

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**1997.**

**PÁPAY ZSÓFIA EDIT**

**Gyógyszerészeti tudományok korszerű kutatási irányai**  
című program

Program- és témavezető: Dr. Antal István, egyetemi tanár  
Konzulens: Bertalanné dr. Balogh Emese, egyetemi adjunktus

# Apigenin-tartalmú multipartikuláris hatóanyagleadó rendszerek formulálási lehetőségei

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Dr. Pápay Zsófia Edit**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Antal István, Ph.D., egyetemi docens

Konzulens: Bertalanné Dr. Balogh Emese, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Alberti-Dér Ágnes, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Kovácsné Dr. Bácskay Ildikó Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóthfalusi László Ph.D., egyetemi docens

Dr. Újhelyi Gabriella Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2016

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	5
<b>1. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR</b> .....	8
<b>1.1. A flavonoidok jelentősége és előfordulásuk</b> .....	9
1.1.1. Apigenin általános jellemzése .....	11
1.1.1.1. <i>Az apigenin biofarmáciai tulajdonságai</i> .....	12
1.1.1.2. <i>Az apigenin farmakológiai hatásai</i> .....	14
1.1.1.3. <i>Az apigenin kölcsönhatásai gyógyszermolekulákkal</i> .....	18
1.1.2. <i>Petroselinum crispum</i> , mint az apigenin legfőbb természetes forrása.....	19
<b>1.2. Az apigenin gyógyszer technológiai vonatkozásai és hordozó rendszerei</b> .....	22
1.2.1. Ciklodextrinek .....	22
1.2.2. Liposzómák és micellák.....	22
1.2.3. Nanorészecskék .....	27
1.2.4. Nanokristályok.....	29
1.2.5. További nanoméretű hordozórendszerek.....	32
1.2.6. Egyéb gyógyszer technológiai eljárások.....	34
<b>1.3. Alkalmazott gyógyszer technológiai eljárások</b> .....	35
1.3.1. Oldékonyságnövelés ciklodextrinnekkel .....	35
1.3.2. Módosított hatóanyagleadás pelletekkel .....	38
1.3.3. Célzott hatóanyagleadás nanorészecskékkel .....	41
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	47
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	48
<b>3.1. Bioaktív hatóanyagok</b> .....	48
3.1.1. Apigenin fizikai-kémiai tulajdonságai .....	48
<b>3.2. Segédanyagok</b> .....	52
<b>3.3. Oldószer, vegyszerek és reagensek</b> .....	54

<b>3.4. <i>Petroselinum crispum</i> kivonat előállítása</b> .....	55
<b>3.5. Gyógyszer technológiai módszerek</b> .....	56
3.5.1. Oldékonyság növelés ciklodextrinekkel .....	56
3.5.2. Bioaktív hatóanyag rétegzése inert pelletmagra és filmbevonás .....	57
3.5.3. Albumin nanopartikulumok előállítása és porlasztva szárítása .....	59
<b>3.6. Vizsgáló módszerek</b> .....	60
3.6.1. Analitikai módszerek .....	60
3.6.1.1. <i>Nagy nyomású folyadékkromatográfia (HPLC)</i> .....	60
3.6.1.2. <i>Tömegspektrometria (MS)</i> .....	61
3.6.2. UV-látható és fluoreszcencia spektroszkópia .....	61
3.6.3. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR) .....	62
3.6.4. Nedvességtartalom meghatározása .....	62
3.6.5. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM).....	63
3.6.6. Pelletek fizikai ellenőrző vizsgálatai .....	63
3.6.6.1. <i>Méret és szemcsealak vizsgálata képanalízissel</i> .....	63
3.6.6.2. <i>Törési szilárdság, tömörödési tulajdonságok és gördülékenység mérése</i> .....	63
3.6.6.3. <i>Közeli infravörös spektroszkópiai mérések (NIR)</i> .....	64
3.6.6.4. <i>Hatóanyag tartalom mérése és kioldódás vizsgálatok</i> .....	64
3.6.7. Albumin nanopartikulumok vizsgálatai .....	65
3.6.7.1. <i>Részecskeméret és zeta potenciál meghatározása</i> .....	65
3.6.7.2. <i>Hatóanyag tartalom és bezárási határfok meghatározása</i> .....	65
3.6.7.3. <i>Röntgen por-diffrakció (XRPD)</i> .....	66
3.6.7.4. <i>Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)</i> .....	66
3.6.7.5. <i>Lézer diffrakciós szemcseméret eloszlás vizsgálata</i> .....	66
3.6.7.6. <i>In vitro aerodinamikai tulajdonságok vizsgálata</i> .....	66
<b>3.7. Antioxidáns hatás vizsgálata</b> .....	67

<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	69
<b>4.1. <i>Petroselinum crispum</i> kivonat előállítás és antioxidáns hatásának vizsgálata</b>	69
<b>4.2. A hatóanyagtartalom kimutatása</b> .....	71
<b>4.3. Gyógyszer technológiai módszerek</b> .....	74
4.3.1. Oldékonyság növelés ciklodextrinekkel .....	74
4.3.1.1. <i>Elővizsgálatok és fázis-oldhatósági vizsgálatok eredményei</i> .....	74
4.3.1.2. <i>UV-látható és fluoreszcencia spektroszkópiai mérések</i> .....	77
4.3.1.3. <i>Antioxidáns hatás vizsgálata</i> .....	80
4.3.2. Multipartikulumok minőségi paraméterei .....	81
4.3.2.1. <i>Méret és szemcsealak vizsgálata képanalízissel, morfológia</i> .....	81
4.3.2.2. <i>Törési szilárdság, görbülékenység és nedvességtartalom</i> .....	83
4.3.2.3. <i>FTIR és NIR spektroszkópiai mérések</i> .....	85
4.3.2.4. <i>Rétegzett pellet hatóanyag tartalma és kioldódás vizsgálatok</i> .....	88
4.3.2.5. <i>Antioxidáns hatás vizsgálata</i> .....	90
4.3.3. Albumin nanopartikulumok előállítása és jellemzése .....	91
4.3.3.1. <i>Részecskeméret és zeta potenciál meghatározása</i> .....	91
4.3.3.2. <i>Hatóanyag tartalom és bezárási határfok meghatározása</i> .....	92
4.3.3.3. <i>Fluoreszcencia spektroszkópia vizsgálatok</i> .....	92
4.3.3.4. <i>Nedvességtartalom meghatározása</i> .....	94
4.3.3.5. <i>Röntgen por-diffrakció (XRPD)</i> .....	94
4.3.3.6. <i>Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)</i> .....	95
4.3.3.7. <i>FTIR spektroszkópiai mérések</i> .....	96
4.3.3.8. <i>Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM)</i> .....	97
4.3.3.9. <i>Lézer diffrakciós szemcseméret eloszlás vizsgálata</i> .....	99
4.3.3.10. <i>In vitro aerodinamikai tulajdonságok vizsgálata</i> .....	101
4.3.3.11. <i>Antioxidáns vizsgálat</i> .....	103

<b>5. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>105</b>
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>107</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>109</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>110</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>111</b>
<b>10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>138</b>
<b>11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>140</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

$\alpha$ -CD	$\alpha$ -ciklodextrin
ACN	Acetonitril
AmmAc	Ammónium-acetát
AP	Aktivátor protein
APC	Adenomatózus polipózis coli ( <i>Adenomatous polyposis coli</i> )
Api	Apigenin
BaP	Benzopirén
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciklodextrin
BCS	Biofarmáciai Osztályozási Rendszer ( <i>Biopharmaceutical Classification System</i> )
BSA	Szarvasmarha szérum albumin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CDDS	Vastagbél specifikus gyógyszerhordozó rendszerek ( <i>Colon-specific drug delivery systems</i> )
CMC	Kritikus micellaképző koncentráció
CNP	Szén nanopor
CYP	Citokróom P450 enzimesalád
DL	Hatóanyagtartalom ( <i>Drug loading</i> )
DM- $\beta$ -CD	Dimetil- $\beta$ -ciklodextrin
DPI	Száraz porinhalációs aeroszol ( <i>Dry powder inhaler</i> )
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DS	Szubsztituáltság mértéke ( <i>Degree of substitution</i> )
DSC	Páztázó kalorimetria ( <i>Differential scanning calorimetry</i> )
DSPC	1,2-Disztearoil-sn-glicero-3- foszfatidilkolin
ED	Emittált dózis
EE	Bezárási hatásfok ( <i>Encapsulation efficiency</i> )
EGF	Epidermális növekedési faktor
EPR	Elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia ( <i>Electron paramagnetic resonance spectroscopy</i> )
ESI	Elektroporlasztásos ionizáció ( <i>Electrospray ionization</i> )
ESIPT	Gerjesztett állapotban végbemenő intramolekuláris proton transzfer ( <i>Excited-state intramolecular proton transfer</i> )

FDA	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FTIR	Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia
$\gamma$ -CD	$\gamma$ -ciklodextrin
GIT	Gasztrointesztinális traktus
GR	Glutation-reduktáz
GSD	Geometriai szórás
HepG2	Máj hepatocelluláris karcinóma sejtvonala
HP- $\beta$ -CD	Hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrin
HPH	Nagy nyomású homogenizálás ( <i>High pressure homogenization</i> )
HPMC	Hidroxipropil-metilcellulóz
HSS	Nagy sebességű kevertetés ( <i>High speed stirring</i> )
LNC	Lipid nanokapszulák
MCC	Mikrokristályos cellulóz
MCF-7	Emlődaganat sejtvonala ( <i>Michigan Cancer Foundation-7</i> )
MMAD	Tömegmediánnak megfelelő aerodinamikai átmérő ( <i>Mass median diameter</i> )
MRP	Multidrog rezisztencia fehérje
MCC	Mikrokristályos cellulóz
MFT	Minimális filmképződési hőmérséklet
MS	Tömegspektrométer ( <i>Mass spectrometer</i> )
NGI	Kaszád impaktor ( <i>Next generation cascade impactor</i> )
NIR	Közeli infravörös spektroszkópia ( <i>Near infrared spectroscopy</i> )
NP	Nanorészecske
OAT	Organikus anion transzporter
PDI	Polidiszperzitás index
PEG	Polietilén-glikol
PEO-PPO-PEO	Poli (etilén-oxid)/poli (propilén-oxid) blokk-kopolimerek
PLGA	D,L-tejsav-glikolsav kopolimer ( <i>Poly (lactic-co-glycolid acid)</i> )
PVAc	Polivinil-acetát
PVKap	Polivinil-kaprolakton
RAMEB	Random metilált $\beta$ -ciklodextrin



RD	Visszanyert dózis ( <i>Recovered dose</i> )
RES	Retikuloendoteliális rendszer
ROS	Reaktív oxigén szabadgyök
SAS	Szuperkritikus antiszolvens technológia
SBE- $\beta$ -CD	Szulfobutil-éter- $\beta$ -ciklodextrin
SCS	Nátrium-koleszteril-szulfát
SDs	Szilárd diszperziók
SEM	Pásztázó elektronmikroszkóp ( <i>Scanning electron microscopy</i> )
SGLT1	Nátrium/glükóz kotranszporter
SLN	Szilárd lipid nanopartikulum
SMEDDS	Önemulgeáló gyógyszerhordozó rendszerek
SOD	Szuperoxid-diszmutáz
SPARC	Extracelluláris mátrix glikoprotein
TIC	Teljes ionáram kromatogram
TEC	Trietil-citrát
TFA	Trifluor-ecetsav
TNF	Tumor nekrosis faktor
TRAIL	Tumor nekrosis faktorhoz kapcsolt apoptózist indukáló ligand ( <i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> )
UGT	UDP-glükuronozil-transzferáz
USP	Amerikai Egyesült Államok Gyógyszerkönyve ( <i>United States Pharmacopeia</i> )
VEGF	Érképződésért felelős növekedési faktor
VMD	Térfogat mediánnak megfelelő aerodinamikai átmérő ( <i>Volume median diameter</i> )
XRPD	Röntgen por-diffrakció

## 1. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR

Napjainkban már tudományosan is igazolták azt az epidemiológiai megfigyelést, miszerint zöldségek, gyümölcsök és gyógynövények fogyasztásával számos degeneratív betegség kialakulása megelőzhető. Ilyen kóros elváltozásoknak számít például a krónikus gyulladás, a szív- és érrendszeri, valamint a daganatos megbetegedések, melyek kialakulásában a káros szabadgyökök felhalmozódásának is nagy szerepe van. Ezért a bioaktív hatóanyagokkal rendelkező növények, főként antioxidáns kapacitásuknak köszönhetően, jótékony hatással vannak az emberi szervezetre. Az egyik figyelemre méltó bioaktív flavonoid az *apigenin*, mely képes gátolni a reaktív oxigéngyököket és csökkenteni a krónikus gyulladást. Ezáltal megakadályozza kardiovaszkuláris betegségek és a tumorok kialakulását, továbbá sejtekben jelátviteli utak befolyásolásával antikarcinogén hatású.

Az utóbbi évekre visszatekintve azt tapasztalhatjuk, hogy az orvostudományban új szemlélet alakult ki, miszerint a betegségek kialakulásának megelőzésére nagyobb hangsúlyt fektetnek. Előtérbe kerültek olyan növényi alapú, gyógyhatású készítmények, melyek a megelőzésen kívül, a kezelésben vagy az utókezelésben is hatékonyan alkalmazhatóak. Ezért a gyógyszerkutatás és -fejlesztés figyelme is a *fitokomponensek* felé irányult, mert kiváló hatékonyságuk mellett, a mellékhatások kialakulásának csekély kockázata áll fenn. Továbbá fontos szempont, hogy gyártásuk költséghatékonyabb lehet, hiszen egy új szintetikus úton előállított hatóanyag fejlesztése rendkívül időigényes és drága folyamat.

A szintetikus gyógyszermolekulákhoz hasonlóan, a bioaktív tulajdonságú anyagok esetében is a vízoldhatóság és a permeabilitás szerepe meghatározó jelentőségű a hatás kialakulása szempontjából. A készítményfejlesztés során eleget nem lehetne fontos a megfelelő kioldódás és felszívódás, tehát a szükséges koncentráció biztosítása a hatás helyén. Az apigenint alacsony vízoldhatósága és magas permeabilitása következtében a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) II. osztályába sorolták, ezért formulálásának egyik kiemelt célja vízoldékonyságának javítása. Mivel a gyógyszeripar folyamatos igénye az egyre újabb és hatékonyabb gyógyszer technológiai eljárások fejlesztése, egy magas apigenin tartalmú, akár célzott hatóanyagleadást biztosító *innovatív készítmény* kifejlesztése nagymértékben hozzájárulhat a gyógyszeres terápia sikeréhez.

### 1.1. A flavonoidok jelentősége és előfordulásuk

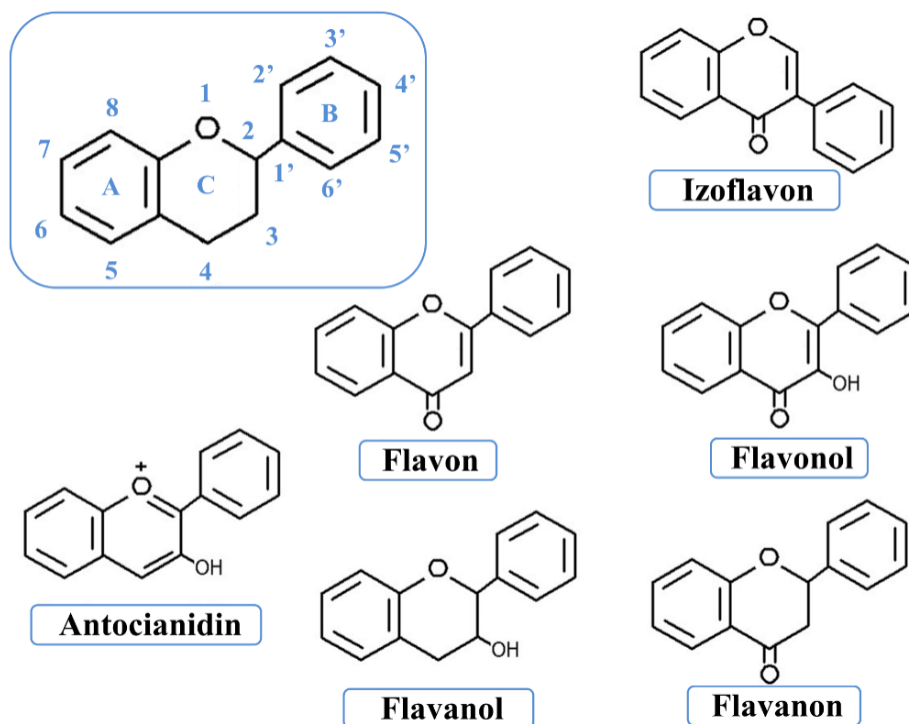
A flavonoidok a növényvilágban rendkívül elterjedt anyagok. Kémia diverzitásuknak köszönhetően több, mint 6000 vegyületük ismert. A flavonoid elnevezés eredete a latin „flava”, azaz sárga szóból ered, mivel a flavonid vegyületek az esetek túlnyomó többségében sárga színűek és a pigmentsejtekben akkumulálódva a növények színét is adják. Másodlagos anyagcsere termékként keletkeznek, ami azt jelenti, hogy bioszintézisük nem kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez vagy növekedéséhez. A növény káros anyagokkal szembeni (pl.: UV sugárzás) védekező mechanizmusa révén keletkeznek, így *in vivo* termelődésük csak kedvezőtlen környezeti körülmények hatására indul be. Bioszintézisük a növényben a sikimisav úton megy végbe, melynek központi intermedier vegyülete a sikimisav. Ezt követően, több lépésben fenilalanin aromás aminosavból fahéjsav keletkezik, melyek a flavonoidok fő prekursora (1; 2).

