

**Zmiany odczynu rozcieńczonych rozproszeń polimerów
N-izopropylakryloamidu poniżej i powyżej LCST
w obecności chlorheksydyny**

WITOLD MUSIAL^{1,2)}, VANJA KOKOL¹⁾, BOJANA VONCINA¹⁾

¹⁾Uniwersytet w Mariborze, Zakład Materiałów Włókienniczych,
Laboratorium Chemii Barwników i Polimerów, Słowenia

²⁾ Akademia Medyczna we Wrocławiu, Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku

Streszczenie

Odczyn rozcieńczonych rozproszeń modyfikowanego poli(N-izopropylakryloamidu) z chlorheksydyną oceniano w temperaturze powierzchni skóry, oraz poniżej i powyżej wartości LCST (lower critical solution temperature). Zsyntetyzowano trzy różne pochodne tego polimeru za pomocą SFEP (surfactant free emulsion polymerization). pH wymienionych polimerów z chlorheksydyną badano w rozcieńczonych rozproszeniach. Kierunek zmian pH był zbliżony we wszystkich mieszaninach polimerów, w zakresie temperatury pomiędzy 25°C i 45°C. Wartości pH obniżały się od zakresu 9,87-9,94 do zakresu 9,38-9,46. Zmiana pH pomiędzy 32°C i 45°C była znacznie większa niż pomiędzy 25°C i 32°C, aczkolwiek spadek temperatury był regularny.

Zgodnie z otrzymanymi wynikami zmiana pH mieszanin polimeru z chlorheksydyną jest większa, niż zmiana pH samej chlorheksydyny w obserwowanym zakresie temperatury. Preparaty przeznaczone do stosowania miejscowego oraz doustne, powinny podlegać ocenie pH w odpowiednim zakresie temperatury.

Słowa kluczowe: chlorheksydyna, mikrożele, N-izopropylakryloamid, termowrażliwość

WPROWADZENIE

Polimery termowrażliwe w zakresie temperatur pomiędzy 32°C i 36°C znajdują szczególne zastosowanie w badaniach medycznych i farmaceutycznych, bowiem punkt ich przemiany fazowej znajduje się blisko fizjologicznej temperatury ciała ludzkiego - ok. 37°C oraz temperatury 32°C, charakterystycznej dla powierzchni skóry ludzkiego ciała. Makrocząsteczki poli(N-izopropylakrylamidu) zwane mikrożelami, są szeroko znaną i intensywnie badaną grupą związków na wielu polach biotechnologii i nauk medycznych. Przechodzą one charakterystyczną przemianę fazową w tzw. temperaturze LCST (lower critical solution temperature), zazwyczaj w temperaturze ok. 32°C, w układach wodnych [1-3]. W tej grupie polimerów sieć jest trwała, a rozmiar cząstek polimeru jest rzędu nanometrów lub mikrometrów.

W przebiegu pęcznienia polimeru czynnikiem decydującym jest dyfuzja; szybkość zapadania się sieci polimerowej zależy od wielkości porów w sieci polimeru. Na tej zasadzie substancje lecznicze mogą być dostarczane w sposób celowany do odpowiedniego miejsca działania [4,5]. Dzięki kontrolowanemu podawaniu substancji leczniczej miejscowo na skórę, możliwe staje się utrzymanie pożądanych stężeń terapeutycznych leku, przy jednoczesnym ograniczeniu prawdopodobieństwa wystąpienia działań niepożądanych. Wiązanie stosunkowo dużych cząsteczek substancji leczniczej, takich jak insulina czy octan prednizolonu badano pod kątem możliwości zastosowania wraz z polimerami termowrażliwymi [6, 7]. Poprzez zastosowanie odpowiednich modyfikacji chemicznych polimeru można osiągnąć przedłużenie uwalniania lub celowane podanie leku. Z drugiej jednak strony potencjalne nośniki substancji leczniczych, mogą wpływać na naturalny odczyn powierzchni ciała i zmieniać pierwotne kwasowe pH skóry w kierunku wyższych wartości. Te skomplikowane systemy zawierające wodę, termowrażliwy polimer i substancję leczniczą powinny być oceniane w zakresie pH, przy zastosowaniu zróżnicowanych temperatur, w celu zapewnienia bezpieczeństwa pacjenta w przypadku preparatu leczniczego stosowanego na skórę.

