

PŮVODNÍ PRÁCE

Vplyv pomocných látok na permeáciu kofeínu z gélov

Influence of excipients on caffeine permeation from gels

Alexandra Kodadová • Zuzana Vitková • Petra Herdová • Jozef Čižmárik • Monika Zsidová

Došlo 15. září 2014 / Přijato 13. listopadu 2014

Súhrn

V práci sa študuje vplyv pomocných látok na permeáciu kofeínu z dermálnych polotuhých liekov v *in vitro* podmienkach. Vďaka výhodným vlastnostiam nachádza kofeín využitie v dermálnych hydrogélach. Dôležitý je tiež výber pomocných látok zo skupiny humektantov a kationových tenzidov. Ich cieľom je zabezpečiť dlhodobú stabilitu hydrogélů a čo najlepšiu permeáciu použitého liečiva z gélov. Predmetom výskumu je štúdium vplyvov rôznych pomocných látok na permeáciu kofeínu z gélov a taktiež ich vplyv na reologické vlastnosti hydrogélů. Na základe získaných výsledkov sa určilo nasledovné optimálne zloženie pre kofeínový gél: 2,5% chitosan + 0,1% kofeín + 10% propylénglykol + 0,1% benzyldimethylhexadecylamóniumchlorid.

Kľúčové slová: kofeín • hydrogély • permeácia • reologické parametre

Summary

The subject of this paper is a study of the influence of excipients on caffeine permeation from dermal semisolid drugs. Due to its advantageous properties, caffeine can be successfully used in dermal hydrogels. The choice of excipients from the group of humectants and cationic surfactants also plays an important role. The excipients should ensure long-term stability of hydrogels and the best permeation of the drug from gels. In particular, the influence of various excipients on caffeine

permeation from gels and at the same time their influence on rheological properties of hydrogels were investigated. Based on the obtained results, the following optimal composition of caffeine gel was determined: 2.5 % chitosan + 0.1 % caffeine + 10 % propylenglycol + 0.1 % benzyldimethylhexadecylammonium chloride.

Keywords: caffeine • hydrogels • permeation • rheological parameters

Úvod

Kofeín sa v kozmetickom priemysle stále častejšie využíva ako významná biologicky aktívna látka. Využitie nachádza ako anticelulitídové kozmetikum. Vďaka blokade α -adrenergného receptora a inhibícií fosfodiesterázy stimuluje lipolýzu, a teda bráni kumulácii nadbytočného tuku v adipocytoch¹⁾.

Je známe, že UV lúče účinkujú nepriaznivo na kožu, v extrémnych prípadoch môžu spôsobiť až rakovinu kože. UV žiarenie tiež vedie k vzniku voľných radikálov. Pridávaním kofeínu do opaľovacích prípravkov môže kofeín pôsobiť ako účinná prevencia pred UV-indukovanou rakovinou kože a ako účinný vychytávač voľných radikálov²⁾.

Prostredníctvom lokálnej aplikácie kofeínu sa predpokladá takisto stimulačný účinok na rast vlasov. Prospešné účinky u pacientov s androgénnou alopeciou dosahuje kofeín vďaka blokade α -reduktázy, ktorá spôsobuje degradáciu testosterónu na dihydrotestosterón (DHT). Tým bráni nadmernému hromadeniu DHT a oslabovaniu vlasových cibuliek. Inhibíciou aktivity tohto enzýmu sa umožňuje obnovenie rastu vlasov^{3, 4)}.

Vlastnosti kofeínu je vhodné uplatniť v dermálnych polotuhých liekoch – hydrogélach. Hydrogély pozostávajú z polymérnych, navzájom zosieťovaných, refazcov. Prírodné polyméry vykazujú lepšie vlastnosti ako syntetické polyméry – nízku alebo žiadnu toxicitu, biokompatibilitu či biodegradovateľnosť⁵⁾. Chitosan je semisyntetický kationový polymér získavaný čiastočnou deacetyláciou prírodného polysacharidu chitínu⁶⁾. Mnohými štúdiami boli dokázané pozitívne účinky chitosanu.

