

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VERONIKA ROŽMAN

DIPLOMSKA NALOGA

**DOLOČANJE KONCENTRACIJE MODELNE KOZMETIČNO AKTIVNE  
SESTAVINE V TERMOREVERZIBILNEM HIDROGELU**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ KOZMETOLOGIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

*Univerza v Ljubljani*  
*Fakulteta za farmacijo*



VERONIKA ROŽMAN

DIPLOMSKA NALOGA

**DOLOČANJE KONCENTRACIJE MODELNE KOZMETIČNO AKTIVNE  
SESTAVINE V TERMOREVERZIBILNEM HIDROGELU**

**DETERMINATION OF MODEL COSMETICALLY ACTIVE INGREDIENT  
CONCENTRATION IN THERMOREVERSIBLE HYDROGEL**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ KOZMETOLOGIJE

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Oddelku za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner, mag. farm.

*Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner, mag. farm., za strokovno vodenje in potrpežljivo usmerjanje pri nastajanju diplomske naloge.*

*Za pomoč v laboratoriju se zahvaljujem ge. Mojci Keržan, ing. kem. teh.*

*Posebno pa sem hvaležna svoji družini za finančno in moralno podporo med študijem.*

## **Izjava**

**Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner, mag. farm.**

**Veronika Rožman**

Predsednik diplomske komisije:

izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član diplomske komisije:

doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

# VSEBINA

|                                                                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>POVZETEK.....</b>                                                                                         | <b>III</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                        | <b>V</b>   |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>                                                                                 | <b>VII</b> |
| <b>1. UVOD .....</b>                                                                                         | <b>1</b>   |
| 1.1. GELI .....                                                                                              | 1          |
| 1.2. HIDROGELI .....                                                                                         | 2          |
| 1.2.1. Stimulacijsko odzivni hidrogeli (hidrogeli občutljivi na dražljaje).....                              | 3          |
| 1.1.2.1. Temperaturno odvisni hidrogeli na osnovi poloksamerov .....                                         | 3          |
| 1.3. POLIMERI.....                                                                                           | 4          |
| 1.4. POLOKSAMERI .....                                                                                       | 5          |
| 1.4.1. Micelarno obnašanje poloksamerov .....                                                                | 6          |
| 1.4.2. Termoreverzibilno obnašanje poloksamerov .....                                                        | 7          |
| 1.4.3. Poloksamer 407/Pluronic F 127®.....                                                                   | 8          |
| 1.5. TRANSPORT SNOVI SKOZI KOŽO .....                                                                        | 9          |
| 1.5.1. Vrednotenje prehajanja snovi skozi kožo .....                                                         | 10         |
| 1.5.2. Vrednotenje sproščanja snovi iz poloksamernih formulacij .....                                        | 10         |
| 1.6. DIFUZIJSKE CELICE.....                                                                                  | 11         |
| 1.6.1. Statične difuzijske celice .....                                                                      | 13         |
| 1.6.2. Pretočne difuzijske celice .....                                                                      | 14         |
| 1.6.3. Difuzijski model Saarbrücken .....                                                                    | 14         |
| 1.6.4. Permeabilnostni test z uporabo paralelnih membran – PAMPA.....                                        | 15         |
| <b>2. NAMEN DELA.....</b>                                                                                    | <b>16</b>  |
| <b>3. MATERIALI IN NAPRAVE.....</b>                                                                          | <b>17</b>  |
| 3.1. MATERIALI.....                                                                                          | 17         |
| 3.2. NAPRAVE.....                                                                                            | 17         |
| <b>4. POSTOPKI IN METODE .....</b>                                                                           | <b>18</b>  |
| 4.1. PRIPRAVA FOSFATNEGA PUFRA .....                                                                         | 18         |
| 4.2. UMERITVENA PREMICA.....                                                                                 | 18         |
| 4.3. PRIPRAVA TERMOREVERZIBILNEGA HIDROGELA.....                                                             | 18         |
| 4.4. DOLOČANJE PRODIRANJA MODELNE KOZMETIČNO AKTIVNE SESTAVINE IZ<br>RAZTOPINE V POLOKSAMERNI HIDROGEL ..... | 20         |
| 4.4.1. Priprava raztopine z modelno kozmetično aktivno sestavino .....                                       | 20         |
| 4.4.2. Izdelava praznega hidrogela .....                                                                     | 21         |
| 4.4.3. Nanos raztopine na gel.....                                                                           | 21         |
| 4.4.4. Merjenje koncentracij po navideznih slojih v različnih časovnih točkah .....                          | 21         |

|                                                                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>                                                                                              | <b>23</b> |
| 5.1. IZDELAVA UMERITVENE PREMICE .....                                                                                            | 23        |
| 5.2. VGRAJEVANJE MODELNE KOZMETIČNO AKTIVNE SESTAVINE V POLOKSAMERNI<br>HIDROGEL IN DOLOČANJE HOMOGENOSTI NJENE PORAZDELITVE..... | 24        |
| 5.3. VREDNOTENJE PENETRACIJE NATRIJEVEGA SALICILATA V POLOKSAMERNEM<br>HIDROGELU .....                                            | 28        |
| <b>6. ZAKLJUČEK .....</b>                                                                                                         | <b>33</b> |
| <b>7. LITERATURA .....</b>                                                                                                        | <b>35</b> |

## POVZETEK

Geli so poltrdni sistemi. Glede na topilo jih razvrščamo na organogele, kjer je topilo nepolarno, in hidrogel, kjer je topilo polarno. Poznamo konvencionalne in stimulacijsko oz. okoljsko odzivne hidrogel. Za razliko od konvencionalnih se stimulacijsko odzivni hidrogeli odzovejo na spremembe v okolici z nabrekanjem ali krčenjem. Najbolj preučevani okoljsko odzivni polimerni sistemi so temperaturno odvisni hidrogeli in med njimi termoreverzibilni. Temperaturno odvisne hidrogel tvorijo tudi poloksameri. Slednji pri spremembi temperature preidejo iz sol v gel obliko in obratno. Poloksameri so funkcionalni blok kopolimeri, sestavljeni iz molekul polietilen- in polipropilenoksida v razmerju 2:1. Vodne raztopine poloksamerov kažejo termoreverzibilne sposobnosti – pri povišani temperaturi tvorijo hidrogelno strukturo, pri ohlajanju pa se spremenijo v tekočino.

Pomemben del raziskav dermalne absorpcije kozmetično aktivnih sestavin (KAS) predstavljajo metode *in vitro*. Najpogostejše se za merjenje penetracije uporabljajo difuzijske celice. Za študije penetracije se uporabljajo tudi alternativni difuzijski modeli (Saarbrücken), vse več pa je raziskav v smeri prepustnostnih testov brez difuzijske celice.

V nalogi smo se osredotočili na razvoj metode, ki bi omogočala preučevanje penetracije spojin skozi termoreverzibilni hidrogel. V ta namen smo metodo razdelili na dva dela. V prvem sklopu smo v 20 % poloksamerni hidrogel (Lutrol F127) v fosfatnem pufru vgrajevali različne koncentracije natrijevega salicilata (NaSAL): 0,17 %, 0,33 %, 0,50 % in 0,83 %. Ugotavljali smo, pri kateri koncentraciji učinkovine lahko ponovljivo določimo ustrezno količino modelne KAS. Najboljše rezultate homogene razporeditve aktivne učinkovine je kazala koncentracija 0,50 %, zato smo jo uporabili pri nadaljnjem delu.

V drugem delu smo tako opazovali penetracijo modelne aktivne učinkovine v 20 % hidrogelu brez učinkovine po različnih slojih v časovnih točkah: 4 h, 8 h, 24 h, 48 h in 72 h. NaSAL je po gelu prodiral enakomerno, vendar zelo počasi, saj po 72 urah še ni bil enakomerno porazdeljen po celotni globini vzorca. Z novo metodo pa smo po vseh navidezni globinah vzorca uspeli določiti celotno vgrajeno količino NaSAL, kar nam je omogočilo termoreverzibilnost sistema. Pri višjih temperaturah je namreč ta sistem v obliki poloksamernega gela, kar omogoča ločitev vzorca raztopine od gela brez dodatne vmesne

membrane, hkrati pa ga pri nekoliko nižjih temperaturah zlahka utekočinimo in kvantitativno prenašamo vzorce, kar omogoča zelo ponovljive rezultate.

Pri nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno zmanjšati koncentracijo poloksamera, da bi dobili hidrogel, po katerem bi modelna, kozmetično aktivna učinkovina prehajala hitreje.

## ABSTRACT

Gels are semi-solid systems. Depending on the solvent they are classified in organogels, where the solvent is non-polar, and hydrogels, where the solvent is polar. Another classification divides them in conventional and stimulation or environmentally sensitive hydrogels. Unlike conventional, stimulation sensitive hydrogels respond to changes in surroundings by swelling or shrinking. The most studied environmentally sensitive polymer systems are temperature sensitive hydrogels and between them thermoreversible. Temperature sensitive hydrogels are amongst others formed by poloxamers. Aforementioned are with change in temperature transformed from sol to gel form, and vice versa. Poloxamers are functional block copolymers, made up of molecules of polyethylene- and polypropylene oxide in ratio of 2:1. An aqueous solution of poloxamer shows thermoreversible ability – at an elevated temperature forms a hydrogel structure, after cooling down it is changed into liquid.

*In vitro* methods represent an important part of research in dermal absorption of cosmetic ingredients. Most commonly used models to measure penetration are diffusion cells. Also, alternative diffusion models (Saarbrücken) are used for penetration studies and there is increasing number of research towards permeability tests without diffusion cells.

In thesis, we were focused on development of method that would enable penetration studies of compounds through thermoreversible hydrogel. For this purpose, we divided experiments into two sections. In first part, we incorporated various concentrations of sodium salicylate (NaSAL): 0,17 %, 0,33 %, 0,50 % and 0,83 % into 20 % poloxamer hydrogel (Lutrol F127) in phosphate buffer. We explored, which is the lowest concentration where repeatable determination of model cosmetically active ingredient is possible. Best results when homogeneous distribution of active ingredient was prepared, were at concentration 0,50 %, so we used this concentration afterwards.

In the second part, we observed penetration of model active ingredient in 20 % hydrogel without active ingredient, according to different layers at different time points: 4 h, 8 h, 24 h, 48 h and 72 h. NaSAL was penetrating the gel evenly, but obviously very slowly, since it was still not evenly distributed throughout the sample after 72 hours. On the other hand, we managed to determine the whole amount of penetrated NaSAL distributed on different depths within poloxamer hydrogel. This was enabled to us by thermoreversibility system.

This system forms gel at higher temperatures, which enables us to separate hydrogel sample from solution without any intermediate membrane, while at slightly lower temperatures hydrogel is easily liquefied, which enables us to quantitatively transfer samples and that altogether provides very reproducible results.

It would be reasonable for further research to reduce the concentration of poloxamer. In such way we might create hydrogel, where model cosmetically active ingredient would penetrate faster.

## SEZNAM OKRAJŠAV

KAS: kozmetično aktivna sestavina

BASF: vodilno kemijsko podjetje na svetu (Badische Anilin- und Soda Fabrik)

KMK: kritična micelarna koncentracija

FDA: Zvezna agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration)

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (International Union of Pure and Applied Chemistry)

NaSAL: natrijev salicilat

OECD: Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)

OR: osnovna raztopina

PEO: polietilenoksid

PPO: polipropilenoksid

PAMPA: permeabilnostni test z uporabo paralelnih umetnih membran (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)

rpm: merska enota za obrate na minuto (revolutions per minute)

SC: stratum corneum

SD: standardni odklon

WHO: Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organisation)

# 1. UVOD

## 1.1. GELI

Gel je netekoča koloidna ali polimerna mreža, ki je skozi celoten volumen razširjena s tekočino (IUPAC) (1). Z drugimi besedami so geli poltrdni sistemi, kjer je tekočina lahko polarna (hidrogeli) ali nepolarna (organogeli) in je imobilizirana med prostore tridimenzionalne mrežne strukture (2). Geli vsebujejo nizko koncentracijo ( $< 15 \%$ ) gelirnih molekul, ki se v prisotnosti primerne topila uredijo preko fizikalnih ali kemijskih interakcij v trdno mrežo, ki zaradi interakcij mreže polimera s topilom ter zaradi površinske napetosti preprečuje tekočini, da teče. Geli imajo širok nabor lastnosti – od mehkih in šibkih do trdnih in čvrstih.

Glede na topilo jih razvrščamo na (3,5):

- **Organogeli** – to so viskoelastični poltrdni sistemi, kjer je gelirna tekočina nepolarna. Snovi, ki tvorijo gele, so običajno polimeri, večina organogelskih molekul pa je relativno majhnih ( $MW \sim 3000$  Da). Polimeri imobilizirajo organsko topilo tako, da tvorijo premreženje ali preplet verig s kemičnimi ali fizikalnimi vezmi.
- **Hidrogeli** – to so viskoelastični poltrdni sistemi, sestavljeni iz polimerov in polarnih topil.

Glede na vezi v mreži jih razvrščamo na (3, 4):

- **Fizikalni geli** – tvorijo jih šibke fizikalne privlačne sile med sestavinami gela (Van der Waalsove interakcije, vodikove vezi), zato so reverzibilni in pod vplivom različnih dejavnikov prehajajo iz poltrdnega v tekoče stanje. Fizikalni hidrogeli so v vodi netopni zaradi ionskih interakcij in vodikovih vezi v mrežni strukturi, vendar v stiku z velikimi količinami bioloških tekočin ali vode nabreknejo. Tudi takrat, ko nabreknejo, ohranijo integriteto in mehansko trdnost zaradi svojega zamreženja. Nekateri pa se lahko ob veliki količini medija tudi koloidno raztopijo.
- **Kemijski geli** – tvorijo jih snovi, povezane z močnimi kovalentnimi vezmi, zato je vrnitev v prvotno tekoče stanje onemogočeno.

