

DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA V ANALÝZE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

PETRA ŠEVČÍKOVÁ^a, VĚRA KAŠPÁRKOVÁ^{a,b},
JIŘÍ KREJČÍ^a a PAVLÍNA VLTAVSKÁ^a

^a Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 760 01 Zlín, ^b Centrum polymerních systémů, Univerzitní institut, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Nad Ovcírnou 3685, 760 01 Zlín
psevcikova@ft.utb.cz, vkasparkova@ft.utb.cz

Došlo 18.4.13, přijato 14.6.13.

Klíčová slova: dynamický rozptyl světla, mikroemulze, nanoemulze, povrchově aktivní látka

Úvod

V posledních letech došlo k výraznému rozvoji metod zabývajících se problematikou měření velikosti částic disperzních soustav a tím i k jejich rozšíření především do průmyslové praxe. Jednou z těchto metod, která je rutinním způsobem stále častěji využívána v řadě průmyslových odvětví, je metoda dynamického rozptylu světla¹.

Dynamický rozptyl světla (DLS), rovněž nazývaný jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) nebo fotonová korelační spektroskopie (PCS), je metoda vhodná pro měření velikosti částic v submikronové oblasti^{2,3,4}. Základem této neinvazivní techniky je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty. Tyto fluktuace souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na nestacionárních částicích disperzní fáze, podléhajících Brownovu pohybu¹. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Rychlost těchto změn je tudíž přímo závislá na pohybu molekuly⁵. Okamžitou hodnotu fluktuace intenzity v čase τ popisuje pro monodisperzní systém autokorelační funkce $g(\tau)$ definovaná vztahem:

$$g(\tau) = \exp[-\tau/\tau_c]$$

kde τ_c je relaxační čas, který je charakterizován jako doba potřebná k návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. Hodnota relaxačního času je v úzkém vztahu k difuznímu koeficientu D rozptylujících částic, který lze vyjádřit pomocí rovnice:

$$\tau_c = 1/Dq^2$$

kde q je absolutní hodnota vlnového vektoru, daná vlnovou délkou primárního světelného paprsku λ a úhlem θ , pod nímž je měřena intenzita rozptýleného světla: $q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2)$ (cit.¹).

Velikost částic lze pak vypočítat pomocí translačního difuzního koeficientu D prostřednictvím Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

$$d(H) = kT/3\pi\eta D$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částice, D je translační difuzní koeficient, k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí^{2,6,7}.

Nespornými výhodami této metody je rychlý a jednoduchý průběh měření, které trvá obvykle od několika sekund do 10 minut (cit.^{3,8,9}), metoda je absolutní (kalibrace pomocí standardů o známé velikosti a distribuci není nutná), analýza velikosti částic vyžaduje jen velmi malé množství vzorku a měřicí zařízení je komerčně dostupné s automatizací včetně analýzy dat^{8,9}. Jednou z hlavních výhod této techniky je její využití při analýze velikosti částic s rozměry od několika nanometrů až do 1 až 2 μm (cit.^{8,10}).

Kritickým krokem u většiny aplikací DLS je čištění a plnění měřicí kyvety, do které přichází vzorek. Pokud se v roztoku objeví prach nebo mikrobublinky, může dojít k narušení nebo překrytí signálu analytu a měření pak může být zatíženo artefakty⁵. Z tohoto důvodu je nezbytná filtrace všech používaných kapalin, zvláště vody, a důkladné čištění kyvet, pipet a stříkaček⁸.

Dynamický rozptyl světla je metoda, která je vhodná pro přesné stanovení velikosti částic v suspenzích¹¹. Lze ji využít při charakterizaci emulzí, micel, liposomů, latexů a pigmentů. Velmi zajímavé uplatnění si tato metoda našla také v biologické a mikrobiologické oblasti pracující s materiálem, jako jsou bakterie, viry, proteiny a DNA⁸.

Cílem tohoto příspěvku bylo prakticky dokumentovat širokou využitelnost metody dynamického rozptylu světla, a to jak při měření velikosti částic povrchově aktivních látek (PAL), tak i při charakterizaci relevantních emulzních systémů, mikroemulzí, nanoemulzí a klasických emulzí s velikostí částic v měřicím rozsahu přístroje.

