

XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia (OTDK)

Veszprém, 2015 április 9-11

Indigó kármin inkubálása szol-gél bevonatokba

Szerző:

Szőke Árpád Ferenc

Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Kémia-és Vegyészmérnöki Kar, Szerves anyagok kémiája és technológiája, kőolaj- és szénkémia szak, IV. év

Témavezetők:

dr. Hórvölgyi Zoltán professzor, BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék, Kolloidkémiai Csoport

dr. Szabó Gabriella egyetemi adjunktus, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Kémia-és Vegyészmérnöki Kar, Fizikai kémia tanszék

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
1. Általános elméleti bevezető	
1.1. Az indigó kármin (IC)	4
1.2. A kitozán	5-7
1.3. Alkalmazott módszerek	8-9
1.4. Inkubált polimerek	10
1.5. Módosított elektródok	11-12
1.6. Gyógyszer hatóanyag leadás	13-14
2. Kísérleti rész	
2.1. Felhasznált anyagok és eszközök	15
2.2. Bevezető	16
2.3. Inkubálás pórusos szilika bevonatba	16-17
2.4. Inkubálás kitozán bevonatba	18-21
2.5. IC kiengedése kitozán rétegekből	
2.5.1. Bevezető	21-22
2.5.2. IC kiengedése bázikus közegben	22-23
2.5.3. IC kiengedése savas közegben	24-25
2.6. Térhálósított kitozán	26
2.7. Az IC kalibrációja	26-27
2.8. A kitozán film vastagsága. Az IC feldúsulása	
2.8.1. Rétegvastagság meghatározása	27-29
2.8.2. A réteg felületének és térfogatának a meghatározása	30
2.9. Következtetések	31
3. Mellékletek	
3.1. Képmelléklet	32-33
3.2. Bibliográfia	34-36

Bevezetés

Különböző fémionok klasszikus minőségi és mennyiségi vizsgálati módszerei elég nehézkesek. Átmenetei fémeket rendszerint színes komplexek formájában mutatunk ki, míg alkálifémeket többek között lángfotometriával. Ezekben az esetekben a méréshez szükséges műszer helyigénye elég nagy, a mérés menet sem egyszerű. A korszerű módszerek egyike fémionok analízisére a módosított elektród.

Az indigó kármin képes komplexet képezni rézzel, továbbá képes beágyazódni polimer filmekbe. Ezek ismeretében módosított elektródot szerettem volna létrehozni - réz szenzor gyártása céljából. A következő nehézséget az jelentette, hogy a megkötött színezék stabilan megkötve maradjon, miközben a réz ionok szabadon áramlanak az oldat és a polimer mátrix között, miközben komplexet képez az indigó kárminnal. A dolgozatomban tárgyalok az ilyen módosított elektródok működéséről, létrehozásáról és jelentőségéről.

Manapság igen fontosak a biokompatibilis polimerek. Számos alkalmazásuk létezik és számos potenciális alkalmazást vizsgálnak. Az egyik a mátrixanyagként való felhasználás a gyógyászatban, melynek során a polimer granulátumban vagy filmben megkötünk egy hatóanyag-molekulát, amit aztán a mátrixanyag lead a páciens szervezetében. A leadás sebességét, helyét könnyen lehet módosítani a polimer tulajdonságainak a módosításával.

A kutatások során gyakori a modell hatóanyag használata egy valós hatóanyag helyett a könnyebb vizsgálhatóság érdekében. Ezek rendszerint festékek.

Az indigó kármin festék segítségével vizsgálni lehet a kitozán bevonatok hatóanyag leadó tulajdonságait, ezáltal segítve nyújtott hatóanyag leadó és célzott hatóanyag leadó rendszerek létrehozását.

.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szabó Gabriella tanárnőnek a lehetőségért, illetve az útmutatásért a kutatásaim során. Köszönöm a Balassi Intézetnek, Dr. Hórvölgyi Zoltán tanár úrnak, Volentiru Emőkének és a BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék, Kolloidkémiai Csoportjának a lehetőséget, hogy Budapesten folytathattam le a kutatásaim egy részét, továbbá a kolozsvári és budapesti diáktársaknak, akik mindig segítettek, amiben tudtak!

1. Általános elméleti bevezető

1.1. Az indigó kármin (IC)

Az indigó kármin vízben oldódó, indigoid színezék.(1.1.

és 1.2. Ábra)

Anionos jellegű és Na-sóját hozzák forgalomba. A molekulára jellemző az intramolekuláris H-kötés.

Nagy mennyiségben gyártott és alkalmazott ételszínezék (E132) [1], gyógyászatban veseműködés vizsgálatára használják fel: mennyi idő alatt szűri ki a vese a vérből - a vizelet jellegzetes elszíneződésével vizsgálható.

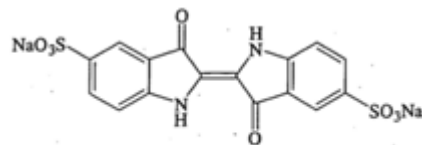
Hő hatására nem bomlik és oldatban is csak hosszabb idő elteltével figyelhető meg bomlás.

Érdemes még megemlíteni, hogy az -NH- csoportoknak hála képes komplexet képezni különböző fémionokkal. (1-es képmelléklet) [2]

Fizikai tulajdonságok:

- Szilárd állapotban kékes-lilás por
- Molekulatömege: $M = 466,36 \text{ g/mol}$
- Oldhatóság: 10 g/L (25°C)
- Olvadáskor bomlik
- Irritáló hatása van belélegezve, megfelelő védőfelszerelés mellett kezelendő

Alkalmazható, mint indikátor, átcsapási tartománya: 11,4 - 14 pH egység.



1.1. Ábra

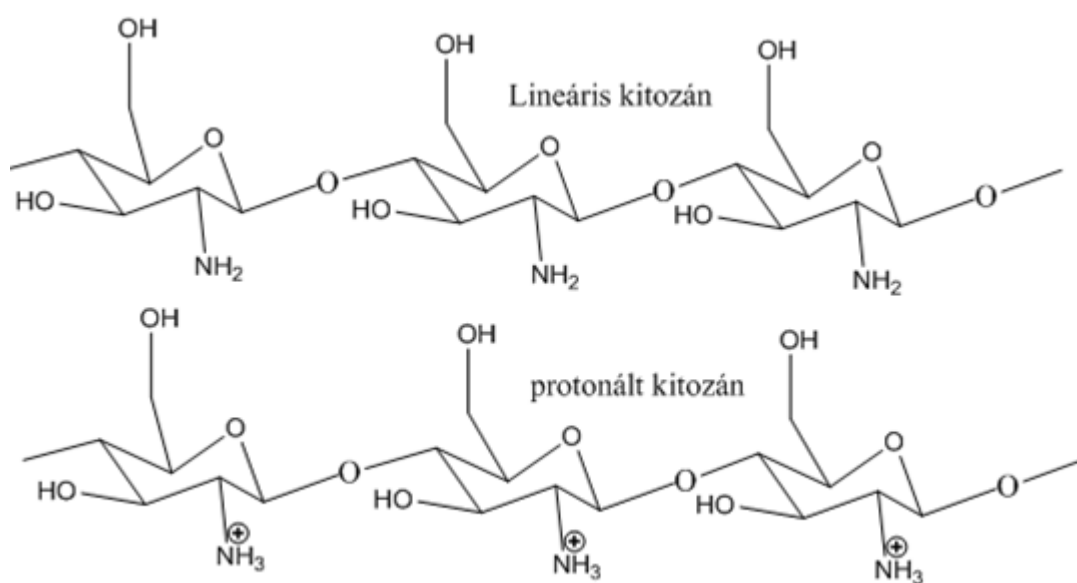


1.2 Ábra

1.2. A kitozán

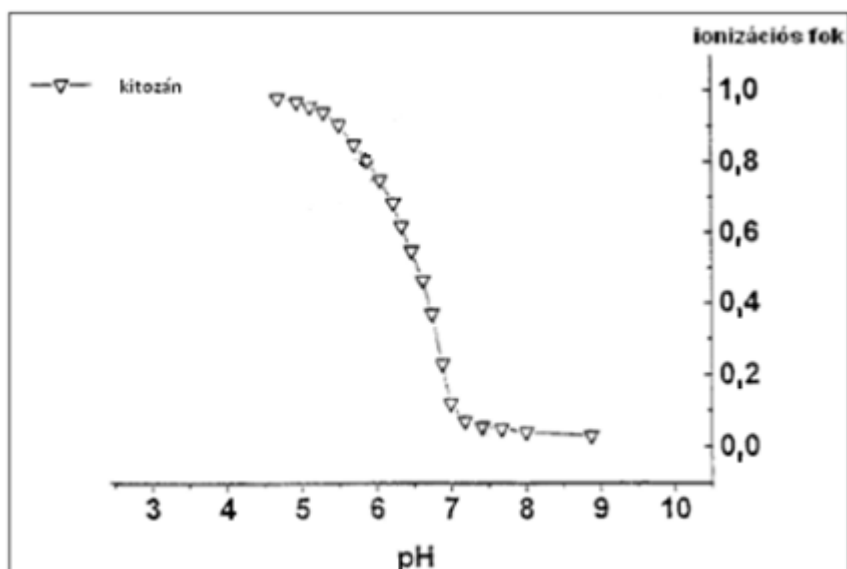
A különböző polimer filmek közül különösen érdekesek, melyek biokompatibilisek. Ilyenek például a pórusos szilika és a kitozán.

