

Ćwiczenie 3 - 5

Otrzymywanie i analiza rozmiaru nanocząstek srebra oraz hydrożelowych nanocząstek polisacharydowych

Wprowadzenie

Ze względu na znaczącą zmianę właściwości materiałów przy przejściu ze skali makroskopowej (materiały objętościowe) do skali molekularnej (materiały kwantowe), znajdujące się pomiędzy tymi skalami nanomateriały wykazują zaskakujące cechy. Zagadnienia nanoskali rozpatruje się zwykle w odniesieniu do materiałów, które zbudowane są w przynajmniej 50% (liczbowo) z cząstek, których rozmiar nie przekracza 100 nm. Jednak, w wielu przypadkach, również związanych z zagadnieniami medycznymi, skalę tę rozszerza się do 1 000 nm (1 μm). Nawet dla szerszej z przedstawionych definicji nanoskali możliwe są obserwacje zjawisk przejściowych pomiędzy zjawiskami klasycznymi (dla skali makroskopowej) oraz zjawiskami kwantowymi (dla skali molekularnej) [1-3].

Wiele obiektów, których funkcje są ściśle związane z funkcjami życiowymi organizmów żywych, swoimi rozmiarami lokuje się w obszarze zainteresowań nanotechnologii (Tab. 1). To właśnie w zmiany, usprawnianie lub zastępowanie funkcji takich obiektów celuje nanotechnologia medyczna [3].

Tab.1 Nanoobiekty i ich średnie rozmiary [3]

Obiekt	Rozmiar [nm]
Czerwona krwinka	2 500
Pęcherzyki (ang. <i>vesicles</i>) w komórkach	200
Bakterie	1 000
Wirusy	100
Egzosomy	65-100
Szerokość DNA	2,5
Rybosomy	2-4
Para zasad w ludzkim genomie	0,4
Białka	1-20
Aminokwasy (np. tryptofan – największy)	1,2 (największy wymiar)
Cząsteczka aspiryny	1
Pojedynczy atom	0,25

Najczęściej stosowanym narzędziem medycznym dostarczanym na drodze procesów nanotechnologicznych są nanocząstki. Ze względu na swoje rozmiary, a co za tym idzie – wyjątkowe właściwości – nanocząstki stosowane są jako budulec systemów diagnostycznych, terapeutycznych lub pełniących jednocześnie obie te funkcje (ang. *theranostics*). Niezależnie od zastosowań nanocząstek, można je podzielić ze względu na materiał, z którego zostały utworzone:

1. Nanocząstki metaliczne – np. nanocząstki srebra, złota, tlenku tytanu.
2. Nanocząstki ceramiczne – np. hydroksyapatyt (fosforan wapnia).
3. Nanocząstki węglowe – np. fulereny, kropki kwantowe na bazie tlenku grafenu.
4. Nanocząstki polimerowe – z polimerów syntetycznych lub naturalnych [4].

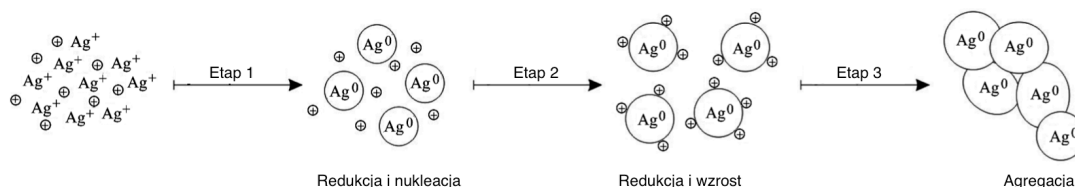
Nanocząstki srebra

Synteza nanocząstek srebra metodą redukcji chemicznej polega na wykorzystaniu obecnych w środowisku reakcyjnym jonów srebra, które pod wpływem działania reduktora przechodzą w nienaładowane, wolne atomy srebra. Dodatkowo, aby ograniczyć agregację powstających w wyniku redukcji nanocząstek stosowane są stabilizatory takich procesów.