Szerkezetüket tekintve oxigén tartalmú heterociklusos vegyületek, két vagy több aromás gyűrűt tartalmazó polifenolok. Általános szerkezetük C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, melyből két fenolgyűrű (A és B) és egy heterociklusos pirén gyűrű (C) tevődik össze. A B gyűrű elhelyekedése alapján három szerkezeti izomerük van, flavonoid, izoflavonoid és neoflavonoid alapvázak. A gyűrűk felépítésétől és szubsztituensektől függően hat alcsoportot különböztetünk meg, melyek közül kiemelkednek a flavonok, izoflavonok és flavonolok (**1. ábra**). A növényekben általában cukormolekulákkal konjugálódva, glikozidos kötésben raktározódnak. Megkülönböztetünk O- és C-glikozidokat, attól függően, hogy a cukorkomponensek éterkötéssel vagy C-C kovalens kötéssel kapcsolódnak az aglikon molekulákhoz (1; 2).

Biológiai hatásaik kifejtésében jelentős a hidroxil és egyéb funkciós csoportok száma és elhelyezkedése. A cukormolekulák kapcsolódásával (pl.: glükóz, apióz és ramnóz) megnő az alaplakmolekula vízdékonysága, de a farmakológiai hatások kialakulásáért az aglikon molekulák felelősek (3). Szervezetbe jutva diverzitásuknak köszönhetően számos jótékony hatást fejtenek ki, ezek közül legkiemelkedőbbek az antioxidáns, antikarcinogén és antiflogisztikus hatások. Ezen kívül immunmodulátor, antibakteriális és analgetikus tulajdonsággal is rendelkeznek (2; 4; 5). Az elfogyasztott étellel jutnak be a szervezetbe ahol a komponensek szinergista hatása is érvényesül. Napi bevitelük általában 1-2 g-ra tehető, de ez az adat jelentős interperszonális variabilitást mutat (6; 7). Felszívódásukban szerepet játszanak a bélben lejátszódó aktív és passzív

transzportmechanizmusok is (8). Feltehetően mind az aglikon, mind a glikozidok is képesek felszívódni, de a molekulák 80%-a ún. first pass metabolizmust szenved. Gyors metabolizációjuk során szulfát és glükuronid konjugátumok keletkeznek, melyek nagyrészt vizelettel ürülnek (9).

A flavonoidok jelentősége abban rejlik, hogy az emberi szervezet nem képes őket előállítani, ennél fogva kiemelt a gyógyászatban történő alkalmazásuk. A gyógyszeripar jövőbeli feladata a hatékony alkalmazás érdekében a kinyerésre, előállításra és formulálásra vonatkozó eljárások kidolgozása, melyet rossz vízdékonyságuk és ebből adóan igen alacsony biohasznosíthatóságuk tesz szükségessé. Az elmúlt évtizedekben a növényi hatóanyagok felhasználása jelentősen megnőtt többek között olyan krónikus betegségek megelőzésében, mint a kardiovaszkuláris megbetegedések vagy a diabétesz. Egyes vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a daganatok kialakulásának rizikófaktorát is csökkentik (1;2;5). Mindazonáltal a terápia során lejátszódó hatásmechanizmus és az ehhez szükséges a pontos dózis meghatározása egyelőre még várat magára.



**1. ÁBRA** A FLAVONOIDOK ÁLTALÁNOS SZERKEZETI KÉPLETE (BEKERETEZVE) ÉS ALCSOPORTJAİK (SAJÁT SZERK.)

## 1.1.1. Apigenin általános jellemzése

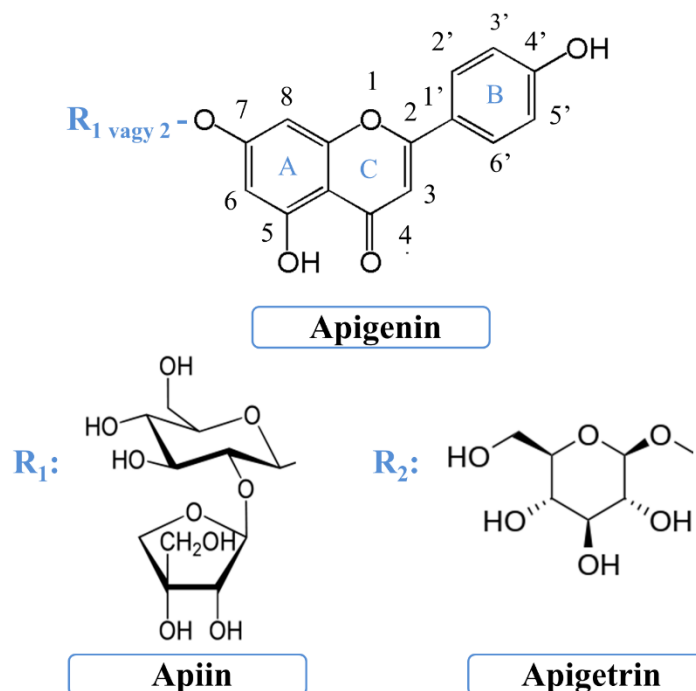
Az apigenin az egyik legelterjedtebb flavonoid, döntően glikozidok formájában fordul elő a természetben. Legnagyobb mennyiségben az *Apiaceae* család (Ernyősvirágzatúak) tagjaiban található meg, mint a zeller és a petrezselyem és a kamilla (*Asteraceae* család) (10). Az **I. táblázatban** látható néhány jól ismert növény apigenin tartalma. Európában az apigenin bevitel egy megfelelően táplálkozó felnőtt esetén átlagosan  $3 \pm 1$  mg/nap (7), de ez országoként, valamint az egyén táplálkozási szokásainak megfelelően eltérő lehet. Ezért több eltérő irodalmi adatot közöltek erre vonatkozóan: 0,4 mg/nap (11), 0,6 mg/nap (12), 1 mg/nap (13) és 2,34 mg/nap (10). Átlagosan az elfogyasztott flavonoidok 0,5%-a apigenin. A magyar gyermekek  $0,57 \pm 0,71$  mg, míg a felnőttek  $0,85 \pm 0,87$  mg apigenint fogyasztanak naponta, mely az európai átlaghoz képest alacsony (14).

**I. TÁBLÁZAT** NÉHÁNY NÖVÉNY ÉS GYÓGYNÖVÉNY MEGKÖZELÍTŐLEGES  
APIGENIN TARTALMA (15; 16)

Növény	Apigenin tartalom (mg/100 g)
Articsóka ( <i>Cynara scolymus</i> )	7,48
Borsmenta ( <i>Mentha x piperita</i> )	5,39
Édesrépa ( <i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i> )	3,85
Kerti kakukkfű ( <i>Thymus vulgaris</i> )	2,5
Kamilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	1000 <sup>SZ</sup>
Közönséges orbáncfű ( <i>Hypericum perforatum</i> )	1,72
Leveles saláta ( <i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i> )	0,13
Majoranna ( <i>Origanum majorana</i> )	3,50 <sup>SZ</sup>
Orvosi zsálya ( <i>Salvia officinalis</i> )	1,20
Rozmaring ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	0,55
Szurokfű ( <i>Origanum vulgare</i> )	17,71 <sup>SZ</sup>
Zeller ( <i>Apium graveolens</i> )	2,41

<sup>SZ</sup> szárított növényben

Az apigenin flavonvázis vegyület, ezért az összes flavonoidhoz hasonlóan, bioszintézise a növényekben a fahéjsav átalakításával történik. Ezt követően további lépésekben a flavonok szintézisét (2S)-flavanonból a legtöbb esetben a sejtmembránhoz kötött flavon-szintáz II enzim katalizálja. Az *Apiaceae* család néhány tagjában a citoszolban levő flavon-szintáz I katalizálja ezt a reakciót. Ez utóbbi folyamat játszódik le a petrezselyemben is, ahol a flavanon vázas naringeninből apigenin keletkezik a citoszolban levő flavon-szintáz I enzim katalízisével (17). Ezt követően az apigenin főként glikozidok formájában raktározódik a növények sejtjeiben, melyek közül leggyakoribbak az apiin (apigenin-7-*O*-apioglükozid) és az apigetrin (apigenin-7-*O*-glükozid). A szerkezeti képletek a **2. ábrán** láthatók.



**2. ÁBRA** AZ APIGENOIDOK SZERKEZETI KÉPLETE (SAJÁT SZERK.)

#### 1.1.1.1. Az apigenin biofarmáciai tulajdonságai

Az apigenin a szervezetbe való bejutásának elsődleges formája az apigenin tartalmú növények elfogyasztása, melyekben a glikozidok nagyobb mennyiségben vannak jelen, mint az aglikon (**2. ábra**). Korábban azt feltételezték, hogy a flavonoid glikozidok szervezetbe jutást követően nem tudnak felszívódni a vékonybélben csak kizárólag a vastagbélben, ahol a mikroflóra által termelt  $\beta$ -glikozidáz enzimek segítségével meg nem történik a glikozidos kötés hasítása. Mára azonban azonosítottak

emberben is három endogén  $\beta$ -glikozidáz enzimet, melyek közül az egyik megtalálható a vékonybél, máj és vese sejtek citoszoljában és szubsztrátjai közé tartoznak a flavon-, flavanon- és izoflavon-7-glükozidok (18-20). A hidrolízis elősegíti a flavonoidok felszívódását, tehát az így felszabaduló aglikon jobban abszorbeálódik, ugyanis a poláros cukor szubsztituensek megnehezítik a celluláris felvételt. Az enzimek aktivitásában egyéenkénti szignifikáns eltérések mutatkoznak, mely befolyásolja a flavonoidok biohasznosulását (21). Az apigenin szerkezetben történő felszívódását több tanulmány is igazolja, hiszen az apigenin-glikozidokban gazdag ételek fogyasztása után az aglikon detektálható volt a vérplazmában (22-24). Ellenben az alacsony maximum plazmakoncentráció értékek arra utalnak, hogy az apigenin molekula nagy mértékben first pass metabolizmust szenved el a bél enterocitáiban és a májban, valamint ezen kívül feltehetően enterohepatikus körforgásban is részt vesz (23). A bélben aktívabb lehet a cukrok hasítása, mert az apigetrin glikozid a vékonybélben 83%-ban, a májban 49%-ban deglikozilálódott (18). A felszívódás helyéről és mechanizmusáról különféle eredmények születtek, mivel a bél különböző területeiről eltérő mennyiségben történik a felszívódás. Az egyik tanulmány szerint az elfogyasztott apigenin legnagyobb százalékban a vastagbélből (40%), kisebb mennyiségben a patkó- és csípőbélből (21%) abszorbeálódott (23). Ezzel ellentétben állatkísérletekben azt mutatták ki, hogy az apigenin főbb felszívódási helye a patkóbél (25). Ennek a jelenségnek a pontos oka a mai napig nem tisztázott. Valószínűsíthető, hogy az apigenin az egész bélcsatornában képes aktív és passzív transzport mechanizmusok segítségével felszívódni, de az egyes bélszakaszokon különböző mértékben. Összefoglalva tehát az apigenin-glikozidok a bélfalba transzportálódnak, ahol gyorsan deglikozilálódnak, majd felszívódnak.

Felszívódást követően a vérplazmában humán szérum albuminhoz (HSA) kötődik hidrofób és elektrosztatikus kötésekkel, tehát a nem disszociált, neutrális apigenin képes kötődni. Elhelyezkedése a HSA fehérje II A szubdomén ún. site I részénél valósul meg (26). *In vitro* kísérletben a fázis I metabolizációja során monohidroxilált termékek keletkeznek (szkutellarin, izoszkutellarin és luteolin), melyeknek szintén van biológiai aktivitásuk. Ebben a folyamatban a CYP enzimek közül főként az 1A1 2B és a 2E1 vesznek részt. *In vitro* fázis II metabolizáció alatt konjugálódási folyamatokon megy keresztül, aminek következtében az apigenin molekulából három monoglükuronizált és egy monoszulfatált termék keletkezik. Az így létrejövő luteolin molekulából pedig négy

monoglükuronizált, két monoszulfatált és egy metilkonjugált termék, a diozmetin, keletkezik. *Ex vivo* kísérletben - preparált patkány máj perfúziója során - nem tudtak kimutatni Fázis I metabolitokat, ezzel szemben egy diglükuronizált és egy glükuronoszulfatált származékot fedeztek fel (27). Egy másik kutatócsoport által végzett *in vitro* és *in vivo* farmakokinetikai vizsgálat során szintén glükouronizált és szulfatált konjugátumokat ugyanolyan mennyiségben mutattak ki a májban. A *per os* beadott apigenin gyorsan megjelent a vérplazmában, felszívódásában feltehetőleg SGLT1 és MRP2 transzporterek, valamint a P-glikoprotein segédkeznek. A first pass metabolizmust modellezve *in situ* preparált bél perfúziós modellen azt az eredményt kapták, hogy a vérkeringésbe a vizsgált apigenin mennyiség 29%-a jutott át a bél enterocitáin, melyből 16% változatlan, 9% glükuronizált és 4% szulfatált formában. Ezek az eredmények szintén arra engednek következtetni, hogy az apigenin metabolizációt szenved el a bélben még a felszívódás előtt, mely jelentősen csökkenti az orális biohasznosíthatóságát (28). A konjugátumok létrejöttében feltehetően az UGT1A9 (29), UGT1A3 és az UGT1A6 enzimek játszanak szerepet (30). A konjugátumok intesztinális effluxában jelentős szerepet kapnak az MRP és OAT enzimek is (31).

Az exkréció során az elfogyasztott dózis kisebb része 24 óra alatt vizelettel [ $0,22 \pm 0,16\%$ -a (23) illetve  $0,58 \pm 0,16\%$ -a (22)], nagyobb része pedig széklettel ürül, nagy individuális eltérésekkel, de a kiválasztásban nincs nemenkénti különbség (22).

#### 1.1.1.2. Az apigenin farmakológiai hatásai

A felszívódott apigenin biológiai aktivitása és azok mechanizmusai rendkívül sokrétűek, ezért csak a legjelentősebbek kerülnek bemutatásra. Kiemelkednek antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásai, melyek a kemopreventív és a daganatellenes hatásaival is szorosan összefüggenek (32). Az *antioxidáns hatását* elsősorban szabadgyökök ellen fejt ki (33). Az oxigénből származó reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) a szervezetben természetes módon keletkeznek, például a mitokondriumokban lejátszódó energiefel szabadító folyamatok vagy enzimrendszerek működése révén. Ezek a rendkívül reaktív, párosítatlan elektront tartalmazó oxigén vegyületek (szuperoxid,  $\bullet\text{O}_2^-$  vagy hidroxil,  $\bullet\text{OH}$ ) fontos szerepet töltenek be a sejt működés szabályozásában és ezért keletkezésük és eliminációjuk egyensúlyi folyamatban áll. Eliminációjukat a sejtben defenzív enzimek végzik, mint a glutation-reduktáz (GR), glutation-peroxidáz vagy a



szuperoxid-diszmutáz (SOD). Ha ez az egyensúlyi folyamat felborul, tehát túl sok ROS termelődik vagy csökken a defenzív enzimek szintje, akkor oxidatív stressz lép fel a sejtben. A ROS túlzott mennyiségben képes oxidálni a DNS-t, a lipoproteineket és a többszörösen telítetlen zsírsavakat, valamint deaktiválni a fehérjéket. Az oxidatív stressz a makromolekulák károsításával számos betegség, mint a diabétesz, neurodegeneráció és a daganat kialakulásának táptalaja lehet (34). Az apigenin molekula szerkezetéből adódóan hidrogén-donor tulajdonságú és így képes eliminálni az oxigén gyököket, nem reaktív termékeket eredményezve. A szabad hidroxil csoportok száma és elhelyezkedése jelentősen befolyásolja a molekula ezen hatását (35). Az A gyűrűn lévő két hidroxil csoport elhelyezkedése folytán képes H-kötést kialakítani a szabadgyökökkel. Ezen kívül a C gyűrűn lévő C2=C3 kettőskötés és az oxocsoport elősegítik a  $\pi$  delokalizált elektronrendszer kialakulását a szomszédos gyűrűikben, melynek folytán könnyen vesz részt elektron-donor reakciókban (36). *In vitro* kísérletekben bizonyítottan csökkentette a DNS károsodását (37) és a lipidperoxidációt (38). *In vivo* állatkísérletekben neuroprotektív hatásának bizonyult (39) és növelte a glutation-transzferáz (40) és a glutation-reduktáz antioxidáns enzimek szintjét (41). Humán szervezetben gyakorolt antioxidáns hatását alátámasztja, hogy apigeninben gazdag étrend fogyasztása után elmelkedett az eritrocita GR és a SOD szabadgyökfogó enzimek szintje is a vérplazmában (22), mely hatását az ételek előkészítése során sem veszíti el (42).