Experimentální část

Příprava vzorků

Povrchově aktivní látky (PAL): Anionická PAL lauroyl sarkosinát sodný (SDSa) (Merck) a neionické PAL Igepal CA 720, Tween 20 a Tween 60 (Sigma-Aldrich) byly rozpuštěny v demineralizované vodě v koncentracích, které ležely vždy nad hodnotou jejich kritické micelární koncentrace (CMC).

Mikroemulze: Stabilní mikroemulze 1-monoacylglycerolů (1-MAG) byly připraveny na základě předem sestrojených fázových diagramů. Olejovou složku mikroemulze tvořil roztok 1-MAG v ethanolu (1-butanolu) v poměru 1:2 (hm.%). Tyto dva alkoholy s krátkou délkou řetězce sloužily zároveň jako kosurfaktanty. Byly použity monoacylglyceroly s nasycenou mastnou kyselinou o různé délce uhlíkového řetězce, C10, C11, C12 a C14, které byly připraveny na Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky Fakulty technologické, UTB ve Zlíně postu-

pem popsaným v publikaci¹². Jako PAL byl zvolen Tween 80 (Sigma-Aldrich). Jelikož mikroemulze vznikají spontánně, byly vodná a olejová složka v předem stanoveném poměru smíchány s PAL a kosurfaktantem a systém byl krátce homogenizován.

Nanoemulze: Nanoemulze undekanu ve vodě byly připraveny metodou fázové inverze. Na přípravu směsi o požadované hodnotě HLB byla použita vhodná dvojice neionických PAL Igepal 210 (HLB = 4), Igepal 520 (HLB = 10) a Igepal 720 (HLB = 14,7). Hodnota HLB vyjadřuje hydrofilně-lipofilní rovnováhu mezi polární a nepolární částí molekuly tenzidu. Výsledné HLB hodnoty směsi PAL byly vypočítány z individuálních hodnot HLB udaných dodavatelem pomocí rovnice $HLB = x_1 \cdot HLB_1 + x_2 \cdot HLB_2$, kde x_1 a x_2 jsou hmotnostní zlomky použitých PAL s hodnotami HLB_1 a HLB_2 . Emulgace probíhala při laboratorní teplotě (25 °C) pomocí míchadla RZR 2020 (Heidolph), při rychlosti míchání 1050 ot./min. Byly připraveny nanoemulze s následujícími poměry olej/voda: 10/90, 15/85, 20/80, 25/75 a 30/70. Celkové množství PAL v emulzi činilo 3 nebo 5 hm.%. Na základě předběžných studií¹³ byly použity PAL o HLB hodnotách 9; 5; 10; 10,5; 11 a 11,5.

Úprava vzorku pro DLS

Měření velikosti částic pomocí DLS probíhalo u PAL a mikroemulzí bez dalšího ředění vzorku, a to tak, že 1 ml dané suspenze byl pipetován do plastové kyvety a použit pro analýzu. U nanoemulzí bylo vždy nutno vzorky zředit. Pro měření bylo použito 5 μ l vzorku dané emulze v 1 ml sterilní, demineralizované vody, která byla dvakrát filtrována. Všechna měření velikosti částic byla prováděna při teplotě 25 °C a rozptylovém úhlu 173°. Vyhodnocení výsledků bylo zpracováno na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK).

Kontrola přístroje Zeta Nano ZS

Správnost měření velikosti částic byla prověřena analýzou suspenze monodisperzního standardu polystyrénového latexu o nominálním průměru velikosti částic 60 nm (Thermo Scientific). Jako disperzní médium byl použit roztok NaCl o koncentraci 9 mg ml⁻¹. Pro vlastní měření byl použit 1 ml roztoku NaCl a 5 μ l standardu. Získané výsledky analýzy prokázaly, že hodnoty velikosti částic polystyrénového latexu ležely v rozmezí 59 \pm 2,5 nm, udávaném pro tuto nominální velikost částic standardu dodavatelem.

Jako součást kontroly měření byla stanovena i opakovatelnost měření velikosti částic emulzí (z-průměr), která byla vyjádřena pomocí směrodatné odchylky devíti analýz. Při z-průměru 149,1 nm byla směrodatná odchylka 0,76 nm.

Výsledky a diskuse

Velikost částic

Micely ionických i neionických PAL lze studovat řadou metod. Dynamický rozptyl světla je jednou z nich a vzhledem k sub-mikronovému pracovnímu rozsahu je metodou velmi vhodnou. Aplikovatelnost metody pro analýzu micel byla testována měřením velikosti micel vybraných ionických i neionických PAL a jejich směsí. Výsledky zahrnující hodnoty z-průměru velikosti částic jsou shrnuty v tab. I.

