

Hibrid kitozán-szilika bevonat, mint szabályozott hatóanyag-leadásra alkalmas rendszer vizsgálata

Dabóczi Mátyás¹, Kabai-Faix Márta¹, Albert Emőke¹, Hórvölgyi Zoltán¹

¹Kolloidkémia Csoport, Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Összefoglalás

Pórusos szilika és kitozán vékonyrétegből álló modellrendszer hatóanyag felvételére és leadására való alkalmasságát vizsgáltuk. A rétegeket „dip-coating” technikával képeztük. A pórusrendszert CTAB, illetve Pluronic felületaktív anyagok segítségével alakítottuk ki. A felvett és leadott hatóanyag mennyiségét Rodamin 6G színezéken, mint modellhatóanyagon vizsgáltuk UV-Vis spektroszkópiával. Vizsgáltuk az inkubálási paramétereket a színezék pórusrendszerbe való juttatásakor. Elnyújtott-hatóanyag leadás eléréséhez ionosan és kovalensen térhálósítottuk a kitozán réteget. Megállapításra került, hogy milyen módon lehet a legnagyobb mértékben visszatartani a hatóanyag-leadást.

Bevezetés

A szabályozott hatóanyag-leadó rendszerek segítségével bizonyos betegségek gyógyszeres kezelése jelentősen egyszerűbbé válhat. Használatukkal hosszú időn, akár heteken-hónapokon keresztül további gyógyszeradagolás nélkül tartható a hatóanyag koncentráció a megfelelő, hatásos szinten. A célzott és elnyújtott hatóanyag leadást lehetővé tevő rendszerek megnövelik a gyógyszer hatékonyságát, mivel összességében kisebb mennyiséget, kevesebb alkalommal szükséges csak alkalmazni. Mindez pedig az esetleges mellékhatások csökkenését is jelentheti. Ezen túl fontos szempont, hogy a betegek is szívesebben használják [1] egy tapaszt [2], implantátumot vagy éppen bőr alá ültethető chipet [3], melyek hetekig, hónapokig hatékonyak lehetnek, ezzel jelentősen csökkentve a szükséges beavatkozások számát.

A hatóanyag-leadó rendszernek rendelkeznie kell egy olyan résszel, mely képes a hatóanyagot felvenni, tárolni, majd azt a szervezetben leadni. A mezopórusos szilika alapú rendszerek igen alkalmasnak tűnnek erre a feladatra. Ez többek között biokompatibilitásuknak, nagy mennyiségű hatóanyag megkötésére alkalmas nagy fajlagos felületüknek, nyílt és szabályozható méretű pórusrendszerüknek, valamint felületi módosíthatóságuknak [4] köszönhető.

A hatóanyag-leadás szabályozására jó lehetőséget nyújtanak a pH-ra, hőre, ionerősségre érzékeny polimerek [5]. Ezek közül a pH-ra érzékeny, rezponzív kitozán biopolimerrel igen sok kutatás foglalkozik. Relatív alacsony az ára, mivel a természetben fellelhető kitinből állítják elő. Egyedülállóvá teszi a kitozánt, hogy egy biokompatibilis [6], antibakteriális hatású [7], mukoadhezív poliszacharid. Térhálósítására ionos és kovalens módon is lehetőség van. A hatóanyag-leadás területén leginkább különböző módon térhálósított kitozán nano-és mikrorészecskéket vizsgálnak [8], [9].

A hatóanyag-leadás vizsgálata során egy egyszerűbb, de a lényeges elemeket tartalmazó modellrendszer segíthet a valódi rendszer mélyebb megismerésében. Egy ilyen modellrendszernek tekinthetjük a pórusos szilika és kitozán vékonyréteg alkotta hibrid rendszert is.

1. Célkitűzés

Munkánk során pórusos szilika vékonyréteg alapú elnyújtott hatóanyag-leadó modellrendszer fejlesztése és vizsgálata volt a célunk. Az inkubálási vizsgálatok során

vizsgáltuk különböző paraméterek változtatásának hatását, ami egy hatékony inkubálási eljárás kidolgozása szempontjából is fontos, azonban ezen kísérletek segítségével a modellhatóanyag felvétel és ezzel együtt a leadás mechanizmusának megismerése is célunk volt.

