

Fizičko-hemijska karakterizacija i procena bezbednosti model podloga sa alkil poliglukozidnim emulgatorom za NSAID

**Ivana Jakšić^{1*}, Milica Lukić¹, Mirjana Rajić²,
Katarina Jončić-Savić², Vesna Radulović², Jela Milić¹,
Snežana Savić¹**

¹ Institut za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450, Beograd

² Institut za istraživanje i razvoj, Galenika a.d., Batajnički drum bb, Beograd

Kratak sadržaj

Poslednjih godina raste interesovanje za grupu prirodnih emulgatora okarakterisanih kao „prijatelji kože i životne sredine”, pri čemu se posebno izdvojila grupa **alkil poliglukozidnih (APG) emulgatora**, koji se dobijaju iz šećernih jedinica prirodnog porekla i masnog alkohola.

Cilj ove studije bio je da se ispita potencijal prirodnog mešanog emulgatora (cetostearil glukozid i cetostearil alkohol) kao ekscipijensa za stabilizaciju emulzionih nosača za model lekovite supstance iz grupe NSAID. Izabrane su formulacije kremovano-sača jednostavnog sastava, kako bi se ujedno procenila mogućnost primene APG emulgatora da stabilizuju jednostavne tzv. **“ready-to-use”** podloge namenjene izradi magistralnih dermatoloških lekova. Imajući u vidu slabu rastvorljivost mnogih, a naročito nosintetisanih lekovitih supstanci, variran je dodatak izopropil alkohola u sastavu podloge, koji bi imao ulogu korastvarača i potencijalnog ubrzivača penetracije.

Karakterizacija pripremljenih uzoraka kremova (sa i bez dodatka model NSAID-nesteroidnih antiinflamatornih lekova) sprovedena je u tri faze, kojima su obuhvaćena fizičko-hemijska i biofarmaceutska ispitivanja i procena bezbednosnog profila model podloga sa APG emulgatorom. Usporedna ispitivanja sprovedena su u odnosu na referentnu, farmakopejsku podlogu (Nejonski hidrofilni krem, DAB 2006).

Dobijeni rezultati ukazali su na zadovoljavajuće fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike ispitanih podloga sa prirodnim mešanim emulgatorom APG tipa, koje su imale povoljan bezbednosni profil. Dodatak izopropil alkohola (10% (m/m)) nije se odrazio na stabilnost i bezbednost primene podloga sa APG

emulgatorom. U zavisnosti od inkorporirane lekovite supstance iz grupe NSAIL u ispitivane podloge, uočen je različit uticaj na biofarmaceutska svojstva izrađenih uzoraka kremova.

Ključne reči: Alkil poliglukozidni emulgator, izopropil alkohol, NSAIL, fizičko-hemijska karakterizacija, *in vitro/in vivo* procena profila bezbednosti

* Autor za korespondenciju: **Ivana Jakšić**, E-mail: ijaksic@pharmacy.bg.ac.rs

Uvod

Poznato je da izbor odgovarajućeg emulgatora za izradu farmaceutskog oblika tipa emulzionog sistema za lokalnu primenu, često određuje podnošljivost formulisane emulzije ili krema na koži. Iako primena takozvanih tradicionalnih jonskih i polietoksilovanih nejonskih emulgatora dovodi do zadovoljavajuće stabilizacije kremova, odnosno emulzionih podloga (kao inherentno termodinamički nestabilnih sistema), neki od njih su poznati kao iritansi (npr. natrijum-laurilsulfat). Iz tog razloga, poslednjih godina raste interesovanje za grupu prirodnih emulgatora okarakterisanih kao „prijatelji kože i životne sredine” (eng. *skin- and environment-friendly*). Posebno se izdvojila grupa **alkil poliglukozidnih (APG) emulgatora**, koji se dobijaju iz šećernih jedinica prirodnog porekla i masnog alkohola. Bitno je istaći da se sinteza pomenutih emulgatora sprovodi bez primene polietilenglikola (polietilenoksida) (eng. *PEG-free*) (1, 2).

Mešani emulgator (**cetostearil glukozid i cetostearil alkohol**) iz APG grupe nedavno je dobio status farmaceutskog ekscipijensa pod nazivom **Alkil glukozid** (3), od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA). U do sada sprovedenim studijama (4-7), Alkil glukozid se pokazao kao dobar stabilizator emulzionih sistema polučvrste konzistencije, ispoljivši zadovoljavajuću bezbednost (iritacioni potencijal procenjen *in vitro* i *in vivo metodama*) i značajno poboljšanje hidratacije i barijerne funkcije tretirane kože. Istraživanja su pokazala da ovaj emulgator karakteriše izražen potencijal građenja lamelarne tečne kristalne i lamelarne gel kristalne faze u koloidnoj strukturi emulzionih sistema.

Budući da izbor podloge za svaku lekovitu supstancu znatno utiče na ishod lokalne terapije, nametnuo se zahtev za formulacijom i karakterizacijom „univerzalnih” model podloga sa APG emulgatorom, kao potencijalnih nosača za niz lekovitih supstanci različitih fizičko-hemijskih karakteristika, odnosno karakterizacija pojedinih sistema (lekovita supstanca + podloga), slučaj po slučaj (eng. *case by case*) (1, 8).

Cilj studije bio je da se ispita potencijal prirodnog mešanog emulgatora (cetostearil glukozid i cetostearil alkohol) kao ekscipijensa za stabilizaciju emulzionih nosača za model lekovite supstance iz grupe NSAIL. Izabrane su formulacije jednostavnog sastava, kako bi se ujedno ispitala mogućnost primene APG emulgatora u pripremi podloga za dermatološke magistralne lekove, tzv. *“ready-to-use”* podoge. Imajući u vidu slabu rastvorljivost mnogih, posebno novosintetisanih lekovitih supstanci (9, 10), u model podlogama variran je udeo izopropil alkohola (IPA), kao korastvarača i potencijalnog pojačivača/ubrzivača penetracije. Karakterizacija pripremljenih uzoraka kremova (sa i bez dodatka model NSAIL) sprovedena je u tri faze. Prva faza obuhvata **fizičko-hemijska ispitivanja** (pH vrednosti i električne provodljivosti, mikroskopska i kontinualna reološka analiza) radi dobijanja uvida u stabilnost, koloidnu strukturu i aplikativne osobine uzoraka. U drugoj fazi sprovedeno je uporedno *in vitro* ispitivanje profila oslobađanja model NSAIL, uz paralelno određivanje particionog koeficijenta u cilju ispitivanja načina raspoređivanja leka unutar emulzionog sistema (**biofarmaceutska karakterizacija**). Kao model lekovite supstance izabrani su NSAIL različite rastvorljivosti u vodi: diklofenak-natrijum, diklofenak-dietilamin i ibuprofen.

U trećoj fazi studije, uvid u **bezbednosni profil** emulzionih podloga stabilisanih sa APG (sa i bez dodatka IPA), izveden je na osnovu uporedne analize rezultata dobijenih ***in vitro* ispitivanjem iritacionog potencijala model podloga (analiza citotoksičnosti na modelima humane kože)** i primenom **savremenih *in vivo* metoda bioinženjeringa kože**, nakon dvadesetčetvorčasovne okluzije ispitivane podloge na humanoj koži. U *in vivo* studiji, parametri koji su praćeni pre (bazalne vrednosti) i nakon okluzije kože, bili su eritema indeks (EI), transepidermalni gubitak vlage (TEGV), pH kože i hidratacija *stratum corneum* (SCH). Parametar EI registruje pojavu crvenila (eritema), pa je na osnovu EI vrednosti moguće proceniti lokalnu iritaciju koju izaziva primenjeni preparat. TEGV i njegovo određivanje najznačajniji je pokazatelj stanja epidermalne barijere kože, odnosno njene zaštitne funkcije; povećanje ovih vrednosti ukazuje na oštećenje epidermalne barijere. Površina kože ima kiseli pH i predstavlja tzv. „kiseli omotač” koji ima značajnu ulogu u održanju homeostaze *stratum corneum*-a, pa svako narušavanje prosečnih vrednosti pH kože može uticati na fiziološke procese kože (11).

Paralelno sa procenom model podloga sa APG emulgatorom, sprovedena je i identična karakterizacija uzoraka Nejonskog hidrofilnog krema (*Nichtionische Hydrophile Creme*), oficinalnog u DAB 2006 (12), kao tradicionalno korišćene farmakopejske podloge, dokazanog kvaliteta.

Eksperimentalni deo

Materijali

Nakon preliminarnih preformulacionih ispitivanja, koja su uključivala variranja koncentracije emulgatora, lipofilnih koemulgatora/ stabilizatora, sastojaka i udela masne faze, formulisan je stabilan emulzioni sistem sa 10% (m/m) APG emulgatora, cetostearil glukozid i cetostearil alkohol (Sepineo™ SE 68, Seppic, Francuska) i 17% masne faze (trigliceridi srednje dužine lanca, Saboderm TCC, Sabo S.R.L., Italija, i beli vazelin) (serija uzoraka označenih sa A). Referentni uzorci sa Nejonskim hidrofilnim kremom označeni su sa N. Obe podloge konzervisane su dodatkom smeše parabena u fenoksietanolu (Euxyl® K300, Schülke&Mayr, Nemačka). U izrađene podloge dodato je 10% (m/m) izopropil alkohola (uzorci AIPA i NIPA), kao korastvarača i potencijalnog ubrzivača penetracije (Tabela I).

Tabela I Sastav ispitivanih i referentnih podloga.

Table I Composition of test and reference vehicles.

Sastojci	Zaštićeno ime	Proizvođač	A (g)	AIPA (g)	N (g)	NIPA (g)
Cetostearil glukozid i cetostearil alkohol	Sepineo™ SE 68	Seppic, Francuska	10,0			
Trigliceridi srednje dužine lanca	Saboderm TCC	Sabo SRL, Italija	14,0			
Cetostearil alkohol					10,0	
Polisorbat 60					5,0	
Beli vazelin			3,0		25,0	
Glicerol, 85 %					10,0	
Konzervans	Euxyl® K300	Schülke & Mayr Nemačka	0,5		0,5	
Voda, prečišćena			72,5		44,5	
Podloga/baza				90,0		90,0
Izopropil alkohol				10,0		10,0

U prethodno izrađene podloge inkorporirani su diklofenak-natrijum, diklofenak-dietilamin i ibuprofen, u uobičajenim terapijskim koncentracijama (13), kao model lekovite supstance različitih rastvorljivosti (Tabela II).

Tabela II Sastav uzoraka sa lekom, terapijske koncentracije i rastvorljivost u vodi izabranih lekovitih supstanci.

Table II Composition of drug-loaded samples, therapeutic concentrations of model drugs, and their solubility in water.

Model NSAIL		Rastvorljivost u vodi		Terapijska koncentracija (% m/m)	
<i>Diklofenak-natrijum (DNa)</i>		umereno rastvoran		1,0	
<i>Diklofenak- dietilamin (DDA)</i>		umereno rastvoran		1,16	
<i>Ibuprofen (Ib)</i>		gotovo nerastvoran		5,0	

<i>A uzorci</i> (% (m/m))	<i>A</i>	<i>AIPA</i>	<i>Model NSAIL</i>	<i>N uzorci</i>	<i>N</i>	<i>NIPA</i>	<i>Model NSAIL</i>
<i>ADNa</i>	99,00		1,00	<i>NDNa</i>	99,00		1,00
<i>AIPADNa</i>		99,00	1,00	<i>NIPADNa</i>		99,00	1,00
<i>ADDA</i>	98,84		1,16	<i>NDDA</i>	98,84		1,16
<i>AIPADDA</i>		98,84	1,16	<i>NIPADDA</i>		98,84	1,16
<i>AIb</i>	95,00		5,00	<i>NIb</i>	95,00		5,00
<i>AIPAib</i>		95,00	5,00	<i>NIPAib</i>		95,00	5,00

Metode

Izrada uzoraka

Uzorci stabilisani APG emulgatorom pripremljeni su prethodno standardizovanom metodom izrade. Emulgator i masna faza zagrejani su zajedno na oko 70°C i dodati u vodenu fazu (72-75°C). Nakon spajanja, masa se meša propellerskom mešalicom (Heidolph, Nemačka) utvrđenom dinamikom: 3 minuta brzinom od 700 obrt/min uz održavanje povišene temperature, zatim 3 minuta brzinom od 500 obrt/min. Nakon što je postignuto inicijalno emulgovanje, podloga se hladi uz mešanje na 500 obrt/min u toku 3 min, a potom na 300 obrt/min, do hlađenja na sobnu temperaturu.

Konzervans i odgovarajuće količine IPA, dodaju se u prohladenu podlogu (ispod 40°C). Model lekovite supstance inkorporirane su suspendovanjem u izrađene podloge, kako bi se procenio potencijal podloge (sa i bez dodatka korastvarača) da rastvori model NSAIL.

Izrada Nejonskog hidrofilnog krema, kao referentne podloge, vršena je prema propisu datom u DAB 2006 (12).

Merenje pH vrednosti i električne provodljivosti

Merenje pH vrednosti sprovedeno je direktnim uranjanjem staklene elektrode pH metra (Hanna instruments HI 9321, SAD) u ispitivane uzorke.

U cilju određivanja tipa emulzije (načina raspodele vode u sistemu) merena je električna provodljivost na uređaju Konduktometar CDM 230 (Meterlab, Radiometer, Danska). Sva merenja sprovedena su inicijalno (7 dana po pripremi uzoraka), 30 i 90 dana nakon izrade.

Mikroskopska analiza

Ispitivani uzorci posmatrani su mikroskopom Leika, Nemačka (sa integrisanom digitalnom CCD kamerom), pri uveličanju 400x i 600x, u svetlom polju između unakrsno postavljenih polarizera, uz primenu λ pločice (polarizaciona mikroskopija). Uporednom analizom mikrofotografija snimljenih 7 dana nakon izrade, dobijen je uvid u mikrostrukturu podloga, procenjen je uticaj dodatka IPA na njihovu koloidnu strukturu i stepen rastvaranja inicijalno suspendovanih model NSAIL u ispitivanim podlogama.

Reološka merenja

Kontinualna (rotaciona) reološka merenja sprovedena su primenom reometra (Reometar Haake-008 Rheostress, Nemačka), upotrebom kupa-ploča mernog sistema. Softverski paket Rheo Win 3 Job Menager sa kojim je uređaj integrisan, omogućio je elektronsku kontrolu merenja i automatsku obradu dobijenih rezultata.

Sva merenja ponovljena su tri puta, pod sledećim uslovima: kupa-ploča merni sistem (dijametar kupe 25 mm, ugao 1°), debljina merenog uzorka 0,05 mm, temperatura $20 \pm 0,1$ °C, brzina smicanja 0 do 200 s⁻¹ (120 s, uzlazna kriva) i 200 do 0 s⁻¹ (120 s, silazna kriva). Merenja su izvršena nakon 7, 30 i 90 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi.

Uporedno in vitro ispitivanje liberacionih profila NSAIL iz ispitivanih uzoraka

Preliminarni skrining dermalne biološke raspoloživosti model NSAIL iz ispitivanih uzoraka dobijen je uvidom u *in vitro* profile oslobađanja korišćenjem VanKel difuzione ćelije (VanKel Technology Group, SAD) u uređaju za

ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance - aparatura sa mini lopaticom (*Mini Paddle system*, Erweka DT 600, Nemačka). Oslobođanje model lekovitih supstanci je praćeno tokom 6h, u 300 ml fosfatnog pufera pH 7,4 (propis USP30) (14), kao akceptorskog medijuma, uz održavanje konstantne temperature medijuma od $32,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pri 50 obrt/min. Donorska faza je od akceptorske odvojena membranom od celuloznog acetata (Cuprophan tip 80M, Centar za separacione tehnologije, Srbija). Pre svakog ispitivanja membrane su aktivirane potapanjem u fosfatni pufer pH 7,4 u trajanju od 12 h, kako bi se vazduh unutar pora zamenio akceptorskim medijumom. Svi uzorci su ispitani u triplikatu, 7 dana nakon izrade.

