuka), ali i radi sistemske terapije (transdermalna isporuka lekovitih supstanci) [1].

Kod lekova za lokalnu terapiju, oslobađanje aktivne supstance iz nosača/podloge je prvi veoma značajan korak u postizanju lokalnog efekta. Mala brzina oslobađanja lekovite supstance, posle lokalne primene, uobičajeno, dovodi do niske biološke raspoloživosti/raspoloživosti u koži. Poznato je da promene karakteristika podloge ili termodinamičkog potencijala/aktivnosti aktivne supstance imaju za posledicu i promene u brzini oslobađanja iz izabranog nosača [2].

In vitro ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih preparata ukazuje na kombinovane efekte nekoliko fizičkih parametara, kao što su: rastvorljivost, veličina čestica i/ili kristalni oblik aktivne supstance, reološke karakteristike farmaceutskog preparata. Liberacioni profil lekovite supstance zavisi od termodinamičke aktivnosti same supstance. Termodinamička aktivnost supstance je suštinska odrednica za liberacioni profil i u sebi nosi rastvorljivost, particioni koeficijent, polimorfnost lekovite supstance, interakciju sa podlogom (gde se povratno ocrtava uticaj podloge) i druge činioce [3].

Testovi oslobađanja su jedna od nekoliko standardnih metoda koje se koriste za karakterizaciju polučvrstih farmaceutskih oblika (kremovi, geli i masti) i dobijanje važnih informacija pri formulaciji i razvoju ovih preparata (posebno pri izboru podloge). Ova ispitivanja se izvode primenom sistema difuzionih ćelija, od kojih se najviše preporučuje Franz-ova ćelija [2].

Takođe, studije oslobađanja su našle svoje mesto u regulatornim *scale-up* testovima, kao i u testovima kojima se proverava da li je došlo do promena u

karakteristikama polučvrstih preparata za primenu na kožu, nakon njihovog stavljanja u promet (eng. *postapproval changes*) [2]. Smatra se da se uobičajeni *in vitro* test oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata za primenu na kožu, **ne može koristiti kao zamena za *in vivo*** procenu biološke raspoloživosti i bioekvivalentnosti ove grupe preparata [3]. Ovakav stav je posledica činjenice da su postojeći testovi predloženi bez dovoljno uvida u *in vivo* uslove.

Testovi za *in vitro* ispitivanje oslobađanja aktivne supstance iz određenih farmaceutskih oblika

U farmaceutskoj industriji testovi brzine rastvaranja/oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskog oblika (eng. *dissolution tests*) su veoma važno „oruđe” u razvoju novog leka i u kontroli kvaliteta lekova. Mada su inicijalno razvijeni za čvrste farmaceutske oblike za peroralnu primenu sa trenutnim oslobađanjem, a zatim je primena preneti i na preparate sa kontrolisanim/modifikovanim oslobađanjem, poslednjih godina *in vitro* testovi oslobađanja se koriste i za ispitivanje „novijih” ili „specijalnih” farmaceutskih oblika, kao što su: tablete za žvakanje, transdermalni flasteri, polučvrsti preparati za lokalnu primenu, supozitorije, implantati, preparati sa mikročesticama za parenteralnu (injekcionu) primenu, suspenzije i liposomski preparati [4].

Za čvrste farmaceutske oblike za peroralnu primenu sa trenutnim oslobađanjem, *dissolution test* se opisuje kao test rastvaranja, budući da je cilj da se lekovita supstanca brzo rastvori u medijumu za ispitivanje. **Za polučvrste preparate za lokalnu primenu, transdermalne sisteme, supozitorije ispitivanje se pre svega opisuje kao „test oslobađanja lekovite supstance” ili kao „test *in vitro* oslobađanja”** [4].

Zbog razlika u formulaciji lekova, koje se ogledaju u veoma različitim fizičko-hemijskim osobinama aktivnih i pomoćnih supstanci koje čine farmaceutski preparat i različitih mehanizama oslobađanja, nije moguće predložiti jedinstven test koji će se primeniti na sve farmaceutske oblike i na svaki pojedinačno. Tačnije, aparature, postupci i tehnike se razlikuju od ispitivanja do ispitivanja, tako da metoda mora biti prilagođena određenoj grupi farmaceutskih oblika lekova ili čak pojedinačnom preparatu koji se ispituje. Ipak, opšti principi *dissolution test*-a ustanovljeni kod čvrstih farmaceutskih oblika za peroralnu primenu, moraju se poštovati i kod testova za *in vitro* oslobađanje iz „novijih” farmaceutskih oblika. Ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz preparata za kožu predstavlja **test za biofarmaceutsku karakterizaciju farmaceutskih oblika polučvrste konzistencije** i koristan

postupak kojim se potvrđuje kvalitet preparata (različite serije istog farmaceutskog oblika leka) unutar definisanog seta kriterijuma [4]. Ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskog oblika leka omogućava procenu farmaceutskih oblika u fazi razvoja, kontrole kvaliteta i prilikom ispitivanja stabilnosti odgovarajućeg preparata.

U **Tabeli I** (prema referenci 4) dat je pregled različitih uređaja (aparatura) za praćenje oslobađanja lekovite supstance iz čvrstih, tečnih, polučvrstih i „novijih” farmaceutskih oblika.

Tabela I Aparature koje se koriste za praćenje oslobađanja lekovite supstance iz „novijih/specijalnih” farmaceutskih oblika [4]

Table I Apparatus which used for dissolution test from novel/special dosage forms [4]

Vrsta farmaceutskog oblika	Metoda oslobađanja
Čvrsti peroralni farmaceutski oblici	Aparatura sa korpicom, lopaticom, rotirajućim cilindrom ili protočnom ćelijom
Peroralne suspenzije	Aparatura sa lopaticom
Tablete koje se raspadaju u ustima	Aparatura sa lopaticom
Tablete za žvakanje	Aparatura sa korpicom, lopaticom ili rotirajućim cilindrom sa staklenim kuglicama
Transdermalni flasteri	Aparatura sa lopaticom iznad diska
Polučvrsti preparati za lokalnu primenu	Franz-ova difuziona ćelija
Supozitorije	Aparatura sa lopaticom, modifikovanom korpicom ili zatvorenom dvostrukom protočnom ćelijom
Praškovi i granule	Aparatura sa protočnom ćelijom (ćelija sa uzorkom za prašak/granule)
Preparati sa mikročesticama	Modifikovana protočna ćelija
Implantati	Modifikovana protočna ćelija

Oslobađanje aktivne supstance iz transdermalnih flastera

Metoda izbora za ispitivanje karakteristika *in vitro* oslobađanja aktivne supstance iz transdermalnih flastera jeste aparatura sa lopaticom iznad diska, uz dodatak diska od nerđajućeg čelika. Uslovi u medijumu treba da su u granicama fizioloških uslova kože: pH vrednost od 5-6, a temperatura od 32 °C, što odgovara temperaturi na površini kože [4].

U Jugoslovenskoj farmakopeji iz 2000 godine – poglavlje 2.9.4 (*Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz transdermalnih flastera*) navodi se da ispitivanje treba izvoditi u sledećim aparaturama: aparatura sa lopaticom iznad diska, aparatura sa lopaticom iznad ćelije i aparatura sa rotirajućim cilindrom. Temperatura medijuma se održava na 32 °C ± 0.5 °C [5].

Ph.Eur.5.0. u poglavlju 2.9.4 (eng. *Dissolution test for transdermal patches*) navodi da se brzina rastvaranja lekovite supstance prati u: aparaturi sa lopaticom, uz dodatak diska od nerđajućeg čelika u obliku mreže sa odgovarajućim otvorom (eng. *disk assembly method*); aparaturi sa lopaticom iznad ćelije za ekstrakciju (eng. *cell method*) i aparaturi sa rotirajućim cilindrom (eng. *rotating cylinder method*), gde se umesto lopatice koristi cilindar od nerđajućeg čelika, koji služi i kao elemenat za mešanje. Temperatura medijuma se održava na 32 °C ± 0.5 °C [6].

