

تهیه، بررسی پایداری و جذب پوستی محلول موضعی

مینوکسیدیل - اتینیل استرادیول

* دکتر سیدمنوچهر غروی، دکتر عباس پرداختی، لایلا حقیقت زاده

* دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

خلاصه

در این تحقیق فرمولاسیون هیدروآلکلی حاوی ۲ درصد مینوکسیدیل و ۰/۰۱ درصد اتینیل استرادیول از نظر پایداری و جذب از جدار پوست شکم موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی، عواملی از قبیل شفاف یا رنگی بودن ظرف، حضور یا عدم حضور ماده آنتی اکسیدان و اتینیل استرادیول (در پایداری مینوکسیدیل) و نوع حامل مورد توجه بود. نتایج نشان داد که کینتیک تخریب هر دو ماده درجه یک بوده، از طرفی ماده آنتی اکسیدان و بسته بندی در ظروف شیشه ای قهوه ای (Amber glass) موجب افزایش عمر قفسه ای دو ماده مؤثره در شکل محلول می گردد. به علت سرعت تخریب بالای اتینیل استرادیول در حضور پروپیلن گلیکول و تغییرات نامنظم غلظتی مینوکسیدیل در حضور این کمک حلال، بررسی نهایی پایداری و جذب پوستی در غیاب پروپیلن گلیکول، انجام پذیرفت.

در بررسی جذب پوستی، مشخص شد که کینتیک جذب پوستی مینوکسیدیل درجه صفر بوده و جذب پوستی اتینیل استرادیول از مدل هیگچی پیروی می نماید. جذب نسبتاً کامل اتینیل استرادیول احتمالاً به دلیل قطبیت پایین این ماده می باشد. کلمات کلیدی: مینوکسیدیل، اتینیل استرادیول، پایداری، جذب (نفوذ) پوستی، آلپوسی آندروژنیک

مقدمه

ضدآندروژن نظیر سیپروترون استات، ترکیبات متسع کننده عروقی مانند مینوکسیدیل (۲) و مهارکننده های ۵-آلفا هیدروکورتاز مثل فیناستراید مورد استفاده قرار گرفته اند (۹). استفاده توأم از ترکیبات دارویی نظیر سیپروترون استات و اتینیل استرادیول خوراکی (۹)، مخلوط سیکلوسپورین، مینوکسیدیل و استرادیول (۱۰) و استروژن ها و مینوکسیدیل (۵) نیز به شکل موضعی یا سیستمیک رایج می باشد. در فرمولاسیونهای موضعی هر کدام از این مواد مؤثره دو عامل اساسی پایداری و جذب مناسب پوستی باید مد نظر قرار گیرد. با توجه به حساسیت نور و اکسیژن مینوکسیدیل (۴) و نیز حساسیت اتینیل استرادیول به نور (۱۳) توجه به تدابیری که سرعت واکنشهای فتواکسیداسیون را کاهش دهد، الزامی به نظر می رسد.

آلپوسی آندروژنیک عارضه ای است که دو عامل هورمونی (آندروژن) و ژنتیک در بروز آن مؤثر است. نحوه توارث آن پلی ژنیک و یا اتوزوم غالب با میزان نفوذ بسیار متغیر می باشد (۱۴). این نوع آلپوسی در هر دو جنس دیده می شود، لیکن تابلوی بالینی آن در زنان و مردان متفاوت است.

آلپوسی آندروژنیک شایع ترین علت ریزش مو در مردان بوده و از دوران بلوغ شروع شده و به تدریج افزایش می یابد (۸). ریزش مو در اکثر موارد در ناحیه جلوی سر و یا مرکز رخ می دهد. در خانم ها بیشتر قسمت میانی مرکز سر گرفتار ریزش مو شده و ممکن است فقط کمی خط رویش نساجیه پیشانی عقب نشینی نماید (۷).

در درمان این نوع آلپوسی ترکیبات مختلف نظیر استروژن ها به صورت موضعی و خوراکی، ترکیبات

شد که حذف پروپیلن گلايکول موجب کاهش چشمگیر سرعت تخریب اتینیل استرادیول و ایجاد نظم در روند کاهش غلظت مینوکسیدیل می گردد (۲).