## 1.2. HIDROGELI

Hidrogeli imajo tridimenzionalno mrežno strukturo iz sintetičnih in/ali naravnih polimerov, ki lahko absorbirajo in zadržijo veliko količino vode. Za hidrokele so značilne hidrofilne skupine ali področja, ki so aktivna v polimerni mreži v vodnem okolju ob hidrataciji. Najpomembnejši značilnosti sta prepustnost in zadrževanje vode (4, 6).

Hidrogeli so biokompatibilni zaradi svoje hidrofilne površine, ki ima nizko interfacialno prosto energijo, in zaradi mehke gumijaste narave, ki zmanjšuje draženje pri stiku s tkivi. Dodatno nabrekanje je predvsem posledica osmotskih sil med verigami. Ta osmotska sila nasprotuje elastični sili mreže, kar vzpostavi ravnovesje med nabrekanjem mreže in prepreči hidrogelno deformacijo. Stopnjo nabrekanja hidrogelov določata obseg poroznosti in tip porozne strukture. Na tej osnovi jih delimo v štiri kategorije (Preglednica I) (6, 7):

**Preglednica I:** Klasifikacija hidrogelov glede na porozno strukturo (7)

| Vrsta        | Velikost por       | Mehanizem nabrekanja                           | Stopnja nabrekanja                        | Uporaba                                                                             |
|--------------|--------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Neporozni    | 1-100Å             | difuzija skozi prosti volumen                  | zelo počasna, odvisna od velikosti vzorca | različna uporaba – od kontaktnih leč do umetnih mišic                               |
| Mikroporozni | 100-1000Å          | kombinacija molekularne difuzije in konvekcije | počasna, odvisna od velikosti vzorca      | predvsem v biomedicinskih aplikacijah in pri tehnologiji z nadzorovanim sproščanjem |
| Makroporozni | 0.1-1µm            | difuzija v porah zapolnjenih z vodo            | hitra, odvisna od velikosti vzorca        | superabsorbenti v plenica                                                           |
| Superporozni | nekaj sto mikronov | kapilarne sile                                 | zelo hitra, neodvisna od velikosti vzorca | dostavni sistemi v GIT, tkivni inženiring                                           |

Hidrogele lahko delimo tudi v **konvencionalne** in **stimulacijsko odzivne**. Konvencionalni hidrogeli absorbirajo vodo v vodnem okolju. Njihove polimerne verige niso odvisne od sprememb okolice, kot so temperatura, pH in električno polje. Stimulacijsko odzivni hidrogeli ali "pametni" hidrogeli pa svoje sposobnosti nabrekanja spremenijo, ko se pojavijo spremembe v okolici (6).

#### **1.2.1. Stimulacijsko odzivni hidrogeli (hidrogeli občutljivi na dražljaje)**

Stimulacijsko odzivni hidrogeli spremenijo svoje sposobnosti nabrekanja z zaznavanjem sprememb iz okolice. Taki dražljaji so lahko: temperatura, pH, svetloba, ionska jakost, glukoza, tlak, magnetno polje ali ultrazvok. Dražljaje, ki sprožijo odzive, je mogoče razvrstiti v tri tipe:

- fizikalni: temperatura, svetloba, ultrazvok, električno polje, tlak, magnetno polje;
- kemični: pH, ioni;
- biološki: prisotnost/odsotnost biomolekul.

Nabrekanje glede na dražljaje iz okolice je koristno pri dostavnih sistemih, kjer se kozmetično aktivna sestavina (KAS) sprosti glede na določen dražljaj. Ti "pametni" polimeri ne odločajo samo, kdaj se bo KAS sprostila, temveč tudi pri katerem intervalu. Zato se jih lahko uporablja pri nadzorovanih in tarčnih dostavnih sistemih. Najbolj pogosti preiskovani stimulacijsko odzivni sistemi so pH, ionsko in temperaturno odvisni hidrogeli (8). V nalogi bomo širše raziskali temperaturno odvisne hidrogele na osnovi poloksamerov.

##### **1.1.2.1. Temperaturno odvisni hidrogeli na osnovi poloksamerov**

Temperaturno odvisni hidrogeli so najbolj preučevan razred stimulacijsko odzivnih oz. okoljsko občutljivih polimernih sistemov. Kot rezultat spremembe temperature obdajajoče tekočine lahko nabreknejo ali se skrčijo. Delimo jih na negativno temperaturno odvisne, pozitivno temperaturno odvisne in termoreverzibilne gele.

**Negativno temperaturno odvisni hidrogeli** se pri visokih temperaturah zaradi interpolimernih verižnih asociacij preko hidrofobnih interakcij skrčijo, kar povzroči padec njihove vodotopnosti. S krčenjem polimerne mreže lahko na ta način sprostijo učinkovino. Ti sistemi so pomembni za nadzorovano sproščanje KAS in proteinov.

Večina jih pripada **pozitivno temperaturno odvisnim hidrogelom**, ki se pri visokih temperaturah obnašajo ravno nasprotno – nabreknejo.

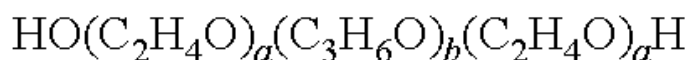
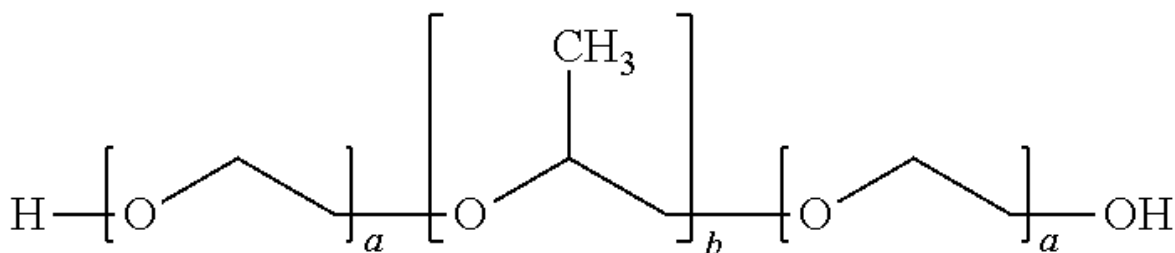
**Termoreverzibilni hidrogeli** pa vsebujejo nekovalentno povezane polimerne verige in namesto lastnosti krčenja/nabrekanja pri spremembi temperature prestopijo iz sol v gel stanje in obratno (4, 8).

### 1.3. POLIMERI

*Polimeri* so snovi, sestavljene iz kovalentno povezanih ponavljajočih se monomernih enot. Imajo visoko molekulsko maso. Pogosto se uporabljajo v farmacevtskih sistemih kot pomožne snovi, emulgatorji, adhezivi, materiali za pakiranje in prekrivanje, vse bolj pa tudi kot sestavni del nadzorovanih in tarčno mestno specifično pogojenih dostavnih sistemov učinkovin. Kemična reaktivnost polimerov je odvisna od kemizma njihovih monomernih enot, vendar so njihove lastnosti odvisne predvsem od medsebojnih povezav monomerov. Polimerne molekule so lahko linearne ali razvejane, kasneje se lahko združijo s prečnimi povezavami. Polimeri, v katerih so vse monomerne enote identične, se imenujejo homopolimeri; sestavljeni iz več kot enega tipa monomera pa se imenujejo kopolimeri. Kopolimere lahko delimo na izmenjajoče (alternirajoče) kopolimere, blok kopolimere in kopolimere s pripajanjem (graft kopolimere). Poloksamer (Pluronic®) je eden najbolj uporabljanih blok kopolimerov. Poloksameri so funkcionalne pomožne snovi. Koncept farmacevtskih pomožnih snovi kot neaktivnih sestavin formulacije je doživel precejšnji razvoj, ker številne pomožne (sicer "inertne") snovi v realnosti kažejo pomembne in uporabne lastnosti, zaradi česar so bistvena sestavina formulacij (9).

## 1.4. POLOKSAMERI

Poloksameri ali Pluronic® (tržno ime BASF Corporation ZDA) ali Lutrol® (tržno ime BASF Corporation Evropa) so vrsta komercialno dostopnih difunkcionalnih triblok kopolimerov neionske narave. Sestavljeni so iz osrednjega bloka relativno hidrofobnega polipropilenoksida (PPO), obdanega z obeh strani z bloki relativno hidrofilnih polietilenoksidov (PEO) (Slika 1).



**Slika 1:** Splošna struktura in molekulska formula poloksamera

Zaradi razmerja PEO : PPO = 2 : 1 te molekule v vodnih topilih nad kritično micelarno koncentracijo tvorijo micelarne strukture. Opisujemo jih tudi kot PEO-PPO-PEO kopolimeri. Kemično so  $\alpha$ -hidro- $\omega$ -hidroksipoli (oksietilen)<sub>a</sub> poli (oksipropilen)<sub>b</sub> poli (oksietilen)<sub>a</sub> blok kopolimer. S spreminjanjem a in b vrednosti je mogoče enostavno spremeniti lipofilnost, hidrofilnost in velikost molekul (Preglednica II) (4, 9).

**Preglednica II:** Poloksameri na tržišču (9)

| Poloksamer | a*  | b** | Molekulska masa (g/mol) | Pluronic® |
|------------|-----|-----|-------------------------|-----------|
| 124        | 12  | 20  | 2090-2360               | L 44 NF   |
| 188        | 80  | 27  | 7680-9510               | F 68 NF   |
| 237        | 64  | 37  | 6840-8830               | F 87 NF   |
| 338        | 141 | 44  | 12700-17400             | F 108 NF  |
| 407        | 101 | 56  | 9840-14600              | F127 NF   |

\*število oksietilenskih delov \*\*število oksipropilenskih delov

Nelastniškemu imenu "poloksamer" sledi trimestna številka. Če prvi dve številki pomnožimo s 100, dobimo približno povprečno molekulsko maso polioksipropilenskega dela. Tretja, pomnožena z 10, ustreza odstotku mase polioksietilenskega dela (10). Poloksameri so brez vonja in okusa, v obliki voskasto belih zrn, sipke narave. Vodne raztopine poloksamera so zelo stabilne v alkalnih ali kislih pogojih ali ob prisotnosti kovinskih ionov. Na splošno so topni v katerem koli topilu. Zaradi teh lastnosti so pogosta sestavina farmacevtskih in kozmetičnih formulacij. Glede na fizikalne in kemijske lastnosti so na tržišču v različnih razredih. Glede na fizikalne lastnosti so označeni s F (flakes) kot kosmiči, P (paste) kot pasta in L (liquid) kot tekočina. Registrirani so pod različnimi komercialnimi imeni Pluronic®, Synpersonic® ali Tetronic® (4, 9). Funkcionalno se uporabljajo kot snovi za dispergiranje, kot emulgatorji, solubilizatorji, stabilizatorji, močljivci, veziva in drsila. V kozmetični industriji se uporabljajo kot emulgatorji O/V (olje v vodi), čistila v blagih proizvodih za obraz in kot snovi za dispergiranje, trži pa jih BASF Corporation pod imenom Pluracare® (10).

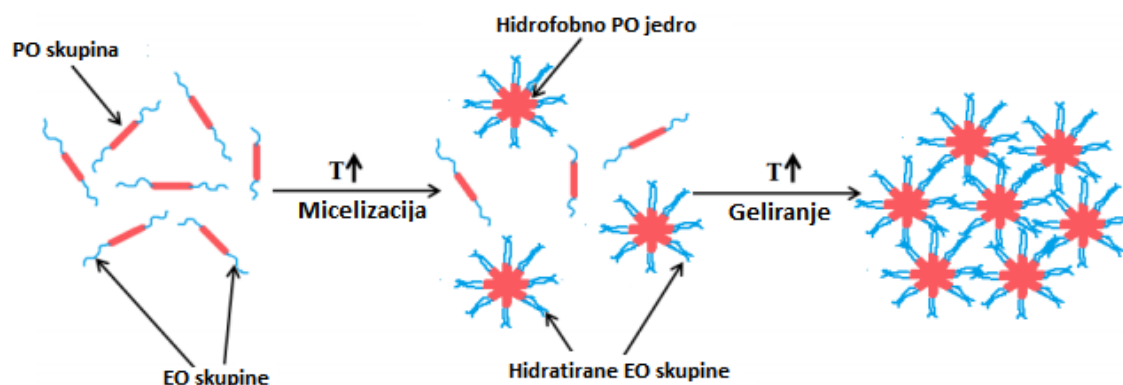
Funkcionalni polimeri, kot so poloksameri, se na široko uporabljajo v farmacevtski industriji zaradi njihove termoreverzibilne sposobnosti. Ti visoko viskozni vodotopni vehikli omogočajo nadzorovano dostavo aktivnih učinkovin. Zaradi široke združljivosti s snovmi raznolike narave, služijo v formulacijah kot odlično sredstvo za sproščanje snovi pri različnih poteh aplikacije (9).

#### **1.4.1. Micelarno obnašanje poloksamerov**

Poloksameri so pri koncentracijah malo nad kritično micelarno koncentracijo (KMK) posamični monomolekularni miceli. To povzroči zmanjšanje površinske napetosti, pa tudi površinske proste energije. Ko se koncentracija poloksamera v sistemu poviša, se tvorijo multimolekularni agregati. Polipropilenoksid tvori osrednje hidrofbno jedro. Metilne skupine na polipropilenoksidu (PPO) preko Van der Waalsovih sil pritegnejo nepolarne molekule. Polietilenoksidni (PEO) blok pa preko vodikovih vezi poveže kisik z molekulami vode, kar povzroči da je poloksamer topen v vodi. Zaradi teh interakcij so poloksameri zlahka topni v polarnih in nepolarnih organskih topilih. Micelarno obnašanje različnih blok kopolimerov je odvisno od sestave topila in od temperature. Na micelizacijo pa vplivajo tudi različne soli, površinsko aktivne snovi, polimeri, sotopila in dodatki (9).

