Opracowanie technologii wytwarzania oraz ocena jakościowa aerozolu z chlorowodorkiem lidokainy z wykorzystaniem alginianu sodu

Marta Czapiewska¹, Piotr Bilski¹

¹Katedra Technologii Postaci Leku, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska

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

Adres do korespondencji

Marta Czapiewska, Katedra Technologii Postaci Leku, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, Polska; e-mail: marta.czapiewska@cm.umk.pl

Źródła finansowania

Nie wskazano źródeł finansowania.

Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2021.06.06

Zaakceptowano: 2021.08.24

Opublikowano on-line: 2021.08.28

DOI

10.32383/farmpol/141575

ORCID

Marta Czapiewska (ORCID id: 0000-0002-1695-6512)

Piotr Bilski (ORCID id: 0000-0002-6375-805X)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC

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

Development and qualitative assessment of medicinal aerosol with lidocaine hydrochloride based on sodium alginate

Medicinal aerosols for external use are a less popular form of the drug than aerosols for internal use, i.e., inhalation aerosols. Most common are dermal and nasal aerosols. If the aerosol is used on damaged skin, it must be sterile. Aerosols intended for use on damaged epidermis form a bandage after spraying, protecting the wound from external contamination.

The use of natural polymers such as alginates is also widespread in the treatment of wounds and burns. Alginates gel creates hydrogels with a high degree of hydration. This process happens by adding electrolytes. A moist environment promotes proper wound healing processes. What is more, bandages reduce the risk of wound infection.

The aim of this work was to develop the composition and technology of manufacture for an aerosol gel based on the natural polymer such as sodium alginate. The active ingredient used as a topical anesthetic in the formulations was lidocaine hydrochloride in 1% concentration. It is characterized by a local anesthetic effect and is used in creams, ointments, and gels commercially available in pharmacies. After the aerosol is sprayed on the surface, the gel covers it evenly and does not need to be spread. The form of a gel gives a feeling of cooling to the burned area, and lidocaine hydrochloride is designed to anesthetize it additionally.

Rheological evaluation of the obtained gels was a performer. Effects of the addition of the active substance and excipients on the viscosity of the formulations were investigated. The efficacy of antimicrobial preservation was assessed to select the preservative. In addition, the amount of propellant and a suitable valve and spray atomizer were also chosen for each aerosol to reduce the foaming effect.

Quantitative determination of the active substance present in the aerosol composition was performed using high-performance liquid

chromatography (HPLC) with isocratic elution. The method used was validated for specificity, accuracy, precision, and linearity. Based on the calibration curve, limits of detection and quantification (LOD and LOQ) for lidocaine hydrochloride were also calculated.

The optimal concentration of sodium alginate in the developed gel is 0.6%, which was confirmed by the viscosity test results. The preservative was bronopol in concentration 0.01%. Isopropanol and colloidal silica were included in the formulation to reduce the foam created after the aerosol was sprayed on the substrate. The amount of propellant in relation to the amount of the gel was around 10:90 (m/m).

Keywords: aerosols, lidocaine hydrochloride, sodium alginate, gels.

© Farm Pol, 2021, 77 (6): 339–348

Wstęp

Polimery są szeroko wykorzystywane w farmacji i technologii postaci leku od długiego czasu. Polimer definiowany jest jako substancja o dużej masie cząsteczkowej, w skład której wchodzi sekwencje powtarzającego się atomu lub grupy atomów, które połączone są zwykle wiązaniami kowalencyjnymi i mają postać liniowych łańcuchów lub struktur rozgałęzionych. Wyróżnia się homopolimery i kopolimery. Homopolimery zawierają jeden powtarzający się fragment strukturalny (monomer), natomiast kopolimery składają się z więcej niż jednego monomeru [1].

W technologii hydrożeli wykorzystywane są polimery rozpuszczalne w wodzie. Zwykle wykazują one zdolność do absorpcji wody bądź płynów biologicznych, co jest pożądaną cechą zwłaszcza dla tych hydrożeli, które mają być wykorzystane w terapii ran czy oparzeń jako opatrunki hydrożelowe. Niektóre z nich wykazują dużą wrażliwość na bodźce środowiska takie jak: temperatura, elektrolity, pH czy światło. Wrażliwość tę warunkuje zwykle obecność określonych grup funkcyjnych w strukturze polimeru [2].

