

Zastosowanie pomiarów przewodnictwa do oceny badań kontrolowanego uwalniania chloroheksydyny z termowrażliwych mikrożeli, pochodnych N-izopropylakryloamidu

WITOLD MUSIAŁ^{1, 2}, VANJA KOKOL¹,
BOJANA VONCINA¹

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

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

Streszczenie

Celem pracy była ocena zmian przewodnictwa w środowisku wodnym, zawierającym chloroheksydynę (CX) oraz mikrożel – pochodną N-izopropylakryloamidu, w zakresie temperatur pomiędzy 25°C i 42°C, jako wskaźnika służącego rozwojowi mikrożeli przeznaczonych do kontrolowanego uwalniania chloroheksydyny, pod wpływem zmian temperatury. Wraz ze zmianami temperatury w badanych preparatach wykazano specyficzne zmiany przewodnictwa. W przypadku systemu z polimerem PNM I wartości przewodnictwa były w zakresie 104,47 µS/cm – 134,70 µS/cm, dla zakresu temperatury 25°C – 42°C. Dla preparatu PNM II – CX odpowiednie wartości wynosiły 91,75 µS/cm – 135,95 µS/cm. Najniższe wartości zaobserwowano w przebiegu badania preparatu PNM III – CX. Wyznaczone pomiarowo wartości wynosiły w tym przypadku 96,90 µS/cm – 117,37 µS/cm.

The conductivity measurements applied for the evaluation of controlled release of chlorhexidine from thermosensitive N-isopropylacrylamide derivative microgels

WITOLD MUSIAŁ^{1, 2}, VANJA KOKOL¹,
BOJANA VONCINA¹

¹ University of Maribor, Department
for Textile Materials and Design
Laboratory for Chemistry Dyes
and Polymers, Slovenia

² Wrocław Medical University, Chair and
Department of Pharmaceutical
Technology, Poland

Summary

The aim of the work was the evaluation of the conductivity changes in aqueous environment, consisting of chlorhexidine, and N-isopropylacrylamide derivative microgel, during increasing the temperature between 25°C and 42°C, as a prerequisite to develop the this microgel for controlled release of chlorhexidine, when alterations in temperature are involved. Conductivity of studied systems underwent specific alterations, when temperature increased. For the system with polymer PNM I the values of conductivity were in the range 104,47 µS/cm – 134,70 µS/cm, for temperature range 25°C and 42°C. In the case of PNM II – CX system, respective values reached 91,75 µS/cm – 135,95 µS/cm. The lowest conductivity values were observed when PNM III – CX mixture was studied: 96,90 µS/cm and 117,37 µS/cm.

When a complex of derivatives of N-isopropylacrylamide with chlorhexidine under-

Podczas podwyższania temperatury układu zawierającego chloroheksydynę dochodzi do zmian, które umożliwiają uzyskanie kontrolowanego uwalniania chloroheksydyny z łożyska polimerowego w temperaturach pomiędzy 25°C i 42 °C. Powinowactwo chloroheksydyny do polimeru może być oceniane za pomocą oznaczeń konduktometrycznych. Rozpuszczalność chloroheksydyny w badanych preparatach powinna być w przyszłości przedmiotem dalszych badań, w celu oceny jej współwplywu na zmiany przewodnictwa oceniane w zróżnicowanych temperaturach.

Słowa kluczowe: chloroheksydyna, mikrożel, N-izopropylakryloamid, termowrażliwość, przewodnictwo, kontrolowane uwalnianie

WPROWADZENIE

Chloroheksydyna stanowi skuteczny antyseptyk przeciwko bakteriom płytki nazębnej, a ze względu na tendencję do retencji w błonach śluzowych, uważana jest za jedną z najważniejszych substancji stosowanych w zwalczaniu płytki nazębnej [1]. Również inne potencjalne zastosowania chloroheksydyny przyciągają uwagę badaczy. Rouse i wsp. analizowali irygacje pochwy chloroheksydyną w celu zapobiegania infekcjom dróg rodnych [2]. Chloroheksydyna jest zalecana w celu zmniejszenia śmiertelności i zachorowalności noworodków i matek w ośrodkach, które dysponują niskimi środkami budżetowymi – miejscowe zastosowanie chloroheksydyny u noworodków oraz płukanki dopochwowe u matek w stężeniu 0,25% i 1,00%, zmniejszały wymienioną wcześniej zachorowalność i śmiertelność u matek i niemowląt [3].

Działanie przeciwdrobnoustrojowe chloroheksydyny jest szeroko stosowane w dezynfekcji przedoperacyjnej całego ciała, kiedy konieczne jest wdrożenie profilaktyki zakażeń ran [4]. Zmiany składu flory bakteryjnej na powierzchni skóry były oceniane przez wielu autorów. Zgodnie z tymi danymi codzienne wcieranie chloroheksydyny zmniejszało kolonizację skóry przez odporne na antybiotyki szczepy *Staphylococcus epidermidis* [5]. Pole zastosowań chloroheksydyny obejmuje także procedurę dezynfekcji skóry w przebiegu katetyzacji naczyń krwionośnych [6].

Pochodne N-izopropylakryloamidu o strukturze sferycznej i średnicy ok. 1 µm, wciąż stanowią

goes thermal alteration, there is a potential to obtain controlled release of chlorhexidine from the polymeric bead in the range between 25°C and 42°C. The affinity of chlorhexidine to the polymer may be assessed in this systems applying the conductivity measurements. The solubility of chlorhexidine in the polymeric systems should be in future evaluated, to determine role of this factor in the conductivity alterations.

