

ARTUR BARTKOWIAK^{1)*}, WOJCIECH BRYLAK²⁾

Hydrożelowe mikrokapsułki z udziałem naturalnych i chemicznie modyfikowanych chitozanów — właściwości mechaniczne i porowatość

Streszczenie — Podjęto próbę określenia wpływu stężenia roztworów anionowego polisacharydu oraz kationowych oligochitozanów (niemodyfikowanych bądź modyfikowanych) na niektóre właściwości otrzymywanych z nich dwuskładnikowych mikrosfer alginian sodu/kation Ca^{2+} i trójskładnikowych mikrokapsulek alginian sodu/kation Ca^{2+} /oligochitozan (lub jego czwartorzędowa pochodna amoniowa). Dobór stężenia roztworów pozwala na regulowanie porowatości określanej na podstawie oznaczania górnej granicy wykluczania metodą chromatografii żelowej. Badania potwierdziły możliwość wykorzystania oligochitozanów do formowania mechanicznie stabilnych mikrokapsulek. Zastosowanie modyfikowanych oligomerów chitozanu pozwala na regulowanie zarówno wytrzymałości mechanicznej zewnętrznej membrany mikrokapsulek, jak i jej porowatości. Uzyskane hydrożelowe układy charakteryzują się dużą stabilnością wytrzymałości na ściskanie, co ustalono na podstawie badań zmęczeniowych. Zastosowanie niedestrukcyjnych badań relaksacyjnych pozwoliło na określenie wstępnych korelacji pomiędzy wytrzymałością na ściskanie i porowatością mikrokapsulek a współczynnikami równania opisującego krzywe relaksacji.

Słowa kluczowe: mikrosfery hydrożelowe, mikrokapsułki, alginian sodu, oligochitozan, czwartorzędowe sole amoniowe oligochitozanu, porowatość, wytrzymałość na ściskanie, badania zmęczeniowe, relaksacja.

HYDROGEL MICROCAPSULES CONTAINING NATURAL AND CHEMICALLY MODIFIED OLIGOCHITOSAN — MECHANICAL PROPERTIES AND POROSITY

Summary — Attempt has been made to determine the effect of the concentration of the solutions of anionic polysaccharides and cationic oligochitosans (modified or not) on some properties of the systems obtained. They were either binary microspheres: sodium alginate/ Ca^{+2} cation or ternary ones: sodium alginate/ Ca^{+2} cation/oligochitosan (or its quaternary ammonium derivatives) (Fig. 1, Table 1). Selection of solution concentration let control the porosity (determined on the basis of molar mass cut-off by gel permeation chromatography — Fig. 2). The investigations confirmed the possibility of oligochitosan applications to the formation of mechanically stable microcapsules. The use of modified oligomers let control both the mechanical strength of outer membrane of microcapsule and porosity. The prepared hydrogel systems show high stability of compression strength what was find on the basis of fatigue tests (Table 3). Non-destructive relaxation tests results allowed finding the preliminary correlation between compression strength and porosity of microcapsules and coefficients in the equation describing the relaxation curves [equation (3), Table 2, Fig. 4—6].

Key words: hydrogel microspheres, microcapsules, sodium alginate, oligochitosan, quaternary ammonium salts, porosity, compression strength, fatigue tests, relaxation.

Mikrokapsułkowanie, stanowiące obecnie jedną z dynamicznie rozwijających się technologii, umożliwia m.in. „zamykanie” mikroskopijnej ilości substancji (tworzącej tzw. rdzeń mikrokapsułki) w otoczkach formowanych z jednego lub kilku różnych polimerów na drodze określonych procesów fizycznych i reakcji chemicznych [1]. Szczególnego znaczenia nabierają badania dotyczące warunków takich reakcji oraz poszukiwanie nowych

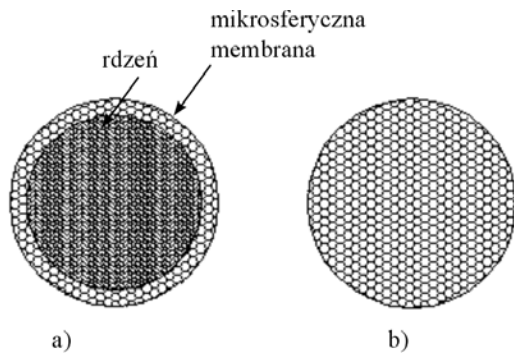
potencjalnych substratów takich reakcji, kompatybilnych z materiałami pochodzenia naturalnego, np. z żelatyną, powszechnie stosowaną w kapsułkowaniu. W literaturze naukowej pojawia się ostatnio coraz więcej doniesień na temat mikrokapsułkowania w układach opartych na polimerach naturalnych i ich odpowiednich pochodnych [2].

Mikrokapsułki i mikrosfery są tworami kulistymi o wymiarach od kilku mikrometrów do kilku milimetrów (rys. 1). Mikrosfery (rys. 1b) to małe porowate jednofazowe kulki polimerowe, które są najczęściej równomiernie zżelowane, stanowiąc w istocie membranę w całej swej objętości. Wytrzymałość mechaniczną mikrosfer można poprawić w wyniku formowania dodatkowej

¹⁾ Akademia Rolnicza w Szczecinie, Zakład Opakowalnictwa i Biopolimerów, ul. Kazimierza Królewicza 4, 71-550 Szczecin, e-mail: bartkowiak@tz.ar.szczecin.pl

²⁾ Politechnika Szczecińska, Instytut Polimerów, Zakład Technologii i Recyklingu Tworzyw Sztucznych, ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin

^{*)} Autor do korespondencji



Rys. 1. Schematy struktury: (a) mikrokapuśki, (b) mikrosfery
Fig. 1. Schematic structure representation of: (a) microcapsule, (b) microspheres

zewewnętrznej membrany ze związków zdolnych do tworzenia trwałych wiązań kowalencyjnych lub jonowych [3], uzyskując w ten sposób mikrokapuśki. Mikrokapuśki stanowią więc układy dwufazowe z płynnym lub hydrożelowym rdzeniem oraz zewnętrzną porowatą membranę (rys. 1a).