Oslobađanje aktivne supstance iz polučvrstih preparata za spoljašnju primenu

Detaljan opis aparature, postupaka i opreme za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih preparata za kožu, veoma retko može da se nađe u farmakopejama. Metode za praćenje brzine oslobađanja aktivne supstance iz dermofarmaceutskih preparata nisu propisane ni u najnovijim farmakopejama, kao što su USP 30 ili peto izdanje Evropske farmakopeje i njeni dodaci (5.0 – 5.8) [4].

Prema preporukama FIP/AAPS [4] za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih preparata za spoljašnju primenu (tabela 1) preporučuje se Franz-ova difuziona ćelija. U radovima koji obrađuju problematiku kinetike oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih farmaceutskih oblika za kožu, eksperimenti su rađeni na Franz-ovoj ćeliji, a ređe upotrebom Enhancer ćelije, dok se prema najnovijim literaturnim podacima *in vitro* test brzine oslobađanja može izvoditi i na aparaturi sa protočnom ćelijom (USP aparatura 4), pri čemu je ćelija specijalno razvijena za dermofarmaceutske preparate [4, 7].

Prema preporukama proizvođača (VanKel Technology Group, SAD) Enhancer ćelija je predviđena za ispitivanje brzine oslobađanja lekovitih

supstanci iz masti, kremova, gela i suspenzija. Enhancer ćelija je u potpunosti izrađena od fluorougļjovodoničnih polimera, što je čini otpornom i inertnom za veliki broj test supstanci i vehikuluma [8,9]. U katalogu proizvođača nalazi se podatak da se ova ćelija može koristiti sa aparaturom II koja je oficinalna po američkoj farmakopeji (aparatura sa lopaticom, eng. *Paddle method*) i to sa sudovima za *dissolution* od 100 – 1000 mL, jer se sama zapremina ćelije može podešavati [10].

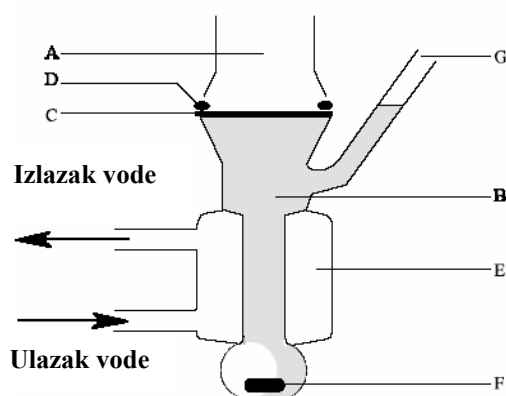
FDA je predložila da se praćenje brzine oslobađanja izvodi uz primenu vertikalne difuzione ćelije (Franz-ova ćelija) i dala zahteve za brzinu oslobađanja aktivne supstance. Franz-ova difuziona ćelija se smatra najpogodnijom aparaturom i za praćenje promena koje nastaju nakon stavljanja u promet polučvrstih farmaceutskih oblika za primenu na kožu [4].

Na slici 1, dat je shematski prikaz Franz-ove difuzione ćelije, na osnovu koga se vidi da se ćelija sastoji od donorskog (A) i akceptorskog dela (B), između kojih se stavlja membrana (C), a prsten O (D) se koristi za pozicioniranje membrane. Akceptorski deo, određene zapremine, puni se akceptorskim medijumom, koji treba da obezbedi „difuzione *sink* uslove” [4]. Temperatura od 32 °C (za polučvrste preparate za primenu na kožu) se održava proticanjem vode kroz spoljašnje vodeno kupatilo (E). Izuzetak su preparati koji se aplikuju na određene membrane (vaginalna sluzokoža) kada je preporučena temperatura medijuma 37 °C [11]. Priprema uzorka za ispitivanje izvodi se tako da se prvo postigne uravnoteženost membrane sa akceptorskom fazom (ispitivani preparat se nanese uniformno na membranu pomoću pipete, bez zaostajanja vazduha i ostavi da stoji 30 minuta). Donor i deo sa ispitivanim uzorkom se zatim prekriju membranom (parafilmom), da bi se sprečila evaporacija rastvarača i promene u strukturi preparata. Akceptorski medijum se kontinuirano meša magnetnom mešalicom (magnetom) (F). Uzorkovanje, koje može biti i automatsko, vrši se kroz otvor za uzimanje uzorka (G) u tačno definisanim vremenskim intervalima [4]. **Vreme uzorkovanja i ukupno vreme trajanja eksperimenta moraju biti određeni i standardizovani u preliminarnim ispitivanjima [12].**

Uobičajeno trajanja testa u laboratorijskim uslovima je **šest sati** (u FDA laboratorijama), a **ukupan broj ćelija je šest** [12].

Dužina trajanja eksperimenta može da se razlikuje od uobičajenog perioda koji navodi FDA, zavisno od osobina sistema koji se ispituje, receptora i membrane [12]. Za eksperiment koji traje 6 sati, preporučuje se najmanje pet uzorkovanja, posle 30 minuta, a zatim posle 1, 2, 4 i 6 sati. Količina (volumen) uzorka koji se uzme za analizu svaki put se nadoknadi istom količinom zagrejanog akceptorskog medijuma, tako da donja površina membrane ostane u

kontakta sa medijumom tokom čitavog eksperimenta [3]. Lekovita supstanca mora da bude stabilna u medijumu za ispitivanje [12]. Za analizu uzoraka treba koristiti odgovarajući validiran specifičan i osetljiv analitički postupak. Sadržaj aktivne supstance može se određivati visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom (HPLC) ili drugom analitičkom metodom. Mehanizam oslobađanja aktivne supstance iz test formulacija se analizira primenom različitih modela za praćenje oslobađanja (pr. Higuchi model, kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, Hixon-Crowell's model, jednačina kubnog korena). Na osnovu pomenutih modela se može proceniti tip kinetike, odnosno profil oslobađanja, izračunati vrednost difuzionog koeficijenta, i na taj način se može odrediti set kritičnih parametara od kojih najviše zavisi oslobađanje [11]. Za *in vitro* procenu brzine oslobađanja lekovite supstance iz dermofarmaceutskih preparata, najviše se koristi parametar brzina oslobađanja ili u nešto manjem obimu fluks.



Slika 1. Statička Franz-ova difuziona ćelija (A) donorska faza; (B) akceptorska faza; (C) membrana; (D) O-prsten; (E) vodeno kupatilo; (F) magnet; (G) mesto za uzorkovanje [3]

Figure 1. Static Franz diffusion cell (A) donor compartment; (B) receptor compartment; (C) membrane; (D) O-ring; (E) water bath; (F) magnetic stirrer; (G) sampling place [3]

Brzina oslobađanja se određuje na osnovu nagiba krive koja pokazuje zavisnost količine lekovite supstance koja se oslobodi po jedinici površine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) u funkciji kvadratnog korena vremena, u toku koga je praćeno oslobađanje aktivne supstance [3]. **Fluks** (kumulativna količina oslobođene aktivne supstance u jedinici vremena) se određuje kao nagib linearnog dela krive, koja daje zavisnost kumulativne količine oslobođenog leka po jedinici površine od vremena, u toku koga je praćeno oslobađanje [13].

Prema empirijskom pravilu za dermofarmaceutske preparate, prihvatljiva količina oslobođene lekovite supstance na kraju eksperimenta ne mora da bude veća od 30 % ukupne primenjene doze [14].

pH vrednost medijuma za ispitivanje je od velikog značaja i njegov izbor treba vršiti prema pH ispitivanog preparata, pH vrednosti od koje zavisi rastvorljivost aktivne supstance i pH membrane koja se koristi za praćenje ispitivanja brzine oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih farmaceutskih oblika [11].