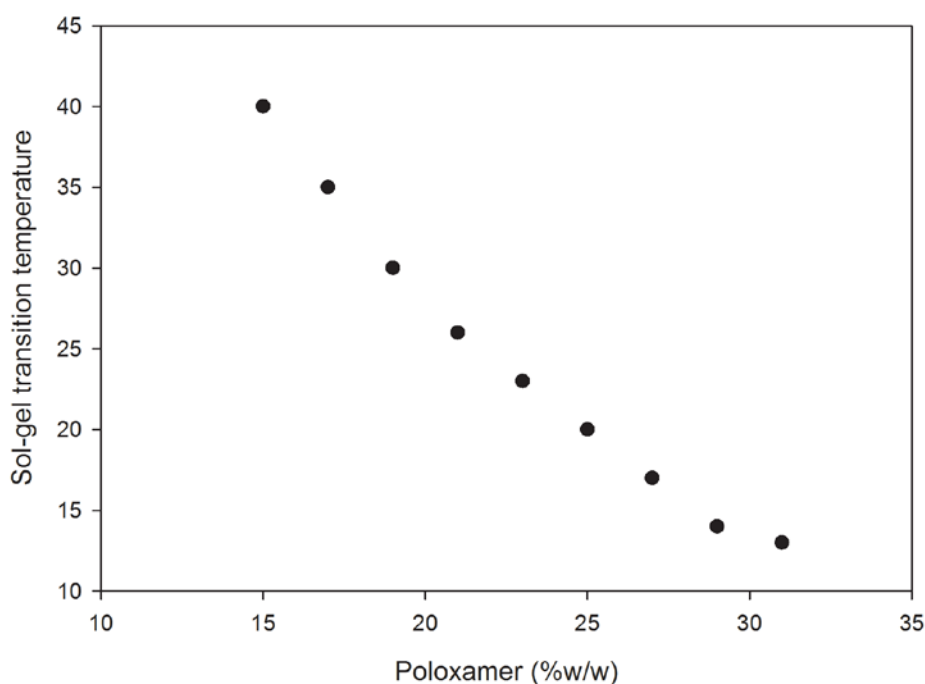
#### 1.4.2. Termoreverzibilno obnašanje poloksamerov

Poloksameri so vrsta ABA kopolimerov in kažejo značilne lastnosti termoreverzibilnega geliranja. Na splošno je tako vedenje opazno v vodnih raztopinah v koncentracijskem območju 20-30 % m/m. Pri 4-5 °C so tekoči, pri sobni temperaturi pa v obliki gela. Postopek geliranja poloksamerov je ponavadi v dveh delih. Poloksamere v nizki koncentraciji v mrzli vodi obda hidrationski sloj, kar povzroči ločitev hidrofnih delov. Zaradi hidratacije hidroksilne skupine kopolimerov postanejo bolj dostopne in polimeri so topni. Nato temperaturo dvigamo in, ko doseže kritično micelarno temperaturo, poloksamerni kopolimeri agregirajo in tvorijo sferične micele. Te micele sestavlja zunanji ovoj hidriranih nabreklih PEO verig, jedro pa je iz dehidriranih PPO blokov. Z naraščajočo temperaturo se namreč zaradi razcepa vodikovih vezi desolvatirajo hidrofilne verige, vzpostavijo se hidrofbne interakcije med PPO domenami v micelu (Slika 2). Pri ponovnem ohlajanju se gel spremeni nazaj v tekočino.



Slika 2: Nastanek micelnega gela (4)

Tekoča micelarna faza, ki je stabilna pri nizki temperaturi, se ob povišani temperaturi pretvori v kubično strukturo. Gel, ki se oblikuje, je micelaren gel. Molekulska masa celotne molekule in molekulska masa hidrofnega dela sta odločilna dejavnika, ki vplivata na geliranje. Tvorba gela se pojavi samo pri povišani temperaturi in takrat, ko je koncentracija poloksamernih molekul nad KMK (Slika 3).



**Slika 3:** Vpliv koncentracije poloksamera na sol-gel temperaturo prehoda (4)

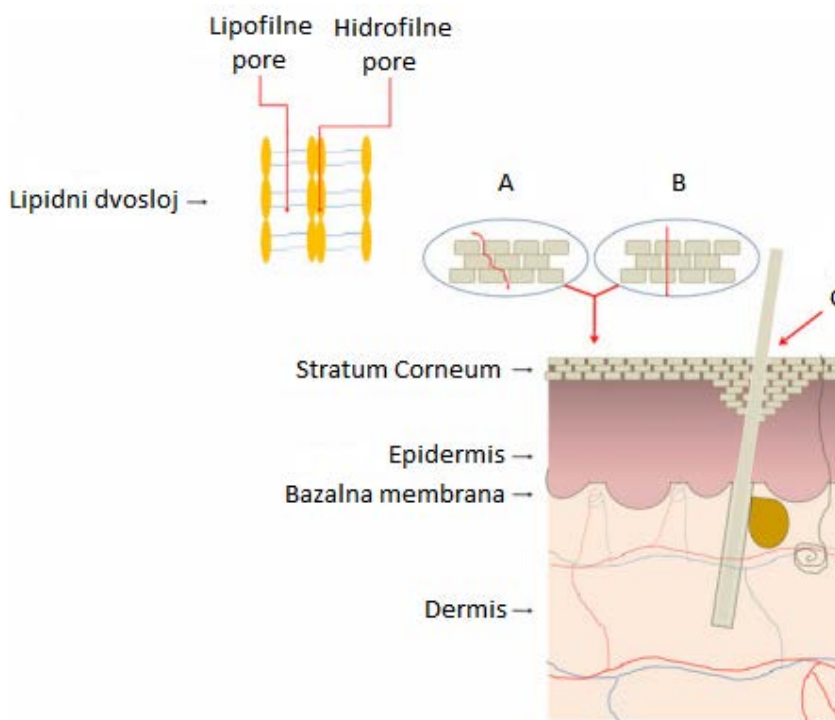
Reverzibilno termično geliranje je edinstvena lastnost poloksamernih kopolimerov. Ta lastnost je uporabna v različnih farmacevtskih oblikah za dermalno, oralno, očesno, nazalno in zobozdravstveno dostavo učinkovin (9, 11). Za dermalno dostavo se uporabljajo različne farmacevtske oblike, kot so: praški, losjoni, mazila, geli, raztopine, emulzije in suspenzije. Poloksamerne hidrogele koža dobro prenaša (4).

#### **1.4.3. Poloksamer 407/Pluronic F 127®**

Poloksamer 407 je pogosto uporabljen kopolimer v kozmetičnih izdelkih. S strani FDA je sprejet kot "neaktivna" sestavina za vključevanje v različne vrste formulacij. Poloksamer 407 se uporablja v formulacijah mnogih protivnetnih, protiglivičnih in antibakterijskih zdravil za dermalno dostavo. Večinoma so formulirani skupaj s sredstvi za zgoščevanje (karbopol ali celulozni derivati), da se poveča mehanska trdnost in bioadhezivnost formulacij. Pogosto so dodane tudi snovi, kot sta etanol in propilenglikol za izboljšanje topnosti aktivne komponente (4, 11).

## 1.5. TRANSPORT SNOVI SKOZI KOŽO

Obstaja nekaj pasivnih poti po katerih lahko molekule prečkajo stratum corneum (SC) oz. roženo plast kože: intercelularna (s pomočjo solubilizacije v ekstracelularnih lipidih, urejenih v dvosloj), transcelularna (preko korneocitov in lipidnega dvosloja), skozi kožne žleze (lojnice, znojnice) in skozi lasne folikle (Slika 4).



**Slika 4:** Mehanizmi transporta snovi skozi kožo (A - intercelularno, B - transcelularno, C - lasni folikel) (12)

Najpomembnejši transportni poti sta intercelularna in transcelularna. Neprepustnost kože je ovira za dostavo KAS. Rožena plast, koherentna in kompaktna membrana, je glavna plast za preprečevanje penetracijskih procesov in deluje kot pasivna pregrada za difuzijo. Na penetracijo pomembno vpliva celotna zgradba SC in koncentracija nanešene snovi. Le majhen odstotek snovi doseže tarčo po dermalni uporabi. Odločilen faktor za penetracijo v epidermis je porazdelitveni koeficient med epidermisom in kozmetološko obliko. Ta določa hitrost penetracije snovi, ki je najpogostejše pasivna difuzija, skozi kožo (12).

### **1.5.1. Vrednotenje prehajanja snovi skozi kožo**

Na področju kozmetološkega razvoja se raziskovalci soočajo s paradoksom: iskati morajo nove aktivne spojine in zagotoviti varnost potrošnikov, istočasno pa morajo zmanjšati število živali, ki se uporabljajo v poskusih. Modeli *in vitro* postajajo vedno bolj pomembni, tako za predčasno ugotavljanje stanja kože kot za raziskovanje mehanizmov delovanja kozmetičnih izdelkov. Prednosti metod *in vitro* so, da se zmanjša število poskusov na živalih ali človeških prostovoljcih, relativno enostavno in hitro jih lahko izvedemo – po razumni ceni, za testiranje ne zahtevajo velikih količin snovi, ponovljivost rezultatov je boljša, manj je omejenih variacij parametrov in lahko nudijo uporabne znanstvene podatke v zgodnjih fazah razvoja produkta. Po drugi strani pa je treba paziti, saj so modeli *in vitro* le poenostavitve bolj zapletenega živega organizma. Interpretacija eksperimentalnih rezultatov za napovedovanje tveganja za ljudi, ni enostavna. Pravilna uporaba modelov *in vitro* je bistvenega pomena. Problematiko primerljivosti rezultatov ustvarja število uveljavljenih smernic in protokolov s strani Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) (13, 14).

Poskusi *in vitro* so večinoma namenjeni merjenju dermalne penetracije. Smernice Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) za dermalno absorpcijo razlikujejo med procesom penetracije in permeacije. Penetracija je prehod snovi v določen sloj ali strukturo, permeacija pa je transport snovi iz enega sloja v naslednji sloj. Neživa koža se uporablja izključno za merjenje penetracije in permeacije, na metabolično aktivni koži pa se lahko hkrati vrednoti tudi presnovne procese. Permeacija skozi neživi zunanji sloj kože (SC) je pogosto glavna ovira za perkutano absorpcijo. Prepuščanje snovi skozi roženo plast je odvisno od specifičnih dejavnikov, kot so: molekulska masa, topnost v vodi in v lipidih, polarnost in stopnja ionizacije snovi (12, 14).

### **1.5.2. Vrednotenje sproščanja snovi iz poloksamernih formulacij**

Kinetika sproščanja iz poloksamerne formulacije *in vitro* služi kot primerjalno orodje pri procesu razvoja dermalnih oblik. Poloksamerne formulacije sprostijo KAS v receptorski medij z difuzijo iz polimernega matriksa ali z raztapljanjem poloksamera v receptorski medij. Tak *in vitro* eksperiment se izvede na membranskem ali brezmembranskem modelu. Pri membranskem se membrana uporablja kot meja med donorsko (vsebuje vzorec) in

receptorsko komoro (vsebuje pufer). KAS se sprošča v receptorski medij z difuzijo. Pri brezmembranskem modelu se polimerni matriks počasi raztopi v receptorskem mediju in povzroča nadzorovano sproščanje. Za analitsko detekcijo KAS se alikvoti vzorcev odvijemajo v rednih časovnih presledkih in analizirajo s pomočjo različnih spektrofotometričnih metod, kot so UV-VIS spektrofotometer ali z uporabo visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC).

Za receptorski medij se običajno uporablja fosfatni pufer. Temperatura in pH se izbereta glede na mesto uporabe formulacije in pot dostave aktivne komponente. S pomočjo testov sproščanja *in vitro* se definira kinetika dostave KAS – bodisi zadržano ali takojšnje sproščanje. Hidrogelni sistemi se v glavnem uporabljajo za zadržano sproščanje snovi (4).

## **1.6. DIFUZIJSKE CELICE**

Najpogostejše metode za vrednotenje penetracije in permeacije *in vitro* uporabljajo difuzijsko celico. Obstaja širok izbor: od preproste dvodelne statične oz. nepretočne celice (Franz, 1975) do kompleksnih večdelnih pretočnih difuzijskih celic (Bronaugh & Stewart, 1985). V vseh primerih je izrezana koža nameščena kot bariera med donorsko in receptorsko komoro. Testna snov, ki je lahko označena z radioaktivnim izotopom, je nanešana na površino kožnega vzorca. Volumen receptorske/donorske komore je približno 0,5-10 ml, površina izpostavljene membrane pa približno 0,2-2 cm<sup>2</sup> (14).

