

Znaczenie spektrofotometrii UV-Vis w badaniach biodostępności farmaceutycznej w warunkach *in vitro*

Joanna GOŚCIAŃSKA, Anna OLEJNIK, Ewa SOBIESZCZUK, Karolina LATANOWICZ, Izabela NOWAK –
Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

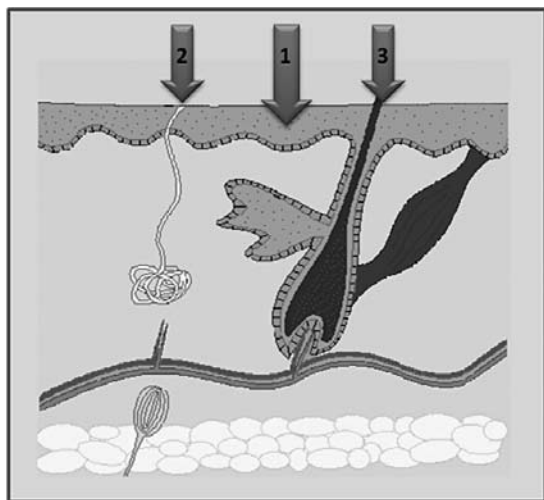
Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 7, 649-654

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się ogromny wzrost zainteresowania badaniami biodostępności farmaceutycznej substancji leczniczych zawartych w maściach. Wynika to przede wszystkim z ogromnej roli skóry jako narządu będącego miejscem podania leków w celu uzyskania ich efektywnego stężenia w kompartmentcie tkankowym, a nawet stężenia równowagowego w kompartmentcie centralnym. Jakość preparatów maściowych aplikowanych tą drogą zależy od wielu czynników, m.in. właściwości substancji leczniczych oraz innych substancji pomocniczych, rodzaju zastosowanego podłoża, a nawet od techniki sporządzania preparatu. Dobór odpowiednich składników maści w znacznym stopniu decyduje o szybkości uwalniania substancji leczniczej [1].

Preparaty dermatologiczne mogą działać na powierzchni skóry (środki odkażające), w warstwach położonych głębiej (np. leki przeciwhistaminowe) lub w narządach, do których dana substancja lecznicza dociera krwiobiegami. Wchłanianie substancji aktywnych przez skórę przebiega odmiennie od wchłaniania z układu pokarmowego. Wynika to z głównej funkcji skóry, tj. bariery ochronnej przed czynnikami zewnętrznymi [2, 3].

Istnieją różne drogi, przez które substancja lecznicza może dostać się w głąb skóry. Wśród nich wyróżniamy: bezpośrednie przenikanie przez warstwę rogową, przenikanie przez ujścia gruczołów łojowych i potowych, albo przenikanie przez ujścia mieszków włosowych (rys. 1).



Rys. 1. Przenikanie substancji przez skórę. Drogi przez: 1 – naskórek, 2 – ujścia gruczołów potowych, 3 – ujścia mieszków włosowych

Proces uwalniania substancji aktywnej z leku (zależnie od postaci leku) stanowi bardzo ważny etap w określeniu efektu jego działania. Dlatego badania biodostępności farmaceutycznej składników leczniczych maści prowadzone są w przemysłowych laboratoriach kontroli jakości. Umożliwiają one udokumentowanie działania preparatu po wprowadzeniu niewielkich zmian w jego składzie, aparaturze lub w procesie produkcyjnym [4].

Farmakopee charakteryzują ogólne warunki prowadzenia badań biodostępności farmaceutycznej produktów leczniczych. Konieczne jest ustalenie następujących parametrów: rodzaju, objętości oraz tem-

peratury płynu do uwalniania, szybkości obrotu mieszadła, czasu prowadzenia badania i pobierania próbek płynu akceptorowego, analizy stężenia rozpuszczonej substancji leczniczej (za pomocą spektrofotometrii UV-Vis, chromatografii cieczowej HPLC) [5].

