



**Dorota Wątróbska-Świetlikowska**

**BADANIE DYSTRYBUCJI ŚRODKÓW  
KONSERWUJĄCYCH W FAZACH NOWOCZESNYCH  
SUBMIKRONOWYCH UKŁADÓW DYSERSYJNYCH**

Praca wykonana  
w **Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej**  
**Akademii Medycznej w Gdańsku**  
i przedstawiona  
Radzie Wydziału Farmaceutycznego  
w celu uzyskania stopnia  
doktora nauk farmaceutycznych

Promotor rozprawy  
**prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska**

Badania wykonano w ramach **grantu MNiSzW nr 2P05F 040 30**

**Gdańsk 2008**

## **SPIS TREŚCI**

<b>STRESZCZENIE (SUMMARY)</b> .....	<b>5</b>
<b>SKRÓTY I SYMBOLE</b> .....	<b>12</b>
<b>I. WSTĘP</b> .....	<b>16</b>
<b>1. Ochrona przeciwdrobnoustrojowa produktów leczniczych</b> .....	<b>17</b>
1.1. Charakterystyka i podział środków konserwujących.....	17
1.2. Wpływ pH na aktywność przeciwdrobnoustrojową środków konserwujących ....	23
1.3. Interakcje środków konserwujących z substancjami pomocniczymi i opakowaniami.....	24
1.4. Konserwowanie układów emulsyjnych.....	28
<b>2. Submikronowe układy dyspersyjne</b> .....	<b>30</b>
2.1. Emulsje submikronowe.....	30
2.2. Wodne dyspersje lecytyny (WLD).....	34
2.3. Liposfery.....	37
2.4. Liposomy.....	39
<b>3. Charakterystyka wybranych środków konserwujących</b> .....	<b>41</b>
3.1. Parabeny.....	41
3.2. Chlorek benzalkoniowy.....	47
3.3. Fenoksyetanol.....	50
<b>II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY</b> .....	<b>53</b>
<b>III. METODYKA</b> .....	<b>56</b>
<b>1. Odczynniki, materiały, aparatura</b> .....	<b>57</b>
1.1 Odczynniki.....	57
1.2 Materiały.....	59
1.3 Aparatura.....	60
<b>2. Emulsje submikronowe i tradycyjne</b> .....	<b>62</b>
2.1. Sporządzanie podstawowych emulsji submikronowych.....	62
2.2. Sporządzanie emulsji tradycyjnych.....	63
2.3. Wprowadzanie środków konserwujących do emulsji.....	64
a) Parabeny metylowy i propylowy (M i P).....	64
b) Chlorek benzalkoniowy.....	64
c) Phenonip.....	65
d) Mieszanina chlorku benzalkoniowego z alkoholem $\beta$ -fenyloetylowym.....	66
2.4. Przechowywanie układów.....	67
2.5. Długoterminowe badanie trwałości emulsji submikronowych ze środkami konserwującymi.....	67
<b>3. Wodne dyspersje lecytyny (WLD)</b> .....	<b>68</b>
3.1. Sporządzanie układów podstawowych.....	68
3.2. Wprowadzanie środków konserwujących do WLD.....	69
a) Parabeny M i P.....	69
b) Chlorek benzalkoniowy.....	69
<b>4. Dyspersje liposfer (NLC)</b> .....	<b>70</b>
4.1. Sporządzanie NLC ze środkami konserwującymi.....	70
4.2. Długoterminowe badanie trwałości fizykochemicznej dyspersji liposfer ze środkami konserwującymi.....	71
<b>5. Dyspersje liposomów (Zakosomy®)</b> .....	<b>71</b>
<b>6. Podstawowe roztwory i dyspersje przeznaczone do badań aktywności powierzchniowej</b> .....	<b>71</b>

<b>7. Analiza fizykochemiczna</b> .....	<b>73</b>
a) Ocena wizualna.....	74
b) Obserwacje mikroskopowe .....	74
c) Badanie pH .....	74
d) Badanie wielkości cząstek.....	75
e) Badanie potencjału zeta .....	75
f) Pomiar lepkości kinematycznej.....	75
<b>8. Pomiar aktywności powierzchniowej mieszanin surfaktantów ze środkami konserwującymi</b> .....	<b>76</b>
<b>9. Badanie dystrybucji środków konserwujących w układach dyspersyjnych</b> .....	<b>77</b>
9.1. Badanie rozpuszczalności parabenów M i P.....	78
9.2. Oznaczanie współczynnika podziału parabenów pomiędzy olej sojowy i wodę ..	78
9.3. Oznaczanie całkowitej zawartości środków konserwujących w układach dyspersyjnych .....	78
9.4. Otrzymanie fazy wodnej badanych układów .....	79
a) Ultrawirowanie (metoda uw).....	79
b) Ultrafiltracja (metoda uf).....	79
9.5. Ocena adsorpcji oraz absorpcji parabenów na sączku ultrafiltracyjnym.....	80
9.6. Ocena zdolności ultrafiltracji miceli tworzonych przez chlorek benzalkoniowy ..	80
9.7. Określanie dystrybucji środków konserwujących pomiędzy fazy emulsji na podstawie modelu matematycznego .....	80
<b>10. Analiza ilościowa środków konserwujących metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)</b> .....	<b>81</b>
<b>11. Ocena statystyczna wyników</b> .....	<b>84</b>
<b>IV. WYNIKI</b> .....	<b>85</b>
<b>Rozpuszczalność parabenów</b> .....	<b>86</b>
<b>Emulsje submikronowe</b> .....	<b>87</b>
Parabeny M i P.....	88
Chlorek benzalkoniowy .....	95
Phenonip .....	100
Mieszanina chlorku benzalkoniowego z alkoholem $\beta$ -fenyloetylowym .....	112
Długoterminowe badanie trwałości fizykochemicznej emulsji submikronowych ze środkami konserwującymi.....	114
<b>Wodne dyspersje lecytyny</b> .....	<b>120</b>
Parabeny M i P.....	121
Chlorek benzalkoniowy .....	124
<b>Dyspersje liposfer (NLC)</b> .....	<b>125</b>
Phenonip .....	130
Chlorek benzalkoniowy .....	131
<b>Liposomy (Zakosomy O<sup>®</sup>)</b> .....	<b>132</b>
<b>Pomiary napięcia powierzchniowego</b> .....	<b>133</b>
<b>V. OMÓWIENIE WYNIKÓW</b> .....	<b>142</b>
<b>VI. WNIOSKI</b> .....	<b>163</b>
<b>VII. PIŚMINNICTWO</b> .....	<b>166</b>

**STRESZCZENIE**  
**(SUMMARY)**

Wśród aktualnych problemów technologii farmaceutycznej szczególnie istotny jest dobór właściwego dla danej postaci leku środka konserwującego i jego stężenia. Środek konserwujący powinien chronić przede wszystkim fazę wodną, która jest najbardziej narażona na zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Niestety większość środków konserwujących cechują właściwości lipofilne, co utrudnia uzyskanie odpowiedniego stężenia w fazie wodnej. Dodatkowo, ze względu na złożone struktury wewnętrzne i rozwiniętą powierzchnię międzyfazową, submikronowe układy dyspersyjne są szczególnie trudne do konserwacji. Niestety nie podjęto do tej pory szerszych badań tego zagadnienia, kluczowego dla powszechnego zastosowania nowoczesnych form leku w praktyce klinicznej.

Przedmiotem badań były nowoczesne, submikronowe układy dyspersyjne już wykorzystywane jako nośniki substancji leczniczych (emulsje submikronowe, zawiesiny liposomów) lub będące potencjalnymi nośnikami substancji leczniczych (wodne dyspersje lecytyny oraz zawiesiny nanosfer lipidowych). Badania obejmowały ocenę trwałości fizykochemicznej submikronowych dyspersji w obecności środków konserwujących. Zasadniczym etapem było badanie dystrybucji środków konserwujących do fazy wodnej i pozostałych faz układów.

W submikronowych dyspersjach przeznaczonych do podania pozajelitowego, jako biozgodny emulgator, stosuje się lecytynę. Ponieważ lecytyna w wysokich stężeniach służy do inaktywacji środków konserwujących w badaniach jałowości leków, ważnym aspektem badań było określenie wpływu fosfolipidów lecytyny na dystrybucję środków konserwujących i porównanie pod tym względem układów stabilizowanych lecytyną z układami zawierającymi inne surfaktanty.

W długoterminowych badaniach stwierdzono zgodność alkoholu benzyłowego, alkoholu  $\beta$ -fenyloetyłowego, chlorku benzalkoniowego, glukonianu chlorheksydyny, chlorokrezolu, fenolu, m-krezolu, parabenów M i P, Phenonipu oraz tiomersalu z emulsjami submikronowymi i zawiesiną liposfer oraz bronopolu z zawiesiną liposfer. Jedynie w teście przyspieszonego starzenia (40°C) niezgodnymi środkami konserwującymi okazały się: Phenonip (z emulsjami submikronowymi) oraz parabeny i chlorek benzalkoniowy (z liposferami). Natomiast stwierdzono stabilizujący wpływ parabenów na emulsje submikronowe i wodne dyspersje lecytyny (WLD).

Podstawowym celem pracy było określenie dystrybucji najczęściej stosowanych środków konserwujących (parabenów M i P, chlorku benzalkoniowego, składników Phenonipu oraz alkoholu  $\beta$ -fenyloetyłowego) pomiędzy fazy występujące w badanych

submikronowych układach dyspersyjnych. Badanie miało wykazać zależność dystrybucji od składu i struktury układów. Porównywano układy stabilizowane lecytyną oraz innymi surfaktantami (np. polisorbate 80, poloksamerem). W celu poznania dystrybucji środków konserwujących pomiędzy wszystkie fazy układów dyspersyjnych (wodną, olejową, liposomalno-micelną i międzyfazę) stosowano model matematyczny.

W celu oddzielenia „strukturalnej fazy wodnej” („wodno-liposomalno-micelarnej, „w-l-m”) submikronowych układów dyspersyjnych od fazy olejowej, liposomalnej i międzyfazy stosowano metodę ultrawierowania. Dopiero zastosowanie ultrafiltracji umożliwiło uzyskanie fazy wodnej bez struktur wewnętrznych, zawierającej frakcję środka konserwującego w formie wolnej (rozpuszczonej). Analizę ilościową środków konserwujących w wydzielonych fazach prowadzono metodą HPLC.

Badane środki konserwujące różniły się właściwościami fizykochemicznymi, co wpływało na ich dystrybucję w fazach badanych układów. W emulsji submikronowej (10%) stabilizowanej lecytyną jajową (1,2%) w fazie wodnej (pozbawionej nanocząstek) wykrywano: 27,8; 15,4; 5,1 i 12,3% odpowiednio: parabenu M (log P 2,00), parabenu A (log P 2,45), parabenu P (log P 2,98) i alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego (log P 1,33), natomiast aż 58,4% fenoksyetanolu (log P 1,00). Chlorek benzalkoniowy będący związkami o charakterze surfaktantu, praktycznie nie ulegał dystrybucji do pozbawionej struktur fazy wodnej tych emulsji. Wraz ze wzrostem zarówno stężenia fazy olejowej, jak i lecytyny notowano zmniejszenie zawartości środków konserwujących w fazie wodnej.

W emulsjach submikronowych zawierających lecytynę paraben i chlorek benzalkoniowy gromadziły się przede wszystkim w międzyfazie (np. paraben M w zakresie 47-56%), przy czym większe stężenie w tej fazie było przy zastosowaniu lecytyny sojowej niż jajowej. W przeciwieństwie do emulsji submikronowych stabilizowanych lecytyną, w emulsjach zawierających jako emulgator polisorbate dużą część środków konserwujących (np. parabenu P 41%) znajdowano w strukturach micelarnych tworzonych przez ten związek powierzchniowo czynny.

Zwiększenie wielkości kropli olejowych w emulsjach z polisorbate prowadziło do zmniejszenia udziału środków konserwujących w międzyfazie. W emulsjach tradycyjnych sporządzonych z zastosowaniem poloksameru i pseudoemulgatorów (metyloceluloza i karbomer) oznaczano więcej niż w emulsjach submikronowych

środków konserwujących w fazie wodnej (mniej lipofilne związki - paraben M i fenoksyetanol) lub w fazie olejowej (bardziej lipofilne związki - parabeny A i P).

Wyniki pracy dowodzą, że w emulsjach submikronowych w większym stopniu niż w tradycyjnych dochodzi do gromadzenia środków konserwujących w międzyfazie, co wskazuje, że większa powierzchnia międzyfazowa i interakcje środków konserwujących z surfaktantem mają większe znaczenie niż współczynnik podziału olej/woda.

Dla ocenianych środków konserwujących ich ostateczne stężenia w formie wolnej (faza wodna bez nanocząstek) były, w zależności od środka konserwującego, dwukrotnie (fenoksyetanol) albo nawet dwudziestokrotnie (paraben P) mniejsze niż stężenia całkowite. O ile przy dwukrotnym spadku stężenia można oczekiwać nadal dużej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, co wynika z zakresu stosowanych stężeń (np. paraben M 0,065-0,25%), to problematyczne staje się większe obniżenie stężenia, gdyż nie gwarantuje to właściwej skuteczności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej.

Badania dystrybucji środków konserwujących najszerzej prowadzono dla emulsji submikronowych, a w bardziej ograniczonym stopniu (Phenonip) dla pozostałych submikronowych układów dyspersyjnych (WLD, liposfery, liposomy). W fazie wodnej 1,2% WLD oraz w dyspersji liposomów (2,5% lecytyny) wykrywano podobny udział środków konserwujących jak w emulsjach submikronowych stabilizowanych lecytyną. Wraz ze wzrostem stężenia lecytyny malała frakcja wolnego środka konserwującego w układzie WLD.

W zawiesinie liposfer środki konserwujące gromadziły się w fazie wodnej i międzyfazie. W układach tych wykrywano podobną dystrybucję do fazy wodnej składników Phenonipu oraz chlorku benzalkoniowego, jak notowano w emulsjach, pomimo że nie dochodziło do zamykania środków konserwujących w matrycy liposfer.

Praca ma charakter naukowy i praktyczny. Jej wyniki mogą być wykorzystane w technologii nowoczesnych układów submikronowych jako nośników leku przeznaczonych do podania nie tylko pozajelitowo, lecz także do oczu, na skórę, doustnie.



In pharmaceutical technology it is important to choose the proper preservatives and their concentration for each formulation. The preservative should protect an aqueous phase where the microbial growth occurs. Most preservatives are lipophilic so it is difficult to obtain appropriate concentration in the aqueous phase. Additionally preservation of submicron dispersed systems is a more challenging task due to a more complex internal structure, existence of different phases, expanded interphase. Unfortunately there is only limited research of this problem being important for the use of the modern formulation in clinical practice.

Modern submicron dispersed systems such as: submicron emulsions and liposomes which are already used as drug carriers as well as potential drug carriers - aqueous lecithin dispersions and suspensions of lipospheres (nanostructured lipid carriers, NLC) - were the subject of the presented studies. The physicochemical stability of these systems in the presence of preservatives was investigated. The main aim of these study, however, was to determine the distribution of preservatives between the phases of the submicron dispersions.

Lecithin as a biocompatible emulsifier is used in submicron dispersed systems intended for parenteral use. However, lecithin in high concentration is used for inactivation of preservatives in pharmacopoeial sterility test. For this reason the important aspect of this investigation was to determine the influence of lecithin phospholipids on distribution of preservatives and to compare with formulations stabilized with other surfactants.

The long-term demonstrated the good physical stability of submicron emulsions and suspension of lipospheres containing benzyl alcohol, phenylethyl alcohol, benzalkonium chloride, chlorhexidine gluconate, chlorocresol, m-cresol, parabens M and P, Phenonip and thiomersal. Besides bronopol was compatible with lipospheres was found. Only in accelerated stability test lack of stability was discovered in submicron emulsions with Phenonip and in suspension of lipospheres with parabens and benzalkonium chloride. Moreover parabens stabilized the submicron emulsion and aqueous lecithin dispersions (WLD).

The main aim of the study was to determine the distribution of commonly used preservatives (parabens, benzalkonium chloride, Phenonip and  $\beta$ -phenylethyl alcohol) into the phases present in the investigated submicron dispersed systems. The research was supposed to reveal the influence of the structure and composition of dispersed systems on the distribution events. The formulations stabilized with lecithin were compared with dispersions stabilized with other surfactants (e.g. polysorbate 80 and poloxamer).

Mathematical model was used to determine the distribution of preservatives between all phases of the dispersion systems (aqueous, oil, liposomal-micellar and interphase).

In order to separate the “structural aqueous phase” (water-liposomes-micelles, “w-l-m”) from oil phase, liposomal phase and interphase ultracentrifugation was performed. Only ultrafiltration allowed to obtain the aqueous phase without the internal structures, containing the fraction of free, dissolved preservative. The concentrations of preservatives present in the separated phases were studied by HPLC methods.

The investigated preservatives differ in physicochemical characteristics what influenced the distribution. In submicron emulsion (10%) stabilized with lecithin (1.2%) in the aqueous phase (free of nanoparticles) 31.0, 16.6, 5.9 and 12.3% of paraben M (log P 2.00), paraben A (log P 2.45), paraben P (log P 2.98) and  $\beta$ -phenylethanol (log P 1.33), respectively, was found, while for phenoxyethanol (log P 1.00) this value was the highest 58.4%. Benzalkonium chloride, a surfactant-type preservative, practically was not present in the particle-free aqueous phase. Increase in concentration of either oil or lecithin resulted in reduction of the preservatives in the aqueous phase.

In submicron emulsions containing lecithin parabens and benzalkonium chloride cumulated mainly in the interphase (for example 46-56% of paraben M) and higher distribution into this phase occurred in emulsions containing soya-lecithin than in those with egg lecithin. In contrast to the submicron emulsions with lecithin, emulsions stabilized with polysorbate larger fraction of the preservatives (for example 41% of paraben P) was found in micellar phase easily created by this surfactant.

Increase in the oily droplet size in emulsions with polysorbate resulted in reduction of the fraction present in the interphase. In traditional emulsions prepared with poloxamer or pseudoemulsifiers (methylcellulose, carbomer) the cumulation of preservatives in the aqueous phase (less lipophilic substances – paraben M and phenoxyethanol) or in the oily phase (more lipophilic paraben A and P) was lower than observed in submicron emulsions.

The results demonstrate that accumulation in the interphase is more significant in submicron than in traditional emulsions, what allows for conclusion that larger interphase surface and interaction with surfactants are more important factors determining distribution than simple oil/water partition coefficient.

Concentrations of preservatives in a free, active form (present in the particle-free aqueous phase) were, depending on a preservative, two-fold (phenoxyethanol) or even 20-fold lower than total concentrations in the formulation. Although the two-fold

reduction may still provide sufficient antimicrobial activity (this can be concluded from the range of the used concentrations, e.g. paraben M is used in concentrations 0.065-0.25%), larger reduction of the concentration may be problematic.

Although the distribution of preservatives was mainly studied in emulsion formulations, but some experiments (with Phenonip) were carried out also in other submicron systems (WLD, lipospheres, liposomes). In the aqueous phase of WLD (1.2%) and in liposome dispersion (2.5% of lecithin) similar accumulation of preservatives was found as observed in submicron emulsions stabilized with lecithin. The fraction of a free preservative decreased with increase of lecithin concentration in WLD.

In suspensions of lipospheres the preservatives cumulated in the aqueous phase and in the interphase. Although the preservatives (Phenonip and benzalkonium chloride) were not encapsulated in the lipid solid matrix, their distribution into the aqueous phase was similar to the observed in emulsions.

This study is of a scientific and practical value. The results may be used in the technology of modern submicron dispersed systems intended not only for parenteral but also for ocular and oral administration.

## **SKRÓTY I SYMBOLE**

### **Wykaz używanych skrótów i symboli**

- BAC – chlorek benzalkoniowy
- b.z. – bez zmian
- cmc - krytyczne stężenie micelarne
- CMC – karmeloza
- FP – Farmakopea Polska
- HPMC – hypromeloza
- MC – metyloceluloza
- n.b. – nie badano
- NLC – zawiesina nanosfer lipidowych
- nw – niewyjałowione
- PC – fosfatydylocholina
- Ph. Eur. – Farmakopea Europejska
- w - wyjałowione
- WLD – wodne dyspersje lecytyny
- „w-l-m” – „wodno-liposomalno-micelarna”
- uf – ultrawierowanie w połączeniu z ultrafiltracją
- USP – Farmakopea Amerykańska
- uw – ultrawierowanie
- $\gamma$  (c) – napięcie powierzchniowe w funkcji stężenia

Tabela 1. Wykaz sporządzonych układów

Symbol układu	Środki konserwujące (% , m/m)	Emulgator (% , m/m)	Olej (% , m/m)
<b>EMULSJE SUBMIKRONOWE</b>			
<b>E1</b>	-	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>E2*</b>	-	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>E3*</b>	-	Lecytyna jajowa (1,2)	20,0
<b>E4</b>	-	Lecytyna jajowa (2,4)	20,0
<b>N1</b>	Parabeny M i P (0,18; 0,02)	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>N1*</b>	Parabeny M i P (0,18; 0,02)	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>N2</b>	Parabeny M i P (0,18; 0,02)	Lecytyna jajowa (1,2)	20,0
<b>N3</b>	Parabeny M i P (0,18; 0,02)	Lecytyna jajowa (2,4)	20,0
<b>N4</b>	Parabeny M i P (0,36; 0,04)	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>B1*</b>	Chlorek benzalkoniowy (0,005)	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>B2</b>	Chlorek benzalkoniowy (0,01)	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>B3*</b>	Chlorek benzalkoniowy (0,02)	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>BT</b>	Chlorek benzalkoniowy (0,02)	Polisorbat 80 (1,2)	10,0
<b>P1</b>	Phenonip (0,8)	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>P2*</b>	Phenonip (0,8)	Lecytyna jajowa (1,2)	20,0
<b>P3S</b>	Phenonip (0,8)	Lecytyna sojowa (1,2)	10,0
<b>P4T</b>	Phenonip (0,8)	Polisorbat 80 (2,5)	10,0
<b>P5T</b>	Phenonip (0,8)	Polisorbat 80 (2,5)	20,0
<b>P6P</b>	Phenonip (0,8)	Poloksamer F68 (2,5)	10,0
<b>BF</b>	Alkohol β-fenyloetylowy (0,5) i chlorek benzalkoniowy (0,02)	Lecytyna jajowa (1,2)	10,0
<b>EMULSJE TRADYCYJNE</b>			
<b>tBT</b>	Chlorek benzalkoniowy (0,02)	Polisorbat 80 (1,2)	10,0
<b>tPP</b>	Phenonip (0,8)	Poloksamer F68 (2,5)	10,0
<b>tPT</b>	Phenonip (0,8)	Polisorbat 80 (2,5)	10,0
<b>tPM</b>	Phenonip (0,8)	Metolose SM 100 (2,0)	10,0
<b>tPC</b>	Phenonip (0,8)	Carbopol (0,1)	10,0
<b>WODNE DYSERSJE LECYTINY</b>			
<b>WLD1</b>	-	Lecytyna jajowa (1,2)	-
<b>WLD2</b>	-	Lecytyna jajowa (1,2)	-
<b>N1-WLD</b>	Parabeny M i P (0,18; 0,02)	Lecytyna jajowa (1,2)	-

<b>N2-WLD</b>	Parabeny M i P (0,18; 0,02)	Lecytyna jajowa (2,4)	-
<b>N3-WLD</b>	Parabeny M i P (0,18; 0,02)	Lecytyna jajowa (5,0)	-
<b>N4-WLD</b>	Parabeny M i P (0,36; 0,04)	Lecytyna jajowa (1,2)	-
<b>B-WLD</b>	Chlorek benzalkoniowy (0,02)	Lecytyna jajowa (1,2)	-
<b>ZAWIESINY LIOSFER (NLC)</b>			
<b>P1-NLC</b>	Phenonip (0,8) <sup>(**)</sup>	Poliglukozyd alkilowy (5,0)	45,0
<b>P2-NLC</b>	Phenonip (0,8) <sup>(**)</sup>	Poliglukozyd alkilowy (5,0)	45,0
<b>P3-NLC</b>	Phenonip (0,8) <sup>(**)</sup>	Poliglukozyd alkilowy (5,0)	45,0
<b>P4-NLC</b>	Phenonip (0,8) <sup>(**)</sup>	Poliglukozyd alkilowy (5,0)	45,0
<b>B1-NLC</b>	Chlorek benzalk. (0,005)	Poliglukozyd alkilowy (5,0)	45,0
<b>B2-NLC</b>	Chlorek benzalk. (0,01) <sup>(**)</sup>	Poliglukozyd alkilowy (5,0)	45,0
<b>B3-NLC</b>	Chlorek benzalk. (0,01) <sup>(**)</sup>	Poliglukozyd alkilowy (5,0)	45,0

<sup>(\*)</sup> - wykorzystano Ivelip

<sup>(\*\*)</sup> – sporządzono w różnej temperaturze (21, 65, 80°C)

## **I. WSTĘP**



## 1. OCHRONA PRZECIWDROBNOUSTROJOWA PRODUKTÓW LECZNICZYCH

### 1.1. Charakterystyka i podział środków konserwujących

Wśród aktualnych problemów technologii farmaceutycznej szczególnie istotny jest dobór właściwego dla danej postaci leku środka konserwującego i jego stężenia. Środki konserwujące są szeroko stosowane w produktach farmaceutycznych przeznaczonych do podania różnymi drogami (np. pozajelitowo, doustnie, do oka, na skórę i błony śluzowe). Poza pewnymi wyjątkami związanymi z drogą podania, środki konserwujące są wymaganymi składnikami preparatów zawierających w swoim składzie fazę wodną. Środek konserwujący powinien chronić przede wszystkim fazę wodną, która jest najbardziej narażona na zanieczyszczenia mikrobiologiczne, ponieważ właśnie w tej fazie następuje wzrost i rozwój drobnoustrojów [1]. Niestety większość środków konserwujących cechują właściwości lipofilne, co utrudnia uzyskanie odpowiedniego stężenia w fazie wodnej. Dodatkowym problemem związanym z konserwowaniem układów dyspersyjnych jest możliwość zamykania środków konserwujących w submikronowych strukturach wewnętrznych tych układów, co osłabia ich działanie przeciwdrobnoustrojowe.

Obecność mikroorganizmów jest niepożądana, zarówno dla postaci leku, jak również dla chorego. Drobnoustroje powodują rozkład substancji czynnych i pomocniczych, co w konsekwencji obniża wartość terapeutyczną danego preparatu [1]. Źle konserwowany preparat ulega zepsuciu, które może być rozpoznane wizualnie np. zmiana barwy, widoczny wzrost bakterii czy grzybów, albo w postaci nieprzyjemnego zapachu. Jednak bardziej niebezpieczne są zmiany niewidoczne „gołym okiem” dotyczące zarówno fizycznej trwałości danego preparatu, jak i chemicznej jego stabilności. Wprowadzenie drobnoustrojów do chorego organizmu z nieprawidłowo konserwowanego preparatu leczniczego może stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia pacjenta [2].

Środki konserwujące są dodawane przede wszystkim w postaciach leków niejałowych w celu zabezpieczenia produktu przed nadmiernym rozwojem drobnoustrojów w trakcie przechowywania i stosowania przez pacjenta. Często również w lekach jałowych stosuje się dodatek środków konserwujących. Są one wymagane przede wszystkim w opakowaniach wielodawkowych, ponieważ zabezpieczają lek

przed rozwojem mikroorganizmów, które mogą być wprowadzone podczas kolejnych pobrań leku z tego samego opakowania (np. fiołki) [1]. Ich dodatek jest również praktykowany w jałowych lekach jednodawkowych (np. iniekcje w ampułkach), jeżeli wyjaławianie odbywa się przez sączenie. Skuteczność wyjaławiania przez sączenie zależy od wielu trudnych do kontroli czynników, dlatego producenci leków, ze względów etycznych i ekonomicznych, powinni zapewnić odpowiednie konserwowanie preparatów leczniczych. Należy jednak pamiętać, że konserwacja nigdy nie zastąpi odpowiedniej produkcji czy właściwych warunków sporządzania leków.

Istnieją pewne ograniczenia w stosowaniu środków konserwujących. Czasem ze względu na sposób podania nie zaleca się stosowania środków konserwujących. Według FP VI środki konserwujące nie powinny być dodawane do iniekcji podawanych jednorazowo w objętości powyżej 15 ml oraz do preparatów podawanych dordzeniowo i do gałki ocznej [3]. Obecność środków konserwujących również nie jest konieczna, gdy [2, 4]:

- produkt nie zawiera wody (np. suche postacie leku, takie jak tabletki czy proszki) ponieważ mikroorganizmy wymagają do wzrostu obecności wody, więc produkty niezawierające wody nie są środowiskiem sprzyjającym wzrostowi mikroorganizmów,
- produkt nie zawiera substancji organicznych, które mogą być źródłem składników odżywczych dla drobnoustrojów,
- wartość pH leku jest poza zakresem optymalnym dla rozwoju drobnoustrojów, czyli poza zakresem pH 3 – 9,
- obecne są składniki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Miarą ilości wody dostępnej dla drobnoustrojów jest tzw. aktywność wody ( $A_w$ ), która maleje ze wzrostem stężenia substancji w układzie. Aktywność wody zależy od temperatury i wyraża ją stosunek ciśnienia pary wywieranej przez postać leku do ciśnienia pary czystej wody w tej samej temperaturze [2, 5]:

$$A_w = \frac{\text{ciśnienie pary postaci leku}}{\text{ciśnienie pary wody}} \quad (1)$$

Wartość  $A_w$  wpływa na zdolności rozwoju mikroorganizmów. Większość drobnoustrojów wymaga  $A_w$  około 0,92 i powyżej. Jednak niektóre mikroorganizmy

tolerują niższe wartości  $A_w$  (np. dla gronkowca złocistego  $A_w$  wynosi 0,86, dla grzybów 0,9, a dla osmofilnych drożdży 0,62). Na zdolność rozwoju drobnoustrojów przy odpowiedniej wartości  $A_w$  wpływa również temperatura i odczyn środowiska.

Zwiększając ciśnienie osmotyczne, np. poprzez zwiększenie stężenia cukrów (syrupy), można obniżyć wartość  $A_w$  do poziomu uniemożliwiającego przeżycie większości drobnoustrojów, chociaż osmofilne drożdże potrafią egzystować nawet w środowisku o bardzo wysokim stężeniu cukrów. Innym sposobem zmniejszenia aktywności wody, w wyniku zwiększenia ciśnienia osmotycznego jest dodanie do wody niewielkiej ilości chlorku sodu, co również ogranicza rozwój mikroorganizmów [5].

Stężenie środka konserwującego powinno być optymalne dla danej postaci leku z uwzględnieniem drogi aplikacji. Nie można zastosować zbyt dużego stężenia środka konserwującego, ponieważ większość z tych związków wywiera niepożądane efekty uboczne (drażnienie, uczulenia, toksyczność). Właściwy dobór stężenia środka konserwującego stanowi kompromis pomiędzy efektywnością działania na mikroorganizmy i bezpieczeństwem pacjenta [6].

Dodatkowym problemem jest różna aktywność środków konserwujących w zależności od pH, rodzaju opakowania (powszechne jest zjawisko absorpcji i adsorpcji), substancji pomocniczych obecnych w leku, postaci fizycznej preparatu. Dochodzi często do interakcji środków konserwujących z substancją leczniczą i/lub substancjami pomocniczymi. Grupa środków konserwujących dopuszczonych do celów farmaceutycznych jest nieliczna, szczególnie, gdy bierze się pod uwagę dopuszczone do użytku pozajelitowego lub do oczu. Utrudnia to dobór właściwego środka konserwującego.

Szczególnie trudny jest dobór środka konserwującego i jego stężenia do układów dwu- i wielofazowych (zawiesiny, emulsje, dyspersje, kremy). Jak już wspomniano, środek konserwujący powinien chronić przede wszystkim fazę wodną. Uzyskanie odpowiedniego stężenia w fazie wodnej jest utrudnione przez właściwości lipofilne, które cechują większość środków konserwujących. W wyniku tego środki konserwujące ulegają dystrybucji do fazy olejowej, międzyfazy oraz mogą być zamykane w strukturach obecnych w układach wielofazowych (szerzej omówiono w p. 4 i 5). Nie jest możliwe zwiększenie stężenia środka konserwującego w danym preparacie, tak by zrekompensować to zjawisko, gdyż nie powinny być przekraczane stężenia środków konserwujących zwykle stosowane, co grozi wystąpieniem działania toksycznego.

Obowiązkiem producenta chcącego zarejestrować nowy produkt leczniczy zawierający środki konserwujące jest przeprowadzenie badania skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej. Przeprowadzenie tego testu jest opisane w farmakopeach. W określonych odstępach czasowych (przez 28 dni) bada się logarytm redukcji określonej liczby szczepów wzorcowych drobnoustrojów wprowadzonych w odpowiedniej ilości do badanego preparatu zawierającego środek konserwujący. Kryteria akceptacji w zakresie obniżenia liczby komórek drobnoustrojów w czasie są podane w farmakopeach i są różne dla różnych rodzajów preparatów w zależności od zamierzonego stopnia ochrony.

Straty aktywności przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących, ewentualnie zachodzące w preparacie, kontroluje się również w badaniu trwałości w trakcie przechowywania.

Środek konserwujący powinien działać bakteriobójczo, czyli zabijać drobnoustroje. Mechanizm tego działania jest różny i w większości przypadków prowadzi do denaturacji białek, inaktywacji enzymów komórkowych i zahamowania szlaków metabolicznych mikroorganizmów. Niektóre środki konserwujące w zależności od zastosowanego stężenia działają bakteriostatycznie albo bakteriobójczo (np. fenole).

Niezależnie od rodzaju i postaci leku środek konserwujący musi odpowiadać określonym wymaganiom pod względem bezpieczeństwa oraz jakości. Idealny środek konserwujący powinien charakteryzować się [4]:

- szerokim spektrum działania w małych stężeniach,
- trwałości fizykochemiczną w warunkach stosowania oraz w szerokim zakresie wartości pH,
- odpowiednimi właściwościami lipofilnymi,
- zgodnością z substancjami leczniczymi i pomocniczymi,
- brakiem zapachu, smaku, koloru,
- brakiem działania toksycznego,
- brakiem właściwości uczulających lub drażniących,
- zgodnością fizykochemiczną z opakowaniami lub zamknięciami leków,
- nie powinien powodować powstawania form opornych.

Pod względem chemicznym najczęściej stosowane środki konserwujące należą do grup:

- fenoli,
- alkoholi,
- kwasów organicznych lub ich estrów,

- biguanidów,
- organicznych związków rtęci,
- czwartorzędowych soli amoniowych.

Wybór odpowiedniego rodzaju środka konserwującego zależy przede wszystkim od drogi podania leku. Podział powszechnie stosowanych środków konserwujących, ich zastosowanie i zakres najczęściej stosowanych stężeń przedstawiono w tabeli 2 oraz w tabeli 4.

Tabela 2. Środki konserwujące – mechanizm działania, zastosowanie, zwykle stosowane stężenia w preparatach farmaceutycznych [2, 4 – 13]

Środek konserwujący	Stężenie [%]	Droga podania
<b>ALKOHOLE</b>		
Zaburzenie integralności błony komórkowej oraz denaturacja białek bakteryjnych, hamowanie syntezy metabolitów niezbędnych do podziału komórki.		
Alkohol etylowy	5,0 – 10,0	doustnie, pozajelitowo, zewnętrznie
Alkohol benzyłowy	0,5 – 2,0	pozajelitowo
	1,0 – 2,0	zewnętrznie
Chlorobutanol	0,25 – 0,5	do oczu, pozajelitowo
Alkohol β-fenyloetyłowy	0,25 – 0,5	do oczu, do nosa, do uszu
	1,0	zewnętrznie
Fenoksyetanol	0,5 – 1,0	zewnętrznie
Bronopol	0,01 – 0,1	zewnętrznie
<b>KWASY ORGANICZNE</b>		
Blokada enzymów komórkowych drobnoustrojów.		
Kwas benzoowy	0,1 – 0,2	doustnie, zewnętrznie, dopochwowo, pozajelitowo (sól sodowa)
Kwas sorbowy	0,05 – 0,2	doustnie, zewnętrznie
<b>ESTRY KWASU P-HYDROKSYBENZOESOWEGO</b>		
Wchodzą w miejsce metabolitów komórkowych i hamują rozwój komórki		
Paraben M	(tabela 4)	
Paraben P		

<b>ORGANICZNE POCHODNE RTEŹCI</b>		
Bakteriobójczo - łączą się z grupami tiolowymi białek bakteryjnych i enzymów, co zaburza metabolizm komórkowy i procesy oddychania.		
<b>Tiomersal</b>	0,01	pozajelitowo, do oczu
	0,01 - 0,02	zewnętrznie
	0,001 – 0,15	doustnie
<b>Azotan, octan, boran fenylortęciowy</b>	0,002 – 0,02	zewnętrznie, doodbytniczo, dopochwowo
	0,001 – 0,002	pozajelitowo (oprócz boranu), do oczu
<b>IV-RZĘDOWE SOLE AMONIOWE</b>		
Bakteriostatycznie – adsorpcja na powierzchni komórki, uszkodzenie błony komórkowej, denaturacja białek, inaktywacja enzymów i zahamowanie szlaków metabolicznych.		
<b>Chlorek benzalkoniowy</b>	0,0025 – 0,02	do oczu
	0,004 – 0,02	doustnie, do nosa, do uszu, zewnętrznie
	0,02	pozajelitowo
<b>Chlorek benzetoniowy</b>	0,01	do oczu
	0,01 – 0,02	do uszu, pozajelitowo, zewnętrznie
<b>BIGUDANIDY</b>		
Bakteriostatycznie – w małych dawkach powodują lizę błony cytoplazmatycznej i wypływ składników komórkowych, a w większych bakteriobójczo - wytrącają białka cytoplazmatyczne i kwasy nukleinowe.		
<b>Octan, glukonian chlorheksydyny</b>	0,01- 0,05	do oczu, zewnętrznie
<b>FENOLE</b>		
Trucizny protoplazmatyczne – w zależności od stężenia działają bakteriostatycznie lub bakteriobójczo: w mniejszych stężeniach wpływają na przepuszczalność błon komórkowych (powodują ich lizę), a w większych - denaturację i koagulację białek, co prowadzi do zniszczenia układów enzymatycznych.		
<b>m-Krezol</b>	0,15 – 0,3	pozajelitowo, zewnętrznie
<b>Chlorokrezol</b>	0,05	do oczu
	0,1 – 0,3	pozajelitowo, zewnętrznie
<b>Fenol</b>	0,2 – 0,5	pozajelitowo

## 1.2. Wpływ pH na aktywność przeciwdrobnoustrojową środków konserwujących

Niezwykle ważnym parametrem decydującym o aktywności przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących jest pH preparatu. Od pH zależy dysocjacja środków konserwujących, ich trwałość oraz rozpuszczalność. Tylko niezdisocjowana forma środka konserwującego wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową, ponieważ w takiej formie środek konserwujący może przeniknąć przez bariery lipidowe komórek mikroorganizmów. Dodatkową trudnością jest fakt, że jony obdarzone ładunkiem nie są łatwo rozpuszczalne w lipidach.

O dysocjacji związku, a więc o zakresie pH, w którym środek konserwujący jest aktywny, decyduje stała dysocjacji ( $pK_a$ ). Jeżeli pH układu jest równe  $pK_a$  środka konserwującego, to środek konserwujący występuje w 50% w formie zdysocjowanej. Dzięki temu łatwo można przewidzieć stopień dysocjacji danego środka konserwującego w zależności od pH preparatu. Środki konserwujące o charakterze kwasów (np. kwas benzoowy, sorbowy, dehydrooctowy) mają niską wartość  $pK_a$ , tzn. około 4. Oznacza to, że w środowisku o niskim pH występują one w formie niezdisocjowanej, dlatego optimum ich działania występuje w preparatach o  $pH < 4$ , a w środowisku alkalicznym będą nieaktywne. Również w środowisku kwaśnym jest aktywny fenol ( $pK_a$  10). Natomiast tiomersal ( $pK_a$  4) w środowisku kwaśnym działa bakteriobójczo, a w środowisku alkalicznym bakteriostatycznie [14]. Parabenyl (estry kwasu parahydroksybenzoowego) charakteryzują się  $pK_a$  8,4, a optimum ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej występuje w preparatach o  $pH$  4 - 8. W układach o  $pH$  alkalicznym (powyżej 8,4) aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza parabenów powinna maleć, ale jeżeli są obecne jony sodowe powstają sole sodowe parabenów, które posiadają również właściwości przeciwdrobnoustrojowe [15]. Są też środki konserwujące, których aktywność nie zależy od pH preparatu. Przykładem są czwartorzędowe związki amoniowe o charakterze amfoterycznym. Oznacza to, że są zdysocjowane niezależnie od pH, a w konsekwencji ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe nie zależą od pH [5].

Od pH preparatu zależy również trwałość wielu środków konserwujących. Na przykład, dla bronopolu w czasie 5 lat stwierdzono 50% rozkładu w  $pH$  4, a w  $pH$  8 taki sam rozkład nastąpiłby w ciągu dwóch miesięcy. Podobną zależność wykazuje chlorobutanol, którego okres półtrwania w  $pH$  3 wynosi 90 lat, a w  $pH$  7,5 niecałe trzy miesiące [5]. Zatem często pojawia się problem w wyborze odpowiedniego pH, w celu

zapewnienia właściwej skuteczności i jednocześnie zachowania odpowiedniej trwałości danego środka konserwującego. Kwas sorbowy wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w kwaśnym środowisku (optymalne pH dla działania kwasu sorbowego wynosi około 4), jednakże w tych warunkach jest mniej trwały i bardziej podatny na utlenianie [14].

### 1.3. Interakcje środków konserwujących z substancjami pomocniczymi i opakowaniami

Problem konserwowania nowoczesnych, submikronowych układów dyspersyjnych jest nowy i tylko nieliczne prace dotyczą tego zagadnienia [16-21]. W układach tych występuje bardziej złożona struktura wewnętrzna w porównaniu z tradycyjnymi układami wielofazowymi (np. emulsje). Submikronowa wielkość powoduje zwiększenie powierzchni międzyfazowej. Dodatkowo w układach tych znacznie zwiększa się udział różnego rodzaju submikronowych struktur wewnętrznych tworzonych z udziałem lecytyny, która nie występuje w układach tradycyjnych. W emulsjach submikronowych, stabilizowanych lecytyną wykryto takie struktury jak: liposomy, micle blaszkowate i dyskowate, ciekłe kryształy, nanocząstki i struktury sieciowe [22, 23]. Jak opisano w p. 1 ważne jest, aby środek konserwujący był obecny w fazie wodnej, ponieważ migracja środka konserwującego poza tę fazę zmniejsza jego skuteczność działania. Mikroorganizmy rozwijają się tylko w środowisku wodnym, ale mogą gromadzić się w międzyfazie [5]. Różnice w rozmiarach cząstek rozproszonych oznaczają różnice w wielkości powierzchni międzyfazowej, ładunkach powierzchniowych i w konsekwencji w rozmieszczeniu występujących w nich związków amfifilnych (surfaktantów). Dodatkowo środki konserwujące mogą ulegać zamykaniu w strukturach submikronowych, przez co zmniejsza się ich stężenie aktywne w fazie wodnej, a więc skuteczność przeciwdrobnoustrojowa.

Bardzo często związki powierzchniowo czynne inaktywują środki konserwujące [24]. Szczególnie dotyczy to niejonowych surfaktantów np. lecytyny lub polisorbatu 80. Większa interakcja surfaktantów niejonowych ze środkami konserwującymi, w porównaniu z kationowymi i anionowymi, jest spowodowana mniejszymi wartościami ich krytycznego stężenia micelnego (cmc), wpływem pH oraz rozpuszczalnością. W celu przewidzenia interakcji danego surfaktantu ze środkiem konserwującym wymagana jest znajomość jego liczby HLB. Zmniejszenie skuteczności środków



konserwujących w obecności surfaktantów może następować w wyniku zamykania środków konserwujących wewnątrz tworzonych miceli lub w wyniku kompleksowania środków konserwujących [24]. Za pomocą metod fizykochemicznych można teoretycznie określić inaktywację środków konserwujących przez surfaktanty. Jednak tylko przeprowadzenie badania skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej pozwala na wiarygodną ocenę aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej środków konserwujących. Jeżeli w preparacie leczniczym lub kosmetycznym drobnoustroje giną zbyt wolno z powodu zbyt małego stężenia środka konserwującego lub jego interakcji z surfaktantem, może dojść do powstania oporności na dany środek konserwujący.

Środki konserwujące nie tylko ulegają interakcjom z substancjami pomocniczymi lub leczniczymi. Bardzo często czynnikami odpowiedzialnymi za zmniejszenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej są interakcje z opakowaniami leków w wyniku adsorpcji lub absorpcji środków konserwujących. Przykłady substancji konserwujących reagujących z substancjami leczniczymi i pomocniczymi, a także z opakowaniami przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Interakcje środków konserwujących z substancjami leczniczymi, pomocniczymi i opakowaniami [4, 5, 10, 14, 24 - 30]

Środek konserwujący	Substancje lecznicze i pomocnicze	Opakowania
<b>Alkohol benzyłowy</b>	Środki utleniające, silne kwasy, niejonowe surfaktanty, parabeny, czwartorzędowe sole amoniowe, metyloceluloza	Polietylen, polistyren, guma
<b>Bronopol</b>	Metabisiarczek sodu, tiosiarczan sodu, chlorowodorek cysteiny, lecytyna, polisorbata	Aluminium
<b>Cetrimid</b>	Mydła, anionowe surfaktanty, bentonit, azotan fenylortęciowy	Metale
<b>Chlorek benzalkoniowy</b>	Mydła, niejonowe surfaktanty (polisorbata 80), cytryniany, azotany, nadmanganiany, salicylany, jony srebra, winiany, glin, jodki, sól sodowa fluoresceiny, woda utleniona, kaolin, niektóre sulfonamidy, pochodne celulozy, guma arabska, alginiany, miękkie soczewki kontaktowe, węgiel bizmutu, talk, tlenek magnezu, węgiel wapnia	Plastik, guma

<b>Chlorek cetylopirydyniowy</b>	Mydła, związki anionowe, pochodne celulozy, guma arabska, alginiany	Plastik, guma
<b>Chlorheksydyna</b>	Mydła, związki anionowe, polisorbit 80, kaolin, alginiany, tragakanta, jony wapnia i magnezu, cynk, borany, dwuwęglany, węglany, chlorki, cytryniany, azotany, fosforany, siarczany, karmeloza sodowa, skrobia	Brak danych
<b>Chlorobutanol</b>	Talk, bentonit, karmeloza, tragakanta, poliawidon	Polietylen, guma, polihydroksyetylometakrylany
<b>Chlorokrezol</b>	Fosforan kodeiny, metyloceluloza, niejonowe surfaktanty, cetomakrogol 1000	Polipropylen, polietylen, guma
<b>Fenoksyetanol</b>	Pochodne celulozy (metyloceluloza, karmeloza sodowa, hypromeloza), niejonowe surfaktanty	Polichlorek winylu
<b>Fenol</b>	Pochodne celulozy, skrobia, guma arabska, tragakanta, alginiany, roztwory jodu, żelatyna, kamfora, mentol, tymol, fenacetyna, wodzian chloralu, rezorcyna, fosforan sodu	Brak danych
<b>Kwas sorbowy</b>	Zasady, środki redukujące i utleniające, niejonowe surfaktanty	Polipropylen, polietylen, polichlorek winylu
<b>Parabeny</b>	Talk, krzemian magnezowo-glinowy, pochodne celulozy, niejonowe surfaktanty, atropina, żelazo, sorbitol, słabe zasady, silne kwasy, skrobia, guma arabska, tragakanta, alginiany, żelatyna	Plastik, guma
<b>Tiomersal</b>	Silne kwasy i zasady, silne środki utleniające, chlorek sodu, lecytyna, związki fenylortęciowe, czwartorzędowe sole amoniowe, białka, EDTA	Guma, plastik, aluminium, metale

Konserwowanie układów dyspersyjnych jest utrudnione ze względu na stosunkowo małą trwałość fizyczną tego typu dyspersji w obecności wielu związków chemicznych oraz z powodu występujących interakcji pomiędzy środkami konserwującymi i substancjami pomocniczymi. Najczęściej dochodzi do oddziaływań pomiędzy środkami konserwującymi i surfaktantami – tworzą się kompleksy lub następuje zamykanie w micelach [24]. W micelach może też dochodzić do

specyficznych interakcji chemicznych pomiędzy środkiem konserwującym i związkiem powierzchniowo czynnym [9]. Stężenie środków konserwujących w układzie, wskutek powyższych reakcji, ulega zmniejszeniu, co prowadzi do zmniejszenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej [5].

Częstym problemem związaniem z konserwowaniem układów dyspersyjnych są oddziaływania środków konserwujących z substancjami wielkocząsteczkowymi zwiększającymi lepkość w zawiesinach. Substancje wielkocząsteczkowe mogą inaktywować środki konserwujące w wyniku oddziaływań chemicznych na skutek tworzenia wiązań wodorowych lub jonowych [9, 14]. Wiązania jonowe są przyczyną inaktywacji czwartorzędowych związków amoniowych przez anion karmelozy.

Dodatkowym problemem jest możliwość otaczania komórek bakteryjnych przez substancje pomocnicze, np. pochodne celulozy, co ogranicza dostępność środków konserwujących do mikroorganizmów. Badano wpływ na aktywność przeciwbakteryjną wobec *Pseudomonas aeruginosa* chlorokrezolu, parabenu metylowego i fenoksyetanolu w obecności pochodnych celulozy: metylocelulozy (MC), karmelozy (CMC) oraz hypromelozy (HPMC) [26]. CMC oraz HPMC w największym stopniu hamowały aktywność chlorokrezolu. Aktywność parabenu metylowego była zmniejszana tylko przez HPMC. Wszystkie trzy pochodne celulozy znacząco ograniczały działanie fenoksyetanolu. Stwierdzono, że pomiędzy chlorokrezolem i MC oraz parabenem metylowym i CMC dochodziło głównie do oddziaływań chemicznych. Zmniejszenie aktywności fenoksyetanolu następowało w wyniku otaczania komórek bakteryjnych przez badane pochodne celulozy. Natomiast za hamowanie aktywności przeciwbakteryjnej chlorokrezolu w obecności HPMC oraz parabenu metylowego w obecności MC i HPMC odpowiadały obydwie mechanizmy.

W układach zawiesin wielofazowych występuje możliwość adsorpcji drobnoustrojów na cząstkach zdyspergowanej fazy, co stwarza warunki zwiększonej ochrony i umożliwia przeżycie mikroorganizmom. Zawiesiny ze środkami zobojętniającymi sok żołądkowy są najczęściej zanieczyszczone bakteriami Gram ujemnymi, przykładem jest adsorpcja *Escherichia coli* na trójkrzemianie magnezu w wyniku oddziaływania elektrostatycznego [9]. Adsorpcji mogą ulegać również składniki odżywcze, występujące w danym preparacie farmaceutycznym, dodatkowo ułatwiając rozwój mikroorganizmom, ponieważ w postaci zaadsorbowanej są łatwiej dla nich dostępne.

W zawieszinach adsorpcji na cząstkach zdyspergowanej fazy mogą ulegać także środki konserwujące, co powoduje ograniczenie ich skuteczności przeciwdrobnoustrojowej (tabela 3).

#### 1.4. Konserwowanie układów emulsyjnych

W układach dwufazowych składających się tylko z fazy olejowej i wodnej stężenie środka konserwującego w fazie wodnej jest funkcją współczynnika podziału olej/woda ( $K_{o/w}$ ) i zależy od stosunku objętości fazy olejowej do wodnej (wzór 2). Współczynnik podziału olej/woda zależy od temperatury, pH, właściwości fazy olejowej.

$$K_{o/w} = \frac{C_o}{C_w} \quad (2)$$

$K_{o/w}$  – współczynnik podziału olej / woda w danej temperaturze

$C_o$  – stężenie środka konserwującego w fazie olejowej w stanie równowagi

$C_w$  - stężenie środka konserwującego w fazie wodnej w stanie równowagi

Chociaż wartość  $K_{o/w}$  w zależności od rodzaju fazy olejowej może być różna, przyjmuje się, że istnieje korelacja pomiędzy wartością  $K_{o/w}$  i log P (oktanol/woda).

