

Badania reologiczne i analiza tekstury termowrażliwych hydrożeli dopochwowych z chlorowodorkiem benzydaminą

The rheological and textural characteristics of thermosensitive vaginal hydrogels with benzydamine hydrochloride

Tomasz Osmałek¹, Anna Froelich¹, Barbara Jadach¹, Katarzyna Ancukiewicz¹,
Piotr Gadziński¹, Dorota Wagner¹, Wojciech Białas²

¹ Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp. Infekcje dróg rodnych należą do najczęściej diagnozowanych schorzeń kobiecych. Leczenie polega zazwyczaj na miejscowym stosowaniu antybiotyków lub innych środków ograniczających rozwój infekcji, a także substancji przeciwzapalnych. Wśród aktualnie prowadzonych badań, zmierzających do uzyskania nowych dopochwowych postaci leku, na uwagę zasługują prace dotyczące hydrożeli termowrażliwych. Dzięki unikalnej zdolności do zwiększania lepkości pod wpływem temperatury ciała, preparaty na ich bazie można łatwo aplikować w formie płynnej, dzięki czemu dokładnie wypełniane jest miejsce leczone. Następnie, pod wpływem temperatury ciała, formułacje takie zwiększają swoją lepkość i w efekcie utrzymują się dłużej w miejscu podania, co przekłada się między innymi na wzrost skuteczności leczenia. **Materiał i metody.** Głównym celem badań była ocena właściwości mechanicznych hydrożeli na bazie poloksameru 407, zawierających różne stężenia chlorowodoru benzydaminą (BD) (0,5 oraz 1,5%). Jako składniki dodatkowe zastosowano również dwa polimery mukoadhezyjne: wysokometylowaną pektynę (PK) oraz hydroksypropylometylocelulozę (HPMC). W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę reologiczną z wykorzystaniem reometru rotacyjnego HAAKETM RheoStress 1 (*Thermo Scientific*) wyposażonego w układ geometryczny typu płytka-płytką, o średnicy 35 mm. Badania obejmowały wykreślenie krzywych płynięcia, wykonanie testów pełzania i powrotu, jak również przemiatanie próbek amplitudą i temperaturą, przy stałej częstotliwości oscylacji. Uzyskane dane zostały wykorzystane do wyznaczenia punktów płynięcia, oceny stopnia powrotu do formy pierwotnej oraz wskazania temperatury przejścia żol-żel. Kolejnym etapem była analiza teksturometryczna wykonana z użyciem analizatora tekstury TA-XT2i (*Stable Micro Systems*). Wykreślone profile tekstury zostały wykorzystane do obliczenia takich parametrów, jak twardość, adhezyjność oraz ściśliwość. Ostatnim etapem było wyznaczenie pH oraz osmolarności żeli. **Wyniki.** Okazało się, że badane formułacje należą do układów pseudoplastycznych, rozrzedzanych ścinaniem. Krzywe płynięcia, testy pełzania i powrotu sprężystego oraz badania oscylacyjne pozwoliły stwierdzić, że wzrost stężenia substancji aktywnej wpłynął na rozluźnienie sieci polimerowej, czego efektem był spadek lepkości. Temperatura żelowania mieściła się w granicach 27,2-30,3°C. **Wnioski.** Największą twardością, adhezyjnością oraz ściśliwością odznaczały się żele zawierające 0,5% chlorowodoru benzydaminą (BD) oraz dodatek HPMC. Najbardziej zbliżone pH do warunków fizjologicznych pochwy posiadały żele zawierające pektynę. Z kolei wszystkie formułacje posiadały osmolarność wyższą niż śluz pochwowy. (*Farm Współ* 2018; 11: 72-82)

Słowa kluczowe: poloksamer, hydrożel, chlorowodorek benzydaminą, reologia, tekstura

Abstract

Introduction. Vaginal infections and vaginitis are the most frequently diagnosed female disorders. The therapy most often involves local administration of antibiotics, microbicides or anti-inflammatory agents. One of the most important directions among currently conducted studies is focused on thermosensitive hydrogels. Because of their unique ability to increase viscosity at physiological temperature, these formulations can be easily administered in a liquid form which enables filling the cavity in which the disease is located. In the next step, upon the body temperature the dosage form is increasing its viscosity and as a result stays at the administration

site for a prolonged time which results in the increase of therapeutic efficiency. **Material and methods.** The main objective of this study was to investigate the mechanical properties of hydrogels containing poloxamer 407 with different concentrations of benzydamine hydrochloride (BD) (0.5 and 1.5%). As mucoadhesive components, high-methoxyl pectin (PK) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) were applied. The samples were subjected to rheological analyses performed with HAAKETM RheoStress 1 (*Thermo Scientific*) equipped with plate-plate geometry (diameter: 35 mm). The studies comprised flow analyses, creep and recovery tests, as well as oscillatory stress and temperature sweep tests at constant oscillatory frequency. The obtained results were employed to assess the yield stress values, sol-gel transition temperatures and the ability to recover the original sample structure. In the next step, the textural studies were performed with the use of texture analyzer TA-XT plus (*Stable Micro Systems*). From the obtained texture profiles parameters like hardness, adhesiveness and compressibility were calculated. In the last step pH and osmolality of the investigated systems were measured. **Results.** The obtained results indicate that the analyzed formulations are pseudoplastic fluids revealing shear-thinning properties. Flow curves, creep and recovery tests and oscillatory analyses revealed that the increase of active ingredient content resulted in loosening the polymer network which was observed as a decrease of viscosity values. Sol-gel transition temperature ranged from 27.2 to 30.3°C. **Conclusions.** The highest hardness, adhesiveness and compressibility were recorded for the samples containing 0.5% of BD and HPMC as an additive. The pH values closest to the physiological range were obtained for the hydrogels with pectin. Moreover, all of the investigated samples revealed higher osmolality than the vaginal mucus. (*Farm Współ* 2018; 11: 72-82)