برخی از آزمونهای انجام شده در بررسی نوسانات غلظت مینوکسیدیل عبارتند از:

تغییر ظرف نگهداری نمونه ها به منظور اطمینان از عدم تبخیر حلال در آن، بررسی احتمال تشکیل محصول تخریب و ایجاد اختلال در روش TLC (سیستم TA با ماده مرجع دیازپام $R_f=75$)، بررسی تغییرات غلظت مینوکسیدیل در حضور و عدم حضور اتینیل استرادیول و تیوسولفات سدیم، تغییر منبع تهیه اتانول و مینوکسیدیل و بالاخره تغییر روش نمونه برداری با استفاده از سرنگ هامیلتون، نمونه گیر با حجم ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و پیت ۰/۱ میلی لیتر.

در بررسی نهائی، پایداری زمانهای نمونه گیری تا هشت هفته تمدید و در هر درجه حرارت ۳ بار آزمایش تکرار شد. برای بررسی جذب پوستی از پوست شکم موش صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۵۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. روش کار بدین ترتیب بود که بلافاصله قبل از آزمایش، موش صحرایی با استنشاق بیش از حد اتر کشته شده و موهای سطح شکم آن بطور کامل تراشیده شد. سپس قطعه ای متناسب با ابعاد دهانه سل دیفوزیون (مدل Franz) جدا گردیده و توسط محلول سرم فیزیولوژی که به منظور جداسازی چربیهای زیرجلدی شسته شد (۱). پوست آماده شده به نحوی بین دو بخش سل دیفوزیون قرار داده شد که سطح اپیدرمی آن به سمت فاز دهنده قرار گرفت. فاز گیرنده شامل اتانل ۵۰ درصد بوده و مطالعه جذب در 1 ± 37 درجه سانتیگراد انجام پذیرفت. پس از قرار دادن یک میلی لیتر از فرآورده حاوی مینوکسیدیل یا اتینیل استرادیول به تنهایی و فرآورده حاوی هر دو ماده مؤثره در بخش دهنده، میزان عبور مواد مؤثره در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه تا ۳ ساعت تعیین گردید. بررسی جذب پوستی برای هر فرمولاسیون ۳ بار تکرار شد.

چون فرآورده موضعی دارای مینوکسیدیل و ترکیب استروژنی در بازار دارویی ایران عرضه نمی شود، بنابراین در این تحقیق پایداری فرمولاسیونهای هیدروالکلی حاوی مینوکسیدیل و اتینیل استرادیول و نیز جذب آنها از خلال پوست شکم موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

مواد

مینوکسیدیل، اتینیل استرادیول، پروپیلن گلايکول، اتانل، سدیم تیوسولفات، اسید کلریدریک، هیدروکسید سدیم، کلروفرم استون از کارخانه Merck آلمان تهیه شدند.

روش کار

محلول ۲ درصد مینوکسیدیل و ۰/۰۱ درصد وزنی حجمی از اتینیل استرادیول با حل نمودن مواد مؤثره در اتانل، افزودن پروپیلن گلايکول به میزان ۲۰ درصد و به حجم رساندن با آب دوبار تقطیر، تهیه شد. حجم نهایی اتانل در ۱۰۰ میلی لیتر سیستم حلال، ۵۰ میلی لیتر بوده و در فرمولاسیونهای حاوی ماده آنتی اکسیدان از تیوسولفات سدیم ۰/۱ درصد استفاده شد. فرمولاسیونهای مذکور در دو نوع ظرف شیشه ای شفاف و کهربایی که به خوبی درب آنها بسته می شد، در چهار درجه حرارت ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و در زمانهای ۰، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت و یک هفته نمونه برداری از فرمولاسیونها انجام پذیرفت. پس از رقیق سازی مناسب نمونه ها، میزان ماده مؤثره با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۲۹ نانومتر برای مینوکسیدیل و ۲۷۹ نانومتر برای اتینیل استرادیول تعیین مقدار شد.

