

Ćwiczenie nr XVII

OTRZYMYWANIE LIPOSOMÓW. WPŁYW RODZAJU ELEKTROLITU NA STABILNOŚĆ LIPOSOMÓW

I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest otrzymanie zawiesiny liposomów, ich charakterystyka i ocena stabilności w obecności elektrolitu.

II. Zagadnienia wprowadzające

1. Charakterystyka fosfolipidów. Błony biologiczne.
2. Metody otrzymywania liposomów.
3. Podział i właściwości liposomów.
4. Zastosowanie liposomów.
5. Charakterystyka koloidów. Metoda nefelometryczna.

Literatura obowiązuująca:

1. A. Basiński, *Zarys fizykochemii koloidów*, PWN Warszawa, 1957, str. 9–74.
2. A. Kozubek, A.F. Sikorski, J. Szopa, *Molekularna organizacja komórki II. Lipidy, liposomy i błony biologiczne*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1996.
3. A. Kozubek, *Wstęp do technologii liposomowej*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2004.
4. www.portal.wsiz.rzeszow.pl
5. H. Sonntag, *Koloidy*, PWN Warszawa, 1982.
6. E. T. Dutkiewicz, *Fizykochemia powierzchni*, WNT Warszawa, 1998, str. 137–208.
7. W. Malinka, *Zarys chemii kosmetycznej*, Volumed Wrocław, 1999, str. 111–175.
8. A. Marzec, *Chemia kosmetyków*, Dom Organizatora Toruń, 2005, str. 99–107, 204–205, 218–229, 239–254.
9. <http://chem.uw.edu.pl/people>

III. Część teoretyczna

III. 1. Charakterystyka fosfolipidów. Błony biologiczne

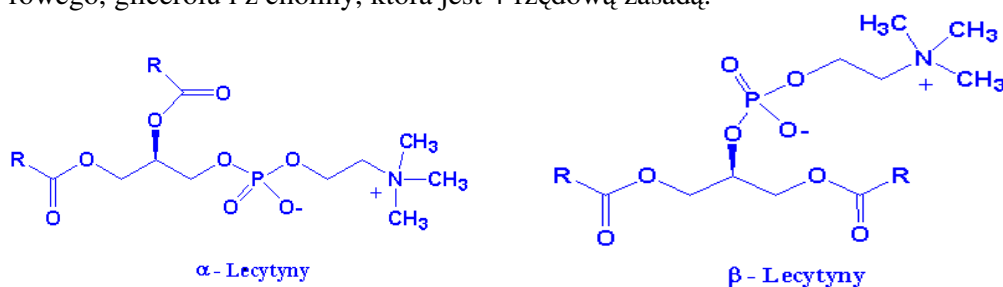
Cząsteczki fosfolipidów składają się z rdzenia zbudowanego z glicerolu lub sfingozyny, połączonego wiązaniem estrowym z kwasem fosforowym i z dwoma kwasami tłuszczowymi. Kwas fosforowy występujący w tych cząsteczkach jest połączony wiązaniem estrowym nie tylko z rdzeniem, ale także z innym alkoholem. Kwasy tłuszczowe połączone z rdzeniem stanowią część hydrofobową, podczas gdy charakter hydrofilowy, umożliwiający kontakt ze środowiskiem, determinowany jest przez pozostałą część cząsteczki, którą jest polarna „głowa”. Część polarna złożona jest z grupy fosforanowej połączonej wiązaniem estrowym z innym polarnym związkiem, którym jest jeden z następujących alkoholi: cholina (trójmetylowa pochodna etanoloaminy), seryna, etanoloamina, inozytol lub glicerol [1–3].

Fosfolipidy, których rdzeń składa się z glicerolu nazywają się **fosfoglicerydami**. Związek zbudowany z glicerolu zestryfikowanego przy atomach węgla C-1 oraz C-2 grupami karboksylowymi (pochodzącymi z dwu cząsteczek kwasów tłuszczowych) a przy atomie C-3 kwasem fosforowym nazywany jest **fosfatydem** (lub **kwasem fosfatydowym**). Pochodne fosfatydu stanowią większość fosfolipidów. Pochodne tego związku powstają dzięki utworzeniu wiązań estrowych pomiędzy fosfatydem i alkoholem, np. choliną jak ma to miejsce w fosfatydylocholinie [1–3].

Fosfolipidy to podstawowe składniki większości biomembran, zarówno błon dzielących całe komórki, jak i dzielących komórki na wewnętrzne przedziały. Powierzchnia błon komórkowych utworzona jest przez hydrofilowe „głowy”, zaś hydrofobowe „ogony” połączone z apolarnymi elementami innych lipidów są skierowane w kierunku wnętrza dwuwarstwy. Do grupy fosfolipidów są zaliczane: lecytyny, serynofosfatydy, fosfoinozyty i kefaliny [1–3].

III.1.1. Charakterystyka lecytyny

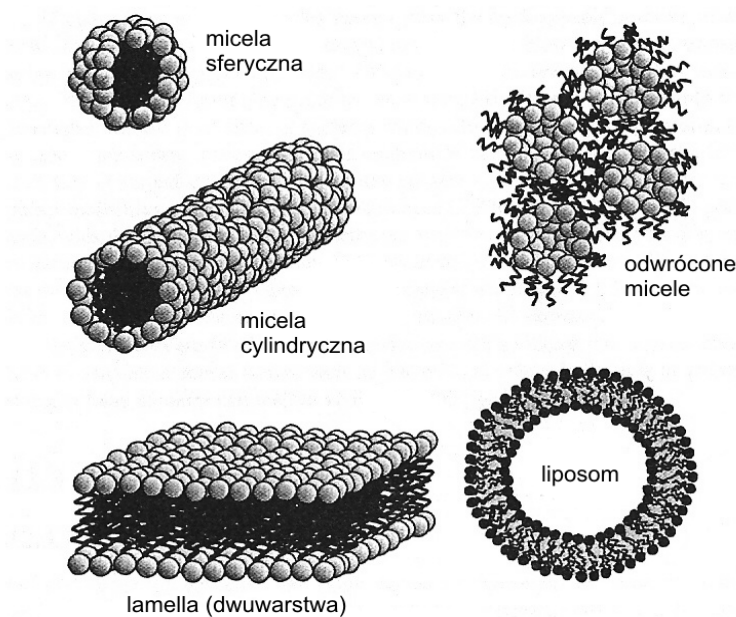
Fosfatydylocholina (czyli lecytyna) jest zbudowana z kwasów tłuszczowych, kwasu fosforowego, glicerolu i z choliny, która jest 4-rzędową zasadą.



