

Biopolimery w biotechnologii

Studia II stopnia (magisterskie), stacjonarne, Rok I, semestr I

Określenie właściwości sorpcyjno-desorpcyjnych mikrocząstek chitozanowych

Opracowała: dr inż. J. Wolska

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest określenie szybkości sorpcji i uwalniania analogu leku na zsyntetyzowanych, podczas ćwiczenia nr 1, sfer chitozanowych, które mogą stanowić nośniki cytostatyków.

Wstęp:*Systemy dostarczania leków w medycynie*

Standardowe sposoby podawania leków nie wykorzystują w pełni terapeutycznych możliwości medykamentów [1]. Większość stosowanych obecnie leków należy do związków o małej masie cząsteczkowej. Ich wadami są: szybki metabolizm i szybkie wydalanie z organizmu, niekorzystna biodystrybucja oraz niewielka wybiórczość działania terapeutycznego [2]. Zmniejsza to szansę na dotarcie dużej ilości dawki do miejsca przeznaczenia, co wymusza zwiększenie jej w aplikowanym preparacie [1]. Problemy te próbuje się rozwiązać poszukując nowych preparatów o bardziej wybiórczym działaniu albo stosując nośniki leków [2]. Praktyczne wykorzystanie nośników leków w medycynie ma duże perspektywy i już w tej chwili cieszą coraz większym zainteresowaniem i popularnością. Istnieją różne sposoby dostarczania leków do organizmu [1]:

- koniugaty nośnik-lek,
- micelle i liposomy,
- mikrocząstki,
- hydrożele.

Podczas pierwszego ćwiczenia otrzymaliście Państwo mikrocząstki chitozanowe, dlatego w niniejszej instrukcji bliżej omówiony zostanie właśnie ten rodzaj nośników leków. Mikrocząsteczki są sferycznymi cząstkami o średnicy 1-500 mikrometrów, zbudowane z medykamentu zamkniętego w polimerze pochodzenia bądź to naturalnego (np. z albuminy, kolagenu, żelatyna, chitozanu, alginiany, kwas hialuronowego) bądź to syntetycznego. W przypadku wykorzystania polimerów syntetycznych, jako nośników leków, otrzymuje się mikrocząsteczki zarówno z polimerów biodegradowalnych (poliesterów, poliamidów, pochodnych celulozy itp.) jak i biostabilnych (polimerów akrylowych i pochodnych celulozy) [1]. Nośniki w leków w tej formie posiadają szereg wad jak i zalet. Do ich zalet można zaliczyć biogodność, zdolność do przenoszenia różnorodnych substancji leczniczych, kontrolowany profil uwalniania substancji leczniczej. Natomiast do ich wad należy przede wszystkim ich nietrwałość. Mogą one występować w formie mikrosfer (mikrokulek) lub w formie mikrokapsułek. Podstawowa różnica pomiędzy mikrosferami i mikrokapsułkami tkwi w sposobie umieszczenia substancji leczniczej. W mikrosferach jest ona inkorporowana przez rozpuszczenie lub zawieszenie w polimerowej matrycy, natomiast w mikrokapsułkach jest zamknięta w postaci płynnej lub stałej wewnątrz polimerowej otoczki. Uwalnianie leków z mikrocząstek następuje w wyniku powolnej enzymatycznej degradacji polimeru i

jednoczesnej penetracji płynu ustrojowego w głąb matrycy. Substancja wydostaje się stopniowo, przez powstające w strukturze polimeru mikrokanały [1].

Aby dobrze scharakteryzować nośniki leków należy określić ich profil uwalniania substancji czynnej, jak również szybkość sorpcji medykamentu w materiale nośnika oraz jego pojemność sorpcyjną. Dlatego podczas tego ćwiczenia Studenci będą badać zarówno proces sorpcji analogu leku z roztworów wodnych, jak i desorpcji tegoż analogu leku do roztworu przypominającego płyn fizjologiczny.

