Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Spring 2024. Vol 33. Num 1

Research Paper

Preparation and Investigation of Physicochemical Properties and Stability of Azelaic Acid Gel Formulation

Saeed Ghasemi[1], Zahra Sabour[2], Mohammad Moazen[2], *Saeed Manoochehri[2]

1. Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
2. Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Ghasemi S, Sabour Z, Moazen M, Manoochehri S. [Preparation, Investigation of Physicochemical Properties and Stability of Azelaic Acid Gel Formulation (Persian)]. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2024; 33(1):97-108. https://doi.org/10.32598/JGUMS.33.1.495.1

https://doi.org/10.32598/JGUMS.33.1.495.1

Received: 14 Aug 2023
Accepted: 02 Jan 2024
Available Online: 01 Apr 2024

Keywords:
Azelaic acid, Rosacea, Gel, Stability

ABSTRACT

Background Rosacea as a skin inflammatory disease may be triggered by some types of bacteria. Azelaic acid with antibacterial property can be used for treatment of skin conditions such as Rosacea.

Objective In this study, we aim to prepare and evaluate the physicochemical properties and primary stability of 15% azelaic acid gel.

Methods For the gel preparation, first, an aqueous solution containing ethylenediaminetetraacetic and benzoic acids was prepared. Then, a mixture of polysorbate 80 and triglyceride was added to the solution at 50°C. Then, lecithin, propylene glycol, and carbomer 940 P was added to the mixture, and stirred. After that, the gel was prepared. Then, 15 g of dissolved azelaic acid in propylene glycol was added to the gel. Finally, the formulation was homogenized for 15 min.

Results On the day of production, all the formulations had a smooth appearance and the amount of azelaic acid was about 15%. In the preliminary stability study for 3 months, the amount of azelaic acid in the formulation 5 (F5), prepared using homogenizer, was more than 99% of drug content, without any significant difference with other formulations. The released drug from F5 was 30% in the first hour and 50% after 2 hours.

Conclusion All prepared formulations have acceptable pH, viscosity, and drug content. In 3 months, the highest homogeneity of azelaic acid with the lowest standard deviation was seen in the F5 formulation, indicating the importance of using homogenizer in azelaic acid gel preparation. Also, the propylene glycol 18% w/w, in addition to having a co-solvent role, can increase the release of azelaic acid from the gel.

Corresponding Author:
Saeed Manoochehri
Address: Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
Tel: +98 (13) 33486470
E-Mail: manoochehri@gums.ac.ir

Copyright © 2024 The Author(s);
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-By-NC: https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Extended Abstract

Introduction

Acne is a very common inflammatory skin disease, which is also known as pimples. They are usually found on the face, chest, upper back and neck. *Propionibacterium* and *Staphylococcus aureus* are acne-causing bacteria [1]. The occurrence of acne is closely related to many factors, including excessive sebum production, hormone levels, bacterial infection, and inflammatory reactions, among which excessive sebum production is a more important cause [2]. The main activity of mature sebaceous glands is the production and secretion of sebum, which contains a complex mixture of lipids. Sebum composition is different between species, and this difference is probably due to the diverse functions of sebum [3]. Other functions of sebaceous glands, including the secretion of pro-inflammatory sebaceous lipids, various locally produced cytokines, peptides and neuropeptides around the sebaceous glands, are related to the occurrence of acne [2].

Acne rosacea is an inflammatory and chronic skin disease that often affects the cheeks, nose, chin and forehead. Manifestations of this disease include persistent facial erythema, papules, pimples, telangiectasia and frequent flushing [4]. The prevalence of rosacea in light-skinned populations varies between 2 and 22% [5]. Rosacea has episodes of exacerbation and remission and is seen in people aged between 30-50 years. Women are more affected by this disease than men [4].

Topical drugs approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of acne rosacea include topical formulations of sodium acetamide sulfate, metronidazole, and azelaic acid [6]. Azelaic acid is a straight chain dicarboxylic acid with two pKa values of 4.53 and 5.33 and limited solubility in water. Azelaic acid has antimicrobial activity against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. This antimicrobial activity may be due to inhibition of the synthesis of microbial cell proteins. With this mechanism, azelaic acid reduces the bacterial population of *propionibacterium* on the skin and sebaceous follicles. Also, azelaic acid has anti-tyrosinase and anti-mitochondrial activities, and by reducing free radicals, it reduces the activity of melanocytes and their growth in melasma, and stops the local hyperpigmentation of the macula in the skin [7].

Azelaic acid gel formulation has advantages over its cream formulation which include the loading of a lower dose of azelaic acid and longer duration on the skin, which increases the drug release and biological supply. In addition, the gel formulation can penetrate into the skin without damaging the skin or reducing the epidermal water content. Therefore, it is a suitable treatment option for acne rosacea [11]. This study aims to prepare an azelaic acid gel formulation and evaluate its physicochemical properties and perform preliminary stability testing on the formulation.

Methods

Azelaic acid, sodium hydroxide, potassium dihydrogen phosphate, polysorbate, benzoic acid, propylene glycol, ethylenediaminetetraacetic acid and ethanol 96% were purchased from Merck Company, Germany. Moreover, carbomer P940 was purchased from Corel Pharma Chem, India; lecithin from DUKSAN company, South Korea; triglyceride from Nutricia company, the Netherlands; and methanol from Dr. Majeli Company, Iran. Azelaic acid gel formulation was prepared in several steps using the method presented in a previous study [14].

To draw the standard curve of azelaic acid, concentrations of 10, 20, 40, 60, 80 and 100 µg/ml of azelaic acid were prepared in methanol, and according to the λmax obtained from the photodiode array (PDA) detector, the area under the curve (AUC) during was read at a wavelength of 212 nm [15]. Phosphate buffer with pH 4.8 and molarity 0.05 was prepared. To determine the amount of azelaic acid, 18C column and HPLC methanol-phosphate buffer (20:80) were used as the mobile phase. To stabilize the device pressure, the column was washed by the mobile phase for 60 minutes. Then, the area under the peak curve was measured at a wavelength of 212 nm. This test was repeated on F3, F4 and F5 formulations (each for 3 times).

Five grams of each of F3, F4 and F5 formulations were weighed and made up to 50 ml with distilled water. The pH of the sample was measured by a pH meter (Metrohm) at a temperature of 25˚C. A viscometer (DV-II, Brookfield) with spindle 5 was used to determine the viscosity of the gel formulation (at 2 shear speeds of 30 and 50 rpm). To investigate the long-term stability of azelaic acid in the gel formulation for 3 months from the day of manufacture, the amount of azelaic acid in the F5 gel formulation was measures in this period. The long-term stability study was conducted at a temperature of 25˚C and a humidity of 60˚C. The required temperature and humidity were provided by a stability climate chamber (Memmert company).