Rys. 1. Struktura lecytyny [4].

Fosfatydylocholina jest cząsteczką o charakterze amfifilowym. Dwa hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych są równoległe względem siebie, natomiast hydrofilowa reszta cząsteczki zwrócona jest w przeciwnym kierunku. W cząsteczkach lecytyny grupy trimetyloamionowe są oddzielone od grup fosforanowych dwoma grupami metylenowymi. Z tego powodu fosfatydylocholina może występować w postaci dwóch form jonowych: z maksymalnym i z minimalnym rozkładem ładunków. Te dwie odrębne struktury jonowe mają duży wpływ na właściwości lecytyny, a zwłaszcza na jej tendencję do pokrywania powierzchni i na jej zdolność do stabilizowania układów [1–3].

Lecytyna jest naturalnym emulgatorem koloidalnym. Jej rola w stabilizowaniu emulsji polega w mniejszym stopniu na obniżaniu napięcia powierzchniowego, a w większym na otaczaniu substancji zdyspergowanych przez warstwy ochronne. Lecytyna jest zaliczana do biosurfaktantów, chociaż niektóre właściwości odróżniają ją od typowych surfaktantów. Przy niskich stężeniach surfaktanty mają tendencję do tworzenia warstw monomolekularnych na swobodnej powierzchni wody. Warstwy monomolekularne powstają w wyniku oddziaływań odpychających pomiędzy częściami hydrofobowymi cząsteczek a fazą wodną, przy czym części hydrofilowe surfaktantów mają skłonność do kierowania się w stronę fazy wodnej. Po przekroczeniu pewnego stężenia tzw. krytycznego stężenia micelizacji (CMC) surfaktanty tworzą w środowisku wodnym micelle. **Micelle** są to agregaty amfifilowych cząstek ułożonych w ten sposób, że części apolarne tworzą wnętrze, natomiast części polarne stanowią powierzchnię agregatu. Micelle tworzą różne kształty począwszy od najczęściej spotykanych miceli sferycznych po elipsoidalne i cylindryczne układy dwuwymiarowe tzw. **biwarstwy i liposomy** [5–8].



Rys. 2. Struktury asocjacyjne surfaktantów [9].

Ze względu na budowę lecytyna ma tendencję do tworzenia w środowisku wodnym podwójnej warstwy lipidowej (czyli warstwy bimolekularnej), której powstanie jest bardziej uprzywilejowane, niż powstanie innego rodzaju micel. Jest to spowodowane amfifilowym charakterem, którego miarą jest równowaga hydrofilowo-lipofilowa (HLB) oraz istnieniem w cząsteczce DPPC dwóch długich łańcuchów kwasów tłuszczowych, których objętość jest zbyt duża, by mogły się one zmieścić we wnętrzu miceli [1–3].

Równowaga hydrofilowo-lipofilowa HLB świadczy o funkcjonalności związku powierzchniowo czynnego na granicy faz. HLB wiąże właściwości fizykochemiczne związków amfifilowych z ich działaniem emulgującym. Wartość HLB oblicza się przez przypisanie wszystkim grupom funkcyjnym w cząsteczce pewnych liczb, a następnie zsumowanie wartości odpowiadających grupom hydrofilowym i lipofilowym zgodnie z zależnością: $HLB = \Sigma W + 7$.

Wartości mieszczące się w granicach od 3 do 6 wskazują na dobry emulgator typu woda w oleju. HLB pomiędzy 7 a 9 świadczą o dobrych właściwościach zwilżających. Natomiast wartości HLB od 10 do 18 wskazują na doby emulgator typu olej w wodzie. DPPC ma wysoką wartość HLB. W określeniu stabilności układu liczba HLB emulgatora odgrywa ważną rolę, jednakże w celu ścisłego poznania czasu życia układu niezbędna jest dokładna znajomość także składu i struktury poszczególnych faz [5–8].

Siłą napędową powstania warstwy bimolekularnej jest tzw. oddziaływanie hydrofobowe. Mniejsze znaczenie mają przyciągające siły van der Waalsa występujące pomiędzy apolarnymi łańcuchami kwasów tłuszczowych oraz oddziaływania wodorowe i elektrostatyczne występujące pomiędzy fazą wodną i częściami polarnymi cząsteczek DPPC. Podwójna warstwa lipidowa zbudowana z lecytyny DPPC, która posiada długie łańcuchy węglowodorowe, stanowi nieprzenikalną barierę dla jonów i wody [1-3].

