

## PŮVODNÍ PRÁCE

# Vplyv pomocných látok na permeáciu kofeínu z gélov

## Influence of excipients on caffeine permeation from gels

Alexandra Kodadová • Zuzana Vítková • 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 nachádzajúce sa kofein využitie v dermálnych hydrogéloch. Dôležitý je tiež výber pomocných látok zo skupiny humektantov a katiónových tenzidov. Ich cieľom je zabezpečiť dlhodobú stabilitu hydrogélov a čo najlepšiu permeáciu použitého liečiva z gélov. Predmetom výskumu je štúdium vplyvov rôznych pomocných látok na permeáciu kofeínu z gélov a tiež ich vplyv na reologické vlastnosti hydrogélov. Na základe získaných výsledkov sa určilo nasledovné optimálne zloženie pre kofeinový gél: 2,5% chitosan + 0,1% kofein + 10% propylenglykol + 0,1% benzylidimethylhexadecylammoniumchlorid.

**Kľúčové slová:** kofein • hydrogély • permeácia • reologické parametre

### Summary

The subject of this paper is a study of the influence of excipients on caffeine permeation from dermal semisolids 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 % propylene glycol + 0.1 % benzylidimethylhexadecylammonium chloride.  
**Keywords:** caffeine • hydrogels • permeation • rheological parameters

### Úvod

Kofein sa v kozmetickom priemysle stále častejšie využíva ako významná biologicky aktívna látka. Využitie nachádza ako antiselulitídové kozmetikum. Vďaka blokáde  $\alpha$ -adrenergného receptoru a inhibícii fosfodiesterázy stimuluje lipolýzu, a teda bráni kumuláciu nadbytočného tuku v adipocytoch<sup>1)</sup>.

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 kofein pôsobiť ako účinná prevencia pred UV-indukovanou rakovinou kože a ako účinný vychytávač voľných radikálov<sup>2)</sup>.

Prostredníctvom lokálnej aplikácie kofeínu sa predpokladá takisto stimulačný účinok na rast vlasov. Prospešné účinky u pacientov s androgénou alopeciou dosahuje kofein vďaka blokáde  $\alpha$ -reduktažy, ktorá spôsobuje degradáciu testosterónu na dihydrotestosterón (DHT). Tým bráni nadmernému hromadeniu DHT a oslabovaniu vlasových cibuliek. Inhibíciu aktivity tohto enzymu sa umožňuje obnovenie rastu vlasov<sup>3, 4)</sup>.

Vlastnosti kofeínu je vhodné uplatniť v dermálnych polotuhých liekoch – hydrogéloch. Hydrogély pozostávajú z polymérnych, navzájom zosietovaných, refázovcov. Prírodné polymery vykazujú lepšie vlastnosti ako syntetické polymery – nízku alebo žiadnu toxicitu, biokompatibilitu či biodegradovateľnosť<sup>5)</sup>. Chitosan je semisynthetický katiónový polymér získavaný čiastočnou deacetyláciou prírodného polysacharidu chitínu<sup>6)</sup>. Mnohými štúdiami boli dokázané pozitívne účinky chitosanu.

PharmDr. Alexandra Kodadová (✉) • Z. Vítková • 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

Hydrogéľ č.	Zložky hydrogélov % (m/m)					
	chitosan	kofein	propylénglykol	glycerol	benzetoniumchlorid	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 – benzylidimethylhexadecylamóniumchlorid

Potvrdená bola antimikrobiálna aktivita<sup>7)</sup> chitosanu proti rôznym druhom grampozitívnych i negatívnych baktérií a tiež proti hubám, antinádorová aktivita<sup>8)</sup> či antioxidačná aktivita<sup>9)</sup>. Chitosan ako súčasť hydrogélov pôsobí ako účinný a nedráždivý urýchlovač permeácie liečiva cez pokožku alebo sliznice. Spôsobuje reverzibilné zvýšenie prieplustnosti medzibunkových kožných priestorov<sup>10)</sup>. Chitosanové hydrogély sa pripravujú o rozličnej koncentrácií chitosanu<sup>11–14)</sup>. Hydrogély majú stále v oblasti farmácie významné postavenie. Nenáročná aplikácia, príjemný pocit na koži, chladivý účinok vedú pacienta k dobrej kompliancii. Lahkým zmytím gélu vodou je možné rýchlo prerušíť 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 koféínu a sledovať stálosť pripravených gélov na základe ich reologických vlastností.

