

Piotr OWCZARZ, Patryk ZIÓLKOWSKI, Marek DZIUBIŃSKI

e-mail: piotr.owczarz@p.lodz.pl

Katedra Inżynierii Chemicznej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Pomiar potencjału zeta jako metoda wyznaczania punktu przemiany fazowej zol-żel dla układów chitozanowych

Wstęp

W latach 80. ubiegłego wieku rozpoczęto badania związane ze strukturą, właściwościami oraz zastosowaniem chitozanu, pochodną chityny. Chitozan jest polisacharydem trudno rozpuszczalnym w wodzie. Jako rozpuszczalnik stosuje się niskostężone roztwory kwasów. W środowisku kwaśnym jon H^+ zostaje przyłączony do grupy $-NH_2$ w pierścieniu piranozowym. Powoduje to zmianę właściwości chitozanu z hydrofobowych na hydrofilowe i wytworzenie układu koloidalnego, w którym łańcuchy polimeru pozostają zdyspergowane w ośrodku ciągłym – roztworze kwasu. Zgodnie z podziałem, uwzględniającym wykładnik równania *Marka-Houwinka*, w roztworach kwaśnych cząsteczki chitozanu przyjmują konfigurację od sztywnej nieprzenikliwej kuli (w słabych kwasach) do *kłębka gaussowskiego* ze swobodnym przepływem rozpuszczalnika (w mocnych kwasach). Tak wytworzony układ koloidalny jest wrażliwy na zmiany temperatury i/lub *pH*. Pod wpływem wzrostu temperatury (w warunkach stałego *pH*) układ podlega przemianie fazowej zol-żel. Temperatura punktu tej przemiany jest istotnym parametrem inteligentnych układów uwalniania leków. Układy takie powinny wykazywać właściwości charakterystyczne dla zoli w momencie ich dozowania do organizmu ludzkiego, a po przekroczeniu fizjologicznej temperatury $37^\circ C$ tworzyć żel. Substancje lecznicze, dodane do roztworu, są blokowane w strukturze powstałej sieci polimerowej i stopniowo uwalniane w organizmie człowieka.

Mechanizm formowania się żeli z roztworów soli chitozanowych w obecności disodowego β -glicerofosforanu (β -GP) jest w literaturze tematem dyskusji [*Chenite i in.*, 2006; *Filion i in.*, 2007; *Lavertu i in.*, 2008; *Qiu i in.*, 2011]. Podejście *Lavertu i in.*[2008] oraz *Filiona i in.*[2007] wydaje się być dość interesujące. Sugerują oni tworzenie żelu na skutek transportu protonów H^+ z grup aminowych do cząsteczek β -GP. Wykazali znaczący spadek stałej dysocjacji (*pKa*) chitozanu wraz ze wzrostem temperatury. Nie stwierdzili natomiast wpływu wzrostu temperatury na *pKa* disodowego β -glicerofosforanu (β -GP). Wg autorów redukcja *pKa* chitozanu wywołana dostarczoną energią cieplną powoduje uwolnienie protonów z cząsteczki chitozanu ($-NH_3^+ \leftrightarrow -NH_2 + H^+$), z kolei niewrażliwy na temperaturę *pKa* disodowego β -glicerofosforanu powoduje, że związek ten jest w stanie przejąć uwolnione protony przez ujemnie naładowaną grupę fosforanową. Efektem neutralizacji dodatniego ładunku cząsteczki chitozanu jest zanik odpychających sił elektrostatycznych. Dominują siły przyciągania między cząstkami polimeru i tworzy się sztywny układ przestrzenny.

Trwałość układu koloidalnego, jakim jest roztwór soli chitozanowych w rozcieńczonych kwasach, zależy od obecności ładunku powierzchniowego znajdującego się na powierzchni cząstki. Pochodzenie ładunku powierzchniowego jest zależne od rodzaju cząstek oraz otaczającego medium. Powstający ładunek powierzchniowy jest odpowiedzialny za wzrost stężenia przeciwnie naładowanych jonów w pobliżu powierzchni cząstki. Na granicy zetknięcia się cząstki koloidalnej z roztworem powstaje podwójna warstwa elektryczna, która wywołana jest istnieniem różnicy potencjałów między fazami. Warstwa ta składa się z powłoki wewnętrznej zwanej absorpcyjną, która ściśle przylega do powierzchni zewnętrznej, na której znajduje się warstwa przeciwnie naładowanych jonów. Pomiędzy warstwą adsorpcyjną (nieruchomą częścią warstwy podwójnej) a dyfuzyjną (ruchomą częścią warstwy podwójnej) występuje potencjał elektrokinetyczny nazywany potencjałem zeta. Jako graniczną wartość określającą stabilność dyspersji przyjmuje się około ± 30 mV. Punkt, dla którego potencjał zeta przyjmuje wartość zero nazywany jest punktem izoelektrycznym lub punktem przemiany fazowej.