W zależności do rodzaju oleju (mineralny lub roślinny) różne jest powinowactwo środków konserwujących do fazy olejowej. Na przykład, parabeny metylowy i propylowy charakteryzują dla oleju mineralnego  $K_{o/w}$  odpowiednio 0,02 i 0,5, a dla oleju sojowego odpowiednio 6,1 i 65,9 [14]. Lepszym środkiem konserwującym dla układu dwufazowego byłby środek konserwujący słabo rozpuszczalny w olejach np. fenoksyetanol (dla oleju roślinnego  $K_{o/w}$  2,6). Niestety nie zawsze teoretycznie dobrane stężenie środka konserwującego zapewnia właściwą ochronę mikrobiologiczną danego układu. Chociaż substancje o charakterze hydrofilowym ulegają dystrybucji głównie do fazy wodnej, to jednak substancje te są mniej aktywne mikrobiologicznie. Nie zapewnia to faktycznie właściwej ochrony mikrobiologicznej preparatu, ponieważ właściwości hydrofilowe utrudniają im wnikanie do komórek drobnoustrojów.

W fazie wodnej występuje frakcja wolna środka konserwującego, aktywna mikrobiologicznie. W celu określenia frakcji wolnej środka konserwującego w fazie wodnej należy uwzględnić stosunek objętości fazy olejowej do fazy wodnej [14].

$$C_w = C \frac{\phi + 1}{K_{o/w} \times \phi + 1} \quad (3)$$

$C_w$  – stężenie wolnego środka konserwującego w fazie wodnej

$C$  – całkowite stężenie środka konserwującego w układzie

$\phi$  - stosunek objętości fazy olejowej do wodnej układu

$K_{o/w}$  – współczynnik podziału olej / woda (w danej temperaturze)

Na przykład badano dystrybucję chlorokrezolu w emulsji zawierającej olej arachidowy (20%).  $K_{o/w}$  chlorokrezolu dla oleju arachidowego wynosi 116,7, a całkowite stężenie chlorokrezolu w układzie wynosiło 0,1%. Podstawiając powyższe wartości do wzoru uzyskuje się teoretycznie, że stężenie chlorokrezolu w fazie wodnej powinno wynosić 0,004%. Obliczone tak małe stężenie chlorokrezolu w fazie wodnej jest poniżej stężenia hamującego wzrost mikroorganizmów [14].

W układach dyspersyjnych, oprócz fazy olejowej i wodnej, dzięki obecności emulgatora tworzy się trzecia faza tzw. międzyfaza. Środki konserwujące mogą ulegać do niej dystrybucji, wiązać się z nią, w wyniku czego maleje ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Przedstawione powyżej wzory nie są przydatne do dokładniejszego określania rozmieszczenia substancji w emulsjach, ponieważ nie uwzględniają gromadzenia się środków konserwujących w międzyfazie. Ponadto w fazie wodnej występują micelle surfaktantu, które mogą zamykać cząsteczki środka konserwującego. Faktycznie stężenie wolnego (aktywnego mikrobiologicznie) środka konserwującego w fazie wodnej ( $C_w$ ) będzie częścią całkowitego stężenia środka konserwującego w fazie wodnej ( $C_A$ ) [6]. Zaproponowano wzór pozwalający obliczyć stężenie wolnego (aktywnego mikrobiologicznie) środka konserwującego w fazie wodnej ( $C_w$ ) uwzględniając gromadzenie się jego w micelach:

$$C_w = \frac{C(\phi + 1)}{K_{o/w} \times \phi + R} \quad (4)$$

$C_w$  – stężenie wolnego środka konserwującego w fazie wodnej

$C$  – całkowite stężenie środka konserwującego w układzie

$C_A$  - całkowite stężenie środka konserwującego w fazie wodnej (razem z międzyfazą)

$\phi$  - stosunek objętości fazy olejowej do wodnej układu

$K_{o/w}$  – współczynnik podziału olej / woda

$R$  – stała surfaktantu możliwa do obliczenia z przebiegu krzywej zależności  $C_A/C_w$  i stężenia surfaktantu, podczas gdy  $k$  jest nachyleniem krzywej

$$R = 1 + k(\text{stężenie surfaktantu}) \quad (5)$$

Dalsze wzory (6-10) pozwalające określić dystrybucję środków konserwujących pomiędzy fazy emulsji submikronowych przedstawiono na str. 34.

## 2. SUBMIKRONOWE UKŁADY DYSERSYJNE

### 2.1. Emulsje submikronowe

Emulsje submikronowe to dyspersje oleju w wodzie charakteryzujące się wielkością kropli olejowych poniżej 1  $\mu\text{m}$  (zwykle 100-500 nm) [31]. Submikronowe rozmiary kropli olejowych umożliwiają stosowanie tych emulsji dożylnie oraz w żywieniu pozajelitowym (od ponad 50 lat). Służą one jako źródło energii, pokrywając 15-40% zapotrzebowania energetycznego zwykłych chorych i do 60% zapotrzebowania energetycznego chorych wymagających ograniczenia podaży glukozy. Oprócz tego emulsje tłuszczowe dostarczają organizmowi niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (głównie linolowego i linolenowego) potrzebnych do syntezy m.in. prostaglandyn i tromboksanów [32, 33]. Oprócz tego wykorzystywane są jako nośniki dla substancji hydrofobowych podawanych pozajelitowo: diazepam, propofol, etomidat, a także witamin rozpuszczalne w tłuszczach (A, D, E i K) [33, 34]. Emulsje submikronowe są kontrolowane na obecność cząstek powyżej 5  $\mu\text{m}$ , które mogłyby powodować embolię naczyń krwionośnych, a w konsekwencji prowadziłyby do uszkodzenia tkanek, procesów zapalnych i zaburzenia funkcji poszczególnych narządów [35].

Emulsje submikronowe składają się z fazy olejowej i fazy wodnej. Składnikami fazy olejowej są oleje pochodzenia naturalnego (najczęściej w stężeniu 100-200 g/l): sojowy, bawełniany, kukurydziany, sezamowy, rzadziej oliwkowy, szafranowy czy rybi oraz oleje półsyntetyczne o średniej długości łańcucha (MCT, Miglyol) [31, 32, 36, 37].

W emulsjach submikronowych emulgatorem jest lecytyna jajowa lub sojowa (lub jej izolowane frakcje) [37]. Pomimo stosunkowo słabych właściwości emulgujących, lecytyna stanowiąca mieszaninę fosfolipidów, jest jedynym emulgatorem w dożylnych emulsjach handlowych, co wynika z faktu dużej biozgodności z tkankami - fosfolipidy są naturalnymi składnikami strukturalnymi błon komórkowych oraz błon cytoplazmatycznych wielu organelli komórkowych. Optymalne stężenie lecytyny warunkujące odpowiednią trwałość i wielkość cząstek olejowych wynosi 12 g/l [36]. Oprócz lecytyny, w emulsjach submikronowych stosowanych innymi drogami niż dożylnie, stosuje się czasami niejonowe surfaktanty, takie jak polisorbat (Tween 80) lub glikol polioksyetylenopolioksypropylenowy (poloksamer) [31].

Emulsje submikronowe podawane dożylnie powinny być izotoniczne i izohydryczne. Najczęściej stosowaną substancją izotonizującą jest glicerol [31]. W celu ochrony emulsji przed procesami utleniania często stosuje się przeciwutleniacze np.  $\alpha$ -tokoferol (emulsje do oczu), kwas askorbowy oraz EDTA [31].

Słaby emulgator, jakim jest lecytyna, nie wystarcza do utworzenia stabilnej emulsji tradycyjnej. Trwałość emulsji submikronowych z lecytyną zapewniona jest dzięki małej wielkości cząstek oleju, które podlegają ruchom Browna, a to zapobiega ich łączeniu się. Ważny jest również ujemny ładunek kropli oleju w wyniku dysocjacji fosfolipidów. Lecytyna stabilizuje emulsje submikronowe w wyniku wytwarzania elektrostatycznej bariery lub ładunku powierzchniowego. Elektryczny ładunek powierzchniowy kropli olejowych jest tworzony w wyniku jonizacji składników tworzących międzyfazę. Emulsje submikronowe charakteryzują się wysokim ujemnym potencjałem zeta (-40 mV) [31, 37, 38]. Potencjał zeta zależy od pH emulsji, ponieważ od pH zależy stopień dysocjacji kwasów tłuszczowych a także fosfolipidów. Głównymi składnikami lecytyny są fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina, przy czym fosfatydylocholina nie posiada ładunku elektrycznego i jest obojętna w szerokim zakresie pH, natomiast fosfatydyloetanolamina posiada ładunek ujemny.

Optymalne pH zapewniające fizjologiczną zgodność i jednocześnie trwałość emulsji submikronowych to pH 7-8. Podczas wyjaławiania termicznego emulsji pH

ulega obniżeniu z powodu hydrolizy kwasów tłuszczowych [32, 39]. Dlatego początkowe pH powinno wynosić około 8, co uzyskuje się najczęściej za pomocą roztworu wodorotlenku sodu, aby po wyjałowieniu uzyskać pH 7-8.

Do emulsji submikronowych mogą być dodawane substancje stabilizujące, zdolne do lokalizacji w międzyfazie np. kwas olejowy, kwas cholowy, kwas deoksycholowy oraz odpowiednio ich sole sodowe. Z reguły takie substancje są amfifilowe i mają słabe właściwości emulgujące, ale stabilizują międzyfazę w wyniku interakcji międzycząsteczkowych i zwiększania elektrostatycznego ładunku powierzchniowego kropli olejowych [32].

Podczas sporządzania emulsji submikronowych osobno przygotowuje się fazę olejową i osobno wodną, a następnie łączy się obie fazy ogrzane do tej samej temperatury (70-80°C). Zasadniczym etapem jest poddanie wstępnej emulsji procesowi zmniejszenia wielkości cząstek, co gwarantuje stabilność emulsji. W tym celu utworzoną emulsję wstępną poddaje się mieszanemu mieszadłem szybkoobrotowym oraz homogenizacji wysokociśnieniowej [36, 37, 40]. Szczegółowy opis metody sporządzania emulsji submikronowych znajduje się w dziale Metodyka (p. 2.1).

Emulsje submikronowe niezawierające substancji leczniczych są stabilne przez okres 2-3 lat [41, 42]. Emulsje należy przechowywać w temperaturze do 25°C, ponieważ wyższa temperatura przyspiesza ich destabilizację. Nie powinno się zamrażać tych układów, ponieważ może to prowadzić do złamania układu emulsyjnego.

Emulsje submikronowe charakteryzują się złożoną strukturą wewnętrzną. Obecne są cząstki o różnej budowie. Metodami niskokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS), spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^{31}\text{P}$  NMR) oraz za pomocą elektronowego mikroskopu transmisyjnego (TEM) badano strukturę wewnętrzną handlowych emulsji submikronowych różniących się rodzajem fazy olejowej i emulgatora [36, 43]. Stwierdzono obecność w emulsjach submikronowych:

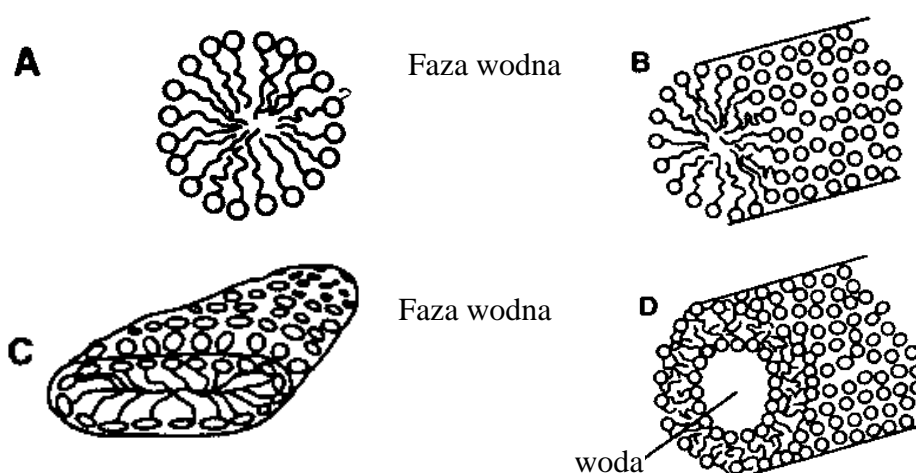
- kropele oleju pokrytych monowarstwą lub wielowarstwą emulgatora,
- podwójnych kropele olejowych,
- małych jednowarstwowych liposomów (SUV),
- śladowych ilości hydrofobowych białek.

Stwierdzono, że tylko 28% emulgatora jest zaangażowane w tworzenie dwuwarstwowych struktur, przy czym nie stwierdzono obecności dużych



jednowarstwowych liposomów oraz mieszanych miceli [43]. W fazie wodnej stwierdzono obecność rozpuszczalnych w wodzie produktów degradacji fosfolipidów, natomiast nie wykryto lizofosfolipidów w tej fazie, co wskazuje na fakt, że są one głównie zaangażowane w strukturach warstwowych [43].

Ogólnie uznaje się, że struktura wewnętrzna submikronowych układów dyspersyjnych jest bardziej skomplikowana niż tradycyjnych rozproszeń lipidowych. Poza fazą olejową, wodną międzyfazą i czasem fazą liposomalną, obecna jest większa liczba różnego rodzaju mikrostruktur. W zależności od rodzaju emulgatora tworzą się różne rodzaje struktur micelarnych (ryc. 1).



Ryc. 1. Rodzaje struktur micelarnych w układach dyspersyjnych (opis w tekście) [44].

Przy małym stężeniu emulgatora występują micelle sferyczne (ryc. 1 A) o dobrze określonej liczbie agregacji, w wyniku czego są to układy monodispersyjne. Znacznie powyżej krytycznego stężenia micelarnego micelle ulegają zniekształceniu - mają postać cylindryczną (ryc. 1 B), płaskich dysków (ryc. 1 C) lub miceli rurkowych (ryc. 1 D). Natomiast przy bardzo dużych stężeniach surfaktantów tworzą się ciekłe kryształy [44]. W specyficznych warunkach surfaktanty mogą tworzyć błony dwuwarstwowe. Jeżeli błona taka jest ciągła i zawiera wewnątrz fazę wodną, tworzą się liposomy.

W celu dokładniejszego określenia dystrybucji środków konserwujących w układach submikronowych (emulsje dożyłne), uwzględniając bardziej złożoną strukturę wewnętrzną, Han i in. [16] zaproponowali nowy model matematyczny, który pozwala obliczyć dystrybucję środka konserwującego pomiędzy cztery fazy układu emulsyjnego: fazę wodną, olejową, międzyfazę i fazę liposomalno-micelarną. Przy stosowaniu poniżej przedstawionych wzorów niezbędna jest znajomość współczynnika

podziału ( $P$ ), całkowitego stężenia środka konserwującego w układzie emulsyjnym ( $m_{tot}$ ), stężenia w fazie wodnej ( $C_w$ ) oraz w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” ( $C_c$ ). W celu uzyskania  $C_w$  należy usunąć z fazy „wodno-liposomalno-micelarnej” frakcję submikronową np. stosując metodę ultrafiltracji.

$$F_w = \frac{C_w \times V_w}{m_{tot}} \quad (6)$$

$$F_l = \frac{(C_c - C_w) \times V_w}{m_{tot}} \quad (7)$$

$$F_{o+i} = 1 - (F_l - F_w) \quad (8)$$

$$F_o = \frac{P \times C_w \times V_o}{m_{tot}} \quad (9)$$

$$F_i = F_{o+i} - F_o \quad (10)$$

$F_w, F_l, F_{o+i}, F_o, F_i$  - frakcja środka konserwującego w fazach: wodnej, liposomalno-micelarnej, olejowej i międzyfazie, olejowej, w międzyfazie,

$C_w$  - stężenie w fazie wodnej bez frakcji submikronowej (po ultrafiltracji),

$C_c$  - stężenie w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” (po ultrawirowaniu),

$V_w$  - objętość fazy wodnej,

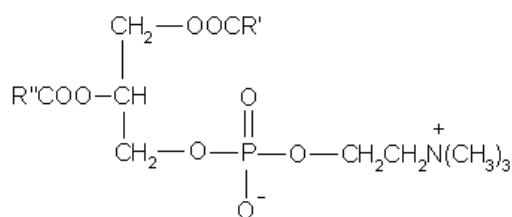
$V_o$  - objętość fazy olejowej,

$m_{tot}$  - całkowita zawartość środka konserwującego w emulsji,

$P$  - współczynnik podziału olej/woda.

## 2.2. Wodne dyspersje lecytyny (WLD)

Wodne dyspersje lecytyny (WDL) są układami o prostym składzie, złożonymi z biozgodnych składników: wody, lecytyny (jajowej lub sojowej) oraz glicerolu (substancji zapewniającej odpowiednie ciśnienie osmotyczne). Wodne dyspersje lecytyny charakteryzują się submikronową wielkością cząstek fosfolipidowych [46]. Lecytyna jest mieszaniną fosfolipidów: głównie fosfatydylocholiny (98%) (ryc. 2), fosfatydyloetanolaminy, fosfatydyloseryny i fosfatydyloinozytolu [7].



Ryc. 2. Wzór strukturalny fosfatydylocholiny ( $R'$ ,  $R''$  – reszty kwasów tłuszczowych).

Przy pierwszym węglu glicerolu są głównie nasycone i jednonienasycone kwasy tłuszczowe (palmitynowy, stearynowy, oleinowy) ( $R'$ ), a przy drugim węglu - wielonienasycone kwasy tłuszczowe ( $R''$ ). W zależności od rodzaju surowca, z którego lecytyna jest otrzymywana, różny jest jej skład glicerofosfolipidowy oraz charakter i ilość poszczególnych kwasów tłuszczowych. Lecytyna sojowa charakteryzuje się większą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (64%) oraz mniejszą kwasów nasyconych (24%) w porównaniu z lecytiną jajową, dla której wartości te wynoszą odpowiednio 17 i 46% [47]. Z tego powodu lecytyna jajowa jako bardziej odporna na utlenianie jest częściej stosowana jako substancja pomocnicza w technologii postaci leków, natomiast lecytyna sojowa jest podstawowym składnikiem liposomów. Do celów farmaceutycznych stosuje się lecytynę oczyszczoną i odolejoną, pozbawioną glicerydów, cholesterolu i jego estrów.

Lecytyna rozpuszcza się w alifatycznych i aromatycznych węglowodorach, oleju mineralnym, kwasach tłuszczowych, natomiast jest praktycznie nierozpuszczalna w zimnych olejach roślinnych i zwierzęcych, polarnych rozpuszczalnikach i w wodzie. Lecytyna zmieszana z wodą tworzy dyspersje [7].

Lecytyna posiada właściwości dyspergujące, emulgujące oraz stabilizujące, dzięki którym ma zastosowanie w [7]:

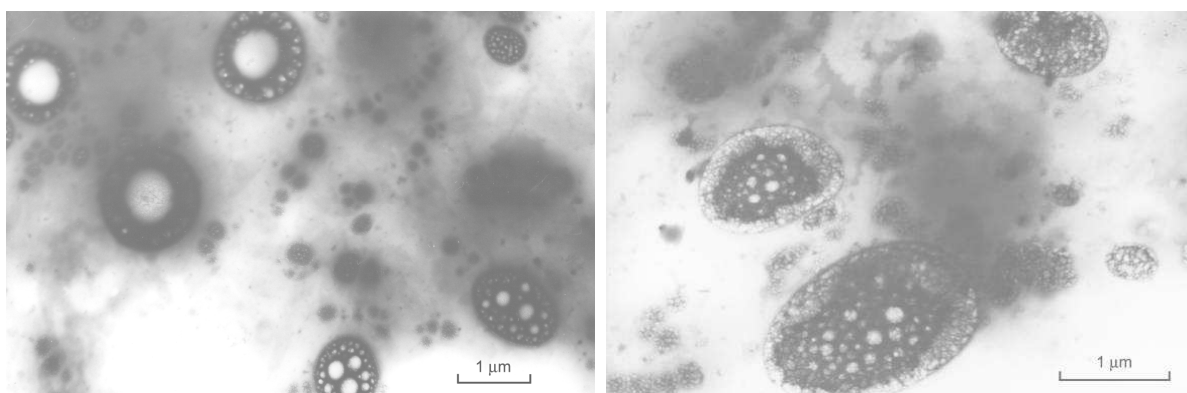
- emulsjach submikronowych (emulgator),
- liposomach (buduje dwuwarstwę fosfolipidową),
- mieszanych micelach (ułatwia solubilizację substancji leczniczych),
- czopkach (wpływa na właściwości reologiczne podłoża czopkowego zmniejszając jego lepkość) [48],
- aerozolach i preparatach podawanych w zaburzeniach oddychania u noworodków (suplementacja naturalnego surfaktantu),
- jako stabilizator tłuszczów – głównie lecytyna sojowa, która dzięki obecności kwasów nienasyconych działa przeciwutleniająco,

- suplementach diety jako substancja wspomagająca procesy zapamiętywania,
- preparatach kosmetycznych jako składnik płynów do kąpieli i kremów (wspomaga odbudowę naturalnej bariery lipidową skóry).

W Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej AMG opracowano technologię otrzymywania wodnych dyspersji lecytyny [49]. WLD zawierające lecytynę w stężeniu 1-5% (m/m) stanowią potencjalne nośniki substancji leczniczych. W celu sporządzenia WLD w początkowym etapie miesza się składniki w wodzie w temperaturze 60°C, po czym następują etapy:

- sonikacji,
- korekty pH,
- ponownej sonikacji,
- dozowania w atmosferze azotu do opakowań,
- wyjałowienia termicznego.

WLD nie znalazły jeszcze zastosowania w leczeniu jako nośniki substancji leczniczych, a ich struktura wewnętrzna nie jest dokładnie poznana. W Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej AMG od kilku lat prowadzone są badania nad zastosowaniem WLD jako nośników substancji leczniczych podawanych pozajelitowo [50]. Uważa się, że ze względu na amfifilne właściwości fosfolipidów, z ich udziałem mogą być tworzone micelle blaszkowate i dyskowate, liposomy, ciekłe kryształy, nanocząstki oraz struktury sieciowe [23]. W prowadzonych w Katedrze badaniach z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, stwierdzono obecność w WLD dwóch rodzajów struktur submikronowych (ryc. 3) [51].



Ryc. 3. Struktura WLD - obserwacje za pomocą mikroskopu elektronowego [51].

Oba rodzaje struktur mają charakter makrocząstek. Nie są to typowe agregaty micelarne, ponieważ granice obserwowanych struktur są regularne i ostro widoczne. Nie wykryto liposomów, czyli cząstek wielowarstwowych, chociaż ich obecność nie jest całkowicie wykluczona. Obserwowane struktury były najbardziej podobne do struktur obecnych w mieszanych micelach.

### 2.3. Liposfery

Liposfery to kuliste cząstki lipidowe o wielkości 0,01 – 100  $\mu\text{m}$ , które w zależności od wielkości można podzielić na mikrosfery lipidowe i nanosfery lipidowe [52]. Chociaż mikrosfery polimerowe są stosowane pozajelitowo w lecznictwie, to ani mikrosfery ani nanosfery lipidowe nie znalazły jeszcze zastosowania klinicznego. W literaturze dużo prac dotyczy zastosowania nanosfer lipidowych w kosmetyce. Niestety pomimo dużego zainteresowania nanosferami lipidowymi przemysłu kosmetycznego nie ma jeszcze metod konserwacji tych układów.

Nanosfery lipidowe charakteryzują się średnicą cząstek poniżej 1  $\mu\text{m}$  (100 – 300 nm), dzięki czemu mogłyby być podawane podskórną, domięśniowo, do płuc, do oka, doustnie, a także dożylnie. W lecznictwie nanosfery lipidowe mogą być podawane jako wodna zawiesina lub mogą wchodzić w skład tradycyjnych postaci leku, takich jak: peletki, tabletki, kapsułki, kremy lub maści [53-57].

Nanosfery lipidowe są potencjalnymi nośnikami substancji leczniczych zarówno hydrofilowych jak i lipofilowych [56, 57]. Układy te przeznaczone byłyby do stosowania w postaci wodnej zawiesiny stabilizowanej emulgatorami i innymi substancjami pomocniczymi [52].

Wśród nanosfer lipidowych można wyróżnić:

- stałe nanocząstki lipidowe (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN), których matryca zbudowana jest ze stałych lipidów,
- nanostrukturalne nośniki lipidowe (*Nanostructured Lipid Carriers*, NLC) zawierające matrycę złożoną ze stałych i ciekłych lipidów.

Podstawowym składnikiem matrycy nanosfer lipidowych są lipidy stałe w temperaturze pokojowej i temperaturze organizmu ludzkiego, na przykład: wysokooczyszczone triglicerydy, częściowe glicerydy, kwasy tłuszczowe oraz woski [52]. Najczęściej stosowanymi lipidami są: Precirol (ester glicerolu z kwasem palmitostearynowym) o temperaturze topnienia 53-57°C, Compritol (ester glicerolu z

kwasem behenowym) o temperaturze topnienia 69-74°C, a także wosk pszczele (ester długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i długołańcuchowych alkoholi jednowodorotlenowych) o temperaturze topnienia 62-66°C [7]. Po aplikacji stała matryca liposfer ulega biodegradacji na drodze trawienia przez lipazy ludzkiego organizmu, a uwalnianie substancji leczniczych jest przedłużone nawet do kilku dni [52]. Nanosfery NLC zawierają dodatek lipidów ciekłych np. Miglyolu lub oleju z nasion porzeczek czarnych. Zastosowanie lipidu ciekłego ma teoretycznie zwiększyć inkorporację substancji leczniczej i zmniejszyć efekt jej wykluczania z lipidowej matrycy [54] w czasie zestalania, gdyż zostaje zaburzona zwarta struktura liposfer oraz większa jest rozpuszczalność substancji leczniczych w ciekłych lipidach [58].

Müller i in. [59] oraz Jening i in. [60] uważają, że NLC mają strukturę sferyczną, w której olej jest wewnątrz stałej matrycy lipidowej. Natomiast Jores i in. [61] zaproponowali strukturę płytkową NLC, w której olej jest między płytką stałego lipidu, a powierzchnia emulgatora znajdującego się na zewnątrz, czyli poza stałą matrycą lipidową.

Substancja lecznicza w nanosferach może być zlokalizowana w [53, 56]:

- całej objętości matrycy w postaci rozproszenia stałego,
- otoczce cząstki lipidowej,
- rdzeniu cząstki lipidowej.

Istnieje kilka metod otrzymywania liposfer, dzięki którym można uzyskać nanosfery lub mikrosfery różniące się wielkością cząstek [53, 57]. Najczęściej wykorzystywane to metody:

- homogenizacji wysokociśnieniowej,
- tworzenia mikroemulsji.

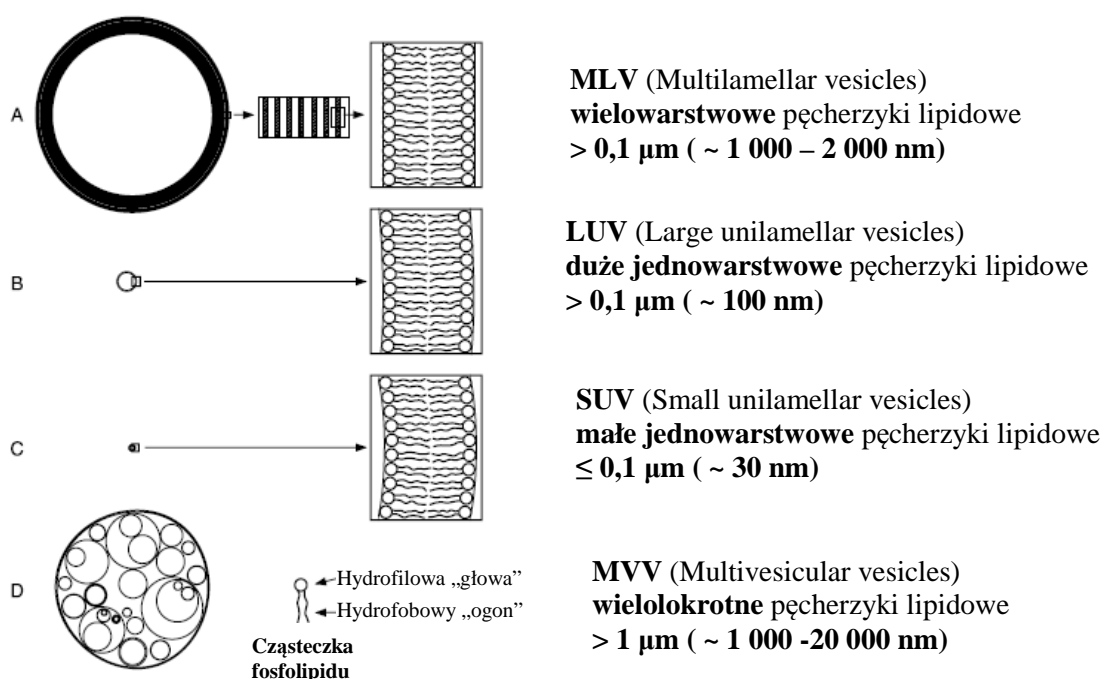
Dużym problemem podczas przechowywania zawiesin liposfer jest ich destabilizacja objawiająca się żelowaniem [58, 62]. W układach tych dochodzi do aglomeracji cząstek [55] i zwiększania ich wielkości oraz często do wykluczania substancji leczniczej z matrycy lipidowej [58]. W celu poprawy stabilności fizycznej liposfer należy odpowiednio dobrać skład matrycy lipidowej, rodzaj emulgatora i współemulgatora, składniki i pH fazy dyspersyjnej oraz właściwości inkorporowanych substancji leczniczych. Na trwałość zawiesiny liposfer podczas przechowywania wpływa ekspozycja na światło, temperatura oraz materiał opakowań. Destabilizująco w

procesie otrzymywania liposfer działają sonikacja, proces sterylizacji oraz suszenie rozpyłowe [59].

Można tworzyć koncentraty liposfer (żele), które rozcieńcza się przed zastosowaniem [55, 62, 63]. Dodatkowo ze względu na większą zawartość lipidu (do 80%), zarówno w przypadku koncentratu SLN [63], jak i NLC [54, 55], możliwa jest inkorporacja większej ilości substancji leczniczej.

## 2.4. Liposomy

Liposomy są kulistymi pęcherzykami o wielkości 0,05 – 5,0  $\mu\text{m}$  zbudowanymi z wodnego rdzenia i fosfolipidowej otoczki [64]. Otoczki liposomów składają się z podwójnych warstw fosfolipidowych, pomiędzy którymi obecne są przestrzenie wodne [65]. Liposomy jednowarstwowe zbudowane są z pojedynczej dwuwarstwy lipidowej. Otoczki zbudowane są z naturalnych (lecytyna) i/lub syntetycznych (fosfo- i sfingolipidy) lipidów i mogą zawierać również inne składniki, takie jak cholesterol lub hydrofilowe polimery [64, 65]. Skład lipidowy i modyfikacja powierzchni otoczki decyduje o zastosowaniu terapeutycznym liposomów, ponieważ determinują one sposób oddziaływania tych dyspersji z błoną komórkową [64, 66]. W zależności od wielkości i liczby warstw otoczki wyróżnia się liposomy: jednowarstwowe, duże jednowarstwowe, wielowarstwowe oraz wielokrotne (ryc. 4).



Ryc. 4. Rodzaje liposomów w zależności od wielkości i liczby warstw otoczki [64, 65].

Zaletami liposomów są: biodegradowalność i biogodność. Lipidy liposomalne zgodne są ze składnikami błon biologicznych [65, 67, 68], a więc pozbawione są działania toksycznego i uczulającego. Rozmiary cząstek liposomów umożliwiają podawanie dożylnie. W liposomach można inkorporować zarówno substancje hydrofilne, jak i lipofilne. Substancje lecznicze, w zależności od lipofilności, mogą lokalizować się w obrębie liposomu w warstwie wodnej (substancje hydrofilne) lub w błonie fosfolipidowej (substancje lipofilne). Substancja lecznicza zamknięta wewnątrz struktury liposomów jest chroniona przed zbyt szybkim uwolnieniem, dzięki czemu wykazuje przedłużone działanie.

Bardzo dużo badań dotyczy zastosowania liposomów jako potencjalnych nośników substancji aktywnych biologicznie w terapii genowej, chemio- i immunoterapii, miejscowo w chorobach skóry, diagnostyce [67, 68]. Liposomy wykorzystuje się w biotechnologii i kosmetyce [65]. W praktyce podstawowym zastosowaniem liposomów jest terapia celowana w leczeniu chorób nowotworowych. Liposomy są nośnikami doksorubicyny, daunorubicyny, jak również amfoterycyny B stosowanej w leczeniu zakażeń grzybiczych oraz amikacyny stosowanej w leczeniu ciężkich zakażeń bakteryjnych [69]. Podawanie w postaci liposomów pozwala zmniejszyć toksyczność tych substancji leczniczych. Preparaty liposomalne mogą być podawane: domięśniowo, doustnie, donosowo, do płuc, a także miejscowo. Postacie farmaceutyczne z liposomami to: zawiesiny, aerozole, maści, kremy, lotiony [67, 68]. Ze względu na trwałość czasem są przechowywane w postaci liofilizatów.

Istnieje wiele metod otrzymywania liposomów. Jedną z prostych metod najczęściej stosowanych w warunkach laboratoryjnych jest metoda Banghama. W metodzie tej składniki rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym, a następnie podczas odparowywania rozpuszczalnika na ściankach w kolbie okrągłodennej tworzy się film lipidowy. Roztwór substancji leczniczej wytrząsa się w kolbie z perełkami szklanymi, co powoduje odrywanie „filmu” od ścianek kolby. Otrzymuje się zawiesinę wielowarstwowych liposomów o różnej wielkości. W celu ujednoczenia ich wielkości można poddać je (po ochłodzeniu) ekstruzji (przetłaczaniu przez odpowiednie filtry) lub homogenizacji wysokociśnieniowej czy działaniu ultradźwięków [70].

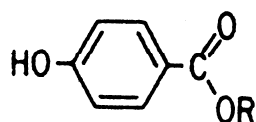
Niestety powszechne stosowanie na szeroką skalę liposomów jako nośników substancji leczniczych ograniczają m.in. niska stabilność fizykochemiczna, wysoki koszt produkcji, termolabilność fosfolipidów oraz podatność na procesy utleniania i hydrolizy, krótki czas półtrwania *in vivo* [64, 67, 68].



### 3. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH

#### 3.1. Parabeny

Parabeny, czyli estry kwasu parahydroksybenzoesowego (ryc. 5), są najszerzej stosowanymi środkami konserwującymi zarówno w przemyśle farmaceutycznym, jak i w przemyśle kosmetycznym oraz spożywczym [71].



#### Estry kwasu p-hydroksybenzoesowego

**R = CH<sub>3</sub> - metylowy**

**C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> - etylowy**

**C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> - propylowy**

**C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> - butylowy**

Ryc. 5. Wzór strukturalny parabenów.

Najczęściej są stosowane: ester metylowy (paraben M), ester etylowy (paraben A), ester propylowy (paraben P) oraz ester butylowy (paraben B). Parabeny mogą być stosowane pojedynczo lub w mieszaninie (głównie parabeny M i P oraz M i A). Mogą być też stosowane w połączeniu z innymi środkami konserwującymi. Parabeny używane są w preparatach farmaceutycznych przeznaczonych do podania różnymi drogami (tabela 4).

Tabela 4. Stężenia parabenów w preparatach farmaceutycznych [7]

Postacie leków	Stężenie [%]	
	paraben M	paraben P
Domięśniowo, dożylnie, podskórnice	0,065 – 0,25	0,005 – 0,035
Roztwory do inhalacji	0,025 – 0,07	0,015
Iniekcje śródskórne	0,10	0,02 – 0,26
Preparaty donosowe	0,033	0,017
Preparaty do oczu	0,015 – 0,2	0,005 – 0,01
Roztwory i zawiesiny doustne	0,015 – 0,2	0,01 – 0,02
Preparaty doodbytnicze	0,1 – 0,18	0,01 – 0,02
Preparaty miejscowe	0,02 – 0,3	0,01 – 0,6
Preparaty dopochwowe	0,1 – 0,18	0,02 – 0,1

Parabeny zostały po raz pierwszy otrzymane w 1924 roku przez Sabalitschaka [14], który poszukiwał alternatywnych substancji przeciwdrobnoustrojowych dla kwasu salicylowego i benzooesowego – środków konserwujących skutecznych tylko w środowisku mocno kwaśnym. W wyniku estryfikacji kwasu p-hydroksybenzooesowego różnymi alkoholami alifatycznymi i aromatycznymi otrzymał związki skuteczne przeciwbakteryjnie w szerokim zakresie pH. Paraben metylowy po raz pierwszy został opisany w piętnastej edycji Farmakopei Szwedzkiej w 1934 roku, a w Stanach Zjednoczonych w National Formulary VII w 1942 r. Oba estry – metylowy i propylowy, po raz pierwszy pojawiły się w USP XIII w 1947 roku.

W tabeli 5 przedstawiono nazewnictwo, wzory chemiczne, masy cząsteczkowe parabenów [7]. Najczęściej spotykane nazwy synonimowe parabenów to Nipaginy, Aseptiny, Solbrole, Tegosepty.

Tabela 5. Rodzaje parabenów, nazwy i wzory chemiczne, masy cząsteczkowe [7]

Paraben	Nazwa chemiczna	Wzór chemiczny	Masa cząsteczkowa
Metylowy	4-hydroksybenzoesan metylu	$C_8H_8O_3$	152,15
Etylowy	4-hydroksybenzoesan etylu	$C_9H_{10}O_3$	166,18
Propylowy	4-hydroksybenzoesan propylu	$C_{10}H_{12}O_3$	180,20
Butylowy	4-hydroksybenzoesan butylu	$C_{11}H_{14}O_3$	194,23

Parabeny mają postać białego lub prawie białego krystalicznego proszku. Paraben M jest trudno rozpuszczalny w wodzie, a paraben P bardzo trudno rozpuszczalny w wodzie. Oba parabeny są łatwo rozpuszczalne w metanolu i etanolu [7]. Wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej lipofilność parabenów rośnie, a ich rozpuszczalność w wodzie maleje (tabela 6). Istnieje liniowa zależność pomiędzy długością łańcucha alkilowego i rozpuszczalnością parabenów w wodzie oraz pomiędzy długością łańcucha alkilowego i współczynnikiem podziału olej/woda. Roztwory parabenów są bezbarwne. Parabeny w postaci substancji powinny być przechowywane w suchym i ciemnym miejscu.

Tabela 6. Właściwości fizykochemiczne parabenów, rozpuszczalność oraz współczynnik podziału ( $K_{o/w}$ ) olej roślinny / woda [5, 7]

	Paraben M	Paraben P
<b>Właściwości</b>		
Fizyczna postać	Biały lub prawie biały krystaliczny proszek	
Gęstość (g/cm <sup>3</sup> )	1,352	1,288
Stała dysocjacji (pK <sub>a</sub> ) (22°C)	8,4	8,4
Temperatura topnienia (°C)	125 – 128	96 – 99
Log P	2,00	2,98
<b>Rozpuszczalność [g/100g] w temp. 25°C</b>		
Metanol	59,0	124,0
Etanol	52,0	95,0
Etanol (10%)	0,5	0,1
Etanol (50%)	18,0	18,0
Gliceryna	1,7	0,4
Olej mineralny	0,01	0,03
Olej arachidowy	0,5	1,4
Glikol propylenowy	22,0	26,0
Woda (25°C)	0,25	0,04
Woda (15°C)	0,16	0,023
Woda (80°C)	3,2	0,45
<b>Współczynnik podziału (<math>K_{o/w}</math>) olej / woda</b>		
Lanolina	7,0	-
Mirystynian izopropylu	18,0	-
Olej arachidowy	4,2	51,8
Olej kukurydziany	4,1	58,0
Olej migdałowy	7,5	-
Olej mineralny	0,1	0,5
Olej rycynowy	6,0	-
Olej sojowy	6,1	65,9

Parabeny ulegają kwasowej i zasadowej hydrolizie. Najtrwalsze są roztwory parabenów o pH 4-5. Kilkogodzinne ogrzewanie wodnych roztworów parabenów o pH obojętnym lub słabo kwaśnym nie powoduje praktycznie hydrolizy, natomiast szybki

rozkład tych związków podczas ogrzewania następuje w roztworach o pH powyżej 8. Wodne roztwory parabenów o pH 3-6 mogą być wyjaławiane termicznie w autoklawie w 121°C przez 20 min i są trwałe przez 4 lata w temperaturze pokojowej [7, 71]. Wykryto, że podczas wyjaławiania w autoklawie (121°C, 20 min) roztworu parabenu M o pH 9 jego zawartość zmalała do 58,0% w stosunku do początkowej zawartości [14]. Nasze badania nie wykazały rozkładu parabenów w wyjaławianych termicznie roztworach parabenów o pH około 8,0.

Parabeny często wykazują interakcje fizykochemiczne zarówno z substancjami leczniczymi lub pomocniczymi, jak również z materiałami opakowań.

Zastosowanie współrozpuszczalników w celu zwiększenia rozpuszczalności parabenów może wpłynąć na ich aktywność przeciwbakteryjną. Darwish i Bloomfield [73] badali aktywność przeciwbakteryjną roztworu parabenów w etanolu (12,8%), glicerolu (18,6%) i glikolu propylenowym (27,6%). Autorzy stwierdzili, że wzrost rozpuszczalności parabenów w obecności współrozpuszczalników wpływał na zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej. Najmniej polarny współrozpuszczalnik (etanol) najefektywniej zwiększał rozpuszczalność parabenu M (0,45%) i parabenu P (0,09%), natomiast najslabszy efekt obserwowano dla najbardziej polarnego glicerolu. Wpływ różnych współrozpuszczalników na integralność błony komórkowej bakterii zwiększał się w szeregu: glicerol < glikol propylenowy < etanol. Wzrost skuteczności przeciwbakteryjnej parabenów w roztworze wodno-organicznym następuje nie tylko w wyniku zwiększenia rozpuszczalności, ale również z powodu synergistycznego działania rozpuszczalników organicznych na błonę komórkową bakterii.

Również w innych badaniach stwierdzono w obecności współrozpuszczalników większą aktywność parabenu M i P wobec *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* [74].

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa parabenów ulega obniżeniu w obecności niejonowych związków powierzchniowo czynnych, takich jak polisorbit 80. Wyjaśnia się to zamykaniem środków konserwujących wewnątrz miceli surfaktantu.

Oceniano aktywność przeciwbakteryjną parabenu M wobec *Pseudomonas aeruginosa* w obecności substancji wielkocząsteczkowych takich jak: guma arabska, tragakanta, alginian sodu, guma guar i karagenina [75]. Wymienione hydrokoloidy zmniejszyły skuteczność parabenu M. Tragakanta i guma guar w większym stopniu hamowały działanie przeciwbakteryjne aniżeli pozostałe polimery. Substancje te działały według dwóch mechanizmów. Główny mechanizm interakcji polegał na

interakcji środka konserwującego z hydrofilowymi makromolekułami, co w konsekwencji zmniejszało dostępność środka konserwującego. Alginian sodowy, guma arabska i karagenina prawdopodobnie stwarzały środowisko sprzyjające wzrostowi drobnoustrojów. W innych badaniach wykazano, że trójkrzemian magnezu obniża skuteczność parabenu M, podczas gdy kaolin, metyloceluloza, poliwinylpirolidon i żelatyna nie mają takiego wpływu [5].

Aktywność przeciwbakteryjna parabenu M, octanu fenylortęciowego i chlorobutanolu wobec *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* rosła w obecności karbomeru (0,2 %) [76]. W połączeniu z parabenem M uzyskano po 60–90 minutach całkowite działanie bakteriobójcze zarówno w stosunku do pałeczek ropy błękitnej jak i gronkowca złocistego.

Cyklodekstryny zastosowane w roztworze zwiększają rozpuszczalność parabenów i zmniejszają ich skuteczność przeciwdrobnoustrojową. Badano interakcje zachodzące pomiędzy 2-HP- $\beta$ -cyklodekstryną oraz chlorkiem benzalkoniowym, glukonianem chlorheksydyny, chlorobutanolem i parabenami M i P [77]. Mechanizm interakcji polegał na zmniejszeniu aktywności przeciwbakteryjnej środków konserwujących w wyniku tworzenia się kompleksu: środek konserwujący – cyklodekstryna.

Adsorpcja środków konserwujących na materiałach, z których wykonane są filtry membranowe, powoduje zmniejszenie stężenia tych środków w wyjaławianym preparacie, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia skuteczności przeciwbakteryjnej. Dodatkowo zjawisko adsorpcji może przyczynić się do otrzymania błędnych wyników badań jałowości. Casetta i in. [78] stwierdzili, że parabeny adsorbują się na filtrach membranowych, a metodą przepływową oceniano mechanizm tej adsorpcji [79]. Zjawisko miało charakter interakcji hydrofobowych. Filtry silniej adsorbowały paraben P aniżeli paraben M, a filtry o właściwościach hydrofobowych wykazywały większą adsorpcję w porównaniu z filtrami hydrofilowymi. Stwierdzono, że ładunek znajdujący się na błonach filtracyjnych nie wpływa na adsorpcję parabenów. Wykazano, że adsorpcja wzrasta proporcjonalnie do stężenia parabenów, natomiast obecność związków osmotycznie czynnych (chlorku sodu, mannitolu, glicerolu) lub chelatujących (soli sodowej EDTA) nie wpływa na ten proces.

Ważnym zagadnieniem mającym znaczenie podczas przechowywania środków konserwujących i ich roztworów jest dobór odpowiedniego rodzaju opakowania w celu uniknięcia strat związanych z adsorpcją. Parabeny ulegają w różnym stopniu adsorpcji

na plastiku w zależności od jego rodzaju [7]. Uważa się jednak, że butelki wykonane z polietylenu o niskiej i wysokiej gęstości nie absorbują parabenów ani ich roztworów. Przechowywano roztwory parabenu M (0,1%) w butelkach polietylenowych oraz w pojemnikach z polichlorku winylu w temp. 25°C. Przez 12 tygodni nie stwierdzono adsorpcji parabenu M na badanych opakowaniach [7]. Natomiast w innych badaniach [80] wykazano, że parabeny M i P adsorbują się na giętkich przewodach wykonanych z różnych tworzyw, szeroko stosowanych w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz w szpitalach. Po 24 h przepływie niektóre z materiałów przewodów adsorbowały prawie całkowicie paraben M z roztworu oraz około 40% parabenu P. Stwierdzono również, że teflon praktycznie nie adsorbuje obu parabenów nawet w czasie 120 h.

Cechą charakterystyczną większości środków konserwujących jest częste wywoływanie różnego rodzaju podrażnień, uczuleń czy działania toksyczne. Uważa się, że parabeny nie mają działania ani mutagennego, ani teratogennego [7]. Uczulenia na te środki konserwujące występują rzadko. Nie zaobserwowano znacznego wzrostu uczuleń słonecznych po stosowaniu preparatów konserwowanych parabenami ani działania fototoksycznego. Reakcje nadwrażliwości na parabeny zwykle mają charakter opóźniony i występują w wyniku kontaktu przezskórnego po stosowaniu zewnętrznym parabenów, chociaż tego typu reakcje występowały również po podaniu doustnym. Istnieją nieliczne doniesienia o wystąpieniu natychmiastowej reakcji uczuleniowej na skutek pozajelitowego podania preparatów konserwowanych parabenami. Zaskakująca jest możliwość podania preparatów konserwowanych parabenami pacjentom, u których wcześniej wystąpiła reakcja nadwrażliwości na te substancje. Oznacza to, że preparaty zawierające parabeny mogą być stosowane pozajelitowo przez pacjentów, u których po ich wcześniejszej aplikacji wystąpiła skórna reakcja alergiczna.

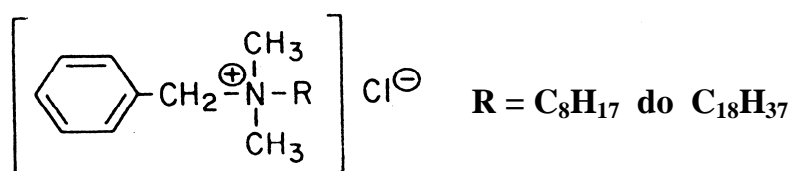
Istnieją doniesienia literaturowe o działaniu miejscowo znieczulającym parabenów [81]. Efekt ten prawdopodobnie jest związany z budową chemiczną parabenów, które jako estry kwasu p-hydroksybenzoesowego mają podobną strukturę chemiczną do kwasu p-aminobenzoowego wykazującego działanie miejscowo znieczulające. Działanie anestetyczne parabenów rośnie wraz z ilością atomów węgla w łańcuchu alkilowym. Efekt 0,1% roztworu parabenu M jest podobny do działania 0,05% roztworu prokainy [82].

Ostatnie dane kwestionują bezpieczeństwo stosowania parabenów jako środków konserwujących [83, 84]. W badaniach przeprowadzonych przez brytyjskich naukowców [83] wykryto obecność parabenów (20,6 ng/g tkanki) w komórkach

nowotworowych pobranych z piersi 20 kobiet. Związki te były obecne w nowotworach piersi w formie estrowej, czyli najprawdopodobniej przedostały się przez skórę z pominięciem układu pokarmowego, na skutek stosowania antyperspirantów. Po wchłonięciu przez skórę parabeny wiążą się z ludzkimi receptorami estrogenowymi, w których mogą powodować wzrost komórek nowotworowych piersi. Gdyby okazało się, że parabeny przyczyniają się do rozwoju raka piersi, to ich wpływ na ten proces byłby niewielki z uwagi na ich 1000 razy słabsze działanie estrogenne w porównaniu z naturalnymi estrogenami [84].

### 3.2. Chlorek benzalkoniowy

Chlorek benzalkoniowy jest kationowym związkiem powierzchniowo czynnym posiadającym właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Pod względem chemicznym jest mieszaniną chlorków alkilodimetylobenzyloamoniowych (C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> i C<sub>16</sub>). Farmakopea Amerykańska podaje, że substancja zawiera nie mniej niż 40% homologu C<sub>12</sub> oraz nie mniej niż 20% C<sub>14</sub>, a całkowita ilość obu homologów powinna stanowić ponad 70% całości [5]. Na ryc. 6 przedstawiono wzór strukturalny homologów chlorku benzalkoniowego.



Ryc. 6. Wzór strukturalny homologów chlorku benzalkoniowego.

Nazwy synonimowe i handlowe chlorku benzalkoniowego to: chlorek alkilobenzylodimetyloamoniowy, BAC, BKC, Pentonium, Roccal, Zephiran.

Chlorek benzalkoniowy jest aktywny w szerokim zakresie pH. Jest trwały w temperaturze pokojowej, odporny na wyjaławianie termiczne bez utraty właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Roztwory chlorku benzalkoniowego mogą być przechowywane przez długi czas w temperaturze pokojowej, natomiast właściwości przeciwdrobnoustrojowe rozcieńczonych roztworów przechowywanych w opakowaniach z polichlorku winylu lub poliuretanowych mogą ulec obniżeniu w

wyniku adsorpcji. Wykazano również adsorpcję chlorku benzalkoniowego na częściach gumowych lub plastikowych [7]. W trwającym 84 dni badaniu wpływu rodzaju opakowania na aktywność przeciwdrobnoustrojową chlorku benzalkoniowego nie stwierdzono różnic pomiędzy opakowaniem kropli do oczu wykonanym z polietylenu o niskiej gęstości, a szklanymi butelkami [85].

