

Uticaj faktora formulacije na fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike ketoprofen 2,5% gela

**Katarina Jončić-Savić^{1*}, Jelena Pešić¹, Mirjana Rajić¹,
Milica Lukić², Ivana Jakšić², Jela Milić², Snežana Savić²,
Gordana Vuleta²**

¹ Institut za istraživanje i razvoj, Galenika a.d., Batajnički drum bb,
Beograd

² Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutski
fakultet, Vojvode Stepe 450, Beograd

Kratak sadržaj

Poslednjih godina se sve više pažnje posvećuje razvoju i karakterizaciji podloga kao nosača lekovitih supstanci (aktivni farmaceutski sastojak, *eng.* API) u farmaceutskim oblicima polučvrste konzistencije za primenu na koži ili sluzokoži. S obzirom da ispitivanja novih lekovitih supstanci zahtevaju velika ulaganja i dugo trajanje, jedan od pristupa unapređenja terapije bolesti kože, sluzokože ili bolova u mišićima i zglobovima, usmeren je ka modifikaciji postojećih podloga i razvoju i karakterizaciji novih nosača lekovitih supstanci.

Cilj rada je bio da se ispita uticaj variranja različitih faktora formulacije kao što su tip i koncentracija sredstva za geliranje, koncentracija izopropil alkohola (IPA) kao rastvarača i „pojačivača”/inhenjera penetracije, fizičko-hemijske karakteristike uzoraka aktivne supstance (ketoprofen), nabavljenih od različitih proizvođača, na osobine i stabilnost hidrofилnog gela sa 2,5% (m/m) ketoprofena.

Karakterizacija pripremljenih uzoraka ketoprofen gela sprovedena je kroz fizičko-hemijska i biofarmaceutska ispitivanja i ispitivanje stabilnosti.

Dobijeni rezultati ukazuju na zadovoljavajuću stabilnost ispitivanih uzoraka, kao i na to da faktori formulacije koji ispoljavaju najveći uticaj na fizičko-hemijske karakteristike preparata ketoprofen gela jesu: tip upotrebljenog gelirajućeg sredstva,

zatim koncentracija korišćenog sredstva za geliranje, a najmanji uticaj ima koncentracija IPA (u ispitivanom opsegu).

Poređenjem profila oslobađanja lekovite supstance iz ispitivanih formulacija karbomernih gelova, nije zapažen značajan uticaj variranih faktora (koncentracije gelirajućeg sredstva i IPA) na oslobađanje ketoprofena.

Ključne reči: Ketoprofen, karbomerni gel, izopropil alkohol, reološka karakterizacija, profili oslobađanja, ispitivanje stabilnosti.

*Adresa autora za korespondenciju: katarinajoncics@gmail.com

Uvod

Ketoprofen pripada grupi nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), koji se često upotrebljavaju za lečenje hroničnih inflamatornih procesa. Ograničena efikasnost i neželjeni efekti, kao što su iritacija gastrointestinalnog trakta (GIT), prilikom primene peroralnih farmaceutskih oblika ketoprofena (film tablete, tvrde kapsule sa produženim oslobađanjem), doveli su do razvoja farmaceutskih oblika podesnih za alternativne puteve primene, pre svega hidrofilnih gelova ketoprofena (1). Jednostavne formulacije vodeno-alkoholnih gelova često se koriste kao nosači za slabo rastvorne API, kakav je ketoprofen. Očekivano je da se primenom gelova na bazi alkohola može unaprediti isporuka API iz grupe NSAIL, odnosno ostvariti bolja penetracija leka u kožu, kako zbog poboljšanja rastvorljivosti lekovite supstance u nosaču, tako i zbog mogućih interakcija alkohola sa lipidima kožne barijere i posledičnog povećanja permeabilnosti kože. S druge strane, upotreba alkohola u kombinaciji sa gelirajućim sredstvima iz grupe hidrofilnih polimera često je ograničena potencijalnim interakcijama (2). Poznato je da faktori formulacije, koji se dovode u vezu sa reološkim ponašanjem sistema, u velikoj meri mogu da utiču na osobine i kvalitet preparata polučvrste konzistencije, uključujući *in vitro* profile oslobađanja leka iz podloge/nosača (3-5).

U ovom radu razvoj formulacije ketoprofen 2,5% (m/m) gela, koncipiran je tako da se upotrebom različitih tipova karbomera, kao sredstava za geliranje (karbomer 940 i karbomer 934P) u različitim koncentracijama (1,5% i 1,8%), i upotrebom izopropil alkohola (IPA), kao rastvarača za ketoprofen i potencijalnog pojačivača penetracije (koncentracije od 20% (m/m) i 25% (m/m)), dobiju proizvodi odgovarajućih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika. U toku preliminarnih ispitivanja izrađeni su uzorci gelova sa nižom koncentracijom karbomera (1% (m/m)); dobijeni gelovi bili su

neodgovarajuće konzistencije (suviše tečni), bilo da se radilo o karbomeru tipa 934P ili 940, tako da su ove formulacije izostavljene iz daljih ispitivanja.

Karbomeri su nerastvorni polimeri akrilne kiseline koji u vodenom rastvoru nakon neutralizacije daju gelove različitog reološkog ponašanja (2). Reološko ponašanje rastvora polimera određeno je ne samo polimer-polimer konformacijama i umreženošću već i koncentracijom polimera i polimer-rastvarač efektima (2). Sa industrijskog aspekta, reološke karakteristike proizvoda za primenu na koži od značaja su ne samo kao merilo kvaliteta, bitno za specifikaciju finalnog proizvoda, već i kao parametar in-procesne kontrole, čijom se proverom mogu pratiti farmaceutsko-tehnološke operacije u proizvodnom postupku i definisati procesni parametri (temperatura, brzina i vreme mešanja) tokom validiranja procesa proizvodnje. Pored toga, poznato je da reološke osobine utiču i na ponašanje proizvoda u toku prenosa mase sistemom cevi, punjenja u ambalažu, kao i prilikom primene proizvoda (istiskivanje proizvoda iz kontejnera/unutrašnjeg pakovanja) i razmazivanja na koži.

