

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **240500**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430274**

(51) Int.Cl.
G01N 13/02 (2006.01)
G01N 15/08 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **18.06.2019**

(54) **Sposób wyznaczania współczynnika dyfuzji środków aktywnych biologicznie do podania przezskórnie, zwłaszcza leków, oraz urządzenie do pomiaru współczynnika dyfuzji środków aktywnych biologicznie do podania przezskórnie, zwłaszcza leków**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

09.03.2020 BUP 06/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

19.04.2022 WUP 16/22

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

STANISŁAW POGORZELSKI, Gdańsk, PL

PAWEŁ ROCHOWSKI, Gdańsk, PL

MACIEJ GRZEGORCZYK, Stegna, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

PL 240500 B1

Opis wynalazku

Wynalazek mieści się w dziedzinie wyznaczania dynamiki transportu środków czynnych biologicznie do podania przezskórnie. Przedmiotem wynalazku jest sposób wyznaczania współczynnika dyfuzji środków czynnych biologicznie do podania przezskórnie a przez to pośrednio dynamiki transportu środków czynnych biologicznie do podania przezskórnie, zwłaszcza leków, z wykorzystaniem membrany biologicznej naśladującej barierę naskórka, bądź imitującej naskórek. Przedmiotem wynalazku jest również urządzenie do pomiaru współczynnika dyfuzji a przez to dynamiki przenikania – transportu środków aktywnych biologicznie do podania przezskórnie, zwłaszcza leków z wykorzystaniem membran naśladujących barierę skóry. Wynalazek z perspektywy zasad fizyki ma zastosowanie w wyznaczaniu dynamiki transportu masy w rozumieniu samorzutnego rozprzestrzeniania się masy w ośrodku, o naturze dyfuzyjnej, na potrzeby przezskórnych systemów terapeutycznych do zastosowania przedklinicznego.

Podawanie leków przez skórę ma tę zaletę nad innymi drogami aplikacji (np. iniekcja, doustnie), że nie prowadzi do negatywnych skutków globalnego obciążenia organizmu daną substancją chemiczną oraz jest metodą nieinwazyjną. Jednym z głównych celów badań przedklinicznych na systemach modelowych bądź naturalnych *ex-vivo* danego środka aktywnego biologicznie np. danego leku jest oszacowanie dynamiki jego penetracji przez zewnętrzne warstwy skóry, będące jednocześnie główną barierą wchłaniania. Badania te w dalszych etapach umożliwiają określenie dynamiki przenikania związków aktywnych biologicznie przez barierę – membranę, a dalej określenie odpowiednich dawek terapeutycznych oraz czasu działania środka aktywnego do podania przezskórnie, zwłaszcza leku.

Wśród znanych technik wykorzystywanych w dziedzinie badań transportu masy (w ogólnym rozumieniu samorzutnego rozprzestrzeniania się substancji w ośrodku) można wymienić metody znakowania radiologicznego (autoradiografia) oraz spektroskopowe, w tym fluorescencyjne, odbiciowe (w tym spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni, ATR-FTIR) i fototermiczne. Wymienione techniki służą do określania ilości substancji sorbowanej przez próbkę jako całość lub obserwacji zmian rozkładu (lokalizacji) substancji wewnątrz próbki w czasie (metody profilometryczne). Pierwsze z wymienionych są prostsze od strony doświadczalnej. W typowym eksperymencie, rezerwuar z lekiem (w rozumieniu zasobnika leku, w formie umożliwiającej przenikanie leku przez ośrodek – np. substancja aktywna rozpuszczona w wazelinie, czyli związek aktywny w postaci farmaceutycznej do podania przezskórnie) umieszcza się na określony czas w kontakcie z badanym ośrodkiem, np. imitującą tkankę membranę (badania przedkliniczne) bądź, w finalnej fazie badań – skórą zwierzęcą lub ludzką. Następnie, po usunięciu nadmiaru substancji leczniczej z powierzchni, próbkę membrany lub skóry rozpuszcza się i poddaje odpowiedniemu badaniu analitycznemu. Najczęściej używane do tego celu są metody chromatograficzne (HPLC, GLC) i scyntylograficzne.

Alternatywę stanowią badania określania ubytku donora substancji leczniczej w układzie lek – membrana; ilość sorbowanej materii jest równa różnicy jej wartości początkowej i końcowej. Pod względem technicznym używa się standardowo tzw. komór dyfuzyjnych Franza (obszary donora i akceptora są przedzielone badaną membraną), przy czym dynamika przenikania masy jest określana dodatkową metodą analityczną, przykładowo HPLC, UV-VIS, czy znakowania radiologicznego. Przykładowy układ bazujący na wykorzystaniu komory typu Franza znany jest z amerykańskiego opisu patentowego US6929782B1, gdzie badaną substancję nakłada się na uchwyt do badania uwalniania substancji – pomiaru szybkości uwalniania lub rozpuszczania badanego preparatu (do podawania miejscowego i/lub przezskórnego dostarczania leku) do cieczy, przy czym badana substancja dyfunduje do cieczy przez porowatą membranę zamontowaną w uchwycie. Jednakże w przypadku metod wykorzystujących komorę Franza konieczna jest modyfikacja chemiczna badanej substancji (wprowadzenie znaczników luminescencyjnych bądź promieniotwórczych) oraz pośrednia detekcja (na podstawie określenia ilości substancji w obszarze cyrkulującego płynu akceptora). Co więcej zestaw zwyczajowo opiera się na komorze dyfuzyjnej i oddzielnie na aparaturze analitycznej, co wpływa na wydłużenie procesu oraz zwiększenie kosztów aparatury.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu wyznaczania dynamiki przenikania środków biologicznie aktywnych do podawania przezskórnie z wykorzystaniem membrany biologicznej w dokładny sposób bez konieczności wykorzystania zaawansowanej aparatury analitycznej.

Cel osiągnięto dzięki opracowanemu sposobowi i urządzeniu do wyznaczania współczynnika dyfuzji środków aktywnych biologicznie przez membranę a przez to pośrednio wyznaczenie dynamiki przenikania środków aktywnych, do podawania przezskórnie.

W trakcie badań na Uniwersytecie Gdańskim opracowano metodykę dzięki wykorzystaniu opracowanej na potrzeby tego wynalazku metody sukcesywnej analizy kształtu kropli cieczy próbkującej będącej w kontakcie z membraną biologiczną, przez którą przechodzi substancja aktywna biologicznie, zwłaszcza lek w danej postaci farmaceutycznej, czyli analizy zmian kątów kontaktu pomiędzy brzegiem (czołem) kropli a warstwą ciała stałego, do której kropla przylega, czyli membrany. Zmiana kształtu kropli cieczy próbkującej w kontakcie z badaną membraną jest wywołana procesem adsorpcji powierzchniowej leku z wnętrza membrany, co jednocześnie wpływa na zmianę energetyki powierzchniowej membrany oraz zmianę symetrii (zamiennie: kształtu) kropli – zmianę obserwowanych kątów kontaktu kropli z membraną – dynamicznych kątów kontaktu: wstępującego zstępującego.

Obecnie używane goniometry stosowane w różnych dziedzinach do określania energetyki powierzchni ciała na podstawie kształtu kropli cieczy próbkującej będącej w kontakcie z badanym ciałem umożliwiają jedynie pomiar swobodnej energii powierzchniowej pojedynczej próbki w sprecyzowanym czasie od rozpoczęcia pomiarów. Jednak do określenia dynamiki przenikania substancji aktywnych przez membrany konieczna jest znajomość przebiegu czasowego zmian energetyki powierzchni. Wobec tego dodatkowym celem wynalazku jest opracowanie dedykowanego urządzenia do pomiaru dynamiki przenikania substancji przez membrany biologiczne, imitujące barierę skóry, np. naskórek, umożliwiającego realizację wariantu sposobu według wynalazku. Sposób według wynalazku umożliwia opracowanie, prostszego aparaturowo niż znane ze stanu techniki, urządzenia do pomiaru dynamiki przenikania substancji ale w sposób precyzyjny.

Metoda według wynalazku bazuje na cyklicznych pomiarach dynamicznych kątów kontaktu cieczy (o znanym napięciu powierzchniowym) z membraną, do której jednocześnie podaje się środek aktywny biologicznie np. lek (w rozumieniu substancji aktywnej w formie farmaceutycznej, np. maści); obraz kropli będącej w kontakcie z badanym materiałem rejestruje się np. kamerą i odczytuje się dynamiczne kąty kontaktu, a następnie oblicza ustalone parametry.

Metody bazujące na wykorzystaniu zmian energetyki powierzchniowej substancji na podstawie symetrii spoczywającej kropli na ciele stałym, tj. badaniu tzw. kątów kontaktu ciecz/ciało stałe, w przypadku wynalazku kropla próbkująca/membrana jak dotąd nie były wykorzystywane w badaniach przenikania substancji biologicznie czynnych przez skórę. Określanie energetyki powierzchni jest stosowane w odmiennych dziedzinach techniki według odmiennej metodologii – badaniach własności powierzchni materiałów: własności zwilżających (określające hydrofilowość/hydrofobowość materiału), energetyki i struktury powierzchni oraz kinetyki adsorpcji na granicy międzyfazowej. Charakteryzacji materiału dokonuje się poprzez pomiar kątów kontaktu pomiędzy cieczą próbkującą o znanym napięciu powierzchniowym γ_{LV} a badaną próbką wraz z odpowiednią interpretacją fizyczną, których może być wiele w tym bazując na teorii Younga oraz Wenzela czy Cassie-Baxtera.

Sposób wyznaczania współczynnika dyfuzji środków aktywnych biologicznie do podania przezskórnego przez membrany biologiczne, zwłaszcza leków, poprzez analizę zmian własności zwilżających powierzchni membrany naśladującej naskórek, charakteryzuje się według wynalazku tym, że przeprowadza się następujące czynności.

1. Przygotowuje się układ pomiarowy zbudowany z co najmniej trzech membran naśladujących barierę naskórka o znanej grubości membrany L zaś na powierzchni wierzchniej powierzchni trzech membran umieszcza się, w trakcie pomiaru właściwego, ciecz próbkującą o znanym napięciu powierzchniowym γ_{LV} , tworząc w ten sposób kroplę cieczy próbkującej rozpostartą na powierzchni membrany, zaś na drugiej stronie tych membran nanosi się, w trakcie pomiaru właściwego, środek aktywny biologicznie. Czynności te dokonuje się na każdej membranie w tym samym czasie lub różnym jednakże pomiaru właściwego dokonuje się po innym czasie w trakcie transportu środka aktywnego biologicznie.
2. Przeprowadza się co najmniej jeden pomiar referencyjny dla membrany wolnej od środka aktywnego biologicznie w czasie $t = 0$, czyli przed przeniknięciem środka aktywnie biologicznego w głąb membrany. Co najmniej dwa kolejne pomiary dokonuje się w innych niż czas $t = 0$ – różnych przedziałach czasowych po nałożeniu środka aktywnie biologicznego, w trakcie przenikania środka aktywnego biologicznie przez membranę. Dwa kolejne pomiary przeprowadza się w przedziale czasowym odpowiadającym wzrostowi powierzchniowej koncentracji substancji przed osiągnięciem wartości maksymalnej nasycenia C_{max} . Uzyskanie wartości maksymalnej C_{max} ustala się z przebiegu czasowej zależności rejestrowanego kąta kontaktu jako wartość stałą plateau funkcji względnej koncentracji C/C_0 określonym z przebiegu czasowej zależności rejestrowanego kąta kontaktu aż wartość C/C_0 osiągnie wartość stałą,

przy czym dla układów, gdzie nie można aproksymować odpowiedniego dla pomiarów okna czasowego, należy wykonać pełny profil ewolucji koncentracji powierzchniowej leku aż do osiągnięcia C/C_0 i wówczas ten czas do uzyskania C_{max} jest znany.