Jedną ze szczególnie obiecujących metod mikrokapuśkowania jest formowanie mikrosferycznych hydrożelowych otoczek na drodze kontrolowanego procesu tworzenia kompleksów polielektrolitowych (KPE) [4]. Kompleksy takie mogą powstawać bądź w całej objętości polielektrolitu w wyniku oddziaływania anionowych grup z kationami metali wielowartościowych, bądź też w reakcji na granicy dwóch stykających się wodnych roztworów polielektrolitów zawierających jonowe grupy funkcyjne o przeciwnych ładunkach. Przykładem najczęściej stosowanych kompleksów KPE są mikrosfery hydrożelowe otrzymywane poprzez sieciowanie alginianu sodu kationami wapnia. Niestety, tego rodzaju mikrosfery charakteryzują się niewielką stabilnością mechaniczną, zwłaszcza podczas długotrwałego ich przechowywania w roztworach buforowych (typowe systemy biologiczne). Można wówczas zaobserwować dezintegrację takiego układu, postępującą w wyniku stopniowego procesu wymiany kationów Ca^{2+} (pochodzących z kompleksu KPE) na jednowartościowe kationy obecne w roztworze buforu, przede wszystkim kationy sodu i potasu. Dlatego też opracowano wiele innych struktur wykorzystujących dodatkową modyfikację powierzchni takich hydrożelowych mikrosfer kationowymi polimerami lub z zastosowaniem systemów wieloskładnikowych [5]. Otrzymane w ten sposób mikrokapuśki charakteryzują się lepszymi właściwościami mechanicznymi i zmniejszoną porowatością.

Niniejsza praca ma na celu określenie potencjalnych możliwości zastosowania oligochitozanu i jego kationowej pochodnej w procesie otrzymywania sferycznych mikrokapuśki na drodze modyfikacji mikrosfer alginian/ Ca^{2+} . W prezentowanych badaniach jako układy modelowe posłużyły mikrosfery formowane jednoetapowo na podstawie anionowego alginianu sodu i katio-

nów wapnia Ca^{2+} oraz mikrokapuśki formowane dwuetapowo z mikrosfer i wprowadzanego dodatkowo kationowego oligochitozanu albo jego pochodnych. Podjęliśmy także próbę oceny wpływu podstawowych parametrów (w tym stężeń wyjściowych roztworów alginianu sodu oraz oligochitozanu lub jego pochodnej zawierającej czwartorzędową grupę amoniową) na wytrzymałościowe właściwości mikrokapuśki otrzymywanych w trójskładnikowych układach polisacharyd anionowy/kation Ca^{2+} /oligokation chitozanowy. Dokonaliśmy też próby określenia właściwości materiałów hydrożelowych na podstawie wyników badań relaksacyjnych. Zaprezentowaliśmy przy tym dokładny opis wszystkich zastosowanych metod charakterystyki mechanicznej i badania porowatości ze względu na wciąż jeszcze odczuwany brak ustaleń dotyczących wiarygodnych sposobów oceny coraz częściej opracowywanych nowych sferycznych materiałów hydrożelowych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały

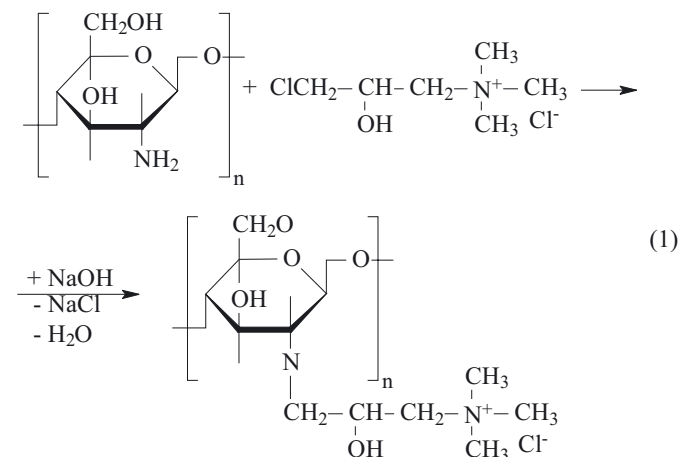
W pracy wykorzystano:

— alginian sodu „Keltone HV” firmy ISP (Wielka Brytania), o lepkościowo średnim ciężarze cząsteczkowym $\overline{M}_n = 440\,000$ [6];

— oligochitozan o liczbowo średnim ciężarze cząsteczkowym $\overline{M}_n = 4700$ i polidispersyjności 1,7 (zweryfikowanej metodą chromatografii żelowej z wykorzystaniem względnej kalibracji wzorcami dekstranowymi [7]), otrzymany z chitozanu o symbolu CH-K05011512 (*chitosan food grade*, firmy Yuhuan Ocean Biochemical, Chiny) w wyniku kontrolowanej degradacji nadtlenkiem wodoru [6].

Modyfikacja oligochitozanu

Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność oligochitozanów o $\overline{M}_n > 4000$ w środowisku o $\text{pH} > 6,3$ [8] używany oligochitozan poddano modyfikacji związkiem zawierającym czwartorzędowe grupy amoniowe. Mia-



nowicie, do 100 cm³ 5-proc. wodnego roztworu oligochitozanu o temp. 60 °C wkraplano powoli 4 cm³ wspólnego wodnego roztworu chlorku (3-chloro-2-hydroksypropylo)trimetyloamoniowego (firmy Aldrich) oraz wodorotlenku sodu (udział molowy — jednostka glikozydowa:czwartorzędowa sól amoniowa:NaOH = 1:0,5:1) [równanie (1)]. Po zakończeniu reakcji (6 h) wytrącano produkt (na drodze wkraplania mieszaniny poreakcyjnej do acetonu), ekstrahowano z niego nieprzereagowany związek modyfikujący i NaOH czterokrotnie przemywając odsączony osad acetonem, a następnie produkt suszono w temp. 40 °C. Modyfikację chitozanu potwierdzono zarówno jakościowo (spektroskopia w podczerwieni, aparat „ATR-FTIR Nexus” firmy Thermo Nicolet Co.), jak i ilościowo (protonowy rezonans magnetyczny H-NMR, aparat NMR „Spectrometer AC-200” firmy Bruker — rozpuszczalnik D₂O) [10]; stopień podstawnienia wyniósł 0,5.