Ruch naładowanych jonów poruszających się w ośrodku dyspersyjnym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego nazywa się elektroforezą. Szybkość poruszania się jonów zależy od natężenia pola, stałej

dielektrycznej, potencjału zeta oraz lepkości ośrodka. Ruch naładowanych cząstek koloidalnych jest taki sam jak jonów w roztworze, dlatego można go badać w ten sam sposób. Ruchliwość cząstek można wyrazić równaniem:

$$v = \frac{CXD\xi}{\eta} \quad (1)$$

gdzie:

C – stała, której wartość zależy od wielkości i kształtu cząstek,*D* – stała dielektryczna ośrodka dyspersyjnego,*X* – natężenie pola elektrycznego, ξ – potencjał elektrokinetyczny, η – lepkość ośrodka

W literaturze przedmiotu podstawowym, opisywanym sposobem wyznaczania temperatury przemiany fazowej zol – żel dla układów chitozanowych są pomiary właściwości reologicznych wywołanych zmianą temperatury. Najczęściej wykonywane są pomiary rotacyjne lub oscylacyjne (ze stałymi parametrami odkształcenia mechanicznego) w czasie wzrostu temperatury. Pomiary takie mogą być obciążone błędem spowodowanym deformacją powstającej struktury przestrzennej polimeru pod wpływem ścinania próbki.

Celem pracy było zaproponowanie metody pomiaru temperatury punktu przemiany fazowej (dla układów nisko stężonych soli chitozanowych) wykorzystującej pomiary zmian potencjału zeta i porównanie otrzymanych wyników z klasyczną metodą charakteryzującą przemianę zol-żel układów koloidalnych poprzez pomiary zmian właściwości reologicznych wywołanych zmianą temperatury.

Badania doświadczalne

Medium badawcze

W pracy badaniom wyznaczania temperatury przemiany fazowej zol-żel poddano 0,1% roztwór chitozanu *Shrimp* o masie cząsteczkowej 862 kDa i stopniu deacetylacji wynoszącym 83,4 DD. Rozpuszczalnikiem był 0,1 M roztwór kwasu chlorowodorowego. Jako substancji sieciującej użyto disodowego β -glicerofosforanu (β -GP) w ilości stechiometrycznej.

Metodyka pomiarów

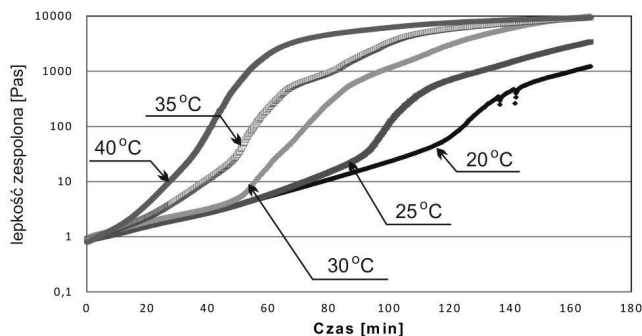
Pomiar właściwości reologicznych roztworów chitozanowych przeprowadzono za pomocą reometru rotacyjnego *Anton Paar Physica MR 301* w układzie pomiarowym stożek-płytką. Zastosowano stożek o średnicy 50 mm i kącie nachylenia 1° . Płytką układu pomiarowego wyposażoną była w układ regulacji temperatury – ogniwo *Peltiera*. Układ ten pozwalała na dokładną regulację temperatury i umożliwienia sterowania szybkością nagrzewania/chłodzenia badanej próbki. Roztwór soli chitozanu umieszczano w temperaturze $4^\circ C$ w układzie pomiarowym reometru. Następnie próbkę podgrzewano do temperatury $20^\circ C$ z szybkością 9 K/s. W warunkach stałej temperatury dokonywano pomiaru właściwości reologicznych, wyznaczając przebiegi krzywych lepkości zespolonej oraz modułów zachowawczego i stratności. W kolejnych pomiarach próbkę podgrzewano do temperatur 25, 30, 35 i $40^\circ C$ (przy zachowaniu szybkości nagrzewania 9 K/s), powtarzając pomiary w każdej z temperatur.