A kitozán egy sárgás por, előállítási módtól függően könnyebben, nehezebben oldatba vihető. A makromolekulán levő amin-csoportok már enyhén savas közegben protonálódnak, ami azt eredményezi, hogy a kitozán oldhatóvá válik, viszkózus oldatot képezve. Rendszerint ecetsavban szokás oldani. **1.3. Ábra**



1.3. Ábra

A kitozán ionizációs foka 6-os pH felett gyorsan csökken, 8-as pH-n gyakorlatilag zérus. **1.4. Grafikon** [3]



1.4. Grafikon: kitozán ionizációs fokának pH függése

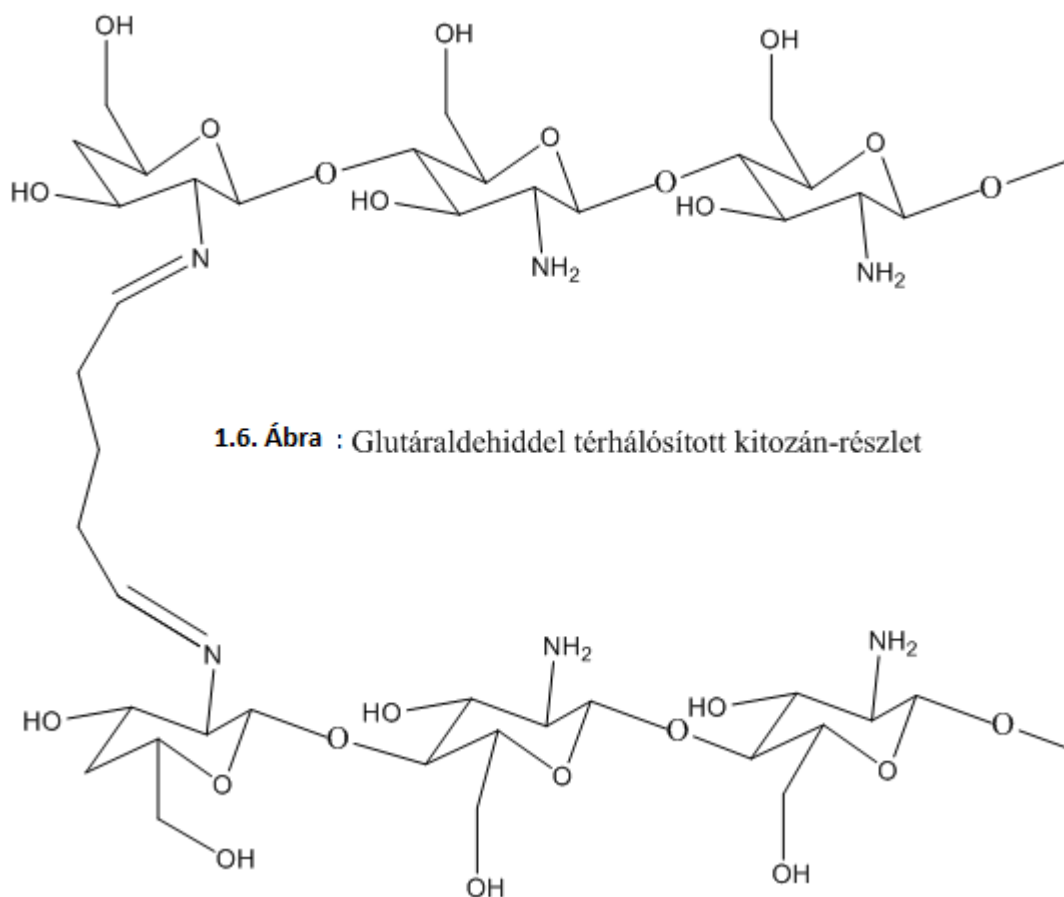
A kitozán számos forrásból származhat és különböző módon készülhet (a gyártás során a reakciólépések egy része felcserélhető). A kitozán alapanyag szezonálisan is változhat, így az alkalmazott vegyszerek tulajdonságait sokszor csak intervallumokban adják meg. Még az azonos forrásból származó, de máskor gyártott vegyszer tulajdonságai is változhatnak. A példa kedvéért feltüntettem pár különböző forrásból származó kitozán (1% oldat) adatait. A viszkozitás 1%-os ecetsav-oldatra vonatkozik. **1.5. Táblázat** [23]

M	Deacetilezettség	por sűrűsége	η_{oldat}
(*10 ⁶ Da)	%	g/ml	cP
1,19	87,6	0,24	134
0,75	100	0,21	40
1,67	98,9	0,18	360
1,11	79,2	0,24	144
0,22	92	0,31	26
0,78	96,6	0,33	52

1.5. Táblázat

Amint látható, a viszkozitás értékek elég nagyok, a kitozán oldat sűrűn folyó lesz.

A kitozánt alkalmazzák nyújtott gyógyszerhatóanyag leadásra [5]. Jelenleg elsősorban a gyógyszerhatóanyag mikro vagy nanorészecskéit vonják be kitozánnal, ezzel gátolva annak a felszabadulását és felszívódását. Ilyen esetben fontos szerepe van a térhálósításnak, mely jelentősen változtathatja a kitozán tulajdonságait. Ez a térhálósítás lehet ionos (többszörös negatív töltésű ionokkal) vagy kovalens (pl. glutáraldehiddel). [6]



Alkalmazzák még mezőgazdaságban [7], [9], véralvadás elősegítőként [8], fogyasztó-tabletták gyártására [10], öngyógyuló felületek létrehozására [11] és víztisztításra [12].

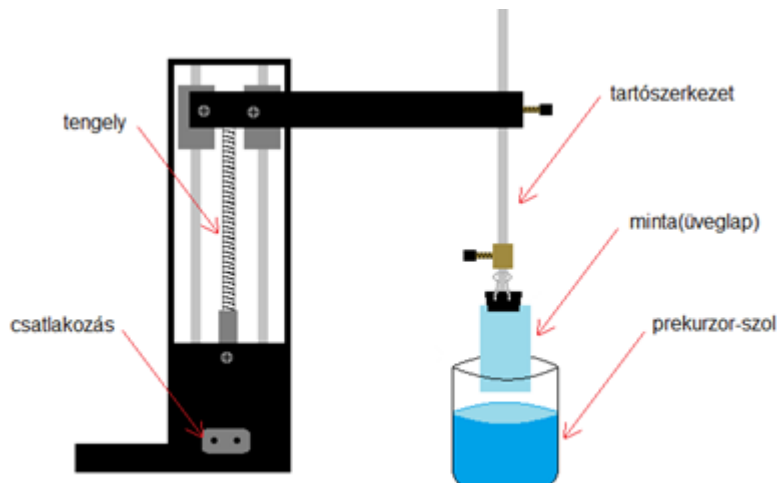
1.3. Alkalmazott módszerek

A mártásos szol-gél vékonyrétegek létrehozása során polimereket vagy szervetlen prekursorokat koncentrálnak be a hordozó felületén egy komplex folyamat segítségével, mely során fontos a gravitáció, a száradás és a folyamatos kondenzációs reakciók. Mindezek egyszerre mennek végbe a rétegeképzés során. A képzett film szerkezete polimerek esetében függ a prekursorban levő részecskék tulajdonságaitól (pl. méret), de a kondenzálódási sebességtől, az oldószer párolgási sebességétől, a kapillaris-nyomástól és a hordozó (szubsztrát) húzási sebességétől is. [13]

A szolok inkoherens rendszerek, a diszperziós kolloidok csoportjába tartoznak. Ezzel szemben a gélek koherens kolloid rendszerek, melyek legjellemzőbb tulajdonsága, hogy valamelyik komponens összefüggő szerkezetet, gélvázat képez.

A szol-gél technika prekursor szol használatát feltételezi (egy ilyen szol előállítható anorganikus oxidok hidrolízisével: SiO_2). Szol-gél nyerhető még makromolekulás anyagok oldatba vitelével is.

Előállíthatóak pórusos és kompakt bevonatok is.



1.7. Ábra: réteghúzó berendezés

A 1.7. Ábra mutatja be, hogyan készülnek a szol-gél bevonatos minták dip-coating eljárással. A szerkezet számítógéphez van csatlakoztatva, ahonnan irányítható a merítési sebesség [14].

A dip-coating eljárás esetében rendszerint a prekursorra merőlegesen mártjuk a hordozót az oldatba. A felületre került réteg egy jól meghatározott száradási vonalnál végződik. [13]

A rétegvastagságot a Landau-Levich egyenlet segítségével lehet meghatározni, vagy számítógéppel, iterációkkal.

A **Landau-Levich egyenletet** [15], [16] szerint kis viszkozitású szol (1% kitozánnál még nem túl nagy a viszkozitás) és nem túl nagy réteghúzási sebesség esetén a rétegvastagság arányos lesz a húzási sebesség hatványával.

$$h = 0,94 \frac{(\eta U_0)^{\frac{2}{3}}}{\gamma_{LV}^{\frac{1}{6}} (\rho g)^{\frac{1}{2}}}$$

1.1. Egyenlet

Ahol:

h - rétegvastagság

η - dinamikus viszkozitás

U_0 - húzási sebesség

γ_{LV} - felületi feszültség a folyadék-levegő határon

ρ - sűrűség

g - gravitációs gyorsulás

A mintákat spektrofotometriásan vizsgáltam. A spektrofotometria esetében érvényes törvényszerűség a BLB (Bouguer–Lambert–Beer) törvény.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

1.2. Egyenlet

Ahol:

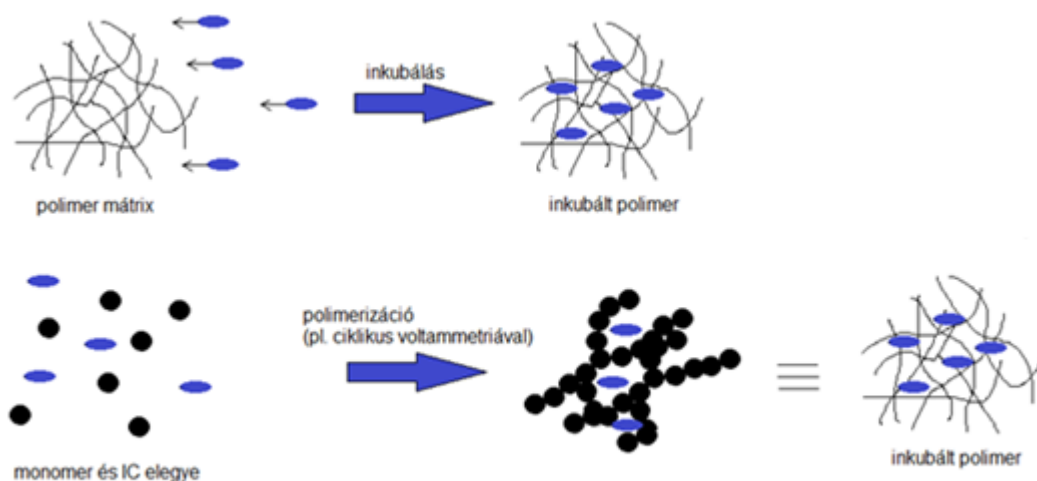
A - abszorbancia

ε - moláris abszorptivitás (1/Mcm)

l - optikai úthossz (cm)

C - moláris koncentráció (M)

1.4. Inkubált polimerek



1.8. Ábra

Az **1.8. Ábra** szemlélteti az inkubált polimer létrejöttét: az első módszer szerint először létrehozok egy polimer bevonatot (általában szol-gélekből), amibe aztán inkubálom az IC-t, ami rendszerint áztatást jelent tömény vizes oldatban ($C_{\max} = 10\text{g/l}$ szobahőmérsékleten).

