

# Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolum z wielofazowych półstałych postaci leku dopochwowego

Michał Smoleński<sup>1</sup>, Dorota Haznar-Garbacz<sup>1</sup>, Susanne Florin-Muschert<sup>2</sup>,  
Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

<sup>2</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1008, F-59000 Lille, France

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

## Adres do korespondencji

Dorota Haznar-Garbacz,  
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska;  
e-mail: dorota.haznar-garbacz@umw.edu.pl

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## Źródła finansowania

Prezentowane wyniki badań zrealizowano w ramach tematu ujętego w systemie Simple pod nr STM.D140.20.067. Badania zrealizowano w ramach grantu Mobilix przyznanego przez Université de Lille we Francji.

## Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2023.04.15

Zaakceptowano: 2023.05.05

Opublikowano on-line: 2023.05.05


## DOI

10.32383/farmpol/165925


## ORCID

Michał Smoleński –  0000-0002-6075-9866


Dorota Haznar-Garbacz

–  0000-0002-0626-6067

Susanne Florin-Muschert

–  0000-0001-7111-6105

Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska

–  0000-0002-0127-835X

## Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

## Development of the method for the pharmaceutical availability testing of clotrimazole from multiphase semi-solid vaginal dosage forms

**Introduction.** The intravaginal drug administration enables treatment of the local and systemic diseases. The anatomy and physiology of a vagina provide several difficulties for drug technologists due to the small amount and continuous production of vaginal discharge, especially in the case of lipophilic drugs often characterized by insufficient solubility. The application of poorly soluble drug substances in the form of nanoemulsions improves their availability. However, in the case of nanoemulsion-based vaginal dosage forms, no standardized methods have been defined for testing the amount of a drug released from encapsulated form.

**Aim of the study.** Comparison and development of a method for testing the availability of active pharmaceutical substances from vaginal nanoemulsion-based drug forms.

**Materials and methods.** The nanoemulsion and reference products (cream and suspension) were placed in a dialysis bag separating them from the acceptor medium. The changes in the concentration of the free fraction of the model active substance – clotrimazole were assessed. The experiments were performed using 2 static methods of different mixing method (magnetic stirring and USP apparatus III) and 2 dynamic methods including the flow of the medium through the flow-through cell at 2 mL/min and 2 mL/h. The experiments were conducted for 5 h.

**Results.** Incomplete release of the active pharmaceutical ingredient was observed for all tested formulations over the experiment. Despite

the delivery of a fresh portion of the medium, low concentrations of the free clotrimazole fraction were observed for both flow-through methods i.e., a maximum of about 7.5% of the dose for the 2 mL/min flow rate and 5% for the 2 mL/h flow rate. In stationary methods, the maximum recorded concentrations of the free fraction of the drug corresponded to approx. 25% of the initial amount. For the pilot stationary method, high standard deviations (SD) were observed, which affected the low discriminatory properties of the method. The method based on the reciprocating cylinder dissolution apparatus provided results exhibiting smaller SD and more significant differences between the tested formulations. The highest concentrations among the evaluated formulations were observed for nanoemulsion or nanoemulsion and suspension, depending on the used test technique. Significantly lower doses of the drug were released from the cream in almost every test.

**Conclusions.** The selection of the method used to assess the pharmaceutical availability of an active pharmaceutical ingredient has a crucial impact on the release profiles obtained. The stationary method using a reciprocating cylinder apparatus (USP apparatus III) had the highest measurement precision and provided the most discriminatory results.

**Keywords:** dissolution, dosage forms, vagina, nanoemulsion, clotrimazole.

© Farm Pol, 2022, 78 (12): 675–684

## Przedmiot badań

Dopochwowe podanie umożliwia precyzyjne miejscowe leczenie zakażeń bakteryjnych, grzybiczych i wirusowych, jak również może być wykorzystane do systemowego podawania leków z pominięciem krążenia wątrobowego [1–5]. Jednakże, opracowanie dopochwowych formuacji stanowi trudność z uwagi na fizjologiczne uwarunkowania miejsca podania. Pierwszą trudnością tej drogi podania jest niewielka ilość wydzieliny pochwy obecna w świetle pochwy, wynosząca około 2 mL, i ograniczająca rozpuszczanie substancji leczniczych, kolejną trudnością jest klirens tej wydzieliny w ilości do 6 mL/24 h, co jest przyczyną krótkiego czasu kontaktu leku z błoną śluzową i może wpływać na ograniczenie czasu przebywania substancji leczniczej w miejscu podania [6–8].

Formuacje dopochwowe oparte na nanoemulsjach stanowią dynamicznie rozwijający się dział technologii postaci leków dopochwowych. Zastosowanie nanoemulsji w tej drodze podania dostarcza korzyści, takich jak: a) możliwość jednoczesnego podania leków lipofilowych i hydrofilowych, b) zwiększoną adhezję do błony śluzowej pochwy, c) możliwości dostosowania wielkości fazy rozproszonej do potrzeb

terapeutycznych związanych z przenikaniem przez warstwę wydzieliny pochwy i warstw ściany pochwy [9].

Pomimo dużego zainteresowania postacią leku, wciąż brakuje usystematyzowanych metod pozwalających testować dostępność farmaceutyczną leku z postaci emulsyjnych w dopochwowym podaniu leku. Dotychczasowe rekomendacje *Food and Drug Administration* (FDA) oraz komitetu *United States Pharmacopeia* (USP) określają metody badawcze głównie dla tabletek i krążków dopochwowych obejmujące wykorzystanie urządzeń farmakopealnych, takich jak aparaty koszykowe, łopatkowe, aparat USP typu VII, lub metod niekonwencjonalnych, takich jak wytrząsarki i inkubatory [10–13]. Modele farmakopealne znajdują zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako narzędzia służące do porównania technologii, jednak nie są w stanie symulować warunków fizjologicznych. Kale *et al.* podjęli starania w celu zaadaptowania modelu Setnikar i Fantelli do prowadzenia badań dostępności farmaceutycznej postaci dopochwowych w skali zbliżonej do warunków fizjologicznych [14, 15]. Model ten nie znajduje zastosowania w badaniu formuacji emulsyjnych. Oddzielenie postaci leku od medium akceptorowego za pomocą błony półprzepuszczalnej, pozwala na oznaczanie wolnej frakcji leku niezwiązanej z fazą lipofilową nanoemulsji, co wydaje się istotne z punktu widzenia skuteczności leczenia [16, 17].