Do wyznaczenia potencjału zeta wykorzystano *Zetasizer Nano ZS* firmy *Malvern*. Jednym z elementów układu była U-kształtna celka kapilarna z elektrodami na każdym z jej końców, do których przykładano napięcie. Cząsteczki poruszały się w stronę elektrody o przeciwnym ładunku. Zastosowanie spolaryzowanego światła laserowego i pomiaru prędkości na podstawie zjawiska *Dopplera LDV (Laser Doppler Velocimetry)* dzięki metodzie *M3-PALS* pozwala śledzić ruch naładowanej cząsteczki w kapilarze. Wyznaczano prędkość i kierunek ruchu cząstki. Znając właściwości fizyczne badanej próbki oraz prędkość przemiesz-

czania się cząstek wyznaczono wartość potencjału zeta z równ. (1). Pomiar wykonano dla tej samej próbki termostatując ją w temperaturach od 20 do 40°C przy skokowych zmianach temperatury co 2 stopnie. Wykonano po pięć pomiarów potencjału zeta dla każdej z temperatur.

Wyniki i dyskusja

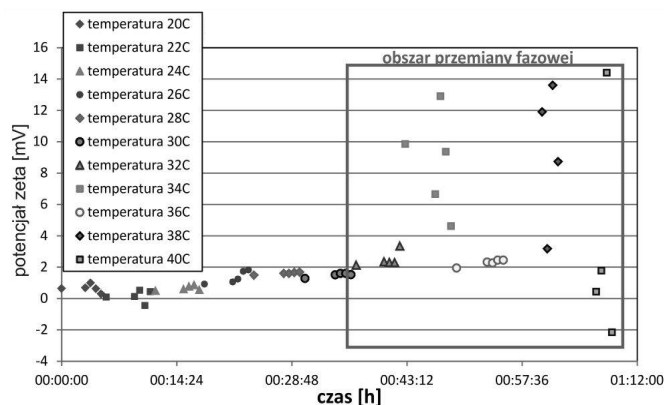
Wyniki pomiarów uzyskane w warunkach termostatowania próbki w różnych temperaturach posłużyły wyznaczeniu zmian lepkości zespolonej. Przebiegi zmian lepkości zespolonej w funkcji czasu przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Zmiany lepkości zespolonej w funkcji czasu podczas termostatowania próbki

Badania reologiczne układu koloidalnego przeprowadzone podczas termostatowania próbki w zakresie temperatur od 20 do 40°C, przy zachowaniu identycznych parametrów pomiarów oscylacyjnych, wykazały, że układ taki charakteryzuje się przemianą fazową w każdej z badanych temperatur. Z przedstawionych na wykresach (Rys. 1) przebiegach krzywych lepkości zespolonej widać, że każda z krzywych posiada trzy zakresy zmian tej wielkości. Łagodny wzrost w początkowej fazie termostatowania – odpowiadający powolnej przemianie z cieczy do struktury *miękkiej gumi*. Następnie występuje zakres raptownego wzrostu wartości lepkości zespolonej. Punkt przegięcia krzywej odpowiada punktowi przemiany fazowej zol-żel w danej temperaturze. Powstaje w pełni rozwinięta struktura szklista żelu. Końcowy przebieg krzywych to obszar prawie stałej wartości lepkości zespolonej – odpowiedź w pełni rozwiniętej struktury szklistej na deformacje mechaniczne (szczególnie jest to widoczne na przebiegach krzywych uzyskanych w wyższych temperaturach). Czas wystąpienia kolejnych przemian struktury badanego medium zależy od temperatury, im wyższa temperatura tym szybsza przemiana fazowa. Jednak im wyższa temperatura, w której wykonane zostały badania, tym czas potrzebny na osiągnięcie punktu przemiany fazowej jest krótszy. Wzrost temperatury powoduje, zgodnie z tezą zaproponowaną przez Lavertu i in. [2008] oraz Filiona i in. [2007] spadek stałej dysocjacji (pK_a) dla grup aminowych chitozanu, zmianę ładunku powierzchniowego cząsteczki. Układ staje się hydrofobowy i powstają wiązania pomiędzy cząsteczkami polimeru. Dodatkowo wzrost temperatury powoduje obniżenie lepkości ośrodka rozpraszającego, wzrasta szybkość dyfuzji cząstek polimeru.

Na rys. 2 przedstawiono zmiany wartości potencjału zeta w funkcji czasu dla różnych temperatur badanego roztworu soli chitozanowych.