3. W trakcie każdego pomiaru wywołuje się zmianę kształtu kropli cieczy, w postaci zwilżania powierzchni membrany i cofania się kropli z powierzchni membrany, poprzez inicjację ruchu kropli cieczy próbkującej poprzez ruch uchylny membrany wraz z kroplą bądź mechaniczną zmianę kształtu kropli cieczy próbkującej, korzystnie poprzez tłoczenie/odsysanie cieczy do/z kropli cieczy próbkującej. W momencie inicjacji ruchu kropli cieczy na powierzchni membrany odczytuje się co najmniej dwa kąty nachylenia czoła kropli cieczy próbkującej do powierzchni membrany: kąt wstępujący Θ_{ADV} zawarty między linią kontaktu kropli cieczy próbkującej z powierzchnią membrany a styczną do czoła kropli ze strony zwilżającej powierzchni membrany oraz kąt zstępujący Θ_{REC} zawarty między linią kontaktu kropli cieczy próbkującej z powierzchnią membrany a styczną do czoła kropli ze strony cofającej się kropli z powierzchni membrany.
4. Dla każdego pomiaru oblicza się swobodną energię powierzchniową $\Delta\gamma_{SV}$ oraz ciśnienie powierzchniowe Π filmu cieczy 2-wymiarowej struktury będącej następstwem adsorpcji powierzchniowej na podstawie zarejestrowanych dynamicznych kątów z równania:

$$\Delta\gamma_{SV} = \frac{\Pi(1+\cos\Theta_{ADV})^2}{(1+\cos\Theta_{REC})^2 - (1+\cos\Theta_{ADV})^2} \quad (1)$$

$$\Pi = \gamma_{LV}(\cos\Theta_{REC} - \cos\Theta_{ADV}). \quad (2)$$

Następnie, na podstawie zależności:

$$\Pi = \Delta\gamma_{SV} = R_g T \Gamma \quad (3)$$

$$\Gamma = -\frac{C}{R_g T} \frac{d\gamma_{SV}}{dC}, \quad (4)$$

oblicza się względną koncentrację powierzchniową środka aktywnego jako stosunek C/C_0 :

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left[-\frac{\gamma_{SV}}{\Pi}\right]. \quad (5)$$

dla każdego punktu pomiaru, gdzie C – koncentracja powierzchniowa w danym punkcie czasowym, a C_0 to koncentracja maksymalna w układzie, przy czym dla pomiaru referencyjnego wartość C/C_0 odpowiada zerowej koncentracji powierzchniowej.

5. Dla pomiarów przeprowadzonych w trakcie przenikania środka biologicznie aktywnego przez membranę wykonuje się dopasowanie liniowe typu $y=at+b$ w czasie, gdzie $y=C/C_0$, a – współczynnik kierunkowy prostej ($a>0$), t – argument funkcji – mierzony czas, b – wyraz wolny, zaś dla pomiaru referencyjnego wyznacza się dopasowanie liniowe referencyjne $y= C/C_0$,
6. Wyznacza się wartość czasu martwego t_{lag} poprzez znalezienie punktu przecięcia dopasowania liniowego dla pomiarów właściwych z dopasowaniem liniowym referencyjnym stanowiącym prostą referencyjną odpowiadającą zerowej koncentracji powierzchniowej, przy czym ustalone dopasowanie liniowe dla pomiarów właściwych z prostą referencyjną jest równe czasowi martwemu t_{lag} .
7. Na podstawie znajomości czasu martwego t_{lag} oraz grubości membrany L , wyznacza się współczynnik dyfuzji D według równania:

$$D = L^2/6t_{lag}, \quad (6)$$

którego wartość określa szybkość penetracji substancji przez membranę.

Korzystnie, jako ciecz próbkującą stosuje się wodę, diiodometan, formamid lub glikol etylenowy. Dobór cieczy próbkującej powinien być taki, by właściwości chemiczne cieczy były nieinwazyjne dla badanego układu – dla układów biologicznych typowo woda bądź glikol etylenowy.

Korzystnie, punkt przecięcia dopasowania liniowego dla pomiarów właściwych z dopasowaniem liniowym referencyjnym i na tej podstawie ustalenie czasu martwego t_{lag} wykonuje się z rozwiązania układu równań dopasowania liniowego dla pomiarów właściwych $y=at+b$ i dopasowania liniowego referencyjnego $y= C/C_0$, obliczając wartość t_{lag} .

Korzystnie, punkt przecięcia dopasowania liniowego dla pomiarów właściwych z dopasowaniem liniowym referencyjnym i na tej podstawie ustalenie czasu martwego t_{lag} wykonuje się poprzez naniesienie obliczonych punktów C/C_0 dla wartości pomiarów właściwych i nałożenie obliczonego dopasowania liniowego referencyjnego $y= C/C_0$ na wykresie zależności C/C_0 od czasu pomiaru t , zaś czas martwy t_{lag} wyznacza się jako punkt przecięcia linii referencyjnej z linią dla punktów pomiarów właściwych.

Urządzenie do pomiaru współczynnika dyfuzji – pomiaru kątów kontaktu kropli cieczy z powierzchnią membrany i umożliwiające tym samym pośrednie wyznaczanie dynamiki przenikania środków aktywnych biologicznie do podania przezskórnie przez membrany biologiczne, zwłaszcza leków, do realizacji sposobu opisanego powyżej, charakteryzuje się według wynalazku tym, że podstawa wykonana jest w postaci tarczy z możliwością obrotu wokół własnej osi. Na obrzeżach tarczy wykonane są zęby, pomiędzy którymi utworzone są co najmniej trzy przestrzenie na tarczy, w których umieszcza się naczynie pomiarowe z membraną, zwane dalej slotami. W każdej przestrzeni umieszczone jest w sposób rozłączny naczynie pomiarowe, którego wymiary i kształt dostosowany jest do umieszczenia w nim membrany sytuowanej w naczyniu na środku aktywnym tak, że środek wnika do membrany od dolnej powierzchni membrany, zaś na drugiej stronie membrany kształt naczynia zapewnia umieszczenie cieczy próbkującej. Urządzenie wyposażone jest w ruchomą w osi pionowej urządzenia platformę zaopatrzoną w wysięgnik usytuowany co najmniej częściowo nad tarczą oraz zawiera aplikator dla cieczy próbkującej. Jak wyjaśniono dalej szczegółowo w przykładzie w punkcie opisującej fazę I i II, platforma, wysięgnik i aplikator znajdują się w pionowej osi symetrii badanej próbki-membrany umieszczonej w przestrzeni tarczy. Wysięgnik jest trwale umocowany ze znanym w stanie techniki obrotowym modułem z silnikiem i przekładnią nadającym mu ruch obrotowy. Wysięgnik ma kształt i wymiary umożliwiające swobodne przemieszczanie w kierunku pionowym przez przestrzenie na tarczy tak, aby w trakcie ruchu platformy w osi pionowej realizować pobranie i odkładanie naczynia pomiarowego z tarczy z jednoczesnym ruchem obrotowym wysięgnika realizowanym poprzez obrotowy moduł.

Ruch ten wywołuje zmianę kształtu kropli cieczy próbkującej ułożonej na membranie a tym samym umożliwia odczyt kątów stępujących i zastępujących.

Według wynalazku oparto się w części na wiedzy teoretycznej dostosowanej na potrzeby uzyskania celu według wynalazku. Wyróżnia się trzy kąty kontaktu kropli cieczy na styku powierzchnia membrany czyli podłoże / brzeg kropli rozpostartej na membranie: statyczny Θ_{eq} – równowagowy kąt kontaktu membrana/kropla przed zmianą kształtu kropli – jest to kąt nachylenia pomiędzy styczną do czoła kropli a prostą równoległą do linii kontaktu kropla/podłoże (membrana), oraz kąty dynamiczne: wstępujący oraz zstępujący po zmianie kształtu (symetrii) kropli (odpowiednio Θ_{ADV} oraz Θ_{REC}), wywołanej poprzez ruch kropli po powierzchni badanego materiału – kąt zawarty między linią kontaktu ciecz/ciało stałe a styczną do czoła kropli zwilżającej powierzchnię (Θ_{ADV}), oraz kąt zawarty między linią kontaktu a styczną do czoła cofającej się kropli (Θ_{REC}). Pomiaru wartości kątów kontaktu dokonuje się na podstawie analizy zarejestrowanego obrazu kropli w kontakcie z badanym materiałem – membraną (zdjęcia lub wideo) przy użyciu wybranego programu (np. programów edytorskich jak ImageJ, TopView) umożliwiającego pomiar kąta pomiędzy dwoma prostymi, stanowiącymi linię kontaktu kropla/podłoże oraz wybrane czoło kropli (zwilżające lub cofające).

Według wynalazku mierzy się dynamiczne kąty, które opisane są skrótowo jako kąt membrana (podłoże)/ciecz lub membrana/kropla cieczy, kąt nachylenia czoła kropli do powierzchni membrany z danej strony brzegu kropli, czyli wcześniej opisany kąt kontaktu lub kąt styku pomiędzy powierzchnią membrany a kroplą cieczy próbkującej. Poprzez zmianę kształtu kropli cieczy wywołuje się rozpościeranie się kropli cieczy na powierzchni membrany i/lub cofanie się czoła kropli. Zmiany kształtu kropli dokonuje się zwłaszcza poprzez przechyl płytki na jakiej umieszcza się membranę, wówczas obserwuje się jednocześnie Θ_{ADV} oraz Θ_{REC} z różnych stron brzegów kropli. Możliwe jest również mechaniczne oddziaływanie na kroplę – pompując lub odsysając do kropli dodatkową ciecz próbkującą wywołując odpowiednio rozpościeranie kropli a następnie cofanie się kropli.

Wynalazek dotyczy sposobu pomiaru współczynnika dyfuzji środków aktywnych biologicznie, zwłaszcza leków do podawania przezskórnego poprzez wyznaczenie współczynnika dyfuzji masy D – na podstawie parametryzacji zmian energetyki powierzchniowej użytej membrany określanej na pod-

stawie ewolucji obserwowanych kątów kontaktu ciecz/membrana, opisanych powyżej. Według wynalazku opracowano metodę pomiarów kątów kontaktu ciecz/membrana w trakcie trwania procesu transportu leku przez membranę. Pomiaru te pozwalają obliczyć wartości swobodnej energii powierzchniowej γ_{SV} oraz ciśnienia powierzchniowego (stanowiącym różnicę energii powierzchniowej membrany niezaburzonej i zaburzonej pojawiającym się na powierzchni membrany lekiem) 2-wymiarowego filmu (cienkiej warstwy) Π tworzącego się na powierzchni membrany wskutek przenikania leku, czasu martwego t_{lag} procesu transportu (tj. czasu potrzebnego na przeniknięcie leku przez membranę), co ostatecznie pozwala wyznaczyć współczynnik D .

Pomiar dynamicznych kątów kontaktu ciecz/membrana daje możliwość, przy zastosowaniu formalizmu Chibowskiego (E. Chibowski, Surface free energy of a solid from contact angle hysteresis, Adv. Colloid Interface Sci. 103 (2003) 149–172. doi:10.1016/S0001-8686(02)00093-3), wyznaczenia na podstawie rejestrowanych wartości kątów kontaktu oraz znanej wartości napięcia powierzchniowego użytej cieczy próbującej, swobodnej energii powierzchniowej γ_{SV} oraz ciśnienia powierzchniowego filmu Π :

$$\Delta\gamma_{SV} = \frac{\Pi(1+\cos\Theta_{ADV})^2}{(1+\cos\Theta_{REC})^2 - (1+\cos\Theta_{ADV})^2} \quad (1)$$

$$\Pi = \gamma_{LV}(\cos\Theta_{REC} - \cos\Theta_{ADV}). \quad (2)$$

Względną koncentrację substancji zaadsorbowanej na powierzchni membrany wyznacza się na podstawie formalizmu adsorpcji powierzchniowej Gibbsa, gdzie obowiązują zależności termodynamiczne dla nadmiaru powierzchniowego Γ (gęstość powierzchniowa substancji zaadsorbowanej na granicy faz) (A.W. Adamson, A.P. Gast, Physical Chemistry of Surfaces, 6th ed., Wiley and Sons, New York, 1997.):

$$\Pi = \Delta\gamma_{SV} = R_g T \Gamma \quad (3)$$

$$\Gamma = -\frac{c}{R_g T} \frac{d\gamma_{SV}}{dc}, \quad (4)$$

gdzie: R_g – stała gazowa, T – temperatura.

Rozwiązując równanie (4) z uwzględnieniem (3) otrzymuje się zależność na względną koncentrację substancji na powierzchni układu (membrany):

$$\frac{c}{c_0} = \exp\left[-\frac{\gamma_{SV}}{\Pi}\right]. \quad (5)$$

Pomiary wartości kątów kontaktu w kolejnych fazach trwania procesu transportu umożliwiają, poprzez wyznaczenie γ_{SV} oraz Π na podstawie równań (1–2) oraz zastosowaniu wyrażenia (5), stworzenie profilu ewolucji względnej koncentracji powierzchniowej substancji C/C_0 . Wyniki (1) oraz (2) są wstawiane do wzoru (5), zaś wzór (3) oraz (4) uzasadniają, zastosowanie wzoru (5). W literaturze nie jest znane takie postępowanie.