Komórki bakteryjne mają ładunek ujemny, a chlorek benzalkoniowy posiada ładunek dodatni, co umożliwia interakcję pomiędzy nimi. Aktywność chlorku benzalkoniowego zmniejszają związki obdarzone ładunkiem ujemnym, głównie anionowe związki powierzchniowo czynne np. mydła. Niejonowe związki powierzchniowo czynne np. polisorbate 80 mogą obniżać jego aktywność w wyniku zamykania cząsteczek wewnątrz miceli. Zdolność adsorpcji BAC wykazują m.in. węglan bizmutu, talk, węglan wapnia, kaolin, trójsalicylan magnezu, tlenek magnezu, tlenek cynku, skrobia [7].

Chlorek benzalkoniowy najczęściej służy do konserwowania leków stosowanych do oczu, nosa i uszu. Używany jest w zakresie stężeń od 0,0025–0,02%. Jego skuteczność przeciwdrobnoustrojową zwiększają: sól sodowa EDTA (0,01–0,1%) oraz alkohol benzylowy i alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy [5]. Stosowany jest również do konserwowania preparatów do wstrzykiwań (tabela 2). Badając strefy zahamowania wzrostu bakterii nie stwierdzono działania przeciwbakteryjnego na *Pseudomonas aeruginosa* [86].

Chlorek benzalkoniowy jest jednym z najczęściej stosowanych środków konserwujących w preparatach do oczu. Istnieją jednak liczne dane literaturowe dotyczące jego toksyczności i niekorzystnego działania na oko (przedstawiono poniżej). Podczas stosowania środków konserwujących może wystąpić działanie uczulające, a nawet toksyczne [87]. Nie ma idealnego środka konserwującego, który chroniłby preparat mikrobiologicznie, a jednocześnie był pozbawiony działań ubocznych. Efekty niekorzystne związane ze stosowaniem chlorku benzalkoniowego, jak również innych środków konserwujących, są przede wszystkim powodowane zbyt długotrwałą terapią preparatami zawierającymi te substancje [88].

Chlorek benzalkoniowy z powodu właściwości powierzchniowo czynnych silnie zmniejsza stabilność cieczy łzowej oka. Dodatkowo działa toksycznie na komórki nabłonkowe i zwiększa przepuszczalność warstwy rogowej [89]. Badania *in vitro* potwierdziły jego toksyczność, nawet użytego w bardzo niskim stężeniu. Zastosowany



w stężeniu takim, jakie jest w kroplach ocznych, powodował nekrozę komórek po kilku minutach, a w niższych stężeniach – apoptozę.

Badano *in vitro* proliferację ludzkich komórek rogówki oka w obecności: chlorheksydyny (0,005%), chlorku benzalkoniowego (0,01%), chlorku polidroniowego (Polyquad) (0,001%) i tiomersalu (0,001%). Środki konserwujące były toksyczne, przy czym chlorek polidroniowy wykazywał najmniejsze właściwości cytotoksyczne [90].

W innych badaniach na szczurach stwierdzono dobrą tolerancję w kontakcie z rogówką 13-nastu najbardziej popularnych środków konserwujących w stężeniach powszechnie używanych [87]. Stwierdzono tylko w nielicznych przypadkach, że zwiększenie ich stężenia lub zastosowanie połączenia kilku związków może uszkadzać rogówkę oka (szczególnie dotyczyło to chlorku cetylopirydyniowego).

Chlorek benzalkoniowy może wykazywać działanie toksyczne na drogi oddechowe. Najprawdopodobniej czwartorzędowe związki amoniowe ulegają wchłanianiu przez drogi oddechowe z preparatów stosowanych do dezynfekcji i przyczyniają się do rozwoju zawodowej astmy oskrzelowej wśród personelu medycznego. Pielęgniarki stosujące w szpitalach do dezynfekcji roztwory zawierające chlorek benzalkoniowy, częściej niż pozostałe osoby, wykazywały objawy astmy oskrzelowej [91, 92, 93].

Zastosowanie chlorku benzalkoniowego z EDTA w roztworze bromku ipratropium (Atrovent®) stosowanym do nebulizacji powodowało paradoksalnie skurcz oskrzeli u pacjentów cierpiących na dychawicę oskrzelową i zmniejszało skuteczność substancji aktywnej [94]. Roztwory do nebulizacji nie powinny być konserwowane chlorkiem benzalkoniowym [28, 95].

Toksyczne właściwości chlorku benzalkoniowego mogą być ograniczone poprzez zastosowanie polimerów (np. poprzecznie usieciowanego kwasu poliakrylowego, hydroksypropylocelulozy, alkoholu poliwinylowego). Kation benzalkoniowy łączy się np. z ujemnie naładowaną grupą karboksylową kwasu poliakrylowego, w wyniku czego zostaje zamknięty wewnątrz sieci polimeru. Prowadzi to do zmniejszenia toksycznych właściwości chlorku benzalkoniowego, ale jednocześnie obniża jego skuteczność przeciwdrobnoustrojową [96].

Środki konserwujące, w szczególności chlorek benzalkoniowy, mogą zwiększać przenikanie przez rogówkę oka substancji leczniczych, co wykryto badając wpływ chlorku benzalkoniowego na przenikanie izotiocyjanianu fluoresceiny w połączeniu z dekstranami o masie cząsteczkowej 4400 Da i 9400 Da [97] przez wyizolowaną

rogówkę królików. Badania te wskazują, że chlorek benzalkoniowy, dzięki właściwościom powierzchniowo czynnym, może być potencjalnym promotorem wchłaniania leków podawanych do oka np. hydrofilowych makrocząsteczek, w tym insuliny [98, 99]. W obecności chlorku benzalkoniowego stwierdzono zwiększenie wchłaniania diazepamu [100], lorazepamu [101], ibuprofenu i flurbiprofenu [102].

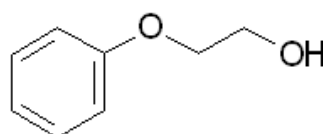
Stwierdzono, że również pomiędzy chlorkiem benzalkoniowym a 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryną dochodzi do tworzenia kompleksów inkluzyjnych, w wyniku czego właściwości przeciwdrobnoustrojowe środka konserwującego ulegają obniżeniu [77].

### 3.3. Fenoksyetanol

Fenoksyetanol jest jednym z najstarszych środków konserwujących, nadal szeroko stosowanym przede wszystkim w przemyśle kosmetycznym. Stosowano go już w preparatach penicyliny w celu ochrony ich przed bakteriami Gram ujemnymi. Do czasów obecnych przetrwało zastosowanie tego środka konserwującego w różnego rodzaju szczepionkach, co wskazuje na dużą zgodność fizykochemiczną fenoksyetanolu z materiałem biologicznym [14]. Bardzo często spotyka się użycie fenoksyetanolu w połączeniu z innymi środkami konserwującymi np. parabenami (preparat Phenonip<sup>®</sup>).

Fenoksyetanol jest bezbarwną cieczą o zwiększonej lepkości, przyjemnym zapachu i piekącym smaku. Związek ten jest otrzymywany w wyniku działania na fenol tlenkiem etylenu w środowisku alkalicznym [7].

Nazwy synonimowe fenoksyetanolu to: alkohol  $\beta$ -fenoksyetylowy, eter monofenyloetylenoglikolowy, eter fenylo- $\beta$ -hydroksyetylowy, 1-hydroksy-2-fenoksyetan, *Phenoxen*, *Phenoxetol*, *Uniphen P-23* [7]. Na ryc. 7 przedstawiono wzór strukturalny fenoksyetanolu, a jego właściwości fizykochemiczne przedstawiono w tabeli 7.



Ryc. 7. Wzór strukturalny fenoksyetanolu.

Zewnętrznie są stosowane stężenia fenoksyetanolu 0,5 – 1,0%. W stężeniu 2,0 - 2,2% fenoksyetanol ma zastosowanie jako środek antyseptyczny w roztworach i kremach przeznaczonych do aplikacji na rany powierzchowne, oparzenia, zakażenia skóry i błon śluzowych [7]. Fenoksyetanol wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w szerokim zakresie pH, jednak jego spektrum działania jest wąskie, ponieważ jest aktywny wobec *Pseudomonas aeruginosa* i w mniejszym stopniu wobec *Proteus vulgaris* i innych bakterii Gram ujemnych. W celu zwiększenia spektrum przeciwdrobnoustrojowego fenoksyetanolu jest on bardzo często stosowany w połączeniu z innymi środkami konserwującymi np. parabenami [7]. Fenoksyetanol powinien być przechowywany w dobrze zamkniętych opakowaniach w chłodnym i ciemnym miejscu [7]. Wodne roztwory fenoksyetanolu są trwałe i mogą być wyjaławiane termicznie.

Tabela 7. Rozpuszczalność oraz współczynnik podziału fenoksyetanolu [7]

<b>Rozpuszczalność [g/100g] w temp. 20°C</b>	
Aceton	Miesza się
Benzen	Miesza się
Etanol (95%)	Miesza się
Eter	Miesza się
Glicerol (86%)	Miesza się
Glikol propylenowy	Miesza się
Palmitynian izopropylu	3,9
Olej mineralny	0,7
Olej oliwkowy	2,0
Olej z orzeszków ziemnych	2,0
Woda	2,3
<b>Współczynnik podziału</b>	
Palmitynian izopropylu : woda	2,9
Olej mineralny : woda	0,3
Olej arachidowy : woda	2,6
<b>Log P</b>	
Oktanol/woda	1,00

Aktywność przeciwdrobnoustrojową fenoksyetanolu mogą zmniejszać niejonowe związki powierzchniowo czynne oraz absorpcja przez polichlorek winylu. Pochodne celulozy (metyloceluloza, karmeloza oraz hypromeloza) mogą również zmniejszać aktywność fenoksyetanolu, co wykazano wobec *Pseudomonas aeruginosa* [7].

Fenoksyetanol wykazuje działanie miejscowo znieczulające w kontakcie z błonami śluzowymi. Czysty związek może drażnić skórę i oczy. W badaniach na zwierzętach wykazano, że 10% roztwór fenoksyetanolu nie wykazywał działania drażniącego na skórę królików, a 2% roztwór nie drażnił oczu królików. Narażenie na fenoksyetanol przez dłuższy czas może powodować efekty toksyczne podobne do rozpuszczalników organicznych [7].

## **II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY**

Przedmiotem badań niniejszej pracy są nowoczesne, submikronowe układy dyspersyjne: emulsje submikronowe, dyspersje micelarne, liposfery oraz liposomy. Do tej pory w lecznictwie znalazły zastosowanie emulsje submikronowe i liposomy, natomiast wodne dyspersje lecytyny, których skład i metodę sporządzania opracowano w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej, jak również liposfery są dopiero potencjalnymi nośnikami dla wielu substancji leczniczych. Wymienione układy, oprócz fazy wodnej, zawierają lipidowe składniki, dzięki czemu umożliwiają podanie leków trudno rozpuszczalnych w wodzie. Niestety lipofilowe właściwości środków konserwujących, jak również złożona struktura wewnętrzna i rozwinięta powierzchnia międzyfazowa utrudniają konserwowanie fazy wodnej submikronowych układów dyspersyjnych. Dodatkowym problemem jest często stosunkowo mała trwałość fizykochemiczna dyspersji submikronowych w obecności wielu związków chemicznych. Nie jest całkowicie do tej pory poznana interakcja środków konserwujących z lecytyną, często stosowanym w tych układach biogodnym surfaktantem, a przecież lecytyna jest wykorzystywana w badaniach mikrobiologicznych jako neutralizator środków konserwujących. W konsekwencji wybór zgodnego fizykochemicznie środka konserwującego i osiągnięcie odpowiedniego jego stężenia w fazie wodnej może być niełatwy.

Podstawowym celem pracy było określenie dystrybucji najczęściej stosowanych środków konserwujących (parabenów M i P, chlorku benzalkoniowego, alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego, składników Phenonipu) w submikronowych układach dyspersyjnych, różniących się składem oraz poznanie zależności pomiędzy składem i strukturą badanych układów i rozmieszczeniem środków przeciwdrobnoustrojowych, a więc ich skutecznością. Badane układy różnią się zawartością i rodzajem fazy olejowej: emulsje submikronowe zawierają olej w postaci ciekłej, w liposferach obecne są lipidy stałe, natomiast dyspersje lecytyny i liposomy nie zawierają typowej fazy olejowej, jedynie związki amfifilne. Ważnym aspektem badań było określenie wpływu fosfolipidów lecytyny na dystrybucję środków konserwujących i porównanie pod tym względem układów stabilizowanych lecytyną z innymi surfaktantami (np. polisorbatem 80, poloksamerem) oraz ostatecznie ustalenie czy jest możliwe konserwowanie postaci leków stabilizowanych lecytyną.

Dystrybucję środków konserwujących w emulsjach submikronowych porównywano z ich rozmieszczeniem w emulsjach tradycyjnych charakteryzujących się

znacznie mniejszą powierzchnią międzyfazową wynikającą z większej wielkości kropeł olejowych.

W początkowym etapie badań podjęto próbę oceny długoterminowej zgodności fizykochemicznej alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego, chlorku benzalkoniowego, glukonianu chlorheksydyny, chlorokrezolu, fenolu, m-krezolu, parabenów M i P, Phenonipu oraz tiomersalu z emulsjami submikronowymi i zawiesiną liposfer. Na podstawie przeprowadzonych badań wytypowano środki konserwujące, dla których badano dystrybucję pomiędzy fazy układów submikronowych.

Za formę efektywną środka konserwującego w układach wielofazowych uznaje się wolne cząsteczki obecne w fazie wodnej, nieulegające inkorporacji do struktur wewnętrznych układu np. micelarnych. W celu określenia udziału tej frakcji konieczne jest oddzielenie fazy wodnej od jakichkolwiek struktur submikronowych. Stosując metodę ultrawierowania, uzyskiwano strukturalną fazę wodną, zawierającą struktury submikronowe tworzone przez surfaktanty. Dopiero zastosowanie ultrafiltracji pozwalało uzyskać fazę wodną z rozpuszczoną frakcją środka konserwującego.

Wykorzystując model matematyczny oceniano dystrybucję środków konserwujących do pozostałych faz submikronowych dyspersji: fazy olejowej i międzyfazy. W ten sposób uzyskiwano dodatkowe informacje, dotyczące lokalizacji środków konserwujących w układach submikronowych.

### **III. METODYKA**



## 1. ODCZYNNIKI, MATERIAŁY, APARATURA

### 1.1 Odczynniki

- Acetonitryl (*Merck*, Darmstadt, Niemcy)
- Alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy (*Fluka*, Steinheim, Niemcy)
- Amonu diwodorofosforan –  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  cz.d.a. (*POCh*, Gliwice)
- Bronopol (*Sigma-Aldrich Chemie*, Steinheim, Niemcy)
- Karbomer (Carbopol ETD 2050) (*Noveon Inc.*, Cleveland, USA)
- Chlorheksydyny glukonian (*Pol – Nil*, Warszawa)
- Chlorku benzalkoniowego 50% roztwór (*FeF Chemicals A/S*, Køge, Dania)
- Chlorokrezol (*Sigma – Aldrich Chemie*, Steinheim, Niemcy)
- Ester metylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego (paraben M) (*Fluka*, Steinheim, Niemcy)
- Ester etylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego (paraben A) (*Synteza*, Poznań)
- Ester propylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego (paraben P) (*Fluka*, Steinheim, Niemcy)
- Faza ruchoma do chromatografii chlorku benzalkoniowego oraz alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego:
  - 70% (v/v) acetonitryl
  - 30% (v/v) 0,05 mol/l roztwór  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  o pH 2,5 (kwas ortofosforowy 85%)
- Faza ruchoma do chromatografii składników Phenonipu:
  - 70% (v/v) 0,05 mol/l roztwór  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o pH 3,5 (kwas ortofosforowy 85%)
  - 30% (v/v) acetonitryl
- Faza ruchoma do chromatografii parabenów M i P:
  - 65% (v/v) metanol
  - 35% (v/v) woda
- Fenoksyetanol (*Fluka*, Steinheim, Niemcy)
- Fenol (*Riedel-de Haën*, Seelze, Niemcy)
- Fosfatydylocholina (Phospholipon 90 G) (*Phospholipid*, Cologne, Niemcy)
- Glicerol bezwodny cz.d.a. (*Pollena - Strem*, Dąbrowa Górnicza)
- Ivelip<sup>®</sup> 10%, 20% - emulsja submikronowa (*Baxter*, Amilly, Francja)

Tabela 8. Skład emulsji Ivelip®

Składniki	Stężenie [%, m/m]
Oczyszczony olej sojowy	10,0 lub 20,0
Oczyszczone fosfolipidy jaja kurzego	1,2
Glicerol	2,5
Oleinian sodu	0,03
Wodorotlenek sodu	do pH 7 – 9
Woda do wstrzykiwań	do 100,0

- Laurylosiarczan sodu (*Fluka*, Steinheim, Niemcy)
- Lecytyna jaja kurzego (Lipoid E 80) (*Lipoid*, Ludwigshafen, Niemcy)
- Lecytyna sojowa Lipoid S100 (*Lipoid*, Ludwigshafen, Niemcy)
- m - Krezol (*Merck*, Schuchart, Niemcy)
- Kwas ortofosforowy 85% (*Fluka*, Steinheim, Niemcy)
- Metanol do chromatografii HPLC (*POCh*, Gliwice)
- Metyloceluloza (Metolose SM 100) (*Shin-Etsu Chemical Co.*, Tokyo, Japonia)
- Nanosfery lipidowe (wodna zawiesina liposfer, *nanostructured lipid carriers*, NLC) (*FU*, Berlin, Niemcy)

Tabela 9. Skład nanosfer lipidowych (NLC)

Składniki	Stężenie [%, m/v]
Olej z nasion czarnej porzeczki	25,0
Wosk pszczeli	18,0
Poliglukozyd alkilowy	5,0
Koenzym Q10 – substancja czynna	2,5
Woda do wstrzykiwań	do 100,0

- Olej sojowy (*Lipoid*, Ludwigshafen, Niemcy)
- Polisorbat 80 (Tween 80) (*Sigma*, St. Louis, USA)
- Poloksamer (Synperonic F68, Poloxamer F68) (*Serva Electrophoresis GmbH*, Heidelberg, Niemcy)
- Potasu diwodorofosforan (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) cz.d.a. (*Fluka*, Steinheim, Niemcy)
- Phenonip® (*PhenoChem Sharon Laboratories*, Ashdod, Izrael)

Tabela 10. Skład Phenonipu®

Składniki	Stężenie [%, m/m]
Fenoksyetanol	71
Paraben metylowy	17
Paraben etylowy	4
Paraben propylowy	2
Paraben butylowy	4
Paraben izobutyłowy	2

- Sodu wodorotlenek (*Zakłady Chemiczne Oświęcim, Gliwice*)
- Tiomersal (*Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy*)
- Wersenian disodowy (EDTA) (*POCH, Gliwice*)
- Woda oczyszczona przez wymianę jonową i odwróconą osmozę - system Elix 3 (*Millipore, Bedford, USA*)
- Zakosomy 0® (wodna dyspersja liposomów) (*Zakofarm, Warszawa*)

Tabela 11. Skład dyspersji liposomów (Zakosomy 0®)

Składniki	Stężenie [%, m/m]
Lecytyna sojowa	2,5
Phenonip – środek konserwujący	0,8
Woda do wstrzykiwań	do 100,0

## 1.2 Materiały

- Bibuła filtracyjna jakościowa średnia (*Polska Grupa Laboratoryjna, Warszawa*)
- Filtry membranowe (*Millipore, Bedford, USA*):
  - z octanu celulozy, średnica porów 0,45 µm
  - z fluorku poliwinylidenu (Durapore), średnica porów 0,45 µm
  - z teflonu, średnica porów 0,5 µm
- Filtry do ultrafiltracji (Microcon YM-100, regenerowana celuloza, limit filtracji 100 000 Da) (*Millipore, Bedford, USA*)

- Kapilara wiskozymetryczna typ 532 23 / IIc, 532 11/Ia (*Schott-Geräte*, Hofheim, Niemcy)
- Kolumna chromatograficzna z wypełnieniem oktadecylosililowym LiChrospher® 100 RP 18 (5µm, 250 x 4 mm) (*Merck Hitachi*, Darmstadt, Niemcy)
- Kolumna chromatograficzna z wypełnieniem oktadecylosililowym Purospher® STAR RP 18e (5µm, 250 x 4,6 mm) (*Merck Hitachi*, Darmstadt, Niemcy)
- Mieszadła magnetyczne PTFE (*VIT-LAB*, Seeheim-Jugenheim, Niemcy)
- Oprawki do filtrów poliwęglanowe o średnicy 47 mm (*Sartorius*, Goettingen, Niemcy)
- Sito ze stali nierdzewnej o średnicy oczek 80 µm (*Retsch*, Haan, Niemcy)

### 1.3 Aparatura

- Aparat do oczyszczania wody metodą wymiany jonowej i odwróconej osmozy (*Millipore*, Bedford, USA)
- Chromatograf cieczowy wysokociśnieniowy złożony z integratora model D-7000, pompy typu L-7100, autosamplera model D-7200 i detektora UV-Vis L-7420 (*Merck Hitachi*, Darmstadt, Niemcy)
- Chromatograf cieczowy wysokociśnieniowy złożony z integratora model D-2500A, pompy typu L-6200 i detektora UV-Vis L-4250 (*Merck Hitachi*, Darmstadt, Niemcy)
- Dezintegrator ultradźwiękowy typ UD - 11 (*Zakład Doświadczalny Techpan*, Warszawa)
- Dyfraktometr laserowy, MasterSizer\E (*Malvern Instruments*, Malvern, Wielka Brytania)
- Komora klimatyczna do utrzymywania stałych warunków temperatury i wilgotności z kontrolerem MB 1 (*WTB Binder Labortechnik*, Tuttlingen, Niemcy)
- Łaźnia wodna typ LW2 (*Wytwórnia Sprzętu Laboratoryjnego*, Bytom)
- Łaźnia wodna typ 356P (*Unipan*, Warszawa)
- Mieszadło laboratoryjne elektryczne – łopatkowe (*IKA Labortechnik*, Staufen, Niemcy)
- Mieszadło laboratoryjne elektryczne – łopatkowe typ KN 4bs (*ASPA*, Wrocław)

- Mieszadło magnetyczne wielostanowiskowe typ POLY 15 (*Variomag*, Oberschleissheim, Niemcy)
- Mieszadło szybkoobrotowe Ultra-Turrax T25 (*Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik*, Staufen, Niemcy)
- Mikroskop biologiczny typ B1 223A (*Motic*, Wetzlar, Niemcy) wyposażony w kamerę Panasonic typu GP-KR 222 (*Matsushita, Communication Industrial*, Jokohama, Japonia) i program analizy obrazu Multiscan
- Pehametr, model 350 (*Orion*, Beverly, USA) wyposażony w elektrodę kombinowaną ERH-11 (P.E.A.F. „Hydrometr”)
- Przyrząd do pomiaru potencjału zeta Zetamaster 2000 (*Malvern Instruments*, Malvern, Wielka Brytania)
- Spektrofotometr UV-Vis typ V-530 (*JASCO Corporation*, Tokio, Japonia)
- Sterylizator parowy poziomy typ ASHE (*Splódzielnia Pracy Mechaników*, Warszawa)
- Tensometr sterowany ręcznie (czujnik siły + ramię model GM2+UL5) (*Scaime*, Francja)
- Ultrawirówka typ UP 65 (*VEB MLV*, Engelsdorf, Niemcy)
- Waga analityczna typ WAX 62 (*Radwag*, Radom)
- Waga laboratoryjna typ WPS 600/C/1 (*Radwag*, Radom)
- Wirówka typ MPW-2 (*Mechanika Precyzyjna*, Warszawa)
- Wiskozymetr kapilarny (*Schott-Geräte*, Hofheim, Niemcy)
- Wysokociśnieniowy homogenizator laboratoryjny 8.30 H (*APV Gaulin*, Kopenhaga, Dania)
- Wytrząsarka do próbek „Vortex” (*DHN*, Warszawa)
- Zestaw do sączenia pod zwiększonym ciśnieniem (*Sartorius*, Goettingen, Niemcy)

## 2. EMULSJE SUBMIKRONOWE I TRADYCYJNE

### 2.1. Sporządzanie podstawowych emulsji submikronowych

W badaniach wykorzystano emulsje submikronowe typu o/w zawierające 10 lub 20% oleju sojowego i odpowiednio 1,2 lub 2,4% lecytyny jajowej, jak również handlowy preparat Ivelip<sup>®</sup> zawierający 10 lub 20% oleju sojowego i 1,2% lecytyny. Skład sporządzonych układów przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Skład podstawowych emulsji submikronowych [% m/m]

Emulsja submikronowa	Olej sojowy	Lecytyna jajowa	Pozostałe składniki
E1	10,0	1,2	glicerol 2,5 1 mol/l wodorotlenek sodu woda oczyszczona
E2*	10,0	1,2	
E3*	20,0	1,2	
E4	20,0	2,4	

\* wykorzystano Ivelip

Oprócz lecytyny jajowej, jako emulgator w emulsjach submikronowych stosowano również lecytynę sojową, Tween 80 oraz poloksamer F68. Skład emulsji z tymi emulgatorami przedstawiono w p. 2.3.c.

W pierwszym etapie sporządzania emulsji submikronowych (oprócz E2\* i E3\*) przygotowano dyspersję lecytyny albo roztwór polisorbatu lub poloksameru w mieszaninie wody i glicerolu. W tym celu odważone składniki mieszano w temperaturze 50-60°C mieszadłem magnetycznym przez 20 min, a następnie mieszadłem szybkoobrotowym Ultra-Turrax (2 min, 8000 obr./min). Otrzymaną w ten sposób fazę wodną po przesączeniu przez filtr membranowy (0,45 µm, estry celulozy) ogrzewano do temperatury 70°C i mieszając mieszadłem elektrycznym - łopatkowym dodawano do niej stopniowo olej sojowy przesączony przez filtr membranowy (0,5 µm, teflon) ogrzany do tej samej temperatury. Zwiększano temperaturę do 85°C i utworzoną emulsję wstępną mieszano 20 min. Następnie układ na gorąco poddano mieszanii mieszadłem szybkoobrotowym (10 min, 20500 obr./min). Emulsję chłodzono do temperatury 25°C w strumieniu zimnej wody, homogenizowano 8-krotnie przy ciśnieniu 500-600 bar i ponownie chłodzono do temperatury 25°C. Za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (1 mol/l) korygowano pH otrzymanej emulsji do wartości około 8,0.



### 2.3. Wprowadzanie środków konserwujących do emulsji

#### a) Parabeny metylowy i propylowy (M i P)

Sporządzono emulsje submikronowe, zawierające paraben M oraz paraben P w stężeniu odpowiednio 1,8 oraz 0,2 mg/g. Emulsje różniły się zawartością oleju oraz lecytyny (tabela 13). Dodatkowo sporządzono układ zawierający podwójną ilość obu środków konserwujących (N4) (odpowiednio 3,6 i 0,4 mg/g). Parabeny rozpuszczono w oleju sojowym w temperaturze 70°C przed połączeniem z fazą wodną (metoda *de novo*). Emulsję N1\* otrzymano dodając środki konserwujące *ex tempore* do handlowych emulsji submikronowych Ivelip (E2 i E3). W celu rozpuszczenia obu parabenów emulsje wytrząsano ręcznie i pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mierzono pH emulsji i dokonywano korekty pH za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (1 mol/l) do wartości około 8,3, a następnie dozowano w atmosferze azotu do szklanych fiolek, wyjaławiano i przechowywano (jak opisano w p. 2.4).

Tabela 13. Skład emulsji zawierających parabeny [% m/m]

Emulsja	Olej sojowy	Lecytyna jajowa	Paraben M	Paraben P	Pozostałe składniki
N1	10,0	1,2	0,18	0,02	glicerol 2,5% 1 mol/l NaOH woda oczyszczona
N1*	10,0	1,2	0,18	0,02	
N2	20,0	1,2	0,18	0,02	
N3	20,0	2,4	0,18	0,02	
N4	10,0	1,2	0,36	0,04	

\* wykorzystano Ivelip

#### b) Chlorek benzalkoniowy

Chlorek benzalkoniowy w stężeniu 0,05 - 0,2 mg/g dodawano *de novo* (B2, BT, tBT) lub *ex tempore* (B1\*, B3\*) do 10% emulsji submikronowych (tabela 14) korzystając z 0,5% (m/m) roztworu pomocniczego. Sporządzając emulsje submikronowe *de novo* pomocniczy roztwór chlorku benzalkoniowego dodawano na etapie homogenizacji wysokociśnieniowej. Emulsje B1\* oraz B3\* otrzymano dodając pomocniczy roztwór chlorku benzalkoniowego do emulsji submikronowych Ivelip



(10%) i mieszając szklanym mieszadłem łopatkowy (150 obr./min, 10 min). Sporządzając emulsję tradycyjną (tBT) pomocniczy roztwór chlorku benzalkoniowego dodawano po ochłodzeniu układu do temperatury pokojowej przed korektą pH.

Tabela 14. Skład emulsji zawierających chlorek benzalkoniowy [% m/m]

Symbol	Olej sojowy	Emulgator (1,2%)	Chlorek benzalkoniowy	Pozostałe składniki
<b>Emulsje submikronowe</b>				glicerol 2,5% 1 mol/l NaOH woda oczyszczona
<b>B1*</b>	10	Lecytyna jajowa	0,005	
<b>B2</b>	10		0,01	
<b>B3*</b>	10		0,02	
<b>BT</b>	10	Polisorbat 80	0,02	
<b>Emulsja tradycyjna</b>				
<b>tBT</b>	10	Polisorbat 80	0,02	

\* wykorzystano Ivelip

### c) Phenonip

Sporządzano z Phenonipem (8,0 mg/g) emulsje submikronowe, różniące się zawartością fazy olejowej i rodzajem emulgatora oraz emulsje tradycyjne, różniące się rodzajem emulgatora (tabela 15).

Niezależnie od rodzaju emulsji (submikronowa lub tradycyjna) Phenonip dodawano na etapie sporządzania fazy olejowej, przed połączeniem faz.

Wyjątkiem była emulsja submikronowa P2\* sporządzana *ex tempore*, której nie wyjaławiano termicznie, tylko sporządzano aseptycznie. Phenonip dodawano do 20% emulsji submikronowej Ivelip, mieszano mieszadłem magnetycznym (200 obr./min) w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po tym czasie, ze względu na niecałkowite rozpuszczenie Phenonipu, emulsję zanurzono krótkotrwale (2 min) w łaźni wodnej o temperaturze 50°C, a po ochłodzeniu dozowano w warunkach aseptycznych do wyjałowionych fiolek.

Tabela 15. Skład emulsji zawierających Phenonip [% m/m]

Emulsja	Olej sojowy	Emulgator	Phenonip	Pozostałe składniki
<b>Emulsje submikronowe</b>				glicerol 2,5% 1 mol/l wodorotlenek sodu woda oczyszczona
<b>P1</b>	10,0	Lecytyna jajowa (1,2)	0,8	
<b>P2*</b>	20,0		0,8	
<b>P3S</b>	10,0	Lecytyna sojowa (1,2)	0,8	
<b>P4T</b>	10,0	Polisorbat 80 (2,5)	0,8	
<b>P5T</b>	20,0		0,8	
<b>P6P</b>	10,0	Poloksamer F68 (2,5)	0,8	
<b>Emulsje tradycyjne</b>				
<b>tPP</b>	10,0	Poloksamer F68 (2,5)	0,8	
<b>tPT</b>	10,0	Polisorbat 80 (2,5)	0,8	
<b>tPC</b>	10,0	Carbopol EDT 2050 (0,1)	0,8	
<b>tPM</b>	10,0	Metolose SM 100 (2,0)	0,8	

\* wykorzystano Ivelip

#### d) Mieszanina chlorku benzalkoniowego z alkoholem $\beta$ -fenyloetylowym

Alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy (5,0 mg/g), chlorek benzalkoniowy (1,0 mg/g) oraz roztwór soli sodowej EDTA (o pH 8,14) dodawano *ex tempore* do Ivelip (10%) (tabela 16). Po dodaniu składników emulsję BF mieszano mieszadłem mechanicznym (150 obr./min, 20 min), dozowano do szklanych fiolek w atmosferze azotu i wyjaławiano termicznie.

Tabela 16. Skład emulsji submikronowej [% m/m] zawierającej chlorek benzalkoniowy i alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy (emulsja BF)

Skład	Ilość
Olej sojowy	9,5
Alkohol $\beta$ -fenyloetylowy	0,5
Lecytyna jajowa	1,2
Glicerol bezwodny	2,5
Chlorek benzalkoniowy	0,02
Wersenian disodowy	0,1
Woda oczyszczona	do 100,0

## 2.4. Przechowywanie układów

Zarówno emulsje podstawowe, jak i ze środkami konserwującymi, przechowywano w lodówce (4°C) chroniąc przed dostępem światła.

## 2.5. Długoterminowe badanie trwałości emulsji submikronowych ze środkami konserwującymi

Oceniano trwałość fizykochemiczną emulsji submikronowych Ivelip (10% i 20%) ze środkami konserwującymi. W tabeli 17 podano środki konserwujące i ich stężenia stosowane w badaniu trwałości z emulsjami submikronowymi.

Tabela 17. Środki konserwujące i ich stężenia [%, m/m] w emulsjach Ivelip (10% i 20%)

Środek konserwujący	Stężenie
Alkohol benzylowy	2,0
Bronopol	0,1
Chlorheksydyny glukonian	0,1
Chlorokrezol	0,1
Fenol	0,5
m- Krezol	0,1
Phenonip	0,8
Tiomersal	0,02

Środki konserwujące (oprócz Phenonipu) rozpuszczano w emulsjach Ivelip (10% lub 20%), mieszając szklanym mieszadłem łopatkowym przez 2 h (200 obr./min) w temperaturze pokojowej, a następnie dozowano w atmosferze azotu do szklanych fiolek, zamykano teflonowymi korkami i wyjaławiano termicznie w autoklawie.

Emulsję (20%) z Phenonipem stosowaną w badaniu stabilności fizykochemicznej sporządzono aseptycznie, jak opisano w p. 2.3 c.

Sporządzane emulsje przechowywano w temperaturze: 4°C (lodówka), 21±1°C (temperatura pokojowa) oraz 40°C (komora termostatowana). W odstępach czasowych: po sporządzeniu (t=0) oraz po 1, 3 oraz 6 miesiącach dokonywano analizy fizykochemicznej, która obejmowała: ocenę wizualną, obserwację mikroskopową, pomiar wielkości cząstek i pomiar pH (p. 7).

### 3. WODNE DYSPERSJE LECYTINY (WLD)

#### 3.1. Sporządzanie układów podstawowych

Sporządzano wodne dyspersje lecytyny (WLD) zawierające w swoim składzie lecytynę jajową w stężeniu: 1,2%; 2,4%; 5,0% (m/m). Dodatkowe substancje to: glicerol (2,5%), pełniący rolę substancji izotonizującej oraz wodorotlenek sodu (1 mol/l) dodany do korekty pH do ok. 8,0.

Składniki dyspersji odważono w kolbie stożkowej, a następnie ogrzewano w łaźni wodnej w temp. ok. 60°C przez 60 min, z równoczesnym mieszaniem mieszadłem magnetycznym. Uzyskane dyspersje, na gorąco, mieszano mieszadłem szybkoobrotowym Ultra-Turrax przez 2 minuty (8000 obr./min). Dalej postępowano stosując jedną z dwóch opisanych poniżej metod. Metoda 1 polegała na homogenizacji z użyciem ultradźwięków, a w metodzie 2 stosowano homogenizację wysokociśnieniową.

Metoda 1: po etapie mieszania mieszadłem szybkoobrotowym dyspersje poddawano sonikacji przez 10 min, przy częstotliwości 20 kHz i chłodzono do temperatury pokojowej. Za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (1 mol/l) korygowano pH do około 8,0, a następnie ponownie (na zimno) poddawano procesowi sonikacji przez 10 min przy częstotliwości 20 kHz. Natychmiast po sonikacji ciepłą dyspersję sączono przez filtr membranowy z estrów celulozy (0,45 µm).

Metoda 2: po etapie mieszania mieszadłem szybkoobrotowym dyspersje sączono przez filtr membranowy (0,45 µm, estry celulozy), ogrzewano do temperatury 70°C mieszając mieszadłem elektryczno - łopatkowym przez 20 min, chłodzono do temperatury 25°C w strumieniu zimnej wody, homogenizowano 8-krotnie przy ciśnieniu 500-600 bar i ponownie chłodzono do temperatury 25°C. Za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (1 mol/l) korygowano pH do około 8,0.

Dyspersje lecytyny, każdorazowo sporządzane w ilości około 300 ml, dozowano do szklanych fiolek (20 ml) w atmosferze azotu, zabezpieczano gumowymi korkami pokrytymi teflonem i metalowymi kapslami, a następnie wyjaławiano termicznie w autoklawie (121°C, 15 min).

WLD niezawierające środków konserwujących, jak i ze środkami konserwującymi, przechowywano w lodówce (4°C) chroniąc przed dostępem światła.

### 3.2. Wprowadzanie środków konserwujących do WLD

#### a) Parabeny M i P

Sporządzono WLD zawierające paraben M oraz paraben P w stężeniu 1,8 oraz 0,2 mg/g. Dyspersje N-WLD (tabela 18) różniły się zawartością lecytyny oraz zawartością parabenów. Układy sporządzano metodą 1 (p. 3.1) dodając na etapie wstępnego ogrzewania WLD (przed pierwszą sonikacją) odpowiednie ilości odważonych parabenów M i P.

Tabela 18. Skład wodnych dyspersji lecytyny [% m/m] ze środkami konserwującymi

WLD	Lecytyna jajowa	Glicerol	Paraben M	Paraben P	Chlorek benzalkoniowy	Pozostałe składniki	
<b>WLD bez środków konserwujących *</b>							
WLD1	1,2	2,5	-	-	-	glicerol 2,5% 1 mol/l NaOH woda oczyszczona	
WLD2	2,4	-	-	-	-		
<b>WLD ze środkami konserwującymi</b>							
N1-WLD	1,2	2,5	0,18	0,02	-		
N2-WLD	2,4	2,5	0,18	0,02	-		
N3-WLD	5,0	2,5	0,18	0,02	-		
N4-WLD	1,2	2,5	0,36	0,04	-		
B-WLD	1,2	2,5	-	-	0,02		

\* sporządzono metodą 1

#### b) chlorek benzalkoniowy

Sporządzono wodną dyspersję lecytyny (1,2% lecytyny jajowej) zawierającą chlorek benzalkoniowy w stężeniu 0,2 mg/g (B-WLD, tabela 18). Chlorek benzalkoniowy w postaci 0,5% roztworu pomocniczego dodawano na etapie odważania składników, a następnie postępowano jak opisano w metodzie 2 (p. 3.1).

## 4. DYSPERSJE LIPOSFER (NLC)

### 4.1. Sporządzanie NLC ze środkami konserwującymi

W badaniach wykorzystano gotową wodną zawiesinę liposfer (nanosfer lipidowych, NLC) o składzie przedstawionym w tabeli 9.

Phenonip (8 mg/g) lub chlorek benzalkoniowy (0,05 lub 0,1 mg/g) wprowadzano do dyspersji NLC w temperaturze pokojowej (mieszając mieszadłem magnetycznym) lub w trakcie ogrzewania poniżej lub powyżej 75°C (temperatura topnienia stałego lipidu). Rodzaje sporządzonych układów przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. NLC ze środkami konserwującymi [% m/m] w zależności od temperatury sporządzania

NLC	Phenonip	Chlorek benzalkoniowy	Temperatura sporządzania
P1-NLC	0,8	-	21°C
P2-NLC	0,8	-	50°C
P3-NLC	0,8	-	65°C
P4-NLC	0,8	-	80°C
B1-NLC	-	0,005	21°C
B2-NLC	-	0,01	21°C
B3-NLC	-	0,01	80°C

W warunkach aseptycznych, odważone środki konserwujące przenoszono ilościowo do wyjałowionych butelek i uzupełniano dyspersją NLC. Butelki zamykano jałowymi korkami, a następnie zawartość mieszano mieszadłem magnetycznym (200 obr./min) w temperaturze pokojowej przez 2 h. Układy dozowano w warunkach aseptycznych do wyjałowionych szklanych fiolek, wysycano azotem i zamykano jałowymi korkami teflonowymi. Dyspersje liposfer przechowywano w lodówce (temp. 4°C) chroniąc przed dostępem światła.

Badano również wpływ ogrzewania dyspersji liposfer na dystrybucję środków konserwujących. Dyspersje liposfer z Phenonipem ogrzewano w temperaturze: 50°C, 65°C lub 80°C, natomiast dyspersje liposfer z chlorkiem benzalkoniowym tylko w temperaturze 80°C. Po etapie ogrzewania ujednociano wielkość cząstek w dyspersjach liposfer mieszając mieszadłem szybkoobrotowym Ultra-Turrax (8000 obr./min) przez 1 min z jednoczesnym chłodzeniem mieszanej dyspersji w lodzie.

## 4.2. Długoterminowe badanie trwałości fizykochemicznej dyspersji liposfer ze środkami konserwującymi

Oceniano trwałość fizykochemiczną dyspersji liposfer z wybranymi środkami konserwującymi podczas przechowywania przez 6 miesięcy w temperaturze 4°C oraz w temperaturze pokojowej ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) (tabela 20).

Tabela 20. Środki konserwujące stosowane w badaniu zgodności fizykochemicznej z NLC

Środek konserwujący	Stężenie [%, m/m]
Benzalkoniowy chlorek	0,02
Bronopol	0,10
Chlorokrezol	0,2
Paraben M i P	0,18 i 0,02
Phenonip	0,8

Środki konserwujące rozpuszczano w temperaturze pokojowej mieszając zawiesiny liposfer mieszadłem magnetycznym 2 h (200 obr./min). Po sporządzeniu ( $t = 0$ ) oraz podczas przechowywania po 1, 3 oraz 6 miesiącach dokonywano analizy fizykochemicznej, która obejmowała ocenę wizualną, obserwację mikroskopową, pomiar wielkości cząstek, pomiar wartości pH, pomiar lepkości kinematycznej (p. 7).

## 5. DYSPERSJE LIPOSOMÓW (ZAKOSOMY®)

W badaniach wykorzystano gotową dyspersję liposomów (Zakosomy®) konserwowaną Phenonipem (8 mg/ml) o składzie podanym w tabeli 11.

## 6. PODSTAWOWE ROZTWORY I DYSPERSJE PRZEZNACZONE DO BADAŃ AKTYWNOŚCI POWIERZCHNIOWEJ

Do badań aktywności powierzchniowej sporządzono układy podstawowe surfaktantów (niezawierające w swoim składzie glicerolu):

- dyspersje lecytyny,
- dyspersje fosfatydylocholiny,

- roztwory polisorbatu 80,

roztwory środków konserwujących:

- chlorku benzalkoniowego,
- parabenu metyloвого

oraz mieszaniny surfaktantów ze środkami konserwującymi.

**Wodną dyspersję lecytyny** zawierającą 2,4% lecytyny jajowej (WLD2), sporządzono metodą 1 (p. 3.1). Przed wykonaniem pomiarów napięcia powierzchniowego sporządzono rozcieńczenia WLD2 w zakresie stężeń lecytyny podanych w tabeli 21. Serię rozcieńczeń wykonywano dodając wodę w stosunku 1:1.

**Wodną dyspersję fosfatydylocholiny** zawierającą 2,4% fosfatydylocholiny sporządzono tak samo jak WLD2 stosując metodę 1 (patrz p. 3.1). Przed wykonaniem pomiarów napięcia powierzchniowego sporządzono, jak podano powyżej, serię rozcieńczeń wyjałowionej dyspersji fosfatydylocholiny w zakresie stężeń fosfatydylocholiny podanym w tabeli 21.

**Roztwór polisorbatu 80** zawierający 2,4% polisorbatu 80 sporządzono w taki sam sposób jak WLD2 stosując metodę 1 (patrz p. 3.1). Przed wykonaniem pomiarów napięcia powierzchniowego wyjałowiony roztwór polisorbatu rozcieńczano wodą (j.w.) uzyskując zakres stężeń polisorbatu podany w tabeli 21.

**Roztwór chlorku benzalkoniowego** o stężeniu 10,0 mg/g sporządzono korzystając z 50% roztworu tego środka konserwującego. Ze sporządzonego roztworu sporządzono serię rozcieńczeń (tabela 21) stosując wodę (j.w.).

**Roztwór parabenu M** o stężeniu 3,60 mg/g sporządzono rozpuszczając paraben M w wodzie oczyszczonej w temperaturze (50°C) mieszając mieszadłem magnetycznym przez 24 h. Ze sporządzonego roztworu przygotowywano rozcieńczenia w zakresie stężeń parabenu M podanym w tabeli 21 stosując wodę (j.w.).

### **Sporządzanie mieszanin surfaktantów ze środkami konserwującymi**

Sporządzono mieszaniny surfaktantów ze środkami konserwującymi o zmiennym stężeniu surfaktantu, zawierające stałe stężenie środka konserwującego: chlorku benzalkoniowego (0,2 mg/g) lub parabenu M (1,8 mg/g). W tym celu każde kolejne rozcieńczenia surfaktantu wykonywano dodając w stosunku 1:1 roztwór środka konserwującego o dwukrotnie zwiększonym stężeniu.



Sporządzono również układ zawierający stałe stężenie lecytyny (12,0 mg/g) i zmienne stężenia chlorku benzalkoniowego (tabela 21). W tym celu każde kolejne rozcieńczenie środka konserwującego wykonywano dodając w stosunku 1:1 dyspersję lecytyny (2,4%).

Tabela 21. Mieszanki surfaktantów i środków konserwujących stosowane w badaniach aktywności powierzchniowej

Surfaktant	Stężenie [mg/g]	Środek konserwujący	Stężenie [mg/g]
Lecytyna jajowa	$4,70 \times 10^{-2} - 12,00$	-	-
	$4,70 \times 10^{-2} - 12,00$	Paraben M	1,80
	$4,70 \times 10^{-2} - 12,00$	Chlorek benzalkoniowy	0,20
	12,00	Chlorek benzalkoniowy	$6,25 \times 10^{-3} - 3,40$
Fosfatydylocholina	$1,17 \times 10^{-2} - 12,00$	-	-
	$1,17 \times 10^{-2} - 12,00$	Paraben M	1,80
	$1,17 \times 10^{-2} - 12,00$	Chlorek benzalkoniowy	0,20
Polisorbat 80	$2,29 \times 10^{-5} - 12,00$	-	-
	$2,29 \times 10^{-5} - 12,00$	Paraben M	1,80
	$2,29 \times 10^{-5} - 12,00$	Chlorek benzalkoniowy	0,20

## 7. ANALIZA FIZYKOCHEMICZNA

W tabeli 22 podano parametry fizykochemiczne, które badano w trakcie analizy submikronowych układów dyspersyjnych. Analiza obejmowała: obserwacje wizualne, mikroskopowe, pomiar pH, wielkość cząstek (metoda dyfrakcji laserowej), pomiar potencjału zeta, lepkości kinematycznej oraz aktywności powierzchniowej. Badania prowadzono po sporządzeniu układu (w przypadku WLD i dyspersji liposomów po 7 dniach od momentu sporządzenia) oraz, w zależności od rodzaju dyspersji, po czasie przechowywania ( $t = 1, 3, 6, 12$  miesięcy). Równolegle analizowano układy niezawierające środków konserwujących (oprócz dyspersji liposomów). Wyniki analiz odnoszono względem wartości początkowej ( $t = 0$ ).

Tabela 22. Parametry oraz czas analizy fizykochemicznej układów dyspersyjnych

Badany parametr	Emulsje submikronowe	Emulsje tradycyjne	WLD	NLC	Dyspersje liposomów
Obserwacje wizualne	+	+	+	+	+
Obserwacje mikroskopowe	+	+	+	-	+
pH	+	+	+	+	+
Wielkość cząstek	+	+	-	+	-
Potencjał zeta	+	+	+	-	-
Lepkość kinematyczna	+	-	-	+	-
Czas badania t =	0, 1, 3, 6, 12 m	0	7 dni	0, 1, 3, 6 m	7 dni

#### a) Ocena wizualna

Obserwacji wizualnej dokonywano okiem nieuzbrojonym oceniając: barwę, wygląd powierzchni, homogenność i konsystencję badanych układów.

#### b) Obserwacje mikroskopowe

Obserwacji mikroskopowej dokonywano za pomocą mikroskopu optycznego oceniając kształt i wielkość cząstek, obecność skupisk lub aglomeratów. Badane układy obserwowano po rozcieńczeniu wodą oczyszczoną - 1:1 (emulsje 10%), 1:2 (emulsje 20%) oraz 1:3 (NLC). Wodne dyspersje lecytyny oraz dyspersje liposomów obserwowano bez rozcieńczania. W przypadku wszystkich układów stosowano powiększenie 100 lub 400-krotne.

#### c) Badanie pH

Wartość pH określano metodą potencjometryczną, za pomocą elektrody kombinowanej, poprzez bezpośrednie zanurzenie elektrody w badanym układzie. Pomiar powtarzano trzykrotnie dla każdej próby, a uzyskany wynik stanowiła wartość średniej arytmetycznej z trzech niezależnych pomiarów.

**d) Badanie wielkości cząstek**

Wielkość cząstek lipidowych oznaczano za pomocą dyfraktometru laserowego Mastersizer E, stosując układ soczewek pozwalający na oznaczenie cząstek o średnicy w zakresie 50 nm - 80  $\mu\text{m}$ . Do jednokrotnego pomiaru używano około 300  $\mu\text{l}$  NLC, 500  $\mu\text{l}$  20% emulsji submikronowej, 1 ml 10% emulsji submikronowej. W przypadku Zakosomów<sup>®</sup> oraz wodnych dyspersji lecytyny, ze względu na zbyt duże rozcieńczenie układów, nie udało się dokonać pomiaru wielkości cząstek tą metodą. Rozkład wielkości cząstek opisywano następującymi parametrami:

- d (0,5) - mediana średnicy; poniżej tej wartości zawiera się średnica 50% cząstek obecnych w układzie,
- d (0,9) - maksymalna średnica 90% cząstek,
- d<sub>max</sub> - średnica największych wykrywalnych cząstek.

**e) Badanie potencjału zeta**

Badanie wielkości potencjału zeta emulsji submikronowych, WLD oraz dyspersji liposfer wykonano za pomocą aparatu Zetasizer w Warszawskich Zakładach Farmaceutycznych „Polfa”.

**f) Pomiar lepkości kinematycznej**

Pomiaru lepkości kinematycznej dokonywano, umieszczając badany układ w kapilarze wiskozymetru kapilarnego typu Ubbelohde'a. Mierzono czas opadania poziomu cieczy w kapilarze na określonym odcinku. Lepkość kinematyczną obliczano ze wzoru:

$$v = K \times t \quad (11)$$

gdzie:  $v$  = lepkość kinematyczna [ $\text{mm}^2/\text{s}$ ]

$K$  = stała charakterystyczna dla danego typu kapilary [ $\text{mm}^2/\text{s}^2$ ]

$t$  = czas opadania cieczy na określonym odcinku kapilary [s]

W badaniach lepkości kinematycznej, w zależności od lepkości układu, stosowano jedną z poniższych kapilar:

- kapilara typu Ia ( $K = 0,4924 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ ) dla dyspersji liposfer (NLC),
- kapilara typu IIc ( $K = 0,3077 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ ) dla emulsji submikronowych.

## 8. POMIAR AKTYWNOŚCI POWIERZCHNIOWEJ MIESZANIN SURFAKTANTÓW ZE ŚRODKAMI KONSERWUJĄCYMI

Pomiary aktywności powierzchniowej wykonywano we współpracy z Instytutem Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Gdańskiego. Badania prowadzono z zastosowaniem tensometru sterowanego ręcznie (uśredniając wyniki pomiarów,  $n = 5$ ) metodą płytkową Wilhelmięgo. Wyznaczano zależności napięcia powierzchniowego ( $\gamma$ ) w funkcji stężenia ( $c$ ) dla roztworów surfaktantów (lecytyna jajowa, polisorbant 80 lub fosfatydylocholina), środków konserwujących (chlorek benzalkoniowy, paraben M) oraz mieszanin surfaktantów z wymienionymi środkami konserwującymi (tabela 20). Metody sporządzania rozcieńczeń badanych roztworów i mieszanin przedstawiono w p. 6 (str. 71).