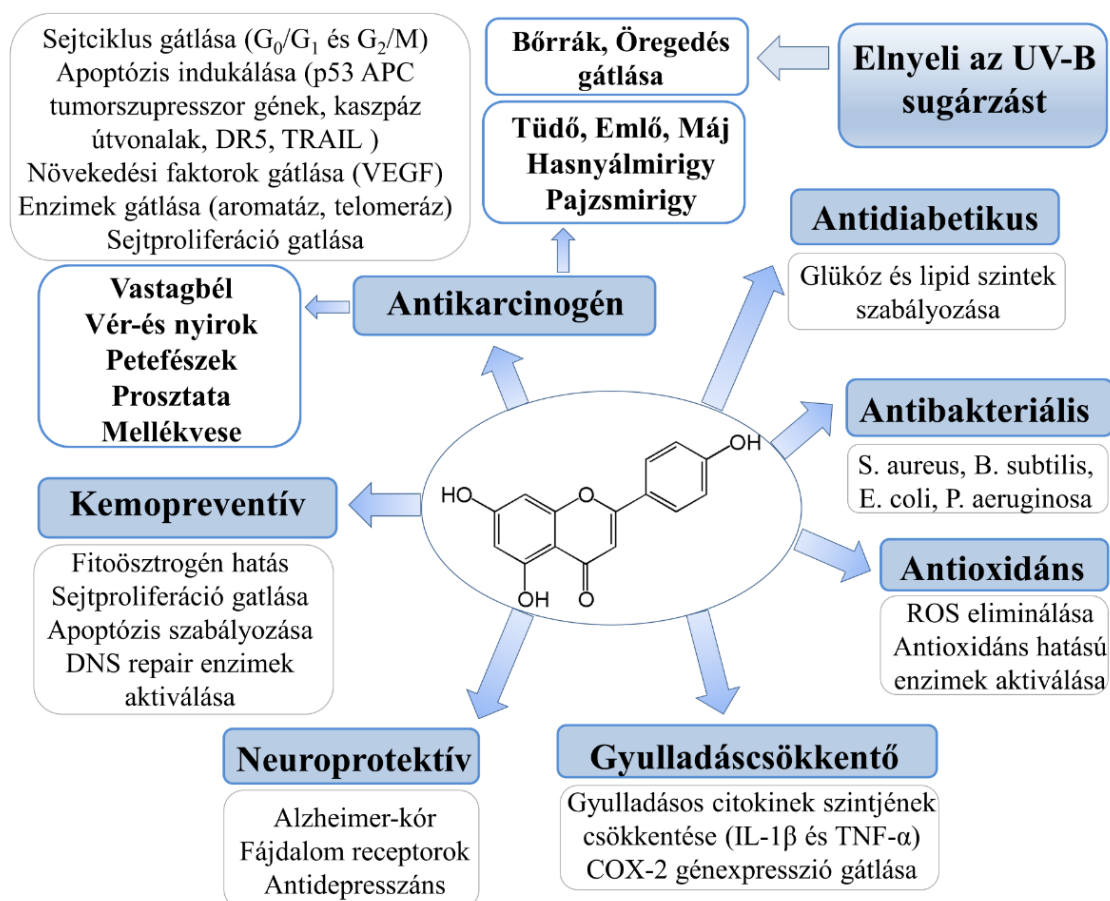
A patofiziológias folyamatokat általában gyulladás kíséri, melynek kialakulásában számos sejtjelátviteli folyamat áll. Ezen folyamatok legjelentősebb mediátorai a nukleáris faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) és az aktivátor protein 1 (AP-1), melyek aktivátorai a pro-inflammatorikus citokinek (pl.: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) és a ROS. Ezen kívül a gyulladást általánosan jellemzi makrofágok jelenléte és fagocitózisa, melynek során sok szabadgyök termelődik, ami krónikus gyulladást is képes előidézni (43-45). Az apigenin az antioxidáns hatásával együtt *gyulladáscsökkentőnek* is bizonyult. Rithidech és mtsai vizsgálata során,  $\gamma$ -besugárzást követően apigeninnel kezelt állatokban jelentős mértékben alacsonyabb volt a pro-inflammatorikus mediátorok (IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$ ) plazmaszintje, mint az apigeninnel nem kezelt egerekben (46). Az apigenin szabadgyökfogó és gyulladáscsökkentő hatását, ugyanezen mediátorok szintjéből csökkenve a *tüdőben* több tanulmány is igazolja (47; 48). Ezen kívül más citokin (IL-2, IL-6, IL-8) és AP 1-re gyakorolt inaktíváló hatását is alátámasztották (49; 50). További

vizsgálatok azt is kimutatták, hogy ezen citokinek gátlásával nem csak a NF- $\kappa$ B aktiválódását, hanem a ciklooxygenáz enzim (COX-2) génexpresszióját is, tehát enzim szintjének emelkedését is megakadályozta. Ez az enzim szintén felelős a gyulladás és a hozzá kapcsolódó fájdalom kialakulásáért. Legújabb kutatások szerint az oxidatív stressz és a gyulladás egyik kiváltó ok a major depresszió kialakulásában, ezért az apigeninnek itt is preventív szerepe lehet (51).

A kemoprevenció célja, hogy megakadályozza, késleltesse vagy esentént visszafordítsa a kóros elváltozások kialakulását. Az apigenin *kemopreventív* hatását a fent említett folyamatok befolyásolása és különféle biomarkerekre gyakorolt hatása révén fejti ki, melynek során képes gátolni a sejtproliferációt és elősegíteni a programozott sejthalált, az apoptózist (52; 53). Olyan géntoxikológiai elváltozásokra, mint a kromoszóma-aberrációk számának növekedése (54; 55) vagy a DNS repair enzimek működésének csökkenésére képes reverzibilisen hatni, vagyis visszafordítani a kóros folyamatokat (56). Ezen kívül gátolja a sejtek túlzott szaporodását (proliferáció) (57) és apoptózist indukál különféle jelátviteli utakon keresztül (58). Továbbá olyan hormonfüggő daganatok kialakulásában, mint a emlődaganat nagy jelentősége van az apigenin ösztrogén szerű hatásának (59). Fitoösztrogénként kötődik a sejtek ösztrogén receptorához és befolyásolja azok növekedését és génátírását, tehát megakadályozza a tumor kialakulását és burjánzását (60).

*Antikarcinogén* hatását szintén számos kutatás igazolja, melyet a daganatsejtekben főként a sejtciklus, valamint a különféle enzimek és jelátviteli útvonalak gátlásával éri el. A sejt reprodukciója, vagyis két sejt létrejöttét eredményező folyamat a sejtciklus, melyet a sejt állapotától függően különböző fázisokra oszthatunk (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> és M fázisok). A tumorsejtek általában a növekedési és osztódási szakaszban vannak. Különböző tumorsejtvonalakat vizsgálva az apigenin képes volt megállítani a sejtciklust a növekedési (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) és az osztódási fázisban (G<sub>2</sub>/M) is, főként a p53 (61) és APC vastagbél tumor szupresszor gének expressziójának növelésével (62). Továbbiakban csak néhány példát említve, az apigenin tumorsejtekben gátolta a proteáz (fehérjebontó enzimek) és telomeráz (sejtosztódásban van szerepe), valamint hormonfüggő daganatokban fontos szerepet betöltő aromatáz (ösztrogén szintéziséért felelős) enzimet is. Ezen kívül gátló hatással bírt a legfontosabb növekedési faktorok daganatkeltő és áttétképző hatására is, mint az EGF (epidermális növekedési faktor) vagy

a VEGF (érképződésért felelős növekedési faktor), így akadályozva az angiogenezist, vagyis a daganatsejt tápanyagellátását és növekedését (63). Továbbá elősegítette a sejthalál a tumor nekrozis faktor alfa ( $TNF\alpha$ ) (64; 65) és a p53 tumor szupresszor protein szintjének emelésével (66), valamint a kaspáz-9 és kaspáz-3 útvonalak aktiválásával (67). És végül, de nem utolsó sorban, serkentette a sejthalál receptor 5 (DR 5) expresszióját, mely szinergista hatását kifejtve a TRAIL halálliganddal szelektíven apoptózist indukált tumorsejtekben (68). Kiemelve a legjelentősebb farmakológiai hatásokat és a háttérükben álló mechanizmusokat a **3. ábra** mutatja. Fontos megemlíteni, hogy ezeken felül analgetikus (69; 70), kardioprotektív (71) antidiabetikus (72) és antibakteriális (73) hatásait is leírták már.



**3. ÁBRA** AZ APIGENIN FŐBB HATÁSAI ÉS HATÁSMECHANIZMUSAI (SAJÁT SZERK.)

Összefoglalásképpen elmondható, hogy epidemiológiai és tudományos adat támasztja alá azt a tényt, hogy az apigenin számos jótékony hatással rendelkezik, melyek közül kiemelkedik kemopreventív és antikarcinogén hatása.

### 1.1.1.3. Az apigenin kölcsönhatásai gyógyszermolekulákkal

Ez előbbieken bemutattam, hogy az apigenin kísérleti körülmények között önmagában is jelentős tumorelleses hatással rendelkezik, de ezen felül képes kemoterápiás szerekkel szinergista hatást kifejteni. Az egyik ilyen gyógyszermolekula a paklitaxel, mely jelentős citotoxicitással bír. Kimutatták, hogy az apigenin szenzitizálta a daganatsejteket a paklitaxelre, tehát a felszaporodott ROS nagy mennyisége és a kaszpáz-2 aktiválódása révén apoptózis következett be a daganatsejtben. Így elősegítheti a paklitaxel terápiás dózisának csökkentését (74). Egy másik vegyület, az 5-fluorouracil citotoxikus hatását is szignifikánsan megnövelte az apigenin, melynek következtében, hasonlóképpen a ROS megnövekedett szintje és a mitokondriumok megváltozott membránpotenciálja apoptózis indukált (75). Ezen kívül tumorsejteket szenzitizálta a sugárzásra is, mely sugárkezelésekben nagy jelentőséggel bírhat a jövőben (76; 77).

Szinergista hatását nem csak szintetikus gyógyszermolekulákkal, hanem más flavonoidokkal is kifejti, potenciózva hatásukat. Egy tanulmányban naringeninnel együtt ösztrogén receptorhoz kapcsolódva fokozták egymás kemopreventív hatását (59). Szintén naringerinnel együtt alkalmazva potenciózta a cefalosporinok csoportjába tartozó ceftazidim antibiotikum hatását rezisztens *Enterobacter cloacae* baktérium törzsön, melynek során gátolták a  $\beta$ -laktamáz bontóenzimet, a peptidoglikán szintézist és a baktérium külső membránját permeábilissá tették az antibiotikumra (78). Egy jól ismert antikarcinogén polifenollal, a kurkuminnal kombinálva gátolta a sejtciklust az osztódási fázisban és apoptózis indukált (79). Ezen kívül az aloe vera növény fő hatóanyagával, az emodinnal kombinálva, a hasnyálmirigy lipázaktivitását gátolva, hatásos ellenszere lehet az elhízásnak (80).

A vegyületek eliminációjának nagy részét a szervezet metabolizáló enzimeik végzik. A metabolizmus fő szerve a máj, ahol egyrészt a citokróm P450 enzimek (CYP) poláris funkciós csoportok bevitelével megnöveli a xenogének vízdékonyságát, másrészt endogén anyagokkal konjugáció következtében az exkréciót segíti elő. Ezen enzimek gátlása a hatóanyagok megnövekedett vérplazmaszintjét, így mellékhatásokat; az enzimek indukálása a terápiás hatások elmaradást is eredményezheti, ezért nagyon fontos egyes vegyületek enzimekre gyakorolt hatásának ismerete. A flavonoidok közül több vegyület, így az apigenin is képes kompetitív és reverzibilis módon gátolni a CYP2C9 (81) és indukálni a CYP1A1 (82) enzimeket, melyek az ember egyik

legfontosabb metabolizáló enzimek közé tartoznak és a molekulák hidroxilációjának nagy részét végzik. Ezen kívül a UDP-glükuronil-transzferáz UGT1A1 konjugációt végző metabolizáló enzim izomerjét is indukálta (82). Továbbá ételinterakciókhoz vezethet, hogy gátolja a humán organikus anoin transzporter polipeptid 1B1 (OATP1B1) transzport molekulát, ezáltal akadályozva olyan gyógyszermolekulák felvételét májsejtekbe, mint az atorvasztatin (83).

#### 1.1.2. *Petroselinum crispum*, mint az apigenin legfőbb természetes forrása

A petrezselyem az Apiaceae (Ernyősvirágzatúak) családjába tartozik, ezen belül is a *Petroselinum* nemzetségébe. Több változatát is megkülönböztethetünk: mint például a fodros metélőpetrezselymet (*Petroselinum crispum*), a sima levelű metélőpetrezselymet (*Petroselinum neapolitanum*) vagy a gyökérpetrezselymet (*Petroselinum tuberosum*). A növény könnyen termeszthető, de a termesztés körülményei jelentős mértékben befolyásolják a komponensek mennyiségét (84). Ez a növény flavonoidokban, ásványi anyagokban és vitaminokban is gazdag, mindemellett még számos más hatóanyagot is tartalmaz, mint kumarinok, poliacetilének és karotinoidok. A hatóanyagok sokrétűségéből adódóan számos terápiás hatással rendelkezik; simaizom görcsoldó, diuretikus, hepatoprotektív, vérlemezke aggregációt gátló, antioxidáns és fitoösztogén (85; 86). A görcsoldó hatásért a magjában található apiol és miriszticin fenilpropán származékok felelnek. Kiemelt terápiás hatással rendelkeznek flavonoidjai, melyek közül a legjelentősebb az apigenin és glikozidjai. Mint azt fentebb említettem, a növényi flavonoidok főként cukrokkal konjugálódva raktározódnak a növényben; malonsavval történő konjugálódását követően pedig a növényi sejt vakuolumaiban tárolódnak. Az apigenin is leggyakrabban cukrokkal és savakkal (malonil, acetyl) konjugálódik, ennek következtében több apigenin származék fordul elő a petrezselyem levelében, kisebb mennyiségben pedig akár a szabad aglikon is. Így a petrezselyemben az apigenin apiin, malonil-apiin és apigetrin formájában található meg leginkább (86). A főbb hatóanyagait, mennyiségüket és hatásukat a **II. táblázat** mutatja.

**II. TÁBLÁZAT** PETROSELINUM CRISPUM FŐBB HATÓANYAGAI, MENNYISÉGÜK ÉS FŐBB HATÁSAIK (15; 17; 84-88)

<b>Bioaktív hatóanyagok</b>	<b>(mg/100 g levél)</b>	<b>Hatásaik</b>	
Flavonoidok	Apigenin	215 /4503,50 <sup>SZ</sup>	Antioxidáns Kemopreventív Gyulladáscsökkentő Antidiabetikus Kardioprotektív
	Luteolin	19,75 <sup>SZ</sup>	
	Izoramnetin	331,24 <sup>SZ</sup>	
	Kempferol	1,49	
	Kvercetin	0,28	
	Miricetin	14,84	
Vitaminok	A	10,61	Antioxidáns Kardioprotektív
	B <sub>3</sub> (niacin)	1,3	
	C	133 /162,8 <sup>SZ</sup>	
	E	0,8	
	K	1640	
Ásványi anyagok	Cink	1,1	Kardioprotektív Sejt anyagcsere
	Kalcium	138	
	Kálium	554	
	Magnézium	50	
	Réz	0,1	
	Vas	6,2	
Furanokumarinok	Bergaptén	~0,003	Antidiabetikus Kemopreventív
	Izopimpinellin	~0,003	
Poliacetilének	Falkarindiol	~230 <sup>SZ</sup>	Antibakteriális Gyulladáscsökkentő Daganatellenes
Karotinoidok	Lutein	4,32	Antioxidáns
	β-karotin	2,58	

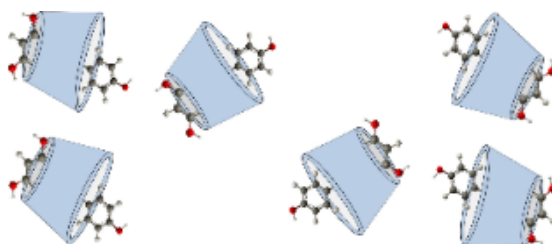
<sup>SZ</sup> szárított levélben

A *Petroselinum folium et fructus* gyógyászati célból történő felhasználása egészen az ókori időkig nyúlik vissza, főként étvágyjavítóként, vizelethajtóként és görcsoldóként használták (1), valamint a középkorban vérhasjárványok idején is alkalmazták (6). Napjainkban diabétesz, vesekőhajtó és magas vérnyomás elleni gyógyteák alkotórésze. Az 1960-as évek tájékán mutatták ki legelőször, hogy flavonoidjai közül a legkiemelkedőbb az apigenin, míg az 1990-es évek végén pedig *in vitro* kísérletekben igazolták, hogy képes a DNS szintézis gátlásán keresztül az emlődaganatsejtek növekedését (70). Későbbiekben bizonyításra került, hogy képes csökkenteni a karcinogén markerek expresszióját (89) és gátolni emlődaganatsejtek migrációját (90). Rendszeres fogyasztásával feltehetőleg olyan oxidatív stresszel összefüggő betegségek kialakulását lehet megakadályozni, mint Alzheimer-kór (91), diabétesz (92) és malignus elváltozások (90). A petrezselyem levél kivonata erős antioxidáns hatásánál fogva képes megvédeni a DNS-t az oxidatív gyökök káros hatásaival szemben (90) és szabadgyökfogó enzimek, mint a glutation reduktáz (GR) vagy a szuperoxid-diszmutáz (SOD) szintjét növeli a sejtplazmában (22). Továbbá fájdalomcsillapító (93), gyulladáscsökkentő hatásúnak is bizonyult (89) és csökkentette a kóros metabolikus folyamatokat és a májsejtek elváltozásait állatkísérletekben (94). Ezen kívül vizes kivonata hatékonyan mutatkozott olyan bőrfertőzéseket okozó baktériumok ellen, mint a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* és a *Streptococcus pyogenes* (95). Tehát a petrezselyem levelét étkezéssel elfogyasztva, bizonyítottan kiváló forrása bioaktív hatóanyagoknak, melyek segítségével növeli az ételek az antioxidáns kapacitását és kemopreventív hatását, ezáltal csökkentik az oxidatív stresszel összefüggő betegségek kialakulását (92; 96).