Célunk volt egy olyan modellrendszert kidolgozni, melyen egyszerű módon lehet vizsgálni a hatóanyag-leadást a pórusrendszerből és ennek további bevonatokkal való szabályozhatóságát. Erre a rendszerre tekinthetünk pórusos szilika nanorészecskék, illetve hatóanyag-leadásra alkalmas bevonatok modelljeként egyaránt.

Célul tűztük ki továbbá, hogy vizsgáljuk a tetszőleges módon szabályozott hatóanyag-leadás kialakításának lehetőségét térhálósított kitozán bevonat alkalmazásával.

2. Felhasznált anyagok és kísérleti eljárások

2.1. Vegyszerek

Abszolút etanol (a.r. > 99,7%, Reanal), tetraetil-ortoszilikát (TEOS, >98%, GC-grade, Merck), hexadecil-trimetil-ammóniumbromid (CTAB, 97,0%, Reanal), Pluronic® PE 10300 (Pluronic, BASF), sósav (purum p.a., >36,5%, Fluka), Rodamin 6G (Sigma-Aldrich, ~95%), kitozán (közepes móltömegű, 98% deacetilezési fokú, Aldrich), ecetsav (100% Merck), pentanátrium-tripolifoszfát (TPP, Reanal), glutáraldehid (GDA, 25%-os vizes oldat, Merck), MilliQ víz (Millipore Simplicity 185, vezetőképesség: 18,2 mS/cm), puffer oldat (pH = 7,3, 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck) és 6,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Reanal)/ 1 dm³ oldat).

2.2. Vékonyrétegek képzése, inkubálása

A bevonatok képzéséhez üveg hordozót (Menzel Gläser tárgylemezek) alkalmaztunk, melyet mosószerrel, izopropil-alkohollal és ioncserélt vízzel tisztítottunk. A szilika rétegek pórusrendszerének kialakításához két különböző templátanyagot (CTAB és Pluronic) használtunk. A prekursor szol készítése során 22 ml etanolban 1,5g CTAB-t, illetve 2 g Pluronic-ot, míg további 22 ml etanolban 4 ml 1 M-os sósavat és 8,8 ml TEOS-t oldottunk fel fél órán át tartó kevertetéssel [10]. Majd a két oldatot összeöntve további fél óráig kevertettük a rendszert. A száraz, tiszta hordozóra a prekursor szolból egy réteghúzó berendezéssel (MTA-MFA-ben készült), dip-coating technikával képeztünk réteget 10 cm/perces húzási sebességgel, majd a pórusrendszer kialakításához 480 °C-on hőkezeltük a rétegeket 1 órán át. Ez a módszer kb. 3 nm átmérőjű hengeres pórusrendszer kialakítását teszi lehetővé [11, 12].

A polimer bevonatok kialakításához a kitozán 1, 2 illetve 2,5%-os, ecetsavas (1%-os) oldatát használtuk. Ezekből az oldatokból 1-5 cm/percig terjedő húzási sebességekkel képeztünk bevonatot a dip-coating eljárással. A rétegeket minden esetben minimum egy napig száradni hagytuk szobahőmérsékleten. A kitozán bevonat jellemzőinek meghatározásakor a polimer réteget üveg hordozóra, a kioldási vizsgálatokkor a modellhatóanyaggal inkubált pórusos szilika vékonyrétegre vittük. A polimer rétegeket szárítás után térhálósítottuk. Ionos térhálósításnál a mintát 10 percig 1, illetve 3%-os, 6-os pH-jú TPP oldatba mártottuk. A kovalens térhálósítást hasonló módon, 5%-os GDA oldat alkalmazásával végeztünk.

A pórusos szilika vékonyrétegek inkubálásához a modellhatóanyagként használt Rodamin 6G színezék 10^{-3} M-os oldatába mártottuk különböző sebességekkel, majd 5 perc, illetve 18 óra múlva kihúztuk és MilliQ vízzel lemostuk a felületüket.

