Hatóanyag kiáramlás pórusos szilika vékonyrétegből

Model drug release from thin silica layer

Dabóczi Mátyás, Kabai-Faix Márta, Hórvölgyi Zoltán

BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék

1111 Budapest, Budafoki út 6-8.

web.fkt.bme.hu/~colloid

Summary

In drug delivery controlled and targeted methods are playing more and more important role. With controlled release technology it would be possible to make the cure of some diseases more efficient and inexpensive. Thin films with porous structure such as porous silica could be used for this target. We applied the widely used dip-coating technique from the sol-gel methods to form thin layers. This technique possesses lots of advantages: it's easy and inexpensive to carry out and give a simple and well-defined possibility for modifying the thickness of the layers with changing withdrawal speed. Rhodamine 6G dye was used as a model drug to be able to observe the release of the agent from the porous structure.

Chitosan has been in scientific spotlight for many years thanks to its unique properties. Chitosan is a biocompatible, biodegradable, antibacterial and non toxic product of deactylation of chitin. These properties, and the possibility to form chitosan thin layer and even to cross-link it with ionic or non-ionic agents make chitosan applicable for controlled drug release.

The aim of this work was the formation and incubation of porous silica thin layer with rhodamine 6G dye as a model drug, the investigation of that model drug release at constant pH in buffer solution and the manipulation of the release with chitosan and cross-linked chitosan thin layers.

A precursor sol containing tetraethyl-ortosilicate (TEOS), hydrogen chloride (HCl) and hexadecyl-trimethyl ammoniumbromide (CTAB) as a template in ethanol medium was applied for the dip-coating procedures. Films were dip-coated into this precursor sol and were annealed at 480 °C for 1hour to form porous structure. These layers were dipped into an aqueous rhodamine 6G solution with very slow dipping speed to incubate rhodamine 6G into the porous structure. After drying, chitosan layer and cross-linked chitosan layer were formed onto the incubated porous silica layers with the usage of acetic acid solution of chitosan and pentanatrium-tripolifoszfat (TPP) solution. The release of the model drug from the layers was studied with taking six layers from each kind (porous silica, porous silica + chitosan and porous silica + cross-linked chitosan) into buffer solutions for different time (2-7-12-24-48-97 hours). With having the UV-Vis spectra of the layers (before and after the release) and the buffer solutions after the release we were able to calculate the percentage of the released model drug in the function of the release time.

We found that the chitosan layer inhibit the release of rhodamine 6G making an extended release time with this. According to our results cross-linked chitosan help at the release of rhodamine 6G at the first period and inhibit it after that.

1. Bevezetés

Gyógyszer hatóanyagok szervezetbe juttatásánál egyre nagyobb szerepet kap a célzottság és szabályozottság. Fontos szempont, hogy a gyógyszerek csak a szükséges helyen hassanak (célzottság) és folyamatosan a megfelelő koncentrációban legyen jelen a szervezetben (szabályozott, retard hatás). Az időbeli elnyújtottságot el lehet érni tapaszokkal [1], gyógyszer bőr alá ültetésével, míg a célzott hatóanyag bevitelre lehetőséget adnak a pH-, fény-, hőmérséklet érzékeny anyagok [2], melyek felhasználásával sokkal hatékonyabbá, gazdaságosabbá és biztonságosabbá válhat különböző betegségek gyógyítása. Többek között a pórusrendszerrel rendelkező vékonyrétegek is igen alkalmasak lehetnek hatóanyagok szabályozott leadására.

Vékonyrétegek képzésére szilárd hordozó felületén igen elterjedt módszer a szol-gél és ezen belül is a mártásos (dip-coating) eljárás [3], köszönhetően költséghatékonyságának, az egyszerűen változtatható rétegvastagságnak és sokféle felület bevonására való alkalmasságának.