## Cel pracy

Celem pracy jest opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej substancji czynnej (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) z dopochwowych wielofazowych postaci na bazie emulsyjnej, tj. kinetyki przechodzenia leku do fazy wodnej z fazy olejowej, w której jest związany. Jako substancję czynną zastosowano clotrimazol (CLT), w przypadku klasyfikacji BCS dotyczącej doustnego podania leków, zaliczaną do grupy BCS II, cechującą się niską rozpuszczalnością i wysoką przenikalnością. Do badań wykorzystano nanoemulsję własnej receptury, będącą przedmiotem zgłoszenia patentowego [18].

Pożądana metoda badania dostępności farmaceutycznej powinna zapewniać warunki dyskryminujące dla 3 badanych formuacji – nanoemulsji zawierającej *clotrimazolium* (NE-CLT), zawiesiny i komercyjnego produktu referencyjnego (kremu), jednocześnie zapewniając warunki zbliżone do fizjologicznych. W tym celu przeprowadzono badania z wykorzystaniem dwóch metod stacjonarnych i dwóch metod

przepliwowych z wykorzystaniem aparatury opisanej w Farmakopei, jak również metod niekonwencjonalnych.

## Materiały i metody

### Materiały

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy zastosowano następujące materiały i odczynniki chemiczne: *clotrimazolum* (CLT) Pol-Aura (Różanowo, Polska); olej rzepakowy Bunge Polska Sp. z o.o. (Kruszwica, Poland); 90% kwas mlekowy, poloxamer 188 (Pluronic F-68) Pol-Aura (Różanowo, Polska); poloxamer 407 (Pluronic F-127), glikol polietylenowy 200 (PEG200), monooleinian sorbitanu (Span 80) Sigma-Aldrich (St. Louis, USA lub Steinheim, Niemcy).

Acetonitryl HPLC gradient (ACN) z S.Witko (Łódź, Polska). Diwodorofosforan (V) potasu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Chempur (Piekary Śląskie, Polska). Wodę do HPLC (< 0,05 μS/cm) użytą do przygotowania formulacji i wszystkich eksperymentów wyprodukowano w laboratorium z wykorzystaniem urządzenia Hydrolab Ultra UV (Hydrolab Sp z o.o., Straszyn, Polska).

Wszystkie zastosowane odczynniki chemiczne były klasy „czysty do analizy”.

Komercyjny produkt referencyjny 1% krem z CLT, MycoHydralin (Bayer Healthcare, Loos, Francja) zakupiono w lokalnej aptece ogólnodostępnej we Francji.

### Metody

#### Otrzymywanie nanoemulsji zawierającej clotrimazolum do badań

W celu przygotowania nanoemulsji przepisana ilość oleju rzepakowego, Spanu 80 i PEG 200 wymieszano wstępnie korzystając z mieszadła magnetycznego. Następnie, wskazaną ilość substancji czynnej rozpuszczono w uprzednio podgrzanej frakcji lipofilowej, po czym kroplami wprowadzono roztwór Poloxameru 188 i kwasu mlekowego. Uzyskaną makroemulsję pozostawiono na 24 h do ustabilizowania, mieszając z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Formulację poddano homogenizacji z wykorzystaniem homogenizatora szybkoobrotowego (PRO250, PRO Scientific Inc., Oxford, USA; 13 000 ± 200 obr./min, 10 min), następnie dwóm cyklom homogenizacji wysokociśnieniowej (GEA PandaPLUS 2000, GEA Mechanical Equipment Italia S.p.A, Parma, Włochy; 1300 ± 100 bar).

Skład formulacji nanoemulsji zawierającej *clotrimazolum* (NE-CLT) przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Skład nanoemulsji zawierającej clotrimazolum.

**Table 1.** Composition of nanoemulsion loaded with clotrimazole.

Składnik	Zawartość [% w/w]
<i>Clotrimazolum</i>	1,0
Olej rzepakowy	20,0
Kwas mlekowy	0,6
Pluronic F-68	16,0
PEG 200	6,6
Span 80	4,0
Woda do HPLC	51,8

#### Pomiar wielkości kropli oleju, współczynnika polidispersyjności, potencjału zeta, pH i osmolalności

Otrzymaną formulację poddano badaniu na analizatorze wielkości cząstek Zetasizer Nano-ZS ZEN3600 (Malvern Instruments Ltd., Worcester-shire, UK) metodą dyfrakcji laserowej (ang. *DLS - Dynamic Light Scattering*) i elektroforetycznego rozpraszania światła (ang. *ELS - Electrophoretic light scattering*), wykorzystując ustawienie lasera pod kątem 173°. Badanie przeprowadzono w temperaturze 25 ± 0,1°C. Badaną nanoemulsję rozcieńczono 50-krotnie w wodzie do HPLC. Zmierzono średnią średnicę kropli oleju (ang. *z-average*), współczynnik polidispersyjności (ang. *Polydispersity index, PDI*) i wartość potencjału zeta (ang. *z-potential*).

Pomiar pH przeprowadzono za pomocą pH-metru Mettler Toledo SevenMulti S40 (Mettler-Toledo LLC, Columbus, USA) wyposażonego w elektrodę szklaną.

Pomiar osmolalności wykonano z użyciem Micro-osmometru Loeser TYP 6 (Loeser Messtechnik, Berlin, Germany). Próbkę rozcieńczono dwukrotnie przed pomiarem osmolalności.

Wszystkie pomiary przeprowadzono w 3 powtórzeniach.

#### Przygotowanie zawiesiny z CLT

Zawiesinę CLT, jako jedną z formulacji referencyjnych, przygotowano poprzez zawieszenie zmikronizowanej substancji czynnej w wodzie do HPLC. Dla przygotowania 100 g zawiesiny odważono 1,0 g CLT, który następnie wprowadzono do 99,0 g wody do HPLC. Mieszaninę poddano intensywnemu wytrząsaniu przez 15 minut do pokonania napięcia powierzchniowego. Zawiesinę wstępnie wymieszano na mieszadle magnetycznym przez 10 min z prędkością 350–500 obr./min. Następnie, zawiesinę poddano sonikacji przez 15 min i pozostawiono na noc na mieszadle magnetycznym, utrzymując 350–500 obr./min.

**Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego**

Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji metodą stacjonarną zostało przeprowadzone z wykorzystaniem aparatury składającej się z łaźni wodnej (Erweka GmbH, Langen, Niemcy), w której zanurzono szklane naczynia (zlewki) o cylindrycznym kształcie (Erweka GmbH, Langen, Niemcy). Jako medium akceptorowe zastosowano 50 mM bufor fosforanowy o pH 3,5. 300 mL medium umieszczono w szklanych naczyniach i termostatowano w warunkach 37°C, jednocześnie mieszając przy prędkości 100 obr./min z wykorzystaniem wielostanowiskowego mieszadła magnetycznego. Badanie przeprowadzono dla 3 formulacji, tj. nanoemulsji z CLT (NE-CLT), 1% zawiesiny i kremu MycoHydralin. Dla oddzielenia frakcji CLT związanej w formulacji od wolnego CLT wykorzystano worki dializacyjne Servapor, wykonane z regenerowanej celulozy o wartości odcięcia masy cząsteczkowej do 12 000 Da i porach o średnicy 2,5 nm. Dla ujednolicenia postępowania do badań przyjęto długość worka dializacyjnego wynoszącą 7 cm przy średnicy 16 mm. Błony kondycjonowano w medium przez 1 h przed badaniem. Do worka dializacyjnego wprowadzano po 5 mL badanych preparatów (formulacji nanoemulsji, zawiesiny i kremu z CLT). Worki dializacyjne zostały zabezpieczone na obu końcach klipsami, które utrzymywały badane formulacje w medium w pozycji wertykalnej. Badanie prowadzono przez 5 h, pobierając próbki co 30 min. Objętość pojedynczej próbki ustalono na 5 mL, którą każdorazowo zastępowano jednakową objętością świeżego medium. Pobrane próbki rozcieńczano 1:1 z ACN celem zapewnienia odpowiedniej stabilności, filtrowano przez filtry strzykawkowe z regenerowanej celulozy (25 mm; 0,22 µm) i analizowano metodą HPLC opisaną w rozdziale *Oznaczanie stężenia CLT metodą RP-HPLC*.

**Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – metoda stacjonarna z wykorzystaniem aparatu USP III**

Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i produktów referencyjnych metodą stacjonarną zostało również przeprowadzone z wykorzystaniem aparatu z ruchomym cylindrem, znanym również jako aparat typu III według USP [19, 20]. W tym celu zastosowano

aparat Varian Bio-Dis Dissolution System z pompą VK 750D (Varian Inc., Weston Parkway, Cary, USA). Jako medium akceptorowe zastosowano 50 mM bufor fosforanowy o pH 3,5. W szklanych cylindrycznych zlewkach o pojemności 300 mL umieszczono 200 mL medium i termostatowano w warunkach 37°C. Celem oddzielenia formulacji od medium akceptorowego wykorzystano worki dializacyjne opisane w rozdziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego*. Z uwagi na mniejszy rozmiar komórki objętość pojedynczej próbki zredukowano do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla 3 formulacji, tj. nanoemulsji z CLT, 1% zawiesiny i kremu MycoHydralin. Prędkość ruchu posuwistego cylindrów zawierających formulacje ustalono na 5 zanurzeń na minutę celem zapewnienia odpowiedniego mieszania próbek. Badanie prowadzono przez 5 h, pobierając próbki co 30 min. Próbkę przygotowano do analizy zgodnie z metodą opisaną w rozdziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego*.

**Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – metoda przepływowa z wykorzystaniem aparatu USP IV**

Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i produktów referencyjnych metodą dynamiczną, przepływową zostało przeprowadzone z wykorzystaniem aparatu przepływowego (znanego również jako USP apparatus IV). Zestaw składał się z celki przepływowej o pojemności 22,6 mL (CE 1, Sotax AG, Basel, Szwajcaria) i pompy tłokowej (CY 7-50, Sotax AG, Basel, Szwajcaria). Jako medium akceptorowe zastosowano 50 mM bufor fosforanowy o pH 3,5. Pojemność rzeczywistą celki pomiarowej, uwzględniającą objętość zajmowaną przez złożo szklanych kulek, ustalono na 18 mL. Badanie prowadzono w układzie otwartym. Przepływ medium ustalono na 2 mL/min, które stanowiło najmniejszą prędkość przepływu medium gwarantującą stabilną pracę pompy tłokowej. Celki przepływowe termostatowano w warunkach 37°C. Celem oddzielenia formulacji od medium akceptorowego wykorzystano worki dializacyjne opisane w rozdziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego*. Z uwagi na rozmiar celki objętość pojedynczej próbki zredukowano



do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla 3 formu-  
lacji tj., nanoemulsji z CLT, 1% zawiesiny i kremu  
MycHydralin. Badanie prowadzono przez 5 h.  
Próbki pobierano co 10 min przez 1 h ekspery-  
mentu, następnie co 30 min do końca testu. Próbki  
przygotowano do analizy zgodnie z metodą opi-  
saną w rozdziale *Badanie zmiany stężenia wolnej  
frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyj-  
nych – pilotażowa metoda stacjonarna z wyko-  
rzystaniem mieszadła magnetycznego*.

#### **Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – metoda przepływowa z wykorzystaniem aparatu USP IV i pompy strzykawkowej**

Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT  
z nanoemulsji i produktów referencyjnych metodą  
dynamiczną, przepływową zostało przeprowa-  
dzone z wykorzystaniem celki przepływowej  
o pojemności 22,6 mL (CE 1, Sotax AG, Basel,  
Szwajcaria), wchodzącej w skład aparatu przepły-  
wowego (USP apparatus IV), oraz pompy strzy-  
kawkowej (PhD2000 Infusion, Harvard Apparatus,  
Holliston MA, USA) [19, 20]. Jako medium akcep-  
torowe zastosowano 50 mM bufor fosforanowy  
o pH 3,5. Rezerwuuar medium akceptorowego sta-  
nowiły strzykawki o pojemności 30 mL. Pojem-  
ność rzeczywistą celki pomiarowej, uwzględnia-  
jącą objętość zajmowaną przez złożone szklanych  
kulek, ustalono na 18 mL. Przepływ medium  
ustalono na 2 mL/h, które stanowiło najmniej-  
szą prędkość przepływu medium gwarantującą  
stabilną pracę pompy tłokowej. Celki przepły-  
wowe termostatowano w warunkach 37°C. Celem  
oddzielenia formulacji od medium akceptorowego  
wykorzystano worki dializacyjne opisane w roz-  
dziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji  
CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych  
– pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzy-  
staniem mieszadła magnetycznego*. Z uwagi na  
rozmiar celki objętość pojedynczej próbki zredu-  
kowano do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla  
3 formuacji, tj. nanoemulsji z CLT, 1% zawiesiny  
i kremu MycoHydralin. Badanie prowadzono przez  
5 h, pobierając próbki co 60 min. Próbki przygoto-  
wano do analizy zgodnie z metodą opisaną w roz-  
dziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji  
CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych –  
pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzysta-  
niem mieszadła magnetycznego*.