Mierzono także napięcie powierzchniowe wody oczyszczonej używanej do sporządzania rozcieńczeń badanych układów oraz roztworu glicerolu (2,5%), będącego składnikiem badanych emulsji submikronowych i wodnych dyspersji lecytyny.

Metoda płytkowa polegała na pomiarze siły potrzebnej do oderwania płytki pozostającej w kontakcie z powierzchnią cieczy przy uwzględnieniu wartości napięcia elektrycznego rejestrowanego dla płytki tuż po jej oderwaniu ( $\Delta U$ , wzór 12) [103, 104]. Wzór 12 posłużył do obliczenia napięcia powierzchniowego badanej cieczy (wzór 13).

$$F = 2d \times \gamma \times (\cos \theta) = k \times \Delta U \quad (12)$$

Zakładając, że kąt kontaktu płytek pomiarowych z badaną cieczą w warunkach całkowitego zwilżania wynosi 0 ( $\cos 0 = 1$ ) otrzymano ostatecznie zależność:

$$\gamma = \frac{k \times \Delta U}{2d} \quad (13)$$

gdzie:

$F$  – siła potrzebna do oderwania płytki pomiarowej [dyn]

$d$  – szerokość płytek pomiarowych [cm]

$\gamma$  – napięcie powierzchniowe [dyn/cm  $\equiv$  mN/m]

$\theta$  – kąt kontaktu płytki pomiarowej z badana cieczą [stopień]

$k$  – stała przyrządowa czujnika siły [dyn/V]

$\Delta U$  – różnica napięcia elektrycznego [V] pomiędzy rejestrowanym przy odrywaniu płytki pomiarowej a wskazywanym dla płytki bezpośrednio po wynurzeniu

Wyznaczano zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia badanego surfaktantu  $\gamma$  (c).

Przed wykonaniem serii pomiarów każdorazowo określano stałą przyrządową czujnika siły (k) obciążając ramię czujnika ciężarkami o znanej masie  $m_c$  ( $\Delta m = 0,001$  g), powodującym siłę  $F_1 = m_c g$  (g – przyspieszenie grawitacyjne  $981 \text{ cm/s}^2$ ), odczytując napięcie (U). Czynność powtarzano dla trzech różnych ciężarków, obliczając wartość średnią (k).

Układ pomiaru napięcia powierzchniowego pozwala na pomiar napięcia powierzchniowego z dokładnością  $0,1 \text{ mN/m}$  przy szerokości zastosowanych płytek (d) około  $5 \text{ cm}$ .

Krytyczne stężenie micelarne (cmc) badanych cieczy wyznaczano z punktu przecięcia stycznych krzywej doświadczalnej zależności  $\gamma$  (c), w sąsiedztwie punktu przegięcia krzywej.

## 9. BADANIE DYSTRYBUCJI ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH W UKŁADACH DYSERSYJNYCH

W celu badania dystrybucji środków konserwujących w układach dyspersyjnych oznaczano ich zawartości w fazie wodnej, którą uzyskiwano dwoma metodami (p. 9.4). Na podstawie znajomości teoretycznej zawartości środków konserwujących w emulsjach submikronowych oraz zawartości w fazie wodnej, wykorzystując model matematyczny (Wstęp str. 34), obliczano dystrybucję pomiędzy fazy emulsji submikronowych i tradycyjnych (p. 9.7).

Uzyskane wyniki zawartości środków konserwujących w fazie wodnej odnoszono do ich teoretycznej zawartości w danym układzie, dlatego w celu sprawdzenia faktycznej ilości środków konserwujących oznaczano całkowitą zawartość środków konserwujących w badanych układach (p. 9.3).

Badano rozpuszczalność parabenów M i P w wodzie, oleju sojowym i WLD oraz współczynnik podziału olej sojowy/woda (p. 9.2).

Analizę ilościową środków konserwujących wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (p. 10).

### 9.1. Badanie rozpuszczalności parabenów M i P

Rozpuszczalność parabenów oznaczano w temperaturze pokojowej ( $21^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Nadmiar parabenów M i P odważano do szklanych fiolek i dodawano 20 ml wody oczyszczonej, oleju sojowego albo wodnej dyspersji lecytyny (1,2% lub 2,4% lecytyny oraz 2,5% glicerolu). Zawiesiny w zamkniętych fiolkach mieszano na wielostanowiskowym mieszadle magnetycznym (600 obr./min) przez 24 h. W celu usunięcia nadmiaru nierozpuszczonych parabenów próby wirowano (20 min, 3000 obr./min). Z pobranego supernatantu sporządzano rozcieńczenia wodne, które analizowano metodą HPLC (p. 10). Każde doświadczenie powtarzano trzykrotnie.

### 9.2. Oznaczanie współczynnika podziału parabenów pomiędzy olej sojowy i wodę

Współczynnik podziału parabenów M i P pomiędzy olej sojowy i wodę oznaczano w temperaturze pokojowej ( $21^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). W tym celu 10 ml nasyconego wodnego roztworu parabenu M i P wytrząsano w rozdzielaczu z 10 ml oleju sojowego i pozostawiono na 24 h. Po tym czasie pobierano z rozdzielacza dolną fazę, wirowano (3000 obr./min, 20 min), a uzyskaną fazę wodną analizowano metodą HPLC (p. 10). Współczynnik podziału obliczano na podstawie początkowego (w roztworze nasyconym) i końcowego (w fazie wodnej) stężenia parabenów M i P.

### 9.3. Oznaczanie całkowitej zawartości środków konserwujących w układach dyspersyjnych

*Emulsje submikronowe, wodne dyspersje lecytyny (WLD) i zawiesiny liposomów*

Do kolbki miarowej poj. 10 ml odmierzano 50  $\mu\text{l}$  badanego układu, ważono, dodawano ok. 7 ml metanolu, wytrząsano ręcznie, a następnie uzupełniano metanolem. Otrzymane roztwory analizowano metodą HPLC (p. 10).

*Zawiesiny liposfer (NLC)*

Zawiesiny liposfer (NLC) odmierzano w ilości 200  $\mu\text{l}$  do probówki, ważono i dodawano ok. 5 ml wody oczyszczonej. Zawartość probówek wstrząsano ręcznie ogrzewając w łaźni wodnej w temperaturze  $80^{\circ}\text{C}$  (stopienie fazy lipidowej). Po

ostudzeniu do temperatury pokojowej, zawartość przenoszono ilościowo do kolbki miarowej i uzupełniano wodą oczyszczoną. Uzyskane dyspersje wirowano (5000 obr./min, 20 min). Ze względu na brak klarownego roztworu próby zamrożono na 24 h. Po rozmrożeniu w temperaturze pokojowej ponownie wirowano (5000 obr./min, 30 min). Zbierano górną, mętną frakcję lipidową, a pozostały, klarowny roztwór analizowano metodą HPLC (p. 10).

#### 9.4. Otrzymanie fazy wodnej badanych układów

Fazę wodną badanych układów, w celu oznaczenia zawartości środków konserwujących, uzyskiwano metodami ultrawierowania lub ultrafiltracji.

##### *a) ultrawierowanie (metoda uw)*

Badane układy ultrawierowano (147000 x g) przez 4 h. W zależności od rodzaju układu dyspersyjnego uzyskiwano rozdział faz na dwie (WLD), trzy (NLC) lub cztery (emulsje) fazy. Najbardziej klarowną fazę pobierano za pomocą igły i strzykawki.

##### *b) ultrafiltracja (metoda uf)*

Do ultrafiltracji używano sączonek ultrafiltracyjnych typu Microcon YM-100 (100 kDa) (ryc. 8). Ultrafiltracji poddawano fazę uzyskaną metodą ultrawierowania („wodno-liposomalno-micelną”). Na sączonek ultrafiltracyjny nanoszono po 300 µl badanego układu i wirowano (4000 obr./min, 20 min). Otrzymywano około 50-200 µl ultrafiltratu, który rozcieńczano metanolem (fazę wodną zawierającą chlorek benzalkoniowy rozcieńczano wodą) i analizowano metodą HPLC (p. 10).



Ryc. 8. Sączonek ultrafiltracyjny typu Microcon YM-100.

Ultrafiltracji poddawano także badane układy dyspersyjne, przy czym wydłużano czas ultrafiltracji do 40, a nawet do 60 min. Uzyskiwano 10-50 µl ultrafiltratu, który analizowano metodą HPLC (p. 10) bezpośrednio lub po

rozcieńczeniu metanolem. W przypadku zawiesiny liposfer nie udało się uzyskać fazy wodnej wyżej opisaną metodą.

### 9.5. Ocena adsorpcji oraz absorpcji parabenów na sączku ultrafiltracyjnym

Metanolowy roztwór parabenów M i P, o stężeniu odpowiednio 9 oraz 1  $\mu\text{g/ml}$ , наносono na sączek ultrafiltracyjny w ilości po 300  $\mu\text{l}$  i poddawano trzykrotnej ultrafiltracji, każdorazowo analizując stężenie obu parabenów w ultrafiltracie metodą HPLC (p. 10). Uzyskane stężenia porównywano ze stężeniem наносzonym na sączek i oceniano procent adsorpcji obu środków konserwujących na sączku ultrafiltracyjnym. Powyższe doświadczenia powtarzano trzykrotnie.

### 9.6. Ocena zdolności ultrafiltracji miceli tworzonych przez chlorek benzalkoniowy

Wodne roztwory chlorku benzalkoniowego o stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  (stężenie zbliżone do wykrywanego w fazie wodnej) oraz o stężeniu 1,0% (m/m) (powyżej krytycznego stężenia micelnego) наносono na sączek ultrafiltracyjny w ilości po 300  $\mu\text{l}$  i poddawano trzykrotnej ultrafiltracji przez ten sam sączek ultrafiltracyjny. Każdorazowo w uzyskiwanym ultrafiltracie oznaczano stężenie środka konserwującego metodą HPLC (p. 10). Powyższe doświadczenia powtarzano trzykrotnie.

### 9.7. Określanie dystrybucji środków konserwujących pomiędzy fazy emulsji na podstawie modelu matematycznego

Korzystając z oznaczonej zawartości środków konserwujących w fazie wodnej uzyskanej metodą ultrafiltracji (uf) i w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” (uw) uzyskanej metodą ultrawirowania oraz wyznaczonego współczynnika podziału olej sojowy/woda, obliczono zawartość parabenów w fazie olejowej (o), liposomalno-micelarnej (ml) i w międzyfazie bogatej w surfaktant. Obliczeń dokonywano stosując następujące równania [16]:



$$F_w = \frac{c_w \times V_w}{m} \quad (6)$$

$$F_{lm} = \frac{(c_{uw} - c_{uf}) \times V_w}{m} \quad (7)$$

$$F_{o+i} = 1 - (F_{lm} + F_w) \quad (8)$$

$$F_o = \frac{c_w \times V_o \times P}{m} \quad (9)$$

$$F_i = F_{o+i} - F_o \quad (10)$$

gdzie:

$F_w$  - frakcja środka konserwującego w fazie wodnej otrzymanej metodą ultrafiltracji

$F_{lm}$  - frakcja środka konserwującego w fazie liposomalno - micelarnej

$F_o$  - frakcja środka konserwującego w fazie olejowej

$F_i$  - frakcja środka konserwującego w międzyfazie

$F_{o+i}$  – frakcja środka konserwującego w fazie olejowej i międzyfazie

$c_{uf}$  - stężenie [mg/ml] środka konserwującego w fazie wodnej otrzymanej metodą ultrafiltracji

$c_{uw}$  - stężenie [mg/ml] środka konserwującego w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” otrzymanej metodą ultrawierowania

$V_w$  - objętość [ml] fazy wodnej

$V_o$  - objętość [ml] fazy olejowej

$m$  – całkowita (teoretyczna) ilość [mg] środka konserwującego w emulsji

$P$  – współczynnik podziału środka konserwującego pomiędzy olej i wodę.

## 10. ANALIZA ILOŚCIOWA ŚRODKÓW KONSERWUJĄCYCH METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)

Stężenie środków konserwujących oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) w układzie odwróconych faz (RP-LC). Do rozdzielania analizowanych środków konserwujących stosowano kolumnę chromatograficzną z wypełnieniem oktadecylosililowym (C18) o wymiarach 250 x 4 mm. W przypadku analizy chlorku benzalkoniowego stosowano kolumnę chromatograficzną z wypełnieniem oktadecylosililowym (C18) o wymiarach 250 x 4,6 mm przeznaczoną dla faz o niskim pH (nie mniejszym niż pH = 1). Na kolumnę nanoszono za pomocą pętli dozującej po 20 µl badanego roztworu. Składy faz

ruchomych, szybkości przepływu fazy ruchomej, analityczne długości fal, przy której dokonywano oznaczeń oraz charakterystyczne czasy retencji poszczególnych środków konserwujących przedstawiono w tabeli 23. Na podstawie uzyskanych wyników, metodą najmniejszych kwadratów, wyznaczano dla danego roztworu wzorcowego środka konserwującego równania regresji liniowej zależności powierzchni pików od stężenia. Równania regresji oraz współczynnik determinacji ( $R^2$ ) podano w tabeli 23.

Tabela 23. Parametry chromatograficzne dla poszczególnych środków konserwujących

Środek konserwujący	Parabeny M i P	Chlorek benzalkoniowy	Alkohol $\beta$ -fenyloetylowy	Phenonip
Faza ruchoma [v/v]	metanol : woda (65 :35)	0,05 mol/l bufor fosforowy ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) o pH 2,5 i acetonitryl (3:7)		0,05 mol/l bufor fosforowy ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) o pH 3,5 i acetonitryl (7:3)
Szybkość przepływu [ml/min]	0,8	1,0	1,0	1,0
Analityczna długość fali [nm]	254	220	220	270
Czas retencji [min]	4,3 (paraben M) 7,2 (paraben P)	6,2; 11,0; 15,6 (analogi alkilowe)	3,4	6,8 (fenoksyetanol) 7,0 (paraben M) 13,7 (paraben A) 27,2 (paraben P)
Stężenia roztworów wzorcowych [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1,0 – 10,0 (M) 1,0 – 10,0 (P)	0,5 – 50,0	10,0 – 100,0	0,5 – 10,0 (fenoksyet.) 0,5 – 20,0 (parab. M) 0,5 – 5,0 (parab. A) 0,1 – 5,0 (parab. P)
Równania regresji liniowej roztworów wzorcowych	$A=77,699c-3,51$ $A=66,727c-1,05$	$A=5,596c-3,97$	$A=12,225c+2,57$	(dla składników j.w.) $A=9,7018c-0,1983$ $A=65,146c-0,0731$ $A=63,901c-0,3525$ $A=60,847c-3,6303$
Współczynnik determinacji ( $R^2$ )	0,9998 (M) 0,9996 (P)	0,9998	0,9992	0,9998 (fenoksyet.) 0,9998 (paraben M) 0,9991 (paraben A) 0,9998 (paraben P)

$A$  – pole powierzchni pików [tys.]

$c$  – stężenie analizowanego środka konserwującego [ $\mu\text{g/ml}$ ]

Stężenia środków konserwujących w analizowanych roztworach,  $c_b$  [ $\mu\text{g/ml}$ ] obliczano na podstawie wzoru 14:

$$c_b = \frac{c_w \times A_b}{A_w} \quad (14)$$

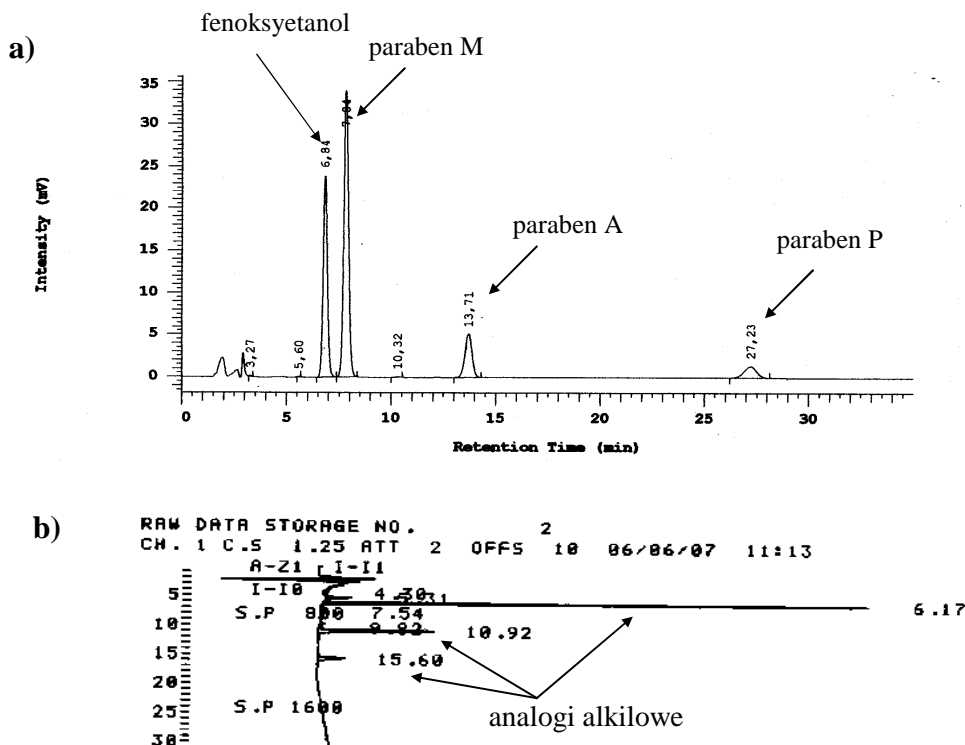
gdzie:

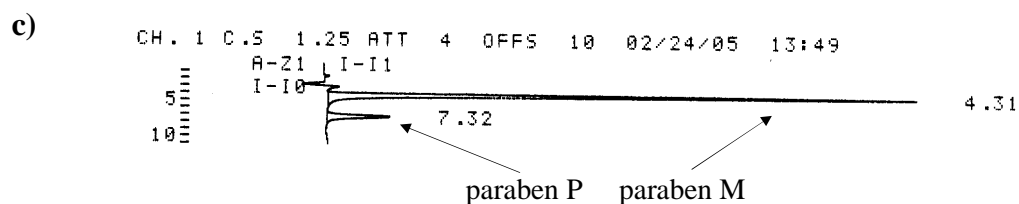
$c_w$  – stężenie [ $\mu\text{g/ml}$ ] roztworu wzorcowego

$A_b$  – pole powierzchni pików na chromatogramie roztworu badanego

$A_w$  – pole powierzchni pików na chromatogramie roztworu wzorcowego

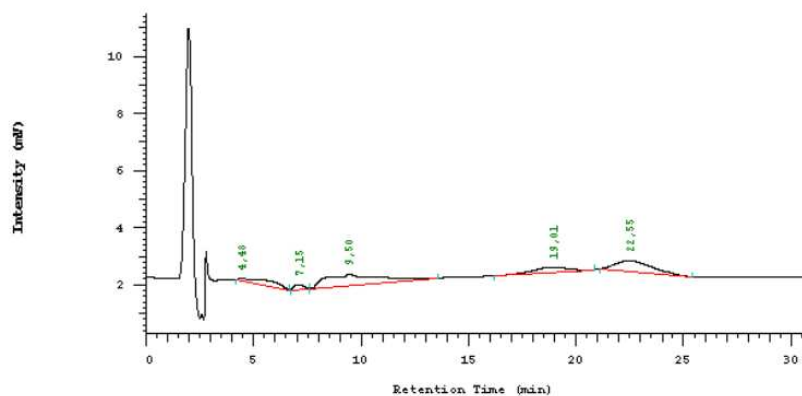
W celu określenia powtarzalności i liniowości metody HPLC analizowano roztwory wzorcowe środków konserwujących. Jako rozpuszczalnik stosowano wodę oczyszczoną (dla chlorku benzalkoniowego) lub metanol (dla pozostałych środków konserwujących). Zakresy stężeń roztworów wzorcowych oraz charakterystyczne czasy retencji przedstawiono w tabeli 23. Na ryc. 9 przedstawiono chromatogramy poszczególnych środków konserwujących. Krzywe wzorcowe oraz równania regresji wyznaczane dla danego środka konserwującego podano w tabeli 23.





Ryc. 9. Chromatogramy roztworów wzorcowych środków konserwujących a) Phenonipu, b) chlorku benzalkoniowego, c) parabenów M i P.

Na ryc. 10 przedstawiono przykładowy chromatogram układu dyspersyjnego niezawierającego środków konserwujących. Na kolumnę chromatograficzną nanoszono odpowiednio rozcieńczone emulsje submikronowe, tradycyjne, WLD, NLC niezawierające środków konserwujących i porównywano uzyskane chromatogramy z wzorcowymi roztworami środków konserwujących.



Ryc. 10. Przykładowy chromatogram układu dyspersyjnego (emulsji submikronowej) bez środków konserwujących.

## 11. OCENA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Weryfikacji statystycznej wyników dokonywano przy użyciu parametrycznego testu istotności (t-Studenta), przy  $\alpha = 0,05$ . Obliczeń dokonywano za pomocą programu MS Excel.

## **IV. WYNIKI**

## ROZPUSZCZALNOŚĆ PARABENÓW

W tabeli 24 podano oznaczoną rozpuszczalność parabenów M i P w fazach emulsji (Metodyka p. 9.1) oraz współczynnik podziału olej sojowy/woda (Metodyka p. 9.2).

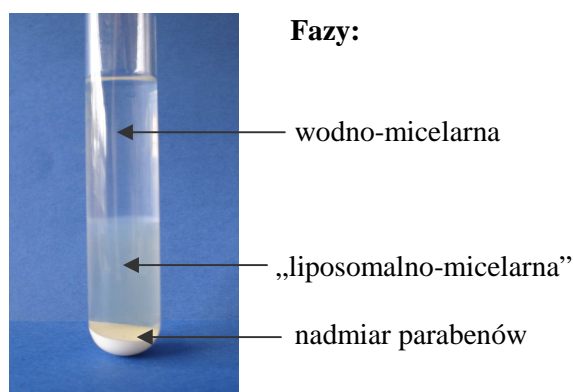
Tabela 24. Rozpuszczalność parabenów [mg/ml] w wodzie, oleju sojowym, WLD i roztworze glicerolu oraz współczynnik podziału olej sojowy/woda

Rozpuszczalnik	paraben M	paraben P
<b>Rozpuszczalność [mg/ml]</b>		
Woda	2,06	0,38
Roztwór glicerolu (2,5%)	3,15	0,50
Olej sojowy	17,90	32,90
WLD (1,2% lecytyny)	2,94	1,26
WLD (2,4% lecytyny)	7,38	5,99
<b>Współczynnik podziału</b>		
Olej sojowy/woda	6,10	65,90

Rozpuszczalność parabenu P w wodzie była około 5-krotnie mniejsza, natomiast w oleju sojowym około 2-krotnie większa w porównaniu z parabenem M. Ostatecznie współczynnik podziału olej sojowy/woda był 10-krotnie większy dla parabenu P niż dla parabenu M. W obecności glicerolu (2,5%) rozpuszczalność obu parabenów w niewielkim stopniu uległa zwiększeniu.

Obecność lecytyny w stężeniu 1,2% (w roztworze 2,5% glicerolu) nie powodowała zmiany rozpuszczalności parabenu M, natomiast 2,5-krotnie zwiększyła rozpuszczalność bardziej lipofilnego parabenu P (tabela 24). Wzrost stężenia lecytyny do 2,4% zwiększył rozpuszczalność obu środków konserwujących - parabenu M 2,5-krotnie, a parabenu P nawet 12-krotnie.

Podczas odwirowywania nadmiaru nierozpuszczonych parabenów w 2,4% WLD obserwowano rozdział faz: nad osadem nierozpuszczonych parabenów obserwowano skondensowaną dyspersję lecytyny (faza „liposomalno-micelarna”), nad którą znajdowała się opalizująca faza wodno-micelarna (ryc. 11).



Ryc.11. Rozdział faz w WLD (2,4% lecytyny) po wirowaniu.

Oznaczona rozpuszczalność parabenów M i P w fazie wodno-micelarnej układu była porównywalna z ich rozpuszczalnością w wodzie (odpowiednio 2,44 i 0,45 mg/ml) (tabela 24). Natomiast w fazie „liposomalno-micelarnej”, niezależnie od różnic w lipofilności, uzyskano porównywalną rozpuszczalność parabenów M i P (odpowiednio 11,80 i 13,10 mg/ml).

## EMULSJE SUBMIKRONOWE

W tabeli 25 przedstawiono środki konserwujące poddane badaniu dystrybucji i zgodności z układem fizycznym emulsji submikronowych. Emulsje submikronowe, których skład przedstawiono w tabelach 12-16, sporządzano w sposób opisany w dziale Metodyka (p. 2.1).

Tabela 25. Środki konserwujące oraz ich stężenia w emulsjach submikronowych w zależności od rodzaju badania

Badania	Środek konserwujący	Stężenie [%, w/w]
Trwałość	Alkohol $\beta$ -fenyloetylowy	0,50
	Bronopol	0,10
	Chlorek benzalkoniowy	0,01
	Fenol	0,50
	Glukonian chlorheksydyny	0,10
	Chlorokrezol	0,10
	m-Krezol	0,10
	Phenonip	0,80
	Mieszanina parabenów M i P	0,18 i 0,02
	Mieszanina chlorokrezolu z alkoholem $\beta$ -fenyloetylowym i EDTA	0,10; 0,50; 0,10

<b>Dystrybucja</b>	Mieszanina parabenów metylowego i propylowego	0,18 i 0,02 0,36 i 0,04
	Phenonip	0,80
	Chlorek benzalkoniowy	0,005; 0,01; 0,02
	Mieszanina chlorku benzalkoniowego z alkoholem $\beta$ -fenyloetylowym i EDTA	0,02; 0,50; 0,10

### ➤ Parabeny M i P

#### Ocena fizykochemiczna emulsji

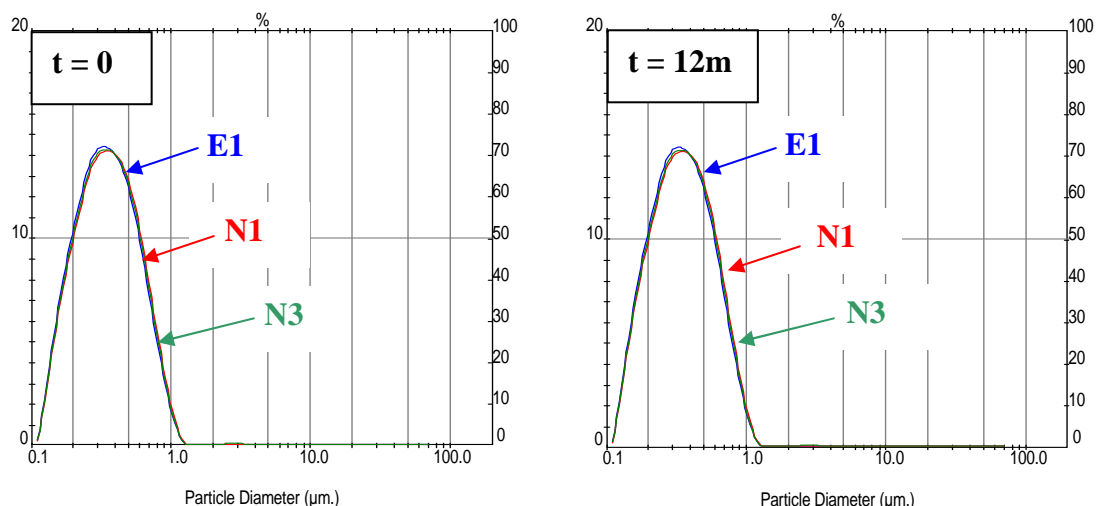
Po sporządzeniu emulsje submikronowe charakteryzowały się białą barwą, płynną konsystencją i homogennością. Dodanie parabenów nie powodowało zauważalnych zmian wizualnych emulsji.

W tabeli 26 oraz na ryc. 12 przedstawiono wpływ procesu wyjaławiania termicznego oraz warunków przechowywania na **wielkość cząstek** emulsji submikronowych.

Tabela 26. Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ] oraz pH emulsji submikronowych: bez środka konserwującego (E1-E4) oraz z parabenami M i P (N1-N4)

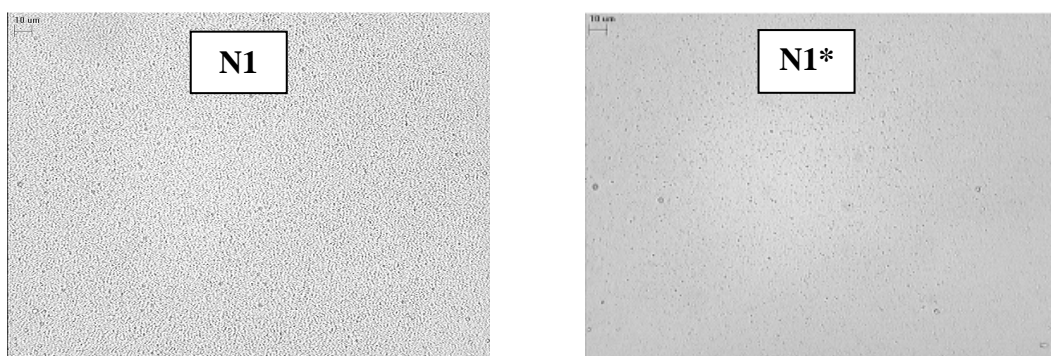
Emulsja	t = 0								t = 12 m (4°C)			
	Niewyjałowiona				Wyjałowiona				Wyjałowiona			
	d <sub>(0,5)</sub>	d <sub>(0,9)</sub>	d <sub>max</sub>	pH	d <sub>(0,5)</sub>	d <sub>(0,9)</sub>	d <sub>max</sub>	pH	d <sub>(0,5)</sub>	d <sub>(0,9)</sub>	d <sub>max</sub>	pH
<b>Emulsje bez środków konserwujących</b>												
<b>E1</b>	0,30	0,55	0,81	8,18	0,34	0,67	4,30	6,41	0,34	0,73	4,37	6,01
<b>E2*</b>	0,37	0,67	1,00	-	0,41	0,76	1,23	7,89	0,31	0,63	4,92	6,64
<b>E3*</b>	0,40	0,76	1,00	-	0,42	0,81	4,30	7,49	0,42	0,81	5,29	6,72
<b>E4</b>	0,30	0,56	0,81	8,21	0,30	0,56	0,81	6,93	0,33	0,77	4,69	6,53
<b>Emulsje z parabenami</b>												
<b>N1</b>	0,35	0,69	4,30	8,15	0,35	0,70	4,30	7,86	0,35	0,67	4,30	7,54
<b>N1*</b>	0,30	0,57	1,00	-	0,31	0,58	4,30	7,11	0,31	0,59	4,92	6,76
<b>N2</b>	0,41	1,07	4,30	8,18	0,41	0,80	4,30	7,80	0,41	0,80	4,30	7,70
<b>N3</b>	0,32	0,60	1,00	8,21	0,35	0,69	4,30	7,59	0,35	0,68	5,29	7,30
<b>N4</b>	0,31	0,59	4,30	8,20	0,31	0,59	4,30	8,00	0,31	0,57	4,30	7,96





Ryc. 12. Rozkład wielkości cząstek w wyjąłowionych termicznie 10% emulsjach submikronowych: bez środka konserwującego (E1) oraz z parabenami (N1, N3), przechowywanych w temperaturze 4°C przez 12 miesięcy.

Obecność parabenów nie powodowała zmiany wielkości cząstek w emulsjach submikronowych. Średnia wielkość cząstek fazy olejowej, zarówno w 10%, jak i 20% emulsjach, wynosiła około 300 nm. Nie stwierdzono cząstek o średnicy powyżej 4,30 µm (tabela 26). Jedynie w 20% emulsjach zawierających 1,2% lecytyny (E3\*, N2) mediana wielkości cząstek wynosiła około 410 nm. Proces wyjąławiania termicznego nie zmieniał wielkości cząstek emulsji. Natomiast dwukrotne zwiększenie całkowitej ilości parabenów w emulsji N4 spowodowało znaczne zmniejszenie wielkości cząstek fazy olejowej ( $p < 0,05$ ). Metoda dodania parabenów do emulsji (*de novo* lub *ex tempore*) nie powodowała zmiany wielkości cząstek emulsji, co potwierdzono również obserwacjami mikroskopowymi (ryc. 13).



Ryc. 13. Obraz mikroskopowy emulsji submikronowych z parabenami dodanymi *de novo* (N1) lub *ex tempore* (N1\*) (znacznik skali 10 µm).

Dwukrotne zwiększenie stężenia lecytyny w 20% emulsjach powodowało nieznaczne zmniejszenie wielkości cząstek, niezależnie od obecności środków konserwujących (emulsje E3\* i E4 oraz N2 i N3). Nie stwierdzono zwiększenia wielkości cząstek w obu rodzajach emulsji podczas przechowywania przez 12 miesięcy w temperaturze 4°C (tabela 26, ryc. 12).

W tabeli 26 podano **wartość pH** emulsji po sporządzeniu i po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 4°C. Po sporządzeniu pH emulsji wynosiło około 5,5, dlatego przed procesem wyjaławiania termicznego korygowano pH do wartości około 8,0. Po wyjałowieniu termicznym obserwowano w emulsjach spadek wartości pH o około 1,5 jednostki, co jest zjawiskiem naturalnie występującym w tego typu układach [36]. W emulsjach z parabenami spadek pH po wyjałowieniu w dużym stopniu został zatrzymany i w emulsji zawierającej największe stężenie parabenów (N4) obserwowano najmniejszy spadek pH (tylko o 0,2 jednostki). Podczas przechowywania przez 12 miesięcy (4°C) pH uległo obniżeniu o 1 jednostkę w emulsjach niezawierających środków konserwujących, a w emulsjach z parabenami tylko o 0,3 jednostki.

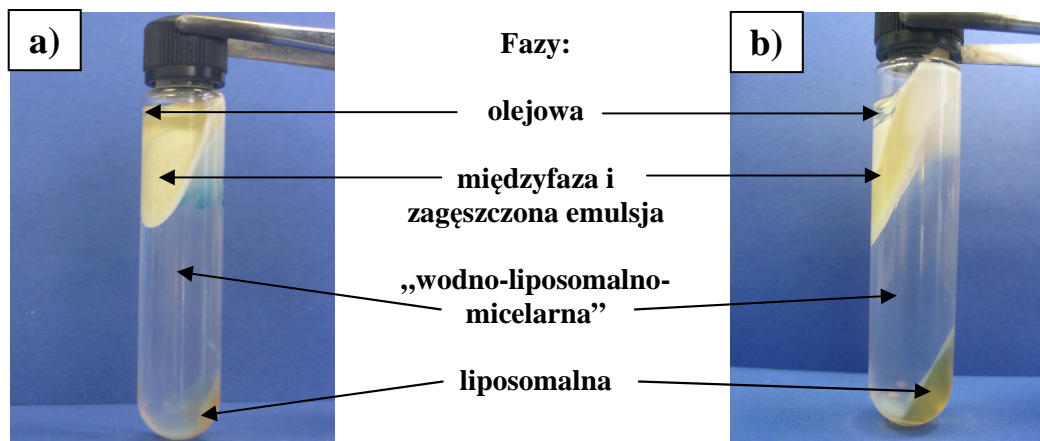
W tabeli 27 przedstawiono wartości **potencjału zeta** sporządzonych emulsji. Emulsja submikronowa (10%), niezawierająca środków konserwujących (E1), sporządzona *de novo*, charakteryzowała się ujemnym potencjałem zeta (-68,5 mV), który podczas przechowywania nie uległ zmianie. Pomiaru potencjału zeta emulsji z parabenami dokonywano po 12 miesiącach po sporządzeniu. Dodanie parabenów nie zmieniło potencjału zeta. We wszystkich emulsjach, oprócz z chlorkiem benzalkoniowym, po 12 miesiącach notowano nadal wysoki ujemny potencjał zeta (od -48 do -69 mV). Najniższą wartością potencjału zeta charakteryzowała się emulsja zawierająca podwójną ilość parabenów (N4), jednak podobny potencjał zeta zmierzono w emulsji Ivelip zawierającej mniejszą ilość parabenów (N1\*).

Tabela 27. Wpływ środków konserwujących na potencjał zeta [mV] emulsji submikronowych

Czas badania	Emulsje z parabenami							Emulsje z chlorkiem benzalkoniowym		
	E1	E4	N1	N1*	N2	N3	N4	B1*	B2	B3*
t = 0	-68,5	-	-	-	-	-	-	-13,3	-36,9	+20,9
t = 12m	-67,3	-66,2	-69,2	-47,9	-67,2	-58,3	-49,9	-	-	+9,8

### Dystrybucja parabenów w fazach emulsji

Ultrawierowanie (Metodyka p. 9.4.a) emulsji submikronowych powodowało rozdział na fazy: olejową, międzyfazę z zagęszczoną fazą emulsyjną, „wodno-liposomalno-micelarną” („w-l-m”) oraz liposomalną (ryc. 14).



Ryc. 14. Rozdział faz uzyskany po ultrawierowaniu emulsji submikronowych: a) 10% oleju sojowego i 1,2% lecytyny oraz b) 20% oleju sojowego 2,4% lecytyny.

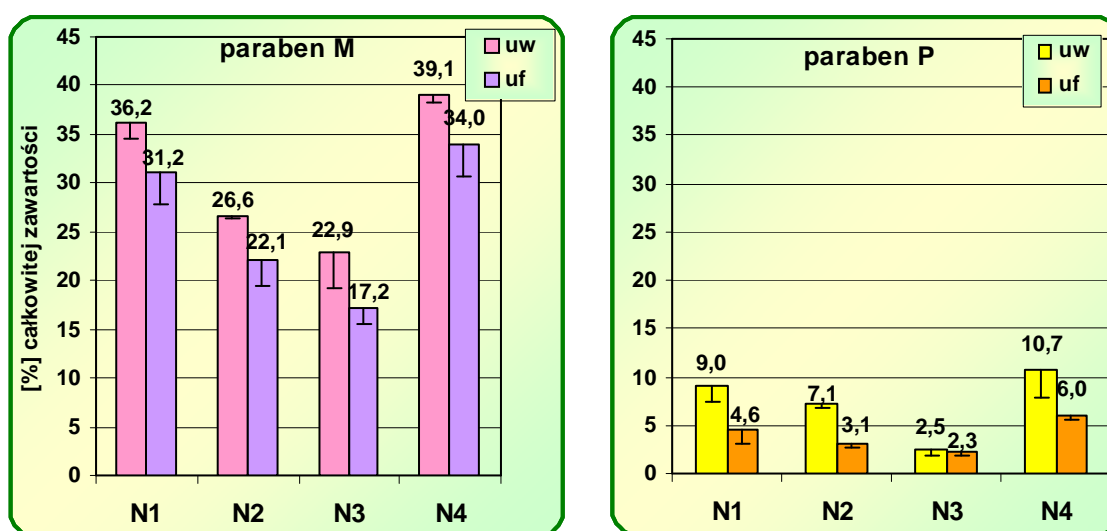
W emulsjach 20% wydzielilo się więcej oleju niż w emulsjach 10%, a warstwa międzyfazy była większa i bardziej sztywna. Niezależnie od rodzaju emulsji uzyskiwano klarowną fazę wodną zawierającą frakcję liposomalno-micelarną. Przy dnie probówki obserwowano niewielki zżelowany osad fosfolipidowy („liposomalny”), który był zdecydowanie większy w emulsji zawierającej 2,4% lecytyny.

Podczas pobierania fazy „w-l-m” dochodziło dodatkowo do zanieczyszczenia tej fazy zagęszczoną emulsją.

Poddając emulsje submikronowe ultrafiltracji (Metodyka p. 9.4.b) bez wstępnego ultrawierowania otrzymywano klarowną fazę wodną w ilości zaledwie 10-20 µl. Lepsze efekty dawała ultrafiltracja uzyskanej po ultrawierowaniu fazy „w-l-m” (metoda uf). Podobnie, niewielkie ilości fazy wodnej uzyskiwano z pozostałych układów dyspersyjnych, a więc fazę wodną, niezależnie od rodzaju układu, otrzymywano metodą ultrafiltracji (metoda uf).

Zawartość parabenów w fazie „w-l-m” oraz w fazie wodnej odnoszono do ich całkowitej zawartości w układzie. Eksperymentalnie potwierdzono, że zawartość parabenów w emulsjach submikronowych była w zakresie 96,5-104,4% (paraben M) i 94,2-106,0% (paraben P).

W fazie „w-l-m”, uzyskanej w wyniku ultrawierowania emulsji (metoda uw), w zależności od składu emulsji, wykryto 23-39% parabenu M oraz 2,5-11% parabenu P (ryc. 15). Zawartość w fazie wodnej pozbawionej struktur submikronowych, otrzymanej metodą ultrafiltracji (metoda uf), wynosiła 17-34% parabenu M oraz zaledwie 2,3-6,0% bardziej lipofilnego parabenu P (log P 2,98).

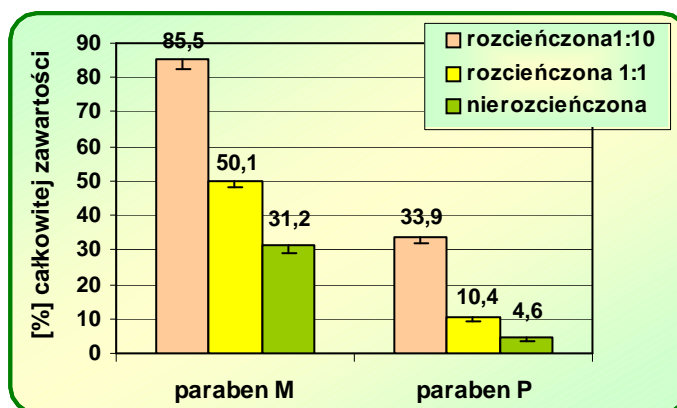


Ryc. 15. Dystrybucja parabenów w fazie „w-l-m” uzyskanej metodą ultrawierowania (uw) oraz w fazie wodnej uzyskanej metodą ultrafiltracji (uf) emulsji submikronowych różniących się składem.

Stosując metodę ultrawierowania w fazie „w-l-m” emulsji N1 (10% oleju sojowego 1,2% lecytyny) wykryto 36% parabenu M i 9,0% parabenu P w stosunku do ich całkowitej ilości (ryc. 15), a różnice wynikają z większej lipofilności parabenu P. Różnice, dla parabenu M w zakresie 4,5-5,7% oraz dla parabenu P 4,0-4,7%, oprócz emulsji N3 (0,2%), pomiędzy metodami ultrawierowania i ultrafiltracji, obrazują frakcję parabenów zawartą w „strukturalnej fazie wodnej” (micele, nanocząstki) oddzielanej metodą ultrafiltracji. Wraz ze wzrostem zarówno fazy olejowej, jak i ilości lecytyny, obserwowano zmniejszenie zawartości obu parabenów w fazie wodnej. Dwukrotne zwiększenie całkowitego stężenia obu środków konserwujących w emulsji N4 praktycznie nie wpływało na ich dystrybucję do fazy wodnej.

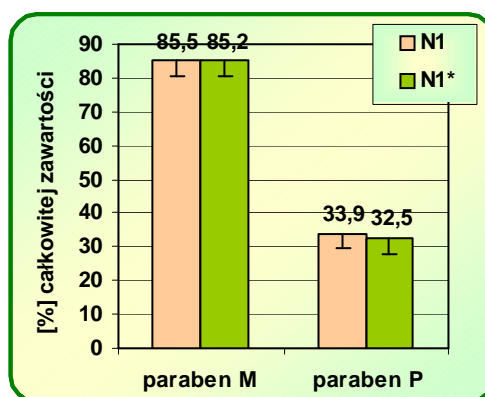
W przypadku 10% emulsji (N1) badano wpływ rozcieńczenia na zawartość parabenów w fazie wodnej. W tym celu poddawano ultrafiltracji emulsję N1 nierozcieńczoną oraz rozcieńczoną w stosunku 1:1 oraz 1:10 wodą oczyszczoną (ryc. 16). Zgodnie z przewidywaniem, istotny był wpływ współczynnika podziału olej

sojowy/woda na zawartość środków konserwujących w fazie wodnej. Rozcieńczenie emulsji powodowało wzrost zawartości obu parabenów w fazie wodnej. Rozcieńczenie w stosunku 1:1 nie powodowało tak dużej różnicy w dystrybucji do fazy wodnej obu parabenów w porównaniu z rozcieńczeniem 1:10.



Ryc. 16. Wpływ rozcieńczenia emulsji na zawartość parabenów w fazie wodnej emulsji N1 uzyskanej metodą ultrafiltracji (uf).

Metoda wprowadzenia parabenów M i P do emulsji submikronowych *de novo* lub w wyniku rozpuszczenia w gotowym układzie (Metodyka p. 2.3.a) nie wpływa na ich zawartość w fazie wodnej uzyskanej metodą ultrafiltracji, co obrazuje ryc. 17.



Ryc. 17. Dystrybucja parabenów w fazie wodnej emulsji (rozcieńczonych 1:10) w zależności od sposobu wprowadzenia środków konserwujących do układu *de novo* (N1) lub *ex tempore* (N1\*).

Ze względu na występujące różnice pomiędzy zawartością w fazie „w-l-m” i w fazie wodnej sprawdzano, czy parabeny nie ulegają sorpcji na sączku ultrafiltracyjnym. Po trzykrotnej ultrafiltracji roztworu wzorcowego parabenów M i P, w stężeniu podobnym do wykrywanego w fazie wodnej (Metodyka p. 9.5), stwierdzono 9,0 µg/ml

parabenu M oraz 0,996 µg/ml parabenu P, co oznacza, że odzysk obu parabenów wynosił odpowiednio 100,0% oraz 99,6%.

Na podstawie oznaczonych zawartości parabenów w fazie „w-l-m” oraz w fazie wodnej, korzystając z modelu matematycznego (Metodyka p. 9.7), obliczono dystrybucję obu środków konserwujących pomiędzy pozostałe fazy emulsji submikronowych. W tabeli 28 przedstawiono frakcję parabenów w fazach emulsji..

Tabela 28. Dystrybucja parabenów pomiędzy fazy emulsji submikronowych (średnia ± SD, n = 5-10)

Emulsja submikronowa	Frakcja w fazie wodnej (F <sub>w</sub> )	Frakcja w fazie liposomalno-micelarnej (F <sub>lm</sub> )	Frakcja w fazie olejowej (F <sub>o</sub> )	Frakcja w międzyfazie (F <sub>i</sub> )
<b>Paraben M</b>				
N1	31,2±3,0	3,4±1,9	21,1±2,0	44,5±4,1
N2	22,2±2,2	4,5±2,2	33,8±3,4	39,6±3,4
N3	17,2±1,0	6,0±3,7	26,3±1,6	50,9±1,7
N4	34,0±2,9	5,0±2,9	23,0±1,9	38,0±1,9
<b>Paraben P</b>				
N1	4,6±0,6	3,3±1,0	33,9±2,5	58,2±3,3
N2	3,2±0,4	3,1±0,4	51,8±1,8	41,9±2,8
N3	2,3±0,4	5,9±1,8	35,7±2,9	56,1±2,5
N4	6,0±0,5	4,3±0,5	44,2±3,6	45,5±3,6

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że paraben M ulega dystrybucji głównie pomiędzy fazy: wodną, olejową oraz międzyfazę, natomiast jego udział w fazie liposomalno-micelarnej jest niewielki (3,4-6,0%). Natomiast bardziej lipofilny paraben P ulega przede wszystkim dystrybucji pomiędzy fazę olejową oraz międzyfazę, a jego udział w fazie wodnej i liposomalno-micelarnej jest porównywalny i niewielki (tabela 28). Frakcję powyżej 50% obu parabenów stwierdzono w międzyfazie emulsji N3 (20% oleju 2,4% lecytyny), a parabenu P także w emulsji N1 (10% oleju 1,2% lecytyny). Natomiast w fazie olejowej powyżej 50% było tylko parabenu P w emulsji N1. Dwukrotne zwiększenie całkowitego stężenia obu parabenów w emulsji N4 powodowało zmniejszenie frakcji parabenów w międzyfazie, natomiast w pozostałych fazach obserwowano niewielki wzrost zawartości parabenów w porównaniu z emulsją N1.

### ➤ Chlorek benzalkoniowy

Z chlorkiem benzalkoniowym sporządzono emulsje submikronowe oraz emulsję tradycyjną (Metodyka p. 2.3.b).

#### Ocena fizykochemiczna emulsji

Obecność chlorku benzalkoniowego w niektórych układach powodowała wystąpienie **zmian wizualnych**. Podczas przechowywania w emulsjach submikronowych zawierających 0,2 mg/g chlorku benzalkoniowego (B3\*, BT) obserwowano śmietankowanie po 6 miesiącach (4°C), a emulsja tradycyjna (tBT) uległa rozwarstwieniu już po jednym miesiącu. W pozostałych emulsjach nie notowano żadnych zmian wizualnych.

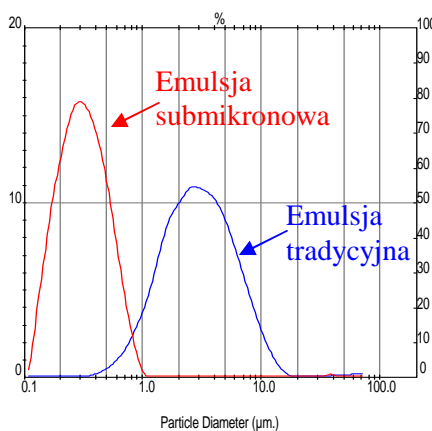
Sporządzone emulsje submikronowe zawierające chlorek benzalkoniowy, w zależności od metody sporządzenia emulsji, znacznie różniły się między sobą **wielkością cząstek** (tabela 29). Sporządzając emulsje submikronowe z chlorkiem benzalkoniowym metodą *de novo* (B2, BT) uzyskiwano nieznacznie większe cząstki - mediana wielkości cząstek w układach niewyjałowionych wynosiła około 400 nm, w porównaniu z emulsjami sporządzanymi *ex tempore*. W emulsjach Ivelip w obecności chlorku benzalkoniowego (B1\*, B3\*) mediana wielkości cząstek nie uległa zmianie i wynosiła 290 nm. W emulsji tradycyjnej (tBT) (otrzymanej bez homogenizacji wysokociśnieniowej) mediana wielkości cząstek wynosiła około 4,18 µm, a 90% cząstek miało wielkość poniżej 15,3 µm (ryc. 18, tabela 29).

W tabeli 29 przedstawiono **pH** emulsji z chlorkiem benzalkoniowym. Chlorek benzalkoniowy w stężeniu 0,005% (w/w) w emulsji submikronowej Ivelip (B1\*) nie powodował zmiany pH, natomiast w stężeniu 0,02% (B3\*) obniżył pH o 0,6 jednostki. Wyjaławianie emulsji Ivelip z chlorkiem benzalkoniowym (B1\* i B3\*) praktycznie nie zmieniało wartości pH (spadek odpowiednio o 0,23 i 0,11 jednostki). Natomiast w emulsjach sporządzanych *de novo*, pomimo korekty pH do około 8,0, notowano większy spadek pH (o około 0,7 jednostki). Po wyjałowieniu w tych emulsjach, niezależnie od rodzaju emulgatora, pH wynosiło około 7,26.