Variranje koncentracije IPA tokom formulacije proizvoda vršeno je u cilju ispitivanja uticaja na fizičko-hemijske karakteristike i oslobađanje ketoprofena iz ispitivanih uzoraka. Utvrđeno je da je 20% (m/m) izopropil alkohola, minimalna koncentracija ekscipijensa potrebna za rastvaranje lekovite supstance, i njeno održavanje u rastvornom obliku u gotovom proizvodu. Tokom razvoja formulacije, sprovedene su probe i sa IPA u koncentraciji od 30% (m/m), ali su dobijeni gelovi bili neodgovarajuće konzistencije (suviše tečni), i usled toga izostavljeni iz daljih ispitivanja.

Preporuka (6-8) je da se u toku razvoja formulacije koriste farmaceutski aktivne supstance različitih proizvođača, i da se u toku preformulacionih i formulacionih studija utvrdi da li postoje razlike u formulacijama dobijenim upotrebom farmaceutski aktivnih supstanci različitih proizvođača. U slučaju farmaceutskog oblika u kome je aktivna supstanca rastvorena, osobine aktivne supstance ne utiču značajno na osobine gotovog proizvoda, kao kada se formulišu farmaceutski oblici tipa suspenzija, ali mogu znatno da utiču na farmaceutsko-tehnološke operacije u toku procesa proizvodnje, kao što su brzina i vreme mešanja u toku procesa rastvaranja, što svakako treba uzeti u obzir prilikom pripreme za uvođenje proizvoda u redovnu proizvodnju (6-8). Iz tog razloga je u eksperimentalnom radu korišćen ketoprofen dva različita proizvođača: S.I.M.S., Italija i Zhejiang Jiuzhou Pharmaceutical Co.LTD, Kina. Kvalitet ketoprofena oba proizvođača je u skladu sa monografijom Ph. Eur.6.0 (9). Planirano je da se tokom razvoja proizvoda proveru uticaj kvaliteta aktivne supstance dva različita proizvođača na karakteristike uzoraka gelova sprovođenjem studije stabilnosti, a u cilju kvalifikovanja odgovarajućeg

proizvođača za nabavku ketoprofena. Ovo je od velikog značaja u industriji, zbog mogućnosti da se aktivna supstanca jednog proizvođača (usled bilo kakvih problema vezanih za kvalitet API jednog od proizvođača ili nabavku API) nesmetano zameni sa API drugog proizvođača, bez ugrožavanja kvaliteta proizvoda (7-10).

Procena kvaliteta i stabilnosti model formulacija ketoprofen gela, praćena je kroz preliminarnu razvojnu studiju stabilnosti, variranjem sledećih test uslova: 25°C/60% relativne vlažnosti (RV), 30°C/65% RV i 40°C/75% RV u periodu od 3 meseca (6). Praćeni su/određivani izgled, pH vrednost, sadržaj ketoprofena i konzervansa (metil parahidroksibenzoata) nakon izrade kao i nakon jednog, dva, odnosno tri meseca čuvanja u svim test uslovima. U cilju verifikacije preliminarne fizičke stabilnosti sistema i izbora optimalne formulacije sa aspekta tipa i koncentracije upotrebljenog sredstva za geliranje, vršena su reološka ispitivanja. Na 4 odabrane model formulacije praćeno je *in vitro* oslobađanje ketoprofena i sprovedeno poređenje profila oslobađanja ispitivanih formulacija, shodno preporukama za ovaj farmaceutski oblik (11-14). Uporedo, neka od navedenih ispitivanja sprovedena su na gotovim lekovima registrovanim u Srbiji: Fastum[®] gel (2,5% (m/m) ketoprofena; Adcock Ingram) i Ketonol[®] Lek (2,5% (m/m) ketoprofena; Sandoz), što tokom razvoja generičkih lekova predstavlja uobičajenu praksu.

Ekperimentalni deo

Materijali

Kao sredstva za geliranje korišćeni su karbomeri: karbomer 940 i karbomer 934P (Lubrizol, Korea) u koncentracijama 1,5% i 1,8% (m/m).

Kao rastvarač i penetracioni „pojačivač“/inhenser teško rastvorne lekovite supstance ketoprofena, korišćen je izopropil alkohol (IPA Brenntag, Austrija) (15-17) u koncentracijama od 20% (m/m) ili 25% (m/m). Kao humektans je upotrebljen propilenglikol (BASF, Nemačka) (17-18) u koncentraciji 15% (m/m). Trietanolamin (BASF, Nemačka) (17) je uključen kao sredstvo za neutralizaciju karbomera u odnosima 1:1,5 i 1:1,35 (karbomer: trietanolamin). Korišćen je u obliku sveže pripremljenog 10% (m/m) vodenog rastvora. Kao konzervans, korišćen je metil parahidroksibenzoat (Ph.Eur 6.0). Sve pomoćne materije korišćene u eksperimentalnom radu imale su kvalitet u skladu sa svojim specifikacijama (19), a kontrolisane su u Službi kontrole kvaliteta Galenike a.d. Beograd. Kvalitativan i kvantitativan sastav uzoraka prikazan je u Tabeli I.

Tabela I Sastav ispitivanih uzoraka ketoprofen gela
Table I Composition of investigated ketoprofen gel samples

Oznaka formula cije	Ketoprofen	Karbomer 940	Karbomer 934P	Izopropil alkohol (IPA)	Propilengli kol	TEA	Metil-p-hidroksi benzoat	Prečišćena voda do
% (m/m)								
5 1,5%	2,5 Zhejiang	1,5	-	20,0	15,0	qs	0,1	100,0
7 1,5%	2,5 Zhejiang	1,5	-	25,0	15,0	qs	0,1	100,0
5 1,8%	2,5 Zhejiang	1,8	-	20,0	15,0	qs	0,1	100,0
7 1,8%	2,5 Zhejiang	1,8	-	25,0	15,0	qs	0,1	100,0
5c 1,5%	2,5 Zhejiang	-	1,5	20,0	15,0	qs	0,1	100,0
7c 1,5%	2,5 Zhejiang	-	1,5	25,0	15,0	qs	0,1	100,0
5c 1,8%	2,5 Zhejiang	-	1,8	20,0	15,0	qs	0,1	100,0
7c 1,8%	2,5 Zhejiang	-	1,8	25,0	15,0	qs	0,1	100,0
5a 1,8%	2,5 S.I.M.S.	1,8	-	20,0	15,0	qs	0,1	100,0
7a 1,8%	2,5 S.I.M.S.	1,8	-	25,0	15,0	qs	0,1	100,0

