

Ocena trwałości klotrimazolu w hydrożelach wykonanych na bazie Carbopolu 980 oraz hydroksyetylocelulozy

Katarzyna Sosnowska, Katarzyna Winnicka

Zakład Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Adres do korespondencji: Katarzyna Sosnowska, ul. Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok, tel./faks 085 748 56 16, e-mail: katarzyna.sosnowska@umwb.edu.pl

Wstęp

Zaletą podłoży hydrofilowych jest łatwa aplikacja, brak pozostawiania na skórze tłustych plam oraz właściwości mukoadhezyjne [1]. Cechy te sprawiają, że hydrożele coraz częściej wykorzystywane są jako preparaty do stosowania na skórę i błony śluzowe. Stosowanie hydrożeli zaleca się w ostrych stanach zapalnych, w przypadku nietolerancji podłoży lipofilowych, schorzeniach błon śluzowych, a także w chorobach skóry owłosionej oraz u osób ze skórą posiadającą skłonność do przettuszczania się i trądziku. Zaobserwowano również, że wiele substancji czynnych szybciej uwalnia się z podłoży hydrofilowych niż lipofilowych [2–4].

Jedną z częściej stosowanych substancji leczniczych o działaniu przeciwrzybiczym jest klotrimazol, który dostępny jest w Polsce w postaci kremu, maści, tabletek dopochwowych oraz płynu do stosowania na skórę [5]. Preparaty klotrimazolu mają zastosowanie w kandydozach skóry, jamy ustnej, pochwy i sromu, a także w grzybiczym zapaleniu brzegów powiek i rogówki oraz łupieżu pstrym [5, 6].

Celem pracy było zbadanie trwałości klotrimazolu w hydrożelach sporządzonych na bazie Carbopolu 980 oraz hydroksyetylocelulozy, wykonanych według opracowanej receptury. Trwałość klotrimazolu w przechowywanych hydrożelach określono za pomocą metody HPLC oraz przez pomiar pH i lepkości sporządzonych formułacji.

Materiały i metody

Odczynniki

Klotrimazol (Aflofarm, Pabianice, Polska), Carbopol 980 (Noveon, Cleveland, USA), hydroksyetyloceluloza

Evaluation of the stability of clotrimazole in hydrogels made on Carbopol 980 and hydroxyethylcellulose base · There is no clotrimazole in hydrogels on polish pharmaceutical market therefore hydrogels with clotrimazole made on Carbopol 980 and hydroxyethylcellulose base were prepared and examined. All the formulations retain minimum 97% of the initial clotrimazole concentration after four week of storage at room temperature. Viscosity and pH of all tested formulations did not significantly change over 28 days.

Keywords: hydrogels, clotrimazole, HPLC.

© Farm Pol, 2010, 66(2): 87-90

(A.C.E.F., Piacenza, Włochy), glikol propylenowy (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), etanol 99,9% (J. T. Baker, Deventer, Holandia), Tween 60 (Fluka, Madryt, Hiszpania), 4-hydroksybenzoosan propylu (Caelo Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Niemcy), 4-hydroksybenzoosan metylu (Fluka, Japonia), metanol do HPLC (Merck, Darmstadt, Niemcy), diwodorofosforan potasu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), bezwodny wodorofosforan disodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), woda do HPLC (Milli-Q Reagent Water System, Billerica, USA).

Sporządzanie hydrożeli

Skład sporządzonych hydrożeli przedstawiono w tabeli 1. Hydrożele o najlepszych właściwościach fizykochemicznych uzyskano wykonując w pierwszej kolejności żele z wybranych polimerów, a następnie dodając do nich poszczególne składniki rozpuszczone w etanolu lub glikolu propylenowym, przy czym tylko część substancji leczniczej pozostała rozpuszczona w hydrożelu. Otrzymane hydrożele poddawano