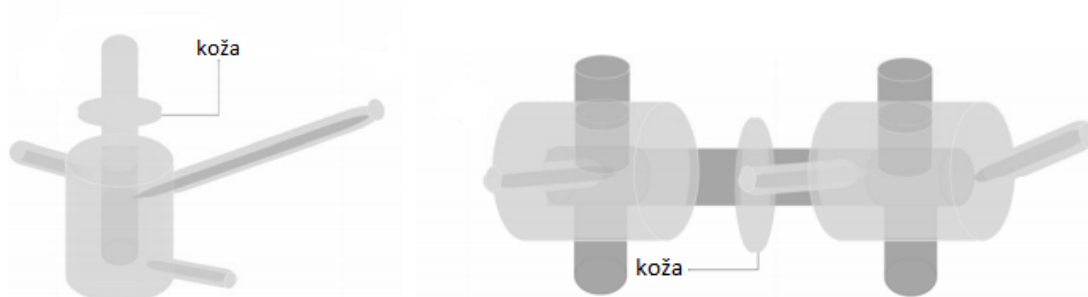
Snov ostane na koži za določen čas, v določeni količini, pod določenimi pogoji, nato pa se odstrani z ustreznimi postopki čiščenja. Ključnega pomena je učinkovito mešanje receptorske faze, da je difuzija neovirana s strani nastanka visokih lokalnih koncentracij in omogoča sink pogoje skozi celoten eksperiment. Receptorska faza vsebuje običajno puferno raztopino s pH 7,4. Če je željen čas inkubacije daljši, se dodajo konzervansi. Če je topnost raziskovane spojine nizka, se dodajo primerni solubilizatorji (14, 15). Za neživo kožo se lahko uporablja fosfatni pufer, za kožo z viabilnimi celicami pa se uporablja bolj fiziološka raztopina, ki lahko obdrži viabilnost kože vsaj do 24 ur (16).

Donorska komora je lahko odprta ali zaprta. Nezaprti pogoji dovoljujejo izmenjavo z okoljem, kot je npr. uparjanje hlapnih snovi in sušenje kože. V nasprotju s tem lahko tesna okluzija vodi do prekomerne hidracije. Temperatura se lahko kontrolira z vodnim slojem okoli vsake difuzijske celice, v zunanji vodni kopeli ali s toplim zrakom v sušilniku.

Ponavadi so eksperimenti izvedeni pri 32 °C, to je temperatura na površini kože. Lahko pa se uporabi temperaturni gradient od 32 °C na površini kože do 37 °C, da se posnema telesno temperaturo (15).

Poleg ugotavljanja prehajanja KAS iz donorskega v receptorski medij se z difuzijsko celico lahko ocenjuje tudi količina snovi, ki se zadrži na koži, ali prodre v različne plasti. Koža se po permeacijskem eksperimentu očisti, da se odstrani preostalo formulacijo. Plasti SC se ponavadi odstrani s "tape-strippingom", epidermis in dermis se lahko loči z uporabo toplote in sile, količina snovi, preostale v vsaki plasti, pa se določi z ekstrakcijo z uporabo topil in testira z analitskimi metodami. Za napovedovanje transporta snovi skozi kožo *in vitro* se uporabljajo različne membrane: sintetične, rastlinske, humane, živalske in rekonstruirane membrane. Na splošno se za oceno transporta snovi skozi kožo uporablja samo humana in živalska koža ter rekonstruirani modeli. Sintetične membrane se običajno uporabljajo za študije sproščanja snovi iz poltrdnih ali tekočih kozmetičnih formulacij *in vitro* (12).

Glede na difuzijo snovi poznamo **vertikalne** in **horizontalne** celice (Slika 5), glede na receptorsko tekočino pa **statične** in **pretočne**.

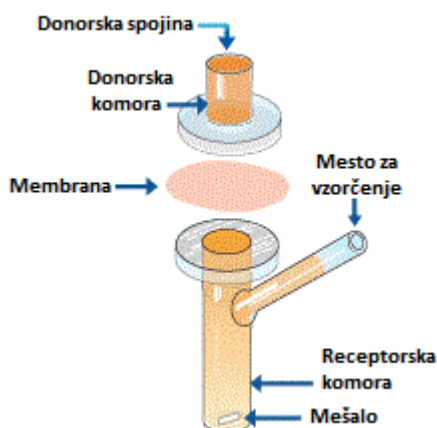


**Slika 5:** Vertikalna difuzijska celica (levo) in horizontalna difuzijska celica (desno) (12)

Pomembno je, da se izbere model, kjer je transport snovi omejen le s kožo in ne s stagnirano difuzijo, ki se lahko pojavi zlasti pri zelo lipofilnih snoveh. Vertikalne celice se uporabljajo za študije prehoda snovi skozi kožo iz poltrdnih formulacij in so optimalne za simulacijo dogajanja *in vivo*. Horizontalne celice so uporabne za preučevanje mehanizmov difuzije skozi kožo. Meri se permeacijo ene raztopine skozi membrano v drugo raztopino pod pogojem mešanja. Uporaba teh celic je manj pogosta. V obeh, tako vertikalni in horizontalni difuzijski celici, se lahko uporablja statični ali pretočni način (12, 14).

### 1.6.1. Statične difuzijske celice

Franz (1975) je razvil statično vertikalno difuzijsko celico in potrdil dobro primerljivost med podatki za organske snovi *in vivo* in *in vitro* (Slika 6).

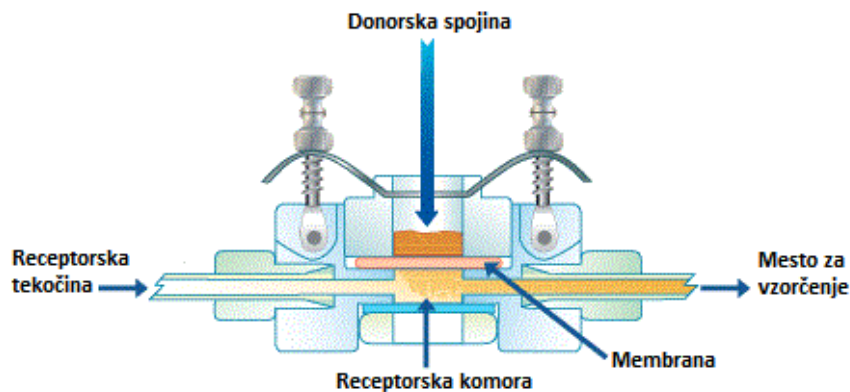


**Slika 6:** Splošni model Franzove difuzijske celice

Franzova difuzijska celica je najpogostejši tip difuzijske celice, predvsem zaradi nizkih stroškov. Poleg tega je uporabna za preučevanje poltrdnih formulacij in je idealna za simuliranje dogajanja *in vivo*. Pri Franzovi tehniki je membrana vpeta med difuzijski komori. Dermis (ob prisotnosti) je obrnjen proti receptorski komori. Vzorec se nahaja v donorski komori na povrhnjici. Sistem se ohranja s konstantnim mešanjem na magnetnem mešalu. Difuzija aktivne učinkovine v receptorsko komoro je določena z ustrezno in preverjeno analitično metodo. Receptorska tekočina pod kožo je ročno vzorčena s periodičnim odstranjevanjem alikvotov za redno analizo. Pri taki aparaturi se lahko na kožo nanese kakršna koli vrsta ali količina vehikla znotraj kapacitet donorske komore. Za bolj realistično testiranje se na 1 cm<sup>2</sup> kože nanese 5-10 µl tekočega vehikla ali 2-5 mg netekočega vehikla, ki vsebuje testno spojino. Pomemben dejavnik, zlasti v statičnih difuzijskih sistemih, je topnost testne spojine v receptorski tekočini. Ta lahko vpliva na sink zmogljivosti in s tem na dimenzije receptorske komore in frekvenco vzorčenja. Statične celice so enostavnejše, cenejše in se lahko uporabljajo na zelo različnih površinah kože (12, 14).

### 1.6.2. Pretočne difuzijske celice

Pretočni sistem sta razvila Bronaugh in Stewart (1985). Pri pretočnih vertikalnih celicah se receptorska tekočina nenehno menja, to predstavlja bolj ali manj pogoje *in vivo* (Slika 7).

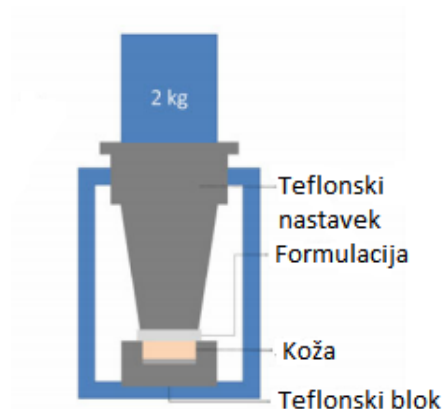


**Slika 7:** Splošni model pretočne vertikalne difuzijske celice

Ta metoda je koristna, ko je snov, ki prehaja kožo, zelo slabo topna v receptorskem mediju. Ker se tekočina nenehno nadomešča z novo s pomočjo primerne črpalke (hitrost črpanja približno 1,5 mL/h), so tako zagotovljeni sink pogoji. Receptorska tekočina in/ali hitrost pretoka se izbere na podlagi podatkov o topnosti in volumnu receptorske komore. Pretočne celice omogočajo neprekinjen pretok receptorske tekočine, kar ohrani fiziološke pogoje. Te se priporoča pri študijah metabolizma snovi v koži (14).

### 1.6.3. Difuzijski model Saarbrücken

Za študije penetracije KAS se lahko izvede tudi alternativni difuzijski model Saarbrücken (Slika 8).

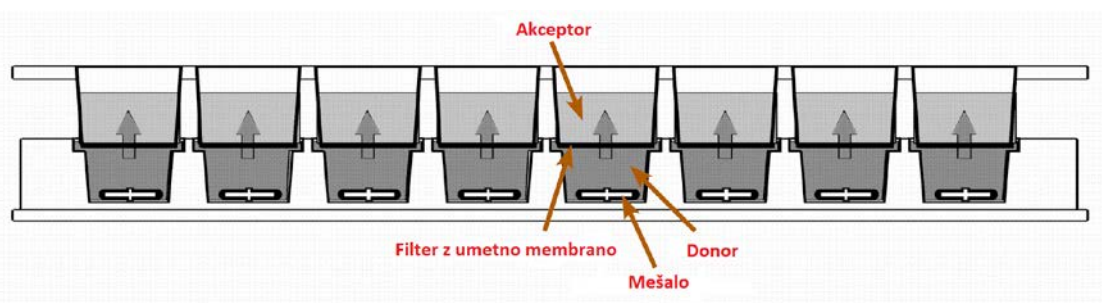


**Slika 8:** Difuzijski model Saarbrücken (12)

Koža se položi na filtrirni papir, ki je navlažen z Ringerjevo raztopino. To se namesti v luknjo teflonskega bloka. Teflonski nastavek s formulacijo se namesti na teflonski blok. Na vrh teflonske aparature se za 2 minuti položi standardna masa, da izboljša kontakt med kožo in formulacijo. Prazni prostori med teflonskima ploščama se zatesnijo, da se prepreči izguba vode. Model se položi v plastično posodo pri  $32 \pm 1$  °C. Koža se s "tape-strippingom" odstrani v različnih časovnih intervalih. Po tem postopku se koža loči v vzporedne odseke z uporabo kriomikrotoma. Za kvantifikacijo spojine se uporabijo ekstrakcijske tehnike (12).

#### 1.6.4. Permeabilnostni test z uporabo paralelnih membran – PAMPA

Meritve, ki jih dobimo z uporabo statične in pretočne difuzijske celice, so le delno standardizirane, velika izbira eksperimentalnih pogojev ter naprav pa lahko povzroči pomembne intra- in inter- laboratorijske variacije in rezultate permeabilnosti. Franzova difuzijska celica je neučinkovita, ko je treba testirati veliko število spojin in/ali njihovih formulacij v paralelkah. Glede na vse te omejitve znanstveniki raziskujejo nove metode *in vitro*, med njimi tudi permeabilnostni test z uporabo paralelnih umetnih membran – PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). To je nizkocenovna metoda, ki omogoča zelo natančne meritve za pasiven prehod molekul skozi membrane. Ta metoda uporablja dve mikrotitrski plošči s 96 predelki, ki skupaj tvorita 96 dvodelnih celic, sestavljenih iz donorskega in receptorskega dela. "Skin PAMPA" je permeabilnostni test, kjer je umetna membrana sestavljena iz mešanice sintetičnih analogov ceramidov, holesterola in prostih maščobnih kislin, s tem pa posnema kompozicijo lipidnega matriksa v SC. Najnovejši model se lahko primerja z visoko standardiziranimi meritvami Franzove difuzijske celice skozi toplotno ločen humani epidermis (17).



**Slika 9:** Shematični prikaz PAMPA permeabilnostnega testa

## 2. NAMEN DELA

Cilj naše naloge je razviti postopke, s katerimi bi natančno in enostavno določali koncentracijo modelne kozmetično aktivne sestavine v termoreverzibilnem hidrogelu, in s tem ugotavljali, kako določena snov prehaja v hidrogel. Širša ideja je namreč razvoj metode za preučevanje prehajanja KAS v kožo *in vitro*, ki bi v prihodnosti služila kot alternativa difuzijskim celicam.

V ta namen bomo nalogo razdelili v dva dela. V prvem bomo izdelali termoreverzibilne hidrogele na osnovi poloksamera. Vanje bomo vgradili različne koncentracije modelne KAS in ugotavljali homogenost njene porazdelitve v vzorcih.

Nadalje bomo ugotavljali, kako določiti prodiranje modelne kozmetično aktivne sestavine v gel. Raztopino z izbrano koncentracijo NaSAL bomo nanašali na poloksamerni hidrogel brez vgrajene KAS. Hidrogel bomo razdelili po slojih in v različnih časovnih točkah (4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h) merili količino snovi po različnih globinah.