A mártásos szol-gél eljárás lehetőséget nyújt prekurzor szolból micellás templát anyag felhasználásával pórusos szilika vékonyréteg előállítására is [4]. Ezek a rétegek nagy fajlagos felületű, nyílt pórusokat is tartalmazó pórusrendszerek, jó mechanikai stabilitással és megnövekedett fényáteresztő képességgel rendelkeznek. A nano mérettartományba eső pórusrendszer kialakulása a prekurzor szolba vitt micellaképző adalék kiégetése során történik.

Az így kialakított vékonyrétegbe hatóanyagot juttatva a pórusrendszer felhasználható lehet annak tárolására és adagolására. Ennek modellezésére kationos rodamin 6G festéket használtuk, mely mind UV-Vis spektroszkópiával (530 nm-nél van abszorbancia maximuma), mind fluoreszcenciával igen kis koncentráció esetén is jól vizsgálható.

A pórusokba juttatott modellanyag kiáramlását egy újabb réteg, hordozóra történő juttatásával befolyásolhatjuk, szabályozhatjuk. Erre a célra az igen nagy figyelemnek örvendő kitozán biopolimert alkalmaztuk. A kitin decetilezésével költséghatékonyan előállítható kitozán igen sok előnyös tulajdonsággal rendelkezik: biodegredábilis, biokompatibilis, bioadhezív, antibakteriális hatású, nem toxikus anyag. Savas közegben oldódik, filmképzésre képes, ionos és nem ionos molekulákkal is térhálósítható [5], duzzadása pH függő [6]. Ennek megfelelően igen sok területen használják [7]: kozmetikai szerek, gyógyászat, élelmiszeripar stb. Ezek a tulajdonságok mind alkalmassá teszik a kitozánt gyógyszer célba juttatásra való használatra.

2. Célkitűzés

Kutatásunk célja volt pórusos szilika vékonyréteg előállítása és inkubálása rodamin 6G festékkel, mint modellanyaggal, kioldódás vizsgálata puffer oldattal beállított állandó pH-jú közegben és a kioldódás befolyásolása kitozán és térhálósított kitozán rétegekkel.

2. Használt anyagok és kísérleti eljárások

2.1. Anyagok és eszközök

Abszolút etanol (a.r. > 99.7% Reanal), tetraetil-ortoszilikát (TEOS, >98%, GC-grade, Merck), hexadecil-trimetil-ammóniumbromid (CTAB, 97,0%, Reanal), sósav-oldat (purum p.a., >36,5%, Fluka), rodamin 6G (Sigma-Aldrich, Dye content ~95%), kitozán (közepes molsúlyú, 98% dezacetilezesi fokú, 522 cps viszkozitasú; Aldrich), Ecetsav (100%; Merck), pentanatrium-tripolifoszfat (TPP, Reanal) MilliQ víz (Millipore Simplicity 185, vezetőképesség: 18.2 mS/cm), puffer oldat **(**1,56 g $NaH_2PO_4*H_2O$ –ból (Merck) és 6,89 g $Na_2HPO_4*2\ H_2O$-ból (Reanal) desztillált vízzel 1 dm^3 oldat, pH = 7,3).

A rétegeket mikroszkóp tárgylemezekre (Menzel Gläser) húztuk az MTA-MFA laboratóriumában készült réteghúzó berendezéssel és egy Nabertherm Controller B170 típusú kemencében hőkezeltünk. Mind a rétegeket, mind az oldatokat Agilent 8453 típusú UV-Vis spektrofotométer segítségével vizsgáltuk.

2.2. Vékonyrétegek létrehozás üveg hordozón, inkubálás rodamin 6G-vel

Első lépéseként prekurzor szolt készítettünk pórusos szilika rétegek előállításához két oldatból [4]: az első oldatnál 1,5 g CTAB-t oldottunk 22 ml abszolút etanolban, míg a másodikat szintén 22 ml etanolból és 4 ml 1 M-os sósavból, valamint 8,8 ml TEOS-ból készítettük. Mindkét oldatot külön, lefedett állapotban fél óráig majd az elsőt a másodikba öntve együtt további fél óráig kevertettük.