Przykładem polimerów wrażliwych na obecność elektrolitów są alginiany, czyli związku anionowe, zbudowane z łańcuchów nierozgałęzionych, złożonych z bloków reszt kwasów D-mannuronowego (M) oraz L-guluronowego (G) i połączonych wiązaniami glikozydowymi [3]. Najpopularniejszym sposobem sieciowania alginianów jest wykorzystanie wielowartościowych kationów, takich jak np. Ca^{2+} , Ba^{2+} czy Fe^{3+} . Mechanizm tego procesu polega na wymianie jonów sodu na jony wielowartościowe (najczęściej jony wapnia), co prowadzi do powstania charakterystycznych struktur, tzw. egg box, w których strefy węzłowe powstają dzięki utworzeniu wiązań jonowych między kationami

Ca^{2+} a resztami kwasu guluronowego. Cechy hydrożeli powstałych z udziałem alginianów powiązane są z typem i gęstością usieciowania, ciężarem cząsteczkowym oraz składem alginianów (uzależnionym od zawartości procentowej i ułożenia w łańcuchu polimeru reszt kwasowych G i M) [4]. Istnieje kilka sposobów prowadzących do uzyskania żelu z zastosowaniem wielowartościowych kationów. Jedną z nich jest metoda z wykorzystaniem tzw. żelowania wewnętrznego, inaczej zwanego żelowaniem in situ. Do procesu używa się nierozpuszczalnej w wodzie soli wapniowej, np. $CaCO_3$, która zostaje rozproszona w roztworze alginianu. Ważnym krokiem jest etap kontrolowanego uwalniania jonów wapnia z soli wapniowej. Uzyskuje się je dzięki obniżeniu pH powstałej zawiesiny poprzez dodatek kwasów lub zwiększenie rozpuszczalności soli wapniowej, co skutkuje stopniowym sieciowaniem alginianu i utworzeniem homogennej żelu [5].

Zalety alginianów to biokompatybilność, mała toksyczność i niewielki koszt pozyskiwania. Hydrożele powstałe z ich udziałem mają duże podobieństwo strukturalne do zewnątrzkomórkowej macierzy żywych tkanek, dzięki czemu znajdują zastosowanie w leczeniu ran, tworząc wilgotne środowisko przyspieszające proces ich gojenia. W literaturze opisano wiele przykładów wykorzystania alginianów, m.in. jako składnika przeciwdrobnoustrojowego hydrożelu z nanocząsteczkami srebra [6], żelu z diklofenakiem sodu o przedłużonym uwalnianiu [7] oraz żelu, w którym zamiast jonów wapniowych wykorzystano chitozan, celem usieciowania alginianu sodu [8].

Aerozole stanowią rozproszone cząstki ciała stałego lub cieczy zawieszone w ośrodku gazowym, którym jest powietrze lub mieszanina powietrza z propelentem, tzw. gazem wytłaczającym. W celu wydostania wsadu z pojemnika aerozolu stosowane są mechaniczne pompki, nebulizatory lub ciśnienie gazu wytłaczającego [9, 10]. Aerozole można podzielić na te do użytku zewnętrznego i wewnętrznego. Aerozole do użytku zewnętrznego, czyli aerozole natryskowe, stosowane są na skórę i powierzchnię błon śluzowych, donosowo i podjęzykowo [9]. Inny podział aeroli dotyczy tych, w których środkiem wytłaczającym jest skroplony gaz. Można je podzielić na dwufazowe i trójfazowe, inaczej homogenne i heterogenne. Układ dwufazowy dotyczy aeroli, w których wsad miesza się z fazą ciekłą gazu wytłaczającego lub tworzy z nim emulsję bądź zawiesinę. Propelent występuje tutaj zarówno w fazie gazowej, jak i ciekłej. Układ homogeny spotykany jest często w aerozolach wziewnych lub donosowych. W układzie trójfazowym roztwór substancji czynnej nie miesza się ze skroplonym propelentem.

Zadanie propolentu to wytworzenie odpowiedniego ciśnienia, które po otwarciu zaworu spowoduje wydostanie się odpowiedniej ilości wsadu na zewnątrz opakowania z odpowiednią szybkością, co z kolei przekłada się na charakterystykę wypływu preparatu, odpowiednią dla danego typu produktu [11, 12].

Aerozol natryskowy w formie żelu z substancją miejscowo znieczulającą, stosowany na nieuszkodzoną skórę, wydaje się być przyjazną dla pacjenta postacią leku. Żel ma działanie chłodzące na skórę, a dodatek chlorowodoru lidokainy ma za zadanie ją dodatkowo znieczulać. Aplikacja takiej postaci leku jest bezbolesna, gdyż nie wymaga jego rozsmarowania, a żel może być rozprowadzony w postaci cienkiej warstwy na określonej powierzchni ciała. Dodatkowe zalety aerozolu to: wygoda i prostota użycia, estetyka oraz zabezpieczenie wsadu przed możliwością wtórnego skażenia mikrobiologicznego (kontaminacją).

