

Iga WASIAK, Tomasz CIACH, Katarzyna DĄBROWSKA

e-mail i.wasiak@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Wykorzystanie technik inżynierii chemicznej do badania właściwości uwalniania substancji aktywnej z nanocząstek jako nośników leków

Wstęp

W ciągu ostatnich lat nanotechnologia jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki. Podczas zmniejszania rozmiaru cząstki stałej bilion razy, liczba budujących ją atomów zmniejsza się od kilku set do tysięcy razy. W tym stanie cząstki wykazują zupełnie inne właściwości elektromagnetyczne lub fizykochemiczne niż ich odpowiedniki wykonane z tych samych materiałów w skali makroskopowej.

Nietypowe właściwości nanomateriałów wymagają dogłębnego scharakteryzowania, a w tym niezbędna jest wiedza z zakresu inżynierii chemicznej.

W niniejszej pracy skupiono się na wpływie metodologii badania profili uwalniania substancji aktywnej na otrzymywane wyniki.

Charakterystyka nanocząstek

W skali nano istotny wpływ zaczynają mieć siły, których działanie w skali makro jest pomijane, a wiedza z dziedziny inżynierii chemicznej pozwala na ich uwzględnienie. Znajomość zachowania nanocząstek w roztworach oraz podczas ich przepływu w płynach, pozwala na zaprojektowanie własności najbardziej odpowiednich do planowanego zastosowania.

Powierzchnia nanocząstek

Nanocząstki ze względu na swój rozmiar wykazują interesujące właściwości. Liczba atomów/cząsteczek obecnych na powierzchni cząstki (nanocząstki) wzrasta podczas zmniejszenia jej rozmiarów. Jeśli σ jest średnicą cząsteczki, to procent atomów/cząsteczek $\%A_t$ na powierzchni cząstki określony jest jako:

$$\%A_t = \frac{\frac{4}{3}\pi[d^3 - (d - \sigma)^3]}{\frac{4}{3}\pi d^3} \cdot 100 = 100 \left[\left(\frac{\sigma}{d}\right)^3 - 3\left(\frac{\sigma}{d}\right)^2 + 3\left(\frac{\sigma}{d}\right) \right] \quad (1)$$

Wzór (1) pokazuje wzrost stosunku powierzchni do objętości cząstki ze zmianą jej rozmiaru. Dla cząstek o rozmiarze $d = 1 \mu\text{m}$ 0,5% atomów znajduje się na powierzchni, ale już dla $d = 10 \text{ nm}$ jest ich 30%. Atomy/cząsteczki znajdujące się na powierzchni cząstki są bardziej reaktywne – wpływają na zmianę własności optycznych, magnetycznych czy fizycznych, takich jak stopień rozpuszczalności substancji.

Sedymentacja nanocząstek

Mały rozmiar nanocząstek ułatwia utrzymanie ich w zawieszeniu w roztworze. Duże mikrocząstki łatwo opadają w wyniku oddziaływania siły grawitacji. Prędkość opadania cząstek v opisana jest prawem Stokesa. Prędkość sedymentacji cząstek o gęstości 1700 kg/m^3 i rozmiarze $1 \mu\text{m}$ wynosi 430 nm/s , natomiast cząstki o rozmiarze 10 nm opadają z prędkością zaledwie $0,043 \text{ nm/s}$ [Gupta i Kompella, 2006].

Drgania termiczne, zwane ruchami Browna, spowalniają sedymentację cząstek. $1 \mu\text{m}$ cząstka w wyniku termicznych fluktuacji wody porusza się z prędkością 1716 nm/s , którą jest wyższa niż podana wcześniej prędkość sedymentacji (430 nm/s). Zatem cząstki o średnicy poniżej $1 \mu\text{m}$ na skutek występowania ruchów Browna, nie będą sedymentowały.