Spośród dużej ilości stosowanych miejscowo leków o działaniu aseptycznym, chlorheksydyna jest jednym z najczęściej stosowanych w schorzeniach bakteryjnych i grzybiczych. Substancję tę badano także w aspekcie uwalniania z podłoża

polimerowych, w celu zapewnienia odpowiedniej aktywności antybakteryjnej preparatu [8, 9].

W niniejszym badaniu oceniano odczyn rozcieńczonych wodnych rozproszeń zmodyfikowanego poli-(N-izopropylakryloamid) w obecności chlorheksydyny, w temperaturze określonej jako temperatura powierzchni ciała ludzkiego, oraz w temperaturze powyżej i poniżej LCST.

MATERIAŁ I METODY

Materialy

Chlorheksydyna została zakupiona w firmie Sigma-Aldrich. Wodę dejonizowaną otrzymano metodą wymiany jonowej (system TKA DI 6000, Niemcy) i stosowano we wszystkich pomiarach i badaniach. N-izopropylakryloamid. Pozostałe odczynniki do syntezy zakupiono w sieci dystrybucyjnej Sigma-Aldrich.

Stosowane polimery

W niniejszym badaniu zastosowano polimery zsyntetyzowane w poprzednich badaniach metodą SFEP. Synteza w środowisku wodnym przebiegała w temperaturze 343K, w atmosferze gazu obojętnego. Prowadzono ją zgodnie z postępowaniem opisanym przez Peltona [10], rozwiniętym przez Vincenta [11], D'Emanuele'a i Dinarvanda [12]. Podstawową charakterystykę polimerów przedstawiono w tabeli 1.

Skład badanych systemów

Skład badanych układów zestawiono w tabeli 2. Chlorheksydynę mieszano w ciągu 24h z wodną dyspersją zsyntetyzowanego polimeru, w temperaturze nie przekraczającej 25°C.

Pomiary pH

W pomiarach pH wykorzystano specjalistyczny pehametr SevenMulti Metler Toledo z przystawką ION segment, pH/mV/ORP. Zastosowano elektrodę InLab 413, NTC, pH 0–14, 0–80°C, a wszystkie pomiary wykonywano z użyciem wody dejonizowanej i powtarzano pięciokrotnie.

Roztwory buforowe - skład

Przygotowano roztwory buforowe o odczynie 9,18 i 10,01, bowiem ich odczyn był najbardziej zbliżony do pH badanych preparatów [13]. Składy sporządzonych roztworów buforowych przedstawiono w tabeli 3.

WYNIKI

Wyznaczone LCST badanych systemów wynosiło ok. 32°C–36°C. Wraz ze wzrostem temperatury badanych systemów obserwowany odczyn obniżał się. Dla systemu zawierającego PNM-I, pH obniżało się z ok. 9,87 w 25°C do ok. 9,74 w 32°C. Po kolejnym podwyższeniu temperatury do 45°C wartość odczynu spadała do 9,46. Podobny przebieg obserwowano w rozproszeniu chlorheksydyny zawierającym polimer PNM-II. Wysoka wartość odczynu 9,87 w temperaturze 25°C obniżyła się do ok. 9,67 w temperaturze 32°C, a następnie do 9,39. Także w przypadku PNM-III wartości pH obniżały się z 9,94 do 9,46, z wartością pośrednią 9,73 w temperaturze 32°C.

Wykonane pomiary porównano na wykresie na rycinie 1 z przebiegiem zmian pH standartowych buforów o odczynie 9,18 i 10,01, w odpowiednich temperaturach.

W celu dokładniejszej interpretacji wyników badań, wybrany obszar przedstawiony na rycinie 1 przedstawiono powiększony na rycinie 2, dla zakresu temperatury pomiędzy 25°C i 32°C. Pogrubiona przerywana linia przedstawia odczyn rozproszenia chlorheksydyny, który wynosił od 9,78 do 9,79 w tym zakresie. Dla porównania odczyn rozproszenia chlorheksydyny połączonej z polimerem obniżał się, a różnica pomiędzy temperaturą początkową (25°C) i pośrednią (32°C) przyjmowała wartości pomiędzy 0,10 - 0,20 jednostki pH.