Keywords: poloxamer, hydrogel, benzydamine hydrochloride, rheology, texture

Wstęp

Stan zapalny narządów rodnych to jedna z najczęściej spotykanych dolegliwości ginekologicznych [1]. Zazwyczaj jest efektem osłabienia naturalnej bariery mikrobiologicznej pochwy, co może prowadzić do zakażeń wywołanych przez chorobotwórcze bakterie, grzyby lub pierwotniaki [2,3]. Za główne przyczyny uznaje się długotrwałą antybiotykoterapię oraz zaburzenia gospodarki hormonalnej, którym często towarzyszy zmiana odczynu środowiska pochwy na zasadowy [4]. Jako czynniki pośrednie można wymienić stosowanie niewłaściwych środków higieny osobistej lub używanie nieodpowiedniej bielizny. Niepokojące objawy występują często w czasie ciąży, w trakcie zastępczej terapii hormonalnej lub podczas stosowania doustnych środków antykoncepcyjnych [5]. Wśród najczęściej opisywanych dolegliwości, towarzyszących stanowi zapalnemu pochwy, wymienia się upławy, uczucie podrażnienia, swędzenie, pieczenie, ból oraz obrzęk [6,7].

Obecnie na rynku farmaceutycznym dostępne są różnego rodzaju preparaty OTC (wydawane bez recepty lekarskiej; ang. *Over The Counter*), które zwalczają przyczynę stanów zapalnych pochwy, usuwają nieprzyjemne objawy, regenerują i przywracają fizjologiczne funkcje błony śluzowej, jak również zapewniają odpowiedni stopień nawilżenia. Do najczęściej stosowanych

postaci należą globulki [8], kremy i żele [9] oraz tabletki dopochwowe [10]. Dużą popularnością cieszą się także probiotyki doustne lub dopochwowe, zawierające wyselekcjonowane szczepy bakterii kwasu mlekowego (*Lactobacillus* sp.) [11]. Popularnym preparatem jest również proszek do przygotowania irygacji, którego składnikiem aktywnym jest chlorowodorek benzydminy [12]. Benzydmina to substancja zaliczana do pochodnych indazolu [13]. Wśród najważniejszych działań terapeutycznych benzydminy wymienia się aktywność przeciwzapalną, działanie przeciwobrzękowe, przeciwbólowe, jak również miejscowo znieczulające. Wykazano także aktywność antyseptyczną w odniesieniu do różnego rodzaju grzybów oraz bakterii [14]. Obecnie benzydmina jest stosowana w leczeniu stanów zapalnych mięśni i ścięgien w postaci kremu oraz żelu. Z kolei tabletki do ssania, płyny do rozpylania i płukania wykorzystywane są w terapii zapaleń jamy ustnej i gardła oraz po ekstrakcji zębów [15]. Proszek do irygacji cieszy się dużym zainteresowaniem wśród pacjentek leczących stany zapalne pochwy, jak również stosujących go w celu utrzymania odpowiedniej higieny i przyspieszenia procesu gojenia w okresie poporodowym. Jednak pomimo skuteczności oraz zadowalających efektów terapeutycznych, jako niekorzystną cechę wymienia się konieczność wcześniejszego przygotowania roztworu. Ponadto

ograniczony czas kontaktu preparatu z błoną śluzową pochwy stwarza konieczność powtarzania aplikacji w ciągu dnia. Ze względu na specyficzne warunki ochronne panujące w pochwie, podanie leków tą drogą może być kłopotliwe. Tradycyjnie stosowane postaci, takie jak maści lub wkładki często powodują dyskomfort. Zdecydowanie lepiej tolerowane są w tym przypadku żele lecznicze [16,17]. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się hydrożele polimerowe o strukturze warunkującej przedłużone uwalnianie substancji aktywnej [18,19]. Mając na uwadze powyższe informacje, uzasadnione wydają się badania nad opracowaniem preparatu zawierającego chlorowodorek benzydamininy w formie hydrożelu. Bez wątpienia taka postać zapewni wygodniejszą aplikację, jak również zagwarantuje dłuższy kontakt z błoną śluzową pochwy, a tym samym przyczyni się do wzrostu efektywności leczenia [20,21]. Spośród dostępnych polimerów, które można wykorzystać jako podłoża dla hydrożeli dopochwowych, idealnym kandydatem wydaje się poloksamer 407, będący kopolimerem tlenku etylenu (ang. *ethylene oxide*; EO) z tlenkiem propylenu (ang. *propylene oxide*; PO). Jest to polimer niejonowy, nietoksyczny, dlatego znalazł już zastosowanie jako nośnik dla substancji leczniczych podawanych drogą doustną, donosową, doodbytniczą, do oka oraz w postaci parenteralnej [22,23]. Na uwagę zasługuje fakt, że wodne roztwory poloksameru 407, o stężeniu powyżej 15% wykazują właściwości termowrażliwe. W niższych temperaturach występują w postaci płynnej, natomiast po przekroczeniu temperatury granicznej ($T_{\text{zol-żel}}$) przechodzą do formy półstałej. Zjawisko to nosi nazwę odwrotnego żelowania termicznego. Nie ulega wątpliwości, że roztwór żelujący w warunkach *in situ* stanowi interesującą alternatywę dla tradycyjnych postaci leku, przeznaczonych do podania drogą dopochwową [24,25].

Material i metody

Chlorowodorek benzydamininy (numer serii: 80061667, w pracy oznaczony jako BD) został nieodpłatnie przekazany do badań przez ICN *Polfa Rzeszów* (Polska). Poloksamer 407 (Kolliphor®F127, numer serii: BCBH0774V, w pracy oznaczony jako P407), hydroksypopylometyloceluloza (numer serii: NYGH05889S, w pracy oznaczona jako HPMC) zostały kupione w *Sigma Aldrich* (Saint Louis, MO). Pektyna wysokometoksylovana (Genu® Pectin /citrus/ Type USP/100 numer serii: SK13653, w pracy oznaczona

jako PK) została przekazana do badań przez *CP Kelco U.S. Inc.* (Atlanta, USA). Glukonian chlorheksydyny 20% (numer serii: 020705, w pracy oznaczony jako CHG) został kupiony w *Polfa-Łódź SA* (Polska). Wodę dejonizowaną otrzymywano bezpośrednio przed badaniami z wykorzystaniem zestawu *Simplicity® Water Purification System* produkcji *Merck Millipore* (Darmstadt, Germany).