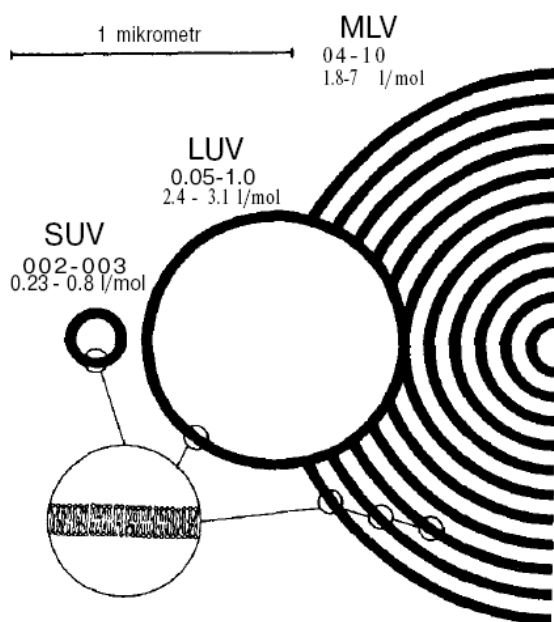
Najważniejsze cechy dwuwarstw lipidowych nadające im niepowtarzalne właściwości fizykochemiczne to: półprzepuszczalność, płynność membran, mała grubość, warstwowa budowa oraz zdolność do samoorganizacji w środowisku wodnym. Grubość membran lipidowych jest bardzo mała i zawiera się w przedziale od 4 do 13 nm. Czyste dwuwarstwy lipidowe są dobrymi izolatorami elektrycznymi. Półprzepuszczalność biwarstw, z których zbudowane są błony biologiczne jest niezbędna dla istnienia życia. Półprzepuszczalność pozwala na: transportowanie substancji odżywczych do komórek, wydalanie zbędnych produktów przemiany materii, przekazywanie sygnałów i transport jonów. Transport substancji przez dwuwarstwę lipidową może odbywać się na kilka sposobów: przepływ substancji może być bierny tzn. transport w dół gradientu elektrochemicznego substancji lub aktywny przy zastosowaniu układu transportującego, do którego dostarczana jest energia. Taki transport odbywa się w kierunku przeciwnym do gradientu elektrochemicznego. Jony organiczne o dużych rozmiarach są zdolne do dyfuzji przez membrany lipidowe. Natomiast błony są nieprzepuszczalne dla małych jonów. Małe jony by móc się przedostać przez dwuwarstwę lipidową łączą się ze specjalnymi substancjami (jonoforami) tworząc kompleksy. W układach wodnych następuje zginanie płaskiej warstwy bimolekularnej, jest to spowodowane skłonnością do

zmniejszania całkowitej energii brzegowej. Ta tendencja do minimalizowania energii prowadzi do powstania pęcherzyków lipidowych (liposomów) [1–3, 5–8].

III. 1.2. Podział i właściwości liposomów

Fosfolipidowe struktury pęcherzykowe (liposomy) można podzielić na następujące klasy:

1. małe jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe (SUV) o wielkości 25–100 nm,
2. duże jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe (LUV) o wielkości 100–400 nm,
3. wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe (MLV) o wielkości od 200 nm do kilku mikronów,
4. pęcherzyki ogromne (giant) o wielkości powyżej 1 mikrona.



Rys. 3. Główne typy liposomów i ich podstawowe parametry [2].

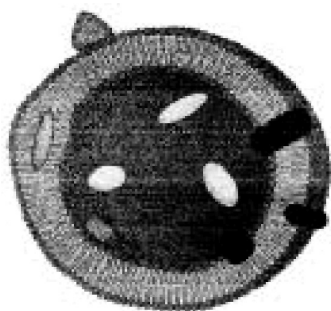
Podstawową cechą rozróżniającą liposomy jest liczba budujących je dwuwarstw lipidowych. Liposomy typu SUV i LUV są otoczone tylko przez jedną dwuwarstwę, typu MLV natomiast przez kilka (w przekroju przypominają główkę cebuli). Drugą istotną różnicą jest wielkość przestrzeni wodnej zamkniętej w liposomie (stosunek wielkości przestrzeni wodnej do ilości lipidu wymaganego dla jej zamknięcia). Granice pomiędzy poszczególnymi klasami nie są ostre (np. liposomy SUV i LUV).

Liposomy MLV i SUV nie są idealne jeśli chodzi o zastosowania praktyczne. Ilość zamykanego roztworu wodnego w tych liposomach jest bardzo mała w stosunku do ilości lipidu potrzebnej dla zamknięcia tej objętości albo też zbyt mała, aby go wykorzystać jako nośnik. Jednak kryteria te ulegają zmianie wraz ze zmianą charakteru substancji, która ma być transportowana przy pomocy liposomu. Związki hydrofobowe lub silnie amfifilowe,

które preferują środowisko niewodne będą w trakcie tworzenia liposomu lokować się przede wszystkim we wnętrzu dwuwarstwy, tak więc dla tego typu związków warstwowość liposomów nie stanowi istotnego ograniczenia. Podobnie w przypadku związków silnie asocjujących z powierzchnią dwuwarstwy.

III. 1.3. Metody otrzymywania liposomów

Fosfolipidy wykazują tendencję do tworzenia liposomów, która wynika z ich wyjątkowo korzystnych wartości HLB jako związków amfifilowych oraz kształtu cząsteczek. Dzięki temu preferują tworzenie agregatów o strukturze dwuwarstwowej. Pęcherzyki liposomowe tworzą się podczas minimalizacji całkowitej energii brzegowej, która ma miejsce w czasie zaginania płaskiej dwuwarstwy i tworzenia struktur zamkniętych. Jeszcze do niedawna fosfolipidy naturalne lub półsyntetyczne były jedynym materiałem wyjściowym do produkcji liposomów [3].



Rys. 4. Pęcherzyk liposomowy [3].

W chwili obecnej liposomy można otrzymywać również z innych związków amfifilowych. Warunkiem fizykochemicznym, jaki musi spełniać taki związek jest zdolność do preferowania w warunkach silnego uwodnienia struktury dwuwarstwowej, analogicznej do struktury tworzonej przez fosfolipid. Istnieją związki amfifilowe dwupolarne, które tworzą struktury warstwowe o grubości odpowiadającej grubości dwuwarstwy fosfolipidowej a będące w istocie monowarstwami, lecz o obu powierzchniach hydrofilowych. Mimo iż zarówno fosfolipidy, jak i niefosfolipidowe związki amfifilowe tworzą pęcherzyki liposomowe, generalnie jednak termin „liposom” jest zastrzeżony dla pęcherzyków zbudowanych przede wszystkim z fosfolipidów. Pęcherzyki zbudowane z innych amfifilów nazywane są „nanocząstkami” lub „nanosferami” [3].