Key words: chlorhexidine, microgel, N-isopropylacrylamide, pulsed release, thermosensitivity, conductivity

INTRODUCTION

Due to the potency against plaque bacteria, and the tendency to retention on the mucosal surfaces, chlorhexidine is considered to be one of the most effective antiplaque agent [1]. However other potential applications attracted the researchers. Rouse et al. analyzed the vaginal irrigation for the prevention of peripartur infection [2]. Chlorhexidine is advised for reduction of maternal and neonatal mortality and morbidity in the so called low-resource settings; the neonatal, and vaginal chlorhexidine applications demonstrated potential in reducing before mentioned maternal and neonatal mortality and morbidity, in concentrations applied for the irrigation between 0,25 and 1,00% [3].

The antimicrobial activity of chlorhexidine is widely used for the preoperative whole-body disinfection, when prophylaxis against wound infections is required [4]. Changes in skin flora composition were evaluated by many authors. According to that data, the daily scrub with chlorhexidine reduced the skin colonization by antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis* [5]. The application field of chlorhexidine was evaluated to skin disinfection procedure for insertion of peripheral catheters [6].

N-isopropylacrylamide derivatives, structured as spheres of dimension ca. 1 µm attract the researchers, according to the respective thermosensitivity, pH-sensitivity, etc. The new copolymers, consisting the N-isopropylacrylamide, and another comonomer groups are now synthesized, to obtain particles with proper characteristics, including the chemical, physical, and biological properties. The deposition of biologically active components on the microgel carriers was widely studied.

atrakcyjny przedmiot badania, szczególnie ze względu na potencjalne właściwości, takie jak termowrażliwość, wrażliwość na zmiany pH, itd. Nowe kopolimery, zawierające N-izopropyllokaryloamid i inne kopolimery syntetyzowane, są stosowane w celu otrzymania makrocząsteczek o odpowiednich właściwościach chemicznych, fizycznych i biologicznych. Depozycja biologicznie czynnych składników na powierzchni i wewnątrz cząsteczek mikrożelu jest obecnie szeroko badana.

Cząsteczkę protoporfiryny IX wiązano z nowym polimerem, otrzymanym na bazie mikrożelu poli(N-izopropylloakryloamidu) z grupą imidazolową, w celu uzyskania rozpuszczalnych struktur, zawierających liczne jony żelaza [7]. Zhang i współpracownicy zsyntetyzowali nowy, biodegradowalny termowrażliwy mikrożel, o strukturze zbliżonej do Pluronicu F127 i opracowali odpowiednią technikę w celu enkapsulacji trzech białek, tj. natywnej hemoglobiny o masie cząsteczkowej ok. 67.000, wołowej albuminy osoczowej o masie cząsteczkowej ok. 66.000, oraz insuliny o masie cząsteczkowej ok. 5.700 [8]. Termowrażliwe nanocząstki poli(N-winylokaprolaktamu) zastosowano do wiązania trzech modelowych substancji leczniczych, tj. nadololu, propranololu i takryny. Wymienione cząsteczki substancji biologicznie czynnych wpływały na pęcznienie zsyntetyzowanego polimeru: nadolol i propranolol wiązały się mocniej z polimerem wraz ze wzrostem temperatury [9]. Kontrolowane uwalnianie dokсорubiny uzyskano w eksperymentach z zastosowaniem termowrażliwych mikrożeli [10]. Według autorów wspomnianych badań jest to pierwszy przypadek systemu opracowanego w celu symulacji naturalnej sieci polimerowej ciałek wydzielniczych, w którym wykorzystano przemianę fazową w odpowiednim środowisku.

W celu oceny uwalniania oraz charakterystyki substancji aktywnej w obecności różnych nośników, stosowano liczne metody, w tym zalecenia farmakopealne [11]. Jednak ocena obecności cząsteczek substancji czynnej w wewnętrznej lub zewnętrznej fazie badanego systemu, może być prowadzona metodami łączącymi prostotę wykonania z odpowiednią dokładnością.

W poprzednich badaniach autorzy niniejszej pracy zaproponowali ocenę uwalniania chloroheksydyny i lidokainy z jonowych [12] i niejonowych podłoży [13]. Zgodnie z danymi bibliograficznymi uwalnianie substancji czynnej z nośnika do kompartmentu akceptorowego może być badane za pomocą odpowiedniej elektrody, selektywnej wobec wybra-

The iron protoporphyrin IX molecule was bonded to new polymer developed on the basis of imidazole containing poly(N-isopropylacrylamide) microgel, to enable forming of soluble structures containing multiple iron centers [7]. Zhang and coworkers synthesized novel biodegradable thermosensitive microgel with structure similar to Pluronic F127, and evaluated the related technique for the encapsulation of three proteins, i.e. native hemoglobin of molecular weight ca. 67.000, bovine serum albumin of molecular weight ca. 66.000, and insulin of molecular weight ca. 5.700 [8]. Thermosensitive poly(N-vinyl caprolactam) nanoparticles were used for binding of three model drugs, namely nadolol, propranolol, and tacrine. The applied bioactive molecules influenced the swelling of the synthesized polymer, and for nadolol and propranolol increased binding to polymer was observed, with the increase of the temperature of assessments [9]. The triggered delivery of doxorubicine was evaluated in release experiments [10]. According to authors statements this was the first system engineered to mimic the natural polymer network within the secretory granules, applying the phase transition behavior, in respective environment.

To study the release and the behavior of active compounds in the presence of different carriers, numerous methods are applied, including specific pharmacopeial guidelines [11]. However the evaluation of the bioactive molecules presence in the inner and outer phase of the analyzed system, may be performed by more sophisticated, but still simple methods.