## 1.2. Az apigenin gyógyszertechnológiai vonatkozásai és hordozó rendszerei

### 1.2.1. Ciklodextrinek

Az utóbbi évek tendenciáit figyelembe véve megállapítható, hogy a rossz vízoldhatóságú farmakonok oldódásának javítása érdekében a nanoméretű hordozó rendszerek, azon belül is a ciklodextrinek, egyre nagyobb teret nyernek. A CD-ek zárványkomplex képzéssel segítik elő az oldékonyság növelését, ezáltal lehetővé teszik a fitokomponensek nagyobb biohasznosíthatóságát is (97). Az Api-CD zárványkomplex képződését mindezig azonban csak a  $\beta$ -CD-nel, valamint ezen CD random metilált (RM- $\beta$ -CD) és hidroxilált (HP- $\beta$ -CD) származékaival vizsgálták. A fázis-oldhatósági vizsgálatok eredményei alapján a létrejött zárványkomplexek 1:1 (flavonoid:CD) sztöchiometriájúak, továbbá a származék CD-k hatékonyabban növelik meg az apigenin oldékonyságát, mint az alap ciklodextrinek. A stabilitási állandót ( $K_{1:1}$ ), amely a komplexekre jellemző érték, a fázis-oldhatósági diagram lineáris szakaszából számolták ki,  $827,6 \text{ M}^{-1}$  ( $\beta$ -CD),  $1038,6 \text{ M}^{-1}$  (DM- $\beta$ -CD) és  $4511,5 \text{ M}^{-1}$  (HP- $\beta$ -CD) voltak. Az így kapott értékeket figyelembe véve jól látható, hogy jelentősen stabilabb komplex alakul ki az apigenin és a HP- $\beta$ -CD között. A jelenség magyarázatául a nagyobb számban előforduló hidrogén-híd kötések szolgálnak, mely az oldékonyság 11,5x-ös növekedését jelenti 2 mM HP- $\beta$ -CD koncentrációjú vizes oldatban (98; 99). Az apigenin feltételezett elhelyezkedését a ciklodextrin üregében a **4. ábra** szemlélteti.



**4. ÁBRA** A SEMATIKUS ÁBRA AZ APIGENIN FELTÉTELEZETT ELHELYEZKEDÉSÉT MUTATJA CIKLODEXTRIN ZÁRVÁNYKOMPLEXBEN (102)

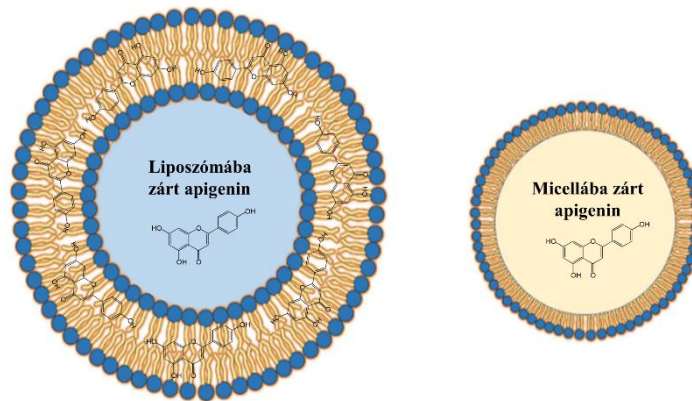
### 1.2.2. Liposzómák és micellák

Banerjee és munkatársai apigenin tartalmú nagy unilamelláris vezikulumokat állítottak elő DSPC foszfolipidből vékonyréteg hidratációs technikával (100). Mikroszkópos felvételeken jól megfigyelhető, hogy a liposzómák a baktériumok



külső membránjához tapadva bejuttatták az apigenint a baktérium belsejébe (kikerülve a Gram negatív baktériumok külső lipopoliszacharid-protein védő burkát is). Ezt követően az apigenin a baktérium sejt lízisét okozta a sejtmembrán károsításával. A vizsgált Gram negatív (*Escherichia coli*) és Gram pozitív (*Staphylococcus aureus*) baktériumokra is hatékonyan bizonyult a készítmény. Tehát a liposzómák elősegítették az apigenin antibiotikus hatását és csökkentették a szükséges dózist vagyis megnövelék az apigenin terápiás indexét és antibiotikus hatását (100).

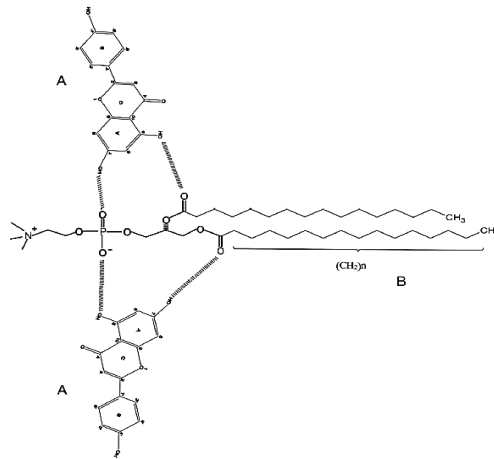
Standardizált, magas apigenin tartalmú kamilla kivonatot inkorporáltak Natipide® II félszilárd gélbe, mely 20% foszfolipidet tartalmazott és vizsgálták a készítmény hatékonyságát dermális kortikoszteroid terápia lehetséges helyettesítőjeként Arsic és mtsai (101). Összehasonlításképpen liposzómákat nem tartalmazó, O/V típusú kenőcs alapanyagot alkalmaztak, melyben a kivonat mennyisége ugyanannyi volt. Az *in vitro* kioldódás vizsgálatok és *in vivo* klinikai tesztek is bizonyították, hogy mindkét készítmény jól tolerálható, de a liposzómákat tartalmazó gél hatékonyabban csökkentette a gyulladást. Ezért feltételezhető, hogy liposzómák a bőr mélyebb rétegeibe eljutva nyújtott hatást tudnak kifejteni. Ez is azt bizonyítja, hogy növényi kivonatok ígéretesek lehetnek a mellékhatás-mentes terápiában (101). Az apigenin lehetséges elhelyezkedését a vezikulumokban az **5. ábra** mutatja (102).



**5. ÁBRA** A SEMATIKUS ÁBRA AZ APIGENIN BEZÁRÁSÁT MUATAJA LIPID NANOKARRIEREK BEN (102 ALAPJÁN)

Lengyel kutatók az apigenin pontos elhelyezkedését a lipid membránban és így módon membránra gyakorolt hatásait modellezték dipalmitoil-foszfátidilkolin (DPPC) liposzómákkal (103). A vizsgálatokat EPR méréssel, valamint FTIR és  $H^1$ NMR spektroszkópiával is elvégezték, melyek hasznos információkat nyújtanak a flavonoid-membrán interakciókról. Az eredmények azt mutatták, hogy az apigenin molekula

hidrogén-híd kötésekkel kapcsolódik a DPPC molekula „poláris fej” részéhez. Így nem csak a lipid kettősréteg felsőbb régiójában helyezkedik el, ahol a poláris fej található, hanem membrán mélyebb régióiban is az apoláris láncrésznél. Tehát a sejtmembránban az apigenin apoláris gyűrűi a lipid kettősréteg hidrofób részén, míg a poláris hidroxil csoportjai a vizes fázishoz közelebb helyezkednek el. A lehetséges kötődési mechanizmust **6. ábra** mutatja (103). Mivel az apigenin molekula megoszlik a membrán hidrofób és hidrofil régiói között, lecsökkenti a lipidek fluiditását, így képes rigidebbé tenni a membránt. Ez az ún. membránstabilizáló hatás feltehetően csökkenti a perifériás enzimek aktivitását és mobilitását, mely hozzájárulhat az apigenin daganatellenes hatásához, megváltoztatva jelátviteli útvonalakat és sejtciklust is (54,55).

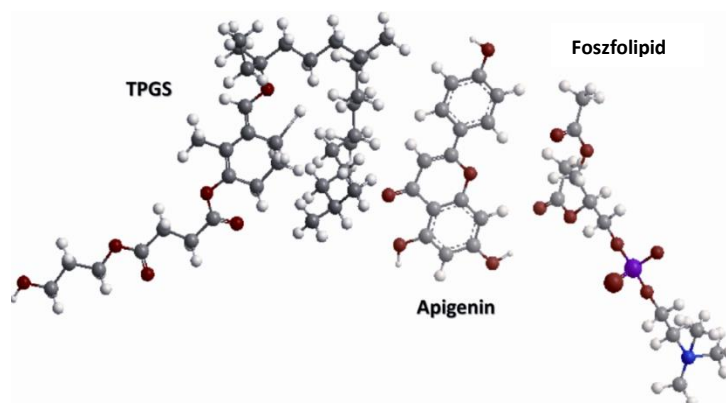


**6. ÁBRA** AZ APIGENIN MOLEKULA (A) HIDROGÉN-HÍD KÖTÉSEKKEL KAPCSOLÓDIK A DPPC MOLEKULA (B) „POLÁRIS FEJ” RÉSZÉHEZ (103)

Egy másik kutatócsoport az oldékonyság növelésére és a *transzdermális* hatás elérésére *etoszómákba* is formulálták az apigenint (104). Ez a típusú liposzóma 20-50% (v/v) alkoholt tartalmaz, mely leggyakrabban etanol és/vagy propilén-glikol. A hagyományos liposzómákkal szemben nagy előnyük, hogy akár szisztémás keringésbe is képesek eljuttatni a hatóanyagot jelentősen megnövelve azok oldékonyságát. A formulálás optimalizálását kísérlettervező programmal végezték, melynek segítségével az optimalizált készítmény 50%-ban tartalmazta propilén-glikol és etanol 1:10 térfogatarányú keverékét, valamint lipidfázisként 5% Lipoid® S 75-öt (68-75%-ban tartalmazott szójalecitint). Általánosságban az etoszómák méretét jelentősen befolyásolja az alkohol tartalmuk, tehát növekvő alkohol koncentrációt alkalmazva nő a méretük. Ellenben az etanol jó penetrációfokozó, míg a propilén-glikol növeli a viszkozitást és a stabilitást, ezért elősegíti az akkumulációt a bőrbe. Ezt *in vivo* megoszlási és

transzdermális efflux kísérletekkel is alátámasztották ebben a publikációban, ahol azt tapasztalták, hogy az alkoholok mennyiségével nőtt az etoszómák fluiditása, elasztikusabbá váltak, ezáltal jobban penetráltak a bőr mélyebb rétegeibe is. Továbbá a lipidfázis növelésével nőtt az etoszómák stabilitása és bezárási hatásfoka ( $91,22 \pm 6,38\%$ ). A hatékonyságot hagyományos liposzómákkal, „üres” etoszómákkal (melyekbe nem inkorporáltak apigenint csak hozzáadták a diszperzióhoz) és ún. elasztikus liposzómákkal, melyek Tween<sup>®</sup> 80-at is tartalmaztak (Transfersomes<sup>®</sup>) hasonlították össze. A bezárási hatásfok a többi készítménynél kisebbnek bizonyult az optimalizált készítményhez képest. Továbbá az apigenin tartalmú etoszómák kis méretük ( $67,09 \pm 4,10$  nm) és jobb deformálhatóságuk következtében a bőr mélyebb rétegeibe is képesek voltak penetrálni ezért hatékonyabban csökkentették az UV-B okozta gyulladást, mint a kontroll készítmények (104).

Az apigenin *orális* biohasznosíthatóságának javítására Munyendo és mtsai *foszfolipid micellákat* állított elő, melyek stabilitását TPGS-sel (D- $\alpha$ -tokoferil-polietilén-glikol-szukcinát) növelték (105). A TPGS az E-vitamin vízdékony származéka, előállításánál az E-vitamint polietilén-glikollal észterifikálják és így felületaktív anyagként viselkedik. Alacsony CMC értéke (0,02%, m/m) ideálissá teszi liposzómák és nanoparikulumok előállításában, mert szolubilizáló, stabilizáló és penetráció fokozó hatású (106). *Per os* alkalmazva képes megnövelni a hatóanyagok plazmafelezési idejét, javítani a celluláris felvételt és gátolja az exocitózist (107). Az apigenin-foszfolipid-TPGS micellákat vékonyréteg hidratációs technikával állították elő. Vizsgálták az apigenin elhelyezkedését 3D molekulamoddellel. Itt is hasonló eredményt kaptak, miszerint az apigenin hidrofób láncoknál helyezkedik el, közel a poláris régiókhoz és a kapcsolódásban intramolekuláris hidrogén-híd kötések és elektrosztatikus erők is közrejátszanak. Az elhelyezkedést a **7. ábra** szemlélteti. A micellák bezárási hatásfoka 87,35%, hatóanyag tartalma 12,6%-nak és méretük  $137,1 \pm 3,4$  nm-nek bizonyult; stabilitásukat megőrizték több, mint 90 napig. A negatív zeta potenciál érték (-12,94 mV), megerősítette a számítógépes predikciót, miszerint a PEG láncok a micella felszínénél helyezkednek el. *In vitro* kioldódás vizsgálatok azt mutatták, hogy az apigenin nagy része 2 óra alatt felszabadult. Szintén *in vitro* vizsgálatokban az intesztinális felszívódás 2,4-szeresére növekedett, továbbá az elváltozott sejtvonalakon szignifikánsan nőtt a citotoxikus hatás (105).



**7. ÁBRA AZ APIGENIN ELHELYEZKEDÉSE FOSZFOLIPID-TPGS KOMPLEXBEN  
(105 ALAPJÁN)**

Zhai és mtsai az apigenin oldékonyságának növelésére *polimer micellákat* állítottak elő (108). Ezek a polimerekből álló micellák általánosan kis méretűknél fogva (10-100 nm) alkalmas hordozói lehetnek daganatellenes készítmények, mert akumulálódnak a sejtekben és a védekező szerepet betöltő retikuloendoteliális rendszer (RES) sem ismerik fel őket. Micellaképződés során vizes közegben, az amfipatikus molekulák hidrofób részükkel körbeveszik a vízoldhatatlan hatóanyagot (mag), míg a hidrofil részükkel a vizes fázis felé fordulnak (héj). A Pluronic® P123 az egyik leggyakrabban alkalmazott triblokk kopolimer, melynek struktúrája: PEO-PPO-PEO. A hidrofób PPO csoportot 70%-ban tartalmazza és 30%-ban a hidrofil PEO-t, ezért vizes közegben vékony hidrofil héj alakul ki, melynek következtében további stabilizálásra van szükség (109). Erre alkalmas nem-ionos szolubilizáló ágens a Solutol® HS 15 (polietilén-glikol-660-hidroxisztearát), mely szerepel az Európai Gyógyszerkönyvben is és PEG tartalma növeli a készítmények stabilitást és a szisztémás keringési időt (110). Az apigenin tartalmú, Pluronic® P123 és Solutol® HS15 polimerekből álló micellákat vékonyréteg hidratációs technikával állították elő. Az optimalizált készítmény 148 szeresére növelte meg az apigenin oldékonyságát (320,8 µg/mL). A bezárási hatásfok 96,36%, a hatóanyag tartalom 1,32% volt. Mikroszkóppal vizsgálva a micellák homogén eloszlást mutattak és méretük kisebbnek bizonyult (16,9 nm), mint az „üres” micelláké (18,9 nm). A lehetséges magyarázat erre, az apigenin hidroxil csoportjai és a PEG lánc karboxil csoportjai között létrejövő intramolekuláris H-híd. *In vitro* kioldódás vizsgálatok nyújtott hatóanyagleadást mutattak és a készítmény növelte az apigenin citotoxikus hatását HepG2 és MCF-7 májsejteken *in vivo* (108).

### 1.2.3. Nanorészecskék

A biohasznosíthatóság növelésére a liposzómákon kívül más lipid alapú hordozórendszereket is alkalmaznak. A *lipid nanokapszulák* (LNC) szabadalmaztatott biomimetrikus hordozórendszerek, melyek liposzómából és polimer nanokapszulából állnak. Általános felépítésük alapján, az olajos belső fázist a közepes lánc hosszúságú trigliceridek építik fel, melyet pegilált felületaktív anyagok vesznek körbe külső fázist alkotva. Oldószermentes előállításuk és hosszú stabilitásuk (max. 18 hónap) jelentős előnyt jelent a liposzómákkal szemben (111). Ilyen LNC-ba fázis inverzió módszerével sikeresen inkorporálták az apigenint Ding és mtsai. A kísérletek optimalizálása során maximálisan  $1,26 \pm 0,05\%$  hatóanyag tartalmat és  $95,86 \pm 0,38\%$  bezárási hatásfokot tudtak elérni. Az összapigenin tartalom  $5,88 \text{ mg/ml}$ -re tehető, a közel gömb alakú,  $46,1 \text{ nm}$  méretű és  $-28,18 \text{ mV}$  zeta potenciálú kolloid rendszerben. Az *in vitro* vizsgálatok két fázisú kioldódást mutattak, míg a megnövekedett hatékonyságot *in vivo* antiproliferatív vizsgálatok igazolták (112).

Egy másik ázsiai kutatócsoport tagjai *szilárd lipid nanopartikulumokba* (SLN) inkorporálták az apigenint (113; 114). Az SLN-eket 1992-ben formulálták először a polimer nanopartikulumok és az o/v típusú emulziók alternatívájaként. Szobahőmérsékleten 1-30% (m/m)-ban biokompatibilis szilárd lipidekből állnak és 0,5-5% (m/m)-ban tartalmaznak felületaktív anyagot. SLN-ek előállítása során a rossz vízoldékonyságú hatóanyagot a lipid és a felületaktív anyag keverékében oldják, majd hozzáadják a vizes fázist nagy sebességű kevertetéssel. Ezt követően leggyakrabban HPH alkalmaznak a nanorészecskék előállítására (115). Azonban az apigenin tartalmú SLN-eket ultrahang segítségével állították elő, melynek segítségével homogén eloszlású, szférikus nanopartikulumokat kaptak. A részecskeméret  $135 \text{ nm}$ , a zeta potenciál érték  $-18,90 \text{ mV}$  volt. *In vitro* kioldódás vizsgálatokban az apigenin felszabadulása elsőrendű kinetikát mutatott. Továbbiakban az eltarthatóság növelésére liofilizálták a mintákat. Patkányokon végzett kísérletekben orálisan adagolva hasonlították össze a készítmény szervezeti sorsát apigenin makroszuszpenzióival. *In vitro* a relatív biohasznosíthatóság 327%-kal nőtt, valamint magasabb plazmaszintet és lassabb eliminációs sebességet mértek a kontroll csoporthoz képest, mely egyértelműen jelzi, hogy az SLN készítmény jelentősen növelte az apigenin biohasznosíthatóságát *per os* alkalmazva is (114).