Za proučavanje oslobađanja i permeacije lekovitih supstanci iz preparata za primenu na kožu najčešće se koriste membranski modeli. U FDA laboratorijama se prednost daje **polisulfonskim membranama (Supor[®])** zbog inertnosti i niske difuzione rezistencije [10]. Druge membrane takođe se mogu uspešno koristiti, kao što su: **Cellulosic Acetate Plus[®]** (izrađene od celuloznog acetata) ili membrane od **najlona, teflona**, celuloznog acetat/nitrata, politetrafluoroetilena ili polikarbonata [12].

Ispitivanje permeacije i/ili perkutane resorpcije supstanci je važno u dermatologiji i kozmetologiji, jer se jedino na taj način može utvrditi pravo mesto delovanja lekovite tj. kozmetički „aktivne” supstance [15,16]. Za procenu permeacije i/ili perkutane resorpcije postoji veliki broj *in vivo* i *in vitro* metoda. Najmerodavniji rezultati se dobijaju izvođenjem *in vivo* eksperimenata na ljudima. Obzirom da je veliki broj supstanci potencijalno toksičan ili nije pogodan za testiranje na ljudima, penetracija/perkutana resorpcija se najčešće ispituju *in vitro* tehnikama na difuzionim ćelijama i to uglavnom na Franz-ovoj difuzionoj ćeliji koja se preporučuje i za praćenje brzine oslobađanja aktivnih supstanci iz dermofarmaceutskih preparata [17,18]. Za procenu penetraciono/permeacionog profila lekovite supstance iz različitih farmaceutskih oblika nakon primene na kožu, najčešće se koriste sistemi sa jednoslojnim membranama, pri čemu se permeabilnost kože procenjuje na osnovu kinetičkih parametara, kao što su fluks i penetracioni koeficijent, a u slučaju prolaska lekovite supstance u dublje slojeve kože i permeacioni koeficijent [13].

Kao potencijalni modeli kože za procenu perkutane penetracije i/ili resorpcije lekovitih supstanci iz polučvrstih preparata za primenu na kožu, ispitivane su različite jednoslojne ili višeslojne veštačke membrane kao što su membrane od polidimetilsiloksana (PDMS), lipidne membrane, polietilenski filmovi, koloidne membrane, polikaprolaktamske, celulozne membrane i druge [19]. Međutim, mnogo češće se za ova ispitivanja koriste isecci humane ili životinjske kože, ili se rade *in vivo* eksperimenti na životinjama [16,18].

Upotreba **humane kože** je od koristi u testiranju veoma lipofilnih lekova. Isečak humane kože može da se koristi i u ispitivanju perkutane penetracije jedinjenja, koja se uglavnom metabolišu u koži. Međutim, isečak humane kože

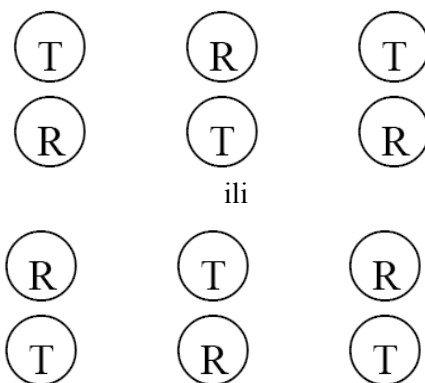
je poželjno koristiti odmah nakon pripreme da bi se održala vijabilnost i enzimski aktivnost tkiva, što predstavlja limitirajući faktor za širu upotrebu [20]. Primena ljudske kože kao modela za *in vitro* ispitivanje je ograničena i zbog toga što se ne mogu nabaviti velike količine ljudske kože [13].

Ispitivanja na životinjama su se pokazala veoma značajnim za predviđanje aktivnosti aktivnih supstanci kod čoveka. Kada su u pitanju životinjski modeli, opšti zaključak je da su koža svinje, zamorca ili majmuna verovatno modeli izbora, ali su oni dosta skupi i komplikovani za rad i održavanje [13].

Koža dobijena kulturom tkiva – **veštačka koža** (eng. *reconstructed, artificial skin, skin construct*) je alternativa za standardizovanje testa percutane penetracije i prevazilaženje interindividualnih varijacija. Upotrebom humanih keratinocita i fibroblasta moguća je kultivacija veštačke humane kože, koja ima permeabilne karakteristike komparativne sa humanim *stratum corneum*-om. Upotreba veštačke kože je pogodna za ispitivanje permeabilnosti lekova koji se metabolišu u živom epidermisu [20].

***In vitro* studije poređenja brzine oslobađanja aktivne supstance iz ispitivanog i referentnog preparata**

Ukoliko se izvodi uporedni test ispitivanja brzine oslobađanja aktivne supstance iz test i referentnog preparata, za svaku aparaturu treba obezbediti da ispitivani i referentni preparati budu naizmenično raspoređeni, kao što se vidi na slici 2 [3].



Slika 2. Shematski prikaz rasporeda uzoraka preparata u studiji poređenja (T predstavlja ispitivani, a R referentni preparat) [3]

Figure 2. Schematic representation of the arrangements samples in comparison study (T represents the test product and R represent the reference product) [3]

Raspored ispitivanog i referentnog preparata može se odrediti sistematski ili slučajno (randomizirano). Za slučaj *nestandardne aparature* (koja nema šest ćelija) trebalo bi koristiti isti princip uključivanja ispitivanog i referentnog preparata [3].

Prikaz rezultata *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja nekih lekovitih supstanci iz polučvrstih farmaceutskih oblika za kožu

***In vitro* ispitivanje oslobađanja tretinoina iz krema**

Thakker i Chern [12] su proučavali *in vitro* oslobađanje (eng. *in vitro release test, IVRT*) tretinoina iz različitih novijih formulacija kremova, uz primenu Franz-ove difuzione ćelije. Cilj istraživanja je bio da se ispita uticaj različitih promenljivih na brzinu oslobađanja tretinoina iz kremova [12].

U prvom koraku se pratilo oslobađanje tretinoina iz tri formulacije Retin-A[®] krema koje su imale različite koncentracije tretinoina (0.025 %, 0.05 % i 0.1 % (m/m)). Posle prvog sata ispitivanja, uočeno je da postoji veza između srednje kumulativne količine oslobođene supstance i kvadratnog korena vremena. Brzina oslobađanja i ukupna količina oslobođene aktivne supstance u fosfatnom puferu (65:35 v/v) čiji je pH = 5.5, bile su proporcionalne koncentraciji tretinoina u preparatu, odnosno najveći procenat se oslobađa iz Retin-A[®] krema sa 0.1% (m/m), a najmanji iz Retin-A[®] krema sa 0.025 % (m/m) ove lekovite supstance [12].

U ispitivanjima uticaja pojačivača (eng. *enhancer*) penetracije na brzinu oslobađanja tretinoina iz dve formulacije, koje su se razlikovale samo u prisustvu, odnosno odsustvu pojačivača penetracije, uočeno je da se u oba krema veća količina supstance oslobađa u prisustvu, nego u odsustvu modifikatora penetracije. Međutim, ova razlika je manje izražena kod krema koji je imao niži viskozitet. Autori su potvrdili poznate stvari, da je viskozitet jedan od ključnih parametara koji određuje karakteristike polučvrstih preparata i ima veliki uticaj i na brzinu oslobađanja. Utvrđeno je da je procenat oslobođenog tretinoina obrnuto proporcionalan količini sredstva za povećanje viskoziteta, koja je uključena u formulaciju ispitivanog krema [12].