Formowanie mikrosfer hydrożelowych i mikrokapsulek

Mikrosfery hydrożelowe w układzie alginian/kationy wapnia otrzymywano w wyniku wkraplania 20 cm³ roztworu alginianu sodu (0,5—1,5-proc.) do 1-proc. roztworu CaCl₂ przy użyciu strzykawki pojemności 20 cm³ zakończonej igłą (Ø 0,7 mm × 30 mm); igła znajdowała się 2,5—3 cm nad poziomem lustra roztworu CaCl₂. Dodatkowo, podczas formowania mikrosfer roztwór był delikatnie mieszany za pomocą mieszadła magnetycznego. Taki sposób formowania mikrosfer pozwolił na uzyskanie produktów średnicy ok. 3 mm. W celu wyeliminowania wpływu szybkości dozowania roztworu alginianu, do nastrzykiwań zastosowano pompę infuzyjną 680 A firmy Medipan-Warszawa w warunkach stałego przepływu = 4 cm³/min.

Formowanie mikrokapsulek w procesie dwuetapowym polegało na otrzymywaniu na pierwszym etapie w opisany powyżej sposób mikrosfer hydrożelowych (z 1,5-proc. roztworu alginianu „Keltone HV”) i na następnej modyfikacji tak powstałych mikrosfer poprzez zanurzenie ich w 0,5—2-proc. roztworach oligochitozanu lub jego czwartorzędowej pochodnej amoniowej w 0,9-proc. roztworze NaCl (wymagane pH roztworu wynoszące 6,5 ustalano za pomocą 1 M NaOH). Przyjęty czas takiej modyfikacji w odniesieniu do wszystkich przeprowadzonych prób był stały i wynosił 20 minut. Wartość tę dobrano tak, aby w stosunkowo krótkim czasie otrzymać maksymalny stopień przereagowania oligokationu chitozanowego; opieraliśmy się przy tym na wynikach wcześniejszych badań dotyczących otrzymywania dwuskładnikowych mikrokapsulek alginian/oligochitozan [4]. W referowanej obecnie pracy w przypadku oligochitozanu zarówno niemodyfikowanego, jak i modyfikowanego stosowano ich sole chlorkowe. Składy tak otrzymanych mikrokapsulek i mikrosfer są podane w dalszym tekście (por. tabela 1).

Metody badań właściwości otrzymanych układów hydrożelowych

Maksymalna wytrzymałość na ściskanie

Właściwość tę oceniano w maszynie wytrzymałościowej firmy Zwick („Rolle Z 2,5”) z ruchomą głowicą; prędkość natarcia głowicy wynosiła 1 mm/s [7]. Zmiany wartości siły nacisku rejestrowano z wykorzystaniem zintegrowanego systemu komputerowego, umożliwiającego określenie maksymalnej odporności membrany hydrożelowej przy ściskaniu pojedynczej mikrosfery lub mikrokapsułki. W celu otrzymania statystycznie weryfikowalnych wyników, badania wszystkich otrzymanych układów przeprowadzano w co najmniej 10 powtórzeniach.

Porowatość

Porowatość analizowanych hydrożelowych mikrosfer i kapsulek określano wartością tzw. górnej granicy wykluczania wyznaczaną na podstawie techniki chromatografii żelowej. Jest to dokładna metoda służąca do oceny porowatości materiałów polimerowych poprzez pomiar maksymalnego ciężaru cząsteczkowego wzorców, które mogą dyfundować przez zewnętrzne pory badanych materiałów do ich wnętrza. W naszych badaniach jako wzorzec wykorzystano 0,2-proc. wodny roztwór mieszaniny dekstranów o średnich ciężarach cząsteczkowych 200 000, 110 000, 15 000, 5 000 oraz dekstran małowcząsteczkowy (<5 000).

Do ok. 2 cm³ materiału w postaci mikrosfer lub mikrokapsulek, umieszczonego w cylindrze miarowym pojemności 10 cm³, wprowadzano po 2 cm³ roztworów ww. dekstranów. Do badań chromatograficznych wykorzystywano dwie próbki: — pobraną bezpośrednio po wprowadzeniu dekstranów (próbka „0”) oraz pobraną po 24 h, czyli po czasie, po którym ustala się równowaga dyfuzyjna (próbka „24”) [6]. Zestawienie i porównanie obu chromatogramów („0” i „24”) pozwala na ustalenie tzw. górnej granicy wykluczania określonej jako ciężar cząsteczkowy dekstranu wyznaczany z zastosowaniem metody dwuetapowej, mianowicie:

— wyznaczenia ciężaru cząsteczkowego odpowiadającego miejscu połączenia się chromatogramów próbek „0” i „24” — wartość D_A na rys. 2a;

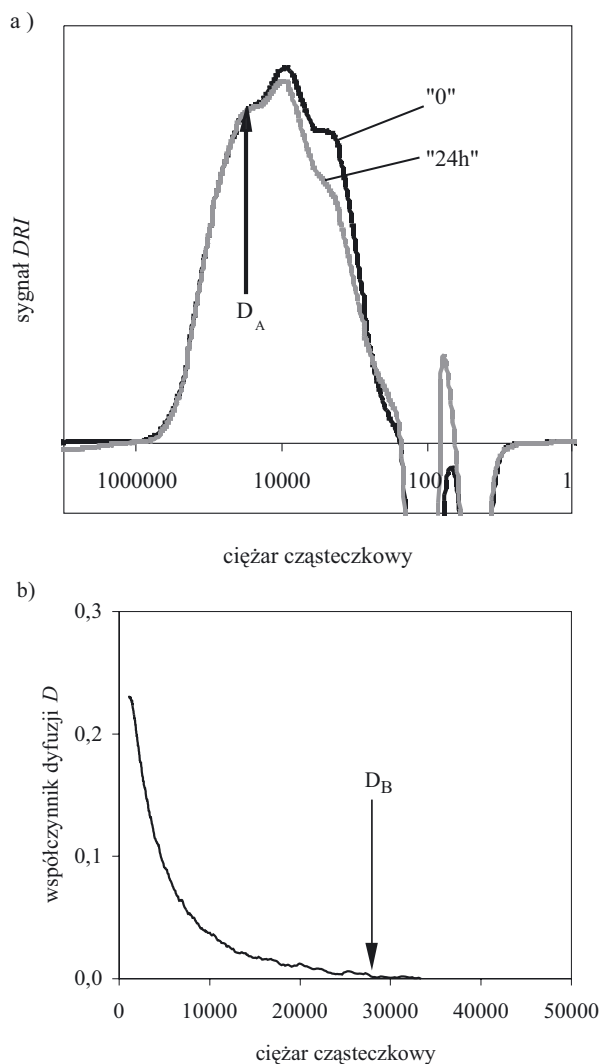
— ustalenia wartości ciężaru cząsteczkowego (D_B) dekstranu odpowiadającej zerowemu współczynnikowi dyfuzji D na rys. 2b.