Određivanje sadržaja model lekovitih supstanci u eluatima vršeno je UV spektrofotometrijski (u slučaju DN_a i DDA), odnosno HPLC tehnikom (Ib, s obzirom na izuzetno slab odgovor koji ova model supstanca u datim koncentracijama daje primenom direktne UV spektrofotometrije).

Matematičkim modelovanjem ispitana je kinetika oslobađanja model supstanci iz uzoraka serije A i N, primenom četiri kinetička modela, uobičajena za polučvrste preparate (kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, Higuchi-jev model i Hixon-Crowell model).

Određivanje partitionog koeficijenta

Shodno sastavu uzoraka A i N, napravljena je odgovarajuća smeša prečišćene vode i triglicerida srednje dužine lanca, koja odgovara udelu vodene i masne faze ispitivanih uzoraka. Pre spajanja polarne i nepolarne faze (ukupna količina smeše 10 g), odgovarajuća količina model lekovite supstance koja odgovara koncentraciji u uzorku, rastvorena je u polarnoj fazi. Pripremljeni uzorci mešani su 24 h na laboratorijskoj mućkalici/ šejkeru (Heidolph Unimax 1010, Nemačka), pri 250 obrt/min. Nakon centrifugiranja uzoraka (Tehtnica, Slovenija) 30 minuta na 3000 obrt/min, polarna faza je odvojena od nepolarne, i nakon filtriranja spektrofotometrijski određen sadržaj model lekovite supstance. Imajući u vidu rastvorljivost NSAIL korišćenih u ispitivanju, partitioni koeficijent određen je za DN_a i DDA (umereno/slabo rastvorni u vodi), u cilju procene načina raspodele ovih supstanci u emulzionom sistemu. Ispitivanje je ponovljeno četiri puta za svaki uzorak.

Partitioni koeficijent izražen je kao odnos koncentracija DN_a, odnosno DDA, u nepolarnoj i polarnoj fazi.

In vitro ispitivanje iritacionog potencijala model podloga – studija citotoksičnosti na modelima humane kože

U studiji je korišćen modifikovani Mosmanov MTT metod (15, 16). Modeli veštačke kože (MVK) uronjeni su u disperzije podloga A i AIPA

različitih koncentracija: 0,25%, 2,5% i 25% (m/m). Kao medijum za dispergovanje ispitivanih podloga korišćen je Krebs-Ringerov (KR) pufer (17). Veštačke kože uronjene u čist KR pufer (vijabilnost ćelija 100%), odnosno KR pufer sa 1% natrijum-laurilsulfata (NaLS) (vijabilnost ćelija 0%), korišćene su kao kontrola. Nakon 2 h inkubacije pod navedenim uslovima, MVK su isprani KR puferom, a zatim im je dodato 900 µl minimalno suplementovanog bazalnog medijuma (MSBM) i 100 µl vodenog rastvora boje MTT (0,5%), pa inkubirano pri 37°C i 5% CO₂ još 2 h. Supernatant je zatim dekantovan, a obojeni MVK obojeni dodatkom 500 µl lizirajućeg rastvora koji sadrži NaLS, hlorovodoničnu kiselinu, vodu i izopropanol (18). Apsorbanca tako dobijenog obojenog rastvora merena je na 570 nm. Rezultati su prikazni kao srednja vrednost tri merenja.

Procena bezbednosnog profila model podloga primenom in vivo tehnika bioinženjeringa kože - eritema indeks, transepidermalni gubitak vlage, pH kože i hidratacija stratum corneum-a

In vivo procena iritacionog potencijala uzoraka sprovedena je primenom savremenih neinvazivnih tehnika bioinženjeringa kože u 24-očasovnoj studiji pod okluzijom. Ispitivanje je sprovedeno na deset zdravih dobrovoljaca (24,9 ± 1,8 godina) koji su pre početka ispitivanja detaljno informisani o mogućim efektima tretmana i o pravilima ponašanja za vreme ispitivanja. Ispitanici su bili u obavezi da dva dana pre početka, kao i tokom ispitivanja ne koriste lekove i kozmetičke proizvode za negu i čišćenje kože. Studija je sprovedena u skladu sa protokolom Etičkog komiteta, a svi ispitanici potpisali su pisani pristanak.

Ispitanici su, u skladu sa protokolom, pre početka merenja 30 minuta adaptirani na uslove prostorije u kojoj je merenje vršeno (23 ± 1°C i vlažnost 35 ± 5 %), nakon čega su izvršena merenja bazalnih vrednosti. Mereni su sledeći parametri: vlažnost *stratum corneum*-a (SCH), transepidermalni gubitak vlage (TEGV), pH vrednost kože i eritema indeks (EI), na volarnim stranama podlaktice, na površinama (16 cm²) unapred utvrđenim kartonskim šablonima. Nakon inicijalnih merenja, naneti su ispitivani uzorci (model podloga sa APG emulgatorom, sa i bez IPA), preko kojih je naneta okluzija u vidu silikonskog filma (Parafilm[®], SAD) i fiksirana adhezivnim trakama. Merenja su sprovedena primenom uređaja firme Courage + Khazaka (Keln, Nemačka): Combi[®] 3 (pH kože i SCH), Mexameter[®] MX18 (EI) i Tewameter[®] TM 210 (TEGV).

Statistička analiza

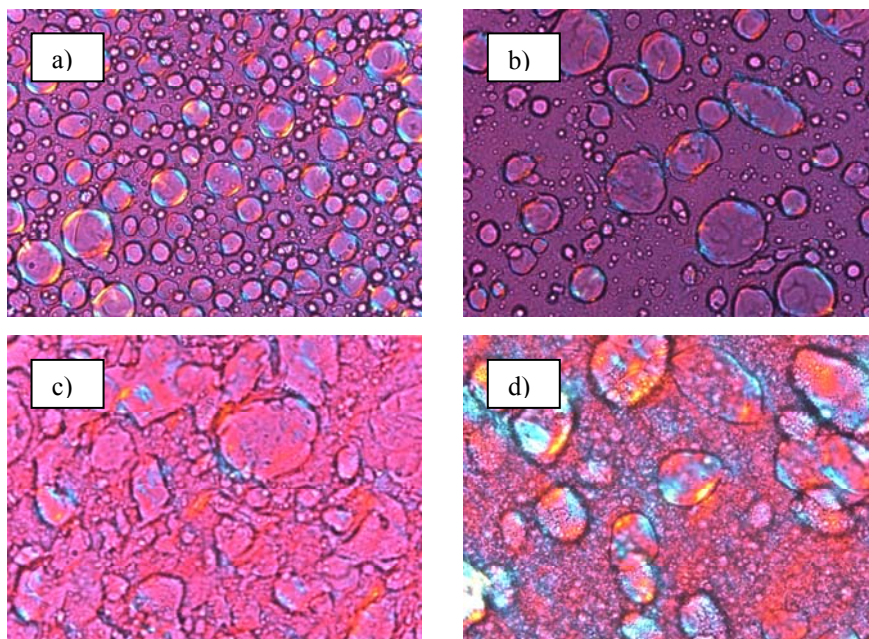
Parametri *in vivo* merenja izraženi su kao procentne promene vrednosti izmerenih nakon okluzije (1h posle uklanjanja), u odnosu na bazalne vrednosti. Efekti ispitivanih uzoraka (podloge sa APG emulgatorom, sa i bez IPA, kao i oficinalne podloge, sa i bez IPA) poređeni su na sledeći način: poređenje

rezultata dobijenih nakon uklanjanja okluzije u odnosu na bazalne vrednosti; poređenje rezultata ispitivanih uzoraka u odnosu na netretiranu kontrolu sa i bez okluzije (NKO i NK). Statistička procena izvedena je primenom testa jednofaktorska ANOVA (*post hoc* Tukey test kada je to bilo neophodno) u statističkom programu SigmaStat 3.11 verzije za Windows. Statistička značajnost podešena je na $p < 0,05$.