Sorpcja jest zjawiskiem polegającym na zwiększeniu stężenia substancji na powierzchni, a siłą napędową takiego procesu jest skompensowanie nie zrównoważonych sił powierzchniowych. Minimum energii powierzchniowej zostaje osiągnięte w wyniku pokrycia powierzchni warstwą zaadsorbowanych cząsteczek. Opisując zjawisko sorpcji należy zrównoważyć charakter oddziaływań pomiędzy powierzchnią sorbentu (materiał o rozwiniętej powierzchni), zwykle kilkuset do tysiąca metrów kwadratowych na gram suchej masy), która adsorbuje, a cząsteczkami sorbatu (substancja rozpuszczona w fazie ciekłej, ulega sorpcji). Oddziaływania te mogą być fizyczne i chemiczne. Pierwsze z nich to oddziaływania słabe, niespecyficzne, spowodowane siłami van der Waalsa i Londona. Drugie to oddziaływania silniejsze, kierunkowe, np. dipol-dipol, oddziaływania z przeniesieniem ładunku, wiązania wodorowe. Sorpcja spowodowana przez pierwszy rodzaj oddziaływań to sorpcja fizyczna. Jest ona odwracalna: desorpcja następuje w podwyższonej temperaturze lub poprzez zmianę oddziaływań, np. przez lucję sorbentu rozpuszczalnikiem (metanol, acetonitryl). Sorpcja spowodowana drugimi z tych oddziaływań nosi nazwę chemisorpcji i nie zawsze jest procesem odwracalnym.

Literatura:

1. <http://laboratoria.net/download/Systemy%20dostarczania%20lek%C3%B3w%20w%20medycynie.pdf>, dokument elektroniczny „Systemy dostarczania leków w medycynie”
2. Dmitry Nevozhay, Urszula Kańska, Renata Budzyńska, Janusz Boratyński, Współczesny stan badań nad koniugatami i innymi systemami dostarczania leków w leczeniu schorzeń nowotworowych i innych jednostek chorobowych, *Postepy Hig Med Dosw.* (online), 2007; 61: 350-360

Wykonanie ćwiczenia:

Grupa zostanie podzielona na 4 podgrupy: 2 podgrupy będą wykonywały pomiary kinetyki sorpcji, a 2 pozostałe podgrupy będą wykonywały pomiary kinetyka desorpcji, poszczególne grupy wymieniają się otrzymanymi wynikami pomiarów (2 zestawy wyników z sorpcji i 2 zestawy wyników desorpcji), każda grupa wykonuje samodzielnie obliczenia, nie kopiuje od Kolegów z pozostałych grup, wyciąga wnioski z obliczeń średnich z dwóch pomiarów kinetyki sorpcji i dwóch wyników kinetyki uwalniania analogu leku).

Określenie szybkości sorpcji

1. Umieścić próbki spęcznianego w wodzie sorbentu na bazie chitozanu w nuczach do wirowania, zrównoważyć je i wirować polimery przy obrotach 3000 obr./min. przez 5 minut.
2. Następnie odważyć na papierku wagowym podaną przez Prowadzącego masę sorbentu (UWAGA! **(Uwaga! Dodać odwirowany, spęczniony polimer w przeliczeniu na masę suchą 0,25 g).**
3. Przenieść odważony sorbent do dużych butelek z niebieską zakrętką (500 cm^3) i zalać go 250 cm^3 roztworu analogu leku o stężeniu wyjściowym równym $0,1\text{ g/dm}^3$
4. Wytrząsać preparaty i w określonych czasach pobierając z butelek do podpisanych probówek - próbki roztworów za pomocą pipety automatycznej (po 1 cm^3) po czasie: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 i 90 minut. **UWAGA! nie pobierać sorbentów!!!**

5. Do każdej z probówek dodać po 4 cm³ (pipetą automatyczną) i dla tak rozcieńczonych próbek zmierzyć stężenia analogu leku po podanych czasach (przy długości fali $\lambda = 465$ nm) wykorzystując metodę spektroskopii UV/Vis.

Obliczenia

1. Sorpcję S , obliczyć jako:

$$S = \frac{\frac{c_p - c_k}{4}}{m_s} \quad (1),$$

gdzie:

c_p – początkowe stężenie analogu leku, g/dm³

c_t – stężenie analogu leku po czasie t , g/dm³

m_s – masa polimeru (w przeliczeniu na masę suchą), otrzymana przez pomnożenie masy naważki użytej w doświadczeniu przez procentową zawartość polimeru w spęcznianym żelu.