W niniejszej pracy podjęto badania nad uwalnianiem izotretynoiny oraz heparyny z maści o różnym składzie chemicznym w komorze dyfuzyjnej połączonej ze spektrofotometrem UV-Vis. Zastosowanie spektrofotometrii UV-Vis w badaniach biodostępności farmaceutycznej pozwala oszacować szybkość uwalniania substancji biologicznie czynnej z preparatów maściowych do środowiska zewnętrznego, rzędowość procesu, a także właściwości powierzchni wymiany masy użytych membran dializacyjnych na granicy faz.

Część eksperymentalna

Preparatyka formulacji farmaceutycznych

• Żele

W pierwszej kolejności odważono 21,25 mg soli sodowej heparyny (Sigma-Aldrich), po czym dodano ją do 25 ml wody destylowanej i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego aż do całkowitego jej rozpuszczenia. Następnie roztwór zagęszczono gumą ksantanową (Evonic) do postaci żelu. Guma ksantanowa jest egzopolisacharydem pochodzenia bakteryjnego. Stosowana jest jako naturalny emulgator i zagęszczacz, który rozpuszcza się zarówno w zimnej jak i ciepłej wodzie. Podobną procedurę zastosowano w przypadku preparatyki żelu z izotretynoiną (BASF).

• Emulsje typu olej w wodzie

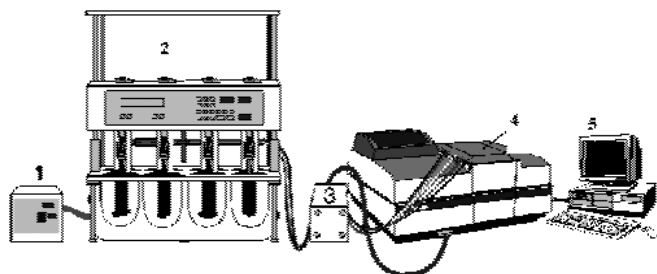
W zlewce o pojemności 25 ml odważono składniki fazy tłuszczowej: 6,5 g oleju arachidowego (Sunniva Med), 1,5 g alkoholu cetylowego (Sigma-Aldrich) oraz 2 g monostearynianu glicerolu (Sigma-Aldrich) i ogrzewano w łaźni wodnej do temperatury 60°C. W drugiej zlewce o pojemności 100 ml odważono fazę wodną: 40 g wody destylowanej, do której dodano odpowiednio 21,25 mg soli sodowej heparyny lub 50 mg izotretynoiny. W obu przypadkach całość mieszano do całkowitego rozpuszczenia substancji czynnej za pomocą mieszadła magnetycznego, a następnie ogrzewano w łaźni wodnej do temp. 60°C. Gdy faza tłuszczowa i wodna osiągnęły oczekiwaną temperaturę 60°C, fazę olejową dodano do fazy wodnej i homogenizowano za pomocą homogenizatora mechanicznego firmy IKA Ultra-Turrax® Tube Drive.

• Maści na bazie lanoliny

Na szalce Petriego odważono 45 g lanoliny (Fluka). Z kolei w zlewce o pojemności 10 ml odmierzone 5 ml wody destylowanej, do której dodano odpowiednio 21,25 mg soli sodowej heparyny lub 50 mg izotretynoiny, po czym całość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego do całkowitego rozpuszczenia substancji czynnych. Następnie powoli wkręcano za pomocą tłuczka i moździerza fazę wodną do fazy tłuszczowej.

Badanie biodostępności farmaceutycznej

W celu zbadania kinetyki uwalniania izotretynoiny oraz heparyny z formulacji farmaceutycznych o różnym składzie chemicznym, zastosowano zautomatyzowany aparat dyfuzyjny VanKel 7010 (firmy Varian) połączony ze spektrofotometrem UV-Vis Cary 50 Bio (Varian) (rys. 2).