### 3. MATERIALI IN NAPRAVE

#### 3.1. MATERIALI

- poloksamer 407 (Lutrol F127) (71.5-74.9 %), Sigma – Aldrich, Germany
- kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (99,5 % - 100,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ) (> 99,0 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev salicilat ( $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COONa}$ ) ( $\geq 99.5$  %), Sigma – Aldrich, Germany

Natrijev salicilat se v kozmetičnih izdelkih uporablja kot konzervans in denaturant. V nalogi smo ga uporabili le kot modelno spojino. Ker je v vodi dobro topen, smo predvidevali, da bo dober pokazatelj procesa penetracije v poloksamernem hidrogelu.

- fosforjeva (V) kislina (85 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- s postopkom reverzne osmoze prečiščena voda

#### 3.2. NAPRAVE

- tehtnice:
  - o analitska tehtnica XS 205, Mettler Toledo, Scherzenbach, Švica
  - o analitska tehtnica AG 245, Mettler Toledo, Scherzenbach, Švica
- magnetno mešalo, IKA WERKE, Nemčija
- pH meter MA234, Mettler Toledo, pH/Ion Analyzer, Schwarzenbach, Švica
- UV/VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453, Nemčija

## **4. POSTOPKI IN METODE**

### **4.1. PRIPRAVA FOSFATNEGA PUFRA**

Pripravili smo fosfatni pufer s pH 7,4. Najprej smo pripravili 0,2 M raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 0,2 M raztopino NaOH. Raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 M) smo pripravili tako, da smo v 1000 mL merilno bučko natehtali 27,22 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Mešali smo na magnetnem mešalu, dokler se  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ni popolnoma raztopil. Raztopino NaOH (0,2 M) smo pripravili tako, da smo v 1000 mL merilno bučko natehtali 8,0 g NaOH in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Premešali smo, da se je NaOH raztopil. V 1000 mL merilno bučko smo z merilnim valjem prenesli 250 mL 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 195,5 mL 0,2 M NaOH. Merilno bučko smo s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Nastali raztopini smo izmerili pH in ga na 7,4  $\pm$  0,05 natančno uravnali s fosforjevo (V) kislino (85 %) ali 0,2 M NaOH.

### **4.2. UMERITVENA PREMICA**

Osnovno raztopino (OR) NaSAL (koncentracija 0,15 mg/mL) smo pripravili tako, da smo v 100 mL bučko natančno natehtali približno 15 mg NaSAL in do oznake dopolnili s fosfatnim pufrom. Raztopino smo mešali z magnetnim mešalom in ultrazvokom, da se je NaSAL popolnoma raztopil. Nato smo z redčenjem OR (1/50, 1/25, 2/25, 3/25, 3,5/25) dobili različne koncentracije raztopine NaSAL. Absorbance smo na UV-VIS spektrofotometru izmerili pri valovni dolžini 230 nm (absorpcijski maksimum), ker smo tu zaznali največjo odzivnost za manjše koncentracije. Kot slepi vzorec smo uporabili fosfatni pufer. Umeritveno krivuljo smo določali v dveh paralelkah in s primerjavo določili, da je premica druge paralelke najbolj primerna.

### **4.3. PRIPRAVA TERMOREVERZIBILNEGA HIDROGELA**

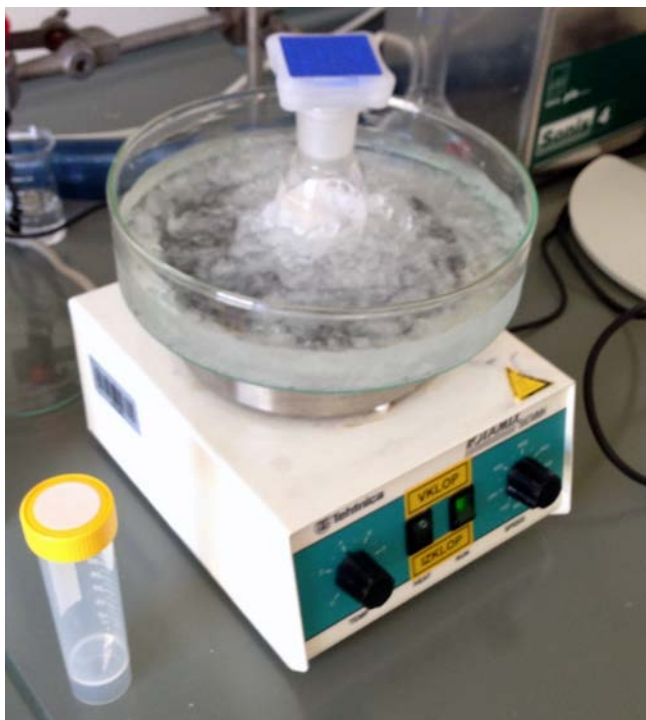
Najprej smo pripravili hidrogel brez učinkovine. Poskusili smo z različnimi odstotki poloksamera (10 %, 15 %, 20 % in 30 %) in ugotovili, da je 20% poloksamerni gel najustreznejše konsistence. Vsakič smo pripravili po 30 g vzorca. Nato smo v hidrogel vgradili NaSAL.

Zatehte 20 % poloksamernega gela brez KAS:

Fosfatni pufer: 24 g

Lutrol F127: 6 g

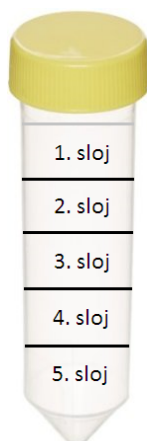
V 50 mL erlenmajerico s širokim vratom smo natančno natehtali NaSAL in nato še pufer. Erlenmajerico smo v posodi z ledom postavili na magnetno mešalo (Slika 10).



**Slika 10:** Raztapljanje poloksamera v posodi z ledom

Natehtali smo poloksamer in ga počasi med mešanjem dodali v raztopino. Po približno 1 uri pri 200-400 rpm se je poloksamer popolnoma raztopil. Mešalo smo izklopili in počakali še 15 min, da so mehurčki (nastali zaradi mešanja) izginili. Raztopino smo prelili v 50 mL falkonko in jo nato za 24 ur potopili v vodno kopel (37 °C), da je poloksamerna raztopina zgelirala.

Po 24 urah smo v vzorcu določili homogenost razporeditve aktivne učinkovine. Vzorec smo razdelili na 5 navideznih slojev, ki smo si jih na falkonki označili v enakomernih razdaljah (Slika 11).



**Slika 11:** Odvzem vzorca (1 g) poloksamernega hidrogela po globini

Začnši z vrha, smo iz vsakega sloja na stekleni čolniček zatehtali 1 g, preostalo maso gela pa zavrgli. Čolniček smo nato postavili za 30 min v hladilnik. Na tak način smo vzorec utekočinili in ga kvantitativno prenesli v 20 mL bučko, dopolnili s pufrom do oznake in premešali. Iz bučke smo s pipeto odpipetirali 1 mL raztopine v novo 20 mL bučko in s pufrom dopolnili do oznake. Izmerili smo absorbanco in jo primerjali s teoretično.

Vgrajevali smo štiri, po koncentraciji različne raztopine: 50 mg/30g, 100 mg/30g, 150 mg/30g in 250 mg/30g. Za vsako serijo smo naredili slepi vzorec in 3 vzorce z vgrajenim NaSAL.

#### **4.4. DOLOČANJE PRODIRANJA MODELNE KOZMETIČNO AKTIVNE SESTAVINE IZ RAZTOPINE V POLOKSAMERNI HIDROGEL**

##### **4.4.1. Priprava raztopine z modelno kozmetično aktivno sestavino**

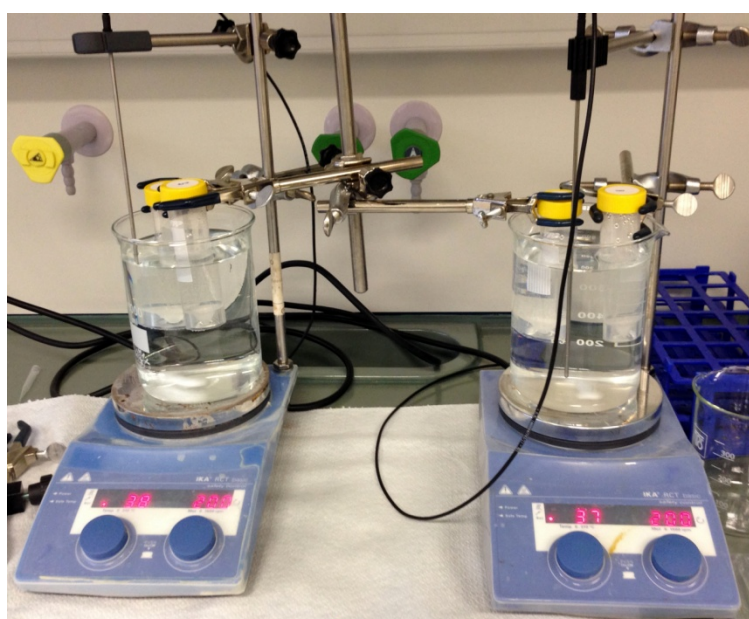
V 50 mL erlenmajerico s širokim vratom smo natančno zatehtali 1 g NaSAL. Nato smo s pipeto v erlenmajerico odpipetirali 20 mL fosfatnega pufra in jo postavili na magnetno mešalo za 1 h pri 300 rpm. Nastala je raztopina NaSAL s koncentracijo 50 mg/mL. V 200 mL bučko smo nato odpipetirali 1 mL raztopine in jo s pufrom redčili do oznake. Pri valovni dolžini 230 nm smo preverili koncentracijo nastale raztopine NaSAL.

#### 4.4.2. Izdelava praznega hidrogela

Pripravili smo 20 % poloksamerni gel po postopku, opisanem v poglavju *Priprava termoreverzibilnega hidrogela* (4.3.), le da vanj nismo vgradili NaSAL.

#### 4.4.3. Nanos raztopine na gel

Na predpripravljen gel smo nalili 3 mL raztopine NaSAL (koncentracija 50 mg/mL) in pustili za določen čas (4 h / 8 h / 24 h / 48 h / 72 h) na vodni kopeli (37 °C) (Slika 12). Na slepi vzorec smo nalili 3mL fosfatnega pufra brez KAS.



**Slika 12:** Vzorci poloksamernega hidrogela z nanešeno raztopino na vodni kopeli

#### 4.4.4. Merjenje koncentracij po navideznih slojih v različnih časovnih točkah

Po določenem času smo preostalo raztopino z vrha vzorca odlili v plastičen čolniček, odtehtali 1 g v steklen čolniček, prenesli v 20 mL bučko in s pufrom dopolnili do oznake. Nato smo ustrezno redčili in izmerili koncentracijo KAS, ki je preostala v raztopini nad gelom.

Vzorec hidrogela smo nato razdelili na 3 navidezne sloje in jih na falkonki označili v enakomernih razdaljah (Slika 13).



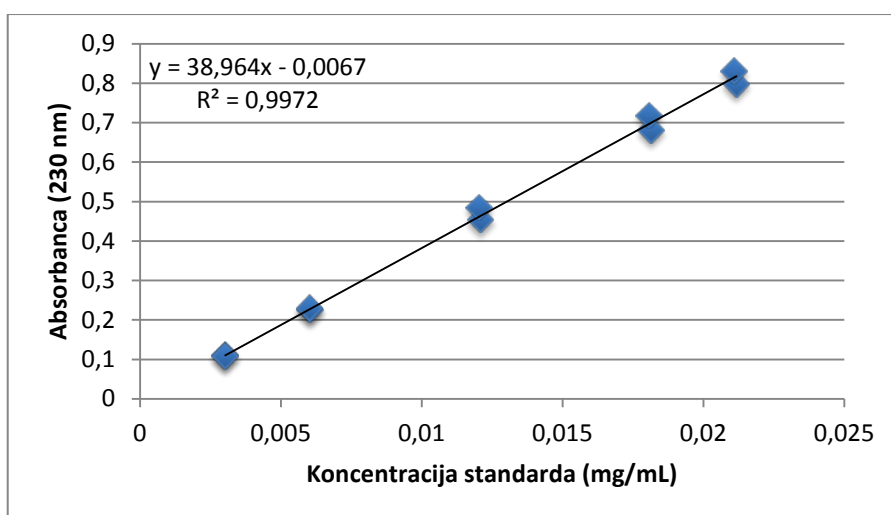
**Slika 13:** Odvzem vzorca (2 g) poloksamernega hidrogela po globini

Začnši z vrha, smo iz vsakega sloja na stekleni čolniček zatehtali 2 g, preostalo maso gela pa zavrgli. Čolniček smo postavili za 30 min v hladilnik. Na tak način smo vzorec utekočinili in ga nato kvantitativno prenesli s pufrom v 20 mL bučko ter premešali. Zadnji sloj pri dnu smo zaradi morebitnih nizkih koncentracij zatehtali v 20 mL bučko in 10 mL bučko, da so bile redčitve čim nižje in meja detekcije pri ustrezni nizki koncentraciji KAS. Izmerjene absorbance smo primerjali s teoretičnimi.

