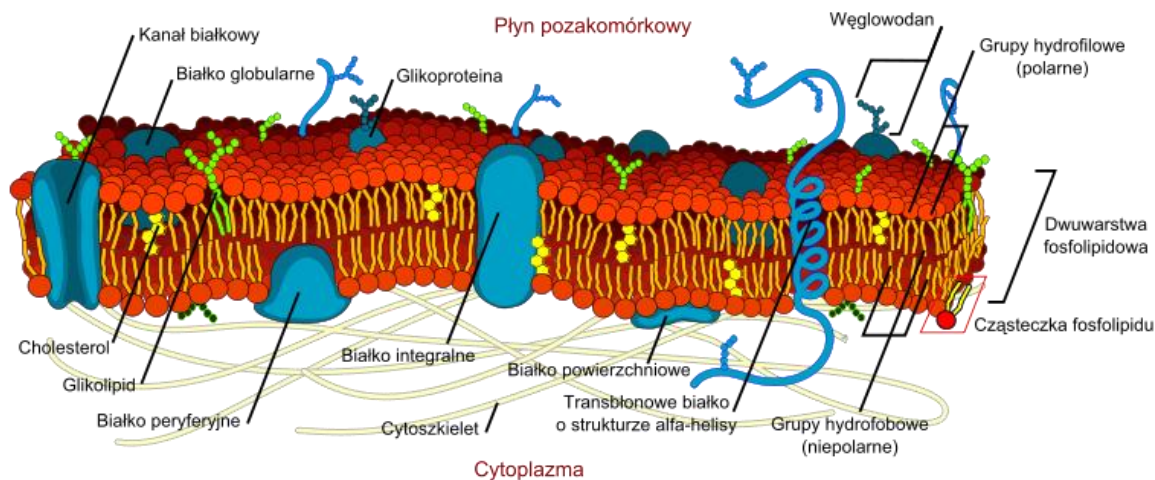


A. Właściwości błon biologicznych. Liposomy, preparatyka liposomów i ich ładowanie substancją barwną. Określanie wielkości cząsteczki lipidu poprzez pomiar powierzchni warstwy monomolekularnej.

Każda komórka otoczona jest błoną komórkową (plazmatyczną), która pozwala oddzielić komórkę od środowiska zewnętrznego i zachować charakterystyczny dla niej skład chemiczny, często różniący się od otaczającego jej środowiska (mówi się, że błona ta zapewnia integralność komórki). Jednocześnie zapewnia ona wymianę materii i informacji pomiędzy komórką, a jej otoczeniem, dzięki zdolności błon do wybiórczego przepuszczania określonych substancji. Badania składu chemicznego błon komórkowych wykazały, że jej głównymi składnikami są białka (w zależności od pełnionych funkcji przez błonę stanowią one ok. 20-70 %) i związki lipidowe. Przykładowo w osłonce mielinowej białka stanowią ok. 20 % masy suchej, a w wewnętrznej błonie mitochondrialnej aż 70 % masy błony. W błonach plazmatycznych większości komórek udział białek (ok. 40 %) i lipidów (ok. 60 %) jest zbliżony do siebie.

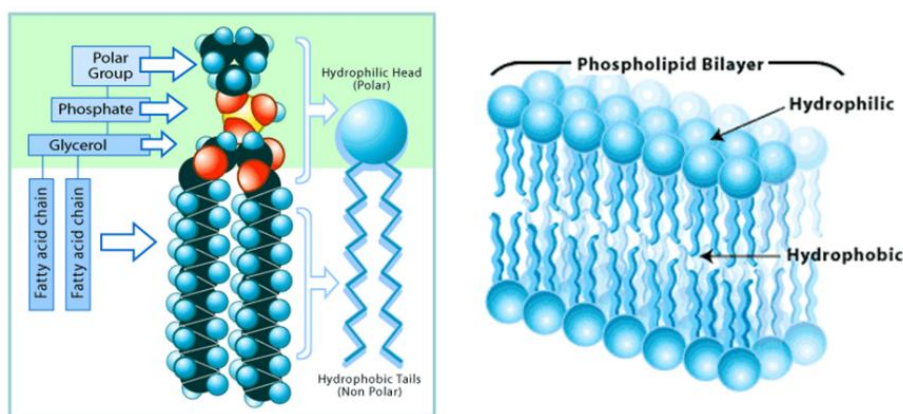
W latach 70-tych XX wieku zaproponowano tzw. *mozaikowy model budowy błon biologicznych*, według którego lipidy tworzą podwójną warstwę, w której zanurzone są białka (ryc. 1). Część białek „przebija” błonę i ich końce wystają po obu stronach dwuwarstwy lipidowej (białka integralne, transbłonowe; kanały białkowe), część natomiast jest luźniej związana z powierzchnią błony (białka powierzchniowe/periferyjne, globularne). Białka te odpowiedzialne są za specjalistyczne funkcje pełnione przez dany typ komórek.



Ryc. 1. Mozaikowy model budowy błony

Spośród związków lipidowych tworzących zrąb błony komórkowej, najbardziej liczne są fosfolipidy. Pod względem chemicznym fosfolipidy są pochodnymi kwasu fosfatydylowego, którego rdzeniem jest cząsteczka glicerolu zestryfikowana dwoma długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi i kwasem fosforowym. Charakterystyczną cechą związków lipidowych jest ich amfifilowość, czyli dwojaki sposób oddziaływania z cząsteczkami wody. Wynika to z faktu, że reszty kwasów tłuszczowych mają charakter *hydrofobowy* (nie mają momentu dipolowego – są niepolarne), a grupa fosforanowa

połączona wraz z przyłączoną do niej częścią polarną ma charakter *hydrofilowy* (ryc. 2). W środowisku wodnym strukturą energetycznie korzystną dla fosfolipidów jest taka struktura, w której części hydrofobowe nie mają kontaktu z wodą. Dlatego też w błonie plazmatycznej hydrofobowe reszty kwasów tłuszczowych skierowane do środka, a hydrofilowe „głowy” pozostają w kontakcie z środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym komórki, w których woda jest jednym z integralnych składników chemicznych.



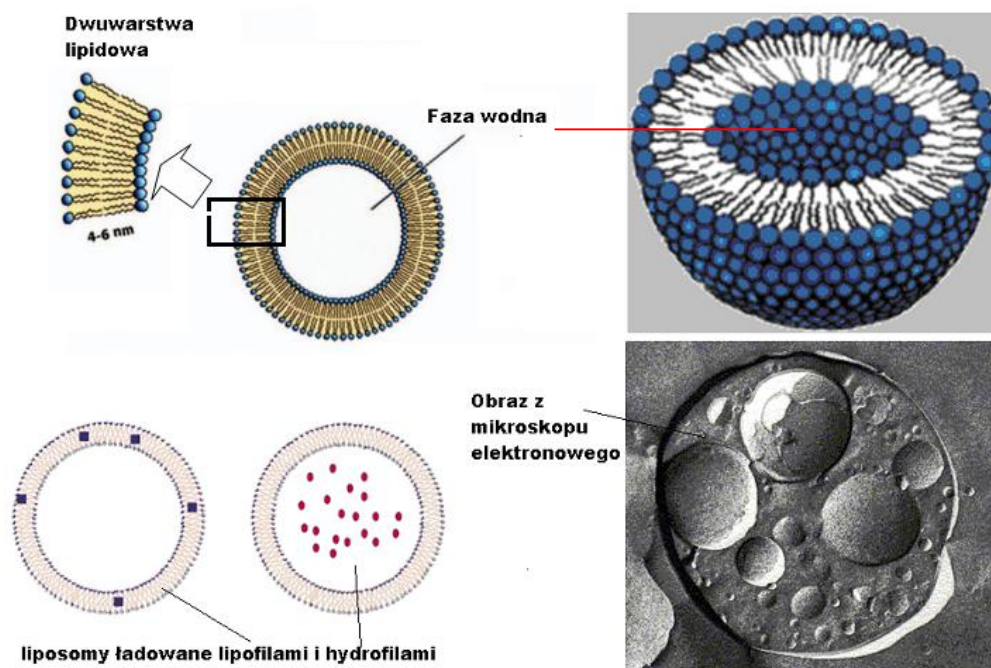
Ryc. 2. Amfifilowa cząsteczka fosfolipidu i fragment dwuwarstwy lipidowej

Wiele fosfolipidów, w środowisku wodnym tworzy spontaniczne, podwójne warstwy folipidowe. Pojedyncze cząsteczki lipidowe w warstwie podwójnej mogą się poruszać zarówno w płaszczyźnie błony (dyfuzja lateralna, która zachodzi stosunkowo łatwo), jak i w poprzek błony (dyfuzja wertykalna, gdzie te mechanizmy są bardziej skomplikowane i jedne składniki przemieszczają się stosunkowo swobodnie, a w przypadku innych nie udało się eksperymentalnie potwierdzić samorzutnego przemieszczania się). Dlatego też mówi się, że podwójna błona jest półpłynnym tworem, a jej płynność zależy od składu i temperatury otoczenia. Przykładowo obecność cząstek cholesterolu zmniejsza płynność błony - usztywnia ją i zmniejsza przepuszczalność dla małych cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie.