Odczytuje się kąty dynamiczne, wstawia do wzorów (1–2), a następnie oblicza C/C_0 wg (5). C i C_0 to nie są niewiadome, bowiem wyznacza się względną koncentrację daną przez C/C_0 – jednostka względna. C/C_0 oznacza, że na powierzchni mamy koncentrację leku, która jest równa np. połowie maksymalnie możliwej koncentracji. Ważny jest przebieg C/C_0 .

Według wynalazku opracowano schemat dalszej analizy. W celu dalszej analizy danych przyjęto równanie dyfuzji masy zaproponowane przez Daynesa: $\frac{c}{c_0} = \frac{D}{l_{eff}L} \left(t_{lag} - \frac{L^2}{6D} \right)$, gdzie D – współczynnik dyfuzji, l_{eff} – efektywny wymiar układu, L – grubość membrany, t_{lag} – czas martwy zmian powierzchniowych, tj. czas potrzebny substancji do przekroczenia drogi równej grubości membrany i zainicjowania zmian powierzchniowych, których mierzalnym efektem, według sposobu, jest ewolucja wartości danej przez równanie (5). Z równania Daynesa ustalono, że istnieje pewna przerwa czasowa (czas martwy) zanim system osiągnie stan równowagi.

Czas martwy według wynalazku wyznacza się na podstawie zmian C/C_0 (tj. koncentracji leku na powierzchni membrany – C – względem koncentracji leku na granicy ośrodków membrana/rezerwuuar z lekiem – C_0 – będącej jednocześnie maksymalną możliwą koncentracją leku w ośrodku) według wyrażenia (5) jako punkt czasowy, w którym zaczyna się obserwować jednostajną zmianę (tj. dającą się

opisać przy pomocy funkcji liniowej $y=at+b$, $a>0$, a – współczynnik kierunkowy, t – argument funkcji (czas), b – wyraz wolny) koncentracji substancji przenikającej przez ośrodek nad ośrodkiem. Wartość t_{lag} wyznacza się jako miejsce przecięcia funkcji liniowej opisującej jednostajny przyrost względnej koncentracji powierzchniowej substancji C/C_0 według wyrażenia (5) z wartością referencyjną C/C_0 otrzymaną dla wolnej od leku membrany (tj. czas wnikania substancji $t=0$). Znajomość czasu martwego oraz grubości membrany umożliwia wyznaczenie współczynnika dyfuzji substancji przez membranę jako:

$$D = L^2/6t_{lag} \quad (6)$$

Przyjęta według wynalazku metodologia ma tę zaletę, że jako cieczy roboczej wystarczy użyć tylko jednego płynu próbkującego. Przykładowo inna metoda, zaproponowana przez Owensa i Wendta, wykorzystuje kilka płynów o różnej polarności: prócz obojętnej wody (ciecz polarna) popularnie używa się diiodometanu (ciecz niepolarna), związku o własnościach silnie toksycznych i z tego powodu nienadającego się do badań powierzchni biologicznych.

Wynalazek dotyczy również urządzenia do wykonywania cyklicznych pomiarów kątów kontaktu ciecz/membrana w trakcie trwania procesu transportu, umożliwiającego wyznaczenie współczynnika dyfuzji substancji przez membranę według sposobu.

Wynalazek bliżej opisano w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym na poszczególnych figurach przedstawiono:

- Fig. 1 – Kąty statyczne i kąty dynamiczne uzyskiwane w dwóch modułach zmiany kształtu kropli cieczy i zmiany kąta styku membrana/kropla cieczy,
- Fig. 2 – Poszczególne etapy zmiany kąta nachylenia kropli do powierzchni membrany – kąta membrana/kropla cieczy według przykładu 2,
- Fig. 3 – Przykładowy obraz zarejestrowany w trakcie badań dynamiki transportu substancji biologicznie aktywnej – leku przez membranę – dynamiki dyfuzji,
- Fig. 4 – Uproszczony schemat aparatury – urządzenia do odczytu kąta styku ciecz/membrana,
- Fig. 5 – Schemat urządzenia w innym wariantcie,
- Fig. 6 – Schemat dedykowanego urządzenia do badania dynamiki transportu leku przez membranę – dyfuzji – metodami pochylonej płytki oraz ekspandującej kropli w rzucie bocznym (A) oraz pionowym (B),
- Fig. 7 – Schemat działania urządzenia według wynalazku dla jednego cyklu pomiarowego, składającego się z faz I–V, wraz z przypadającymi ruchami modułów liniowych i obrotowych i pozycją próbek.

P r z y k ł a d ogólny 1

Na fig. 1 przedstawiono dwa układy do pomiaru kątów kontaktu kropla/membrana czyli kątów nachylenia czoła kropli do powierzchni membrany.

Według wynalazku kąty, których pomiaru się dokonuje, to kąty dynamiczne: Θ_{ADV} oraz Θ_{REC} . Ruch kropli oraz towarzyszącą zmianę kształtu kropli wykonuje się w jednym ze znanych układów i według wynalazku stosując metodę nachylonej płytki – ruch uprzednio umieszczonej kropli inicjuje się poprzez stopniowy obrót platformy z próbką, metodę ekspandującej kropli – ruch cieczy inicjuje się poprzez tłoczenie/odsysanie cieczy próbkującej – płynu roboczego z badanej powierzchni. Schemat ideowy przytoczonych metod przedstawiono na Fig. 1. Oba układy (ekspandującej kropli oraz nachylonej płytki), co do zasady, prowadzą do identycznych wyników ilościowych. Według wynalazku dokonuje się pomiaru kąta zarejestrowanego w trakcie zmiany kształtu kropli podczas rozpoczęcia jej ruchu – albo w module przechylania płytki, na której umieszcza się membranę, bądź w trakcie mechanicznego oddziaływania poprzez tzw. pompowanie kropli (2 mody opisane później). Bez zmiany kształtu kropli obserwuje się kąt równowagowy – statyczny, jednak jego wartość nie jest istotna dla dalszych obliczeń. Jest to po prostu obserwowalny punkt wejściowy eksperymentu.

Na Fig. 1 pokazano układy do pomiaru kątów kontaktu kropla/membrana czyli kątów nachylenia czoła kropli do powierzchni membrany: 1 – statycznego, 2 – dynamicznych w układzie nachylonej płytki, 3a i 3b – dynamicznych w układzie ekspandującej kropli tzw. „pompowania kropli” – oddziaływanie mechaniczne, 4 – badany materiał, 5 – kropla cieczy próbkującej zwilżająca materiał 4, 6 – statyczny kąt kontaktu, 7 – dynamiczny kąt kontaktu – kąt wstępujący, 8 – dynamiczny kąt kontaktu – kąt zstępujący, 9 – kąt krytyczny nachylenia płytki, przy którym zostaje zapoczątkowany ruch kropli, 10 – ujście igły umożliwiającej mechaniczne tłoczenie/odsysanie cieczy na badaną powierzchnię w metodzie ekspan-

dującej kropli. Strzałkami oznaczono kierunek ruchu kropli cieczy próbkującej w dwóch układach – nachylonej płytki i ekspandującej kropli. Układ nachylonej płytki – deformację kropli (tj. uzyskanie kątów dynamicznych) można wywołać według wynalazku poprzez pochył membrany, również w sposób mechaniczny – zaprogramowany w urządzeniu pochył platformy, na której umieszcza się membranę. W układzie ekspandującej kropli ruch kropli cieczy próbkującej na powierzchni badanego materiału można wywołać przez mechaniczne tłoczenie (kąt wstępujący) i odsysanie (kąt zstępujący) cieczy próbkującej dzięki ujściu igły 10 będącej w stałym kontakcie z kroplą cieczy próbkującej.

Według wynalazku wykorzystuje się membranę imitującą naskórek (będący główną barierą przenikania leku podawanego przezskórnie) w postaci porowatej membrany nitrocelulozowej wypełnionej kwasem tłuszczowym. Ten kwas tłuszczowy stanowi fazę umożliwiającą przenikanie substancji aktywnej biologicznie zwłaszcza leku w formie farmaceutycznej przez membranę.

Membranę umieszcza się na substancji leczniczej tak, że lek wnika do membrany od dolnej powierzchni membrany. Na drugiej, wierzchniej stronie membrany umieszcza się ciecz próbkującą o znanym napięciu powierzchniowym γ_{LV} .

W sposobie według wynalazku wykorzystuje się jedną (dowolną) z dwóch form wywoływania zmiany kąta kontaktu ciecz/membrana – kąta próbkującej cieczy na membranie stosując metodę nachylonej płytki – ruch uprzednio umieszczonej kropli cieczy próbkującej inicjuje się poprzez stopniowy obrót platformy, na której usytuowana jest membrana, metodę ekspandującej kropli – ruch cieczy inicjuje się poprzez tłoczenie/odsysanie płynu roboczego z badanej powierzchni. Obie formy wywoływania zmian kątów kontaktu prowadzą do tych samych wyników ilościowych. Schemat ideowy przytoczonych metod przedstawiono na Fig. 1.

W celu wyznaczenia współczynnika dyfuzji D substancji przez membranę według sposobu należy:

- 1) przed wykonaniem doświadczenia, o ile grubość membrany nie jest z góry znana, przeprowadzić niezależny pomiar grubości wykorzystywanych membran, np. czujnikiem mikrometrycznym, ultradźwiękowym bądź elipsometrycznie, a następnie ułożyć membrany na rezerwuarze z lekiem;
- 2) w zadanych odstępach czasowych, liczonych od zetknięcia substancji z membraną (inicjacja procesu transportu) do rozpoczęcia pomiaru, zmierzyć dynamiczne kąty kontaktu (7 i 8 na Fig. 1) między znaną cieczą próbkującą a membraną. Istotnym jest, że wykonanie pomiaru na danej próbce (membranie wraz ze znajdującym się w niej lekiem) nieodwracalnie zaburza (niszczy) tę próbkę, dlatego do śledzenia ewolucji wspomnianych własności istotne jest przygotowanie serii identycznych próbek (przygotowanych w tych samych warunkach/czasie), zaś pomiaru kąta dokonuje się w odstępach czasowych w trakcie przenikania substancji aktywnej zwłaszcza leku;
- 3) na podstawie równań (1–2) należy obliczyć wartości γ_{SV} oraz Π dla każdego z etapów ujętych w 2), co pozwala stworzyć profil zmian względnej koncentracji według zależności (5) w funkcji czasu;
- 4) w kolejnym kroku wyznacza się czas martwy t_{lag} z punktu przecięcia prostej $y=at+b$ najlepszego dopasowania do danych doświadczalnych zebranych wg punktu 2 dla obszaru jednostajnego przyrostu powierzchniowej koncentracji substancji, tj. sukcesywnego wzrostu wartości C/C_0 (przynajmniej 2 punkty pomiarowe, poza referencyjnym, stanowią absolutne minimum) z prostą 0-wej koncentracji (jeden punkt referencyjny zmierzony dla $t=0$ eksperymentu).
- 5) na podstawie znajomości czasu martwego oraz grubości membrany, wyznacza się współczynnik dyfuzji według równania (6). Jak podano wcześniej, wartość współczynnika D określa szybkość penetracji substancji aktywnej biologicznie przez badany układ.

W celu przeprowadzenia pojedynczego pomiaru (podpunkt 2), na przeciwnej stronie membrany tj. niemającej kontaktu z substancją aktywną biologicznie np. lekiem, umieszcza się kroplę cieczy próbkującej o znanym napięciu powierzchniowym. Najpopularniej używaną cieczą próbkującą, ze względu na wysoką wartość napięcia powierzchniowego, a co za tym idzie możliwość wykorzystania w badaniach szerokiej gamy materiałów, jest woda (jeśli napięcie powierzchniowe cieczy jest mniejsze niż swobodna energia powierzchniowa badanego ciała, dochodzi do całkowitej zwilżalności materiału, co ostatecznie uniemożliwia przeprowadzenie pomiaru). Innymi często stosowanymi cieczami próbkującymi są dijdometan, formamid lub glikol etylenowy. W przypadku prowadzenia badań nad układami biologicz-

nymi istotny jest dobór cieczy nietoksycznej (nieinwazyjnej) dla zadanego układu. Następnie, wykorzystując jedną z metod zmiany kątów styku/kontaktu ciecz/membrana np. metodę nachylonej płytki czy ekspandującej kropli (Fig. 1), wyznacza się kąty wstępujący Θ_{ADV} oraz zstępujący Θ_{REC} .

W celu stworzenia profilu ewolucji względnej koncentracji powierzchniowej (podpunkt 3) należy przeprowadzić serię pomiarów dynamicznych kątów kontaktu dla pojedynczych próbek, w zadanych odstępach czasowych od momentu rozpoczęcia procesu przenikania leku przez membranę. Pomiarów dokonuje się w co najmniej trzech punktach czasowych (pomiar na co najmniej 3 membranach). Liczba punktów pomiarowych wynika z konieczności przeprowadzenia dopasowania liniowego do zebranych danych doświadczalnych w fazie analitycznej doświadczenia.