Rezultati i diskusija

Fizičkohemijska stabilnost i karakterizacija koloidne strukture ispitivanih emulzionih sistema

Anizotropne strukture koje se vide na polarizacionim mikrografijama uzoraka sa APG emulgatorom (Slika 1) ukazuju na tečnu kristalnu ili gel kristalnu fazu lamelnarnog tipa, a definisane su kao deformisani Malteški krstovi (19).



Slika 1. Polarizacione mikrografije uzoraka (600x):

a) A, b) AIPA, c) N i d) NIPA.

Figure 1. Polarization micrographs (600x) of samples: a) A, b) AIPA, c) N and d) NIPA.

Rezultati prethodnih istraživanja Savić i saradnika (5), ukazali su da alkil poliglukozidni emulgator, korišćen u ovoj studiji, pokazuje izraženo mezomorfno ponašanje, odnosno sposobnost formiranja lamelarnih tečnih kristala i lamelarne gel faze kako u binarnim sistemima sa vodom, tako i u emulzionim nosačima sa trigliceridima srednje dužine lanca. Polarizacione mikrofografije pokazuju da nije došlo do razaranja emulzione strukture test uzorka kao ni referentnog uzorka u prisustvu izopropil alkohola.

Nakon inkorporiranja lekovitih supstanci u uzorak A, njegova karakteristična struktura ostala je očuvana i to u najvećoj meri u prisustvu ibuprofena. Mikrofografije uzoraka sa IPA i aktivnim supstancama ukazuju na značaj IPA kao korastvarača, naročito za model supstancu Ib, koja je praktično nerastvorna u vodi (Slika 2).

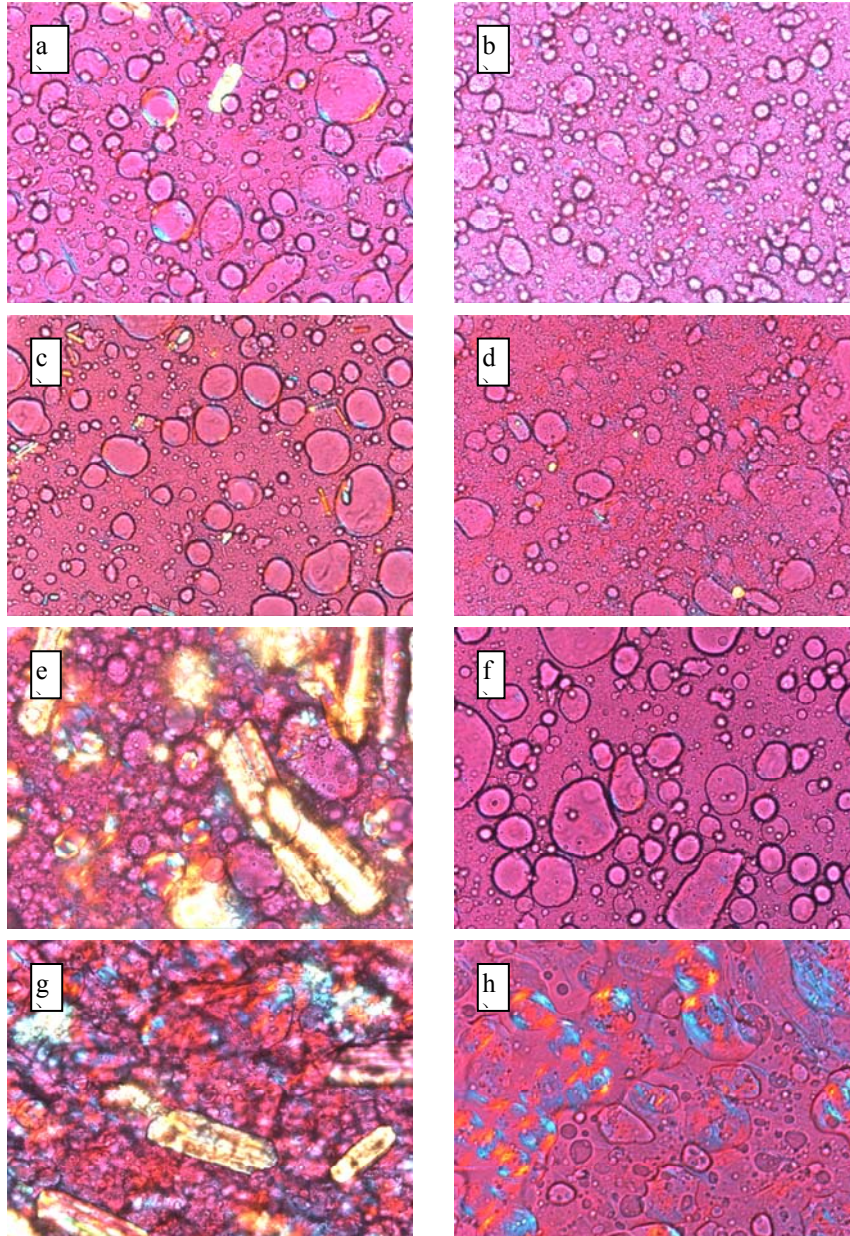
Bitno je istaći da je i po dodatku većeg udela IPA (do 20% (m/m)), upotrebljena koncentracija emulgatora bila dovoljna da postigne zadovoljavajuću stabilnost podloge *per se*, ali ne i u slučaju uzoraka sa DNa, gde je do izražaja došao uticaj prirode lekovite supstance (amfifil tipa elektrolita).

Na osnovu rezultata ispitivanja pH vrednosti i električne provodljivosti u periodu od 90 dana, može se zaključiti da su ispitivani uzorci pokazali zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost, jer nije došlo do značajnih promena vrednosti praćenih parametara (Tabela III).

Tabela III pH vrednosti i električne provodljivosti ispitivanih uzoraka (A i N serije) 7, 30 i 90 dana nakon izrade.

Table III pH and conductivity values of investigated samples (A and N series), assessed 7, 30 and 90 days after samples preparation.

Formulacija	pH vrednost			Električna provodljivost ($\mu\text{S/cm}$), $t=25 \pm 0,5^\circ\text{C}$		
	7 dana	30 dana	90 dana	7 dana	30 dana	90 dana
N	4,3	3,8	3,7	5,2	5,0	3,2
NIPA	4,5	4,1	3,9	5,4	5,8	2,7
A	4,7	4,30	4,1	13,9	8,4	10,1
AIPA	4,8	4,5	4,5	7,5	4,3	3,7
NDNa	7,7	7,6	7,3	49,8	60,9	17,1
NIPADNa	7,4	7,3	7,1	46,9	26,1	27,0
ADNa	7,4	7,2	7,1	79,1	87,5	63,7
AIPADNa	7,4	8,5	8,1	88,6	80,9	79,6
NDDA	7,7	7,7	7,1	61,7	36,7	28,6
NIPADDA	7,4	7,2	7,0	45,2	30,1	26,1
ADDA	7,2	7,1	7,0	68,5	84,3	47,4
AIPADDA	7,3	7,1	7,0	8,3	44,4	44,7
Nib	4,2	3,8	3,7	4,9	5,9	3,4
NIPAib	4,3	4,0	4,0	6,3	2,8	1,9
Alb	4,8	4,6	4,5	16,0	14,7	4,2
AIPAib	4,6	4,3	4,2	13,0	7,8	3,9