Podobne struktur do błon tworzą **liposomy** (pęcherzyki fosfolipidowe, pęcherzyki Banghama, ang. *liposomes*), będące zamkniętymi kulistymi strukturami gdzie części hydrofilowe skierowane są na zewnątrz, a hydrofobowe skierowane ku wnętrzu dwuwarstwy lipidowej (Ryc. 3). Mają one na ogół postać pęcherzyków (o wielkości od kilku nanometrów do kilku mikrometrów, często literatura podaje zakres 0,01-10 μm) wypełnionych wodą (lub roztworem wodnym) i otoczonych dwuwarstwą lipidową o strukturze analogicznej do tej występującej w błonach biologicznych.

Podobieństwo właściwości liposomów do właściwości błon biologicznych powoduje, że stały się one modelowym obiektem badań właściwości błon biologicznych. Ponieważ są zbudowane z tych samych składników (fosfolipidów) co błony komórkowe i swobodnie mogą przez nie przenikać (są niewielkie) to wykorzystywane są również do przenoszenia różnorodnych substancji (zarówno lipofilowych, jak i hydrofilowych). To sprawia, że strukturami tymi szczególnie zainteresował się przemysł kosmetyczny i farmaceutyczny. Pierwsze praktyczne zastosowanie liposomów miało miejsce w latach 80-tych XX wieku, a obecnie formułę liposomową można spotkać w: kremach pielęgnacyjnych (na dzień, na noc,

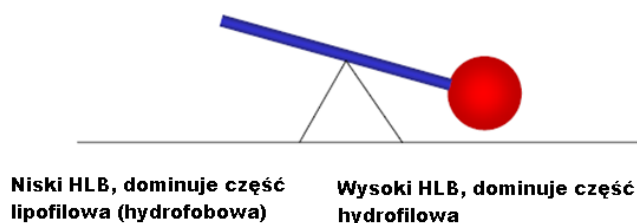
regeneracyjne, przeciwzmarszczkowe), środki pielęgnacyjne do i po goleniu, preparatach samoopalających, płynach do kąpieli, preparatach do pielęgnacji skóry, olejkach do smarowania rozstępów, tonikach bezalkoholowych itd.



Ryc. 3. Budowa liposomów (przekrój z zaznaczonym fragmentem dwuwarstwy lipidowej, struktura pęcherzyka lipidowego, zdjęcie z mikroskopu elektronowego).

Liposomy powstają w wyniku spontanicznej hydratacji (uwodnienia) suchego filmu fosfolipidowego (faza hydrofobowa). Możliwość ich powstawania wynika z wyjątkowo korzystnych wartości HLB (Ryc. 4) fosfolipidów jako amfifilów oraz kształtu ich cząsteczek, dzięki czemu większość fosfolipidów preferuje tworzenie agregatów o strukturze dwuwarstwowej. Ponieważ płaska struktura dwuwarstwowa jest energetycznie niekorzystna, to powstająca dwuwarstwa lipidowa zaczyna tworzyć zamknięte struktury (o kształcie kulistym), aby zminimalizować całkowitą energię tworzonej struktury.

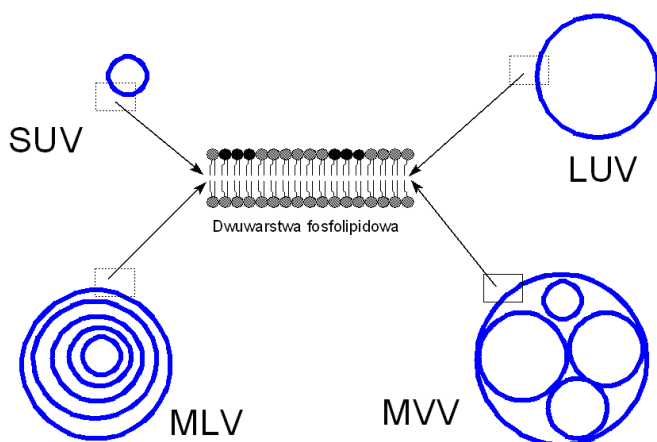
**Hydrofilowe właściwości fosfolipidu wyrażone w liczbach.
Skala Griffina 1-20**



Ryc. 4. Współczynnik HLB (*ang. hydrophilic-lipophilic balance*) - równowaga hydrofilowo-lipofilowa fosfolipidu jest parametrem, mówiącym w jakim stopniu jest on hydrofilowy, czy lipofilowy. Wyznacza się go obliczając wartości tych cech dla różnych regionów cząsteczki. W skali Griffina wartość HLB równa 0 odpowiada cząsteczce całkowicie hydrofobowej, a 20 cząsteczce zbudowanej w całości z części hydrofilowych.

Liposomy występują w organizmach żywych (liproteiny krwi) oraz są produkowane na skalę laboratoryjną i przemysłową (wykorzystywane do produkcji leków, kosmetyków). Wyróżniamy więc liposomy sztuczne i liposomy naturalne. Liposomy sztuczne można podzielić pod względem rozmiaru, ilości warstw otoczki i sposobu wykonania (ryc. 5). Z względu na właściwości otoczki lipidowej dzieli się je też na obojętne (zbudowane z fosfatydocholiny, gdzie ujemny ładunek reszty fosforanowej neutralizowany jest dodatnim ładunkiem na azocie w cholinie), liposomy kationowe (oprócz fosfolipidów i cholesterolu zawierają związki naładowane dodatnio) i liposomy anionowe (zawierają związki naładowane ujemnie). Z kolei z względu na ilość lipidowych budujących liposomy oraz wielkość przestrzeni wodnej w ich wnętrzu możemy je podzielić na:

- **Liposomy z więcej niż jedną warstwą lipidową**
 - liposomy wielowarstwowe (ang. *multilamellar vesicles*, **MLV**) - rozmiar: $0,4 \div 10 \mu\text{m}$
- **Liposomy jednowarstwowe** (ang. *unilamellar vesicles*; **UV**) - rozmiar: $0,01 \div 1 \mu\text{m}$ (wszystkie zakresy wielkości)
 - małe liposomy jednowarstwowe (ang. *small (or sonicated) unilamellar vesicles*; **SUV**) rozmiar: $0,02 \div 0,03 \mu\text{m}$
 - duże liposomy jednowarstwowe (ang. *large unilamellar vesicles*) - **LUV**) – rozmiar: $0,05 - 1 \mu\text{m}$.
 - olbrzymie liposomy jednowarstwowe (ang. *giant unilamellar vesicles*) - **GUV**) – powyżej $1 \mu\text{m}$.
- **Wielopęcherzykowe liposomy** (ang. *multivesicular vesicles*; **MVV**) - rozmiar: $> 1 \mu\text{m}$.