***In vitro* oslobađanje diklofenak-dietilamina iz višestrukih emulzija**

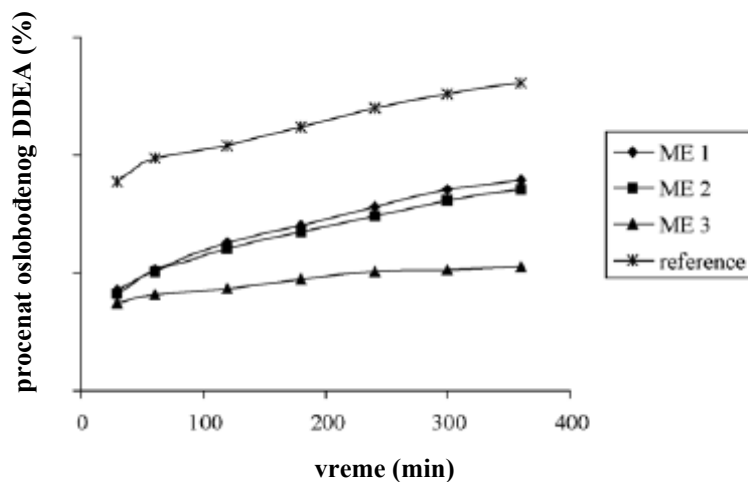
Uparedno ispitivanje oslobađanja diklofenak-dietilamin (DDEA) iz uzoraka višestrukih (multiplih) V/U/V emulzija (sa visokim sadržajem unutrašnje faze ($\Phi_1 = \Phi_2 = 0.8$), relativno niskim koncentracijama (0.8, 1.6 i 2.4 % (m/m)) lipofilnog, primarnog, polimernog emulgatora (PEG 30-

dipolihidroksistearat, PDHS) i nepromenjenom koncentracijom (0.8 % (m/m)) poloksamera kao sekundarnog emulgatora (Poloxamer 407, Lutrol®) i iz komercijalnog preparata - Voltaren® Emulgel® (Novartis Pharma AG, Švajcarska) izvedeno je primenom Ehnancer ćelija (VanKel Industries Inc., Edison, SAD) sa membranom od regenerisane celuloze (Cuprophan®, Akzo, Wuppertal, Nemačka). Profili *in vitro* oslobađanja praćeni su preko difuzionog koeficijenta i fluksa oslobođene lekovite supstance [21].

Rezultati ispitivanja su pokazali da se kod svih ispitivanih uzoraka V/U/V emulzija sa DDEA radi o oslobađanju leka koje je u skladu sa Higuchi – jevim difuzionim modelom [21].

Poznato je da su dva glavna mehanizma oslobađanja iz multiplih V/U/V emulzija difuzija i „rušenje” emulzije / ruptura membrane emulzija [22,23]. Oslobađanje koje se zasniva na difuziji zavisi od polarnosti i molekulske mase lekovite supstance, tipa/koncentracije upotrebljenog surfaktanta, dok „rušenje” emulzija i time uslovljeno oslobađanje aktivne supstance, zavisi od fizičke stabilnosti emulzionih nosača [21]. Kod ispitivanih multiplih V/U/V emulzija uočen je dominantno difuzioni mehanizam oslobađanja aktivne supstance, pri čemu je produženo oslobađanje, odnosno najniži difuzioni koeficijent zapažen kod formulacije sa najvećim procentom – 2.4 % (m/m) lipofilnog emulgatora (ME3). Difuzioni koeficijent je bio veći kod uzoraka sa 0.8 i 1.6 % (m/m) primarnog emulgatora (ME1 i ME2) u odnosu na uzorak ME3, dok je najveći difuzioni koeficijent, tj. brzina oslobađanja zabeležena kod uzorka Voltaren® Emulgel® (slika 3) [21].

Na osnovu literaturnih podataka proizilazi stav da je lekovita supstanca kod multiplih emulzija dostupna za delovanje na kožu posle dvostepene raspodele. Najpre, dolazi do raspodele između unutrašnje vodene i srednje uljane faze, a potom sledi raspodela između srednje uljane i spoljašnje vodene faze. Kod ispitivanih uzoraka multiplih emulzija, bilo je potrebno određeno vreme (eng. *lag time*) da bi supstanca prošla kompleksnu barijeru i počela da se oslobađa, zbog čega je najsporije oslobađanje zabeleženo kod višestruke emulzije koja je imala najveći procenat primarnog emulgatora [21].



Slika 3. Profili oslobađanja DDEA iz ME1-ME3 i referentnog preparata (ME-multiple emulzije) [21]

Figure 3. DDEA release profiles for ME1-ME3 and reference (ME-multiple emulsions) [21]

Vasiljević i saradnici [21] su takođe utvrdili da viskozitet uzoraka multiplih emulzija može uticati na brzinu oslobađanja, pošto su dobili usporenu difuziju lekovite supstance iz uzorka ME3 koji je imao najveći viskozitet. Hemijska struktura DDEA, kao amfifilne supstance, omogućuje da on može da se ponaša i kao kosurfaktant i povećava rigidnost međufaznog filma, pa na taj način dalje može da uspori sopstveno oslobađanje. Ova interakcija je verovatno više izražena kada su koncentracije lipofilnog emulgatora veće, obzirom da su profili oslobađanja u slučaju uzoraka sa nižim procentom PDHS (0.8 % i 1.6 % (m/m)) gotovo identični. Rezultati ukazuju da je promenom koncentracije PDHS moguće modifikovati oslobađanje DDEA iz višestrukih V/U/V emulzija [21].

***In vitro* oslobađanje diklofenak-dietilamina iz mikroemulzija**

Lekovite supstance inkorporirane u mikroemulzije nosače raspodeljuju se u unutrašnjoj strukturi ovih sistema i mogu uticati na nju, posebno ako aktivna supstanca ima amfifilne i/ili mezogene osobine, i takve interakcije u velikoj meri mogu modifikovati oslobađanje lekovite supstance [24,25].

U radu Đorđević i saradnika [26] ispitivan je uticaj parametara formulacije i strukture vehikuluma na brzinu oslobađanja amfifilne lekovite supstance, diklofenak-dietilamina (DDEA) iz mikroemulzionih nosača, koji

sadrže PEG - 8 kaprilokaprinske gliceride (surfaktant), poligliceril – 6 dioleat (kosurfaktant), izopropilmiristat i vodu. Test oslobađanja izveden je na Ehnancer ćeliji (VanKel Industries Inc., Edison, SAD) sa membranom od regenerisane celuloze (Cuprophan®, Akzo, Wuppertal, Nemačka). Ispitivanje je izvedeno sa pet uzoraka mikroemulzionih nosača: V/U, U/V mikroemulzije i tri formulacije označene kao uravnotežene mikroemulzije. Kod V/U i U/V formulacija, koje su imale nizak procenat disperzne faze, uočena je linearna difuzija DDEA. Vrednosti fluksa se povećavaju od V/U do U/V sistema, kako raste sadržaj vodene faze. Kod bikontinuiranih formulacija (tzv. uravnotežene mikroemulzije) uočen je nelinearan profil oslobađanja lekovite supstance, koji se pripisuje kompleksnoj distribuciji DDEA između vodene, uljane i amfifilne faze. Kompleksna distribucija je rezultat interakcije lekovite supstance i vehikuluma. Dobijene vrednosti fluksa ukazuju da uravnotežene mikroemulzije mogu poslužiti kao vehikulumi za kontrolisano oslobađanje amfifilne lekovite supstance, kao što je DDEA [26].