Agregacja

Najbardziej niepożądanym procesem, oprócz ograniczonej sedymentacji, jest wytrącanie się nanocząstek z roztworu w wyniku agregacji. Agregacja perykinetyczna, wynikająca z ruchów Browna, zachodzi wtedy, gdy średnia odległość między dwiema cząstkami skraca się umożliwiając wzajemne oddziaływania. Zjawisku temu sprzyja duże stężenie

nanocząstek w roztworze. W wyniku agregacji powstają klastry o dużych rozmiarach sedymentujące grawitacyjnie. Przepływ płynu przyspiesza ten proces, ponieważ w zakresie nieustalonych prędkości powoduje powstawanie sił ścinania i zmusza agregaty do przyjęcia orientacji optymalnej dla układów przepływowych. Przy dużych prędkościach przepływu oczekiwane jest rozrywanie klastrów, jednak zwiększenie sił ścinania powoduje agregację ortokinetyczną. Wysokie naprężenie ścinające prowadzi do zagęszczania cząstek umożliwiając hydrodynamiczne oddziaływania krótkiego zasięgu.

Względny wpływ agregacji perikinetycznej i ortokinetycznej można wyrazić poprzez liczbę Pecleta:

$$Pe = \frac{3\pi\eta_0\gamma d^3}{8k_B T} \left[\left(\frac{\varphi_m}{\varphi}\right)^{1/3} - 1 \right] \quad (2)$$

gdzie:

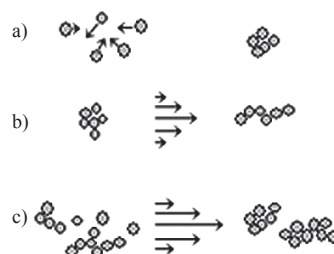
φ – udział frakcji stałej,

φ_m – maksymalny objętościowy współczynnik zagęszczenia,

η_0 – lepkość dynamiczna [Pa·s],

γ – szybkość ścinania [1/s].

Liczba Pe wyraża stosunek ruchów Browna do sił ścinających. Do istotnych parametrów wpływających na zjawisko agregacji należą: wielkość cząstek, lepkość płynu i temperatura. Na rys. 1 przedstawiono ułożenie cząstek w zależności od liczby Pe . Dla rozcieńczonych wodnych roztworów nanocząstek o średnicy $d = 25 \text{ nm}$ w temperaturze pokojowej liczba $Pe = 1$ dla $\gamma = 10^5 \text{ s}^{-1}$ [Chevalier i Tillement, 2009].



Rys. 1. Rodzaje agregacji w zależności od liczby Pecleta: a) agregacja perikinetyczna $Pe < 1$, b) ścinanie agregatów w wyniku przepływu, c) agregacja ortokinetyczna w wyniku przewagi oddziaływań hydrodynamicznych $Pe > 1$ [Chevalier i Tillement 2009]

Dyfuzja

Małe cząstki białka i nanocząstki dyfundują zaskakująco szybko w roztworach o wysokiej lepkości. Ich współczynniki dyfuzji są często o rząd wielkości większe od wyniku oczekiwanego po rozwiązaniu równania Stokesa-Einsteina w oparciu o lepkość makroskopową η_m . Obserwację tę można wyjaśnić uwzględniając lepkość zależną od skali η_p

$$\frac{\eta_p}{\eta_m} = \exp(\alpha\varphi) \quad (3)$$

gdzie:

α – współczynnik zależny od rozmiaru cząstki,

φ – współczynnik zależny od stężenia substancji w roztworze.

Współczynniki dyfuzji oszacowane przez autorów na podstawie korelacji Stokesa – Einsteina po uwzględnieniu lepkości zależnej od skali różnią się kilkudziesięciokrotnie. Sugeruje to znaczenie rozmiaru cząstek badanej substancji i pozwala również na modelowanie zachowań nanocząstek w układach o dużej lepkości jak i w roztworach wodnych [Szymański i in., 2006].

Wydzielanie leku

Jednym z najistotniejszych parametrów charakteryzujących nanocząstki, stosowane jako nośniki leków, jest profil uwalniania substancji aktywnej. Do opisu profili stosuje się opracowane modele inżynierii

chemicznej. Modele te uwzględniają strukturę i materiał stosowanej nanocząstki. Opracowując taki model należy wziąć pod uwagę, czy substancja czynna uwalniana jest na drodze dyfuzji, czy też znaczenie mają również efekty rozpadu nanocząstki [Pathak i Thassu, 2009].