Skład i sposób przygotowania hydrożeli

Składy hydrożeli wykorzystanych do badań przedstawiono w tabeli I. W przypadku formułacji 1 oraz 2 przygotowano w zlewce odpowiednią ilość wody dejonizowanej, schłodzonej wcześniej do temperatury $4,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Natomiast dla formułacji 3-6 na powierzchnię wody o temp. pokojowej sypano odpowiedni polimer (PC – pektyna wysokometylovana lub HPMC – hydroksypopylometyloceluloza) i po spęcznieniu mieszano, ogrzewając do temp. $80,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Następnie roztwór polimeru chłodzono do temp. $4,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. We wszystkich przypadkach naczynie umieszczano w parownicze wypełnionej lodem. Podczas mieszania z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego *RET control-visc (IKA®, Staufen, Niemcy)* do zlewek z ochłodzoną wodą lub roztworem polimeru dodawano porcjami P407 mieszając do całkowitego rozpuszczenia. Następnie rozpuszczano odważony wcześniej chlorowodorek benzydamininy oraz dodawano roztwór glukonianu chlorheksydyny. Przed badaniami otrzymane hydrożele termostatowano w cieplarni z funkcją chłodzenia KB 115 (*Binder, Gleisdorf, Austria*) w temp. $4,0\text{-}5,0^{\circ}\text{C}$ przez 24 h.

Ocena parametrów reologicznych

Do oceny właściwości reologicznych wykorzystano reometr *HAAKE™ RheoStress1*, wyposażony w termostat *HAAKE™ DC30 (ThermoElectron Corp., Waltham, USA)* z oprogramowaniem *HAAKE RheoWin Job Manager*. Badania prowadzono w tytanowym układzie geometrycznym typu płytka-płytką o średnicy 35 mm. Przed pomiarem schłodzone żele w formie płynnej ($4,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) pobierano strzykawką ($1,5\text{ cm}^3$) i umieszczano w cieplarni KB115 (*Binder, Gleisdorf, Austria*) w temp. $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ do zastygnięcia. Po 20 min próbkę wprowadzano na dolną płytkę układu geometrycznego i opuszczano płytkę górną. Wysokość szczeliny pomiędzy płytkami wynosiła 1,0 mm. Nadmiar próbki usuwano szpательką. Wszystkie badania reologiczne prowadzono

Tabela I. Składy hydrożeli wykorzystanych do badań (P407 – poloksamer 407, BD – chlorowodorek benzydamin, PC – pektyna, HPMC – hydroksypropylometyloceluloza, CHG – glukonian chlorheksydyny)

Table I. The percentage compositions of the hydrogels used for the experiments (P407 – poloxamer 407, BD – benzydamin hydrochloride, PC – pectin, HPMC – hydroxypropylmethylcellulose, CHG – chlorhexidinum gluconicum)

Formulacja	Składnik	Woda [g]	P407 [g]	BD [g]	PK [g]	HPMC [g]	CHG [g]
1		82,45	17,0	0,5	–	–	0,05
2		81,45	17,0	1,5	–	–	0,05
3		81,95	17,0	0,5	0,5	–	0,05
4		80,95	17,0	1,5	0,5	–	0,05
5		81,95	17,0	0,5	–	0,5	0,05
6		80,95	17,0	1,5	–	0,5	0,05

w temperaturze $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Po 2 min od nałożenia próbki (stabilizacja) wykonywano ścinanie wstępne przy prędkości ścinania równej 200 s^{-1} w czasie 5 s. Wszystkie oznaczenia powtarzano trzykrotnie ($n = 3$).

Krzywe płynięcia w trybie kontrolowanego naprężenia ścinającego

Analizę przeprowadzono w zakresie wartości naprężenia stycznego $1,0 \rightarrow 250,0 \text{ Pa}$. Czas pomiaru wynosił 30 s. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 1 w postaci zależności szybkości ścinania od naprężenia stycznego.

Test pełzania i powrotu sprężystego

W pierwszej kolejności próbkę poddawano działaniu naprężenia stycznego o wartości 20 Pa w czasie 60 s. Następnie usuwano naprężenie styczne i badano zachowanie próbki w czasie 180 s (test powrotu). Wyniki przedstawiono na rycinie 2 jako zależność modułu podatności J [$1/\text{Pa}$] od czasu. Podatność zdefiniowano za pomocą równania 1:

$$J = \frac{\gamma}{\tau} \quad (1)$$

gdzie:

γ – odkształcenie [-]

τ – naprężenie ścinające [Pa].

Analiza oscylacyjna – przemiatanie naprężeniem

Próbki poddawano działaniu wzrastającego naprężenia stycznego w zakresie $0,1 \rightarrow 150,0 \text{ Pa}$, przy stałej wartości częstotliwości oscylacji $f = 1,0 \text{ Hz}$. Wyniki przedstawiono na rycinie 3, w postaci zależności modu-

łów sprężystości G' oraz lepkości G'' od zmiennego naprężenia stycznego.

Analiza oscylacyjna – przemiatanie temperaturą

Test przemiatania temperaturowego w warunkach oscylacji przeprowadzono przy naprężeniu stycznym równym $10,0 \text{ Pa}$. Częstotliwość oscylacji wynosiła $1,0 \text{ Hz}$. Podczas eksperymentu zastosowano przyrost temperatury w zakresie $25,0$ – $32,0^{\circ}\text{C}$. Wyniki przedstawiono na rycinie 4, jako zależność procentowego przyrostu modułu sprężystości G' od temperatury. Temperaturę żelowania próbek odczytywano przy 50-procentowym przyroście G' . Wyniki przedstawiono w tabeli II.