Z tabulky je zřejmé, že v případě PAL Tween 20 a Tween 60 dokáže metoda spolehlivě rozlišit velikosti micel obou neionických PAL i stanovit velikost směsné micely vzniklé po smísení obou PAL v poměru 50/50. Micely Tweenu 60 (13 \pm 0,1 nm) jsou větší než Tweenu 20 (8,4 \pm 0,1 nm), což je v dobré shodě se strukturou obou PAL. Analýza ionické PAL laurylsarkosinátu sodného, pro který byla publikována velikost micely 2,2 nm (cit.¹⁴), byla stanovena pomocí DLS na 2,7 nm. Velikost micel PAL Igepal 720 stanovená v této práci je však větší (7,1 \pm 0,2 nm) než její rozměr získaný touto metodou v práci¹⁵ (4,5 nm).

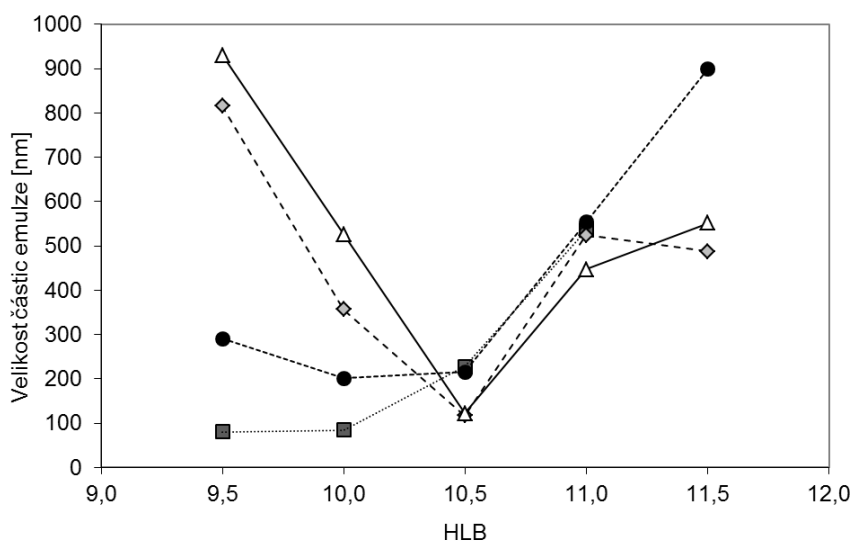
Analýza 1-MAG mikroemulzí prokázala přítomnost částic s velikostí v rozmezí 11 až 24 nm, což dle publikací^{16,17} odpovídá rozsahu očekávanému pro tyto emulzní systémy, tedy 10 až 50 nm. Výsledky získané z měření distribuce velikosti částic ukázaly u většiny vzorků na přítomnost úzké monomodální distribuce, svědčící o výskytu jedné populace částic.

Výsledky analýzy nanoemulzí ukazují, že velikost jejich částic je významně ovlivněna jak hodnotou HLB použitých PAL, tak také poměrem olejové a vodné (O/V) fáze. Obr. 1 znázorňuje vztah mezi HLB a velikostí částic pro sledované poměry O/V a 3% koncentraci povrchově aktivních látek. Z obrázku je patrná optimální hodnota HLB 10,5, při které byly u všech studovaných poměrů O/V připraveny nanoemulze, tedy emulze s velikostí částic menší než 200 nm. Toto zjištění je v souladu se závěry práce¹³, která pro úspěšnou tvorbu stabilních emulzních systémů s undekanem jako olejovou fází doporučuje pou-

Tabulka I

Velikost micel studovaných povrchově aktivních látek stanovená jako průměr sedmi měření a směrodatná odchylka σ stanovení

PAL	z-průměr \pm σ [nm]
Tween 20	8 \pm 0,1
Tween 60	13,0 \pm 0,1
Tween 20/Tween 60 v poměru 50/50	9,0 \pm 0,1
SDSa	2,7 \pm 0,1
Igepal CA 720	7,1 \pm 0,2



Obr. 1. Velikost částic emulzí změřená ihned po jejich přípravě. Vliv hodnoty hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB) a poměru olej/voda (3 % povrchově aktivních látek); ■ 10/90, ◆ 20/80, △ 25/75, ● 30/70