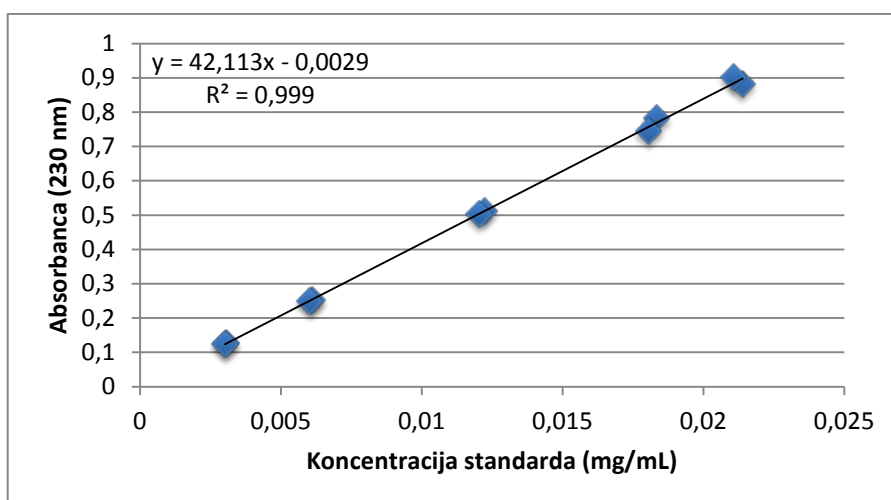
## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. IZDELAVA UMERITVENE PREMICE

Koncentracijo NaSAL v fosfatnem pufru smo določili z UV-VIS spektrofotometrom, zato smo za ta medij izdelali umeritveno premico. Osnovno raztopino (OR) in razredčene raztopine smo naredili po postopku, opisanem v poglavju *Umeritvena premica* (4.2.). Nato smo pripravljenim raztopinam pri valovni dolžini 230 nm, kjer ima NaSAL absorpcijski maksimum, izmerili absorbanco. Točke smo nanegli na graf in narisali premico. Postopek smo ponovili dvakrat in izbrali umeritveno premico št. 2 z boljšim Pearsonovim koeficientom korelacije  $R^2$  (Slika 14, 15).



Slika 14: Umeritvena krivulja št. 1 za NaSAL v fosfatnem pufru



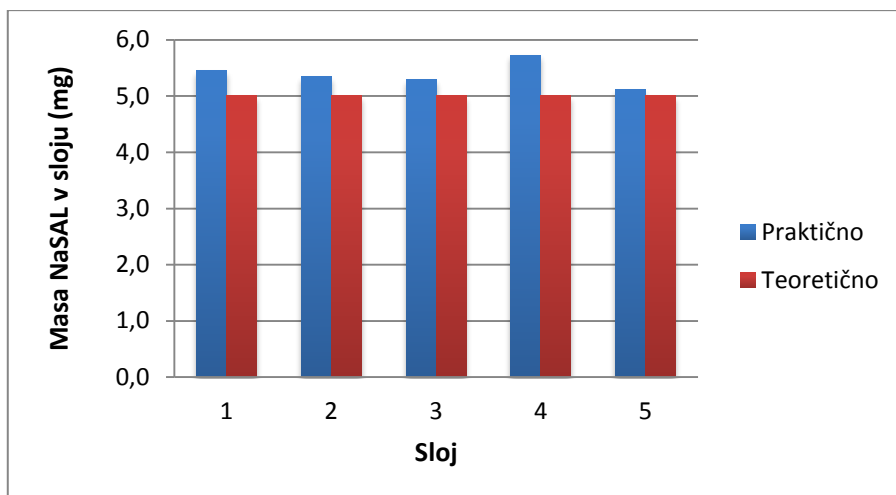
Slika 15: Umeritvena krivulja št. 2 za NaSAL v fosfatnem pufru

## **5.2. VGRAJEVANJE MODELNE KOZMETIČNO AKTIVNE SESTAVINE V POLOKSAMERNI HIDROGEL IN DOLOČANJE HOMOGENOSTI NJENE PORAZDELITVE**

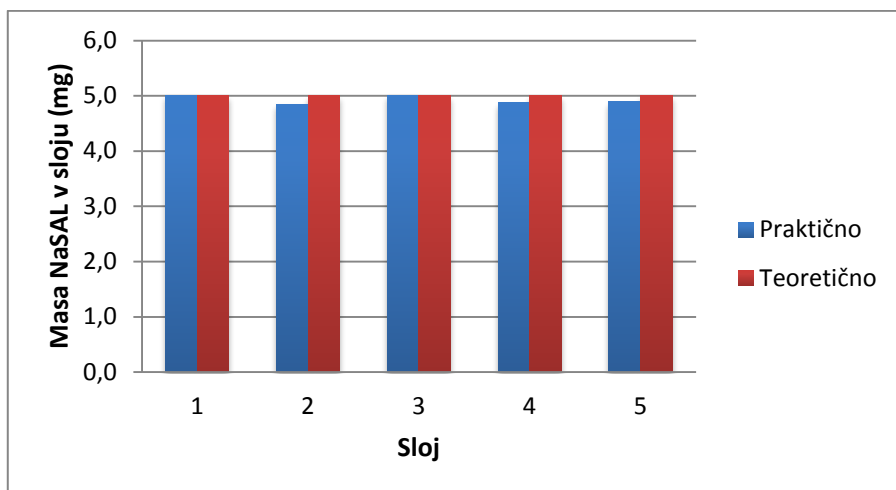
Pri izdelavi gela za učinkovito dostavo učinkovin je najboljšše, da je sol-gel prehod formulacije pri temperaturi 25-35 °C. Temperatura prehoda nad 37 °C lahko pri fiziološki temperaturi povzroči utekočinjenje formulacije, kar lahko vodi v nenadzorovano sproščanje KAS. Po drugi strani pa temperatura prehoda pod 25 °C povzroči tvorjenje gela pri sobni temperaturi, kar lahko povzroči težave pri nanosu formulacije. V našem primeru gel ni predstavljal kozmetičnega izdelka za dostavo učinkovin, temveč bolj stabilno strukturo za opazovanje prehajanja KAS. Zato je bilo ključno, da je temperatura prehoda sobna temperatura. Na sol-gel temperaturo prehoda vpliva vrsta topila (v našem primeru fosfatni pufer pri fiziološkem pH 7,4) in koncentracija poloksamera – višja kot je, nižja je sol-gel temperatura prehoda (4).

Kot modelno kozmetično aktivno učinkovino za vgrajevanje v hidrogel smo izbrali natrijevo sol salicilne kisline, ki je zaradi svoje ionske narave v vodi dobro topna. V 20 % poloksamerni gel smo vgrajevali različne koncentracije raztopine NaSAL (50 mg/30g, 100 mg/30g, 150 mg/30g in 250 mg/30g) in tako ugotavljali, katera je tista najnižja količina vgrajene KAS, ki jo v hidrogelu še lahko ponovljivo določimo.

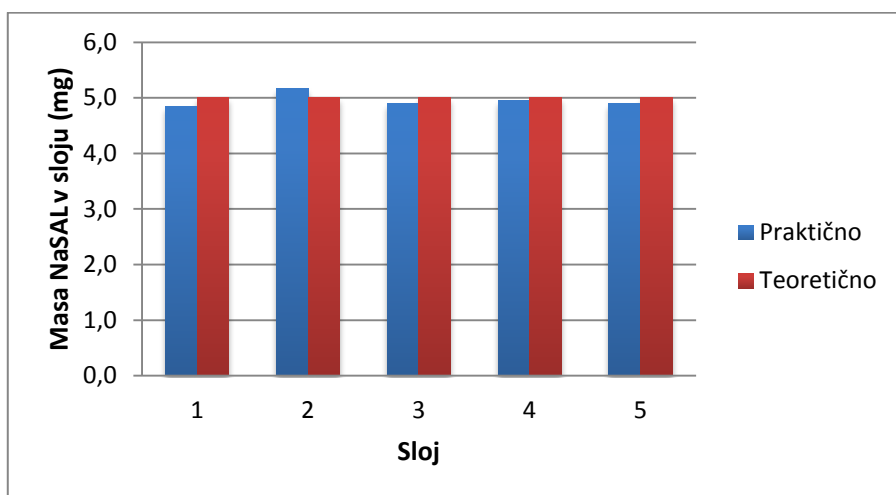
Izdelali smo 30 g gela s 150 mg vgrajenega NaSAL. 1 g odvzetega vzorca naj bi teoretično vseboval 5 mg NaSAL. Količine vgrajenega NaSAL smo nato tudi eksperimentalno določili na 5-ih različnih globinah izdelanega hidrogela in ugotovili, da so bile praktične vrednosti z majhnim odstopanjem enake teoretičnim. To smo določili v vseh 3-eh paralelkah (Slika 16-18).



**Slika 16:** Primerjava praktičnih in teoretičnih vrednosti prvega vzorca po slojih

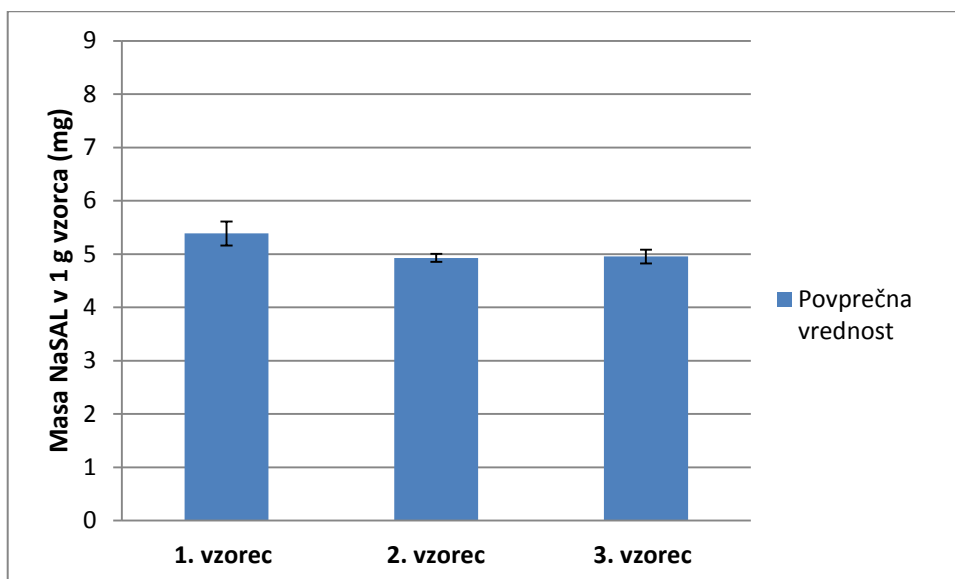


**Slika 17:** Primerjava praktičnih in teoretičnih vrednosti drugega vzorca po slojih



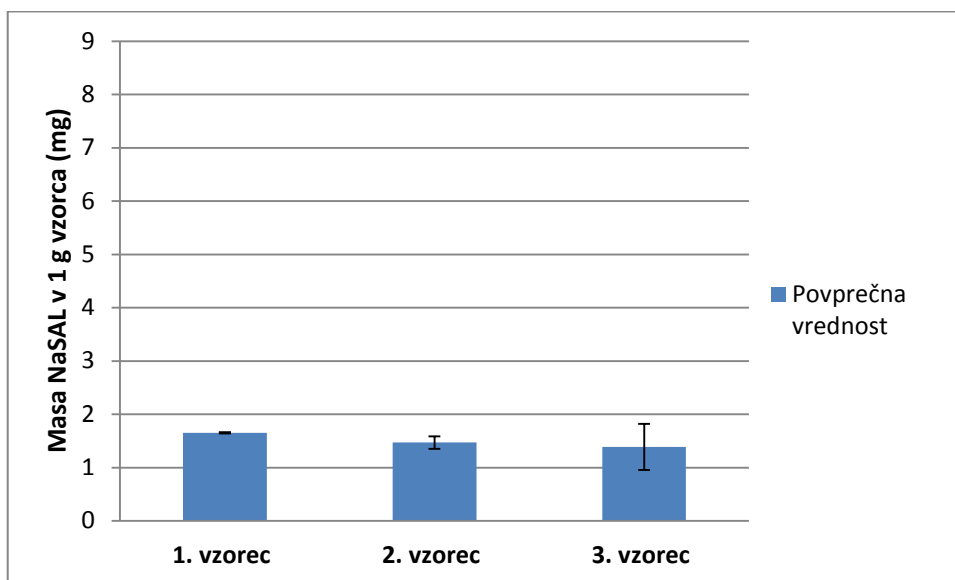
**Slika 18:** Primerjava praktičnih in teoretičnih vrednosti tretjega vzorca po slojih

Odstopanja so bila znotraj 8 %, določili pa smo v povprečju 2 % nižjo količino od teoretične, ki je 5 mg/g (Slika 19).

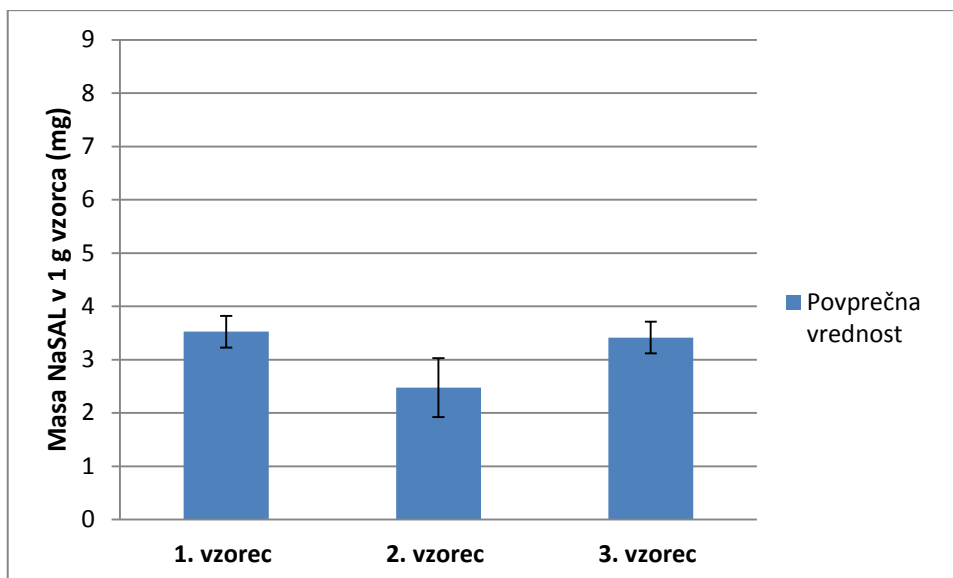


**Slika 19:** Povprečna vrednost NaSAL v 1 g vzorca in SD pri koncentraciji 150 mg/30g

Ugotovili smo, da je naš postopek izdelave hidrogela in vgradnje KAS ponovljiv. Zaradi dobrih rezultatov pri koncentraciji 150 mg/30g NaSAL v hidrogelu smo z enakim postopkom naredili še serije z nižjo koncentracijo 50 mg/30g in 100 mg/30g (Slika 20, 21).