W szczególności, pierwszy – referencyjny punkt pomiarowy, wyznacza się dla czasu $t=0$ gdy koncentracja substancji aktywnej biologicznie wynosi $C=0$. Kolejne dwa punkty muszą znajdować się w przedziale czasowym odpowiadającym jednostajnemu wzrostowi powierzchniowej koncentracji substancji (adsorpcji powierzchniowej leku), tj. zanim ta osiągnie wartość maksymalną (nasycenia), C_{max} . Wartość C_{max} dana jest jako plateau funkcji C/C_0 (względnej koncentracji) dla czasów długich. Przebieg funkcji C/C_0 jest ściśle powiązany ze zmianami swobodnej energii powierzchniowej poprzez formalizm adsorpcji Gibbsa.

Dla układów nieznanych, tj. takich gdzie nie można aproksymować odpowiedniego dla pomiarów okna czasowego na podstawie uprzednio zgromadzonej wiedzy dla układów podobnych, należy wykonać pełny profil C/C_0 , tj. zbadać ewolucję koncentracji powierzchniowej leku według sposobu aż do osiągnięcia plateau koncentracji C/C_0 dla czasów długich.

Według sposobu modyfikacja chemiczna substancji przenikającej i membrany nie jest wymagana, co pozwala na wyznaczenie zmian koncentracji powierzchniowej substancji przenikającej przez membranę bez konieczności modyfikacji chemicznej substancji w celu dodatkowego znakowania fizykochemicznego dla celów detekcji aparaturowej, co wpływa korzystnie na jakość odwzorowania substancji na potrzeby badań laboratoryjnych (w przypadku sposobu, testowana substancja może być tożsama z wersją ostateczną np. leku). Stosowanie metody oraz urządzenia według wynalazku eliminuje element w postaci powszechnie znanej i wykorzystywanej standardowo do badań dynamiki komory Franza, typowo składającej się z obszaru donora i akceptora leku przedzielonych badaną membraną. W rozwiązaniu według wynalazku własności membrany (i dynamika transportu masy) określane są bezpośrednio przez monitoring powierzchni układu, co podnosi sprawność operacyjną urządzenia, jednocześnie redukując jego koszt.

P r z y k ł a d 2 – ogólny przykład pomiaru współczynnika dyfuzji środka aktywnego np. leku przez skórę w metodzie modelu przedklinicznego

Metodę pomiaru dokonuje się jak opisano powyżej i przedstawiono graficznie na Fig. 2.

Fig. 2 ilustruje proces przepływu leku z rezeruaru 12 przez badany układ 4 – membranę w kierunku niższej koncentracji leku 13 oraz wpływ adsorpcji powierzchniowej 14 leku na obserwowaną ewolucję kątów kontakt 6–8 cieczy próbującej 5 w metodzie pochylonej płytki. Na rysunku posłużono się strzałką czasu 11 ilustrującą kolejne etapy procesu wnikania substancji do membrany i modyfikacji struktury powierzchni (poprzez adsorpcję powierzchniową). Fig. 2 pokazuje kroki pomiaru – ewolucję 11 kątów kontaktu 6–8 cieczy próbującej 5 w kontakcie z membraną 4 na skutek zwiększającej się koncentracji powierzchniowej leku w metodzie pochylonej płytki, 11a – stan początkowy (koncentracja powierzchniowa leku $C=0$), 11 – stan układu po pewnym czasie t od rozpoczęcia wnikania leku 12 do membrany 4 na skutek gradientu koncentracji substancji (13 – kierunek przenikania leku), 14 – adsorpcja powierzchniowa leku powodująca zmiany obserwowanych kątów kontaktu, 11c – końcowy stan równowagi układu – koncentracja zaadsorbowanej powierzchniowo substancji nie ulega dalszym zmianom i osiąga C_{max} . Wartość kąta 9 ma być taka by wywołać ruch kropli – wartość krytyczna nachylenia układu.

11a – początkowy etap procesu oraz doświadczenia ($t=0$).

Membrana 4 zostaje ulokowana na rezerwarze z lekiem. Między podukładami 4 oraz 12 pojawia się gradient koncentracji leku, który w dalszych etapach prowadzi do wnikania i przenikania leku przez membranę 4 w kierunku 13.

W chwili $t=0$ membrana jest wolna od leku, a symetria cieczy próbującej postawionej na górnej powierzchni membrany, wyrażona poprzez obserwowane kąty kontaktu ciecz/membrana 6–8, ma związek z własnościami zwilżania wolnej od leku powierzchni membrany, tj. gdy koncentracja powierzchniowa leku $C=0$. Własności te określa się stosując formalizm Chibowskiego dla dynamicznych kątów kontaktu (równania (1–2)), wyznaczając swobodną energię powierzchniową oraz ciśnienie powierzchniowe filmu na podstawie zmierzonych kątów 7–8 oraz znanego napięcia powierzchniowego cieczy

próbkującej (5). Wielkości te są punktem odniesienia w dalszej analizie danych – określają γ_{sv} oraz Π powierzchni, a co za tym idzie, referencyjną wartość C/C_0 według wyrażenia (5) dla koncentracji powierzchniowej leku $C=0$ (czas $t=0$).

Kąt statyczny θ może pełnić rolę indikatora hydrofilowości membrany, jednakże jest nieistotny w kwantyfikacji własności energetycznych powierzchni.

11b – przedstawia etap pośredni – stan nieustalony – procesu przenikania leku przez membranę oraz następującej adsorpcji powierzchniowej leku na powierzchni membrany.

W początkowej fazie etapu lek wnika do membrany i rozpoczyna się proces dyfuzji leku przez membranę w kierunku jej przeciwległej powierzchni - przeciwnie względem gradientu koncentracji (jednocześnie, powierzchnia ta wciąż jest wolna od molekuł substancji przenikającej).

Po pewnym czasie od rozpoczęcia obserwacji 11a – czasie martwym t_{lag} , rozpoczyna się druga faza etapu 11b – cząsteczki substancji farmaceutycznej docierają do powierzchni membrany adsorbując się na niej 14. Obecność tych cząstek zmienia własności powierzchniowe materiału – membrany, czego mierzalnym efektem jest zmiana obserwowanych kątów kontaktu cieczy próbkującej z badaną membraną, a co za tym idzie, wartości wyrażen – wzorów 1–2 oraz 5. Pierwszym celem doświadczenia jest wyznaczenie czasu martwego, tj. punktu czasowego, w którym pierwsze molekuły substancji przenikającej przez ośrodek docierają do jego górnej powierzchni (zgodnie z Fig. 2). Jego wartość, w połączeniu ze znaną grubością membrany, pozwala ostatecznie obliczyć współczynnik dyfuzji na podstawie formalizmu Daynesa – równanie (6).

Najważniejsza część eksperymentu dotyczy badań tego etapu 11b procesu przenikania leku. Poniżej czasu martwego (początkowa faza 11b), własności powierzchni membrany (wyrażone poprzez obserwowane kąty kontaktu) nie odbiegają od tych obserwowanych w (11a). Powyżej t_{lag} (druga faza 11b) następuje jednostajny przyrost koncentracji powierzchniowej leku. Przyrost ten można kwantyfikować na podstawie pomiarów kątów kontaktu w funkcji czasu (i dalej: ewolucji C/C_0 danego przez relację 5). W celu wyznaczenia wartości t_{lag} , należy wykonać przynajmniej 2 pomiary (rozdzielone czasowo) kątów kontaktu dla czasów $t > t_{lag}$ (przy czym nie może zostać osiągnięty etap końcowy 11c). Następnie, na podstawie równań (1–2) wyznaczyć dla danych punktów czasowych wartości swobodnej energii powierzchniowej oraz ciśnienia powierzchniowego filmu. Następnie, na podstawie relacji 5 przedstawić zależność C/C_0 w funkcji czasu (dla $t=0$ przyjmując wartość otrzymaną w 11a). Następnie wykonać dopasowanie liniowe ($y=at+b$) do danych doświadczalnych zebranych dla obserwowanego jednostajnego przyrostu C/C_0 danego przez 5, oraz znaleźć punkt przecięcia tego dopasowania z osią $C=0$ otrzymaną w 11a.

11c – stan ustalony – koncentracja powierzchniowa leku w membranie osiąga stan nasycenia i nie zmienia się dalej w czasie ($C/C_0=C_{MAX}$). Pomiary wykonywane w tym etapie procesu powinny dawać taki sam wynik.

Pośredni cel doświadczenia i analizy według sposobu dotyczy znalezienia wartości t_{lag} . Wartość ta znajduje się czasowo w etapie 11b. W celu wyznaczenia t_{lag} nieznanymi systemów, należy wykonywać serię pomiarów kątów kontaktu ciecz/membrana w zadanych interwałach czasowych (np. co 5 min) jednocześnie badając zmienność przebiegu relacji 5: od czasu $t=0$ do czasu, aż wartość C/C_0 osiągnie wartość stałą dla czasów długich (tj. C_{MAX}).

P r z y k ł a d 3 – praktyczne badanie współczynnika dyfuzji przez skórę danego leku – wersja uproszczona

Do doświadczenia wykorzystano 2% roztwór leku ditranolu w wazelinie oraz membrany dodekano-kolodionowe (udział masowy nitrocelulozy i dodekanolu 1:1) imitujące ludzki naskórek.

W doświadczeniu użyto 3 membran o grubości $L = 30 \pm 3 \mu\text{m}$ oraz średnicy ok. 2 cm. Dwie z nich ułożono na rezerwarze z lekiem. Własności energetyczne powierzchni tych próbek były monitorowane (poprzez pomiar kątów kontaktu) po 30 i 50 minutach. Trzecia z próbek posłużyła jako referencyjna, tj. jej własności energetyczne powierzchni odpowiadają czasowi transportu leku $t = 0$ minut.

Pomiary dynamicznych kątów kontaktu wykonano metodą nachylonej płytki (średnica kropli cieczy próbkującej – wody – ok. 4 mm, znane napięcie powierzchniowe $\gamma_{LV} = 72.5 \text{ mJm}^{-2}$ – wartość tablicowa), schematycznie zgodnie z Fig. 2. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach normalnych.

Przykładowe zdjęcie zarejestrowane dla próbki $t = 30$ min przedstawiono na fig. 3, gdzie: 4 – membrana dodekano-kolodionowa, 5 – kropla cieczy próbkującej, 7, 8 – dynamiczne kąty kontaktu, 12 – rezerwar z lekiem.

Odczytane wartości kątów kontaktu przy pomocy programu ImageJ dla kolejnych próbek w trakcie trwania procesu transportu leku w membranie – wyniosły odpowiednio:

- 1) $t = 0$ min (referencyjna), $\Theta_{ADV} = 64.2^\circ$, $\Theta_{REC} = 32.1^\circ$;
- 2) $t = 30$ min, $\Theta_{ADV} = 68.5^\circ$, $\Theta_{REC} = 33.1^\circ$;
- 3) $t = 50$ min, $\Theta_{ADV} = 75.1^\circ$, $\Theta_{REC} = 26.9^\circ$.

Wartości ciśnienia powierzchniowego filmu oraz swobodnej energii powierzchniowej zostały wyznaczone na podstawie równań (1–2). W szczególności, dla próbki referencyjnej (indeks dolny $t=0$) otrzymano:

$$\Pi_{t=0} = \gamma_{LV}(\cos\Theta_{REC} - \cos\Theta_{ADV}) = 72.5\text{mJm}^{-2}(\cos32.1^\circ - \cos64.2^\circ) = 29.9\text{mNm}^{-1}$$

$$\gamma_{SV,t=0} = \frac{\Pi(1+\cos\Theta_{ADV})^2}{(1+\cos\Theta_{REC})^2 - (1+\cos\Theta_{ADV})^2} = \frac{29.9\text{mJm}^{-2}(1+\cos64.2^\circ)^2}{(1+\cos32.1^\circ)^2 - (1+\cos64.2^\circ)^2} = 45.5\text{mJm}^{-2}.$$

Analogicznie, dla kolejnych dwóch próbek (indeksy dolne odpowiednio $t = 30$ i $t = 50$);

$$\Pi_{t=30} = \gamma_{LV}(\cos\Theta_{REC} - \cos\Theta_{ADV}) = 72.5\text{mJm}^{-2}(\cos33.1^\circ - \cos68.5^\circ) = 34.2\text{mNm}^{-1}$$

$$\gamma_{SV,t=30} = \frac{\Pi(1+\cos\Theta_{ADV})^2}{(1+\cos\Theta_{REC})^2 - (1+\cos\Theta_{ADV})^2} = \frac{34.2\text{mJm}^{-2}(1+\cos68.5^\circ)^2}{(1+\cos33.1^\circ)^2 - (1+\cos68.5^\circ)^2} = 42.3\text{mJm}^{-2}.$$

$$\Pi_{t=50} = \gamma_{LV}(\cos\Theta_{REC} - \cos\Theta_{ADV}) = 72.5\text{mJm}^{-2}(\cos26.9^\circ - \cos75.1^\circ) = 46.0\text{mNm}^{-1}$$

$$\gamma_{SV,t=50} = \frac{\Pi(1+\cos\Theta_{ADV})^2}{(1+\cos\Theta_{REC})^2 - (1+\cos\Theta_{ADV})^2} = \frac{46.0\text{mJm}^{-2}(1+\cos75.1^\circ)^2}{(1+\cos26.9^\circ)^2 - (1+\cos75.1^\circ)^2} = 36.4\text{mJm}^{-2}.$$

Podstawiając obliczone pary wartości γ_{SV} oraz Π dla kolejnych czasów do wyrażenia (5) otrzymano:

- 1) dla $t = 0$ min $C/C_0 = \exp[-45.5/29.9] = 0.22$; wartość ta jest dalej utożsamiana z zerową koncentracją powierzchniową leku (wartość referencyjna), $C = 0$;
- 2) dla $t = 30$ min, $C/C_0 = \exp[-42.3/34.2] = 0.29$
- 3) dla $t = 50$ min, $C/C_0 = \exp[-36.4/46] = 0.45$.

Dla punktów 2) oraz 3) wykonano dopasowanie liniowe typu $y=at+b$, gdzie $y=C/C_0$, a – współczynnik kierunkowy prostej, t – argumenty funkcji (czas w minutach), b – wyraz wolny. Parametry a oraz b wyznacza się rozwiązując układ równań: $0.29 = 30a + b$, $0.45 = 50a + b$, otrzymując $a = 0.008$ oraz $b = 0.05$.

Dalej, na podstawie formalizmu Daynesa, szuka się punktu przecięcia prostych $C/C_0 = 0.22$ (prosta 0-wej koncentracji powierzchniowej leku – wartość referencyjna przed przenikaniem leku do membrany – linia referencyjna) oraz $C/C_0 = 0.008t + 0.05$. W punkcie przecięcia obie funkcje mają tę samą wartość, stąd $0.22 = 0.008t + 0.05$. Rozwiązując równanie ze względu na t (czas), otrzymuje się wartość $t = 21.265$ min. Otrzymana wartość jest równa czasowi martwemu, stąd $t_{lag} = 21.25$ min.

Możliwe jest obliczenie czasu martwego rozwiązując powyższe równania lub możliwe jest graficzne wyliczenia czasu martwego – jako punkt przecięcia linii referencyjnej z linią dla punktów pomiarowych czyli przedstawienie obu linii na wykresie zależności C/C_0 od czasu znalezienia przecięcia linii referencyjnej i linii powstałych z dwóch punktów pomiaru.

Znając grubość membrany L oraz czas martwy procesu t_{lag} stosuje się równanie (6) w celu wyznaczenia współczynnika dyfuzji: $D = (30\ \mu\text{m})^2 / (6 \cdot 21.25\ \text{min}) = 1.17 \cdot 10^{-9}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$.

W uproszczonej wersji doświadczenia (3 próbki) głównym źródłem błędu wyznaczonej wartości D jest grubość membrany, $\pm 3\ \mu\text{m}$. W celu wyznaczenia błędu należy posłużyć się metodą różniczki zupełnej (tj. wyznaczenie błędu maksymalnego):

$$\Delta D = \left| \frac{\partial D}{\partial L} \Delta L \right| = \left| \frac{2L}{6t_{lag}} \Delta L \right| = \left| \frac{2 \cdot 30\ \mu\text{m}}{6 \cdot 21.25\ \text{min}} 3\ \mu\text{m} \right|, \text{ ostatecznie otrzymując } D = (1.17 \pm 0.23) \cdot 10^{-9}\text{cm}^2\text{s}^{-1}.$$

Źródłem błędu jest grubość membran, która zawiera się w przedziale 27–33 μm .

Przykład 4 – praktyczne badanie współczynnika dyfuzji i przez to pośrednio dynamiki przenikania przez skórę danego leku – wersja rozszerzona.

Do doświadczenia wykorzystano 2% roztwór leku ditranolu w wazelinie oraz membrany dodekano-kolodionowe (udział masowy nitrocelulozy i dodekanolu 1:1) imitujące ludzki naskórek.

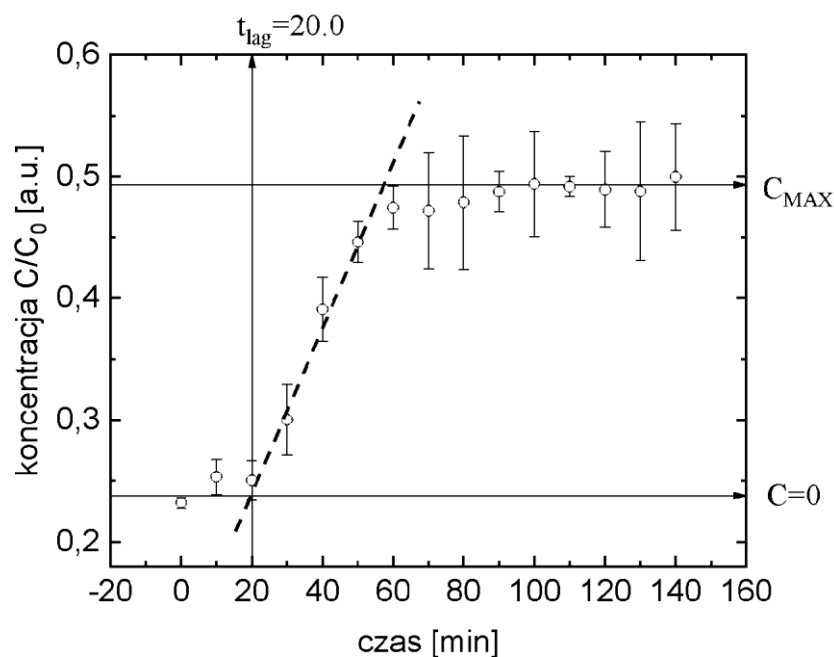
45 membran o grubości $L = 30 \pm 3 \mu\text{m}$ oraz średnicy ok 2 cm ułożono na rezerwarze z lekiem. Całkowity czas pomiarów zaplanowano na 140 min, przy czym własności energetyczne powierzchni próbek były monitorowane (poprzez pomiar kątów kontaktu) w cyklach 10-minutowych. W każdym cyklu użyto 3 membran (konieczność uśredniania wyników, ze względu na niejednorodną grubość membran ($\pm 3 \mu\text{m}$)).

Pomiary dynamicznych kątów kontaktu wykonano metodą nachylonej płytki (średnica kropli cieczy próbującej – wody – ok 4 mm, napięcie powierzchniowe $\gamma_{LV} = 72.5 \text{ mJm}^{-2}$), schematycznie zgodnie z Fig. 2. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach normalnych

Zebrane wartości dynamicznych kątów kontaktu posłużyły do analizy danych zgodnie z przedstawioną metodą, tj. wyznaczano γ_{SV} oraz Π zgodnie z równaniami (1–2) dla każdego z interwałów czasowych. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 1. Następnie, na podstawie obliczonych γ_{SV} oraz Π oraz na podstawie relacji (5), stworzono profil ewolucji względnej koncentracji powierzchniowej substancji – wykres 1. Za wartość koncentracji powierzchniowej $C=0$ przyjęto referencyjną wartość otrzymaną dla czasu doświadczenia $t=0$. Za wartość maksymalnej koncentracji powierzchniowej substancji C_{MAX} przyjęto wartość funkcji stałej otrzymanej dla długich czasów doświadczenia $t > 70 \text{ min}$ (tj. wartość koncentracji substancji nie ulega już zmianie).

Tab 1. Ewolucja dynamicznych kątów kontaktu oraz wybranych własności zwilżających powierzchni dla układu ditranol/membrana dodekano-kolodionowa. Jako cieczy próbującej użyto wody destylowanej ($\gamma_{LV} = 72.5 \text{ mJm}^{-2}$).

Czas [min]	Θ_{ADV} [°]	Θ_{REC} [°]	Π [mN m ⁻¹]	γ_{SV} [mJ m ⁻²]
0	64.6±0.7	31.4±0.8	30.6±0.3	44.7±0.4
10	65.8±0.6	31.5±0.8	31.9±1.3	43.8±0.8
20	65.7±1.2	30.2±1.0	31.7±1.4	42.9±0.9
30	69.1±1.1	33.1±0.7	34.5±1.6	41.5±2.1
40	75.0±1.0	35.9±0.7	39.6±1.7	37.2±0.9
50	74.7±0.7	26.8±1.1	45.1±1.3	36.4±0.3
60	76.2±1.3	26.4±1.0	47.2±0.7	35.2±0.8
70	76.1±1.6	26.8±0.5	47.0±2.6	35.3±1.6
80	76.6±1.7	26.8±1.3	47.5±2.3	35.0±2.3
90	76.7±1.1	25.6±1.4	48.3±1.2	34.7±0.3
100	77.0±1.5	25.1±1.5	48.9±2.3	34.5±1.4
110	77.1±1.4	25.9±0.7	48.6±0.4	34.5±0.3
120	77.0±1.0	26.0±0.9	48.4±1.8	34.6±0.9
130	76.9±2.0	26.3±0.9	48.2±2.7	34.6±2.1
140	78.2±1.6	28.1±1.0	48.7±2.1	33.8±1.5



Wykres 1

Uśrednione wartości względnej koncentracji powierzchniowej substancji (okręgi) wraz z odchyleniem (słupki) w funkcji czasu otrzymane na podstawie relacji (5) dla danych zebranych w tabeli 1. Linia przerywana – dopasowanie funkcji liniowej ($C/C_0 = a \cdot t + b$, gdzie a – współczynnik kierunkowy, t – czas, b – wyraz wolny) do danych w obszarze jednostajnego wzrostu koncentracji powierzchniowej leku, tj. gdy $d(C/C_0)/dt > 0$. Punkt przecięcia linii przerywanej z osią $C=0$ wskazuje czas martwy procesu dyfuzji t_{lag} , umożliwiając, na podstawie formalizmu Daynesa, wyznaczenie współczynnika dyfuzji substancji przez membranę (zgodnie z relacją (6)).

Na wykresie pokazano 15 punktów – membran było 45, ale w danym punkcie czasowym były mierzone 3, co zaowocowało pokazanymi niepewnościami na wykresie.

Następnie, korzystając z programu Origin2016 umożliwiającego analizę numeryczną dużych zestawów danych (opcjonalnie można użyć na przykład pakietów Mathematica, Matlab, MSEExcel bądź ręcznie wykorzystując metodę regresji liniowej) na podstawie zmian względnej koncentracji powierzchniowej (Fig. 4) wyznaczono t_{lag} , jako punkt przecięcia prostych najlepszego dopasowania do danych pomiarowych w obszarze jednostajnego wzrostu koncentracji ($y = C/C_0 = 0.006t + 0.12$, linia przerywana na Fig. 4) z osią poziomą koncentracji dla $C=0$ ($y = C/C_0 = 0.24$), otrzymując wartość $t_{lag} = 20 \pm 1.9$ min. Następnie korzystając z wyznaczonego czasu martwego oraz zmierzonej grubości membrany, na podstawie równania (6) wyznaczono współczynnik dyfuzji leku przez membranę $D = (1.25 \pm 0.19) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Wartość wyznaczonego współczynnika dyfuzji na podstawie sposobu według wynalazku pozostaje w zgodności z wartością $(1.49 \pm 0.03) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ wyznaczoną na podstawie badań spektroskopowych (profilometria fotoakustyczna) (P. Rochowski, J. Szurkowski, Physical signatures of drug transport through an artificial skin barrier-A proposed model and its validation, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 117 (2014) 107–113. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.002.).

P r z y k ł a d 5 – urządzenie – wersja uproszczona

Uproszczony schemat aparatury do pomiaru kątów kontaktu (goniometr) przedstawiono na Fig. 4. Dedykowane urządzenie do wyznaczania współczynnika dyfuzji – transportu membranowego zgodnego ze sposobem powinno posiadać wybrane cechy typowego goniometru, w tym: na ramie urządzenia (15) umieszczona jest kamera (16) rejestrująca kąty kontaktu cieczy próbkującej umieszczonej na badanej próbce aplikatorem (17) – standardowo strzykawka bądź pompa perystaltyczna (zakończona igłą (10) – jak na Fig. 1); próbka ustawiana jest na podstawie (18) będącej w osi optycznej kamery. Aplikator cieczy ma zwyczajowo możliwość ruchu w osi pionowej, co umożliwia zbliżenie się igły (10) do bada-

nego materiału (4) w celu umieszczenia kropli płynu próbkującego. Rola oraz sposób działania elementów (17) oraz (18) zależy od przyjętej metody pomiaru (przykłady na Fig. 1): dla metody pochylonej płytki, (17) aplikuje na zadaną próbkę kroplę cieczy próbkującej, ruch kropli zapoczątkowany zostaje poprzez ruch uchylny (18); dla metody ekspandującej kropli (18) nie zmienia położenia, ruch kropli jest efektem pompowania/odsysania płynu roboczego przez (17). Standardowo, jakość otrzymywanych obrazów zwiększa się poprzez zastosowanie elementu doświetlającego próbkę (19) – zwiększanie kontrastu rejestrowanego obrazu w obszarze kropli cieczy próbkującej. Dostępne na rynku goniometry umożliwiają wykonanie pomiarów metodami nachylonej płytki oraz ekspandującej kropli w obrębie pojedynczego zestawu aparaturowego.

Na fig.4 przedstawiono uproszczony schemat aparatury: 15 – rama urządzenia, 16 – kamera, 17 – aplikator cieczy próbkującej, 18 – podstawa na próbki, 19 – element doświetlający próbkę (zwiększający kontrast rejestrowanego przez 16 obrazu).

Zastosowanie sposobu według wynalazku umożliwia detekcję zmian względnej powierzchniowej koncentracji substancji poprzez pomiar kątów kontaktu cieczy z badaną membraną w trakcie kolejnych etapów przenikania substancji przez układ. Pomiaru dokonuje się metodą nachylonej płytki bądź ekspandującej kropli, to jest metodami prostszymi operacyjnie względem technik detekcji znanych ze stanu techniki dla pomiarów dynamiki transportu masy.

Ze względu na konieczność prowadzenia badań nad wieloma próbkami według sposobu (śledzenie ewolucji własności energetycznych powierzchni membrany), niestandardowym rozwiązaniem usprawniającym goniometr według Fig. 4 jest modyfikacja elementu 18, poprzez dodanie zautomatyzowanego podajnika próbek (klasyczne goniometry budowane są z myślą o badaniu pojedynczych próbek) tak, by w zadanych interwałach czasowych eksperymentu wykonywać pomiar nad kolejnymi próbkami. Ideę można zrealizować jak na Fig. 5, poprzez zastosowanie przyłączonej do elementu 18 tarczy 20a z możliwością obrotu 20b, w slotach 21 której umieszcza się naczynia pomiarowe 22 ze skrzydełkami 22a, umożliwiającymi odwracalne mocowanie naczyń w slotach tarczy. W naczyniu pomiarowym umieszcza się próbkę składającą się z membrany 4 rozpostartej na substancji farmaceutycznej 12. Mocowanie tarczy 20a do elementu 18 powinno być wykonane w takim miejscu elementu 18 by jeden ze slotów w początkowym ustawieniu tarczy znajdował się w osi strzykawki 10 aplikatora cieczy 17; wtedy, wraz z pełnym obrotem tarczy, strzykawka znajduje się w osi każdego ze slotów po kolei.

Na fig. 5A przedstawiono schemat ideowy podstawy na próbki 18 z dodatkowym elementem umożliwiającym badanie serii próbek (w celu śledzenia ewolucji energetyki powierzchni według sposobu) zrealizowanym przez tarczę 20a z możliwością obrotu 20b oraz slotami 21 na naczynia pomiarowe 22 wyposażone w skrzydełka do klinowego mocowania 22a na tarczy (20a). B – schemat naczynia pomiarowego, z membraną (4) rozpostartą na rezerwarze z lekiem (12).

Klasyczne goniometry umożliwiają prowadzenie badań metodami nachylonej płytki i ekspandującej kropli w obrębie tego samego urządzenia. Ze względu na sposób działania takiego urządzenia (ruch pochylony elementu 18 inicjujący ruch kropli przy metodzie pochylonej płytki), urządzenie uproszczone według rozwiązania z Fig. 5, tj. z dołączoną tarczą obrotową, może działać jedynie w modzie ekspandującej kropli. W szczególności, ruch pochylony elementu 18 powodowałby jednoczesny ruch pochylony elementu 20a – tarczy, wraz ze znajdującymi się w niej naczyniami pomiarowymi 22. W przypadku leków 12 w formie płynnej/półpłynnej, zmiana kąta nachylenia próbki powodowałaby grawitacyjne opadanie leku w komorze 22, zaburzające gradient koncentracji leku przenikającego przez membranę 4, uwidaczniający się w skali czasowej porównywalnej z t_{lag} . Innymi słowy, stosowanie wersji uproszczonej urządzenia w modzie nachylonej płytki skutkowałoby występowaniem znacznych błędów systematycznych w doświadczeniu.

Działanie urządzenia w modzie ekspandującej kropli przedstawia się następująco.

1. W naczyniach pomiarowych 22 umieszcza się substancję farmaceutyczną 12 do poziomu skrzydełek naczynia 22a; nad substancją 12 rozpościera się badane membrany 4 o znanej grubości.
2. Naczynia 22 umieszcza się w slotach 21 tarczy 20a. Pierwsza z próbek znajduje się bezpośrednio pod igłą 10 aplikatora cieczy 17.
3. Inicjuje się pomiar dla $t=0$ (pierwszy pomiar powinien być wykonany w czasie możliwie krótkim od wykonania czynności z punktu 1., tj. aby koncentracja powierzchniowa leku $C=0$) zgodnie ze schematem z Fig. 1.3a – tłoczenie cieczy i rejestracja kąta wstępującego, oraz Fig. 1.3b – odsysanie cieczy oraz rejestracja kąta zstępującego, pomiędzy cieczą próbkującą a badaną membraną. Rejestracji kątów dokonuje się kamerą 16.

4. Po zakończeniu pomiaru następuje taki obrót tarczy, że kolejne z naczyń z próbką 22 znajduje się pod igłą 10 aplikatora cieczy 17.
5. Po czasie Δt (interwał czasowy wynikający z zaplanowanego eksperymentu, np. 10 min jak w przykładzie 3.) następuje aplikacja cieczy próbkującej na membranę, tłoczenie/odsysanie cieczy próbkującej oraz rejestracja kątów kontaktu.
6. Kroki 5–6 powtarza się aż do zbadania wszystkich próbek.

P r z y k ł a d 7 – urządzenie – w danym wariantcie realizacji

Pełna wersja urządzenia – goniometru – przeznaczonego do badań dynamiki transportu farmaceutyków przez membrany, umożliwia pomiar metodami pochylonej płytki oraz ekspandującej kropli. Jest to możliwe dzięki m.in. rozdzielaniu podajnika próbek w formie obracającej się tarczy od platformy urządzenia, jak pokazano na Fig. 6. Tarcza 20a, podobnie jak w przykładzie poprzednim, spełnia rolę podajnika próbek. W wersji pełnej urządzenia w trakcie doświadczenia tarcza nie zmienia swojego nachylenia względem ramy urządzenia 15, dzięki czemu kierunek przenikania leku przez membranę 4 pozostaje niezaburzony względem pierwotnego. Szczególną cechą urządzenia jest platforma pomiarowa 24 z możliwością ruchu w osi pionowej, umożliwiającą, dzięki wysięgnikowi 25, odwracalne pobranie/odłożenie naczyń pomiarowych 22 z tarczy 20a. Moduł obrotowy 26 wysięgnika 25 umożliwia zainicjowanie ruchu kropli zgodnie z metodą nachylonej płytki (Fig. 1.2). Istotnym jest, by czas nachylenia układu (czas pomiaru) był znacznie krótszy od t_{lag} (warunek jest zwyczajowo spełniony – w Przykładzie 2 t_{lag} wynosił ok 20 min, podczas gdy pojedynczy pomiar (nachylenie próbki) trwa do kilkunastu sekund).

Na fig. 6 przedstawiono schemat dedykowanego urządzenia do badania dynamiki transportu leku przez membrany metodami pochylonej płytki (wyznaczanie dynamiki dyfuzji) oraz ekspandującej kropli w rzucie bocznym (A) oraz pionowym (B). 23 – moduł liniowy umożliwiający ruch pionowy platformy 24, 25 – wysięgnik naczyń pomiarowych 22 z tarczy 20a z możliwością ruchu obrotowego dzięki obrotowemu modułowi mocującemu 26 do platformy 24. Na Fig. 6A ruchy modułów liniowych 17 i 23 i obrotowych 20b i 26 oznaczono strzałkami odpowiednio ciągłymi oraz przerywanymi.

Sposób działania pełnej wersji urządzenia według wynalazku w modzie nachylonej płytki przedstawiono na Fig. 7 dla pojedynczego cyklu pomiarowego (badanie jednej próbki – membrany).

Przed rozpoczęciem serii pomiarowej wielu próbek, naczynia pomiarowe 22 wypełnia się substancją farmaceutyczną 12 do poziomu skrzydełek naczynia 22a; nad substancją rozpościera się badane membrany. Następnie naczynia pomiarowe umieszcza się w slotach 21 tarczy 20a.

Cykl pomiarowy – pomiar pojedynczej próbki – dzieli się na fazy zgodnie z Fig. 7:

- Faza I – platforma 24 znajduje się w pozycji minimalnego (początkowego) położenia (oś y) tak, że element krańcowy wysięgnika (25) znajduje się poniżej tarczy podajnika próbek 20a, przy czym naczynie pomiarowe (22) z próbką znajduje się w jednej osi z aplikatorem cieczy (17) (odpowiednie ustawienie tarczy poprzez obrót 20b);
- Faza II – platforma 24, dzięki modułowi liniowemu (23), wznosi się ($y \uparrow$). Jednocześnie, naczynie (22) z próbką zostaje (odwracalnie) przytwierdzone do wysięgnika próbek (25) w położeniu krańcowym wysięgnika. Należy zapewnić stabilność mocowania naczynia pomiarowego do wysięgnika, np. poprzez zamocowanie magnesów na spodzie naczyń pomiarowych (22) i górnej powierzchni platformy (25). Wysokość wznoszenia platformy jest taka, by próbka znajdowała się na wysokości elementu doświetlającego (19) – maksymalizacja kontrastu obrazu rejestrowanego przez kamerę (16);
- Faza III – następuje ruch aplikatora cieczy (17) zakończonego igłą (10) w kierunku próbki ($y \downarrow$) a następnie depozycja kropli cieczy próbkującej o znanym napięciu powierzchniowym γ_{LV} na powierzchni badanej membrany (4);
- Faza IV – aplikator cieczy próbkującej (17) powraca na pierwotną pozycję ($y \uparrow$); rozpoczyna się akwizycja danych – rejestracja obrazu kropli (będącej w kontakcie z próbką) przy pomocy kamery (16) w trybie ciągłym; następnie rozpoczyna się obrót wysięgnika próbek (25) wraz z naczyniem (22) poprzez ruch rotacyjny modułu (26) w płaszczyźnie yz . Rejestracja obrazu kończy się gdy zostanie zainicjowany ruch kropli cieczy próbkującej – w tym momencie zostają odczytane dynamiczne kąty kontaktu, zgodnie z Fig. 1.2.
- Faza V – po odczytaniu dynamicznych kątów kontaktu moduł obrotowy (26) wraca do położenia początkowego (ruch w płaszczyźnie yz), tym samym przywraca ustawienie wysięgnika próbek (25) do stanu początkowego fazy IV. Następnie, dzięki modułowi liniowemu (23), następuje obniżanie platformy (24) do pozycji z fazy I ($y \downarrow$). Następnie, gdy skrzydełka (22a)

naczynia pomiarowego (22) znajdują się na wysokości tarczy podajnika próbek (20a), następuje klinowe odłączenie naczynia (22) od wysięgnika (25) (naczynie trafia na slot (21) zajmowany w fazie I doświadczenia).

Po wykonaniu pełnego cyklu pomiarowego (fazy I–V) podajnik próbek w formie tarczy z możliwością obrotu (20a) wykonuje ruch rotacyjny (20b) w płaszczyźnie x-z o taki kąt, że kolejna z próbek umieszczonych w (20a) znajduje się w osi y wysięgnika (25). Dalej mogą następować kolejne cykle pomiarowe opisane fazami I–V, rozdzielone interwałem czasowym wynikającym z planowanego doświadczenia. Według wynalazku w slotach (21) znajdują się co najmniej 3 próbki, a operacje powtarzane są do momentu zbadania każdej z próbek z podajnika próbek (20a).

Cykl pomiarowy w modzie ekspandującej kropli różni się tym od cyklu w modzie nachylonej płytki, że fazy IV i V przyjmują postać:

Faza IVa – rozpoczyna się akwizycja obrazu w trybie ciągłym. Aplikator cieczy tłoczy ciecz – następuje rejestracja kąta wstępującego, następnie aplikator cieczy odsysa ciecz – następuje rejestracja kąta zstępującego (zgodnie z Fig. 1.3a i 1.3b);

Faza Va – aplikator cieczy próbkującej (17) powraca na pierwotną pozycję ($y\uparrow$); następnie, dzięki modułowi liniowemu (23), następuje obniżanie platformy (24) do pozycji z fazy I ($y\downarrow$). Następnie, gdy skrzydełka (22a) naczynia pomiarowego (22) znajdują się na wysokości tarczy podajnika próbek (20a), następuje klinowe odłączenie naczynia (22) od wysięgnika (25) (naczynie trafia na slot (21) zajmowany w fazie I doświadczenia).

Cykl pomiarowy w modzie ekspandującej kropli można uprościć dodając w układzie Fig. 6 moduł liniowy (ruch w osi y) elementu doświetlającego (19) tak, by (19), (20a) oraz (25) znajdowały się w jednej osi. Wtedy, na cykl pomiarowy składają się fazy:

- Faza 1b – próbka w naczyniu (22) znajduje się w jednej osi z aplikatorem cieczy (17) (odpowiednie ustawienie tarczy poprzez ruch 20b);
- Faza 2b – następuje ruch aplikatora cieczy (17) zakończonego strzykawką (10) w kierunku próbki ($y\downarrow$) a następnie depozycja kropli cieczy próbkującej o znanym napięciu powierzchniowym γ_{LV} na powierzchni badanej membrany (4);
- Faza 3b – rozpoczyna się akwizycja obrazu w trybie ciągłym. Aplikator cieczy tłoczy ciecz – następuje rejestracja kąta wstępującego, następnie aplikator cieczy odsysa ciecz – następuje rejestracja kąta zstępującego (zgodnie z Fig. 1.3a i 1.3b);
- Faza 4b – aplikator cieczy próbkującej (17) powraca na pierwotną pozycję ($y\uparrow$).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyznaczania współczynnika dyfuzji procesu przenikania środków aktywnych biologicznie do podania przezskórnie przez membrany biologiczne, zwłaszcza leków, poprzez analizę zmian własności zwilżających powierzchni membrany naśladującej naskórek na podstawie ewolucji kątów kontaktu, **znamienny tym**, że przeprowadza się następujące czynności:
 - przygotowuje się układ pomiarowy zbudowany z co najmniej trzech membran naśladujących barierę naskórka o znanej grubości membrany L zaś na wierzchniej powierzchni trzech membran umieszcza się w trakcie pomiaru ciecz próbkującą o znanym napięciu powierzchniowym γ_{LV} , tworząc w ten sposób kroplę cieczy próbkującej rozpostartą na powierzchni membrany, zaś na drugiej stronie każdej z tych trzech membran nanosi się środek aktywny biologicznie;
 - przeprowadza się co najmniej jeden pomiar referencyjny dla membrany wolnej od środka aktywnego biologicznie w czasie $t=0$ oraz co najmniej dwa pomiary właściwe dokonuje się w innym czasie niż pomiar referencyjny w różnych przedziałach czasowych po nałożeniu środka aktywnie biologicznego w trakcie jego przenikania przez membranę w przedziałach czasowych odpowiadających liniowemu wzrostowi koncentracji powierzchniowej substancji aktywnej przed osiągnięciem wartości maksymalnej nasycenia C_{max} , zaś uzyskanie C_{max} ustala się z przebiegu czasowej zależności rejestrowanego kąta kontaktu jako wartość stałą plateau funkcji względnej koncentracji C/C_0 ; aż wartość C/C_0 osiągnie wartość stałą, przy czym dla układów, gdzie nie można aproksymować odpowiedniego dla pomiarów okna czasowego, należy wykonać pełny profil ewolucji koncentracji powierzchniowej leku aż do osiągnięcia C/C_0 ;

- w trakcie każdego pomiaru wywołuje się zmianę kształtu kropli cieczy, w postaci zwilżania powierzchni membrany i cofania się kropli z powierzchni membrany, poprzez inicjację ruchu kropli cieczy próbkującej poprzez ruch uchylny membrany wraz z kroplą, bądź mechaniczną zmianę kształtu kropli cieczy próbkującej, korzystnie poprzez tłoczenie/odsysanie cieczy do/z kropli cieczy próbkującej, po czym w momencie inicjacji ruchu kropli cieczy na powierzchni membrany odczytuje się co najmniej dwa kąty nachylenia czoła kropli cieczy próbkującej do powierzchni membrany: kąt wstępujący Θ_{ADV} zawarty między linią kontaktu kropli cieczy próbkującej z powierzchnią membrany a styczną do czoła kropli ze strony zwilżającej powierzchni membrany oraz kąt zstępujący Θ_{REC} zawarty między linią kontaktu kropli cieczy próbkującej z powierzchnią membrany a styczną do czoła kropli ze strony cofającej się kropli z powierzchni membrany;
- dla każdego pomiaru oblicza się swobodną energię powierzchniową $\Delta\gamma_{SV}$ oraz ciśnienie powierzchniowe Π filmu 2-wymiarowej struktury będącej następstwem adsorpcji powierzchniowej na podstawie zarejestrowanych dynamicznych kątów równania:

$$\Delta\gamma_{SV} = \frac{\Pi(1+\cos\Theta_{ADV})^2}{(1+\cos\Theta_{REC})^2 - (1+\cos\Theta_{ADV})^2} \quad (1)$$

$$\Pi = \gamma_{LV}(\cos\Theta_{REC} - \cos\Theta_{ADV}) \quad (2)$$

- następnie, na podstawie zależności:

$$\Pi = \Delta\gamma_{SV} = R_g T \Gamma \quad (3)$$

$$\Gamma = -\frac{C}{R_g T} \frac{d\gamma_{SV}}{dC}, \quad (4)$$

gdzie: $\Delta\gamma_{SV}$ – swobodna energia powierzchniowa, γ_{SV} – napięcie powierzchniowe cieczy próbkującej, R_g – stała gazowa, T – temperatura
oblicza się względną koncentrację powierzchniową środka aktywnego jako stosunek C/C_0 :

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left[-\frac{\gamma_{SV}}{\Pi}\right] \quad (5)$$

dla każdego punktu pomiaru, gdzie C – koncentracja w powierzchniowa w danym punkcie czasowym, a C_0 to koncentracja maksymalna w układzie, przy czym dla pomiaru referencyjnego wartość C/C_0 odpowiada zerowej koncentracji powierzchniowej,

- dla pomiarów właściwych wykonuje się dopasowanie liniowe typu $y=at+b$ w czasie, gdzie $y=C/C_0$, a – współczynnik kierunkowy prostej ($a>0$), t – argument funkcji – mierzony czas, b – wyraz wolny, zaś dla pomiaru referencyjnego wyznacza się dopasowanie liniowe referencyjne $y=C/C_0$,
- wyznacza się wartość czasu martwego t_{lag} poprzez znalezienie punktu przecięcia dopasowania liniowego dla pomiarów właściwych z dopasowaniem liniowym referencyjnym stanowiącym prostą referencyjną odpowiadającą zerowej koncentracji powierzchniowej, przy czym ustalone dopasowanie liniowe dla pomiarów właściwych z prostą referencyjną jest równy czasowi martwemu t_{lag} ,
- na podstawie znajomości czasu martwego t_{lag} oraz grubości membrany L , wyznacza się współczynnik dyfuzji D według równania:

$$D = L^2/6t_{lag} \quad (6)$$

którego wartość określa szybkość penetracji substancji przez membranę.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ciecz próbkującą stosuje się wodę, diiodometan, formamid lub glikol etylenowy.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że punkt przecięcia dopasowania liniowego dla pomiarów właściwych z dorysowaniem liniowym referencyjnym i na tej podstawie ustalenie czasu martwego t_{lag} wykonuje się z rozwiązania układu równań dopasowania liniowego dla pomiarów właściwych $y=at+b$ i dopasowania liniowego referencyjnego $y=C/C_0$, obliczając wartość t_{lag} .
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że punkt przecięcia dopasowania liniowego dla pomiarów właściwych z dopasowaniem liniowym referencyjnym i na tej podstawie ustalenie czasu martwego t_{lag} wykonuje się poprzez naniesienie obliczonych punktów C/C_0 dla wartości pomiarów właściwych i nałożenie obliczonego dopasowania liniowego referencyjnego $y= C/C_0$ na wykresie zależności C/C_0 od czasu pomiaru t , zaś czas martwy t_{lag} wyznacza się jako punkt przecięcia linii referencyjnej z linią dla punktów pomiarów właściwych.
5. Urządzenie do pomiaru współczynnika dyfuzji procesu przenikania środków aktywnych biologicznie do podania przezskórnie na podstawie pomiarów kątów kontaktu kropli cieczy z powierzchnią mierzonej membrany zawierające podstawę, na której umieszcza się membranę, rejestrator kątów kontaktu kropli cieczy próbkującej umieszczanej na membranie, do realizacji sposobu określonego w zastrzeżeniach od 1 do 4 **znamiennie tym**, że podstawa wykonana jest w postaci tarczy (20a) z możliwością obrotu wokół własnej osi (20b), a ponadto na obrzeżach tarczy wykonane są zęby, pomiędzy którymi utworzone są co najmniej trzy przestrzenie (21) na tarczy (20a), w których umieszcza się naczynie pomiarowe (21) z membraną zaś w każdej przestrzeni (21), (21) umieszczone jest w sposób rozłączny naczynie pomiarowe (22) dostosowane wymiarem i kształtem do umieszczenia w nim membrany na środku aktywnym tak, że środek wnika do membrany od dolnej powierzchni membrany, zaś na drugiej stronie membrany kształt naczynia zapewnia umieszczenie cieczy próbkującej, a ponadto wyposażone jest w ruchomą w osi pionowej urządzenia platformę (24) zaopatrzoną w wysięgnik (25) usytuowany co najmniej częściowo nad tarczą (20a) oraz aplikator (17) cieczy próbkującej, przy czym platforma (24), wysięgnik (25) i aplikator (17) znajdują się w pionowej osi symetrii badanej próbki-membrany umieszczonej w przestrzeni (21) tarczy (20a), przy czym wysięgnik (25) jest trwale umocowany ze znanym obrotowym modułem (26) z silnikiem i przekładnią nadającym mu ruch obrotowy, przy czym wysięgnik ma kształt i wymiary umożliwiające swobodne przemieszczanie w kierunku pionowym przez przestrzenie (21) na tarczy (20a) tak, aby w trakcie ruchu platformy (24) w osi pionowej realizować pobranie i odkładanie naczynia pomiarowego (22) z tarczy (20a) z jednoczesnym ruchem obrotowym wysięgnika (23) realizowanym poprzez obrotowy moduł (26).

Rysunki

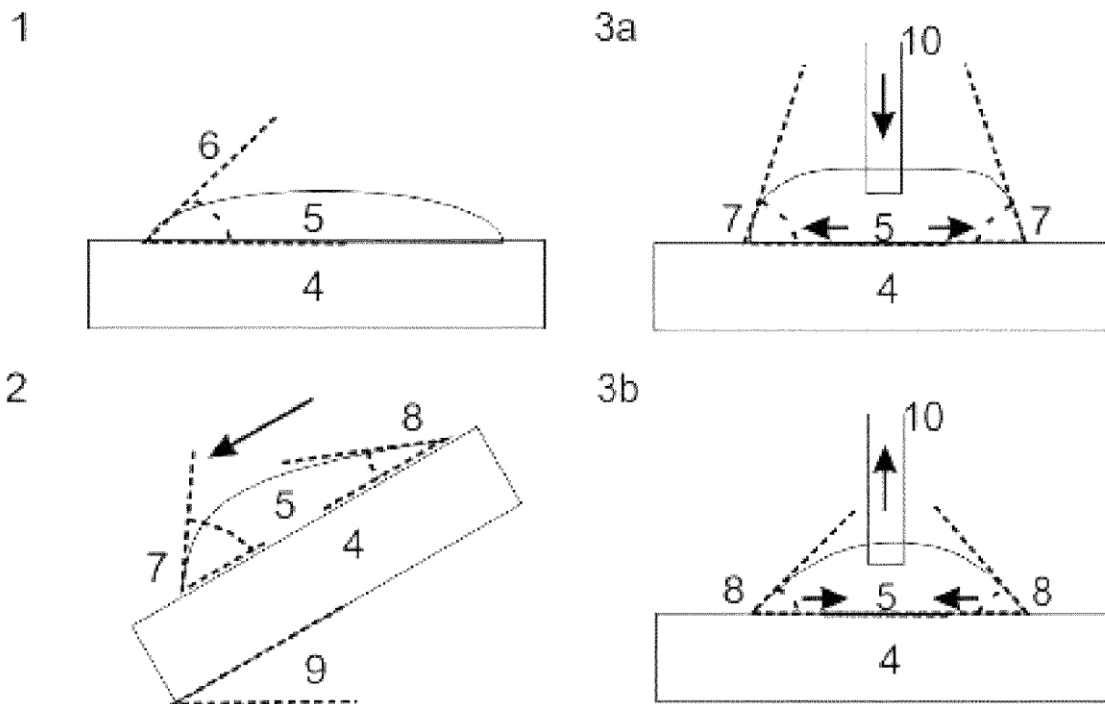


Fig. 1

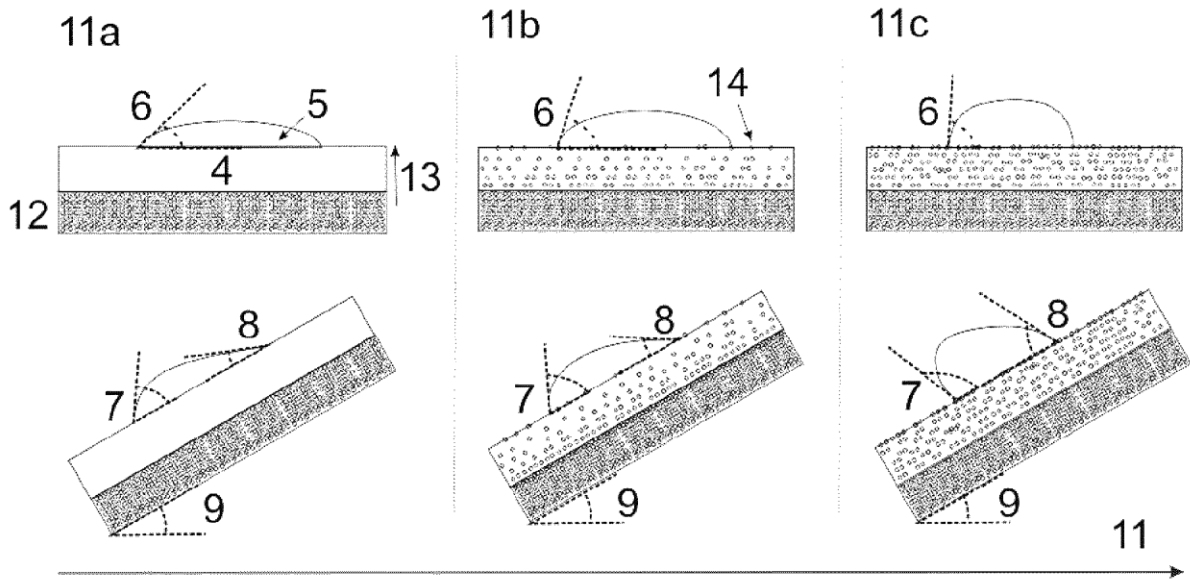


Fig. 2

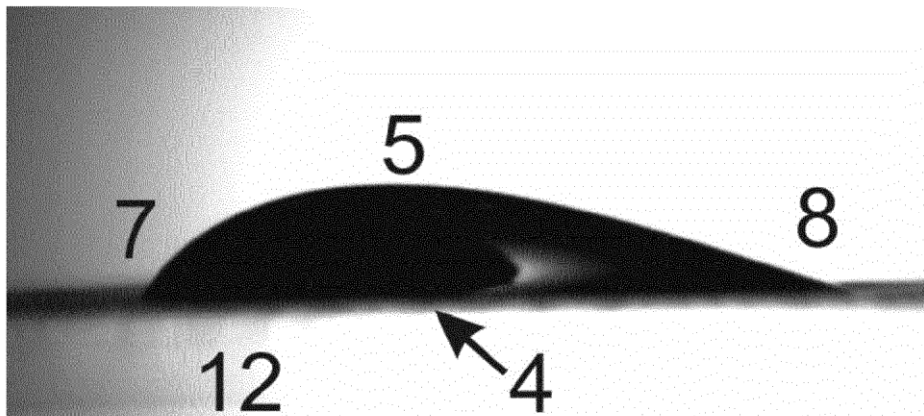


Fig. 3

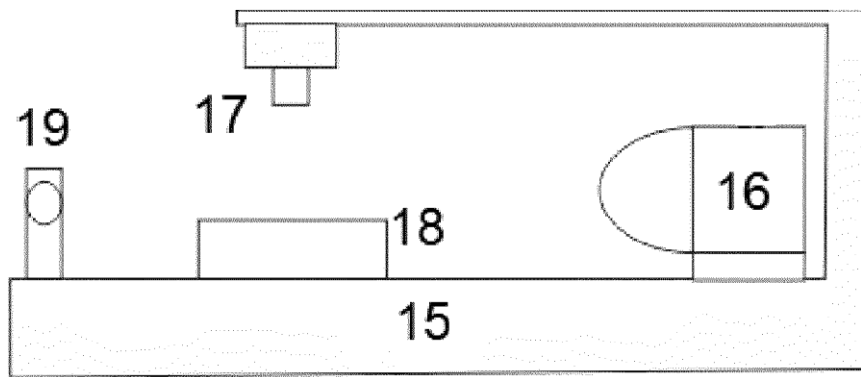


Fig. 4

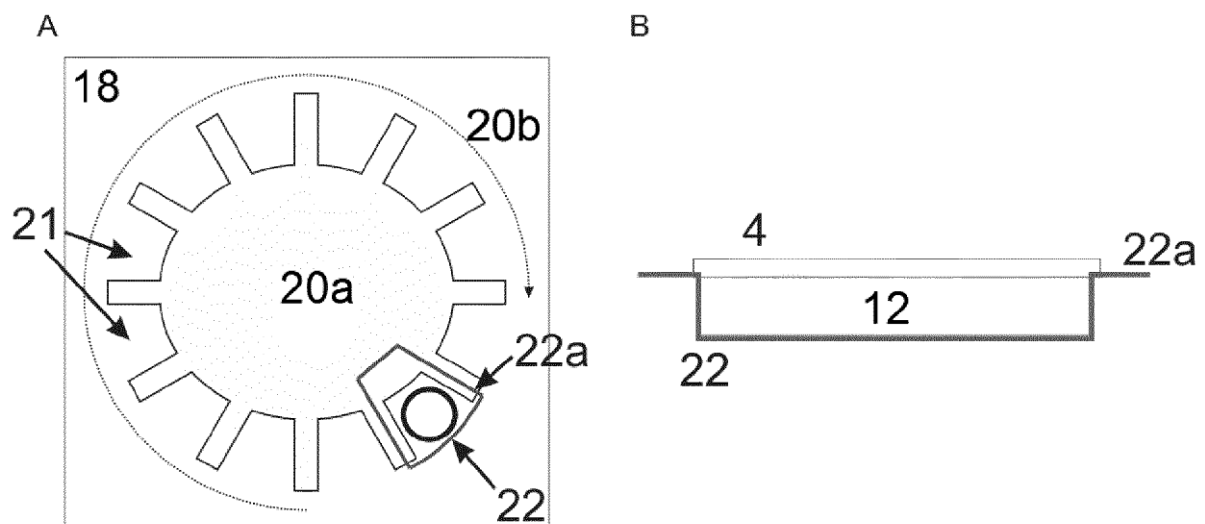


Fig. 5

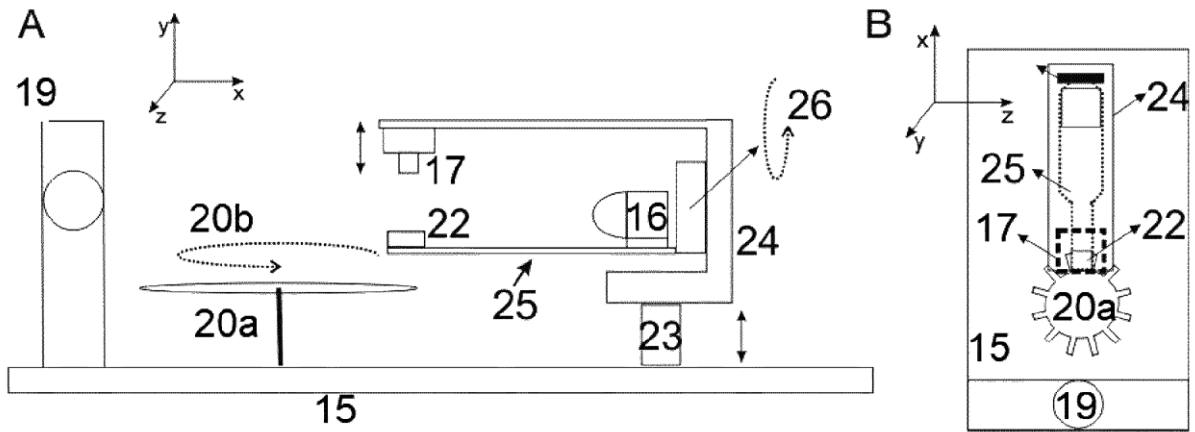


Fig. 6

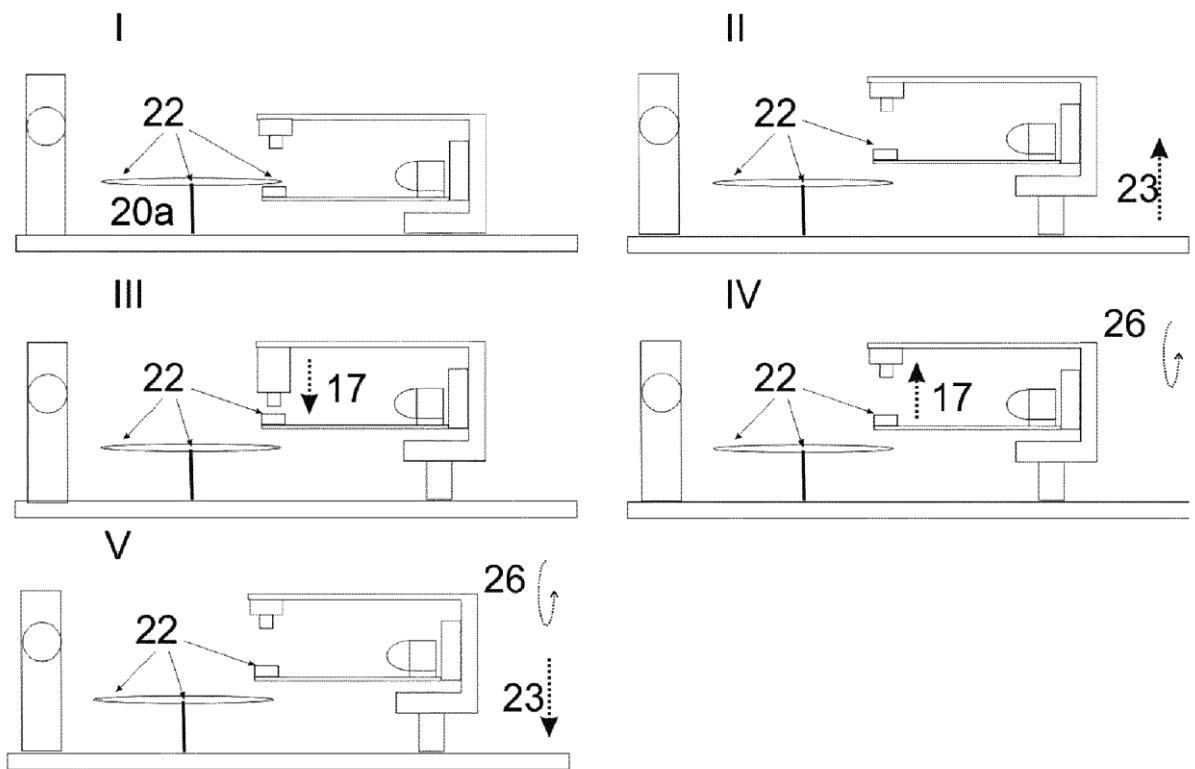


Fig. 7