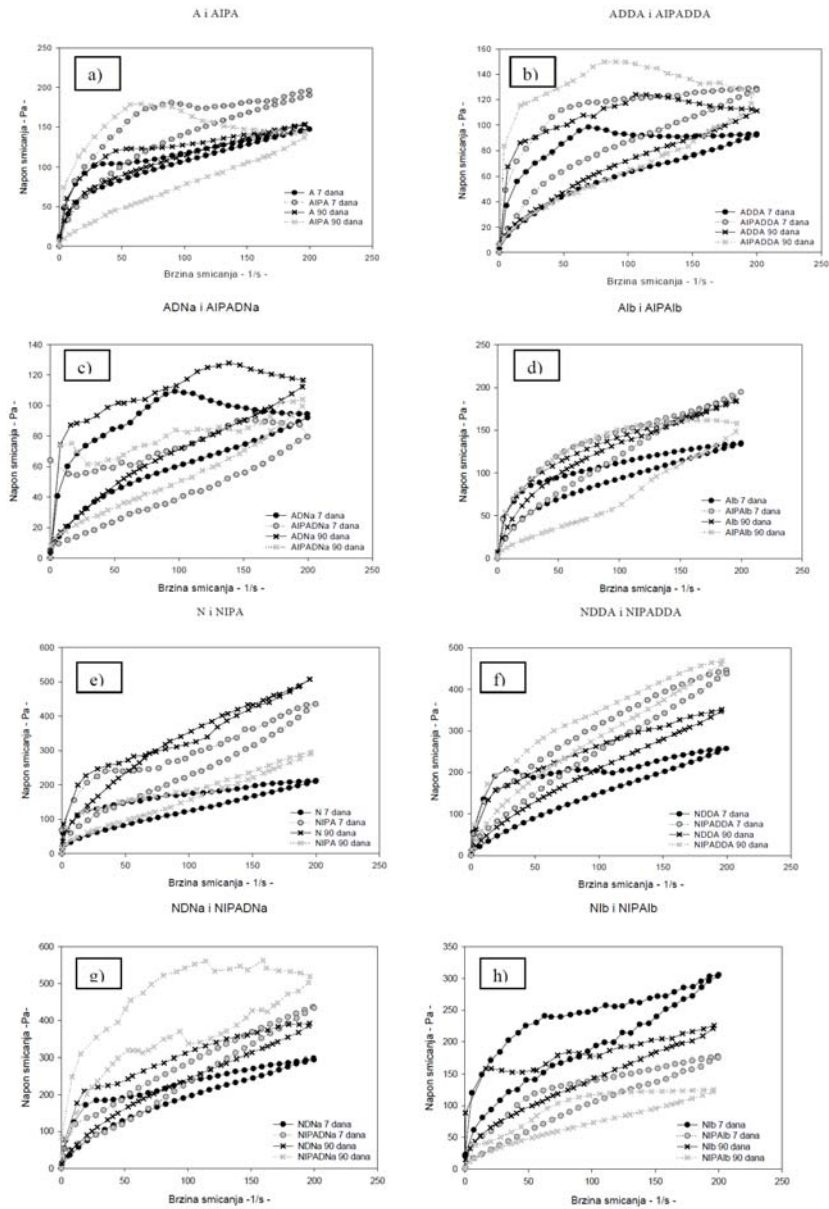
Slika 2. Polarizacione mikrografije uzoraka (600x): a) ADDA, b) AIPADDA, c) ADNa, d) AIPADNa, e) Aib, f) AIPAib, g) Nib i h) NIPAib.

Figure 2. Polarization micrographs (600x) of samples: a) ADDA, b) AIPADDA, c) ADNa, d) AIPADNa, e) Aib, f) AIPAib, g) Nib and h) NIPAib.

Izmerene vrednosti električne provodljivosti za A i N uzorke, bez i po dodatku IPA (AIPA i NIPA) pokazuju da se radi o multifaznim ulje/voda emulzionim sistemima, koje karakteriše kompleksna mikrostruktura, sa dva tipa vode: slobodna i vezana voda. Slično polarizacionim mikrofotografijama, vrednosti električne provodljivosti nosača sa APG emulgatorom, u koje su inkorporirane aktivne supstance, ukazuju na činjenicu da dodatak mezogenih aktivnih supstanci - diklofenak-dietilamin i diklofenak-natrijum (20), dovodi do promena u strukturi ovih nosača, odnosno do promena u načinu raspodele vode u ovim sistemima, što je slučaj i sa referentnom podlogom. Dodatak ibuprofena, sa i bez IPA, nije doveo do ovakvih promena.

Određivanje reoloških osobina – nepovratnih viskoznih, delimično povratnih viskoelastičnih i povratnih elastičnih osobina – pruža pouzdane i raznovrsne informacije o strukturnim osobinama kremova (21). Kontinualna reološka merenja, u kojima se ispitivani uzorak podvrgava kontinuiranom stresu (brzina smicanja) koji se u toku vremena konstantno povećava (uzlazna kriva), a zatim smanjuje (silazna kriva), uglavnom daju pouzdane informacije o fizičkoj stabilnosti. U zavisnosti od primenjenih brzina smicanja, ova merenja mogu pružiti podatke značajne za proces proizvodnje - o ponašanju kremova u toku procesa proizvodnje (više brzine smicanja) ili podatke značajne sa aspekta aplikacije kremova (niže brzine smicanja).

Kao što je i očekivano silazne krive ispitivanih sistema su ispod uzlaznih (Slika 3), što predstavlja karakteristiku polučvrstih sistema koji pokazuju vremenski zavistan efekat: tiksotropiju. Tokom smicanja, dolazi do delimičnog razaranja unutrašnje strukture (rastečnjavanja), a po prestanku smicanja ili smanjenju primenjenog stresa, dolazi do delimičnog oporavka strukture. Ovo je vremenski zavisni proces zbog čega je i oporavak delimičan, a stajanjem se sistem vraća u početno stanje. Jedino je kod referentnog uzorka (N) došlo do preklapanja uzlazne i silazne krive, odnosno pojave reopeksije, koja ukazuje na činjenicu da u toku samog procesa smicanja dolazi do izvesnog strukturiranja sistema. Svi uzorci pokazali su (pseudo)plastičan tip proticanja, odnosno postojanje prinosnog napona, što uz rastečnjavanje tokom smicanja ukazuje na viskoelastične osobine kremova (21). Sa reograma se jasno uočava da je tokom stajanja došlo do strukturiranja sistema, pri čemu se izvesna nehomogenost kod uzoraka sa IPA može objasniti isparavanjem alkohola tokom merenja.