***In vitro* procena brzine oslobađanja diklofenak-dietilamina iz emulzionih nosača na bazi prirodnih (šećernih) emulgatora**

Šećerni emulgatori, kao grupa prirodnih U/V emulgatora poslednjih godina su u istraživačkom fokusu, zbog toga što grade lamelarnu mezofazu oko kapljica ulja i lamelarnu tečno kristalnu/gel strukturu u kontinuiranoj fazi i kao takvi doprinose kompleksnoj stabilizaciji emulzionih nosača [27-30]. Sa druge strane, mezomorfno ponašanje šećernih emulgatora utiče na osobine emulzionih sistema važne za dermofarmaceutsku primenu, bilo kao nosača aktivnih supstanci ili kao vehikuluma koji povećavaju sadržaj vlage u *stratum corneum*-u [28]. Sličnost ovih emulzionih struktura sa organizacijom intercelularnih lipida *stratum corneum*-a daje im prednost u primeni na kožu, u odnosu na tradicionalne emulzione sisteme, naročito zbog njihovog efekta povećanja penetracije kroz *stratum corneum*, kao glavnu barijeru kože [31,32]. U cilju razvoja optimalne formulacije emulzionih sistema sa šećernim emulgatorima kao nosačima za amfifilnu nesteroidnu antiinflamatornu supstancu, diklofenak-dietilamin (DDEA) procenjivan je uticaj različitih faktora na *in vitro* profil oslobađanja DDEA [33]. Ispitivanje brzine oslobađanja DDEA izvedeno je na Ehnancer ćeliji (VanKel Industries Inc., Edison, SAD) sa membranom od regenerisane celuloze (Cuprophan®, Akzo, Wuppertal, Nemačka). Dobijeni rezultati su pokazali da inkorporiranje lekovite supstance u različite faze emulzionih nosača sa šećernim emulgatorima ne utiče na profile oslobađanja DDEA [33].

Ispitivano je ukupno šest uzoraka, tri uzorka emulzionih sistema koji su izrađeni sa emulgatorom – cetearil alkohol&cetearil glukozid u koncentraciji 10

% (m/m) (Montanov™ 68 – Seppic, Francuska) i tri uzorka sa emulgatorom sorbitan stearat&saharoza kokoat (7 % (m/m)) Arlatone®2121 – ICI Surfactants), pri čemu je ukupna količina DDEA inkorporirana u vodenu fazu, ukupna količina lekovite supstance u uljanu fazu i 50 % u uljanu, 50 % u vodenu fazi krema. Iako su postojale razlike u fizičko-hemijskim karakteristikama ovih uzoraka, nisu uočene značajnije razlike u profilima oslobađanja DDEA. Uzorak stabilizovan sa 7 % (m/m) emulgatora Arlatone®2121, gde je lekovita supstanca potpuno rastvorena u vodenoj fazi, imao je najniži viskozitet i nešto veću brzinu oslobađanja, ali neznatno veću u odnosu na ostale ispitivane formulacije kremova (tri uzorka koja su sadržala 10 % (m/m) Montanov-a™ 68 i dva uzorka sa 7 % (m/m) Arlatone®2121) [33].

Autori su zaključili, shodno prethodnim istraživanjima, da su ovakvi rezultati očekivani, s obzirom da amfifilne aktivne supstance, kao DDEA, pokazuju mezomorfno ponašanje i potencijal da interaguju sa liotropnom tečno-kristalnom fazom, što može da uslovi modifikovano oslobađanje [34-36].

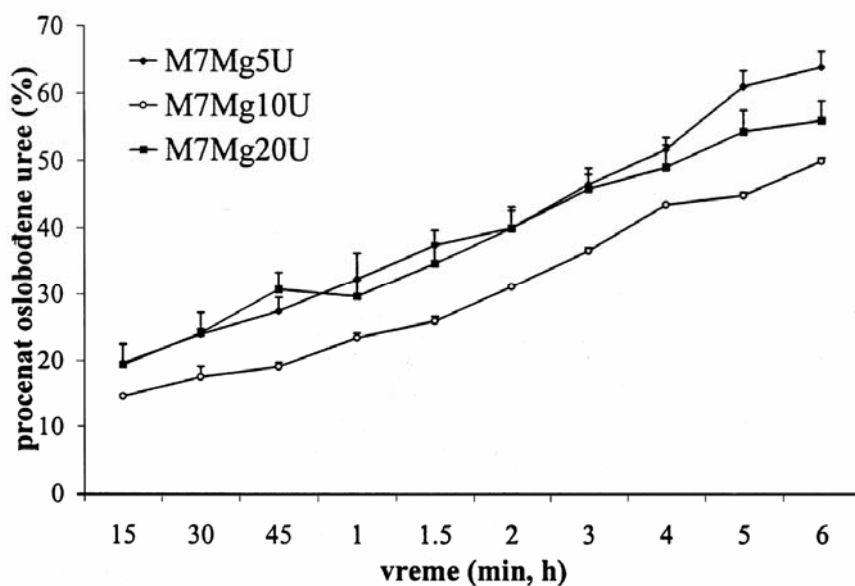
Analizom profila oslobađanja DDEA nađeno je da se oni najbolje slažu sa Higuchi difuzionim matematičkim modelom, i još jednom potvrđeno da ograničavajući faktor koji utiče na kinetiku oslobađanja supstance iz nosača sa strukturom lamelarnih tečnih kristala jeste difuzija [37].

Uzimajući u obzir amfifilnu prirodu DDEA i kompleksnu mikrostrukturu ispitivanih emulzionih nosača, autori su izveli zaključak da inkorporiranje ove supstance u vodenu/masnu fazu kremova sa šećernim emulgatorima, ne utiče na profile njenog oslobađanja [32].

***In vitro* ispitivanje oslobađanja uree iz kremova stabilizovanih šećernim emulgatorima**

U cilju procene uticaja koji može imati koloidna struktura emulzionih nosača stabilizovanih alkilpoliglukozidnim nejonskim mešanim emulgatorom (cetearil glukozid&cetearil alkohol - Montanov™68 PHA, Seppic, Francuska) na liberacioni profil uree, Savić [20] je ispitivala brzinu oslobađanja uree iz tri formulacije sa različitim udelom masne faze (5 %, 10 % i 20 % (m/m) triglicerida srednjeg lanca (Miglyol® 812)). *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja uree praćeno je na Enhancer ćeliji (VanKel Technology Group, SAD) sa veštačkom kuprofanskom membranom (Kuprofanska membrana za ultrafiltraciju 80M, Centar za separacione tehnologije, Srbija). Očekivano je da različita koncentracija ulja može da proizvede strukturne promene (distribucija vode u sistemu), koje se mogu odraziti na liberacioni profil inkorporiranog leka [20].

Na slici 4 predstavljena je zavisnost procenta oslobođene supstance od vremena oslobađanja. Na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka izvršeno je fitovanje profila oslobađanja prema odgovarajućim modelima oslobađanja (kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, Hixon Crowell-ov model i Higuchi-jev model). U sve tri formulacije radi se o oslobađanju leka kinetikom prvog reda [20].



Slika 4. Procenat oslobođene uree iz aktivnih uzoraka u funkciji vremena (M7Mg5U, M7Mg10U, M7Mg20 - uzorci sa 7 % (m/m) emulgatora (Montanov™ 68 PHA), 5 %, 10 % i 20 % (m/m) masne faze (Miglyol® 812), respektivno) [20]

Figure 4. Carbamid release profiles (%) from active samples vs. the time (M7Mg5U, M7Mg10U, M7Mg20 - samples with 7 % (m/m) emulsifier (Montanov™ 68 PHA), 5 %, 10 % i 20 % (m/m) oil (Miglyol® 812), respectively) [20]

Najveća brzina oslobađanja uree je iz formulacije sa 5 % (m/m) ulja, uz takode, najviše vrednosti fluksa i kumulativne količine supstance oslobođene nakon 6 sati. Sledi uzorak krema sa 20 % (m/m) ulja, nasuprot uzorku sa 10 % (m/m) ulja koji je oslobodio najniži procenat aktivne supstance, iako je bio manje viskozan od krema sa 20 % (m/m) ulja [20].