Reakcja powstawania nanocząstek srebra na drodze redukcji dzieli się na:

1. Etap redukcji soli srebra i tworzenia nienaładowanych nanocząstek srebra – atomy srebra łączą się ze sobą w efekcie tworząc stabilne załączki nukleacji (etap nukleacji).
2. Etap dalszej redukcji jonów srebra przebiegający na powierzchni załączków nukleacji – jest to etap wzrostu nanocząstek, do momentu redukcji wszystkich jonów obecnych w środowisku reakcji.
3. Etap agregacji powstałych (Rys.1).

Etap 3 jest najczęściej procesem niekorzystnym z punktu widzenia dalszych zastosowań nanocząstek jako zawiesiny. Dlatego też, aby przeciwdziałać agregacji nanocząstek stosuje się stabilizatory.



Rys. 1 Schemat powstawania nanocząstek srebra w wyniku redukcji soli srebra [5].

Najczęściej stosowaną solą srebra jest azotan srebra $AgNO_3$ ze względu na stałe tempo syntezy w ciągu trwania reakcji. Przy stosowaniu innych soli srebra, takich jak $AgBF_4$, $AgClO_4$ czy $AgPF_4$ zaobserwowano spadek szybkości reakcji po upływie około 10 minut od jej rozpoczęcia. Jako reduktory używane są zarówno proste związki jak etanol, cytrynian sodu, formaldehyd, glukoza, żelatyna, jak i związki złożone, np. urotropina lub hydrochinon [6].

Stabilizatorami, które mają przeciwdziałać agregacji nanocząstek są najczęściej polimery takie jak poliwinylpirolidon (PVP) – homopolimer, którego polarne grupy wykazują duże powinowactwo do nanocząstek srebra, pokrywając ich powierzchnię, zapobiegając w ten sposób agregacji – poli(alkohol winylowy) (PVA) lub polimery naturalne, takie jak polisacharydy [7]. Innym przykładem stabilizatora może być surfaktant dodecylosiarczan sodu (SDS) [6].

Proces powstawania nanocząstek silnie zależy od ilości oraz stosunków dodanych reagentów. Przykładowo, zbyt niska ilość stabilizatora może w niewystarczający sposób pokryć zredukowane cząstki srebra, które zaczną agregować, w rezultacie dając mieszaninę agregatów o znacząco różnych rozmiarach. Zbyt duży stosunek molowy dodanego stabilizatora do soli srebra może z kolei zahamować proces redukcji i nanocząstki srebra nie powstaną. Stężenie reduktora w stosunku do źródła jonów srebra ma wpływ na szybkość i wielkość powstających nanocząstek. Duży stosunek molowy soli srebra do reduktora powoduje powstawanie wielu małych załączków nukleacji, a w efekcie

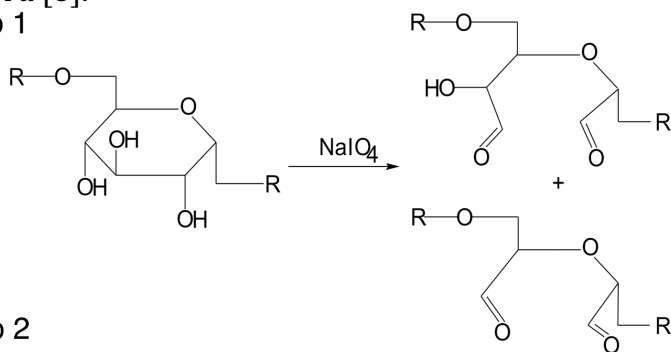
powstanie małych nanocząstek o monodispersyjnym rozkładzie rozmiarów. Zmniejszenie tego stosunku, powoduje powstawanie mniejszej ilości załączków nukleacji i ich stopniowego wzrostu, co prowadzi do powstania większych nanocząstek o bardziej zróżnicowanych rozmiarach.