Tabela 29. Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ] w emulsjach submikronowych oraz w emulsji tradycyjnej (tBT) zawierających chlorek benzalkoniowy

Emulsja	Emulgator	Chlorek benzalk. [%]	W	t = 0				t = 6 m (4°C)		
				Wielkość cząstek			pH	Wielkość cząstek		
				d(0,5)	d(0,9)	d max		d(0,5)	d(0,9)	d max
<b>Emulsje submikronowe</b>										
<b>B1*</b>	Lecytyna jajowa	0,005	w	0,29	0,51	0,81	7,65	0,29	0,53	0,81
			nw	0,29	0,51	0,81	7,88	0,29	0,54	0,81
<b>B2</b>	Lecytyna jajowa	0,01	w	0,72	1,16	0,72	7,22	-	-	-
			nw	0,42	0,86	0,42	7,89	-	-	-
<b>B3*</b>	Lecytyna jajowa	0,02	w	0,37	0,70	1,00	7,23	0,37	0,70	1,00
			nw	0,29	0,54	0,81	7,34	0,35	0,83	12,2
<b>BT</b>	Polisorbat 80	0,02	w	0,87	1,53	8,04	7,25	-	-	-
			nw	0,37	0,87	4,92	7,99	-	-	-
<b>Emulsja tradycyjna</b>										
<b>tBT</b>	Polisorbat 80	0,02	w	4,62	17,1	24,9	7,31	-	-	-
			nw	4,18	15,3	24,9	8,00	-	-	-

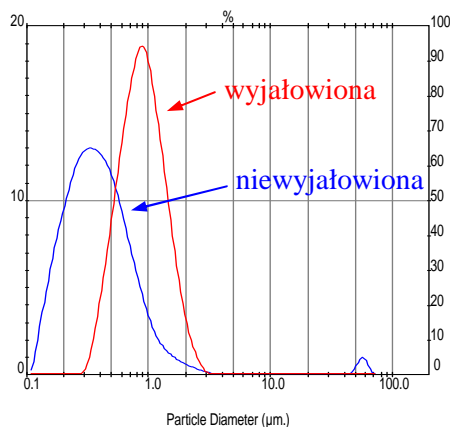
w – wyjąłowione; nw – niewyjąłowione



Ryc. 18. Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ] w emulsji: submikronowej oraz tradycyjnej, zawierających chlorek benzalkoniowy (0,2 mg/g).

Proces wyjąłowiania emulsji z chlorkiem benzalkoniowym sporządzonych *de novo* powodował zwiększenie średniej wielkości cząstek do 720 nm w emulsji z lecytyną (B2) oraz do 870 nm w emulsji z polisorbatem 80 (BT) (ryc. 19). Natomiast nie notowano zmian wielkości cząstek w emulsji zawierającej najmniejsze stężenie chlorku benzalkoniowego (B1\*) (tabela 29).





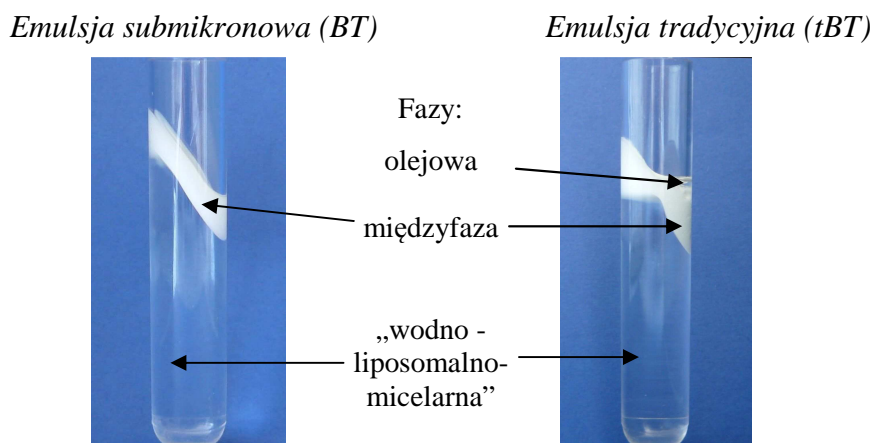
Ryc. 19. Wpływ procesu wyjąłowienia termicznego na wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ] emulsji submikronowej z polisorbatem 80 (BT).

**Potencjał zeta** mierzono w tylko emulsjach submikronowych z lecytyną. Dodanie chlorku benzalkoniowego do emulsji sporządzonej *de novo* (B2) powodowało zmniejszenie ujemnej wartości potencjału zeta do  $-36,9$  mV (tabela 27). Podobnie w emulsjach Ivelip notowano zmniejszenie ujemnej wartości potencjału zeta w zależności od całkowitego stężenia chlorku benzalkoniowego. W emulsji zawierającej 0,005% chlorku benzalkoniowego (B1\*) potencjał zeta wynosił  $-13,3$  mV, natomiast przy stężeniu tego środka konserwującego 0,02% (B3\*) nastąpiła inwersja ładunku do wartości potencjału zeta  $+20,9$  mV.

### Dystrybucja chlorku benzalkoniowego w emulsjach

Na ryc. 20 przedstawiono rozdział faz uzyskany po ultrawierowaniu emulsji submikronowej oraz tradycyjnej z polisorbatem 80. Rozdział faz uzyskany po ultrawierowaniu emulsji submikronowych zawierających lecytynę był identyczny z przedstawionym na ryc. 14 (str. 91).

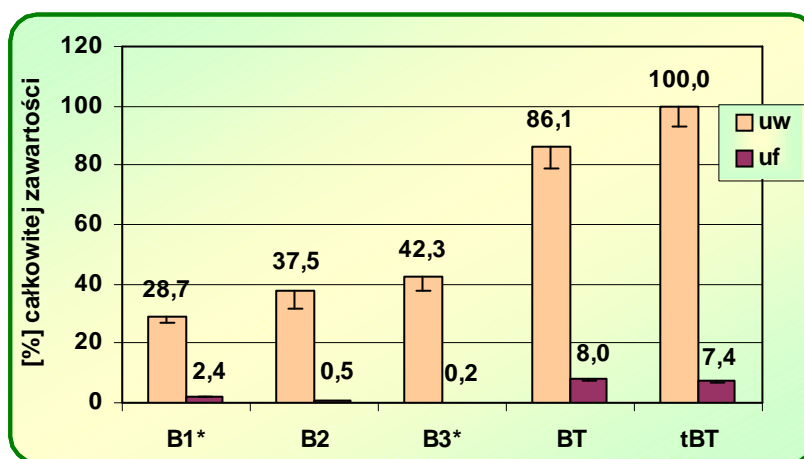
W wyniku ultrawierowania emulsji submikronowej z polisorbatem uzyskiwano rozdział na 2 fazy: międzyfazę oraz fazę „wodno-liposomalno-micelną”. Brak fazy olejowej przy stosowanej prędkości ultrawierowania świadczy o dużej stabilności emulsji. W emulsji tradycyjnej z polisorbatem uzyskano rozdział na trzy fazy: olejową, międzyfazę i „wodno-liposomalno-micelną” (ryc. 20).



Ryc. 20. Rozdział faz w emulsji submikronowej i tradycyjnej z polisorbatem po ultrawirowaniu.

Podobnie, jak w emulsjach z parabenami, poddając bezpośredniej ultrafiltracji emulsje z chlorkiem benzalkoniowym, uzyskiwano niewielką ilość fazy wodnej (około 10  $\mu$ l), dlatego stwierdzono, że korzystniejsze jest przed ultrafiltracją stosowanie ultrawirowania.

Na ryc. 21 przedstawiono zawartość chlorku benzalkoniowego w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” („w-l-m”, metoda uw) oraz w fazie wodnej emulsji (metoda uf).



Ryc. 21. Zawartość chlorku benzalkoniowego w fazie „w-l-m” (metoda uw) oraz w fazie wodnej (metoda uf) emulsji submikronowych (B1\*, B2, B3\*, BT) i tradycyjnej (tBT).

W emulsjach submikronowych zawierających lecytynę wraz ze wzrostem całkowitego stężenia chlorku benzalkoniowego (emulsje B1\*, B2, B3\*) zwiększała się jego zawartość w fazie „w-l-m” odpowiednio z 29% do 42%. Jak przewidywano, dystrybucja chlorku benzalkoniowego zmieniła się w przypadku zastosowania, zamiast

lecytyny, polisorbata 80 (BT) – dwukrotnie wzrosła jego zawartość w fazie „w-l-m” (porównanie z emulsją B3\*).

Obserwowano bardzo duże różnice w zawartości chlorku benzalkoniowego w fazie „w-l-m” oraz w fazie wodnej (ryc. 21). Zastosowanie ultrafiltracji znacznie ( $p < 0,05$ ) zmniejszyło zawartość chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej, w zależności od całkowitego stężenia tego środka konserwującego, do wartości 2,4% w B1\*, a nawet poniżej 1% w emulsjach B2 oraz B3\*. Natomiast w obecności polisorbata w fazie wodnej wykrywano około 7,7% chlorku benzalkoniowego, niezależnie od wielkości kropli fazy olejowej emulsji (BT i tBT). W emulsji tradycyjnej (tBT) cała ilość chlorku benzalkoniowego była obecna w fazie „w-l-m”. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie ( $p < 0,05$ ) w dystrybucji chlorku benzalkoniowego pomiędzy emulsjami wyjałowionymi i niewyjałowionymi, dlatego przedstawione wyniki są średnią z układów wyjałowionych i niewyjałowionych.

Wyniki zawartości w fazie wodnej odnoszono do całkowitego stężenia chlorku benzalkoniowego w emulsjach. Eksperymentalnie potwierdzono, że zawartość chlorku benzalkoniowego w emulsjach, w zależności od całkowitego stężenia tego środka konserwującego, wynosiła 86-100%. Wyniki uzyskano z dwóch oznaczeń.

Na podstawie uzyskanych wyników, z wykorzystaniem modelu matematycznego (Metodyka p. 9.7), obliczono dystrybucję chlorku benzalkoniowego pomiędzy fazy badanych emulsji: submikronowych i tradycyjnej (tabela 30).

Tabela 30. Dystrybucja chlorku benzalkoniowego pomiędzy fazy emulsji: submikronowych i tradycyjnej (średnia  $\pm$  SD,  $n = 5-10$ )

Emulsja	Emulgator	Fracja w fazie wodnej ( $F_w$ )	Fracja w fazie liposomalno-micelarnej ( $F_{lm}$ )	Fracja w fazie olejowej ( $F_o$ )	Fracja w międzyfazie ( $F_i$ )
<b>Emulsje submikronowe</b>					
<b>B1*</b>	Lecytyna jajowa	2,4 $\pm$ 0,1	22,9 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,1	74,5 $\pm$ 0,6
<b>B2</b>		0,5 $\pm$ 0,0	32,9 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,0	66,6 $\pm$ 0,2
<b>B3*</b>		0,2 $\pm$ 0,0	37,9 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 0,0	61,8 $\pm$ 0,8
<b>BT</b>	Polisorbat 80	8,0 $\pm$ 0,2	69,9 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,0	21,1 $\pm$ 0,9
<b>Emulsja tradycyjna</b>					
<b>tBT</b>	Polisorbat 80	7,35 $\pm$ 0,69	82,2 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,4

W emulsjach submikronowych chlorek benzalkoniowy ulegał dystrybucji przede wszystkim do międzyfazy (ponad 60%) oraz w mniejszym stopniu do fazy liposomalno-micelarnej (23-38%) (tabela 30). Zastąpienie lecytyny polisorbatem przesunęło dystrybucję chlorku benzalkoniowego głównie do fazy liposomalno-micelarnej (70%). Niezależnie od rodzaju emulsji, chlorek benzalkoniowy praktycznie nie ulegał dystrybucji do fazy olejowej (frakcja poniżej 1%). W emulsji tradycyjnej (tBT) chlorek benzalkoniowy był zlokalizowany przede wszystkim w fazie liposomalno-micelarnej (82%), natomiast w fazie wodnej i międzyfazie obserwowano niedużą i porównywalną jego zawartość (około 8%).

Sprawdzano czy micide tworzone przez chlorek benzalkoniowy ulegają ultrafiltracji przez sączonek ultrafiltracyjny Microcon YM-100 (Metodyka p. 9.6). Poddając ultrafiltracji roztwory chlorku benzalkoniowego o stężeniu zbliżonym do wykrywanego w fazie wodnej emulsji (10 µg/ml) oraz powyżej krytycznego stężenia micelarnego (10 mg/ml) odzyskiwano odpowiednio 96% i 97% chlorku benzalkoniowego. Oznacza to, że micide tworzone przez chlorek benzalkoniowy są na tyle małe, że ulegają ultrafiltracji. Jednocześnie można stwierdzić, że chlorek benzalkoniowy nie ulega sorpcji na sączku ultrafiltracyjnym.

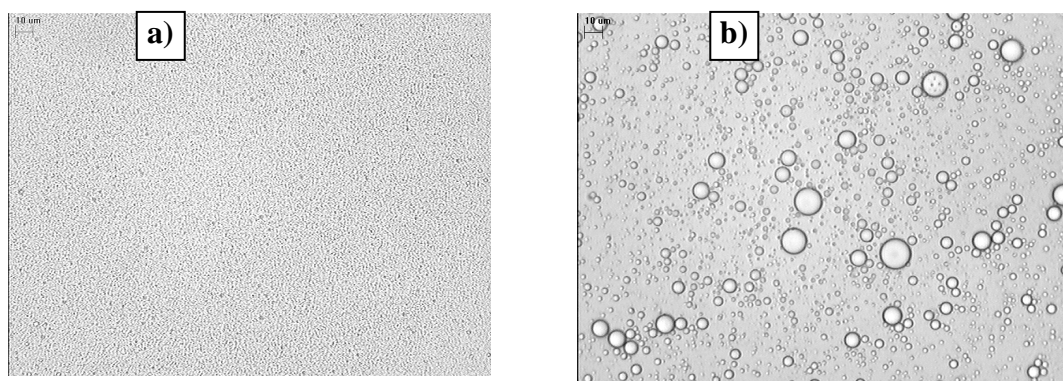
### ➤ Phenonip

W tabeli 15 (str. 66) przedstawiono skład emulsji zawierających Phenonip (8 mg/ml), które wykonano zgodnie z Metodką opisaną w p. 2.3.c.

### Ocena fizykochemiczna emulsji

Emulsje submikronowe były białe i homogenne. Dodanie Phenonipu do emulsji nie powodowało żadnych **zmian wizualnych** emulsji. Barwa oraz konsystencja emulsji tradycyjnych różniły się w zależności od rodzaju emulgatora: emulsje z polisorbatem oraz poloksamerem były białe i płynne, a emulsje z metylocelulozą i karbomerem (pseudoemulgatorami) były półprzezroczyste i charakteryzowały się zwiększoną lepkością.

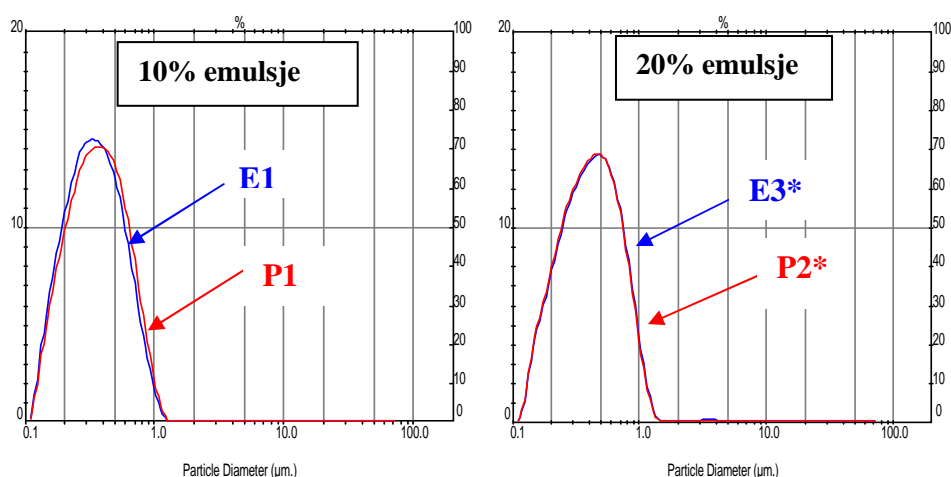
Na ryc. 22 porównano **obrazy mikroskopowe** emulsji submikronowej i tradycyjnej z Phenonipem.



Ryc. 22. Emulsje stabilizowane polisorbatem 80 z Phenonipem (8,0 mg/g): a) submikronowa (BT), b) tradycyjna (tBT) (znacznik skali 10 µm).

W obrazie mikroskopowym emulsji submikronowych obserwowano równomierne rozproszenie cząstek o wielkości poniżej 1 µm. Emulsje tradycyjne charakteryzowały się znacznie większymi rozmiarami kropli olejowych (ryc. 22). W obrazie mikroskopowym w emulsjach z polisorbatem lub poloksamerem w polu widzenia były cząstki o wielkości 10 µm, natomiast w emulsjach z metylocelulozą lub Carbopolem większość kropli olejowych miała wielkość powyżej 60 µm.

Dodanie Phenonipu nie powodowało zmian w **rozkładzie wielkości cząstek** emulsji submikronowych, co obrazuje ryc. 23.

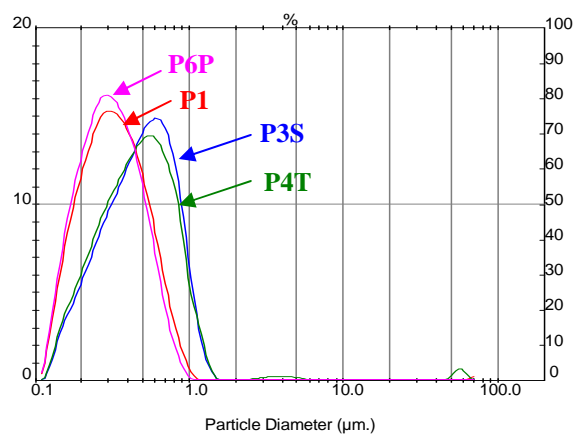


Ryc. 23. Rozkład wielkości cząstek w emulsjach submikronowych stabilizowanych lecytyną: bez środka konserwującego (E1, E3\*) oraz z Phenonipem (P1, P2\*).

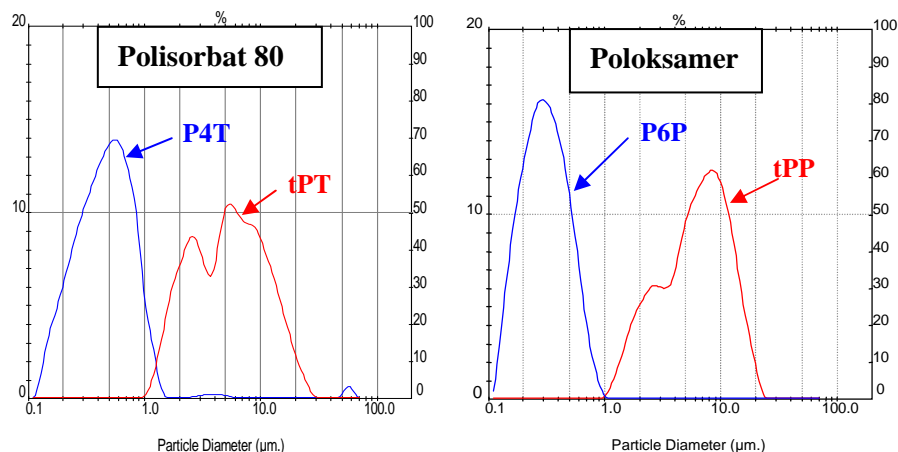
W tabeli 31 oraz na ryc. 24 i 25 przedstawiono rozkłady wielkości cząstek w emulsjach w zależności od użytego emulgatora oraz stężenia oleju.

Tabela 31. Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ] oraz pH emulsji z Phenonipem (0,8 mg/g)

Emulsja	Emulgator	Wielkość cząstek		pH	
		d(0,5)	d(0,9)	nw	w
<b>Emulsje submikronowe</b>					
<b>P1</b>	Lecytyna jajowa	0,32	0,61	8,03	7,85
<b>P2*</b>		0,32	0,62	-	7,18
<b>P3S</b>	Lecytyna sojowa	0,49	0,88	8,01	7,76
<b>P4T</b>	Polisorbat 80	0,47	0,91	8,05	7,83
<b>P5T</b>		1,34	2,16	8,13	7,60
<b>P6P</b>	Poloksamer	0,30	0,56	8,04	7,60
<b>Emulsje tradycyjne</b>					
<b>tPT</b>	Polisorbat 80	5,28	13,07	8,03	-
<b>tPP</b>	Poloksamer	6,27	12,95	8,14	7,87
<b>tPM</b>	Metyloceluloza	68,10	77,69	8,06	-
<b>tPC</b>	Carbopol	64,29	77,09	-	-



Ryc. 24. Rozkład wielkości cząstek emulsji submikronowych (10%) z Phenonipem różniących się rodzajem emulgatora.



Ryc. 25. Rozkład wielkości cząstek w emulsjach submikronowych (P4T, P6P) i tradycyjnych (tPT, tPP) stabilizowanych polisorbatem lub poloksamerem.

Mediana wielkości cząstek emulsji z Phenonipem stabilizowanych lecytyną jajową (P1, P2\*) i poloksamerem (P6P) wynosiła około 310 nm, natomiast w emulsjach stabilizowanych lecytyną sojową (P3S) oraz polisorbatem (P4T) była większa i wynosiła około 480 nm (tabela 31). Największą wielkość cząstek (1,34 µm) obserwowano w 20% emulsji stabilizowanej polisorbatem (P5T).

W emulsjach tradycyjnych obserwowano znacznie większą wielkość cząstek. W emulsjach stabilizowanych polisorbatem (tPT) lub poloksamerem (tPP) połowa cząstek miała wielkość około 600 nm, a 90% cząstek było poniżej około 13 µm. Emulsje zawierające pseudoemulgatory (tPM, tPC) charakteryzowały się jeszcze większymi rozmiarami cząstek (mediana około 66 µm), których obecność potwierdzono obserwacjami mikroskopowymi.

Dodanie Phenonipu do emulsji nie powodowało zmiany **wartości pH**. Po wyjałowieniu termicznym we wszystkich emulsjach obserwowano obniżenie pH o około 0,33 jednostki (tabela 31), pomimo korekty pH przed tym procesem do około 8,0. Niezależnie od rodzaju emulgatora wartość pH emulsji po wyjałowieniu wynosiła 7,18-7,87.

Oprócz emulsji z poloksamerem (tPP), emulsji tradycyjnych nie wyjaławiano termicznie ze względu na występujący rozdział faz po tym procesie.

Badania **lepkości kinematycznej** dotyczyły emulsji z Phenonipem (P1, P2\*). Dodanie Phenonipu do emulsji 10% (P1) powodowało niewielki wzrost lepkości kinematycznej o 0,10 jednostki (w porównaniu z emulsją niezawierającą środków

konserwujących) do wartości 1,27 mm<sup>2</sup>/s. Obecność Phenonipu w emulsji 20% (P2\*) nie zmieniała lepkości emulsji, która wynosiła 1,96 mm<sup>2</sup>/s.

### **Dystrybucja Phenonipu w emulsjach**

W celu otrzymania fazy wodnej emulsje ultrawirovano uzyskując rozdział faz podobny, jak w emulsjach z parabenami lub chlorkiem benzalkoniowym (ryc. 14, ryc. 20). Osad fosfolipidowy, obserwowany w emulsjach stabilizowanych lecytyną, nie występował w emulsjach z pozostałymi emulgatorami. W emulsji z metylocelulozą (tPM) było mniej międzyfazy, a najwięcej wydzieliło się oleju. W emulsjach submikronowych z polisorbatem 80 (P4T, P5T) nie doszło do wydzielenia fazy olejowej.

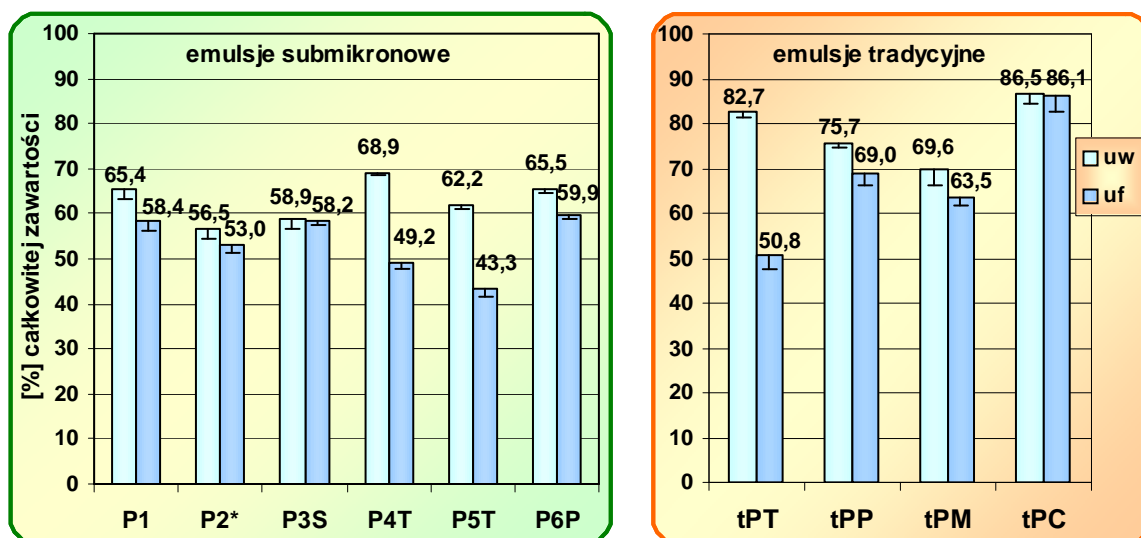
W badaniu rzeczywistej zawartości środków konserwujących w emulsjach, niezależnie od rodzaju emulgatora i stężenia fazy olejowej, wykryto 96-100% fenoksyetanolu oraz parabenów A i P. Jedynie, w przypadku parabenu M, wykryto 83-87% tego środka konserwującego. Wyniki uzyskano z dwóch oznaczeń.

Na ryc. 26-29 przedstawiono zawartości poszczególnych składników Phenonipu w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” (metoda uw) oraz w fazie wodnej (metoda uf) emulsji submikronowych oraz tradycyjnych. W tabelach 32-35 przedstawiono wyniki uzyskane z wykorzystaniem modelu matematycznego (Metodyka pkt. 9.7) obrazujące dystrybucję składników Phenonipu pomiędzy cztery fazy emulsji. Należy zauważyć, że w emulsjach z pseudoemulgatorami faza liposomalno-micelarna nie zawierała miceli (brak surfaktantu), ale mogły być w niej obecne inne struktury submikronowe.

### Fenoksyetanol

Spośród badanych środków konserwujących, będących składnikami Phenonipu, najwięcej w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” emulsji (metoda uw) wykrywano fenoksyetanolu (57-87% całkowitej zawartości). W fazie wodnej emulsji pozbawionej struktur micelarnych (metoda uf) zawartość fenoksyetanolu wynosiła (43–86%), w zależności od rodzaju emulgatora (ryc. 26).





Ryc. 26. Zawartość fenoksyetanolu w fazie „w-l-m” (uw) i fazie wodnej (uf) emulsji submikronowych oraz tradycyjnych.

Obserwowano zmniejszenie zawartości fenoksyetanolu w fazie wodnej wraz ze wzrostem ilości oleju w emulsjach (P1 i P2\* oraz P4T i P5T) (ryc. 26). Oddzielenie frakcji liposomalno-micelarnej tylko w niewielkim stopniu zmniejszyło zawartość fenoksyetanolu w fazie wodnej, a w emulsji stabilizowanej Carbopolem (tPC) wykryto porównywalną zawartość tego środka konserwującego stosując obydwie metody. Natomiast w obecności polisorbata (P4T, P5T) obserwowano bardzo duży udział fenoksyetanolu w strukturach nieulegających ultrafiltracji, który uległ dalszemu zwiększeniu wraz ze wzrostem kropli fazy olejowej (tPT).

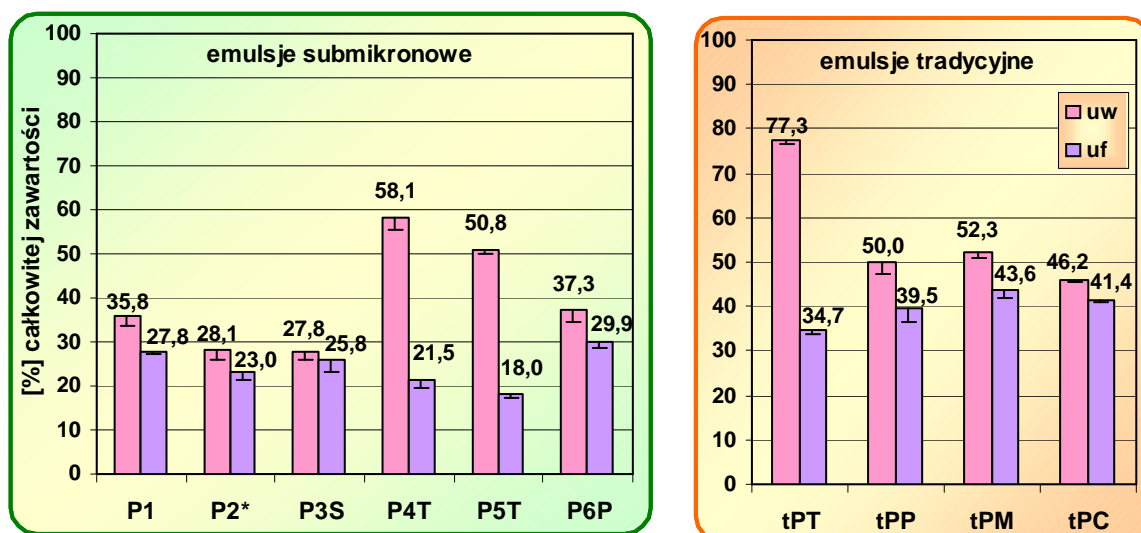
W tabeli 32 przedstawiono dystrybucję fenoksyetanolu pomiędzy fazy sporządzonych emulsji. Z wyjątkiem emulsji z polisorbatem, niezależnie od rodzaju emulsji, w fazie liposomalno-micelarnej zlokalizowane było poniżej 8% fenoksyetanolu. W fazie tej w emulsjach submikronowych z polisorbatem (P4T, P5T) wykryto około 18% fenoksyetanolu, a w emulsji tradycyjnej nawet 30% tego środka konserwującego. W fazie olejowej 10% emulsji wykrywano 11-20% fenoksyetanolu, natomiast wraz ze wzrostem ilości oleju frakcja ta uległa zwiększeniu do 28% w P5T oraz do 32% w P2\*. W 10% emulsjach submikronowych w międzyfazie znajdowało się 17-24% fenoksyetanolu. Zarówno wzrost fazy olejowej, jak i wielkości cząstek, powodował zmniejszenie frakcji fenoksyetanolu w międzyfazie poniżej 11,5%. Natomiast w międzyfazie emulsji z Carbopolem (tPC) nie stwierdzono obecności fenoksyetanolu.

Tabela 32. Dystrybucja fenoksyetanolu pomiędzy fazy emulsji submikronowych i tradycyjnych (średnia  $\pm$  SD, n = 3)

Emulsja	Emulgator	Fracja w fazie wodnej (F <sub>w</sub> )	Fracja w fazie liposomalno-micelarnej (F <sub>lm</sub> )	Fracja w fazie olejowej (F <sub>o</sub> )	Fracja w międzyfazie (F <sub>i</sub> )
<b>Emulsje submikronowe</b>					
<b>P1</b>	Lecytyna jajowa	58,4 $\pm$ 0,5	7,1 $\pm$ 3,4	16,9 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 3,0
<b>P2*</b>		53,0 $\pm$ 1,3	11,0 $\pm$ 0,7	32,0 $\pm$ 0,9	9,2 $\pm$ 0,9
<b>P3S</b>	Lecytyna sojowa	58,2 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,1	16,7 $\pm$ 0,2	23,8 $\pm$ 0,6
<b>P4T</b>	Polisorbat 80	49,2 $\pm$ 0,6	17,7 $\pm$ 0,6	14,2 $\pm$ 0,2	18,9 $\pm$ 0,1
<b>P5T</b>		43,3 $\pm$ 0,6	19,1 $\pm$ 1,1	28,1 $\pm$ 0,4	9,5 $\pm$ 0,2
<b>P6P</b>	Poloksamer	59,9 $\pm$ 1,2	5,6 $\pm$ 3,2	17,3 $\pm$ 0,3	17,2 $\pm$ 2,0
<b>Emulsje tradycyjne</b>					
<b>tPT</b>	Polisorbat 80	50,8 $\pm$ 0,3	30,3 $\pm$ 0,5	14,7 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,9
<b>tPP</b>	Poloksamer	69,0 $\pm$ 0,6	7,7 $\pm$ 0,5	19,9 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,3
<b>tPM</b>	Metyloceluloza	63,6 $\pm$ 2,4	6,6 $\pm$ 4,2	18,4 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 5,4
<b>tPC</b>	Carbopol	86,5 $\pm$ 0,9	2,1 $\pm$ 0,6	11,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,9

Paraben M

W fazie wodnej emulsji submikronowych (metoda uf) oznaczono 18-30% całkowitej zawartości parabenu M, natomiast w emulsjach tradycyjnych zawartość parabenu M była wyższa i wynosiła 35-44% (ryc. 27). W emulsjach z polisorbatem 80 obserwowano bardzo duże różnice zawartości parabenu M w fazie wodnej (metoda uw) i w fazie „w-l-m” (metoda uf). W przypadku pozostałych emulsji różnice te były niewielkie.



Ryc. 27. Zawartość parabenu M w fazie „w-l-m” (uw) i w fazie wodnej (uf) emulsji submikronowych i tradycyjnych.

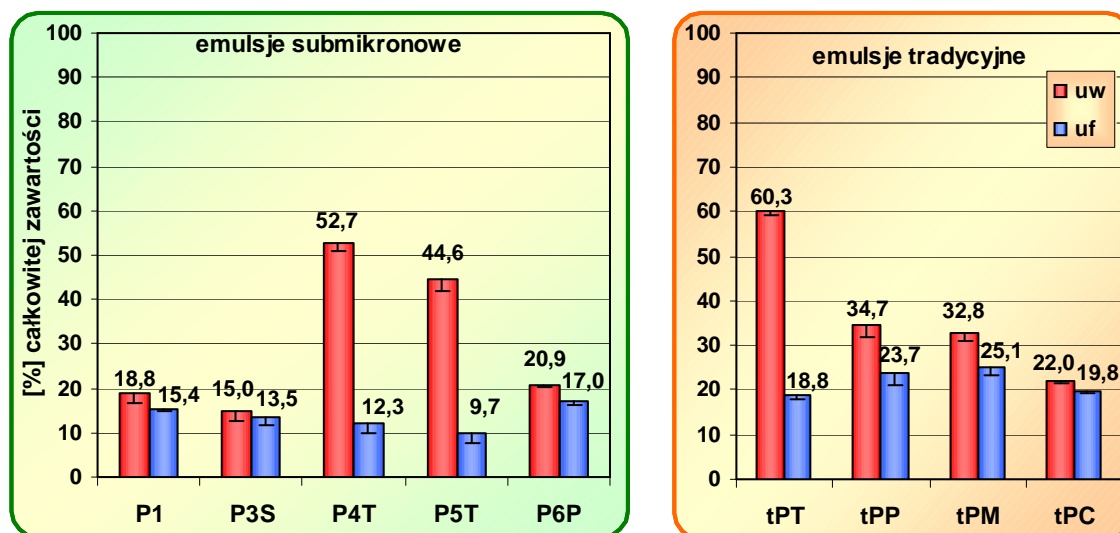
W fazie liposomalno-micelarnej emulsji zamknięte było poniżej 6% parabenu M (tabela 33), z wyjątkiem emulsji tradycyjnej z poloksamerem (tPP) (11%) oraz emulsji z polisorbatem (P4T, P5T, tPT). W emulsjach z polisorbatem w fazie liposomalno-micelarnej było aż 31-41% parabenu M. W fazie olejowej zlokalizowane było 15-30% parabenu M, przy czym najczęściej (35%) notowano w 20% emulsji z lecytyną jajową (P2\*). Wzrost stężenia oleju powodował zwiększenie frakcji parabenu M w fazie olejowej. W emulsjach submikronowych stabilizowanych lecytyną (P1, P3S) lub poloksamerem (P6P) około 50% parabenu M zlokalizowane było w międzyfazie. Paraben M w mniejszym stopniu ulegał dystrybucji do międzyfazy emulsji submikronowych z polisorbatem (21-31%). W porównaniu z emulsjami submikronowymi, w międzyfazie emulsji tradycyjnych wykrywano mniejszą zawartość parabenu M, a w obecności polisorbatu zawartość ta była nawet poniżej 1,5%.

Tabela 33. Dystrybucja parabenu M pomiędzy fazy emulsji submikronowych i tradycyjnych (średnia  $\pm$  SD, n = 3)

Emulsja	Emulgator	Frakcja w fazie wodnej (F <sub>w</sub> )	Frakcja w fazie liposomalno-micelarnej (F <sub>lm</sub> )	Frakcja w fazie olejowej (F <sub>o</sub> )	Frakcja w międzyfazie (F <sub>i</sub> )
<b>Emulsje submikronowe</b>					
<b>P1</b>	Lecytyna jajowa	27,8 $\pm$ 0,6	5,1 $\pm$ 0,2	18,9 $\pm$ 0,4	48,2 $\pm$ 1,1
<b>P2*</b>		23,0 $\pm$ 1,4	3,9 $\pm$ 1,4	35,2 $\pm$ 2,0	37,9 $\pm$ 2,1
<b>P3S</b>	Lecytyna sojowa	25,8 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,3	17,5 $\pm$ 0,2	55,6 $\pm$ 0,3
<b>P4T</b>	Polisorbat 80	21,5 $\pm$ 0,5	32,9 $\pm$ 0,3	14,5 $\pm$ 0,3	31,1 $\pm$ 0,5
<b>P5T</b>		18,0 $\pm$ 0,6	31,2 $\pm$ 0,1	27,5 $\pm$ 1,0	23,3 $\pm$ 1,7
<b>P6P</b>	Poloksamer	29,9 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 0,3	20,3 $\pm$ 0,4	46,6 $\pm$ 0,7
<b>Emulsje tradycyjne</b>					
<b>tPT</b>	Polisorbat 80	34,7 $\pm$ 1,3	41,2 $\pm$ 2,9	22,6 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,6
<b>tPP</b>	Poloksamer	39,5 $\pm$ 1,2	11,0 $\pm$ 2,7	26,8 $\pm$ 0,8	22,6 $\pm$ 1,0
<b>tPM</b>	Metyloceluloza	43,6 $\pm$ 1,8	5,4 $\pm$ 3,5	29,6 $\pm$ 1,2	21,4 $\pm$ 4,5
<b>tPC</b>	Carbopol	41,4 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,5	28,0 $\pm$ 0,4	28,4 $\pm$ 1,5

### Paraben A

W porównaniu z parabenem M w fazie wodnej i w fazie „w-l-m” wykrywano mniejszą zawartość bardziej lipofilnego parabenu A. W fazie wodnej emulsji submikronowych (metoda uf) wykrywano 10-17%, a w emulsjach tradycyjnych 19-25% parabenu A (ryc. 28, tabela 34), w zależności od rodzaju emulgatora i wielkości cząstek fazy olejowej. Podobnie, jak w przypadku wcześniej omawianych składników Phenonipu, w emulsjach z polisorbatem 80 obserwowano dużą zawartości parabenu A w strukturach nieulegających ultrafiltracji.



Ryc. 28. Zawartość parabenu A w fazie „w-l-m” (uw) i w fazie wodnej (uf) emulsji submikronowych i tradycyjnych.

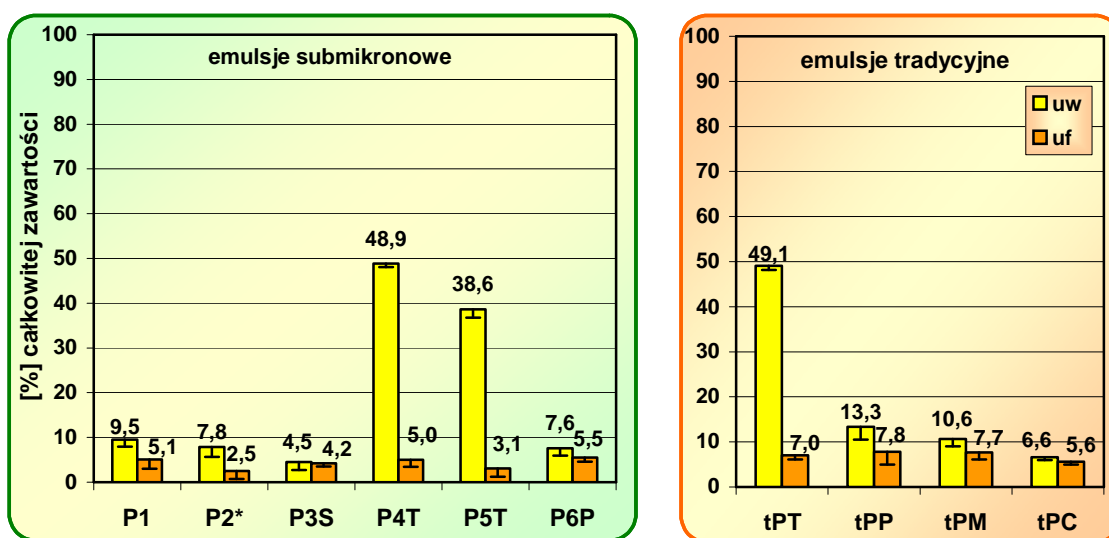
Tabela 34. Dystrybucja parabenu A pomiędzy fazy emulsji submikronowych i tradycyjnych (średnia  $\pm$  SD, n = 3)

Emulsja	Emulgator	Frakcja w fazie wodnej (F <sub>w</sub> )	Frakcja w fazie liposomalno-micelarnej (F <sub>lm</sub> )	Frakcja w fazie olejowej (F <sub>o</sub> )	Frakcja w międzyfazie (F <sub>i</sub> )
<b>Emulsje submikronowe</b>					
P1	Lecytyna jajowa	15,4 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,8	32,1 $\pm$ 0,3	49,0 $\pm$ 0,3
P2*		-	-	-	-
P3S	Lecytyna sojowa	13,5 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	28,1 $\pm$ 0,1	58,3 $\pm$ 0,2
P4T	Polisorbat 80	12,3 $\pm$ 0,2	36,0 $\pm$ 1,1	25,1 $\pm$ 0,4	26,0 $\pm$ 0,5
P5T		9,7 $\pm$ 0,7	36,0 $\pm$ 6,7	45,5 $\pm$ 3,1	8,8 $\pm$ 2,9
P6P	Poloksamer	17,0 $\pm$ 1,2	3,8 $\pm$ 1,8	35,6 $\pm$ 2,5	43,6 $\pm$ 5,4
<b>Emulsje tradycyjne</b>					
tPT	Polisorbat 80	18,8 $\pm$ 2,6	41,5 $\pm$ 3,7	39,2 $\pm$ 3,5	0,5 $\pm$ 0,2
tPP	Poloksamer	23,7 $\pm$ 0,5	9,3 $\pm$ 1,8	49,4 $\pm$ 0,9	17,6 $\pm$ 2,0
tPM	Metyloceluloza	25,1 $\pm$ 1,7	7,3 $\pm$ 3,7	52,5 $\pm$ 3,6	15,1 $\pm$ 3,4
tPC	Carbopol	19,8 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,1	41,4 $\pm$ 1,0	38,0 $\pm$ 1,6

Fracja parabenu A w fazie liposomalno-micelarnej emulsji była niewielka i wynosiła 0,1-9,3% (tabela 34), oprócz emulsji z polisorbatem. Zawartość parabenu A w fazie olejowej była stosunkowo duża i wynosiła 25-53% zależnie od rodzaju emulgatora, a niezależnie od wielkości kropli olejowych. W międzyfazie około 50% frakcji parabenu A było w emulsjach stabilizowanych lecytyną (P1, P3S) oraz poloksamerem (P6P), natomiast w pozostałych układach stwierdzono 9-38% parabenu A, a w emulsji tradycyjnej z polisorbatem (tPT) zaledwie 0,5% tego środka konserwującego. Podobnie, jak w przypadku pozostałych składników Phenonipu, dystrybucja w emulsjach z polisorbatem była odmienna.

### Paraben P

W fazie wodnej emulsji oznaczano najmniejszą zawartość parabenu P, najbardziej lipofilnego składnika Phenonipu (log P 2,98). W fazie wodnej emulsji submikronowych zawartość tego środka konserwującego wynosiła 2,5-5,5% całkowitej zawartości, natomiast w emulsjach tradycyjnych tylko nieznacznie więcej (5,6-7,8%) (ryc. 29). Podobnie, jak w przypadku pozostałych środków konserwujących, niewielka ilość parabenu P uległa zamknięciu w strukturach oddzielanych metodą ultrafiltracji, lecz wyjątek stanowiły emulsje z polisorbatem (około 40%).



Ryc. 29. Zawartość parabenu P w fazie „w-l-m” (uw) i w fazie wodnej (uf) emulsji submikronowych i tradycyjnych.

Frakcja parabenu P obecna w fazie olejowej emulsji była największa (31-57%), przy czym zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia fazy olejowej, jak również ze wzrostem wielkości cząstek w układzie (tabela 35). Bardzo niewielka ilość parabenu P uległa dystrybucji do fazy liposomalno-micelarnej (0-6,5%), z wyjątkiem emulsji stabilizowanych polisorbata, w których w tej fazie było aż 37-42% parabenu P. W emulsjach submikronowych (oprócz zawierających polisorbat) oraz w emulsji tradycyjnej z Carbopolem (tPC) ponad połowa parabenu P uległa dystrybucji do międzyfazy. W emulsjach submikronowych z polisorbata (P4T, P5T) wraz ze zmniejszeniem ilości oleju malała frakcja parabenu P w międzyfazie z 18 do 9%, natomiast w emulsji tradycyjnej stabilizowanej tym emulgatorem (tPT) paraben P nie ulegał dystrybucji do międzyfazy. Tymczasem w emulsjach tradycyjnych z poloksamerem (tPP) i metylocelulozą (tPM) w międzyfazie było odpowiednio 29 i 33% parabenu P.

Tabela 35. Dystrybucja parabenu P pomiędzy fazy emulsji submikronowych i tradycyjnych (średnia  $\pm$  SD, n = 3)

Emulsja	Emulgator	Frakcja w fazie wodnej (F <sub>w</sub> )	Frakcja w fazie liposomalno-micelarnej (F <sub>lm</sub> )	Frakcja w fazie olejowej (F <sub>o</sub> )	Frakcja w międzyfazie (F <sub>i</sub> )
<b>Emulsje submikronowe</b>					
<b>P1</b>	Lecytyna jajowa	5,1 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,1	37,3 $\pm$ 1,5	53,2 $\pm$ 1,6
<b>P2*</b>		2,5 $\pm$ 0,0	6,5 $\pm$ 1,9	41,7 $\pm$ 0,3	49,3 $\pm$ 1,6
<b>P3S</b>	Lecytyna sojowa	4,2 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,1	31,1 $\pm$ 0,9	64,7 $\pm$ 1,0
<b>P4T</b>	Polisorbat 80	5,0 $\pm$ 0,1	40,6 $\pm$ 0,3	36,6 $\pm$ 0,4	17,8 $\pm$ 0,7
<b>P5T</b>		3,1 $\pm$ 0,2	36,6 $\pm$ 1,6	51,7 $\pm$ 2,9	8,6 $\pm$ 1,5
<b>P6P</b>	Poloksamer	5,5 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,11	40,2 $\pm$ 5,5	52,2 $\pm$ 6,1
<b>Emulsje tradycyjne</b>					
<b>tPT</b>	Polisorbat 80	7,0 $\pm$ 0,2	42,0 $\pm$ 3,8	51,0 $\pm$ 1,1	0,0 $\pm$ 0,5
<b>tPP</b>	Poloksamer	7,8 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 2,5	56,9 $\pm$ 2,3	28,9 $\pm$ 5,1
<b>tPM</b>	Metyloceluloza	7,7 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,9	56,7 $\pm$ 1,4	32,6 $\pm$ 1,6
<b>tPC</b>	Carbopol	5,6 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	41,3 $\pm$ 1,2	52,2 $\pm$ 1,6

### ➤ Mieszanina chlorku benzalkoniowego z alkoholem $\beta$ -fenyloetylowym

Emulsję zawierającą chlorek benzalkoniowy (0,2 mg/g), alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy (5 mg/g) oraz EDTA (1 mg/g) sporządzono zgodnie z Metodką opisaną w p. 2.3.d (tabela 16).

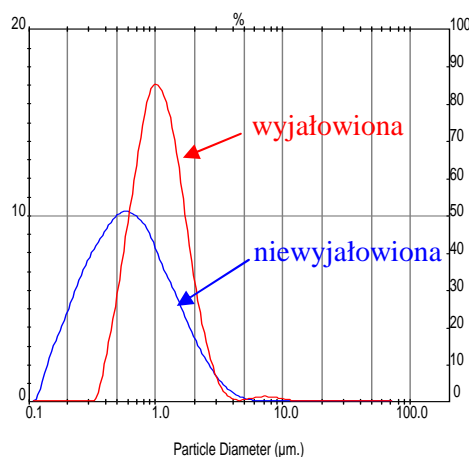
#### Ocena fizykochemiczna emulsji

Dodanie środków konserwujących (chlorku benzalkoniowego, alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego) oraz EDTA do handlowej emulsji Ivelip (10%) nie powodowało żadnych **zmian wizualnych**.

W tabeli 36 oraz na ryc. 30 przedstawiono rozkład wielkości cząstek olejowych w sporządzonej emulsji.

Tabela 36. Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ] oraz pH emulsji submikronowej, zawierającej chlorek benzalkoniowy, alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy oraz EDTA (emulsja BF)

Emulsja BF	Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ]			pH
	$d_{0,5}$	$d_{0,9}$	$d_{\text{max}}$	
Niewyjałowiona	0,59	1,65	9,91	7,54
Wyjałowiona	1,04	1,94	9,91	7,45



Ryc. 30. Wpływ procesu wyjaławiania termicznego na wielkość cząstek w emulsji Ivelip (10%), zawierającej chlorek benzalkoniowy, alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy oraz EDTA (emulsja BF).

Mediana **wielkości cząstek** niewyjałowionej emulsji BF wynosiła 590 nm, a 90% cząstek miało średnicę poniżej 1,65  $\mu\text{m}$ . Po wyjałowieniu termicznym emulsji notowano wzrost wielkości cząstek (mediana 1,04  $\mu\text{m}$ ) (tabela 36, ryc. 30).

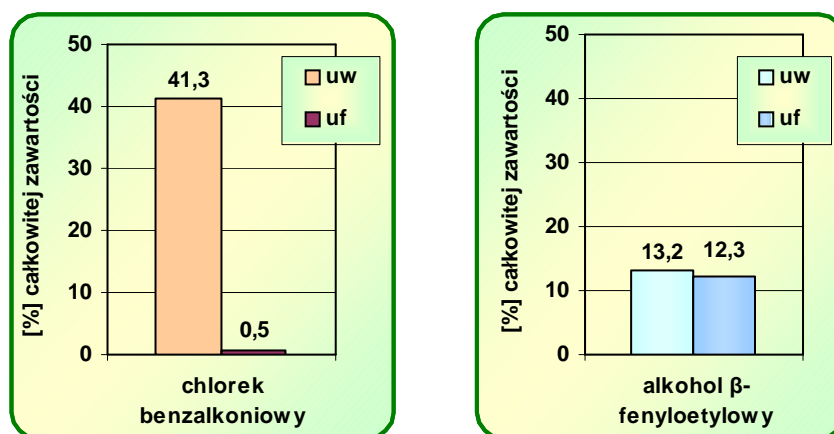


Obecność środków konserwujących, jak również proces wyjaławiania termicznego, nie zmieniały **pH** emulsji (tabela 36).

### Dystrybucja chlorku benzalkoniowego i alkoholu $\beta$ -fenyloetylowego w emulsji submikronowej (BF)

#### Chlorek benzalkoniowy

Na ryc. 31 przedstawiono zawartość chlorku benzalkoniowego w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” oraz w fazie wodnej emulsji BF.



Ryc. 31. Zawartość środków konserwujących w fazie „w-l-m” (metoda uw) i w fazie wodnej (metoda uf) emulsji submikronowej BF.