Cel badań

Celem badań było opracowanie składu i technologii wytwarzania oraz ocena jakościowa żelu w aerozolu z substancją miejscowo znieczulającą – chlorowodorkiem lidokainy. Żel sporządzony był z wykorzystaniem naturalnego polimeru, jakim jest alginian sodu. Celem sprawdzenia, czy wybrany konserwant (bronopol) chroni produkt przed rozwojem w nim drobnoustrojów i zastosowany jest w odpowiednim stężeniu w formułacji, wykonano testy skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej. Badania sporządzonego żelu obejmowały ocenę reologiczną z uwzględnieniem wpływu stężenia polimeru i obecności substancji czynnej na lepkość formułacji. Sprawdzono również wpływ substancji pomocniczych – izopropanolu, krzemionki koloidalnej i propolenta, zastosowanych w określonych stężeniach na redukcję piany, jak również wpływ doboru średnicy zaworu i rozpylacza aerozolu na redukcję piany. Opracowano i zwalidowano metodę ilościowego oznaczania substancji czynnej obecnej w składzie aerozoli, z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC).

Materiały i metodologia

Modelową substancję czynną stanowił chlorowodorek lidokainy (Fagron, Pharma Cosmetic). Substancje pomocnicze wykorzystane do produkcji żelu to alginian sodu (Manucol, FMC Corporation), węglan wapnia (COEL), krzemionka koloidalna (Aerosil 200, Evonik), 1,2-propanodiol (POCH), izopropanol (POCH), kwas cytrynowy jednowodny

(POCH). W celu ochrony przeciwdrobnoustrojowej wykorzystano 2-bromo-2-nitro-1,3-propandiol (bronopol) (Sigma Aldrich). Wodę dejonizowaną otrzymano wykorzystując urządzenie System Synergy®UV (Millipore Corporation).

Analizę chromatograficzną przeprowadzono za pomocą metody HPLC. Do oznaczeń wykorzystano chromatograf cieczowy wyposażony w detektor z diodą UV (Shimadzu Corporation). Zastosowano kolumnę (RP18) o parametrach 4,6 mm x 250 mm (GraceSmart RP-18, Alltech). Odczynniki użyte do HPLC to acetonitryl (Sigma Aldrich), wodorofosforan sodu bezwodny (CHEMPUR), diwodorofosforan potasu (Sigma Aldrich) oraz trietanoloamina (POCH). Badania reologiczne przeprowadzono z użyciem reometru Rheotest RN4 z termostatem (Medingen GmbH).

W pracy badano również wpływ rozpylacza aerozolu na redukcję piany. W tym celu wykorzystano rozpylacze aerozolu, takie jak: VP1.1-100/P1-100, VV1-50/V2-30, VV1-35/V1-38 (KOH-I-NOOR). Wykorzystane zostały zawory typu żeńskiego AV01 (KOH-I-NOOR).

Skład i technologia sporządzania aerozolu trójfazowego z chlorowodorkiem lidokainy

Modelową substancją czynną był chlorowodorek lidokainy. Należy on do leków miejscowo znieczulających i zwykle stosowany jest w stężeniach 1–3% w postaci roztworu stosowanego zewnętrźnie oraz 1–4% w postaci aerozolu na błony śluzowe. W badanym aerozolu zastosowano stężenie substancji czynnej wynoszące 1%.

Alginiany żelują dzięki dodatkowi elektrolitów. W badaniach wykorzystano jony wapniowe, ze względu na ich obojętność fizjologiczną. Żelowanie przeprowadzono metodą sieciowania *in situ*. Stężenie jonów dobrano eksperymentalnie, wykonując zawiesiny ze wzrastającą ilością węglanu wapnia (próby przeprowadzono dla zawiesin, w których stężenie CaCO₃ wynosiło od 0,15% do 0,45%). Wolne jony wapniowe uzyskano poprzez uwolnienie ich z soli wapniowej za pomocą 5% roztworu kwasu cytrynowego. Roztwór zobojętniano do pH równego 7 (początkowe pH to 8–9). Dalszy spadek pH do wartości 3–4 powodował już niepożądany spadek lepkości żelu. Początkowe próby wykazały, że najlepsze efekty osiągnięto wówczas, gdy stężenie CaCO₃ w zawiesinie wynosiło około 0,35%.

Glikol propylenowy pełni funkcję substancji utrzymującej wilgoć oraz kosolwenta. W żelu zastosowany został w stężeniu 5%. Stężenie substancji pomocniczej dobrano na podstawie danych literaturowych [13].

Tabela 1. Skład wsadu (żelu).

Table 1. Composition of the gel.

Składnik	Masa [g]
Alginian sodu	0,6
Chlorowodorek lidokainy	1,0
Węglan wapnia	0,1
Glikol propylenowy	5,0
Izopropanol	15
Bronopol	0,01
Krzemionka koloidalna	0,5
Kwas cytrynowy (5%)	q.s.
Woda	ad 100