A másik módszer szerint a monomer és a színezék elegyét polimerizálom valamilyen módszerrel és így jön létre az inkubált polimer. Az első esetben tehát szol-gélekből készítem a bevonatot, a másodikban nagyon tiszta monomer oldatból (bármilyen szennyezés jelentősen befolyásolja a polimerizációt).

1.5. Módosított elektródok

Az első lehetséges alkalmazás, amit vizsgáltam, az a módosított elektród létrehozása volt.

Ezek olyan elektródok, melyek egy bizonyos spécieszre érzékenyek, hasonlóan, mint a H-ionokra érzékeny üveg elektródok (gyakorlatban alkalmazott példa látható az 2-es számú képmellékletben).

Az IC képes komplexet képezni egyes átmeneti fémek ionjával (Cu, Ni, Zn...). [17] Ez a komplexképződés jó lehetőséget teremt egy ilyen szenzor létrehozására.

A pH növekedésével nő a komplexálódás mértéke, 10-es pH körül maximális, így a további adatok erre a pH-ra vonatkoznak.



1.9. Ábra

A **1.9. Ábrán** azonos koncentrációjú IC oldat-párok vannak: balra a tiszta IC oldat, jobbra a komplexált IC; jól látszik a színváltozás

A spektrofotometriás mérések (1. Képmelléklet) alátámasztották a látottakat: IC 1,5-2 Cu^{2+} ionnal képez komplexet. A tiszta színezék abszorbancia maximuma 610 nm közelében van, ez spektrofotométertől függően pár nm-el változhat (körülbelül 608-612 nm között, más könyvészet 615 nm-t említ [17]). Ezzel szemben a komplex abszorbancia maximuma 715-720 nm közti értéknél jelentkezik és elég széles sávú. Az eredeti IC oldatok koncentrációja azonos és ehhez változó mértékben adagoltam Cu^{2+} oldatot. Az ábrán a két legintenzívebb komplexhez rendelhető sáv 1,5 és 2 Cu^{2+} : IC mól aránynál jelentkezik. Jól látható, hogy ezek gyakorlatilag egybeesnek. Kétszeresnél nagyobb réz-ion többlet (4-8) esetében már nem változnak számottevően a maximumok, innen lehet következtetni a komplexben a két anyag arányára. Hasonló arány olvasható a könyvészetben is. [17]

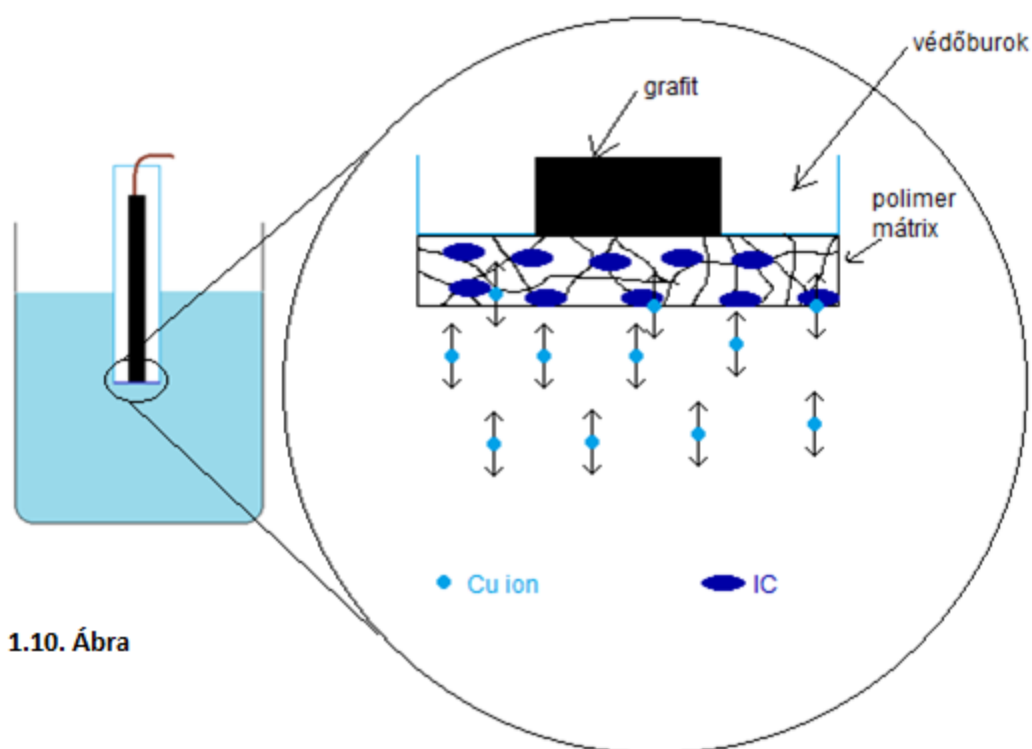
A mérések során átkristályosított CuSO_4 volt a rézion-forrás. Fontos a nagy tisztaság a pufferek esetében is, hiszen nagyobb mennyiségű szennyezés (mely ugyan

nem mutat elnyelést látható tartományban) könnyen befolyásolhatja a rendszerben a tiszta színezéknél látványosan kevésbé oldódó komplex oldhatóságát.

A **1.10. Ábra** az elképzelt elektród működését mutatja be:

Az elektródra (esetünkben grafit) felviszünk egy polimer filmet. Ez a film egy elektromosan vezető anyag, amiben stabilan megkötődik a színezék, ez a kötődés lehet ionos, kovalens vagy H-híd. A fémion ezzel szemben szabadon áramlik az oldat és a polimer film között. Ha a megkötött színezék ilyen formában is képez komplexet a fémionnal (esetünkben réz), akkor ez érzékelhető lesz elektrokémiai módszerrel (esetemben ciklikus voltammetriás mérésekkel [18], [19] próbálkoztam, ahol jellegzetes oxidációs és redukációs maximumok jelennek meg: 3. Képmelléklet).

Próbálkoztam kitozán, polipirrol és szilika filmmel is, de még nem sikerült stabilizálni az inkubált filmet.



1.10. Ábra

Az elektród még kutatási fázisban van.

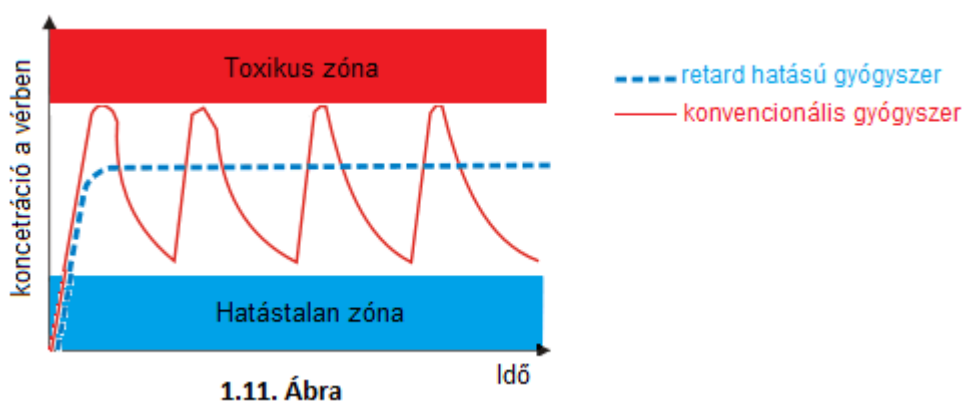
1.6. Gyógyszer hatóanyag leadás

Amennyiben a bevonatot/filmet olyan polimerből készítem, mely biokompatibilis, (vagyis a szervezetre nem káros, az nem támadja meg és nem lökődik ki) akkor ez a film bevihető a szervezetbe. Ha ebben a filmben (mátrix) megkötünk gyógyszerhatóanyagot, akkor, a film egy gyógyszerhatóanyag leadó hordozóvá válik. Az IC mint modell hatóanyag szerepel a kutatásaimban. Ennek előnye, hogy a gyógyszerekkel ellentétben könnyen lehet tanulmányozni a viselkedését a festékekkel inkubált filmeknek.

Ilyen biokompatibilis rendszer a pórusos szilika-IC, illetve a kitozán-IC.

A gyógyszerek esetében nem csak a bevitt hatóanyag mennyisége a fontos, hanem az is, hogy ez hol és mennyi idő alatt szabadul fel, illetve fejt ki hatását. Így megoldható, hogy egy gyógyszer csak egy bizonyos helyen kezdjen hatni (pl. a bélrendszer egy adott szakaszán), de megoldható a nyújtott hatóanyag leadás is.

Gondoljunk csak az egyik legismertebb és széleskörűen alkalmazott ilyen készítményre a Cetebe-re, mely a hatóanyagot 8-12 óra alatt engedi ki [20]. Ennek a nagy előnye: míg az egyszerű tabletták esetében a szervezetből a C-vitamin felesleg kiürül, rengeteg kárba vész, addig lassú kiengedés esetében a vitamin felhasználása a lehető leghatékonyabb lesz.



A módszer előnyeit a **1.11. Ábra** remekül szemlélteti: a konvencionális gyógyszerek esetében az adag bevételekor a gyógyszer mennyiség megközelítheti vagy átlépheti a toxikus határértéket, míg az újabb adag bevétel előtt a hatóanyag mennyiség már közelít a hatástalanhoz. Így csak igen rövid ideig van ideális hatóanyag mennyiség

a páciens szervezetében. Ezzel szemben egy nyújtott hatású gyógyszerrel elérhető, hogy minimális fluktuáció mellett az ideális koncentrációt stabilizáljuk.

Többféle módszer lehetséges a nyújtott hatóanyag kiengedésre. Esetemben egy mátrix-anyagba, ami polimer, beépítünk egy hatóanyagot (vagy hatóanyag modellt), ami pH-tól függően gyorsan vagy lassan szabadul fel.