#### **Oznaczanie stężenia CLT metodą RP-HPLC**

Oznaczanie stężenia CLT przeprowadzono za  
pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

w układzie faz odwróconych (ang. *Reversed phase*  
– *High-Performance Liquid Chromatography*,  
*RP-HPLC*) z wykorzystaniem aparatu Shima-  
dzu LC-2050C (Shimadzu U.S.A Manufacturing  
Inc., Canby, USA), wyposażonego w detektor typu  
DAD (ang. *Diode Array Detector*). Zastosowano  
kolumnę chromatograficzną Gemini C18 o wymia-  
rach 150 mm x 4,6 mm, 3 µm. Badanie prowadzono  
w warunkach elucji izokratycznej z użyciem fazy  
ruchomej składającej się z acetonitrylu i 20 mM  
buforu fosforanowego o pH 6,8 w stosunku 60: 40  
(v/v). Prędkość przepływu wynosiła 1,5 mL/min.  
Objętość nastrzyknięcia ustalono na 20 µL. Detek-  
cję CLT prowadzono przy długości fali wynoszącej  
265 nm. Czas retencji wynosił ok. 5 min. W zakre-  
sie stężeń 2–300 µg/mL uzyskano liniowy zakres  
detekcji o współczynniku  $R^2 = 0,999$ .

#### **Analiza statystyczna**

Wszystkie analizy przeprowadzono w 3 pomi-  
arach. Zostały dla nich obliczone odchylenia stan-  
dardowe (SD). Dokonano analizy statystycznej  
wyników za pomocą metody analizy warian-  
cji (ANOVA) dla poziomu ufności 95%. Obliczeń  
dokonano korzystając z wbudowanego narzędzia  
„Analiza danych” w oprogramowaniu Microsoft  
Excel.

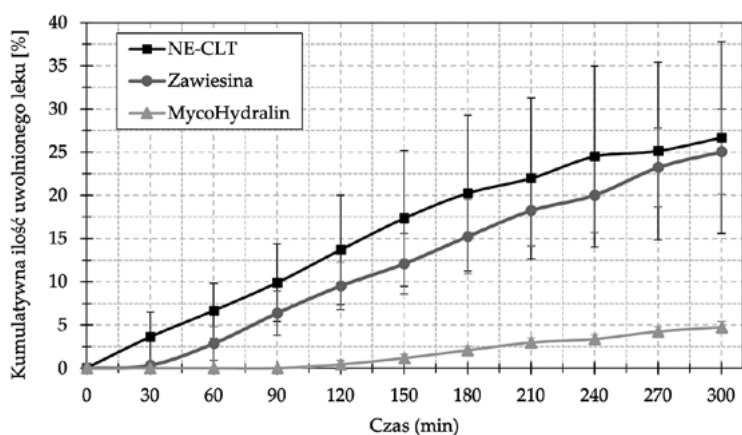
## **Wyniki**

#### **Pomiar średniej wielkości kropli oleju, potencjału zeta i współczynnika polidispersyjności**

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów  
uzyskano średnią wielkość kropli oleju ( $z$ -average)  
wynoszącą  $55,49 \pm 0,44$  nm, współczynnik poli-  
dispersyjności ( $PDI$ ) –  $0,159 \pm 0,009$  oraz poten-  
cjał zeta ( $z$ -potential) wynoszący  $19,70 \pm 1,50$  mV.  
Średnia wartość pH badanej nanoemulsji wynosiła  
 $4,06 \pm 0,05$ , natomiast osmolalność zmierzono na  
poziomie  $852 \pm 17$  mOsm/kg.

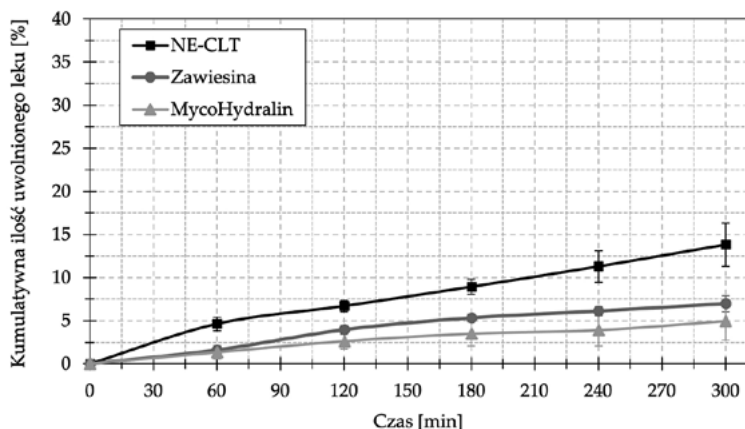
#### **Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego**

Wyniki uzyskanych profili zmiany kumulowa-  
nych ilości wolnej frakcji leku w czasie z postaci  
związanej z formulacją przedstawiono na **ryci-  
nie 1**. Obserwowane profile wskazują na niepełne  
uwolnienie wolnego API z postaci leku. Wyniki  
uzyskane dla NE-CLT i zawiesiny cechowały się  
wysokim odchyleniem standardowym, w prze-  
ciwienństwie do kremu MycoHydralin. Obie for-  
mulacje osiągnęły średnie wartości wolnej frakcji  
CLT na poziomie 22,5–25,0% dawki leku w czasie



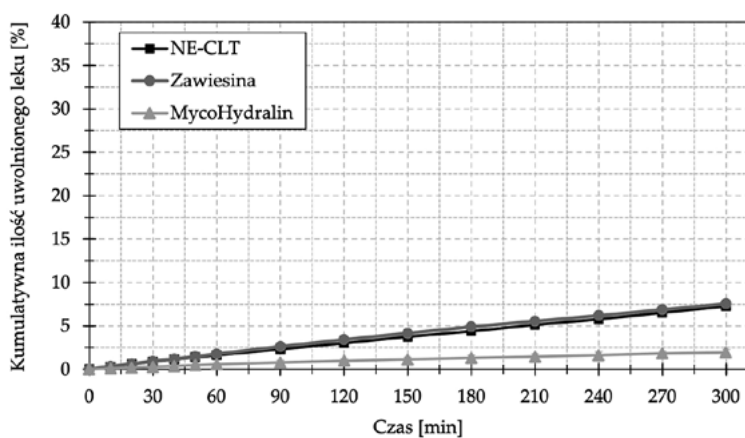
**Rycina 1.** Wyniki zmiany wolnej frakcji CLT w zależności od czasu wyrażone jako kumulatywny procent dawki leku – oznaczenie metodą stacjonarną (n = 3).