Ryc. 5. Typy liposomów (schemat)

W warunkach naturalnych cząsteczki o charakterze hydrofobowym (lipidy, cholesterol, triglicerydy) transportowane są w środowisku wodnym organizmu, z krwią i płynem tkankowym w postaci **cząstek - lipoprotein**. Mają one postać pęcherzyków/dysków otoczonych podwójną lub pojedynczą warstwą lipidową błony, zbudowanej z fosfolipidów, które otaczają hydrofilowe łańcuchy białek - apolipoproteiny

Liposomy sztuczne początkowo wykorzystywano głównie do modelowania procesów zachodzących w naturalnych błonach biologicznych. Liposomy te są bardzo stabilne, a poza tym skład ich może być określony bardzo precyzyjnie i ciągle kontrolowany w czasie

przebiegu eksperymentu. Dogodność ta wraz z dużą całkowitą powierzchnią liposomów udostępnioną dla eksperymentu decydują o tym, że liposomy wykorzystywane są przede wszystkim przy badaniu transportu małych i dużych cząsteczek nieelektrolitów przez błony, badaniu oddziaływań cząsteczek typu lipid-białko.

Badania nad liposomami jako modelowymi błonami biologicznymi przyczyniły się również do rozwoju metod pozwalających na otrzymywanie różnorodnych rodzajów liposomów. Jedne z tych technik są proste, lecz umożliwiają otrzymywanie liposomów składających się z wielu koncentrycznie zamkniętych przedziałów wodnych, inne natomiast dają wprawdzie twory otoczone tylko jedną dwuwarstwą, lecz o zbyt małych w porównaniu do komórki rozmiarach. Jeszcze innym powodem kontynuacji prac nad liposomami, które przekształciły się w oddzielną gałąź badań zwaną technologią liposomową, była chęć praktycznego wykorzystania zdolności zamykania substancji rozpuszczonej (roztworu) w strukturach utworzonych z naturalnych składników błon biologicznych, a więc obojętnych immunologicznie.

Jakie są zalety poszczególnych typów liposomów?

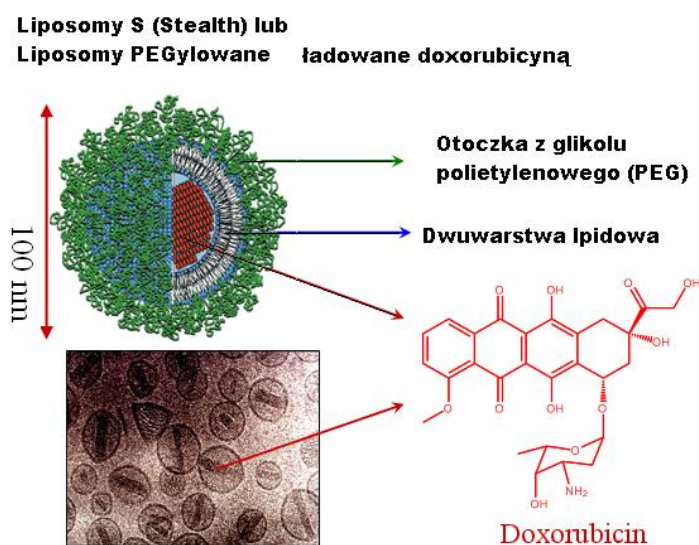
Liposomy wielowarstwowe (MLV) są szczególnie przydatne w przypadkach zamykania roztworów lipofilowych lub też wtedy, gdy efektywność zamykania roztworów wodnych nie jest istotna. Na skalę laboratoryjną odpowiednią techniką jest klasyczna metoda hydratacji cienkiego filmu lipidowego (opisana poniżej), która może być uzupełniona "wymiarowaniem" (przesiewaniem) uzyskanych liposomów przez przeciskanie ich przez filtry membranowe o porach określonej średnicy.

Małe jednowarstwowe liposomy (SUV), z uwagi na wąski zakres ich rozmiarów i wysoki stosunek powierzchni do objętości czyni je bardzo przydatnymi, szczególnie gdy nie jest wymagana wysoka wydajność enkapsulacji wodorozpuszczalnych solutów. Tego typu liposomy mogą być także ładowane substancjami o charakterze hydrofobowym. W tym wypadku przenoszona przez nie substancja jest zlokalizowana nie w środku liposomy lecz w jego lipidowej otoczce. Zaletą tych liposomów jest także ich zdolność penetrowania mniejszych struktur biologicznych. Do ich preparacji na skalę laboratoryjną stosuje się dezintegrację ultradźwiękami.

Duże jednowarstwowe liposomy (LUV) są szczególnie przydatne do wydajnego zamykania rozpuszczalnych w wodzie solutów z powodu preferującej objętość przestrzeni wodnej wartości stosunku objętości do powierzchni. Liposomy tego typu są również pożądane do rekonstrukcji białek błonowych, a także badań nad przepuszczalnością i fuzją błon.

Inny podział otrzymywanych sztucznie liposomów oparty jest na ich budowie i przeznaczeniu. Poza klasycznymi liposomami (*c-liposomes*) wyróżniamy dodatkowo s-liposomy (*sterically stabilized liposomes*) o przedłużonym okresie półtrwania, w których lipidowa osłonka pokryta jest glikolem polietylenowym. Tego typu liposom nie jest rozpoznawany przez komórki układu immunologicznego co umożliwia jego dłuższe przebywanie w chorej tkance. Dobrym przykładem jest tu doksil - preparat liposomowy zawierający doxorubicynę wykorzystywany do niszczenia komórek nowotworowych (ryc. 6).

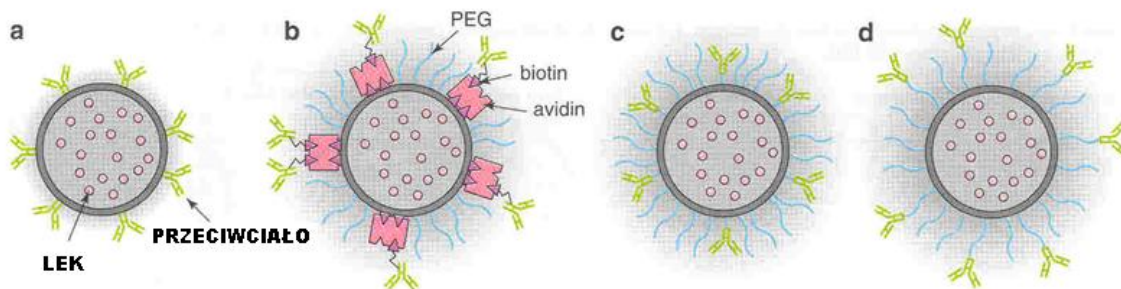
Stabilizowane liposomy wykorzystano także do produkcji immunoliposomów. W tego typu liposomach do otoczki lipidowej bezpośrednio lub pośrednio poprzez PEG lub biotyne/avidynę przyłączone są cząsteczki odpowiedniego przeciwciała.



Ryc. 6.

Immunoliposomy wykorzystuje się w przypadku terapii celowanej lekiem przeciwnowotworowym. W tym wypadku lek zawarty w środku pęcherzyka fosfolipidowego uwalnia się po dotarciu do chorej tkanki. Można również, poprzez zmianę składu, zaprojektować temperaturę, w jakiej ta lipidowa kapsułka ma uwalniać lek. Chore miejsce ma wyższą niż otoczenie temperaturę, co powoduje zwiększenie przepuszczalności ścianki liposomu i uwolnienie substancji terapeutycznej, kierując w ten sposób nośnik wraz lekiem bezpośrednio do komórek nowotworu.