DYSKUSJA

Zazwyczaj, wraz ze zmianą temperatury badanej próbki, obserwowane wartości pH zmieniają się także, w sposób zależny od rodzaju badanej substancji. Jak to wynika z przedstawionej w równaniu 1 zależności, odczyn zmienia się wraz ze wzrostem temperatury.

$$\text{pH} = \text{pH}_s - (E - E_s)/k \quad (1)$$

gdzie: E - potencjał (w V) elektrody pomiarowej, E_s - potencjał standardowy (w V) elektrody w znanym pH_s , k - zmiana potencjału na jednostkę pH wyrażona w Voltach, zgodnie z równaniem Nernsta.

W przypadku roztworów buforowych o odczynie alkalicznym obserwuje się niewielki spadek pH wraz ze wzrostem temperatury pomiaru, podczas gdy dla roztworów buforowych o charakterze kwasowym uwiadcniają się w pomiarach pH nieznaczne wzrosty tych wartości. W przebiegu pomiarów pH rozproszeń chlorheksydyny w mieszaninie z badanymi polimerami, obserwowano obniżenie się pH. Obniżka pH wraz ze wzrostem temperatury była obserwowana w powtarzalnych eksperymentach i była statystycznie istotna.

Jako wyjaśnienie mechanizmu obserwowanych zmian odczynu przyjęto termowrażliwy charakter badanych polimerów. Makrocząsteczki polimeru w temperaturze powyżej LCST, pozostają w postaci niemal całkowicie rozwiniętej sieci polimerowej, stąd molekuly chlorheksydyny mogą wykazywać swoją charakterystyczną aktywność jonową. Cząsteczki chlorheksydyny mogą więc swobodnie dyfundować pomiędzy rozwiniętymi łańcuchami polimeru. Faktycznie w badaniach potwierdzono, że początkowy zakres pH, zmierzony w temperaturze 25°C wynosi od 9,87 do 9,94, i spada do zakresu 9,67-9,74 w temperaturze 32°C. Natomiast rozproszenie chlorheksydyny w wymienionym zakresie temperatury, charakteryzuje się względnie stałą wartością odczynu ok. 9,785. Proponowany sposób wyjaśnienia tego zjawiska zilustrowano na rycinie 3.

Gdy badany układ charakteryzuje się temperaturą poniżej LCST, chlorheksydyna (1) może względnie łatwo dyfundować poprzez macierz polimerową (4), pomiędzy chlorheksydyną związaną z polimerem i chlorheksydyną obecną we frakcji wodnej systemu (2) ustala się stan równowagi. Wraz ze wzrostem

temperatury sieć polimerowa (4) zapada się. Chlorheksydyna pozostająca w obrębie sieci polimerowej (3) może ulegać ściślejszemu związaniu z łańcuchami polimeru, tak więc równowaga dynamiczna pomiędzy związaną (3) i niezwiązaną (1) frakcją chlorheksydyny, przesuwa się na korzyść chlorheksydyny związanej.

Pytaniem otwartym pozostaje kwestia, czy polimer - jeśli jest obecny w formie rozwiniętej - wpływa na jonizację chlorheksydyny i w ten sposób wpływa pośrednio na jej rozpuszczalność. Wraz ze wzrostem temperatury pH systematycznie obniża się, a stałe procesu K_A - zgodnie z ryciną 3 - mogą być uszeregowane w następujący sposób: $K_{A(25^{\circ}\text{C})} > K_{A(32^{\circ}\text{C})} > K_{A(45^{\circ}\text{C})}$. W przebiegu badań związków wielkocząsteczkowych o charakterze mikrożeli wykazano możliwość tworzenia się tzw. mezostruktur, zależnych od temperatury pomiaru [14]. Ich obecność może być czynnikiem wpływającym na obserwowany odczyn badanych systemów.