**Figure 1.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively – stationary method (n = 3).



**Rycina 2.** Wyniki zmiany wolnej frakcji CLT w zależności od czasu wyrażone jako kumulatywny procent dawki leku – oznaczenie metodą USP III (n = 3).

**Figure 2.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively – USP III method (n = 3).



**Rycina 3.** Wyniki zmiany wolnej frakcji CLT w zależności od czasu wyrażone jako kumulatywny procent dawki leku – oznaczenie metodą przepływową USP IV (n = 3).

**Figure 3.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively – USP IV flow-through method (n = 3).

5 h. Otrzymane profile cechowały się istotnie większymi wartościami w porównaniu z kremem MycoHydralin ( $p < 0,05$ ), dla którego zaobserwowano stężenie wolnej frakcji CLT odpowiadające 5% dawki leku. Między NE-CLT a zawiesiną nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie ( $p = 0,40$ ). Początek wzrostu stężenia wolnej frakcji CLT zaobserwowano dla NE-CLT w 30 min, zawiesiny w 60 min, zaś kremu w 120 min.

### Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – metoda USP III

Wyniki uzyskanych profili zmiany stężenia wolnej frakcji leku w metodzie z wykorzystaniem aparatu USP III, również wskazują na niepełne uwolnienie wolnego API z postaci leku (**rycyna 2**). Zaobserwowano znacząco mniejsze odchylenie standardowe niż w przypadku pilotażowej metody stacjonarnej. W tej metodzie NE-CLT osiągnęła maksymalne stężenie odpowiadające średniemu uwolnieniu około 15% dawki CLT w ciągu 5 h. O połowę mniejszy wynik (średnia około 7,5%) odnotowano w przypadku zawiesiny. Komercyjna formuła MycoHydralin odnotowała podobny wynik jak w pilotażowej metodzie stacjonarnej (średnia około 5%). Między obserwowanymi profilami odnotowano istotne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

### Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – metoda przepływową USP IV

Wyniki profili zmiany stężenia wolnej frakcji leku w czasie, uzyskane w metodzie przepływowej, zostały przedstawione na **rycynie 3**. Dane wskazują na niepełne uwolnienie wolnego API z postaci leku w badanym czasie. Zaobserwowano znacząco mniejsze odchylenie standardowe niż w przypadku pilotażowej metody stacjonarnej. W tej metodzie NE-CLT i zawiesina osiągnęły jednakowe maksymalne stężenie odpowiadające średniemu uwolnieniu około 7,5% dawki CLT w ciągu 5 h. Istotną statystycznie ( $p < 0,05$ ) i trzykrotnie mniejszą ilość uwolnionego leku – około 2,5% dawki, zarejestrowano w przypadku komercyjnej formuły MycoHydralin. Między obserwowanymi profilami NE-CLT i zawiesiny nie odnotowano istotnych statystycznie różnic ( $p = 0,79$ ). Początek wzrostu stężenia wolnej frakcji CLT zaobserwowano dla wszystkich

formulacji w jednakowym czasie (tj. 10 min), aczkolwiek obserwowane stężenia były na bardzo niskim poziomie w przypadku kremu.

### Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – metoda przepływowa z pompą strzykawkową

Wyniki profili zmiany stężenia wolnej frakcji leku w czasie, uzyskane w metodzie przepływowej z zastosowaniem pompy strzykawkowej, zostały przedstawione na **rycynie 4**. Dane również wskazują na niepełne uwolnienie API w badanym czasie. Zaobserwowano niewielkie odchylenie standardowe. W metodzie tej, z najmniejszą objętością medium, tj. 18 mL wewnątrz celki, i przepływie najbardziej zbliżonym do fizjologicznego (2 mL/h), NE-CLT osiągnęła wyższy od obu formułacji referencyjnych stopień wolnej frakcji CLT na poziomie 5% dawki API w ciągu 5 h. Niższe ilości uwolnionej wolnej frakcji leku zaobserwowano dla zawiesiny i kremu MycoHydralin – około 2,5% w czasie 5 h, aczkolwiek różnica okazała się być nieistotna statystycznie ( $p = 0,29$ ). Początek wzrostu stężenia wolnej frakcji CLT zaobserwowano dla wszystkich formułacji w jednakowym czasie, tj. 120 min.

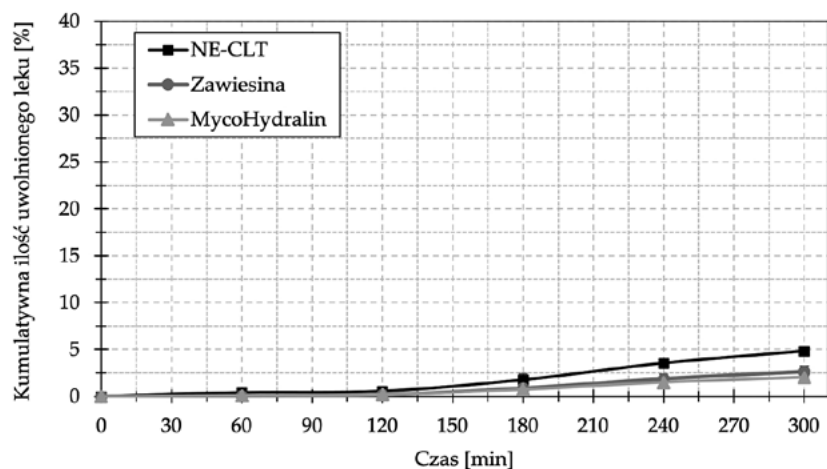
### Dyskusja

Otrzymana nanoemulsja, zawierająca *clotrimazolum* jako substancję czynną, cechuje się wielkością kropli oleju gwarantującą penetrację postaci leku przez warstwy śluzu i wydzieliny pochwowej pokrywających błonę śluzową, jak również wydłużony czas przebywania formułacji w miejscu podania [21–23]. Wysoka homogenność formułacji gwarantuje niewielki rozrzut wyników w badaniach z wykorzystaniem struktur dializacyjnych o ustalonych porach [24]. Zmierzona wartość potencjału z znajduje się w przedziale  $\pm 10$ –20 mV, na podstawie danych literaturowych świadczy to o krótkookresowej stabilności formułacji [25]. Wartość pH mieści się w fizjologicznym zakresie, zaś osmolalność nanoemulsji spełnia wymagania dla dopochwowych formułacji, co świadczy o niskim potencjale drażniącym błonę śluzową pochwy [21, 26].