Metode

Izrada uzoraka

Izrada svih uzoraka ketoprofen gela odvijala se pod istim eksperimentalnim uslovima. U svim fazama izrade vršena je zaštita uzoraka od svetlosti, zbog fotosenzitivnosti ketoprofena. Ketoprofen i metil parahidroksibenzoat rastvarani su u izopropil alkoholu, uz mešanje na magnetnoj mešalici (IKA tip RTC basic, Nemačka). Pripremljeni rastvor je dodavan lagano uz mešanje na magnetnoj mešalici u smešu prečišćene vode i

propilenglikola. Zatim je po površini pripremljene mešavine posipan karbomer 940 ili 934P (u zavisnosti od formulacije) i ostavljan da hidratiše (4 h). Nakon vremena potrebnog za hidrataciju karbomera, uzorak je mešan na laboratorijskoj propelerskoj mešalici (IKA eurostar digital, Nemačka) na 1500 obrt/min da se pripremi homogena disperzija. Dodatno je disperzija homogenizovana na laboratorijskom turbohomogenizeru (Ultraturax IKA T-25B, Nemačka). U homogenu disperziju karbomera postepeno je dodavan 10% (m/m) vodeni rastvor trietanolamina, koji je pripreman neposredno pre upotrebe. Svi uzorci gela su nakon izrade vakuumirani i punjeni u zatopljene dvostruko lakirane aluminijumske tube od 15g.

Ispitivanje izgleda gela

Ispitivanje izgleda pripremljenih gelova vršeno je organoleptički, posmatranjem stuba i razmaza uzoraka u tankom sloju na mikroskopskoj ploči (20).

Određivanje pH vrednosti

Određivanje pH vrednosti ispitivanih gelova je vršeno po propisu Ph. Jug. V (21) potenciometrijskom metodom direktnim određivanjem pH u gelu (pH metar, Radiometar tip PHM 220, Danska). Kalibracija pH-metra rađena je sa standardnim puferima pH = 4,0 i pH = 7,0. Merenja su vršena na temperaturi od 20°C.

Određivanje sadržaja ketoprofena i metil parahidroksibenzoata

Sadržaj ketoprofena i metil parahidroksibenzoata određivan je HPLC metodom (HPLC sistem Agilend series 1100 sa DA detektorom i kvaternom pumpom) na C18 koloni (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). Kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitrila, metanola i amonijumacetata u odnosu 27:18:55. Injektovana zapremina je iznosila 20 µl, pri protoku mobilne faze od 1,5 ml/min i temperaturi od 25°C, a detekcija je vršena na 254 nm.

Reološka merenja

Reološka merenja (reološka karakterizacija) uzoraka gelova vršena su na reometru RheoStress 1 (ThermoHaake, Nemačka). Softverski paket Rheo Win 3 Job Menager sa kojim je uređaj integrisan omogućio je elektronsku kontrolu merenja i automatsku obradu dobijenih rezultata.

Praćene su reološke osobine preparata, koje mogu da budu pokazatelj njegove stabilnosti i ponašanja tokom upotrebe. Ove karakteristike važne su za svaki korak u procesu razvoja farmaceutskeg proizvoda, za ponašanje proizvoda u toku proizvodnje, posebno faze mešanja i punjenja, a mogu da utiču i na ponašanje leka pri primeni (22). Sprovedena su kontinualna reološka

merjenja (krive proticanja i *yield stress test*), 7 dana nakon izrade, a zatim 1 mesec i 3 meseca od izrade (uzorci za reološka merjenja čuvani su na sobnoj temperaturi, $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Kod obe vrste merjenja korišćen je merni sistem kupa/ploča, senzor C35/1° Ti.

Ispitivanje tipa proticanja rađeno je u režimu kontrolisane brzine smicanja (CR linearni režim) na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Parametri uzlazne krive: brzina smicanja $\dot{\gamma}$ od 0 [1/s] do 200 [1/s] u toku 120 s, praćenje u 30 tačaka. Parametri povratne krive: brzina smicanja $\dot{\gamma}$ od 200 [1/s] do 0 [1/s], u toku 120 s, praćenje takođe u 30 tačaka.

Vrednosti prinosnih napona određene su indirektno, fitovanjem dobijenih krivih prema Herschel-Bulkley modelu.

***In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja ketoprofena iz model gelova**

Profili oslobađanja određivani su primenom VanKel difuzione ćelije (VanKel Technology Group, SAD), sa membranom od celuloznog acetata (membrana za ultrafiltraciju „Cuprophane” tip 80M, Centar za separacione tehnologije, Srbija) u aparaturi za *Dissolution test* (*mini paddle* sistem, aparat ERWEKA DT600, Nemačka) pri brzini od 50 obrt/min u fosfatnom puferu pH 7,4; prema propisu USP 30 (11), na temperaturi od $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ tokom 6h, u zapremini medijuma od 300 ml. 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. Uzorkovanje je vršeno nakon 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 i 360 minuta, a zatim je vršeno filtriranje uzoraka (filter 0,45 μm). Sadržaj ketoprofena u eluatima određivan je HPLC metodom.

Uzorci su ispitani u triplikatu, 7 dana nakon izrade.

Matematičkim modelovanjem, ispitana je kinetika oslobađanja ketoprofena iz formulisanih uzoraka gelova, kao i komercijalnih preparata ketoprofen gela registrovanih na tržištu Srbije: Fastum® gela i Ketonol® gela, primenom četiri kinetička modela, uobičajena za polučvrste farmaceutske preparate: kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, Higuchi-jev model i Hixon-Crowell model.

Rezultati i diskusija

Ispitivanje izgleda

Nakon izrade sve model formulacije su bile bistri, transparentni gelovi, homogenog izgleda, karakterističnog mirisa na izopropil alkohol; nepromenjen

nalaz dobijen je i pri rekontroli uzoraka podvrgnutih svim test uslovima (25°C/60% RV, 30°C/65% RV i 40°C/75% RV) u svim test terminima (1, 2, 3 meseca). Formulacije sa karbomerom 934P kao gelirajućim sredstvom, bile su znatno mekše konzistencije (tečnije) od formulacija sa karbomerom 940, što je pokazano i reološkim merenjima. Takođe, očekivano, formulacije sa 1,5% karbomera bile su mekše konzistencije u odnosu na gelove sa 1,8%, nezavisno od tipa karbomera (934P ili 940).