2. Kísérleti rész

2.1. Felhasznált anyagok és eszközök

Anyagok

- Indigó kármin (analitikai tisztaság, Merck)
- Pluronic PZ 10300 nemionos tenzid, Q-BASF, The Chemical Company
- Tetratethyl orthosilicate, Merck
- Abszolút etanol (99,7%, Reanal)
- Hexadecil-trimetil-ammóniumbromid (*CTAB*, 99%, Acros Organics)
- Sósav-oldat (>37%, Carlo Erba)
- Kénsav (96%, Carlo Erba)
- NaH_2PO_4 monohidrát (Merck, analitikai tisztaság)
- Na_2HPO_4 dihidrát (Reanal, analitikai tisztaság)
- Glutáraldehid (25%, Merck)
- Kitozán (közepes molekulatömegű, Aldrich)
- Na-acetát (trihidrát, Lachner)
- Ecetsav (100%, Merck)

Eszközök

- Thermo Scientific Menzel Gläser üveglapok
- MilliQ víz (Millipore Simplicity 185, vezetőképesség: 18,2 mS/cm)
- Agilent 8453 UV-VIS spektrofotométer
- Cintra 202 UV-VIS spektrofotométer, GBC scientific equipment
- kézi pH mérő (ADWA AD 11)
- Multiméter - pH mérésre (Consort C833)
- Réteghúzó berendezés (MTA-MFA laboratóriumában készült)

2.2. Bevezető

Biokompatibilis polimer vékonyrétegek esetében vizsgáltam a hatóanyag leadást.

A kutatásaim során hatóanyag modellként alkalmaztam az IC színezéket, melynek oka az, hogy az intenzív kék szín miatt könnyen tudtam vizsgálni spektrofotometriásan az inkubált/ kiengedett hatóanyag mennyiséget.

Az IC, mint anionos színezék, negatív töltéssel rendelkezik semleges oldatban, szilárd állapotban pedig Na-sóként van jelen.

Semleges körülmények között az IC olyan felületen vagy anyagban tud megkötődni, amely ellentétes, pozitív töltéssel rendelkezik, vagy képes vele H-kötést, kovalens kötést, dipólus kötést kialakítani.

A kísérletek során kipróbáltam, hogyan viselkedik az IC negatív töltésű felület esetén, illetve akkor, ha ezt a felületet megpróbálom pozitívvá tenni.

Első lépésben megpróbáltam pórusos szilika-felületre inkubálni az IC-t oldatból. Ezt a módszert sikeresen alkalmazták pozitív töltésű modell hatóanyag esetén.

2.3. Inkubálás pórusos szilika bevonatba

A pórusos szilika felületet dip-coating eljárással hoztam létre.

Egy alaposan megtisztított üveglapot prekursor-szol és tenzid [15] oldatainak keverékébe mártottam, majd magas hőmérsékleten (kb. 450 °C) ebből kiégettem a tenzidet és maradt egy pórusos szilika-réteg. [15]

Megjegyzés: ha nem alkalmazok tenzidet, nem pórusos, hanem kompakt réteg keletkezik. A pórusos rétegek előnye a kompakt rétegekkel szemben az, hogy a pórusokba különböző anyagokat lehet bejuttatni, ezáltal jelentősen módosítva a bevonatok tulajdonságait, illetve kibővítvé alkalmazhatósági területüket (pl.: öngyógyuló felületek létrehozása).

Prekursor szol:

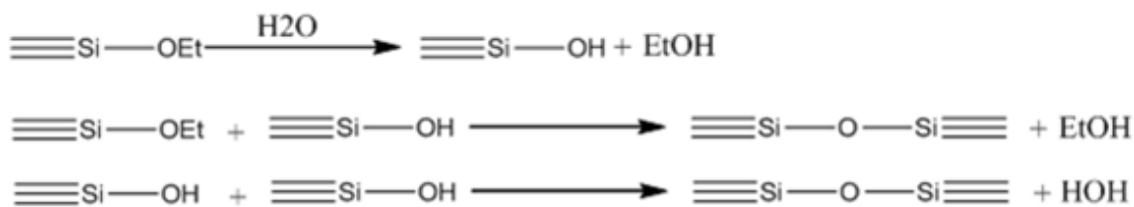
- 8,8 ml tetraetilén-ortoszilikát ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$)
- 4 ml HCl
- 22 ml etanol

Tenzid:

- 1,5 g CTAB: Cetil-trimetil-ammóniumbromid ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$), mely egy kationos tenzid vagy Pluronic, mely egy epoxid/propoxid polimerizálásából készült nemionos tenzid

- 22 ml etanol

Reakciók:



2.12. Ábra : szilikabevonat létrejötte

A réteg felületén, illetve a pórusokban maradnak —OH csoportok, melyek a körülményektől függően (pH) töltést biztosíthatnak a rétegnek.

Semleges, illetve bázikus körülmények között a réteg negatív töltésű, csak erősen savas közegben válik pozitívvá, mivel az —OH csoportok itt már protonálódnak. Így valószínűtlennek tűnt előzetesen, hogy az IC megkötődjön a felületen. Ezt alátámasztották a mérések, melyek szerint IC legfeljebb nyomokban volt megtalálható inkubáció után a felületen, az inkubáló oldat koncentrációjától és pH-jától függetlenül. Amennyiben annyira alacsony pH-n dolgozom, hogy áttöltődik a felület (<2 pH), protonálódnak az IC SO_3^- csoportjai és a színezék továbbra sem képes megkötődni. Ez arra enged következtetni, hogy az IC elsősorban ionosan kötődik. A jelen tapasztalat némileg ellentmond a [21] könyvészetnek, ahol nem vékonyrétegben, de pórusos szilikában kötöttek meg festéket. Ez arra is enged következtetni, hogy a filmek különleges tulajdonságai (melyek eltérnek a csapadékokétól) ebben az esetben is jelentősen befolyásolják a tapasztaltakat.



2.13. Ábra : rodamin 6G-vel inkubált pórusos szilika bevonat

Érdemes megjegyezni, hogy kationos színezék (Rodamin 6 G) esetén igen jó eredményeket értek el ilyen pórusos szilika vékonyrétegeken való megkötés terén, továbbá jól alkalmazható a réteg nyújtott hatóanyag kiengedésre is. 2.13. Ábra [15]

2.4. Inkubálás kitozán bevonatba

Miután azt tapasztaltam, hogy nem sikerült megkötni a pórusos szilika filmben az aninos hatóanyag modellt, pozitív töltésű polimer mátrix-al próbálkoztam. Ilyen a korábban említett kitozán. A kitozán biokompatibilitása miatt megfelel a célnak, továbbá alkalmazható lehet célzott és nyújtott hatóanyag kiengedésre is.

A kitozán lapokat is a dip-coating eljárással állítottam elő: különböző koncentrációjú kitozán (1%, 2%, 2,5%) 1 %-os ecetsavas oldataiból. A következő méréseknél egyaránt **lineáris kitozán**-filmek keletkeznek.

A probléma az, hogy viszkózus anyagok esetén a hordozóra felvitt rétegnek a vastagsága változhat a hordozó mentén. Minden minta esetén tapasztalható volt legalul egy megvastagodott réteg (ezt nem lehetett kiküszöbölni), de a kitozán oldat koncentrációjától és egyúttal a viszkozitástól erősen függött a minta mentén a rétegvastagság változása.

A különböző lapok összehasonlításánál a rétegvastagság vizsgálata helyett a már inkubált lapok abszorbanciáját mértem és ebből következtettem arra, hogy melyik lapokon vastagabb a réteg.

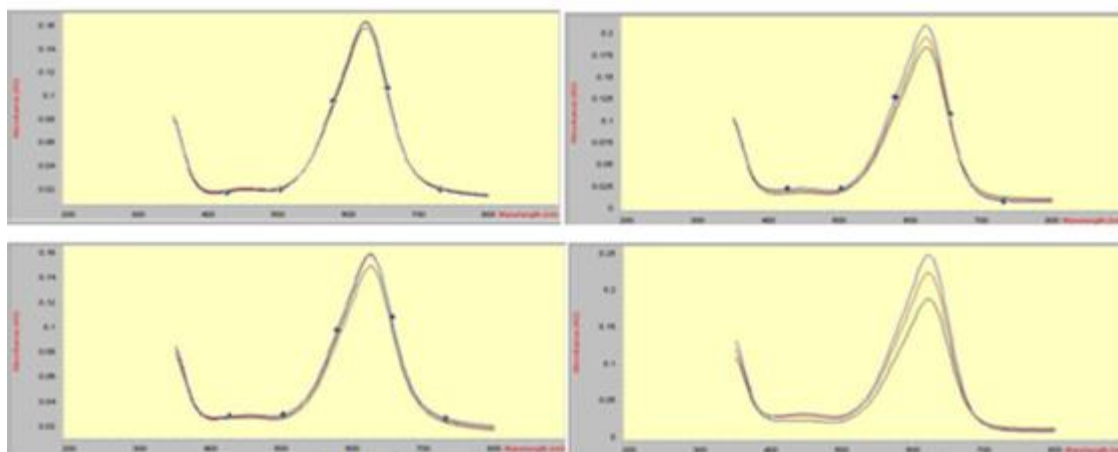
A mérések reprodukibilitása érdekében szükség volt arra, hogy egy vizsgált mintán a rétegvastagság állandó legyen. Ehhez meg kellett határozni az ideális réteghúzási sebességet, illetve az ideális kitozán-töménységet.

Minden esetben 3 pontban mértem az üveglap abszorbanciáját (a réteg tetején, közepén és az alján-még a megvastagodott réteg előtt). Táblázatba foglalva az eltéréseket sikerült meghatározni az ideális paramétereket:

sorszám	mért pont helye	hordozó anyaga	Abszorbancia	eltérés a mért pontok közt	IC-típus	kit konc	állásidő az IC-ben	merítési seb
			-	%		%	min	cm/min
13	fent	üveg	1,13	38,41	SpH	2	5	10
13	közép	üveg	1,401					
13	lent	üveg	1,564					
15	fent	üveg	1,105	21,90	SpH	2	5	2
15	közép	üveg	1,284					
15	lent	üveg	1,347					
17	fent	üveg	0,138	0,43	vizes	1	5	2
17	közép	üveg	0,136					
17	lent	üveg	0,1386					
19	fent	üveg	0,319	17,87	vizes	1	20	10
19	közép	üveg	0,361					
19	lent	üveg	0,376					
20	fent	üveg	0,137	2,41	vizes	1	5	2
20	közép	üveg	0,141					
20	lent	üveg	0,1403					

2.14. Táblázat : különbözőképpen készült minták esetében a 3 mért pont abszorbanciája

A mérések szerint 2%-os kitozán oldat esetében a réteg vastagsága/abszorbanciája jelentősen változott a minta mentén (21,9 % és 38,41 %). Ezzel szemben 1%-os kitozán esetében az eltérés jóval kisebb volt (0,43 %, 2,41% és 17,87 %). Jelentősen befolyásolta még a rétegvastagság egyenletességét a mártási sebesség. Minél nagyobb volt a sebesség, annál vastagabb réteg keletkezett (a 13-as minta abszorbanciája jóval nagyobb, mint a 17 és 20-as minta esetében), egyúttal jobban változott a hossz mentén az abszorbancia.