Nanocząstki polisacharydowe

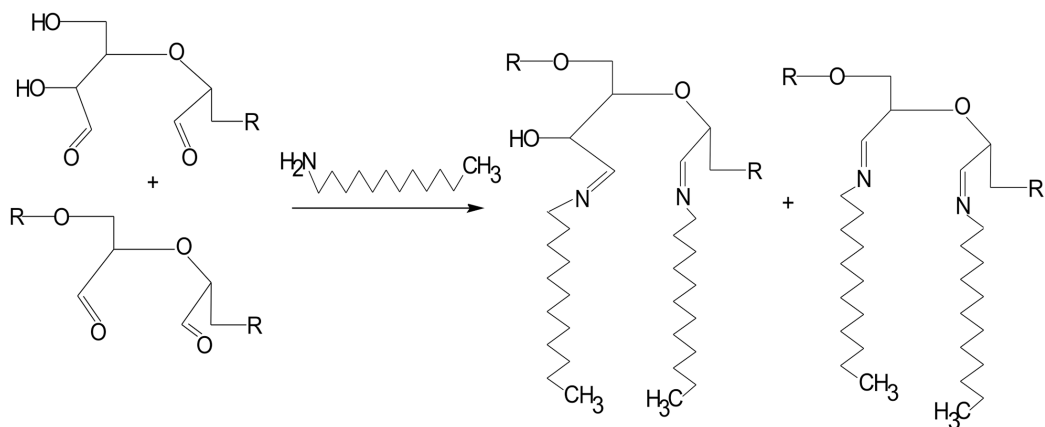
Proces otrzymywania hydrożelowych nanocząstek polisacharydowych – nanocząstek polimerowych – powstał z myślą o przygotowaniu preparatu do celowanej terapii. Ze względu na wodne środowisko reakcji i brak toksycznych reagentów, jak również na możliwość funkcjonalizacji łańcuchów polisacharydów pozwalająca na przyłączenie cząsteczek leków, taki system – nanocząstka z zamkniętym lekiem – został zaproponowany jako produkt medyczny.

Otrzymywanie nanocząstek polisacharydowych polega na zmodyfikowaniu łańcucha polisacharydu – np. dekstranu – w celu wytworzenia w jego łańcuchu grup aldehydowych (etap 1), a następnie na wykorzystaniu reakcji powstawania zasady Schiffa do przyłączenia w odpowiednich miejscach zarówno leku jak i cząstki tzw. czynnika zwijającego (etap 2). Następnie, pod wpływem oddziaływań hydrofilowo-hydrofobowych, na drodze samoorganizacji materii formowane są nanocząstki złożone z około 10 podstawionych łańcuchów polimeru [8].

Etap 1



Etap 2



Rys. 2 Schematyczne przedstawienie modyfikacji łańcucha polisacharydu (etap 1) oraz przyłączenia czynnika zwijającego (amina alifatyczna - dodecyloamina) w reakcji powstawania zasady Schiffa pomiędzy grupą karbonylową polimeru i aminą alifatyczną (etap 2) [8].

W omawianym procesie możliwe jest wykorzystanie polisacharydów takich jak celuloza, dekstran itp. Jako czynniki zwijające najczęściej stosowane są aminy alifatyczne takie jak heksyloamina, oktyloamina, dodecyloamina itp. Właściwości otrzymywanych cząstek, a głównie ich rozmiar, zależą od długości łańcucha polisacharydu (tj. od jego masy cząsteczkowej), długości łańcucha czynnika zwijającego oraz stopnia zmodyfikowania (etap 1) i podstawienia (etap 2) łańcuchów polisacharydu [8].