Tabela 1. Skład badanych hydrożeli

Składniki (g)/Formulacja	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
Klotrimazol	1	1	1	1	1	1
Carbopol 980	0,35	0,35	0,35	–	–	–
Hydroksyetyloceluloza	–	–	–	2,0	2,0	2,0
20% Wodorotlenek sodu	0,5	0,5	0,5	–	–	–
Etanol 96°	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Glikol propylenowy	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
4-hydroksybenzoesan metylu	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4-hydroksybenzoesan propylu	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween 60	–	1,0	3,0	–	1,0	3,0
Woda	do 100,0					

badaniu wielkości cząstek substancji zawieszonych bezpośrednio po przygotowaniu formulacji oraz po 2 i 4 tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej. Wielkość cząstek w żadnym z badanych hydrożeli nie była większa niż 90 µm. Wykonane w ten sposób hydrożele przechowywano w szczelnych pojemnikach w temperaturze pokojowej.

Badanie zawartości klotrimazolu metodą HPLC

Zawartość klotrimazolu zbadano bezpośrednio po sporządzeniu hydrożeli oraz po 2 i 4 tygodniach od dnia wykonania formulacji, metodą HPLC przy użyciu aparatu Agilent Technologies 1200 (Agilent, Waldbronn, Niemcy). Do rozdzielania wykorzystano kolumnę Zorbax Eclipse XDB – C18, 5 µm (Agilent, Waldbronn, Niemcy), na którą nanoszono próbkę w ilości 50 µl. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę metanolu z buforem fosforanowym o pH 7,4 (8:2, v/v) o szybkości przepływu 1 ml/min. Bufor fosforanowy otrzymywano przez rozpuszczenie 0,1775 g KH_2PO_4 i 0,17 g Na_2HPO_4 w 250 ml wody, a następnie doprowadzenie pH do wartości 7,4 przy użyciu 20% roztworu NaOH. Faza ruchoma była sączona i odgazowywana na łaźni ultradźwiękowej bezpośrednio przed użyciem. Detekcji dokonywano przy długości fali 210 nm [6–8]. Wybrana długość fali umożliwia także oznaczenie produktów rozkładu. Za trwałe uznawano hydrożele, w których zawartość substancji czynnej nie była mniejsza niż 95% zawartości początkowej [9].

W celu przeprowadzenia badania, z każdego hydrożelu pobierano po 3 próbki (około 0,5 g). Do każdej z nich dodawano 5 ml bezwodnego etanolu 99,9% i ogrzewano przez 5 min w łaźni wodnej w temperaturze 50°C. Następnie próbki wytrząsano ręcznie przez 5 min, chłodzono w temperaturze –10°C przez kolejne 15 min, po czym wirowano przez 10 min przy 4000 obr/min. Pobierano roztwór z nad osadu, a do osadu dodawano kolejne 5 ml bezwodnego etanolu i powtarzano procedurę. Obie porcje etanolu łączono, pobierano 1 ml, a tuż przed analizą HPLC rozcieńczono dziesięciokrotnie metanolem i sączono przez filtr membranowy o wielkości porów 0,45 µm [10].

Wykrywanie produktów rozkładu klotrimazolu

Klotrimazol jest substancją, która może ulegać hydrolizie w środowisku kwaśnym. Aby zidentyfikować produkty rozkładu odważono 100 mg substancji czynnej i przeniesiono do butelki o pojemności 250 ml. Następnie dodano 100 ml 5 N HCl i poddano wyjałowieniu w autoklawie w 121°C ±2°C przez 20 min. Po ostudzeniu pobierano po 0,25 ml roztworu i 10-krotnie rozcieńczano metanolem. Otrzymane w ten sposób próbki analizowano metodą HPLC.

Badanie pH hydrożeli

Wartość pH mierzono po sporządzeniu hydrożeli oraz po 2 i 4 tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej. Pomiar pH dokonywany był przy użyciu aparatu Orion 3 Star (Thermo Scientific, USA).