2.15. Ábra

- bal oldalon 2 cm/min réteghúzási sebesség

- jobb oldalon 10 cm/min réteghúzási sebesség

2.16. Ábra Azonos módon készült IC-al inkubált kitozán-bevonatos üveglapok



A **2.15. Ábrán**: a bal oldali minták 2 cm/min, a jobb oldaliak 10 cm/min sebességgel voltak húzva. Jól látható, hogy, míg a lassabb sebesség mellett a 3 mért pont esetében szinte egybeesnek a spektrumok, addig a másik esetben jelentős eltérések mutatkoznak. (mintától függően akár >20%)

Az, hogy vastagabb réteg keletkezik nagyobb réteghúzási sebességnél nem meglepő: ezt is vártuk a Landau-Levich egyenlet alapján. (**2.15. Ábra**, **1.1. Egyenlet**)

Az IC oldatban való inkubálási idő befolyása kisebb volt, későbbi mérések kiderítették, hogy 10 perc körüli az ideális inkubálási időtartam. Ha tovább inkubáltam a lapokat, már nem változott jelentősen az abszorbancia, de hosszas inkubáció károsíthatja a rétegeket.

Érdemes megemlíteni: a megkötött IC mennyiségét befolyásolta az, hogy mennyi ideig száradt a minta inkubálás előtt. A kitozán jelentősen duzzad víz hatására és csak lassan szárad ki. Így a régóta szárított minták (2-3 nap) kevesebb IC-t kötöttek meg,

mint a percekig szárított minták. Ez jól megfigyelhető a 2.19. , 2.20. és 2.21. **Grafikonokon** a későbbiekben.

Amennyiben a rétegek a hatóanyagot azonnal kiengedik, alkalmazhatóak célzott, amennyiben lassan, alkalmazhatóak retard hatású gyógyszerekhez.

2.5. Az IC kiengedése kitozán rétegekből

2.5.1. Bevezető

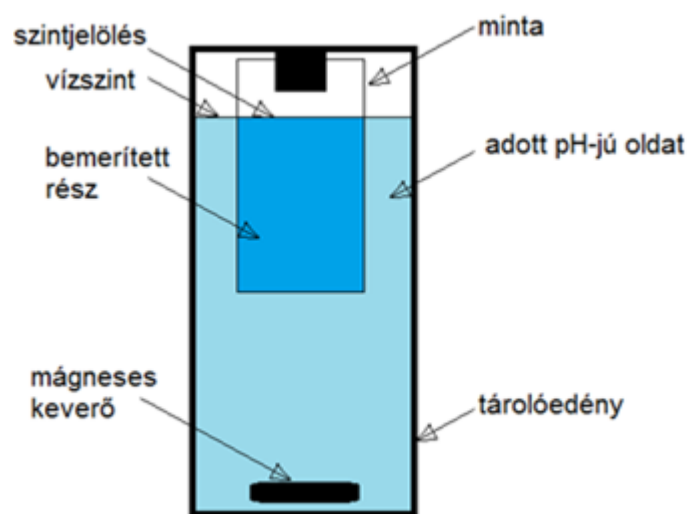
A modell hatóanyag kiengedését különböző pH-kon vizsgáltam. Ezek a pH-k az emberi testnedvek pH-jával egyeztek meg:

- 1-es pH - közel a gyomorsav pH-jához, mely 1 és 2 közti érték
- 5-ös pH - megközelítőleg a bőr pH-ja
- 8-as pH - bélnedvek pH-ja

Pufferek, oldatok:

Az 1-es pH-jú oldatot 1M-os sósav oldattal értem el.

Az 5-ös pH-t acetát pufferrel értem el (NaAc/Ecetsav).



2.17. Ábra

A 8-as pH-jú oldat esetében pedig foszfát-puffert ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) alkalmaztam.

Eljárás (2.17. Ábra): Az adott mennyiségű (40 ml) és pH -jú oldatba helyeztem az azonos módon készült lapokat (3 vizsgált lap minden pH -n). A méréseket szobahőmérsékleten végeztem (25°C, további tervek között szerepel a

hőmérsékletfüggés vizsgálata is). Időközönként az oldatokból mintákat vettem (3 ml) és mértem az abszorbanciát (millipore víz referenciával szemben), majd kalibrációs görbe segítségével megállapítottam a koncentrációt. A mintákat mérés után kiöntöttem majd a számítások legvégén korrekciót hajtottam végre, ami figyelembe vette a mintákban levő és ez által kiöntött modell hatóanyag mennyiségét. A lapokon megjelöltem a bemerítés határát, és mindig lejjebb engedtem annyival a mintát, amennyivel csökkent a folyadékszint a mintavételek miatt.

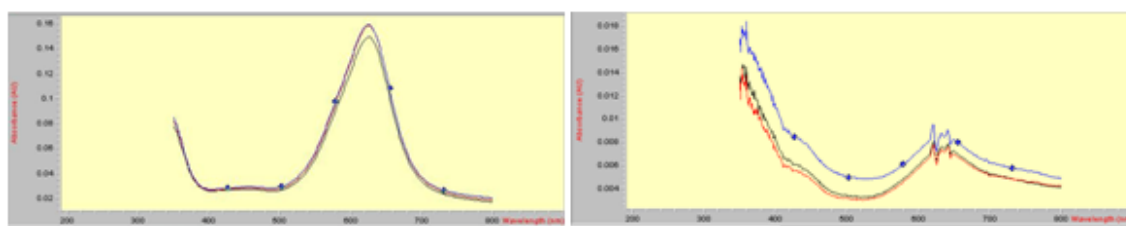
Megjegyzés: a mágneses keverő célja, hogy szimulálja a gyomor mozgását. A gyomorba került gyógyszer állandó keverésen esik át az emberi szervezetben is.

Korrekción: minden mintavételi pontnál meghatároztam az oldatban az IC mennyiségét, de szükség volt egy korrekcióra, mely beleszámítja ebben az előző mérés után kiöntött 3 ml-es mintában levő anyagmennyiséget.

Azért volt szükség erre a mérésmenetre, mert, ha a lapokat kiemelem a mérés idejére az oldatból, a lap kiszáradhat, befolyásolva a további kiengedést (ebben az esetben a lap viszont folyamatosan az oldatban tartózkodik), míg az oldatom a többszörös átöntésnek köszönhetően még a legnagyobb óvatosság ellenére is szennyeződné, ami nagy hibát is eredményezhet ilyen híg oldatnál.

2.5.2. IC kiengedése bázikus közegben

A kitozán ionizációs foka bázikus közegben gyakorlatilag zérus (1.4. Grafikon), így 7-es pH felett ionosan már nem képes megkötni a IC-t. A tapasztalat szerint az IC-vel inkubált kitozán-filmek bázikus közegbe kerülve azonnal kiengedik a színezéket (2.18. Ábra). Ez igen gyors volt, szemmel is jól követhető.



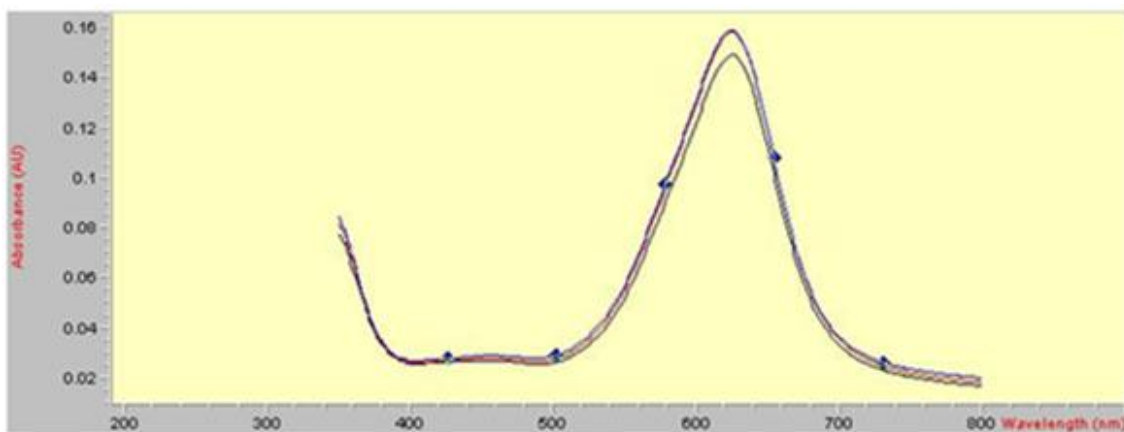
2.18.Ábra

Bal oldalon az eredeti IC-vel inkubált lap abszorbanciája 3 mért ponton, jobb oldalon ugyanaz a lap, 2 perces bázikus áztatás után. A modell hatóanyag pillanatszerűen kioldódott és már csak nyomokban tartalmazott a réteg IC-t. Mivel az IC abszorbanciája arányos a koncentrációval (ha homogénnek tekintem az inkubált filmet, érvényes a BLB törvény - 1.2. Egyenlet), a mérések szerint a teljes modell hatóanyag legalább 95%-a kioldódott.