A rétegek húzása előtt az üveg hordozót mosószeres vízzel, kénsavval, izopropil-alkohollal és nagy tisztaságú desztillált vízzel tisztítottuk. Pórusos szilika rétegeket a prekurzor szolból a száraz hordozókra mártásos technikával, 10 cm/perces húzási sebességgel, majd kemencében, 480 °C-on, 1 órán át tartó (plusz 20 perc felfűtési idő) hőkezeléssel készítettünk.

A kitozán réteget (100 cm^3 1%-os ecetsav oldatból és 1 g kitozánból készített) 1%-os kitozán oldatból állítottuk elő 1 cm/perces kihúzási sebességgel, majd legalább egy napot hagytuk száradni szobahőmérsékleten.

A térhálósítást a kitozán rétegek 10 percig tartó 1%-os TPP oldatba (pH = 8,1) helyezésével végeztük, majd szintén minimum egy napig száradni hagytuk a rétegeket szobahőmérsékleten.

Rodamin 6G molekulák szilika pórusokba való juttatását a rétegek 10^{-3} M-os, vizes közegű rodamin 6G oldatba (pH = 5,3) mártásával, a pórusok kitöltése végett igen lassú 5 mm/perc-es bemártási, majd 1 cm/perces kihúzási sebességgel végeztünk. Az így kapott piros színű rétegeket legalább egy napig száradni hagytunk szobahőmérsékleten.

2.3. Rétegek és oldatok vizsgálata

Mind a vékonyrétegeket, mind a kioldás során kapott oldatokat UV-Vis spektroszkópiával vizsgáltuk. A rodamin 6G tartalmú rétegeket és oldatokat a 350-800 nm-

es, a festékmentes rétegeket a 350-1100 nm-es hullámhossztartományban vizsgáltunk. A rétegek spektrumát kioldás előtt és után is felvettük. A rodaminmentes rétegek vastagságát optikai modell alapján függvényillesztéssel határoztuk meg [8].

2.4. Kioldás vizsgálata

Első lépésként rodaminnal nem inkubált pórusos szilika, kitozán és térhálós kitozán rétegek spektrumát vettük fel, illetve ezek kioldódását vizsgáltuk 20 cm^3 puffer oldatban.

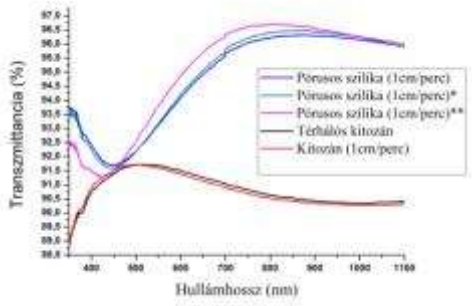
A kioldás kinetikájának vizsgálata során 18 pórusos szilika rétegeket inkubáltunk rodamin 6G-vel, ebből 12-t kitozánnal is bevontunk és ezekből további 6-ot térhálósítottunk TPP-vel. Így három különböző típusú réteghez jutottunk és mindháromból hat, azonos módon előállított minta állt rendelkezésünkre. A rétegek spektrumainak felvétele után azokat egyesével, pontosan 20-20 cm^3 puffer oldatot tartalmazó, műanyag, henger alakú edényekbe helyeztük, közel függőleges helyzetben. Majd bizonyos időközönként (2, 7, 12, 24, 48, 96 óra elteltével) a különböző rétegekből mindig egyet-egyet kivettünk az oldatból, puffer oldattal mostunk, majd száradni hagytunk. Végül felvettük a rétegek és kioldás során keletkezett oldatok UV-Vis spektrumait.