Generalnie, do uzyskiwania liposomów stosuje się następujące techniki:

- Hydratacja cienkiego filmu lipidowego
- Sonifikacja (działanie destrukcyjne) fal ultradźwiękowych
- Kalibracja (przeciskanie przez określonej wielkości pory)

- Zastosowanie prasy Frencha
- Wstrzykiwanie roztworu etanolowego
- Wstrzykiwanie roztworu eterowego
- Dializa detergentowa
- Odparowywanie techniką faz odwróconych

Kolejne etapy w procesie powstawania liposomów i rodzaje liposomów otrzymywane w zależności od zastosowanej metody przedstawia poniższa tabela:

Rozpuszczanie lipidów						
Hydratacja suchego filmu lipidowego			Rozpuszczanie lipidów			Emulgacja
zawiesina MLV			roztwór koloidalny	roztwór w rozpuszczalniku		(mikro) emulsja
odpączkowanie	kalibracja	fragmentacja	usuwanie detergentu	wstrzykiwanie		
				mieszający się z wodą	nie mieszający się z wodą	żel
LUV	LUV, SUV	SUV	LUV	SUV, ML	MLV, LUV	MLV, LUV

Jedną z prostszych metod otrzymywania liposomów (zazwyczaj jednowarstwowych) na skalę laboratoryjną jest metoda powolnego wstrzykiwania etanolowego (eterowego lub detergentowego) roztworu lipidu do roztworu wodnego i homogenizacja uzyskanej zawiesiny (lub poddanie działaniu ultradźwięków). Liposomy powinny być preparowane w temperaturach przewyższających temperaturę ich głównych przejść fazowych. Dla większości fosfolipidów jest to temperatura w pobliżu 40°C (np. dla DPPC temperatura przejścia fazowego wynosi 41°C). Temperatury preparowania liposomów nie powinny jednak przekraczać 45–50°C. Po uzyskaniu jednorodnej zawiesiny można dodatkowo przeprowadzić dializę wobec fazy wodnej w celu usunięcia resztek etanolu (eteru lub detergentu) [3].

Większość z wyżej wymienionych technik pozwala na otrzymanie liposomów, ale o dużej niejednorodności. Dlatego też zazwyczaj zawiesinę liposomów poddaje się procesowi ujednoczenia ich wielkości. Służy do tego celu technika wymiarowego kalibrowania liposomów. Polega ona na przeciskaniu liposomów przez wysoce jednorodne pory w poliwęglanowych filtrach membranowych.

III. 1.4. Zastosowanie liposomów

Zdolność liposomów (pęcherzyków lipidowych) do zamykania wewnątrz różnorodnych roztworów stała się podstawą rozwinięcia dwóch głównych kierunków badawczych: użycia liposomów jako prostych modeli błony biologicznej, jak również zastosowania liposomów jako struktur zdolnych do przenoszenia i dostarczania do komórek zamkniętych w nich substancji.

Pęcherzyki lipidowe mogą migrować w głąb skóry dostarczając do organizmu leki. Jest to możliwe dzięki możliwości zamykania leków wewnątrz liposomów. Taka metoda znajduje zastosowanie w dermatologii, jak również w efektywnym dostarczaniu leków do krwiobiegu. Liposomy mogą przenikać przez warstwę rogową naskórka dzięki podobieństwu strukturalnemu. Wprowadzanie leków metodą liposomową do komórek jest oparte o wymianę składników dzięki połączeniu liposomów z błoną komórkową lub na zasadzie wymiany tłuszczowej. Metodą liposomową wprowadza się takie związki jak: kwas hialuronowy, hydrolizaty kolagenowe, cukry, kompleks witamin odżywczych (A, C, E i prowitaminę B5). W kosmetyce stosuje się liposomy w celu dobrego zabezpieczenia skóry i zapewnienia odpowiedniej hydratacji naskórka.

Liposomy mogą różnić się między sobą wielkością (od kilkudziesięciu nanometrów do kilku mikronów), liczbą dwuwarstw, płynnością błon, ładunkiem pęcherzyków oraz objętością zamkniętą [2, 3].

III. 2. Charakterystyka koloidów. Metoda nefelometryczna

Układami koloidalnymi nazywamy układy dyspersyjne, o wyglądzie układów fizycznie jednorodnych, chociaż w rzeczywistości składniki nie są ze sobą zmieszane cząsteczkowo. Składnik tworzący fazę ciągłą układu nazywamy ośrodkiem dyspersyjnym lub rozpraszającym, drugi zaś fazą rozproszoną lub składnikiem rozproszonym. Faza rozproszona składa się z **cząstek koloidalnych** o wymiarach od 1 do 100 nm, a nawet do 500 nm (0,5 μm), czyli z cząstek dających się rozpoznać za pomocą ultramikroskopu.

Jednym z najważniejszych parametrów określających stabilność koloidów jest **potencjał elektrokinetyczny dzeta** (ζ). Znajomość potencjału dzeta pozwala zrozumieć wiele właściwości układów zdyspergowanych. Potencjał ten w dużym stopniu zależy od rodzaju cząstki, ale także od ośrodka, w którym ta cząstka jest rozproszona i od obecnych w nim jonów. Dlatego zmiana pH, temperatury i stężenia poszczególnych składników powinna uzewnętrznić się również w zmianach potencjału dzeta.

Do wyznaczenia potencjału dzeta stosuje się zjawiska elektrokinetyczne najczęściej – elektroforezę (mikroelektroforezę). Potencjał ζ zależy od ruchliwości elektroforetycznej zgodnie z równaniem Henry'ego:

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(\kappa a) \quad (\text{III.1})$$

gdzie: κ – parametr Debye'a – Hückla zależny od stężenia elektrolitu, U_e – ruchliwość elektroforetyczna, ε – przenikalność elektryczna ośrodka, η – lepkość ośrodka, $1/\kappa$ stanowi miarę efektywnej grubości podwójnej warstwy elektrycznej.

Dla wodnych suspensji o niskiej przenikalności elektrycznej i niskich stężeniach elektrolitu funkcja (κa) wynosi 1, wówczas równanie (III.1) przechodzi w równanie Hückla. Natomiast, jeżeli funkcja (κa) wynosi 1,5 wówczas równanie (III.1) przechodzi w równanie Smoluchowskiego.

$$U_e = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (\text{III.2})$$

Stabilny potencjał dzeta o wysokiej bezwzględnej wartości zazwyczaj oznacza dużą stabilność układu w czasie. Cząstki silnie naładowane odpychają się wzajemnie i nie zachodzą procesy starzenia się lub zachodzą bardzo wolno. Z czym bezpośrednio wiąże się fakt, że najszybsza koagulacja zachodzi w **punkcie ładunku zerowego (pzc)** lub w **punkcie izoelektrycznym (iep)**.