Nakon 6 sati oslobađanja u receptorskoj fazi prisutna je približno dvostruko veća količina uree u odnosu na količinu koja je difundovala posle

jednog sata. Nakon 6 sati ostaje neoslobodeno između 40 i 50 % uree. Pošto se u prvom satu ispitivanja oslobodi u proseku oko 30 % aktivne supstance, zaključeno je da je deo uree rastvoren u vodi koja je interlamelarno fiksirana unutar tečno-kristalnih dvoslojeva oko kapi, zbog čega je ona na raspolaganju za produženo, odloženo oslobađanje [20].

Iako razlike u liberacionom profilu uree nisu značajne, zavisno od udela ulja u kremu, nejasno je kako je došlo do intenzivnijeg oslobađanja uree iz daleko viskoznijeg uzorka sa 20 % (m/m) ulja u odnosu na krem sa 10 % (m/m) ulja. Autor [20] smatra da se ovo može dovesti u vezu sa specifičnom distribucijom vode u sistemima i različitim inkorporiranjem uree unutar određenih frakcija vode u koloidnoj strukturi emulzionih nosača. Savić [20] pretpostavlja da pri određenim količinama ulja u sistemu (10 % (m/m)), zavisno od odnosa udela emulgatora, vode i ulja u formulaciji krema, mnogo veći uticaj na oslobađanje uree ima način distribucije vode u kremu sa ovom vrstom emulgatora [38]. Način distribucije vode u kremu, a sa njom i hidrofilne uree, upravo je takav da je jednim delom supstanca „zarobljena” interlamelarno, dok je ostatak uree prisutan u delu vode koja je slabo vezana – slobodna voda ili unutar vode u sastavu lipofilne gel faze (voda koja je delom iskorišćena za hidrataciju viška cetostearil alkohola, koji je sastojak mešanog emulgatora - MontanovTM68 PHA) [20,28].

Ispitivanje oslobađanja *tokoferilacetata iz emulzija sa polimernim emulgatorima*

U svom radu, Đorđević [13] je ispitivala uticaj polarnosti emolijenasa koji ulaze u sastav kremova izrađenih sa polimernim emulgatorom (Pemulen®, BFGoodrich, SAD) na brzinu oslobađanja tokoferilacetata (TA). Rezultati ispitivanja, koje je provedeno na Ehnancer ćeliji, sa veštačkom kuprofanskom membranom (Kuprofanska membrana za ultrafiltraciju 80M, Centar za separacione tehnologije, Srbija) su pokazali da se TA brže oslobađa iz formulacija u čiji sastav ulaze emolijensi nižeg (ciklometikon, PPG-15 stearil etar) i srednjeg indeksa polarnosti (oktil palmitat, oktil stearat), a sporije iz emulzija sa polarnim emolijensima, kao što su oleiloleat i oktildodekanol [13]. Veća vrednost indeksa polarnosti označava manju polarnost i obrnuto [20]. Utvrđeno je da je brzina oslobađanja TA iz kremova sa nepolarnim emolijensom (tečni parafin) nešto manja nego iz emulzija u čiji sastav ulaze polarni emolijensi srednjeg i visokog indeksa polarnosti [13]. Zapaženo je da je formulacija hidrofilnog krema, koja je sadržala emolijens najmanje polarnosti (tečni parafin) imala i najniži viskozitet. U slučaju korišćenja nepolarnih emolijenasa, zapaženo je sporije oslobađanje vitamina E iz emulzija, što se objašnjava većim afinitetom TA prema nepolarnom parafinskom ulju i

uspostavljanju jake hidrofobne interakcije između nepolarnog dela TA i nepolarnih ugljovodoničnih lanaca [13].

Dobijeni rezultati su bili u saglasnosti sa zapažanjima drugih autora da na brzinu oslobađanja aktivne supstance, pored viskoziteta podloge utiče termodinamička aktivnost TA u vehikuluma, kao i afinitet TA prema vehikulumu [39, 40].

U literaturi se navodi da oslobađanje lipofilne supstance iz hidrofilnog (U/V) krema teče tako da ona treba da pređe iz unutrašnje uljane u spoljašnju vodenu fazu krema i savlada film emulgatora između unutrašnje i spoljašnje faze, a zatim da se oslobodi i dođe do membrane [41,42].

***In vitro* ispitivanje oslobađanja apigenina iz liposomskog i neliposomskog hidrofilnog krema**

Inkorporiranjem liposoma u dermofarmaceutske i kozmetičke preparate obezbeđuje se lokalno delovanje, veća efikasnost i manja toksičnost aktivne supstance u odnosu na konvencionalne oblike za primenu na kožu (masti, kremove ili gelove) [43,44]. Liposomski preparati za lokalnu primenu mogu poslužiti i kao matriksi za solubilizaciju slabo rastvornih lekovitih supstanci, pojačivači penetracije za aktivne supstance koje treba da prođu kroz kožu, lokalni depoi (mikrorezervoari) za kontrolisano oslobađanje, kao i „membranska barijera” koja ograničava sistemsku resorpciju i tako doprinosi smanjenju neželjenih efekata [45]. Inkapsulirane aktivne supstance mogu da budu transportovane do pojedinih slojeva kože, zahvaljujući velikoj sličnosti i građi epiderma kože i liposomskih membrana. Kod aktivne supstance uklopljene u liposome, nekoliko autora navodi da se postiže povećanje prolaza leka kroz *stratum corneum* uz sniženje njegovog nivoa u sistemskoj cirkulaciji, zbog čega se liposomi predstavljaju kao lokalizeri aktivne supstance u koži. U razvoju liposoma, kao nosača lekovitih supstanci u dermatologiji, nastojanja idu u smeru povećanja sadržaja aktivne supstance u koži, smanjenja doze, poboljšanja lokalne podnošljivosti i smanjenja sporednih efekata. Osnovni razlog primene liposomskih dermatika je povećanje kutane raspoloživosti [46].

Praćenje *in vitro* oslobađanja komponenata inkapsuliranih u liposome, odnosno liposomske preparate, otežano je zbog malih dimenzija liposoma i sporog oslobađanja, naročito lipofilnih aktivnih supstanci u hidrofilni medijum za ispitivanje. Oslobađanje liposolubilnih aktivnih supstanci inkapsuliranih u liposome može da se prati uz dodatak surfaktanata ili organskih rastvarača u akceptorski medijum. Prema nekim autorima, dodatak ciklodekstrina u akceptorski medijum, jedan je od načina za povećanje brzine oslobađanja lipofilnih supstanci iz liposoma [4,47].

U ispitivanjima Arsić [46] praćeno je oslobađanje apigenina iz krema sa 5 % (m/m) standardizovanog propilenglikolnog ekstrakta cvasti kamilice inkapsuliranog u liposome (liposomski krem) i krema bez liposoma (neliposomski krem) u *in vitro* uslovima, uz korišćenje smeše vode i etanola (odnos 85/15) kao akceptorskog medijuma. Ispitivanje je izvedeno na Enhancer ćeliji sa kuprofanskom membranom (Centar za separacione tehnologije, Beograd). Pokazano je da je oslobađanje aktivne supstance iz emulzionog nosača koji nije sadržao liposome brže u odnosu na formulaciju koja sadrži liposome. Za multilamelarne liposome (formiraju se u ispitivanom kremu) postoje literaturni podaci da je oslobađanje inkapsulirane aktivne supstance sporije nego iz unilamelarnih. Obično multilamelarni liposomi pokazuju osobine sistema sa produženim oslobađanjem, a kod podloga sa unilamelarnim liposomima je utvrđeno da se inkapsulacijom aktivnih principa gotovo ne menja kinetika oslobađanja [48,49]. Rezultati ispitivanja oslobađanja apigenina iz preparata sa liposomima ukazuju da je kinetika oslobađanja u skladu sa Higuchi-evim difuzionim modelom, što znači da je proces oslobađanja apigenina iz uzoraka sa liposomima, u velikoj meri difuzijom kontrolisan proces kao što su zaključili i drugi autori, kada je u pitanju oslobađanje iz liposoma [50,51]. Difuziono oslobađanje aktivne supstance je mehanizam oslobađanja potvrđen i kod liposomskih preparata u koje je inkorporiran natrijum-askorbil fosfat [52]. Inkorporiranje u liposome tećnog ekstrakta cvasti kamilice standardizovanog na sadržaj apigenina i njihovo inkorporiranje u krem, uslovalo je produženo oslobađanje u toku osam sati, kada se oslobodilo ukupno 11.16% apigenina [46].