Skład wsadu w aerozolu przedstawiono w tabeli 1. Pierwszym krokiem było przygotowanie zawiesiny węglanu wapnia. W tym celu odważono 0,67 g węglanu wapnia i przeniesiono do zlewki z 200 g wody. Całość umieszczono na mieszadle magnetycznym. Do drugiej zlewki wprowadzono około 45 g wody. Następnie odważono 0,01 g bronopolu i 1,0 g chlorowodoru lidokainy. Bronopol przeniesiono do drugiej zlewki z wodą i mieszano do rozpuszczenia. Odważony chlorowodorek lidokainy także przeniesiono do wytarowanej zlewki z wodą i bronopolem i mieszano aż do rozpuszczenia. W kolejnym kroku odważono 0,6 g alginianu sodu i przeniesiono do zlewki,

umieszczonej na mieszadle magnetycznym, zawierającej zawiesinę węglanu wapnia i mieszano przez około godzinę aż do całkowitego rozpuszczenia się polimeru. W kolejnym kroku odważono 30 g zawiesiny węglanu wapnia, którą pobierano pipetą. Podczas pobierania, zawiesina cały czas była mieszana. Zawiesinę połączono z zawartością drugiej zlewki. Do zlewki wprowadzono porcjami 5 g glikolu propylenowego i 0,5 g krzemionki koloidalnej, mieszając zawartość na mieszadle magnetycznym do połączenia się składników, po czym wprowadzono kroplami 15 g izopropanolu, stale mieszając. Do zlewki dodawano powoli roztwór 5% kwasu cytrynowego, całość mieszano na niskich obrotach (300–400 obr./min) na mieszadle mechanicznym, mierząc pH. Roztwór dodawano do czasu, aż pH mieszaniny wynosiło 7. Następnie uzupełniono straty wodą do masy 100 g i ponownie całość mieszano.

Przygotowany wsad przeniesiono do szklanej butelki aerozolowej, założono zawór wraz z rurką zgłębną i wprowadzono gaz wytłaczający. Całość kilkakrotnie wstrząsano i pozostawiono na noc do ustalenia się stanu równowagi.

Test skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej

Wykonanie testu skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej, zwanego również testem konserwacji, miało na celu sprawdzenie czy wybrany konserwant w określonym stężeniu spełnia swoją funkcję w produkcie, chroniąc go przed wzrostem drobnoustrojów.

Badanie polegało na wymieszaniu wsadu aerozolowego z określonym, wcześniej przygotowanym, inokulum odpowiednich drobnoustrojów. Zaszczepiony preparat pozostawiono na 7 dni w odpowiedniej temperaturze (wynoszącej odpowiednio 25°C dla grzybów i 32°C dla bakterii), a następnie oceniano, czy następuje spadek liczby drobnoustrojów lub czy nie dochodzi do wzrostu liczby drobnoustrojów. Wyniki badań w dniach drugim i siódmym od zaszczepienia preparatu przedstawiono na rycinach 1 i 2.

Rycina 1. Zdjęcia płytek mikrobiologicznych wsadu z alginianem sodu i bronopolem w stężeniu 0,01% – posiew dzień drugi, gdzie: a – badanie na podłożu ogólnego zastosowania TSA (Tryptic Soy Agar) dla *Candida albicans*; b – badanie na podłożu SAB (Agar Sabouraud) wybiórczo-różnicującym z chloramfenikolem dla *Candida*; c – badanie na podłożu ogólnego zastosowania TSA dla *Pseudomonas aeruginosa*; d – badanie na podłożu PYA (podłoże wybiórczo-różnicujące z cetrymidem) dla *Pseudomonas*; e – badanie na podłożu ogólnego zastosowania TSA dla *Staphylococcus aureus*; f – badanie na podłożu CH (podłoże Chapmana) wybiórczo-różnicującym dla *Staphylococcus*.

Figure 1. Pictures of agar plates of gels with sodium alginate and bronopol with a concentration of 0.01% – inoculation day two, where: a – test on TSA (Tryptic Soy Agar) for *Candida albicans*; b – test on SAB (Sabouraud Agar) differentiating with chloramphenicol for *Candida*; c – TSA test for *Pseudomonas aeruginosa*; d – PYA test (selective-differentiating medium with cetrymide) for *Pseudomonas*; e – TSA test for *Staphylococcus aureus*; f – test on CH medium (Chapman medium) selective-differentiating for *Staphylococcus*.

Rycina 2. Zdjęcia płytek mikrobiologicznych wsadu z alginianem sodu i bronopolem w stężeniu 0,01% – posiew dzień siódmy, gdzie: b – badanie na podłożu SAB, wybiórczo-różnicującym z chloramfenikolem dla *Candida*; c – badanie na podłożu ogólnego zastosowania TSA dla *Pseudomonas aeruginosa*; d – badanie na podłożu PYA, wybiórczo-różnicującym z cetrymidem dla *Pseudomonas*; e – badanie na podłożu ogólnego zastosowania TSA dla *Staphylococcus aureus*; f – badanie na podłożu CH, wybiórczo-różnicującym dla *Staphylococcus*.

Figure 2. Pictures of agar plates of gels with sodium alginate and bronopol with a concentration of 0.01% – inoculation day seven, where: b – test on SAB differentiating with chloramphenicol for *Candida*; c – TSA test for *Pseudomonas aeruginosa*; d – PYA test for *Pseudomonas*; e – TSA test for *Staphylococcus aureus*; f – test on CH medium selective-differentiating for *Staphylococcus*.