In previous studies an approach was made to assess the release of chlorhexidine and lidocaine from ionic [12] and non-ionic gel vehicles [13]. According to the bibliographical data, the drug release from the carrier to the acceptor compartment may be assessed by drug – selective electrode, where a procaine selective membrane was applied [14].

There are also numerous techniques arising on the background of electrochemical methods, which are applied in biosystems based on the nano-science [15]. The conductometrical analysis per se was evaluated with good results for drug release assessments, in the case of controlled drug delivery systems of naltrexone hydrochloride and morphine hydrochloride [16]. The conductometric methods were also applied with success for the assessment of complexation constants of alprostadil – alphacyclodextrin complex [17]. In last work of Abad-Villar et al. the conductivity measurements were involved to detect the chlorhexidine in eye drops preparations [18].

nego leku; zastosowano np. elektrodę selektywną wobec prokainy [14].

Istnieją także liczne metody opierające się na podstawie oznaczeń elektrochemicznych, które stosuje się w badaniach biosystemów w skali nanotechnologicznej [15]. Analiza konduktometryczna jako taka była rozwijana z dobrymi rezultatami w celu badania uwalniania substancji leczniczej z systemów kontrolowanego uwalniania leku, zawierających chlorowoderek naltreksonu, oraz chlorowoderek morfiny [16]. Metoda konduktometryczna była także z sukcesem stosowana w celu oceny stałej kompleksowania systemu alprostadil – alfa cyklodekstryna [17]. W ostatniej pracy Abad-Villar i wsp. badania przewodnictwa były wykorzystywane w celu wykrywania chloroheksydyny w kroplach do oczu [18].

Celem pracy była ocena zmian przewodnictwa w środowisku wodnym, zawierającym chloroheksydynę oraz mikrożel – pochodną N-izopropylakryloamid, w zakresie temperatur pomiędzy 25°C i 42°C, jako wskaźnika służącego rozwojowi mikrożeli przeznaczonych do kontrolowanego uwalniania chloroheksydyny, pod wpływem zmian temperatury.

MATERIAŁY I METODY

Materiały

Polimery

W badaniach zastosowano mikrożele pochodzące z poprzednio wykonanych badań z zakresu chemii mikrożeli. Polimery syntetyzowano w przebiegu polimeryzacji emulsyjnej bez dodatku surfaktanta. Stosowano dejonizowaną wodę, a syntezę prowadzono w temp. 343 K, w atmosferze gazu obojętnego. Podstawowe właściwości polimerów zaprezentowano w tabeli 1.

Chloroheksydynę zakupiono w firmie Sigma Aldrich. Woda oczyszczona pochodziła z urządzenia TKA DI 6000 (Niemcy) i stosowano ją w poniżej opisanych badaniach. N-izopropylakryloamid >99%, inicjatory i komonomery zakupiono od przedsiębiorstw rynkowych.

Skład badanych preparatów

Skład ocenianych preparatów zestawiono w tabeli 2. Podane ilości wagowe chloroheksydyny łącznie z rozproszeniem zszyntetyzowanego polimeru.

TABELA 1. Charakteryzacja zastosowanych w badaniach mikrożeli

TABLE 1. Characterization of microgels applied in the present study

Rodzaj polimeru Polymer assignation	Struktura grupy funkcyjnej Structure of the functional
PNM I	$\text{H}-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{O}-\text{R1}$
PNM II	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{HC} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{R1} \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$
PNM III	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH} \\ \quad \quad \text{R1} \quad \text{O} \end{array}$

The aim of the work was the evaluation of the conductivity changes in aqueous environment, consisting of chlorhexidine, and N-isopropylacrylamide derivative microgel, during increasing the temperature between 25°C and 42°C, as a prerequisite to develop the this microgel for controlled release of chlorhexidine, when alterations in temperature are involved.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Polymers

pNIPAM microgels obtained in previous works in the field of polymer science. The polymers were synthesized by surfactant free emulsion polymerization (SFEP) in de-ionized water at 343 K, under an inert nitrogen atmosphere. The basic property of the polymers is presented in the Table 1.

Chlorhexidine was supplied by Sigma-Aldrich. Water was purified in the TKA DI 6000 system (Germany), and in this form used for all the experiments. N-isopropylacrylamide >99%, initiators and co-monomer were received from commercial suppliers.

TABELA 2. Skład badanych systemów polimerowych

TABLE 2. The composition of assessed systems

Skład Composition	PNM I [mg]	PNM II [mg]	PNM III [mg]	CX [mg]	Woda Water [g]
PNM I – CX	5,00	–	–	5,00	60,00
PNM II – CX	–	5,00	–	5,00	60,00
PNM III CX	–	–	5,00	5,00	60,00
CX	–	–	–	5,00	60,00

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

Mieszanie prowadzono przez dwadzieścia cztery godziny w temperaturze pokojowej.

Ocena konduktometryczna

Przewodnictwo mierzono w ocenianych układach w następujących temperaturach: 25°C, 32°C i 42°C. Przewodnictwo rozproszenia chloroheksydyny oznaczano w stężeniu zastosowanym w badanych preparatach polimer-chloroheksydyna. W pomiarach używano konduktometru SevenMulti Metler Toledo, TDS/SAL/resistivity z czujnikiem InLab 730, NTC, 0,001–1000 mS/cm, o zakresie mierzonych temperatur –5°C–100°C.