2.3. Vékonyrétegek jellemzése

A színezéket nem tartalmazó kitozán, illetve szilika bevonatok jellemzéséhez UV-Vis spektrofotométerrel (AnalytikJena Specord 200) felvettük a rétegek transzmittancia spektrumát 350 és 1100 nm közötti hullámhossztartományban. A kapott spektrumokra ezután optikai modell [13] alapján függvényt illesztettünk. Az illesztett paraméterekből megkaptuk a törésmutató és vastagság értékeket.

A színezéket tartalmazó rétegek esetében abszorbancia spektrumot vettünk fel a 400-800 nm-es tartományban. Az inkubálás hatékonyságának jellemzéséhez a Rodamin 6G abszorbancia maximumának (kb. 528 nm) értékét tekintettük.

2.4. Hatóanyag-leadási vizsgálatok

Kioldási vizsgálatokat végeztünk a hatóanyag-leadás és a leadás szabályozhatóságának vizsgálata érdekében. Ehhez a színezékekkel inkubált és egyes esetekben kitozán vagy térhálós kitozán bevonatokkal ellátott mintákat 20 cm^3 7,3-as pH-jú puffer oldatba helyeztük, majd rendszeres időközönként rövid időre megszakítottuk a kioldódást, homogenizáltuk a puffer oldatot és megmértük az abszorbanciáját 528 nm-en. A végső, több nap vagy hét után felvett abszorbancia értéket tekintettük 100%-nak és ehhez viszonyítva adtuk meg a százalékos kioldódási értékeket.

3. Eredmények és értékelésük

3.1. Vékonyrétegek jellemzése

Az üveg hordozóra képzett pórusos szilika, illetve kitozán vékonyrétegek transzparenssek és UV-Vis spektroszkópiával jól vizsgálhatók voltak. A kitozán rétegek esetében a nagyobb töménységű kiindulási oldatok alkalmazásakor a rétegek kevésbé voltak egyenletesek, a réteg aljához közeledve szemmel megfigyelhető mértékben változott a réteg vastagsága.

Az optikai modell illesztése során a pórusos szilika vékonyrétegekre meghatározott jellemző értékeket tartalmazza az *1. táblázat*. Ez alapján a modellhatóanyag felvételéhez használt pórusos rétegek 140-150 nm vastagságúnak adódnak. A kioldás gátlása érdekében képzett polimer rétegek vastagságát az oldat töménységének növelésével és a réteghúzás sebességének csökkentésével 150 nm-től egészen $3,5\text{ }\mu\text{m}$ -ig tudtuk növelni. Az alkalmazott vékonyrétegek vastagsága a kioldási vizsgálatok eredményeit megjelenítő *1., 2. és 3. ábrákon* lettek feltüntetve.

1. táblázat: Pórusos szilika vékonyrétegek optikai modell illesztésével meghatározott vastagság és törésmutató értékei.

Vékonyréteg	Húzás sebessége (cm/perc)	Vastagság (nm)	Törésmutató (-)
Pórusos szilika (CTAB)	10	$141,9 \pm 5,9$	$1,430 \pm 0,008$
Pórusos szilika (Pluronic)	8	$153,5 \pm 3,2$	$1,375 \pm 0,012$

3.2. Inkubálási vizsgálatok

Az inkubálási vizsgálatok során az átlátszó pórusos szilika vékonyrétegek intenzív pirosas színűvé váltak. Ez nem változott a rétegek felületének bő MilliQ vízzel való mosása után sem. Ez is mutatja, hogy a modellhatóanyagot a pórusrendszerbe inkubáltuk, nem csak a felületen kötődött meg.

Az inkubálás során változtatott paraméterek hatását az inkubálás eredményességére a *2. táblázat* foglalja össze. A színezék oldatban való állásidő növelésével jól látható módon csökken a vékonyréteg abszorbancia maximumának értéke. Ez alapján azt felételezhetjük, hogy valamilyen módon a színezék oldat pórusrendszerbe történő beáramlásakor a nagy belső felületen gyorsan, jelentős mennyiségű Rodamin 6G kötődik meg. Az adszorpció egyik magyarázata a negatív felületi töltésű szilika és a pozitív töltésű színezék molekulák között létrejövő elektrosztatikus kölcsönhatás lehet. Az állásidő növelésével párhuzamosan tapasztalt

abszorbancia csökkenés azonban más, az előbbivel ellentétes irányú folyamat vagy folyamatok jelenlétére is rámutatnak, melyek felderítése további vizsgálatok tárgyát képezhetik.