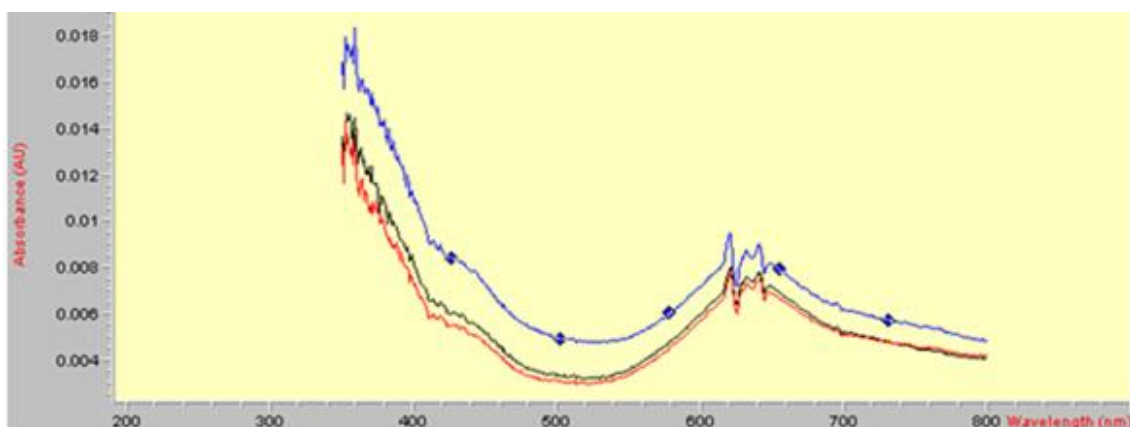
$A \text{ (kezdeti)} = 0,15-0,16$

$A \text{ (kioldás után)} = 0,0075-0,0085$

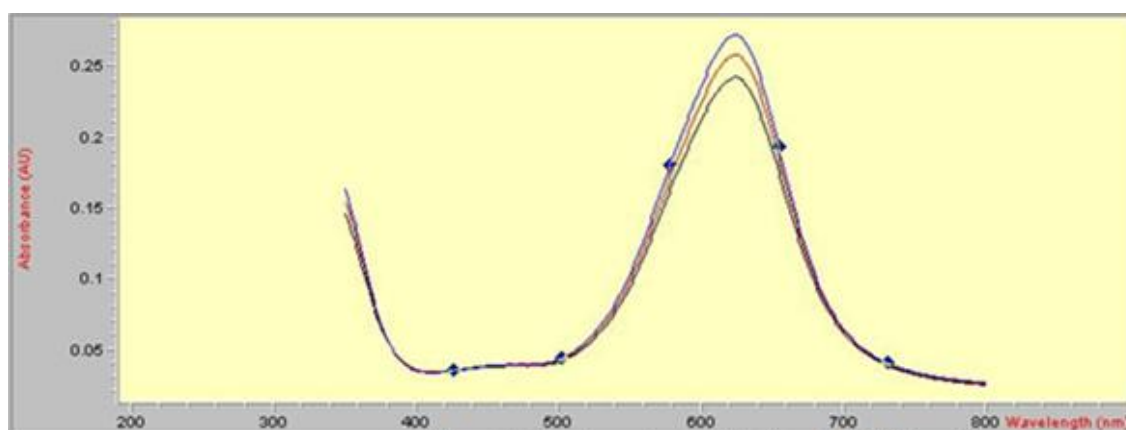
Érdekes megfigyelés, hogy a kitozán film teljesen ép marad a kioldás során, újra inkubálható lesz.



2.19. Ábra: minta abszorbanciája inkubálás után



2.20. Ábra: minta abszorbanciája bázikus kioldás után



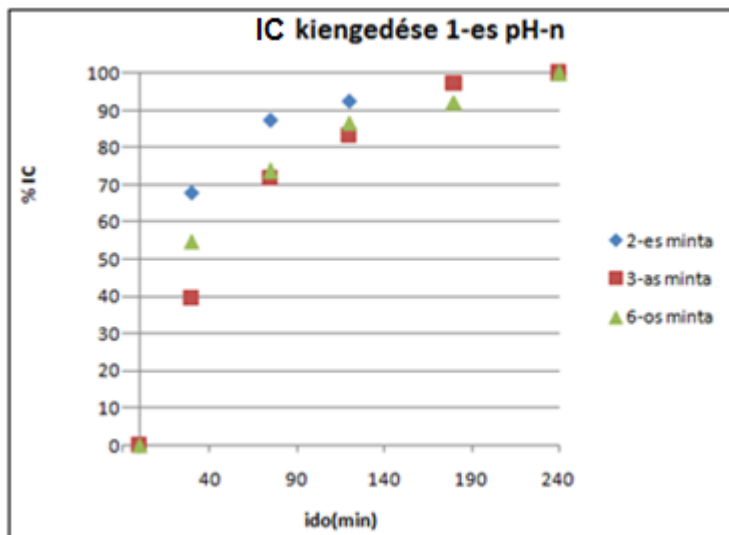
2.21. Ábra: minta abszorbanciája újra-inkubálás után

A 2.19, 2.20 és 2.21. spektrumok ugyanazon lap esetében voltak felvéve. A 2.19. **Grafikon** bázikus áztatás előtt volt felvéve, a 2.20. bázikus áztatás után (csak nyomokban marad IC), a 2.21. szárítás, majd újbóli inkubálás után. Megfigyelhető, hogy a rövid szárítási idő miatt (pár perc) a kitozán film megduzzadva maradt, ami azt eredményezte, hogy az újabb inkubálás során nagyobb mennyiségű anyagot kötött meg ($> 150\%$). Az eredeti lap abszorbanciája 0,15 , az újra inkubálté 0,25.

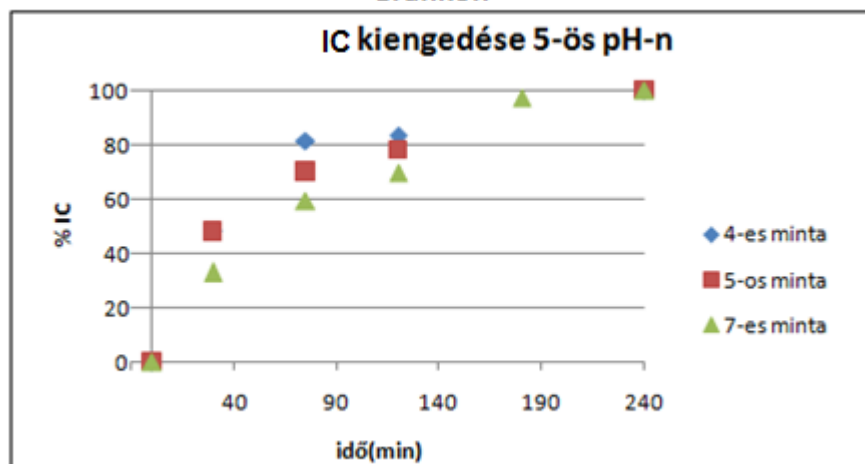
2.5.3. IC kiengedése savas közegben

Savas közegben a kitozán oldódik az amincsoportjának a protonálódása következtében.(1.3. Ábra)

Vizsgálva a modell hatóanyag leadását három párhuzamos mintán a már felvázolt módszerrel a következő eredményeket kaptam:



2.22. Grafikon



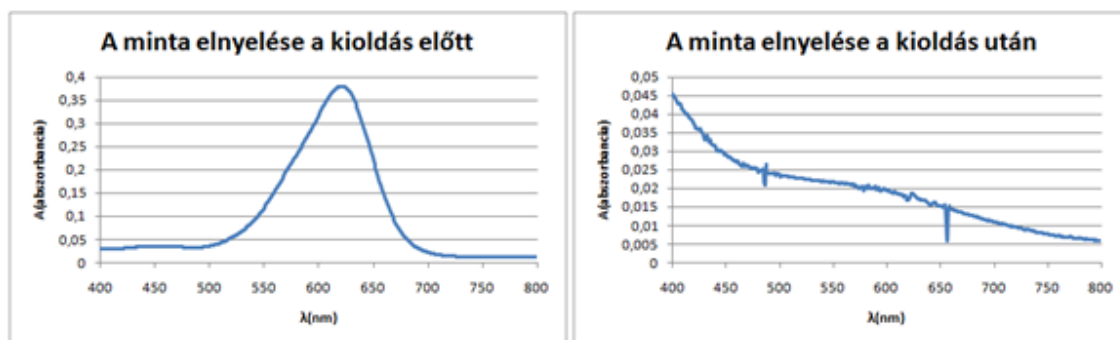
2.23. Grafikon

Megjegyzés: az IC mennyiséget minden mért pontban az összmennyiséghez viszonyítva adtam meg. A későbbiekben bővebben tárgyalok arról, hogy ez milyen feldúsulást jelent az inkubáló oldathoz képest.

Megfigyelések:

Mivel a kitozán protonálódása és oldatba vitele, tehát a réteg degradációja pH függő, ahogy várható volt, a kitozán oldódása és egyúttal a hatóanyag kiengedése jóval gyorsabb volt alacsonyabb pH-n (2.22. Grafikon), mint magasabb pH-n (2.23 Grafikon).

Az eredmények azt mutatják, hogy a kitozán filmek alkalmazhatóak lehetnek nyújtott hatóanyag leadásra (biokompatibilisek és a hatóanyagot hosszabb idő alatt adják le). Az ételek gyomorban töltött ideje kb. 4-5 óra, ez alatt a vizsgált filmekből gyakorlatilag a teljes hatóanyag mennyiség felszabadult. Ezt szemlélteti **2.24. Ábra**, mely egy lap abszorbanciáját ábrázolja a savas kioldás előtt és után.

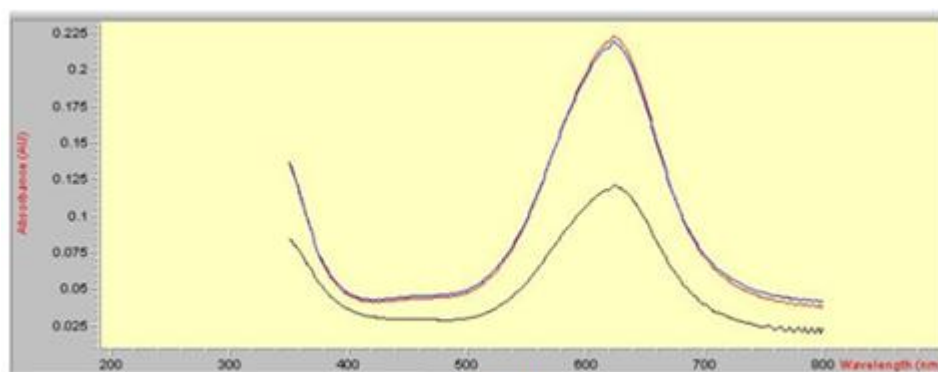


2.24. Ábra

Amennyiben a gyomorból való távozás után mégis marad némi hatóanyag a kitozán-rétegben: a belekbe, vagyis bázikus közegbe kerülve ezt azonnal kiengedi a mátrixanyag, tehát a teljes hatóanyag mennyiség felszabadul a gyomorban, illetve a belek kezdeti szakaszaiban.