Poznato je da brzina oslobađanja supstance *in vitro* iz podloge može imati uticaj na njenu *in vivo* efikasnost [4,37,46]. Egerova i sar. [53] su utvrdili da su kremovi, koji su u *in vitro* uslovima pokazali efekat produženog oslobađanja aktivne supstance, *in vivo* imali najizraženiji antiinflamatorni i antialergijski efekat. Efekat dužeg oslobađanja apigenina iz liposomskog krema, nagovestio je da se može očekivati bolji antiinflamatorni efekat ovog preparata sa inkapsuliranim ekstraktom kamilice u odnosu na konvencionalni krem, što je potvrđeno u ispitivanjima efekata na koži pacijenata [46].

***In vitro* ispitivanje oslobađanja lidokain-hidrohlorida iz liposomskih gela za kožu**

Glavas-Dodov i saradnici [54] su pratili oslobađanje *lidokain-hidrohlorida* iz liposomskog gela, na Enhancer ćeliji (VanKel Technology Group, SAD) kroz hidrofilnu membranu od regenerisane celuloze. U cilju procene stabilnosti kontrolisali su i promene u profilima oslobađanja nakon tri nedelje čuvanja na 4°C. Kao gelirajuće sredstvo korišćen je Carbopol® 940 (1.5

– 2.0 % (m/m)) i utvrđeno je da njegova koncentracija nije značajno uticala na brzinu oslobađanja lokalnog anestetika. Na osnovu profila oslobađanja lidokain hidrohlorida iz liposomskog i neliposomskog gela, pokazano je da se inkapsulacijom ovog lokalnog anestetika u liposome može postići produženo oslobađanje. Na osnovu kinetičkih parametara, supstanca se u toku prva 3 sata oslobađa u skladu sa Higuchi-jevim difuzionim modelom, dok se nakon 3 sata kao dominantan mehanizam oslobađanja pojavljuje kinetika nultog reda. Ovim rezultatima je pokazano da se kinetika oslobađanja nekih lekovitih supstanci iz liposoma može opisati kao difuzijom kontrolisan proces, dok stanje ravnoteže uspostavljeno nakon 3 sata ukazuje da liposomi mogu poslužiti kao rezervoari za kontrolisano oslobađanje [54].

Zaključak

Prema preporukama FDA, a u nedostatku oficinalnih metoda, ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih farmaceutskih oblika za primenu na kožu, treba izvoditi primenom vertikalne Franz-ove difuzione ćelije.

Na osnovu brojnih ispitivanja i empirijskog stava za dermofarmaceutske preparate, prihvatljiva količina oslobođene lekovite supstance iz odgovarajućeg polučvrstog farmaceutskog oblika na kraju eksperimenta ne mora da bude veća od 30 % ukupne primenjene doze.

Eksperimentalna iskustva su pokazala da je test *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskih preparata za primenu na kožu reproduktivan i da je karakteristična osobina ispitivanog preparata podatak o odnosu kvadratnog korena vremena u toku koga se prati oslobađanje i brzine oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih farmaceutskih oblika. Test može da bude „oruđe” u toku razvoja formulacije ove grupe lekova i da posluži samo kao pomoćni dokazni materijal za procenu kvaliteta preparata, ali ne može da zameni testove biološke/kutane raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti.

Podaci o brzini oslobađanja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika leka mogu pružiti dokaz o sličnosti ili o razlikama kod polučvrstog preparata iz različitih serija. Međutim, ostaje i dalje otvoreno pitanje da li se test u dovoljnoj meri može iskoristiti kao jedina ili čak najvažnija reproduktivna mera za procenu preparata iz različitih serija.

Literatura

1. Bosman IJ, Lawant AL, Avegaart SR, Ensing K, de Zeeuw RA. Novel diffusion cell for *in vitro* transdermal permeation, compatible with automated dynamic sampling. *J Pharm Biomed Analysis* 1996;14 (8-10): 1015-23.
2. <http://www.dowpharm.com/publications/PharmTech.pdf> (poslednji pristup: 01.07.2007.)
3. <http://www.fda.gov/CDER/guidance/1447fnl.pdf> (poslednji pristup: 01.07.2007.)
4. Siewert M, Dressman J, Brown C, Shah V. FIP/AAPS Guidelines for dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *Dissolution Technologies*, Februar 2003: 6-15.
5. Jugoslovenska farmakopeja 2000, peto izdanje, Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Savremena administracija a.d. Beograd, 2000.
6. European Pharmacopoeia 5.0, 4th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.
7. Question and answer section. *Dissolution Technologies*, May, 2007:43.
8. Enhancer cell information boklet, Van Kel Technology Group, USA, 1995.
9. Rege P, Vilvalam V, Collins C. Development in release testing of topical dosage forms: use of the enhancer cell with automated sampling. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17: 1225-33.
10. The United States Pharmacopoeia XXIII; The National Formulary 18 U.S. Pharmacopoeia Convention INC. Rockville, 1995.
11. Flynn GL, Shah VP, Tenjarla SN, Corbo M, DeMagistris D, Feldman TG, Franz TJ, Miran DR, Pearce, DM, Sequeira, JA, Swarbrick J, Wang JCT, Yacobi A, Zatz JL. Assessment of value and applications of *in vitro* testing of topical dermatological drug products. *Pharm Res* 1999;16: 1325-30.
12. Thakker KD, Wendy CH. Development and validation of *in vitro* release tests for semisolid dosage forms—case study. *Dissolution Technologies*, Februar 2003: 10-15.
13. Djordjević J. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja karakteristika emulzija tipa U/V sa dl α -tokoferol acetatom za primenu na kožu. Magistarski rad, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu 2001.
14. Question and Answer Section. *Dissolution Technologies*, Februar, 2006:35.
15. Huschka C, Podhaisky P, Wohlrab W. Percutaneous absorption: balancing act between effect and compatibility. *SOFW-Journal* 1999; 125: 4-11.
16. Yourick J, Bronaugh R. Percutaneous penetration as it relates to the safety evaluation of cosmetic ingredients, In: Bronaugh R., Maibach H. (Eds), *Percutaneous absorption: drugs-cosmetics-mechanisms-methodology*, Marcel Dekker, New York, Basel 1999;659-71.
17. Walters K. Methods for measuring percutaneous penetration. Proceeding of Pre-Conference course of Perspectives in Percutaneous Penetration (PPP) Conference 25 April 2000, La grande Motte, 21-35.