Stosowane przez badaczy metody badania dostępności substancji czynnej z dopochwowych formułacji na bazie emulsji są nieusystematyzowane i oparte głównie na metodach farmakopealnych wykorzystujących aparaty koszyczkowy i łopatkowy [9, 20].

Dominujące metody farmakopealne znane z doustnych postaci leku mogą być uzasadnione potrzebami porównania technologii na standaryzowanej aparaturze, jednakże nie dają możliwości predykcji właściwości formułacji w warunkach fizjologicznych. Stosowana objętość medium akceptorowego jest 250–500 razy większa od objętości wydzieliny pochwowej. Wynika to również z faktu, że „Farmakopea Europejska” nie precyzuje w monografii *Vaginalia* badań dostępności farmaceutycznej typowych dla tej specyficznej postaci leku [27].

W pierwszej z zastosowanych metod, pilotażowej metodzie stacjonarnej, zredukowano objętość medium akceptorowego do 150-krotności objętości fizjologicznej. Wynika to z faktu konieczności zapewnienia rozpuszczalności dla substancji czynnej *clotrimazolum*. Zrezygnowano z możliwości zastosowania surfaktantów, które mogłyby zwiększyć rozpuszczalność przy jednoczesnej dalszej redukcji objętości medium, z uwagi na ryzyko uszkodzenia błony i wpłynięcia na stabilność nanoemulsji. Zaobserwowano niską precyzję układu. Zwiększona liczba powtórzeń nie spowodowała poprawy precyzji. Otrzymane wyniki nie dostarczają dostatecznie dyskryminujących warunków oceny formułacji, co jest związane ze znacznymi odchyleniami standardowymi (niską powtarzalnością wyników) generującymi relatywne odchylenie standardowe aż do 40%. Jedyna, istotna statystycznie, obserwowana różnica została wykazana dla NE-CLT i zawiesiny w stosunku do komercyjnego produktu referencyjnego. Biorąc pod uwagę rozdzielczość metody, dane pozwalają jedynie na szacunkową ocenę rzędu wolnej



**Rycina 4.** Wyniki zmiany wolnej frakcji CLT w zależności od czasu wyrażone jako kumulatywny procent dawki leku – oznaczenie metodą przepływową z pompą strzykawkową ( $n = 3$ ).

**Rycina 4.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively – flow-through syringe method ( $n = 3$ ).

frakcji substancji czynnej. Wysoka zmienność wyników może być wynikiem stresu mechanicznego, jakiemu poddane zostały worki dializacyjne, powodując mikrouszkodzenia struktury membrany. Źródłem stresu mechanicznego jest ciśnienie osmotyczne, które powodowało napływ medium do formułacji, jak również obracające się mieszadło magnetyczne, które mogło w sytuacji losowego kontaktu z membraną wywierać nacisk.

Połączenie metody stacjonarnej i jednocześnie dalsze zredukowanie objętości do 100-krotności objętości fizjologicznej uzyskano w wyniku wykorzystania aparatu z ruchomym cylindrem, znanym jako aparat typu III według USP. Zaobserwowano zdecydowanie większą precyzję pomiarów niż w przypadku pilotażowej metody. Uzyskano istotnie statystycznie różnice między badanymi formułacjami. Formułacja NE-CLT wykazała większą ilość wolnej frakcji leku uwolnionej w czasie w stosunku do zawiesiny i kremu. Jednak, w porównaniu do metody stacjonarnej z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego zaobserwowano niższe o około 1/3 wartości w przypadku NE-CLT i zawiesiny. Koresponduje to ze zmniejszeniem objętości medium akceptorowego o 1/3. Należy podkreślić, że nie bez znaczenia jest też inny mechanizm mieszania medium akceptorowego, które wywołane było ruchem posuwistym cylindra z umieszczoną wewnątrz formułacją. W metodzie tej wyeliminowano wpływ stresu mechanicznego związanego z kontaktem mieszadła magnetycznego z membraną. Powyższe czynniki nie pozostają bez wpływu na poziom wolnej frakcji API. Wynik dla formułacji MycoHydralin obserwowany był na podobnym poziomie, co wskazuje na mniej dynamiczny proces dyfuzji CLT przez membranę.

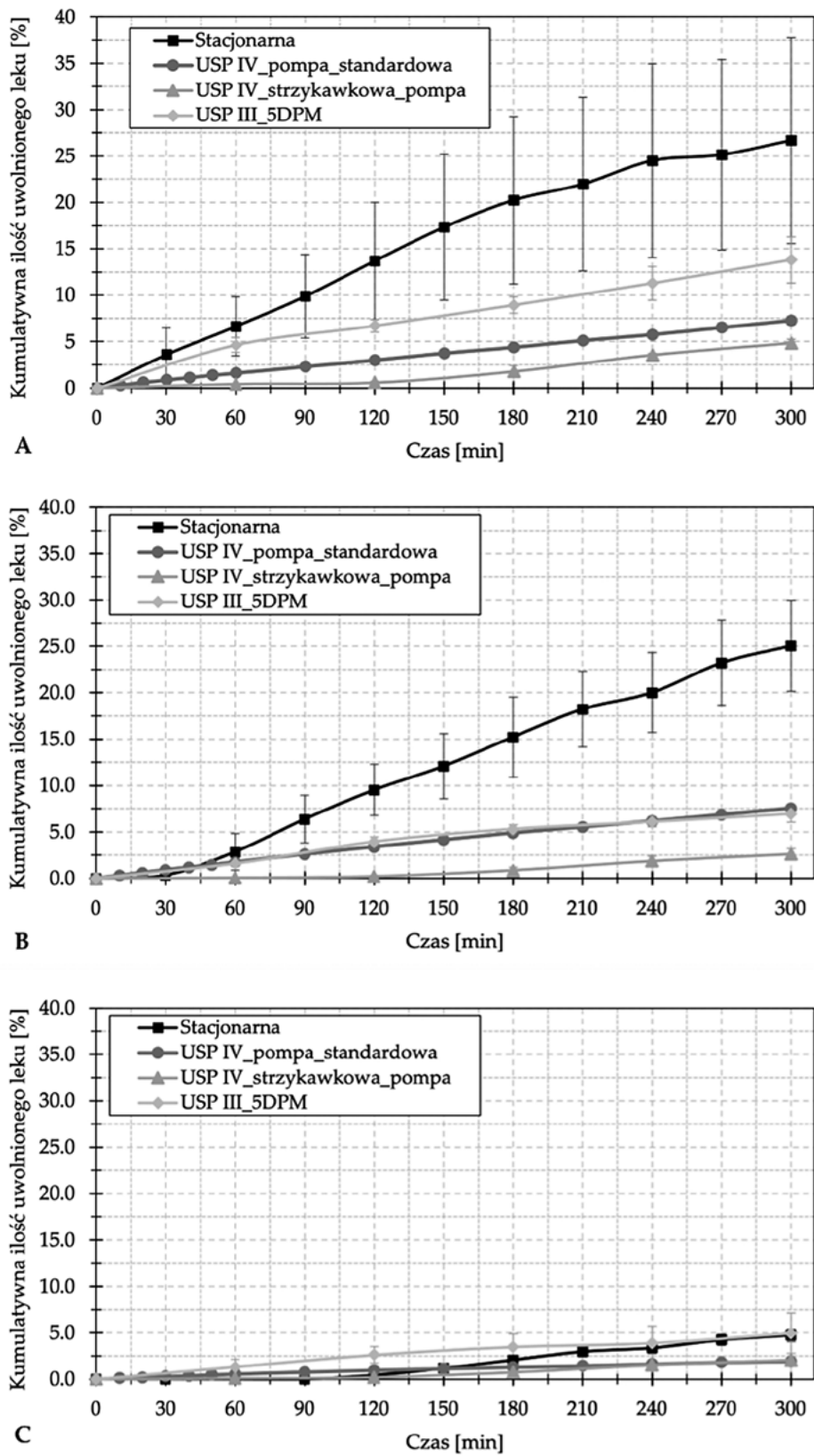
W celu zweryfikowania wpływu medium jako czynnika ograniczającego uzyskiwane stężenia przeprowadzono badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT w funkcji czasu metodą przepływową. W tej metodzie sumaryczna objętość medium dla każdej próbki wynosiła 600 mL, co stanowi 300-krotność warunków fizjologicznych. Pomimo zapewniania stałego dopływu nienasyconego API medium akceptorowego, uzyskano mniejsze stężenia wolnej frakcji CLT dla wszystkich 3 analizowanych formułacji. Wartości obserwowane dla zawiesiny i NE-CLT były jednakowe i wynosiły 7,5% dawki leku w ciągu 5 h. W przypadku NE-CLT kluczowe znaczenie mogą mieć surfaktanty, które w stacjonarnej metodzie zapewniają większą rozpuszczalność API w medium akceptorowym. Surfaktanty obecne w formułacji ułatwiają dyfuzję *clotrimazolum* do