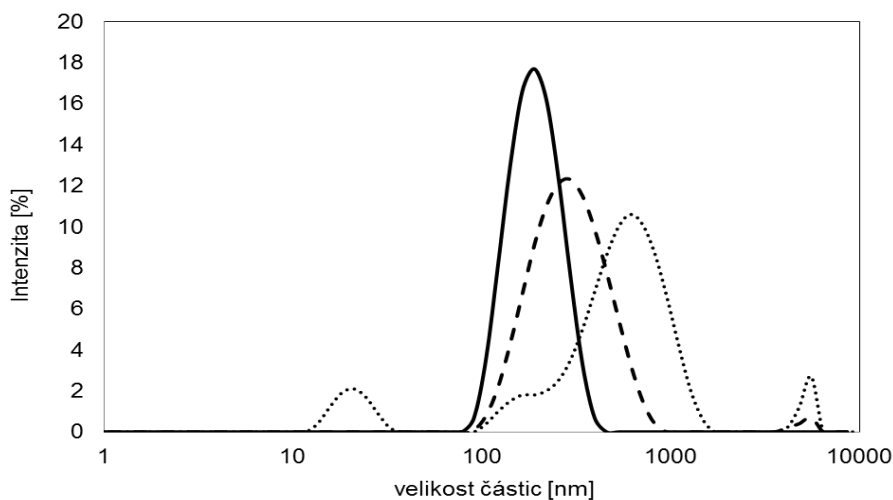
žit PAL v rozmezí HLB hodnot 10 až 11. V přítomnosti PAL s hodnotami HLB vyššími i nižšími než je tato hodnota, lze pozorovat vzrůstající velikost částic po obou stranách optima HLB. S klesající hodnotou HLB byla rovněž zjištěna značná nestabilita připravených emulzních systémů, zejména při poměru O/V 10/90 a HLB 9,5. Z obr. 1 je dále zřejmý charakteristický tvar závislosti mezi velikostí částic a HLB, který byl rovněž uveden v pracích^{18,19}, zabývajících se přípravou emulzních systémů typu O/V pomocí neionických PAL.

Odlišnosti ve velikosti částic byly dále pozorovány při použití rozdílného množství PAL (3 a 5 hm.%). Podle Chanada a spol.²⁰ by měla velikost částic s rostoucí kon-

centrací povrchově aktivní látky klesat. Tento předpoklad byl v převážné většině studovaných nanoemulzních systémů potvrzen.

Stabilita nanoemulzí

Stabilita nanoemulzí byla hodnocena prostřednictvím změn velikostí částic a jejich distribuce v čase. Výsledky prokázaly, že stabilita je ovlivněna nejen jejich složením a způsobem přípravy, ale především dobou a teplotou jejich skladování. Obr. 2 znázorňuje průběh a změny v distribuci velikostí částic nanoemulze během skladování při teplotě 25 °C. Ihned po výrobě vykazovala tato nanoemul-



Obr. 2. Změny distribuce velikostí částic nanoemulze během skladování při teplotě 25 °C. Ihned po výrobě (plná čára), po 4 dnech (přerušovaná čára) a po 11 dnech (tečkovaná čára)

ze úzkou monomodální distribucí částic se z-průměrem 193 nm. Po 4 dnech skladování se velikost částic zvýšila na 228 nm za současného vzniku další populace částic, pohybující se v limitní oblasti přístroje udávanou výrobem na 6 μm . Na distribuční křivce zaznamenané po 11 dnech skladování je pak patrný i výskyt třetí populace částic s velikostí desítek nanometrů a vzrůst z-průměru částic na 398 nm.

Závěr

Výsledky studie, která se zabývá stanovením velikostí a distribuce částic povrchově aktivních látek, jejich směsí a emulzních systémů pomocí metody dynamického rozptylu světla potvrdily, že metoda je schopna relativně snadno a rychle stanovit velikosti částic disperzních systémů, které se liší jak svou velikostí (micely < 10 nm, mikroemulze 10–50 nm, nanoemulze 50–200 nm a emulze >500 nm), tak také postupem přípravy. Z výše uvedených poznatků tedy plyne možnost využít DLS k základní charakterizaci částicových systémů v řadě aplikačních oblastí, jako jsou např. medicína, farmacie, kosmetika, potravinářství, polymerní průmysl nebo průmysl barev a nátěrových hmot. Z experimentů je zřejmá i vhodnost této techniky při sledování stability disperzních systémů, s částicemi v submikronové oblasti, prostřednictvím sledování změn distribuce velikostí částic v čase, a dále také její informační potenciál při stanovení přítomnosti jedné nebo více populací částic zhodnocením průběhu distribučních křivek.