The amounts of azelaic acid at different times were compared using t-test in SPSS software, version 17. To study the release of azelaic acid from the gel, the standard curve of azelaic acid was drawn in a medium containing monobasic phosphate buffer solution with a pH of 4.8 and 96% ethanol with a ratio of 1:1. Then, the release profile of azelaic acid from the F5 gel formulation was investigated during 6 hours in this environment.

Results

The F1 formulation had a sandpaper-like appearance. In the F2 formulation, the sandpaper-like state was eliminated, but the gel formulation was very smooth. In formulation F3, which was made by increasing the concentration of lecithin and using an overhead mixer, the appearance of the formulation was suitable. The F4 and F5 formulations also had a suitable appearance.

The results of determining the amount of azelaic acid in different formulations at the end of the first, second and third months showed that the amount of azelaic acid in the F3 formulation was 99.72% in the first month, 96.25% in the second month, and 100.5% in the third month. In the F4 formulation, the amounts of azelaic acid in the first, second and third months were 100.39, 97.85 and 98.76%, respectively. In the F5 formulation, these amounts were 100.25, 102.9, and 99.5%, respectively. The amount of azelaic acid in the F5 gel formulation was more than 99% of the determined amount during three months. The results of the study on the release of azelaic acid from the gel, showed that about 30% of the drug was released in the first hour. After 2 hours, the release rate reached about 50%, and the release did not increase significantly until 6 hours.

Conclusion

According to the obtained results, in the F5 gel formulation, where three stages of homogenizing were used in its manufacturing process and the formulation was well homogenized, the amount of azelaic acid did not change significantly during the storage period and a lower standard deviation was observed compared to other formulations. It can be concluded that the use of a homogenizer when making the azelaic acid gel formulation is effective in making the gel more homogenous, and the F5 formulation is more homogeneous than the other formulations. Thus, it is suggested as the optimal formulation.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by Ethics Committee of Guilan University of Medical Sciences (Code: IR.GUMS.REC.1399.511).

Funding

This article is taken from PhD dissertation of Zahra Sabour, approved by Ethics Committee of Guilan University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Conceptualization and study design: Saeed Manoochehri; Data collection, analysis and interpretation: Saeed Manoochehri; Mohammad Moazen and Saeed Ghasemi; initial draft preparation and statistical analysis: Saeed Ghasemi and Saeed Manoochehri; Experiments: Zahra Sabour.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Gita Alkan Saberi, (an expert in the Pharmaceutics Laboratory) for her assistance.

مقاله پژوهشی

ساخت، بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و مطالعات پایداری فرمولاسیون ژل آزلائیک اسید

سعید قاسمی[۱]، زهرا صبور[۲]، محمد مؤذن[۲]، *سعید منوچهری[۲]

۱. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم‌پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۲. گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم‌پزشکی گیلان، رشت، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Ghasemi S, Sabour Z, Moazen M, Manoochehri S. [Preparation, Investigation of Physicochemical Properties and Stability of Azelaic Acid Gel Formulation (Persian)]. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2024; 33(1):97-108. https://doi.org/10.32598/JGUMS.33.1.495.1

https://doi.org/10.32598/JGUMS.33.1.495.1

تاریخ دریافت: ۲۳ مرداد ۱۴۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۲ دی ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ۱۳ فروردین ۱۴۰۳

چکیده

زمینه آکنه روزاسه یک بیماری التهابی پوستی است که توسط برخی باکتری‌ها ایجاد می‌شود. آزلائیک اسید به دلیل فعالیت ضد میکروبی می‌تواند در بیماری‌های پوستی، از جمله آکنه روزاسه استفاده شود.

هدف هدف از این مطالعه، تهیه، ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پایداری مقدماتی ژل آزلائیک اسید ۱۵ درصد است.

روش‌ها برای تهیه ژل آزلائیک اسید ابتدا محلول آبی حاوی اتیلن دی آمین ترا استیک اسید و بنزوئیک اسید تهیه شد. سپس مخلوطی همگن حاوی پلیسوربات ۸۰ و تری گلیسرید در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مخلوط اول اضافه شد. پروپیلن گلیکول، لسیتین و کربومر ۹۴۰P به مخلوط فوق افزوده و ژل تشکیل شد. سپس محلول آزلائیک اسید در پروپیلن گلیکول به ژل افزوده شد. در نهایت، فرمولاسیون ژل ۱۵ دقیقه هموژنایز شد.

یافته‌ها در روز ساخت، تمام فرمولاسیون‌های با ظاهر مناسب و میزان آزلائیک اسید حدود ۱۵ درصد بودند. در مطالعه مقدماتی پایداری ۳ ماهه، میزان آزلائیک اسید در فرمولاسیون F5(5) (ساخته شده با هموژنایزر) بیشتر از ۹۹ درصد محتوای دارو شد، البته این فرمولاسیون تفاوت معناداری با سایر فرمولاسیون‌ها نداشت. میزان آزادسازی دارو از F5، در ساعت اول حدود ۳۰ درصد و پس از ۲ ساعت ۵۰ درصد شد.

نتیجه‌گیری فرمولاسیون‌های ساخته‌شده از نظر pH، ویسکوزیته و محتوای دارو مناسب بودند. با توجه به شرایط مشابه نگهداری فرمولاسیون‌ها در طی ۳ ماه، در F5 بیشترین میزان همگن بودن آزلائیک اسید و کمترین مقدار انحراف‌معیار مشاهده شد که نشان‌دهنده اهمیت استفاده از هموژنایزر در فرایند ساخت ژل است. همچنین استفاده از پروپیلن گلیکول ۱۸ درصد وزنی/وزنی، علاوه بر نقش کمک حلالی می‌تواند سبب افزایش میزان رهش آزلائیک اسید شود.

کلیدواژه‌ها:
آزلائیک اسید، آکنه روزاسه، ژل، پایداری

* **نویسنده مسئول:**
سعید منوچهری
نشانی: رشت، دانشگاه علوم‌پزشکی گیلان، دانشکده داروسازی، گروه فارماسیوتیکس.
تلفن: ۳۳۴۸۶۴۷۰ (۱۳) ۹۸+
رایانامه: manoochehri@gums.ac.ir

Copyright © 2024 The Author(s);
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-By-NC: https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

مقدمه

آکنه یک بیماری التهابی پوستی بسیار شایع است که به عنوان جوش نیز شناخته می‌شود. جوش‌ها معمولاً در صورت، قفسه سینه، بالای کمر و گردن یافت می‌شوند. پروپیونی باکتریوم و استافیلوکوکوس اورئوس از باکتری‌های ایجادکننده آکنه هستند [۱]. بروز آکنه با بسیاری از عوامل، از جمله ترشح سبوم، سطح هورمون‌ها، عفونت باکتریایی و واکنش‌های التهابی ارتباط نزدیک دارد که در این میان تغییرات ترشح سبوم یکی از عوامل مهم بروز آکنه به شمار می‌آید [۲].