Wykonanie ćwiczenia

Nanocząstki srebra

Aparatura wykorzystywana na ćwiczeniu

1. Mieszadło magnetyczne z kontrolą temperatury
2. Waga analityczna
3. Pipety
4. Spektrofotometr UV-VIS
5. Analizator rozmiaru cząstek DLS (ZetaSizer NanoZS)

Odczynniki wykorzystywane na ćwiczeniu

1. Roztwór polialdehydodekstranu PAD (stężenie 100 g/l)
2. Azotan srebra AgNO_3 .

Roztwory do przygotowania

1. Rozcieńczyć wyjściowy roztwór PAD do uzyskania po 10 ml roztworów o poniższych stężeniach:
 - a. 1 g/l PAD;
 - b. 2,5 g/l PAD;
 - c. 4 g/l PAD;
 - d. 5 g/l PAD;
 - e. 6 g/l PAD.Roztwory umieścić w ciemnych naczyniach.
2. 0,1 M roztwór AgNO_3 ($M_w=169,87$ g/mol) o objętości 5 ml.

Przebieg reakcji

1. Włączyć mieszadło magnetyczne i ustawić temperaturę kąpieli wodnej na 50°C . Po ustabilizowaniu temperatury w każdym z przygotowanych roztworów polialdehydodekstranu umieścić mieszadło magnetyczne, a następnie roztwory umieścić na mieszadle w łaźni wodnej. Mieszanie nastawić na około 350 obrotów na minutę. Stabilizować temperaturę roztworów PAD przez około 10 minut.
2. Przygotować roztwór AgNO_3 .
3. Do roztworów PAD dodać po 100 μl 0,1 M roztworu AgNO_3 w celu rozpoczęcia reakcji redukcji soli srebra i otrzymywania nanocząstek.
4. Reakcję prowadzić przez 3 godziny.
5. Po zakończeniu reakcji naczynia z otrzymanymi cząstkami wyjąć z kąpieli wodnej i pobrać do kuwet spektrofotometrycznych po 2,5 ml każdego

z otrzymanych preparatów. Przygotować również kuwetę z wodą destylowaną jako ślepą próbę.

6. Wykonać pomiar widma absorpcji w zakresie długości fal od 300 do 700 nm.
7. Wykonać pomiar rozmiaru otrzymanych nanocząstek techniką DLS. Próbkę rozcieńczyć w razie konieczności.

Nanocząstki polisacharydowe

Aparatura wykorzystywana na ćwiczeniu

1. Mieszadło magnetyczne z kontrolą temperatury
2. Waga analityczna
3. Pipety
4. pHmetr
5. Spektrofotometr UV-VIS
6. Analizator rozmiaru cząstek DLS (ZetaSizer NanoZS)

Odczynniki wykorzystywane na ćwiczeniu

1. Roztwór polialdehydodekstranu PAD (stężenie 100 g/l)
2. Dodecyloamina.

Roztwory do przygotowania.

1. 5 ml roztworu PAD umieścić w naczyniu do prowadzenia reakcji.
2. 2 % (w/v) roztwór dodecyloaminy, przy czym stosunek masowy PAD do dodecyloaminy wynosi 1 g do 3 mg. Roztwór dodecyloaminy przygotowywać w temperaturze 30°C intensywnie mieszając.

Przebieg reakcji

1. Włączyć mieszadło magnetyczne i ustawić temperaturę kąpieli wodnej na 30°C. Po ustabilizowaniu temperatury w roztworze polialdehydodekstranu umieścić mieszadło magnetyczne, a następnie roztwór umieścić na mieszadle w łaźni wodnej. Mieszanie nastawić na około 350 obrotów na minutę. Stabilizować temperaturę roztworu PAD przez około 10 minut.
2. Przygotować roztwór dodecyloaminy.
3. Do roztworu PAD dodać cały roztwór dodecyloaminy.
4. W ciągu 15 minut stopniowo podwyższać pH mieszaniny reakcyjnej do 9,5 (10) używając małych objętości (20 µl) 0,1 M roztworu NaOH.
5. Po doprowadzeniu pH do zadanej wartości prowadzić reakcję podstawiania łańcucha polialdehydodekstranu dodecyloaminą przez 60 min utrzymując pH na zadanej wartości.
6. Stopniowo obniżyć pH mieszaniny reakcyjnej do 7,4 przy użyciu 0,1 M roztworu HCl. Nie zejść poniżej zadanej wartości pH!
7. Pobrać 1 ml mieszaniny poreakcyjnej do kuwety spektrofotometrycznej.
8. Wykonać pomiar rozmiaru otrzymanych nanocząstek techniką DLS. Próbkę rozcieńczyć w razie konieczności.