Određivanje pH vrednosti i sadržaja ketoprofena i metil parahidroksibenzoata

Rastvori poliakrilne kiseline formiraju gelove po dodatku sredstva za neutralizaciju i u opsegu pH od 5 do 8 daju stabilne gelove (23, 24). Upotreba organskih amina, kao sredstava za neutralizaciju omogućava geliranje karbomera u različitim rastvaračima, odnosno mešavinama ovih rastvarača i vode, a kompatibilnost polimera sa (ko)rastvaračem zavisi od formiranja jonskih parova sa aminima (23). Interakcije (ko)rastvarač-polimer i korastvarač-rastvarač mogu da izmene način vezivanja između vode, korastvarača i polimera i dovedu do narušavanja gelske mreže što bi se, pored promena u viskoelastičnim karakteristikama, manifestovalo i promenama pH vrednosti. Rezultati sprovedenih ispitivanja uzoraka ketoprofen gela u toku čuvanja od 3 meseca, u originalnoj unutrašnjoj/primarnoj ambalaži, pokazuju da se pH vrednosti (Tabela II) kreću u intervalu od 5,70 do 6,26, kao i da različiti test uslovi nisu doveli do značajnih promena ovog parametra. Dobijeni nalaz ukazuje na zadovoljavajuću fizičku stabilnost gelova, kao i da dodatak IPA (do 25% (m/m)) nije prouzrokovao narušavanje gelske mreže uzoraka. Dobijeni rezultati u skladu su sa literaturnim podacima koji pokazuju da su karbomerni gelovi veoma temperaturno stabilni (23, 25).

Sadržaj aktivne supstance (Tabela III) u gelovima kretao se u opsegu 95,48% do 104,72%, što je u skladu sa preporukama za određivanje sadržaja aktivne supstance u toku studije stabilnosti. Jedino se kod uzorka 7 1,8% javilo odstupanje posle mesec dana čuvanja na 25°C/60% RV (105,36% deklarisanog sadržaja), odnosno posle 3 meseca skladištenja pri istim uslovima (106%). Kod istog uzorka je u ostalim test terminima i pri drugim test uslovima (30°C/65% RV i 40°C/75% RV) dobijen sadržaj ketoprofena u opsegu 101,76% do 104,24%, odnosno u prihvatljivim granicama odstupanja od deklarisanog sadržaja. Odstupanja koja su se javila kod uzorka posle mesec i tri meseca čuvanja na 25°C/60% RV, mogla bi da budu posledica povećanog isparavanja IPA iz gela u toku pripreme uzorka za analizu. Sadržaj metil-parahidroksibenzoata (Tabela IV) kretao se u opsegu 95,5% - 108,4%, što je takođe u skladu sa zahtevima za sadržaj konzervansa u toku studije stabilnosti.

Tabela II pH vrednosti ispitivanih uzoraka ketoprofen gela 7, 30 i 90 dana nakon izrade

Table II pH values of ketoprofen gels 7, 30 and 90 days after preparation

Formulacija	Inicijalna pH	pH 25 °C/60% RV		pH 30 °C/65% RV		pH 40 °C/75% RV	
		7 dana	30 dana	90 dana	30 dana	90 dana	30 dana
5 1,5%	6,03	5,98	5,93	5,99	5,99	6,01	6,02
7 1,5%	6,02	6,01	6,05	6,01	6,12	5,87	6,06
5 1,8%	6,25	6,26	5,70	6,21	6,20	6,26	6,20
7 1,8%	5,94	6,01	6,04	6,00	6,01	6,02	6,05
5c 1,5%	6,05	5,93	6,06	5,97	6,06	6,03	6,02
7c 1,5%	6,19	6,16	6,17	6,17	6,15	6,17	6,02
5c 1,8%	6,18	6,23	6,16	6,24	6,10	6,25	6,22
7c 1,8%	6,12	6,01	6,12	6,11	6,14	6,12	6,12
5a 1,8%	6,07	6,10	6,04	6,08	6,07	6,09	6,07
7a 1,8%	6,00	5,99	6,00	5,99	5,97	5,99	6,03

Tabela III Sadržaj ketoprofena (mg/g) u ispitivanim uzorcima gela 7, 30 i 90 dana nakon izrade

Table III Content of ketoprofen (mg/g) in assessed gel samples 7, 30 and 90 days after preparation

Formulacija	Inicijalni sadržaj ketoprofena	Sadržaj ketoprofena na 25 °C/60% RV		Sadržaj ketoprofena na 30 °C/65% RV		Sadržaj ketoprofena na 40 °C/75% RV	
		7 dana	30 dana	90 dana	30 dana	90 dana	30 dana
5 1,5%	24,63	25,04	25,07	25,23	24,77	25,16	24,52
7 1,5%	24,30	24,99	25,12	25,20	24,90	25,80	24,79
5 1,8%	24,37	25,02	26,18	24,66	24,74	25,10	24,08
7 1,8%	25,87	26,34	26,50	26,06	25,74	26,00	25,98
5c 1,5%	25,06	24,86	24,41	24,50	24,64	25,94	23,87
7c 1,5%	25,30	24,84	25,08	24,91	24,54	24,84	24,63
5c 1,8%	24,94	25,10	24,63	24,52	24,76	24,85	24,21
7c 1,8%	25,69	24,85	24,60	25,21	24,81	25,32	24,57
5a 1,8%	25,98	26,16	25,84	25,74	25,28	25,44	25,04
7a 1,8%	26,09	25,70	25,97	25,46	25,44	25,74	25,16

Tabela IV Sadržaj metil parahidroksibenzoata (mg/g) u ispitivanim uzorcima gela 7, 30 i 90 dana nakon izrade

Table IV Content of methyl-p-hydroxybenzoas (mg/g) in assessed gel samples 7, 30 and 90 days after preparation