Na osobną ocenę zasługuje powiększony obszar zależności pH od temperatury pomiędzy 25°C i 32°C , przedstawiony na rycinie 3. Niemal horyzontalna, przerywana linia reprezentuje odczyn wodnego rozproszenia chlorheksydyny. Wraz ze wzrostem temperatury obserwowana zmiana odczynu ma wartość nie większą niż 0,01 jednostki pH, podczas gdy w przypadku połączeń z polimerem odczyn obniża się o 0,1-0,2 jednostki pH. Można to wyjaśnić za pomocą początkowego wpływu polimeru, na aktywność jonową chlorheksydyny w rozproszeniu wodnym.

Zgodnie z pracami Blackburn'a [15] chlorheksydyna charakteryzuje się posiadaniem pięciu potencjalnych miejsc jonizacji, a związane z nimi stałe kwasowe pK_a wynoszą od -4,46 do 10,15. Obecność polimeru może wpływać stymulująco na aktywność jonową chlorheksydyny w temperaturze 25°C , aczkolwiek po podwyższeniu temperatury wpływ polimeru może się obniżać, ze względu na zapadanie się sieci polimerowej.

Schemat powyższych zmian zaprezentowano na rycinie 4. W celu dokładniejszej analizy omawianych zjawisk, konieczne jest przeprowadzenie, w dalszych etapach badań, oceny rozpuszczalności chlorheksydyny w obecności polimerów.

WNIOSKI

1. Obecność chlorheksydyny wpływa na obserwowane pH w badanych systemach poli(N-izopropylakryloamid) - chlorheksydyna w zróżnicowanej temperaturze.
2. W badanych systemach przebieg zmian jest podobny we wszystkich przypadkach, w zakresie temperatury pomiędzy 25°C i 45°C. Wartość pH obniża się w zakresie od 9,87-9,94 do 9,38-9,46. Spadek pH w zakresie temperatury pomiędzy 32°C i 45°C jest większy niż spadek pomiędzy 25°C i 32°C, aczkolwiek przebieg tych zmian jest regularny.
3. Preparaty zawierające chlorheksydynę charakteryzują się znacznym spadkiem pH, w porównaniu z samą tylko chlorheksydyną rozproszoną w wodzie.
4. Odczyn formulacji zawierających polimery termowrażliwe, a przeznaczonych do preparatów stosowanych na skórę lub w jamie ustnej, powinien być badany w odpowiednim zakresie temperatury.

LITERATURA

- [1] Panayiotou M., Pohner C., Vandevyver C., Wandrey C., Hilbring F., Freitag R.: Synthesis and characterization of thermo-responsive poly(N,N'-diethylacrylamide) microgels. *React. Funct. Polym.* (2007), 67, 807-819.
- [2] Janczewski D., Tomczak N., Han M.Y., Vancso G. J.: Introduction of Quantum Dots into PNIPAM microspheres by precipitation polymerization above LCST. *Eur. Polym. J.* (2009), 45, 1912-1917.
- [3] Spevacek J.: NMR investigations of phase transition in aqueous polymer solutions and gels. *Current Opinion in Colloids and Interface Science.*(2009), 14, 184-191.
- [4] Ravaine V., Ancla C., Catargi B.: Chemically controlled closed-loop insulin delivery. *J. Control. Release.* (2008), 132, 2-11.
- [5] Saunders J. M., Tong T., Le Maitre C. L., Freemont T. J., Saunders B. R.: A study of pH-responsive microgel dispersions: from fluid-to-gel transitions to mechanical property restoration for load-bearing tissue. *Soft Matter* (2007), 3, 486-494.
- [6] Nolan C. M., Gelbaum L. T., Lyon L. A.: ¹H NMR investigation of thermally