PharmDr. Alexandra Kodadová (✉) • Z. Vitková • P. Herdová • M. Zsidová
Katedra galenickej farmácie
Farmaceutická fakulta UK
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR
e-mail: kodadova@fpharm.uniba.sk

J. Čižmárik
Katedra farmaceutickej chémie, Farmaceutická fakulta Univerzity
Komenského v Bratislave, SR

Tab. 1. Zloženie vzoriek

Hydrogél č.	Zložky hydrogélův % (m/m)					
	chitosan	kofeín	propylénglykol	glycerol	benzetóniumchlorid	BDMHDCI
1	2,5	0,1	—	—	—	—
2	2,5	0,1	5	—	—	—
3	2,5	0,1	10	—	—	—
4	2,5	0,1	—	5	—	—
5	2,5	0,1	—	10	—	—
6	2,5	0,1	—	—	0,05	—
7	2,5	0,1	—	—	0,10	—
8	2,5	0,1	—	—	—	0,05
9	2,5	0,1	—	—	—	0,10
10	2,5	0,1	10	—	—	0,10
11	2,5	0,1	10	—	0,05	—
12	2,5	0,1	—	10	0,05	—
13	2,5	0,1	—	10	—	0,10

BDMHDCI – benzyldimethylhexadecylamóniumchlorid

Potvrdená bola antimikrobiálna aktivita⁷⁾ chitosanu proti rôznym druhom grampozitívnych i negatívnych baktérií a tiež proti hubám, antinádorová aktivita⁸⁾ či antioxidačná aktivita⁹⁾. Chitosan ako súčasť hydrogélův pôsobí ako účinný a ne podráždivý urýchlovač permeácie liečiva cez pokožku alebo sliznice. Spôsobuje reverzibilné zvýšenie priepustnosti medzibunkových kožných priestorov¹⁰⁾. Chitosanové hydrogély sa pripravujú o rozličnej koncentrácii chitosanu^{11–14)}. Hydrogély majú stále v oblasti farmácie významné postavenie. Nenáročná aplikácia, príjemný pocit na koži, chladivý účinok vedú pacienta k dobrej kompliance. Lahkým zmytím gélu vodou je možné rýchlo prerušiť prívod liečiva do kože. Keďže ide o lokálne podanie, pravdepodobnosť predávkovania je takmer nulová.

Cieľom tejto štúdie bolo určiť vhodné pomocné látky v hydrogéli s obsahom kofeínu a sledovať stálosť pripravených gélov na základe ich reologických vlastností.

Pokusná časť

Použité chemikálie

Kofeín (*coffeinum*, SL1) – liečivo – Sanitas, Praha, Česká republika; chitosan (*chitosanum*) praktický stupeň získaný z kreviet – gélotvorná látka – stupeň deacetylácie $\geq 75\%$ – Sigma-Aldrich, pobočka Bratislava, Slovenská republika; propylénglykol (*propylenglycolum*, SL1) – humektant – Interpahrm Slovakia a.s., Bratislava, Slovenská republika; glycerol (*glycerolum*, SL1) – humektant – Interpahrm Slovakia a.s., Bratislava, Slovenská republika; benzyldimethylhexadecylamóniumchlorid – kationový tenzid – Sigma-Aldrich, pobočka Bratislava, Slovenská republika; benzetóniumchlorid (*benzethonii chloridum*, SL1) – kationový tenzid – Sigma-Aldrich, pobočka Bratislava, Slovenská republika; kyselina mliečna (*acidum lacticum*, SL1) – Interpharm Slovakia a.s., Bratislava, Slovenská republika; čistená voda (*aqua purificata*, SL1) – FaF UK, Bratislava, Slovenská republika.