Megfigyelhetjük továbbá, hogy a réteg színezék oldatba való mártásának sebessége nem befolyásolja jelentősen a réteg abszorbanciáját, a mártási sebesség nagymértékű növelése csak igen kis abszorbancia csökkést okoz. Ezt okozhatják esetlegesen a nagyobb sebességeknél pórusrendszerben maradt levegő zárványok.

Az inkubálás hatékonyságának szempontjából vizsgálva a folyamatot megállapíthatjuk, hogy nem érdemes hosszú állásidőt alkalmazni (maximum 5 perceset), azonban a bemártás sebessége bizonyos mértékig növelhető a hatékonyság jelentős csökkenése nélkül. A kioldási vizsgálathoz készített mintáknál ennek megfelelően maximum 5 perc állásidőt és 10 mm/perces mártási sebességet alkalmaztunk.

2. táblázat: Az inkubálási paraméterek (sebesség, állásidő) változtatásának hatása az inkubált anyagmennyiségre, melyet a bevonat abszorbancia maximuma jellemez. A pórusos rétegek Pluronic-al való templátolással készültek.

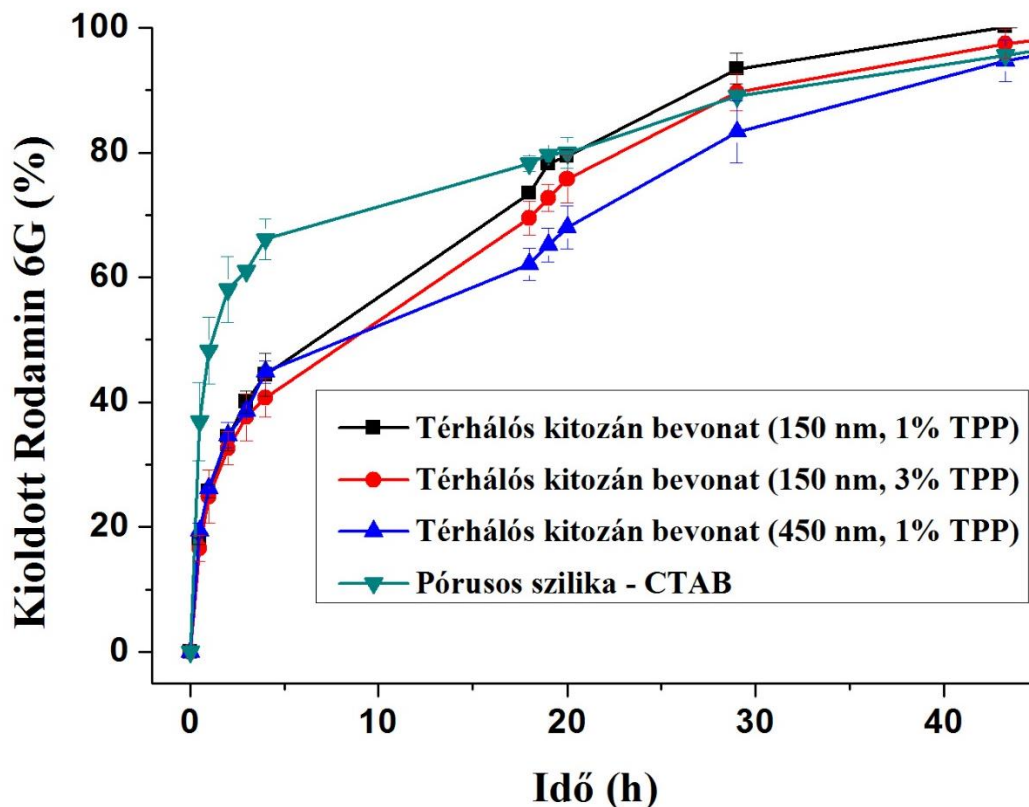
Bemártás sebessége (mm/perc)	Állásidő	Réteg abszorbanciája
200	5 perc	0,68 ± 0,02
10	5 perc	0,72 ± 0,02
200	18 óra	0,32 ± 0,02
10	18 óra	0,33 ± 0,004