فعالیت اصلی غدد چربی بالغ، تولید و ترشح سبوم است که حاوی مخلوط پیچیده‌ای از لیپیدهاست. ترکیب سبوم بین گونه‌ها متفاوت است که این تفاوت احتمالاً به علت عملکرد متنوع سبوم است [۳]. افزایش دفع سبوم عامل اصلی ایجاد آکنه است. سایر عملکردهای غدد چربی، از جمله ترشح لیپیدهای پیش‌التهابی چربی، سیتوکین‌های مختلف تولیدشده در محل، پپتیدها و نوروپپتیدهای اطراف غدد چربی با ایجاد آکنه مرتبط هستند [۲].

آکنه روزاسه یک بیماری التهابی و مزمن پوستی است که اغلب گونه‌ها، بینی، چانه و پیشانی را درگیر می‌کند. تظاهرات این بیماری شامل اریتم مداوم صورت، پاپول، جوش، تلانژکتازی و گرگرفتگی مکرر است [۴]. شیوع روزاسه در جمعیت‌های روشن پوست بین ۲ تا ۲۲ درصد متغیر است [۵]. بیماری روزاسه اپیزودهای تشدید و بهبود دارد و در افراد با سنین بین ۳۰ تا ۵۰ سال دیده می‌شود. خانم‌ها بیشتر از آقایان درگیر این بیماری می‌شوند [۴].

درمان آکنه روزاسه شامل مراقبت‌های پوستی و دارودرمانی است. از درمان‌های غیردارویی می‌توان به مراقبت‌های پوستی نظیر خودداری از قرار گرفتن در معرض آفتاب و استفاده از کرم‌های ضد آفتاب و مرطوب‌کننده‌ها اشاره کرد.

درمان‌های دارویی موضعی مورد تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا[1] برای درمان بیماری آکنه روزاسه شامل فرمولاسیون‌های موضعی سولفات استامید سدیم، مترونیدازول و آزلائیک اسید است [۶].

آزلائیک اسید یک دی کربوکسیلیک اسید با زنجیره مستقیم دو pKa ۴/۵۳ و ۵/۳۳ و حلالیت محدودی در آب دارد. آزلائیک اسید، فعالیت ضد میکروبی علیه پروپیونی باکتریوم آکنه و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس دارد. این عملکرد ضد میکروبی ممکن است به دلیل مهار سنتز پروتئین‌های سلول میکروبی باشد. با این سازوکار، آزلائیک اسید سبب کاهش جمعیت باکتریایی پروپیونی باکتریوم در سطح پوست و فولیکول‌های سباسه می‌شود. همچنین آزلائیک اسید فعالیت‌های ضد آنزیم تیروزیناز و ضد میتوکندریایی دارد و با کاهش رادیکال‌های آزاد، باعث کاهش فعالیت ملانوسیت‌ها و رشد آن‌ها در ملاسما می‌شود و هایپرپیگمنتاسیون موضعی ماکولا در پوست را متوقف می‌کند [۷]. سنتز دی‌ان‌ای باکتری در سیتوپلاسم این باکتری رخ می‌دهد، از این جهت آزلائیک اسید برای رسیدن به این قسمت، باید از طریق لایه شاخی پوست در لایه درم عبور کند و سپس با عبور از چربی پپتیدوگلیکان‌های ضخیم باکتری پروپیونی باکتریوم به داخل سیتوپلاسم باکتری نفوذ کند [۸].

مطالعات متعددی روی فرمولاسیون‌های میکروامولسیون، لیپوزوم، ژل، کریستال مایع و فوم حاوی آزلائیک اسید با هدف افزایش حلالیت در حامل و نفوذپذیری بیشتر از طریق پوست انجام شده است [۹]. فرمولاسیون ژل آزلائیک اسید ۱۵ درصد در سال ۲۰۰۲ برای درمان آکنه روزاسه توسط سازمان غذا و داروی آمریکا تأیید شد [۹].

فرمولاسیون‌های موضعی ژل ۱۵ درصد و کرم ۲۰ درصد آزلائیک اسید در بازار دارویی دنیا موجود است که فرمولاسیون ژل برای درمان آکنه روزاسه و فرمولاسیون کرم برای درمان آکنه وولگاریس توسط سازمان غذا و داروی آمریکا تأیید شده‌اند. در بسیاری از کشورهای اروپایی فرمولاسیون ژل به صورت استفاده خارج از دستور (Off Label) برای درمان آکنه وولگاریس نیز استفاده می‌شود [۱۰].

فرمولاسیون ژل آزلائیک اسید مزایایی نسبت به فرمولاسیون کرم دارد. از جمله این مزایا می‌توان به بارگیری دُز کمتر آزلائیک اسید و ماندگاری بیشتر روی پوست که سبب افزایش آزادسازی دارو و فراهمی زیستی می‌شود، اشاره کرد. علاوه بر این، فرمولاسیون ژل بدون آسیب به پوست یا کاهش محتوای آب اپیدرمی می‌تواند به درون پوست نفوذ کند و به همین دلیل یک گزینه درمانی مناسب در درمان آکنه روزاسه پاپولوپوسچولار التهابی است [۱۱].

در سال‌های گذشته مطالعاتی [۱۲، ۱۳] در خصوص فرمولاسیون کرم آزلائیک اسید انجام شده و این فرمولاسیون در حال حاضر در بازار دارویی ایران موجود است، اما فرمولاسیون ژل تاکنون به بازار دارویی ایران ارائه نشده است؛ بنابراین هدف از مطالعه حاضر تهیه و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی فرمولاسیون ژل آزلائیک اسید و مطالعات پایداری مقدماتی فرمولاسیون است.

1. U.S. Food and Drug Administration (FDA)

روش‌ها

آزلائیک اسید، سدیم هیدروکساید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، پلی سوربات، بنزوئیک اسید، پروپیلن گلیکول، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید[2] و اتانول ۹۶ درصد از شرکت مرک[3] آلمان، کربومر ۹۴۰P از شرکت کورل فارما کم هند، لسیتین از شرکت داکسان کره جنوبی، تری گلیسیرید از شرکت نوتریشیا هلند و متانول از شرکت دکتر مجللی ایران خریداری شدند.