## Pokusná časť

### Použité chemikálie

Kofein (*coffeinum*, SL1) – liečivo – Sanitas, Praha, Česká republika; chitosan (*chitosanum*) praktický stupeň získaný z kreviet – gélotvorná látka – stupeň deacetylácie ≥ 75 % – Sigma-Aldrich, pobočka Bratislava, Slovenská republika; propylénglykol (*propylenglycolum*, SL1) – humektant – Interpharm Slovakia a.s., Bratislava, Slovenská republika; glycerol (*glycerolum*, SL1) – humektant – Interpharm Slovakia a.s., Bratislava, Slovenská republika; benzylidimethylhexadecylamóniumchlorid – katiónový tenzid – Sigma-Aldrich, pobočka Bratislava, Slovenská republika; benzetoniumchlorid (*benzethonium chloridum*, SL1) – katiónový tenzid – Sigma-Aldrich, pobočka Bratislava, Slovenská republika; kyselina mliečna (*acidum lacticum*, SL1) – Interpharm Slovakia a.s., Bratislava, Slovenský republika; čistená voda (*aqua purificata*, SL1) – FaF UK, Bratislava, Slovenská republika.

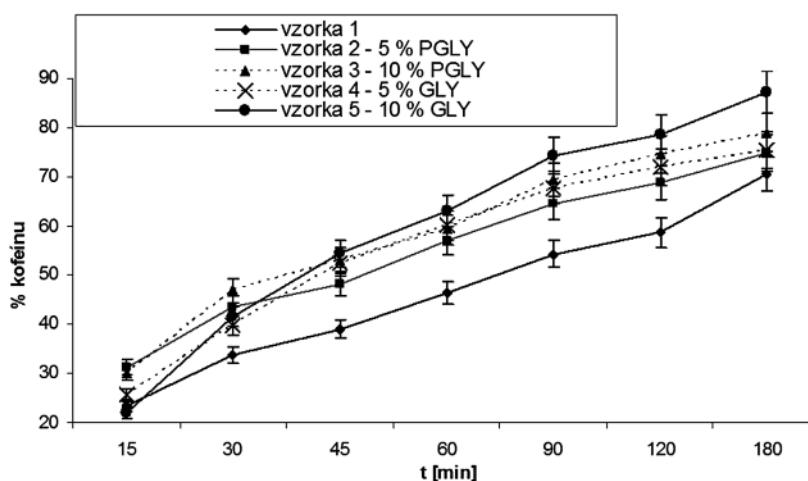
### Použité prístroje

Pri permeačnom experimente boli použité: analytické váhy Mettler Toledo (Greinfensee, Švajčiarsko), permeačná aparátura zostavená na Katedre galenickej farmácie, FaF UK, Bratislava, Slovenská republika). Celofán (EKOZ, Nitra, Slovenská republika) slúžil ako permeačná membrána. Na stanovenie uvoľneného koféínu bol použitý spektrofotometer (Philips 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.

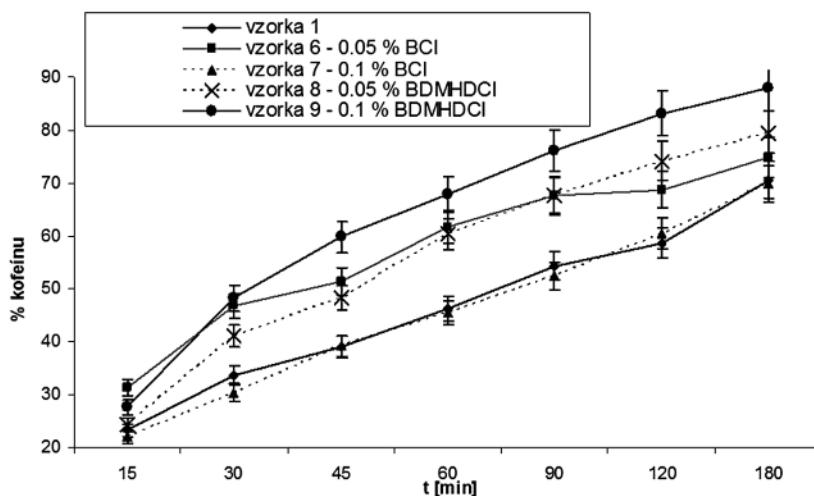
### Zloženie a príprava vzoriek

Hydrogély (100 g) boli pripravené v dvoch paralelných vzorkách zo zložením uvedeným v tabuľke 1. Ku každej vzorke sa zároveň pripravil aj blank – porovnávací 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.