9. Mieszaninę poreakcyjną poddać procesowi dializy wobec wody destylowanej przez ponad 24 h.
10. Z oczyszczonej mieszaniny poreakcyjnej (po procesie destylacji) pobrać próbkę do pomiaru rozmiaru cząstek.
11. Wykonać pomiar rozmiaru oczyszczonych nanocząstek techniką DLS.
12. Oczyszczoną mieszaninę poreakcyjną umieścić w pojemnikach plastikowych, a następnie przenieść do zamrożenia w temperaturze -20°C na około 1 h.
13. Wstępnie zamrożoną próbkę poddać procesowi liofilizacji przez co najmniej 24 h.
14. Przeprowadzić rehydratację otrzymanych nanocząstek (roztwór liofilizatu w wodzie destylowanej, mieszanie przez około 1 h) i zmierzyć ich rozmiar.

Przygotowanie sprawozdania

W sprawozdaniu z wykonania ćwiczenia należy zawrzeć:

1. Krótki opis wykonywanego ćwiczenia.
2. Dla obu rodzajów nanocząstek: wyniki pomiarów rozmiarów cząstek wyrażone w intensywności sygnału na detektorze, objętości cząstek i liczbie cząstek.
3. Dla cząstek metalicznych: wykres przedstawiający zależność średniego rozmiaru wyrażonego w liczbie cząstek od stężenia roztworu PAD użytego w reakcji; zestawienie widm UV-VIS otrzymanych próbek nanocząstek.
4. Dla cząstek polisacharydowych: przedstawić możliwe powody różnic lub braku różnic w pomiarach rozmiaru cząstek na każdym z etapów ich otrzymywania.

Zagadnienia do wejściówki

Treść instrukcji do ćwiczeń.

Literatura

- [1] Kelsall R.W., Hamley I.W., Geoghegan M. Nanotechnologie. Wyd. PWN 2012.
- [2] Cademartiri L., Ozin G.A. Nanochemia. Podstawowe koncepcje. Wyd. PWN 2015.
- [3] Jain K.K The Handbook of Nanomedicine. Humana Press 2017.
- [4] Red. Świdarska-Środa A., Łojkowski W., Lewandowska M., Kurzydłowski K.J., Świat nanocząstek, Wyd. PWN 2016.
- [5] Patakfalvi R., Dékány I. (2005) Nucleation and growth of silver nanoparticles monitored by titration microcalorimetry. J Therm Anal Calorim, 79, 587-594
- [6] Goia D.V., Matijević E. (1998) Preparation of monodispersed metal particles, New Journal of Chemistry, 98, 1203-1215.
- [7] Ma Y., Li N., Yang C., Yang X. (2005) One-step synthesis of amino-dextran-protected gold and silver nanoparticles and its application in biosensors. Anal Bioanal Chem, 382, 1044-1048.

NANOTECHNOLOGIA MEDYCZNA - LABORATORIUM

Specjalność: Inżynieria produktów nanostrukturalnych

Semestr: II, rok akademicki 2019/2020

Opracowanie: dr inż. Michał Wojasiński, mgr inż. Jolanta Duszak

Konsultacje: dr inż. Iga Wasiak

[8] Wasiak I., Kulikowska A., Janczewska M., Michalak M., Cymerman I.A., Nagalski A., Kallinger P., Szymanski W.W., Ciach T. (2016) Dextran nanoparticle synthesis and properties. PLoS ONE 11(1), e0146237.

Literatura dodatkowa

[1] “Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes” Technical Note wydana przez Malvern Instruments.