Określenie lepkości wykonanych hydrożeli

Podczas wykonywania doświadczeń korzystano z reometru typu stożek-plate RVDV-III Ultra (Brookfield, Middleboro, USA). Wyniki zostały wyrażone w jednostkach miliPaskalosekundach (mPa·s). Pomiar lepkości wykonywany był w temperaturze pokojowej w dniu sporządzenia hydrożeli oraz po 2 i 4 tygodniach ich przechowywania. W naczyniu pomiarowym umieszczano 0,5 ml badanej próbki i dokonywano pomiaru lepkości przy szybkości ścinania 15,36 s⁻¹. Wartość lepkości hydrożeli przedstawiono jako średnią z trzech pomiarów.

Analiza statystyczna

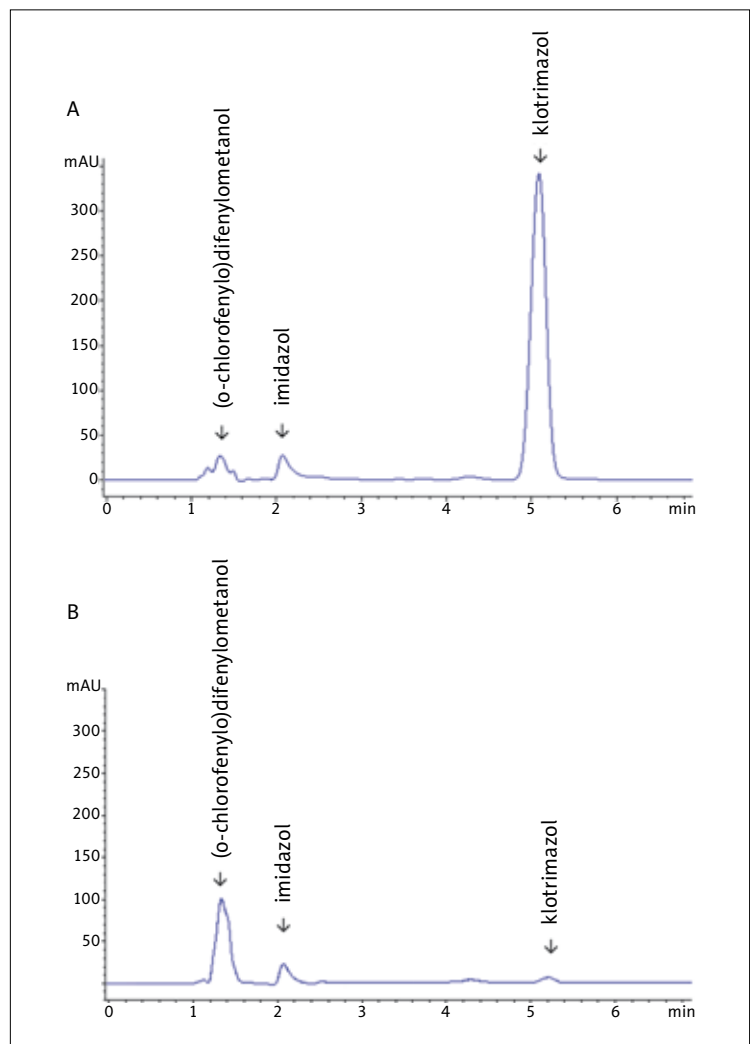
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie (±SD – odchylenie standardowe). Oceny statystycznej wyników dokonano stosując test t-Student'a. Za istotne statystycznie przyjęto wartości p<0,05.

Wyniki i dyskusja

Hydrożele to podłoża maściowe zmywalne wodą. Obecność wody w hydrożelach zapewnia uczucie