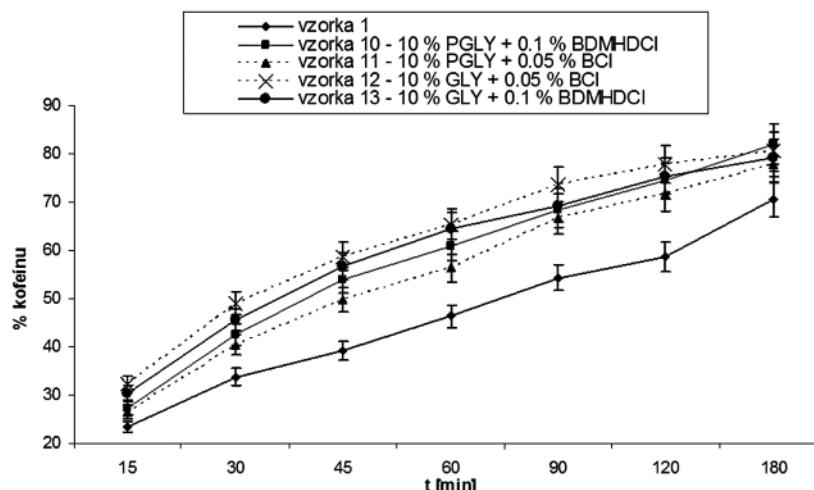
Pri príprave základnej vzorky (bez obsahu študovaných pomocných látok) sa do vytárovanej kadičky presne navážilo požadované množstvo chitosanu a koféínu. Následne sa pridalo také množstvo 1% roztoku kyseliny mliečnej (do 100 g), aby sa dosiahlo vhodné pH pre aplikáciu na kožu (pH 5,5–6,0). Zmes sa pomaly 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 katiónových tenzidov. Vzorky boli pripravované pri laboratórnej teplote  $t = 25^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Po príprave sa všetky hydrogély uskladnili pri teplote  $t = 5^{\circ}\text{C}$  po dobu minimálne 48 hodín.



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



Graf 2. Vplyv katiónových tenzidov na permeáciu kofeínu  
BCI – benzetóniumchlorid, BDMHDCI – benzylidimethylhexadecylamóniumchlorid



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

### Permeácia kofeínu z hydrogélov

Permeačnú apparátu tvorí séria ôsmich za sebou idúcich sklenených komôrok navzájom spojených plastovými hadičkami. Komôrka pozostáva z donorovej a akceptorovej časti oddelených semipermeabilou 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 udržovala konštanthná teplota  $30^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , ktorú zabezpečoval termostat napojený na permeačnú apparátu.

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. Odobratý 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 šest paralelných vzoriek (dve komôrky boli blank).

### Stanovenie reologickej vlastnosti pripravených vzoriek

Stanovenie reologickej parametrov sa realizovalo na rotačnom viskozimetri. Zaznamenávali sa hodnoty točivého momentu, z ktorého sa vypočítali základné reologicke 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 katiónových tenzidov na permeáciu kofeínu z pripravených hydrogélov. Humektanty sú pomocné látky s hygroskopickými vlastnosťami, preto sú nevyhnutnou zložkou hydrogélov. 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 štúdiach<sup>15–17</sup>.

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 zvola na základe prechádzajúcich štúdií<sup>18, 19</sup>. V ďalších štúdiach sa však predpokladá zvyšovanie koncentrácie kofeínu.