Formulacija	Inicijalni sadržaj metil parahidroks sibenzoata	Sadržaj metil parahidroksibenzoata		Sadržaj metil parahidroksibenzoata		Sadržaj metil parahidroksibenzoata	
		na 25 °C/60% RV	na 30 °C/65% RV	na 30 °C/65% RV	na 40 °C/75% RV	na 30 dana	na 90 dana
	7 dana	30 dana	90 dana	30 dana	90 dana	30 dana	90 dana
5 1,5%	0,99	0,96	0,97	0,99	0,99	0,95	1,00
7 1,5%	0,98	0,96	0,96	0,99	0,97	0,98	0,98
5 1,8%	0,99	0,95	1,00	0,97	1,01	0,96	0,97
7 1,8%	1,05	1,00	1,00	1,02	1,03	0,99	1,03
5c 1,5%	0,91	0,90	0,90	0,92	9,94	0,90	0,91
7c 1,5%	0,99	0,98	0,99	1,01	1,01	0,97	1,01
5c 1,8%	1,03	1,04	1,02	1,05	1,08	1,02	1,07
7c 1,8%	0,99	0,96	0,95	1,00	0,98	0,96	0,98
5a 1,8%	0,99	0,99	1,03	0,98	1,03	0,96	1,02
7a 1,8%	0,99	0,99	0,99	1,01	1,00	0,98	1,01

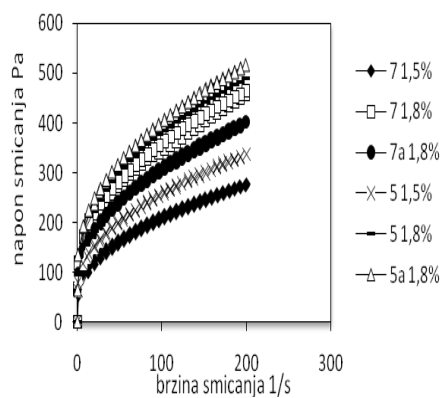
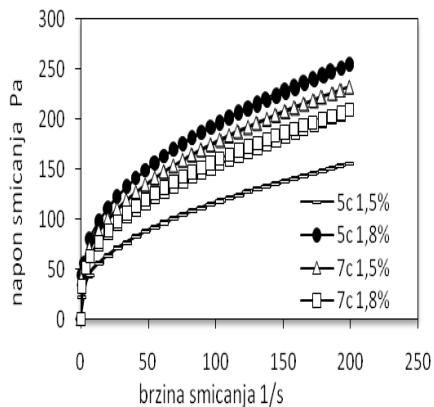
Reološka merenja

Gelovi kao polučvrsti preparati pokazuju nenjutnovsko ponašanje (26, 27), a kao što je prethodno objašnjeno, od posebnog značaja sa aspekta lokalne primene preparata tipa gelova je postojanje prinosnog napona. Gelska struktura izgrađena je od unakrsno umreženih lanaca, a prinosni napon zavisiće od bliskog pakovanja ovih lanaca (23).

Svi reogrami ispitivanih uzoraka (Slika 1), ukazuju na nenjutnovsko ponašanje ispitivanih uzoraka odnosno na pseudoplastičan tip proticanja i rastečnjavanje (eng. *shear thinning*) prilikom smicanja, uz postojanje prinosnog napona, uglavnom bez izražene tiksotropije, u skladu sa literaturnim podacima (22, 23, 26, 28).

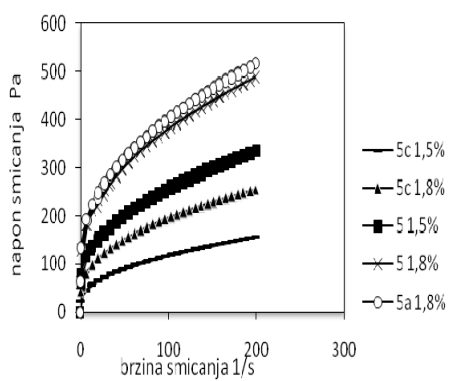
Analizom dobijenih rezultata poredene su reološke karakteristike uzoraka u odnosu na tip i koncentraciju upotrebljenog gelirajućeg sredstva i koncentraciju upotrebljenog IPA, kao i vreme čuvanja u toku perioda procene stabilnosti.

Iz uporednog prikaza krivih proticanja uzoraka sa karbomerom 934P (slika 1A), vidi se da pri koncentraciji IPA od 20% dolazi do očekivanog ugušćivanja sistema sa povećanjem koncentracije karbomera.

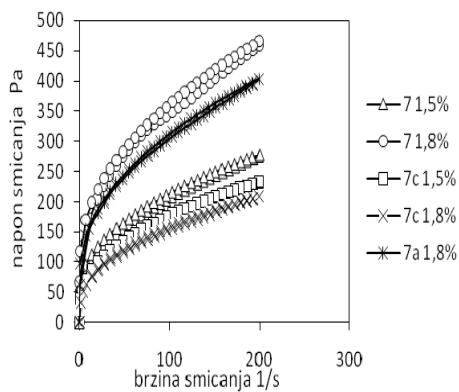


A) Krive proticanja gelova sa karbomerom 934P

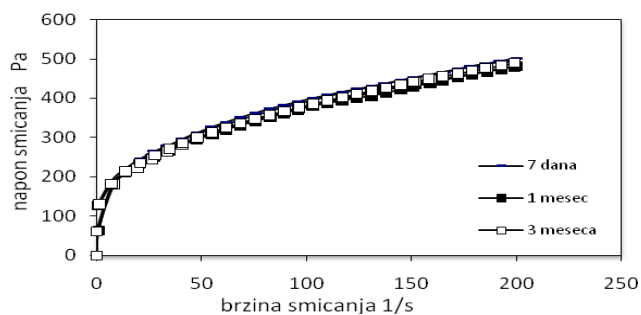
B) Krive proticanja model uzoraka sa karbomerom 940



C) Krive proticanja gelova sa 20% IPA



D) Krive proticanja gelova sa 25% IPA



E) Krive proticanja gela 5 1,8% u funkciji vremena

Slika 1. Krive proticanja ispitivanih uzoraka ketoprofen gelova
Figure 1. Flow curves of investigated samples of ketoprofen gels

Ono što nije očekivano je da gel sa višom koncentracijom gelirajućeg sredstva (7c 1,8%) pokazuje niže vrednosti napona smicanja od gela sa nižom koncentracijom sredstva za geliranje (7c 1,5%), pri istoj koncentraciji IPA (25%). Razlog ovakvih rezultata može biti interakcija polimera (karbomer 934P) i IPA, koji su ovde prisutni u većim koncentracijama, što za posledicu ima smanjenje gelirajuće sposobnosti polimera (2), i usled toga pojavu nehomogenosti uzorka.