Punkt ładunku zerowego to takie stężenie jonów potencjałotwórczych, przy których ładunek powierzchni jest równy zero.

Punkt izoelektryczny to takie stężenie jonów potencjałotwórczych, przy którym potencjał elektrokinetyczny ζ jest równy zero.

W literaturze z tej dziedziny przyjmuje się, że bezwzględne wartości potencjału dzeta rzędu 20 mV i więcej są wystarczające do stabilizowania układu, gdyż utrzymują cząstki w pewnej odległości od siebie i zapobiegają procesom starzenia się, np. emulsji. Układy takie wykazują zazwyczaj dużą stabilność w czasie w różnych warunkach.

Własności optyczne układów zdyspergowanych mają istotne znaczenie. Wiązka światła przechodząc przez układ może ulec absorpcji lub rozproszeniu. W przypadku roztworów właściwych mamy do czynienia głównie z absorpcją, natomiast w układach koloidalnych większe znaczenie ma **rozpraszanie światła**. Rozpraszanie światła zachodzi podczas rozchodzenia się światła w ośrodkach optycznie niejednorodnych. Zjawisko to polega na odchyleniu kierunku biegu promieni świetlnych w ośrodku i objawia się świeceniem ośrodka światłem nie własnym. Świecenie ośrodka powstaje jako efekt, wymuszonych przez pole elektromagnetyczne światła padającego, drgań elektronów w atomach lub cząsteczkach.

Jeżeli współczynnik załamania nie jest jednakowy we wszystkich punktach ośrodka, lecz zmienia się ze względu na zmiany gęstości czy też obecność niewielkich cząstek innej substancji, wówczas ośrodek taki nazywamy **optycznie niejednorodnym**. Światło ulega rozproszeniu na niejednorodnościach ośrodka, pojawiają się niespójne fale wtórne, które nie mogą ze sobą interferować i w efekcie obserwuje się rozpraszanie światła. Czynnikiem zmniejszającym spójność promieniowania wtórnego jest ruch cieplny, w wyniku którego niejednorodności przemieszczają się w ośrodku. Dodatkowym zjawiskiem jest zmiana dróg optycznych między falami wtórnymi wysyłanymi przez poszczególne niejednorodności. Przykładem ośrodków optycznie niejednorodnych są ośrodki mętne (np. układy koloidalne), zawierające cząstki o współczynniku załamania różniącym się od współczynnika załamania otaczającego ośrodka.

Rozpraszanie światła w ośrodkach optycznie niejednorodnych, w których rozmiary niejednorodności nie przewyższają 10–20% długości fali świetlnej nazywamy **zjawiskiem**

Tyndalla. Dawniej efekt Tyndalla uważano za cechę charakterystyczną dla układów koloidalnych. Dzisiaj wiadomo, że wykrycie rozpraszania światła w roztworach właściwych jest możliwe i zależy wyłącznie od czułości przyrządów.

Metoda nefelometryczna jest dość powszechną metodą pomiaru wielkości cząstek koloidalnych (np. emulsji). Jest to metoda analityczna oparta na pomiarze intensywności światła rozproszonego (lub odbitego) przez cząstki koloidalne. Pomiar intensywności światła jest wykonywany pod kątem 90 lub 45° w stosunku do wiązki światła padającego na układ koloidalny, a nie w świetle przechodzącym jak w metodzie spektrometrycznej.

Zachowanie się cząstek o różnych rozmiarach i różnych właściwościach optycznych pod wpływem promieni świetlnych opisuje teoria Mie. Dla niektórych materiałów o rozmiarach cząstek mniejszych od długości fali świetlnej możliwe jest zastosowanie uproszczenia teorii Mie, tzw. teorii Rayleigha – Ganssa – Debye’a. Wszystkie cząstki mniejsze niż 1/10 długości fali padającej na nie wiązki świetlnej zachowują się zgodnie z teorią Rayleigha, czyli rozpraszają światło izotropowo (we wszystkich kierunkach rozpraszana jest taka sama energia). Umożliwia to wprowadzenie zależności intensywności światła rozproszonego I przez cząstki kuliste i bezbarwne z intensywnością światła padającego I_0 :

$$I = 24 \pi^3 I_0 \left(\frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2 + 2n_2^2} \right)^2 \frac{Nv^2}{\lambda^4} \quad (\text{III.3})$$

gdzie: n_1 i n_2 – współczynniki załamania światła odpowiednio fazy rozproszonej i ośrodka dyspersyjnego, N – całkowita liczba cząstek rozpraszających, v – objętość cząstki, λ – długość fali światła padającego.

Stosunek intensywności światła rozproszonego, I_1 i I_2 , dla dwóch układów koloidalnych, różniących się wielkością cząstek fazy rozproszonej, jest proporcjonalny do wielkości cząstek obu zoli v_1 i v_2 :

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{v_1}{v_2} \quad (\text{III.4})$$

Ta zależność pozwala na określenie wielkości cząstek koloidalnych. Gdy dwa układy koloidalne zawierają cząstki o jednakowych wymiarach, stosunek intensywności światła rozproszonego jest proporcjonalny do ich stężeń:

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{c_1}{c_2} \quad (\text{III.5})$$

Na podstawie zależności (III.5) można znaleźć stężenie badanego układu koloidalnego, o ile znane są wartości intensywności światła rozproszonego i stężenie układu wzorcowego. Umożliwia to zastosowanie nefelometrii w analizie ilościowej. Niektóre roztwory koloidalne wykazują silniejszą absorpcję niż rozpraszanie światła. Pomiar absorpcji pozwala na oznaczenie stężenia fazy rozproszonej i monitorowanie procesu koagulacji.

Układy koloidalne posiadają pewne własności wyróżniające koloidy spośród innych mieszanin. Podstawową właściwością kinetyczną emulsji jest **dyfuzja**. Cząstki w koloidach są

znacznie większe niż w roztworach rzeczywistych, dlatego proces dyfuzji w tych układach przebiega znacznie wolniej. Najbardziej charakterystyczną ich własnością mechaniczną są **ruchy Browna**. Są to ciągle, chaotyczne ruchy postępowe, drgające i obrotowe cząstek fazy rozproszonej w ośrodku ciekłym. Po raz pierwszy ruchy cząstek koloidalnych rozproszonych w wodzie zaobserwował Brown w 1827 r., dlatego ruchy te nazwano jego nazwiskiem.