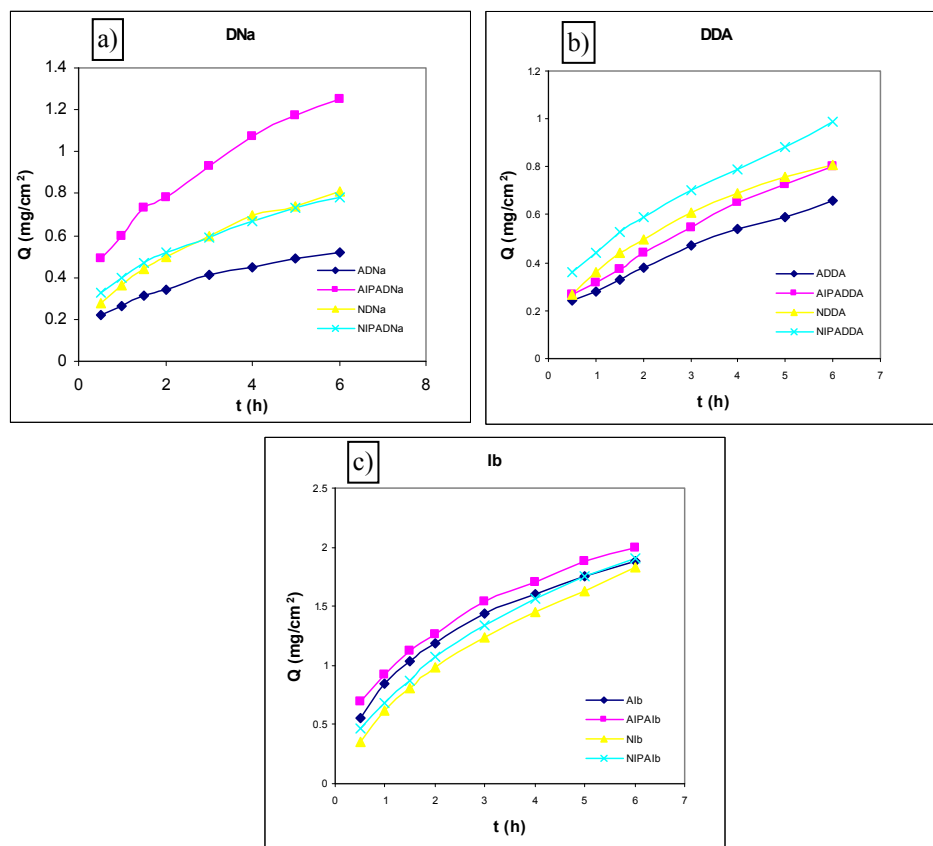


Slika 3. Krive tečenja ispitivanih uzoraka: inicijalne (nakon 7 dana) i posle 90 dana: a) A / AIPA, b) ADDA / AIPADDA, c) ADNa / AIPADNa, d) AIB / AIPAIB, e) N / NIPA, f) NDDA / NIPADDA, g) NDNa / NIPADNa, h) NIB / NIPAIB.

Figure 3. Flow behaviour of evaluated samples: initial (7 days) and 90 days after preparation: a) A / AIPA, b) ADDA / AIPADDA, c) ADNa / AIPADNa, d) AIB / AIPAIB, e) N / NIPA, f) NDDA / NIPADDA, g) NDNa / NIPADNa, h) NIB / NIPAIB.

***In vitro* ispitivanje liberacionih profila NSAIL iz A i N podloga**

Iako je primena Francovih difuzionih ćelija prihvaćena kao preporučena metoda ispitivanja profila oslobađanja lekovitih supstanci iz lokalnih polučvrstih preparata, komparativne studije pokazale su da se u istu svrhu može koristiti i uobičajena aparatura za *Dissolution test* uz dodatak VanKel inhenser/difuzione ćelije, s obzirom da se dobijaju slični rezultati (22, 23). Pored preliminarnog uvida u bioraspoloživost na/u koži, navedeno ispitivanje se u slučaju dermofarmaceutskih preparata smatra korisnim za procenu uniformnosti kvaliteta preparata, odnosno razlika koje se javljaju pri eventualnim promenama formulacije (24).



Slika 4. Liberacioni profili model NSAIL: a) DNa, b) DDA i c) Ib, predstavljeni kao kumulativna količina oslobodene supstance po jedinici površine membrane (mg/cm^2), u funkciji vremena.

Figure 4. Model NSAIDs liberation profiles: a) DNa, b) DDA and c) Ib, presented as cumulative amount of substance released per membrane surface unit (mg/cm^2), versus time.

Za sve tri model supstance primećeno je nešto bolje oslobađanje iz uzoraka sa IPA, u poređenju sa korespondentnim podlogama gde ovaj korastvarač nije dodat. Ipak, jedino u slučaju DNa može se govoriti o statistički značajnoj razlici, pošto $Q_{t=6h}$ za uzorak ADNa iznosi $0,52 \pm 0,03 \text{ mg/cm}^2$, a za AIPADNa $1,25 \pm 0,03 \text{ mg/cm}^2$, (slika 4a). Ovo se može dovesti u vezu sa izraženim uticajem prirode diklofenak-natrijuma (amfifil tipa elektrolita), koja je odgovorna i za nestabilnost tog uzorka, pri čuvanju dužem od mesec dana. Navedene karakteristike uzorka AIPADNa mogu se iskoristiti u izradi dermatoloških magistralnih lekova, kada je poželjna brza perkutana resorpcija NSAIL, a izrađeni preparat ima ograničenu stabilnost (ne duže od mesec dana).

Izostanak značajne razlike u profilima oslobađanja DDA i Ib (slike 4b i 4c) može se dovesti u vezu sa približnim reološkim profilima navedenih uzoraka. Očekivani uticaj većih vrednosti minimalnih i maksimalnih viskoziteta uzoraka N serije (farmakopejska podloga), verovatno je nadomešten prisustvom kompleksne koloidne strukture (lamelarni tečni kristali i lamelarna gel faza) uzoraka A serije, zbog čega su liberacioni profili DDA i Ib iz oba tipa podloga veoma slični.

Matematičkim modelovanjem pokazano je da kinetiku oslobađanja model NSAIL iz većine uzoraka, najbolje opisuje Higuchi-jev difuzioni model (Tabela V).

Tabela V Koeficijenti korelacije dobijeni regresionom analizom iz profila oslobađanja model NSAIL.

Table V Correlation coefficients assessed by regression analysis of model NSAIDs release profiles.

R^2	<i>Kinetika nultog reda</i>	<i>Kinetika prvog reda</i>	<i>Higuchi-jev model</i>	<i>Hixon-Crowell model</i>
ADNa	0,9680	0,9197	0,9958	0,9384
AIPADNa	0,9794	0,9290	0,9979	0,9495
NDNa	0,9688	0,9034	0,9974	0,9297
NIPADNa	0,9746	0,9218	0,9995	0,9428
ADDA	0,9930	0,9580	0,9908	0,9733
AIPADDA	0,9916	0,9541	0,9891	0,9706
NDDA	0,9668	0,8948	0,9986	0,9237
NIPADDA	0,9867	0,9370	0,9963	0,9580
AIb	0,9465	0,8457	0,9933	0,8855
AIPAib	0,9765	0,8675	0,9987	0,9151
NIb	0,9702	0,8415	0,9993	0,8966
NIPAib	0,9735	0,8820	0,9990	0,9205

Oslobađanje NSAIL predominantno po Higuchi-jevom modelu u skladu je sa prirodom datih sistema i može se objasniti činjenicom da su sve model supstance inkorporirane suspendovanjem u izrađene emulziona nosače.

Izuzetno, kod uzoraka ADDA i AIPADDA uočena je bolja korelacija sa kinetikom nultog reda. Razlika u kinetici oslobađanja DDA iz sistema stabilisanih APG emulgatorom može se dovesti u vezu sa izrazito mezogenom prirodom ove lekovite supstance. Ona očigledno stupa u interakcije sa koloidnom mikrostrukturom emulzionog sistema (25), pošto je APG emulgator sposoban da gradi kompleksne tečno-kristalne strukture koje solubilizuju lek i uslovljavaju modifikovano oslobađanje diklofenak-dietilamina.

U cilju procene uticaja raspodele model supstanci unutar polarnih i nepolarnih delova mikrostrukture emulzionih podloga, radi jasnijeg sagledavanja liberacionih profila, određen je particioni koeficijent DNa i DDA u smeši triglicerida srednje dužine lanca i prečišćene vode, nakon 24h mešanja na sobnoj temperaturi (26). Negativne vrednosti izračunatih particionih koeficijenata (tabela VI) ukazuju na hidrofilni karakter supstanci, i mogućnost njihovog značajnijeg raspoređivanja u vodenoj fazi emulzione podloge/nosača (niže vrednosti particionih koeficijenata dovode se u vezu sa povećanjem afiniteta leka ka nosaču (27)). Dodatak IPA nije mogao biti ispitan, s obzirom na sposobnost mešanja sa polarnom i nepolarnom fazom sistema.

Tabela VI Vrednosti particionih koeficijenata DNa i DDA prilagođeni sastavu uzoraka A i N.