buforu fosforanowego. W metodzie przepływowej surfaktanty te są stale wymywane przez napływające świeże medium akceptorowe, co spowalnia proces dyfuzji substancji czynnej przez membranę i ogranicza jej rozpuszczalność. Wskutek powyższych czynników, obserwowana kumulatywna ilość wolnej frakcji *clotrimazolum* obserwowana dla NE-CLT i zawiesiny w metodzie przepływowej z wykorzystaniem USP IV jest podobna oraz zależna od charakteru substancji i właściwości membrany wpływających na proces dyfuzji. Dla zawiesiny zaobserwowano jednakowe profile uwalniania jak w przypadku metody USP III, pomimo 3-krotnie większej sumarycznej objętości medium. Wskazuje to na fakt, że długość czasu kontaktu błony półprzepuszczalnej z medium ma kluczowe znaczenie dla procesu przechodzenia wolnej frakcji CLT do medium akceptorowego.

Mając na uwadze powyższe wyniki zaprojektowano eksperyment uwzględniający cechy metod stacjonarnych i przepływowych, tj. długi kontakt medium akceptorowego z błoną, powolny przepływ medium, niewielka objętość symulująca warunki fizjologiczne. W tym celu pompę tłokową w metodzie przepływowej zastąpiono pompą strzykawkową, która jest w stanie zasymulować przepływ na poziomie 2 mL/h. Wartość przepływu została ustalona na takim poziomie, aby zapewnić możliwość poboru próbek na wyjściu z celki pomiarowej, ponieważ jej konstrukcja uniemożliwia pobór bez otwierania obudowy. Sumaryczna objętość medium była 14-krotnie większa od fizjologicznej, co znalazło znaczące odzwierciedlenie w obserwowanej ilości wolnej frakcji CLT, która maksymalnie osiągnęła 5% dawki w ciągu 5 h w przypadku NE-CLT. Stanowi to 2-krotność ilości obserwowanych w przypadku zawiesiny i kremu. Potwierdza to pozytywny wpływ formułacji opartych na nanoemulsji, która w małych objętościach jest w stanie uzyskać wyższe stężenie od zawiesiny. Jednak, analiza statystyczna wskazuje, że obserwowane różnice nie mają znaczenia statystycznego. W tym wypadku należy wydłużyć czas trwania eksperymentu lub zwiększyć częstotliwość próbkowania (kosztem większego przepływu), gdyż w początkowym etapie nie obserwowano znacznych różnic pomiędzy stężeniami. Nie bez znaczenia w tej metodzie jest również długość odcinka przewodu doprowadzającego medium akceptorowe do kolektora frakcji, która powinna być jak najkrótsza, aby nie obserwować zaniżonych wyników wynikających z opóźnienia medium zatrzymanego w przewodzie.

Dla lepszego porównania metod, na **rycynie 5** przedstawiono porównanie uzyskanej ilości wolnej frakcji CLT w zależności od zastosowanej





**Rycina 5.** Wyniki zmiany w czasie wolnej frakcji CLT w zależności od zastosowanej metody wyrażone jako kumulacyjny procent dawki leku. A – NE-CLT, B – zawiesina, C – krem MycoHydralin.

**Figure 5.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively depending of the used method. A – NE-CLT, B – suspension, C – MycoHydralin cream.

metody dla każdej z badanych formułacji. Dla NE-CLT różnice pomiędzy zastosowanymi metodami są wyraźnie widoczne i istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Świadczy to o fakcie, że dobór metody badawczej w przypadku nanoemulsji ma kluczowe znaczenie. Mniej wyraźne różnice zaobserwowano dla zawiesiny, gdzie wyniki dla metody stacjonarnej USP III pokrywały się z metodą przepływową USP IV, jednak analiza wszystkich profili potwierdza istotne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ). Dla kremu MycoHydralin obserwowano najmniejsze różnice, jednak wciąż istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) pomiędzy obserwowanymi profilami, szczególnie w przypadku obu metod przepływowych. Ważnym kryterium limitującym możliwości analizy kremu jest fakt zastosowania błony półprzepuszczalnej, jak również jego konsystencji, które ograniczają możliwość równomiernego wnikiwania medium akceptorowego w całej objętości próbki. Niemniej, zastosowanie jednakowej metody badawczej umożliwia porównanie tych formułacji.