3.3. Hatóanyag-leadási vizsgálatok

A színezék, mint modellhatóanyag kiáramlásának kinetikáját mutatja az 1. ábra különböző vastagságú kitozán bevonatot tartalmazó pórusos szilika vékonyrétegekből. Megfigyelhető, hogy a bevonat nélküli pórusos réteg esetében is legalább 5 óra volt szükséges, hogy az 5 perc alatt inkubált színezék kb. 70%-át leadja a rendszer. Ezt az elnyújtott hatóanyag-leadást magyarázhatja többek között, a már említett elektrosztatikus kölcsönhatás a szilika felület és a színezék között.

Az ábrán megfigyelhető (legjobban a 20 óra kioldási időhöz tartozó pontok esetében), hogy a réteg vastagságának, illetve a térhálósítószer töménységének növelésével csökkenthető a hatóanyag-leadás mértéke. Ebből következik, hogy az 1%-os TPP-vel való térhálósítás során nem alakult ki az összes lehetséges hálópont, azaz a rendszerben jelen vannak még szabad (protonált) amino csoportok.

A fenti eredményeket magyarázhatja, hogy vastagabb réteg esetén nagyobb az a távolság, melyet a színezék molekuláknak gátolt diffúzióval kell megtenniük. A térhálósítószer töménységének növelésével feltételezhetően csökken a térhálósítási fok, ami kisebb duzzadást eredményez. Ez pedig a diffúzió nagyobb mértékű gátoltságához vezethet.

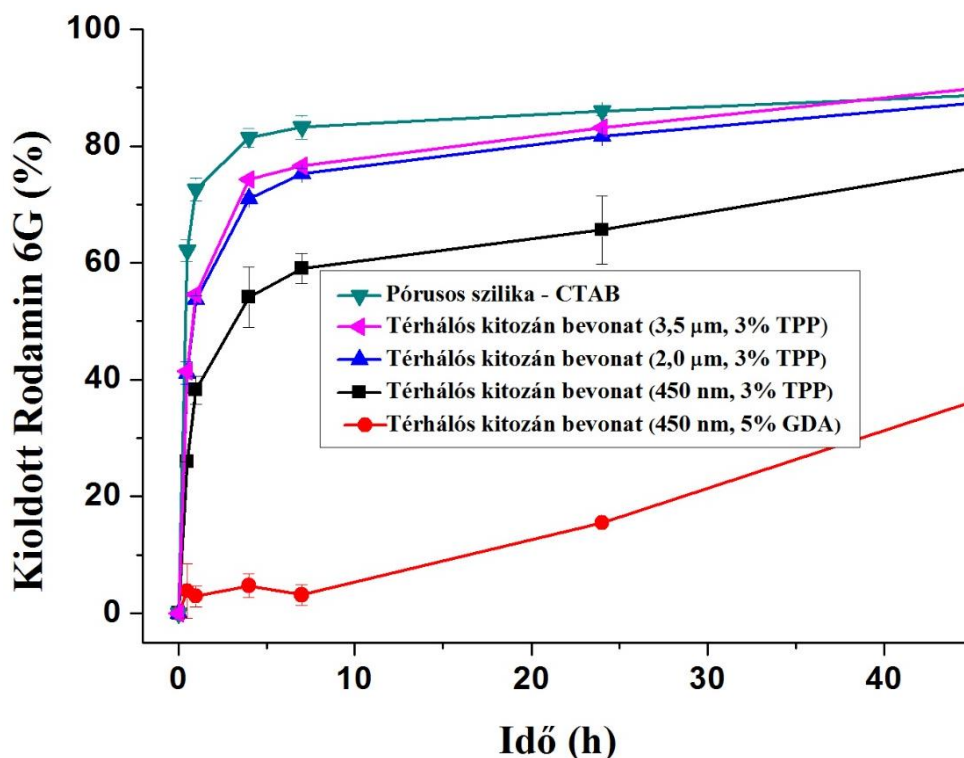


1. ábra. Rodamin 6G modellhatóanyag leadásának kinetikája TPP-vel térhálósított kitozán bevonattal ellátott (CTAB-vel templátolt) pórusos szilika vékonyrétegekből.