S druge strane, kod gelova sa karbomerom 940 (slika 1B) povećanjem koncentracije gelirajućeg sredstva, bilo da se radi o uzorcima sa 20% ili 25% IPA, dobijeni su očekivani rezultati, odnosno pri porastu koncentracije sredstva za geliranje došlo je do porasta prividnog viskoziteta gela. Pri razmatranju uticaja koncentracije IPA na reološke karakteristike gelova sa ovim polimerom, zaključeno je da su najviše napone smicanja pokazali uzorci sa 20% IPA i 1,8% gelirajućeg sredstva, bez obzira na poreklo API (5 1,8% i 5a 1,8%), slede uzorci sa 25% IPA i 1,8% karbomera 940 (7 1,8% i 7a 1,8%), zatim uzorak sa 20% IPA i 1,5% gelirajućeg sredstva (5 1,5%), i na kraju uzorak sa 25% IPA i 1,5% karbomera (7 1,5%). Ovakvi rezultati ukazuju na to da bi veće koncentracije IPA (veće od 25%) mogle da utiču na smanjenje gelirajuće sposobnosti polimera (karbomera 940), kao u slučaju karbomera 934P sa 25% IPA. Takođe se kod uzoraka sa 25% IPA geliranih karbomerom 940 uočava blaga tiksotropija, vremenski zavisani efekat, poželjan kod polučvrstih sistema koji su namenjeni za primenu na koži.

Budući da su gelovi sa karbomerom 940 pokazivali prihvatljivije i reproduktivnije reološke karakteristike od uzoraka sa karbomerom 934P, priprema uzoraka u kojima je varirana API različitih proizvođača, sprovedena je samo sa ovim tipom gelirajućeg sredstva. Iz istih razloga *in vitro* profili oslobađanja lekovite supstance procenjeni su isključivo iz uzoraka sa karbomerom 940, uporedo sa uzorcima sa tržišta (Ketonol[®] gel i Fastum[®] gel).

Ispitivanje reoloških karakteristika u cilju procene uticaja uslova i vremena čuvanja (lagerovanja) uzoraka prikazano je na slici 1E na odabranom uzorku 5 1,8%. Krive proticanja, dobijene nakon 3 meseca lagerovanja, nisu se značajno promenile u odnosu na inicijalne krive, što uz stabilnu pH vrednost može da ukaže na prihvatljivu fizičku stabilnost ispitivanog uzorka. Ostali uzorci pokazali su slično reološko ponašanje kao odabrani uzorak.

Takođe, iz prikazanih reograma (Slika 1) vidi se da svi uzorci poseduju određene vrednosti prinosnog napona. Uzorak koji ima određenu vrednost prinosnog napona počinje da teče samo onda kada je sila eksterno primenjena na uzorak (F_{ext}) veća od internih strukturalnih sila (F_{int}) koje omogućuju stabilizaciju sistema. Prinosni napon predstavlja onu vrednost deformacije pri kojoj sistem više ne može da se suprotstavi sili F_{ext} , kada dolazi do strukturalnih

promena u preparatu i počinje da teče (29). Određivanje prinosnog napona od značaja je posebno u industriji, jer od njegove vrednosti zavisi ponašanje proizvoda prilikom prenosa (npr. kroz cevi) u toku proizvodnog procesa, kao i prilikom punjenja proizvoda u finalnu ambalažu. Od vrednosti prinosnog napona zavisice i ponašanje preparata prilikom upotrebe (istiskivanje iz tube), kao i prilikom primene na koži (lako se razmazuje i utrljava) (29). Vrednosti prinosnih napona određene su indirektno, fitovanjem dobijenih krivih prema Herschel-Bulkley modelu ($r > 0,99$) i prikazane u Tabeli V (30). Dobijene vrednosti prinosnih napona kreću se u opsegu od 3,54 Pa (5c 1,5%) do 43,5 Pa (7c 1,8%) i u skladu su sa ostalim rezultatima reološke karakterizacije. Niske vrednosti prinosnih napona uzoraka sa karbomerom 934P ukazuju na to da bi ovi gelovi, koji pri malim silama smicanja počinju da teku, mogli praviti probleme prilikom procesa proizvodnje, kao i da mogu imati nezadovoljavajuće aplikativne karakteristike (isticanje iz unutrašnjeg pakovanja, razlivanje prilikom primene).

Tabela V Vrednosti prinosnih napona svih ispitivanih uzoraka ketoprofen gela
Table V Yield point values of investigated samples of ketoprofen gels

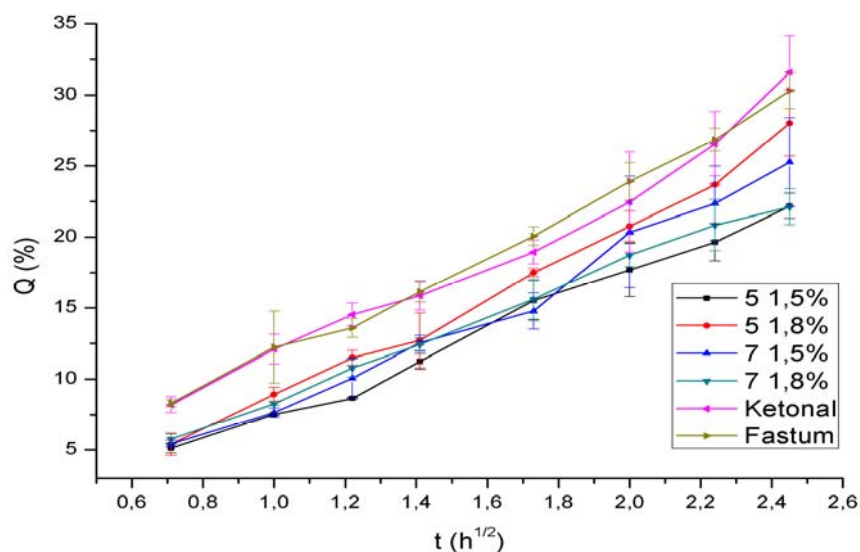
Formulacija	Yield stress test τ_0 [Pa]
5 1,5%	15,44±1,01
5 1,8%	40,97±1,99
5c 1,5%	3,54±0,75
5c 1,8%	8,96±0,85
7 1,5%	19,39±1,05
7 1,8%	43,5±2,00
7c 1,5%	7,641±0,83
7c 1,8%	5,48±0,80
5a 1,8%	6,70±0,81
7a 1,8%	20,25±1,10

Na osnovu prikazanih krivih proticanja svih izrađenih uzoraka (Slika 1), može se konstatovati da najveći uticaj na reološke karakteristike finalnih gelova imaju tip i koncentracija upotrebljenog gelirajućeg sredstva, a potom i koncentracija IPA. Takođe, sprovedena ispitivanja sugerišu postojanje

interakcije polimer-korastvarač, kada se IPA koristi u većim koncentracijama, za šta je neophodno sprovesti obimnije studije.