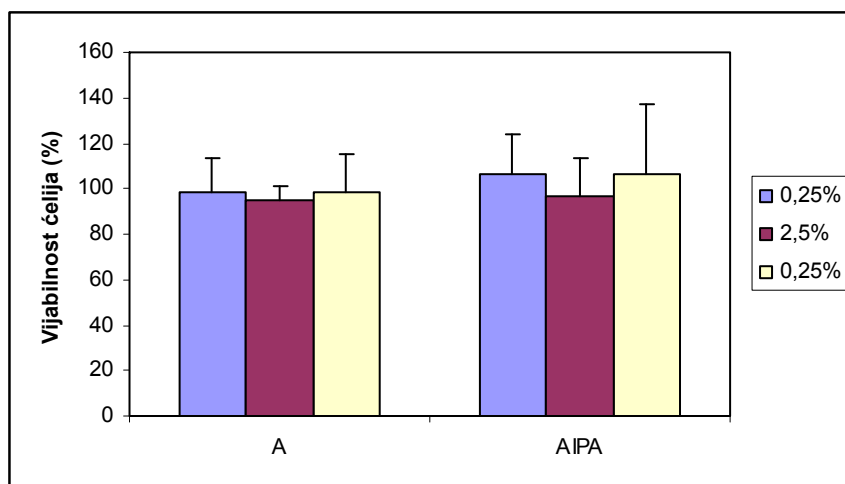
Table VI DNa and DDA partition coefficients, adjusted to samples A and N composition.

Uzorak	<i>P</i>	<i>logP</i>
ADNa	0,06	-1,25
NDNa	0,36	-0,45
ADDA	0,18	-0,75
NDDA	1,02	0,01

Rezultati in vitro studije citotoksičnosti na modelima humane kože

U ovom delu studije primenjen je trodimenzioni model humane kože sa funkcionalnim *stratum corneum*-om. Cilj je bio dvojak: prvo, da se proceni iritacioni potencijal samog APG emulgatora, a potom i uticaj dodatog IPA (10% (m/m)), kao korastvarača i potencijalnog penetracionog inhensera. Oba ispitivana uzorka (A i AIPA) pokazala su minimalne efekte na vijabilnost ćelija kultivisane humane kože. Čak i pri koncentraciji ispitivanog uzorka od 25%, vijabilnost ćelija bila je preko 95% (za uzorak A 98,9±16,9%, a za uzorak AIPA 102,4±30,5%). Imajući u vidu da je granično prihvatljiva vijabilnost humanih fibroblasta u *in vitro* studiji iritacionog potencijala 50%, može se zaključiti da u ispitivanim koncentracijama ne postoji statistički značajna razlika u uticaju

uzoraka A i AIPA na vijabilnost ćelija veštačke humane kože. Ovakav nalaz ukazuje na veoma dobar bezbednosni profil ispitivanog emulgatora, ali i odgovarajućih formulacija model podloga, uključujući i podloge sa 10% (m/m) izopropil alkohola (slika 5).



Slika 5. *In vitro* ispitivanje iritacionog potencijala model podloga (A, AIPA), predstavljeno grafički kao zavisnost vijabilnosti ćelija od koncentracije ispitivanih podloga.

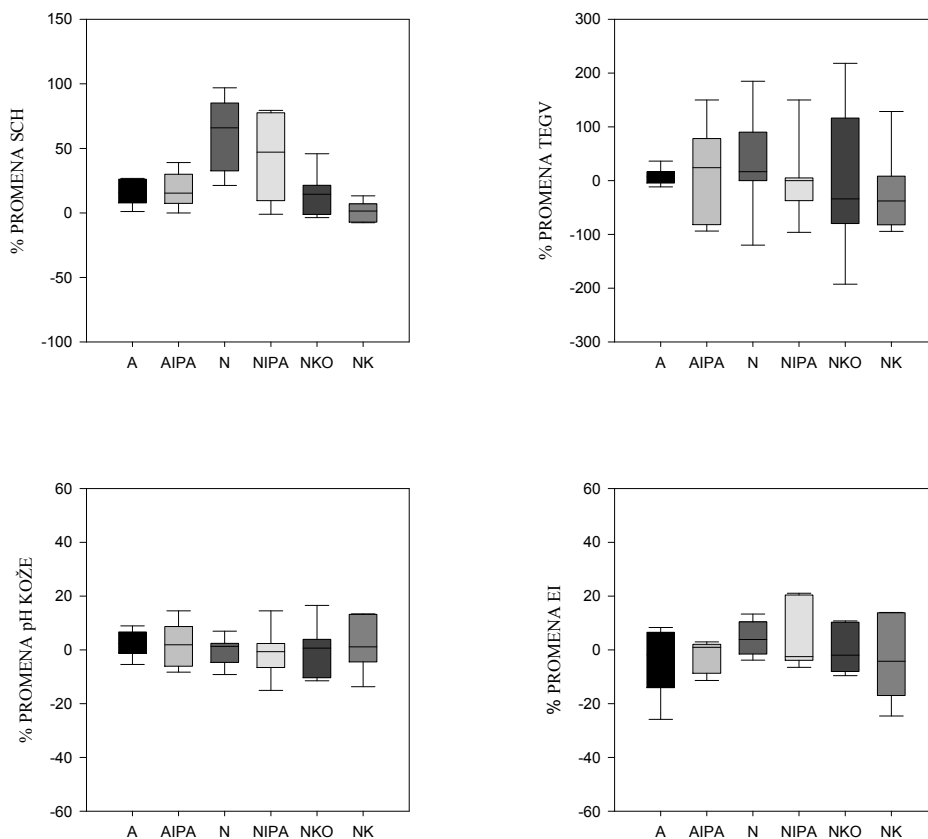
Figure 5. *In vitro* skin irritation test of model vehicles (A, AIPA), presented as concentration-viability histograms.

Rezultati in vivo studije sprovedene primenom metoda bioinženjeringa kože

In vivo studija pod okluzijom sprovedena je u cilju određivanja iritacionog potencijala model podloga A serije na humanim dobrovoljcima, što je najbolji pokazatelj njihovog bezbednosnog profila. Da bi se došlo do relevantnih zaključaka, procenjen je uticaj ispitivanih uzoraka i referentne (farmakopejske) podloge na sledeće parametre: EI, TEGV, SCH i pH kože. Primenjene metode predstavljaju savremene neinvazivne tehnike koje se koriste u cilju procene efekata dermofarmaceutskih i kozmetičkih preparata na humanu kožu (28).

Na slici 6 grafički su prikazani rezultati ovih ispitivanja u kojima nije došlo do statistički značajnih promena EI, pH kože kao ni TEGV za ispitivane uzorke. Kada je u pitanju SCH, postoji trend porasta ovih vrednosti kod svih uzoraka, dok je on statistički značajan samo za N i NIPA uzorak. Interesantno je

napomenuti da ovaj trend kod uzoraka sa IPA pokazuje da ovaj alkohol nije doveo do (očekivanog) isušivanja kože.



Slika 6. Uticaj ispitivane podloge sa APG emulgatorom, bez i sa IPA (A i AIPA), i oficinalne/referente podloge (N, NIPA) na vlažnost *stratum corneum*-a (SCH), transepidermalni gubitak vlage (TEGV), pH kože i eritema indeks (EI). Promene vrednosti ispitivanih parametara nakon uklanjanja okluzije izražene su u procentima u odnosu na bazalne vrednosti.

Figure 6. Influence of investigated APG-based vehicles, with and without IPA (A and AIPA), as well as referent vehicles (N, NIPA) on SCH, TEWL, pH of the skin and EI. Parameters are expressed as the percentage change of recorded values after occlusion removal, compared to basal values.

Dobijeni rezultati upućuju na zadovoljavajući bezbednosni profil ispitivanih podloga/nosača i dobar hidratišući potencijal kože, koji je neophodno, dodatno, ispitati u dugoročnim studijama na humanim dobrovoljcima.