Analiza tekstury

Profile tekstury zostały wykreślone z wykorzystaniem analizatora tekstury TA-XT2i (Stable Micro Systems, Godalming, Wielka Brytania). Podczas pomiaru żele znajdowały się w pojemnikach polipropylenowych. Stalowy sensor cylindryczny o średnicy 20 mm był zanurzany dwukrotnie w każdej próbce z prędkością 1 mm s^{-1} na głębokość 18 mm. Czas pomiędzy zanurzeniami wynosił 20 s. Testy wykonywano w temperaturze $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Na podstawie przebiegu profili tekstury (rycina 5) obliczono takie parametry, jak twardość, ściśliwość oraz adhezyjność (tabela III).

Pomiar pH i osmolarności hydrożeli

Pomiar wartości pH hydrożeli wykonano z wykorzystaniem pH-metru CG 842 (Schott GmbH, Niemcy) w temperaturze $20,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Osmolarność hydrożeli zmierzono z wykorzystaniem osmometru Marcel OS

3000 (Merazet, Polska). Objętość próbek wynosiła 200 µl. Wyniki obu powyższych badań przedstawiono w tabeli II.

Wyniki i dyskusja

Efektywna terapia stanów zapalnych pochwy z wykorzystaniem preparatów hydrożelowych zależy w dużej mierze od właściwości podłoża [26]. Dobór składników wpływa między innymi na kontakt z błoną śluzową oraz uwalnianie substancji leczniczej w odpowiednio długim czasie [27]. Ważne jest również, aby podłoże było nietoksyczne, dobrze tolerowane przez pacjentów oraz nie wykazywało interakcji z lekiem. Z danych literaturowych wynika, że wymienione właściwości posiada poloksamer 407, będący kopolimerem polioksyetylenu z polioksypropylenem, który znalazł już szereg zastosowań w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz medycynie [23]. W odniesieniu do hydrożeli dopochwowych istotne znaczenie ma również zjawisko mukoadhezji, czyli przejściowe łączenie się z błoną śluzową, co przekłada się między innymi na czas przebywania w miejscu aplikacji, a co za tym idzie skuteczność leczenia. Dlatego też w skład badanych formuacji wchodziły polimery mukoadhezyjne: wysokometoksylovana pektyna (PC) [28,29] lub hydroksypropylometyloceluloza (HPMC) [30], które zastosowano w stężeniu 0,5%.

Skład i sposób przygotowania hydrożeli

Hydrożele zawierające sam poloksamer 407 oraz z dodatkiem HPMC były transparentne. Natomiast próbki zawierające pektynę wykazywały niewielkie zmętnienie i były barwy jasno słomkowej. Ocena wizualna nie wykazała występowania niejednorodności w postaci nierozpuszczonych skupisk polimerowych. Podczas przechowywania w temp. 4,0-5,0°C przez 24h nie zaobserwowano żadnych zmian w postaci zmętnienia, osadu lub rozwarstwienia próbek.

Ocena parametrów reologicznych

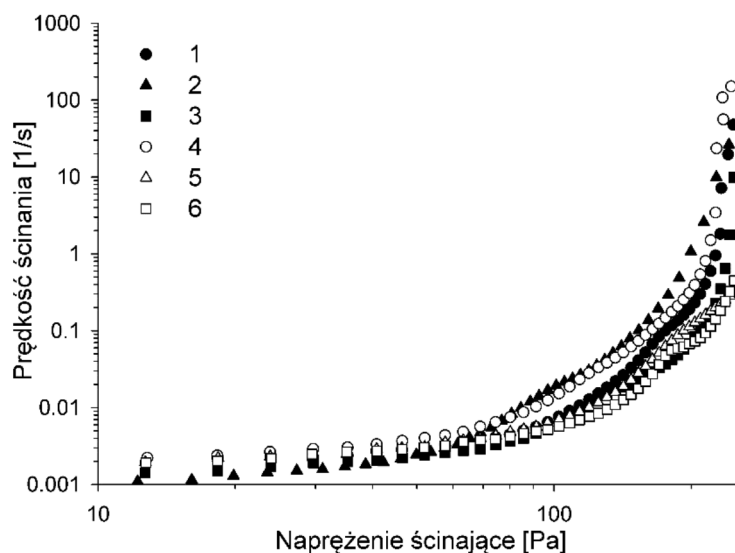
Krzywe płynięcia w trybie kontrolowanego naprężenia ścinającego

Analiza reologiczna w trybie kontrolowanego naprężenia (ang. *controlled stress*) polegała na pomiarze zmian wartości prędkości ścinania, które towarzyszyły wzrastającemu naprężeniu. Jak wynika z zależności przedstawionych na rycinie 1, badane hydrożele posiadają cechy układów nienewtonowskich pseudoplastycznych. W miarę wzrostu szybkości ścinania