Az előbbihez hasonló kioldási eredményeket mutat a 2. ábra is, azonban ebben az esetben vastagabb rétegeket és csak 3%-os TPP oldatot alkalmaztunk, valamint a GDA-val kovalensen térhálósított kitozán bevonatok hatása is megfigyelhető.

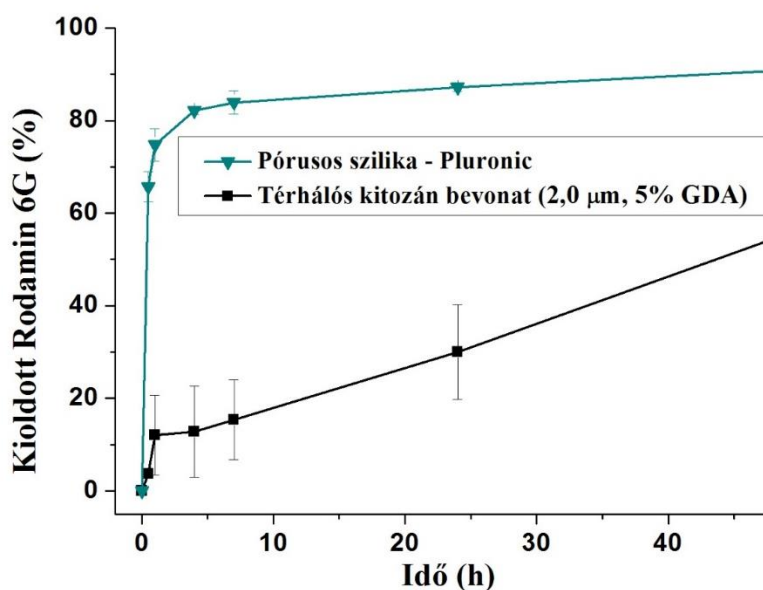
Az ábrán jól látszik, hogy 24 óra alatt a pórusos szilika rétegből a modellhatóanyag kb. 85%-a, 450 nm-es TPP-vel térhálósított kitozán bevonattal csak kb. 60%-a, míg GDA-val térhálósított polimer bevonattal kevesebb, mint 20%-a áramlott ki. A kovalensen térhálósított réteg nagyfokú visszatartó hatása feltételezhetően a stabil kötésekkel és kisebb duzzadásfokkal van összefüggésben.

A 450 nm-es, ionosan térhálósított réteg kioldási görbáját az 1. ábra görbéihez hasonlítva megfigyelhetjük, hogy még tovább sikerült növelni a visszatartó hatást. Érdekes azonban, hogy a jóval vastagabb kitozán bevonatokat alkalmazva kevésbé mutatkozott meg a retard hatás. Ezt annak tudhatjuk be, hogy a több mikrométer vastag kitozán rétegeket a 450 nm vastag rétegekkel megegyező ideig térhálósítottuk. Valószínűsíthető, hogy a vastagabb rétegek esetében nem volt elegendő idő arra, hogy teljes mértékben végbemenjen a térhálósítás és homogén réteg alakuljon ki. Így ugyan egy vastag, de kisebb mértékben térhálósított réteg alakulhatott ki. Ez rámutat a térhálósítási fok elsődleges szerepére a retard hatás elérésében. Ez nem mond ellent azzal, hogy azonos térhálósítási fok esetén egy vastagabb réteg nagyobb mértékben tartsa vissza a modellhatóanyagot.



2. ábra. Rodamin 6G modellhatóanyag leadásának kinetikája TPP-vel, illetve GDA-val térhálósított kitozán bevonattal ellátott (CTAB-vel templátolt) pórusos szilika vékonyrétegekből.