Az apigenin alkalmazása a bőr daganatos elváltozásai kezelésében is egyre jobban felkelti a tudósok érdeklődését. Mivel a hagyományos kemoterápia súlyos mellékhatásokat idéz elő, különböző új gyógyszer technológiai eljárásokat alkalmaznak a mitokondriumok és a DNS célzott kezelésében. Das és munkatársai apigenin tartalmú *PLGA nanopartikulumokat (NP)* állítottak elő (116; 117). A PLGA, tejsav és glikolsav poliészterek kopolimerje, mely biodegradábilis (a keletkező bomlástermékek nem toxikusak a szervezetre nézve), tehát hidrolízise során tejsavra és glikolsavra bomlik. Ezek a szervezetben is megtalálható vegyületek. A polimer összetételétől függően képes megvédeni a nanopartikulumokba bezárt hatóanyagot a bomlástól, valamint hosszú hatóanyagleadást és célzott terápiát képes biztosítani, akár sejtalkotó szinten is (pl.: mitokondriumok). Továbbá könnyen penetrál a bőr mélyebb rétegeibe, ezért dermálisan is alkalmazzák őket (118). Ezt bizonyítja, hogy az apigenin tartalmú PLGA nanorészecskék csökkentették az UV-B és BaP okozta tumoros elváltozásokat és a mitokondriális diszfunkciót *in vivo*. A részecskéket nanoprecipitálással állították elő egy lépésben, mely 101 nm méretű, egységes és szférikus partikulumokat eredményezett 87,2% bezárási hatásokkal. A bifázisú nyújtott hatóanyagleadás gyorsabb kezdeti szakasza 16 óráig tartott, melyet egy lassabb leadás követett 72 óráig (116). Ugyanez a kutatócsoport további kísérletekben kimutatta, hogy az apigenin-PLGA nanopartikulumok képesek a sejtmagba is bejutni és apoptózist indukálni, mely hatékony eszköz lehet a bőrdagatok kezelésében (117).

Hasonlóképpen apigenin tartalmú pegilált PLGA nanopartikulumokat állítottak elő ezúttal a krónikus pankreatitisz kezelésére, melyre kevés célzott terápia ismert Feng és mtsai. Ez a betegség krónikus hasi fájdalomon kívül a diabéteszt és a hasnyálmirigy káros elváltozását is előidézheti. Az előállított PLGA-NP apigenin tartalma 96 µg/mg, méretük 160 nm átméjtű volt. *In vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy ezek a NP-ok hosszabb ideig tartózkodtak a vérkeringésben, mint a kontroll szuszpenzió. Továbbá az anti-inflammatorikus és anti-fibrotikus hatásokat a jelátviteli anyagok mRNS expressziójának csökkentésével érték el. Ezen kívül hatékonyak bizonyultak a fibrotikus sejtek kezelésében is, mert és apoptózist indukáltak, amelyeket további állatkísérletek is igazoltak (119).

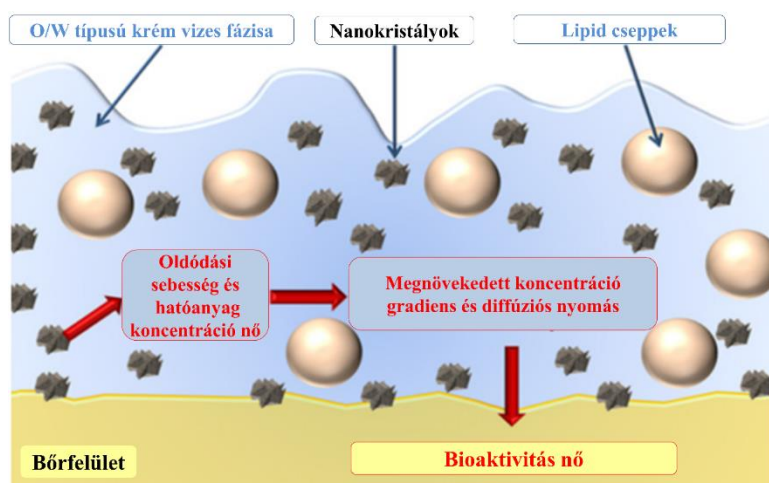
Egy újabb publikációban Rajendran és mtsai apigenin tartalmú *arany nanorészecskéket* állítottak elő (Api-AuNP) (120). Az elmúlt években az arany

nanopartikulumok nagy figyelmet kaptak a daganatellenes terápiában, mind a diagnosztika, mind a célzott hatóanyagleadás területén. Napjainkban a klinikumban fototermális terápiák segédanyagaként is alkalmazzák őket, ugyanis erős fényelnyelő képességgel rendelkeznek, így a tumorban akkumulálódott nanopartikulumokat fényel besugározva felmelegednek és a tumor termális destrukcióját okozzák (121). Gyártásuk vizes közegű fém diszperzió  $\text{Au}^{3+}$  ion redukálásával történhet (pl.: Na-citráttal). Olyan fitokemikáliák, melyekben OH és ketocsoportok vannak, jól használhatók arany kolloid előállítására és stabilizálására. Így Api-AuNP-okat pH 10 közegben állították elő szobahőmérsékleten. A redukcióhoz optimális arány 1:4 (Api: $\text{Au}^{3+}$ ) volt. Vizsgálatok szerint az egészséges epithél sejtekkel biokompatibilisnek bizonyultak, de tumor sejtvonalakon apoptózist indukáltak, ezért ígéretesek lehetnek a bőr rosszindulatú elváltozásainak terápiájában (120).

#### 1.2.4. Nanokristályok

Ez az innovatív gyógyszerforma a vízben rosszul oldódó hatóanyagot kristályos formában tartalmazza, ahol egy hatóanyagkristály mérete kisebb, mint 1000 nm (általában 200-500 nm) (122). A nanoméretű szemcsék oldatokban való oldhatóságát leíró Ostwald egyenlet alapján a részecskék sugarának csökkentésével, oldhatóságuk megnő. Továbbá a Noyes–Whitney egyenlet alapján az oldódás sebessége egyenesen arányos a fajlagos felülettel, vagyis oldószer számára hozzáférhető felülettel (123). Így a nanonizálás következtében megnövelt felület eredményeként nő az oldódási sebesség és az adhezivitás is. Mindezekből következik, hogy a hatóanyag *nanokristályokban* történő formulálása képes jelentősen megnövelni a rossz vízoldékonyságú hatóanyagok (pl.: BCS II. és IV.) biohasznosíthatóságát. Sőt, nanotoxikológiai szempontból ártalmatlannak számítanak (Class I), ugyanis biodegradábilisek és méretük 100 nm felett van, tehát endocitózis nem következik be (124). További előnyeik közé tartozik, hogy kis mennyiségű stabilizátoron kívül (1-2%, m/m) más segédanyagot nem tartalmaznak. Alkalmazási módjaik lehetnek nanoszuszpenzió formájában parenterálisan vagy dermálisan alkalmazva, valamint orálisan adagolt készítményekben tablettá formájában, amikor nyújtott hatás elérése a cél. Nyálkahártyán is jól alkalmazhatók, nanoszuszpenziós spray vagy krém formájában. A nagyobb adhezivitás ilyenkor jól kihasználható, hiszen a kristályok nagy felülete miatt a hatóanyag nagyobb felületen tud érintkezni a

nyálkahártyával. Jó adhezivitásukat továbbiakban növelni lehet pozitív töltésű polimerekkel, mivel az ellentétes töltés megnöveli az affinitást a negatív töltésű hámsejtekhez. Tehát dermálisan alkalmazva, a megnövelt vízdékonyság és oldódási sebességnek köszönhetően a hatóanyag nanokristály formájában gyorsan kioldódik, mely megnövekedett koncentrációgradienshez vezet a készítmény és a bőr *stratum corneum* között. A vizes fázisból felszívódott hatóanyag a gyorsan kiegyenlítődik új molekulákkal a nanokristályokból **8. ábra** (122; 125).



**8. ÁBRA** NANOKRISTÁLYOK HATÁSMECHANIZMUSA DERMÁLIS KÉSZÍTMÉNYEKBEN (124 ALAPJÁN)

A nanokristályokat 1990-es években fejlesztették ki, előállításuk történhet ún. „top-down” (méretcsökkentés) illetve „bottom-up” (méretnövelés) módszerekkel. Gyártásukra 2001 óta alkalmazzák a SmartCrystals® technológiát, mely egy ún. második generációs, kombinált „top-down” technológia és alkalmas stabil nanoszuszpenziók előállítására. A folyamat során az előkészítő lépést követően nagy nyomású homogenizálást alkalmaznak (HPH) (122).

Apigenin nanokristályokat is állítottak elő smartCrystals® technológiával, ahol az előkészítő lépésként nedves őrlést alkalmaztak. A nedves őrlést 7 ciklusban végezték, amit egy alacsonyabb nyomású (300 bar) homogenizálás követett, mely kisebb méretű és egységesebb kristályokat eredményezett. Stabilizáló anyagként, 1%-ban Plantacare 2000 UP® nem-ionos felületaktív anyagot alkalmaztak. Az így előállított kristályok mérete  $396 \pm 12$  nm volt. A PDI érték ( $0,205 \pm 0,007$ ) kedvező fizikai stabilitásra utal és ezt igazolja a  $-38$  mV zeta potenciál is. Az XRPD és DSC vizsgálatok sem mutattak amorf állapotot, mely esetlegesen csökkentené az eltarthatóságot, sőt a nanoszuszpenzió 4-40°C-ig



stabilnak mutatkozott. Ezt követően mérték a készítmény antioxidáns hatását *in vitro*, mely megkétszereződött a makroszuszpenzióhoz képest és jól korreláltak a rutin nanokristályok *in vivo* humán vizsgálatával (126). Mindezekből arra következtettek a kutatók, hogy az apigenin nanokristályok alkalmazása sikeres lehet az UV-B sugárzás okozta melanoma és a bőröregedés megelőzésére dermális készítményekben (127). Más antioxidáns hatású flavonoid nanokristályokat is előállítottak, mint rutin, heszperidin vagy rezveratrol, melyeket sikeresen alkalmaztak orális és dermális készítményekben is (128; 129).

Az ARTcrystal<sup>®</sup> technológia egy újabb kombinált „top-down” előállítási módszer, melynek során a nagy nyomású homogenizálást nagy sebességű kevertetés előzi meg (HSS). Scholz és munkatársai ezzel a módszerrel flavonoid nanokristályokat állítottak elő, köztük apigenint is. A HSS hatékonyabbnak bizonyult a konvencionális őréssel szemben, mely időigényesebb is. Fontos azonban az eljárás optimalizálása (pl.: idő, rotor-sztátor geometria), mert a kiindulási kristályméret és morfológia jelentősen befolyásolja az előállított termék tulajdonságait és ezért minden anyag más beállítási paramétereket tesz szükségessé. A 36000 rpm kevertetés gyorsan és hatékonyan csökkentette az összes vizsgált flavonoid kristály méretét, de mivel az apigenin agglomerálódó túszerű kristályokból áll, a homogenizálási lépésnél nagyobb nyomás alkalmazására volt szükség (500-750 bar). Végeredményül kisebb méretű (262 nm), de ugyanolyan homogén eloszlású és egységes nanokristályokat kaptak, mint smartCrystals<sup>®</sup> technológiával (130).

Az apigenin orális adagolása is jelentős lehet a daganatellenes terápiában, de a már korábban is említett rossz biohasznosíthatósága és nagymértékű metabolizmusa miatt formulálása kihívást jelent. A biohasznosíthatóság egyik limitáló tényezője a kioldódás, melyet a nanokristályok kis méretük és nagy felületük következtében fellépő jelentősen megnövelt oldódási sebességgel javítják. Ezért Zhang és munkatársai apigenin nanokristályokat állítottak elő ún. SAS (supercritical antisolvent process) technológiával *per os* alkalmazásra (131). Ez a „bottom-up” rekrisztallizációs eljárás szuperkritikus-folyadék technológián alapul és nem igényel segédanyagként felületaktív anyagot sem. A folyamat során a vízben rosszul oldódó hatóanyag szerves oldószeres oldatát folyadék halmazállapotú szuperkritikus szén-dioxidhoz injektálják (antisolvent), melynek következtében elpárolog a szerves oldószer, a hatóanyag oldata túltelítetté válik és így kristályok formájában kiválik. Ezzel az eljárással készült apigenin nanokristályok

homogén eloszlást mutattak, de méretük nagyobbak bizonyult ( $562,5 \pm 56$  nm;  $0,92 \pm 0,21$  PDI), mint a fent említett eljárások esetében. Bomlást itt sem tapasztaltak az előállítás során, melyet DSC, XRPD és FTIR készülékekkel ellenőriztek (tehát az apigenin megtartotta kristályos szerkezetét). *In vitro* kioldódás vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy az apigenin több, mint 90%-ban feloldódott vizes közegben 20 perc alatt. A készítményt intravénásan alkalmazva *in vivo* gyorsan csökkent a plazmakoncentráció és *per os* adagolással is kisebb plazmakoncentrációt lehetett elérni, feltehetően a gyors disztribúció és szöveti metabolizmus következtében. De a makroszuszpenzióhoz képest az abszolút biohasznosíthatóság 2%-ról 6,9%-ra emelkedett. Tehát az apigenin biohasznosíthatósága orális készítményekben is javítható nanokristályok alkalmazásával (132).

#### 1.2.5. További nanoméretű hordozórendszerek

Az *önemulgeáló mikroemulziós rendszer* (SMEDDS) egy új típusú folyékony gyógyszerhordzó rendszer, mely *per os* adagolást tesz lehetővé. Felépítését tekintve olajos fázist, tenzidet, kotenzidet és hatóanyagot tartalmaz. A hatóanyag lehet az olajos fázisban oldva és/vagy a felületaktív anyagok segítségével szolubilizálva. Vizes közegbe kerülve termodinamikailag stabil o/v mikroemulziós rendszert képez, ahol az olajos fázis cseppmérete 100 nm alatti. A cseppek mértét főként a tenzidek típusa és koncentrációja határozza meg. A felületaktív anyagoknak HLB < 12 értékkel kell rendelkezniük, hogy stabil és azonnal *önemulgeáló* rendszert alkossanak vizes közegben (133). A kis részecskeméretnek köszönhetően a megnövelt felület elősegíti a hatóanyag gyors kioldódását (134) és ezáltal felszívódását is (135). Zhao és munkatársai egy apigenin tartalmú *önemulgeáló* rendszert fejlesztettek ki, mely *per os* alkalmazva jelentősen javíthatja az apigenin biohasznosíthatóságát. A legjobb összetételt egy hármass olaj/tenzid/hatóanyag fázisdiagrammal határozták meg, mely 60% Cremophor® EL tenzidből, 30% Transcutol® HP kotenzidből és 10% Capryol™ 90 olajból állt. Így 7500 szerez oldékonyság növelést (15 mg apigenin/g SMEDDS) sikerült elérniük, ahol a részecskék mérete 17,1 nm és zeta potenciálja -5,18 mV volt. Azt tapasztalták, hogy a cseppek méretét, mely döntő fontosságú a felszívódásban, nem befolyásolta a pH és az ionerősség, de az apigenin koncentrációja annál nagyobb mértékben. A maximálisan oldható mennyiség 7 mg/g SMEDDS volt, ezen érték felett kiválást tapasztaltak vizes

közegben. A készítmény 1 g-ja 100 ml vízben 30 mp alatt mikroemulziót alkotott szférikus cseppekkel, melyből 10 perc alatt kioldódott az apigenin 95%-a és a rendszer 8 óráig stabil maradt. Mindezek alátámasztják, hogy a SMEDDS szintén alkalmas hordozórendszer lehet az apigenin számára *per os* alkalmazva (136).

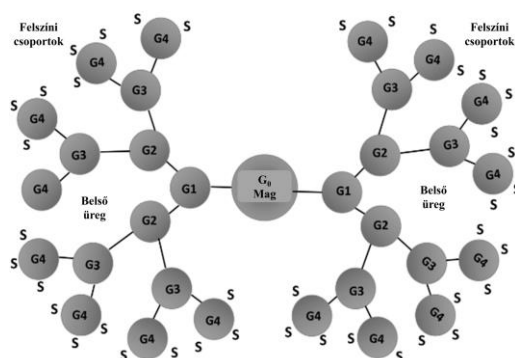
A *szilárd diszperziókat (SDs)* már 1961 óta ismerik, alkalmazásuk mindig újabb teret nyer különböző segédanyagok alkalmazásával, hiszen a rossz vízoldékonyságú hatóanyagok oldékonyság növelése folyamatos igényt támaszt az újabb gyógyszer technológiai eljárások fejlesztésére. A szilárd diszperziókban, a rosszul oldódó hatóanyagok szilárd állapotú hordozóban inkorporálva találhatóak. Az első generációs SDs esetében glükózt, a második generációs SDs-hoz amorf állapotú polimer hordozókat alkalmaztak. A legújabb harmadik generációs készítmények már önmulgeáló vagy nagy felülettel rendelkező segédanyagokat tartalmaznak, melyek az előzőeknél kisebb részecskemérettel rendelkeznek. Ezen kívül könnyebben nedvesíthetők, porózusak és megóvják az amorf állapotú hatóanyagot a kristályosodástól. Ilyen SD például a szén nanopor (CNP), mely számos előnnyel rendelkezik. A szénrészecskék 100 nm alatti mérettartományban is nagy felülettel rendelkeznek és kémiaiilag inertek. Továbbá nagy előnyük, hogy az optimalizált gyártási eljárások segítségével előállításuk könnyen méretnövelhető (137-139). Ding és mtsai CNP-apigenint állítottak elő oldószer bepárlás módszerével. A folyamat során az etanolban oldott apigeninhez CNP-t adtak, majd 40°C-on eltávolították az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével. A vizsgálatokhoz kontrollként fizikai keveréket állítottak elő. DSC és XRPD készülékekkel igazolták, hogy az apigenin diszpergált és amorf állapotban található a formulában. *In vitro* kioldódás vizsgálat során 60 perc alatt 92% apigenin oldódott ki, mely 275%-kal több, mint CNP nélkül. Előzetes toxicitási vizsgálatokat végezve a CNP biztonságos és hatékony hordozónak bizonyult a klinikai alkalmazásra. *In vivo* állatokon végzett farmakokinetikai vizsgálatok alapján az apigenin *per os* biohasznosíthatósága 183%-szerezésre emelkedett. Ez az eredmény is alátámasztja, hogy az apigenin rossz biohasznosíthatóságának elsődlegesen a rossz vízoldhatóság és ezáltal a rossz felszívódás az oka (140).