Oddzielenie frakcji liposomalno-micelarnej od fazy wodnej metodą ultrafiltracji powodowało znaczne zmniejszenie zawartości chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej z wartości 41,3% do 0,5%. Nie stwierdzono wpływu procesu wyjaławiania termicznego emulsji na dystrybucję chlorku benzalkoniowego. Chlorek benzalkoniowy uległ dystrybucji do międzyfazy oraz do fazy liposomalno-micelarnej. Zarówno w fazie wodnej, jak i olejowej, było poniżej 0,5% tego środka konserwującego (tabela 37).

Porównując uzyskane wyniki z emulsją zawierającą tylko chlorek benzalkoniowy (B3\*, ryc. 21) w tym samym stężeniu (0,2 mg/g) stwierdzono, że obecność alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego nie zmienia dystrybucji chlorku benzalkoniowego.

Tabela 37. Dystrybucja chlorku benzalkoniowego oraz alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego pomiędzy fazy emulsji submikronowej BF (średnia  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

Środek konserwujący	Fracja w fazie wodnej ( $F_w$ )	Fracja w fazie liposomalno-micelarnej ( $F_{lm}$ )	Fracja w fazie olejowej ( $F_o$ )	Fracja w międzyfazie ( $F_i$ )
Chlorek benzalkoniowy	0,5 $\pm$ 0,0	40,9 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,0	58,5 $\pm$ 0,2
Alkohol $\beta$ -fenyloetylowy	12,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,0	85,0 $\pm$ 0,2

### Alkohol $\beta$ -fenyloetylowy

Na ryc. 31 przedstawiono zawartość alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” oraz w fazie wodnej emulsji submikronowej BF. Zawartość alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego w fazie wodnej, niezależnie od stosowanej metody, była porównywalna i wynosiła około 13%. Obecność frakcji liposomalno-micelarnej nie wpływa na dystrybucję alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego. Nie stwierdzono wpływu wyjaławiania termicznego na dystrybucję alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego do fazy wodnej.

Alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy (log P 1,33) ulegał dystrybucji przede wszystkim do międzyfazy (85%) i częściowo do fazy wodnej (12%) (tabela 37). Bardzo niewiele tego środka konserwującego było w fazie olejowej. Nie stwierdzono dystrybucji alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego do fazy liposomalno-micelarnej emulsji.

### ➤ **Długoterminowe badanie trwałości fizykochemicznej emulsji submikronowych ze środkami konserwującymi**

Trwałość fizykochemiczną emulsji submikronowych Ivelip 10% i 20% z wybranymi środkami konserwującymi oceniano na podstawie analizy fizykochemicznej prowadzonej po sporządzeniu oraz po 1, 3 i 6 miesiącach (4°C; 40°C) (Metodyka p. 7). Badane układy poddawano obserwacjom wizualnym i mikroskopowym, mierzono wielkość cząstek oraz pH.

W tabeli 38 przedstawiono wpływ warunków przechowywania oraz procesu wyjaławiania termicznego na trwałość fizykochemiczną emulsji w obecności środków konserwujących.

Tabela 38. Ocena fizykochemiczna emulsji ze środkami konserwującymi podczas przechowywania przez 6 miesięcy

Bad.	Ivelip	W	temp	t = 0		t = 1m		t = 3m		t = 6m			
<b>Ivelip10% i 20% niezawierające środków konserwujących</b>													
pH	10%	W	4°C	7,89		7,52		7,42		7,31			
			40°C	j.w.		7,58		nie badano		6,04			
	20%	w	4°C	7,49		7,37		7,31		7,35			
			40°C	j.w.		7,35		nie badano		6,04			
Wielkość cząstek	10%	w	4°C	<b>d<sub>0,5</sub></b>	<b>d<sub>0,9</sub></b>	<b>d<sub>0,5</sub></b>	<b>d<sub>0,9</sub></b>	<b>d<sub>0,5</sub></b>	<b>d<sub>0,9</sub></b>	<b>d<sub>0,5</sub></b>	<b>d<sub>0,9</sub></b>		
			40°C	0,30	0,55	0,31	0,56	0,30	0,57	0,31	0,59		
		20%	w	4°C	j.w.	j.w.	0,29	0,53	0,30	0,57	0,31	0,63	
				40°C	0,30	0,56	0,30	0,56	0,32	0,60	0,31	0,57	
	FENOL	pH	10%	w	4°C	7,35 (↓ 0,5)		b.z.		b.z.		b.z.	
					40°C	7,50 (↓ 0,35)		↓ 0,7		↓ 0,7		↓ 1,0	
				nw	4°C	7,35 (↓ 0,15)		b.z.		b.z.		b.z.	
					40°C	7,42 (b.z.)		↓ 0,6		↓ 1,5		↓ 3,5	
Wielkość cząstek	20%		w	4°C	d(0,5)=0,33 d(0,9)=0,81 dmax.=42,5		b.z.		b.z.		b.z.		
				40°C	d(0,5)=0,32 d(0,9)=0,62 dmax.=42,5		b.z.		b.z.		b.z.		
			nw	4°C	d(0,5)=0,33 d(0,9)=0,81 dmax.=42,5		b.z.		b.z.		b.z.		
				40°C	d(0,5)=0,32 d(0,9)=0,64 dmax.=42,5		nie badano		nie badano		nie badano		
Obserwacja wizualna		10%	w	4°C	b.z.		Lekkie śmiekowanie		Lekkie śmiekowanie		Lekkie śmiekowanie		
				40°C	b.z.		Lekkie śmiekowanie		Lekkie śmiekowanie		Lekkie śmiekowanie		
			nw	4°C	b.z.		Lekkie śmiekowanie		Lekkie śmiekowanie		Lekkie śmiekowanie		
				40°C	b.z.		Lekkie śmiekowanie		Lekkie śmiekowanie		Lekkie śmiekowanie		
	CHLOROKREZOL	pH	10%	w	4°C	7,58 (b.z.)		b.z.		b.z.		b.z.	
					40°C	7,68 (b.z.)		↓ 1,8		↓ 0,7		↓ 1,8	
				nw	4°C	7,35 (↓ 0,15)		b.z.		b.z.		b.z.	
					40°C	7,54 (b.z.)		↓ 1,9		↓ 2,2		↓ 3,5	
CHLOROKREZOL	20%		w	4°C	7,35 (↓ 0,15)		b.z.		b.z.		b.z.		
				40°C	7,54 (b.z.)		↓ 1,4		↓ 0,7		↓ 1,8		
			nw	4°C	7,54 (b.z.)		↓ 0,8		↓ 1,5		↓ 1,7		
				40°C	7,54 (b.z.)		↓ 1,5		↓ 1,9		↓ 2,1		

Bad.	Ivelip	w	temp	t = 0	t = 1m	t = 3m	t = 6m	
Wielkość cząstek	10%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.	
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		b.z.	b.z.	d(0,9) = 4,7	
	20%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.	
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		b.z.	b.z.	d(0,9) = 10,2	
Obserwacja wizualna	10%	w	4°C	b.z.	Lekkie śmie- tankowanie	Lekko kremowe (40°C)	b.z.	
			40°C					
		nw	4°C					
			40°C					
	20%	w	4°C				Lekkie śmie- tankowanie	
			40°C					
		nw	4°C					Krople oleju na ściankach, lekko śmie- tankowanie
			40°C					
<b>m-KREZOL</b>								
pH	10%	w	4°C	7,31 (↓ 0,58)	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		↓ 1,0	↓ 1,2	↓ 1,4	
		nw	4°C	7,63 (↓ 0,26)	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		↓ 0,8	↓ 2,5	↓ 3,7	
	20%	w	4°C	7,40 (b.z.)	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		↓ 1,8	↓ 0,8	↓ 1,0	
		nw	4°C	7,62 (↑ 0,1)	b.z.	↓ 0,7	↓ 0,5	
			40°C		↓ 0,9	↓ 1,5	↓ 2,7	
Wielkość cząstek	10%	w	4°C	d(0,5)=0,31 d(0,9)=0,59 dmax.=1,00	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.	
		nw	4°C	d(0,5)=0,31 d(0,9)=0,57 dmax.=1,00	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		b.z.	b.z.	d(0,5) = 0,6 d(0,9) = 9,79	
	20%	w	4°C	d(0,5)=0,30 d(0,9)=0,59 dmax.=1,00	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.	
		nw	4°C	d(0,5)=0,31 d(0,9)=0,58 dmax.=1,00	b.z.	b.z.	b.z.	
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.	
Obserwacja wizualna	10%	w	4°C	b.z.	b.z.	Lekko kremowe (40°C)	Niewielkie przejaśnienie przy dnie. Krople oleju na ściankach (40°C)	
			40°C					
		nw	4°C					
			40°C					
	20%	w	4°C					
			40°C					
		nw	4°C					
			40°C					

Bad.	Ivelip	w	temp	t = 0	t = 1m	t = 3m	t = 6m
<b>ALKOHOL BENZYLOWY</b>							
pH	10%	w	4°C	7,42 (↓ 0,47)	↓ 0,17	↑ 0,17	↓ 0,28
			40°C		↓ 0,15	↓ 1,4	↓ 0,80
		nw	4°C	7,49 (↓ 0,40)	↓ 0,10	↑ 0,3	↑ 0,30
			40°C		↓ 0,12	↓ 1,1	↓ 0,44
	20%	w	4°C	7,39 (↓ 0,10)	↓ 0,20	b.z.	↓ 0,12
			40°C		↑ 0,35	↓ 0,56	↓ 0,84
		nw	4°C	7,46 (b.z.)	↓ 0,14	↑ 0,36	↑ 0,26
			40°C		↓ 0,18	↓ 0,57	↓ 0,40
Wielkość cząstek	10%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
	20%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
Obserwacja wizualna	10%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	Lekkie śmietankowanie (40°C)
			40°C				
		nw	4°C				
			40°C				
	20%	w	4°C				
			40°C				
		nw	4°C				
			40°C				
<b>TIOMERSAL</b>							
pH	10%	w	4°C	6,97 (↓ 0,90)	↓ 0,3	↑ 0,22	↓ 0,21
			40°C		b.z.	↓ 1,0	↓ 0,35
		nw	4°C	7,01 (↓ 0,86)	↓ 0,27	↓ 0,24	↓ 0,30
			40°C		↓ 0,56	↓ 1,33	↓ 1,25
	20%	w	4°C	7,31 (↓ 0,18)	↓ 0,30	↑ 2,1	b.z.
			40°C		↓ 0,22	↓ 0,77	↓ 0,97
		nw	4°C	7,33 (↓ 0,16)	b.z.	↑ 0,45	↑ 0,41
			40°C		↓ 0,3	↓ 1,1	↓ 0,84
Wielkość cząstek	10%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
	20%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
Obserwacja wizualna	10%	w	4°C	b.z.	Lekkie śmietankowanie (40°C)	Lekkie śmietankowanie barwa lekko kremowa (40°C)	Śmietankowanie ok. 1/3 objętości, barwa lekko kremowa
			40°C				
		nw	4°C				
			40°C				
	20%	w	4°C				
			40°C				
		nw	4°C				
			40°C				

Bad.	Ivelip	w	temp	t = 0	t = 1m	t = 3m	t = 6m
<b>BRONOPOL</b>							
pH	10%	w	4°C	4,11 (↓ 3,78)	b.z.	↓ 0,11	↓ 0,20
			40°C		nie badano	nie badano	Nie badano
		nw	4°C	6,93 (↓ 0,93)	↓ 0,44	↓ 0,25	↓ 0,49
			40°C		↓ 2,3	↓ 3,5	↓ 3,12
	20%	w	4°C	4,23 (↓ 3,26)	nie badano	nie badano	Nie badano
			40°C		nie badano	nie badano	Nie badano
		nw	4°C	6,93 (↓ 0,58)	↓ 0,5	↓ 0,33	↓ 0,61
			40°C		↓ 1,5	↓ 3,2	↓ 3,23
Wielkość cząstek	10%	w	4°C	d(0,9) = 0,14	b.z.	b.z.	d(0,5) = 0,34 d(0,9) = 0,66
			40°C		nie badano	nie badano	nie badano
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
	20%	w	4°C	d(0,5) = 0,8 d(0,9) = 1,15 Mikroskopowo cząstki 5 μm	nie badano	nie badano	nie badano
			40°C		nie badano	nie badano	nie badano
		nw	4°C		b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	d(0,5) = 0,37 d(0,9) = 5,31
Observacja wizualna	10%	w	4°C	b.z.	Żółtawe, lekkie śmientankowanie	Żółtawe, lekkie śmientankowanie 2-3mm	Śmientankowanie
			40°C		Rozdział faz	nie badano	nie badano
		nw	4°C		b.z.	Lekkie śmientankowanie	b.z.
			40°C		b.z.	Lekkie śmientankowanie	Przejaśnienie przy dnie (7 mm)
	20%	w	4°C	Na powierzchni krople oleju	Rozdział faz	nie badano	nie badano
			40°C		Rozdział faz	nie badano	nie badano
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	Lekko kremowe	Rozdział faz
<b>GLUKONIAN CHLORHEKSYDYN</b>							
pH	10%	w	4°C	↓ 2,4	↑ 0,28	b.z.	b.z.
			40°C		↓ 0,13	↓ 0,4	↓ 0,8
		nw	4°C	↓ 2,3	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		↓ 0,2	↓ 0,5	↓ 0,83
	20%	w	4°C	↓ 1,9	↑ 0,19	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	↓ 0,4	↓ 0,72
		nw	4°C	↓ 1,73	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		↓ 0,13	↓ 0,4	↓ 0,83
Wielkość cząstek	10%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
Wielkość cząstek	20%	w	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.
		nw	4°C	b.z.	b.z.	b.z.	b.z.
			40°C		b.z.	b.z.	b.z.

Bad.	Ivelip	w	temp	t = 0	t = 1m	t = 3m	t = 6m
Observacja wizualna	10%	w	4°C	b.z.	Lekkie śmietan- kowanie	Lekkie śmietan- kowanie	Lekkie śmietan- kowanie
			40°C				
		nw	4°C				
			40°C				
	20%	w	4°C				
			40°C				
		nw	4°C				
			40°C				

Podczas przechowywania emulsji submikronowych, niezależnie od obecności środków konserwujących, obserwowano niewielkie śmietankowanie układów, a w emulsjach przechowywanych w temperaturze 40°C, dochodziło do zmiany barwy na lekko kremową. Zjawiska te naturalnie występują w układach emulsji submikronowych i nie świadczą o destabilizacji emulsji.

W emulsjach submikronowych zawierających **fenol** nie notowano żadnych zmian fizycznych układów, zarówno po jego dodaniu, jak również podczas przechowywania. Jedynie po sześciu miesiącach w niewyjałowionych emulsjach przechowywanych w temperaturze 40°C obserwowano spadek wartości pH o 3,5 jednostki.

Dodanie **chlorokrezolu** nie powodowało żadnych zmian fizykochemicznych układów. Po sześciu miesiącach przechowywania 20% emulsji niewyjałowionej w temperaturze 4°C i 40°C obserwowano krople oleju na ściankach fiolek. Po tym czasie w temperaturze 40°C w 10% emulsji wielkość 90% cząstek była poniżej 4,75 µm, a w 20% emulsji - poniżej 10,2 µm, co potwierdzono obserwacjami mikroskopowymi. Po jednym miesiącu w układach przechowywanych w temperaturze 40°C obserwowano spadek pH o około 1,6 jednostki, który uległ dalszemu obniżeniu po sześciu miesiącach. Dodatkowo po sześciu miesiącach notowano obniżenie pH w emulsjach niewyjałowionych przechowywanych w temperaturze 4°C.

Dodanie **m-krezolu** do emulsji nie powodowało żadnych zmian fizykochemicznych układów. Po sześciu miesiącach w 10% emulsji niewyjałowionej obserwowano krople oleju na ściankach fiolek, a wielkość 90% cząstek była poniżej 9,79 µm (40°C). Obserwacje mikroskopowe potwierdziły dużą liczbę cząstek o średnicy 5 oraz 10 µm. Po jednym miesiącu w emulsji 20% doszło do spadku pH o 1,8 jednostki. Po trzech miesiącach pH uległo dalszemu obniżeniu, szczególnie w emulsjach

niewyjałowionych – w 10% o 2,5 jednostki, a w 20% o 1,5 jednostki, a po sześciu miesiącach wynosiło odpowiednio 3,7 i 2,7.

Dodanie **alkoholu benzylowego, tiomersalu** oraz **glukonianu chlorheksydyny** do emulsji submikronowych oraz przechowywanie tych układów, nie powodowało żadnych zmian fizykochemicznych emulsji.

Dodanie **bronopolu** do emulsji submikronowych 10% i 20%, jak również wyjałowienie 10% emulsji nie powodowało zauważalnych zmian wizualnych. Wielkość cząstek w tych układach nie uległa zmianie. Natomiast wyjałowienie termiczne 20% emulsji powodowało pojawienie się kropeł oleju na powierzchni układu. W tym układzie obserwowano wzrost wielkości cząstek – mediana wielkości cząstek wynosiła 800 nm, natomiast 90% cząstek miało średnicę poniżej 1,15  $\mu\text{m}$ , co potwierdzono badaniami mikroskopowymi. Podczas wyjaławiania termicznego emulsji z bronopolem dochodziło do znacznego obniżenia pH o około 3,5 jednostki do pH około 4,1. Po jednym miesiącu w wyjałowionych emulsjach z bronopolem: 10% (40°C) oraz 20% (4°C i 40°C) nastąpił rozdział faz, w związku z tym nie analizowano tych układów. W wyjałowionej 10% emulsji (4°C) obserwowano zmianę barwy na lekko żółtą. Znaczne obniżenie pH nastąpiło w niewyjałowionych emulsjach (40°C): o 2,3 jednostki w 10% emulsji oraz o 1,5 jednostki w 20% emulsji, które uległo pogłębieniu w czasie przechowywania. Po sześciu miesiącach w niewyjałowionej 20% emulsji (40°C) notowano rozdział faz. Najbardziej stabilnym układem z bronopolem były: 10% emulsje wyjałowiona i niewyjałowiona oraz 20% niewyjałowiona emulsja, przechowywane w 4°C.

## WODNE DYSPERSJE LECYTYNY

Wodne dyspersje lecytyny (WLD) w izotonicznym roztworze glicerolu (Metodyka p. 3.1) zawierały mieszaninę parabenów M i P lub chlorek benzalkoniowy (tabela 18). Otrzymane dyspersje poddawano analizie fizykochemicznej oceniając układy wizualnie i mikroskopowo oraz mierząc pH (pkt. 7). W układach WLD nie oznaczano wielkości cząstek metodą dyfrakcji laserowej ze względu na zbyt małe stężenie cząstek fosfolipidowych i związaną z tym konieczność stosowania bardzo dużych ilości WLD do pomiaru (ponad 200 ml). Dystrybucję środków konserwujących do fazy „wodno-



liposomalno-micelarnej” („w-l-m”) oznaczano stosując metodę ultrawierowania (uw), a do fazy wodnej metodę ultrafiltracji (metoda uf) (p. 9.4).

### ➤ Parabeny M i P

#### Ocena fizykochemiczna WLD

Badane układy WLD były nieprzezroczyste, homogenne, charakteryzowały się kremową barwą. Dodanie parabenów nie powodowało zauważalnych **zmian wizualnych**.

**Wielkość cząstek** oznaczona metodą mikroskopową wynosiła około 2-3  $\mu\text{m}$ . Zarówno wyjaławienie, jak i obecność parabenów M i P, nie wpływały na wielkość cząstek.

W tabeli 39 podano pH oraz potencjał zeta WDL. Dodanie parabenów powodowało obniżenie pH wodnych dyspersji lecytyny do wartości 5,3 (w N3-WLD nawet do 4,6). Dlatego po dodaniu środków konserwujących dokonywano korekty pH za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (1 mol/l) do około 8,0.

Tabela 39. Wartość pH oraz potencjał zeta [mV] WLD ze środkami konserwującymi podczas przechowywania w temp. 4°C (t = 7 dni i 12 miesięcy)

Dyspersja lecytyny	pH		Potencjał zeta	
	Nw	w	t =7 dni	t =12 m
<b>WLD bez środków konserwujących</b>				
<b>WLD1</b>	6,54	6,11	-23,1	-17,1
<b>WLD z parabenami</b>				
<b>N1-WLD</b>	7,80	7,63	-16,6	-30,1
<b>N2-WLD</b>	7,91	7,58	n.b.	n.b.
<b>N3-WLD</b>	7,60	7,08	n.b.	n.b.
<b>N4-WLD</b>	7,96	7,75	n.b.	n.b.
<b>WLD z chlorkiem benzalkoniowym</b>				
<b>B-WLD</b>	6,42	6,49	+15,3	+6,0

w – wyjaławione; nw – niewyjaławione

W niewyjaławionych dyspersjach lecytyny: niezawierającej środków konserwujących (WDL1) oraz z chlorkiem benzalkoniowym (B-WLD) już po 7 dniach

nastąpił znaczny spadek pH z wartości 8,0 do około 6,5. Po wyjąłowieniu nie obserwowano dalszego obniżenia pH.

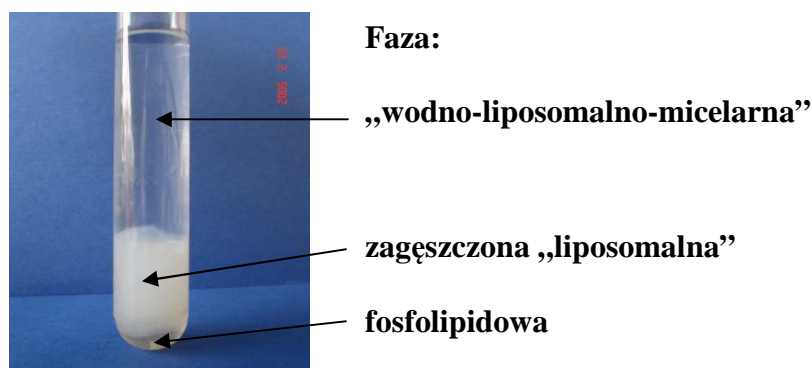
Natomiast w obecności parabenów w WLD niewyjąłowionych po 7 dniach przechowywania obserwowano niewielki spadek pH z wartości 8,00 do 7,60-7,96. Podczas wyjąławiania termicznego pH WLD uległo niewielkiemu obniżeniu. Największe obniżenie pH (do 7,1) notowano w WLD zawierającej 5% lecytyny (N3-WLD).

Potencjał zeta badano w wybranych układach wyjąłowionych. Dodanie parabenów powodowało zmniejszenie ujemnego potencjału zeta do  $-16,6$  mV. Po 12 miesiącach przechowywania ujemny potencjał zeta WLD1 bez środków konserwujących uległ zmniejszeniu, natomiast w obecności parabenów obserwowano zwiększenie ujemnej wartości tego parametru (tabela 39).

### Dystrybucja parabenów w WLD

W wodnych dyspersjach lecytyny, zarówno wyjąłowionych, jak i niewyjąłowionych, niezależnie od składu, wykrywano ponad 90% parabenu M oraz ponad 95% parabenu P (w stosunku do całkowitej zawartości).

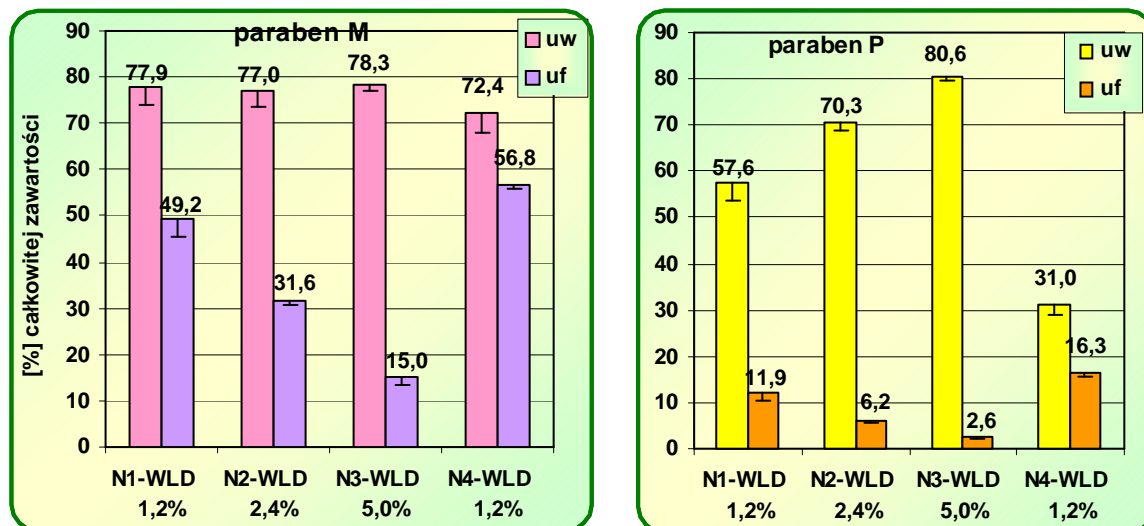
Ultrawierowanie wodnych dyspersji lecytyny powodowało rozdział faz (ryc. 32). Na dole obserwowano żółtawy, przezroczysty osad fosfolipidowy, nad nim była nieprzezroczysta, biała, zagęszczona faza „liposomalna”, a powyżej znajdowała się przezroczysta faza „wodno-liposomalno-micelarna”.



Ryc. 32. Rozdział faz w WLD po ultrawierowaniu.

W fazie wodnej z frakcją liposomalno-micelarną, uzyskanej w wyniku ultrawierowania dyspersji lecytyny (metoda uw), wykryto około 78% parabenu M oraz,

w zależności od stężenia lecytyny, 58-81% parabenu P (ryc. 33). Zawartość w fazie wodnej pozbawionej struktur submikronowych otrzymanej metodą ultrafiltracji (metoda uf) była mniejsza i wynosiła 15-49% parabenu M oraz 2,6-12% parabenu P.



Ryc. 33. Dystrybucja parabenów do fazy „w-l-m” (metoda uw) oraz do fazy wodnej (metoda uf) WLD.

Zawartość parabenów w fazie „w-l-m” WLD była znacznie większa w porównaniu z emulsjami submikronowymi, zawierającymi takie samo stężenie lecytyny: parabenu M dwukrotnie, a parabenu P 10-krotnie (N1-WLD w porównaniu z N1 oraz N2-WLD z N2, ryc. 15 i ryc. 33). Wraz ze wzrostem stężenia lecytyny jajowej w wodnej dyspersji lecytyny w fazie „w-l-m” notowano wzrost stężenia parabenu P, natomiast nie obserwowano takiej zależności dla parabenu M (ryc. 33).

Podobnie, jak w emulsjach submikronowych, wraz ze wzrostem stężenia lecytyny malała zawartość obu środków konserwujących w fazie wodnej WLD. W porównaniu z emulsjami submikronowymi, zawierającymi takie samo stężenie lecytyny, zawartość obu parabenów w fazie wodnej WLD była większa (N1-WLD w porównaniu z N1 oraz N2-WLD z N2, ryc. 15 i ryc.33).

Dwukrotne zwiększenie całkowitego stężenia obu parabenów w N4-WLD powodowało niewielkie zwiększenie procentowego udziału w fazie wodnej - parabenu M z 49 do 57%, a parabenu P z 12 do 16% (ryc. 33).

Podobnie, jak w przypadku emulsji submikronowych, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie ( $p < 0,05$ ) w zawartości parabenów w fazie wodnej pomiędzy układami wyjałowionymi oraz niewyjałowionymi.

## ➤ Chlorek benzalkoniowy

### Ocena fizykochemiczna WLD

Dodanie chlorku benzalkoniowego nie powodowało w układach zauważalnych zmian wizualnych. Podobnie, jak w przypadku parabenów, obecność chlorku benzalkoniowego (B-WLD) nie zmieniała wielkości cząstek. W obrazie mikroskopowym obserwowano cząstki o wielkości 2-3  $\mu\text{m}$ .

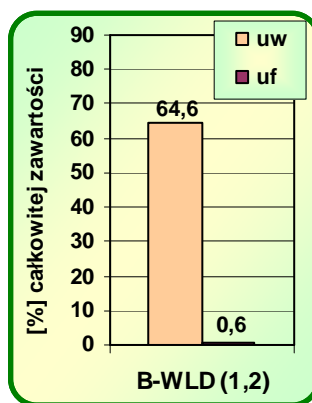
Pomimo korekty pH po sporządzeniu WLD do wartości około 8,0, po 7 dniach w WLD zawierających chlorek benzalkoniowy, następowało obniżenie pH prawie o dwie jednostki - do wartości 6,42 (tabela 39, str.121). Proces wyjąławiania termicznego nie powodował już znacznego obniżenia pH.

Wprowadzenie chlorku benzalkoniowego do dyspersji lecytyny powodowało inwersję ujemnego potencjału zeta na dodatni (z wartości  $-23,1$  na wartość  $+15,3$  mV). Po 12 miesiącach przechowywania dodatni potencjał zeta uległ zmniejszeniu do  $+6,0$  mV (tabela 39, str. 121).

### Dystrybucja chlorku benzalkoniowego w WLD

W wodnej dyspersji lecytyny oznaczono tylko 86% całkowitej zawartości chlorku benzalkoniowego, przy czym nie stwierdzono różnic pomiędzy układem wyjąławionym i niewyjąławionym.

W fazie „w-l-m” B-WLD (metoda uw) wykrywano około 65% całkowitej zawartości chlorku benzalkoniowego. Natomiast w fazie wodnej pozbawionej struktur micelarnych wykrywano tylko 0,6% chlorku benzalkoniowego (ryc. 34). Uzyskane wyniki zawartości chlorku benzalkoniowego w wodnej dyspersji lecytyny były wyższe w porównaniu z emulsją submikronową (1,2% lecytyny), o takim samym stężeniu chlorku benzalkoniowego (B3\*, ryc. 21 str. 98)



Ryc. 34. Dystrybucja chlorku benzalkoniowego w fazie „w-l-m” (metoda uw) oraz w fazie wodnej (metoda uf) B-WLD.

## DYSPERSJE LIPOSFER (NLC)

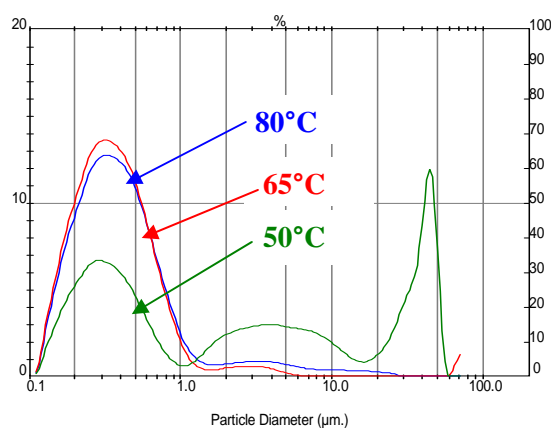
### Ocena fizykochemiczna dyspersji liposfer

Dyspersje liposfer miały barwę żółtą. Środki konserwujące dodane do badanych układów ( $t = 0$ ), w temperaturze pokojowej lub podczas ogrzewania do temperatury  $65^{\circ}\text{C}$  lub  $80^{\circ}\text{C}$ , nie powodowały zmian wizualnych. Tylko w układzie z Phenonipem ogrzewanym do  $50^{\circ}\text{C}$  zaobserwowano zgęstnienie przy powierzchni. Po sześciu miesiącach przechowywania nie notowano zmian wizualnych. Jedynie w teście przyspieszonego starzenia, w układach z chlorkiem benzalkoniowym i parabenami, widoczne były pomarańczowe aglomeraty cząstek układu.

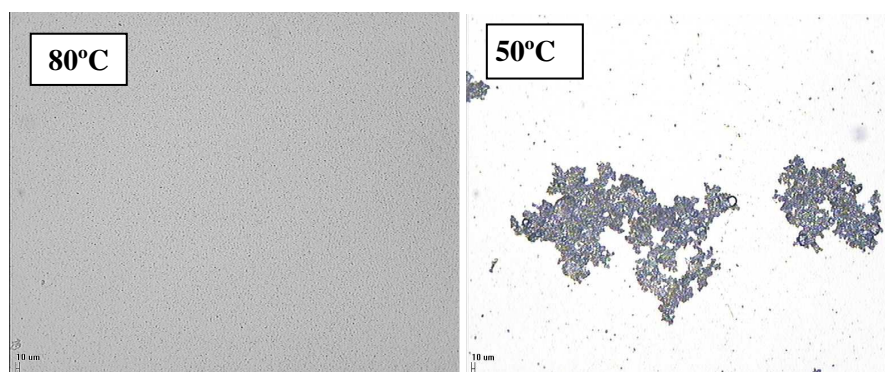
W tabeli 40 oraz na ryc. 35 przedstawiono wpływ ogrzewania podczas dodawania Phenonipu na **wielkość cząstek** w dyspersjach liposfer. Mediana wielkości cząstek w dyspersjach liposfer bez środka konserwującego wynosiła 340 nm. W dyspersjach liposfer z Phenonipem ogrzewanym do  $65^{\circ}\text{C}$  oraz  $80^{\circ}\text{C}$  nie obserwowano zmian wielkości cząstek względem układu niezawierającego środków konserwujących (NLC). Natomiast dodanie Phenonipu w temperaturze pokojowej powodowało wzrost wielkości cząstek w układzie (90% cząstek było poniżej  $2,13\ \mu\text{m}$ ). W układach ogrzewanym tylko do  $50^{\circ}\text{C}$  notowano znaczny wzrost wielkości cząstek. Uzyskane wyniki potwierdzono obserwacjami mikroskopowymi - w dyspersji z Phenonipem ogrzewanej do  $50^{\circ}\text{C}$  obserwowano dużą ilość skupisk cząstek w całym polu widzenia, natomiast w pozostałych układach cząstki były poniżej  $1\ \mu\text{m}$  (ryc. 36).

Tabela 40. Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ] dyspersji liposfer w zależności od temperatury podczas dodawania Phenonipu

Temperatura	Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ]	
	d(0,5)	d(0,9)
<b>NLC bez środka konserwującego</b>		
21°C	0,34	0,70
<b>NLC z Phenonipem</b>		
21°C	0,36	2,13
50°C	2,39	43,23
65°C	0,35	0,80
80°C	0,37	1,10



Ryc. 35. Rozkład wielkości cząstek [ $\mu\text{m}$ ] dyspersji liposfer w zależności od temperatury podczas dodawania Phenonipu.

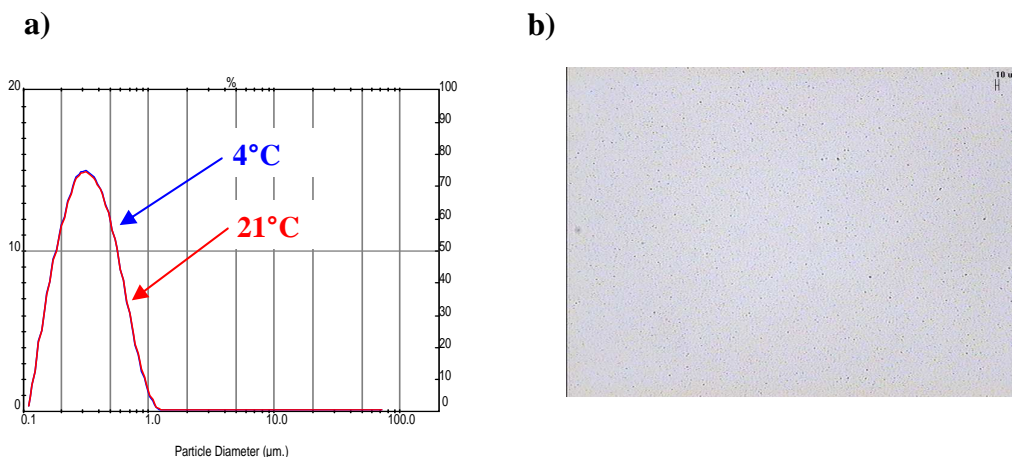


Ryc.36. Obraz mikroskopowy dyspersji liposfer w zależności od temperatury dodawania Phenonipu (znacznik skali 10  $\mu\text{m}$ ).

W tabeli 41 oraz na ryc. 37 przedstawiono wpływ warunków przechowywania przez sześć miesięcy na wielkość cząstek w dyspersjach liposfer ze środkami konserwującymi.

Tabela 41. Wielkość cząstek [ $\mu\text{m}$ ] w dyspersjach liposfer ze środkami konserwującymi podczas przechowywania przez 6 miesięcy

Temp.	Czas badania Środek konserwujący	t = 0		t = 1 m		t = 3 m		t = 6 m	
		d(0,5)	d(0,9)	d(0,5)	d(0,9)	d(0,5)	d(0,9)	d(0,5)	d(0,9)
4°C	Bez środka konserwującego	0,33	0,66	0,33	0,69	0,33	0,64	0,33	0,65
	Bronopol	0,33	0,66	0,34	0,71	0,33	0,63	0,33	0,64
	Chlorek benzalkoniowy	0,35	0,88	0,35	0,96	0,35	0,71	0,35	0,74
	Chlorokrezol	0,34	0,69	0,34	0,69	0,30	0,54	0,34	0,70
	Parabeny M i P	0,34	0,69	0,32	0,62	0,34	0,68	0,33	0,69
	Phenonip	0,33	0,67	0,32	0,60	0,33	0,66	0,33	0,69
21°C	Bez środka konserwującego	j.w.		0,35	0,90	0,34	0,77	0,32	0,63
	Bronopol			0,33	0,64	0,33	0,63	0,32	0,64
	Chlorek benzalkoniowy			0,33	0,71	0,33	0,67	0,34	0,72
	Chlorokrezol			0,32	0,63	0,33	0,67	0,34	0,71
	Parabeny M i P			0,35	0,76	0,32	0,67	0,32	0,60
	Phenonip			0,33	0,66	0,34	0,72	0,32	0,62

Ryc.37. Wielkość cząstek dyspersji liposfer z bronopolem ( $t = 6 \text{ m}$ ): a) pomiar dyfraktometrem laserowym, b) obserwacje mikroskopowe (znacznik skali  $10 \mu\text{m}$ ).

Badania wykazały, że dodanie środków konserwujących do dyspersji liposfer ( $t=0$ ) nie powodowało wzrostu wielkości cząstek. Przechowywanie tych układów przez 6 miesięcy, zarówno w temperaturze  $4^\circ\text{C}$ , jak również w  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , nie zmieniało wielkości cząstek. Wyniki te potwierdzano obserwacjami mikroskopowymi wykazując,

że wielkość cząstek we wszystkich układach ze środkami konserwującymi nie zmieniła się i wynosiła poniżej 1  $\mu\text{m}$  (ryc. 37).

Tabela 42. Wartość pH dyspersji liposfer ze środkami konserwującymi w zależności od temperatury przechowywania przez 6 miesięcy

Temp.	Czas badania Środek konserwujący	pH			
		t = 0	t = 1 m	t = 3 m	t = 6 m
4°C	Bez środka konserwującego	6,89	6,73	6,84	6,88
	Bronopol	6,75	6,85	6,83	6,87
	Chlorek benzalkoniowy	6,85	6,82	6,84	6,93
	Chlorokrezol	6,84	6,85	6,86	6,85
	Parabeny M i P	6,75	6,84	6,76	6,82
	Phenonip	6,96	6,89	6,95	6,97
21°C	Bez środka konserwującego	j.w.	6,74	6,81	6,76
	Bronopol		6,76	6,89	<b>6,45</b>
	Chlorek benzalkoniowy		6,79	6,94	6,83
	Chlorokrezol		6,96	6,90	6,82
	Parabeny M i P		6,84	6,90	6,84
	Phenonip		6,89	6,86	6,85

Dyspersje liposfer, niezależnie od obecności środka konserwującego, charakteryzowały się wartością pH wynoszącą 6,75-6,96 (tabela 42). Podczas przechowywania dyspersji liposfer ze środkami konserwującymi przez sześć miesięcy (4°C i 21°C) pH nie uległo zmianie (tabela 42). Wyjątkiem były liposfery z bronopolem, w których w temperaturze 21°C notowano obniżenie pH do 6,45.

W tabeli 43 przedstawiono **lepkość kinematyczną** dyspersji podczas przechowywania.



Tabela 43. Lepkość kinematyczna [ $\text{mm}^2/\text{s}$ ] dyspersji liposfer ze środkami konserwującymi w czasie przechowywania (średnia,  $n=6$ )

Temp.	Czas badania		t = 0	t = 1 m	t = 3 m	t = 6 m
	Środek konserwujący					
4°C	Bez środka konserwującego		17,53	17,45	17,43	17,57
	Bronopol		15,99	15,62	15,83	15,78
	Chlorek benzalkoniowy		<b>12,68</b>	<b>14,55</b>	<b>14,28</b>	<b>14,28</b>
	Chlorokrezol		17,72	16,91	17,01	17,06
	Parabeny M i P		18,38	18,02	18,18	17,52
	Phenonip		18,19	18,01	18,05	18,46
21°C	Bez środka konserwującego	j.w.		17,63	17,35	17,42
	Bronopol			<b>13,81</b>	<b>14,22</b>	<b>13,40</b>
	Chlorek benzalkoniowy			<b>12,17</b>	<b>14,13</b>	<b>13,06</b>
	Chlorokrezol			15,49	16,50	15,97
	Parabeny M i P			18,10	16,00	<b>15,01</b>
	Phenonip			17,65	17,67	16,95

Lepkość kinematyczna dyspersji liposfer bez środka konserwującego wynosiła  $17,53 \pm 0,09 \text{ mm}^2/\text{s}$  i praktycznie nie uległa zmianie podczas przechowywania.

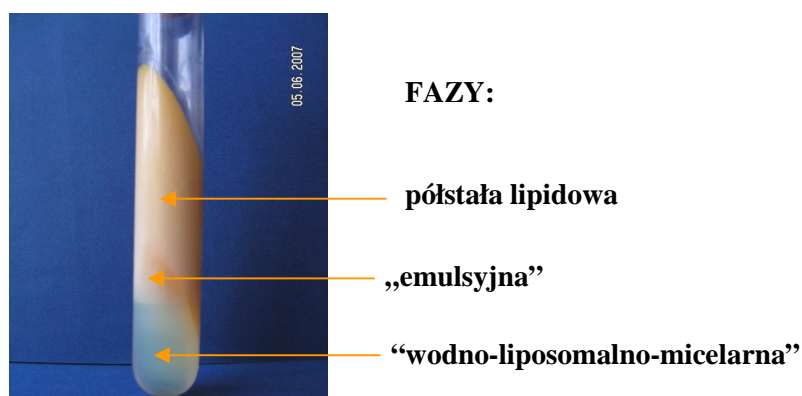
Jedynie dodanie chlorku benzalkoniowego powodowało znaczne zmniejszenie lepkości kinematycznej NLC (o  $4,85 \text{ mm}^2/\text{s}$ ). Po sześciu miesiącach przechowywania dyspersji liposfer ze środkami konserwującymi w temperaturze 4°C nie obserwowano większych zmian wartości tego parametru. W liposferach z bronopolem notowano obniżenie lepkości kinematycznej do  $15,78 \text{ mm}^2/\text{s}$ , a w obecności chlorku benzalkoniowego stwierdzono najniższą wartość tego parametru ( $14,28 \text{ mm}^2/\text{s}$ ). W temperaturze 40°C, już po jednym miesiącu w liposferach z bronopolem i chlorkiem benzalkoniowym oraz po sześciu miesiącach w obecności parabenów, notowano znaczny spadek wartości lepkości kinematycznej.

### Badanie dystrybucji Phenonipu i chlorku benzalkoniowego

W badaniach całkowitej zawartości składników Phenonipu w dyspersji liposfer, w układach ogrzewanych do 80°C lub 65°C, oznaczano około 90% fenoksyetanolu,

76% parabenu metylowego oraz 108% parabenu propylowego w stosunku do całkowitej zawartości. Nie udało się oznaczyć całkowitej zawartości chlorku benzalkoniowego w dyspersjach liposfer. Metoda oznaczania nie była w tym przypadku specyficzna dla chlorku benzalkoniowego, ponieważ następowała interferencja z pikami składników liposfer. Ostatecznie wyniki zawartości środków konserwujących w fazie wodnej odnoszono do ich całkowitego stężenia w dyspersjach liposfer.

Ultrawierowanie dyspersji liposfer powodowało rozdział faz:  $\frac{3}{4}$  objętości próby stanowiła półstała masa lipidowa, pod tą warstwą znajdowały się faza emulsyjna, a poniżej nieprzezroczysta, żółtawa faza „wodno-liposomalno-micelarna” (ryc. 38). Ze względu na duży stopień zmętnienia fazy „w-l-m” nie poddawano tej fazy analizie HPLC.



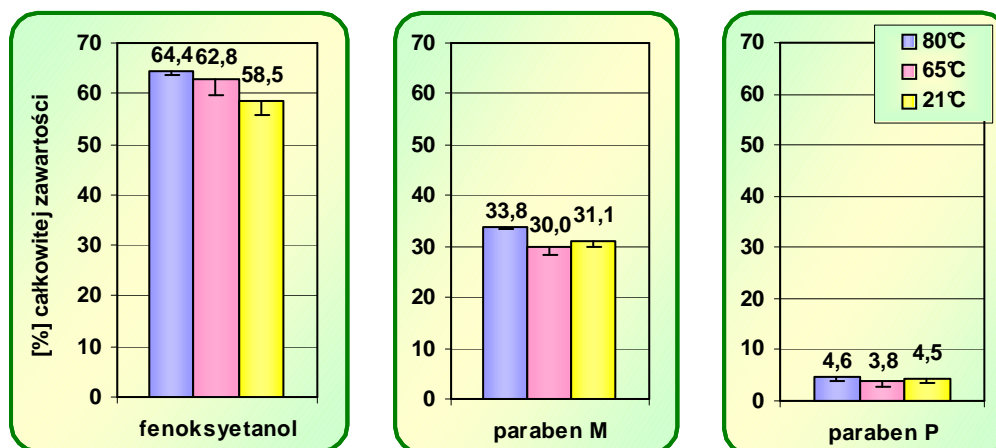
Ryc.38. Rozdział faz dyspersji liposfer po ultrawierowaniu.

### ➤ Phenonip

Na ryc. 39 przedstawiono dystrybucję składników Phenonipu do fazy wodnej dyspersji liposfer (metoda uf).

Zgodnie ze współczynnikiem podziału, największą dystrybucję do fazy wodnej notowano dla fenoksyetanolu (ok. 60%), a najmniejszą dla parabenu propylowego (ok. 4%).

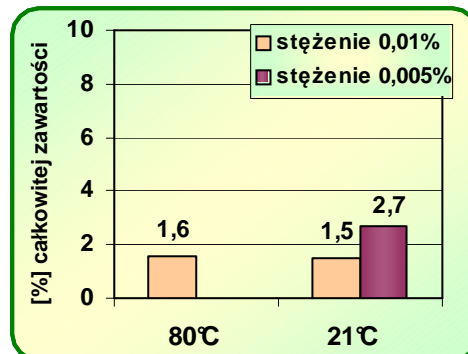
Proces topienia stałego lipidu, podczas wprowadzania środków konserwujących do dyspersji liposfer, nie wpływał na dystrybucję do fazy wodnej parabenów. Jedynie dla fenoksyetanolu obserwowano niewielkie zwiększenie jego zawartości w fazie wodnej po etapie topienia matrycy lipidowej.



Ryc.39. Zawartość składników Phenonipu w fazie wodnej dyspersji liposfer (metoda uf) w zależności od temperatury dodawania.

### ➤ Chlorek benzalkoniowy

W zawiesinach NLC badano dystrybucję chlorku benzalkoniowego w zależności od całkowitego stężenia w układzie (0,005% oraz 0,01%). Na ryc. 40 przedstawiono zawartość chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej dyspersji liposfer (metoda uf).



Ryc. 40. Zawartość chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej (metoda uf) dyspersji liposfer w zależności od temperatury dodawania i całkowitego jego stężenia w układzie.

Podobnie, jak w przypadku emulsji submikronowych, bardzo małe ilości chlorku benzalkoniowego wykrywano w fazie wodnej (poniżej 3%). Stwierdzono, że proces topienia stałego lipidu nie zmienia dystrybucji chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej dyspersji liposfer. Natomiast zmniejszenie całkowitej zawartości chlorku benzalkoniowego w dyspersji liposfer powodowało zwiększenie (wyrażonej procentowo) frakcji tego środka konserwującego w fazie wodnej.

## LIPOSOMY (ZAKOSOMY O<sup>®</sup>)

W badaniach wykorzystano gotową dyspersję liposomów (Zakosomy) zawierającą Phenonip (8,0 mg/g) (tabela 11, str. 59).

### Ocena fizykochemiczna liposomów

Właściwości fizykochemiczne liposomów przedstawiono w tabeli 44.

Tabela 44. Właściwości fizykochemiczne zawiesiny liposomów

Rodzaj badania	Wyniki
Obserwacje wizualne	kremowa barwa, płynna konsystencja, homogenne
Obserwacje mikroskopowe	cząstki poniżej 1 $\mu\text{m}$ ; brak skupisk cząstek
pH	5,96
Gęstość [g/ml]	0,95
Ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]	62

### Badanie dystrybucji Phenonipu

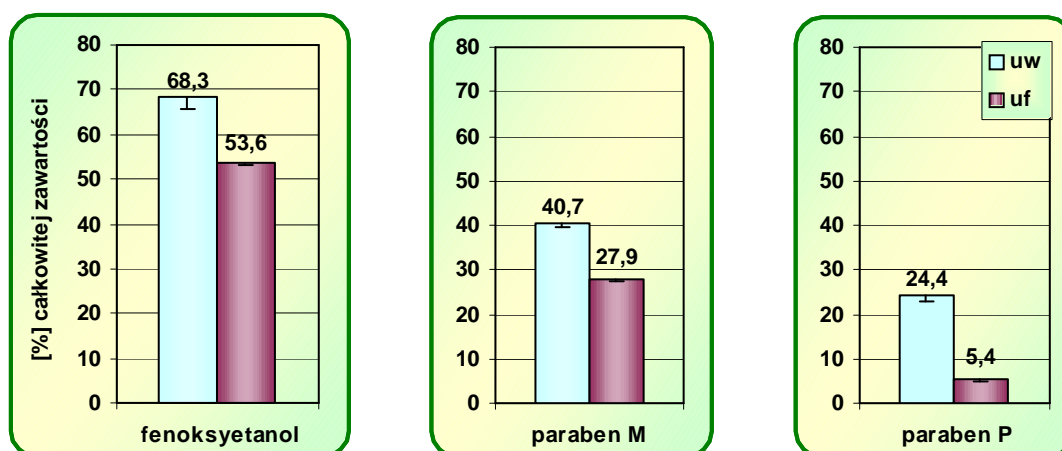
W dyspersjach liposomów, w stosunku do całkowitej zawartości (deklarowanej przez producenta), wykrywano 85,3% fenoksyetanolu, 83,9% parabenu M oraz 90,8% parabenu P.

Ultrawiórowanie dyspersji liposomów powodowało rozdział faz: na górze była klarowna faza „wodno-liposomalno-micelarna”, a pod nią biały osad fazy liposomalnej (ryc. 41).



Ryc. 41. Rozdział faz dyspersji liposomów po ultrawiórowaniu.

Na ryc. 42 przedstawiono zawartość składników Phenonipu w fazie „wodno-liposomalno-micelarnej” („w-l-m”) oraz w fazie wodnej dyspersji liposomów.