WYNIKI

Wraz ze zmianami temperatury w badanych preparatach wykazano specyficzne zmiany przewodnictwa. Zaprezentowano je w kolumnie 3 w tabeli 3. W przypadku systemu z polimerem PNM I wartości przewodnictwa były w zakresie 104,47 $\mu\text{S/cm}$ – 134,70 $\mu\text{S/cm}$, dla zakresu temperatury 25°C–42°C. Dla preparatu PNM II – CX odpowiednie wartości wynosiły 91,75 $\mu\text{S/cm}$ –135,95 $\mu\text{S/cm}$. Najniższe wartości zaobserwowano w przebiegu badania preparatu PNM III – CX. Wyznaczone pomiarowo wartości wynosiły w tym przypadku 96,90 $\mu\text{S/cm}$ –117,37 $\mu\text{S/cm}$.

Odpowiednie wartości dla chloroheksydyny rozproszonej w wodzie były znacznie niższe i wynosiły 46,62 $\mu\text{S/cm}$, 38,08 $\mu\text{S/cm}$ i 41,18 $\mu\text{S/cm}$, kiedy stosowano temperatury odpowiednio 25°C, 32°C i 42°C.

W kolumnie 4 w tabeli 3 bazując na przyjętym założeniu, że przewodnictwo ocenianych systemów

Composition of assessed systems

The composition of evaluated systems was presented in the Table 2. The respective mass of chlorhexidine was composed with synthesized polymer in homogenous mixture. The binding interval was maintained for 24 h, at 22°C.

The conductivity evaluation

The conductivity was evaluated in studied polymeric dispersions, at maintained temperatures: 25°C, 32°C, and 42°C. The conductivity of pure dispersion of chlorhexidine was measured in concentrations applied in the systems. The SevenMulti Metler Toledo, containing conductivity segment TDS/SAL/resistivity with the respective sensor InLab 730, NTC, 0,001–1000 mS/cm, of range –5°C–100°C was used.

RESULTS

Conductivity of studied systems underwent specific alterations, when temperature increased. They are presented in column 3 of Table 3. For the system with polymer PNM I the values of conductivity were in the range 104,47 $\mu\text{S/cm}$ – 134,70 $\mu\text{S/cm}$, in the range between 25°C and 42°C. In the case of PNM II – CX system, respective values reached 91,75 $\mu\text{S/cm}$ – 135,95 $\mu\text{S/cm}$. The lowest conductivity values were observed when PNM III – CX mixture was studied. The data between 96,90 $\mu\text{S/cm}$ and 117,37 $\mu\text{S/cm}$ were observed for this system.

Respective values for CX only, dispersed in water, were much lower. 46,62 $\mu\text{S/cm}$, 38,08 $\mu\text{S/cm}$, and 41,18 $\mu\text{S/cm}$ values were noted, when 25°C, 32°C, and 42°C temperatures were applied.

TABELA 3. Przewodnictwo badanych układów, w których zastosowano polimery i chlorheksydyne

TABLE 3. Conductivity of evaluated systems with polymers and chlorhexidine

Tempe- ratura Tempe- rature [°C]	Typ Type	Przewodnictwo/Conductivity [μS/cm]					
		1*	2	3	4	5	6
		Mikrożel Microgel	CX	Wartości zmierzone CX + mikrożel Measured values CX + microgel	Wartości obliczone CX + mikrożel Estimated values CX + microgel	Różnica Poz. 4 i 3 Difference It. 4 and 3	Przyrost Increase [%]
25	PNM-I	8.73	46.42	104.74 ±0.77 SD	55.15	49.59	47.34
32	PNM-I	10.25	38.08	118.35 ±0.79 SD	48.33	70.02	59.17
42	PNM-I	23.24	41.18	134.70 ±0.24 SD	64.42	70.28	52.17
25	PNM-II	11.61	46.42	91.75 ±1.04 SD	58.03	33.72	36.75
32	PNM-II	24.66	38.08	124.32 ±0.84 SD	62.74	61.58	49.53
42	PNM-II	44.63	41.18	135.95 ±0.61 SD	85.81	50.14	36.88
25	PNM-III	11.79	46.42	96.90 ±0.79 SD	58.21	38.70	39.94
32	PNM-III	13.31	38.08	105.29 ±0.57 SD	51.39	53.90	51.19
42	PNM-III	22.08	41.18	117.37 ±0.71 SD	63.26	54.11	46.10

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

* dane opracowane i przedstawione wcześniej, przy analizie systemów zawierających chlorowodorek lidokainy/
data considered and presented in former research which involved the use of lidocaine hydrochloride, SD – od-
chylenie standartowe/standard deviation

jest wartością addytywną, przedstawiono odpowiednie wartości wyznaczone teoretycznie, obliczeniowo. W przebiegu ogrzewania preparatu PNM I – CX od temperatury 25°C, poprzez 32°C do 42°C, wartości te powinny wzrastać zgodnie z przedstawioną kolejnością: 55,15 μS/cm, 48,33 μS/cm, 64,42 μS/cm. Dla preparatu PNM II – CX odpowiednie wartości wynosiły: 58,03 μS/cm, 62,74 μS/cm i 85,81 μS/cm. W przypadku PNM III – CX uzyskano interesujący ciąg wartości: 58,21 μS/cm, 51,39 μS/cm, 63,26 μS/cm.

Różnice pomiędzy oznaczonymi instrumentalnie i wyznaczonymi teoretycznie wartościami przewodnictwa zebrano w tabeli 3, w kolumnach 5 oraz 6, odpowiednio jako liczby bezwzględne i udział procentowy.