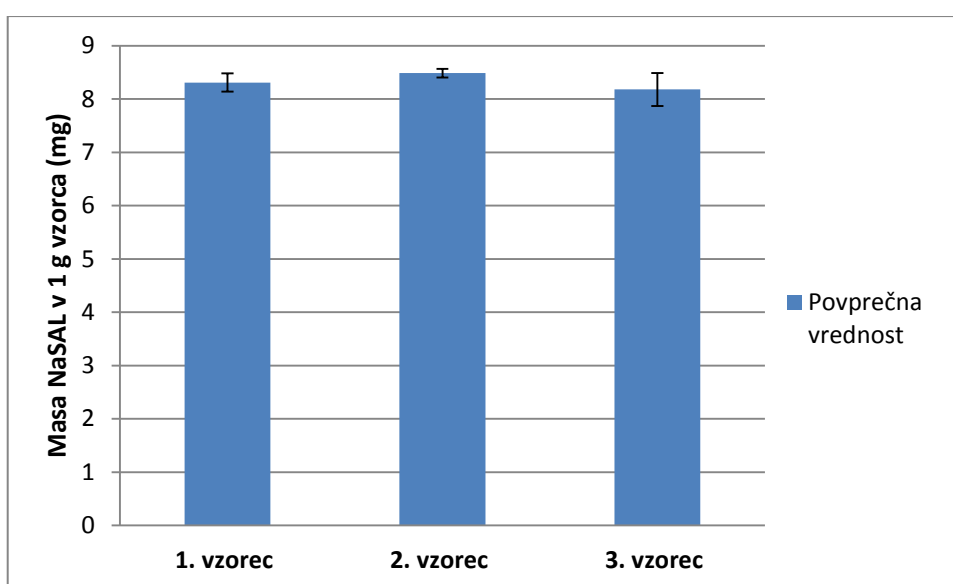
**Slika 20:** Povprečna vrednost NaSAL v 1 g vzorca in SD pri koncentraciji 50 mg/30g



**Slika 21:** Povprečna vrednost NaSAL v 1 g vzorca in SD pri koncentraciji 100 mg/30g

Ugotovili smo, da je količina NaSAL po različnih slojih v obeh primerih neponovljiva. Pri koncentraciji 50 mg/30g so bila odstopanja znotraj 17 %, določili pa smo v povprečju 10 % nižjo količino od teoretične, ki je 1,67 mg/g. Pri 100 mg/30g so bila odstopanja znotraj 26 %, določili pa smo v povprečju 6 % nižjo količino od teoretične, ki je 3,33 mg/g. Pri slednjem poskusu so bili rezultati homogenosti boljši zaradi višje koncentracije NaSAL, vendar neponovljivi zaradi odstopanja 2. vzorca.

Poskusili smo tudi z vgradnjo višje koncentracije KAS. Po pričakovanjih smo pri najvišji koncentraciji 250 mg/30g dobili ponovljive rezultate (Slika 22).



**Slika 22:** Povprečna vrednost NaSAL v 1 g vzorca in SD pri koncentraciji 250 mg/30g

Detekcija aktivne učinkovine je bila zaradi visoke koncentracije natančna, posledice napak pa manj zaznavne. Razlika med teoretično in praktično vrednostjo je bila znotraj 2 %, določili pa smo v povprečju 1 % nižjo količino od teoretične, ki je 8,33 mg/g.

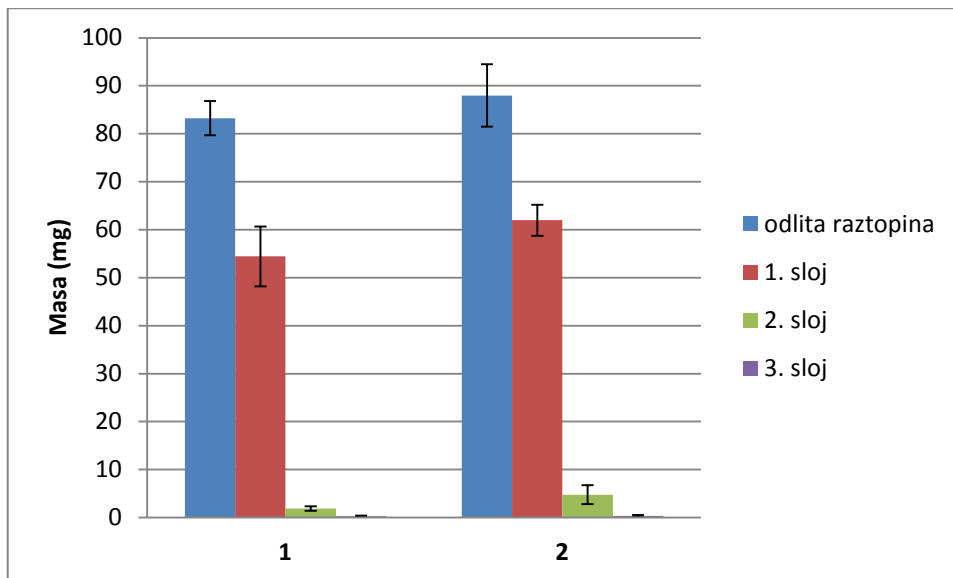
Ugotovili smo, da ponovljivo in točno lahko določimo KAS v koncentraciji 0,50 % oz. 150 mg/30g.

### **5.3. VREDNOTENJE PENETRACIJE NATRIJEVEGA**

#### **SALICILATA V POLOKSAMERNEM HIDROGELU**

Ko smo eksperimentalno potrdili, da lahko ponovljivo določimo 0,50 % KAS v hidrogelu, smo začeli z razvojem modela za spremljanje penetracije modelne kozmetično aktivne snovi. Gel smo pripravili na enak način kot v prvem delu metode, le da tokrat KAS nismo vgradili, temveč smo jo na gel nanесли. Ena serija je vključevala slepi vzorec in 3 vzorce z nanešeno raztopino, ki je vsebovala KAS. V raztopini s koncentracijo 50 mg/mL smo NaSAL lahko zanesljivo raztopili, 3 mL te raztopine pa so vsebovali točno 150 mg NaSAL. Raztopino smo nanесли na gel in vzorce postavili v vodno kopel (37 °C). Po določenem času (5 časovnih točk) smo najprej ločili nanešeno raztopino od gela, jo ustrezno redčili in določili koncentracijo neabsorbirane KAS. Opazili smo, da se gel in raztopina ne mešata in da se nanešena raztopina večinoma ne absorbira, penetrira le NaSAL. Nato smo začeli vzorčiti na 3-eh različnih globinah. Vsak vzorec sloja smo postavili v hladilnik, da se je utekočnil, in ga na tak način kvantitativno prenesli in ustrezno redčili. V poglavju *Vgrajevanje modelne aktivne učinkovine v poloksamerni hidrogel in določanje homogenosti njene porazdelitve (5.2.)* smo gel razdelili v 5 navideznih globin, vendar smo opazili, da so sloji prepogosti in se zaradi tega pojavlja problem ponovljivega odvzemanja vzorca. Z zmanjšanjem števila navideznih slojev na 3, smo onemogočili eksperimentalno manipuliranje, odvzeli pa smo lahko tudi količinsko več vzorca (prej 1 g, zdaj 2 g). Po 4-ih in 8-ih urah smo opazili, da KAS prodira zelo počasi, zato smo poskus izvedli še po 24-ih, 48-ih in 72-ih urah.

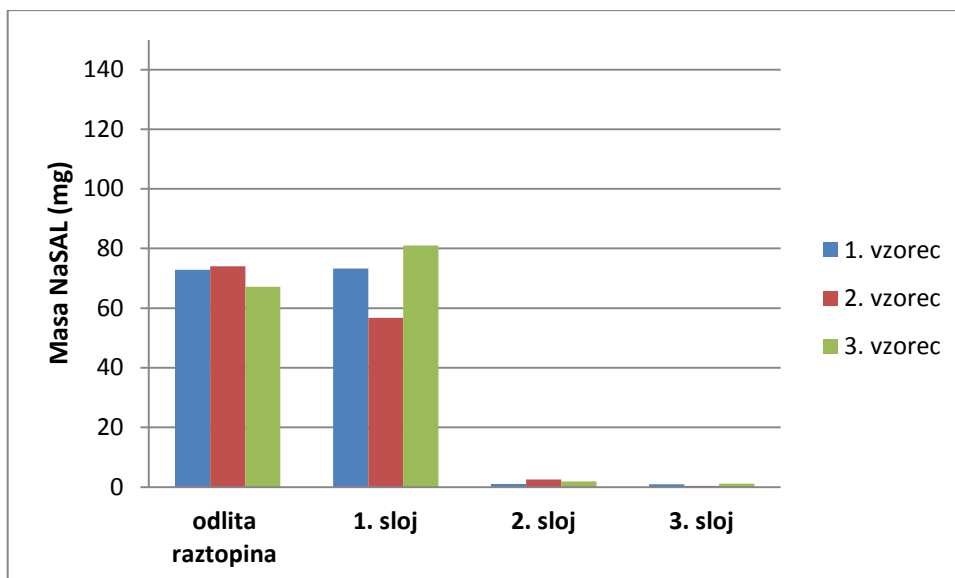
Prve meritve smo izvedli po 4-ih urah in izmerili količino NaSAL na različnih globinah (Slika 23).



**Slika 23:** Masa NaSAL po 4-ih urah v različnih globinah gela po dveh poskusih

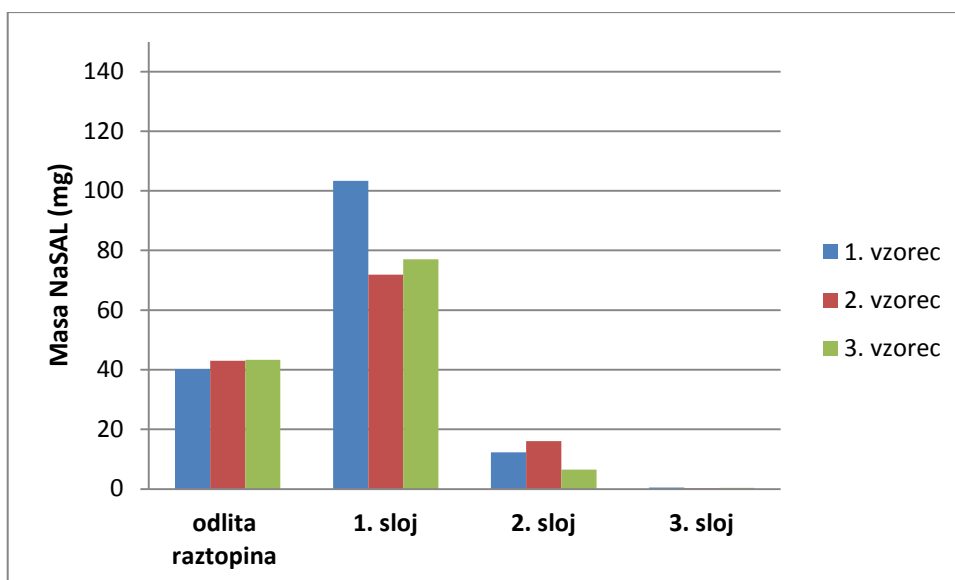
V celotnem prvem sloju smo v 2 g vzorca določili približno 60 mg NaSAL, kar predstavlja 40 % celotnega odmerka. V 2. sloju smo določili približno 3 mg, v 3. sloju pa približno 0,30 mg KAS. To pomeni, da je po 4-ih urah učinkovina komaj zaznavno prodrla v globlje plasti. Ker smo v vseh treh slojih določili le 40 % celotne učinkovine, smo učinkovino določili tudi v preostali tekočini na vrhu vzorca – odliti raztopini. V tej smo določili še preostalih 60 % učinkovine. To pomeni, da KAS po 4-ih urah še ni enakomerno razporejena po vzorcu. Poskus smo ponovili, kar prikazuje Slika 23. Rezultati so podobni v obeh paralelkah, kar pomeni, da je celoten postopek določanja NaSAL po globini ponovljiv.

Nato smo v naslednjem poskusu določali penetracijo skozi gel po 8-ih urah (Slika 24). Ugotovili smo, da je v 1. sloju delež učinkovine preko 50 %, globlje pa je komaj zaznaven. V odliti raztopini je količina NaSAL enaka količini v 1. sloju. V 2. sloju smo določili približno 2 mg učinkovine, v 3. sloju pa približno 0,50 mg učinkovine.