فرمولاسیون ژل آزلائیک اسید

فرمولاسیون ژل آزلائیک اسید طی چند مرحله و با استفاده از روش ارائه‌شده در مطالعات در چند مرحله تهیه شد [۱۴]. ابتدا در یک بشر، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید و بنزوئیک اسید در آب مقطر حل شدند (مرحله ۱). سپس در بشر دیگری مخلوطی همگن حاوی ۱/۵ گرم پلی سوربات ۸۰ و ۲ گرم تری گلیسیرید تهیه شد. مخلوط تهیه‌شده تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و در همین دما به بشر اول اضافه شد، محتوای بشر توسط همزن مغناطیسی یکنواخت شد (مرحله ۲). در ادامه در بشر جداگانه‌ای مخلوط یکنواختی از پروپیلن گلیکول و لسیتین تهیه شد و طی هم زدن به مخلوط قبلی افزوده شد (مرحله ۳).

برای تشکیل ژل از کربومر ۹۴۰P استفاده شد. ابتدا مقدار ۱ گرم کربومر در مجاورت ۱۰ میلی‌لیتر آب قرار گرفت تا خیس شود. سپس کربومر خیس‌شده به مخلوط تهیه‌شده قبلی در دمای ۵۰ سانتی‌گراد اضافه شد. پس از پخش شدن کامل کربومر، سود به صورت قطره قطره به ترکیب تهیه‌شده اضافه شد تا در pH ۵ ژل کربومر تشکیل شود (مرحله ۴). سپس ۱۵ گرم آزلائیک اسید در پروپیلن گلیکول حل شد و به ژل تهیه‌شده افزوده شد. در نهایت، فرمولاسیون ژل حاوی آزلائیک اسید به مدت ۱۵ دقیقه با دستگاه همزن اورهد یکنواخت شد (مرحله ۵).

پس از ساخت فرمولاسیون‌های مقدماتی و انتخاب مقدار مواد تشکیل‌دهنده فرمولاسیون ژل (جدول شماره ۱)، به منظور بررسی تأثیر دستگاه‌های مختلف بر میزان یکنواختی آزلائیک اسید در فرمولاسیون ژل، از ترکیبی از دستگاه‌های هموژنایزر، همزن اورهد و همزن مغناطیسی در مراحل مختلف ساخت فرمولاسیون ژل استفاده شد (جدول شماره ۲). اجزای فرمولاسیون‌های F۳، F۴ و F۵ مشابه هستند.

تعیین مقدار آزلائیک اسید در ژل به روش HPLC

در ابتدا برای رسم منحنی استاندارد آزلائیک اسید، غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آزلائیک اسید در متانول تهیه شد و با توجه به λmax به‌دست‌آمده از آشکارساز آرایه دیودی (PDA)، سطح زیرمنحنی (AUC) در طول موج ۲۱۲ نانومتر خوانده شد [۱۵].

سپس ۱ گرم ژل توزین شد و به بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. ۶۰ میلی‌لیتر متانول به بشر افزوده شد. مخلوط تهیه‌شده در داخل حمام آب در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد تا محلول یکنواختی تشکیل شود. سپس محلول تازه تهیه‌شده با متانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول تهیه‌شده با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر صاف شد. نمونه فیلترشده داخل ویال برای تعیین مقدار توسط HPLC ریخته شد.

برای تعیین مقدار آزلائیک اسید از ستون C۱۸ و متانول گرید HPLC–بافر فسفات (۲۰:۸۰) به عنوان فاز متحرک استفاده شد. بافر فسفات با pH ۴/۸ و مولاریته ۰/۰۵ تهیه شد. به منظور ثابت شدن فشار دستگاه، ستون به مدت ۶۰ دقیقه توسط فاز متحرک شست‌وشو داده شد. در ادامه، مقدار سطح زیر نمودار پیک در طول موج ۲۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش روی فرمولاسیون‌های F۳، F۴ و F۵ (هر کدام ۳ مرتبه) تکرار شد.

تعیین pH فراورده

برای تعیین pH فراورده از دستگاه pH متر Metrohm استفاده شد. ۵ گرم از هر یک از فرمولاسیون‌های F۳، F۴ و F۵ توزین و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. pH نمونه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری ویسکوزیته

برای تعیین ویسکوزیته فرمولاسیون ژل از دستگاه ویسکومتر Brookfield مدل DV-II با اسپیندل ۵ (در ۲ سرعت برشی ۳۰ و ۵۰ rpm) استفاده شد. این آزمایش روی فرمولاسیون‌های F۴ و F۵ که مقادیر فرمولاسیون یکسان و شرایط ساخت متفاوتی داشتند، انجام شد. نحوه اندازه‌گیری ویسکوزیته به این صورت بود که با اضافه کردن ۵۰ میلی‌لیتر از فرمولاسیون‌های F۴ و F۵ به داخل بشر و قرار دادن آن در دستگاه ویسکومتر، ویسکوزیته ژل‌ها اندازه‌گیری شد. این تست در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

تست رهش دارو

برای اندازه‌گیری رهش آزلائیک اسید در فرمولاسیون ژل از روش سل فرانس[4] استفاده شد. سل انتشار فرانتس از ۲ قسمت‌دهنده و گیرنده تشکیل شده که توسط غشایی از هم جدا شده‌اند [۱۶]. با توجه به این‌که محیط گیرنده باید قابلیت ایجاد

2. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)
3. Merck
4. Franz Cell

شرایط سینک برای آزلائیک اسید را داشته باشد، محیطی حاوی محلول بافر فسفات مونوبازیک با pH ۴/۸ و اتانول ۹۶ درصد با نسبت ۱:۱ برای آزمون رهش آزلائیک اسید در فرمولاسیون ژل در نظر گرفته شد [۱۵، ۱۷]. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آزلائیک اسید در محلول حاوی بافر فسفات pH ۴/۸ و اتانول ۹۶ درصد با نسبت ۱:۱ تهیه شد و سطح زیر نمودار پیک در طول موج ۲۱۲ نانومتر توسط آشکارساز آرایه دیودی خوانده شد.

پس از آماده‌سازی، کیسه دیالیز ۳۰ دقیقه در محیط گیرنده قرار گرفت تا توسط محیط اشباع شود. برای انجام آزمایش رهش، ۳۵۰ میلی‌گرم فرمولاسیون F۵ توزین و روی کیسه دیالیز پخش شد. قسمت خروجی محفظه گیرنده با پارافیلم پوشانده شد تا از تبخیر احتمالی اتانول و کاهش حجم محیط گیرنده جلوگیری شود. سل فرانس در دستگاه انکوباتور شیکردار در شرایط معین (دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۰۰ rpm) قرار داده شد. سپس در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ ساعت از محیط گیرنده نمونه‌گیری شد. به این صورت که در هر یک از زمان‌های ذکرشده، ۱ میلی لیتر نمونه برداری انجام شد. در ادامه برای ثابت ماندن حجم محیط گیرنده، ۱ میلی‌لیتر از محیط تازه تهیه‌شده به محفظه گیرنده اضافه و مجدداً با پارافیلم پوشانده شد. برای انجام آنالیز، محتوای میکروتیوب‌ها از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده و به داخل ویال HPLC انتقال داده شد. پس از تزریق به دستگاه HPLC، مقدار سطح زیر نمودار خوانده شد. این تست ۳ مرتبه برای فرمولاسیون F۵ تکرار شد.