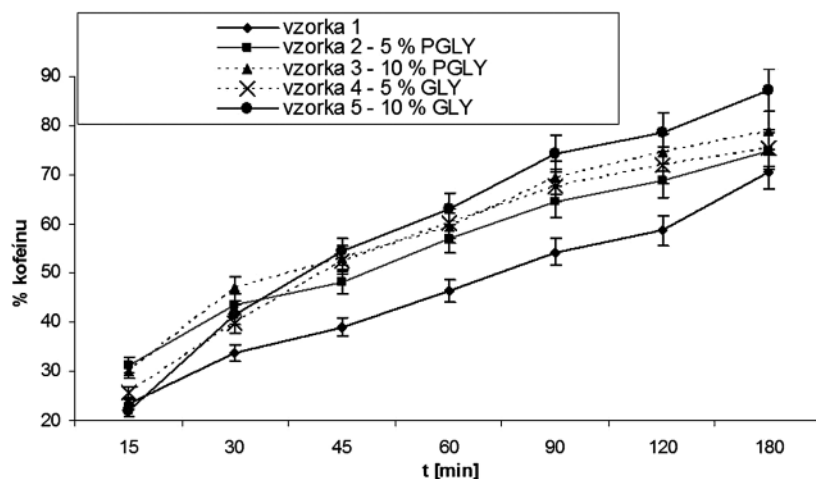
Použité prístroje

Pri permeačnom experimente boli použité: analytické váhy Mettler Toledo (Greinfensee, Švajčiarsko), permeačná aparatura zostavená na Katedre galenickej farmácie, FaF UK, Bratislava, Slovenská republika). Celofán (EKOZ, Nitra, Slovenská republika) slúžil ako permeačná membrána. Na stanovenie uvoľneného kofeínu bol použitý spektrofotometer (Phyllips Pyll UNICAM 8625 Ltd., Cambridge, Veľká Británia). Reologické hodnotenia sa uskutočnili pomocou rotačného viskozimetra Viscotester VT500 (Haake Mess-Technik, Karlsruhe, Nemecko). Thermostat U10 (Prüfgeräte-Werk Medingen, Dresden, Nemecko), ktorý poskytoval konštantnú teplotu počas celého experimentu, bol použitý aj pri liberačnom aj reologickom experimente.

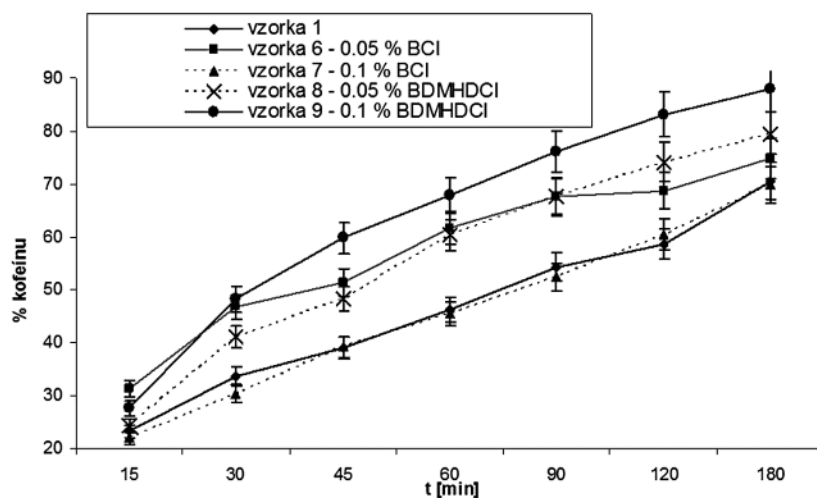
Zloženie a príprava vzoriek

Hydrogély (100 g) boli pripravené v dvoch paralelných vzorkách zo zložením uvedeným v tabuľke 1. Ku každej vzorke sa zároveň pripravil aj blank – porovnávaci gél bez obsahu liečiva (postup prípravy rovnaký). Pre vznik gélového charakteru bolo potrebné chitosan neutralizovať slabou kyselinou. Za týmto účelom sa použil 1% roztok kyseliny mliečnej.