### 1.2.6. Egyéb gyógyszer technológiai eljárások

Li és mtsai dermálisan alkalmazva különböző oldószerekben vizsgálták az apigenin felszívódását, biotranszformációját és kemopreventív hatását (141; 142). *In vitro* preparált egér bőrön és *in vivo* SENCAR egerek hasi és háti bőrén tesztelték apigenint oldva DMSO, aceton/DMSO (4:1) és propilén-glikol/DMSO (4:1) oldószerekben. A felszívódás mindkét esetben következő sorrendet követte: DMSO > aceton/DMSO > propilén-glikol/DMSO (141). Feltételezték, hogy az apigenin csak lokálisan szívódik fel, a kemopreventív hatásában a glukuronid és szulfát metabolitjai nem játszanak szerepet (142).

A *dendrimerek* szerteágazó 3 dimenziós szerkezetű polimer makromolekulák (**9. ábra**), melyek molekulatömege megegyezik az őket felépítő lineáris polimerével, de globuláris struktúrájuk előnyösebbé teszi őket. Számos alkalmazásuk ismert, az 1980-as évtől kezdve gyógyszer technológiai felhasználásuk is egyre nagyobb teret nyer. Napjainkban a biokompatibilis dendrimerek az immunológia, daganatellenes és fotodinamikus terápiában is nagy jelentőségűek. Ezen kívül a diagnosztikában is fontos szerepet kapnak (143, 144). Két leggyakrabban alkalmazott gyártási eljárásuk ismert, melyek a polimer növekedésében különböznek (145; 146): a polifunkciós magból az egyik módszer alapján divergensen, másik módszer alapján convergensen épülnek fel az ágak (147).

Az apigenin, mint fluorofór molekula, gyenge kék emisszióval rendelkezik és három hidroxil csoportja ideálissá teszi dendrimerek szintetizálásához (145; 147). Ezért az apigenint kiindulási magként választották fluoreszcens dendrimerek előállításához, így szerepet kaphat az analitikában és a diagnosztikában is (148).



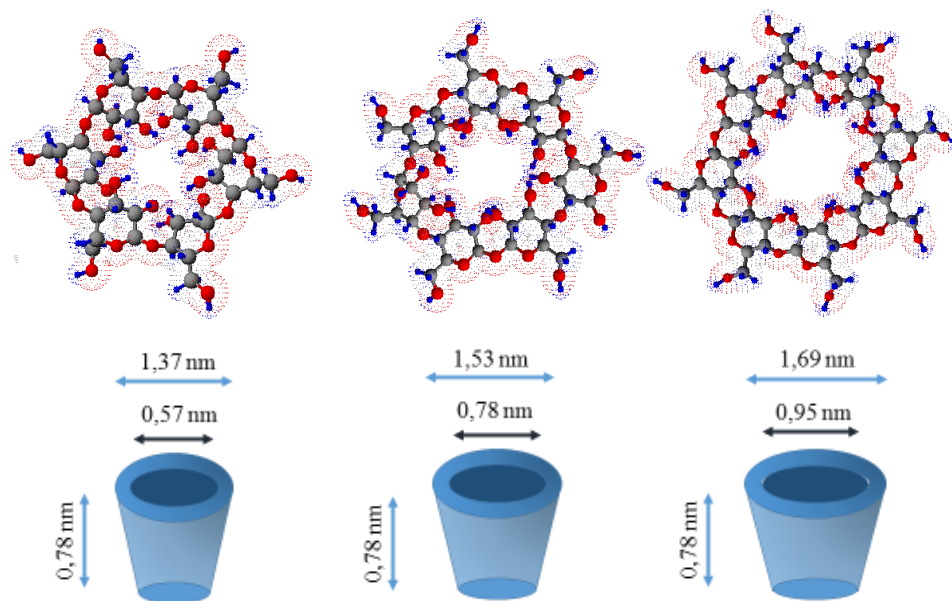
**9. ÁBRA** DENDRIMEREK ÁLTALÁNOS FELÉPÍTÉSE (102 ALAPJÁN)

### 1.3. Alkalmazott gyógyszer technológiai eljárások

#### 1.3.1. Oldékonyságnövelés ciklodextrinekkel

A ciklodextrinek (CD) jól ismert zárványkomplekképző vegyületek ezért felhasználásuk széles körben elterjedt, mind a gyógyszer-, mind az élelmiszeripar területén. Professzor Szejtli József, a hazai ciklodextrin kutatás elindítója, a ciklodextrinek sikertörténetét három korszakra osztotta: 1891-1930-as évekig a felfedezésük, 1935-1970-ig kutatásuk és 1970-től napjainkig felhasználásuk zajlik (149). Felfedezésük A. Villiers francia tudós nevéhez fűződik, aki a keményítő bakteriális bomlásából fedezte fel ezeket a ciklikus oligoszacharidokat 1891-ben. Pontos szerkezeti felépítésükre 1935-ben derített fényt Freudenberg és Jacobi, akik munkatársaikkal együtt meghatározták az alapvető fizikai-kémiai és komplex képzési tulajdonságaikat. Az 1970-es évektől biotechnológiai eljárásokkal sikerült nagy tisztaságú ciklodextrineket előállítani ipari mennyiségben is (149; 150). Ezt követően egyre több publikáció, szabadalom és termék jött létre ciklodextrinek felhasználásával. Ez a tendencia a mai napig sem változott, mely a rendkívül előnyös tulajdonságaiknak, az újabb ciklodextrinek előállításának és a változatos gyógyszer technológiai eljárásoknak köszönhető (pl. nanopartikulumokkal együtt (151; 152), nanogélekben (153) vagy szálképzési technikákat alkalmazva (154).

Szerkezetüket tekintve  $\alpha$ -1,4 kötéssel kapcsolódó  $\alpha$ -D-glükopiranoz egységekből épülnek fel, ezért nem redukáló tulajdonságúak. A gyűrű tagszámától függően megkülönböztetünk  $\alpha$  (6),  $\beta$  (7) és  $\gamma$  (8) ciklodextrineket, melyeket *alap ciklodextrin*ként említ az irodalom. A nagyobb gyűrűtagszámú molekulák, mint a  $\delta$  (9) és az  $\epsilon$  (10) CD-ek gyakorlati jelentősége kisebb (155). A **10. ábra** az alap ciklodextrinek szerkezetét szemlélteti. Mindegyik CD gyűrű a glükopiranoz egységek  ${}^4C_1$  szék konformációjának következtében tölcser szerű alakot vesz fel. A primer OH-csoportok (C6) a gyűrű „keskenyebb” peremén, a szekunder OH-csoportok (C2 és C3) a gyűrű „szélesebb” peremén helyezkednek el. Az utóbbiak között H-híd kötések alakulnak ki, melyek merevíti a peremet. A glükóz molekula szén és glikozidos kötésben lévő oxigén atomjai a belső üreg felé fordulva helyezkednek el, így az kevésbé poláris tulajdonságú. A vízdékony molekulák oldott állapotban, a gyűrű külső felén elhelyezkedő OH-csoportok H-hidat alakítanak ki a vízmolekulákkal (156; 157).



**10. ÁBRA** AZ ALAP CIKLODEXTRINEK SZERKEZETE (SAJÁT SZERK.)

A belső gyűrű polaritása vizes-etanolos oldathoz hasonló, ezért lipofil közeget tud biztosítani a vízben rosszul oldódó hatóanyagok számára. Megfelelő méretű és szerkezetű molekulákkal nem-kovalens, ún. zárványkomplexeket tudnak létrehozni. Ilyen molekula-asszociátumok kialakulásában létfontosságú, hogy a vendégmolekula kiszorítsa az entalpiában gazdag vízmolekulákat a belső üregből. De ezen kívül szerepet játszanak még szterikus és termodinamikai tulajdonságok, valamint az oldószernek is fontos szerepe van. Fontos a térbeli szoros illeszkedés: nagy méretű molekulák esetében feltehetően annak csak egy része vagy funkciós csoportja vesz részt a komplexképzésben. Mindezek összességében megmagyarázzák a CD-ek eltérő komplexképzési tulajdonságait (157; 158). Az  $\alpha$ -CD kismolekulák komplexálására alkalmas. A  $\beta$ -CD hét tagszámú gyűrűjének köszönhetően kiemelkedően szimmetrikus és stabilis molekula, ezért vízdékonysága a többi alap ciklodextrinéhez viszonyítva alacsony. Stabilitása visszavezethető a szekunder OH-csoportok közötti maximális számú intramolekuláris H-kötéseire, melyek egy ún. másodlagos övet hoznak létre a molekulában. Ezen kívül belső üregének átmérője legalkalmasabbá teszi aromás és más heterociklusos molekulák befogadására. A  $\gamma$ -CD gyengébb intramolekuláris kötéseinek következtében jobban oldódik vízben (157).

Széles felhasználásukat és a változatos komplexképző tulajdonságaikat további szerkezeti módosításokkal bővítették az elmúlt évtizedekben. Különleges struktúrájuk lehetővé teszi, hogy primer és szekunder OH csoportokat szintetikus úton módosítsák,

ezáltal eltérő fizikai-kémiai és komplexképző tulajdonságú ún. *derivátumokat* létrehozva (158). Az alap ciklodextrinek közül a  $\beta$ -CD rendelkezik a legtöbb származékkal, melyek közül gyógyszerészeti szempontból nagyobb jelentőséggel a hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD), random metilált- $\beta$ -CD (RM- $\beta$ -CD) és az ionos szulfobutiléter- $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD) rendelkeznek, melyek képesek jelentősen növelni több farmakon oldékonyságát is (159). A ciklodextrinek képesek megnövelni a vendégmolekula látszólagos oldékonyságát, biohasznosíthatóságát és stabilitását, mely különösen előnyös a BCS II. és IV. osztályba sorolt hatóanyagok esetében (157).

Már az 1970-es években igazolták, hogy a ciklodextrinek nem toxikus vegyületek (160). Állatkísérletekben nem tapasztaltak patológiai elváltozásokat (161) és egészséges önkéntesen végzett vizsgálatokban sem mutattak ki károsító hatásokat (162). Az alap ciklodextrinek orális alkalmazása biztonságosnak tekinthető, mert nem szívódnak fel a gasztrointesztinális rendszerből (159). Kis mértékben a humán  $\alpha$ -amiláz enzimek képesek hidrolizálni az oligoszacharidokat ( $\alpha$ -CD <  $\beta$ -CD <<  $\gamma$ -CD) (163), nagyobb mértékben azonban bélbaktériumok segítségével tudnak lebomlani vagy változatlanul ürülnek a szervezetből (164). A  $\beta$ -CD parenterálisan nem alkalmazható kis oldékonysága és esetleges nefrotoxicitása miatt, de a hidrofil (HP- $\beta$ -CD) és az ionos származékai (SBE- $\beta$ -CD) bizonyos mennyiségben jól tolerálhatónak bizonyultak (165). Ezt *in vitro* sejttöxicitási vizsgálatokkal is alátámasztottak (164; 166). Ezzel szemben lipofil származékai nagyobb mértékben át tudnak jutni a membrán barriereken és a metilcsoportok számának növekedésével nőhet a toxicitásuk. Habár a RM- $\beta$ -CD is lipofil származék, rendkívül jó vízóldékonyságát és ártalmatlanságát *per os* vizsgálatokban már igazolták (167). A CD-ek enyhe mellékhatásaiként puffadás, hasmenés fordulhat elő a fermentálódás következtében (164), súlyosabb esetben pedig akár hemolízis is, mert képesek zárványkomplexet képezni a sejtmembránban található koleszterin molekulával (168). Ezért egyes ciklodextrinekhez maximális napi dózist is megállapítottak (1,4 g az  $\alpha$ -CD, 0,35 g a  $\beta$ -CD és 0,07 g a RM- $\beta$ -CD esetében) (169). A széleskörű kutatások eredményeként már mindegyik Gyógyszerkönyvben megtalálhatóak. Az Európai Gyógyszerkönyvben az  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD és a HP- $\beta$ -CD cikkelyei, míg a Japán Gyógyszerkönyvben csak az alap CD-ek szerepelnek, de az Egyesült Államok Gyógyszerkönyvében (USP) az  $\alpha$ -CD Alfadex, a  $\beta$ -CD Betadex és a SBE- $\beta$ -CD Captisol<sup>®</sup> vagy Betadex Sulfobutyl Ether Sodium néven került bejegyzésre.

### 1.3.2. Módosított hatóanyagleadás pelletekkel

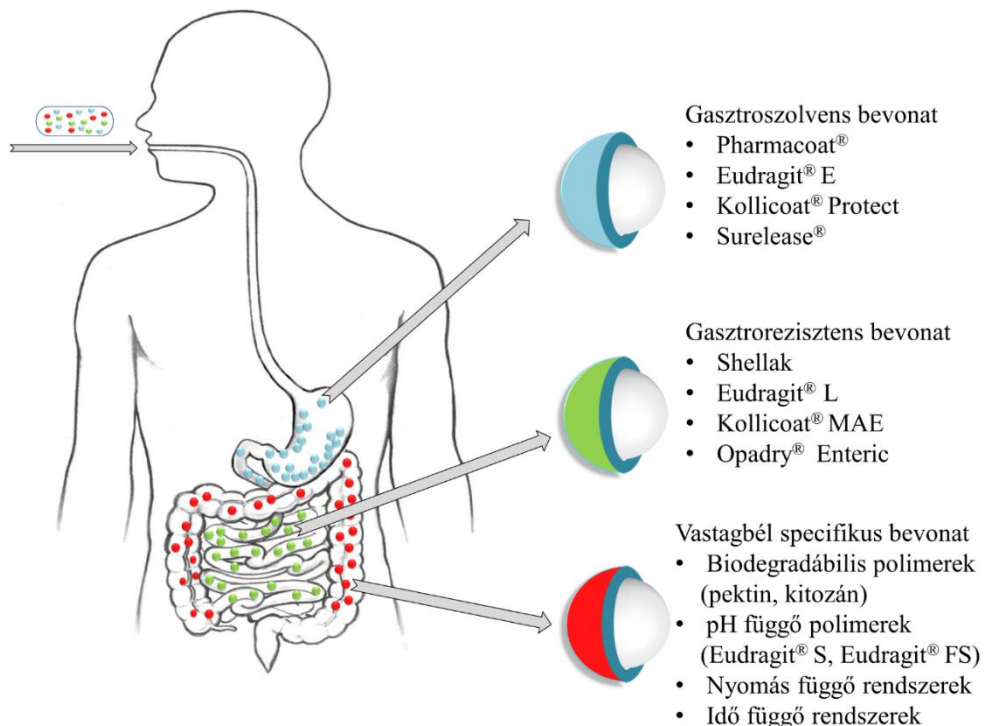
A terápiában használt gyógyszerformák nagy többségét a *per os* alkalmazott, ezen belül is a szilárd gyógyszerformák jelentik, mert egyszerű, kényelmes és fájdalommentes adagolást tesznek lehetővé. A bevételre szánt szilárd gyógyszerformákat feloszthatjuk egységese és többegységes (*multipartikuláris*) rendszerekre. Az utóbbi csoporthoz tartoznak a pelletek, melyek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek az egységese gyógyszerformákkal szemben. A *pellet* angol szó, jelentése golyócska. A definíció szerint 0,2-2 mm méretű, sima felületű, tömör szerkezetű, közel gömb alakú szemcsék. Belső szerkezetüket tekintve nagy sűrűségűek, szemcseméret eloszlásuk homogénebb a granulátumokénál. Felépítésük szerint lehetnek homogének, ahol a hatóanyag és segédanyagok mártixot alkotnak vagy heterogének, amikor a hatóanyag egy inert pelletmagot rétegesen vesz körül (hagyma struktúra) (170-172). A mártix szerkezetű pelletek előállítására nedves granulálással, a réteges szerkezetű pelletek bevonással készülnek. A rétegzéses eljárásokban valamilyen hordozóra, leggyakrabban inert pelletre viszik fel több rétegben a hatóanyagot. Ez az eljárás megvalósítható például fluidizációs berendezésekben, ahol a fluidizáló levegő inert pelletmagokat mozgat és porlasztással kerül a magok felszínére a hatóanyag tartalmú por, oldat vagy szuszpenzió. A fluidizációs készülék egyben alkalmas a pelletek megszáritására is, így egy készülékben állíthatunk elő, vonhatunk be és száríthatunk pelleteket (173; 174).

Az inert magok ötven éve állnak a technológia rendelkezésére és a Gyógyszerkönyvben hivatalos anyagokból készülhetnek, mint a cukor, az izomalt vagy a mikrokristályos cellulóz (MMC). Az előre gyártott pelletmagokkal szembeni legfontosabb követelmények a fizikai paramétereken kívül (pl.: szemcsealak, szemcseméret), hogy különféle hatóanyagokkal kompatibilisek és az emberi szervezet számára neutrálisak (inert) legyenek. Nagy mértékben megkönnyítik a pelletezési eljárást, mert annak kritikus lépése a magképződés (nukleáció) elmarad. További előnye, hogy a pontosan meghatározott a felülete következtében könnyebben kialakítható a bevonatréteg, de hátrányai közé tartozik, hogy alacsonyabb hatóanyag tartalom érhető el, mint a mártix típusú pelletek esetében (175).