Ruchy Browna można opisać następującą zależnością:

$$\overline{x^2} = \frac{RT}{N_A} \frac{t}{3\pi\eta r} \quad (\text{III.6})$$

gdzie: $\overline{x^2}$ – kwadrat średniego rzutu cząstki koloidalnej na wybraną oś, η – współczynnik lepkości, r – promień cząstki koloidalnej, t – czas obserwacji.

IV. Część doświadczalna

A. Aparatura i odczynniki

1. Aparatura: Mętnościomierz 2100AN IS,
Homogenizator MPW-120.
2. Sprzęt:
 - cylinder miarowy o pojemności 100 cm³ – 1 szt.,
 - pipeta o pojemności 5 cm³ – 1 szt.,
 - zlewka 50 cm³ – 1 szt.,
 - strzykawka z igłą o pojemności 2 cm³ – 1 szt.,
 - kuwety do mętnościomierza – 4 szt.,
 - olej silikonowy do czyszczenia kuwet,
 - termometr,
 - tryskawka,
 - czajnik elektryczny,
 - płyn do mycia naczyń.
3. Odczynniki: zawiesina lecytyny kosmetycznej w etanolu (1,85 g w 100 cm³ etanolu), 10⁻¹ M NaCl, 10⁻¹ M CaCl₂, 10⁻¹ M AlCl₃.

B. Program ćwiczenia

1. Przygotowanie mętnościomierza do pomiarów.
2. Otrzymywanie zawiesiny liposomów w wodzie i roztworze elektrolitu.
3. Pomiar zmętnienia Z dla zawiesiny liposomów w funkcji czasu.
4. Opracowanie uzyskanych wyników.

C. Obsługa przyrządów

1. Mętnościomierz 2100AN IS

Mętnościomierz laboratoryjny 2100AN IS firmy Hach jest nefelometrem umożliwiającym pomiar światła rozproszonego lub światła osłabionego zgodnie z międzynarodowymi normami dotyczącymi pomiaru mętności. Kalibracja przy pomocy formazyny zapewnia możliwość bezpośredniego pomiaru w jednostkach FNU (Formazynowe jednostki nefelometryczne) i FAU (Formazynowe jednostki osłabienia). Układ optyczny mętnościomierza składa się z zespołu diody emitującej światło o długości fali 860 nm (LED), detektora monitorującego światło rozproszone pod kątem 90°, detektora światła rozproszonego do przodu, detektora światła przepuszczonego i detektora światła rozproszonego do tyłu.

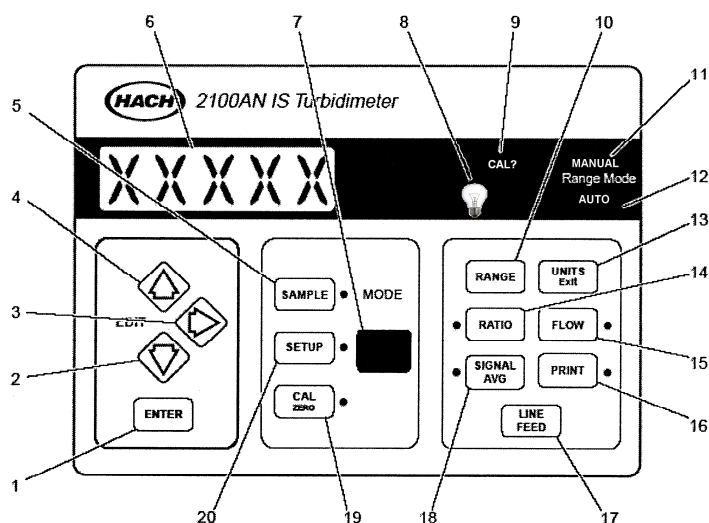
Uwaga: Mętnościomierz model 2100AN IS nie wymaga nagrzewania lampy lub stabilizacji elektronicznej.

Rozwiązania optyczne i elektroniczne zastosowane w mętnościomierzu 2100AN IS zapewniają długotrwałą stabilność i minimalizują potrzebę częstego kalibrowania. Wielodetektorowy układ optyczny kompensuje zmienność występującą w układzie elektronicznym i optycznym pomiędzy kolejnymi kalibracjami. Kalibrację wykonuje się okresowo (wzorce formazynowe mają trwałość do 2 lat) albo, gdy miga wskaźnik kalibracji na wyświetlaczu (CAL?).

Kalibracja mętnościomierza

Uwaga: O konieczności kalibracji przyrządu decyduje prowadzący ćwiczenia

Kalibrację wykonuje się z użyciem 6 podstawowych wzorców formazynowych o mętności <0,1-, 20-, 200-, 1000-, 4000- oraz 7500-NTU zaczynając od wzorca o najniższej wartości NTU. Nacisnąć **CAL/Zero**. Zaświeca się wskaźnik wersji CAL. Każda kuweta z wzorcem powinna spełniać wysokie standardy czystości, dlatego należy pamiętać o przecieraniu kuwety ściereczką nawilżoną olejem silikonowym każdorazowo przed włożeniem do komory pomiarowej. Zamkniętą kuwetę wzorca (<0,1-NTU, bez wstrząsania) umieścić w komorze pomiarowej i zamknąć pokrywę. Nacisnąć **ENTER**. Przyrząd wyświetla liczby od 60 do 0 i następnie wykonuje pomiar. Wynik pomiaru jest wprowadzany do pamięci i wykorzystywany do obliczania współczynnika korygującego. Przyrząd automatycznie przechodzi do następnego, wyższego wzorca, na ekranie wyświetlana jest spodziewana wartość FNU i numer wzorca. Następnie wyjąć kuwetę z wzorcem <0,1-NTU i włożyć kuwetę z wzorcem o wyższej mętności. Wzorce o wyższej mętności przed włożeniem należy delikatnie wstrząsnąć. Nacisnąć **ENTER** i powtórzyć procedurę jak wyżej. Dla każdego kolejnego wzorca postępujemy analogicznie. Po wykonaniu pomiarów dla wszystkich 6 wzorców formazynowych nacisnąć przycisk **CAL/Zero**. Przyrząd wykonuje obliczenia oparte na nowych danych kalibracyjnych, zachowuje w pamięci nową kalibrację i powraca do wersji wykonywania pomiarów. Jeżeli podczas kalibrowania nastąpi przerwa w zasilaniu, przyrząd traci nowe dane, zachowując starą kalibrację. W celu zakończenia kalibracji bez zachowania nowych wartości należy nacisnąć **UNITS Exit**.