Amennyiben magasabb pH-n dolgozunk (**2.23. Ábra**) kevésbé gyors a modell hatóanyag kiengedése, egyenletesebb, a kitozán film is lassabban degradálódik. **Jó hordozó lehet, ha bőrre viszik fel.**

A kioldás sebességét befolyásolja a keverés is. Amennyiben keverés nélkül oldom ki savas közegben az IC-t, lassabban szabadul fel. Így 4 órás kioldás esetében keverés hiányában csak az összes anyagmennyiség körülbelül fele szabadul fel. **2.25. Grafikon**



2.25. Grafikon

2.6. Térhálósított kitozán

Az eddig mérések mindvégig a lineáris kitozánra vonatkoztak. A kitozán könnyen térhálósítható. Ez a térhálósítás lehet ionos (többszörös negatív töltésű ionokkal) vagy kovalens (pl. glutáraldehiddel). **1.6. Ábra** [12]

Amint az megfigyelhető, az IC maga is jó ionos térhálósító anyag (többszörös töltésű negatív ion), emiatt, ha a kitozán oldatba IC jut, azonnal kicsapódik a kitozán egy kékes gumiszerű anyag formájában.

Stabilabb rendszer, amikor kovalens kötésekkel térhálósítunk, erre a legjobb megoldások egyike a glutáraldehid. [6]

Abból a célból végeztem a térhálósítást, hogy ezáltal változtassak a hatóanyag-kiengedésen, esetleg teljesen meggátoljam azt (ezáltal a rendszer alkalmazható lenne az előző fejezetben tárgyalt módosított elektródok esetében is). A térhálósítást úgy végeztem, hogy a már inkubált és megszáradt lapokat 2%-os glutáraldehid oldatba helyeztem 1,5 órára. [6]

A térhálósítás után az inkubált IC mennyisége alig változott, nem oldódott ki a térhálósítás alatt.

A további vizsgálatok során kiderült, hogy a térhálósítás nem volt hatással az eddig vizsgáltakra, bázikus közegben továbbra is azonnali volt a kiengedés, de savas közegben sem lassította a színezékiengedést. Ezen felül mechanikai problémák léptek fel: a térhálósított mintákon a vékonyréteg rigiddé, törékennyé vált, minimális mechanikai terhelés esetén is (csipesszel hozzáértem) könnyen lepergett. Ez az eredmény megegyezik a más módszerrel gyártott térhálós kitozán esetén tapasztaltakkal.[3] A térhálósítást, mint hatóanyag kiengedés módosítást ezután elvetettem, hiszen annak ellenére, hogy előállításuk bonyolultabb, pozitív hatással nem volt a mintákra.

2.7. Az IC oldat kalibrációja

Azért, hogy meghatározzam, milyen mennyiségű IC-t adtak le a minták, szükséges volt egy kalibrációs görbe meghatározása.

$5 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációig gyakorlatilag teljes mértékben érvényesül a BLB törvény ($R^2=0,999$), de még 10^{-4} koncentrációig is jó közelítéssel érvényesül ($R^2=0,985$)

$A=13585 \cdot C$

Ahol: $[C] = M$

Innen a továbbiakban meghatározható az IC mennyiség.

2.8. A kitozán film vastagsága. Az IC feldúsulása

2.8.1. Rétegvastagság meghatározása

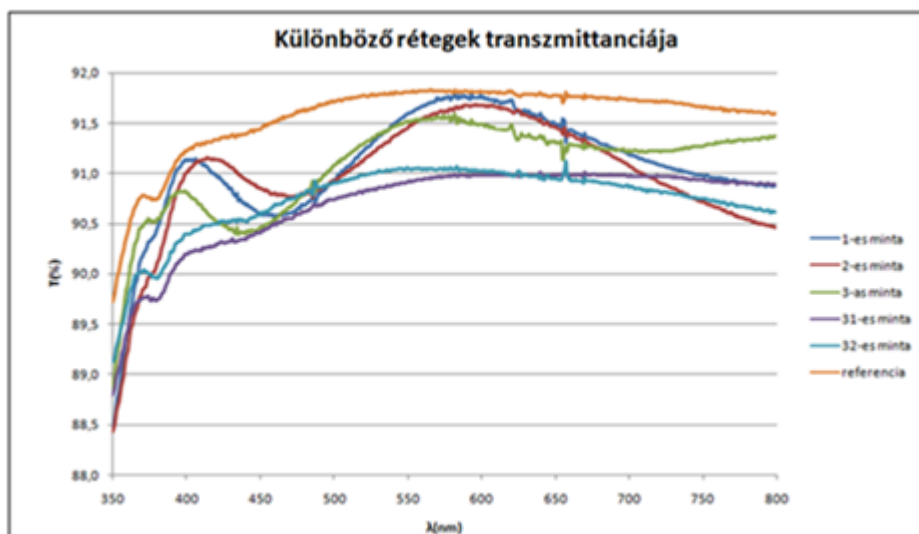
A kitozán réteg jól megkötötte az IC-t, de azt a fenti adatokból nem tudtam meg, hogy a hatóanyag az inkubáló oldatával megegyező koncentrációban található meg a kitozán rétegben, vagy felgyűl-e abban.

Lépések:

- kitozán rétegek vastagságának meghatározása
- kitozán rétegek térfogatának meghatározása
- IC mennyiségének meghatározása a kitozán rétegben

A rétegvastagságot iterációkkal lehet meghatározni, feltételezve azt, hogy a minta teljesen színtelen.

Megjegyezném, hogy a kitozán bevonatok a kitozán forrásától függően sokszor tartalmaznak némi színanyagot. Ezek a színanyagok karotinoidok és jellemző elnyelésük 400-500 nm körül van. Amint az megfigyelhető (2.26. Grafikon), a kész lapok közül pár mutat ebben a tartományban némi elnyelést. Ez arra utal, hogy tartalmaznak szennyeződést. Ez a tény egyes lapoknál a rétegvastagság meghatározását nehezékké teszi, amint az a későbbiekben látható lesz.



2.26. Grafikon

A mellékelt ábrán (**2.26. Grafikon**) az 1,2,3-as minta egy, a 31,32-es minta más forrásból származik (azonos cég, de nem azonos kiszerelés), megfigyelhető a különbség az elnyelésben. A kitozán elnyeléséért elsősorban az alapanyagból (rák-és egyéb páncélok) megmaradt asztaxanthin a felelős. Mindegyik minta teljesen száraznak tekinthető, több napig száradtak, így a duzzadást nem vettem figyelembe a rétegvastagság meghatározásánál.

A rétegvastagság meghatározásához fel kellett venni az üres üveglapok és a kitozán bevonatos üveglapok transzmittancia spektrumát, majd bizonyos korrekciók alkalmazása után illesztést hajtunk végre.

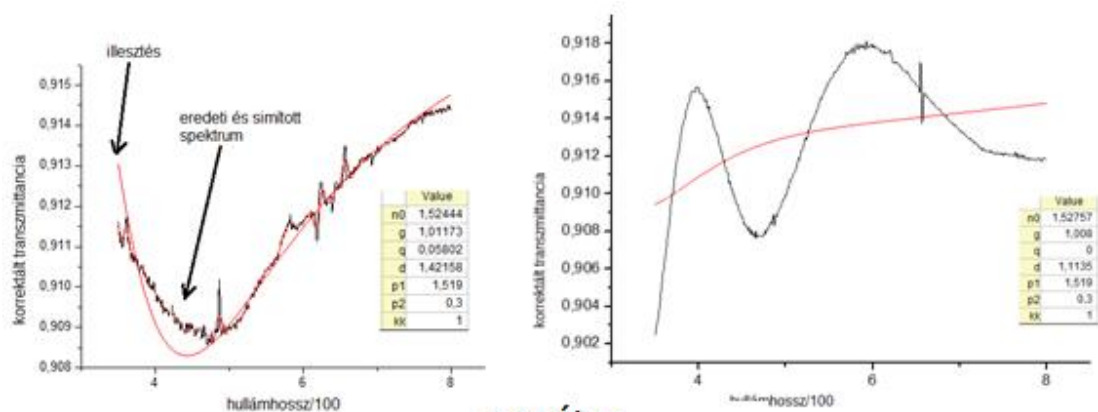
Figyelembe kellett venni:

1. a réteg törésmutóját (n)
2. az inhomogenitási paraméter-hogyan változik a keresztmetszeten a törésmutató (g)
3. a törésmutató diszperziós faktora- hogyan függ a törésmutató a használt fény hullámhosszától (q)
4. rétegvastagságot ($d \cdot 100$)
5. az üveglap törésmutóját (1,519, nem változik)
6. az üveg diszperziós faktorát (0,3, nem változik)
7. a lámpa intenzitásának a változása-rövid mérésnél ez állandó, értéke 1

Iterálással meghatározhatóak a keresett paraméterek. Ennek a lényege, hogy számítógéppel illesztéseket hajtunk végre egy modell szerint úgy, hogy számos paraméter egyszerre változhat. Attól függően, hogy mennyire tér el az illesztés a megfelelőtől, a számítógép minden iteráció során megváltoztatja a paramétereket. Amikor az illesztés megfelelő leolvassuk a paraméterek értékeit. Engem elsősorban a rétegvastagság érdekelt, így csak azzal foglalkozom. [A felvázolt módszer alaposabb tanulmányozásával a 22-es referencia foglalkozik]

Ahol nem mutatkozott a színezék elnyelése, az illesztés jól működött (**2.27. Ábra.** bal oldali illesztés), azonban, ahol elnyelést tapasztaltam, ott nem sikerült megfelelő illesztést kivitelezni (jobb oldali illesztés). Ennek oka, hogy a modell csak színtelen

bevonatok esetén működik.



2.27. Ábra

A kitozán réteg vastagságát nem befolyásolja a benne levő minimális mennyiségű színezék ($<<1\%$), így amennyiben a kitozán oldatok viszkozitása azonos, a szennyezett kitozán is azonos vastagságú réteget hoz létre, mint a szennyezetlen.

Ez alapján az adataim a 2.28. Táblázatban találhatóak meg.

minta sorszáma	n0(törésmutató)	d(rétegvastagság)
-	-	nm
31	1,534	122,86
32	1,534	125,21
42	1,5244	142,16

2.28. Táblázat

Innen tehát:

n(átlag) = 1,53

d(átlag) = 130 nm

2.8.2. A réteg felületének és térfogatának a meghatározása

A kioldási kísérletek során a pufferekbe merített vékony réteggel ellátott minta méretei:

24*24*1 mm

Felülete: $A=1224 \text{ mm}^2$

Figyelembe véve a fentebb számított vastagságértéket, ki tudtam számolni az össztérfogatát a bevonatnak, ami belemerült a pufferekbe, tehát ami leadhat IC-t.