Spontaniczne powstawanie pęcherzyków liposomalnych opisują dwa główne modele: model „pączkowania” oraz model „fuzji fragmentów dwuwarstwy fosfolipidowej”. W modelu „pączkowania” pęcherzyki powstają w czasie stopniowego uwadniania suchych fosfolipidów. Suche, cienkie warstewki fosfolipidów posiadają strukturę warstwową identyczną z dwuwarstwą; podczas uwadniania roztwór wodny wnika pomiędzy poszczególne dwuwarstwy powodując ich rozdzielanie i powstawanie pączkujących zaczątków pęcherzyków. Pęcherzyki podczas mechanicznego wytrząsania hydratowanego fosfolipidu odrywają się, a jako że powstały z wielu warstw suchego fosfolipidu, stają się wielowarstwowymi liposomami. Poddanie tych pęcherzyków działaniu ultradźwięków powoduje dalsze odpączkowywanie małych, jednowarstwowych pęcherzyków. Podobnie „homogenizująco” i reorganizująco działać będzie przeciskanie dużych pęcherzyków przez małe pory filtrów membranowych. W modelu „fuzji fragmentów dwuwarstwy fosfolipidowej” intermediatem, niezależnie od techniki stosowanej do uzyskania finalnych liposomów są mniej lub bardziej płaskie fragmenty dwuwarstwy, z których dopiero na drodze fuzji powstają zamknięte pęcherzyki, których wielkość zależy od wtórnej ich obróbki.



Ryc. 7. Liposomy modyfikowane: a) liposom c (klasyczny) z przyłączonym przeciwciałem, b) liposom PEGylowany z przeciwciałem przyłączonym poprzez biotynę/awidynę, c) liposom PEGylowany z przeciwciałem przyłączonym bezpośrednio z otoczką, d) liposom PEGylowany z przeciwciałem przyłączonym poprzez cząsteczki glikolu polietylenowego (PEG)

Do charakterystyki uzyskanych preparatów stosuje się m.in. określenie wartości tzw. objętości zamkniętej (*captured volume*) definiowanej jako objętość roztworu wodnego zamknięta przez daną ilość lipidu i jest wyrażana w litrach/mol lipidu całkowitego oraz tzw. wydajność zamykania (*encapsulation efficiency*) definiowana jako część roztworu, która jest zamknięta w liposomach. Ten drugi parametr jest wprost proporcjonalny do stężenia lipidu w preparacie liposomowym.

Naskórek jako miejsce podawania preparatów liposomowych

Naskórek stanowi naturalną ochronę zarówno przed utratą substancji z jego wnętrza, jak i wnikaniem obcych cząsteczek ze środowiska. Bariera ta utrudnia, a często wręcz uniemożliwia naskórne podanie leku w postaci wolnej. W kosmetyce natomiast preparaty odżywcze działają jedynie na warstwę rogową naskórka i nie mają zdolności do przenikania w głąb. Zastosowanie liposomów pozwala ominąć ten problem, gdyż mogą one przenosić substancje czynne (witaminy, proteiny, składniki nawilżające) do wnętrza naskórka, gdzie następnie będą uwalniane i wchłaniane. Uwalnianie substancji czynnych dzięki liposomom może być w pewien sposób kontrolowane. Jest to szczególnie ważne, gdy stosuje się substancje mogące w dużych stężeniach powodować podrażnienia lub takie, które mogą ulegać modyfikacjom zanim dotrą do miejsca docelowego. Dodatkowo łącząc się z powierzchniową warstwą naskórka (tzn. z warstwą rogową) wprowadzają wodę i substancje tłuszczowe, co przyczynia się do wzmocnienia jej i przywracając jej spoistość. Jeśli skóra, oprócz codziennej pielęgnacji, potrzebuje bardziej intensywnego zabiegu, to właśnie produkty z liposomami wydają się być idealnym rozwiązaniem. Do najczęściej spotykanych substancji transportowanych przez liposomy, stosowanych w preparatach kosmetycznych należą: aktywne formy witamin (A, B, C, E), koenzym Q₁₀, kwas hialuronowy, kolagen, elastyna, wyciągi z roślin, jak również tlen, który poprawia mikrokążenie i przemianę materii w skórze. Istnieją jednak wątpliwości, czy krem w takiej postaci wniknie w głąb skóry i czy taki zabieg ma sens. Skóra bowiem dba o odpowiedni przepływ krwi, a tym samym

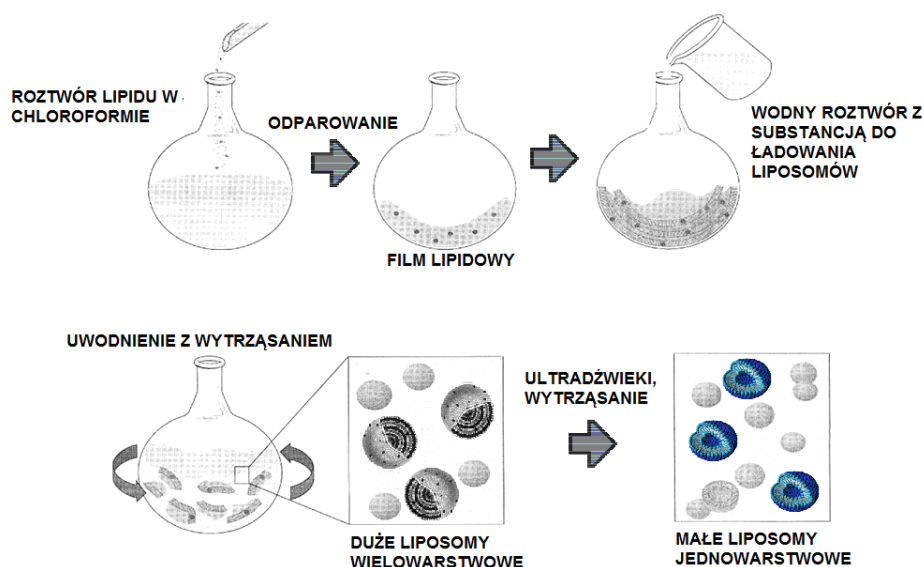
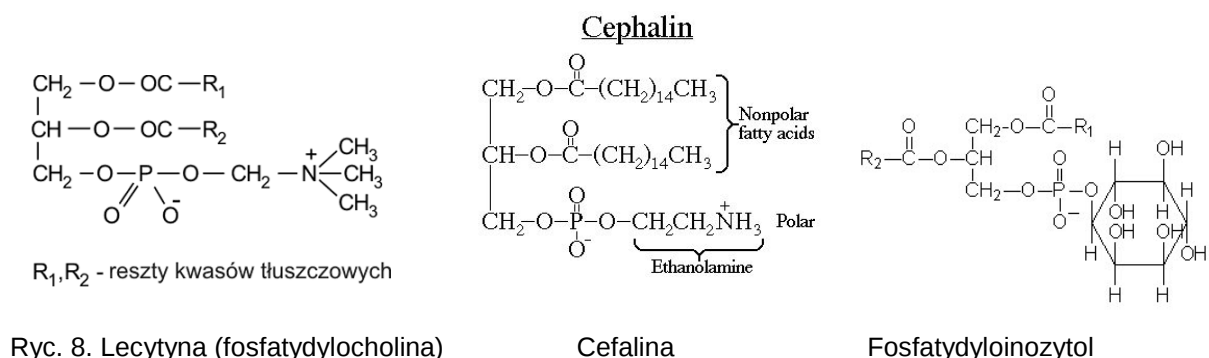
o odpowiednie natlenienie tkanek. Niemniej jednak ponieważ udowodniono, że niedobór tlenu przyczynia się do zwiótnienia i zmęczenia skóry to zastosowanie takich preparatów z tlenem mogłoby wywierać korzystny efekt. Korzyści z stosowania liposomów wykazano, w przypadku witaminy A, która jest bardzo nietrwała (*w postaci pochodnych, np.: soli octanu lub palmitynianu jest bardziej odporna na działanie czynników zewnętrznych) i aby komórki mogły ją wykorzystać, powinna być ona dostarczona skórze głęboko i w postaci „nieprzetworzonej”. Dzięki liposomom może być ona podana w najbardziej aktywnej postaci na odpowiednią głębokość. W kosmetykach stosowane są również liposomy z kwasem hialuronowym, który ma właściwości nawilżające skórę, poprawiające jej elastyczność oraz opóźniające proces starzenia. Substancja aktywna zamknięta w nośniku działa w głębi skóry, dostarczając jej dokładnie tyle wilgoci, ile skóra potrzebuje. Postęp w technologii wytwarzania i modyfikacji liposomów sprawia, że możliwe staje się wprowadzanie do ich wnętrza coraz większej liczby substancji o działu kosmetycznym czy terapeutycznym.