Az oldatok koncentrációjának meghatározása céljából 10^{-3} M-os Rodamin 6G oldatból hígítással készítettünk további ismert koncentrációjú rodamin 6G oldatokat és felvettük ezek spektrumát is kalibrációs görbe készítése céljából.

3. Eredmények és értékelésük

3.1. Rodaminnal nem inkubált vékonyrétegek

A pórusos szilika rétegek növelik az üveg hordozó fényáteresztő képességet, így bizonyos hullámhosszoknál akár 96-97 %-os transzmittancia értékeket, míg a kitozán illetve térhálós kitozán rétegeknél 90-91 %-os fényáteresztést mértünk *(1. ábra)*. Mindkét adat jó fényáteresztést enged meg, ami megfelel a tapasztalatnak, ami szerint ezek a rétegek igen vékonyak, szabad szemmel alig észrevehetőek, transzparensek és a szélektől eltekintve szabad szemmel homogénnek látszók. A görbeillesztésből kapott adatok szerint a pórusos szilika rétegek vastagsága átlagosan 150 nm, a kitozán és térhálós kitozán rétegek vastagsága egymáshoz közel esik, átlagosan 160 nm. Pórusos szilikára felvitt kitozán illetve térhálós kitozán esetében a transzmissziós spektrumban több extrémum is megjelent, ami a várakozásoknak megfelelően a réteg vastagságának növekedését jelzi.



1. ábra: *Pórusos szilika, kitozán és térhálós kitozán vékonyrétegek transzmissziós spektruma*

3.2. Rodaminnal inkubált vékonyrétegek

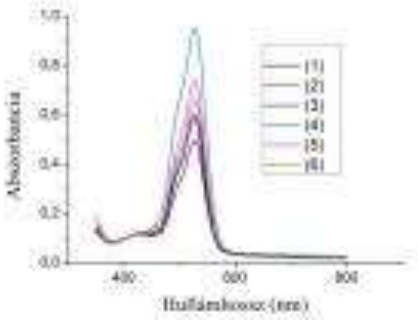
A rodamin 6G-vel inkubált pórusos szilika vékonyrétegek szemmel jól láthatóan piros színűek lettek. Felvéve a rétegek spektrumát a várt 530 nm közelében látunk abszorbancia maximumokat *(2. árba)*. A maximumok annak ellenére eltérő nagyságúak, hogy minden esetben azonos módszerrel dolgoztunk. Ez feltehetőleg annak a következménye, hogy a használt üvegek nem teljes tárgylemezek voltak, így azok mérete és így a képzett filmek mérete kis mértékben eltért egymástól.

A rodamin 6G-vel inkubált, pórusos szilikára történő kitozán réteg húzása során a minta összesen 3-4 percig az 1%-os ecetsavas oldatba merült, mely során a rodamin egy szemmel is látható mennyisége a kitozán oldatba diffundált. Az abszorbancia maximum átlagosan a kiindulási érték a 60%-ra csökkent. Ennek ellenére jelentős mennyiségű rodamin 6G maradt a rétegben.

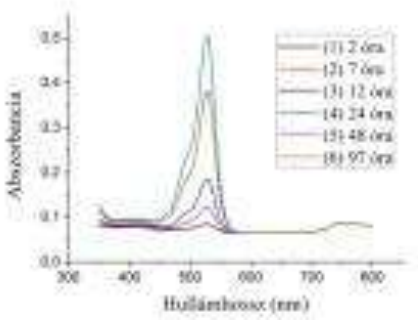
Ebből a térhálósítás során már nem oldódott ki szemmel látható mennyiségű rodamin 6G, mely annak köszönhető, hogy a térhálósításra használt TPP oldat pH-ján (pH = 8,1) a kitozán kis mértékben duzzadt csak és meggátolta a rodamin kioldódását.

3.3. Kioldás, kinetika

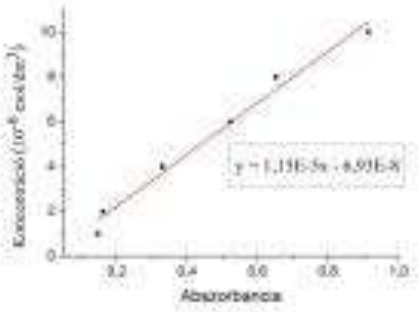
A kioldás után kapott rodamin oldatok abszorbancia maximumain (*3. ábra*) megfigyelhető a kioldódás időfüggése. Az oldatok abszorbancia értékeinek megfelelő tartományban az ismert koncentrációjú és mért abszorbanciájú rodamin 6G oldatok segítségével kalibrációs egyenest szerkesztettünk *(4. ábra)*. Ebből kiszámoltuk az oldatokban lévő rodamin 6G koncentrációt figyelembe véve és azzal korrigálva, hogy rodamint nem tartalmazó rétegeken végzett vizsgálataink szerint a kioldás során a kitozán, illetve térhálós kitozán egy része is beoldódik a puffer oldatban és ezzel abszorbancia növekedést okoz. A számolt koncentrációkból (ismerve a puffer oldat térfogatát, ami minden esetben 20 cm^3 volt) ki tudtuk számolni a kiáramlott rodamin 6G



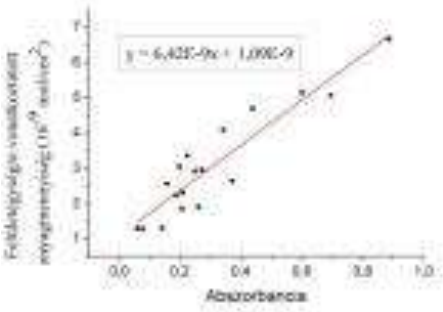
2. ábra: *Rodamin 6G-vel inkubált pórusos szilika vékonyrétegek abszorpciós spektrumai*



3. ábra: *Pórusos szilika rétegekből kioldódott rodamin 6G oldatok abszorpciós spektrumai*



4. ábra: *Rodamin 6G oldatok kalibrációs egyenese*



5. ábra: *Rodamin 6G tartalmú rétegek kalibrációs egyenese*

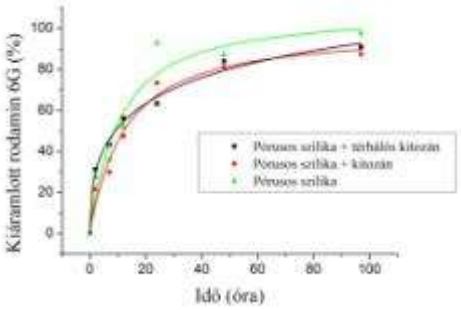
anyagmennyiségét.

A kiindulási rétegek rodamin 6G anyagmennyiségének meghatározásához egy újabb kalibrációs görbét készítettünk *(5. ábra)*. Ebben az esetben a rétegek kioldás során bekövetkező abszorbancia változásának függvényében ábrázoltuk a rétegek felületegységre eső rodamin 6G anyagmennyiséget. Ennek a kalibrációnak a segítségével a rétegek kiindulási abszorbancia értékéből (a rodamint nem tartalmazó rétegek abszorbanciájával korrigálva) ki tudtuk számolni a rétegek rodamin 6G anyagmennyiség tartalmát. Ebből a pórusos szilika vékonyréteg méreteinek ismeretében rétegen belüli rodamin 6G koncentrációt számoltunk, mely rétegenként eltérő, de minden esetben 0,2-0,5 mol/dm^3 közötti érték.

Az összes réteg esetében kiszámolva a kiindulási és eltávozott rodamin 6G anyagmennyiséget %-os anyagkibocsájtást tudtunk számolni, melynek időfüggését a *6. ábra* mutatja és adatait az *1. táblázat* tartalmazza.