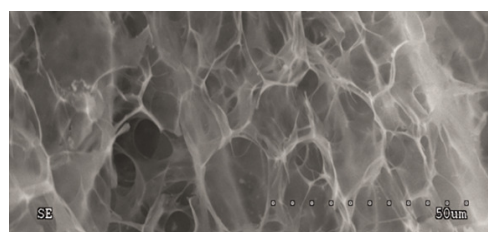


Rys. 2. Przebieg zmian wartości potencjału zeta w czasie podczas ogrzewania próbki

Wyniki pomiarów, w zakresie temperatur od 20 do 40°C, wykazują podobny przebieg zmian tego parametru do wyników pomiarów reologicznych. Można zauważyć, że w zakresie temperatur 20±32°C następuje wolny wzrost potencjału zeta a rozrzut punktów dla określonej temperatury jest nieznaczny. Zakres ten odpowiada stopniowemu oderwaniu protonów z grup aminowych cząsteczki chitozanu, spadek stopnia dysocjacji (pK_a) wraz ze wzrostem temperatury. Gdy badana próbka osiąga temperaturę 34°C następuje gwałtowny wzrost potencjału elektrokinetycznego. Opowiada to powstaniu struktury żelu, raptownemu wzrostowi lepkości zespolonej wykazanemu podczas pomiarów reologicznych. W zakresie temperatur 34-40°C następuje tworzenie żelu.

Duży rozrzut punktów pomiarowych, widoczny na wykresie, spowodowany jest zastosowaniem narzędziem pomiarowym. Wiązka laserowa przechodząca przez próbkę trafia w węzły utworzonej sieci polimerowej lub w przestrzenie pomiędzy łańcuchami polimeru – porównaj z obrazem struktury uformowanego żelu chitozanowego uzyskanego za pomocą mikroskopu sił atomowych SEM (Rys. 3).

W przypadku kiedy wiązka trafia w wolne przestrzenie mierzona jest dyfuzja cząstek rozpuszczalnika wypełniającego wolne przestrzenie sieci polimerowej.



Rys. 3. Obraz w pełni uformowanej struktury żelu chitozanowego, po suszeniu liofilizacyjnym próbki uzyskany z mikroskopu sił atomowych SEM.

Podsumowanie i wnioski

Z przedstawionych w pracy zmian właściwości reologicznych i potencjału zeta podczas termostatowania próbki roztworu soli chitozanu z dodatkiem β -glicerofosforanu disodu widać, że obie metody pomiarów pozwalają określić temperaturę początku procesu przemiany fazowej zol - żel.

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów reologicznych stwierdzono, że położenie punktu przemiany fazowej nie jest stałe. Zależy ono od aktualnej wartości stopnia dysocjacji (pK_a) próbki i lepkości fazy rozpraszającej, a więc od temperatury.

Zmierzone wartości potencjału zeta odzwierciedlają zmiany stopnia dysocjacji chitozanu. Pomiar potencjału zeta w zakresie przemian w fazie ciekłej, przed przemianą fazową zol-żel dobrze opisują występujące zjawiska. Jednak w obszarze tworzenia się żelu, pomiary te obciążone są błędem wynikającym ze specyfiki próbki – brak jej homogeniczności.

Przeprowadzone pomiary potwierdzają przyjęty mechanizm przemiany fazowej zaproponowany przez Lavertu i Filiona.

LITERATURA

- Chenite A., Gori S., Shive M., Desrosiers E., Buschmann M.D., (2006). Monolithic gelation of chitosan solutions via enzymatic hydrolysis of urea. *Carbohydr Polym.*, 64, 3, 419-424. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.12.010
- Filion D., Lavertu M., Buschmann M.D., (2007). Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. *Biomacromolecules*, 8, 3224-3234, DOI: 10.1021/bm700520m
- Lavertu M., Filion D., Buschmann M.D., (2008). Heat-induced transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate produces chitosan precipitation and gelation. *Biomacromolecules*, 9, 640-650. DOI: 10.1021/bm700745d
- Qiu X., Yang Y., Wang L., Lu S., Shaoa Z., Chen X., (2011). Synergistic interactions during thermosensitive chitosan- β -glycerophosphate hydrogel formation. *RSC Advances* 2, 1, 282-289, DOI: 10.1039/C1RA00149C

Praca została wykonana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki pt. "Badanie kinetyki przemiany fazowej układów chitozanowych wrażliwych na wzrost temperatury" – UMO-2014/15/B/ST8/02512.