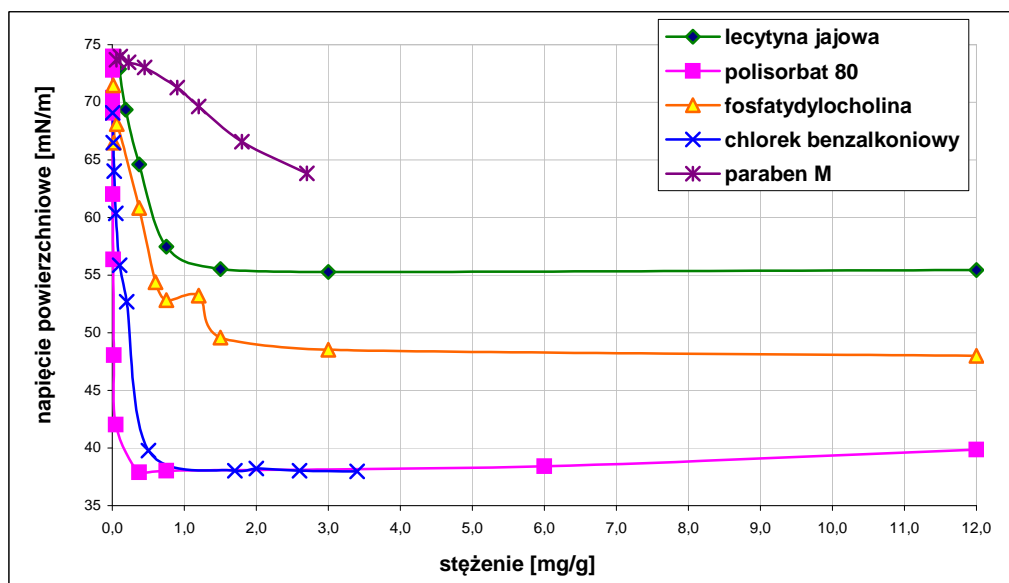
Ryc. 42. Zawartość składników Phenonipu w fazie „w-l-m” (metoda uw) oraz w fazie wodnej (metoda uf) dyspersji liposomów.

Zastosowanie etapu ultrafiltracji powodowało zmniejszenie zawartości środków konserwujących w fazie wodnej. W porównaniu z wodnymi dyspersjami lecytyny (2,4% lecytyny) konserwowanymi mieszaniną parabenów M i P (ryc. 33) uzyskane wartości w fazie wodnej obu tych środków konserwujących są podobne. Z kolei, dystrybucję fenoksyetanolu do fazy wodnej i fazy „w-l-m” można porównywać z dystrybucją otrzymaną w emulsji submikronowej (P1) (ryc. 26).

## POMIARY NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO

Pomiarów napięcia powierzchniowego dokonywano metodą tensometryczną odrywania płytki (Metodyka p. 8). Wyznaczona wartość napięcia powierzchniowego wody oczyszczonej wynosiła 73,57 mN/m, a 2,5% roztworu glicerolu 73,47 mN/m, co pozwala wnioskować, że glicerol w stężeniu 2,5% obecny w submikronowych dyspersjach nie ma aktywności powierzchniowej.

Na ryc. 43 przedstawiono wartość napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia  $\gamma$  (c) dla poszczególnych surfaktantów oraz środków konserwujących.



Ryc. 43. Zależność napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia  $\gamma(c)$  badanych surfaktantów lub środków konserwujących (wartości średnie,  $n=5$ ).

Największą zdolnością obniżania napięcia powierzchniowego charakteryzowały się polisorbát 80 oraz chlorek benzalkoniowy. Obserwowano różnicę w zdolności obniżania napięcia powierzchniowego pomiędzy lecytyną jajową i jej izolowaną frakcją fosfatydylocholiną, dla której w porównaniu z lecytyną obserwowano o około 8 mN/m niższe napięcie powierzchniowe (ryc. 43). Krzywa zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia parabenu M ma charakter monotonicznego spadku ze wzrostem stężenia i nie posiada w zakresie badanych stężeń charakterystycznego punktu przegięcia wskazującego krytyczne stężenie micelarne (cmc). Oznacza to, że paraben M nie jest typowym związkiem powierzchniowo aktywnym. Dalsze zwiększanie stężenia parabenu M (powyżej 2,7 mg/g) w roztworze prowadzi do krystalizacji tego środka konserwującego, co uniemożliwiało określenie cmc z zależności  $\gamma(c)$ .

W tabeli 45 podano krytyczne stężenia micelarne (cmc) oraz wartość napięcia powierzchniowego dla cmc, będącą miarą efektywności powierzchniowej danego surfaktantu.

Badane surfaktanty oraz środki konserwujące można uporządkować według ich wzrastającej efektywności powierzchniowej: lecytyna jajowa < fosfatydylocholina < chlorek benzalkoniowy < polisorbát 80. Jak wyjaśniono powyżej, w przypadku parabenu M nie udało się określić jego efektywności powierzchniowej.

Tabela 45. Parametry adsorpcji powierzchniowej roztworów surfaktantów, środków konserwujących oraz mieszanin surfaktantów ze środkami konserwującymi

	Krytyczne stężenie micelarne cmc [mg/g]			Pomiar napięcia powierzchniowego			
	Surfaktant	Surfaktant + BAC	Surfaktant + paraben	Stężenie [mg/g]	Napięcie powierzchniowe [mN/m]		
					Surfaktant	Surfaktant + BAC	Surfaktant + paraben
<b>Surfaktant</b>							
<b>Polisorbat 80</b>	0,10	0,023	0,097	12,0	39,87	39,46	38,70
				cmc	38,00	46,76	-
<b>PC</b>	0,90	0,187	0,375	12,0	43,05	47,26	31,23
				cmc	43,00	56,50	34,49
<b>Lecytyna jajowa</b>	0,85	0,75?	0,048	12,0	55,40	32,36	47,70
		0,10 <sup>(*)</sup>		cmc	54,50	52,97	56,76
				42,64 <sup>(*)</sup>			
<b>Środek konserwujący</b>							
<b>BAC</b>	0,34	-	-	0,2	52,68	-	-
				cmc	39,50	-	-
<b>Paraben M</b>	-	-	-	1,8	66,59	-	-

BAC – chlorek benzalkoniowy; PC – fosfatydylocholina

<sup>(\*)</sup> - określono dla krzywej zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia chlorku benzalkoniowego, przy stałym stężeniu lecytyny (12 mg/g)

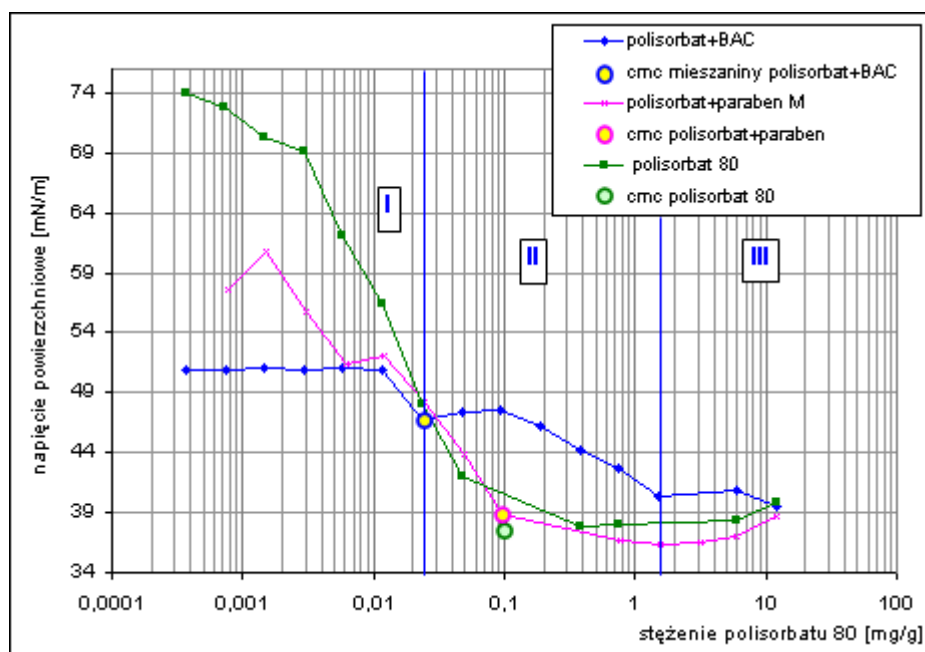
Na ryc. 44-47 porównywano uzyskane profile zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia dla roztworów surfaktantów oraz ich mieszanin ze środkami konserwującymi występującymi w stałym stężeniu (Metodyka p. 6). Z przebiegu zależności  $\gamma$  (c) surfaktantu wyznaczano cmc mieszaniny surfaktantu ze środkiem konserwującym, oceniając w ten sposób wpływ środka konserwującego na zdolność absorpcyjną surfaktantu.

Przebieg zależności  $\gamma$  (c) dla mieszanin surfaktantów może być interpretowany na podstawie modelu dla układu dwóch surfaktantów, z których jeden o większej aktywności powierzchniowej, ale o mniejszym stężeniu, nie tworzy nasyconej warstwy powierzchniowej (traktowany jest jako śladowe „zanieczyszczenie”) i występuje obok surfaktantu bazowego o stężeniu zmiennym powyżej swojego cmc [105].

Dla mieszanin surfaktantów ze środkami konserwującymi można podać ogólną interpretację przebiegów zależności napięcia powierzchniowego w funkcji zmiennego

stężenia surfaktantu przy stałym stężeniu środka konserwującego (ryc. 44-46). Obserwowane minima w przebiegu zależności  $\gamma$  (c) dzielą obszar wykresu na trzy części. W obszarze I surfaktant występuje w bardzo małym stężeniu, więc za spadek napięcia powierzchniowego w dużej mierze odpowiedzialny jest dodany środek konserwujący. Jeżeli w tym zakresie napięcie powierzchniowe nie zmienia się, oznacza to brak wpływu surfaktantu na napięcie powierzchniowe wynikające z niezmiennego stężenia środka konserwującego (ryc. 44).

Na ryc. 44 przedstawiono profile zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia polisorbatu 80 przy stałym stężeniu chlorku benzalkoniowego (0,2 mg/g) lub parabenu M (1,8 mg/g), porównując z profilem obserwowanym dla polisorbatu 80 bez środka konserwującego (ryc. 43).



Ryc. 44. Zależność napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia polisorbatu 80  $\gamma$  (c) przy stałym stężeniu chlorku benzalkoniowego lub parabenu M (stężenia podano w tekście).

Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu napięcie powierzchniowe ulega obniżeniu (pierwsze minimum na wykresie), co jest spowodowane wypełnianiem przez cząsteczki surfaktantu wolnych miejsc na granicy ciecz/powietrze. Obserwowane stężenie w minimum lokalnym (punkt graniczny pomiędzy I a II obszarem) jest nowym krytycznym stężeniem micelarnym surfaktantu w mieszaninie ze środkiem konserwującym (cmc mieszanki). Od tego minimum rozpoczyna się obszar II, w



którym wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu, dochodzi do usuwania z powierzchni monomerów środka konserwującego i tworzenia ewentualnie w głębi roztworu miceli mieszanych surfaktant - środek konserwujący. Procesowi temu towarzyszy wzrost napięcia powierzchniowego do maksimum lokalnego w obszarze II. Powyżej maksimum lokalnego, wraz z dalszym wzrostem stężenia surfaktantu, dochodzi do spadku napięcia powierzchniowego. Oznacza to, że na granicy ciecz/powietrze cząsteczki surfaktantu wypełniają wolne miejsca pozostawione przez środek konserwujący, natomiast w głębi roztworu ilość mieszanych miceli jest stała. Proces kończy się w drugim minimum lokalnym, które jest punktem przejścia pomiędzy II a III obszarem, aż ostatecznie ustala się napięcie powierzchniowe charakterystyczne dla surfaktantu, którego cząsteczki wypełniły całkowicie powierzchnię międzyfazową. Obszar III charakteryzuje się stałą, charakterystyczną dla surfaktantu wartością napięcia powierzchniowego. Dalszy wzrost stężenia surfaktantu prowadzi do postępującej komplikacji struktury miceli mieszanych w głębi roztworu (od kulistych poprzez nitkowate do płytkowych).

Skład fazy objętościowej (roztwór) jest zmienny w zależności od stężenia surfaktantu. W obszarze I jest tylko roztwór środka konserwującego, ponieważ surfaktant występuje w bardzo małym stężeniu. Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w obszarze II w fazie objętościowej mogą tworzyć się mieszane micelle surfaktantu ze środkiem konserwującym, a ich ilość jest stała. Natomiast w obszarze III występują dwie postacie miceli – stała ilość miceli mieszanych i zwiększająca się ze wzrostem stężenia surfaktantu ilość miceli czystego surfaktantu.

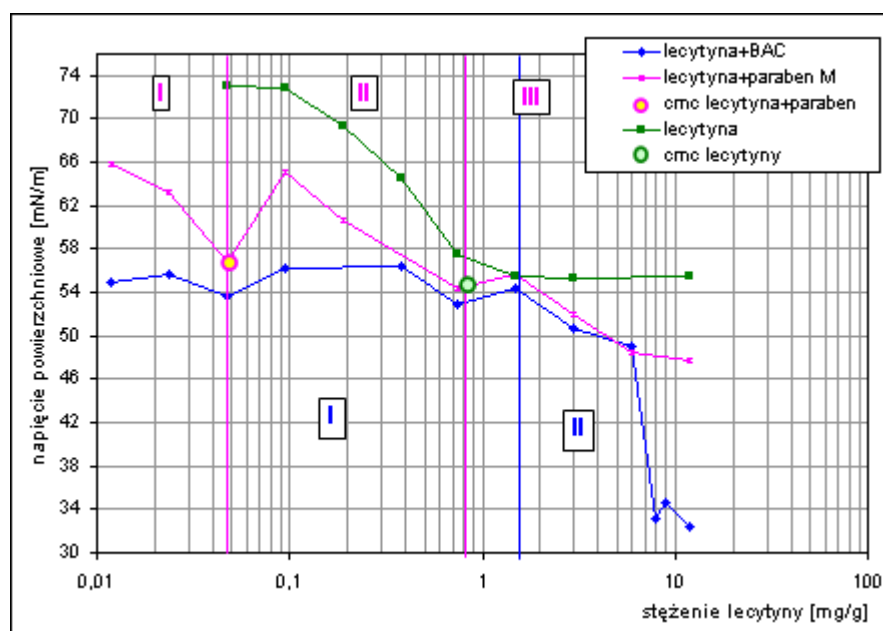
Przebieg **zależności  $\gamma$  (c) polisorbatu 80 w obecności chlorku benzalkoniowego** (ryc. 44) jest charakterystyczny dla podanego powyżej ogólnego schematu interpretacji. Na początku wykresu, kiedy praktycznie nie ma w układzie cząsteczek polisorbatu, napięcie powierzchniowe dla roztworu polisorbatu jest napięciem czystej wody, a dla roztworu polisorbatu z chlorkiem benzalkoniowym jest charakterystyczne dla chlorku benzalkoniowego. Na końcu przebiegu krzywych zostaje osiągnięte napięcie powierzchniowe charakterystyczne dla polisorbatu.

Różnica napięcia powierzchniowego w obszarze I w obecności środka konserwującego wskazuje na większą aktywność powierzchniową chlorku benzalkoniowego niż polisorbatu, a jego usuwanie przez cząsteczki polisorbatu powoduje wystąpienie maksimum lokalnego w obszarze II.

Wprowadzenie chlorku benzalkoniowego do roztworu polisorbatu 80 zmniejszyło cmc tego surfaktantu z wartości 0,10 do 0,023 mg/g (tabela 45, str.135). Przebieg krzywej w obszarze II oraz zmieniona wartość cmc świadczą o interakcji pomiędzy chlorkiem benzalkoniowym i polisorbatem oraz wytworzeniu warstw mieszanych. Nie zaobserwowano takiej interakcji w obecności parabenu.

Profil zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia polisorbatu 80 przy stałym stężeniu parabenu M (1,8 mg/g) wykazuje regularną zależność  $\gamma$  (c), charakterystyczną dla polisorbatu samodzielnie występującego w układzie (ryc. 43), chociaż notuje się pewne obniżenie napięcia powierzchniowego, pomimo małego stężenia polisorbatu (obszar I). Paraben M praktycznie nie powoduje zmiany cmc polisorbatu (tabela 45, str. 135), co oznacza, że w mieszaninie z polisorbatem nie uczestniczy on w budowaniu warstwy powierzchniowej. Brak mieszalności powierzchni świadczy o zróżnicowaniu budowy chemicznej obu związków.

Na ryc. 45 przedstawiono profile zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia lecytyny jajowej przy stałych stężeniach chlorku benzalkoniowego (0,2 mg/g) lub parabenu M (1,8 mg/g). Porównano je z profilem dla lecytyny samodzielnie występującej w układzie (ryc. 43).



Ryc. 45. Zależność napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia lecytyny jajowej  $\gamma$  (c) przy stałym stężeniu chlorku benzalkoniowego (BAC) lub parabenu M (stężenia podano w tekście).

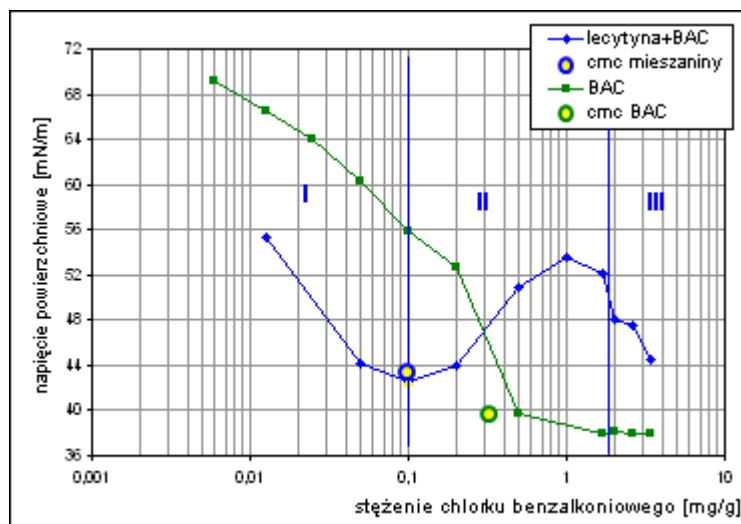
Na uwagę zasługuje fakt, że lecytyna w wodzie nie tworzy miceli, ale oligomery o niskiej liczbie agregacji, przez co przebieg  $\gamma$  (c) może nie ujawnić wyraźnego punktu przegięcia dla stężenia równego cmc lecytyny [106, 107].

Profil **zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia lecytyny przy stałym stężeniu parabenu M (1,80 mg/g)** jest charakterystyczny do opisanego powyżej ogólnego schematu (obszary I-III). Pomimo braku właściwości powierzchniowo czynnych obecność parabenu spowodowała bardzo duże przesunięcie cmc lecytyny w kierunku niższych wartości (tabela 45, str. 135), co dowodzi interakcji ze składnikami lecytyny na granicy faz ciecz – powietrze.

Nietypowy **profil zależności  $\gamma$  (c) lecytyny obserwowano dla lecytyny w obecności chlorku benzalkoniowego (0,20 mg/g) (ryc. 45)**. W obszarze I w zakresie stężeń lecytyny 0-1,5 mg/g nie notowano zmian adsorpcji powierzchniowej ( $\gamma = \text{const.}$ ). Pomimo wzrostu stężenia lecytyny wartość napięcia powierzchniowego w tym obszarze jest praktycznie stała (52–56 mN/m) – trochę większa niż w mieszaninie z polisorbatem. Od stężenia lecytyny 1,5 mg/g następuje stopniowe obniżanie napięcia powierzchniowego, a przy stężeniu lecytyny 6,0 mg/g dochodzi do gwałtownego spadku napięcia powierzchniowego do wartości 33,05 mN/m, co świadczy o zachodzących interakcjach pomiędzy składnikami lecytyny i chlorkiem benzalkoniowym. Do interakcji dochodzi przy wysokich stężeniach lecytyny - takich jakie występują w badanych układach submikronowych. Z powyższych powodów nie można oznaczyć zmiany cmc lecytyny powodowanej przez chlorek benzalkoniowy.

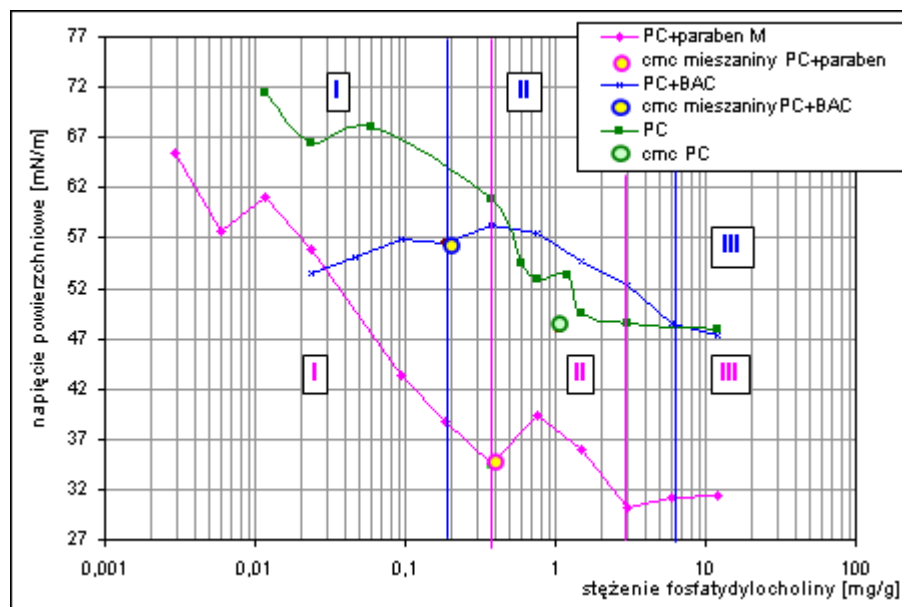
O interakcji chlorku benzalkoniowego ze składnikami lecytyny świadczą także wyniki przedstawione na ryc. 46. W tym przypadku wykres obrazuje zmiany przebiegu graficznego zależności  $\gamma$  (c) **chlorku benzalkoniowego przy stałym stężeniu lecytyny (12,0 mg/g)**.

Okazuje się, że w obecności lecytyny nastąpiło przesunięcie cmc chlorku benzalkoniowego z wartości 0,34 mg/g do wartości 0,10 mg/g oraz wyraźny jest efekt obecności fosfolipidów lecytyny na granicy ciecz/powietrze i zastępowanie jej chlorkiem benzalkoniowym tylko przy wysokich stężeniach (powyżej 1,00 mg/g – maksimum lokalne w obszarze II).



Ryc. 46. Zależność napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia  $\gamma$  (c) chlorku benzalkoniowego przy stałym stężeniu lecytyny (12 mg/g).

W celu wyjaśnienia zachodzących interakcji pomiędzy składnikami lecytyny a środkami konserwującymi badano fosfatydylocholinę (główny składnik lecytyny). Na ryc. 47 przedstawiono profile zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia fosfatydylochliny (PC) przy stałych stężeniach chlorku benzalkoniowego (0,2 mg/g) lub parabenu M (1,8 mg/g), porównując je z profilem notowanym dla fosfatydylochliny samodzielnie występującej w układzie (ryc. 43).



Ryc. 47. Zależność napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia fosfatydylochliny  $\gamma$  (c) przy stałym stężeniu chlorku benzalkoniowego lub parabenu M (stężenia podano w tekście).

Profil **zależności  $\gamma$  (c) fosfatydylocholiny w obecności parabenu M (1,8 mg/g)** jest charakterystyczny dla podanego powyżej ogólnego schematu interpretacji. Na początku wykresu, kiedy w układzie praktycznie nie ma cząsteczek fosfatydylocholiny, napięcie powierzchniowe jest charakterystyczne dla parabenu. Wraz ze wzrostem stężenia fosfatydylocholiny w układzie dochodzi do dużego obniżenia napięcia powierzchniowego, większego niż wykryto w dyspersji fosfatydylocholiny niezawierającej środków konserwujących. W końcowym efekcie napięcie powierzchniowe ustala się na poziomie około 31 mN/m. Notowane zmniejszenie napięcia powierzchniowego świadczy o pozostawaniu fosfatydylocholiny w warstwie granicznej. W obecności parabenu M nastąpiło niewielkie przesunięcie cmc mieszaniny fosfatydylocholina - paraben M (tabela 45, str. 135). Porównanie przebiegu krzywych dla mieszanin fosfatydylocholina - paraben M i lecytyna – paraben M wskazuje na większy wpływ parabenu na aktywność powierzchniową fosfatydylocholiny niż lecytyny, chociaż w obecności parabenu notowano większą zmianę cmc lecytyny.

W obecności **chlorku benzalkoniowego (0,2 mg/g)** w obszarze I profilu **zależności  $\gamma$  (c) fosfatydylocholiny** obserwuje się niewielki wzrost napięcia powierzchniowego wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu. W obszarze II występuje niewielkie maksimum związane z obecnością cząsteczek chlorku benzalkoniowego na powierzchni międzyfazowej ciecz/powietrze. Odmienność omawianego profilu zależności sugeruje o występowaniu innego typu interakcji pomiędzy chlorkiem benzalkoniowym i fosfatydylocholiną a mieszaniną fosfolipidów.

## **V. OMÓWIENIE WYNIKÓW**

W ostatnich latach wprowadzono do lecznictwa nowe postacie leku o charakterze submikronowych układów dyspersyjnych, a kolejne tego typu układy są w fazie zaawansowanych badań i stanowią obiecujące nośniki leków. Wiek XXI to przecież era nanotechnologii. Problem konserwacji tych układów jest aktualny, niezależnie, czy są to postacie leków pozajelitowych, czy podawanych innymi drogami. Ze względu na istnienie złożonych struktur wewnętrznych, różnych faz, rozwiniętą powierzchnię międzyfazową, można przewidywać, że są to układy szczególnie trudne do konserwacji. Niestety nie podjęto do tej pory większych badań tego zagadnienia, kluczowego dla szerszego zastosowania nowoczesnych form leku w praktyce klinicznej.

Uważa się, że konserwowanie emulsji tradycyjnych jest dobrze poznanym zagadnieniem. Trzeba jednak przyznać, że, co prawda stosunkowo dobrze opisano wpływ różnych czynników decydujących o aktywności przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących, trudno jednak jest znaleźć w piśmiennictwie dane liczbowe na temat korelacji stężenia środków konserwujących w preparatach farmaceutycznych i aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Najczęściej dystrybucję środków konserwujących przedstawia się w postaci ogólnych wzorów, uwzględniających współczynnik podziału olej/woda (Wstęp wzory 2-5). Niestety, brakuje powszechnego stosowania tych wzorów, co utrudnia ocenę ich przydatności do przewidywania dystrybucji środków konserwujących w układach złożonych. Najwięcej uwagi poświęca się adsorpcji środków konserwujących w układach zawiesin oraz interakcjom z opakowaniami leków bądź też z substancjami leczniczymi lub pomocniczymi [4, 5, 10, 14, 24-30], jednak brakuje systematyzacji istniejących danych. Większość z prac poświęconych emulsjom pozwala wyciągnąć wnioski tylko o wpływie współczynnika podziału na dystrybucję do fazy wodnej i olejowej. Nieliczne są próby korzystania ze wzorów uwzględniających wpływ większej ilości czynników na dystrybucję [16, 17, 19, 20], a uzyskanych danych, z powodu odmiennych składów badanych układów, często nie można porównywać. Znalaziono tylko dwie prace przedstawiające korelację zawartości środków konserwujących w fazie wodnej z ich skutecznością przeciwdrobnoustrojową, potwierdzoną testem konserwacji. Jedna z nich, dotycząca układów submikronowych, została wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej AMG [21], a druga, dotycząca emulsji tradycyjnych, pochodzi z lat siedemdziesiątych [108]. Kilka prac na temat dystrybucji środków konserwujących w emulsjach tradycyjnych opublikowano w latach 70-tych. Na przykład Shimamoto i in.

[109] stosując metodę ultrafiltracji oceniali zawartość parabenów M i P w fazie wodnej emulsji tradycyjnej, zawierającej 30% fazy olejowej. W fazie wodnej wykryli 32% parabenu M oraz 6,7% parabenu P w stosunku do całkowitej ilości. W celu oznaczenia stężenia środków konserwujących w fazie wodnej emulsji, stosowano także metodę trójkomorowej dializy [110] oraz modele matematyczne (m.in. pozwalające przewidzieć zawartość chlorokrezolu w fazie wodnej emulsji stabilizowanych cetomakroglem) [111, 112].

Przedmiotem badań niniejszej pracy są nowoczesne, submikronowe układy dyspersyjne, wykorzystywane jako nośniki substancji leczniczych: emulsje submikronowe, dyspersje micelarne, zawiesiny liposfer oraz liposomów. Wszystkie układy, poza liposferami, zawierały lecytynę jako surfaktant, a w celach porównawczych badaniom poddano także układy z innymi surfaktantami.

Konserwowanie submikronowych układów dyspersyjnych jest utrudnione ze względu na stosunkowo małą ich trwałość fizyczną w obecności wielu związków chemicznych. Początkowy etapem badań była ocena stabilności submikronowych układów dyspersyjnych w obecności środków konserwujących o różnej budowie i różnych właściwościach fizykochemicznych. Przez sześć miesięcy prowadzono długoterminowe badania zgodności emulsji submikronowych i zawiesin liposfer ze środkami konserwującymi. Jest to kontynuacja wcześniejszych badań wykonywanych w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej dla 10% emulsji submikronowych [18].

Badania przedstawione w niniejszej pracy rozszerzono o trwałość 20% emulsji submikronowych oraz zawiesin liposfer w obecności środków konserwujących. Dodatkowo badano zgodność Phenonipu<sup>®</sup> - preparatu konserwującego, składającego się z sześciu składników (parabeny: metylowy, propylowy, etylowy, butylowy i izobutylowy rozpuszczone w fenoksyetanolu). Phenonip jest przede wszystkim stosowany w kosmetykach i należy do środków konserwujących o niskiej toksyczności, który w zwykle stosowanych stężeniach (0,25-1,0%) nie wywołuje podrażnień skóry lub oczu [15]. Za stabilne uznano układy, które podczas przechowywania nie uległy zmianom wizualnym, mikroskopowym, w których nie nastąpiła zmiana wartości pH ani wielkości cząstek, a w przypadku zawiesiny liposfer nie notowano zmian lepkości kinematycznej. W tabeli 46 przedstawiono podział środków konserwujących na zgodne i niezgodne z badanymi dyspersyjnymi układami submikronowymi (emulsje submikronowe i liposfery).



Tabela 46. Podział środków konserwujących na zgodne (+) i niezgodne (-) z układami submikronowymi (po 6 miesiącach przechowywania)

Środek konserwujący	Stężenie [%]	Emulsje submikronowe	Nanosfery lipidowe (NLC)
Alkohol benzyłowy	2,0	+	Nie badano
Alkohol $\beta$ -fenyloetyłowy	0,5	+	+
Bronopol	0,1	-	+
Chlorek benzalkoniowy	0,02	+	- (40°C)
Chlorheksydyny glukonian	0,1	+	Nie badano
Chlorokrezol	0,2	+	+
Fenol	0,5	+	Nie badano
m-Krezol	0,1	+	Nie badano
Parabeny M i P	0,18 i 0,02	+	- (40°C)
Phenonip	0,8	- (40°C)	+
Tiomersal	0,02	+	Nie badano

W badaniach wcześniej prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej [18] sporządzano emulsje submikronowe metodą *de novo* i większość z przedstawionych powyżej środków konserwujących uznano za destabilizujące te układy. W obecnych badaniach dodawano środki konserwujące do handlowych emulsji Ivelip. Ponieważ w temperaturze pokojowej wykazano trwałość emulsji w obecności wszystkich wymienionych środków konserwujących (z wyjątkiem bronopolu), można uznać, że ta metoda dodawania środków konserwujących jest korzystniejsza, albo że emulsje handlowe, obecnie znajdujące się w obrocie, są skuteczniej stabilizowane (dodatkiem oleinianu sodu).

Poza bronopolem, problematyczne może być użycie w emulsjach submikronowych Phenonipu, gdyż w temperaturze 40°C po 6 miesiącach, pomimo braku zmian wizualnych, notowano wzrost wielkości cząstek fazy olejowej. Badano również nanosfery lipidowe i w układach z parabenami oraz z chlorkiem benzalkoniowym obserwowano niewielkie żelowanie i aglomerację cząstek lipidowych. W praktyce wyniki tych badań mogą ułatwić wybór odpowiedniego środka konserwującego i jego stężenia dla dyspersyjnego układu submikronowego.

Wytypowane środki konserwujące (parabeny, chlorek benzalkoniowy, Phenonip oraz mieszanina chlorku benzalkoniowego z alkoholem  $\beta$ -fenyloetyłowym) posłużyły badaniom dystrybucji pomiędzy fazy submikronowych układów dyspersyjnych.

W badanej grupie znajdowały się środki konserwujące o charakterze lipofilnym, hydrofilnym oraz amfifilnym. Użyte parabeny różniły się lipofilnością (tabela 6), a w konsekwencji rozpuszczalnością w fazach emulsji (tabela 24). W obecności glicerolu (2,5%), powszechnie stosowanego środka izotonizującego, stwierdzono tylko niewielki wzrost rozpuszczalności obu parabenów (tabela 24). Natomiast obserwowano znaczny wpływ lecytyny jajowej (1,2%) na rozpuszczalność parabenu P, a w większych stężeniach (2,4%) również na rozpuszczalność parabenu M.

Emulsje submikronowe zawierają najczęściej 1,2% lecytyny i 10 lub 20% oleju. Sporządzono także emulsje submikronowe o nietypowym składzie, zawierające 20% oleju sojowego oraz 2,4% lecytyny (E4, N3). W praktyce tego typu układy nie są stosowane, chociaż można by się spodziewać ich większej stabilności. Stwierdzono, że dwukrotne zwiększenie stężenia lecytyny nie powodowało istotnych zmian właściwości fizycznych emulsji (tabela 26, ryc. 12).

Różnice we właściwościach lipofilnych środków konserwujących decydowały o sposobie wprowadzenia ich do badanych układów. Do gotowej emulsji dodawano środki konserwujące *ex tempore*, mieszając do rozpuszczenia. W celu całkowitego rozpuszczenia Phenonipu dodatkowo ogrzewano dyspersje w łaźni wodnej. Alternatywną metodą jest wprowadzanie środków konserwujących na etapie sporządzania emulsji (*de novo*), przed połączeniem faz: w zależności od lipofilności do fazy wodnej wprowadza się chlorek benzalkoniowy, a do fazy olejowej parabeny i alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy. Problemem jednak było uzyskanie metodą *de novo* emulsji z chlorkiem benzalkoniowym. Doświadczalnie stwierdzono, że trwałe emulsje uzyskuje się dodając chlorek benzalkoniowy na etapie homogenizacji wysokociśnieniowej.

Obecność środków konserwujących w badanych układach dyspersyjnych nie powodowała zmian wizualnych. Również wielkości cząstek nie uległa zmianie. Jedynie w emulsjach z chlorkiem benzalkoniowym sporządzonych *de novo* (B2, BT) doszło do niewielkiego wzrostu wielkości cząstek, a efekt nasilił się po wyjałowieniu termicznym (tabela 29). Stwierdzono stabilizujący wpływ parabenów na emulsję submikronową (N4), ponieważ zwiększenie całkowitego stężenia parabenów w emulsji powodowało zmniejszenie wielkości cząstek oraz zatrzymanie obniżenia pH emulsji po wyjałowieniu termicznym (tabela 26). Potwierdza to sugestię Pongcharoenkiat i in. [17], że wymienione środki konserwujące mogą modyfikować obszar międzyfazowy.

Badając właściwości emulsji ze środkami konserwującymi stwierdzono wpływ rodzaju emulgatora na wielkość kropli olejowych w emulsji (tabela 31, ryc. 24). W

emulsjach submikronowych z lecytyną jajową (P1, P2\*) i poloksamerem (P6P), wielkość cząstek nie uległa zmianie (mediana 310 nm). Natomiast w emulsjach submikronowych z polisorbatem (P4T) i lecytyną sojową (P3S) notowano większe cząstki fazy olejowej (mediana 480 nm), przy czym w emulsji z polisorbatem (P5T) zwiększenie stężenia oleju powodowało ponad dwukrotny wzrost wielkości cząstek (tabela 31). W emulsjach tradycyjnych (nie homogenizowanych), wykonanych z użyciem polisorbatu (tPT) lub poloksameru (tPP), średnia wielkość kropli fazy olejowej wynosiła około 6  $\mu\text{m}$ , natomiast z użyciem pseudoemulgatorów (metylocelulozy i Carbopolu) otrzymano emulsje o dużo większej wielkości cząstek (mediana około 66  $\mu\text{m}$ ) (tabela 31).

Wprowadzając do emulsji Ivelip mieszaninę chlorku benzalkoniowego z alkoholem  $\beta$ -fenyloetylowym i EDTA (emulsja BF) nie udało się utrzymać po procesie wyjaławiania termicznego rozmiarów submikronowych (tabela 36). Mimo to emulsja BF w krótkoterminowych badaniach była stabilna.

Po wprowadzeniu środków konserwujących emulsje miały odczyn poniżej 7, tymczasem największą trwałość wykazują emulsje submikronowe o pH 7-8 [31, 36, 37]. Biorąc pod uwagę, że podczas wyjaławiania termicznego, z powodu częściowej hydrolizy lipidów, dochodzi do dalszego obniżenia pH emulsji [39], wyjaławiano układy po wcześniejszej korekcie pH do alkalicznego (około 8,0). W emulsjach submikronowych po wyjałowieniu pH wynosiło około 7,5 (tabele 26, 29, 31). Największe obniżenie pH (do wartości około 7,2) notowano w emulsjach z chlorkiem benzalkoniowym (tabela 29).

Spadek pH w dużym stopniu został zatrzymany w emulsjach z parabenami, a w emulsji N4, zawierającej największe stężenie parabenów M i P, nie obserwowano zmiany pH (tabela 26). Hamowanie redukcji pH może następować w wyniku dysocjacji parabenów i produktów ich hydrolizy [17].

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy potencjałem zeta i wartością pH. Potencjał zeta emulsji submikronowych zwykle mieści się w zakresie -40 do -60 mV [31, 37, 38] i potwierdza to analiza wykonanych układów. Jedynie emulsja N4 charakteryzowała się mniejszą wartością ujemnego ładunku, mierzonego na powierzchni kropli olejowych (-49,9 mV), w porównaniu z emulsjami zawierającymi mniejsze stężenia parabenów (N1, N2, N3). W emulsjach z chlorkiem benzalkoniowym notowano znaczne zmniejszenie ujemnej wartości potencjału zeta, a w emulsji B3\* nastąpiła nawet inwersja ładunku emulsji na dodatni (+20,9 mV) (tabela 27).

Lecytyna jest zbyt słabym emulgatorem dla emulsji tradycyjnych i jej użycie prowadzi do rozdziału faz w tego typu układach. Z tego powodu emulsje tradycyjne sporządzano z użyciem polisorbata, poloksameru lub pseudoemulgatorów. Wprowadzenie środków konserwujących do emulsji tradycyjnych nie powodowało zauważalnych zmian wizualnych. Jednak emulsje tradycyjne, ze względu na większą wielkość kropli olejowych, były trwałe po sporządzeniu tylko przez około jeden miesiąc. Porównując emulsje z chlorkiem benzalkoniowym: submikronową (BT) i tradycyjną (tBT) (tabela 29, ryc. 18), stwierdzono mniejszą trwałość emulsji tBT (mediana wielkości cząstek 4,6  $\mu\text{m}$ ), w której po jednym miesiącu dochodziło do rozdziału faz. Podobne zmiany notowano porównując emulsje z Phenonipem stabilizowane polisorbatem lub poloksamerem (odpowiednio P4T i tPT oraz P6P i tPP; tabela 31, ryc. 25). Pseudoemulgatory (karbomer, metyloceluloza) stabilizują emulsje głównie w wyniku zwiększania lepkości. Sporządzono tego typu emulsje z Phenonipem (tPC, tPM) i pomimo dużej wielkości cząstek olejowych (mediana około 66  $\mu\text{m}$ ) w krótkoterminowych badaniach nie obserwowano niezgodności. W niniejszej pracy wykazano, że najmniejszą trwałością fizykochemiczną w obecności środków konserwujących charakteryzują się emulsje z polisorbatem i poloksamerem, nie poddawane homogenizacji (tradycyjne).

Zgodnie z założeniami w pracy badano także wodne dyspersje lecytyny (WLD). Submikronową wielkość cząstek WLD uzyskiwano stosując homogenizację wysokociśnieniową lub ultradźwięki (Metody p. 3.1). Nie stwierdzono różnic pomiędzy tymi dwiema metodami w zakresie analizowanych parametrów. W WLD bez środka konserwującego oraz z chlorkiem benzalkoniowym, pomimo korekty pH po sporządzeniu, notowano znaczny spadek pH już po 7 dniach przechowywania (tabela 39). Podobnie, jak w emulsjach submikronowych, w obecności parabenów obserwowano efekt stabilizujący WLD (niewielkie zmiany pH), co potwierdziły badania potencjału zeta (tabela 39).

Podstawowym badaniem, prowadzonym w produktach leczniczych, zawierających środki konserwujące jest oznaczanie całkowitego ich stężenia w układzie. Niestety, to badanie nie odzwierciedla aktywności przeciwdrobnoustrojowej, którą należy badać w oddzielnym teście farmakopealnym ochrony przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących (str. 20). Dystrybucja środków konserwujących poza fazę wodną jest podstawową przyczyną braku odpowiedniego stężenia w tej fazie, a w konsekwencji braku aktywności przeciwdrobnoustrojowej [21].

Submikronowe układy dyspersyjne składają się z kilku faz, w których środki konserwujące, w zależności od lipofilności, mogą w większym lub mniejszym stopniu się gromadzić.

Zazwyczaj ocenia się dystrybucję do fazy wodnej, ale ważna jest znajomość także rozmieszczenia środków konserwujących w innych fazach, występujących w układzie: olejowej, międzyfazie oraz fazy liposomalnej. Powszechnie do otrzymania fazy wodnej stosuje się metodę ultrawierowania. Należy jednak zaznaczyć, że w dyspersyjnych układach submikronowych nie można tą metodą oddzielić od fazy wodnej struktur submikronowych tworzonych przez surfaktanty. W tych strukturach mogą lokalizować się środki konserwujące.

Fazę wodną, uzyskiwaną metodą ultrawierowania, nazywano umownie „strukturalną fazą wodną” albo fazą „wodno-liposomalno-micelną” (faza „w-l-m”). Metodą ultrawierowania submikronowych dyspersji uzyskuje się rozdział na trzy podstawowe fazy: olejową, międzyfazę i strukturalną fazę wodną (ryc. 20), a w emulsjach submikronowych stabilizowanych lecytyną dodatkowo uzyskuje się fazę liposomalną (ryc. 14). Faza „w-l-m”, oddzielona od fazy olejowej, międzyfazy i fazy liposomalnej, zawierała struktury submikronowe, takie jak: micelle, nanocząstki oraz małe liposomy. Terminem „faza liposomalna” nazywano fazę gromadzącą się w niewielkiej ilości podczas procesu ultrawierowania przy dnie próbki, w postaci żelującego osadu. Termin „liposomalna” został zastosowany, ponieważ ultrawierowanie jest metodą oddzielania liposomów z zawiesiny oraz z powodu obecności tej fazy tylko w układach stabilizowanych lecytyną. Oznaczanie zawartości środków konserwujących w fazie „w-l-m”, uzyskiwanej metodą ultrawierowania, jak i w fazie wodnej po ultrafiltracji, pozwala na dokładniejszą ocenę lokalizacji środków konserwujących w układach.

Badania rozpuszczalności środków konserwujących w fazie wodnej, niezawierającej fazy strukturalnej, oraz różnice pomiędzy metodami uzyskania fazy wodnej były pomocne w interpretacji dystrybucji środków konserwujących pomiędzy fazy układów dyspersyjnych.

Uzyskana metodą ultrawierowania faza „w-l-m” była klarowna we wszystkich emulsjach, z wyjątkiem emulsji tradycyjnej z Carbopolem. Problemem było pobranie fazy wodnej. Podczas jej pobierania, za pomocą strzykawki z igłą, często dochodziło do zanieczyszczenia międzyfazą, co szczególnie było widoczne w emulsjach tradycyjnych, z powodu mniej sztywnej międzyfazy.

W zawiesinach liposfer, ze względu na dużą koncentrację fazy lipidowej, uzyskiwano niewielką ilość fazy „w-l-m”, która była mętna i żółtawa (ryc. 38). Problemem było pobranie tej fazy w klarownej postaci, co uniemożliwiało analizę w niej zawartości środków konserwujących. W WLD i dyspersjach liposomów, z powodu braku fazy olejowej, a więc i międzyfazy, faza „w-l-m” po ultrawiirowaniu lokalizowała się nad fazą liposomalną, co ułatwiało jej pobieranie. W układach tych faza „w-l-m” była klarowna i bezbarwna (ryc. 32, 41).

W celu oddzielenia od fazy wodnej struktur submikronowych w niej obecnych, fazę „w-l-m” poddawano ultrafiltracji przez sączi ultrafiltracyjne typu Microcon YM-100 (Metody p. 9.4.b). Zastosowane sączi służą do oddzielania związków o masie cząsteczkowej powyżej 100 kDa, a więc, z pewnością pozostawały na nich makrocząsteczki i nanocząstki. Oznacza to, że stosując sączi ultrafiltracyjne uzyskiwano czystą fazę wodną pozbawioną nanocząstek, miceli, małych liposomów czy agregatów cząstek, w których środek konserwujący może ulegać zamykaniu. W ten sposób uzyskiwano frakcję środka konserwującego rozpuszczoną w fazie wodnej (frakcja wolna). Uważa się, że w tej formie środki konserwujące wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

Próbowano uzyskać fazę wodną metodą bezpośredniej ultrafiltracji badanych układów, co się udało w emulsjach submikronowych, WLD oraz dyspersjach liposomów. Natomiast ultrafiltracja zawiesiny liposfer nie pozwalała uzyskać fazy wodnej, nawet mimo wydłużenia czasu ultrafiltracji do 60 minut. Zastosowanie samej ultrafiltracji jest najmniej efektywną metodą otrzymania fazy wodnej ze względu na bardzo niewielkie ilości uzyskiwanego ultrafiltratu (10-20  $\mu$ l). Doświadczalnie stwierdzono, że stężenia środków konserwujących w fazie wodnej uzyskanej metodą ultrafiltracji lub metodą ultrawiirowania w połączeniu z ultrafiltracją są porównywalne. Ostatecznie, w celu uzyskania fazy wodnej zawierającej frakcję wolną środka konserwującego stosowano połączenie metody ultrawiirowania z ultrafiltracją (metoda uf).

Analizę ilościową środków konserwujących w fazie wodnej oraz w fazie „w-l-m” badanych układów prowadzono metodą HPLC. Warunki analizy chromatograficznej dobierano w zależności od rodzaju środka konserwującego (tabela 23). Wykrywane tą metodą stężenia środków konserwujących były znacząco wyższe niż określona czułość metod (około 1 ng/ml).

W wydzielanych fazach (wodnej i „w-l-m”) oznaczano różny udział środków konserwujących w zależności od ich właściwości fizykochemicznych i zawsze zawartość w fazie wodnej, uzyskiwanej metodą ultrafiltracji, była mniejsza niż w fazie wydzielonej metodą ultrawierowania. Analiza wyników pozwoliła na ustalenie pewnych poniżej wykazanych zależności. Stwierdzono, że proces wyjąłowania termicznego nie zmienia dystrybucji parabenów do fazy wodnej, dlatego badano tylko dyspersje wyjąłowane.

Istotną częścią badań było określenie dystrybucji parabenów, bardzo popularnych środków konserwujących. Na podstawie tych badań można było obserwować zależność dystrybucji od lipofilności trzech analogów parabenów (metylowego, etylowego i propylowego) różniących się wartością log P (odpowiednio 2,00; 2,49 i 2,98). Różną dystrybucję parabenów M, A i P (odpowiednio 27,8; 15,4 i 5,1%, ryc. 27-29) do fazy wodnej emulsji submikronowej (P1) można skorelować z ich lipofilnością. W fazie wodnej wszystkich emulsji notowano najmniejszą zawartość parabenu P, związku najbardziej lipofilnego, a największą parabenu M (najmniej lipofilnego). Podobną korelację notowano dla wszystkich badanych układów.

Udział parabenu M w fazie wodnej (w formie wolnej) zależał od rodzaju emulgatora, zawartości fazy olejowej, jak również wielkości cząstek fazy olejowej. Zarówno wzrost stężenia fazy olejowej, jak również zawartości emulgatora powodował zmniejszenie dystrybucji, a w konsekwencji stężenia parabenu M w fazie wodnej (ryc. 15). Zastąpienie w emulsjach submikronowych lecytyny jajowej sojową (P3S) lub poloksamerem (P6P), praktycznie nie zmieniało frakcji parabenu M w fazie wodnej (około 28%, ryc. 27). Natomiast w obecności polisorbata (P4T) frakcja ta uległa obniżeniu do 22%.

W przypadku bardziej lipofilnego parabenu etylowego obserwowano mniejszą zawartość w fazie wodnej emulsji submikronowych (około 15%), niezależnie od rodzaju emulgatora (ryc. 28).

Dystrybucja najbardziej lipofilnego parabenu P do fazy wodnej emulsji była około pięciokrotnie mniejsza w porównaniu z parabenem M. W fazie wodnej emulsji submikronowych wykrywano tylko około 5,3% parabenu P, a w emulsjach tradycyjnych około 6,0% tego środka konserwującego (ryc. 29). Podobnie, jak dla parabenu M, wraz ze wzrostem stężenia fazy olejowej w emulsjach notowano mniejszą zawartość parabenów A i P w formie wolnej (faza wodna).

W porównaniu z emulsjami submikronowymi w emulsjach tradycyjnych, z powodu zmniejszonej powierzchni międzyfazowej, frakcja parabenów w fazie wodnej była większa, a w fazie olejowej i międzyfazie mniejsza. W emulsjach tradycyjnych ze wzrostem lipofilności parabenów notowano zwiększony ich udział w międzyfazie. W emulsji z polisorabtem (tPT) parabeny praktycznie nie ulegały dystrybucji do międzyfazy, a gromadziły się przede wszystkim w fazie „w-l-m”. Fenoksyetanol był wykrywany w emulsjach tradycyjnych, przede wszystkim w fazie wodnej, natomiast chlorek benzalkoniowy - głównie w fazie „w-l-m”.

Stwierdzono, że obecność fenoksyetanolu nie wpływa na stężenie parabenów w fazie wodnej emulsji submikronowych (porównanie emulsji N1 i P1), ponieważ ich dystrybucja w emulsjach konserwowanych mieszaniną parabenów M i P była porównywalna z określoną dla emulsji konserwowanych Phenonipem.

Składnikiem Phenonipu, którego dystrybucję również badano był fenoksyetanol. Fenoksyetanol charakteryzuje się mniejszą lipofilnością ( $\log P$  1,0) niż paraben M ( $\log P$  2,0). Zgodnie z przewidywaniem, w porównaniu z parabenem M, w fazie wodnej emulsji wykryto dużo więcej tego środka konserwującego (43-87%). Zwiększenie stężenia oleju w emulsjach (P2\*, P5T) powodowało zmniejszenie frakcji fenoksyetanolu w fazie wodnej (ryc. 26). W emulsjach submikronowych z lecytyną jajową, sojową i poloksamerem nie notowano różnic istotnych statystycznie w dystrybucji fenoksyetanolu do fazy wodnej, niezależnie od rodzaju emulgatora (około 59%). Podobnie, jak w przypadku parabenów, obserwowano wpływ na ten parametr wielkości cząstek fazy olejowej. Wielkość kropli olejowych nie miała znaczenia w emulsjach z polisorbatem - zarówno w emulsji submikronowej (P4T), jak i tradycyjnej (tPT) około 50% fenoksyetanolu znajdowało się w fazie wodnej. W pozostałych emulsjach tradycyjnych w fazie wodnej wykrywano więcej fenoksyetanolu, przy czym w emulsji tradycyjnej z karbomerem (tPC) prawie cała ilość (86%) fenoksyetanolu była zlokalizowana w fazie wodnej (ryc. 26).

Kolejnym badanym środkiem konserwującym był chlorek benzalkoniowy, należący do czwartorzędowych związków amoniowych. Charakteryzuje się on, odmiennie niż inne środki konserwujące właściwościami, ponieważ jest związkiem amfifilnym, a więc surfaktantem. W emulsjach submikronowych stabilizowanych lecytyną (B1\*, B2, B3\*) wykrywano w fazie wodnej zaledwie 0,2-2,4% tego środka konserwującego (ryc. 21). Na zawartość chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej ma wpływ początkowe jego stężenie w badanym układzie oraz rodzaj użytego emulgatora.