با توجه به تغییرات نامنظم غلظتی مینوکسیدیل و سرعت بالای تخریب اتینیل استرادیول، آزمونهای متعددی برای آگاهی از علت این تغییرات انجام پذیرفت و نهایتاً مشخص

نتایج

تخریب مینوکسیدیل و اتینیل استرادیول در تمامی فرمولاسیونها، ظروف نگهداری و درجه حرارت‌های مختلف از کیتیک درجه یک پیروی می نمود. اشکال ۱ تا ۴ چند نمونه از نمودارهای حاصل از بررسی پایداری دو ماده را نشان می دهد. در هر درجه حرارت، ثنابت سرعت تخریب دارو از شیب خط حاصله به دست آمده و سپس با استفاده از رابطه آرنیوس،

$$\log K = \log A - \frac{Ea}{2.303R} \times \frac{1}{T}$$

انرژی فعال سازی ثابت سرعت تخریب دو ماده مؤثره در ۲۵ درجه سانتیگراد و عمر قفسه ای (t₉₀) فرمولاسیونها از رابطه

$$t_{90} = \frac{0.105}{k_{25}}$$

محاسبه گردید (جدول ۱). با توجه به کثرت عوامل مورد بررسی در پایداری، از آزمون ANOVA دو طرفه برنامه MS Excell 2000 برای مقایسه آماری نتایج استفاده شد.

در بخش بررسی جذب پوستی، مقدار ماده مؤثره عبور کرده در برابر زمان، جذر زمان و لگاریتم مقدار داروی باقیمانده در فاز دهنده در برابر زمان برای مینوکسیدیل و اتینیل استرادیول ترسیم گردید، که نمونه ای از نمودارهای حاصله در اشکال ۵ و ۶ ارائه شده است. سپس با استفاده از معادلات مربوط به نمودارها، پارامترهای کیتیک جذب دو ماده از خلال پوست شکم موش صحرائی محاسبه گردید که نتایج حاصله در جدول ۲ درج شده است.

جدول ۱. ثابت سرعت تخریب (k_{25°C}) ثابت سرعت تخریب در درجه حرارت اتاق، t₉₀ عمر قفسه ای، انرژی فعال سازی (Ea) برای فرمولاسیونهای مورد مطالعه

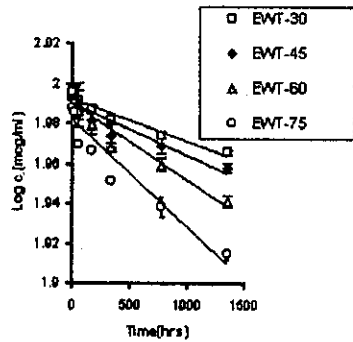
	K ₂₅ (h ⁻¹)	Ea(Cal/mole), ± SD	t ₉₀ (days), ± SD
MW	۰/۰۰۰۲۳	۹۱۲۹ ± ۸۳/۲	۱۹ ± ۶
MA	۰/۰۰۰۱۵۳	۱۱۸۲۰/۸۸ ± ۴۴۶/۱۳	۲۸/۶ ± ۹/۲
MWT	۰/۰۰۰۱۹۳	۹۲۳۵/۸۶۴ ± ۱۲۳/۴۸	۲۲/۶ ± ۱۱/۳
MAT	۰/۰۰۰۱۱۵	۱۱۹۴۶/۳۳ ± ۳۸۷/۷۷	۳۸/۰ ± ۱۳/۱
MEW	۰/۰۰۰۲۱۲	۹۶۶۴/۶۴ ± ۲۳۲/۴۵	۲۰/۶۳ ± ۸/۳
MEA	۰/۰۰۰۱۸۷	۱۱۰۳۷/۹۲ ± ۵۶۳/۳۹	۲۳/۴ ± ۱۴/۲
MEWT	۰/۰۰۰۱۶	۱۹۰۱۵ ± ۱۱۸/۸۹	۲۷/۳ ± ۱۰/۵
MEAT	۷/۲۳ × ۱۰ ^{-۵}	۱۰۸۵۸/۰۸ ± ۷۲۳/۲۵	۶۰/۵ ± ۱۸/۳
EW	۶/۲۹ × ۱۰ ^{-۵}	۴۸۶۴/۳۵۲ ± ۲۵۳/۲۰	۶۹/۵ ± ۲/۸
EA	۴/۲۲ × ۱۰ ^{-۵}	۴۲۶۰/۳۱۳ ± ۳۷۳/۹۹	۱۰۳/۶ ± ۱۱/۷
EWT	۶/۲۹ × ۱۰ ^{-۵}	۴۸۶۴/۳۵ ± ۴۱۴/۰۲	۶۹/۵ ± ۲۴/۳
EAT	۱/۷۴۴ × ۱۰ ^{-۵}	۹۶۵۵/۴۸ ± ۳۱۸/۳۰	۳۰۳/۸ ± ۳۶/۹