Liposomy z zawartością substancji terapeutycznych mają coraz większe zastosowanie w medycynie, wykazując przykładowo działanie antybakteryjne czy przeciwnowotworowe. Pełnią one nie tylko rolę nośnika leku, ale mogą też być wykorzystywane jako samodzielne struktury np. do dostarczenia do miejsca podania określonego rodzaju substancji o charakterze lipidowym. Dzięki temu powstają coraz bardziej zaawansowane systemy dostarczania odpowiednich substancji do komórek, które będą działały coraz efektywniej na nasze ciało. Zastosowanie liposomów jako nośników leku ma wiele zalet. Ułatwia to penetrację leku w najwyższych warstwach naskórka (często również głębiej) dzięki naturalnemu powinowactwu do jego składników. Łatwo też możemy uzyskać zwiększenie stężenia leku w skórze po podaniu mniejszych dawek. Dodatkowo minimalizuje się ryzyko wystąpienia reakcji ubocznych, gdyż lek jest izolowany przez błony liposomów, więc działa na komórki docelowe tylko w miejscu uwolnienia. Kolejną zaletą jest fakt, że umożliwia podawanie substancji leczniczej w większych odstępach czasu, gdyż liposomy po wnikięciu do naskórka stanowią magazyn leku, dzięki czemu substancja uwalniana jest stopniowo działając przez dłuższy czas. Podsumowując możemy stwierdzić, że leki zamknięte w liposomach i następnie uwalniane długotrwale w miejscu docelowym mają za zadanie zrównoważyć uwalnianie substancji czynnej, zmniejszyć jej toksyczność, a jednocześnie wydłużyć czas działania leku.

Preparatyka liposomów

Do preparatyki liposomów wykorzystujemy chloroformowy roztwór azolektyny. Azolektyna jest suchym ekstraktem z nasion soi, którego głównymi składnikami są lecytyna, cefalina i fosfatydyloinozitol (Ryc. 8). Następnie roztwór taki po przeniesieniu do odpowiedniej kolby umieszczany jest w liofilizatorze lub wyparce próżniowej, gdzie z chloroformowego roztworu lipidu usuwamy jest chloroform. Często wykorzystuje się fakt, że już w dość niskiej temperaturze możemy go odparować pod próżnią (przy pomocy wyparki próżniowej w obracającej się kolbie okrągłodennej uzyskujemy cienki suchy film fosfolipidowy). Film lipidowy poddajemy hydratacji przez dodanie wody (jeśli chcemy otrzymać liposomy nie ładowane) lub roztworu wodnego zawierającego ładowaną substancję

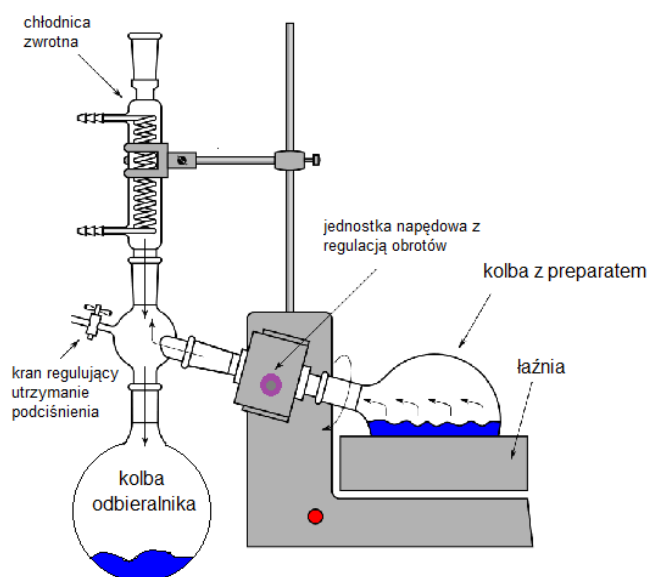
(Ryc. 9). Liposomy otrzymujemy poprzez intensywne wytrząsanie lub przez sonikację (ultradźwięki).



Ryc. 9. Schemat procesu otrzymywania liposomów

Wykonanie ćwiczenia

1. Odważyć 15 mg asolektyny na wadze analitycznej w probówce typu Eppendorf. Tak przygotowaną naważkę rozpuścić w 1 ml chloroformu i po rozpuszczeniu przelać zawartość do kolby okrągłodennej (o pojemności 50 ml).
2. Za pomocą wyparki próżniowej odparować chloroform.



Po podłączeniu kolbki okrągłodennej do pasującego szlif zestawu należy usunąć powietrze z wyparki poprzez zastosowanie pompki wodnej. Dopóki w wyparce nie panuje podciśnienie należy ręcznie podtrzymywać kolbę, która obecnie jest przytrzymywana tylko przez szlif – brak asekuracji może spowodować zsuniecie się kolby i jej rozbitcie lub upadek do

znajdującej się poniżej łaźni wodnej (utrata preparatu)! Pompkę wodną uruchamia się poprzez odkręcenie wody i ustawienie niebieskiego zaworu przy pompce w pozycji górnej (on). Należy też zwrócić uwagę, czy kranik przy kolbie odbieralnika jest w pozycji zamkniętej. Okręcić przepływ wody w drugim kranie, aby zimna woda przepływała przez chłodnicę zwrotną.

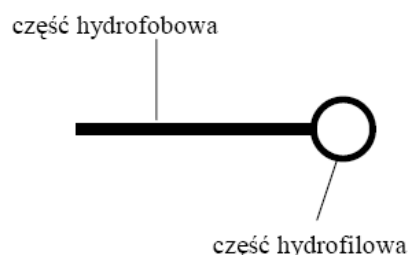
Wzrost wartości na manometrze przy pompce świadczy o wzrastającym podciśnieniu (próżni) w wyparce. Od tego momentu kolba będzie przytrzymywana do wyparki poprzez podciśnienie panujące w urządzeniu. Zanurzyć delikatnie kolbę w termostатовanej łaźni wodnej (45°C - 50 °C), tak aby zawartość kolby znajdowała się w wodzie. Przez cały czas odparowywania kolba powinna być obracana (koliste ruchy – obroty ustawiamy pokrętkiem na wyparce), aby substancja rozpuszczona w chloroformie, po odparowaniu rozpuszczalnika równomiernie rozłożyła się na ściankach kolby tworząc cienką warstwę (film).

3. Przygotowujemy 5 ml buforu Tris-HCl (pH 7,4), do którego dodajemy kilka (6-8) kropli soku z aronii, tak aby uzyskać wyraźne zabarwienie roztworu.
4. Po odparowaniu chloroformu (co zajmuje zazwyczaj kilka minut – określić poprzez obserwację czy w kolbie znajduje się jeszcze płynna zawartość czy już całość chloroformu została odparowana) należy zapowietrzyć wyparkę (zlikwidować próżnię poprzez przekręcenie szklanego kranu obok białego, plastikowego węża - w górnej części wyparki za odbieralnikiem. Delikatny syk powietrza i spadek wartości podciśnienia na manometrze świadczy o wyrównywaniu ciśnień wewnątrz i na zewnątrz wyparki. Od tego momentu znów konieczna jest ręczna asekuracja kolby. Po zlikwidowaniu próżni (wartość 0 na manometrze), wyłączyć ruch obrotowy kolby po czym delikatnie zdjąć kolbę okrągłodenną. Zamknąć kran od pompki wodnej, wyłączyć wyparkę/łaźnię i obieg wody w chłodnicy wyparki.
5. Uzyskany w pkt. 3 bufor przenosimy do kolby okrągłodennej i dokładnie mieszamy, aby cała warstwa lipidowa rozpuściła się. W razie potrzeby możemy użyć szklanej bagietki. Dobre rezultaty otrzymuje się poprzez wytrząsanie lub worteksowanie (jeżeli dostępna jest mikrowytrząsarka). Wytrząsanie kontynuować przez kilka minut. Należy szczególnie uważać, aby kolba nie wypadła z ręki! Wyraźne zmętnienie buforu świadczy o powstaniu liposomów.
6. Uzyskaną zawiesinę liposomów rozdzielamy na dwie części. Jedną z nich przenosimy do próbówki i poddajemy sonifikacji. Próbówkę wstawiamy do lodu i wprowadzamy do niej końcówkę dezintegratora ultradźwiękowego, wcześniej dokładnie przemytą wodą z płynem, a następnie wodą destylowaną (obficie) i wytartą ligniną. Próbkę poddajemy działaniu ultradźwięków (40-60 kHz), aż do uzyskania zmniejszonego zmętnienia. Zwykle stosujemy 2-3 cykle dezintegracji po ok. 15-20 s (pomiędzy poszczególnymi cyklami wymagane są 1-2 minutowe przerwy).
7. Uzyskane liposomy oraz po oglądamy pod mikroskopem. Zalecane jest sprawdzenie różnych ustawień przesłony źródła światła (zbyt mocne światło uniemożliwi zaobserwowanie liposomów). Porównać uzyskane liposomy bezpośrednio po uwodnieniu filmu lipidowego i po zastosowaniu ultradźwięków. Opisać obserwacje.