***In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja ketoprofena iz model gelova**

In vitro profili oslobađanja ketoprofena praćeni su na 4 odabrane model formulacije (5 1,5%, 5 1,8%, 7 1,5% i 7 1,8%) u kojima je kao sredstvo za geliranje korišćen karbomer 940, uporedo sa gotovim lekovima registrovanim u Srbiji (Fastum® gel, Ketonal® gel) (Slika 2). Kako je napred opisano, formulacije ketoprofen gelova sa karbomerom 940 odabrane su za preliminarnu biofarmaceutsku karakterizaciju u skladu sa prethodno dobijenim nalazima organoleptičkih i reoloških ispitivanja. In vitro test za praćenje brzine oslobađanja lekovite supstance iz preparata za primenu na koži, kod koga se koristi sintetska membrana, prihvaćen je od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA) kao koristan test za procenu nivoa sličnosti/razlika između dva kvalitativno i kvantitativno ekvivalentna proizvoda (Q1Q2; varijacije tipa 2) i smatra se mogućim surogat metodom kojim se može demonstrirati biološka ekvivalentnost ispitivanih proizvoda (4).



Slika 2. Profili oslobađanja ketoprofena iz karbomernih (karbomer 940) gelova predstavljani kao procenat oslobodene supstance u vremenu

Figure 2. Profiles of ketoprofen release from carbomer (carbomer 940) gels presented as percentage of substance released, versus time

Matematičkim modelovanjem dobijenih profila kroz četiri kinetička modela uobičajena za polučvrste preparate za primenu na koži, uočeno je da oslobađanje ketoprofena iz ispitivanih uzoraka najbolje opisuje Higuchi-jev difuzioni model (Tabela VI). Oslobađanje ketoprofena dominantno po Higuchi-jevom modelu u skladu je sa prirodom hidrofilnih gelova (31), ali i činjenicom da je ketoprofen u potpunosti rastvoren u gelu, te je korak koji određuje brzinu oslobađanja lekovite supstance proces difuzije kroz gelsku mrežu (32).

Tabela VI Koeficijenti korelacije dobijeni regresionom analizom iz profila oslobađanja ketoprofena.

Table VI Correlation coefficients assessed by regression analysis of ketoprofen release profiles.

Uzorci	0 reda	1 reda	Higuchi	Hixon-Crowell
5 1,5% p	0,9778	0,9037	0,9917	0,9358
5 1,8% p	0,9902	0,8982	0,9918	0,9420
7 1,5% p	0,9870	0,9185	0,9909	0,9511
7 1,8% p	0,9699	0,8840	0,9973	0,9201
Ketonal gel	0,9885	0,9314	0,9954	0,9612
Fastum gel	0,9899	0,9239	0,9942	0,9538

Poređenjem liberacionih profila nije uočena statistički značajna razlika između profila oslobađanja ketoprofena (slika 2) iz ispitivanih i komercijalnih (referentnih) uzoraka (jednofaktorska ANOVA, SigmaStat 3.1). Takođe se na osnovu dobijenih rezultata može zaključiti da nije bilo značajnog uticaja variranih faktora (koncentracije gelirajućeg sredstva i IPA) na profile oslobađanja ketoprofena iz ispitivanih formulacija. Količine oslobođenog ketoprofena nakon 6 sati (20-30% m/m) su u skladu sa uobičajenim zahtevima za oslobađanje API iz polučvrstih preparata za primenu na koži. Rezultati *in vitro* oslobađanja koreliraju sa dobijenim reološkim parametrima, odnosno uočena sličnost reoloških profila u saglasnosti je sa odsustvom statistički značajne razlike u liberacionim profilima (33).

Zaključak

Praćenje pH vrednosti, sadržaja ketoprofena i metil parahidroksibenzoata u periodu od 3 meseca (test uslovi: 25°C/60% RV, 30°C/65% RV i 40°C/75% RV) ukazalo je na zadovoljavajuću preliminarnu fizičko-hemijsku stabilnost svih

ispitivanih uzoraka. Na osnovu rezultata reoloških merenja i biofarmaceutске karakterizacije model formulacija gela sa 2,5% ketoprofena, može se zaključiti da model formulacija (uzorak gela) sa karbomerom 940 u koncentraciji od 1,8% sa 20% IPA ima najprihvatljivije karakteristike sa aspekta procesa proizvodnje i aplikacije kao i zadovoljavajuću brzinu oslobađanja lekovite supstance.

Takođe, utvrđeno je da na reološke osobine ketoprofen gela najveći uticaj ima tip gelirajućeg sredstva, zatim koncentracija upotrebljenog gelirajućeg sredstva i koncentracija IPA. Nije zapažen značajan uticaj variranih faktora (koncentracije gelirajućeg sredstva i IPA) na profile oslobađanja ketoprofena iz ispitivanih uzoraka gela. U toku 6 sati, *in vitro* ispitivanja oslobođeno je manje od 30% ketoprofena iz svih ispitivanih uzoraka, uključujući i oba komercijalna (referentna) uzorka.

Sa aspekta upotrebe aktivne supstance (ketoprofen) različitih proizvođača (ZHEIJAN, Kina i S.I.M.S., Italija), nisu ustanovljene značajne razlike tokom fizičko-hemijske i biofarmaceutске karakterizacije model gelova, pa se supstance ovih proizvođača mogu koristiti kao adekvatna zamena jedna drugoj, tokom serijske proizvodnje finalnog gela.