Rys. 2. Budowa aparatu VanKel 7010 do badania kinetyki uwalniania substancji czynnej: 1-laźnia wodna; 2-moduł, gdzie następuje proces uwalniania; 3-pompa perystaltyczna; 4- spektrofotometr UV-Vis; 5-komputer [6]

Temperaturę procesu uwalniania utrzymywano na stałym poziomie 32°C. Komory dyfuzyjne wypełniono 1 g danej formułacji, zawierającej odpowiednią substancję czynną i pokryto membraną Cuprophane, imitującą barierę skórną. Badania biodostępności izotretynoiny prowadzono w buforze fosforanowym o pH 5,5 z dodatkiem 96% alkoholu etylowego (stosunek: 65:35), natomiast w przypadku heparyny jako płyn akceptorowy zastosowano roztwór wodny azuru II, będącego równowagową mieszaniną azuru B (N,N,N-trimetylotioniny) oraz błękitu metylenowego (pH 6). Ilość uwolnionej substancji czynnej obliczano ze wzoru:

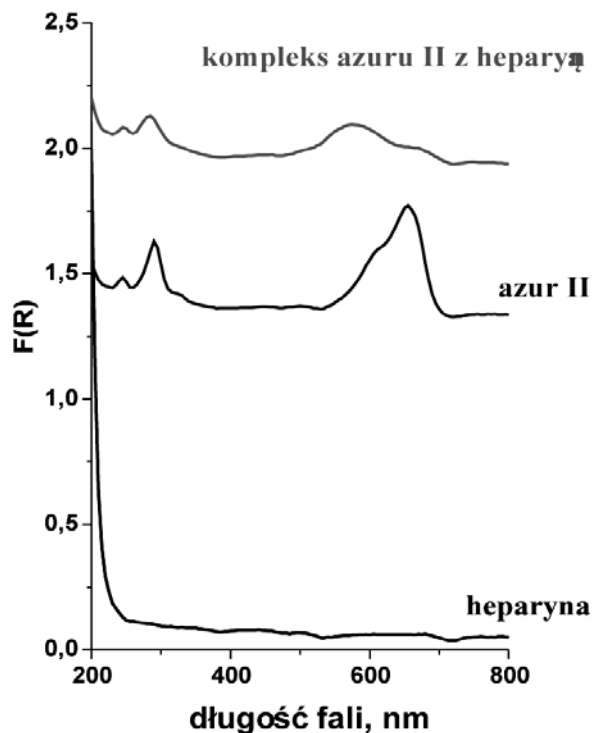
$$\% \text{ uwolnienia} = \left(\frac{A_p}{A_w} \right) \left(\frac{m_w [\text{mg}] \times C_w}{V_w [\text{ml}]} \right) \left(\frac{1}{D_w} \right) \left(\frac{V_p [\text{ml}]}{m_p [\text{mg}]} \right) \times 100$$

w którym poszczególne symbole oznaczają: A_p – absorbanca próbki, A_w – absorbanca wzorca; m_w – masa wzorca; m_p – masa substancji biologicznie czynnej zawartej w próbce; C_w – czystość wzorca; D_w – rozcieńczenie wzorca; V_w – objętość roztworu wzorcowego; V_p – objętość płynu akceptorowego (np. buforu fosforanowego).

Wyniki i dyskusja

Ilościowe oznaczenia procentu uwolnienia heparyny oraz izotretynoiny za pomocą spektrofotometrii UV-Vis, podobnie jak większość oznaczeń instrumentalnych, należą do metod porównawczych. Dlatego występuje konieczność porównywania badanych roztworów z odpowiednimi wzorcami i posługiwania się krzywymi kalibracyjnymi.