- triggered insulin release from poly(N-isopropylacrylamide) microgels. *Biomacromolecules*. (2006), 10, 2918-2922.
- [7] Wei H., Zhang X. Z., Cheng H., Chen W. Q., Cheng S. X., Zhuo R. X.: Self-assembled thermo- and pH responsive micelles of poly(10-undecenoic acid-b-N-isopropylacrylamide) for drug delivery. *J. Control. Release*. (2006), 116, 266-274.
- [8] Manafi A., Hashemlou A., Momeni P., Moghimi H. R.: Enhancing drug absorption through third-degree burn wound eschar. *Burns*. (2008), 34, 698-702..
- [9] Bowker J. M., Stahl P. H., Preparation of water-soluble compounds through salt formation. [in:] *Pract. Med. Chem.* 3rd Edition, Ed. by Wermuth C. G., Elseviere, Academic Press, France, 2008, pages 747-766
- [10] Pelton R.: Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv. Colloid Interface Sci.* (2000), 85, 1-33.
- [11] Vincent B., Clarke J., Barnett K. G.: The flocculation of non-aqueous sterically-stabilised latex dispersions in the presence of free polymer. *Coll. Surf.* (1986), 17, 51-65.
- [12] D'Emanuele A., Dinarvan R.: Preparation, characterisation, and drug release from thermoresponsive microspheres. *Int. J. Pharm.* (1995), 118, 237-242.
- [13] Polish Pharmacopoeia, Vol. I, page 112, Warszawa, Ministry of Health, 2006.
- [14] Bischofsberger I., Trappe V.: Intriguing behaviour of gels formed by poly-N-isopropylacrylamide particles. [in:] *UK Polymer Colloids Forum*, University of Greenwich, London, 28-29 August, 2008. Abstract Book.
- [15] Blackburn R. S., Harvey A., Kettle L.L., Manian A. P., Payne J. D., Russell S. J.: Sorption of Chlorhexidine on Cellulose: Mechanism of Binding and Molecular Recognition. *J. Phys. Chem. B*. (2007), 111, 8775-8784.

Badanie zostało sfinansowane w ramach programu Marie Curie Transfer of Knowledge Fellowship of the European Community 6th Frame Programme, kontrakt nr MTKD-CT-2005-029540-POLYSURF, i wykonane w Uniwersytecie w Mariborze

Adres autorów

Uniwersytet w Mariborze

Wydział Materiałów Włókienniczych

Laboratorium Chemii Barwników i Polimerów

2000 Maribor, Smetanova 17, Słowenia

tel: +386 2 220-7500, fax: +386 2 220-7990

e-mail: bojana.voncina@uni-mb.si

Akademia Medyczna we Wrocławiu

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku

ul. Szewska 38, 50-139 Wrocław, Polska

tel: +48 71 784-03-15, fax +48 71 784-03-17

e-mail: witold@ktpl.am.wroc.pl

Tabela 1. Główna charakterystyka badanych polimerów

Table 1. Main characteristics of assessed polymers

Oznaczenie Assignment	Charakterystyka Characteristics
PNM-I	Inicjator z anionową grupą funkcyjną Initiator with anionic functional groups
PNM-II	Inicjator z kationową grupą funkcyjną Initiator with cationic functional groups
PNM-III	Komonomer z hydrofobową grupą funkcyjną Co-monomer with hydrophobic functional groups