DYSKUSJA

Polimery termowrażliwe w formie małych, sferycznych cząstek posiadają specyficzne właściwości,

In column 4 of the Table 3, basing on the consideration that the conductivity in this systems has additive characteristics, respective theoretical, calculated values are gathered. When PNM I – CX system was heated from 25°C, through 32°C, to 42°C, the values should increase in following manner – 55,15 μS/cm, 48,33 μS/cm, 64,42 μS/cm. For the PNM II – CX system respective values were 58,03 μS/cm, 62,74 μS/cm, and 85,81 μS/cm. In the case of PNM III – CX the values interestingly were ordered as: 58,21 μS/cm, 51,39 μS/cm, 63,26 μS/cm.

The difference between assessed instrumentally and estimated theoretically data are presented as absolute values and as increase in percents, in final two columns, 5 and 6.

DISCUSSION

Thermosensitive polymers, in the form of small spherical particles are characterized by specific prop-

które umożliwiają rozciąganie i zapadanie się sieci polimerowej, kiedy dochodzi do zmian w temperaturze badanego układu. Zmiany w objętości mikrożelu odzwierciedlają się w jego rozpuszczalności, bądź posługując się innym terminem w jego objętości fazowej. Zgodnie z tym, w momencie osiągnięcia tzw. Lower Critical Solution Temperature (LCST) albo określanej w zbliżony sposób Volume Phase Transition Temperature (VPTT), dochodzi do zapadania się mikrocząstki. Konsekwencją zmian objętości mikrocząsteczki staje się zmniejszenie dostępności grup funkcyjnych, ponieważ są one „schowane” wewnątrz zapadającej się mikrocząsteczki. Stąd zapadanie się i rozwijanie mikrosfery w różnych warunkach termicznych wpływa na wiązanie i uwalnianie substancji leczniczej, lub innych małych molekuł w/z mikrożelu. W niniejszym badaniu wpływ temperatury na przewodnictwo preparatów mikrożelowych był oceniany jako pośredni czynnik, odzwierciedlający obecność w preparacie termowrażliwym niezwiązanej substancji o niskiej rozpuszczalności – chloroheksydyny.

Według wykresu na rycinie 1, przewodnictwo preparatu PNM – CX wzrasta wraz ze wzrostem temperatury. W poprzednich badaniach wykazano tendencję wodnych rozprożeń badanych polimerów do wzrostu przewodnictwa wraz ze wzrostem temperatury [19]. Wzrost ten mógł być oceniany jako zależność o charakterze funkcji wykładniczej, z wyjątkiem polimeru PNM II, którego wzrost przewodnictwa był znacznie większy w temperaturze 42°C, porównując z innymi polimerami. Zgodnie z tą informacją, podwyższenie temperatury wpływa na aktywność grup jonowych w obrębie mikrożelu PNM II. Można ten fakt wykorzystać w opracowaniu postaci leku o kontrolowanym uwalnianiu substancji czynnej.

Wzrost przewodnictwa stosowanych w badaniach preparatów był porównywany dla wartości wyznaczonych teoretycznie i oznaczonych w pomiarach. Dane w kolumnie 3 w tabeli 3 były porównywane do wartości w kolumnie 4. Regularne zmiany zaobserwowano w przypadku wszystkich badanych systemów, tzn. przewidywane wartości były ok. 50% niższe od wartości oznaczonych w pomiarach przewodnictwa.

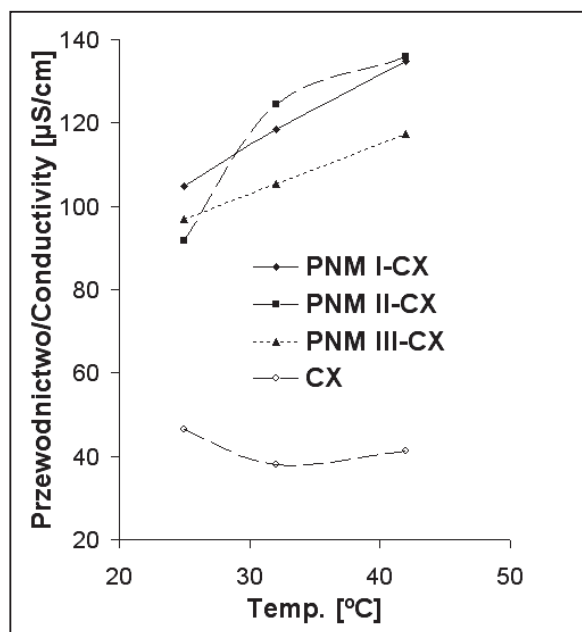
Dla mieszaniny PNM I – CX zmierzone przewodnictwo w temp. 25°C było 47% wyższe od obliczonego. Zgodnie z tym wynikiem można stwierdzić, że w powyższych warunkach temperatury część chloroheksydyny jest lepiej zsolubilizowana, porównując z czystym rozproszeniem chloroheksydyny, lub

erty, which enables expanding and collapsing of the polymeric net, when temperature is altered in evaluated system. The alteration in volume of the particle is reflected by alteration in solubility or in so called phase volume. According to that fact, when Lower Critical Solution Temperature (LCST) or Volume Phase Transition Temperature (VPTT) is exceeded the microparticle collapse. Consequently also the functionals, present in the microparticle should be less available, as they are „hidden” inside of the particle. Hence the collapsing, and expanding of the microsphere at different temperature conditions should influence the binding and the release of the drug, or other small molecules in/from the polymeric bead. Actually, in this study the influence of temperature was assessed as factor influencing the conductivity, which reflects the presence of very sparingly soluble drug – chlorhexidine base in the system containing thermosensitive polymer.