### Wnioski

Zastosowana metoda badania zmiany stężenia wolnej frakcji leku w medium akceptorowym w funkcji czasu ma znaczący wpływ na uzyskane profile. W metodach stacjonarnych, dla nanoemulsji obserwowano wyższe stężenia wolnego leku niż w przypadku metod przepływowych, dodatkowo pomiary wykonane z wykorzystaniem aparatu o posuwistym ruchu cylindra (USP III) cechowały się znacznie wyższą precyzją pomiarową w stosunku do metody pilotażowej. Metody przepływowe w układzie otwartym zapewniły mniejszy stopień uwolnienia wolnej frakcji CLT, co wskazuje na istotę czasu kontaktu medium z badaną formułacją. Opracowana metoda przepływowa z wykorzystaniem pompy strzykawkowej zapewniła warunki najbliższe do fizjologicznych, jednak z uwagi na niskie stężenia leku dalsza analiza efektów jest niemożliwa. Najbardziej dyskryminujące warunki zapewniła metoda stacjonarna z wykorzystaniem aparatu typu USP III (Bio-Dis). Ponadto, metoda jest możliwa do zastosowania w przemyśle z uwagi na wykorzystanie standaryzowanej aparatury.

### Piśmiennictwo

- Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, et al. Why Consider Vaginal Drug Administration? *Fertil Steril*. 2004; 82: 1–12. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.01.025.
- Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J. New Strategies for Local Treatment of Vaginal Infections. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 92: 105–122. doi:10.1016/j.addr.2015.06.008.
- De Araújo Pereira RR, Bruschi ML. Vaginal Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2012; 38: 643–652. doi:10.3109/03639045.2011.623355.
- Major I, McConville C. Vaginal Drug Delivery for the Localised Treatment of Cervical Cancer. *Drug Deliv Transl Res*. 2017; 7: 817–828. doi:10.1007/s13346-017-0395-2.
- Machado RM, Palmeira-de-Oliveira A, Gaspar C, et al. Studies and Methodologies on Vaginal Drug Permeation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 92: 14–26. doi:10.1016/j.addr.2015.02.003.
- Srikrishna S, Cardozo L. The Vagina as a Route for Drug Delivery: A Review. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2013; 24: 537–543. doi:10.1007/s00192-012-2009-3.
- Valea FA. Reproductive Anatomy Gross and Microscopic, Clinical Correlations. W: *Comprehensive Gynecology*; Lobo RA, Gershenson DM, Lentz GM, Valea FA, Eds.; Elsevier: Philadelphia. 2017; pp. 48–77. ISBN 978-0-323-32287-4.
- D'Amati G, di Gioia CR, Proietti Pannunzi L, et al. Functional Anatomy of the Human Vagina. *J Endocrinol Invest*. 2003; 26: 92–96.
- Smoleński M, Karolewicz B, Gołkowska AM, et al. Emulsion-Based Multicompartment Vaginal Drug Carriers: From Nanoemulsions to Nanoemulgels. *Int J Mol Sci*. 2021; 22. doi:10.3390/ijms22126455.
- Tietz K, Klein S. In Vitro Methods for Evaluating Drug Release of Vaginal Ring Formulations: A Critical Review. *Pharmaceutics* 2019; 11. doi:10.3390/pharmaceutics11100538.
- Boyd P, Variano B, Spence P, et al. In Vitro Release Testing Methods for Drug-Releasing Vaginal Rings. *Journal of Controlled Release* 2019; 313: 54–69. doi:10.1016/j.jconrel.2019.10.015.
- Jug M, Hafner A, Lovrić J, et al. An Overview of in Vitro Dissolution/Release Methods for Novel Mucosal Drug Delivery Systems. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; 147: 350–366. doi:10.1016/j.jpba.2017.06.072.
- Jug M, Hafner A, Lovrić J, et al. In Vitro Dissolution/Release Methods for Mucosal Delivery Systems. *ADMET DMPK*. 2017; 5: 173–182. doi:10.5599/admet.5.3.425.
- Kale V, Trivedi R, Muley P. Proposed Design of a Dissolution Apparatus for Vaginal Formulations Containing Probiotics. *Dissolut Technol*. 2008; 15: 27–29. doi:10.14227/DT150208P27.
- Setnikar I, Fantelli S. Liquefaction Time of Rectal Suppositories. *J Pharm Sci*. 1962; 51: 566–571. doi:10.1002/jps.2600510616.
- Kaur A, Saxena Y, Bansal R, et al. Intravaginal Delivery of Polyphenon 60 and Curcumin Nanoemulsion Gel. *AAPS PharmSciTech*. 2017; 18: 2188–2202. doi:10.1208/s12249-016-0652-6.
- Atinderpal K, Kapoor N, Gupta S, et al. Development and Characterization of Green Tea Catechins and Ciprofloxacin-Loaded Nanoemulsion for Intravaginal Delivery to Treat Urinary Tract Infection. *Indian J Pharm Sci*. 2018; 80: 442–452. doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000377.
- Maholepsza-Jarmołowska K, Smoleński M. Pharmaceutical Composition in the Form of Vegetable Oil-Based Nanoemulsion, Multiphase Composition and Method of Preparation of These Compositions 2022, PCT/PL2022/000039.
- <711> Dissolution Test USP 28, 2nd Supplement, Official 1 August 2005;
- 2.9.3 (01/2016:20903). In *Farmakopea Polska XII*; 2020.
- Neves J. das, Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, et al. Vaginal Mucosa and Drug Delivery. W: *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*; Khutoryanskiy V V, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, United Kingdom. 2014; 9781119941: 99–132. ISBN 9781118794203.
- Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, et al. Rapid Transport of Large Polymeric Nanoparticles in Fresh Undiluted Human Mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104: 1482–1487. doi:10.1073/pnas.0608611104.
- Wang Y-Y, Lai SK, Suk JS, et al. Addressing the PEG Mucoadhesivity Paradox to Engineer Nanoparticles That “Slip” through the Human Mucus Barrier. *Angewandte Chemie International Edition* 2008; 47: 9726–9729. doi:10.1002/anie.200803526.
- Danaei M, Dehghankhold M, Atefi S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018; 10: 1–17. doi:10.3390/pharmaceutics10020057.
- Bhattacharjee S. DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *Journal of Controlled Release* 2016; 235: 337–351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- WHO/UNFPA/FHI *Advisory Note Use and Procurement of Additional Lubricants for Male and Female Condoms: WHO / UNFPA / FHI360 Advisory Note*; 2011.
- Ph. Eur. 10.0, 1164 (01/2008)*.