B. Wyznaczanie przybliżonych rozmiarów cząsteczek kwasu tłuszczowego poprzez pomiar powierzchni warstwy monomolekularnej.

Napięcie powierzchniowe jest właściwością cieczy wynikającą z asymetrii sił działających na cząsteczki warstwy powierzchniowej. Istnieje pewna klasa substancji, które mogą znacząco zmniejszać napięcie powierzchniowe nawet wtedy, gdy ich stężenie jest bardzo małe. Nazywamy je substancjami powierzchniowo czynnymi, surfaktantami. Wartości HLB dla surfaktantów są stosunkowo wysokie i wynoszą: dla detergentów 13-18, a dla solubilizatorów 16-18.

W cząsteczce surfaktantu można wyróżnić fragment hydrofobowy oraz polarną grupę funkcyjną o charakterze hydrofilowym (Rys. 10). Część hydrofilowa („rozpuszczalna” w wodzie), posiada elektryczny moment dipolowy (tak jak cząsteczka wody) np. OH, COOH, NH₃). Część hydrofobowa (albo liofilowa) nie posiadająca elektrycznego momentu dipolowego jest „nierozpuszczalna” w wodzie. Grupę tę zwykle stanowi łańcuch węglowodorowy lub fluorowodorowy. Cząsteczki o takiej budowie nazywa się cząsteczkami *amfifilowymi*.



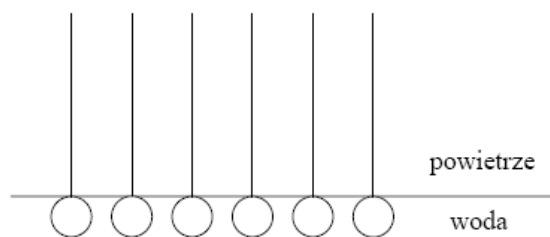
Ryc. 10. Ogólna budowa cząsteczki surfaktantu

Zjawisko amfifilowości jest bardzo ważne biologicznie i technologicznie. W biologii, dzięki temu zjawisku lipidy tworzą błony komórkowe, a także możliwa jest emulgacja tłuszczu w jelicie przy pomocy naturalnych surfaktantów jakimi są kwasy żółciowe. W technologii – amfifile wykorzystuje się do wytwarzania emulsji. Właściwości amfifilowe wykazują także mydła.

Ze względu na rodzaj fragmentu hydrofilowego surfaktanty podzielono na :

- 1) kationowe, np. czwartorzędowe sole amoniowe
- 2) anionowe, np. siarczan dodecylosodowy C₁₂H₂₅OSO₃Na (SDS)
- 3) o charakterze jonów obojnych (ang. *zwitterionic surfactants*)
- 4) niejonowe, np. alkohole posiadające łańcuch polioksoetylenowy, RO(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OH

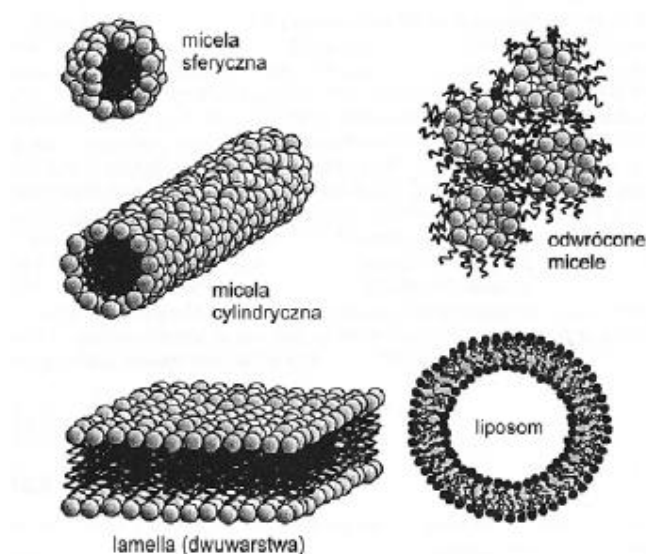
Surfaktanty zachowują się w specyficzny sposób w roztworze wodnym. Ugrupowanie o charakterze polarnym jest silnie solwatowane przez cząsteczki wody, natomiast reszta hydrofobowa nie wykazuje takiego powinowactwa. Odmienny charakter oddziaływań dwóch fragmentów cząsteczki z wodą prowadzi do tworzenia różnego typu uporządkowanych struktur. Jedną z nich jest monomolekularna warstwa na swobodnej powierzchni wody – część hydrofilowa skierowana jest do wnętrza fazy wodnej, natomiast hydrofobowa – w kierunku fazy gazowej (Rys. 11).



Ryc. 11. Schemat monomolekularnej warstwy cząsteczek surfaktantu na granicy faz woda powietrze.

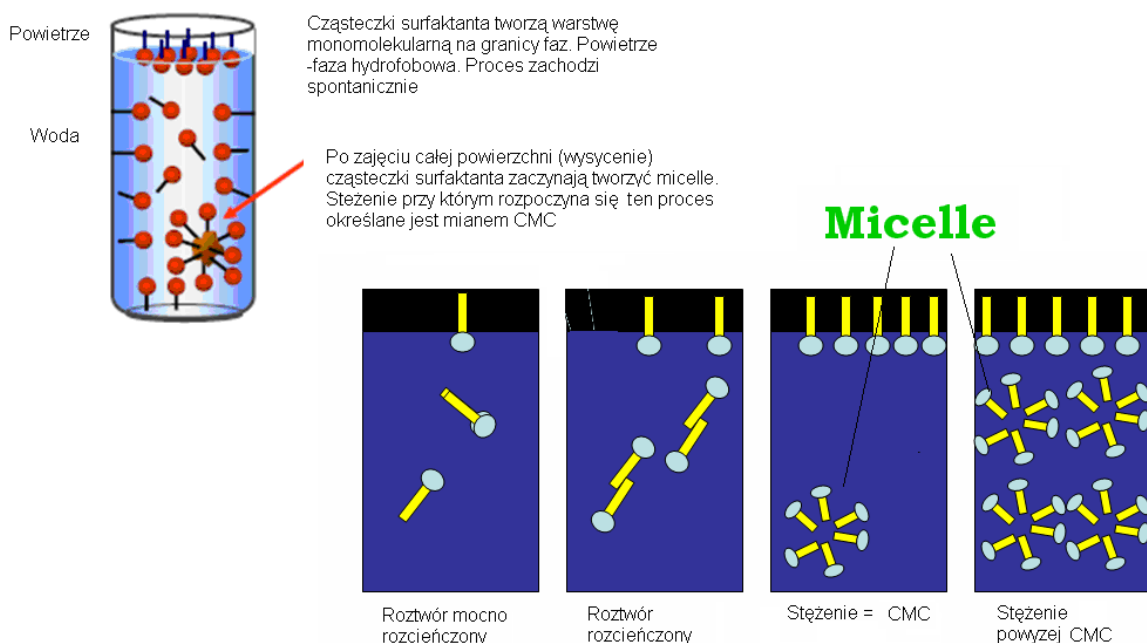
W rozcieńczonych roztworach, poniżej wartości tzw. krytycznego stężenia micelizacji, (ang. *critical micelle concentration* – CMC) surfaktanty gromadzą się na powierzchni, a w fazie wodnej mogą występować wyłącznie jako cząsteczki monomeryczne. Po wysyceniu całej powierzchni i osiągnięciu wartości CMC, w głębi roztworu zaczynają tworzyć się micelle -