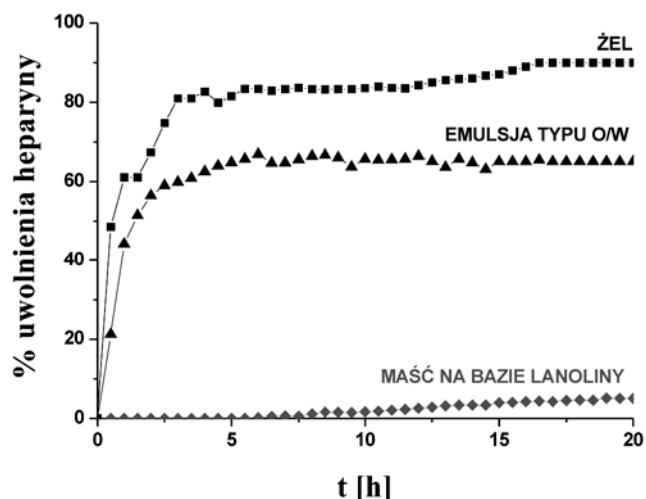
W ramach niniejszej pracy, w celu zbadania biodostępności farmaceutycznej wybranych substancji czynnych, mierzono absorbancję roztworów badanych i odpowiednio przygotowanych wzorców (o znanym stężeniu), w kuwetach o tej samej grubości, co 30 minut w czasie 20-godzinnego procesu uwalniania. Wiarygodność ilościowych oznaczeń przeprowadzanych metodą spektrofotometryczną została zapewniona poprzez dobór charakterystycznych długości fali, przy których absorbują promieniowanie testowane substancje lecznicze, a nie zastosowane rozpuszczalniki (płyny akceptorowe, np. bufor fosforanowy). W przypadku izotretynoiny rejestrowano widma UV przy $\lambda_{\text{max}} = 345 \text{ nm}$. Heparyna wykazuje maksimum absorpcji promieniowania UV przy długości fali 190 nm. Ze względu na to, że przy długości fali w zakresie 190-210 nm absorbują wiele innych substancji zawartych w preparatach farmaceutycznych, pomiar uwalniania substancji czynnej byłby obciążony bardzo dużym błędem. Stąd też dla heparyny użyto odpowiedniego odczynnika kompleksującego (azuru II), aby przesunąć pasmo absorpcji w stronę wyższych długości fali, pamiętając o tym, aby reakcja kompleksowania była selektywna, szybka i odtwarzalna. Z danych literaturowych [7, 8] wynika, że kompleks azuru II z heparyną posiada maksimum absorpcji przy $\lambda_{\text{max}} = 500\text{-}530 \text{ nm}$. Widmo kompleksu zarejestrowane w laboratorium wskazywało na wzrost absorpcji w tym samym obszarze długości fali (rys. 3). Warto zaznaczyć, że po wprowadzeniu heparyny do roztworu wodnego azuru II, zaobserwowano zmianę barwy z niebieskiej na fioletową, charakterystyczną dla kompleksu azuru II z heparyną.



Rys. 3. Widmo UV-Vis heparyny ($\lambda_{\text{max}} 190 \text{ nm}$), roztworu wodnego barwnika azuru II ($\lambda_{\text{max}} 658 \text{ nm}$) oraz kompleksu azuru II z heparyną ($\lambda_{\text{max}} 530 \text{ nm}$)

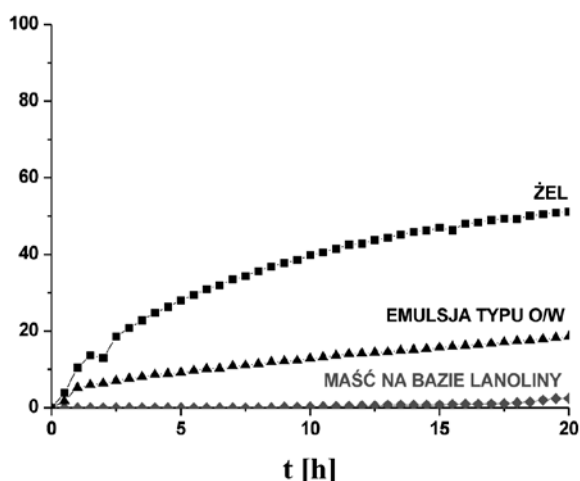
Uwalnianie substancji czynnych obejmuje zjawisko dyfuzji z leku do środowiska aplikacji. Badania przeprowadzone przy użyciu spektrofotometrii UV-Vis wykazały, że szybkość i stopień uwalniania, zarówno heparyny jak i izotretynoiny, zależą w dużym stopniu od postaci danej formułacji farmaceutycznej.