Az általában 0,5-1,5 mm méretű gyógyszeres pelletek bevételt követően eredeti állapotukban szabadulnak fel és kis méretüknek köszönhetően egyenletesen oszlanak el a gasztrointesztinális traktusban (GIT). Az apró partikulumok szinte folyadékként



viselkedve vonják be a belek és a gyomor felszínét (**11. ábra**). Tehát a jobb disztribúció következtében, megnövelik a biohasznosíthatóságot és csökkentik a mellékhatások kialakulásának kockázatát. A gyomor tranzit idő és a gyomor nyálkahártya irritáció egyaránt kisebb és kiszámíthatóbb, mint az egyegységes gyógyszerformák esetében. A korai hatóanyagleadás előfordulása is lecsökken (176-178). Ezen kívül csökkentik a terápiás hatás inter- és intraperszonális variabilitását, ami az elfogyasztott ételek miatt is bekövetkezhet. Mivel a hatóanyag teljes dózisa kis egységekben oszlik el, ezért egy egység hibája nem okoz túladagolást vagy a hatás elmaradását. Valamint előnyei közé tartozik még az is, hogy különböző bevonatokkal egyszerre juttatható a szervezetbe a kezdő és a fenntartó adag is, inkompatibilis anyagok külön egységben, de ugyanazon gyógyszerformában adagolhatók, valamint a részegységek megválasztásával könnyen gyártható különböző hatáserősségű készítmény. A fenti tényekből is látható, hogy a multipartikuláris gyógyszerformák számos előnyük miatt, egyre nagyobb szerepet kapnak a gyógyszeres terápiában, és a bevonattal ellátott pelletekkel biztosítható, hogy a hatóanyag a megfelelő helyre eljusson és kifejtsse hatását (170).



**11. ÁBRA SEMATIKUS ÁBRA A PELLETEK DISZTRIBÚCIÓJÁRÓL ÉS NÉHÁNY LEGGYAKRABBAN HASZNÁLT POLIMER (SAJÁT SZERK.)**

A hatás helyén a hatóanyag felszabadulását és biohasznosíthatóságát számos tényező befolyásolja. A fiziológias körülményeken kívül, mint például a béltartalom viszkozitása és összetétele, a készítmény tulajdonságai is fontos szerepet játszanak. A szilárd gyógyszerkészítményeket hatóanyagleadás szempontjából két csoportba sorolhatjuk: konvencionális- és nem konvencionális (*módosított hatóanyagleadású*) készítmények. A konvencionális készítmények előállítása során nem történik módosítás annak érdekében, hogy a hatóanyag felszabadulás helyét vagy idejét megváltoztassák. Ezzel szemben a nem konvencionális készítményeknél a hatóanyagfelszabadulás helyének és /vagy sebességének módosítása történik a hagyományostól eltérő előállítási módok vagy összetételek alkalmazásával. A pelleteket leggyakrabban színezés, kellemetlen íz elfedése, védelem vagy módosított hatóanyagleadás céljából vonják be. Tehát a bevonat védelmet nyújt a környezeti hatásoktól, esztétikus, valamint íz vagy szagfedésre is alkalmas. Különböző bevonattal ellátott pelleteket kioldódásával különböző hatóanyagleadású rendszereket lehet elérni. Így optimális kioldódás tervezhető, mert a kioldódási profil az egyes egységek egyedi hatóanyagleadásából tevődik össze (179; 180). A módosított hatóanyagleadás eléréséhez különböző polimer bevonatokat és keverékeiket is alkalmazzák a gyógyszeriparban (181). Ezek a polimerek többféleképpen is csoportosíthatók: kémiai szerkezet (pl. akrilát, cellulóz), oldhatóság (pl.: vízoldható) vagy előállítás alapján (pl.: szintetikus, félszintetikus), valamint további csoportokra oszthatók például pH függő oldékonyság, permabilitás alapján. Néhány példát **11. ábra** szemléltet a teljesség igénye nélkül. Leggyakrabban használt polimerek közé tartoznak az akrilát polimerek, ezen belül is a szintetikus poli(met)akrilát kopolimerek, melyek 1955-től Eudragit® márkajelzéssel kerültek forgalomba (182). A gasztrorezisztens bevonatok célja a gyomor nyálkahártya védelme, a hatóanyag bomlástól való védelme és eljuttatása a felszívódás helyére (pl.: duodenum). A vékonybél hosszúsága és nagy felülete következtében optimális hely a felszívódásra a legtöbb gyógyszermolekula számára. Nagyobb kihívást jelent a hatóanyagok vastagbélbe történő eljuttatása főként a speciális fiziológias körülmények miatt (pl.: változó transzít idő, baktériumok által termelt enzimek). Ugyanakkor a vastagbélben oldódó bevonatoknak nagy jelentősége van vastagbél terápiájában is (p.: Crohn betegség, irritábilis bél szindróma, fekélyek), minimalizálva a szisztémás mellékhatást. Továbbá a vastagbél felszálló ágában tudnak felszívódni az emésztő enzimekre érzékeny, terápiás jelentőségű

fehérjék is (183). Ezért az elmúlt években nőtt a kutatók és az ipar érdeklődése a vastagbél specifikus gyógyszerhordozó rendszerek (CDDS) iránt. Habár a fiziológiai körülmények kihívást jelentenek, ez a felület biztosítani tudja a biztonságosságot, hatékonyságot és a jó beteg compliance-t. A pH függő rendszereken kívül más technológiai fejlesztésekkel is elérhető a vastagbélben történő hatóanyagleadás (184).

Növényi kivonatok vagy hatóanyagok pelletékbe történő inkorporálására csak kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Kaledaite és munkatársai *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis* és *Urtica dioica* száraz kivonatával készítettek extrúziós-szferonizációs módszerrel mátrix pelletéket, melyek kedvező fizikai paraméterekkel rendelkeztek. Ezt követően különböző mennyiségű Eudragit® FS polimerrel vonták be és vizsgálták a kioldódást (185). Egy másik publikációban a vastagbél gyulladással járó betegségek kezelésére rutin tartalmú kitozán pelletéket állítottak elő szintén extrúziós-szferonizációs módszerrel. A legjobb *in vivo* eredményt kitozán és alginát kombinációjával érték el, mely 12-14% hatóanyagot adott le a felső GIT-ban, majd a vastagbélbe kerülve felgyorsult a kioldódás (186). A számos jótékony hatással rendelkező naringin flavonoid felezési ideje nagyon gyors, ezért naringin tartalmú nyújtott hatóanyagleadású pelletéket készítettek szintén extrúziós módszerrel, mikrokristályos cellulóz segédanyaggal. A farmakokinetikai vizsgálatok 119%-os relatív biohasznosíthatóságot mutattak (187).

### 1.3.3. Célzott hatóanyagleadás nanorészecskékkel

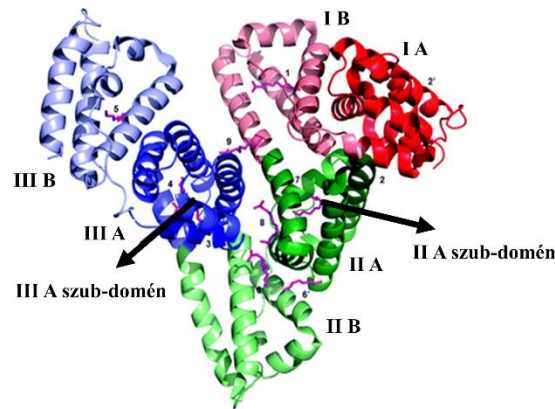
A konvencionális folyékony vagy szilárd gyógyszerformák is olyan hátrányokkal rendelkeznek, melyek a hatóanyagok alacsony hasznosíthatóságát, túladagolását vagy intoleranciáját okozhatják a szervezetben. Ezzel szemben a nanorészecskéket egyre szélesebb körben alkalmazzák, mert segítségükkel szinte ideális terápiás hatás érhető el. A nanopartikulumok olyan kolloid gyógyszerhordozó rendszerek, ahol egy részecske mérete 10-1000 nm mérettartományba esik. Főbb előnyeik a (vízben rosszul oldódó) hatóanyagok megnövelt oldékonyság következtében létrejövő nagyobb biohasznosíthatóság, valamint a nyújtott és a célzott hatóanyagleadás biztosítása. Mindezek alacsonyabb dózissal biztonságosabb hatóanyagbevitelt tesznek lehetővé, minimalizálva a mellékhatásokat és megcélözva a beteg sejteket/szervet (188). A nanorészecskéket felépítő anyagok és módszerek rendkívül szerteágazóak, mint ahogy néhány példát már bemutatam. Mivel ez egy fejlődő tudományág, ezért újabb és újabb

segédanyagok kerülnek alkalmazásra. Kiemelkedő jelentőségűek azonban szervezetre ártalmatlan, ún. biodegradábilis vegyületek, hiszen az esetleges immunválasz és a toxicitás veszélye is így még tovább csökkenthető (189).

Gyógyszer technológiai szempontból a nanorészecskék egyik legjelentősebb biodegradábilis alkotóeleme a szérum albumin. Ez a fehérje az emberi és állati szervezetben egyaránt megtalálható. A humán szérum albumin (HSA) az emberi szervezetben legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje, 80%-ban az intravaszkuláris térben és a fennmaradó 20%-a az extravaszkulárisan a bélnedvekben és a nyirokrendszerben található. Élettani szempontból rendkívül fontos szerepeket tölt be, úgy mint a vér pH-jának stabilizálása, az ozmotikus nyomás kialakítása és képes különböző anyagokat reverzibilisen megkötni, szállítani, ezáltal a gyógyszer molekulák felszívódásában is meghatározó jelentőségű. 585 aminosavból épül fel, molekulatömege 66000 Da. A polipeptidlánc 67%-ban  $\alpha$ -helikális, 10%-ban  $\beta$ -redőzött és a többi része flexibilis régiókba rendeződött. Izoelektromos pontja 4,7 ezért semleges közegben felületi össztöltése negatív. Három szerkezetileg homológ doménből épül fel (I, II, III), melyek további két alegységre bonthatók (A és B). Ezek közül a IIA és a IIIA a legjelentősebbek ugyanis a molekulák nagy része az itt lévő szubdoménekhez (ún. hidrofób zsebekhez) képesek kötődni. A IIA szubdomén (Site I) sztérikusan nyitottabb, flexibilisebb és a kötődésben főként hidrofób interakciók játszanak szerepet. A IIIA szubdomén (Site II) sztereoszektivebb és itt inkább H-híd kötések alakulnak ki. A kötőhelyek felépítésében fontos szerepet játszik a triptofán (Trp 214, szubdomén IIA), mely részt vesz a hidrofób kölcsönhatásokban. A polipeptid felépítését a **12. ábra** mutatja (190).

A készítményekhez alkalmazott, forgalomban kapható albuminnak több típusát különböztetjük meg, attól függően, hogy milyen forrásból származik: ovalbumin (OVA, tojásfehérjéből), bovin szérum albumin (BSA, marha plazmából) és humán szérum albumin (HSA, emberi plazmából). A BSA aminosav szekvenciája 80%-ban, a harmadlagos szerkezete 76%-ban egyezik meg a HSA-nal. 582 aminosavból áll, és a HSA-nal ellentétben két triptofánt tartalmaz (Trp 134 és Trp 212). A Trp 134 a globuláris protein felszínéhez közel helyezkedik el, míg a Trp 212 hidrofób mikro környezetben, hasonlóan a Trp 214-hez (HSA). Mivel szerkezetileg alig különböznek egymástól, ezért

a BSA-t gyakran helyettesítik HSA-nel a gyógyszergyártásban, hogy elkerüljék az esetleges immunválaszt (191).



## 12. ÁBRA A SZÉRUM ALBUMIN SZERKEZETI FELÉPÍTÉSE ÉS KÖTŐHELYEI (191)

Az albumin nanopartikulumok a gyógyszeripar számára kiemelkedő jelentőségűek, mert biokompatibilisek, tolerálhatók és előállításuk könnyen reprodukálható (191, 192). Ezen felül kiváló ligandkötési képességekkel rendelkeznek különféle molekulákhoz a hidrofób zsebeknek köszönhetően (193). Az albumin rendkívül robusztus fehérje, 40%-os etanolban oldódik, stabil pH 4-9 között és nem denaturálódik. pH-tól függően több konformációba is rendeződhet, fiziológias közegben (pH 7,4) 50:50%-ban normál és bázikus konformációkat vesz fel. Nanopartikulumok előállítására több módszer, mint a deszolvatálás (koacerváció) és az emulzifikálás, valamint újabb technológiák állnak rendelkezésre, mint a nano-porlasztva szárítás vagy a NAB<sup>TM</sup> (nanoparticle-albumin bound) technológia (194). A NAB<sup>TM</sup> technológiát az American Bioscience, Inc. vállalat fejlesztette ki és szabadalmaztatta 2006-ban. Az előállítás során a lipofil hatóanyagot és az albumin vizes oldatát elegyítik és nagy nyomású homogenizáló berendezésen keresztül nanopartikulumokat állítanak elő. Ezzel a módszerrel előállított forgalomban lévő szer az Abraxane<sup>®</sup>, mely a paklitaxel daganatellenes szert tartalmazza (195). Ezen kívül előrehaladott klinikai vizsgálatok alatt van egy új készítmény, mely a doxorubicin albuminhoz kötött prodrugja, az Aldoxorubicin (196).

A bioaktív hatóanyagok, mint a flavonoidok szintén kötődnek szérum albuminhez H-híd és elektrostatikus kötésekkel (197). A kötődési affinitást befolyásolja a flavonoid molekula OH csoportjainak száma és a glikozidjai is (198). A B gyűrűn lévő OH csoportok növelik, míg az A gyűrűn lévő OH csoportok és a glikozidok csökkentik a

kötődési affinitást. Ezen kívül a C gyűrű C2=C3 kettős kötés telítése és a kapcsolódó glikozidok sztérikus gátlása szintén csökkenthetik a flavonoidok kötődési affinitását az albumin molekulához. Flavonoidok inkorporálása szérumban albumin nanorészecskébe jelentősen növeli stabilitásukat, biohasznosíthatóságukat és ezáltal daganatellenes hatásukat. A kötési konstansból arra következtettek, hogy a BSA-nak nagyobb a kötődési affinitása a flavonoidokhoz, mint a HSA-nak (190). Fang és munkatársai kvercetin tartalmú BSA NPs állítottak elő (< 10 nm), mely nem csak a kvercetin stabilitását, hanem antioxidáns hatását is megnövelte. Feltehetőleg a stabilizálásban H-híd kötések is szerepet játszottak (199). Ugyanez a kutatócsoport kempferol és a rutin tartalmú BSA NPs is előállított (30 nm), ahol szintén azt az eredményt kapták, hogy a BSA nanorészecske, mint hordozó rendszer, védelmet nyújt flavonoidok degradációja ellen de nem gátolja antioxidáns hatásukat (200). Szkutellarin-BSA nanopartikulumokat állítottak elő deszolvatációs technikával a nyújtott hatás és biohasznosíthatóság növelésének érdekében. Az optimalizált folyamat során BSA vizes oldatához 95%-os etanolt csepegtettek folyamatos kevertetés mellett. A BSA részecskék kémiai stabilizálásához 5%-os glutáraldehid oldatot használtak. A tisztítási lépést követően - a hatóanyag adszorbeálásához - a szkutellarin etanos oldatával állni hagyták a BSA partikulumokat majd liofilizálták a készítményt. Az így készült részecskékkel (283,4 nm) magasabb plazmakoncentrációt és hosszabb felezési időt sikerült elérni (201). Kim és mtsai kurkumin-HSA NP állítottak elő NAB<sup>TM</sup> technológiával. Az részecskék (130-150 nm) mintegy 300 szorosára tudták megnövelni a kurkumin vízdékonyságát. Intravénásan alkalmazva az albumin elősegítette a kurkumin akkumulációját, ezáltal biológiai aktivitását a tumorsejtekben (202). Számos publikáció és klinikai vizsgálat támasztja alá, hogy az albumin elősegíti a hatóanyagok tumorsejtekbe történő felvételét és szöveti megoszlását (203; 204). A tumorsejtekbe történő akkumuláció patofiziológias körülményekből adódik. A daganat hipervaszkuularizált, vagyis átszövik gyengült falú kapillárisok. Ezen kívül a daganatsejtek túlexpresszálják a felszíni 60-kDa glikoprotein (gp60) receptort és az extracelluláris mátrix glikoproteint (SPARC), melyekhez hozzá tud kötődni az albumin és így elősegíti a transzcitózist. Látható, hogy az albumin NP-ok javítják a daganatellenes hatóanyagok szöveti disztribúcióját és bejutását a tumorsejtbe, csökkentve ezáltal a nemkívánt mellékhatásokat (191).

A nanorészecskék széleskörű felhasználása bizonyítottan hatékony mind a célzott hatóanyagleadás, mind a diagnosztika területén. Szervezetbe juttatásuk nem csak intravénásan történhet, sok publikáció születik nazális, dermális és orális beviteli alkalmazási módokról is. A inhalációval történő non-invazív pulmonális adagolásuk számos előnnyel rendelkezik (205). A gyors hatás és a jó beteg compliance mellett a tüdő alacsony enzim tartalma, nagy felülete és permeabilitása optimális beviteli kaput jelent a légúti és szisztémás megbetegedések kezelésére is (pl.: first pass metabolizmus elkerülése) (206). A rossz vízdékonyságú hatóanyagok biohasznosíthatósága a tüdőben jelentősen javítható nanorészecskék segítségével a jobb oldékonyságnak és gyors kioldódásnak köszönhetően (207). Továbbá a szérum albumin fehérje megnöveli a membrán permeabilitását, ezáltal elősegíti az epithél sejtek celluláris felvételét és az alveo-kapilláris barrieren történő átjutást (208), valamint a fehérjék a tüdőből transzcitózissal is felszívódnak a vérkeringésbe (209).