wielocząsteczkowe agregaty (ryc. 12). Części hydrofobowe grupują się tworząc wewnętrzny rdzeń agregatu, natomiast części hydrofilowe zwrócone są w kierunku fazy wodnej. Micelle mogą mieć różne kształty – najczęściej spotykane są micelle sferyczne, elipsoidalne i cylindryczne, liposomy oraz twory dwuwymiarowe, tzw. lamelle (Rys. 11). Micelle sferyczne składają się przeciętnie z 30–100 molekuł i mają średnicę kilku nanometrów. Średnia liczba cząsteczek tworzących micellę nazywana jest liczbą agregacji miceli.



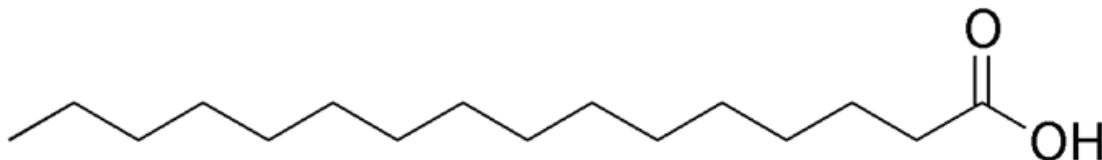
Ryc. 11. Typowe micelle tworzone przez surfaktanty (*Physics and Chemistry of Interfaces*, H.-J. Butt, M. Kappl, 2003 Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA)

Ryc. 12. Powstawanie warstwy monomolekularnej i miceli (poniżej)



Część ćwiczeniowa

Przykładem substancji o charakterze amfifilowym wykorzystywanej na ćwiczeniach jest kwas palmitynowy $\text{H}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ (ryc. 13), którego cząsteczka zbudowana jest z długiego łańcucha węglowodorowego $\text{H}(\text{CH}_2)_{15}$ o charakterze hydrofobowym oraz z hydrofilowej grupy karboksylowej.



Ryc. 13. Wzór kwasu palmitynowego

Aby otrzymać monomolekularną warstwę kwasu palmitynowego $\text{H}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ rozpuszczamy go w lotnym rozpuszczalniku (np. benzen, chloroform), a następnie kroplę roztworu nanosimy na wodę. Roztwór rozplywa się równomiernie po powierzchni, a po wyparowaniu lub rozpuszczeniu się rozpuszczalnika pozostaje monomolekularna błonka powierzchniowa. Cząsteczki kwasu stearynowego, znajdujące się na granicy faz woda - powietrze ustawiają się grupami polarnymi (COOH) w wodzie, a łańcuch węglowodorowy „sterczy” w powietrzu.

Zjawisko tworzenia się warstwy monomolekularnej może być wykorzystane do wyznaczania rozmiarów cząsteczek. W ćwiczeniu wyznaczać będziemy rozmiary cząsteczki kwasu palmitynowego: długość łańcucha, pole przekroju poprzecznego i średnicę przekroju.

W tym celu sporządzamy roztwór kwasu palmitynowego w chloroformie. Aby obserwacja warstwy monomolekularnej była łatwiejsza powierzchnię wody posypujemy talkiem. Cząsteczki talku nie są zwilżane przez wodę i pływają po jej powierzchni. Jeżeli kroplę roztworu kwasu palmitynowego upuścimy na powierzchnię wody posypanej talkiem, to chloroform odparowuje, zaś cząsteczki kwasu palmitynowego rozprzestrzeniają się po powierzchni wody, odsuwając przed sobą talk. Po pewnym czasie utworzy się kolistą, monomolekularna warstwa kwasu palmitynowego. Mierzmy średnicę takiej warstwy (D) i wyliczamy pole powierzchni (S) zajmowanej przez warstwę. Znając stężenie roztworu (c) oraz objętość kropli (V) roztworu naniesionej na powierzchnię wody, możemy obliczyć liczbę n cząsteczek tworzących warstwę monomolekularną wg wzoru:

$$n = \frac{cN_A V}{M} \quad [1]$$

gdzie: N_A - liczba Avogadra ($= 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$); $M = 254 \text{ g}$ - masa molowa kwasu palmitynowego.

Powierzchnia $S = \frac{\pi \cdot D_{sr}^2}{4}$ zajmowana przez warstwę monomolekularną,

$$S = n \cdot s_0 \quad [2]$$

gdzie: s_0 - średnie pole przekroju poprzecznego cząsteczki. Z [1] i [2] wynika, że

$$s_0 = \frac{\pi \cdot D_{sr}^2 \cdot M}{4c \cdot N_A \cdot V} \quad [3]$$

Przyjmując, że cząsteczka w przekroju ma kształt koła, możemy obliczyć średnicę (d) cząsteczki:

$$d = \sqrt{\frac{s_0}{\pi}} \quad [4]$$

Długość (L) cząsteczki kwasu stearynowego w jej pionowym ustawieniu jest równa grubości warstwy monomolekularnej. Grubość warstwy otrzymujemy dzieląc objętość (V_k) warstwy przez powierzchnię (S) warstwy.

$$L = \frac{V_k}{S} \quad [5]$$

Objętość warstwy równa się objętości kwasu stearynowego zawartego w kropli roztworu puszczonej na wodę i wynosi:

$$V_k = \frac{c \cdot V}{\rho} \quad [6]$$

gdzie: $\rho = 0,84 \text{ g/cm}^3$ - gęstość kwasu palmitynowego. Po podstawieniu [6] do [5] otrzymujemy wzór, z którego wyliczamy długość (L) cząsteczki:

$$L = \frac{c \cdot V}{S \cdot \rho} \quad [7]$$

Wykonanie ćwiczenia:

- 1) Przygotować zestaw pomiarowy jak na rycinie 14 (poniżej):



Ryc. 14. Zestaw do pomiaru wielkości cząsteczek tworzących warstwę monomolekularną

- 2) Napełnić płytkę Petriego wodą destylowaną. Przesuwając bibułę po powierzchni wody zdjąć wszelkie ewentualne zanieczyszczenia.
- 3) Posypać powierzchnię wody równą, cienką warstwą talku, tak aby równomiernie pokrył on całą powierzchnię. Można zamieszać bagietką lub wykonując delikatne koliste ruchy rozprościć go równomiernie po całej powierzchni.
- 4) Przygotować roztwór kwasu palmitynowego o stężeniu $1,5 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$. W tym celu rozpuścić 1,5 mg kwasu palmitynowego (przygotowana naważka) w 1 ml chloroformu.
- 5) Na powierzchnię wody z talkiem nanieść (w różnych miejscach) pipetą automatyczną (ustawioną na pojemność 100-200 μl) co najmniej 7 kropli roztworu kwasu palmitynowego w chloroformie ($C = 1,5 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$). Możemy założyć, że objętość 1 kropli wynosi ok. 20 μl . Chloroform powoduje odsuwanie cząsteczek talku od siebie, dlatego też po dodaniu kropli na powierzchni wody powinny być wyraźnie widoczne krople dodanego rozpuszczalnika.

- 6) Odczekać kilka minut, aby rozpuszczalnik odparował. Następnie sfotografować płytkę trzymając aparat bezpośrednio nad nią. Obok fotografowanego obszaru powinien znajdować się papier milimetrowy, aby na uzyskanym zdjęciu móc zaznaczyć okrąg, o średnicy 1 cm (w zależności od odległości od fotografowanego obiektu możemy uzyskać obiekty o różnej wielkości – okrąg o średnicy 1 cm będzie naszym punktem odniesienia).
- 7) Wybrać 3-4 różne powierzchnie, które są zbliżone kształtem do powierzchni kolistej i zmierzyć średnicę powstałych warstw monomolekularnych.