Badania reologiczne

Badanie reologiczne przeprowadzono z użyciem reometru Rheotest RN4 z termostatem. Pomiary lepkości przeprowadzono przy kontrolowanej, wzrastającej szybkości ścinania 0–200 [1/s] w czasie 120 sekund (CR test Ramp). Z uwagi na małą lepkość ocenianego wsadu, zdecydowano się na wykorzystanie układu cylinder-cylinder. Masa badanej próbki wynosiła 20 g.

Najpierw zbadano wpływ dodatku różnych stężeń polimeru na lepkość żelu. W tym celu sporządzono trzy żele placebo o trzech różnych stężeniach alginianu sodu (stężenia węglanu wapnia dobrano proporcjonalnie do stężeń polimeru). Składy wsadów placebo w zakresie stężeń od 0,5% do 0,7% alginianu sodu przedstawiono w tabeli 2. Wyniki badań lepkości przedstawiono w tabeli 3. Krzywą lepkości żelu o docelowym stężeniu polimeru wynoszącym 0,6% przedstawiono na rycinie 3.

Zbadano również wpływ substancji czynnej na lepkość formułacji. Sporządzono żele z chlorowodorkiem lidokainy i z alginianem sodu

Tabela 2. Składy wsadów placebo.

Table 2. Compositions of placebo.

	Składniki	Masa [g]
1	Alginian sodu	0,5
	Węglan wapnia	0,08
	Glikol propylenowy	5,0
	Izopropanol	15,0
	Kwas cytrynowy 5%	q.s.
	Woda	ad 100
2	Alginian sodu	0,6
	Węglan wapnia	0,1
	Glikol propylenowy	5,0
	Izopropanol	15,0
	Kwas cytrynowy 5%	q.s.
	Woda	ad 100
3	Alginian sodu	0,7
	Węglan wapnia	0,12
	Glikol propylenowy	5,0
	Izopropanol	15,0
	Kwas cytrynowy 5%	q.s.
	Woda	ad 100

Tabela 3. Wyniki badań lepkości wsadów placebo.

Table 3. Placebo viscosity test results.

Stężenie alginianu sodu [%]		Lepkość [mPa · s]	Średnia z trzech pomiarów [mPa · s]	Odchylenie standardowe
0,5	Próba 1	340	336	3,21
	Próba 2	335		
	Próba 3	334		
0,6	Próba 1	421	421	0
	Próba 2	421		
	Próba 3	421		
0,7	Próba 1	590	560	26,9
	Próba 2	552		
	Próba 3	538

Rycina 3. Krzywa lepkości żelu, w którym stężenie alginianu sodu wynosi 0,6%.

Figure 3. Viscosity curve for gels based on 0,6% sodium alginate.

Tabela 4. Skład wsadu z chlorowodorkiem lidokainy na bazie alginianu sodu o stężeniu 0,6% i 0,7%.

Table 4. The compositions of the gels with lidocaine hydrochloride based on sodium alginate at a concentration of 0,6% and 0,7%.

	Składniki	Masa [g]
1	Chlorowodorek lidokainy	1,0
	Alginian sodu	0,6
	Węglan wapnia	0,1
	Glikol propylenowy	5,0
	Izopropanol	15,0
	Kwas cytrynowy 5%	q.s.
	Woda	ad 100
2	Chlorowodorek lidokainy	1,0
	Alginian sodu	0,7
	Węglan wapnia	0,1
	Glikol propylenowy	5,0
	Izopropanol	15,0
	Kwas cytrynowy 5%	q.s.
	Woda	ad 100

Tabela 5. Lepkość wsadu z chlorowodorkiem lidokainy (1%) na bazie alginianu sodu o stężeniu 0,6% i 0,7%.

Table 5. The viscosity of gels with lidocaine hydrochloride (1%) based on sodium alginate at a concentration of 0,6% and 0,7%.

Stężenie alginianu sodu [%]		Lepkość [mPa · s]	Średnia z trzech pomiarów [mPa · s]	Odchylenie standardowe
0,6	Próba 1	238	236	2
	Próba 2	236		
	Próba 3	234		
		Lepkość [mPa · s]	Średnia z trzech pomiarów [mPa · s]	Odchylenie standardowe
0,7	Próba 1	174	158	14,29
	Próba 2	155		
	Próba 3	146		

o stężeniach 0,6% i 0,7%. Składy wsadów przedstawiono w tabeli 4, a wyniki badań lepkości w tabeli 5.