PNM-I, PNM-II, PNM-III - polimery/polymers

Tabela 2. Skład badanych układów

Table 2. The composition of evaluated dispersions

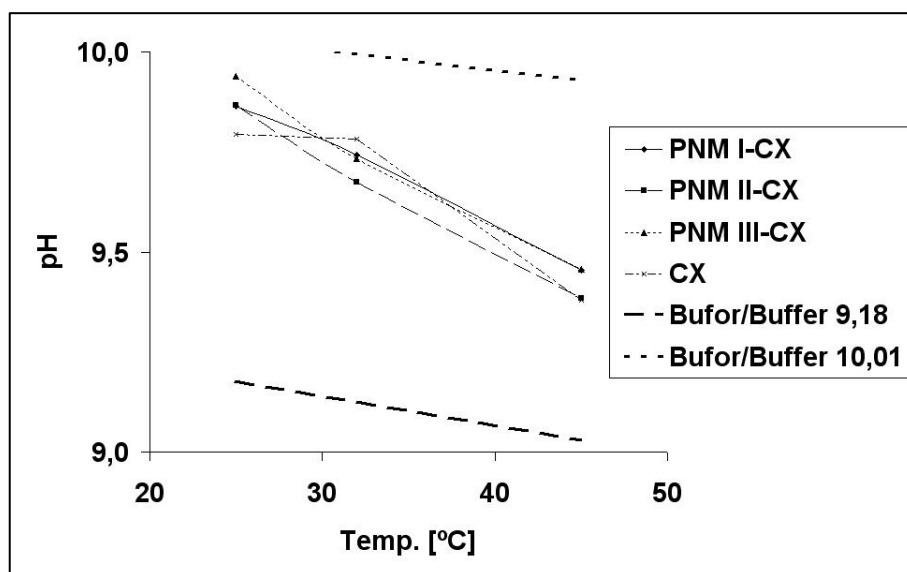
Skład Composition	PNM-I [mg]	PNM-II [mg]	PNM-III [mg]	CX [mg]	Woda Water [g]
PNM-I-CX	2,5	-	-	2,5	30,00
PNM-II-CX	-	2,5	-	2,5	30,00
PNM-III-CX	-	-	2,5	2,5	30,00
CX dispersion/rozproszenie	-	-	-	2,5	30,00

PNM-I, PNM-II, PNM-III - polimery/polymers, CX - chlorheksydyna/chlorhexidine

Tabela 3. Skład roztworów buforowych

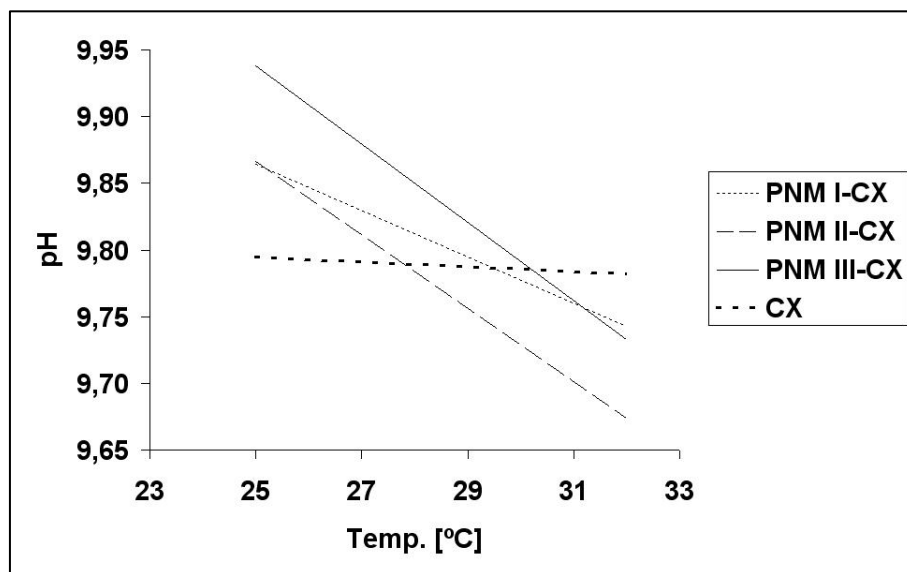
Table 3. Composition of buffer solutions

Składniki Components	Roztwór buforowy Buffer solution pH 9,18	Roztwór buforowy/ Buffer solution pH 10,01
Tetraboran sodu/Disodium tetraborate [M]	0,01	-
Węglan sodu/Sodium carbonate [M]	-	0,0125
Wodorowęglan sodu/Sodium hydrocarbonate [M]	-	0,0125
Objętość roztworu wodnego/Aqueous solution volume [ml]	1000,0	1000,0



Ryc. 1. Wpływ temperatury na odczyn rozproszeń badanych polimerów N-izopropylakrylamidu i chlorcheksydyny