	1.	2.	3.
Idő (óra)	% - os kiáramlás	% - os kiáramlás	% - os kiáramlás
0	*0,0*	*0,0*	*0,0*
2	*27,7*	*21,6*	*31,4*
7	*36,1*	*30,0*	*43,3*
12	*52,0*	*47,4*	*56,3*
24	*92,9*	*73,4*	*63,3*
48	*87,1*	*81,2*	*84,0*
97	*97,6*	*87,4*	*91,0*

1.táblázat: *Pórusos szilika (1), Pórusos szilika + kitozán (2) és Pórusos szilika + térhálós kitozán (3) rétegek rodamin tartalmámak időbeli változása*



6. ábra: *Rodamin 6G kioldódásának kinetikája*

Megfigyelhető, hogy a csak pórusos szilikát tartalmazó réteg minden pontja a kitozánnal bevont réteg felett halad, illetve, hogy a pórusos szilika rétegből gyakorlatilag 24 óra alatt kioldódik a benne lévő rodamin 6G majdnem teljes mennyisége, míg kitozánnal bevont esetben ez jóval elnyújtottabb, akár kétszer annyi ideig is tarthat.

Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a kitozán réteg gátolja a modellanyag kiáramlását, ezáltal retard hatást létrehozva. A térhálós kitozán viselkedését, mely szerint a kezdeti szakaszban több rodamin 6G oldódik ki belőle, mint a csak pórusos szilikát tartalmazó rétegből a térhálósítás során bekövetkező esetleges töredezettség és a térhálós kitozán beoldódása indokolhat, melynek bizonyítása további vizsgálatot igényel.

4. Összegzés

Sikeresen előállítottunk pórusos szilika vékonyréteget és inkubáltuk rodamin 6G-vel, valamint erre felvittünk még egy kitozán illetve térhálós kitozán réteget. UV-Vis spektroszkópia és függvényillesztés segítségével meg tudtuk határozni a rétegek vastagságát és rodamin 6G rétegbeli koncentrációját.

Vizsgáltuk a modellanyag puffer oldatba való kioldódását és ezt befolyásolni tudtuk kitozán, illetve térhálós kitozán vékonyréteg segítségével. Az élő szervezetekben biztonságosan alkalmazható, antibakteriális hatással rendelkező kitozán réteg segítségével a hatóanyag leadás időbeli elnyújtottságát, retard hatást értünk el.

5. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Dr. Hild Erzsébetnek az optikai mérések értékelésében nyújtott segítségéért, valamint összes munkatársunknak, különösképpen Volentiru Emőkének, valamint az Országos Tudományos Kutatási Alapnak (OTKA CK 78629) és a Nemzeti Fejlesztési Ügynökségnek (Társadalmi Megújulás Operatív Program, TÁMOP- 4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002) az anyagi támogatásért.

6. Irodalomjegyzék

[1] Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, R. V.; Kulkarni, A. R., *Polymer News*,214–218. (2004)

[2] A.K. Bajpai , Sandeep K. Shukla, Smitha Bhanu, Sanjana Kankane, *Progress in Polymer Science 33 1088–1118 (2008)*

[3] C. Jeffrey Brinker and Alan J. Hurd, *J. Phys. III France*, 4, 1231-1242 (1994)

[4] Zámbó Dániel: *Mezopórusos SiO_2 szol-gél bevonatok előállítása és jellemzése*, Szakdolgozat, BME (2010)

[5] Berger, J. et al., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57, 19-34. (2004)*

[6] Komlai Krisztina: *Kitozán-zselatin hibrid filmek előállítása és tulajdonságai,* Szakdolgozat, BME (2010)

[7] Pradin Kumar Dutta, Joydeep Dutta, V S Tripathi: *Journal of Scientific & Industiral Research* 63, January 20-31 (2004)

[8] E. Hild, A. Deák, L. Naszályi, Ö. Sepsi, N. Ábrahám, Z. Hórvölgyi; *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 9 920-930 (2007)