Zaključak

Sprovedena fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija kao i procena bezbednosnog profila ukazuje na zadovoljavajuću preliminarnu stabilnost i lokalnu podnošljivost podloga sa mešanim emulgatorom (Alkil glukozid), koji ima status farmaceutskog ekscipijensa, prema FDA. Ispitivanja su rađena u poređenju sa referentnom farmakopejskom podlogom (DAB 2006). Od interesa je istaći da dodatak 20 % (m/m) IPA nije narušio fizičku stabilnost APG emulzionog sistema *per se*, ali su u slučaju inkorporiranja DNa, kao amfifila tipa elektrolita, zapaženi znaci fizičke nestabilnosti posle 30 dana.

Sve model supstance iz grupe NSAIL pokazale su zadovoljavajuće profile oslobađanja iz novo-razvijenih formulacija podloga u poređenju sa Nejonskim hidrofilnim kremom, kao podlogom dokazanog kvaliteta. Očigledna je korelacija prikazanih rezultata *in vitro* i *in vivo* procene bezbednosti, što ukazuje na veoma dobru podnošljivost podloga stabilisanih mešanim emulgatorom pod nazivom Alkil glukozid.

Fizičko-hemijske karakteristike ispitanih jednostavnih podloga sa prirodnim mešanim emulgatorom APG tipa, koje su pokazale i povoljan bezbednosni profil, ukazuju da bi se ispitane podloge mogle koristiti za izradu dermatoloških magistralnih lekova.

Ispitivane podloge sa APG emulgatorom, jednostavnog sastava i postupka izrade, odlikuje i jednostavnost upotrebe prilikom inkorporiranja lekovitih supstanci u izradi magistralnih lekova u apoteci odnosno one ispunjavaju zahteve koji se odnose na kvalitet podloga široke namene (tzv. *ready-to-use* podloge).

Zahvalnica

Rad je urađen u okviru projekta TR 19058 finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Literatura

1. Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci* 2009; 31: 1-19.
2. Savić S, Savić M, Tamburić S, Vuleta G, Vesić S, Müller-Goymann C. An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: The influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation. *Eur J Pharm Sci* 2007; 30: 441-50.
3. www.seppic.com (poslednji pristup 15.01.2010.)
4. Savić S, Tamburić S, Savić M, Cekić N, Milić J, Vuleta G. Vehicle-controlled effect of urea on normal and SLS-irritated skin. *Int J Pharm* 2004; 271: 269-80.
5. Savić S, Vuleta G, Daniels R, Müller-Goymann C. Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized with an alkylpolyglucoside non-ionic emulsifier. *Colloid Polym Sci* 2005; 283: 439-51.
6. Savić S, Savić M, Vesić S, Vuleta G, Müller-Goymann C. Vehicles based on a sugar surfactant: Colloidal structure and its impact on in vitro/in vivo hydrocortisone permeation. *Int J Pharm* 2006; 320: 86-95.
7. Baudonnet L, Grossiord J-L, Rodriguez F. Physicochemical characterization and in vitro release of salicylic acid from o/w emulsions prepared with Montanov 68®: Effect of formulation parameters. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 975-84.
8. Daniels R, Knie U. Galenics of dermal products – vehicles, properties and drug release. *JDDG*; 5: 367-83.
9. Stanos S. Topical agents for the management of musculoskeletal pain. *J Pain Symptom Manage* 2007; 33: 342-55.
10. Buggins T, Dickinson P, Taylor G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. *Adv Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 1482-503.
11. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is an average below 5, which is beneficial for its resident flora, *Int J Cosmet Sci* 2006; 28: 359-70.
12. Deutsches Arzneibuch 2006, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart&Govi Verlag GmbH, 2006
13. Sweetman S. ed. Martindale: The Complete Drug Reference, 36th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.
14. United States Pharmacopoeia 30, National Formulary 25, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, 2007.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
16. Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicology in Vitro* 2002; 16: 557-72.

17. www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Products_Information_Sheet/1/k4002pis.pdf (poslednji pristup 03.02.2010.)
18. Savić S, Weber C, Tamburić S, Savić M, Müller-Goymann C. Topical vehicles based on natural surfactant/fatty alcohols mixed emulsifier: The influence of two polyols on the colloidal structure and in vitro/in vivo skin performance. *J Pharm Sci* 2009; 98 (6): 2073-90.
19. Fairhurst CE, Fuller S, Graz J, Holmes MC. Lyotropic surfactant liquid crystals. In: Demus D, Goodby J, Gray GW, Spiess HW, Vill V. eds. *Handbook of liquid crystals*, vol 3. Weinheim: Wiley-VCH, 1998: 341-92.
20. Kriwet K, Müller-Goymann C. Binary diclofenac diethylamine – water systems: Micelles, vesicles and lyotropic liquid crystals. *J Pharm Biopharm* 1993; 36 (6): 234-38.
21. Korhonen M, Lehtonen J, Hellen L, Hirvonen J, Yliruusi J. Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactants. *Int J Pharm* 2002; 247: 103-14.
22. Sanghvi P, Collins C. Comparison of diffusion studies of hydrocortisone between the Franz cell and the enhancer cell. *Drug Dev Ind Pharm* 1993; 19 (13): 1573-85.
23. Rege P, Vilivalam 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.
24. Shah V, Elkins J, Williams R. Importance of in vitro release measurement in topical dermatological dosage forms. In: Bronaugh R, Maibach H. eds. *Topical absorption of dermatological products*. New York: Marcel Dekker Inc, 2001: 283-98.
25. Kriwet K, Müller-Goymann C. Diclofenac release from phospholipids drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int J Pharm* 1995; 125: 231-42.
26. Herkenne C, Naik A, Kalia Y, Hadgraft J, Guy R. Effect of propylene glycol on ibuprofen absorption into human skin in vivo. *J Pharm Sci* 2008; 97 (1): 185-97.
27. Bendas B, Schmalfuß U, Neubert R. Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanisms of drug transport from hydrogels. *Int J Pharm* 1995; 116: 19-30.
28. An S, Lee E, Kim S, Nam G, Lee H et al. Comparison and correlation between stinging responses to lactic acid and bioengineering parameters. *Contact Dermatitis* 2007; 57: 158-162.

Physicochemical characterization and safety evaluation of model vehicles based on alkyl polyglucoside emulsifier for the incorporation of NSAID

Ivana Jakšić^{1*}, Milica Lukić¹, Mirjana Rajić²,
Katarina Jončić-Savić², Vesna Radulović², Jela Milić¹,
Snežana Savić¹

¹ Institute of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, University of Belgrade

² Institute for Research and Development, Galenika a.d., Batajnički drum bb, Belgrade

Summary

A growing interest in natural surfactants characterized as *skin- and environment-friendly* has been observed recently, especially in a group of alkyl polyglucoside (APG) emulsifiers, comprised of natural-origin sugar units and fatty alcohol.

The aim of this study was to evaluate the potential of a natural mixed emulsifier (cetostearyl glukozide&cetostearyl alcohol) as an excipients for stabilisation of emulsion vehicles for model NSAID drugs. Formulations were kept as simple as possible, in order to assess their use in compounding practice or as so-called *ready-to-use* vehicles. Taking into consideration poor solubility of many, particularly new drug entities, the addition of isopropyl alcohol as a co-solvent and potential penetration enhancer was varied.

Characterization of both active and placebo samples (prior to drug incorporation), was organized in three phases that included physicochemical investigation, preliminary NSAID bioavailability screening and safety profile assessment.

Results obtained suggest satisfactory physicochemical stability of investigated simple vehicles based on natural mixed emulsifier, followed by an exceptional safety profile. Additionally, emulsion vehicles demonstrated an ability to sustain alcohol phase (10% m/m). It can be concluded that these vehicles present promising tools in preparation of various galenic dermatological preparations.

Keywords: Alkyl polyglucoside emulsifier, isopropyl alcohol, NSAID, physicochemical characterization, *in vitro/in vivo* safety profile assessment