Średnicę powstałych monowarstw mierzymy stawiając szalkę Petriego na podkładkę z podziałką milimetrową (Ryc. 14). Zapisać wyniki poszczególnych pomiarów, a następnie obliczyć średnią wartość średnicy (D_{sr}).

- 8) Uzyskane zdjęcia przenieść do komputera i przy użyciu programu Motic Images Plus 2.0 obrysować warstwy monomolekularne i wyznaczyć ich powierzchnie* (-> patrz obsługa programu Motic Images Plus 2.0). Porównać to z wynikiem uzyskanym dla powierzchni okręgu o średnicy 1 cm ($\sim 0,785 \text{ cm}^2$). W przypadku uzyskania bardzo różniących się wartości wyliczyć współczynnik korekcji i wykorzystać go przy wyliczaniu powierzchni warstwy zajmowanej przez kwas palmitynowy.

*) Powierzchnie (S) zajmowaną przez monowarstwę można też wyznaczyć korzystając z zależności: $S = \frac{\pi \cdot D_{sr}^2}{4}$,

jeżeli została określona średnica okręgu utworzonego przez badaną substancję.

- 9) Wyliczyć liczbę cząsteczek (n), które tworzą monowarstwę i na tej podstawie określić średnie pole przekroju poprzecznego (S_0):

$$n = \frac{c N_A V}{M}$$

gdzie: $N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$;

$M = 254 \text{ g/mol}$

$C = 1,5 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$

$V = 0,02 \text{ cm}^3$

$S = n \cdot s_0$ gdzie powierzchnia S to wartość wyznaczona w p. pkt. 8

- 10) Wyliczyć średnią długość (L) cząsteczki oraz średnią średnicę (d) cząsteczki kwasu palmitynowego:

$$L = \frac{c \cdot V}{S \cdot \rho}$$

$$d = \sqrt{\frac{s_0}{\pi}}$$

gdzie: $\rho = 0,84 \text{ g/cm}^3$

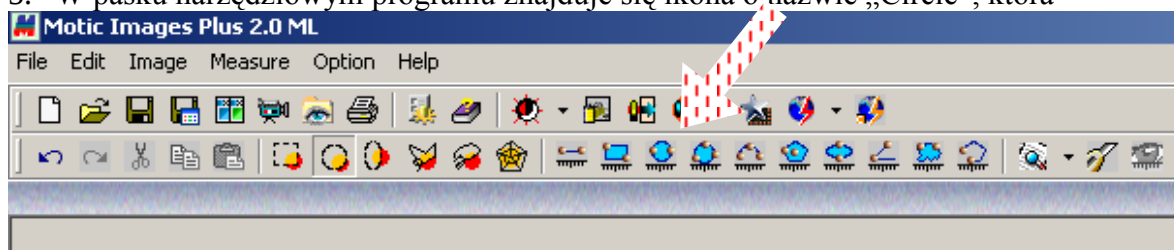
- 11) Całą procedurę powtarzamy dla oleju rzepakowego. Nie rozpuszczamy go jednak w benzenie, lecz wkraplamy bezpośrednio na warstwę wody. Wykonać analogiczne obliczenia aby wyznaczyć długość cząsteczki oleju rzepakowego (L).

Gęstość oleju rzepakowego: $\rho = 0,90 \text{ g/cm}^3$. Ponieważ olej rzepakowy nie jest roztworem rozcieńczanym (nie rozcieńczamy go w żaden sposób), jego stężenie wyrażone w g/cm^3 , będzie równe gęstości (Kwas palmitynowy był rozcieńczany dlatego tam podane jest zarówno jego stężenie, jak i gęstość).

Wśród kwasów tłuszczowych obecnych w oleju rzepakowym najwięcej jest kwasu oleinowego ($M=282,46 \text{ g/mol}$) i linolinowego ($M=280,45 \text{ g/mol}$). Dlatego w obliczeniach gdzie konieczne jest użycie masy molowej dla oleju możemy przyjąć przybliżoną wartość: 281 g/mol

Obsługa programu Motic Images Plus 2.0

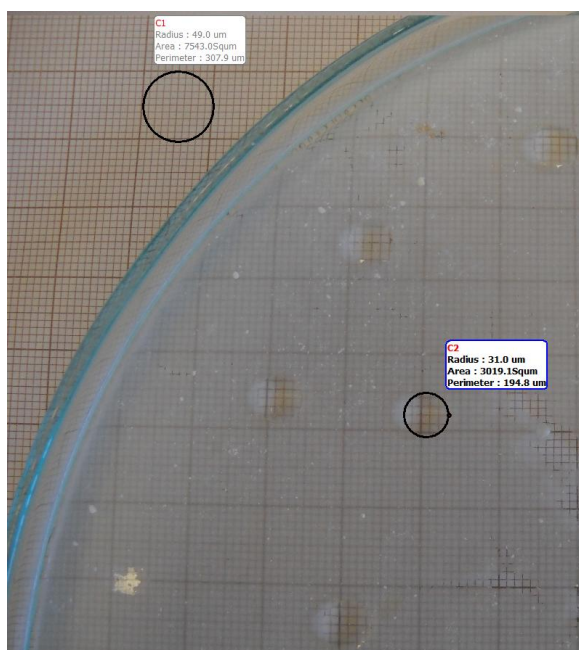
1. Zdjęcia z aparatu przenosimy na komputer, do wskazanego przez prowadzącego zajęcia folderu.
2. Uruchomić program Motic Images Plus 2.0
3. Z zakładki File wybieramy opcję „Open” (Ctrl+O) i otwieramy wybrane przez nas zdjęcie (proszę wskazać folder w którym są zgrane zdjęcia)
4. Klikając na polecenie „Image”, a następnie „Image Size” możemy ustawić wielkość obrabianego zdjęcia. Zalecana wielkość to: 1600 (width)/ 1200 (height) pikseli.
5. W pasku narzędziowym programu znajduje się ikona o nazwie „Circle”, która



umożliwia zmierzenie powierzchni zaznaczonego obszaru (w tym przypadku okręgu). Obrysowujemy interesujący nas obszar na zdjęciu (w miarę dokładnie)

Jednoczesne użycie klawiszy „Ctrl Z” pozwala odznaczyć zaznaczony obszar i ponowne obrysowanie interesującego nas obiektu)

6. Program automatycznie wyliczy nam powierzchnię zaznaczonego obszaru (μm^2).
7. Przełączamy na kolejne zdjęcie i czynność powtarzamy.
8. **Nie otwieramy jednorazowo dużej ilości zdjęć (2-3 max.).**



Przykład wykonanego zdjęcia w programie Motic Images Plus 2.0 z zaznaczonymi powierzchniami (obliczenia):

- koło o średnicy 1 cm (C1) wyliczone wartości w programie: $D = 98 \mu\text{m}$ ($r = 49 \mu\text{m}$); $S = 7543 \mu\text{m}^2$

- kropla badanej substancji (C2); wyliczone wartości w programie: $D = 62 \mu\text{m}$ ($r = 31 \mu\text{m}$); $S = 3019 \mu\text{m}^2$

Zatem:

$$7543 \mu\text{m}^2 \quad \text{----- (odpowiada dla)} \quad 0,785 \text{ cm}^2$$

$$3019 \mu\text{m}^2 \quad \text{-----} \quad x \quad \text{(wartość szukana)}$$

$$x = \frac{3019 \cdot 0,785}{7543} = 0,314 \text{ cm}^2$$

Podobną wartość uzyskamy, z wzoru: $S = \frac{\pi \cdot D_{sr}^2}{4}$

Jeżeli zmierzona średnica wynosiła $D = 0,63 \text{ cm}$, to po podstawieniu ($\pi = 3,14$) do wzoru: $S = 0,312 \text{ cm}^2$