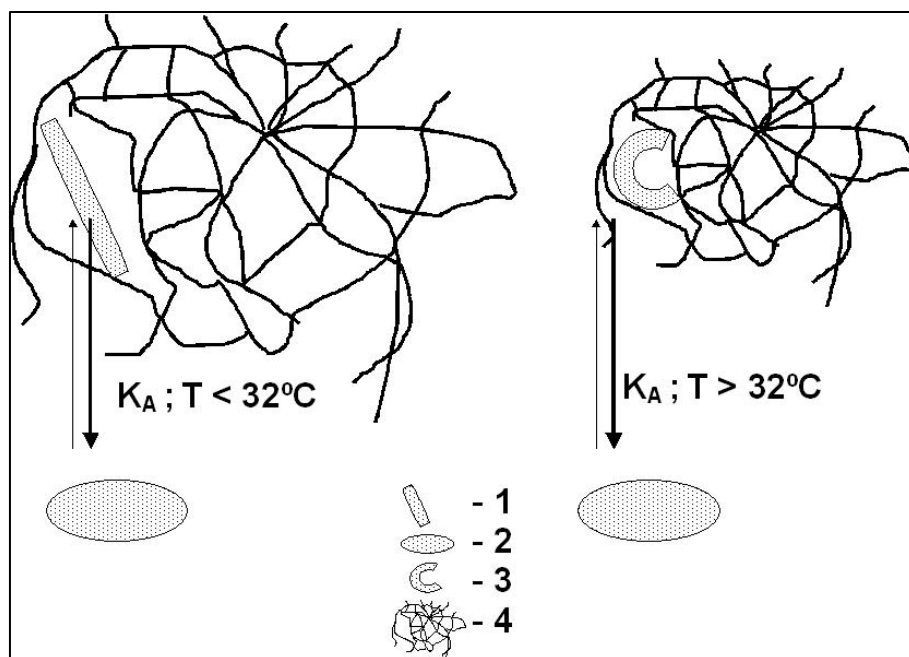
Fig. 2. The pH of dispersions of synthesized polymers and chlorhexidine at different temperatures



Ryc. 2. Wpływ temperatury na odczyn rozproszeń badanych polimerów

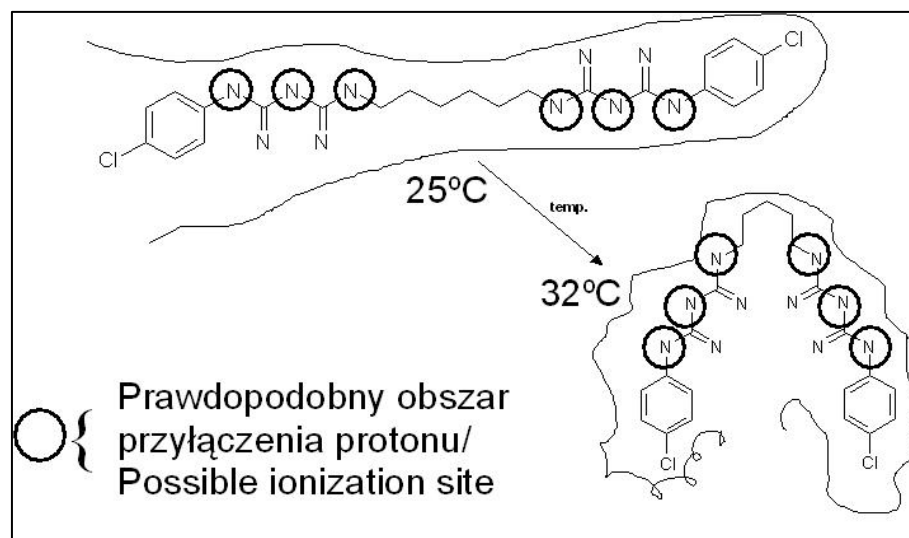
N-izopropylakryloamidu i chlorcheksydney – powiększony obszar

Fig. 2. The pH of dispersions of synthesized polymers and chlorhexidine at different temperatures – the enlarged area



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie równowag dynamicznych w obrębie systemu polimer-chlorheksydyna - objaśnienia w tekście

Fig. 3. Schematic representation of dynamic equilibria in the system polymer-chlorhexidine – details in the tekst



Ryc. 4. Możliwy wpływ polimeru na jonizację cząsteczki chlorheksydyny

Fig. 4. The possible influence of polymer on the ionization of the chlorhexidine molecule