18. Bronaugh R, Collier S. *In vitro* methods for measuring skin permeation, In: Zatz J. (Ed), Skin permeation, Allured Publishing Corporation, USA, 1993;93-112.
19. Riviere J. Biological factors in absorption and permeation. In: Zatz J. (Ed), Skin permeation, Allured Publishing Corporation, USA, 1993; 33-73.
20. Savić S. Fizičko-hemijski aspekti i *in vitro/in vivo* karakterizacija emulzionih nosača sa nejonskim emulgatorom tipa šećernog etra. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu 2004.
21. Vasiljevic D, Parojcic J, Primorac M, Vuleta G. An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier. *Int Pharm J* 2006; 309: 171-7.
22. Florence AT, Law TK, Whateley TL. Nonaqueous foam structures from osmotically swollen w/o/w emulsion droplets. *J Colloid Interface Sci* 1985;107: 584-8.
23. Laugel C, Chaminade P, Baillet A, Seiller M, Ferreira D. Moisturizing substances entrapped in w/o/w emulsions: analytical methodology for formulation, stability and release studies. *J Control Rel* 1996; 38: 59-67.
24. Müller-Goymann CC, Kriwet K, Eder I, Papantoniou I. Microemulsions and related systems for the dermal application of drugs. *B.T. Gattefosse* 1995; 88: 43-54.
25. Kriwet K, Müller-Goymann CC. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int J Pharm* 1995; 125: 231-42.
26. Djordjevic LJ, Primorac M, Stupar M. *In vitro* release of diclophenac diethylamine from caprylocaproyl macroglycerides based microemulsions. *Int Pharm J* 2005; 296: 73-9.
27. Loll P. Liquid crystals in cosmetics emulsions. *ICI Surfactants*, publication RP 94/93 E, Everberg 1993.
28. Savic S, Vuleta G, Daniels R, Müller-Goymann CC. Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized with an alkylpolyglucoside nonionic emulsifier. *Colloid Polym Sci* 2005; 283: 439-51.
29. Savic S, Vuleta G, Milic J, Tamburic S, Daniels R, Müller-Goymann CC. Structural characterisation of multiphase emulsion systems based on an alkylpolyglucoside non-ionic emulsifier, *RISG La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 2005, 82 (5): 236-244.
30. Savić S, Tamburić S, Kovačević A, Krajišnik D, Milić J, Vuleta G. Alkylpolyglucoside based hydrous and anhydrous emulsion vehicles: physico-chemical characterisation and skin performance test. *Skin and formulation 2nd Symposium*, Versailles, France, October 9-10, 2006.
31. Hadgraft J. Modulation of the barrier function of the skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14 (1): 72-81.

32. Norlén L. Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16 : 203-1134.
33. Vučinić-Milanković N, Savić S, Vuleta G, Vučinić S. The physicochemical characterization and *in vivo/in vitro* evaluation of natural surfactants – based emulsions as vehicles for diclophenac diethylamine. *Drug Dev Ind Pharm* 2007; 33: 1-14.
34. Kriwet K, Müller-Goymann CC. Binary diclophenac diethylamine water systems: micelles, vesicles and lyotropic crystals. *Eur J Pharm Biopharm* 1993; 39: 234-8.
35. Papantoniou I, Müller-Goymann CC. Influence of the phase separation from reverse micellar solution into lamellar liquid crystal on sustained release. *Pharm Pharmacol Lett* 1995; 1: 28-31.
36. Makai M, Csanyi E, Nemeth Z, Palinkas J, Erös I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int Pharm J* 2003; 256: 95-107.
37. Woolfson AD, Malcolm RK, Campbell K, Jones DS, Russel JA. Rheological, mechanical and membrane penetration properties of novel dual systems for percutaneous delivery. *J Control Rel* 2000; 67: 395-408.
38. Savić S. The impact of urea on colloidal structure of alkylpolyglucoside –based emulsions: physico-chemical and *in vitro/in vivo* characterisation. 4th World Congres on Emulsions, October 2006, Lyon, 94.
39. Shah V, Elkins J, Williams R. Role of *in vitro* release measurements in semisolid dosage forms , In: Bronaugh R., Maibach H (Eds) *Percutaneous absorption: drugs-cosmetics-mechanisms-methodology*, Marcel Dekker, New York, Basel, 1999; 555-69.
40. Neubert R, Wohlrab W. *In vitro* methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulation. *Acta Pharm Technol* 1990; 36: 197-206.
41. Ruitz M, Gallardo V, Delgado A, Vera P. Study of *in vitro* release of corticosteroids in topical formulations, *IL FARMACO* 1994; 49: 147-52.
42. Clement P, Laugel C, Marty J. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated w/o emulsions. *J Control Rel* 2000; 66: 243-54.
43. Rollan, A., Particulate carriers in dermal and transdermal drug delivery: myth or reality. In: Rollan, A. (Ed.), *Pharmaceutical Particulate Carriers, Therapeutical Application*, New York, Marcel Dekker, 1993, pp. 367–421.
44. Reimer K, Fleischer W, Brigmann B, Srrier H, Burkhard, P. Povidone iodine liposomes, an overview. *Dermatol* 1997; 195 (Suppl. 2): 93–9.
45. Arsić I. Uticaj inkapsulacije standardizovanih ekstrakata cvasti kamilice *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. (Asteraceae) na stabilnost i antiinflamatornu aktivnost preparata za lokalnu primenu. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu 2005.

46. Burgess JD, Hussain SA, Ingallinera ST, Chen ML. Assuring Quality and performance of sustained and Controlled Release Parenterals: Workshop Report, AAPS Pharm Sci 2002; 4(2) article 7.
47. Natipide® II-Information, Nattermann Phospholipids GmbH, Nemačka, 1999.
48. Fadda AM, Barole BM, Maccioni AM, Sinico C, Alhaique F. *In vitro* release of liposomal caffeine: Effects of polysorbates. Proceeding Int 1. Symp Control Rel Bioact Mater. Sweden 1997; 24: 437-8.
49. Saarinen-Savolainen P, Järvinen T, Taipale H, Urtili A. Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions. Int Pharm J 1997; 159: 27-33.
50. Ritchel WAB, Gangadharan B. Pharm Ind 1988; 350-5.
51. Korsmeyer RVR, Gurny RE, Doelker EP, Buri PNA, Peppas NA. Int Pharm J 1983; 15-25.
52. Fočo A., Gašperlin M., Kristl J. Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection. Int Pharm J 2005; 291: 21-9.
53. Egorova SN, Ziganshina LE, Kadirova EA. Slowing down the release of the dimethylphosphone increases the efficiency of dermato-cosmetic cream. Cosmetic&Household Ingredients Conference Proceedings, Warsaw, Poland, November 1999, Proceeding 259-63.
54. Glavas-Dodov M, Goracinova K, Mladenovska K, Fredro-Kumbaradzi E. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. Int Pharm J 2002; 242: 381-4.

Dissolution test for pharmaceutical semisolid dosage forms

Gordana Vuleta, Anđelka Kovačević,
Snežana Savić, Jela Milić

Institute of Pharmaceutical technology and Cosmetology
Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade

Summary

In vitro release tests are one of several standard methods which can be used to characterize performance of a finished topical dosage form, i.e., semisolids such as creams, gels, and ointments and offer important informations during selection of formulation. Drug-release studies is used in regulatory scale-up and postapproval changes (SUPAC) testing to verify that no change exists in product quality or performance after a manufacturing process modification. However, *in vitro* release testing, alone, is not a surrogate test for *in vivo* bioavailability or bioequivalence.

New pharmacopoeias don't offer methods for these investigation, but FDA proposed using the vertical diffusion cell (Franz cell) procedure for the release rate studies of semisolid dosage forms. Franz cell is considered the most promising apparatus for investigation of post approval changes of semisolid dosage forms. The ultimate goal of these tests is analogous to that for solid oral dosage forms, i.e. to use the test for the biopharmaceutical characterization of the drug product, and as a tool to assure consistent product (batch) quality of the same pharmaceutical dosage form within a defined set of specification criteria.

The study present results of release investigation of diclofenac diethylamine, retinolic acid, carbamide, vitamin E acetate, lidocaine HCl and apigenin from different vehicles/bases using Franz or Enhancer diffusion cell.

Key words: dermopharmaceutical preparations, dissolution test, Franz diffusion cell, Enhancer cell, diclofenac diethylamine, tretinoin, vitamin E acetat, lidocaine HCl, apigenin