Rys. 5. Mętnościomierz laboratoryjny 2100AN IS.

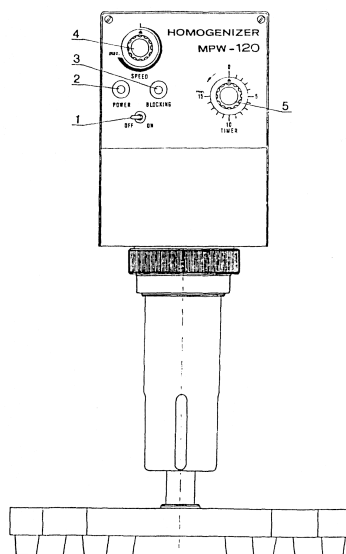
- 1 – **ENTER** Używany w kalibracji do wybierania wartości wzorca formazynowego i do zainicjowania pomiaru wzorca. Wybiera funkcje w czasie nastawiania przyrządu i inicjuje zerowanie;
- 2, 3, 4 – **Strzałka w prawo** przesuwają kursor do edytowanych cyfr w czasie kalibracji wzorcem oraz wybierania numeru próbki, **strzałka w górę** edytuje cyfry LED w wersji kalibracji i liczbę SETUP w czasie procedury nastawiania przyrządu,
- 5 – **SAMPLE** Inicjuje edytowanie numeru próbki;
- 6 – **Ekran**;
- 7 – Wyświetla numer wzorca kalibracyjnego, parametru lub numer próbki;
- 8 – Świecenie wskaźnika wskazuje włączenie lampy;
- 9 – **CAL?** Świecenie wskazuje, że wartość zarejestrowana w procesie kalibracji leży poza zakresem możliwym do przyjęcia (błąd w czasie kalibracji lub wadliwe działanie przyrządu). Jeżeli wskaźnik miga przyrząd należy ponownie skalibrować;
- 10 – **RANGE** Wybiera automatyczne lub ręczne ustalanie zakresu pomiarowego (11 – **Manual Range**, 12 – **Auto Range**);
- 13 – **UNITS Exit** Wybiera jednostkę pomiarową. Dostępnymi jednostkami są: FNU, FAU, EBC, ASC (kalibracja do zastosowań specjalnych), % T (przepuszczalność) i absorbancja;
- 14 – **RATIO** Miganie wskazuje na przekroczenie zakresu do 40 NTU;
- 15 – **FLOW** Świecenie wskaźnika oznacza, że jest włączona opcja układu z automatyczną kuletą przepływową. Migotanie informuje o zakończeniu cyklu przepływu;
- 16 – **PRINT** Przesyła wynik pomiaru do komputera lub drukarki;
- 17 – **LINE FEED** Przesuwa do przodu papier wewnętrznej drukarki o jeden wiersz;
- 18 – **SIGNAL AVG** Włącza i wyłącza uśrednianie sygnału;
- 19 – **CAL/Zero** Inicjuje kalibrację w wersjach pomiarów w jednostkach FNU, FAU, NTU, EBC i ASC. Zapoczątkowuje zerowanie analityczne przy pomiarze % T lub absorbancji;
- 20 – **SETUP** Konfiguruje specyficzne funkcje operacyjne.

Pomiar wielkości zmętnienia w jednostkach NTU

Przed przystąpieniem do pomiarów należy:

- Włączyć aparat do sieci. W celu włączenia zasilania mętnościomierza należy zamknąć pokrywę kuwety pomiarowej i nacisnąć włącznik **I/O** na tylnej ścianie przyrządu. Natychmiast po włączeniu pojawiają się ciemne odczyty wskazań detektora. Jeżeli pokrywa komory kuwety pozostanie otwarta w czasie włączania może pojawić się kod błędu **E7**.
- Pomiary można wykonywać z włączonym lub wyłączonym uśrednianiem **SIGNAL AVERAGE** oraz z ręcznym lub automatycznym wybieraniem zakresu.
- Nacisnąć przycisk **RANGE** i dokonać automatycznego wyboru zakresu pomiarowego. W przypadku przekroczenia zakresu pomiarowego ekran wyświetla same cyfry 9, zaś poniżej zakresu same cyfry 0.
- Wybrać jednostkę pomiarową NTU przez naciśnięcie przycisku **UNITS Exit**.
- Próbkę zawierającą badany roztwór wlać do kuwety, do kreski (około 30 ml). Kuwetę trzymać u góry. Zamknąć zakrętką. Trzymając kuwetę za zakrętkę wytrzeć ścianki ściereczką nawilżoną olejem silikonowym w celu usunięcia plam i odcisków palców.
- Umieścić kuwetę w komorze pomiarowej przyrządu, tak aby strzałka na kuwecie znajdowała się w linii prostej ze znacznikiem orientacyjnym komory i zamknąć pokrywę. Dla zaktualizowania wskazań na ekranie nacisnąć **ENTER**.
- Przy otwieraniu pokrywy pojawia się napis **DOOR**.
- Umieścić kuwetę z kolejnym badanym roztworem w komorze pomiarowej przyrządu i zamknąć pokrywę. Nacisnąć **ENTER**.
- Odczytać i zanotować wynik pomiaru. W trakcie wykonywania pomiarów nie trzymać kuwety z badaną próbką cały czas w aparacie.
- Po zakończeniu pomiarów kuwety dokładnie umyć i wyłączyć przyrząd wyłącznikiem na tylnej ścianie przyrządu.

2. Homogenizator MPW-120



Rys. 6. Głowica homogenizatora typu MPW-120:

- 1 – wyłącznik sieciowy,
- 2 – zasilanie,
- 3 – blokada,
- 4 – regulator obrotów,
- 5 – wyłącznik czasowy.