Pre vysoký obsah vody v hydrogéloch je potrebné ich stabilizovať antimikrobiálou látkou. Za týmto účelom sa vybrali dva katiónové tenzidy (benzetóniumchlorid a benzyldimetylhexadecylamóniumchlorid) o dvoch rôznych koncentráciách (0,05 % a 0,1%), osvedčené v predchádzajúcich štúdiach<sup>12, 14, 15</sup>. Okrem antimikrobiálnej aktivity sa osvedčili v týchto koncentráciách aj ako enhancers liečiv. Ich výber bol podmienený katiónovým charakterom chitosanu.

Graf 2 zobrazuje vplyv týchto tenzidov (vzorky 6 až 9) na permeáciu kofeínu z hydrogélov. 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 hydrogeli 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 hydrogélov. Na tento experiment bola zvolená koncentrácia chitosanu 2,5 % vďaka výhodným reologic kým vlastnostiam, ktoré boli dokázané v predchádzajúcich štúdiach<sup>11–14</sup>.

U jednotlivých pripravených vzoriek sa stanovili základné reologicke parametre: rýchlosťný spád D, tangenciálne napätie  $\tau$  a štruktúrna viskozita  $\eta_Q$ . Z priebehu tokových kriviek vyplýva, že všetky pripravené vzorky patrili medzi nenewtonovské sústavy. Základná vzorka

nadobudla tixotropný charakter. Charakteristické sú dve tokové krivky (stúpajúca a klesajúca) líšiace sa tvarom i polohou. Spoločný majú iba bod pri najvyššom rýchlosťnom gradiente. Z hľadiska dermálnej aplikácie je tixotropný charakter výhodný<sup>20</sup>. Z porovnania vzoriek s obsahom humektantov vyplýva, že tixotropné vlastnosti vykazoval iba hydrogel 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 katiónových tenzidov sa dá usúdiť, že tixotropný charakter nadobudla len vzorka s obsahom 0,05% benzetóniumchloridu. Gely 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 opakovanych 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 hydrogélov. Nedošlo k zmene časovo závislého tixotropného charakteru na časovo nezávislý charakter. Hydrogely si tiež zachovali pôvodnú viskozitu.

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

**Stret záujmov:** žiadny.

## Literatúra

- Herman A., Herman A. P. Caffeine's mechanism of action and its cosmetics use. Skin. Pharmacol. Physiol. 2013; 26, 8–14.
- León-Carmona J. R., Galano A. Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? J. Phys. Chem. B, 2011; 115, 4538–4546.
- Otherg N., Patzelt A., Rasulev U., Hagemeyer 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.
- Bansal M., Machanda K., Pandey S. S. Role of caffeine in the management of androgenetic alopecia. Int. J. Trichology, 2012; 4, 185–186.
- 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.
- Basu K. S., Kavitha K., Rupeshkumar M. Evaluation of ionotropic cross-linked chitosan/gelatin b microspheres of tramadol hydrochloride. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2011; 12, 28–34.
- Yajun X., Xiaofei L., Qiang, CH. Synthesis and characterization of water soluble chitosan derivates and its antibacterial activity. Carbohydr. Polym. 2007; 69, 142–142.
- Uragami T., Tokura S. Material science of chitin and chitosan. 1. vyd. Japan: Kodansha Scientific Ltd. 2010; 284–284.
- Vavříková E., Vinšová J. Chitosan a jeho farmaceutická aplikácia. Chem. Listy 2009; 103, 56–57.

- 
10. Herdová P., Vitková Z. Štúdium liberácie liečiv z chitosanových hydrogélov. 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., Ikinci 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 hydrogélov. In : Zborník Preveda – IV. interaktívna konferencia mladých vedcov. Bratislava 2012; 70.
  15. Cižmárik J., Vitková Z., Herdová P., Kodadová A., Vími D. Fomulácia benzetoniumchloridu do gélov. Čes. slov. Farm. 2014; 63, 123–126.
  16. Vitková Z., Herdová P., Kodadová A., Šeligová J., Grančai D., Poláková D. Formulácia gélov s obsahom šalvie lekárskej. Čes. slov. Farm. 2012; 61, 169–171.
  17. Capková Z., Vitková Z., Uhrovská S. Vplyv humektantov na farmaceutickú dostupnosť a reologické vlastnosti hydrogélov 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 hydrogélov. 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 hydrogélov s obsahom kvartérnej amóniovej soli. In: Zborník abstraktov 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.