According to the Fig. 1, the conductivity of PNM – CX systems increases with the increase of temperature. In former research we identified the tendency of aqueous dispersions of studied polymers to express increased conductivity when heated [19]. The increase had similar course like the exponential function, with the exception of PNM II polymer, where the increase was much higher at 42°C. This information leads to the suggestion, that the increased temperature influences the activity of ionic groups in the PNM II microgel. That information should lead to the application of the thermosensitive polymer in development of the controlled drug delivery system.

The increase in the conductivity of applied systems in the course of extending temperature was compared between values calculated theoretically and assessed during measurements. The informations from table 3, column 3 were compared to values from the column 4. The regularity was observed in all the cases, i.e. the conductivity predicted, calculated was ca.50% lower than that assessed in the measurements of respective samples. For PNM I – CX mixtures, the measured conductivity at 25°C was 47% higher than that calculated.

According to that it may be assumed, that in this conditions, part of the chlorhexidine is better solubilized than in the case of dispersion of pure chlorhexidine base, or ionization of the total system increased. Also at higher temperatures, 32°C and 42°C, the measured values are 59% and 52% higher, comparing to the theoretically predicted, so there is increase in the presence of ionized substances in the dispersion. We should mention, that this interaction was ob-

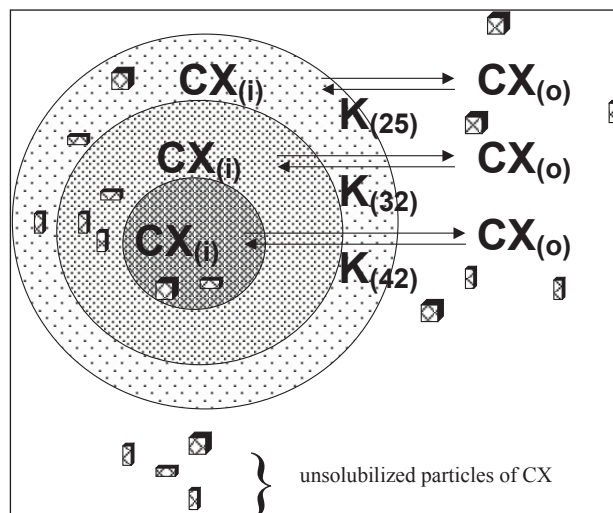


Ryc. 1. Wpływ temperatury na przewodnictwo badanych systemów zawierających polimery i chloroheksydynę, oraz na samą chloroheksydynę w układzie wodnym, PNM I – CX, PNM II – CX, PNM III – CX: odpowiednie mieszaniny polimerów i chloroheksydyny, CX: chloroheksydyna

FIG. 1. Influence of temperature on the conductivity of assessed systems containing polymers and chlorhexidine, PNM I – CX, PNM II – CX, PNM III – CX: respective mixtures of polymers and chlorhexidine, CX: chlorhexidine

jonizacja w całym systemie odpowiednio wzrastała. Także przy wyższych temperaturach 32°C i 42°C, zmierzone wartości wynosiły 59% i 52% więcej, porównując do teoretycznie przewidywanych, tak więc można stwierdzić wzrost ilości zjonizowanych substancji w badanych dyspersjach. Należy tu podkreślić, że interakcja ta była obserwowana, niezależnie od tego czy polimer syntetyzowano z udziałem inicjatora alkalicznego czy kwasowego, aczkolwiek w przypadku PNM I oddziaływanie to było nieco silniejsze.

Podobnie zachowywał się preparat PNM II – CX – przewodnictwo wyznaczone pomiarowo jest tu wyższe od wartości wyliczonych. Biorąc pod uwagę fakt, że PNM II został zsyntetyzowany z udziałem inicjatora alkalicznego istotnie przewodnictwo w tym systemie powinno być nieco niższe niż w preparacie PNM I – CX, ze względu na możliwość cofnięcia dysocjacji chloroheksydyny. Faktycznie zaob-



Ryc. 2. Wizualizacja wiązania chloroheksydyny z mikrożelami, w zależności od temperatury pomiaru. $CX_{(i)}$ – chloroheksydyna związana z mikrożelem, $CX_{(o)}$ – chloroheksydyna poza mikrożelem, gęstość zacielenia odpowiada zmianom morfologicznym zachodzącym w trakcie podwyższania i obniżania temperatury rozproszenia mikrożeli

FIG. 2. Visualization of the influence of temperature on the binding of chlorhexidine with microgels. $CX_{(i)}$ – chlorhexidine bonded to microgels, $CX_{(o)}$ – chlorhexidine outside the microgels, density of the dots represents the alterations during increasing and decreasing the temperature

served, nevertheless the polymer was synthesized with acidic initiator or alkali initiator, however in the case of PNM I it is slightly higher. The PNM II – CX system behaves similarly – the conductivity is regularly higher in the measurements, comparing the predicted and measured values. Regarding the alkali character of the initiator applied in the synthesis, it would be logical result of the interaction between the polymer and drug, that the increase in conductivity is slightly lower, comparing to PNM I – CX system. This happened actually, and in our assessments the resulting values for that system were: 36,75 $\mu\text{S/cm}$, 49,53 $\mu\text{S/cm}$, and 36,88 $\mu\text{S/cm}$ respectively for the temperatures 25°C, 32°C, and 42°C. The difference in range of 10%, could be assigned to the reversed ionization of the chlorhexidine in the presence of polymer synthesized with the use of alkali initiator.