Zauważono, że wraz ze wzrostem całkowitego stężenia chlorku benzalkoniowego w emulsjach maleje jego udział w fazie wodnej. Bezwzględne wartości stężenia w formie wolnej są zbliżone (około 0,5 µg/ml), pomimo wzrostu całkowitego stężenia. Praktycznie stałe stężenie chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej prawdopodobnie jest związane z wartością krytycznego stężenia micelnego (cmc), charakteryzującego układ (tabela 45, ryc. 45). Byłoby ono niższe niż w roztworze chlorku benzalkoniowego (0,17%).

W przypadku zastosowania, zamiast lecytyny, polisorbatu w fazie wodnej znajdowano aż 8% chlorku benzalkoniowego, więc znacznie więcej niż w układach z lecytiną, przy czym nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy emulsją submikronową (BT) i tradycyjną (tBT) stabilizowanymi polisorbatem. Oznacza to, że chlorek benzalkoniowy w większym stopniu jest zamykany w strukturach submikronowych, pozostających na sączku ultrafiltracyjnym, tworzonych z udziałem lecytyny niż z udziałem polisorbatu.

Istniało podejrzenie, że w czasie ultrafiltracji usuwane są micelle chlorku benzalkoniowego. Stwierdzono jednak, że chlorek benzalkoniowy użyty w stężeniu zbliżonym do wykrywanego w fazie „w-l-m” nie tworzy struktur, które pozostawałyby na sączku ultrafiltracyjnym, a micelle tworzone przez ten środek konserwujący, w roztworze o stężeniu 0,25% (powyżej cmc), przechodzą przez sączek. Oznacza to, że najprawdopodobniej dochodzi w układach do interakcji chlorku benzalkoniowego z surfaktantami i tworzenia struktur większych, niż byłyby tworzone z udziałem samego chlorku benzalkoniowego. Podejrzewać można, że pojawia się nowa wartość krytycznego stężenia micelnego mieszaniny (str. 139).

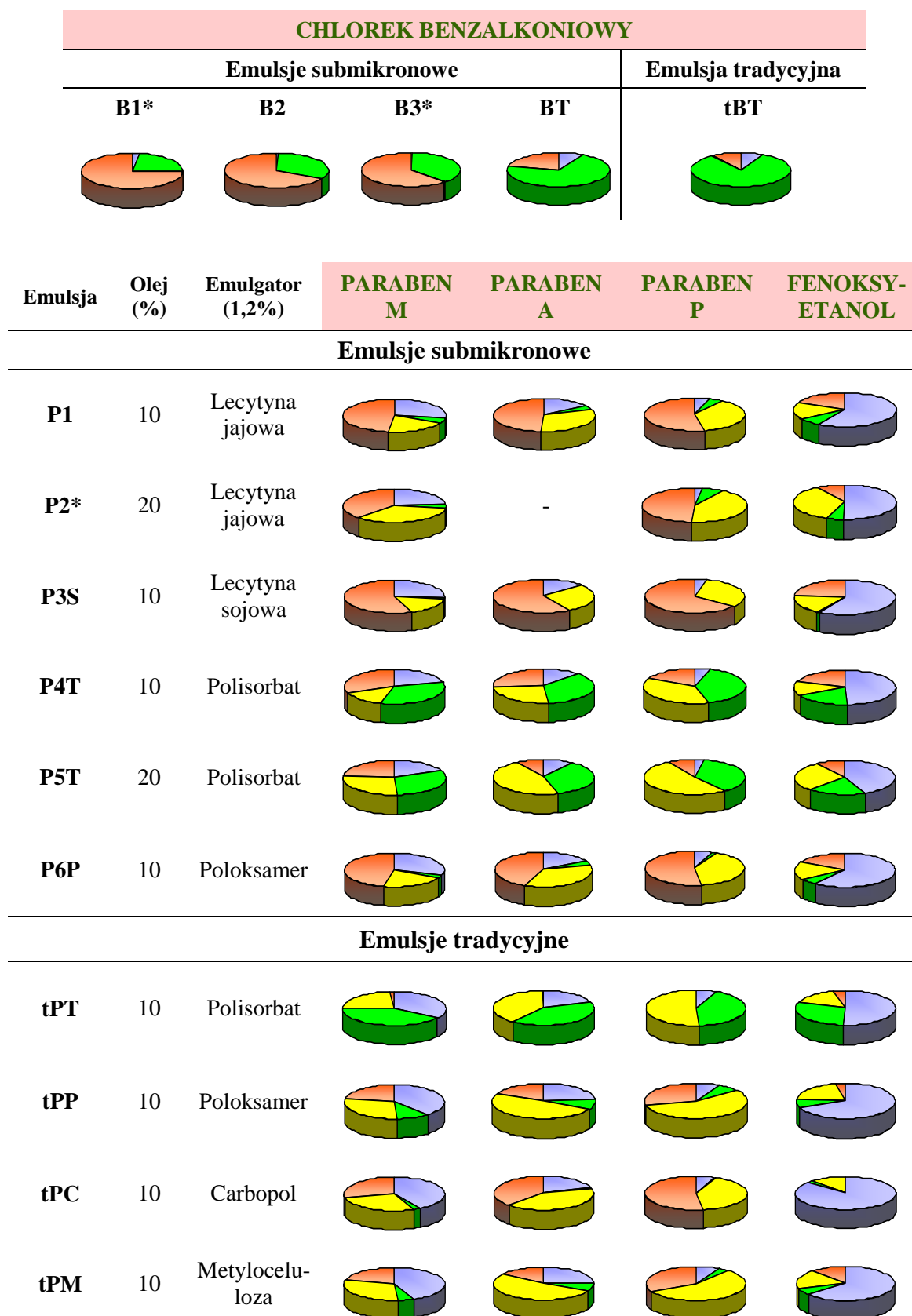
W strukturalnej fazie wodnej („w-l-m”) badanych układów oznaczano większą zawartość środków konserwujących niż w fazie pozbawionej nanostruktur, przy czym różnice te dla większości środków konserwujących były niewielkie (poniżej 10%). Porównanie dwóch metod otrzymywania fazy wodnej pozwalało na oszacowanie frakcji środków konserwujących zlokalizowanej w strukturach submikronowych zawartych w fazie wodnej. Bardzo duże różnice dotyczące zawartości chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej i w fazie „w-l-m” obserwowano dla chlorku benzalkoniowego w emulsjach stabilizowanych lecytiną (ryc. 21) oraz dla składników Phenonipu w emulsjach stabilizowanych polisorbatem (ryc. 26-29). Przykładowo, w strukturach liposomalno-micelarnych fazy wodnej emulsji submikronowych zamknięte było aż 42% chlorku benzalkoniowego (ryc. 21), a tylko 5% parabenu M (ryc. 15).

Wprawdzie można było ocenić zawartość środków konserwujących w strukturalnej fazie wodnej na podstawie różnic pomiędzy metodami ultrawierowania i ultrafiltracji, jednak zastosowanie modelu matematycznego pozwoliło określić dystrybucję środków konserwujących dodatkowo do fazy olejowej i międzyfazy (Metodyka p. 9.7). W ten sposób można było uzyskać dokładniejsze informacje dotyczące lokalizacji środków konserwujących w układach submikronowych. Na ryc. 48 oraz w tabelach 28, 30, 32-36 przedstawiono dystrybucję poszczególnych środków konserwujących pomiędzy wszystkie fazy badanych układów emulsyjnych.

W fazie olejowej emulsji submikronowych stabilizowanych lecytyną jajową (P1), polisorbatem (P4T) oraz poloksamerem (P6P) notowano porównywalną dystrybucję dla każdego z parabenów (tabela 33, 34, 35). Wraz ze wzrostem stężenia fazy olejowej z 10 do 20%, w zależności od lipofilności parabenów, w fazie olejowej, notowano znaczny wzrost ich zawartości, niezależnie od rodzaju emulgatora. Jednak wzrost stężenia parabenu P w fazie olejowej nie był aż tak duży, jak można by się spodziewać na podstawie różnicy lipofilności w szeregu parabenów i rozpuszczalności w oleju sojowym (tabela 24).

Na granicy faz pomiędzy fazą olejową i wodną, gromadzi się surfaktant stabilizujący układ. Można więc, ten obszar traktować jako odmienną fazę tzw. międzyfazę, która charakteryzuje się amfifilnym środowiskiem i zwiększoną lepkością. W zależności od właściwości fizykochemicznych środków konserwujących notowano mniejsze lub większe gromadzenie się w ich międzyfazie. Międzyfaza ma największe znaczenie w dystrybucji parabenów w emulsjach submikronowych stabilizowanych lecytyną i poloksamerem, przy czym wraz ze wzrostem lipofilności parabenów zwiększał się ich udział w międzyfazie. Na uwagę zasługuje największa zawartość parabenów w międzyfazie emulsji z lecytyną sojową (P3S). Natomiast w emulsjach stabilizowanych polisorbatem międzyfaza ma mniejsze znaczenie i ze wzrostem lipofilności parabenów malało ich stężenie w międzyfazie tych układów.

Stwierdzono korelację pomiędzy stężeniem środków konserwujących w międzyfazie oraz w fazie „w-l-m” – wraz ze wzrostem zawartości środka konserwującego w międzyfazie malał jego udział w fazie „w-l-m” i odwrotnie. Niezależnie od lipofilności parabenów, w fazie „w-l-m” emulsji stabilizowanych lecytyną oraz poloksamerem, notowano najmniejszą zawartość parabenów i fenoksyetanolu, a największą w emulsjach z polisorbatem. Świadczy to o tworzeniu typowych miceli za pomocą polisorbatu, z czym jest związana solubilizacja micelarna



Ryc. 48. Dystrybucja środków konserwujących pomiędzy fazy emulsji.

■ faza wodna, ■ faza olejowa, ■ faza „w-l-m”, ■ międzyfaza

środków konserwujących w międzyfazie. Zjawiska tego nie obserwowano w emulsjach stabilizowanych lecytyną.

Uzyskane wartości można porównać z wynikami innych autorów. Pongcharoenkiat i in. [17] stosując model matematyczny uwzględniający wielkość cząstek fazy olejowej, objętość fazy olejowej i całkowitą powierzchnię międzyfazową, stwierdzili, że w emulsji submikronowej (20% fazy olejowej, 1,2% lecytyny jajowej) 56% parabenu M gromadzi się w fazie „w-l-m”. Natomiast Sila-on i in. [20] w fazie „w-l-m” 10% emulsji submikronowej (1,2% lecytyny) wykryli 36% parabenu M, a więc wartość mniejszą, lecz zbliżoną do oznaczonej w niniejszej pracy (emulsja N1). Han i in. [16], stosując taki sam sposób uzyskania fazy wodnej dla emulsji Diprivan (z propofolem), notowali mniejszą frakcję parabenu M w fazie wodnej (24%).

Jak już wspomniano, w porównaniu z parabenami, notowano znacznie większą zawartość mniej lipofilnego ( $\log P$  1,00) **fenoksyetanolu** w fazie wodnej emulsji (tabela 32). Zawartość fenoksyetanolu w fazie olejowej była porównywalna we wszystkich emulsjach (około 17%) i nie obserwowano wpływu, zarówno rodzaju emulgatora, ani wielkości kropli olejowych na tę wartość. O dużym wpływie współczynnika podziału na dystrybucję fenoksyetanolu świadczy fakt, że wzrost stężenia fazy olejowej powodował istotny wzrost frakcji tego środka konserwującego w fazie olejowej (np. w emulsjach z lecytyną jajową z 17 do 37%). W międzyfazie emulsji submikronowych (10%), niezależnie od rodzaju emulgatora, udział fenoksyetanolu był porównywalny i podobny (18%). Jedynie w międzyfazie emulsji z lecytyną sojową, podobnie jak w przypadku parabenów, obserwowano większe gromadzenie się fenoksyetanolu (24%). Podobnie jak dla parabenów, w emulsjach tradycyjnych, z powodu zmniejszonej powierzchni międzyfazowej, notowano mniejszą niż w emulsjach submikronowych dystrybucję fenoksyetanolu do międzyfazy.

**Chlorek benzalkoniowy**, będąc związkami powierzchniowo czynnym ulegał odmiennej dystrybucji nie tylko do fazy wodnej (str. 152-153), ale też do pozostałych faz emulsji. Niezależnie od rodzaju emulsji oraz emulgatora, praktycznie nie wykrywano chlorku benzalkoniowego w fazie olejowej (poniżej 1%) (tabela 30). Jak już wspomniano, w fazie wodnej emulsji stabilizowanych lecytyną również nie oznaczono chlorku benzalkoniowego, a w obecności polisorbata frakcja jego w tej fazie ulega tylko nieznacznemu zwiększeniu. W emulsjach z lecytyną jajową (B1\*, B2, B3\*) największą frakcję chlorku benzalkoniowego notowano w międzyfazie (około 68%), przy czym wraz ze wzrostem całkowitego jego stężenia (z 0,05 do 0,2 mg/g),

następowało zmniejszenie udziału środka konserwującego w tej fazie (odpowiednio z 75 do 62%). W fazie „w-l-m” emulsji z lecytyną wykrywano około 32% chlorku benzalkoniowego. Natomiast w obecności polisorbata w fazie „w-l-m” gromadziło się aż 70% tego środka konserwującego (emulsja BT). Tak więc, również w obecności chlorku benzalkoniowego obserwowano wskazaną wcześniej różnicę pomiędzy lecytyną i polisorbatem polegającą na dystrybucji środka konserwującego do fazy „w-l-m” w obecności polisorbata. Wzrost cząstek fazy olejowej w emulsji tradycyjnej z polisorbatem (emulsja tBT) powodował niewielkie obniżenie stężenia chlorku benzalkoniowego w międzyfazie.

**Alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy** charakteryzujący się zbliżoną do fenoksyetanolu budową chemiczną i lipofilnością ( $\log P$  1,33), ulegał zupełnie odmiennej niż fenoksyetanol dystrybucji w fazach emulsji. Największą zawartość alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego w obecności chlorku benzalkoniowego notowano w międzyfazie emulsji BF (85%), natomiast w fazie wodnej było tylko 12% tego środka konserwującego. Brak korelacji dystrybucji z lipofilnością pomiędzy alkoholem  $\beta$ -fenyloetylowym i fenoksyetanolom prawdopodobnie był spowodowany obecnością chlorku benzalkoniowego w emulsji BF (tabela 37, ryc. 31).

W emulsjach tradycyjnych, niezależnie od rodzaju emulgatora, w fazie olejowej było więcej parabenów i fenoksyetanolu niż w emulsjach submikronowych, przy czym różnice te są szczególnie widoczne dla bardziej lipofilnych środków konserwujących (parabenów A i P). Oznacza to, że oprócz współczynnika podziału olej/woda inne zjawiska odpowiadają za gromadzenie środków konserwujących w fazie olejowej (szczególnie widoczne w układach submikronowych).

Zgodnie z przewidywaniem, przy wzroście wielkości kropli olejowych zmniejsza się dystrybucja do międzyfazy wszystkich środków konserwujących, a w obecności polisorbata (emulsja tPT) nie notowano praktycznie obecności parabenów w międzyfazie. Na uwagę zasługuje porównywalna z emulsjami submikronowymi zawartość parabenu P w międzyfazie emulsji tradycyjnej z karbomerem.

Podsumowując można stwierdzić, że w emulsjach stabilizowanych **lecytyną** parabenowy oraz chlorek benzalkoniowy (niezależnie od ich lipofilności) ulegają dystrybucji głównie do międzyfazy, przy czym widać zdecydowanie większy udział parabenów w międzyfazie emulsji z lecytyną sojową. Dystrybucja środków konserwujących do fazy „w-l-m” jest niewielka lub praktycznie nie występuje. Natomiast odwrotnie jest w emulsjach z **polisorbatem**, w których małe znaczenie w

dystrybucji środków konserwujących ma międzyfazą, natomiast duże znaczenie ma faza „w-l-m”. Dotyczy to również fenoksyetanolu. Dystrybucja środków konserwujących w emulsjach submikronowych stabilizowanych **poloksamerem** jest porównywalna z emulsjami stabilizowanymi lecytyną jajową. W dystrybucji środków konserwujących w emulsjach tradycyjnych z pseudoemulgatorami duże znaczenie ma międzyfaza.

Obliczona dystrybucja parabenu M pomiędzy fazy emulsji submikronowej z lecytyną w obecności parabenu P (emulsja N1) jest odmienna od wyznaczonej przez Han i Washington [16] w emulsji submikronowej Diprivan (z propofolem). W porównaniu z emulsją N1, autorzy uzyskali większą frakcję parabenu M w fazie olejowej i liposomalnej emulsji Diprivan (odpowiednio 42 i 11%), a mniejszą w fazie wodnej i międzyfazie (odpowiednio 24 i 23%). Wyniki przedstawione przez Han i Washington wskazują na większy udział parabenu M w fazie olejowej niż w międzyfazie.

Wodne dyspersje lecytyny w odróżnieniu od emulsji, są układami niezawierającymi fazy olejowej i międzyfazy. Z uwagi na brak fazy olejowej w WLD nie jest obecna międzyfaza (ryc. 32), a cała ilość lecytyny tworzy fazę „w-l-m”. Badania WLD miały na celu poznanie wpływu struktur tworzonych tylko z udziałem lecytyny na dystrybucję środków konserwujących do fazy wodnej. Jak już wspomniano, technologię sporządzania WLD opracowano w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej AMG. Wodne dyspersje lecytyny charakteryzują się bogatą strukturą wewnętrzną, która dokładnie nie jest poznana [51] (Wstęp str. 36).

W wodnych dyspersjach lecytyny stężenie lecytyny wynosiło 1,2-5,0%. Frakcji wolnej parabenów M i P (metoda uf) jest znacznie więcej w dyspersjach lecytyny (np. 49% parabenu M, ryc. 33) niż w emulsjach submikronowych o takim samym stężeniu lecytyny (ryc. 15), przy czym udział środków konserwujących w fazie wodnej maleje ze wzrostem całkowitego stężenia lecytyny (np. dla parabenu M z 49% do 15%). Metodą ultrawierowania WLD można było oddzielić od nanocząstek mikrocząstki, które lokalizowały się po ultrawierowaniu w postaci osadu (agregaty lecytyny). Obliczając różnicę pomiędzy całkowitą zawartością parabenów w WLD, a wykrytą w strukturalnej fazie wodnej stwierdzono, że w mikrocząstkach, niezależnie od stężenia lecytyny, było około 22% parabenu M. Natomiast różną zawartość w zależności od stężenia lecytyny uzyskano dla parabenu P (19-42%). Porównanie ultrawierowania i ultrafiltracji wskazuje na większe zamykanie parabenów w nanocząstkach tworzonych przez lecytynę i dla obu parabenów zaznacza się wpływ lipofilności na ten parametr. Frakcja parabenów

solubilizowana w nanocząstkach rośnie wraz ze wzrostem stężenia lecytyny od 29 do 63% dla parabenu M oraz od 46 do nawet 78% dla parabenu P, co oznacza większe znaczenie solubilizacji dla parabenu P. Już w WLD zawierającej 2,4% lecytyny przeważa efekt solubilizacji w nanocząstkach nad efektem zamykania w agregatach cząstek.

Zawartość chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej WLD (tylko 0,6%) potwierdza tworzenie struktur chlorku benzalkoniowego z lecytiną, na co wskazywały eksperymenty z ultrafiltracji (str. 153) i poniżej opisane wyniki badań napięcia powierzchniowego.

Uzyskane wyniki zawartości środków konserwujących w fazach układów emulsyjnych wskazują, że bardzo duże znaczenie w dystrybucji środków konserwujących ma gromadzenie się ich w międzyfazie lub inkorporowanie w nanostrukturach. Oddziaływania te próbowano potwierdzić pomiarami zmian napięcia powierzchniowego surfaktantów (lecytyny jajowej, polisorbatu 80 oraz fosfatydylocholiny) w obecności środków konserwujących (chlorku benzalkoniowego i parabenu M). Zdecydowanie większą efektywnością powierzchniową charakteryzował się polisorbat 80 niż lecytyna jajowa czy fosfatydylocholina (ryc. 43).

Pomiary napięcia wykazały różnego rodzaju interakcje, przy czym notowano różnice pomiędzy lecytiną i polisorbatem, a także pomiędzy lecytiną i fosfatydylocholiną. Typowe oddziaływania surfaktantów ze środkami konserwującymi, w których cząsteczki środka konserwującego są zastępowane cząsteczkami surfaktantu, notowano dla większości z badanych układów (polisorbat i paraben M, polisorbat i chlorek benzalkoniowy, lecytyna i paraben M, fosfatydylocholina i paraben M). Dla lecytyny i chlorku benzalkoniowego oraz fosfatydylocholiny i chlorku benzalkoniowego obserwowano bardziej złożone interakcje. Przebieg krzywych zależności napięcie powierzchniowe – stężenie surfaktantu wskazuje na większą zdolność tworzenia mieszanych miceli w układzie chlorek benzalkoniowy – polisorbat niż chlorek benzalkoniowy – lecytyna. Taką zależność już obserwowano na podstawie różnic w dystrybucji chlorku benzalkoniowego w obecności lecytyny (gromadzenie się chlorku benzalkoniowego w międzyfazie) i polisorbatu (większy udział chlorku benzalkoniowego w fazie „w-l-m”) (str. 156-157).

Wyraźną zmianę krytycznego stężenia micelnego (cmc) w kierunku mniejszych stężeń stwierdzono dla układów obu środków konserwujących z fosfatydylocholiną oraz dla chlorku benzalkoniowego z polisorbatem (tabela 45).

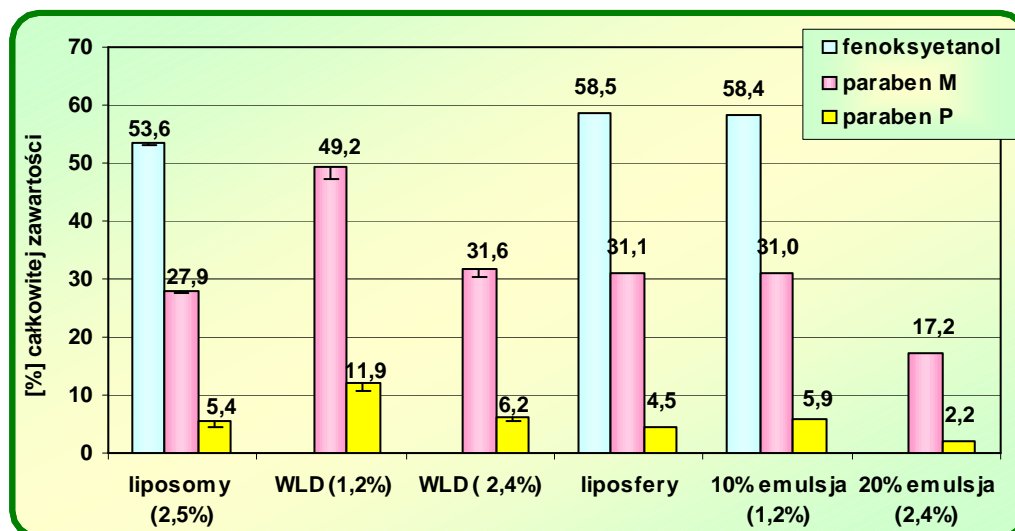
Natomiast w układzie polisorbatu z parabenem praktycznie nie notowano zmiany cmc. Obserwowano odmienny wpływ chlorku benzalkoniowego na profil zależności napięcia powierzchniowego w funkcji stężenia lecytyny - dopiero przy stosunkowo dużych stężeniach lecytyny następował gwałtowny spadek napięcia powierzchniowego (ryc. 45). Na zmianę cmc w kierunku niższych stężeń lecytyny w obecności chlorku benzalkoniowego wskazywały wyniki oznaczenia chlorku benzalkoniowego w fazie wodnej po ultrafiltracji (ryc. 21), lecz przeprowadzone badania napięcia powierzchniowego nie pozwalają stwierdzić, czy na pewno dochodzi do zmiany cmc. Nietypowy przebieg omawianej zależności wymaga dalszych badań.

Interesujący jest fakt odmiennej interakcji pomiędzy środkami konserwującymi i lecytiną jajową lub fosfatydylocholiną (ryc. 45, 47). Różnice pomiarów napięcia powierzchniowego tłumaczyć mogą różną dystrybucję środków konserwujących pomiędzy fazy emulsji stabilizowanych lecytiną jajową lub sojową. Niestety na podstawie przeprowadzonych pomiarów aktywności powierzchniowej badanych układów nie można jednoznacznie wytłumaczyć zjawisk zachodzących na granicy faz w badanych układach submikronowych.

Przedmiotem badań niniejszej pracy były także zawiesiny liposomów. Liposomy są nośnikami substancji leczniczej mającymi zastosowanie w praktyce, ale są liczne trudności związane z ich konserwowaniem. Zawiesiny liposomów charakteryzują się składem podobnym do WLD (2,5% lecytyny, brak fazy olejowej), ale różną strukturą wewnętrzną, wynikającą ze sposobu ich sporządzania. Na podstawie badań dystrybucji środków konserwujących w liposomach oceniano, czy nie dochodzi do zamykania składników Phenonipu w tych strukturach.

Pomimo różnej struktury wewnętrznej badanych układów nie stwierdzono różnic w dystrybucji środków konserwujących do fazy wodnej liposomów i pozostałych submikronowych układów dyspersyjnych zawierających w swoim składzie 2,4% lecytyny jajowej (emulsje submikronowe i WLD), a także zawiesiny liposfer (NLC) stabilizowanej poliglukozydem alkilowym (ryc. 49).





Ryc. 49. Zawartość składników Phenonipu w fazie wodnej submikronowych układów dyspersyjnych otrzymanej metodą ultrafiltracji (w nawiasach podano stężenie lecytyny).

Podobna, do pozostałych układów submikronowych, dystrybucja środków konserwujących do fazy wodnej liposomów, pomimo braku fazy olejowej i międzyfazy, świadczy o bardzo dobrym zamykaniu środków konserwujących w liposomach.

Obecnie bardzo dużo uwagi poświęca się nanocząstkom lipidowym. Stała faza lipidowa może wpływać na odmienny skład międzyfazy, która w tych układach nie ma takiej płynności. Ze względu na obecność innego emulgatora (poliglukozydu alkilowego) nie można bezpośrednio porównywać zawartości środków konserwujących w fazie wodnej z pozostałymi badanymi układami submikronowymi. Stwierdzono, że obecność stałej matrycy lipidowej nie wpływa na dystrybucję badanych środków konserwujących (składników Phenonipu oraz chlorku benzalkoniowego). W fazie wodnej oznaczono podobną zawartość środków konserwujących do notowanej w pozostałych badanych układach submikronowych, pomimo obecności innego rodzaju emulgatora i składu międzyfazy (ryc. 49). Phenonip oraz chlorek benzalkoniowy dodawano do zawiesin liposfer w temperaturze pokojowej oraz podczas ogrzewania (powyżej temperatury topnienia stałego lipidu). Nie stwierdzono wpływu topienia stałego lipidu na zawartość środków konserwujących w fazie wodnej zawiesiny liposfer, która niezależnie od temperatury była porównywalna (ryc. 39, 40). Oznacza to, że nie dochodzi do zamykania środków konserwujących w stałej matrycy lipidowej NLC.

Określenie stężenia środków konserwujących w fazie wodnej jako warunkującego aktywność mikrobiologiczną jest aktualnym problemem, niedostatecznie opisanym w literaturze. W Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej prowadzono równoległe badania dotyczące oceny skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej niektórych, badanych w niniejszej pracy, submikronowych układów dyspersyjnych (emulsji submikronowych, wodnych dyspersji lecytyny oraz zawiesin liposomów). Młynarczyk [113] stwierdziła, że środki konserwujące użyte w badanych (maksymalnych) stężeniach nie zapewniały właściwej ochrony przeciwdrobnoustrojowej układów, gdy zastosowano kryteria według wymagań Ph. Eur. dla leków parenteralnych i ocznych (Kategoria 1). Przy zastosowaniu bardziej łagodnych kryteriów akceptacji zgodnych z USP, jedynie emulsja P2\* (20% Ivelip zawierający 0,8% Phenonip) spełnia wymagania dla leków doustnych. Wynik ten jest zaskakujący, ponieważ emulsja P2\* charakteryzowała się porównywalną do pozostałych układów dystrybucją środków konserwujących.

Dla ocenianych środków konserwujących ich ostateczne stężenia w formie wolnej były, w zależności od środka konserwującego, dwukrotnie (fenoksyetanol) albo nawet dwudziestokrotnie (paraben P) mniejsze niż stężenia całkowite. O ile przy dwukrotnym spadku stężenia można oczekiwać nadal dużej aktywności mikrobiologicznej, co wynika z zakresu stosowanych środków konserwujących (np. parabenu M 0,065-0,25%), to problemem staje się obniżenie stężenia 20 razy. Dlatego wynik słabej aktywności przeciwdrobnoustrojowej może być skutkiem braku wystarczającego stężenia wolnej frakcji. Problem ten jest poważniejszy w układach submikronowych niż w tradycyjnych ze względu na międzyfazę i strukturalną fazę wodną. Natomiast niewątpliwie brak skutecznej ochrony przeciwdrobnoustrojowej submikronowych układów dyspersyjnych może wynikać z obecności lecytyny, która jest neutralizatorem szeregu biocydów, a dodatkowo może otaczać komórki bakterii i grzybów tworząc wokół nich mechaniczną barierę chroniącą przed dostępem tych środków. Wyniki oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej nie mogą być bezpośrednio skorelowane z wynikami zawartości środków konserwujących w fazie wodnej.

## **VI. WNIOSKI**

- W długoterminowych badaniach stwierdzono zgodność badanych środków konserwujących z emulsjami submikronowymi i zawiesiną liposfer. Jedynie w teście przyspieszonego starzenia (40°C) niezgodnymi środkami konserwującymi okazały się: Phenonip (z emulsjami submikronowymi) oraz parabeny i chlorek benzalkoniowy (z liposferami).
- W celu określenia wolnej, aktywnej przeciwdrobnoustrojowo frakcji środków konserwujących konieczne jest oddzielenie fazy wodnej od obecnych w niej nanostruktur tworzonych przez surfaktanty. W tym celu właściwe jest zastosowanie ultrafiltracji po uprzednim ultrawierowaniu układów. Wzory matematyczne pozwoliły na obliczenie dystrybucji środków konserwujących do fazy olejowej, liposomalno-micelarnej i międzyfazy na podstawie oznaczonego stężenia w wydzielonej fazie wodnej zawierającej nanocząstki (po ultrawierowaniu) oraz pozbawionej tych struktur (po ultrafiltracji).
- Badane środki konserwujące różniły się lipofilnością, co wpływało na ich dystrybucję w fazach badanych układów. W emulsji submikronowej (10%) stabilizowanych lecytyną jajową (1,2%) w fazie wodnej (pozbawionej nanocząstek) wykrywano: 58, 28, 15 i 5% odpowiednio: fenoksyetanolu (log P 1,00), parabenu M (log P 2,00), parabenu A (log P 2,45) i parabenu P (log P 2,98). Natomiast w tej fazie oznaczano tylko 12% alkoholu  $\beta$ -fenyloetylowego (log P 1,33). Wraz ze wzrostem zarówno stężenia fazy olejowej, jak i lecytyny notowano zmniejszenie zawartości środków konserwujących w fazie wodnej.
- Chlorek benzalkoniowy, będąc związkiem o charakterze surfaktantu, praktycznie nie ulegał dystrybucji do fazy wodnej emulsji. Wykryto tworzenie mieszanych struktur chlorku benzalkoniowego z surfaktantami.
- W emulsjach submikronowych stabilizowanych lecytyną parabeny i chlorek benzalkoniowy gromadziły się przede wszystkim w międzyfazie, przy czym większe stężenie w tej fazie było przy zastosowaniu lecytyny sojowej niż jajowej. Badania napięcia powierzchniowego wykazały odmienną interakcję środków konserwujących z fosfatydylocholiną niż mieszaniną fosfolipidów lecytyny jajowej, co również wskazuje na zależność dystrybucji od rodzaju lecytyny w układzie.

- W przeciwieństwie do emulsji submikronowych stabilizowanych lecytyną, w emulsjach zawierających polisorbate jako emulgator środki konserwujące znajdowały się w strukturach micelarnych tworzonych przez ten surfaktant, a frakcja obecna w międzyfazie była mniejsza.
- Zwiększenie wielkości kropli olejowych w emulsjach prowadziło do zmniejszenia dystrybucji środków konserwujących do międzyfazy. W emulsjach tradycyjnych sporządzonych z zastosowaniem poloksameru lub pseudoemulgatorów (metyloceluloza i karbomer) mniej lipofilne związki (paraben M i fenoksyetanol) w większym stopniu ulegały dystrybucji do fazy wodnej, a bardziej lipofilne związki (parabeny A i P) do fazy olejowej niż obserwowano w emulsjach submikronowych.
- Zmniejszenie zawartości w fazie wodnej wolnej frakcji środków konserwujących w większym stopniu wynika z oddziaływań z surfaktantem niż procesów podziału olej/woda.
- Na skutek tych oddziaływań w fazach wodnych dyspersji liposomów i WLD, pomimo nieobecności oleju, wykrywano stężenie środków konserwujących podobne do obserwowanego w fazie wodnej emulsji.
- Pomimo braku zamykania środków konserwujących w lipidowej matrycy liposfer (NLC) stężenie formy wolnej, aktywnej przeciwdrobnoustrojowo, było podobne jak w innych badanych układach.
- Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno bogata struktura wewnętrzna układów submikronowych i rozwinięta powierzchnia międzyfazowa, jak również właściwości lecytyny mogą utrudniać konserwowanie tych układów, co zostało potwierdzone w niezależnych badaniach skuteczności środków konserwujących.

## **VII. PIŚMINNICTWO**

1. Meyer B. K., Ni A., Hu B., Shi L.: Antimicrobial preservatives use in parenteral products: past and present. *J. Pharm Sci.*, 2007, 96, 3155-3167
2. Lund W.: *The pharmaceutical codex – principles and practice of pharmaceutics*. The Pharmaceutical Press, Londyn, 1994
3. *Farmakopea Polska VI*. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, 2002
4. Thompson J.E.: *A practical guide to contemporary pharmacy practice*. Williams&Wilkins, Baltimore, 1998
5. Lieberman H.A., Rieger M.M., Banker G.S.: *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*, Vol. 1. Marcel Dekker, New York, 1996
6. Gilbert P., Allison D.: *Presentation of Pharmaceutical Products*, w: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Swarbrick J.(red.), Informa Healthcare, New York, 2007, 2983-2992
7. Kibbe A.: *Handbook of pharmaceutical excipients*. American Pharmaceutical Association, Washington, 2003
8. Aulton M.E.: *Pharmaceutics. The science of dosage form design*. Churchill Livingstone, Toronto, 2002
9. Wade A., Weller P.J.: *Handbook of pharmaceutical excipients*. American Pharmaceutical Association, Washington, 1994
10. Parnowska W.: *Mikrobiologia farmaceutyczna. Problemy produkcji i kontroli leków*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998
11. Russell A.D.: Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990, 3, 99-119
12. Denyer S.P., Stewart G.S.A.: Mechanism of action of disinfectants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 1998, 41, 261-268
13. Russell A.D.: Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants an increasingly important area of investigation. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, 49, 597-599
14. Kabara J.J.: *Cosmetic and drug preservation. Principles and practice*. Marcel Dekker, New York, 1984
15. [www.clartin.com](http://www.clartin.com)
16. Han J., Washington C.: Partition of antimicrobial additives in an intravenous emulsion and their effect on emulsion physical stability. *Int. J. Pharm.*, 2005, 288, 263-271
17. Pongcharoenkiat N., Narsimhan G., Lyons R.T., Hem S.L.: The effect of surface charge and partition coefficient on the chemical stability of solutes in o/w emulsion. *J. Pharm. Sci.*, 2002, 91, 559-570
18. Sznitowska M., Janicki S., Dąbrowska E. A., Gajewska M.: Physicochemical screening of antimicrobial agents as potential preservatives for submicron emulsion. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2002, 15, 489-495
19. Wątróbska-Świetlikowska D., Sznitowska M.: Partitioning of parabens between phases of submicron emulsions stabilized with egg lecithin. *Int. J. Pharm.*, 2006, 312, 174-178
20. Sila-on W., Vardhanabhuti N., Ongipattanakul B., Kulvanich P.: The influence of physicochemical properties of preservative compounds on their distribution into various phases of oil in water submicron emulsion. *J. Pharm. Sci. Technol.*, 2006, 60, 172-181

21. Młynarczyk M., Sznitowska M., Wątróbska-Świetlikowska D.: Antimicrobial activity of parabens in submicron emulsions stabilized with lecithin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2008, 34, 355-362
22. Müller-Goymann C.C.: Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 58, 343-356
23. Stoye I., Schröder K., Müller-Goymann C.: Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles – physicochemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1998, 46, 191-200
24. Rieger M.M., Rhein L.D.: *Surfactants in cosmetics*. Marcel Dekker, New York, 1997
25. Bloomfield S.F.: *Microbial quality assurance in pharmaceuticals, cosmetics and toiletries*. Ellis Horwood, Chichester, 1988
26. Kurup T.R.R., Wan L.S.C., Chan L.W.: Interaction of preservatives with macromolecules. Part II. Cellulose derivatives. *Pharm. Acta Helv.*, 1995, 70, 187-193
27. Remington J.P.: *Remington's pharmaceutical sciences*. Mack, Easton, 1990
28. Sweetman S.C.: *Martindale. The complete drug reference*. Pharmaceutical Press, Londyn, 2005
29. Ansel H.C., Popovich N.G.: *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1990
30. Akers M. J.: Review. Excipient – drug interactions in parenteral formulation. *J. Pharm. Sci.*, 2002, 91, 2283-2300
31. Benita S., Levy M.Y.: Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J. Pharm. Sci.*, 1993, 82, 1069-1079
32. Driscoll D.F.: Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. *Pharm. Res.*, 2006, 23, 1959-1969
33. Pertkiewicz M.: Podstawy żywienia pozajelitowego. *Farm. Pol.*, 1994, 50, 636-645
34. Sznitowska M., Janicki S., Dąbrowska E., Żurowska-Pryczkowska K.: Submicron emulsions as drug carriers: Studies on destabilization potential of various drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001, 12, 175-179
35. Gonyon T., Patel P., Owen H., Dunham A.J., Carter P.W.: Physicochemical stability of lipid injectable emulsions: Correlating changes in large globule distributions with phase separation behavior. *Int. J. Pharm.*, 2007, 343, 208-219
36. Westesen K., Wehler T.: Physicochemical characterization of a model intravenous oil-in-water emulsion. *J. Pharm. Sci.*, 1992, 81, 777-786
37. Floyd A.: Ten top considerations in the development of parenteral emulsions. *PSTT*, 1999, 2, 134-143
38. Roland I., Piel G., Delattre L., Evrard B.: Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *Int. J. Pharm.*, 2003, 263, 85-94
39. Herman C.J., Groves M.J.: The influence of free fatty acid formation on the pH of phospholipid-stabilized triglyceride emulsions. *Pharm. Res.*, 1993, 10, 774-775



40. Bock T.K., Lucks J.S., Kleinebudde P., Müller R.H., Albrecht Ch.: High pressure homogenisation of parenteral fat emulsions – influence of process parameters on emulsion quality. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1994, 40, 157-160
41. Müller R.H., Lucks J.S., Diederichs J.E., Heinemann S.: Lecithin stabilized emulsion for parenteral nutrition, a three-year stability study. 6 Congress International de Technologie Pharmaceutique, Paryż, 1992, 351-387
42. Washington C., Chawla A., Christy N., Davis S.S.: The electrokinetic phase properties of phospholipid-stabilized fat emulsion. *Int. J. Pharm.*, 1989, 54, 191-197
43. Férézou J., Gulik A., Domingo N., Milliat F., Dedieu J.C., Dunel-Erb S., Chevalier C., Bach A.C.: Intralipid 10% - physicochemical characterization. *Nutrition*, 2001, 17, 930-933
44. Burgess J.: Colloids and colloid drug delivery systems, w: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Swarbrick J. (red.), Informa Healthcare, New York, 2007, 636-647
45. Kurup T.R.R., Wan L.S.C., Chan L.W.: Preservative requirements in emulsion. *Pharm. Acta Helv.*, 1992, 62, 204-208
46. Sznitowska M., Dąbrowska E.A., Janicki S.: Solubilizing potential of submicron emulsions and aqueous dispersions of lecithin. *Int. J. Pharm.*, 2002, 246, 203-206
47. Sosada M., Pasker B.: Zastosowanie naturalnych i modyfikowanych chemicznie lecytyn oraz syntetycznych fosfolipidów w farmacji. *Farm. Pol.*, 2003, 59, 492-500
48. Müller B.W.: Suppositorien. *Pharmakologie, biopharmazie und galenik rectal und vaginal anzuwendender Arzneiformen*. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1986
50. Sznitowska M., Klunder M., Płaczek M.: Paclitaxel solubility in aqueous dispersions and mixed micellar solutions of lecithin. *Chem. Pharm. Bull.*, 2008, 56, 70-74
49. Dąbrowska E. A.: Porównanie właściwości wodnych dyspersji lecytyny (WDL) oraz emulsji submikronowych jako nośników substancji leczniczych. Praca doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku, 2003
51. Sznitowska M., Bodnar M., Petruszewicz J., Janik H., Dąbrowska E.: Preliminary in vivo studies of a new lecithin-based formulation of paclitaxel. *J. Microencapsul.*, 2008, (w druku)
52. Mehnert W., Mäder K.: Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Adv. Drug Del. Rev.*, 2001, 47, 165-196
53. Müller R.H., Mäder K., Gohla S.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of state of the art. *Eur. J. Pharm. Biophar.*, 2000, 50, 161-177
54. Radtke M., Müller R.H.: Nanostructured lipid drug carriers. *New drugs. Nanotechnol.*, 48-52, [www.pharmasol.com](http://www.pharmasol.com)
55. Radtke M., Souto E.B., Müller R.H.: Nanostructured lipid carriers: a novel generation of solid lipid drug carriers. *Pharm. Techn. Eur.*, 2005, 17, 45-50
56. Wissing S.A., Kayser O., Müller R.H.: Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, 36, 1257-1272
57. Attama A.A., Müller-Goymann C.C.: Investigation of surface-modified solid lipid nanocontainers formulated with a heterolipid-templated homolipid. *Int. J. Pharm.*, 2007, 334, 179-189

58. Jores K., Mehnert W., Drechsler M., Bunjes H., Johann C., Mäder K.: Investigation on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J. Control. Release*, 2004, 95, 217-227
59. Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A.: Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.*, 242, 2002, 121-124
60. Jennings V., Mäder K., Gohla S.H.: Solid lipid nanoparticles (SLN TM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a <sup>1</sup>H-NMR study. *Int. J. Pharm.*, 2000, 205, 15-21
61. Jores K., Mehnert W., Mäder K.: Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. *Pharm. Res.*, 2003, 20, 1274-1283
62. Pietkiewicz J.: Mikrosfery lipidowe jako nowa postać leku pozajelitowego: opracowanie metody sporządzania i próba inkorporacji substancji leczniczych. Praca doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku, 2006
63. Pietkiewicz J., Sznitowska M., Płaczek M.: The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates. *Int. J. Pharm.*, 2006, 310, 64-71
64. Sharma A., Sharma U.S.: Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.*, 1997, 154, 123-140
65. Kozubek A.: Wstęp do technologii liposomowej. Wrocław, 2004, [www.ibmb.uni.wroc.pl](http://www.ibmb.uni.wroc.pl)
66. Yamabe K., Kato Y., Onishi H., Machida Y.: In vitro characteristics of liposomes and double liposomes prepared using novel glass beads method. *J. Control. Release*, 2003, 90, 71-79
67. Lasic D.D.: Liposomes: from physics to applications. Elsevier, Amsterdam, 1993
68. Patel S. S., Patel N. M., Patel M. R.: Liposome: a versatile platform for targeted delivery of drugs. 2006, [www.pharmainfo.net](http://www.pharmainfo.net)
69. Rote Liste 2002: Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 2008
70. Gregoriadis G.: Liposome Technology, Vol. I. Liposome preparation and related techniques. Informa Healthcare, New York, 2007
71. Soni M. G., Taylor S. L., Greenberg N. A., Burdock G. A.: Evaluation of health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.*, 2002, 40, 1335-1373
72. Soni M. G., Burdock G. A., Taylor S. L., Greenberg N. A.: Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.*, 2001, 39, 513-532
73. Darwish R.M., Bloomfield S.F.: The effect of co-solvents on the antibacterial activity of paraben preservatives. *Int. J. Pharm.*, 1995, 119, 183-192
74. Darwish R.M., Bloomfield S.F.: Effect of ethanol, propylene glycol and glycerol on the interaction of methyl and propyl p-hydroxybenzoate with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Pharm.*, 1997, 147, 51-60
75. Kurup T.R.R., Wan L.S.C., Chan L.W.: Interaction of preservatives with macromolecules: Part I - Natural hydrocolloids. *Pharm. Acta Helv.*, 1992, 67, 301-307
76. Aggag M., Fawzi M.A., El-Guink N.M., Abdel M.: Effect of Carbopol on the antimicrobial activity of some preservatives in eye drop preparations. *Alex. J. Pharm. Sci.*, 2001, 15, 59-64

77. Loftsson T., Stefansdottir O., Frioriksdottir H., Guomundsson O.: Interactions between preservatives and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1992, 18, 1477-1484
78. Casetta C., Negretti F., Trabattoni C.: Microbiological control of pharmaceutical products containing preservatives: drawbacks of the method of membrane filtration. *Boll. Chim. Farm.*, 1992, 131, 274-283
79. Bin T., McCrosky L., Kulshreshtha K.A., Stanley L.: Adsorption of esters of p-hydroxybenzoic acid by filter membranes: mechanism and effect of formulation and processing parameters. *Pharm. Dev. Technol.*, 2000, 5, 95-104
80. Bahal S.M., Romansky J.M.: Sorption of parabens by flexible tubings. *Pharm. Dev. Technol.*, 2001, 6, 431-440
81. Smolinski S.C.: Handbook of food, drug and cosmetic excipients. CRC Press, Londyn 1992
82. Braven A.L., Davidson P.M., Salminen S.: Food additives. Marcel Dekker, New York, 1990
83. Harvey P.W., Everett D.J.: Significance of the detection of esters of p-hydroksybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.*, 2004, 24, 1-4
84. Darbre P.D., Aljarrah A., Müller W.R., Coklham N.G., Sauer M. J., Pope G.S.: Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.*, 2004, 24, 5-13
85. Barnes A.R.: Compatibility of a commercially available low-density polyethylene eye-drop container with antimicrobial preservatives and potassium ascorbate. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 1995, 20, 341-344
86. Dantas P.E., Uesugui E., Nishiwaki-Dantas M.C., Mimica L.J.: Antibacterial activity of anesthetic solutions and preservatives: An in vitro comparative study. *Cornea*, 2000, 19, 353-354
87. Furrer P., Mayer J.M., Plazonnet B., Gurny R.: Ocular tolerance of preservatives on the murine cornea. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1999, 47, 105-112
88. Noecker R.: Ophthalmic preservatives: considerations for long-term use in patients with dry eye or glaucoma. *Rev. Ophthalmol.*, 2001, 8, 73-79
89. Debbasch C., Rat P., Warnet J.M., Saint J.M., Baudouin C., Pisella P.J.: Evaluation of the toxicity of benzalkonium chloride on the ocular surface. *J. Toxicol. Cutan. & Ocular. Toxicol.*, 2000, 19, 105-115
90. Mencucci R., Scrivanti M., Crisa A., Salvi G.: Cell cultures of human corneal epithelium and ophthalmic preservatives. *Ophthalmologie*, 1996, 10, 13-15
91. Purohit A., Kopferschmitt-Kubler M.C., Moreau C., Popin E., Blaumeiser M., Pauli G.: Quaternary ammonium compounds and occupational asthma. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2000, 73, 423-427
92. Cho J.H., Kwun Y.S., Jang H.S., Kang J.M., Won Y.S., Yoon H.R.: Long-term use of preservatives on rat nasal respiratory mucosa: Effects of benzalkonium chloride and potassium sorbate. *Laryngoscope*, 2000, 110, 312-317
94. Beasley R., Fishwick D., Miles J.F., Hendeles L.: Preservatives in nebulizer solutions: Risks without benefit. *Pharmacotherapy*, 1998, 18, 130-139
95. Asmus M.J., Sherman J., Hendeles L.: Bronchoconstrictor additives in bronchodilator solutions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, 104, 53-60
93. Graf P.: Benzalkonium chloride as a preservative in nasal solutions: re-examining the data. *Respir. Med.*, 2001, 95, 728-733

96. Coquelet C., Lakhchaf N., Pages B., Persin M., Rao L.S., Sarrazin J., Tarrago G.: Association between benzalkonium chloride and a poly(acrylic acid) gel. Study by microfiltration and membrane dialysis. *J. Membr. Sci.*, 1996, 120, 287-293
97. Sasaki H., Nagano T., Yamamura K., Nishida K., Nakamura J.: Ophthalmic preservatives as absorption promoters for ocular drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1995, 47, 703-707
98. Sasaki H., Tei C., Nishida K., Nakamura J.: Effect of preservatives on serum concentration and local irritation of ocularly applied insulin. *Biol. Pharm. Bull.*, 1995, 18, 169-171
99. Sasaki H., Tei C., Yamamura K., Nishida K., Nakamura J.: Effect of preservatives on systemic delivery of insulin instillation in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1994, 46, 871-875
100. Shokri J., Nokhodchi A., Dashbolaghi A., Hassan-Zadeh D., Ghafourian T., Barzegar Jalali M.: The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *Int. J. Pharm.*, 2001, 228, 99-107
101. Nokhodchi A., Shokri J., Dashbolaghi A., Hassan-Zadeh D., Ghafourian T., Barzegar Jalali M.: The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. *Int. J. Pharm.*, 2003, 250, 359-369
102. Gupta M., Majumdar D.K.: Effect of concentration, pH, and preservative on in vitro transcorneal permeation of ibuprofen and flurbiprofen from non-buffered aqueous drops. *Indian. J. Exp. Biol.*, 1997, 35, 844-849
103. Dutkiewicz E.T.: *Fizykochemia powierzchni*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1998
104. Adamson A.W.: *Chemia fizyczna powierzchni*. PWN, Warszawa 1963
105. Turro N.J., Kuo P.L., Somasundaran P., Wong K.: Surface and bulk interactions of ionic and nonionic surfactants. *J. Phys. Chem.*, 1986, 90, 288-291
106. Filipović-Vinceković N., Bujan M., Dragčević D., Nekić N.: Phase behavior in mixtures of cationic and anionic surfactants in aqueous solutions. *Colloid Polym. Sci.*, 1995, 273, 182-188
107. Lindman B., Wennerström H.: *Micelles*. Topics in current chemistry, Vol. 87. Springer-Verlag, Berlin, 1980
108. Shimamoto T., Ogawa Y., Ohkura N.: Ultrafiltration method for measuring free preservatives in aqueous phase of oil-in-water emulsion. *Chem. Pharm. Bull.*, 1973, 21, 316-322
109. Shimamoto T., Mima H.: A model for the evaluation and prediction of preservative activity in oil-in-water emulsions. *Chem. Pharm. Bull.*, 1979, 27, 2743-2750
110. Kazmi S.J.A., Mitchell A.G.: Dialysis method for determining preservative distribution in emulsions. *J. Pharm. Sci.*, 1971, 60, 1422-1424
111. Kazmi S.J.A., Mitchell A.G.: Preservation of solubilized and emulsified systems I: Correlation of mathematically predicted preservative availability with antimicrobial activity. *J. Pharm. Sci.*, 1978, 67, 1260-1266
112. Kazmi S.J.A., Mitchell A.G.: Preservation of solubilized and emulsified systems II: Theoretical development of capacity and its role in antimicrobial activity of chlorocresol in cetomacrogol-stabilized systems. *J. Pharm. Sci.*, 1978, 67, 1266-1271

113. Młynarczyk M.: Ocena możliwości konserwacji przeciwdrobnoustrojowej emulsji submikronowych stabilizowanych lecytyną. Praca doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku, 2008