بررسی تعیین مقدار آزلائیک اسید در مطالعه پایداری طولانی‌مدت در بازه زمانی ۳ ماهه

بررسی تعیین مقدار آزلائیک اسید در فرمولاسیون ژل که پیشتر درباره آن صحبت شد، مربوط به زمان ساخت فرمولاسیون بود. در ادامه برای بررسی پایداری طولانی‌مدت آزلائیک اسید در فرمولاسیون ژل در بازه زمانی ۳ ماهه از روز ساخت، تعیین مقدار آزلائیک اسید در فرمولاسیون ژل F۵ در این بازه زمانی بررسی شد. با توجه به محدوده جغرافیایی کشور ایران، مطالعه پایداری طولانی‌مدت به مدت ۳ ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. دما و رطوبت مورد نیاز توسط دستگاه محفظه پایداری شرکت Memmert تأمین شد.

یافته‌ها

از نظر ظاهری فرمولاسیون F۱ ظاهر مناسبی نداشت و پس از قرار گرفتن ژل در دست حالت شنی احساس می‌شد. در فرمولاسیون F۲ حالت شنی برطرف شد، اما فرمولاسیون ژل بسیار روان بود. در فرمولاسیون F۳ که با افزایش غلظت لسیتین و توسط دستگاه همزن اورهد ساخته شد، شکل ظاهری فرمولاسیون مناسب بود. همچنین فرمولاسیون‌های F۴ و F۵ نیز ظاهر مناسبی داشتند.

نتایج ویسکوزیته برای فرمولاسیون‌های F۴، F۵ با اسپندل ۵ در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در جدول شماره ۳ ذکر شده است. همچنین نتایجpH فرمولاسیون‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز ساخت بین ۴/۹ تا ۵/۱ بود. نتایج نشان داد pH فرمولاسیون‌ها در طی ۳ ماه حدود ۵ بود (جدول شماره ۳).

جدول ۱. مقادیر مواد تشکیل‌دهنده فرمولاسیون‌های تهیه‌شده در آزمایش‌های مقدماتی

اجزای فرمولاسیون (% w/w)	F1	F2	F3
Azelaic acid	۱۵	۱۵	۱۵
Benzoic acid	۰/۱	۰/۱	۰/۱
EDTA	۰/۱	۰/۱	۰/۱
Carbopol 940	۱	۱	۱
Polysorbate 80	۱/۵	۱/۵	۱/۵
Lecithin	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵
Propylene glycol	۱۲	۱۸	۱۸
MCT Oil	۲	۲	۲
Purified water	۶۸/۰۵	۶۲/۰۵	۶۱/۸

جدول ۲. دستگاه‌های استفاده‌شده در تهیه فرمولاسیون‌های F3، F4 و F5

فرمولاسیون	هموژنایزر در مراحل ۲ و ۳	همزن مغناطیسی در مراحل ۲ و ۳	هموژنایزر در مرحله ۵	همزن اورهد مرحله ۵
F3		●		●
F4		●	●	
F5	●		●	

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تعیین مقدار آزلائیک اسید در ژل در روز ساخت و پایداری طولانی‌مدت ۱، ۲ و ۳ ماهه

بر اساس منحنی استاندارد (تصویر شماره ۱) و پیک HPLC (تصویر شماره ۲) نتایج میانگین غلظت آزلائیک اسید در فرمولاسیون ژل در روز ساخت، ماه‌های اول، دوم و سوم در جدول شماره ۴ ذکر شده است. نتایج تعیین مقدار آزلائیک اسید فرمولاسیون‌های F۳، F۴ و F۵ در روز ساخت در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۴ درصد قرار داشت.

نتایج تعیین مقدار آزلائیک اسید در فرمولاسیون‌های مختلف در پایان ماه‌های اول، دوم و سوم نشان داد (جدول شماره ۴) مقدار آزلائیک اسید در فرمولاسیون F۳، در ماه اول ۹۹/۷۲ درصد، در ماه دوم ۹۶/۲۵ درصد و در ماه سوم ۱۰۰/۵ درصد بود. مقدار آزلائیک اسید در فرمولاسیون F۴ در ماه‌های اول، دوم و سوم به ترتیب ۱۰۰/۳۹ درصد، ۹۷/۸۵ درصد و ۹۸/۷۶ درصد محاسبه شد. همچنین مقدار آزلائیک اسید موجود در فرمولاسیون F۵ در ماه اول ۱۰۰/۲۵ درصد، در ماه دوم ۱۰۲/۹ درصد و در ماه سوم ۹۹/۵ درصد شد. میزان آزلائیک اسید در فرمولاسیون ژلF۵ در طول مدت ۳ ماه بیشتر از ۹۹ درصد تعیین مقدار شد. نتایج به‌دست‌آمده از تعیین مقدار آزلائیک اسید در زمان‌های مختلف با روش تی‌تست در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ ارزیابی شد.

همان‌طور که ذکر شد برای بررسی رهایش آزلائیک اسید از ژل، منحنی استاندارد آزلائیک اسید در محیط حاوی محلول بافر فسفات مونوبازیک با pH ۴/۸ و اتانول ۹۶ درصد با نسبت ۱:۱ رسم شد، سپس پروفایل رهش آزلائیک اسید از فرمولاسیون ژل F۵ در طی ۶ ساعت در این محیط بررسی شد. همان‌طور که در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌شود در ساعت اول حدود ۳۰ درصد از دارو آزاد شد و پس از ۲ ساعت میزان آزادسازی آزلائیک اسید به حدود ۵۰ درصد رسید و رهش تا مدت زمان ۶ ساعت، افزایش معناداری نداشت.