The data from present experiments, will be further developed, including the influence of the increased lipophilicity of PNM III on the conductivity

serwowano w preparacie PNM I – CX następujące wartości przewodnictwa: 36,75 $\mu\text{S/cm}$, 49,53 $\mu\text{S/cm}$ i 36,88 $\mu\text{S/cm}$ odpowiednio dla temperatur 25°C, 32°C i 42°C. Różnica około 10%, może być przypisana zmniejszonej jonizacji chloroheksydyny w obecności grup kationowych pochodzących z inicjatora alkalicznego.

Dane z przeprowadzonych badań będą dalej rozwijane, m. in. w celu oceny wpływu zwiększonej lipofilowości PNM III, na przewodnictwo preparatu z chloroheksydyną. Jak to wynika z tabeli 3, kolumna 6, przewodnictwo PNM III – CX w temperaturach 25°C, 32°C i 42°C może być interpretowane jako pośrednie pomiędzy PNM I – CX i PNM II – CX. Należy wnioskować, że zarówno zwiększona lipofilowość polimeru, jak i obecność grup kwasowych mają wspólny wpływ na stopień jonizacji preparatu PNM III – CX.

Zależności w zakresie przewodnictwa, związane ze zmianami temperatury badanych systemów, przedstawiono na rycinie 2. $K_{(25)}$, $K_{(32)}$ i $K_{(42)}$ odzwierciedlają w badaniu powinowactwo substancji czynnej do mikrożelu, w zmieniających się temperaturach pomiaru konduktometrycznego. Wartości stałej K różnią się nieznacznie w ocenianych systemach i zależą zarówno od rodzaju badanego preparatu, jak i od temperatury. Wartości K dla systemów PNM I – CX, PNM II – CX i PNM III – CX układają się w następujący sposób: $K_{(25)} > K_{(32)} < K_{(42)}$. Jednakże przy porównaniu powinowactwa chloroheksydyny do ustalonego polimeru można ustalić następujący porządek stałych: $K_{(\text{PNM II})} > K_{(\text{PNM III})} > K_{(\text{PNM I})}$. Ważnym czynnikiem, który w przyszłości powinien posłużyć dalszej ocenie oddziaływań polimer-chloroheksydyna w zróżnicowanych temperaturach, jest rozpuszczalność tej substancji czynnej.

WNIOSKI

1. Podczas zmian temperatury układu zawierającego chloroheksydynę dochodzi do zmian, które umożliwiają uzyskanie kontrolowanego uwalniania chloroheksydyny z łożyska polimerowego w temperaturach pomiędzy 25°C i 42°C.
2. Powinowactwo chloroheksydyny do polimeru może być oceniane za pomocą oznaczeń konduktometrycznych.
3. W przypadku kationowego inicjatora polimeryzacji, zgodnie z zaobserwowanymi zmianami przewodnictwem polimer na bazie N-izopropylakrylamidu może być zastosowany w produktach przeznaczonych do kontrolowanego

of the system with chlorhexidine. As it is seen from the Table 3, column 6, the conductivity data for 25°C, 32°C, and 42°C may be interpreted as intermediate level between PNM I – CX and PNM II – CX. We can conclude, that both lipophilicity, and acidity influence the ionization of the PNM III – CX system.

The relations in a microgel particle, according to the alterations in temperature are depicted on Fig. 2. The $K_{(25)}$, $K_{(32)}$, and $K_{(42)}$ values reflect in this study the affinity of the assessed substance to the microgel in altered temperatures, when the conductivity is measured. Actually the K values differ slightly in various systems, depending both on the applied system and temperature of evaluation. When PNM I – CX, PNM II – CX, and PNM III – CX systems are considered, the values are in following pattern: $K_{(25)} > K_{(32)} < K_{(42)}$. However comparing the affinity of chlorhexidine to the polymers following order should be evaluated: $K_{(\text{PNM II})} > K_{(\text{PNM III})} > K_{(\text{PNM I})}$. The important factor, which should be in future additionally analyzed is the solubility of chlorhexidine in evaluated systems.

CONCLUSIONS

1. When a complex of derivatives of N-isopropylacrylamide with chlorhexidine undergoes thermal alteration, there is a potential to obtain controlled release of chlorhexidine from the polymeric bead in the range between 25°C and 42°C.
2. The affinity of chlorhexidine to the polymer may be assessed in this systems applying the conductivity measurements.
3. In the case of cationic initiator involved in the synthesis, according to the observed conductivity changes the N-isopropylacrylamide polymer may be involved in devices, which release chlorhexidine in controlled manner, when increased temperature is applied.
4. Also the N-isopropylacrylamide derivatives synthesized with anionic initiator, and characterized by increased lipophilicity, may exhibit the controlled release during cooling the polymeric beads.
5. The solubility of chlorhexidine in the polymeric systems should be in future evaluated, to determine role of this factor in the conductivity alterations.

This research was financed by a Marie Curie Transfer of Knowledge Fellowship of the European Community 6th Frame Program under contract no. MTKD-CT-2005-029540-POLYSURF, and made at the University of Maribor.

uwalniania chloroheksydyny w podwyższonej temperaturze.

4. Także pochodne N-izopropylakryloamidu zsyntetyzowane z zastosowaniem inicjatora kwasowego i komonomeru lipofilowego, mogą być wykorzystane do kontrolowanego uwalniania chloroheksydyny wraz ze wzrostem temperatury.
5. Rozpuszczalność chloroheksydyny w badanych preparatach powinna być w przyszłości przedmiotem dalszych badań, w celu oceny jej wpływu na zmiany przewodnictwa oceniane w zróżnicowanych temperaturach.