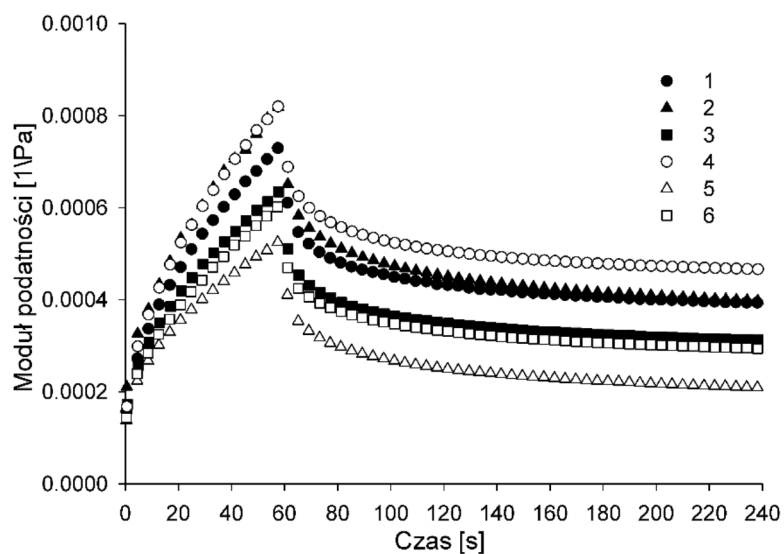
układy takie wykazują tendencję do rozrzedzania, czyli zmniejszania lepkości. Istotnym parametrem w odniesieniu do hydrożeli, mającym znaczenie nie tylko podczas aplikacji przez pacjenta, ale również odgrywającym dużą rolę na etapie procesu technologicznego jest punkt (granica) płynięcia. Jest to graniczna wartość siły niezbędnej do rozpoczęcia procesu płynięcia [31]. W praktyce ten parametr przekłada się między innymi na rozsmarowywalność danego preparatu lub na warunki, jakie należy zastosować w trakcie procesów produkcyjnych (mieszanie, przetłaczanie przez rury, napełnianie pojemników). Wykorzystując wykreślone zależności wyznaczono punkty płynięcia jako wartość naprężenia stycznego odpowiadającą punktom przecięcia dwóch stycznych poprowadzonych dla każdego z ramion wykresu przed oraz za punktem przegięcia. Wartości zostały przedstawione w tabeli II. Jak wynika z przedstawionych danych, dodatek benzydminy powodował rozrzedzenie struktury hydrożeli. Podobne zjawisko zaobserwowali Ricci i wsp. dla układów zawierających P407 i chlorowodorek lidokainy [32]. W przypadku analizowanych w pracy żeli złożonych efekt ten był najsilniejszy w przypadku formuacji zawierających wyłącznie P407. Upłynnienie struktury było słabsze w żelach z pektyną. W przypadku próbek z HPMC benzydmina rozrzedzała żele w najmniejszym stopniu. W odniesieniu do efektów związanych z polimerami mukoadhezyjnymi, można stwierdzić, że HPMC usztywniała strukturę P407 silniej niż PC, przy czym zjawisko to było bardziej zauważalne przy mniejszym stężeniu BD.

Test pełzania i powrotu sprężystego

Jedną z metod oceny właściwości lepkosprężystych materiałów jest test pełzania i powrotu sprężystego. W fazie pełzania pod wpływem działającej siły (naprężenia) próbka ulega deformacji, która jest obrazowana przez zmiany modułu podatności. W przypadku układów typowo sprężystych po ustaniu działania siły deformacja znika całkowicie. Wówczas energia jest odzyskiwana w 100%. Wyniki testu uzyskane dla badanych żeli przedstawiono na rycinie 2 jako zależność modułu podatności od czasu. Jak widać, w fazie pełzania największą podatność wykazywał żel 2, zawierający BD w stężeniu 1,5%, bez dodatku polimerów mukoadhezyjnych. Z kolei najmniej podatny na deformację okazał się żel nr 5, zawierający HPMC oraz BD w stężeniu 0,5%. Ponadto w tabeli II przedstawiono wartości parametru $(J_r/J_{max}) \cdot 100\%$,



Rycina 1. Krzywe płynięcia badanych hydrożeli wykreślone w trybie kontrolowanego napężenia stycznego
Figure 1. The flow-curves plotted for the hydrogels in the controlled stress mode



Rycina 2. Zmiany modułu podatności w czasie podczas testu pełzania i powrotu
Figure 2. The changes of susceptibility modulus in time during the creep and recovery test

gdzie J_{max} to maksymalna wartość podatności w fazie pełzania, natomiast J_r odpowiada różnicy pomiędzy J_{max} i wartością podatności po osiągnięciu stanu równowagi w trakcie powrotu [33]. Dane liczbowe uzyskane w badaniu potwierdziły, że najbardziej sprężysty był

żel 5, natomiast najmniejszą tendencję do powrotu do pierwotnego kształtu wykazywał żel 2.

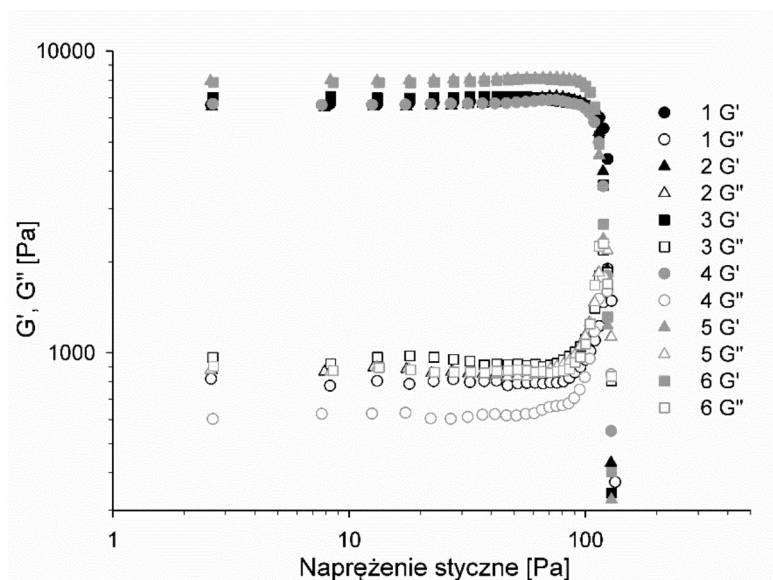
Analiza oscylacyjna – przemiatanie napężeniem