**Slika 24:** Masa NaSAL po 8-ih urah na različnih globinah gela

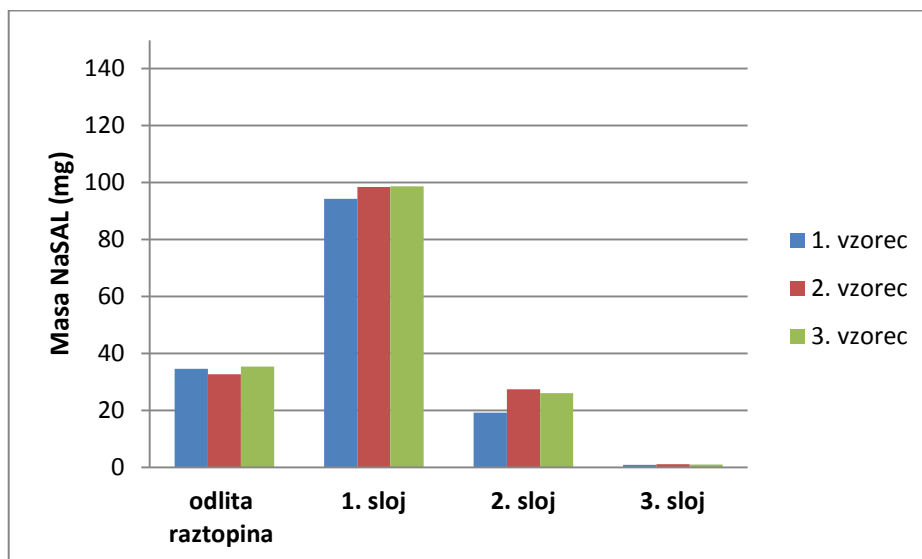
Po 24-ih urah je razvidno, da se penetracija NaSAL iz raztopine v 1. sloj nadaljuje, saj se masa v 1. sloju veča glede na izhodno raztopino (Slika 25).



**Slika 25:** Masa NaSAL po 24-ih urah na različnih globinah gela

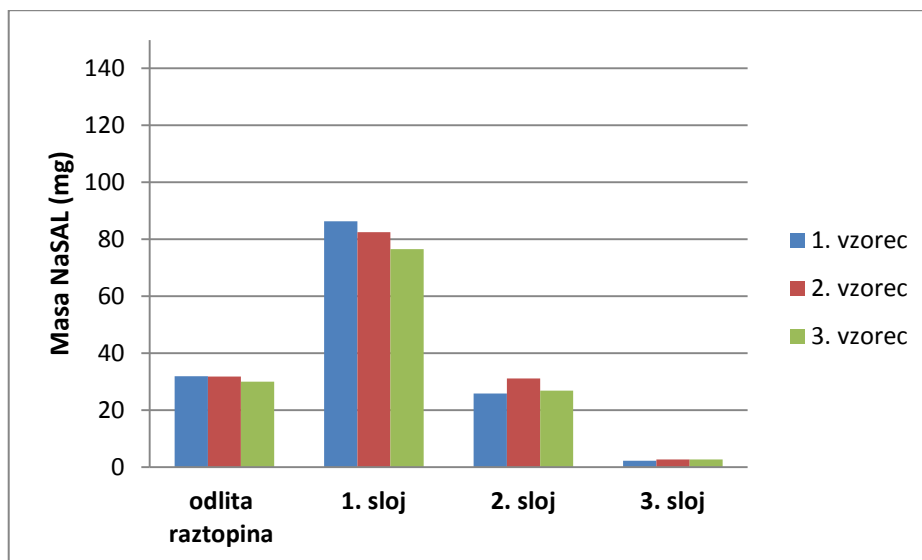
V 1. sloju je 60 %, v odliti raztopini pa 30 % učinkovine. Spojina je začela penetrirati skozi 1. sloj globlje v 2. sloj, kjer smo zaznali 10 % učinkovine. Izmerjena masa NaSAL v 3. sloju je še vedno nizka, približno 0,40 mg.

Po 48-ih urah rezultati ne odstopajo veliko od rezultatov po 24-ih urah (Slika 26). V odliti raztopini je manj NaSAL, in sicer 20 %. V 1. sloju je sedaj 65 %, v 2. sloju 15 %, v 3. sloju pa le približno 1 mg učinkovine.



**Slika 26:** Masa NaSAL po 48-ih urah na različnih globinah gela

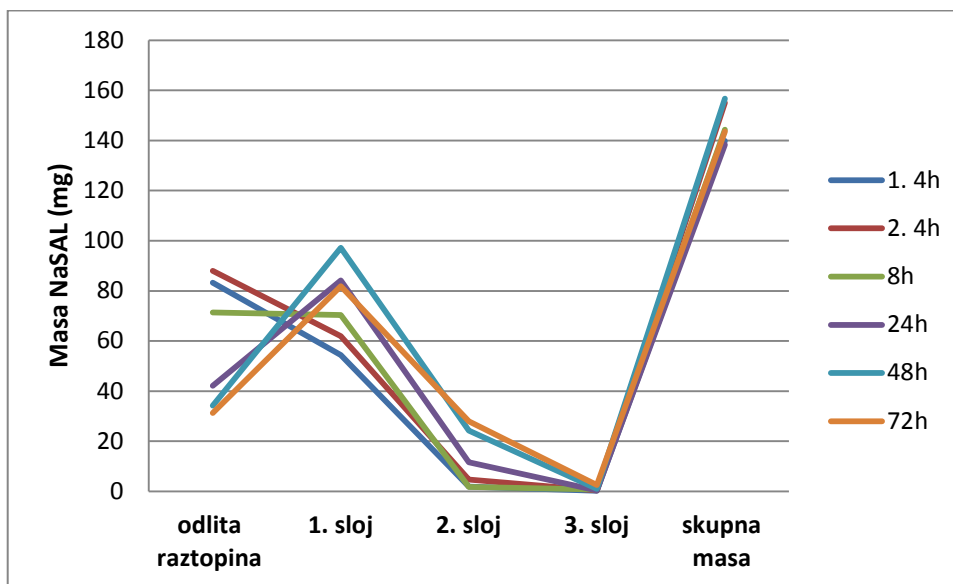
Po 72-ih urah je penetracija povišana znotraj gela v vseh treh slojih (Slika 27).



**Slika 27:** Masa NaSAL po 72-ih urah na različnih globinah gela

Količina KAS je v 1. sloju nižja kot po 48-ih urah – 55 %, saj je učinkovina začela penetrirati v globlje plasti. V odliti raztopini je približno enaka količina NaSAL kot v odliti raztopini po 48 h – 20 %. V 2. sloju je skoraj 20 %, v 3. sloju pa približno 3 mg učinkovine.

Celokupno smo v vseh časovnih točkah uspeli detektirati praktično vso vgrajeno učinkovino (150 mg), porazdeljeno po različnih slojih, kar pomeni, da je med poskusom ne izgublamo (Slika 28).



**Slika 28:** Primerjava časovnih točk na različnih globinah gela

Slika 28 prikazuje prehajanje NaSAL po slojih s časom. Penetracija je na prehodu raztopina/gel hitrejša, nato po gelu med navideznimi sloji poteka počasneje, saj je proces penetracije spojin močno odvisen od narave vehikla, ki je v našem primeru termoreverzibilni poloksamerni hidrogel. Snovi počasneje prehajajo skozi bolj viskozne vehikle (4).

Teoretično lahko pričakujemo, da bo penetracija učinkovine v globlje plasti potekala do izenačitve koncentracije po slojih 1-3, kar se počasi kaže tudi na Sliki 28, kjer učinkovina iz 1. sloja zaradi koncentracijskega gradienta prehaja globlje.

Termoreverzibilnost sistema se je izkazala za zelo praktično, saj z ohlavitvijo celoten sistem prehaja v tekočino in se tako lažje prenaša.

Gel in nanešena raztopina se pri sobni temperaturi ne mešata, čeprav ni umetnih berier, kar olajša ločevanje raztopine od gela.

Kasnejših časovnih točk nismo raziskovali, ker je penetracija potekala prepočasi in so že poizkusi v izbranih časovnih točkah zahtevali veliko časa.

## 6. ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo določali koncentracijo modelne kozmetično aktivne učinkovine v poloksamernem hidrogelu.

V prvem sklopu poskusov, kjer smo iskali najnižjo koncentracijo natrijevega salicilata, pri kateri so rezultati porazdelitve aktivne učinkovine natančni in ponovljivi, smo ugotovili sledeče:

- Pripravimo lahko 20 % poloksamerni hidrogel, ki pri temperaturi pod 5 °C kaže lastnosti tekočine, pri temperaturi nad 20 °C oz. pri sobni temperaturi pa se pretvori v gel.
- Rezultati kažejo, da pri 50 mg/30g in 100 mg/30g oz. pri 0,17 % in 0,33 % koncentraciji KAS v hidrogelu ne moremo ponovljivo določiti vsebnosti NaSAL.
- Pri 150 mg/30g oz. pri 0,50 % koncentraciji KAS v hidrogelu, lahko NaSAL določimo ponovljivo, v različnih globinah vzorca. Praktične vrednosti mase NaSAL po slojih so skoraj enake teoretičnim izračunom pri vseh treh vzorcih, zato je to najprimernejša koncentracija za detekcijo NaSAL v 20 % poloksamernem hidrogelu.
- Pri 250 mg/30g oz. pri 0,83 % koncentraciji KAS v hidrogelu so rezultati po pričakovanjih pri vseh treh vzorcih ustrezni, vendar je ta koncentracija višja od najnižje, pri kateri dobimo zanesljive rezultate (0,50 %), kaže pa na to, da je mogoče višje koncentracije lažje in bolj ponovljivo določati.

V drugem sklopu poskusov smo raztopino z izbrano koncentracijo nanašali na 20 % poloksamerni hidrogel brez KAS in določali penetracijo NaSAL v različnih časovnih točkah:

- Prehajanje iz nanešene raztopine v 1. sloj gela je hitrejše, nato se upočasni (prehajanje po gelu).

- Poskus je ponovljiv, kar smo dokazali z dvakratnim izvajanjem merjenja prehajanja NaSAL po 4-ih urah.
- Po 4-ih in 8-ih urah se večina NaSAL nahaja v vrhnjem sloju gela in v izhodiščni raztopini.
- Po 24-ih, 48-ih in 72-ih urah se večina NaSAL še vedno nahaja v vrhnjem sloju gela, prodira pa tudi globlje v 2. in 3. sloj.
- Skupna vsebnost aktivne komponente v vsakem vzorcu je blizu teoretični vrednosti (150 mg), kar dokazuje dobro načrtovan poskus in možnost ponovljive detekcije relativno nizkih količin NaSAL.

Glede na to, da NaSAL po gelu prehaja zelo počasi, bi bilo smiselno za nadaljnje raziskave zmanjšati koncentracijo poloksamera oz. poiskati najnižjo koncentracijo, kjer bi dobili hidrogel ustrezne konsistence, po katerem bi modelna kozmetično aktivna učinkovina prehajala hitreje. Ta model pa je dobra osnova za nadaljnje delo.

## 7. LITERATURA

- 1) Jones R G, Wilks E S, Metanowski W V, Kahovec J, Hess M, Stepto R, Kitayama T: Compendium of polymer terminology and nomenclature (IUPAC Recommendations 2008), RSC Publishing, Velika Britanija, 2009: 215.
- 2) Tarun G, Ajay B, Bhawana K, Sunil K, Ravi J: Organogels: advanced and novel drug delivery system. International research journal of pharmacy 2011; 12: 15-21.
- 3) Debnath S, Vanitha G, Hima Bindu P, Niranjana-Babu M: Applications of organogels in drug delivery. Indian journal of research in pharmacy and biotechnology 2014; January-February: 976-981.
- 4) Reddy Gandra S C: The preparation and characterization of poloxamer-based temperature-sensitive hydrogels for topical drug delivery, 2013, dosegljivo (10.4.2014): [https://etd.ohiolink.edu/rws\\_etd/document/get/mco1373375178/inline](https://etd.ohiolink.edu/rws_etd/document/get/mco1373375178/inline)
- 5) Sahoo S, Kumar N, Bhattacharya C, Sagiri S S, Jain K, Pal K, Ray S S, Nayak B: Organogels: Properties and applications in drug delivery. Designed monomers and polymers 2011; 14: 95-108.
- 6) Carpi A: Progress in molecular and environmental bioengineering – from analysis and modeling to technology applications, InTech, Velika Britanija, 2011: 117-141.
- 7) Ganji F, Vasheghani-Farahani S, Vasheghani-Farahani E: Theoretical description of hydrogel swelling: A review. Iranian polymer journal 2010; 19: 375-398.
- 8) Masteiková R, Chalupová Z, Šklubalová Z: Stimuli-sensitive hydrogels in controlled and sustained drug delivery. Medicina 2003; 39: 19-24.
- 9) Karmarkar A B: Poloxamers and their applications, 2008, dosegljivo (10.4.2014): <http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/poloxamers-and-their-applications-0>
- 10) Rowe R C, Sheskey P J, Quinn M E: Handbook of pharmaceutical excipients, American Pharmaceutical Association, Washington, 2005: 507-509.
- 11) Dumortier G, Grossiord J, Florence A, Chaumeil J: A review of Poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. Pharmaceutical Research 2006; 23: 2709-2728.
- 12) Beek R, Guterres S, Pohlmann A: Nanocosmetics and nanomedicines (new approaches for skin care), Springer, Nemčija, 2011: 4-11.

- 13) Castell J V, Gómez-Lechón M J: *In vitro* methods in pharmaceutical research, Academic press, Velika Britanija, 1997: predgovor.
- 14) Kielhorn J, Melching-Kollmuß, Mangelsdorf I: Dermal absorption – environmental health criteria (EHC) 235, World health organization (WHO), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2006: 38-58.
- 15) Ehrhardt C, Kim K J: Drug absorption studies (*in situ*, *in vitro* and *in silico* models), Springer, New York, 2008: 12-16.
- 16) Riviere J E: Dermal absorption models in toxicology and pharmacology, Taylor & Francis group, ZDA, 2006: 21-25.
- 17) Tsinman K, Sinkó B: A high throughput method to predict skin penetration and screen topical formulations. *Cosmetics & Toiletries* 2013; 128: 192-199.