Wartości D odnoszące się do poszczególnych ciężarów cząsteczkowych dekstranu oblicza się na podstawie równania

$$D = \frac{RI_0 - RI_{24}}{RI_0} \quad (2)$$

gdzie: RI_0 i RI_{24} — wartości sygnałów detektora DRI na rys. 2a.

Metoda ta prowadzi więc do uzyskiwania dwóch wartości ciężarów cząsteczkowych — pierwotnej D_A i wtórnej D_B obarczonej co najmniej takim samym



Rys. 2. Górna granica wykluczenia wyznaczana z wykorzystaniem techniki chromatografii żelowej: (a) chromatogramy próbek „0” i „24”, (b) współczynnik dyfuzji (D) w funkcji ciężaru cząsteczkowego wzorcowego dekstranu obliczony na podstawie rys. 2a [6]

Fig. 2. Molar mass cut-off determination by GPC method: (a) chromatograms of the samples „0” and „24”, (b) diffusion coefficient D versus molecular weight of dextran standard, calculated on the basis of Fig. 2a [6]

błędem pomiarowym jak D_A . W niniejszej pracy przedstawiamy obydwie te wartości (por. tabela 1), w dyskusji wyników powołujemy się jednak głównie na wartość D_A jako pierwotną.

Badania zmęczeniowe

Hydrożelowe mikrosfery bądź mikrokapsułki zanurzone w wodzie cyklicznie odkształcano (ściskano) do poziomu ok. 50 % deformacji w ciągu kolejno 20, 100, 200, 400 i 600 cykli. Czas jednego cyklu wynosił ok. 1,5 s; wytrzymałość na ściskanie oznaczano po podanych seriach cykli. W celu otrzymania statystycznie wiarygodnych wyników, badaniom poddawano co najmniej 10 mikrokapsulek/mikrosfer w każdej próbie.

Badania relaksacyjne

Badania te prowadzono za pomocą wspomnianej już maszyny wytrzymałościowej „Rolle Z 2,5”, także z prędkością natarcia głowicy wynoszącą 1 mm/s. Polegały one na wstępnym odkształceniu układów hydrożelowych do zadanego poziomu deformacji (50-proc. lub 80-proc.), a następnie na ciągłej rejestracji przez 200 s (z częstotliwością 10 punktów pomiarowych na sekundę) siły nacisku. Obserwowane w wyniku zmian strukturalnych hydrożeli „zjawisko relaksacji” prowadzi do stopniowego zmniejszania wartości rejestrowanej siły. Przyjęty poziom deformacji odpowiadał wartości początkowej siły nacisku równej 60—70 % (50-proc. deformacja) i 80—90 % (80-proc. deformacja) ustalonej przez nas maksymalnej wytrzymałości na ściskanie badanych układów hydrożelowych.

Podobnie jak w przypadku badania maksymalnej wytrzymałości na ściskanie, i tu oceniano mikrokapsułki oraz mikrosfery bezpośrednio po ich wyjęciu z wody; zauważono przy tym częściowe wydzielanie się z nich wody podczas szybkiego ściskania.

Wyniki przeprowadzonych testów relaksacyjnych różnych badanych układów przedstawiano graficznie jako zmiany siły nacisku w funkcji czasu (czyli tzw. krzywe relaksacji), po czym dokonywano wzajemnego skorelowania krzywej i opisującej ją równania matematycznego [11].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Do najbardziej interesujących, oznaczanych w prosty sposób parametrów opisujących materiały żelowe zalicza się: wytrzymałość na ściskanie oraz stopień deformacji i porowatość. Ponieważ jednak seria próbek materiału na podstawie żelu tego samego typu nie zawsze jest jednorodna, to wartości maksymalnej siły nacisku bądź stopnia deformacji znacznie się od siebie różnią, a wyniki prostych badań wytrzymałościowych nie pozwalają na pełną charakterystykę otrzymanych produktów [12]. Dlatego też w celu określenia ich rzeczywistych właściwości mechanicznych przeprowadziliśmy trzy grupy badań:

- standardowe, w których oznaczano maksymalną wytrzymałość mechaniczną na ściskanie — podstawową cechę badanych układów,
- relaksacyjne,
- zmęczeniowe.

We wszystkich tych grupach badań zastosowano jednakową szybkość odkształcania wynoszącą 1 mm/s, ponieważ wiadomo, że już w warunkach szybkości $> 0,6$ mm/s wyniki badań mechanicznych hydrożelowych mikrokapsuł są niezależne od ich średnicy [13].

Wytrzymałość na ściskanie

Ocena wytrzymałości na ściskanie polegała na pomiarze maksymalnej siły nacisku, pod wpływem której

nie następuje jeszcze zniszczenie zewnętrznej struktury mikrosfer i mikrokapsulek. W przypadku otrzymywanych na drodze dwuetapowej mikrokapsulek występują charakterystyczne pęknięcia zewnętrznej membrany, objawiające się zmniejszeniem wartości siły nacisku, po czym jej zwiększeniem aż do chwili całkowitego zniszczenia hydrożelowego rdzenia mikrokapsułki (alginian/ Ca^{2+}) [7]. Dane zestawione w tabeli 1 potwierdzają typowy wpływ stężenia alginianu na maksymalną wytrzymałość na ściskanie otrzymanych mikrosfer, mianowicie zastosowanie roztworu alginianu sodu o stężeniu 0,75 % powoduje gwałtowny wzrost ich wytrzymałości. Natomiast w przypadku mikrokapsulek otrzymywanych z 1,5-proc. roztworu alginianu sodu i formowanych na drodze modyfikacji mikrosfer chitozaniem zarówno niemodyfikowanym, jak i modyfikowanym można zauważyć monotoniczny wzrost wytrzymałości wraz ze wzrostem stężenia roztworu użytego oligochitozenu. Jednak, niezależnie od tego stężenia, otrzymane materiały charakteryzują się zdecydowanie mniejszą wytrzymałością niż wyjściowe mikrosfery. Dodatkowa modyfikacja oligochitozanu, praktycznie biorąc, nie wpływa na wytrzymałość na ściskanie formowanych kapsulek.