Zahvalnica

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

Literatura

1. Yaw-Bin H., Ren-Jiunn W., Jui-Sheng C., Yi-Hung T., Pao-Chu W., Evaluation of ketoprofen formulations via penetration rate and irritation in vivo study, *Int J Pharm* 2007; 339: 47–51.
2. Fresno M. J. C., Ramirez A. D., Jimenez M. M., Systematic study of the flow behaviour and mechanical properties of Carbopol® UltrezTM¹⁰ hydroalcoholic gels, *Eur J of Pharm Biopharm*, 2002; 54: 329-335.
3. FDA Guidance for Industry: Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs – In Vivo Bioavailability, Bioequivalence, In Vitro Release, and Associated Studies, Draft Guidance 6/2/98.

4. Yogeeta N., Bioequivalence for Topical Products – An Update. Pharm Res DOI 10.1007/s1 1095-010-0250-3. 2010
5. Wei L., Meiling H., Wenshuang L., Chengbin X., Huibi X., Xiangliang Y., Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate, Int J Pharm 2009; 364: 135-141
6. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and products, Current Step 4 version, 2003.
7. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use Q8 Pharmaceutical Development, Current Step 4 version, 2005.
8. Block J. D., Belle D., The Complete Handbook Series of Pharmaceutical Drug Development ISBN 0793 8632- Electronic Version- Handbook Development 24 Volume Series, ISSN Series N° 0793 761X- Elektronik Version,
9. European Pharmacopoeia sixth edition, Strasbourg: Council of Europe, 2008.
10. European Medicines Agency / Note for guidance on development pharmaceuticals CPMP/QWP/155/96, 1998
11. The United States Pharmacopoeia XXX; The National Formulary 25, Pharmacopoeia Convention INC. Rockville, 2007.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Stanos S., Topical agents for the management of musculoskeletal pain. J Pain Symptom Manag 2007; 33: 342-55.
16. Buggins T., Dickinson P., Taylor G., The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. Adv Drug Delivery Reviews 2007; 59: 1482-503.
17. Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2006, electronic version
18. 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.
19. European Medicines Agency /CPMP Note for guidance on extipients, antioxidants and antimicrobial preservatives in the dossier for application for marketing authorisation of a medicinal product, 2003.

20. Voigt R, Pharmaceutische Technologie, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 2006.
21. Jugoslovenska farmakopeja 2000, V izdanje, Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Savremena administracija a.d., Beograd, 2000.
22. Lee C. H., Moturi V., Lee Y., Thixotropic property in pharmaceutical formulation, *J Control Release* 2009; 136: 88-98.
23. Islam M. T., Rodriguez-Hornedo N., Ciotti S., Ackermann C., Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. *Pharmaceut Res* 2004; 21 (7): 1192-1199.
24. Carretti E., Dei L., Baglioni P., Aqueous polyacrylic acid based gels: physicochemical properties and applications in cultural heritage conservation. *Progr Colloid Polym Sci* 2004; 123: 280–283.
25. Kim J. Y., Song J. Y., Lee E. J., Park S. K., Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid Polym. Sci.* 2003; 281:614–623.
26. Lucero M. J., Vigo J, Leon M. J., A study and compression deformations on hydrophilic gels of α -tocopherol. *Int J Pharm* 1994; 111: 261-269.
27. Owen D., Peters J. J., Lavine M. L., Katz D. F., Effect of temperature and pH on contraceptive gel viscosity. *Contraception* 2003; 67: 57-64.
28. Contreras M. J. F., Dieguez A. R., Soriano MM J., Rheological characterization of hydroalcoholic gels - 15% ethanol - of Carbopol® Ultrez™ 10. *Il Farmaco* 2001; 56: 437–441.
29. Mezger T. G., *The Rheology Handbook for users of rotational and oscillatory rheometers*, 2nd revised edition, Coatings Compendia, Stuttgart, 2006.
30. Tiu C, Guo J, Uhlherr P. H. T, Yielding Behaviour of Viscoplastic Materials. *J Ind and Eng Chem* 2006; 12(5) 653-662.
31. Glavas-Dodov M., Goracinova K., Mladenovska K., Fredro-Kumbaradzi E., Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. *Int J Pharm* 2002; 242: 381–384.
32. Arellano A, Santoyo S, Martin C, Ygartua P. Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. *Eur J Pharm Sci* 1998; 7: 129–135.
33. Siewert M, Dressman J, Brown C, Shah V. FIP/AAPS Guidelines for dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *Dissolut Technol* 2003: 6-15.

The influence of different formulation factors on physicochemical and biopharmaceutical characteristics of ketoprofen 2,5% gel

**Katarina Jončić-Savić^{1*}, Jelena Pešić¹, Mirjana Rajić¹,
Milica Lukić², Ivana Jakšić², Jela Milić², Gordana Vuleta²,
Snežana Savić²**

¹Institute for Research & Development Galenika a.d., Batajnicki drum bb,
11080 Belgrade

²Department of Pharmaceutical Tehnology and Cosmetology, Faculty of
Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade

Summary

In recent years there has been a growing interest for the development and characterization of vehicles for active pharmaceutical ingredients (API) for semisolid dosage forms. Considering that research efforts applied on the new APIs are time consuming and costly, one of the approaches for advancement of therapies of skin and mucous tissue diseases or therapies for muscle and joint pain is focused on the modification of the existing formulations and development and characterization of new vehicles for APIs. The aim of this study was to evaluate the effect of variation of different factors of formulation such as type and concentration of gelling agents, concentration of isopropyl alcohol (IPA) as a solvent and as a penetration enhancer, physicochemical properties of the active substance (ketoprofen) obtained from different manufacturers, on properties and stability of hydrophilic gel with 2.5% m/m ketoprofen.

Characterization of prepared samples was done through physicochemical, biopharmaceutical investigation and stability testing.

Results obtained suggest satisfactory physicochemical stability of investigated samples as well as the formulation factors which have the most effect on physicochemical properties of ketoprofen gel product: the type of gelling agent followed by the concentration of the gelling agent, while the IPA concentration has the least effect (in the investigated range). Comparison of release profiles of the investigated formulations of carbomer gels did not show significant effect of the varied factors (concentration of the gelling agent and IPA) on ketoprofen release.

Keywords: Ketoprofen, carbomer, isopropyl alcohol,
rheological characterization, release profiles, stability testing