LITERATURA

- [1] MEDLICOTT N. J., HOLBOROW D. W., RATHBONE M. J., JONES D. S., TUCKER J. G.: Local delivery of chlorhexidine using a tooth-bonded delivery system. *J. Control. Release* (1999), 61, 337–343.
- [2] ROUSE D. J., HAUTH J. C., ANDREWS W. W., MILLS B. B., MAHER J. E.: Chlorhexidine vaginal irrigation for the prevention of peripartur infection: A placebo-controlled randomized clinical trial. *Am. J. Obstetr. Gynecol.* (1997), 176, 617–622.
- [3] MCCLURE E. M., GOLDENBERG R. L., BRANDES N., DARMSTADT G. L., WRIGHT L. L.: The use of chlorhexidine to reduce maternal and neonatal mortality and morbidity in low-resource settings. *Int. J. Gynecol. Obstetr.* (2007), 97, 89–94.
- [4] LYNCH W., DAVEY P. G., MALEK M., BYRNE D. J., NAPIER A.: Cost-effectiveness analysis of the use of chlorhexidine detergent in preoperative whole-body disinfection in wound infection prophylaxis. *J. Hosp. Inf.* (1992), 21, 179–191.
- [5] HEDIN G., HAMBRAEUS A.: Daily scrub with chlorhexidine reduces skin colonization by antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Inf.* (1993), 24, 47–61.
- [6] TRAORE O., ALLAERT F. A., FOURNET-FAYARD S., VERRIERE J. L., LAVERAN H.: Comparison of in-vivo antibacterial activity of two skin disinfection procedures for insertion of peripheral catheters: povidone iodine versus chlorhexidine. *J. Hosp. Inf.* (2000), 44, 147–150.
- [7] CORNELIUS V. J., SNOWDEN M. J., SILVER J., FERN G. R.: A study of the binding of the biologically important hematin molecule to a novel imidazole containing poly(N-isopropylacrylamide) microgel. *React. Func. Polym.* (2004), 58, 165–173.
- [8] ZHANG Y., ZHU W., WANG B., DING J.: A novel microgel and associated post-fabrication encapsulation technique of proteins. *J. Control. Release.* (2005), 105, 260–268.
- [9] VIHOLA H., LAUKKANEN A., HIRVONEN J., TENHUU H.: Binding and release of drugs into and from thermosensitive poly(N-vinyl caprolactam) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2002), 16, 69–74.
- [10] KISER P. F., WILSON G., NEEDHAM D.: Lipid-coated microgels for the triggered release of doxorubicin. *J. Control. Release.* (2000), 68, 9–22.
- [11] The United States Pharmacopoeia 31st ed. – The National Formulary 26th ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention Inc.; 2007.
- [12] MUSIAŁ W., KOKOL V., VONCINA B.: The preliminary assessment of chlorhexidine and lidocaine release from preparations of anionic polymer, evaluated by the conductivity measurements. *Polim. Med.* (2009), 39, 3–15.
- [13] MUSIAŁ W., KOKOL V., VONCINA B.: The application of conductivity measurements for preliminary assessments of chlorhexidine and lidocaine hydrochloride release from methylcellulose gel at various temperatures. *Polim. Med.* (2009), 39, 17–29.
- [14] TAN J. P. K., TAM K. C.: Application of drug selective electrode in the drug release study of pH-responsive microgels. *J. Control. Release.* (2007), 118, 87–94.
- [15] AMBROSI A., MERKOCI A., DE LA ESCOSURA-MUNIZ A.: Electrochemical analysis with nanoparticle-based biosystems. *Tr. Anal. Chem.* (2008), 27, 568–584.
- [16] CARABALLO I., ALVAREZ-FUENTES J., MELGOZA L. M., MILLAN M., HOLGADO M. A., RABASCO A. M., FERNANDEZ-AREVALO M.: Validation study of the conductometrical analysis. Application to the drug release studies from controlled release systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (1998), 18, 281–285.
- [17] SHEEHY P. M., RAMSTAD T.: Determination of the molecular complexation constant between alprostadil and alpha-cyclodextrin by conductometry: Implications for a freeze-dried formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2005), 39, 877–885.
- [18] ABAD-VILLAR E. M., ETTER S. F., THIEL M. A., HAUSER P. C.: Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylene biguanide in eye drops by capillary electrophoresis with

contactless conductivity detection. Anal. Chim. Acta. (2006), 561, 133–137.

- [19] MUSIAL W., KOKOL V., VONCINA B.: The use of conductometric assessments for development of pulsed release of lidocaine hydrochloride from thermosensitive N-isopropylacrylamide microgels. Polim. Med. (2009), 41, 39, 4, 15–24.

Badanie zostało wykonane w ramach programu Marie Curie Transfer of Knowledge Fellowship of the European Community 6th Frame Programme, kontrakt nr MTKD-CT-2005-029540-POLY-SURF, 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,
50-139 Wrocław, ul. Szewska 38, Polska
Tel: +48 71 784-03-15, Fax +48 71 784-03-17
witold@ktpl.am.wroc.pl

Author's address

University of Maribor, Department
for Textile Materials and Design,
Laboratory for Chemistry Dyes and Polymers
2000 Maribor, Smetanova Str. 17, Slovenia
Tel: +386 2 220-7500, Fax: +386 2 220-7990
e-mail: bojana.voncina@uni-mb.si

Wroclaw Medical University
Chair and Department of Pharmaceutical
Technology
50-139 Wrocław, Szewska Str. 38, Poland
Tel: +48 71 784-03-15, Fax +48 71 784-03-17
e-mail: witold@ktpl.am.wroc.pl