Profile uwalniania heparyny z żelu i emulsji typu olej w wodzie (rys. 4) wskazują, że w preparatach tych nie występują żadne związki mogące hamować dostępność farmaceutyczną substancji czynnej. Proces uwalniania zachodzi bardzo szybko przy zastosowaniu membrany Cuprophane, wykonanej z octanu celulozy. W ciągu dwóch pierwszych godzin analizy można zaobserwować ok. 60% uwolnienie substancji aktywnej. W pozostałym czasie ilość ta nieznacznie wzrasta i utrzymuje się do końca procesu na stałym poziomie 65% dla emulsji typu olej w wodzie oraz 81% dla żelu. W przypadku uwalniania heparyny z maści przygotowanej na podłożu lanolinowym, pierwsze ilości substancji aktywnej w płynie akceptorowym pojawiają się dopiero po upływie 6,5 godziny. Jest to związane z wysoką hydrofobowością oraz lepkością tego typu formułacji. Maksymalny stopień uwolnienia heparyny jest bardzo niski i wynosi ok. 6%.



Rys. 4. Profile uwalniania heparyny z różnych formułacji farmaceutycznych

Podobne zależności, ilości uwalnianej substancji biologicznie czynnej od rodzaju formułacji farmaceutycznej, zaobserwowano w przypadku izotretynoiny. Przedstawione na rysunku 5 profile wskazują, że izotretynoina uwalnia się stopniowo zarówno z żelu jak i emulsji typu olej w wodzie. Równomierny przyrost uwolnionej substancji czynnej następuje podczas pierwszych 7 godzin analizy, po czym osiągnięty zostaje stan równowagi. Dostępność farmaceutyczna izotretynoiny wprowadzonej do żelu wynosi ok. 52%, natomiast w emulsji typu olej w wodzie utrzymuje się na poziomie 19%. Maść na bazie lanoliny hamuje uwalnianie izotretynoiny. Dopiero po upływie 10 godzin pojawiają się pierwsze bardzo małe ilości (ok. 1%) substancji czynnej w płynie akceptorowym. Maksymalny procent uwolnienia izotretynoiny wynosi 3%. Duża zawartość fazy tłuszczowej, skutkująca wysoką lepkością maści wykonanej na bazie lanoliny, hamuje uwalnianie substancji czynnej z tej formułacji.



Rys. 5. Profile uwalniania izotretynoiny z różnych formułacji farmaceutycznych

Wnioski

Zastosowanie technik spektroskopowych (a w szczególności spektrofotometrii UV-Vis) w badaniach biodostępności farmaceutycznej przyczynia się do opracowania nowych, efektywnych preparatów leczniczych aplikowanych na skórę. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania wykazały, że zarówno heparyna jak i izotretynoina dodane do podłoża maściowych o dużej lepkości (np. na bazie lanoliny) znacznie wolniej przenikają przez membrany dializacyjne imitujące barierę skórną niż w przypadku zastosowania podłoża o niższej lepkości (na bazie gumy ksantanowej). Obniżenie zawartości składników tłuszczowych w formułacjach farmaceutycznych sprzyja większej biodostępności substancji biologicznie czynnych.

Podziękowania

Badania wykonane w ramach niniejszej pracy były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu nr N N204 403040.