Tabela 1. Wpływ stężenia roztworów alginianu oraz oligochitozanu na maksymalną wytrzymałość na ściskanie (F_{max}) i porowatość (górną granicę wykluczania) badanych układów

T a b l e 1. Effects of alginate and oligochitosan solutions concentrations on compression strength and porosity (molar mass cut-off) of the systems investigated

L.p.	Skład układu i stężenie użytych roztworów (% mas.)	F_{max} , N	Górna granica wykluczania	
			D_A	D_B
1	0,5 % alginian/ Ca^{2+}	3,2 ($\pm 0,51$)	120 000	400 000
2	0,75 % alginian/ Ca^{2+}	3,9 ($\pm 0,76$)	110 000	230 000
3	1,0 % alginian/ Ca^{2+}	6,3 ($\pm 0,66$)	90 000	130 000
4	1,5 % alginian/ Ca^{2+}	14,2 ($\pm 1,96$)	75 000	100 000
5	1,5 % alginian/ Ca^{2+} /0,5 % oligochitozan	3,7 ($\pm 0,42$)	58 000	37 000
6	1,5 % alginian/ Ca^{2+} /1 % oligochitozan	5,6 ($\pm 0,77$)	40 000	25 000
7	1,5 % alginian/ Ca^{2+} /2 % oligochitozan	7,4 ($\pm 0,96$)	21 000	22 000
8	1,5 % alginian/ Ca^{2+} /0,5 % oligochitozan mod.	3,6 ($\pm 0,43$)	40 000	29 000
9	1,5 % alginian/ Ca^{2+} /1 % oligochitozan mod.	5,5 ($\pm 0,78$)	25 000	18 000
10	1,5 % alginian/ Ca^{2+} /2 % oligochitozan mod.	8,4 ($\pm 0,92$)	10 000	10 000

Porowatość

W charakterystyce układów hydrożelowych opisywanych w niniejszej pracy, poza właściwościami mechanicznymi bardzo istotne jest wiarygodne określenie ich parametrów morfologicznych. Oceniany przez nas sto-

pień porowatości wyznacza kierunek zastosowania mikrokapsulek jako potencjalnych nośników szeregu związków chemicznych wykorzystywanych w przemyśle medycznym, farmaceutycznym, a także spożywczym. Wymiar porów membran hydrożelowych bezpośrednio wpływa na szybkość uwalniania zawartej w takich kapsułach substancji, a więc na możliwość kontrolowanego ich dozowania w zależności od potrzeb. Zbadaliśmy porowatość układów w postaci mikrosfer hydrożelowych uzyskanych poprzez zastosowanie roztworów alginianu sodu o różnym stężeniu (tabela 1), a także mikrokapsulek otrzymywanych na drodze pokrywania mikrosfer kationowym oligochitozaniem w celu wytworzenia dodatkowej zewnętrznej membrany. Określano tzw. górną granicę porowatości wykorzystując zjawisko wykluczania przestrzennego makrocząsteczek o średnicy uniemożliwiającej ich penetrację przez zewnętrzną warstwę mikrosfer lub dodatkową membranę mikrokapsulek. Na podstawie wyników zestawionych w tabeli 1 można stwierdzić, że wraz ze wzrostem stężenia roztworu użytego w procesie tworzenia mikrosfer alginianu znacznie zmniejsza się porowatość otrzymanych hydrożeli (wartości D_A i D_B), a dodatkowa modyfikacja kationowym oligochitozaniem wpływa na dalsze ograniczenie porowatości. Ograniczenie to staje się coraz bardziej widoczne wraz ze zwiększaniem stężenia roztworu chitozanu (zarówno niemodyfikowanego, jak i modyfikowanego).

Tak więc sterując tylko jednym parametrem, mianowicie stężeniem roztworów alginianu i chitozanu, można zmieniać porowatość mikrokapsulek i mikrosfer w bardzo szerokim zakresie wartości D_A . Wykorzystanie pochodnych chitozanu zawierających czwartorzędowe grupy amoniowe pozwala na otrzymanie układów charakteryzujących się najmniejszą porowatością, co prawdopodobnie wiąże się z tworzeniem większej niż w przypadku niemodyfikowanego oligochitozanu liczby wiązań sieciujących w reakcji z grupami karboksylowymi alginianu. Dodatkowo, dzięki lepszej rozpuszczalności takich pochodnych chitozanu, jest możliwe — w celu otrzymywania mechanicznie stabilnych mikrokapsulek w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (tzn. w roztworach o pH ok. 7,0) — zastosowanie modyfikowanych oligochitozanów w szerszym przedziale ich ciężarów cząsteczkowych [9]. Uzyskane w ten sposób membrany charakteryzują się większą homogenicznością [14].

Badania zmęczeniowe

Próby zmęczeniowe posłużyły do określenia wpływu działania cyklicznie zmiennego obciążenia na wytrzymałość wybranych mikrosfer i mikrokapsulek. W układach rzeczywistych zarówno mikrokapsułki, jak i mikrosfery są narażone właśnie na cyklicznie zmienne obciążenia, które mogą prowadzić do zmian strukturalnych układu hydrożelowego, zatem do zmian jego właściwości mechanicznych, a w konsekwencji — również

porowatości. W związku z tym badania zmęczeniowe mają ogromne znaczenie w tzw. laboratoryjnych testach weryfikujących możliwość zastosowania danego układu hydrożelowego w praktyce. Układy tego rodzaju o stosunkowo dużej wyjściowej wytrzymałości na ściskanie i charakteryzujące się brakiem istotnej zmiany wytrzymałości pod wpływem badań zmęczeniowych, mają największe możliwości technicznego zastosowania. Przeprowadzone przez nas badania wybranych mikrosfer i mikrokapsulek (tabela 2) wskazują na spełnianie tego warunku — różnice między wynikami mieszczą się w przedziale odchylenia standardowego $\pm 15\%$.