جدول ۳. ویسکوزیته و pH فرمولاسیون‌ها

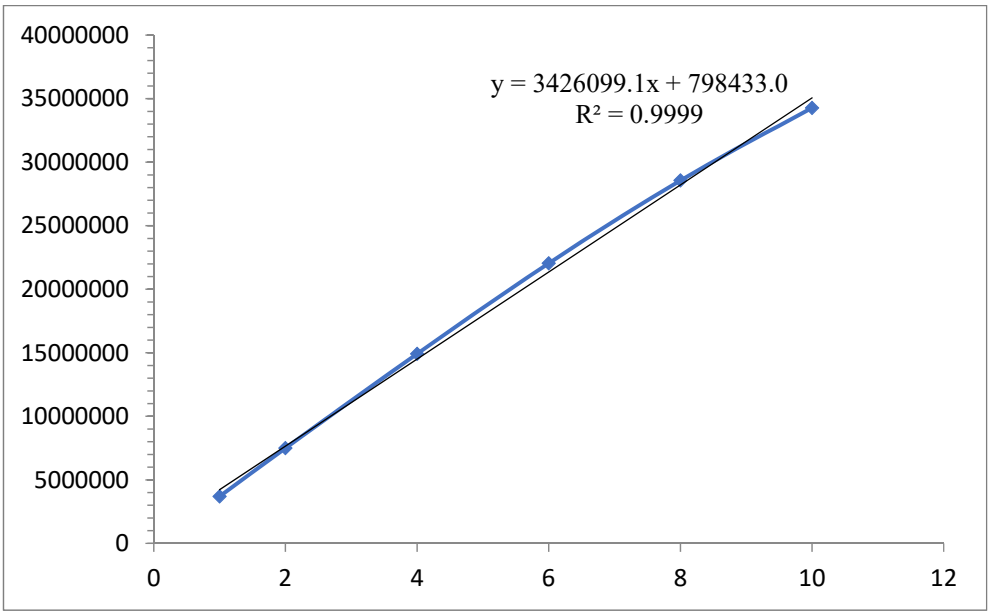
فرمولاسیون	ویسکوزیته (mPa.s) سرعت (rpm)		pH (روز ساخت)	pH (پایان ماه اول)	pH (پایان ماه دوم)	pH (پایان ماه سوم)
	۵۰	۳۰				
F4	۶۲۸۰	۹۰۴۰	۵/۱	۵/۰۲	۵/۰۲	۵/۰۰
F5	۵۷۵۲	۸۰۸۰	۵/۰۰	۵/۱	۵/۱	۵/۰۰

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

جدول ۴. مقدار محتوای آزلائیک اسید و انحراف‌معیار آن در فرمولاسیون‌های مختلف ژل در روز ساخت و زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ماهه

فرمولاسیون	روز ساخت	انحراف‌معیار	ماه اول	انحراف‌معیار	ماه دوم	انحراف‌معیار	ماه سوم	انحراف‌معیار
F3	۱۰۱/۸۷	۱/۲۳	۹۹/۷۲	۳/۸۴	۹۶/۲۵	۱/۷۶	۱۰۰/۵	۴/۵۹
F4	۱۰۳/۸	۰/۱۴	۱۰۰/۳۹۵	۰/۷۱	۹۷/۸۵	۰/۲۱	۹۸/۷۶	۱/۷۶
F5	۱۰۱/۵	۰/۷۰	۱۰۰/۲۵	۰/۳۵	۱۰۲/۹	۰/۸۴	۹۹/۵	۰/۷۰

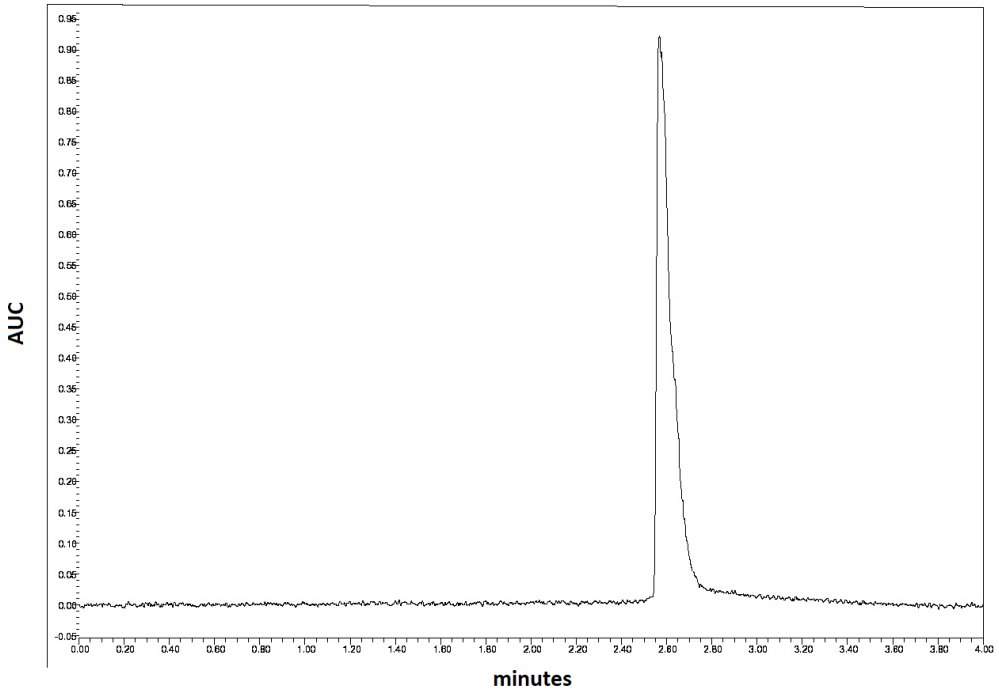
مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان



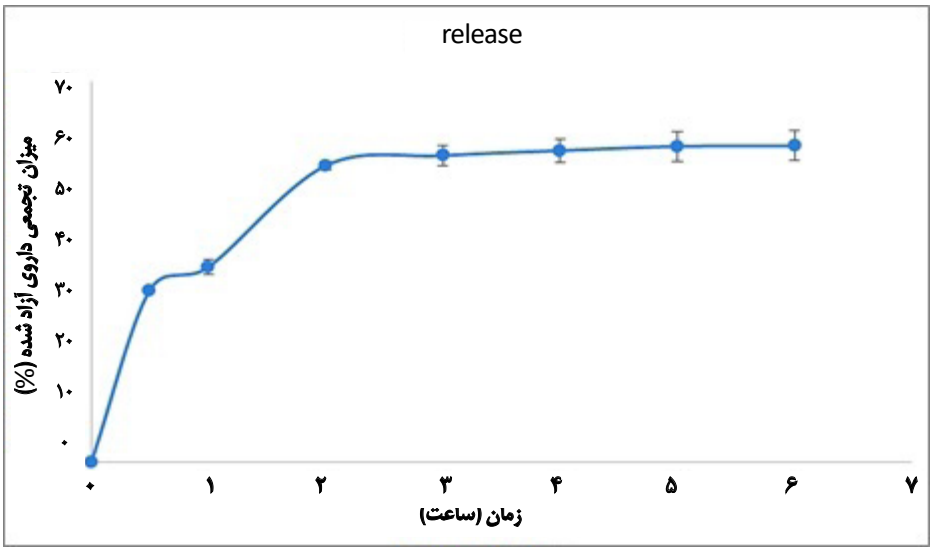
تصویر ۱. منحنی استاندارد آزلائیک اسید در حلال متانول