Redukcja piany: dobór optymalnego stężenia krzemionki koloidalnej, izopropanolu, propelenta i odpowiedniego rozpylacza aerozolowego

W celu redukcji piany podjęto próby dodatku substancji pomocniczych, takich jak izopropanol i krzemionki koloidalnej do formulacji. Stężenia obydwu substancji pomocniczych ustalono eksperymentalnie. Wpływ różnych stężeń omawianych substancji pomocniczych na redukcję piany, po natryśnięciu aerozolu na podłoże, zobrazowano na rycinach 4 i 5.

Na obecność piany po natryśnięciu aerozolu na podłoże ma wpływ także ilość propelenta w stosunku do ilości wsadu. Ilość propelenta w stosunku do masy wsadu jest zwykle niewielka w tego typu aerozolach i wynosi około 5:95–15:85. Zbadano więc wpływ stężenia propelenta na redukcję piany. Najmniejsza badana ilość propelenta to 10%, gdyż mniejsze ilości nie pozwoliły na wydobywanie wsadu z opakowania. Wyniki przedstawiono na rycinie 6.

Efekty natrysku z wykorzystaniem rozpylaczy o różnych średnicach otworów rowka na redukcję piany, po natryśnięciu aerozolu na podłoże, przedstawiono na rycinie 7.

Metoda analizy zawartości chlorowodorku lidokainy w aerozolu

Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Badanie zawartości chlorowodorku lidokainy w żelu przeprowadzono za pomocą HPLC (wysokosprawnej chromatografii cieczowej). Zastosowano izokratyczny przepływ fazy ruchomej, składającej się z acetonitrylu i buforu fosforanowego w proporcjach: 35:65. Skład buforu fosforanowego

Rycina 4. Obraz formułacji po natryśnięciu aerozolu na podłoże przedstawiający wpływ dodatku izopropanolu w różnych stężeniach: a – dodatek izopropanolu w stężeniu 12%; b – dodatek izopropanolu w stężeniu 15%; c – dodatek izopropanolu w stężeniu 20%.

Figure 4. Picture made after spraying the aerosol on the substrate showing the effect of the addition of isopropanol in various concentrations: a – addition of isopropanol in a concentration of 12%; b – addition of isopropanol in a concentration of 15%; c – addition of isopropanol in a concentration of 20%.

Rycina 5. Obraz formułacji po natryśnięciu aerozolu na podłoże przedstawiający wpływ dodatku krzemionki koloidalnej w różnych stężeniach: a – dodatek krzemionki koloidalnej w stężeniu 0,25%; b – dodatek krzemionki koloidalnej w stężeniu 0,5%.

Figure 5. Picture made after spraying the aerosol on the substrate showing the effect of the addition of colloidal silica in various concentrations: a – addition of colloidal silica at a concentration of 0,25%; b – addition of colloidal silica at a concentration of 0,5%.

Rycina 6. Obraz formułacji po natryśnięciu aerozolu na podłoże przedstawiający wpływ różnych stężeń propelenta: a – ilość propelenta wynosi 15%; b – ilość propelenta wynosi 10%.

Figure 6. Picture made after spraying the aerosol on the substrate showing the effect of the addition of propellant in various concentrations: a – addition of propellant at a concentration of 15%; b – addition of propellant at a concentration of 10%.

Rycina 7. Obraz po natryśnięciu aerozolu na podłoże – dobór rozpylacza; od lewej do prawej – malejąca średnica otworów dyszy i rowka: a – rozpylacz VP1.1-100/P1-100; b – rozpylacz VV1-50/V2-30; c – rozpylacz VV1-35/V1-38.

Figure 7. Picture made after spraying the aerosol on the substrate – selection of the valve; from left to right – decreasing the diameter of the nozzle: a –VP1.1-100/P1-100, b –VV1-50/V2-30, c – VV1-35/V1-38.

Tabela 6. Skład buforu fosforanowego.**Table 6.** Composition of phosphate buffer.

Składnik	Masa [g]
Wodorofosforan disodu	1,63
Diwodorofosforan potasu	5,24
Trietanolamina	0,5
Woda	ad 1000

przedstawiono w **tabeli 6**. Opracowany został w oparciu o wyniki badań Ricci E. i wsp. [14]. Do badań wykorzystano kolumnę chromatograficzną C-18 o wymiarach 4,6 x 250 mm (5 µm) wraz z pre-kolumną C-18 o wymiarach 4,6 x 7,5 mm (5 µm). Prędkość przepływu fazy ruchomej ustalono na 1,0 mL/min. Objętość nastrzyku wynosiła 20 µL. Analizę przeprowadzono w temperaturze 25°C. Długość fali UV dla chlorowodoru lidokainy wyniosła 263 nm. Czas retencji substancji czynnej

Rycina 8. Analiza regresji krzywej wzorcowej chlorowodoru lidokainy.**Figure 8.** Standard curve regression analysis of lidocaine hydrochloride. **Rycina 9.** Chromatogram żelu placebo sporządzonego z udziałem alginianu sodu.**Figure 9.** Chromatogram of placebo gel based on sodium alginate.

wynosił około 12 minut. Odzysk chlorowodoru lidokainy z żelu wynosił od 102,21% do 104,12%.