(M: مینوکسیدیل، E: اتینیل استرادیول، W: شفاف، T: تیوسولفات سدیم، A: قهوه ای)

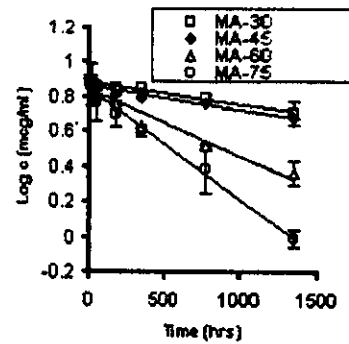
جدول ۲. پارامترهای کیتیک جذب مینوکسیدیل و اتینیل استرادیول از خلال پوست شکم موش صحرائی

	Jss(μg/cm ² /sec)	P(cm/sec)	T _L (sec)
Min.	۴/۲۸ × ۱۰ ^{-۶}	۲/۱۴ × ۱۰ ^{-۶}	۴۱۸
Es.	۵/۴۸ × ۱۰ ^{-۶}	۵/۴۸ × ۱۰ ^{-۶}	*

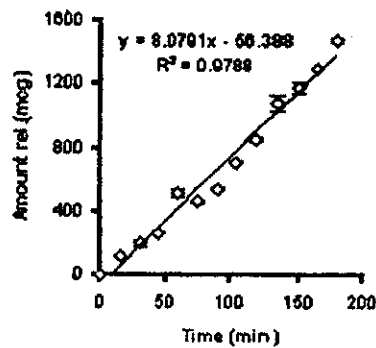
Flux: میزان داروی عبور یافته در واحد زمان از واحد سطح، 2: ضریب نفوذپذیری، 3: زمان تأخیری جذب دارو* : به دلیل منفی شدن T_L، ضریب توزیع (K_m) و (h) برای اتینیل استرادیول محاسبه نشده است، Min: مینوکسیدیل، Es: اتینیل استرادیول



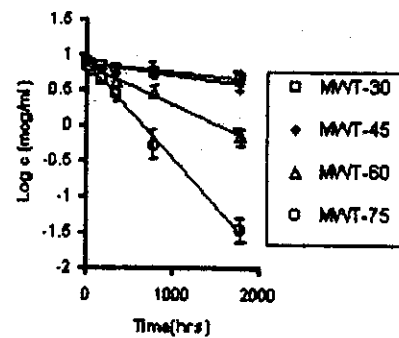
نمودار ۴: نتایج حاصل از بررسی پایداری اتینیل استرادیول (ES) در شیشه شفاف (W) در حضور تیوسولفات (T) در دماهای مختلف (n=۳)



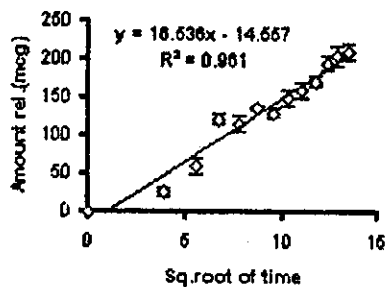
نمودار ۱: نتایج حاصل از بررسی پایداری مینوکسیدیل (M) در شیشه قهوه ای (A) در دماهای مختلف (n=۳)



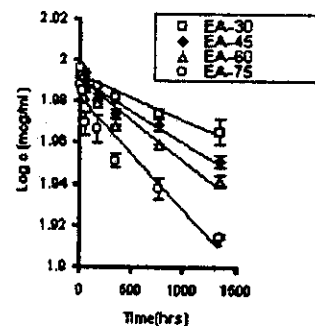
نمودار ۵: مقدار مینوکسیدیل عبور کرده از پوست رت بر حسب زمان (n=۳)



نمودار ۲: نتایج حاصل از بررسی پایداری مینوکسیدیل (M) در شیشه شفاف (W) در حضور تیوسولفات (T) در دماهای مختلف (n=۳)



نمودار ۶: نمودار مقدار اتینیل استرادیول عبور کرده از پوست موش بر حسب جذر زمان (n=۳)



نمودار ۳: نتایج حاصل از بررسی پایداری اتینیل استرادیول (ES) در شیشه قهوه ای (A) در دماهای مختلف (n=۳)

پوستی بالایی از این دارو وجود دارد که در این پژوهش تأیید گردید و مشاهده شد که در طی ۳ ساعت حدود ۹۰ درصد ماده مؤثره موجود در پایه هیدروالکلی از پوست جدا شده رت عبور می نماید.

در مورد جذب پوستی مینوکسیدیل مشخص گردیده که در غلظتهای ۰/۵ تا ۵ درصد این دارو در پایه هیدروالکلی حاوی پروپیلن گلیکول، حداکثر غلظتی حدود ۳ تا ۴ درصد مشاهده می شود (۳). کاهش جذب در غلظتهای بالاتر احتمالاً ناشی از تشکیل سریع کریستالهای مینوکسیدیل در سطح پوست می باشد. حضور پروپیلن گلیکول با ایجاد محلولی اشباع از دارو در سطح پوست تشکیل این کریستالها را در غلظتهای زیر ۴ درصد به میزان زیادی کاهش می دهد (۶). با توجه به اینکه غلظت مورد استفاده مینوکسیدیل در تحقیق حاضر ۲ درصد می باشد، حذف پروپیلن گلیکول احتمالاً موجب تشکیل رسوب نخواهد شد، لیکن تأثیر فزاینده نفوذ پروپیلن گلیکول حذف گردیده و شاید یکی از دلایل کاهش نسبی جذب در فرمولاسیونهای حاضر باشد. جذب درجه صفر مینوکسیدیل در کاربرد بالینی و مطالعات درون تنی (In vivo) فرمولاسیونهای موضعی آن اثبات شده است (۶). در این تحقیق نیز کینتیک جذب درجه صفر در مورد پایه های هیدروالکلی بدست آمد. با توجه به محلول بودن مینوکسیدیل در پایه هیدروالکلی، کینتیک جذب درجه صفر می تواند مؤید این نکته باشد که مرحله محدودکننده جذب پوستی مینوکسیدیل، عبور از سد اصلی اپیدرم یعنی لایه شاخی می باشد.

در پایان بایستی به این نکته اشاره نمود با وجود بهبود نسبی و پایداری مینوکسیدیل در حضور ماده آنتی اکسیدان و بسته بندی در شیشه قهوه ای، عملاً قفسه ای حاصله (T₉₀) برای فرمولاسیون موضعی کافی نبوده و مطالعات بیشتری در حال انجام است. که در آینده گزارش می گردد.

نحوه محاسبه پارامترهای کینتیک جذب بدین گونه بود که با رسم مقدار داروی عبور یافته در واحد سطح در برابر زمان (رابطه Fick) و شیب خط حاصله، مقادیر Jss و ضریب نفوذ پذیری (P) بدست آمد. از سوی دیگر هنگامی که در رابطه فیک، مقدار داروی آزاد شده (d_m) صفر در نظر گرفته شود، محل برخورد خط با محور Xها (زمان) برابر با زمان تاخیر در جذب (Lag time, t_l) خواهند بود.