Literatura

1. Piechota-Urbańska M.: Wpływ parametrów lepkościowych wybranych podłoży absorpcyjnych i hydrożelowych na dostępność farmaceutyczną modelowego środka leczniczego. *Polish Journal of Cosmetology* 2005, **4**, 260-270.
2. Madison K.C.: Barrier Function of the Skin: "La Raison d'EOE tre" of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 2003, **121**, **2**, 231-241.
3. Krówczyński L.: *Zarys technologii postaci leku*. PZWL, Warszawa 1977.
4. Janicki S., Fiebig A.: *Farmacja stosowana*. PZWL, Warszawa 1998.
5. Janicki S., Sznitowska M., Zieliński W.: *Dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna leków*. OIN Polfa, Warszawa 2001.
6. Cary Dissolution System, 2002.
7. Klein M.D., Drongowski R.A., Linhardt R.J., Langer R.S.: A colorimetric assay for chemical heparin in plasma. *Analytical Biochemistry* 1982, **124**, **1**, 59-64.
8. Gutowska A., Bae Y., Feijen J., Kim S.: Heparin release from thermosensitive hydrogels. *Journal of Controlled Release* 1992, **22**, 95-104.

Dr Joanna GOŚCIAŃSKA jest adiunktem w Pracowni Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień magistra uzyskała w 2005 r., a tytuł doktora w 2009 r. na Wydziale Chemii UAM. Jej tematyka badawcza koncentruje się wokół syntezy, modyfikacji i charakterystyki mezoporowatych sit molekularnych i tlenków metali. Dodatkowo zajmuje się analitycznymi metodami badania preparatów kosmetycznych. Jest współautorką 12. publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, 10. artykułów w recenzowanych wydawnictwach zbiorowych oraz 32. prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Mgr Anna OLEJNIK jest doktorantką w Pracowni Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień magistra chemii uzyskała w 2008 r., a w 2009 r. ukończyła studia w specjalności chemia kosmetyczna na tej samej uczelni. W pracy badawczej zajmuje się oznaczaniem niskocząsteczkowych peptydów w formułacjach kosmetycznych oraz badaniem ich przenikania przez błony syntetyczne. Jest współautorką 2. publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, 7. artykułów w recenzowanych wydawnictwach zbiorowych oraz 10. prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Mgr Ewa SOBIESZCZUK – studentka Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (specjalność: chemia kosmetyczna) w latach 2009-2011.

Mgr Karolina LATANOWICZ – studentka Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (specjalność: chemia kosmetyczna) w latach 2009-2010.

Prof. UAM dr hab. Izabela NOWAK jest profesorem nadzwyczajnym i kierownikiem Pracowni Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu. W ramach stypendium TEMPUS przebywała w latach 1992-1993 na Uniwersytecie w Reading, UK, gdzie napisała pracę magisterską. W 1993 r. otrzymała tytuł magistra chemii, zaś w 1997 r. stopień naukowy doktora w zakresie chemii. Odbyła także staż doktorski w Leverhulme Centre for Catalysis w Liverpool. W 2006 r. otrzymała stopień naukowy doktora habilitowanego za badania nad syntezą, charakterystyką i katalitycznymi właściwościami nanoporowatych materiałów w procesach utleniania w fazie ciekłej. Jej obecne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół syntezy i modyfikacji uporządkowanych materiałów, ich właściwościach teksturalnych/strukturalnych/powierzchniowych/kwasowo-zasadowych/redoks, heterogenicznie katalizowanych syntezach wysokowartościowych chemikaliów oraz nowoczesnych strategiach syntez dla celów kosmetycznych. Jest współautorem ponad 80. prac naukowych, 3. patentów i przedstawiła ponad 140. prezentacji na sympozjach i konferencjach naukowych.



SŁONECZNA CHEMIA

[www.miesiecznikchemik.pl](http://www miesiecznikchemik.pl)