Analiza polegała na ocenie zmian wartości modu-

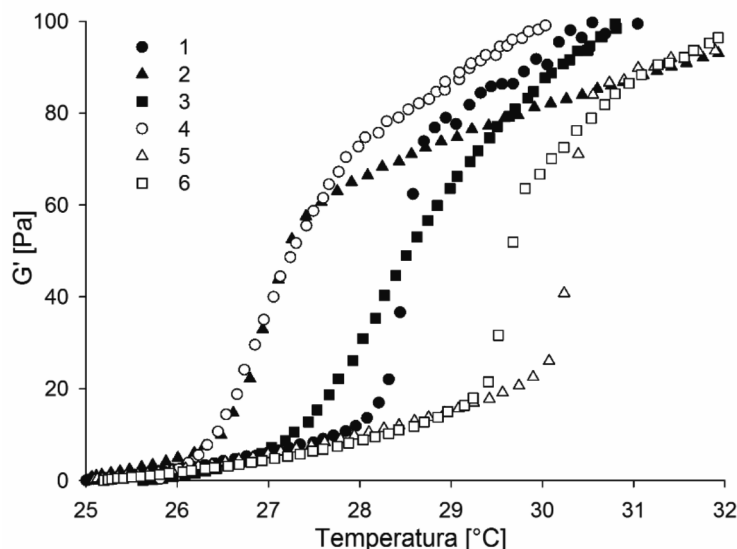
łów sprężystości G' oraz lepkości G'' pod wpływem przyrastającego naprężenia stycznego w warunkach stałej oscylacji. Jak wynika z ryciny 3, przy wartościach naprężenia w zakresie 1,0-70,0 Pa wartości G' nie zmieniały się. Ten odcinek uznano za liniowy zakres lepkośćsprężystości (ang. *linear viscoelastic regime*). Odpowiada on stanowi próbki, w którym sieć polimerowa zachowuje się podobnie do ciała stałego, reagując sprężystością na działającą siłę. Po przekroczeniu 70,0 Pa można zaobserwować tendencję spadkową wartości G' oraz wzrostową G'' . Świadczy to o tym, że w układzie zaczynają słabnąć oddziaływania pomiędzy łańcuchami polimerowymi tworzącymi sieć przestrzenną, a zaczyna dominować odpowiedź lepka badanego układu. W wyniku dalszego wzrostu naprężenia, wartości obu modułów ulegały zrównaniu, co świadczyło o całkowitym zniszczeniu sieci polimerowej oraz wejściu badanego układu w zakres odpowiedzi nieliniowej. Ze względu na możliwe trudności w wizualnej ocenie różnic w zachowaniu próbek na podstawie przedstawionego wykresu, wartości naprężenia, przy których G' i G'' ulegały zrównaniu przedstawiono w tabeli II. Podobnie jak w przypadku analizy w trybie kontrolowanego naprężenia stwierdzono, że BD osłabia oddziaływania między łańcuchami polimerów.

Analiza oscylacyjna – przemiatanie temperaturą

Jak wynika z ryciny 4, proces żelowania badanych próbek przebiegał z różną prędkością. Najostrzejsze przejście zaobserwowano w przypadku żeli 1, 5 oraz 6. Wzrost lepkości był najwolniejszy w przypadku żelu 3, zawierającego 0,5% BD oraz pektynę. Z danych przedstawionych w tabeli II wynika, że wzrost temperatury żelowania następuje ze wzrostem stężenia chlorowodoru benzydaminu. Ponadto można stwierdzić, że niższą temperaturę przejścia wykazują formułacje bez dodatku polimerów mukoadhezyjnych. Uzyskane wyniki odbiegają od rezultatów otrzymanych przez Ricci i wsp. w badaniach dotyczących właściwości reologicznych żeli na bazie poloksameru 407 z chlorowodorkiem lidokainy [32]. We wspomnianych badaniach stwierdzono, że dodatek substancji czynnej nie wpłynął na temperaturę żelowania układu. Inne efekty zaobserwował również Koffi i wsp. [34] w pracy dotyczącej formułacji zawierających P407 i HPMC. Przedstawione badania pozwoliły stwierdzić, że dodatek HPMC obniżył temperaturę żelowania, co odbiega od rezultatów uzyskanych w niniejszej pracy. Należy jednak podkreślić, że opisane w literaturze układy powstałe odbiegały składem od analizowanych tutaj formułacji, co mogło przyczynić się do powstania różnic w obserwowanych właściwościach reologicznych.



Rycina 3. Zależność modułów sprężystości (G') i lepkości (G'') od zmiennego naprężenia w analizie oscylacyjnej
Figure 3. The dependence of elasticity (G') and viscosity (G'') moduli on changing oscillatory stress



Rycina 4. Zmiany modułu sprężystości podczas przemiatania temperaturowego
Figure 4. The changes of elasticity modulus during the temperature sweeping

Tabela II. Wartości punktów płynięcia, temperatury żelowania, wyniki testu pełzania i powrotu sprężystego obliczone na podstawie pomiarów reologicznych oraz wartości pH i osmolarności

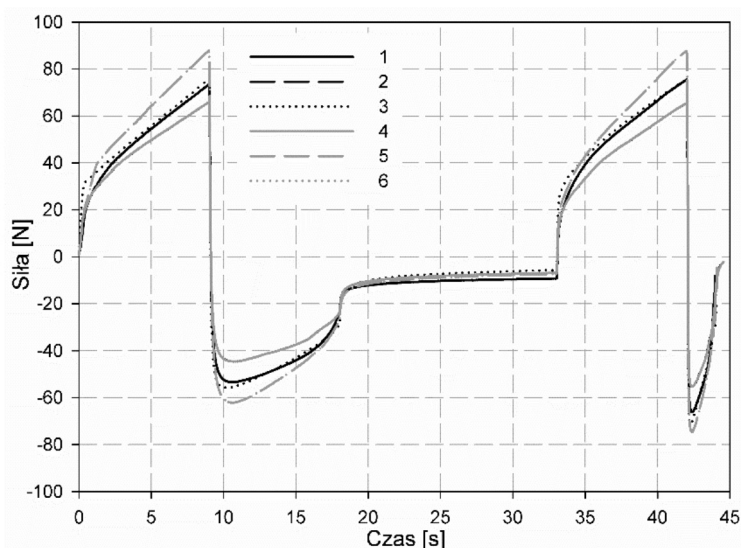
Table II. The values of yield points, gelling temperature, creep&recovery results calculated from the rheological measurements and pH and osmolality