Homogenizator typ MPW-120 jest urządzeniem przeznaczonym do uzyskiwania jednorodnych mieszanin i zawiesin, rozdrabniania preparatów do badań farmakologicznych, medycznych i ogólnie fizykochemicznych. Posiada regulację obrotów w zakresie 1000–15000 obr./min., maksymalny czas pracy 15 minut.

Aby wykonać pomiar należy:

- Pokręta ustawić w pozycji początkowej, a **wyłącznik sieciowy** [1] w pozycji **OFF**.
- Włączyć aparat do sieci. Do metalowego pojemnika wlać mieszaninę do homogenizacji i wkręcić go do głowicy.
- **Pokrętko regulatora obrotów** [4] ustawić na 10000 obr./min. – strzałka skierowana pionowo w dół.
- Ustawić pokrętko **wyłącznika czasowego** [5] na 1 min., pokręcając je **w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara**.
- Włączyć zasilanie (przełącznik [1] w pozycji **ON**), co sygnalizuje zapalenie lampki [2], lampka [3] nie powinna się zapalić).

- Zapalona lampka [3] oznacza blokadę (źle założona głowica lub nieprawidłowo przykręcony pojemnik).
- Po upływie nastawionego czasu homogenizator zakończy pracę.
- Po zakończeniu wykonywania ćwiczenia używane elementy homogenizatora należy zdemontować, umyć i osuszyć.
- Wyłącznik sieciowy [1] ustawić w pozycji **OFF**, wyłączyć aparat z sieci.

D. Sposób wykonania ćwiczenia

1. Preparatyka liposomów

a) preparatyka liposomów w wodzie

Ogrzać wodę destylowaną w czajniku (pod dygestorium) do temperatury dokładnie 50°C. Odmierzyć cylindrem 95 cm³ ogrzanej wody i przelać do metalowego pojemnika homogenizatora. Energicznie wymieszać zawiesinę lecytyny w etanolu. Pobrać 5 cm³ suspensji i przelać do zlewki, następnie pobrać do strzykawki 1 cm³ zawiesiny i wstrzyknąć jej zawartość do wody, zwracając uwagę na to, by igła była zanurzona w wodzie. Temperatura suspensji w momencie rozpoczęcia homogenizacji powinna wynosić 45°C. Następnie metalowy pojemnik przykręcić do głowicy homogenizatora. Ustawić czas homogenizacji na 1 min., a obroty na 10000 obr./min. Należy pamiętać, że przy ustawianiu czasu pokrętko obracamy w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara.

W celu uzyskania jednorodnej zawiesiny liposomów powyższe czynności powtórzyć 4-krotnie, do całkowitego zużycia lecytyny w etanolu (5 cm³).

Moment zakończenia homogenizacji całej zawiesiny przyjmujemy za $t = 0$ [min].

Po zakończeniu homogenizacji zawiesiny umyć metalowy pojemnik – wlać ciepłej wody, pojemnik przykręcić do głowicy i włączyć homogenizator na 2 min.

b) preparatyka liposomów w roztworze elektrolitu

Przygotować roztwór CaCl₂ o stężeniu 10⁻² M. W tym celu pobrać 10 cm³ roztworu o stężeniu 10⁻¹ M i przelać do cylindra. Ogrzać wodę do temperatury dokładnie 50°C i wlać do cylindra do objętości 95 cm³. Przygotowany roztwór przelać do metalowego pojemnika. Energicznie wymieszać zawiesinę lecytyny w etanolu. Pobrać 5 cm³ suspensji i przelać do zlewki. Następnie pobrać do strzykawki 1 cm³ zawiesiny i wstrzyknąć jej zawartość do roztworu, zwracając uwagę na to, by igła była zanurzona w cieczy. Następnie wykonać analogiczne czynności jak dla wody.

Zgodnie z zaleceniami asystenta opisaną powyżej procedurę powtórzyć z roztworami NaCl i AlCl₃ o stężeniu 10⁻² M.

2. Pomiar stabilności

Pomiar zmętnienia przeprowadzamy zgodnie z instrukcją w punkcie **Pomiar wielkości zmętnienia w jednostkach NTU**. Kuwetę napełniamy roztworem liposomów, umieszczamy w komorze pomiarowej i wykonujemy pomiar wielkości zmętnienia w celu sprawdzenia jego stabilności.

Wielkość zmętnienia Z w jednostkach NTU mierzymy zaczynając od $t = 5$ min. (od momentu zakończenia homogenizacji), następnie, co 5 minut aż do 25 minut od zakończenia homogenizacji. W trakcie trwania pomiaru należy wykonać homogenizację kolejnej zawiesiny liposomów w roztworze CaCl_2 o stężeniu 10^{-2} M. Należy pamiętać o umyciu metalowego naczynka do homogenizacji i dokładnym wypłukaniu go wodą destylowaną. Po zakończeniu pomiarów należy umyć dokładnie wszystkie kolbki.

E. Opracowanie wyników

1. Uzyskane wartości zmętnienia Z otrzymane dla poszczególnych zawiesin liposomów umieścić w tabeli:

Zawiesina liposomów wodzie			Zawiesina liposomów w roztworze CaCl_2		
t [min]	Z [NTU]	v [nm]	t [min]	Z	v [nm]
5		280	5		
10			10		
15			15		
20			20		
25			25		

oraz w postaci wykresów zależności $Z = f(t)$ dla wszystkich serii pomiarowych na jednym wykresie. Na ich podstawie określić wpływ elektrolitu na stabilność zawiesiny liposomów.

2. Dla poszczególnych pomiarów wyznaczyć wielkości liposomów w roztworze elektrolitu na podstawie pomiarów intensywności światła rozproszonego zgodnie z równaniem:

$$\frac{Z_1}{Z_2} = \frac{v_1}{v_2} \quad (\text{IV.1})$$

W obliczeniach należy przyjąć, że średnia wielkość cząstek liposomów uzyskanych w tych warunkach w roztworze wodnym v_1 wynosi 280 nm (wartość zmierzona przy pomocy metody dynamicznego rozpraszania światła).