Tabela 2. Wyniki badań zmęczeniowych wybranych układów hydrożelowych

Table 2. Fatigue tests results of selected hydrogel systems

Badany układ	Liczba cykli	Wytrzymałość na ściskanie, N
Mikrosfery (L.p. 4 w tabeli 1)	0	14,6
	20	14,2
	100	12,8
	200	11,3
	400	13,5
	600	13,8
Mikrokapsułki (L.p. 6 w tabeli 1)	0	5,6
	20	5,3
	100	7,2
	200	7,0
	400	6,0
	600	5,9

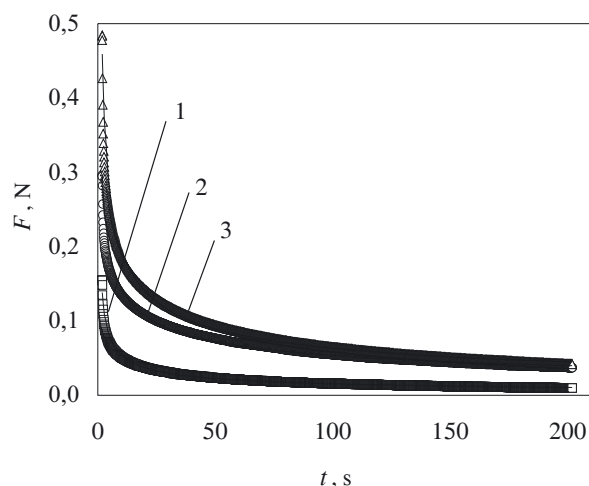
Badania relaksacyjne

Aby wykazać możliwości zastosowania tego rodzaju niedestrukcyjnych badań do określenia strukturalnych właściwości sferycznych materiałów hydrożelowych przeprowadziliśmy dodatkowo badania relaksacyjne. Przykład przebiegu zarejestrowanych przez nas krzywych relaksacji mechanicznej ilustruje rys. 3. Autorzy [11] zaproponowali wspomniane już w części doświadczalnej ogólne równanie matematyczne opisujące zmiany relaksacyjne odnoszące się do hydrożelowych mikrosfer alginian/ Ca^{2+} . Ma ono postać następującej zależności wykładniczej:

$$F_t = F_\infty + A \cdot e^{-k \cdot t} \quad (3)$$

gdzie: F_t — wartość siły rejestrowanej w pomiarach relaksacyjnych po czasie t , F_∞ — wartość siły w czasie dążącym do nieskończoności, A — współczynnik przedwykładniczy, k — współczynnik uwarunkowany strukturą morfologiczną badanego materiału (porowatością), t — czas.

Wyniki badań przeprowadzonych w warunkach 50-proc. i 80-proc. wstępnej deformacji interpolowano do ogólnej postaci krzywej wykładniczej najlepiej opisującej zaobserwowane zmiany:



Rys. 3. Zależność relaksacji mechanicznej (siły nacisku F) w funkcji czasu (t) w odniesieniu do mikrosfer formowanych w układzie roztwór alginianu sodu/1-proc. roztwór CaCl_2 ; stężenie roztworów alginianu sodu: 1—0,75 %, 2—1 %, 3—1,5 %
Fig. 3. Time (t) dependence of mechanical relaxation (load force F) for the microspheres formed in the system: sodium alginate solution/1 % solution of CaCl_2 . Sodium alginate solution concentration: 1 — 0.75 %, 2 — 1 %, 3 — 1.5 %

$$F_{(x)} = F_\infty + A \cdot e^{-k \cdot t} + A_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t^2} \quad (4)$$

We wszystkich przypadkach wartość członu $A_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t^2}$ stanowiła mniej niż 2 % wartości siły $F_{(x)}$, dlatego też została pominięta w dalszych rozważaniach.

Porównanie średnich wartości współczynników A i k funkcji wykładniczych odnoszących się do poszczególnych układów sferycznych wykazało brak jakiegokolwiek logicznej korelacji z wynikami badań w warunkach 80-proc. deformacji. Prawdopodobnie jest to efekt powstawania po tak dużym odkształceniu nieodwracalnych zmian (mikropęknięć), co odnotowano już we wcześniej opisanych w literaturze badaniach relaksacyjnych [11]. W przypadku 50-proc. deformacji otrzymaliśmy natomiast powtarzalne wyniki z bardzo dużymi współczynnikami korelacji i małymi odchyleniami standardowymi w odniesieniu do poszczególnych wyrazów wolnych i współczynników w równaniach charakteryzujących ten rodzaj krzywej wykładniczej (F_∞ , A oraz k), (tabela 3).

Po wstępnej analizie otrzymanych wyników (tabela 1 i 3) dokonano w postaci graficznej prób następujących korelacji ze współczynnikami A oraz k a także wyrazem wolnym F_∞ , występującymi w równaniu (3):

- wytrzymałości mechanicznej na ściskanie w funkcji współczynnika A (rys. 4);
- górnej granicy wykluczania D_A w funkcji odwrotności współczynnika k ($1/k$) (rys. 5);
- wytrzymałości mechanicznej na ściskanie w funkcji F_∞ (rys. 6).