Należy także rozważyć metodykę prowadzenia badań. Nanocząstki ze względu na swoje rozmiary najczęściej umieszczane są w różnego rodzaju przegrodach zanurzanych w roztworze. Wielu badaczy korzystających ze wspomnianych modeli nie bierze jednak pod uwagę oporów transportu substancji spowodowanych przez zastosowaną przegrodę. Badania przeprowadzone przez autorów niniejszej pracy wskazują na konieczność uwzględnienia tych oporów podczas prowadzenia badań.

Badania doświadczalne

Metodyka

Badania przeprowadzono metodą dializy. 5 ml roztworu błękitu metylenowego (374 g/mol), daunorubicyny (564 g/mol), nanocząstek dekstranowych z daunorubicyną umieszczono w worku dializacyjnym, który zanurzono w 100 ml roztworu buforu fosforowego. W odpowiednich momentach pobierano próbki roztworu buforu fosforowanego do spektrofotometrycznej analizy ilości daunorubicyny ($\lambda = 482$).

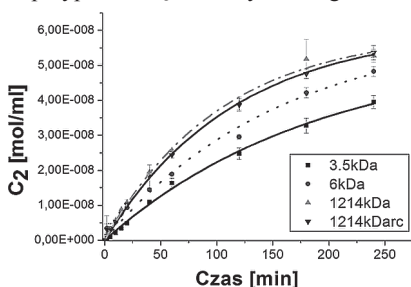
Zakres badań

Przebadano worki dializacyjne o wartości molekularnego odcięcia 3,5; 6; 12 kDa. Zbadano też wpływ warunków prowadzenia dializy. Dializa prowadzona była w temperaturze 25 i 37°C, przy pH buforu 7,4 oraz 5,5. Stężenie błękitu metylenowego, leku i leku w nanocząstkach było takie samo i wynosiło 0,0025 g/ml.

Przeprowadzono również badanie wpływu poszczególnych składników nanocząstek na szybkość dializy leku: dekstranu (70 kDa) o stężeniu 0,1 g/ml oraz dodecyloaminy (185 g/mol) o stężeniu 0,005 g/ml.

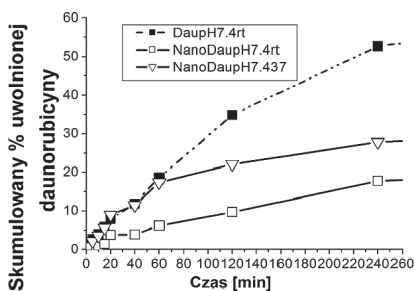
Wyniki badań

Badania przeprowadzone dla błękitu metylenowego potwierdziły zmiany oporów membrany dializacyjnej o różnych wartościach molekularnego odcięcia (Rys. 2). Potwierdziły również brak wpływu materiału membrany, którym była celuloza regenerowana i nieregenerowana w przypadku błękitu metylenowego.



Rys. 2. Zmiana stężenia błękitu metylenowego w czasie dla różnych membran dializacyjnych

Na rys. 3 przedstawiono skumulowane wyniki procentowe daunorubicyny uwolnionej z nanocząstek oraz nie związanej daunorubicyny otrzymane metodą dializacyjną. Przedstawiony wykres pokazuje różną szybkość dyfuzji leku przez membrany.



Rys. 3. Skumulowane % profile uwolnionej daunorubicyny – ■ i daunorubicyny uwolnionej z nanocząstek – w temperaturze pokojowej oraz z nanocząstek w temperaturze 37°C – ▽. Membrana celulozowa (12÷14 kDa)

Aby jednak prawidłowo wyznaczyć szybkość wydzielania leku z nanocząstek należy wziąć pod uwagę nie tylko metodę degradacji nanocząstki, ale również opory membrany.