بحث

مینوکسیدیل در برابر نور حساس بوده و تخریب دارو با تغییر رنگ ماده در محلول و شکل خوراکی جامد همراه می باشد (۴). حضور تیوسولفات سدیم مانع تغییر رنگ محلول به زرد تیره و تشکیل رسوب احتمالی محلولهای حاوی مینوکسیدیل گردیده و مشخص شده که در حضور این ماده و در بسته بندی شیشه قهوه ای حداکثر عمر قفسه ای بدست می آید. حضور اتینیل استرادیول، تأثیر چشمگیری بر پایداری مینوکسیدیل در شرایط مختلف نداشته است (P > ۰/۰۱). این نکته به عنوان مثال با مقایسه عمر قفسه ای فرمولاسیون مینوکسیدیل در شیشه شفاف (MW) با همین فرمولاسیون در حضور اتینیل استرادیول (MEW) مشخص می گردد (جدول ۱).

محلولهای اتینیل استرادیول در شیشه قهوه ای حاوی ساده آنتی اکسیدان دارای عمر قفسه ای حدود ۹ ماه می باشد که از نظر آماری تفاوت معنی داری با محلولهای فاقد تیوسولفات سدیم بسته بندی شده در شیشه ای شفاف دارد (P < ۰/۰۵). این نتیجه گیری مؤید حساسیت اتینیل استرادیول به نور می باشد (۱۳).

اتانل قادر به افزایش Flux انواع استرادیول (از جمله اتینیل استرادیول) از مسیر لیپوفیلیک لایه شاخی می باشد (۱۱). از جهت با توجه به قطبیت کم این ماده دارویی، انتظار جذب

7. Ichard L. and Dvillez, 1994, Androgenic alopecia in the female treatment with 2% topical minoxidil solution, *Arch. Dermatol*, 130: 303-307.
8. Jones G.A. and Rofland M., 1998, Propecia and rogaie extra strenght for alopecia, *Med. Letter Drug. theraput.*, 40: 27.
9. Kenkichi O., 1988, Cosmetic products influencing hair growth, *Cosmet & Toilet.*, 193 (May) : 70-9.
10. Kiesewetter F., 1991; Effect of testosterone and estradiol on growth of human hair outer root sheath keratinocytes in vitro, *Arch. Derm. Res.*, 283(7) : 476-9.
11. Liu P., Kurihara B.T. and Good W.R., 1991, Quantitative evaluation of ethanol effects on diffusion and metabolism of beta-estradiol in hair less mouse skin, *Pharm. Res.*, 8: 865-72.
12. Parrott. Eugene L., *Pharmaceutical technology*, 3rd ed. Burgess Pb. Co, USA; 1971, 375.
13. Strusialk Sh., Hoogerheide J.G. and Gardner M.S., 1982, Determination of ethinyl estradiol in solid dosage forms by HPLC, *J. Pharm. Sci.*, 71: 626-40.
14. Wilma F., Dergfeld M.D. and Cleveland O., 1998, Androgenic alopecia an autosomal dominant disorder, *Am. Med.*, (Suppl. 1A) : 94-8.

References

1. Barber A., 1990, Piroxicam release from dermatological bases: In-vitro studies using cellulose membrane and hairless mouse skin, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 16: 325-40.
2. Brenner S. and Tamir A., 1991, Treatment of androgenetic alopecia with topical minoxidil, 121(9) : 297-302.
3. Chia M. Ch., 1989, Bioavailability assessment of topical delivery system: effect of vehicle evaporation upon in vitro delivery of minoxidil from solution formulations., *Int. J. Pharm.*, 55: 229-36.
4. Chinnian D., 1996, Photostability profiles of minoxidil solution., *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 50 (2) : 94-8.
5. Feldman H.A. and Puschett J.B., 1980, Minoxidil induced hypertrichosis, *Current ther. Res.*, 27 (Feb) : 205-7.
6. Ferry J.J., 1990, Relationship between contact time of applied dose and percutaneous absorption of minoxidil from a topical solution, *J. Pharm Sci.*, 79: 483-86.