Formulacja	Punkt płynięcia [Pa]		$T_{\text{zol-gel}}$ [°C]	$(J_r/J_{\text{max}}) \cdot 100\%$	pH	Osmolarność [mOsm/kg]
	CS	SS				
1	220,4±1,5	232,9±2,2	28,5±0,2	51,6 ± 4,1	6,40±0,03	356,33±13,13
2	145,8±1,3	208,6±3,5	27,2±0,1	44,5 ± 1,3	6,06±0,02	378,00±15,09
3	220,6±2,4	232,0±1,2	28,6±0,1	52,4 ± 1,6	4,12±0,01	413,67±12,75
4	162,1±2,7	214,6±1,9	27,3±0,1	48,5 ± 7,1	4,10±0,04	519,33±10,31
5	227,2±2,1	281,5±2,3	30,3±0,2	61,5 ± 6,9	5,43±0,03	364,67±15,95
6	223,3±0,7	243,7±2,7	29,7±0,1	52,4 ± 2,8	5,10±0,17	432,00±12,00

Analiza tekstury

Analiza tekstury polegała na dwukrotnej kompresji żeli z wykorzystaniem stalowego sensora cylindrycznego. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 5, jako zależność siły od czasu. Dane liczbowe wykorzystano do obliczenia trzech parametrów: twardości, adhezyjności oraz ściśliwości (tabela III). Twardość danego materiału definiuje się jako siłę niezbędną do kompresji. Innymi słowy jest to maksymalna wartość siły rejestrowana podczas pierwszego cyklu kompresji. Z kolei adhezyjność to praca potrzebna do przezwyciężenia sił przyciągania między powierzchnią

próbki a powierzchnią innych materiałów, z którymi wchodzi w styczność, czyli praca wymagana do odezwania sondy od próbki. Posiada ona wartości ujemne. Trzecim wyznaczonym parametrem tekstury była ściśliwość definiowana jako zdolność ciała do odwracalnego zmniejszenia swojej objętości pod wpływem obciążenia, czyli praca wymagana do odkształcenia materiału po pierwszej kompresji [35,36]. Jak widać badania tekstury potwierdziły obserwacje pochodzące z badań reologicznych. Największą twardością i ściśliwością charakteryzowały się żele zawierające HPMC. W przypadku formulacji na bazie czystego



Rycina 5. Profile tekstury wykreślone dla hydrożeli
Figure 5. The texture profiles plotted for the hydrogels

Tabela III. Parametry tekstury hydrożeli obliczone na podstawie analizy profili tekstury
Table III. Texture parameters of the gels calculated from texture profile analysis

Formulacja	Twardość [N]	Adhezyjność [Ns]	Ściśliwość [Ns]
1	0,75±0,01	-5,19±0,73	9,07±0,14
2	0,65±0,06	-4,57±1,00	8,49±0,13
3	0,75±0,08	-5,21±1,33	9,00±0,22
4	0,72±0,03	-5,16±0,75	8,70±0,11
5	0,86±0,02	-5,55±0,82	10,54±0,28
6	0,74±0,07	-5,35±0,63	9,80±0,11

poloksameru oraz z dodatkiem pektyny potwierdzono, że w wyniku zwiększenia zawartości benzydaminu struktura hydrożeli ulegała osłabieniu, czemu towarzyszył również spadek adhezyjności.

Pomiar pH i osmolarności

W warunkach fizjologicznych pH pochwy mieści się w zakresie 3,5-4,5 [37,38], natomiast osmolarność śluzu pochwowego to ok. 286 mOsm/kg [39]. Uzyskane w badaniu wartości pH hydrożeli (tabela II) wskazują, że w przypadku formulacji z dodatkiem pektyny pH nie zmieniało się po wprowadzeniu benzydaminu. Z kolei wartość pH zarówno żeli na bazie czystego P407 jak i zawierających HPMC obniżała się przy wzroście stężenia BD. Stwierdzono, że pH najbardziej zbliżone do fizjologicznego wykazywały formułacje zawierające

pektynę. Najwyższe wartości odnotowano natomiast dla formułacji o niższym stężeniu chlorowodoru benzydaminu, zawierających HPMC. Z wartości osmolarności przedstawionych w tabeli II wynika, że wszystkie formułacje były hiperosmolarne. Ciśnienie osmotyczne najbardziej zbliżone do fizjologicznych wykazywały żele z HPMC o niższym stężeniu chlorowodoru benzydaminu.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można sformułować następujące wnioski:

- badane hydrożele wykazują właściwości typowe dla układów pseudoplastycznych, rozrzedzanych ścinaniem;

- punkty płynięcia próbek wyznaczone techniką przemiatania naprężeniem dowiodły, że chlorowoderek benzydaminę upłynniał strukturę hydrożeli;
- wzrost stężenia chlorowodoru benzydaminę wpływał na obniżenie temperatury żelowania;
- pektyna wyraźnie obniżała pH hydrożeli, silniej niż HPMC;
- chlorowoderek benzydaminę podwyższał osmolarność hydrożeli.

Podziękowania / Acknowledgments

Autorzy składają serdeczne podziękowania prof. dr hab. Beacie Czarneckiej, kierownik Katedry i Zakładu Biomateriałów i Stomatologii Doświadczalnej na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu, za umożliwienie wykonania pomiarów reologicznych. Dziękujemy również prof. dr hab. Janinie Lulek za pomoc merytoryczną podczas przygotowywania manuskryptu. Składamy również podziękowania firmie ICN Polfa Rzeszów za bezpłatne przekazanie do badań próbki chlorowodoru benzydaminę.