Az inkubálási vizsgálatok során Pluronic templát anyaggal képzett pórusrendszert vizsgáltunk. A 3. ábrán látható kioldási görbék azonos módon készített minták kioldási vizsgálatát mutatják. A bevonat nélküli görbe gyakorlatilag megfelel a CTAB-s pórusos szilika esetében kapott kioldási görbével, ami alátámasztja azt a feltevést, hogy a két rendszer hasonlóan viselkedik hatóanyag-felvétel és leadás szempontjából. A Pluronic-al képzett pórusos szilika rétegek esetében is a GDA-val térhálósított kitozán bevonattal jelentős mértékű hatóanyag visszatartást, azaz elnyújtott hatóanyag leadást lehetett elérni.



3. ábra. Rodamin 6G modellhatóanyag kioldási vizsgálata Pluronic-al templátolt pórusos szilika vékonyrétegekből bevonat nélkül, illetve kovalensen térhálósított kitozán bevonattal.

Összegzés

Pórusos szilika vékonyréteget képeztünk üveg hordozóra dip-coating technikával CTAB és Pluronic templátanyagok alkalmazásával. Szintén a mártásos módszerrel kitozán vékonyrétegeket hoztunk létre mind üveg hordozóra, mind pedig a pórusos szilikára. Ezeket a rendszereket optikai módszer segítségével vizsgáltuk és jellemeztük.

A pórusos réteg pórusrendszerébe Rodamin 6G modellhatóanyagot inkubáltunk és vizsgáltuk, hogy a bemártás sebessége, valamint az inkubálás ideje milyen hatással van az inkubált hatóanyag mennyiségére. A mártás sebességétől csak kis mértékben függött a réteg abszorbancia maximumának értéke. A hatékony inkubáláshoz maximum 5 perc állásidőt állapítottunk meg.

Vizsgáltuk az inkubált modellhatóanyag kioldási kinetikáját. Az eredmények megmutatták, hogy a pórusos szilika rétegekből elnyújtottan oldódik ki a színezék. A hatóanyag-leadás idejének további elnyújtására adott lehetőséget a TPP-vel, de leginkább a GDA-val térhálósított kitozán bevonat alkalmazása.

A szerzők köszönettel tartoznak Dr. Hild Erzsébetnek és a Kolloidkémia csoport minden egyes tagjának.

Felhasznált irodalom:

- 1) D. J. Brayden, Controlled release technologies for drug delivery, *Drug Discovery Today*, Vol. 8, 21, (2003) 976-978.
- 2) T. M. Aminabhavi, R. V. Kulkarni, A. R. Kulkarni, Polymeric membranes, *Polymer News*, Vol. 29, 6, (2004) 214–218.
- 3) Prescott, J. H., Lipka, S., Baldwin, S., Sheppard Jr., N. F., Maloney, J. F., Coppeta¹, J., Yomtov, B., Staples, M. A., Santini Jr., J. T., *Nature Biotechnology*, 32 (3), 437-438 (2006)
- 4) Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. R., Wu, C-W., Lin, V. S-Y., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1278–1288, (2008)
- 5) Bajpai, A. K., Sandeep, K. S., Bhanu, S., Kankane, S., *Progress in Polymer Science*, 33, 1088–1118 (2008)
- 6) Thanou, M., Verhoef, J. C., Junginger, H. E., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, 117–26 (2001)
- 7) Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., Park, H. J., *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51–63 (2010)
- 8) Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Mengíbar, M., Heras, A., *Carbohydrate Polymers*, 84, 803–806 (2011)
- 9) Gupta, K. C., Jabrail, F. H., *Carbohydrate Research*, 342, 2244–2252 (2007)
- 10) Zámbo D., Megnövelt fényáteresztésű, pórusos szilika szol-gél bevonatok, Diplomamunka, BME, Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék, 2010.
- 11) Losurdo M., Giangregorio M. M., Bruno G., Poli F., Armelao L., Tondello T.: Porosity of mesoporous silica thin films: Kinetics of the template removal process by ellipsometry, *Sensors and Actuators B*, 126, 168–173 (2007).
- 12) Wei L., Ming Z., Jinli Z., Yongcai H., Self-assembly of cetyl trimethylammonium bromide in ethanol-water mixtures, *Front. Chem. China*, 4, 438–442 (2006).
- 13) 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).