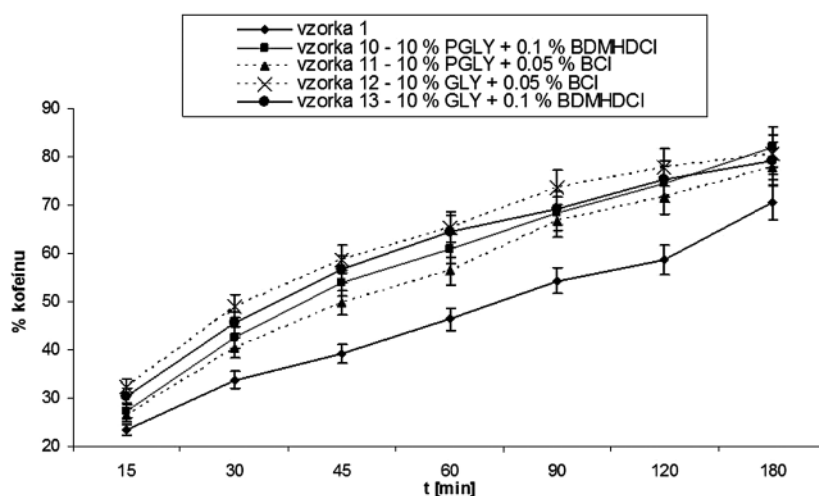
Pri príprave základnej vzorky (bez obsahu študovaných pomocných látok) sa do vytárovej kadičky presne navážilo požadované množstvo chitosanu a kofeínu. Následne sa pridalo také množstvo 1% roztoku kyseliny mliečnej (do 100 g), aby sa dosiahlo vhodné pH pre aplikáciu na kožu (pH 5,5–6,0). Zmes sa pomaly miešala, až dokým nedošlo k rozpusteniu a napučaniu všetkých zložiek, a nevznikol tak homogénny gél. Rovnakým postupom sa pripravilo celkom 13 rôznych vzoriek, ktoré sa navzájom líšili obsahom pomocných látok z radu humektantov a kationových tenzidov. Vzorky boli pripravované pri laboratórnej teplote $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po príprave sa všetky hydrogély uskladnili pri teplote $t = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu minimálne 48 hodín.



Graf 1. Vplyv humektantov na permeáciu kofeínu
PGLY – propylénglykol, GLY – glycerol



Graf 2. Vplyv kationových tenzidov na permeáciu kofeínu
BCI – benzetóniumchlorid, BDMHDCI – benzyldimetylhexadecylamóniumchlorid



Graf 3. Vplyv kombinácie pomocných látok na permeáciu kofeínu
PGLY – propylénglykol, GLY – glycerol, BCI – benzetóniumchlorid, BDMHDCI – benzyldimetylhexadecylamóniumchlorid

Permeácia kofeínu z hydrogélů

Permeačnú aparatúru tvorí séria ôsmich za sebou idúcich sklenených komôrok navzájom spojených plastovými hadičkami. Komôrka pozostáva z donorovej a akceptorovej časti oddelených semipermeabilnou membránou, ktorú v *in vitro* podmienkach predstavuje celofán. Na akceptorovej strane je umiestnené magnetické miešadlo, ktoré sa otáča okolo vlastnej osi. Vonkajšiu časť komôrky tvorí výhrevný plášť, ku ktorému priliehajú otáčajúce sa magnety. Súčasne sa otáčajú aj magnetické miešadlá vo vnútri komôrok, a tým premiešavajú ich obsah. Počas celého experimentu sa udržiavala konštantná teplota $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, ktorú zabezpečoval termostat napojený na permeačnú aparatúru.