بحث

آزلائیک اسید یک دی کربوکسیلیک اسید طبیعی است و با کاهش ضایعات التهابی و اریتم در افراد مبتلا به آکنه روزاسه سبب درمان بیماری آکنه می‌شود [۱۸]. شیوع این بیماری بین جمعیت با پوست‌های رنگی در آمریکا، آفریقا و آسیا تا ۱۰ درصد گزارش شده است [۱۹]. اگرچه تأثیرات آکنه روزاسه بر سلامت جسمی فرد محدود است، اما تأثیرات عمیق روحی بر فرد مبتلا می‌گذارد؛ بنابراین درمان این بیماری تا حد زیادی باعث بهبود کیفیت زندگی فرد می‌شود [۶].



تصویر ۲. کروماتوگرام HPLC آزلائیک اسید در طول موج ۲۱۲ نانومتر



تصویر ۳. پروفایل رهایش آزلائیک اسید از فرمولاسیون ژل F5 در طی ۶ ساعت

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

با توجه به این‌که فرمولاسیون ژل موضعی آزلائیک اسید در بازار دارویی ایران موجود نیست، در این تحقیق ساخت و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پایداری کوتاه‌مدت فرمولاسیون ژل موضعی ۱۵ درصد آزلائیک اسید بررسی شد. با توجه به این‌که میزان انحلال‌پذیری آزلائیک اسید در آب کم است، به‌طوری که میزان انحلال‌پذیری آن در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد ۲/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است؛ بنابراین انتخاب غلظت مناسب کمک حلال از اهمیت بسزایی برخوردار است.

در این مطالعه از پروپیلن گلیکول با ۲ نسبت ۱۲ و ۱۸ درصد وزنی / وزنی به عنوان کمک حلال در فرمولاسیون ژل استفاده شد، نتایج نشان داد افزایش میزان پروپیلن گلیکول هم‌زمان با افزایش غلظت لسیتین موجب تهیه فرمولاسیون ژل با قوام مناسب می‌شود. برای بررسی نقش دستگاه هموژنایزر و همزن اورهد در مراحل ساخت، نتایج انحراف‌معیار تعیین مقدار روز ساخت فرمولاسیون‌های F۳، F۴ و F۵ بررسی شد. آزلائیک اسید موجود در این فرمولاسیون‌های F۴ و F۵ که توسط دستگاه هموژنایزر به خوبی هموژن شده بودند، به شکل مناسب‌تری در فرمولاسیون ژل پراکنده شدند و انحراف‌معیار کمتری نسبت به فرمولاسیون F۳ که توسط همزن اورهد تهیه شده بود، داشتند.

تعیین مقدار فرمولاسیون ژل F۵ در بازه زمانی ۳ ماهه، میزان آزلائیک اسید بیشتر از ۹۹ درصد را نشان داد، اما نتایج تعیین مقدار فرمولاسیون F۳ که فرایند ساخت آن توسط همزن مغناطیسی و همزن اورهد انجام شده بود، نشان داد مقدار آزلائیک اسید در مدت زمان ۳ ماه کاهش داشته و این کاهش نسبی با افزایش انحراف‌معیار همراه بود.

به نظر می‌رسد با وجود شرایط نگهداری مشابه هر ۳ فرمولاسیون در طی ۳ ماه، استفاده از همزن‌های مغناطیسی و اورهد در فرمولاسیون F۳ سبب شده میزان همگن بودن آزلائیک اسید در این فرمولاسیون کمتر باشد، اما مقدار آزلائیک اسید در این فرمولاسیون نسبت به فرمولاسیون F۵ در طی مدت ۳ ماه افت کمتری داشت؛ این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت استفاده از نوع دستگاه در فرایند ساخت فرمولاسیون ژل برای حفظ یکپارچگی و همگنی فرمولاسیون در مدت طولانی باشد.

مطالعه آزمون تی‌تست نشان داد ۳ فرمولاسیون در مدت زمان مطالعه‌شده تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند؛ بنابراین برای نتیجه‌گیری مناسب‌تر بهتر است مطالعه پایداری در زمان‌های طولانی‌تری انجام شود یا نوع مطالعه پایداری به مطالعه تسریع‌شده تغییر یابد.

مقدار pH اندازه‌گیری‌شده در هر ۳ فرمولاسیون‌های F۳، F۴ و F۵ در ماه‌های مختلف مطالعه نشان داد pH ژل در محدوده مناسب پوست قرار داشت و تغییر چندانی نکرد [۲۰، ۲۱]. ویسکوزیته ژل موضعی ساخته‌شده در مطالعه اوسیتومیوا و همکاران در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در بازه mPa.s5000 تا mPa.s9000 قرار داشت. نتایج ویسکوزیته مطالعه حاضر نیز در محدوده mPa.s5000 تا mPa.s 9100 قرار داشت که با مطالعه فوق در یک راستا بود [۲۲].

بررسی نتایج حاصل از تست رهش فرمولاسیون F۵ نشان داد آزادسازی دارو در ساعت اول ۳۵/۸ درصد بود و سپس تا ساعت دوم، آزادسازی به ۵۴/۴ درصد رسید. در ساعت سوم، افزایش معناداری در آزادسازی مشاهده نشد و تا پایان ساعت ششم، آزادسازی به ۵۸/۱ درصد رسید. المرابح و همکاران، آزمایشی

برای افزایش میزان رهایش پیش‌داروی آزلائیک اسید انجام دادند و میزان درصد تجمعی آزلائیک اسید را بعد از ۶ ساعت حدود ۴۰ درصد محاسبه کردند [۱۷].

همچنین کاررِر و همکاران در سال ۲۰۲۰ در پژوهش خود نشان دادند پروپیلن گلیکول در فرمولاسیون‌های موضعی می‌تواند به عنوان حلال کمکی و همچنین عاملی برای افزایش نفوذ دارو به پوست عمل کند [۲۳]. در نتیجه، به نظر می‌رسد افزایش مقدار پروپیلن گلیکول به میزان ۱۸ درصد وزنی / وزنی در فرمولاسیون F5 علاوه بر نقش کمک حلالی، می‌تواند سبب افزایش میزان رهش آزلائیک اسید شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، در فرمولاسیون ژل F5 که از ۳ مرحله هموژنایزر در فرایند ساخت آن استفاده شد و فرمولاسیون به خوبی یکنواخت شده بود، مقدار آزلائیک اسید در مدت زمان نگهداری تغییر محسوسی نداشته و انحراف‌معیار کمتری نسبت به سایر فرمولاسیون‌ها مشاهده شد. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که استفاده از دستگاه هموژنایزر هنگام ساخت فرمولاسیون ژل آزلائیک اسید در همگن شدن بیشتر ژل مؤثر است و فرمولاسیون F5 همگن‌تر از سایر فرمولاسیون‌ها بوده و به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم‌پزشکی گیلان با کد اخلاق IR.GUMS.REC.1399.511 تصویب شد.