Analiza zmian wytrzymałości mechanicznej podczas ściskania w funkcji współczynnika A (rys. 4) wskazuje na liniowy charakter takich zależności w odniesieniu do

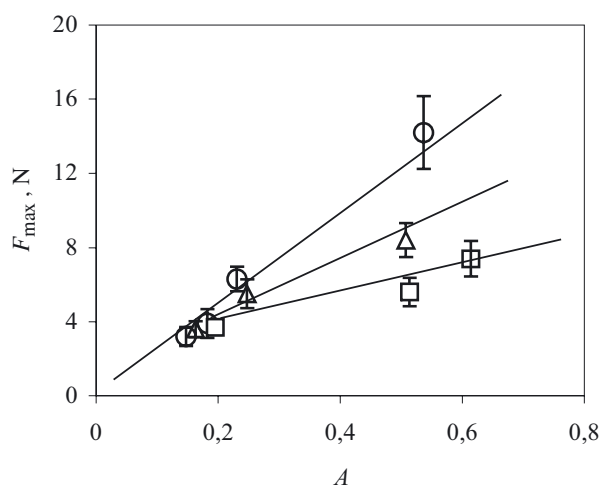
T a b e l a 3. Występujące w ogólnym równaniu (3) wyrazy wolne oraz współczynniki [wraz z odpowiednimi wartościami odchylenia standardowego i współczynników korelacji (R)] odnoszące się do wyników pomiarów relaksacji badanych układów hydrożelowych poddanych 50-proc. deformacji

T a b e l e 3. Free terms and coefficients in general equation (3) [and respective values of standard deviation and correlation factor (R)] concerning the results of relaxation measurements of the investigated hydrogel systems, subjected to 50 % deformation

L.p. ^{*)}	F_{∞} , mN	$A \cdot 10^3$	$1/k$	R^2
1	0 (± 0)	147 ($\pm 2,0$)	4,04 ($\pm 0,066$)	0,966
2	9,7 ($\pm 0,1$)	182 ($\pm 3,0$)	2,22 ($\pm 0,032$)	0,988
3	37 ($\pm 0,19$)	230 ($\pm 3,4$)	2,76 ($\pm 0,040$)	0,993
4	45,0 ($\pm 0,26$)	536 ($\pm 9,8$)	2,10 ($\pm 0,033$)	0,990
5	38,5 ($\pm 0,18$)	195 ($\pm 2,1$)	3,93 ($\pm 0,054$)	0,995
6	37,8 ($\pm 0,22$)	513 ($\pm 7,4$)	2,64 ($\pm 0,038$)	0,992
7	32,1 ($\pm 0,19$)	614 ($\pm 9,0$)	2,22 ($\pm 0,031$)	0,991
8	40,8 ($\pm 0,18$)	163 ($\pm 1,8$)	3,71 ($\pm 0,054$)	0,995
9	35,0 ($\pm 0,19$)	247 ($\pm 3,0$)	3,12 ($\pm 0,045$)	0,994
10	31,0 ($\pm 0,19$)	507 ($\pm 7,9$)	2,31 ($\pm 0,033$)	0,991

^{*)} l.p. układów — por. tabela 1.

wszystkich badanych układów — zarówno mikrosfer, jak i mikrokapsulek. W przypadku mikrokapsulek można zauważyć, że utworzone linie przecinają się w punkcie odpowiadającym wartościom F_{max} , charakterystycznym dla mikrosfer 0,5—0,75-proc. roztwór alginianu/ Ca^{2+} , a nie dla mikrosfer 1,5-proc. roztwór alginianu/ Ca^{2+} , stanowiących wyjściową podstawę mikrokapsulek. Wyniki te mogą wskazywać na zmianę morfolo-

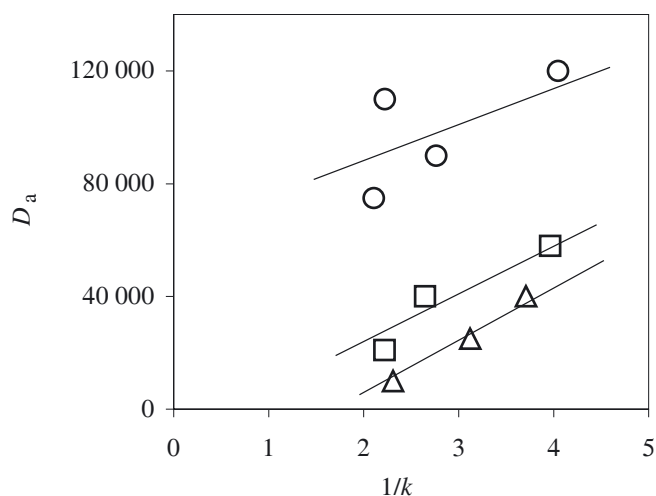


Rys. 4. Zależność maksymalnej wytrzymałości na ściskanie (F_{max}) od współczynnika A (o — mikrosfery alginian/ Ca^{2+} ; □ — mikrokapsułki alginian/ Ca^{2+} /oligochitozan niemodyfikowany; Δ — mikrokapsułki alginian/ Ca^{2+} /oligochitozan modyfikowany; mikrokapsułki zostały uformowane na podstawie mikrosfer 1,5 % alginian/ Ca^{2+})

Fig. 4. Compression strength (F_{max}) versus coefficient A (o — alginate/ Ca^{2+} microspheres, □ — alginate/ Ca^{2+} /unmodified oligochitosan microcapsules, Δ — alginate/ Ca^{2+} /modified oligochitosan microcapsules; microcapsules were formed on the basis of 1.5 % alginate/ Ca^{2+} microspheres)

gicznego charakteru rdzenia formowanych mikrokapsulek.

Współczynnik k , a dokładnie jego odwrotność, prawdopodobnie charakteryzujący strukturę morfologiczną takich układów [11], jest tylko pośrednio związany z górną granicą wykluczania (D_A) badanych materiałów (rys. 5). Zależności te są widoczne zwłaszcza w przypadku układów otrzymywanych z zastosowaniem takich samych stężeń wyjściowych roztworów reagentów (w odniesieniu do mikrosfer oraz obu rodzajów mikrokapsulek).