Źródło finansowania / Funding source

Badania były częściowo finansowane ze środków Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (UMP) na utrzymanie potencjału naukowego nr 502-01-03314429-03439, z grantu UMP dla młodych pracowników nauki nr 502-14-03314429-09983 oraz z grantu Studenckiego Towarzystwa Naukowego UMP nr 502-05-03314429-50780.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji:

✉ Tomasz Osmałek
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku
UM w Poznaniu
ul. Grunwaldzka 6; 60-780 Poznań
☎ (+48 61) 854 66 61
✉ tosmalek@ump.edu.pl

Piśmiennictwo

1. Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;92:105-22.
2. Karaca M, Bayram A, Kocoglu ME, et al. Comparison of clinical diagnosis and microbiological test results in vaginal infections. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2005;32(3):172-4.
3. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, et al. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis.* 1993;16(4):273-81.
4. Landers DV, Wiesenfeld HC, Heine RP, et al. Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(4):1004-8.
5. Eschenbach D. Vaginal Infection. *Clin Obstet Gynecol.* 1983;26(1):186-202.
6. Kunin CM. Urinary tract infections in females. *Clin Infect Dis.* 1994;18(1):1-10.
7. Peipert JF. Clinical practice Genital Chlamydial Infections. *N Engl J Med.* 2003;349:2424-30.
8. Globulki dopochwowe – Portal Dbam o Zdrowie [Online]. Available: https://www.doz.pl/apteka/k244-Globulki_dopochwowe. [wejście z dn. 10.12.2017].
9. Żel intymny nawilżający, żel i krem stymulujący – Portal Dbam o Zdrowie [Online]. Available: https://www.doz.pl/apteka/k243-Zele_kremy. [wejście z dn. 10.12.2017].
10. Iladian direct plus, tabletki dopochwowe, 10 szt – Portal Dbam o Zdrowie [Online]. Available: https://www.doz.pl/apteka/p61858-Iladian_direct_plus_tabletki_dopochwowe_10_szt. [wejście z dn. 10.12.2017].
11. Reid G, Bruce AW. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World J Urol.* 2006;24(1):28-32.
12. Tantum Rosa – porady w leczeniu dolegliwości intymnych [Online]. Available: <http://tantumrosa.pl/>. [wejście z dn. 10.12.2017].
13. El-Didamony AM. Spectrophotometric determination of benzydaminę HCl, levamisole HCl and mebeverine HCl through ion-pair complex formation with methyl orange. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2008;69(3):770-5.
14. Quane PA, Graham GG, Ziegler JB. Pharmacology of benzydaminę. *Inflammopharmacology.* 1998;6(2):95-107.

15. Aerozol do gardła Tantum Verde – na ból gardła dla dzieci [Online]. Available: http://tantumverde.pl/aerozol?gclid=CjwKCAiAjanRBRByEiwAKGyZrK_adlipOxXn_NlGfTTzMQVBQPWZSxw2_OoyQVjW1kiwBDjChucHBoCtbMQAvD_BwE. [wejdźcie z dn. 10.12.2017].
16. Coggins C, Blanchard K, Alvarez F, et al. Preliminary safety and acceptability of a carrageenan gel for possible use as a vaginal microbicide. *Sex Transm Infect.* 2000;76(6):480-3.
17. Bachhav YG, Patravale VB. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2009;365(1-2):175-9.
18. Das Neves J, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int J Pharm.* 2006;318(1-2):1-14.
19. Nirmal HB, Bakliwal SR, Pawar SP. In-Situ gel: New trends in Controlled and Sustained Drug Delivery System. *Int J PharmTech Res.* 2010;2(2):1398-408.
20. Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:154-62.
21. Saxena BB, Singh M, Gospin RM, et al. Efficacy of nonhormonal vaginal contraceptives from a hydrogel delivery system. *Contraception.* 2004;70(3):213-9.
22. Patel HR, Patel RP, Patel MM. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. *Int J PharmTech Res.* 2009;1(2):299-303.
23. Osmałek TK, Froelich A, Kapela M. Przegląd wybranych zastosowań poloksameru 407 w technologii farmaceutycznej i medycynie. *Farm Pol.* 2014;70(7):400-10.
24. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, et al. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Sci.* 2006;9(3):339-58.
25. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm Res.* 2006;23(12):2709-28.
26. Almomen AA, Cho S, Li Z, et al. A thermosensitive glycol chitin hydrogel for the vaginal delivery of progesterone. *J Control Release.* 2015;213:74-5.
27. Aka-Any-Grah A, Bouchemal K, Koffi F, et al. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76(2):296-303.
28. Sriamornsak P, Wattanakorn N, Takeuchi H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. *Carbohydr Polym.* 2010;79(1):54-9.
29. Sriamornsak P, Wattanakorn N, Nunthanid J, et al. Mucoadhesion of pectin as evidence by wettability and chain interpenetration. *Carbohydr Polym.* 2008;74(3):458-67.
30. Bilensoy E, Abdur Rouf M, Vural I, et al. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech.* 2006;7(2):E54-E60.
31. Coussot P. Yield stress fluid flows: A review of experimental data. *J Nonnewton Fluid Mech.* 2014;211:31-49.
32. Ricci EJ, Bentley MVLB, Farah M, et al. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *Eur J Pharm Sci.* 2002;17(3):161-7.
33. Froelich A, Osmałek T, Kunstman P, et al. Rheological and textural properties of microemulsion-based polymer gels with indomethacin. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016;42(6):854-61.
34. Koffi AA, Agnely F, Ponchel G, et al. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *Eur J Pharm Sci.* 2006;27(4):328-35.
35. Szczesniak AS. Texture is a sensory property. *Food Qual Prefer.* 2002;13(4):215-25.
36. Cevher E, Sensoy D, Taha MAM, et al. Effect of Thiolated Polymers to Textural and Mucoadhesive Properties of Vaginal Gel Formulations Prepared with Polycarbophil and Chitosan. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9(3):953-65.
37. Caillouette JC, Sharp CF, Zimmerman GJ, et al. Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176(6):1270-7.
38. Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1692-712.
39. Rossato M, Virgilio F, Foresta C. Involvement of osmo-sensitive calcium influx in human sperm activation. *Mol Human Reprod.* 1996;2:903-9.