Krzywa wzorcowa

Pierwszym krokiem było sporządzenie krzywej wzorcowej przedstawiającej zależność pola powierzchni pików od stężenia substancji czynnej w zakresie stężeń 25–150% w stosunku do oczekiwanych wyników analizy we wsadzie aerozolu. Krzywą wzorcową przedstawiono na **rycynie 8**. W celu udowodnienia, że otrzymane wyniki analizy mają wartość rzeczywistą, dokonano oceny istotności regresji oraz oceny istotności korelacji zmiennych. Metodę zwalidowano pod kątem specyficzności, dokładności, precyzji, wykrywalności, oznaczalności i liniowości.

W celu wykazania, że opracowana metoda ilościowego oznaczania chlorowodoru lidokainy i lidokainy w badanym żelu jest specyficzna, poddano analizie chromatograficznej matrycę, którą stanowił roztwór wszystkich substancji pomocniczych wchodzących w skład żelu sporządzonego z udziałem alginianu sodu. Chromatogram przedstawiono na **rycynie 9**. Dodatkowo, na **rycynie 10** zaprezentowano chromatogram dla pików chlorowodoru lidokainy, obrazujący przy jakiej długości fali i w jakim czasie retencji wykazuje on maksimum absorpcji.

Granica wykrywalności (DL, detection limit) chlorowodoru lidokainy wynosiła 0,000346 [g/100 ml], a granica wykrywalności (QL, quantity limit) dla tej substancji wynosiła 0,001048 [g/100 ml].

Dyskusja wyników

Badania reologiczne

Celem dobrania optymalnego stężenia alginianu sodu, zbadano lepkość wsadu aerozolowego. Stężenie polimeru poniżej i równe 0,5% było zbyt niskie, żel spływał z powierzchni, na którą był natryskiwany. Zwiększono więc stężenie polimeru do 0,6%, w wyniku czego zaobserwowano wyraźny wzrost lepkości żelu, co potwierdzają wyniki pomiarów lepkości. Podjęto próbę zwiększenia lepkości żelu poprzez zwiększenie stężenia alginianu sodu do 0,7%, co spowodowało, że żel był bardziej grudkowaty i mniej jednorodny, co potwierdzają duże wartości odchylenia standardowego w badaniach lepkości dla pojedynczej próbki. Wyniki pomiarów lepkości w zależności od stężenia alginianu sodu w zakresie 0,5–0,7% przedstawiono w **tabeli 3**. Sprawdzone więc wpływ dodatku substancji czynnej na lepkość żeli tylko w stężeniach 0,6% i 0,7% polimeru. Wyniki badań przedstawiono w **tabeli 5**. Wykazano, że dodatek substancji czynnej wpływa negatywnie na lepkość żelu. Zaobserwowano duży spadek lepkości dla żelu z alginianem sodu

w stężeniu 0,7%. Wybrany więc docelowym stężeniem polimeru było stężenie 0,6%.

Test skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej

Alginiany ze względu na swoją budowę chemiczną są polimerami wykazującymi szereg interakcji z substancjami konserwującymi. Na podstawie danych literaturowych wyeliminowano te substancje konserwujące stosowane w produktach leczniczych, które wykazują interakcję z alginianami. Test konserwacji przeprowadzono dla formułacji, w której stężenie środka konserwującego – bronopolu wynosiło 0,01%. W badaniu wykazano, że kolonie *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* uległy redukcji do zera, po 7 dniach od posiewu. Na podłożu ogólnego zastosowania TSA dla *Candida albicans* po dwóch dniach kolonie drobnoustrojów zredukowane zostały do zera, wobec czego badania nie kontynuowano. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że bronopol w stężeniu 0,01% skutecznie spełnia rolę konserwantu w żelu, chroniąc preparat przed rozwojem drobnoustrojów.

Redukcja piany

Optymalne stężenie izopropanolu w formułacji to 15%. Niższe stężenie (12%) nie wystarczyło, aby zredukować pianę po natryśnięciu na podłoże. Natomiast zastosowanie wyższych stężeń alkoholu nie skutkowało oczekiwaną większą redukcją piany (rycina 5), a dodatkowo powodowało powstawanie grudek w żelu i jego niejednorodność. Stężenie krzemionki koloidalnej również dobrano doświadczalnie. Optymalne stężenie tej substancji to 0,5%. Próby rozpoczęto od dodatku krzemionki koloidalnej w ilości 2%, jednak przy tak wysokim stężeniu trudno było wydobyć wsad z pojemnika aerozolowego. Zmniejszając stężenie tego dodatku do wartości 0,5%, uzyskano satysfakcjonującą redukcję piany. Dalsze zmniejszanie stężenia krzemionki koloidalnej poskutkowało wzrostem pienienia (rycina 6).