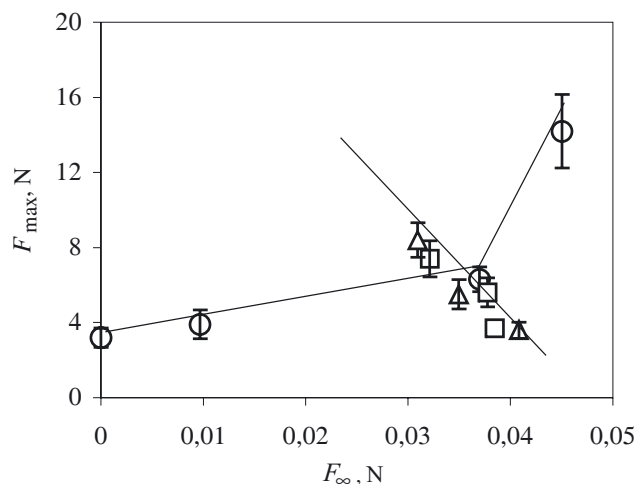


Rys. 5. Zależność górnej granicy wykluczania (D_A) od odwrotności współczynnika k ($1/k$); oznaczenia jak na rys. 4

Fig. 5. Molar mass cut-off (D_A) versus inverse of the coefficient k ($1/k$); denotations as in Fig. 4

Natomiast współczynnik F_{∞} , odpowiadający wartości siły, do której dąży krzywa relaksacji w czasie $t \rightarrow \infty$, jest prawdopodobnie związany wyłącznie z wytrzymałością na ściskanie hydrożelu alginian/ Ca^{2+} (czyli mikrosfer lub rdzenia mikrokapsulek), a nie tworzącego się kompleksu alginian/ Ca^{2+} /oligochitozan (tj. dodatkowej membrany mikrokapsulek). Potwierdzeniem tego może być obserwowany odmienny kierunek zmian wartości współczynnika F_{∞} dotyczącego mikrosfer w porównaniu z odpowiednimi wartościami odnoszącymi się do mikrokapsulek (rys. 6). Mianowicie, w pierwszym przypadku wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia roztworu alginianu sodu obserwujemy jednoczesny wzrost wytrzymałości na ściskanie i zwiększanie się wartości tego współczynnika, natomiast w przypadku mikrokapsulek wraz ze wzrostem stężenia roztworów oligochitozanów, zastosowanych do powlekania wyjściowych mikrosfer (z 1,5-proc. roztworu alginianu/ Ca^{2+}), obserwuje się zwiększenie F_{max} (tabela 1), ale w połączeniu ze zmniejszaniem F_{∞} (tabela 3).

Oczywiście, przedstawione wnioski należy traktować jako wstępne potwierdzenie zaproponowanej hipotezy.



Rys. 6. Wytrzymałość na ściskanie (F_{max}) w funkcji F_{∞} ; oznaczenia jak na rys. 4

Fig. 6. Compression strength (F_{max}) versus F_{∞} ; denotations as in Fig. 4

tezy o możliwości zastosowania powyższych korelacji do opisu zmian właściwości mechanicznych hydrożelowych układów sferycznych (tu — mikrosfer i mikrokapsulek). Hipoteza ta zostanie zweryfikowana w naszych kolejnych pracach doświadczalnych z zastosowaniem innych sferycznych układów hydrożelowych.

PODSUMOWANIE

Analiza otrzymanych wyników potwierdza tezę, że poprzez zmianę stężenia użytego roztworu alginianu sodu można kontrolować porowatość oraz wytrzymałość mechaniczną (wytrzymałość na ściskanie) badanych układów hydrożelowych w postaci mikrosfer. Zastosowanie dwuetapowego procesu formowania pozwoliło na zmniejszenie stopnia porowatości tak otrzymywanych mikrokapsulek w porównaniu z mikrosferami otrzymywanymi jednoetapowo. Wykorzystanie pochodnych chitozanu zawierających czwartorzędowe grupy amoniowe, dzięki ich lepszemu rozpuszczalności w wodnych roztworach, umożliwia poszerzenie przedziału ciężarów cząsteczkowych stosowanych substratów polimerowych i oligomerowych oraz formowanie z nich mikrokapsulek stabilnych mechanicznie i o zmniejszonej porowatości. W testach zmęczeniowych dotyczących wybranych układów badanych w warunkach

powtarzalnych cyklicznych ok. 50-proc. odkształceń nie obserwuje się widocznej zmiany właściwości mechanicznych (wytrzymałości na ściskanie). Wyniki badań relaksacyjnych potwierdziły zależności między porowatością i wytrzymałością mikrokapsulek oraz mikrosfer, a współczynnikami w równaniu opisującym krzywą relaksacji. Zadowalająca wytrzymałość na ściskanie, a także niewielkie wartości porowatości zewnętrznej membrany wskazują, że układy formowane metodą dwuetapową z wykorzystaniem oligochitozanu bądź jego pochodnej amoniowej potencjalnie mogą być wykorzystywane w różnych technologiach bioimmobilizacji.

Praca naukowa finansowana ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki w latach 2003—2006 jako projekt badawczy zamawiany.

LITERATURA

1. Renken A., Hunkeler D.: *Polimery* 1998, **43**, 530.
2. Gupta P., Vermani K., Garg S.: *Drug Discov. Today* 2002, **7** nr 10, 569.
3. Florjańczyk Z., Penczek S.: „Chemia polimerów” — tom III, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1998, str. 175—178.
4. Bartkowiak A., Hunkeler D.: *Chem. Mat.* 1999, **11** nr 9, 2486.
5. Prokop A., Hunkeler D., Powers A. C., Whitesell R. R., Wang T. G.: *Adv. Polym. Sci.* 1998, **136**, 53.
6. Bartkowiak A.: „Binary polyelectrolyte microcapsules based on natural polysaccharides”, *Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej* 2001, 566.
7. Bartkowiak A., Lisiecki S., Orive G., Pedraz J. L.: *J. Chem. Technol. & Biotechnol.* 2006, **81(4)**, 511.
8. Struszczyk M. H.: *Polimery* 2002, **47**, 316.
9. Zgł. patent. PL P 372 100 (2004).
10. Brylak W., Bartkowiak A.: *Mat. konf. „XII International Workshop on Bioencapsulation”*, Vitoria 2004, 287—290.
11. Zhao L., Zhang Z.: *Artif. Cells, Blood Subst. Biotechnol.* 2004, **32**, 25.
12. Carin M., Barthes-Biesel D., Edwards-Levy F., Postel C., Andrei D. C.: *Biotechnol. Bioeng.* 2003, **82** nr 2, 207.
13. Wang C.X., Cowen C., Zhang Z., Thomas C. R.: *Chem. Eng. Sci.* 2005, **60** nr 23, 6649.
14. Wandrey Ch., Bartkowiak A.: *J. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2001, **180**, nr 1-2, 141.