Tento článek byl vytvořen za podpory Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace, jenž je spolufinancován Evropským fondem pro regionální rozvoj (ERDF) a státním rozpočtem České republiky, v rámci projektu Centra polymerních systémů (CZ.1.05/2.1.00/03.0111). Tato práce vznikla také za podpory interního grantu UTB ve Zlíně č. IGA/FT/2013/016 financovaného z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu.

LITERATURA

1. Kvítek L., Novotný R., Píkal P.: Chem. Listy 92, 431 (1998).
2. Flippen R. B., v knize: *Modern Methods of Polymer Characterization* (Barth H., Mays J. W., ed.), kap. 10. J. Wiley, New York 1991.
3. Hassellöv M., Readman J. W., Ranville J. F., Tiede K.: *Ecotoxicology* 17, 344 (2008).
4. Pabst W., Gregorová E.: *Charakterizace částic a částicových soustav*. VŠCHT, Praha 2007.
5. Jackson K.: *Chemmagazín* 1, 12 (2007).
6. Mezinárodní norma ISO 13321: *Particle size analysis – Photon correlation spectroscopy*.
7. Kaszuba M., McKnight D., Connah M. T., McNeil-Watson F. K., Nobbmann U.: *J. Nanopart. Res.* 10, 823 (2008).
8. Meyers R. A.: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. J. Wiley, New York 2011.
9. Weiner B. B., v knize: *Modern Methods of Particle Size Analysis* (Barth H. G., ed.), sv. 73, kap. 3. J. Wiley, New York 1984.
10. Alexander M., Dalgleish D. G.: *Food Biophys.* 1, 2 (2006).
11. McClements D. J.: *Food emulsions: Principles, Practices and Techniques*. CRC Press, London 2005.
12. Janiš R., Klásek A., Bobálová J.: *J. Food Lipids* 13, 199 (2006).
13. Yamaguchi S.: *Langmuir* 14, 7183 (1998).
14. Rao J. N., Kim Y. E., Park L. S., Ulmer T. S.: *J. Mol. Biol.* 390, 516 (2009).
15. Ghosh S. K., Khatua K., Bhattacharya S. Ch.: *Int. J. Mol. Sci.* 4, 562 (2003).
16. Garti N., Yuli-Amar I., v knize: *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals* (Garti N., ed.), kap. 6. CRC Press, Cambridge 2008.
17. Heuschkel S., Goebel A., Neubert R. H.: *J. Pharm. Sci.* 97, 603 (2008).
18. Florence A. T., Attwood D.: *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Pharmaceutical Press, London 2006.
19. Prinderre P., Piccerelle P., Cature E., Kalantzis G., Reynier J. P., Joachim J.: *Int. J. Pharm.* 163, 73 (1998).
20. Chanada G. D., Sheth B. B.: *J. Pharm. Sci. Technol.* 49, 71 (1995).

P. Ševčíková^a, V. Kašpárková^{a,b}, J. Krejčí^a, and P. Vltavská^a (^a Department of Fat, Surfactant and Cosmetics Technologies, Faculty of Technology, ^b Centre of Polymer Systems, Tomas Bata University, Zlín): **Dynamic Light Scattering in Analysis of Colloidal Systems**

Dynamic light scattering (DLS) is a non-invasive technique, capable of measuring the size of submicron particles in the submicron range. The study was focused on the applicability of DLS in measurement of colloidal particles of different types. The micelle sizes of surfactants (Tween 60, Tween 20, Igepal CA 720 and Na lauryl sarcosinate) and particle sizes of micro- and nanoemulsions were measured. The diameters of surfactant micelles were 13.0±0.1 nm, 8.4±0.1 nm, 7.1±0.2 nm and 2.7±0.1 nm for Tween 60, Tween 20, Igepal CA 720 and Na lauryl sarcosinate, respectively. Stability of nanoemulsions as a consequence of the changes of particle size distributions in storage was monitored. The results revealed the presence of uni-, bi- and trimodal distributions reflecting the occurrence of various particle populations as well as a shift of distribution curves due to the particle growth. It was confirmed that DLS can provide reliable and rapid determinations of particle sizes of micro-, nano- and classical emulsions.