Badania przeprowadzone dla samej daunorubicyny wykazały wpływ oporów membrany dializacyjnej na szybkość uwalniania leku. Wykorzystano układ równań:

$$D = C_1 v_1 + C_2 v_2 \quad (4)$$

$$\frac{dC_1}{dt} v_1 = \frac{dC_2}{dt} v_2 = \frac{C_1 - C_2}{R} \quad (5)$$

gdzie:

D – dawka [g],

C_1 i C_2 – stężenie substancji badanej odpowiednio wewnątrz i na zewnątrz membrany [g/ml],

v_1 i v_2 – objętości roztworów [ml].

i obliczono całkowite opory membrany podczas transportu daunorubicyny przez membranę celulozową (12÷14 kDa) dla różnych warunków prowadzenia dializy. Wyniki przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Obliczone opory całkowite podczas transportu daunorubicyny przez membranę celulozową (12÷14 kDa), wartość średnia z 5 powtórzeń

pH	t [°C]	Daunorubicyna		Daunorubicyna z dekstranem		Daunorubicyna z dodecyloaminą	
		R [min/ml]	SD	R [min/ml]	SD	R [min/ml]	SD
7,4	25	66,87	2,35	69,07	4,54	67,11	4,00
7,4	37	37,43	0,78	43,65	1,78	39,40	3,31
5,5	25	55,11	2,14	61,76	2,56	57,07	4,80
5,5	37	29,41	1,56	36,97	2,92	32,26	3,96

Wpływ pH środowiska obserwowano dla daunorubicyny. Obniżenie pH z 7,4 do 5,5 powoduje spadek oporów dyfuzji na membranie wywołany efektem jonizacji dodecyloaminy.

Zauważono również wpływ dekstranu na szybkość dyfuzji. Dla pH obu roztworów w temperaturze 37°C stwierdzono wzrost otrzymanych wartości oporów o ¼. Jest to spowodowane dużą masą cząsteczkową dekstranu i właściwościami wiązania wody, które powodują wzrost lepkości roztworu wewnątrz membrany dializacyjnej. Takie zmiany oporów mogą mieć istotny wpływ na interpretację kinetyki uwalniania leku z nanocząstek otrzymanych z dekstranu.

Natomiast dodecyloamina nie wpływa na szybkość dyfuzji. Jest to spowodowane znacznie mniejszą masą cząsteczkową jak i niewielkim stężeniem. Wzrost temperatury ułatwia dyfuzję substancji w wyniku zwiększenia drgań termicznych atomów.

Wnioski

W niniejszej pracy przytoczono kilka spośród wielu zastosowań inżynierii chemicznej do wyjaśnienia i opisanie zjawisk związanych z nanocząstkami. Zastosowanie zagadnień dotyczących dyfuzji pozwala uprościć skomplikowane układy do roztworów wodnych. Jednak prowadząc badania nie można dokonać zbyt dużych uproszczeń.

Zaproponowana kinetyka uwalniania leku opracowywana jest w oparciu o modele wykorzystujące wiedzę z zakresu inżynierii chemicznej. Jednak wykorzystanie takiego modelu powinno być poprzedzone badaniami, które również uwzględniają założenia tej dziedziny nauki.

Wykonując badania należy pamiętać o oporach transportowych membrany oraz składnikach zawartych w układzie które mogą wpływać na otrzymane wyniki.

Dokładne scharakteryzowanie nanocząstek pozwala na ich prawidłowe zaprojektowanie co ma szczególnie istotne znaczenie w systemach podawania leków.

LITERATURA

- Chevalier I., Tillement O., Ayela F., 2009. Structure and rheology of SiO₂ nanoparticles suspension under very high shear rates. *Phys. Rev. E*, **80**, nr 051403. DOI: 10.1103/PhysRevE.80.051403
- Gupta R.B., Kompella U.B., 2006. *Nanoparticle technology for drug delivery* Taylor & Francis, New York
- Pathak Y., Thassu D., 2009. *Drug delivery nanoparticles formulation and characterization*. Informa Healthcare, New York
- Szymański J., Patkowski A., Wilk A., Garstecki P., Hołyst R., 2006. Diffusion and viscosity in a crowded environment: from nano- to macroscale. *J. Phys. Chem., B*, **110**, 25593-25597. DOI: 10.1021/jp0666784