chłodzenia, co w niektórych schorzeniach jest zjawiskiem korzystnym. Ponadto, duża zawartość wody sprzyja wysuszeniu skóry na skutek parowania wody z cienkiej warstwy rozsmarowanego hydrożelu. Żele wskazane są w stanach wysiękowych skóry, natomiast nie powinny być stosowane na skórę przesuszoną i szorstką. Jako substancje pomocnicze w hydrożelach wykorzystywane są glicerol, glikol propylenowy, alkohol etylowy oraz środki konserwujące. Dodatek glicerolu lub glikolu propylenowego opóźnia wysychanie żelu, natomiast etanol ułatwia rozpuszczanie substancji leczniczych w podłożach żelowych oraz poprawia ich penetrację przez skórę [11, 12]. Zdolność do zwiększania przenikania przez skórę substancji czynnych posiadają również polisorbaty oraz glikol propylenowy [12]. W przypadku hydrożeli niezwykle istotne jest, aby podczas mieszania nie wprowadzić zbyt dużo powietrza, gdyż może to przyspieszać rozkład substancji czynnej. Ponadto temperatura oraz czas przechowywania mogą przyczynić się do zmiany konsystencji (np. upłynnienia, twarzenia) hydrożeli i tym samym zmian szybkości dyfuzji substancji leczniczych. Ze względu na brak na polskim rynku farmaceutycznym klotrimazolu w postaci hydrożelu, opracowany został skład hydrożeli (tabela 1), które następnie zostały poddane badaniom mającym na celu ocenę trwałości substancji czynnej w sporządzonych formułacjach. Dodatek Tweenu 60 w hydrożelu H-2, H-3, H-5 i H-6 miał na celu poprawę rozpuszczalności klotrimazolu oraz przedłużenie jego działania na skórę. Otrzymanie trwałych hydrożeli z wybraną substancją czynną pozwoliłoby lekarzom i pacjentom na alternatywny wybór postaci leku, odpowiednio dostosowanej do schorzenia i stanu skóry pacjenta. Należy zauważyć, że klotrimazol w stanie statym jest trwały, natomiast w środowisku kwaśnym ulega hydrolizie do imidazolu i (o-chlorofenylo)difenylometanolu [13]. Identyfikacja produktów rozkładu klotrimazolu została dokonana przy użyciu metody HPLC poprzez porównanie chromatogramów klotrimazolu przed hydrolizą i po hydrolizie w środowisku kwaśnym (rycyna 1).

Istotnym czynnikiem decydującym o przydatności podłoża w preparatach dermatologicznych jest wartość pH [14]. Aby sprawdzić, czy pH sporządzonych hydrożeli nie przyczynia się do inaktywacji substancji czynnej, przy użyciu HPLC zbadano zawartość klotrimazolu w preparatach tuż po ich sporządzeniu oraz po 2 i 4 tygodniach od dnia wykonania. We wszystkich żelach przechowywanych przez 4 tygodnie w temperaturze pokojowej stwierdzono zawartość klotrimazolu powyżej 97% początkowej zawartości substancji czynnej (tabela 2). Niewielki wzrost zawartości klotrimazolu po 4 tygodniach od sporządzenia w formułacjach H-2, H-4 i H-6 prawdopodobnie spowodowany był parowaniem lotnych składników z podłoża hydrożelowych. Przykładowe chromatogramy klotrimazolu w hydrożelach uzyskane bezpośrednio po sporządzeniu oraz po



Rycina 1. Przykładowe chromatogramy klotrimazolu:

A – próbka klotrimazolu (0,025 mg/ml) rozpuszczonego w metanolu,

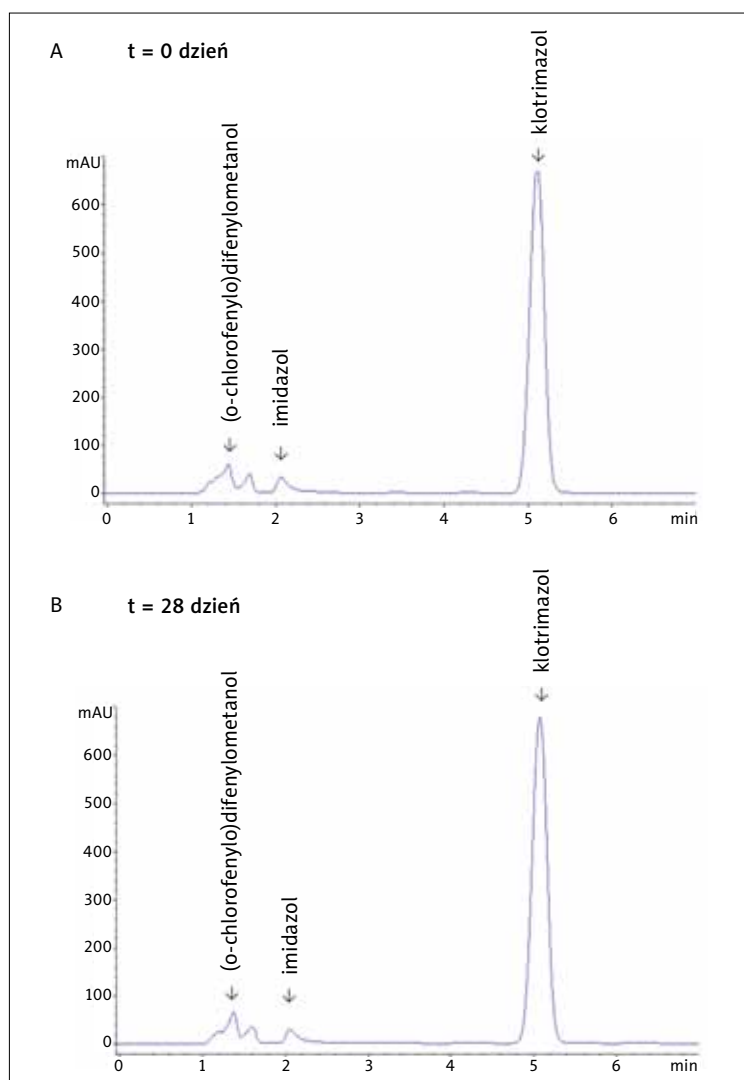
B – próbka klotrimazolu (0,025 mg/ml) rozpuszczonego w 5N HCl-u, poddana wyjąłowaniu w 121°C ±2°C przez 20 minut

4 tygodniach przechowywania hydrożeli w temperaturze pokojowej zostały przedstawione na rycynie 2. Porównując chromatogramy hydrożeli z klotrimazolem bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 4 tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej nie zaobserwowano wzrostu pól powierzchni pików imidazolu i (o-chlorofenylo)difenylometanolu we wszystkich badanych formułacjach, co dodatkowo świadczy o trwałości klotrimazolu w wykonanych preparatach. Warto podkreślić, że odczyn pH hydrożeli nie tylko nie powinien przyczynić się do inaktywacji substancji czynnej, ale także naruszać ustalonej równowagi kwasowo-zasadowej skóry, gdyż może to prowadzić do wystąpienia zakażeń bakteryjnych lub grzybiczych. pH żeli wykonanych na bazie hydroksyetylocelulozy mieściło się w zakresie 5,4–6,59, a pH żeli na bazie Carbopolu 980 – w zakresie 5,48–6,29. Nie zaobserwowano istotnych zmian pH hydrożeli przechowywanych w temperaturze pokojowej w stosunku do pH wyjściowego.

Tabela 2. Zawartość klotrimazolu w badanych hydrożelach

Formulacja	Stężenie początkowe (mg/ml)	Zawartość klotrimazolu wyrażona jako % stężenia początkowego*	
		Dzień 14	Dzień 28
H-1	10 mg/ml	98,09±6,46	98,23±6,99
H-2	10mg/ml	97,39±2,54	101,02±1,07
H-3	10 mg/ml	97,20±2,55	97,20±0,19
H-4	10 mg/ml	97,65±6,64	103,49±2,87
H-5	10 mg/ml	102,84±2,04	101,37±5,05
H-6	10 mg/ml	98,30±1,03	99,61±1,08

* Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ±S.D. uzyskane z trzech eksperymentów



Rycina 2. Przykładowe chromatogramy klotrimazolu:

A – próbka hydrożelu H-1 analizowana bezpośrednio po sporządzeniu,
B – próbka hydrożelu H-1 analizowana po 4 tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej

Rodzaj użytego polimeru, substancji pomocniczych (w tym solubilizatorów), a także sposób oddziaływania polimeru z substancją czynną mogą wpływać na cechy reologiczne hydrożelu, takie jak lepkość oraz rozciągliwość. Lepkość żeli wykonanych na bazie

Carbopolu 980 (np. H-1–10485,45 ±54,20) w dniu sporządzenia była wyższa, niż lepkość żeli wykonanych na bazie hydroksyetylocelulozy (np. H-3–9100,33 ±55,13). Po 4 tygodniach przechowywania preparatów nie wykazano istotnych zmian lepkości badanych hydrożeli.

Wnioski

We wszystkich żelach przechowywanych przez 4 tygodnie w temperaturze pokojowej stwierdzono zawartość klotrimazolu powyżej 97% początkowej zawartości substancji czynnej. Ponadto nie zaobserwowano istotnych zmian pH i lepkości wykonanych hydrożeli. Wyniki przeprowadzonych badań mogą świadczyć o trwałości klotrimazolu w wykonanych hydrożelach. Jako uzupełnienie powyższych badań zasadne wydaje się porównanie szybkości dyfuzji klotrimazolu z maści, kremu i hydrożelu.

Praca została przedstawiona na Konferencji naukowej pt. „Wpływ czynników technologicznych na wchłanianie substancji leczniczej z postaci leku”. Warszawa 18.11.2009. Organizator: Komisja Postaci Leku Farmakokinetyki i Farmacji Klinicznej PAN, Komitet Terapii i Nauk o Leku PAN, Wydział VI Nauk Medycznych PAN, Zakład Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego WUM.

Otrzymano: 2009.11.18 · Zaakceptowano: 2009.12.01

Piśmiennictwo

- Rosiak J.M., Janik I., Kadlubowski S., Kozicki M., Kujawa P., Stasica P., Ułański P.: Radiation formation of hydrogels for biomedical applications. The International Atomic Energy Agency's Raport 2002.
- Liu C.H., Ho H.O., Hsieh M.C., Sokotoski T.D., Shieu M.T.: Studies on the in-vitro percutaneous penetration of indomethacin from gel systems in hairless mice. J Pharm Pharmacol. 1995, 47: 365–372.
- Grabowska-Bochenek J., Kubis A.: Investigation of dressings developed for the treatment of alveolitis sicca dolorosa. Part 2: Influence of glycerol and PEG 200 on the properties of tablets and dressings comprising mefenamic acid and Nipagin P. Pharmazie. 1986, 41: 648–650.
- Dumitriu S., Popa M.I., Dumitriu M., Dumitriu D., Tara A.: Bioactive polymers 68 – controlled release of neomycin – furazolidone bicomponent system from xanthan hydrogel. J Biomater Appl. 1993, 7: 265–276.
- www.pharmindex.pl
- Hájková R., Sklenářová H., Matysová L., Šrecová P., Solich P.: Development and validation of HPLC method for determination of clotrimazole and its two degradation products in spray formulation. Talanta. 2007, 73: 483–489.
- Farmakopea Polska VIII, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. 2008. Tom I.
- Hashiguchi T., Kodama A., Ryu A., Otagini M.: Retention capacity of topical imidazol antifungal agents in the skin. Int J Pharm. 1998, 161: 195–204.
- Farmakopea Polska VI. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. 2002.
- United States Pharmacopeia 30, United States Pharmacopeia Convention, Rocville 2007.
- Pietkiewicz J., Sznitowska M.: Możliwość zamiany postaci maści lipofilowej na hydrożel. Terapia i Lek. 2007, 56: 50–52.
- Cal K.: Cross skin barrier: known methods, new performances. Front Drug Des Discov. 2009, 4: 162–188.
- Repka M. A., Prodduturi S., Stodghill P. S.: Production and characterization of hot-melt extruded films containing clotrimazole. Drug Dev Ind Pharm. 2003, 7: 757–765.
- Bornkessel A., Flach M., Arens-Corell M., Elsner P., Fluor J.W.: Functional assesment of washing emulsion for sensitive skin: mild impairment of stratum corneum hydration, pH, barrier function, lipid content, integrity and cohesion in a controlled washing test skin. Skin Res Technol. 2005, 11: 53–60.