2. Stałe procesu sorpcji wyznaczyć poprzez wykreślenie zależności:

Na podstawie otrzymanych danych dopasować model kinetyki sorpcji, korzystając z dwóch podstawowych modeli:

Model pseudo-I-rzędowy

$$-\ln\left(1 - \frac{S_t}{S_k}\right) = f(t) \quad (2).$$

Model pseudo-II-rzędowy

$$-\ln\left(\frac{S_t}{S_k}\right)^2 = f(t) \quad (3),$$

gdzie:

S_t – sorpcja fenolu po czasie t , g/g

S_k – końcowa sorpcja fenolu po czasie 90 min., g/g

t – czas, s,

wykreślić zależności poszczególnych dla modeli i znaleźć nachylenia tak otrzymanych prostych. Na podstawie dopasowania prostych, współczynnik dopasowania (R^2), określić jak otrzymane wyniki korelują z danym modelem analizy procesu sorpcji.

Określenie szybkości desorpcji analogu leku z cząstek chitozanowych

1. Do kolbki miarowej o pojemności 25 cm³, za pomocą pipety automatycznej, pobrać 5 cm³ roztworu znad dostarczonych studentom próbek sorbentów chitozanowych i dopełnić kolbkę do kreski wodą. Oznaczyć stężenie analogu leku w roztworze nad sorbentem, za pomocą metody spektroskopii UV/Vis.
2. Umieścić próbki, nasyconego analogiem leku, sorbentu w nuczach do wirowania, zrównoważyć je i wirować polimery przy obrotach 3000 obr./min. przez 5 minut.
3. Następnie odważyć do kolebek stożkowych podaną przez Prowadzącego masę sorbentu (UWAGA! **(Uwaga! Dodać odwirowany polimer w przeliczeniu na masę suchą 0,025 g).**)
4. Następnie sorbent zalać 50 cm³ 0,9 wag.% NaCl w wodzie.

5. Wstrząsać preparaty i w określonych czasach po: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 i 90 minutach. Pobierać za pomocą pipety automatycznej 3 cm³ roztworu mierzyć od razu absorbancję pobranych próbek i **ponownie zawracać do butelek!**
UWAGA!!!! nie pobierać sorbentów!!!

UWAGA!!!! nie wylewać pobranych próbek, ale po pomiarze zawracać do butelek, w których przeprowadzanych jest proces uwalniania leku.

Obliczenia

Studenci w pierwszej kolejności korzystając z danych uzyskanych u Prowadzącego będą musieli obliczyć sorpcję analogu leku na przygotowanych kulkach chitozanowych, w tym celu Studenci pobierali roztwór znad załadowanego lekiem sorbentu. Sorpcję obliczają Studenci zgodnie ze wzorem nr 1. Pozwoli to oszacować pojemność sorpcyjną mikrosfer.

Obliczenie desorpcji (D)

$$D = \frac{C_t V}{m_s} \quad (4),$$

w którym:

C_t – stężenie analogu leku po czasie t , [g/dm³],

V – objętość roztworu w którym odbywa się proces desorpcji, [dm³],

m_s – masa polimeru (w przeliczeniu na masę suchą), otrzymana przez pomnożenie masy naważki użytej w doświadczeniu przez procentową zawartość polimeru w spęcznianym żelu.

Następnie wykreślić wykres zależności $D = f(t)$

W sprawozdaniu należy zamieścić wyniki pomiarów w tabeli, obliczoną sorpcję analogu leku, przedstawić przykładowe obliczenia, wykresy zależności (równanie 2 i 3) dla analogu leku, a także wyjaśnienie obserwowanych zależności, dyskusja wyników, wnioski.

Zagadnienia:

- informacje na temat procesu sorpcji (np. definicja, rodzaje, od czego jest proces uzależniony itd.),
- informacje na temat różnych materiałów sorpcyjnych,
- informacje na temat wykorzystanych w ćwiczeniu sorbentów (np. budowa chemiczna, grupy w matrycy polimerowej, wielkości powierzchni, właściwości fizykochemiczne),
- informacje na temat usuwanych podczas ćwiczenia związków oraz ich wzory strukturalne potrzebne do interpretowania otrzymanych wyników.

Przygotowanie krzywych kalibracyjnych barwników: