

МАТЕМАТИЧКА ГИМНАЗИЈА

**МАТУРСКИ РАД**  
из хемије

**Молекулски обележени полимери:  
Синтеза и примена у изради  
терапеутских меких контактних  
сочива**

Ученик:  
Филип Колџић IVБ

Ментор:  
Аника Влајић

Београд, јун 2020.



# Садржај

<b>1</b>	<b>Увод</b>	<b>1</b>
1.1	Третман обољења ока . . . . .	1
1.2	Хидрогелови . . . . .	2
1.3	Молекулски обележени полимери . . . . .	3
1.4	Особине меких контактних сочива . . . . .	4
1.5	Конјунктивитис . . . . .	5
1.6	Хлорамфеникол . . . . .	5
1.7	Комомери . . . . .	6
1.8	<i>UV – Vis</i> спектрофотометрија . . . . .	6
1.9	Течна хроматографија високих перформанси ( <i>HPLC</i> ) . . . . .	8
1.10	Инфрацрвена спектроскопија - <i>FTIR</i> . . . . .	11
1.11	Циљ . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Материјал и методе</b>	<b>15</b>
2.1	Синтеза хидрогелова . . . . .	15
2.2	Иницијација . . . . .	16
2.3	Карактеризација полимера . . . . .	16
2.3.1	IR спектроскопија . . . . .	16
2.3.2	Садржај воде . . . . .	17
2.3.3	Пропустљивост кисеоника . . . . .	17
2.4	Анализа хлорамфеникола . . . . .	17
2.5	Припрема <i>PBS</i> раствора . . . . .	17
2.6	Апсорпција лека . . . . .	18
2.7	Отпуштање лека . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Резултати и дискусија</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Закључак</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Референце</b>	<b>27</b>



# 1

## Увод

### 1.1 Третман обољења ока

Ефикасност терапије антибиотицима у великој мери зависи од концентрације лека у околини инфициране регије током времена. Капи и масти за очи се користе као примарни третман за већину очних болести (слика 1.1). Када се лек за одређену болест уноси у виду капи или масти за очи, веома кратко се заржава у оку, свега 5 минута, и тек 1-5 % унетог лека пролази кроз рожњачу и доспева до унутрашњости ока где делује. Ово је последица ефекта трептања и интензивног одношења лакрималне течности. (Choi, Kim, 2018; Das, Saha, 2017)



Слика 1.1: Третман обољења ока капима (лево) и машћу за очи (десно)

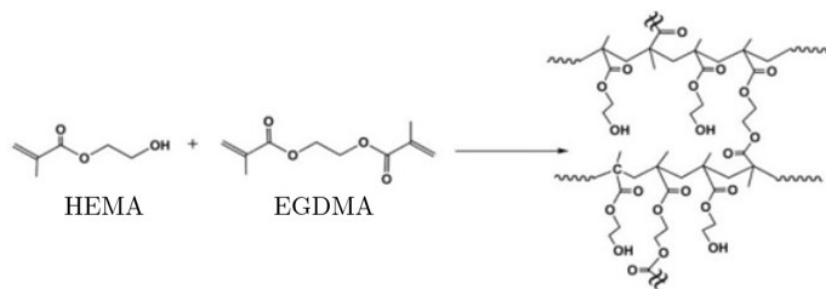
Због тога, пацијенти су приморани да уносе велике количине капи или масти за очи, са већом концентрацијом лека. Значајна количина унетог лека се неефективно апсорбује у крвоток. Овакав начин терапије може изазвати бројне потешкоће код пацијената због тога што се концентрација лека током времена значајно мења и повећан је ризик од нежељених

ефеката.

Како би се овај проблем превазишао, све више се ради на развијању различитих метода за ефикасно уношење офталмолошких лекова. Већа ефикасност може се постићи применом терапеутских контактних сочива и спољним уношењем антибиотика. Иако су нека контактна сочива веома удобна и имају могућност дужег задржавања лека, њихов капацитет је мали и недовољан за постизање терапеутске дозе лека у оку током дужег периода. Овај недостатак могао би бити превазиђен употребом сочива која су молекулски обележени хидрогелови, која имају знатно већи капацитет и афинитет према леку. (Gulsen, Chauhan, 2004; Singh et al, 2017)

## 1.2 Хидрогелови

Хидрогелови су полимери који имају способност да апсорбују значајне количине воде, али се у њој не растварају. Хидрогелови су веома флексибилни, попут неких ткива, због чега су постали веома популарни последњих година. Способност хидрогелова да апсорбују воду повећава се са бројем хидрофилних група мономера, док се растварање у води избегава захваљујући укрштању полимерних ланаца. Углавном се синтеишу полимеризацијом и истовременим укрштањем помоћу мултифункционалних мономера или полимерних ланаца (слика 1.2). Хидрогелови се све више користе као материјали за производњу меких контактних сочива због својих погодних особина, као што су флексибилност и хидрофилност. (Enas, 2015)



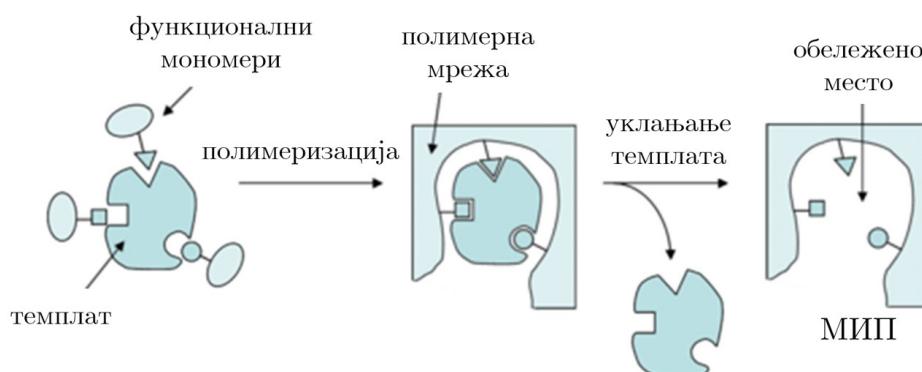
Слика 1.2: Умрежавање 2-хидроксиетил метакрилата са етиленгликол диметакрилатом

Од како су хидрогелови почели да се користе за израду меких контактних сочива, интензивно се ради на њиховој примени као система за третман акутних и хроничних болести ока. Основни мономер великог броја меких контактних сочива је поли(2-хидроксиетилметакрилат)

(pHEMA). Његов садржај воде је велики, због чега је олакшана дифузија лека и кисеоника кроз гел. Када се хидрогел унесе у концентровани раствор лека, он апсорбује одређену количину лека. Када се тај хидрогел постави у око, дифузијом се лек преноси у лакрималну течност. Због споре размене лакрималне течности, лек се отпушта дуже него у случају третмана капима или мастима за очи. Међутим, само мали број лекова се може на овај начин достављати јер већина само дифундује кроз полимерну мрежу, без успостављања интеракција са њом. Због тога, капацитет хидрогелова за већину лекова је веома мали и недовољан за достизање терапеутске дозе током дужег периода. Овај проблем могао би бити превазиђен применом молекулски обележених хидрогелова. Како би се додатно побољшале карактеристике материјала за израду терапеутских меких контактних сочива, могуће је да се HEMA кополимеризује са другим мономерима. (Goda, Ishihara, 2006; Hiratani et al, 2004; Корећек, 2009)

### 1.3 Молекулски обележени полимери

Молекулски обележени полимери (МИП-ови) су полимери синтетисани техником молекулског обележавања, која подразумева формирање шупљина у полимерној мрежи које имају афинитет ка одређеном молекулу или групи молекула тј. темплату. Темплату се прво омогући да успостави интеракције са функционалним елементима полимера (ковалентне везе, координативно ковалентне везе, водоничне везе итд). Услед успостављених интеракција, функционални елементи полимерне мреже се постављају тако да шупљине буду селективне за темплат. Чак и када се темплат уклони из полимера, распоред функционалних елемената полимера остаје непромењен (слика 1.2).



Слика 1.3: Схематски приказ молекулског обележавања полимера

При синтези МИП-ова користе се темплат, мономер или више њих, умреживач, растварач и иницијатор полимеризације. У присуству умреживача, формира се тродимензионална структура полимера (слика 1.3), а функционални елементи остају оријентисани према темплату. (Yan, Ramström, 2005)

## 1.4 Особине меких контактних сочива

Само мека контактна сочива која за себе везују воду могу се комерцијално користити, јер везана вода омогућава долазак кисеоника до ока и тиме, омогућава његово нормално функционисање. Процент воде који сочиво везује за себе назива се садржај воде. Пожељно је да садржај воде сочива буде што већи. Да би довољна количина кисеоника могла да дође до ока, садржај воде мора бити најмање 17 %. (Nicolson, Vogt, 2001; Nikoletic, 2016; Van der Worp, 2008).



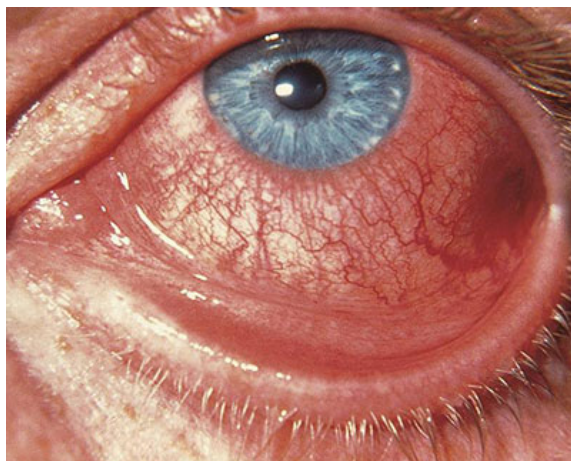
Слика 1.4: Мека контактна сочива

Транспарентност сочива је веома значајна за израду контактних сочива, јер је неопходно да оптичка јасноћа не буде смањена због употребе контактних сочива (слика 1.4). Најбоља транспарентност се постиже код терапеутских сочива код којих су лек и полимер од кога је сочиво израђено међусобно мешљиви. Када се лек диспергује и формира полимер, карактеристике отпуштања лека зависе од дифузије лека кроз полимерну мрежу, интеракција лека са мономерима који изграђују полимер и стерних фактора. Уколико лек успоставља јаке интеракције са полимером, теже ће се отпуштати и обрнуто. (Xinming et al, 2008).



## 1.5 Конјунктивитис

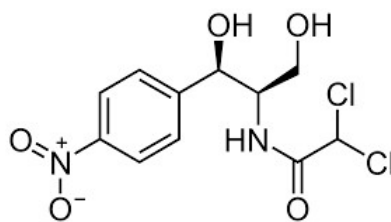
Конјунктивитис или упала вежњаче манифестује се црвенилом ока, сврабом, осећајем сувог ока и иритацијом ока (слика 1.5). Узроци конјунктивитиса су многобројни: инфекција (бактеријска или вирусна), алергија, изложеност одређеним лековима, загађеном ваздуху итд. Конјунктивитис је најчешће последица инфекције услед неадекватне хигијене ока. Најчешћи узрок јесте контаминација ока прљавим рукама. Због непријатности које изазива, конјунктивитис је потребно адекватно и ефикасно излечити. Један од лекова који се често користи за ефикасан третман конјунктивитиса и бројних инфекција ока јесте хлорамфеникол. (Richards, Guzman-Cottrill, 2010).



Слика 1.5: Око пацијента оболелог од конјунктивитиса

## 1.6 Хлорамфеникол

Хлорамфеникол је антибиотик који се примењује, како код одраслих, тако и код деце, за лечење бактеријског конјунктивитиса и бројних инфекција ока. Примењује се у виду масти за очи, при чему је веома тешко прецизно одмерити дозу лека. Као и већина других лекова, хлорамфеникол може имати бројна нежељена дејства уколико се прекомерно примењује. Нека од њих јесу отицање, анафилакса, грозница, дерматитис, па чак и апластична анемија. Структурна формула хлорамфеникола приказана је на слици 1.6. (Galenika, 2017; Brock, 1961; Maulvi et al, 2018)



Слика 1.6: Структурна формула хлорамфеникола

## 1.7 Комономери

Комономери који су коришћени у овом истраживању одабрани су на основу структуре темплата тј. лека. Молекул хлорамфеникола има две хидроксилне групе и једну амидну групу које могу да граде водоничне везе, као и бензеново језгро које може да остварује  $\pi - \pi$  интеракције са мономерима. Хлорамфеникол је умерено базно једињење. Мономери коришћени у овом истраживању су бирани тако да имају способност грађења водоничних веза (хидроксилне, карбоксилне, естарске и карбонилне групе) или да имају ароматично језгро. Као чести комонери у производњи меких контактних сочива, коришћени су: итаконска киселина, акрилна киселина, метакрилна киселина и метил метакрилат. Као комонер који повећава садржај воде у сочивима коришћен је 4-винил пиридин. (Yan, Ramström, 2005; Zhinmin, Craig, 2004)

## 1.8 $UV - Vis$ спектрофотометрија

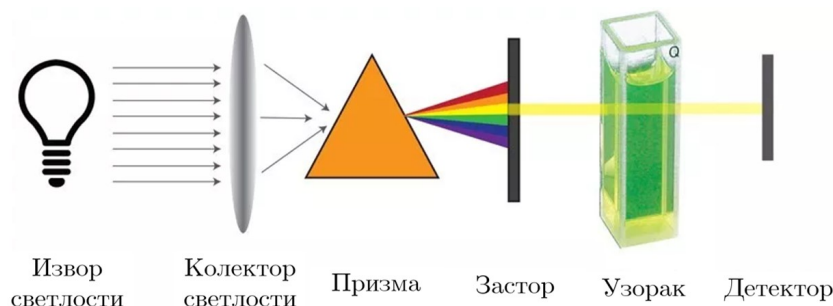
Оптичке инструменталне аналитичке методе заснивају се на интерговању супстанци са електромагнетним зрачењем. Оптичке методе се деле на несектроскопске и сектроскопске, које се деле на апсорпционе и емисионе. Апсорпционе сектроскопске методе се заснивају на мерењу смањења интензитета електромагнетног зрачења након проласка кроз аналит. Постоје различите врсте апсорпционих сектроскопских метода: колориметрија, спектрофотометрија и атомска апсорпциона спектрофотометрија. Код спектрофотометрије мери се однос упадне и пропуштене светлости. Ова величина може се квантификовати кроз апсорбанцију ( $A$ ) или трансмитанцију ( $T$ ):

$$A = -\log \frac{I}{I_0}$$

$$T = \frac{I}{I_0} * 100\%$$

где је  $I_0$  - интензитет упадне светлости и  $I$  - интензитет пропуштене светлости.

*UV – Vis* спектрофотометријом се могу анализирати супстанце које апсорбују светлост на таласним дужинама из видљивог дела спектра и блиске *UV* области.

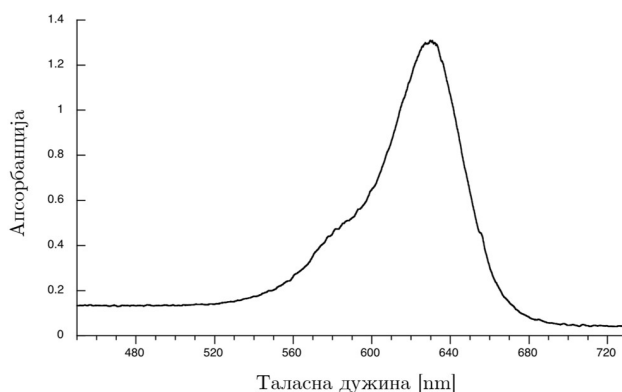


Слика 1.7: Схематски приказ спектрофотометра

Основни делови спектрофотометра (слика 1.7) су извор светлости, колектор, призма или дифракциона решетка, застор, детектор и рачунар. Анализа започиње емитовањем светлости из одговарајућег извора, која се помоћу система сочива усмерава ка призми или дифракционој решетки, где долази до дисперзије светлости. Само светлост одређене таласне дужине пролази кроз отвор на застор. Таласна дужина светлости се може подешавати ротацијом призме или дифракционе решетке. Светлост одређене таласне дужине се усмерава ка кивети са узорком. Детектор потом мери интензитет пропуштене светлости и израчунава се однос пропуштене и упадне светлости. Да би узорак могао да се анализира мора бити прозиран, како би се избегао ефекат дисперзије светлости. Такође, како би се униформисало мерење, оптички пут зрака кроз узорак мора бити константан.

Као резултат анализе *UV – Vis* спектрофотометријом добија се спектар као график зависности апсорбанције анализираниог узорка од таласне дужине на којој је мерење вршено (слика 1.8). На *UV – Vis* спектрима углавном се уочавају пикови, који се називају максимуми апсорпције. На тим таласним дужинама аналит апсорбује највише светлости. Најчешће се користе пластичне или стаклене кивете, али уколико се снимање врши на таласним дужинама из *UV* области спектра, неопходно је да се мерења изводе у кварцној кивети како би се избегла апсорпција светлости од стране саме кивете.

*UV – Vis* спектрофотометрија се може примењивати и за квалитативну и за квантитативну хемијску анализу. Према Ламбер-Беровом закону



Слика 1.8: Пример UV-Vis спектра

(*Lambert-Beer*), апсорбанција ( $A$ ) је директно пропорционална производу оптичког пута светлосног зрака кроз узорак  $b$  и његове концентрације  $C$ . Коефицијент сразмерности назива се екстинкциони коефицијент  $\epsilon_a$ .

$$A = \epsilon_a * b * C.$$

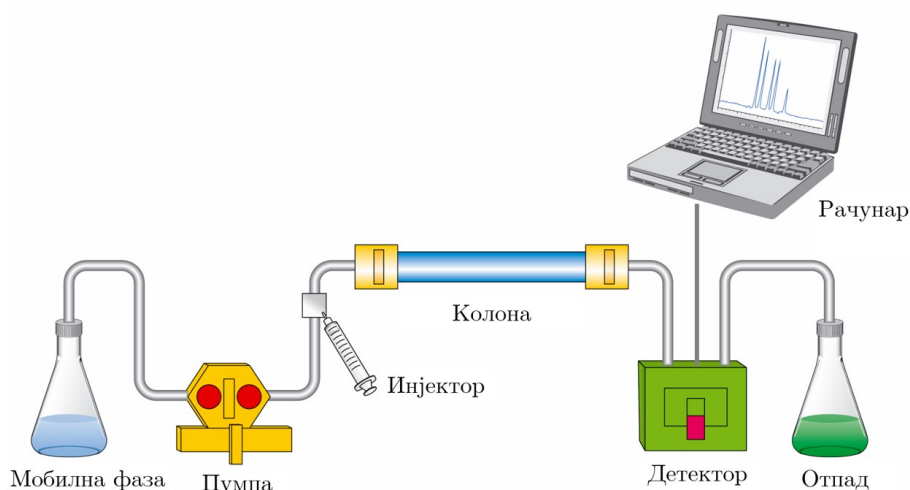
*UV – Vis* спектрофотометрија се може примењивати у сврхе квалитативне анализе тако што се за узорак познате концентрације измери апсорбанција и добијени екстинкциони коефицијент упореди са литературним подацима. Када се *UV – Vis* спектрофотометрија примењује у сврхе квантитативне анализе, неопходна је конструкција калибрационе праве, мерењем апсорбанције раствора познатих концентрација, како би се одредио екстинкциони коефицијент анализата. Потом се измери апсорбанција узорка непознате концентрације и на основу коефицијента правца калибрационе праве израчунава се непозната концентрација. (Clayden et al, 2012; Skoog et al, 2007; Vollhardt, Schore, 2018)

## 1.9 Течна хроматографија високих перформанси (*HPLC*)

Хроматографија подразумева технике раздвајања састојака меша. Данас постоје бројне врсте хроматографских метода. Према стању фаза хроматографија се може поделити на течну, гасну и суперкритичну флуидну хроматографију. Према облику система у коме се изводи, хроматографија се дели на планарну и хроматографију на колони. Течна хроматографија високих перформанси или течна хроматографија под високим притиском (енгл. *High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) је инструментална аналитичка метода која се примењује

## 1.9. Течна хроматографија високих перформанси (*HPLC*) 9

за раздвајање, идентификацију и квантификацију компонената смеше. Компоненте смеше се раздвајају као последица различитих интеракција између супстанци које се анализирају и стационарне фазе у колони.



Слика 1.9: Схематски приказ основне *HPLC* поставке

Принцип раздвајања јесте пумпање смеше која се анализира по веома високим притиском кроз колону испуњену адсорбентом. Адсорбенти су најчешће материјали чије честице имају велику површину. Део смеше који се анализира се уноси у колону кроз коју протиче мобилна фаза. На основу специфичних интеракција између компонената смеше и стационарне фазе долази до разлике у времену задржавања одређене супстанце на колони - ретенционо време. Свака супстанца има карактеристично ретенционо време при одређеним условима извођења хроматографије. Ретенционо време зависи од природе анализата, стационарне фазе, мобилне фазе и притиска у колони. Примена високог притиска омогућава брже спирање супстанци са колоне и убрзава процес раздвајања. Основни делови *HPLC* поставке су резервоари за мобилну фазу и отпад, пумпа, инјектор узорка, колона, детектор и рачунар за читавање резултата (слика 1.9).

Као мобилна фаза могу се користити чисти растварачи, али се чешће користе њихове смеше. Често се примењује вода у комбинацији са органским растварачима, попут метанола и ацетонитрила, али могу се користити и раствори различитих неорганских киселина и соли, као и пуферски раствори. Избор мобилне фазе је веома битан пошто у великој мери утиче на резолуцију хроматографије. Као стационарна фаза користе се адсорбенти велике специфичне површине, како би се омогућио што

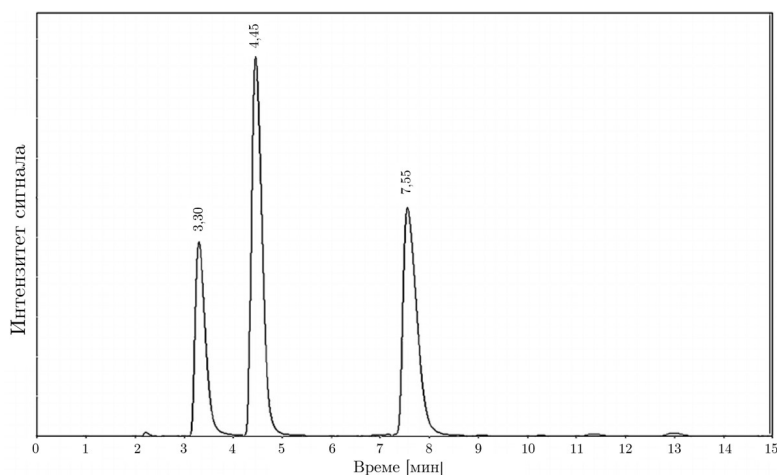


Слика 1.10: Хроматограф на коме је извођена течна хроматографија високих перформанси

већи број интеракција између компонената смеше и стационарне фазе. Често се примењује силика гел, у модификованом или немодификованом облику. У зависности од поларности стационарне и мобилне фазе, разликују се два основна типа течне хроматографије високих перформанси: нормално-фазна и реверзно-фазна хроматографија. Нормално-фазна хроматографија подразумева употребу поларне стационарне фазе и неполарне мобилне фазе, а реверзно-фазна хроматографија подразумева употребу неполарне стационарне фазе и поларне мобилне фазе. У зависности од тога да ли је састав мобилне фазе константан или се са временом мења, елуирање се дели на изократско или градијентно.

За анализу елуираних компоненти смеше која се анализира користе се различити детектори. Они могу бити деструктивни или недеструктивни. Један од деструктивних детектора који се веома често примењује у течној хроматографији јесте масени детектор. Недеструктивни детектори који се често примењују у течној хроматографији су: *UV* детектори са фиксним или променљивим таласним дужинама, флуоресцентни детектори, рефрактометри и хирални детектори. Већина детектора који се користе у хроматографским методама има веома ниске лимите детекције, па се

стога течна хроматографија високих перформанси може примењивати и за одређивање веома ниских концентрација одређених супстанци у њиховом раствору.



Слика 1.11: Пример хроматограма

Као резултат хроматографије добија се хроматограм (слика 1.11), који представља график зависности интензитета сигнала детектора од ретенционог времена. Сваки пик одговара некој компоненти анализираних смеша. У оптималним условима, површина испод пика на хроматограму је директно пропорционална концентрацији анализата. Како би се одредио коефицијент сразмерности површине испод пика и концентрације анализата неопходно је конструисати калибрациону праву, као график зависности површине испод пика од концентрације анализата, за стандардну серију раствора анализата. Како би се постигли оптимални услови за анализу одређене супстанце, неопходно је ускладити све параметре хроматографске методе: састав стационарне и мобилне фазе, притисак, температуру итд. (Clayden et al, 2012; Skoog et al, 2007; Vollhardt, Schore, 2018)

## 1.10 Инфрацрвена спектроскопија - *FTIR*

Инфрацрвена спектроскопија је врста спектроскопије која се бави инфрацрвеним делом спектра електромагнетног зрачења - светлост веће таласне дужине и мање енергије од видљиве светлости. Код инфрацрвене спектроскопије мери се зависност трансмитанције  $T$  од таласног броја  $\bar{\nu}$ . *IR* спектар окарактерисан је апсорпционим максимумом, апсорпционим тракама и "отиском прста" молекула. Користи се углавном за квалитативну анализу хемијских једињења јер омогућава идентификацију

функционалних група. Да би дошло до апсорпције  $IR$  зрачења неопходно је да фреквенција осцилације хемијске везе одговара фреквенцији зрачења и да хемијска веза има својства електричног дипола. Положај трака зависи од фреквенције осцилације хемијских веза, а њихов интензитет од величине промене диполног момента. Осцилације веза описане су Хуковим законом (*Hooke*):

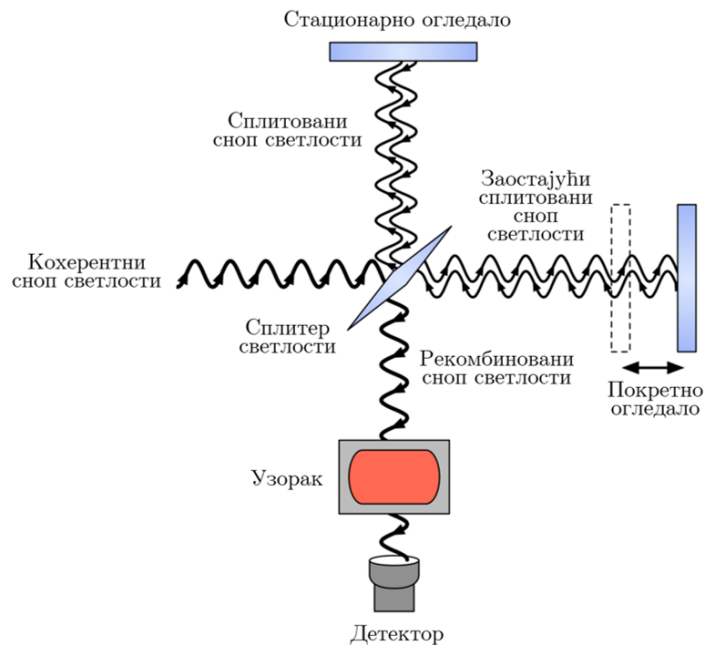
$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K}{\mu}},$$

где је  $\bar{\nu}$  таласни број (реципрочна вредност таласне дужине зрачења),  $K$  константа силе хемијске везе и  $\mu$  редукована маса.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B},$$

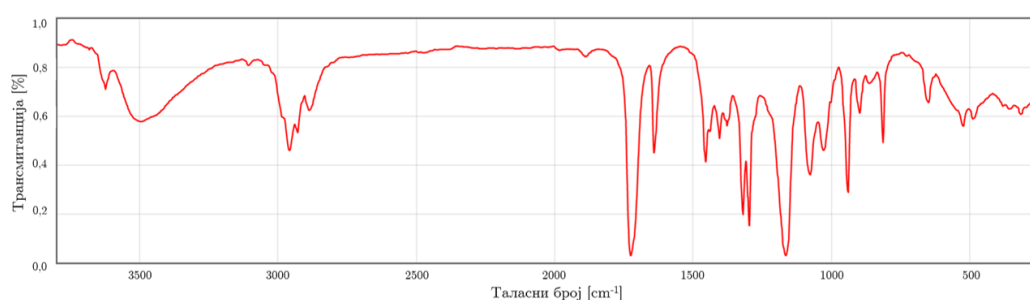
где је  $m_i$  маса  $i$ -тог атома. Најчешће се користи спектрометар са инфрацрвеном Фуријеовом трансформацијом. Делови инфрацрвеног спектроскопа су: извор  $IR$  зрачења, Мајклсонов (*Michelson*) интерферометар, детектор и рачунар. Делови Мајклсоновог интерферометра су (слика 1.12): сплитер светлости (огледало које 50% зрачења пропушта, а 50% зрачења рефлектује), покретно огледало и стационарно огледало.



Слика 1.12: Схематски приказ Мајклсоновог интерферометра



Као резултат анализе помоћу *FTIR*-а добија се *IR* спектар (слика 1.13) на коме се уочавају минимуми трансмисије - траке. Свака трака одговара одређеној осцилацији неке хемијске везе. На основу положаја траке и њеног интензитета може се одредити које функционалне групе су присутне у аналиту. Такође, исте групе могу давати више сигнала због тога што могу осциловати на више различитих начина. На пример, две везе угљеник-водоник могу осциловати на 6 различитих начина: симетрично и асиметрично истезање, савијање, увијање, љуљање и преврћање. (Clayden et al, 2012; Skoog et al, 2007; Vollhardt, Schore, 2018)



Слика 1.13: Пример *IR* спектра

## 1.11 Циљ

**Циљ** овог истраживања била је синтеза молекулски обележених полимера за хлорамфеникол, који би могли да се користе за израду терапеутских меких контактних сочива, као и испитивање утицаја врсте и односа количина мономера на могућност сорпције и отпуштања лека.



## 2

# Материјал и методе

## 2.1 Синтеза хидрогелова

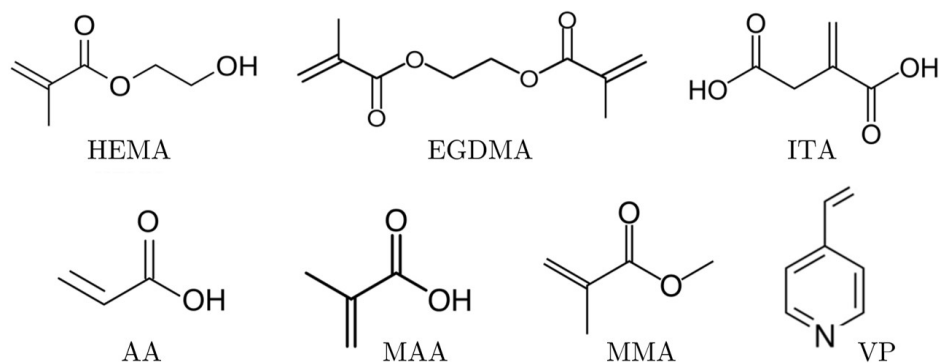
Синтетисано је 6 различитих врста полимера. Хомополимер 2-хидроксиетил метакрилата (HEMA) (Acros Organics, р. а) и његови кополимери са итаконском киселином (ITA) (Acros Organics, р. а), акрилном киселином (AA) (Acros Organics, р. а) и 4-винил пиридин (VP) (Acros Organics, р. а). Као умреживач коришћен је етиленгликол диметакрилат (EGDMA) (Acros Organics, р. а), а као иницијатор коришћен је 2-2'-азобис(изобутиронитрил) (AIBN) (Acros Organics, р. а). У вијалицама запремине 5 mL помешано је 1 mL HEMA ( $8,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$ ), 16  $\mu\text{L}$  EGDMA ( $4,48 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$ ) и 16,8 mg AIBN ( $1,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$ ), одређене количине комомера и хлорамфеникола (CAP) (Acros Organics, р. а) (табела 2.1, слика 2.1). Кроз реакционе смеше је продуван аргон и оне су потом хомогенизоване у ултразвучном купатилу током 10 минута.

Табела 2.1: Количине супстанци додаване у реакционе смеше

Полимер	HEMA [mL]	EGDMA [ $\mu\text{L}$ ]	AA [ $\mu\text{L}$ ]	MMA [ $\mu\text{L}$ ]	ITA [ $\mu\text{L}$ ]	MAA [ $\mu\text{L}$ ]	VP [ $\mu\text{L}$ ]	CAP [mg]	AIBN [mg]
MIP 0	1	16,0	-	-	-	-	-	32,0	16,8
NIP 0	1	16,0	-	-	-	-	-	-	16,8
MIP 1	1	16,0	63,2	-	-	-	-	32,0	16,8
NIP 1	1	16,0	63,2	-	-	-	-	-	16,8
MIP 2	1	16,0	-	98,0	-	-	-	32,0	16,8
NIP 2	1	16,0	-	98,0	-	-	-	-	16,8
MIP 3	1	16,0	-	-	31,0	-	-	32,0	16,8
NIP 3	1	16,0	-	-	31,0	-	-	-	16,8
MIP 4	1	16,0	-	-	-	78,0	-	32,0	16,8
NIP 4	1	16,0	-	-	-	78,0	-	-	16,8
MIP 5	1	16,0	-	-	-	-	99,2	32,0	16,8
NIP 5	1	16,0	-	-	-	-	99,2	-	16,8

Вијалице са реакционим смешама постављене су у уљано купатило на 60-70 °C током 12 сати. Након завршетка полимеризације синтетисани хидрогелови су прво третираны кључалом водом током 1 сата. Сви

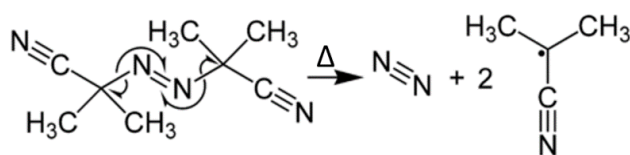
синтетисани хидрогелови испирани су 50 % етанолом током 2 дана. Хидрогелови су чувани потоњени у дестиловану воду како би константно били набубрени.



Слика 2.1: Структурне формуле коришћених мономера и умреживача

## 2.2 Иницијација

2-2'-азо-бис(изобутиронитрил) (AIBN) се често користи као иницијатор приликом синтезе хидрогелова, поготово оних који би могли да се користе као мека контактна сочива. Иницијација је термална, односно под утицајем топлоте. Приликом загревања AIBN долази до издвајања елементарног азота који напушта реакциону смешу и настајања радикала који иницирају полимеризацију (слика 2.2).



Слика 2.2: Термичко разлагање AIBN

## 2.3 Карактеризација полимера

### 2.3.1 IR спектроскопија

Снимљени су инфрацрвени спектри свих синтетисаних хидрогелова, као и чистог HEMA (Perova et al, 1996).

### 2.3.2 Садржај воде

Део сваког синтетисаног хидрогела потпуно је осушен на 70-80 °C и измерена је његова маса ( $m_d$ ), а потом је постављен у дестиловану воду да потпуно набубри и поново му је измерена маса ( $m_s$ ). За све синтетисане хидрогелове одређен је садржај воде према формули (Sintzel et al, 1996):

$$Q = \frac{m_s - m_d}{m_s} * 100\%.$$

### 2.3.3 Пропустљивост кисеоника

За све синтетисане хидрогелове је, на основу садржаја воде, израчуната пропустљивост кисеоника ( $D_k$ ) по формули (Morgan, 1998):

$$D_k = 1,67^{0,0397Q}.$$

## 2.4 Анализа хлорамфеникола

Хлорамфеникол је анализиран помоћу течне хроматографије високих перформанси (*HPLC*) са *DAD* детектором (*DiodeArrayDetector*). Коришћена је колона *HypersilGold*. Параметри методе били су: инјектована запремина 10  $\mu L$ , проток 1  $mL/min$ . Елуент је била смеша фосфатног пуфера (40  $mM$ , рН=3) и метанола у односу 65:35, елуирање је било изократско на 25 °C. Мерења су вршена на таласној дужини 278  $nm$ . Конструисана је калибрациона права за хлорамфеникол, као график зависности површине испод пика на хроматограму од масене концентрације узорка, на основу раствора концентрација 0,001  $mg/mL$ , 0,002  $mg/mL$ , 0,004  $mg/mL$ , 0,005  $mg/mL$ , 0,006  $mg/mL$ , 0,008  $mg/mL$  и 0,010  $mg/mL$ . Стандардна серија раствора хлорамфеникола припремљена је растварањем чврстог хлорамфеникола у *PBS* раствору.

## 2.5 Припрема *PBS* раствора

Фосфатни пуфер физиолошког раствора (*PBS*) је припреман као водени раствор натријум-хлорида (Merck, р. а), калијум-хлорида (Merck, р. а), натријум-хидрогенфосфата (Merck, р. а) и калијум-дихидрогенфосфата (Merck, р. а). Концентрација натријум-хлорида била је 8  $g/L$ , калијум-хлорида 0,2  $g/L$ , натријум-хидрогенфосфата 1,44  $g/L$  и калијум-дихидрогенфосфата 0,24  $g/L$ .

## 2.6 Апсорпција лека

Ради праћења апсорпције лека испрани МИП-ови масе 20 *mg* потапани у 2 *mL* воденог раствора САР концентрације 3,1 *mg/mL*. Узимани су аликвоти од 100  $\mu\text{L}$  у правилним временским интервалима: након 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 и 240 минута, и одређивана је концентрација САР у њима. Количина апсорбованог лека одређивана је као разлика почетне и тренутне концентрације лека у раствору.

## 2.7 Отпуштање лека

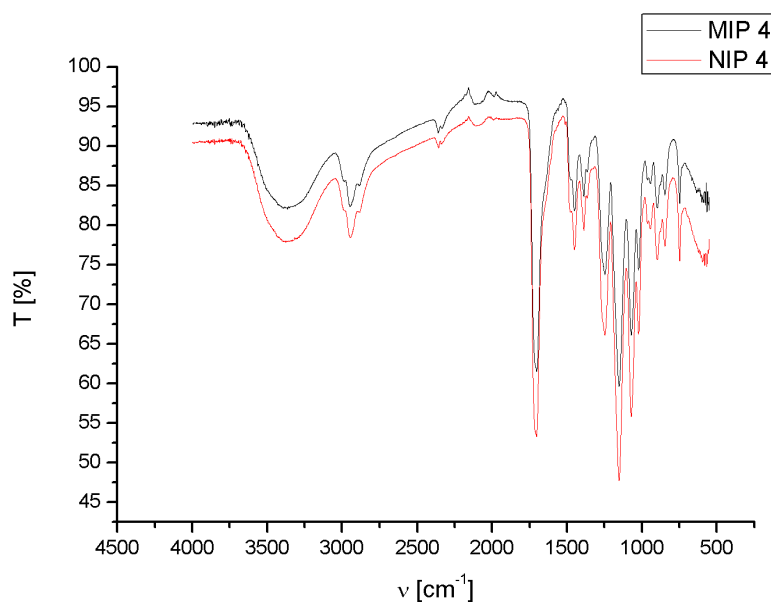
Након испитивања апсорпције лека, полимери су извађени из раствора САР и пажљиво обрисани филтер папиром како би се уклонио вишак раствора. Обрисани полимери су потапани у 2 *mL* *PBS* раствора на 37 °C. У правилним временским интервалима узимани су аликвоти раствора запремине 100  $\mu\text{L}$ , а додавани аликвоти исте запремине *PBS* раствора, како би укупна запремина била константна и што веродостојније симулирала услове у оку. Узорковање је вршено након 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720 и 1440 минута од потапања сочива у *PBS* раствор.

# 3

## Резултати и дискусија

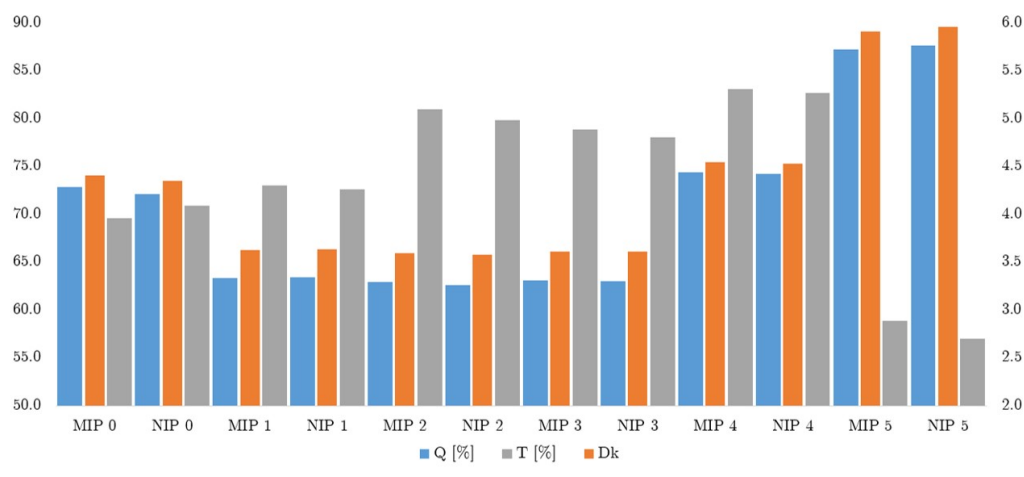
Након 12 сати од почетка полимеризације, реакциона смеша је извађена из вијалица. Добијен је гел који је након третмана кључалом водом набубрео и постао мекан.

На *IR* спектрима синтетисаних полимера (слика 3.1) уочавају се траке на  $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ , која одговара хидроксилним групама НЕМА и киселинских мономера и на  $1780\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$ , која одговара карбонилној групи акрилата и метакрилата.



Слика 3.1: *IR* спектри молекулски обележеног и необележеног кополимера НЕМА са МАА

Уочава се потпуно одсуство траке на  $1680\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ , која одговара двострукој вези у неизреагованим мономерима. То указује на то да су из полимера испирањем успешно уклоњени неизреаговани мономерни. У хидрогеловима који као комономер садрже 4-винил пиридин уочавају се траке на  $3150\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  и  $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ , које одговарају пиридину. Сви синтетисани хидрогелови су потпуно прозирни. Хидрогелови који као комономер садрже 4-винил пиридин су ћилибарне боје, а сви остали хидрогелови су безбојни, што значи да се сви синтетисани хидрогелови, осим оних са 4-винил пиридином, могу примењивати у изради меких контактних сочива јер неће утицати на оптичку јасноћу ока корисника. Садржај воде и пропустљивост кисеоника одређени су за све синтетисане хидрогелове (слика 3.2) и на основу њих се може закључити да ће дифузија кисеоника бити довољна како би око корисника несметано функционисало.

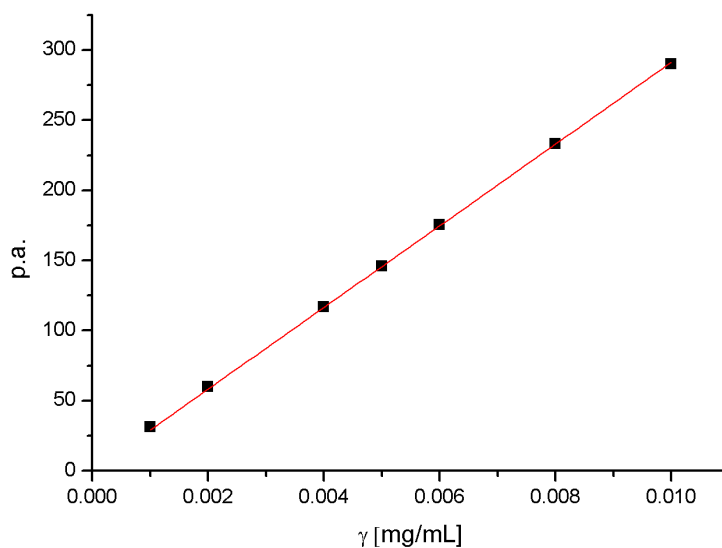


Слика 3.2: Карактеристике синтетисаних хидрогелова

Највећи садржај воде и пропустљивост кисеоника уочени су код MIP 5 и износили су  $87,3\%$  и  $5,9$  респективно, док су најмањи уочени код MIP 2 и износили су  $63,0\%$  и  $3,6$  респективно. Добијени резултати указују на то да MIP 0-4 задовољавају норме материјала за израду меких контактних сочива, што није случај са MIP 5. (Mutlu et al, 2019) Коришћена је иста стандардна серија при свакој анализи хлорамфеникола за конструкцију калибрационе праве и у једном од мерења добијени су резултати који су приказани на слици 3.3. Једначина добијене калибрационе праве је  $y = 29131,707x$ , а коефицијент корелације је  $R^2 = 0,99995$ . С обзиром на висок коефицијент корелације, потврђено је да је стандардна серија раствора одговарајућа за конструкцију калибрационе праве.

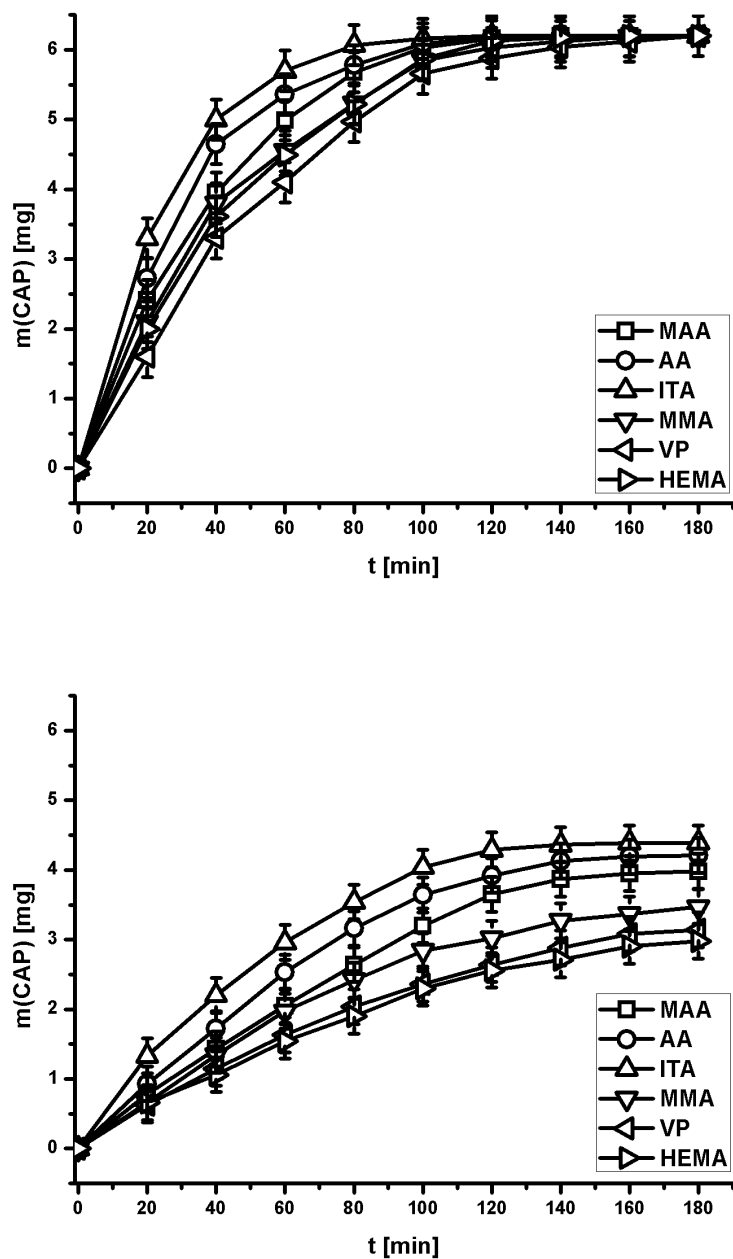


Као коефицијент правца калибрационе праве добијен је однос површине испод пика на хроматограму и масене концентрације САР. На основу добијеног односа рачуната је концентрација САР на основу резултата хроматографије.



Слика 3.3: Калибрациона права за хлорамфеникол

Сви синтетисани молекулски обележени полимери су апсорбовали целокупну количину САР за највише 3 сата од почетка сорпције (слика 3.4). Брзина сорпције САР је највећа код кополимера НЕМА са итаконском киселином, а најмања код кополимера са 4-винил пиридином, што је у складу са претпоставком. Пошто је САР слабо базна супстанца, очекује се да ће боље интераговати са киселим него са базним супстанцама.



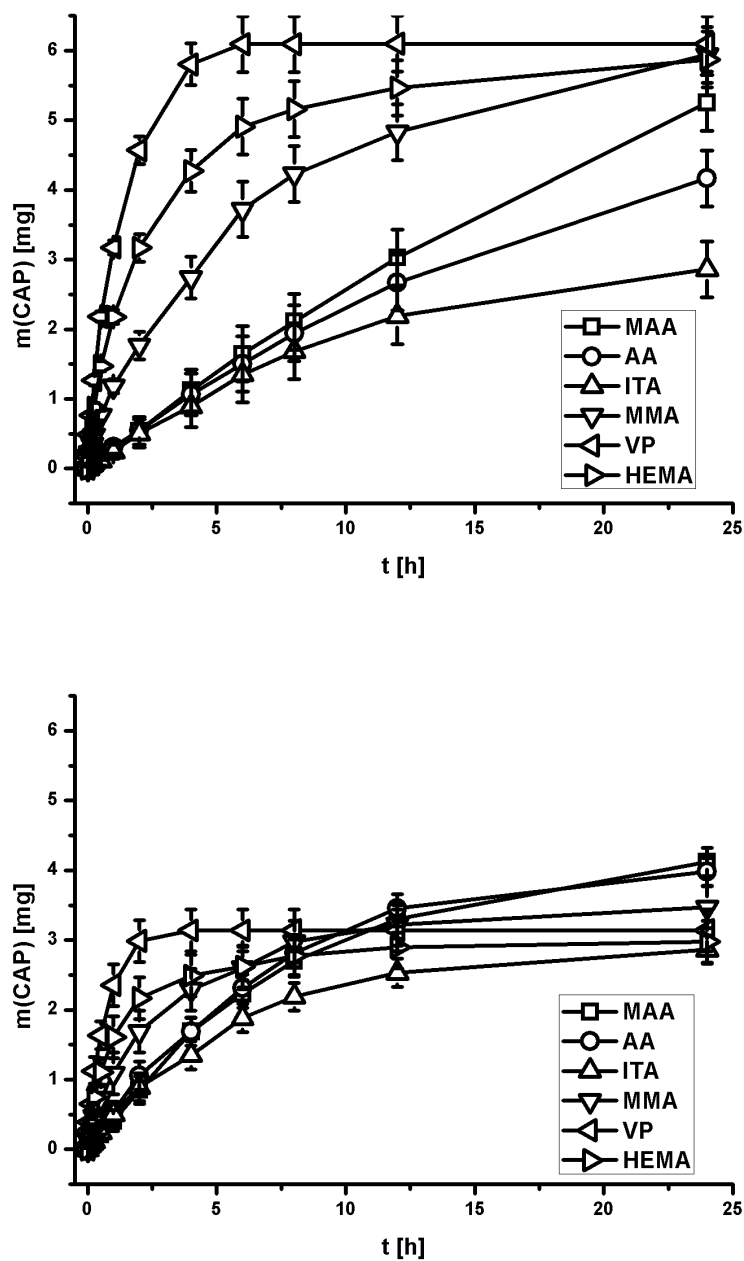
Слика 3.4: Графици зависности масе сорбованог CAP од дужине трајања сорпције за молекулски обележене полимере (лево) и молекулски необележене полимере (десно)

У случају молекулски необележених полимера, добијени су значајно лошији резултати (слика 3.4). Након 3 сата од почетка сорпције, свега 50-70 % целокупне количине САР је сорбовано. Тиме је потврђена хипотеза да ће молекулски обележени полимери имати значајно већи афинитет према САР и самим тим га боље везивати. Ово указује на чињеницу да су молекулски обележени полимери бољи потенцијални материјал за израду терапеутских меких контактних сочива због тога што имају већи капацитет за лек и, самим тим, продужено достављање лека.

На слици 3.5 приказана је кинетика отпуштања САР током 24-часовног периода. Брзина отпуштања је највећа код кополимера НЕМА са 4-винил пиридином, потом код кополимера НЕМА са метил метакрилатом, метакрилном киселином и акрилном киселином, и најмања код кополимера НЕМА са итаконском киселином, што је такође у складу са претпоставком. Пошто САР боље интерагује са киселим мономерима и због тога је спорије код полимера са иселим мономерима. Може се приметити да полимер чистог НЕМА и кополимери НЕМА са VP и MMA превише брзо отпуштају САР и да је целокупна количина отпуштена пре краја 24-часовног периода. Такође, може се приметити и да је брзина отпуштања САР превише мала код кополимера НЕМА са AA и ITA и да је само 60% целокупне количине САР отпуштено током 24-часовног периода. Отпуштање САР код кополимера НЕМА са МАА било је готово линеарно током читавог 24-часовног периода отпуштања. Брзина отпуштања била је приближно  $0,28 \text{ mg/h}$ , што одговара терапеутској дози за хлорамфеникол. С обзиром на линеарно отпуштање САР током читавог 24-часовног периода, може се закључити да би мека контактна сочива направљена од овог хидрогела обезбеђивала довољну количину САР како би се излечио конјунктивитис, али недовољном да би се испољили било какви споредни ефекти.

Резултати за необележене полимере су значајно лошији због тога што је отпуштање било нелинеарно и неодговарајуће брзине за све синтетисане хидрогелове. Ово је још један доказ да молекулско обележавање има значајан утицај на карактеристике хидрогелова.

Пошто су сва мерења вршена у квинтупликату и уочене су веома мале разлике, може се претпоставити да ће се веома слични резултати добити и када би се синтетисани хидрогелови примењивали у комерцијалне сврхе.



Слика 3.5: Графици зависности масе отпуштеног CAP од дужине трајања отпуштања за молекулски обележене полимере (лево) и молекулски необележене полимере (десно)

## 4

# Закључак

Кополимеризација 2-хидроксиетил метакрилата са другим функционалним мономерима и умрежицачима пружа могућност прилагођавања особина полимера за одређене потребе и због тога је нашла велику примену у изради биоматеријала. У овом истраживању синтетисано је шест различитих хидрогелова на бази 2-хидроксиетил метакрилата и испитана је могућност њихове примене у изради меких терапеутских контактних сочива. Пет од њих имају особине материјала погодног за израду меких контактних сочива. Кинетика сорпције и отпуштања хлорамфеникола је испитана за све синтетисане хидрогелове. Показано је да кополимер 2-хидроксиетил метакрилата са метакрилном киселином отпушта хлорамфеникол брзином оптималном за постизање терапеутске дозе лека у оку током дужег периода. Брзина отпуштања била је готово константна током 24-часовног периода, што указује на то да овај хидрогел представља обећавајући материјал за израду терапеутских меких контактних сочива, способних за продужено достављање хлорамфеникола до ока. Истраживање би могло бити настављено *in vivo* испитивањима, у којима би потенцијал овог хидрогела био испитан у живим организмима. Такође, могу се развијати и хидрогелови за доставу других офталмолошких лекова.

## Захвалница

Посебно се захваљујем Анамарији Николетић, студенту Хемијског факултета Универзитета у Београду, на помоћи при експерименталном делу истраживања и одабиру лека, као и на помоћи око обраде резултата. Захваљујем се и професорки и ментору, Аники Влајић, на конструктивним критикама и сугестијама у вези са писањем рада. Такође, захваљујем

се и професоркама Соњи Чукић и Јелени Јевремовић на великој помоћи приликом обраде текста рада.

## Напомена

Овај рад објављен је под називом *Molecularly Imprinted Soft Contact Lenses as Chloramphenicol Delivery Systems* у часопису „Техника”, категорија Нови материјали. Аутори рада су Филип Колџић и Анамарија Николетић. DOI број овог рада је 10.5937/*tehnika*2002141K.

Референца рада:

Koldžić Filip, Nikoletić Anamarija, 2020, Molecularly Imprinted Soft Contact Lenses as Chloramphenicol Delivery Systems, *Tehnika - Novi materijali* 29, 141-147.

# 5

## Референце

- Allison B. C, Applegate B. M, Youngblood J. P, 2007, Hemocompatibility of hydrophilic antimicrobial copolymers of alkylated 4-vinylpyridine, *Biomacromolecules* 8, 2995-2999;
- Alvarez-Lorenzo C, Hiratani H, Gómez-Amoza J. L, Martínez-Pacheco R, Souto C, Concheiro A, 2002, Soft contact lenses capable of sustained delivery of timolol, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91, 2182-2192;
- Alvarez-Lorenzo C, Yañez F, Barreiro-Iglesias R, Concheiro A, 2006, Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery system, *Journal of Controlled Release* 113, 236-244;
- Brock T. D, 1961, Chloramphenicol, *Bacteriol Review* 25, 32-48;
- Choi S. W, Kim J, 2018, Therapeutic contact lenses with polymeric vehicles for ocular drug delivery: A review, *Materials* 11, 1125-1145;
- Clayden J, Greeves N, Warren S, 2012, Organic chemistry, 2<sup>nd</sup> edition *Oxford University Press*;
- Das P. S, Saha P, Contact lenses: A development towards ocular drug delivery systems, *World Journal of Pharmaceutical Research* 6, 207-216;
- Enas M. A, 2015, Hydrogel:Preparation, characterization and applications: A review, *Journal of Advanced Research* 6, 105-121;
- Ferreira L, Vidal M. M, Gil M. H, 2000, Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values, *International Journal of Pharmaceutics* 194, 169-180;

- Goda T, Ishihara K, 2006, Soft contact lens biomaterials from bioinspired phospholipid polymers, *Expert Review of Medical Devices* 3, 167-174;
- Gulsen D, Chauhan A, 2004, Ophthalmic drug delivery through contact lenses, *Physiology and Pharmacology* 45, 2342-2347;
- Hiatani H, Alvarez-Lorenzo C, 2004, The nature of backbone monomers determines the performance of imprinted soft contact lenses as timolol drug delivery systems, *Biomaterials* 25, 1105-1113;
- Hiratani H, Fujiwara A, Tamiya Y, Miyutani Y, Alvarez-Lorenzo C, 2005, Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses, *Biomaterials* 26, 1293-1298;
- Kopeček J, Hydrogels: From soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials, *Journal of Polymer Science* 47, 5929-5946;
- Lebow K. A, Campvell-Burns D, 1998, Understanding the values that describe oxygen flux through a contact lens, *Contact Lens Spectrum*;
- Maulvi F. A, Singhanian S. S, Desai A. R, Shukla M. R, Tank A. S, Ranch K. M, Vyas B. A, Shah D. O, 2018, Contact lenses with dual drug delivery for the treatment of bacterial conjunctivitis, *International Journal of Pharmaceutics* 548, 139-150;
- Morgan P. B, Efron N, 1998, The oxygen performance of contemporary hydrogel contact lenses, *Contact Lenses and Anterior Eye* 21, 3-6;
- Mutlu Z, Es-haghi S. S, Cakmak M, 2019, Recent trends in advanced contact lenses, *Advanced Healthcare Materials* 8, 1-14;
- Nicolson P. C, Vogt J, 2001, Soft contact lens polymers: An evolution, *Biomaterials* 22, 3273-3283;
- Николетић А, 2016, Синтеза молекулски обележених полимера за натријум-сулфацетамид и њихова примена као терапеутска мека контактна сочива, *ИС Петница*;
- Perova T. S, Vij J. K, Xu H, 1996, Fourier transform infrared study of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) PHEMA, *Colloid Polymer Science* 275, 323-332;
- Richards A, Guzman-Cottrill J. A, 2010, Conjunctivitis, *Pediatrics in Review* 31, 196-208;



- 
- Schirhagl R, 2014, Bioapplications for molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry* 86, 250-261;
  - Singh R. B, Ichhpujani P, Thakur S, Jindal S, 2020, Promising therapeutic drug delivery systems for glaucoma: A comprehensive review, *Therapeutic Advances in Ophthalmology* 12, 1-17;
  - Sintzel M. B, Bernatchez S. F, Tabatabay C, Gurny R, 1996, Biomaterials in ophthalmologic drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 42, 358-374;
  - Skoog D. A, Holler F. J, Crouch S. R, 2007, Principles of Instrumental Analysis, 6<sup>th</sup> edition, *Thomson Brooks Cole*;
  - Van der Worp E. C. J, 2008, Corneal desiccation in rigid gas permeable contact lens wear, *Universitaire Pers Maastricht*, 11-21;
  - Vollhardt K. P. C, Schore N. E, 2018, Organic chemistry: Structure and function, 8<sup>th</sup> edition, *Springer*;
  - White C. J, Tieppo A, Byrne M. E, 2011, Controlled drug release from contact lenses: A comprehensive review from 1965-present, *Journal of Drug Delivery: Science and Technology* 21, 369-384;
  - Xinming L, Yingde C, Lloyd A. W, Mikhalovsky S. V, Sandeman S. R, Howel C. A, Liewen L, 2008, Polymeric hydrogels for novel contact lens - based ophthalmic drug delivery systems: A review, *Contact Lens Anterior Eye* 31, 57-64;
  - Yan M, Ramström O, 2005, Molecularly imprinted materials: Science and technology, *Marcel Dekker*, 1-12;
  - Zhinmin Q, Craig A, 2004, Potentiometric determination of acid dissociation constants ( $pK_a$ ) for human and veterinary antibiotics, *Water Research* 38, 2874-2890.