Na membránu sa navážili 3,0 g vzorky a vložili sa do donorovej časti komôrky. Do akceptorovej sa pridávalo 20 ml fyziologického roztoku. Po stanovených časových intervaloch – 15, 30, 45, 60, 90, 120 a 180 minút sa z každej komôrky odoberali 2 ml vzorky. Odoberatý objem sa vždy nahradil rovnakým množstvom fyziologického roztoku z dôvodu zachovania pôvodného objemu. Uvoľnené množstvo liečiva sa stanovilo spektrofotometricky pri $\lambda = 274\text{ nm}$. Hodnotilo sa vždy šesť paralelných vzoriek (dve komôrky boli blank).

Stanovenie reologických vlastností pripravených vzoriek

Stanovenie reologických parametrov sa realizovalo na rotačnom viskozimetri. Zaznamenávali sa hodnoty točivého momentu, z ktorého sa vypočítali základné reologické parametre. Merania sa uskutočnili na 3. deň od prípravy, po 2 týždňoch a 1. a 2. mesiaci od prípravy vzoriek.

Výsledky a diskusia

Prvou etapou experimentu bolo študovanie vplyvu pomocných látok zo skupiny humektantov a kationových tenzidov na permeáciu kofeínu z pripravených hydrogélů. Humektanty sú pomocné látky s hygroskopickými vlastnosťami, preto sú nevyhnutnou zložkou hydrogélů. Zabraňujú nadmerným stratám vody zo systému, a tým zabraňujú aj znehodnoteniu gélu. V experimente

boli použité dve koncentrácie (5 % a 10 %) dvoch humektantov (glycerol a propylénglykol), ktoré sa osvedčili v predchádzajúcich štúdiách^{15–17}.

Graf 1 porovnáva množstvo permeovaného kofeínu zo základnej vzorky (vzorka 1) cez semipermeabilnú membránu do fyziologického roztoku so vzorkami s obsahom študovaných humektantov (vzorky 2 až 5). Ide o závislosť množstva permeovaného množstva liečiva za jednotku času. Z grafu vyplýva, že pomocné látky pozitívne ovplyvnili permeáciu kofeínu, keďže zo všetkých vzoriek sa uvoľnilo viac kofeínu ako zo základnej vzorky. Z hydrogélu 1 sa po 180 minútach uvoľnilo 70,55 % kofeínu. Signifikantné zvýšenie uvoľňovania kofeínu spôsobil hlavne 10 % glycerol (87,21 %).

Koncentrácia kofeínu 0,1 % sa zvolila na základe predchádzajúcich štúdií^{18, 19}. V ďalších štúdiách sa však predpokladá zvyšovanie koncentrácie kofeínu.

Pre vysoký obsah vody v hydrogéloch je potrebné ich stabilizovať antimikrobiálnou látkou. Za týmto účelom sa vybrali dva kationové tenzidy (benzetóniumchlorid a benzyldimetylhexadecylamóniumchlorid) o dvoch rôznych koncentráciách (0,05 % a 0,1%), osvedčené v predchádzajúcich štúdiách^{12, 14, 15}. Okrem antimikrobiálnej aktivity sa osvedčili v týchto koncentráciách aj ako enhancery liečiv. Ich výber bol podmienený kationovým charakterom chitosanu.

Graf 2 zobrazuje vplyv týchto tenzidov (vzorky 6 až 9) na permeáciu kofeínu z hydrogelov. Tenzidy pozitívne ovplyvnili permeáciu liečiva. Zvýšením koncentrácie benzyldimetylhexadecylamóniumchloridu sa vo významnej miere zvýšilo aj množstvo permeovaného kofeínu, zatiaľ čo pri zvýšení koncentrácie benzetóniumchloridu nastal pokles uvoľnenia kofeínu. Štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) kofeínu sa zistil hlavne zo vzorky 9 s obsahom 0,1 % benzyldimetylhexadecylamóniumchloridu (87,9 %) oproti základnej vzorke.

V hydrogéloch je nevyhnutná prítomnosť humektantov aj konzervantov, preto sa pripravili štyri vzorky s ich vzájomnou kombináciou (vzorky 10 až 13).

V grafe 3 sú spracované liberačné profily základnej vzorky a štyroch vzoriek s kombináciou pomocných látok (zloženie v tab. 1). Z grafu sa dá usúdiť, že kombinácie pomocných látok spôsobili zvýšenie uvoľňovania kofeínu oproti základnej vzorke, a teda sa dá aj skonštatovať, že kombinácia nevyhnutných pomocných látok v hydrogéli kladne ovplyvnila permeáciu kofeínu z hydrogélu do fyziologického roztoku. Ako optimálna kombinácia pomocných látok sa ukázala 10 % propylénglykol a 0,1 % benzyldimetylhexadecylamóniumchlorid (81,92 %). Avšak, liberačné krivky vzoriek 10–13 nevykazujú štatisticky významné rozdiely.

Druhým krokom výskumu bolo sledovanie stability pripravených gélov stanovením reologických vlastností jednotlivých hydrogelov. Na tento experiment bola zvolená koncentrácia chitosanu 2,5 % vďaka výhodným reologickým vlastnostiam, ktoré boli dokázané v predchádzajúcich štúdiách^{11–14}.

U jednotlivých pripravených vzoriek sa stanovili základné reologické parametre: rýchlostný spád D , tangenciálne napätie τ a štruktúrna viskozita η_0 . Z priebehu tokových kriviek vyplýva, že všetky pripravené vzorky patrili medzi newtonovské sústavy. Základná vzorka

nadobudla tixotropný charakter. Charakteristické sú dve tokové krivky (stúpajúca a klesajúca) líšiac sa tvarom i polohou. Spoločný majú iba bod pri najvyššom rýchlostnom gradiente. Z hľadiska dermálnej aplikácie je tixotropný charakter výhodný²⁰. Z porovnania vzoriek s obsahom humektantov vyplýva, že tixotropné vlastnosti vykazoval iba hydrogél s obsahom 10 % propylénglykolu. Vzorky obsahujúce 5 % propylénglykol a glycerol v oboch koncentráciách vykazovali pseudoplastické vlastnosti – menej vhodné pri dermálnej aplikácii. Z porovnania reogramov vzoriek s obsahom kationových tenzidov sa dá usúdiť, že tixotropný charakter nadobudla len vzorka s obsahom 0,05 % benzetóniumchloridu. Gély s kombináciami vybraných pomocných látok vykazovali tixotropný charakter, okrem kombinácie 10 % glycerol a 0,1 % benzyldimetylhexadecylamóniumchlorid. Najvýraznejší tixotropný charakter vykazovala vzorka s kombináciou 10 % propylénglykol + 0,1 % benzyldimetylhexadecylamóniumchlorid.

Počas doby skladovania sa merania tokových vlastností uskutočnili na 3. deň od prípravy vzoriek, po 2 týždňoch a 1. a 2. mesiaci od prípravy vzoriek. Cieľom opakovaných meraní bolo zistiť, či nedochádza k zmene viskozity jednotlivých gélov. Zistilo sa, že doba skladovania ani teplota, pri ktorej boli skladované, nemenili výrazne tokové vlastnosti hydrogelov. Nedošlo k zmene časovo závislého tixotropného charakteru na časovo nezávislý charakter. Hydrogély si tiež zachovali pôvodnú viskozitu.

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že optimálne zloženie hydrogélu pre kofeín z hľadiska liberácie aj reologických vlastností vykazuje hydrogél nasledovného zloženia: 2,5 % chitosan + 0,1 % kofeín + 10 % propylénglykol + 0,1 % benzyldimetylhexadecylamóniumchlorid.

Stret záujmov: žiadny.

Literatúra

1. Herman A., Herman A. P. Caffeine's mechanism of action and its cosmetics use. *Skin. Pharmacol. Physiol.* 2013; 26, 8–14.
2. León-Carmona J. R., Galano A. Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? *J. Phys. Chem. B*, 2011; 115, 4538–4546.
3. Otberg N., Patzelt A., Rasulev U., Hagemester T., Linscheid M., Sinkgraven R., Sterry W., Lademann J. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2007; 65, 488–492.
4. Bansal M., Machanda K., Pandey S. S. Role of caffeine in the management of androgenetic alopecia. *Int. J. Trichology*, 2012; 4, 185–186.
5. Mohamed N. A., Fahmy M. M. Synthesis and antimicrobial activity of some novel cross-linked chitosan hydrogels. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13, 11194–209.
6. Basu K. S., Kavitha K., Rupeshkumar M. Evaluation of ionic cross-linked chitosan/gelatin microspheres of tramadol hydrochloride. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2011; 12, 28–34.
7. Yajun X., Xiaofei L., Qiang, CH. Synthesis and characterization of water soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* 2007; 69, 142–142.
8. Uragami T., Tokura S. Material science of chitin and chitosan. 1. vyd. Japan: Kodansha Scientific Ltd. 2010; 284–284.
9. Vavříková E., Vinšová J. Chitosan a jeho farmaceutická aplikace. *Chem. Listy* 2009; 103, 56–57.

10. **Herdová P., Vitková Z.** Štúdium liberácie liečiv z chitosanových hydrogélů. *Derma* 2010; 10, 2–20.
11. **Kodadová A., Vitková Z., Herdová P.** Hodnotenie liberácie kofeínu z dermálnych polotuhých liekov. *Čes. slov. Farm.* 2013; 62, 220–222.
12. **Vitková Z., Oremusová J., Herdová P., Kodadová A.** Release and Rheological Properties of Topical Drugs. *Tenside Surfact. Det.* 2013; 50, 39–44.
13. **Senel S., İkinci G., Ka S., Yousefi-Rad A., Sargon M.F., Hincal A.A.** Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int. J. Pharm.* 2000; 193, 197–203.
14. **Herdová P., Kodadová A., Vitková Z.** Vplyv enhanceru na tokové vlastnosti hydrogélů. In : Zborník Preveda – IV. interaktívna konferencia mladých vedcov. Bratislava 2012; 70.
15. **Čižmárik J., Vitková Z., Herdová P., Kodadová A., Vími D.** Formulácia benzetóniumchloridu do gélů. *Čes. slov. Farm.* 2014; 63, 123–126.
16. **Vitková Z., Herdová P., Kodadová A., Šeligová J., Grančai D., Poláková D.** Formulácia gélů s obsahom šalvie lekárskej. *Čes. slov. Farm.* 2012; 61, 169–171.
17. **Capková Z., Vitková Z., Uhrovská S.** Vplyv humektantů na farmaceutickú dostupnosť a reologické vlastnosti hydrogélů s cetirizínom. *Čes. slov. Farm.*, 2005; 54, 226–230.
18. **Kodadová A., Vitková Z., Herdová P., Šeligová J.** Vplyv teploty a tenzidu na reologické vlastnosti chitosanových hydrogélů. In: Zborník Preveda – V. interaktívna konferencia mladých vedcov. Bratislava 2013; 53.
19. **Kodadová A., Vitková Z., Herdová P., Oremusová J., Fořtová M.** Vplyv teploty na liberáciu kofeínu z hydrogélů s obsahom kvartérnej amóniovej soli. In: Zborník abstraktů zo VI. vedeckej konferencie „Mladí vedci – bezpečnosť potravinového reťazca“. Bratislava 2013.
20. **Kopecký F., Kopecká B.** Fyzikální a fyzikálně-chemická teorie léků jejich forem. In *Technologie léků*. 3. vydání. Praha: Galén 2006; kap. 2, 14–15.