حامی مالی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه زهرا صبور با شماره ثبت د/۱۵۰، رشته داروسازی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی گیلان است و هیچ گونه کمک مالی از سازمانهای دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی و طراحی مطالعه: سعید منوچهری؛ کسب، تحلیل و تفسیر داده‌ها: سعید منوچهری، محمد مؤذن و سعید قاسمی؛ تهیه پیش‌نویس و تحلیل آماری: سعید قاسمی و سعید منوچهری؛ انجام مطالعه: زهرا صبور.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات گیتا الکن صابری، کارشناس آزمایشگاه فارماسیوتیکس که در این پژوهش ما را همراهی کردند، تشکر و قدردانی کنند.

References

[1] Amrutbhai HH, Jaykumar PA, Narkhede SB. A review on azelaic acid emulgel for acne and hyperpigmentation. Journal of Innovation in Pharmaceutical Sciences. 2019; 3(1):16-21. [Link]

[2] Li X, He C, Chen Z, Zhou C, Gan Y, Jia Y. A review of the role of sebum in the mechanism of acne pathogenesis. Journal of Cosmetic Dermatology. 2017; 16(2):168-73. [DOI:10.1111/jocd.12345] [PMID]

[3] Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A. Sebaceous gland lipids. Dermato-Endocrinology. 2009; 1(2):68-71. [DOI:10.4161/derm.1.2.8472] [PMID]

[4] van Zuuren EJ. Rosacea. New England Journal of Medicine. 2017; 377(18):1754-64. [DOI:10.1056/NEJMcp1506630] [PMID]

[5] Culp B, Scheinfeld N. Rosacea: A review. Pharmacy and Therapeutics. 2009; 34(1):38-45. [PMID]

[6] Two AM, Wu W, Gallo RL, Hata TR. Rosacea: Part II. Topical and systemic therapies in the treatment of rosacea. Journal of the American Academy of Dermatology. 2015; 72(5):761-70. [DOI:10.1016/j.jaad.2014.08.027] [PMID]

[7] Liu RH, Smith MK, Basta SA, Farmer ER. Azelaic acid in the treatment of papulopustular rosacea: A systematic review of randomized controlled trials. Archives of Dermatology. 2006; 142(8):1047-52. [DOI:10.1001/archderm.142.8.1047] [PMID]

[8] Apriani EF, Rosana Y, Iskandarsyah I. Formulation, characterization, and in vitro testing of azelaic acid ethosome-based cream against Propionibacterium acnes for the treatment of acne. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research. 2019; 10(2):75-80. [DOI:10.4103/japtr.JAPTR_289_18] [PMID]

[9] Hung WH, Chen PK, Fang CW, Lin YC, Wu PC. Preparation and evaluation of azelaic acid topical microemulsion formulation: In vitro and in vivo study. Pharmaceutics. 2021; 13(3):410. [DOI:10.3390/pharmaceutics13030410] [PMID]

[10] Bergman D, Luke J. Azelaic acid. Journal of the Dermatology Nurses' Association. 2017; 9(3):157-60. [DOI:10.1097/JDN.0000000000000309]

[11] Gupta AK, Gover MD. Azelaic acid (15% gel) in the treatment of acne rosacea. International Journal of Dermatology. 2007; 46(5):533-8. [DOI:10.1111/j.1365-4632.2005.02769.x] [PMID]

[12] Cunliffe WJ, Holland KT. Clinical and laboratory studies on treatment with 20% azelaic acid cream for acne. Supplementum. 1989; 143:31-34. [PMID]

[13] Maddin S. A comparison of topical azelaic acid 20% cream and topical metronidazole 0.75% cream in the treatment of patients with papulopustular rosacea. Journal of the American Academy of Dermatology. 1999; 40(6 Pt 1):961-5. [DOI:10.1016/S0190-9622(99)70085-X] [PMID]

[14] Franke P, Günther C, Riedl J. Composition with azelaic acid. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office; 2003. [Link

]

[15] Sharma A, Mishra A, Sharma S. Stability indicating simultaneous validation of azelaic acid, minoxidil and tretinoin with forced degradation behavior study. By Rp-Hplc in Pharmaceutical Dosage Form. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 2016; 3. [Link]

[16] Klimundová J, Satinský D, Sklenárová H, Solich P. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. Talanta. 2006; 69(3):730-5. [DOI:10.1016/j.talanta.2005.11.011] [PMID]

[17] Al-Marabeh S, Khalil E, Khanfar M, Al-Bakri AG, Alzweiri M. A prodrug approach to enhance azelaic acid percutaneous availability. Pharmaceutical Development and Technology. 2017; 22(4):578-86. [DOI:10.1080/10837450.2016.1200614] [PMID]

[18] Jones DA. Rosacea, reactive oxygen species, and azelaic acid. The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology. 2009; 2(1):26. [PMID]

[19] Alexis AF, Callender VD, Baldwin HE, Desai SR, Rendon MI, Taylor SC. Global epidemiology and clinical spectrum of rosacea, highlighting skin of color: Review and clinical practice experience. Journal of the American Academy of Dermatology. 2019; 80(6):1722-9. e7. [DOI:10.1016/j.jaad.2018.08.049] [PMID]

[20] Bandier J, Johansen JD, Petersen LJ, Carlsen BC. Skin pH, atopic dermatitis, and filaggrin mutations. Dermatitis. 2014; 25(3):127-9. [DOI:10.1097/DER.0000000000000045] [PMID]

[21] Schmidt T, Zollner T, Friedrich M. Azelaic acid-comprising formulation with added pigment. United States patent application. 2012; Application No. 13/116,791. [Link]

[22] Osipitan OO, Shi Y, Di Pasqua AJ. Phenethyl isothiocyanate-containing carbomer gel for use against squamous cell carcinoma. Pharmaceutics. 2021; 13(1):106. [DOI:10.3390/pharmaceutics13010106] [PMID]

[23] Carrer V, Alonso C, Pont M, Zanuy M, Córdoba M, Espinosa S, et al. Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs. Archives of Dermatological Research. 2020; 312(5):337-52. [DOI:10.1007/s00403-019-02017-5] [PMID]