Térfogat: $V= A*d(\text{átlag})=1224*10^{-4}*130*10^{-8} \text{ L}$

$V= 1,59*10^{-7} \text{ liter.}$

Kiszámítható a befogott IC mennyisége, ugyanis a kioldott IC-oldat abszorbanciájából kiszámolt mólszámmal egyezik meg (bebizonyosodott, hogy a rétegen legfeljebb nyomokban maradt színezék, a teljes IC mennyiség az oldatba jutott):

- Mintánként megközelítőleg $0,257*10^{-6}$ mól IC szabadul fel (0,12 mg).
- Tehát a felületben a megkötött IC koncentrációja 1,62 M.
- Ugyanakkor a vizes oldat koncentrációja, amiből inkubáltam a színezéket 0,02 M.
- Eszerint az inkubáció során a vizsgált rétegekben 81-szeresen felgyűl a modell hatóanyag. Eltérés mutatkozhat elsősorban a lapok alján levő megvastagodott kitozán réteg miatt.

2.9. Következtetések

Az IC spektrofotometriásan alkalmazható Cu^{2+} ionok kimutatására.

Az IC alkalmazható lehet módosított elektródok létrehozására, mely Cu^{2+} mennyiségi analízisére alkalmas, de fontos megtalálni a megfelelő polimert, amibe inkubáljuk.

Pozitív töltésű biokompatibilis polimerekbe az IC inkubálható, mint modell hatóanyag.

Bázikus közeg esetén azonnali a kiengedés, savas közegben a pH csökkenésével gyorsul és megközelítőleg a gyomorban való tartózkodási idővel egyezik meg a teljes modell hatóanyag kiengedéséhez szükséges idő. A kitozán filmek esetében érdemes figyelembe venni a duzzadási tulajdonságokat, mert a duzzadt, még ki nem szárított kitozán film jóval nagyobb anyagmennyiség megkötésére lehet alkalmas. A továbbiakban érdemes kibővíteni a kutatásokat a duzzadási tulajdonságok vizsgálatával.

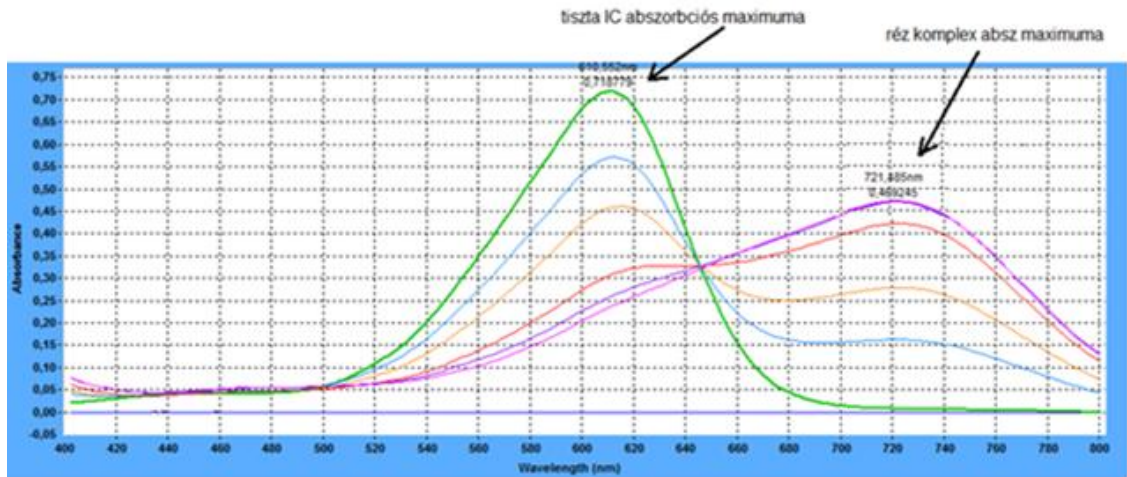
A filmek rétegvastagságát vizsgálva bebizonyosodott, hogy a színezék jelentős mértékben felgyűl a kitozán felületben az inkubáció során (81-szeresen).

Mindezen adatok ismeretében kijelenthető, hogy érdemes valós gyógyszer hatóanyagok esetében is vizsgálni a kitozánt, mint lehetséges hordozó, illetve leadó anyagot, ugyanis a vizsgált modell hatóanyag esetében az inkubált filmek előállítása egyszerű volt és az jelentősen feldúsult a rétegben.

3. Mellékletek

3.1. Képmelléklet

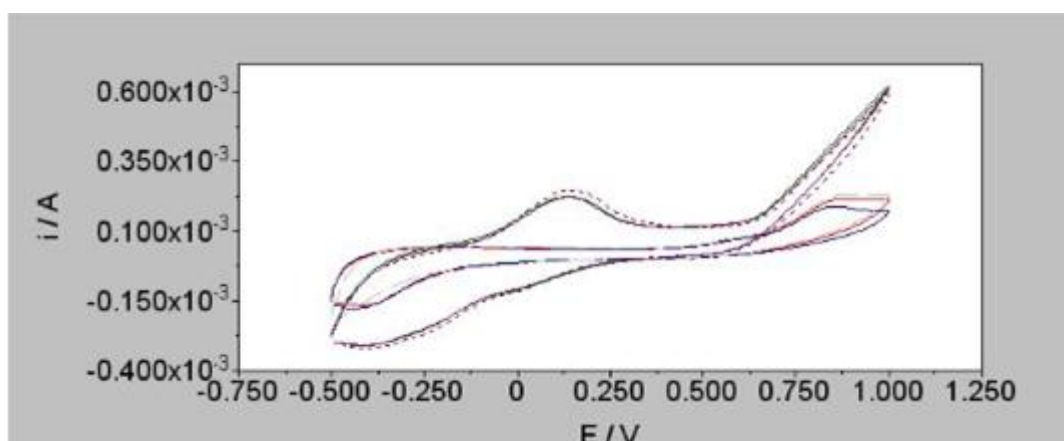
1. Spektrofotometriás mérések



2. A Margittai „Pop Mircea” Kórház szerológiai laboratóriumában alkalmazott módosított elektródokkal működő vér-, illetve vizelet elektrolit-szintjét mérő berendezés. Képes mérni Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Li^+ ionok koncentrációját.[24]



3. Jellegzetes csúcsok megjelenése ciklikus voltammetriánál.



3.2. Bibliográfia

1. Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices
2. <http://www.nexusresearchgroup.com/fun-science/magic2.htm>
3. Jáksó Ágnes, *Kitozán filmek térhálósítása ionos és nemionos molekulákkal. Térhálósított kitozán filmek vizsgálata*, BME, 2010. december
4. <http://scholarbank.nus.edu.sg/bitstream/handle/10635/14363/03Chap1-Introduction.pdf?sequence=3>
5. Vipin Bansal, Pramod Kumar Sharma, Nitin Sharma, Om Prakash Pal, Rishabha Malviya, *Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery*, *Advances in Biological Research* 5 (1): 28-37, 2011
6. Antonio R. Cestari, Eunice F.S.Vieira, Andréa M.G.Tavares, Roy E. Bruns, *The removal of the indigo carmine dye from aqueous solutions using cross-linked chitosan-Evaluation of adsorption thermodynamics using a full factorial desing*, *Journal of Hazardous Materials* (2008) 566-574
7. http://www.qddvp.com/product-agriculture_chitosan_oligosaccharide_-81.html
8. http://www.djfindthis.com/media/pharm/db21156/tk_chitosan+bandage/91281
9. Abdelbasset El Hadrami, Lorne R. Adam, Ismail El Hadrami, Fouad Daayf, *Chitosan in Plant Protection*, *Mar Drugs*. 2010; 8(4): 968–987.
10. Optimum Nutrition Chitosan Diet Formula Reviews
11. Biswajit Ghosh, Kishore V. Chellappan, Marek W. Urban, *UV-initiated self-healing of oxolane–chitosan–polyurethane (OXO–CHI–PUR) networks*, J.

Mater. Chem., 2012,22, 16104-16113

12. <http://www.youtube.com/watch?v=WZNgDDNp7WE>
13. C.J.Brinker, G.C. Frye, A.J. Hurd, C.S.Ashley, *Fundamentals of sol-gel dip coating*, Sandia National Laboratories, Albuquerque, NM 87185-5800, USA
14. Zámbo Dániel, *Megnövelt fényátersztésű, pórusos szilika szol-gél bevonatok*, Diplomamunka, BME, 2013
15. Dabóczi Mátyás, *Szabályzott hatóanyag-leadásra alkalmas pórusos szilika alapú modellrendszer fejlesztése*, OTDK dolgozat, Budapest, BME, 2012
16. L. D. Landau, B. G. Levich, *Acta Physico-Chimica Sinica*, U.R.S.S. 17 (1942) 42-54
17. Thalita Boldrin Zanoni, Arnaldo Alves Cardoso, Maria Valnice Boldrin Zanoni, Antonio Aparecido Pupim Ferreira, *Exploratory study on sequestration of some essential metals by indigo carmine food dye* Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 46, n.4, 2010
18. Z. Gao, J. Bobacka, A.Lewenstam, A. Ivaska, *Electrochemical behaviour of polypyrrole film polymerized in indigo carmine solution*, *Electrochimica Acta*, VOL. 39, No. 5, pp. 755-762, 1994
19. Mariame Coulibaly, Liana Maria Muresan, Ionel Cătălin Popescu, *Detection of Cu(II) using its reaction with indigo carmine and differential pulse voltammetry*, *Studia UBB Chemia*, LVII, 3, 2012(p.65-72)
20. http://www.cetebe.ro/?utm_source=Google&utm_medium=Search&utm_campaign=Cetebe_Search%20
21. Chanatip Samart, Chatchawan Sookman, *Effect of silica sources in nanoporous silica synthesis on releasing behaviour of indigo carmine*, Songklanakarin

22. Hild E., Deák A., Naszályi L., Sepsi Ö., Ábrahám N., Hórvölgyi Z, *Use of the optical admittance function and its WKB approximation to simulate and evaluate transmittance spectra of graded-index colloidal films*, Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, 9, 920-930 (2007).
23. Kitano, T., Kataoka, T., and Shirota, T., *An empirical equation of the relative viscosity of polymer melts filled with various inorganic fillers*, (1981).. Rheologica Acta 20 (2): 207.
24. Szőke Árpád Ferenc, *Szakmai gyakorlat füzet*, 2013