Ilość propelenta w stosunku do masy wsadu ustalono na 10:90. Wprowadzenie większych ilości gazu wytłaczającego powodowało pienienie się produktu podczas natrysku, a mniejsze ilości skutkowały problemem z wydobywaniem całości wsadu z opakowania aerozolowego (rycina 7).

Najlepszy efekt natrysku i minimalizację piany uzyskano stosując rozpylacz o pośredniej średnicy otworów rowka (rycina 8).

Analiza zawartości substancji czynnej w aerozolu

W celu zbadania zawartości substancji czynnej posłużono się metodą HPLC. Metodę analityczną

Rycina 10. Chromatogram chlorowodoru lidokainy przy analitycznej długości fali 263 nm.

Figure 10. Chromatogram of lidocaine hydrochloride at the analytical wavelength of 263 nm.

poddano walidacji, w ramach której określono specyficzność, dokładność, precyzję, liniowość oraz obliczono granicę wykrywalności i oznaczalności. Liniowość metody określono poprzez wykonanie krzywej wzorcowej dla chlorowodoru lidokainy, wykonanej w zakresie stężeń od 25% do 150% w stosunku do oczekiwanych wyników analizy odzysku chlorowodoru lidokainy z żelu.

Przeprowadzone analizy regresji potwierdziły istotności korelacji między stężeniem substancji czynnej a oznaczanymi polami powierzchni pików. Odzysk chlorowodoru lidokainy z żelu wynosił od 102,21% do 104,12%. Zakres ten spełnia normy wymagań ICH (+/-5%).

Wnioski

W niniejszej pracy przedstawiono skład i technologię wytwarzania aerozolu do użytku zewnętrznego z substancją miejscowo znieczulającą. Wykazano przydatność metody żelowania wewnętrznego (in situ) alginianu sodu i jonów wapniowych w celu uzyskania jednorodnego żelu. Zbadano również wpływ zastosowania różnych stężeń substancji, takich jak izopropanol i krzemionka koloidalna, stężenia propelenta oraz zaworu i rozpylacza na redukcję piany, po natryśnięciu aerozolu na podłoże. Badanie analizy zawartości substancji czynnej w aerozolu wykazało, że odzysk chlorowodoru lidokainy mieści się w normach ICH.

Piśmiennictwo

1. Young JR, Lovell AP. Concept and Nomenclature, Introduction to Polymers, Tom 3. CRC Press, New York; 2011.
2. Utrata-Wesołek A, Trzebiecka B, Dworak A. Polimery wrażliwe na bodźce. *Polimery* 2008; 53(10): 717–724.

3. Leea KY, Mooneya DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2012; 37: 106–126.
4. Ngouémazong DE, Tengweh FF, Fraeye I, Duvetter T, Cardinaels RM, Van Loey AM, Moldenaers P, Hendrickx ME. Effect of de-methylesterification on network development and nature of Ca²⁺-pectin gels: Towards understanding structure-function relations of pectin. *Food Hydrocolloids* 2012; 26: 89–98.
5. Paques JP, van der Linden E, van Rijn CJ, Sagis LM. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv Colloid Interfac* 2014; 209: 163–171.
6. Catanzano O, D'Esposito V, Pulcrano G, Maiolino S, Rosaria Ambrosio M, Esposito M, Miro A, Ungaro F, Formisano P, Rosaria Catania M, Quaglia F. Ultrasmall silver nanoparticles loaded in alginate-hyaluronic acid hybrid hydrogels for treating infected wounds. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2017; 66: 626–634.
7. Suhail M, Khan A, Rosenholm JM, Minhas MU, Wu P-C. Fabrication and Characterization of Diclofenac Sodium Loaded Hydrogels of Sodium Alginate as Sustained Release Carrier. *Gels* 2021; 7(1): 10.
8. Belhadji L, HadjSadok, A, Moulai-Mostefa N. Design and characterization of calcium-free in-situ gel formulation based on sodium alginate and chitosan. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2017; 44(4): 662–669.
9. Hinds WC. Introduction, Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles. 2nd Edition. Canada: John Wiley & Sons 1999; 1–14.
10. Achmatowicz T, Barteczko I, Fiebieg A. i in. *Aerозole lecznicze, Farmacja stosowana*, red. Janicki S., Fiebieg A., Sznitowska M. i in. Warszawa: PZWL; 2014.
11. Elsner Z, Leszczyńska-Bakal H, Pawlak E. Podstawowe wiadomości o aerозolach leczniczych, *Preparaty lecznicze w postaci aerозoli*. Warszawa: PZWL, 1972.
12. Aerosol systems. Internet <http://pharmlabs.unc.edu/labs/aerosols/systems.htm>. Dostęp: 11.05.2021.
13. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Propylene Glycol Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, USA; 2009.
14. Ricci E, Bentley MVLB, Marchetti JM. HPLC assay of lidocaine in in vitro dissolution test of the Poloxamer 407 gels. *Braz J Pharm Sci*. 2002; 38(1): 108–111.