Száraz porinhalációs készítmények (DPI) a hatóanyagot tartalmazó por pontos és reprodukálható adagolását teszik lehetővé a tüdő bronchiális részébe és gazdasági szempontból költséghatékonyabbak is, mint más hasonló készítmények (210). Előállításuk leggyakrabban porlasztva szárítással (*spray drying*) történik. Ez az eljárás egy készülékben, egy lépésben teszi lehetővé az optimális aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkező termékek gyártását. A végtermék paramétereit (pl.: méret, sűrűség, morfológia) jól lehet szabályozni a készülék beállításával (pl.: adagolási sebesség, hőmérséklet) (211). A folyamat során a készülék a folyadékfázist apró cseppekre bontja, melyek gyorsan megszáradnak a nagy fajlagos felületüknek és a szárító kamrában lévő sűrített levegőnek köszönhetően. A szárító kamrában nem uralkodik magas hőmérséklet és a cseppekből hamar elpárolog az oldószer, így hőérzékeny anyagok és kolloid rendszerek is jól száríthatók vele tehát a fehérjék sem szenvednek degradációt (212). Ezért a porlasztva szárítást számos gyógyszergyártási területen használják, mint az inhalációra szánt porok előállításához is. Azonban a megfelelő aerodinamikai tulajdonságú formuláció előállítása az optimális beállítási paraméterek mellett segédanyagokat is igényelhet. A leggyakrabban alkalmazott, egyetlen Gyógyszerkönyvben megtalálható aerodinamikai tulajdonságok javítására felhasználható ún. hordozó típusú segédanyag a laktóz-monohidrát, melyet fehérjék inhalációval történő adagolására is felhasználnak (212; 273). Napjainkban ún. hordozó mentes, új generációs

típusú anyagok, az aminosavak kezdenek előtérbe kerülni a pulmonális hatóanyag bevitel elősegítésére, melyek közül a legjobb hatásfokkal a L-leucin emelkedik ki (208). Nanorészecskék inhalációval történő adagolása egy viszonylag új alkalmazási mód, mely nem csak lokális, hanem szisztémás terápiára is lehetőséget tud biztosítani. A nanorészecskék számos előnyökkel rendelkeznek a hagyományos porinhalációs készítményekkel szemben, mint a hatóanyag oldékonyságának növelése, ezáltal a dózis és az előforduló mellékhatások csökkentése, valamint nyújtott és célzott hatóanyagleadás is (213).

Az irodalmi áttekintés alapján megállapíthatjuk, hogy a gyógyszerkutató szektorban a bioaktív hatóanyagok alkalmazása és így különféle, korszerű gyógyszerformákba történő formulálása is egyre nagyobb teret nyer. Az apigenin, mint bioaktív flavonoid, jelentős terápiás hatásokkal rendelkezik, melyet számos irodalmi adat támaszt alá. Azonban alacsony biohasznosulása, melyet elsősorban rossz vízdékonysága és ennek következtében alacsony felszívódása okoz, továbbá a szervezetbeni extenzív metabolizmusa tovább csökkent, akadályozza a jótékony hatások kialakulását. Ezért a gyógyszer technológia feladata, hogy megfelelő gyógyszerhordozó rendszerek kifejlesztésével biztosítsa a bioaktív hatóanyagok számára is a megfelelő terápiás koncentrációt, mely elengedhetetlen annak érdekében, hogy a felhasznált hatóanyagok hatásfokát növelje, csökkentse az esetleges mellékhatásokat és célzott terápiát valósítson meg.



## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során több célkitűzést is tettem arra törekedve, hogy az apigenin számára egy megfelelő gyógyszerhordozó rendszert alakítsak ki, mely lehetővé tenné gyógykészítményként történő forgalmazását.

Első lépésként az apigenin szelektív meghatározása érdekében egy *analitikai módszer* kidolgozása volt fontos, hiszen ez elengedhetetlen annak érdekében, hogy a készítmények és a növényi kivonat apigenin tartalmát meghatározzam. Ezt követően célul tűztem ki az apigenin *oldékonyságának növelését ciklodextrin* molekulák segítségével, alap- és származékciklodextrinek felhasználásával. Ehhez a létrejött zárványkomplexek szöchiometriájának és stabilitási állandójának meghatározása fázis-oldhatósági vizsgálatok segítségével, valamint a komplexek UV-látható és fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálata kapcsolódott. Fő célom az apigenin számára alkalmas *multipatrikuláris hordozórendszer* kialakítása és biohasznosíthatóságának növelése volt. Elsőként inert pelletmagokat alkalmazva, a bioaktív hatóanyagok (apigenin és növényi kivonat) rétegzése volt a célom. Majd a fluidizációs rétegzéses eljárás optimalizálását követően, különböző fiziológiás pH értéken oldódó polimerrel történő bevonás kritikus paramétereinek kísérletes úton történő meghatározása volt feladatom. Az így elkészült *módosított hatóanyagleadású pelletek* fizikai paramétereinek vizsgálata, mint a szemcsealak, a szemcseméret eloszlás és a törési szilárdóság, valamint a rétegzés és bevonás folyamatának nyomonkövetése FTIR és NIR készülékekkel valósult meg. Fontos szempont volt az apigenin kioldódásának ellenőrzése és annak biztosítása, hogy a felszívódás helyén magas apigenin koncentrációt érhesen el készítmény. Mivel a kolloid mérettartományban lévő gyógyszerhordozó rendszerek a hatóanyagok vízdoldhatóságának növelését, jobb felszívódását és ezáltal jobb biohasznosíthatóságát teszik lehetővé, munkám során célul tűztem ki magas apigenin tartalmú *nanopartikulumok* előállítását *célzott hatóanyagleadás* érdekében. Törekedve a költséghatékony formulációra, olyan részecskék előállítása volt a célom, melyek lehetővé tennék az apigenin hatásának fokozottabb kifejtését lokális vagy szisztémás úton is száraz porinhalációs készítményben alkalmazva. Ennek érdekében a nanorészecskék bezárási hatásfokának, zeta potenciáljának, majd porlasztva szárítást követően aerodinamikai tulajdonságainak mérése elengedhetetlen volt. Továbbá célul tűztem ki az *antioxdiáns hatás mérését*, mely lehetővé tette, hogy vizsgáljam és ellenőrizzem az előállított készítmények hatásfokát.

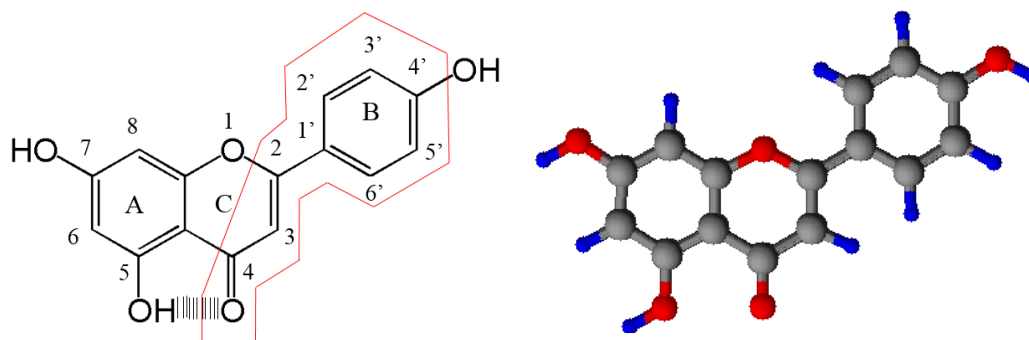
### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Bioaktív hatóanyagok

A petrezselyem kivonat készítéséhez kereskedelmi forgalomban kapható, szárított és aprított leveleket használtam fel (Kotányi Hungária Kft., Magyarország). Az apigenint (tisztaság > 99%) Hangzhou Dadyangchem Co., Ltd. (Kína) gyártótól rendeltem. Az analitikai mérésekhez a HPLC tisztaságú apigenint, apiint és apigetrint a Sigma Aldrich Ltd. (Németország) biztosította.

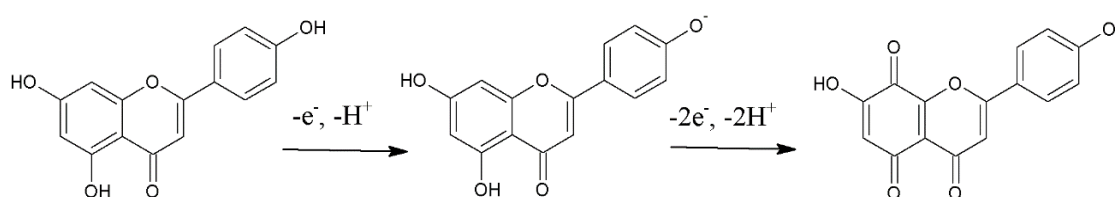
##### 3.1.1. Apigenin fizikai-kémiai tulajdonságai

Az apigenin (4',5,7-trihidroxi-flavon) flavon vázas vegyület, mely három gyűrűből áll (**13. ábra**). A flavonoidokra jellemzően kiterjesztett  $\pi$  delokalizált elektronrendszerrel rendelkezik a szomszédos gyűrűiben. Ebből következik, hogy ionizációs potenciálja alacsony és könnyen vesz részt egy-elektron-transzfer mechanizmusokban. A C5-OH és a C4 ketocsoport között intramolekuláris hidrogénhíd kötés található. A C3-C2-C1'-C2' torziós szöge közel  $0^\circ$  ezért a molekula planáris szerkezetű (36), de mivel nem tartalmaz C3-OH csoportot, ezért a B gyűrű könnyen elfordulhat, és ekkor  $18,2^\circ$ -ot zár be az A+C gyűrű síkjaihoz képest (214). A három hidroxil csoportból (C4', C5 és C7) hidrogén ion elvonásával gyökök keletkeznek. Elektron sűrűségi mérések alapján, a legstabilabb gyök a C4'-OH csoportból keletkezik, mert a C4'-OH gyök nem kötő elektronpárja delokalizálódik a B és a C gyűrű fölé, feltehetően a planáris konformáció miatt. A legkevésbé stabil gyök a H-híd felbomlása



**13. ÁBRA** AZ APIGENIN SZERKEZETE,  
A BEKERETEZETT RÉSZ A CINNAMOIL RÉSZT JELÖLI (SAJÁT SZERK.)

során keletkezik a C5-OH csoportból (36). Könnyen képez komplexeket Al(III) és Fe(II) ionokkal, ezért kelátkomplex képződés figyelhető meg a fémionok és az apigenin molekula C5-OH - C4=O csoportjai között 1:3 arányban (215; 216). Oxidációjának lehetséges mechanizmusát voltametriás mérésekkel vizsgálták. Az reakció teljesen irreverzibilis, melynek során az elektród felületén csak oxidálódik a molekula és redukció nem megy végbe, ezért antioxidáns tulajdonságú. Az oxidálódás lehetséges mechanizmusa a **14. ábrán** látható (217).



**14. ÁBRA** AZ APIGENIN OXIDÁCIÓJÁNAK MECHANIZMUSA (217)

Oldékonyságát tekintve az apigenin vízben kevésbé oldható, azonban tömény lúgokban és szerves oldószerekben jól oldódik, oldhatósága a hőmérséklet növelésével nő (25; 218; 219). Az oldhatóságát és egyéb jellemző paramétereit a **III. és IV. táblázat** mutatja, melyek alapján a BCS II. osztályába sorolható (25). Magas lipofilitásának és jó permeabilitásának köszönhetően passzív diffúzióval is bejut a sejtekbe az apigenin molekula (25). A sejtmembránban a molekula apoláris gyűrűi feltehetőleg a lipid kettősréteg leghidrofóbb részén, míg a poláris csoportjai a vizes fázishoz közelebb helyezkednek el (220).

**III. TÁBLÁZAT** APIGENIN FIZIKAI-KÉMIAIAI PARAMÉTEREI

Fizikai-kémiai paraméter	Mért értékek	Hivatkozások
Molekula tömeg (g/mol)	270,24	(221)
Olvadáspont (°C)	345-350	(221)
	360-365	(219)
log P érték	3,23	(222)
	2,87	(219)
	1,50	(223)
	1,40	(224)
pK <sub>a1</sub> (C7-OH)	7,86	(223)
	6,61	(225)
pK <sub>a2</sub> (C4'-OH)	9,31	(225)

**IV. TÁBLÁZAT APIGENIN OLDHATÓSÁGA SZERVES OLDÓSZEREKBE ÉS FIZIOLÓGIÁS PH ÉRTÉKEKEN (25°C-ON)**

<b>Oldószer</b>	<b>Oldhatóság (mg/ml)</b>	<b>Hivatkozások</b>
Etanol	1,630	(219)
	1,397	(226)
Metanol	0,999	(226)
	1,480	(219)
Aceton	1,598	(226)
	> 100	(219)
Desztillált víz	0,00135	(219)
	0,00154	(226)
pH 1,0	0,00143	(25)
pH 2,5	0,00101	(25)
pH 5,0	0,00128	(25)
pH 5,8	0,00136	(25)
pH 6,8	0,00156	(25)
pH 7,0	0,00163	(25)
pH 7,5	0,00216	(25)

UV spektroszkópiai tulajdonságait tekintve, a flavonoidokra jellemző két abszorpciós maximuma van, mely a flavonoidok általános szerkezetéből adódik és a molekula szubsztituáltsági fokát is jellemzi. Tehát első maximum 300-380 nm (I. sáv) között található és az ún. cinnamoil részből adódik (B+C gyűrű) adódik, míg a második maximum 240-280 nm (II. sáv) közé esik és az A+C gyűrűből, az ún. benzoil részből ered. Ezen kívül az abszorpciós hullámhossz értékeket jelentősen befolyásolja a gyűrűkön lévő hidroxil csoport száma. A jobban hidroxilált B gyűrű jellemzően hosszabb hullámhossznál nyel el, de a hidroxiláltság az A gyűrűn kevésbé befolyásolja a sáv pozícióját (227). Az apigenin is két abszorpciós maximumot mutat, 340 nm és 267 nm-en. Mindazonáltal a közeg típusa és pH-ja, ezáltal a flavonoid disszociációs foka befolyásolja az abszorbancia spektrumot, tehát a maximumok kissé eltolódhatnak vagy az egyik sáv intenzitása megnőhet/lecsökkenhet. Például az apigenin esetében, pH növelésével nő az disszociáció foka, ezért az II. sáv intenzitása lecsökken és az I. sáv

megnö. Lehetséges magyarázat erre, hogy a fenolos hidroxilcsoport az 5,7 és a 4' pozícióban részlegesen disszociált állapotban vannak és a disszociációs egyensúlyt befolyásolja a pH érték, így pH értéktől függően egy egyensúly alakul ki a semleges és az anionos formák között. Az apigenin UV abszorpciós karaktere különböző pH értéken arra enged következtetni, hogy a hosszabb hullámhossznál látható sáv az anionos molekula, a rövidebb sáv a neutrális apigenin molekula jelenlétére utal, ezért eltérő irodalmi adatok találhatóak erre vonatkozóan (26; 225).

Az apigenin egy autofluoreszcens molekula, tehát adott hullámhosszúságú fénnel besugározva (gerjesztés) fluoreszkálásra készíthető (emisszió). Így az elnyelt energiát fény formájában, az elnyeltnél nagyobb hullámhosszúságú (kisebb energiájú) fényként sugározza ki és visszakerül alapállapotba, melyet spektrofluoriméter segítségével lehet detektálni. Az apigenin gerjesztési hullámhossz függvényében egy vagy két fluoreszcencia emissziós sávot mutat. A dupla emisszió, vagyis a két sáv együttes megjelenése azon a tényen alapszik, hogy a gerjesztés hatására bekövetkező  $\pi,\pi^*$  állapotban a molekula intramolekuláris proton transzferen megy keresztül (ESIPT=gerjesztett állapotban végbemenő intramolekuláris proton transzfer), ami a savasabb karakterű C5-OH csoporttól indul a bázikusabb C4=O felé (225). Az ESIPT gyakran előfordul a flavonoidok körében és megváltoztathatja ezen molekulák geometriáját. Így az apigenin esetében is, a nem gerjesztett állapotban lévő  $18,2^\circ$  torziós szöggel rendelkező molekula gerjesztést követően majdnem planárisává válik ( $2,8^\circ$ ) (228). Ezen kívül az apigenin abszorpciós gerjesztési és emissziós spektruma is változik a pH-val. Savas és semleges közegben a jel nagyon gyenge vagy nincs, de bázikus közegben könnyen detektálható (225). A fluoreszcencia emissziós csúcsok intenzitása az oldószer polaritásának növelésével csökken az intermolekuláris H-híd kötések kialakulása következtében (214).

Stabilitását tekintve glikozidok formájában stabilnak mondható még mikrohullámú melegítéssel szemben is (229). A flavonoidok stabilak fénnel szemben, de növekvő hőmérséklet hatására nő a degradáció. A pH is jelentősen befolyásolja a stabilitást, pH 5 és 7 között stabilak a leginkább, de lúgos közegben bomlás tapasztalható. A glikozidok hosszú távú stabilitási vizsgálatait azt mutatták, hogy vizes oldatban a glikozidok átalakulnak aglikonná (230).

### 3.2. Segédanyagok

Az oldékonyság növeléshez használt ciklodextrineket, a CycloLab R&D Ltd. (Magyarország) bocsátotta rendelkezésemre, a HP- $\beta$ -CD-t pedig a Sigma Aldrich Ltd. (Németország) szállította. A kísérletekben felhasznált ciklodextrinek jellemző paramétereit az **V. táblázatban** foglaltam össze.

**V. TÁBLÁZAT A FELHASZNÁLT CIKLODEXTRINEK JELLEMZŐ PARAMÉTEREI (150)**

Paraméterek	Alap ciklodextrinek			Származék ciklodextrinek		
				Ionos	Nem-ionos	
Név	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	SBE- $\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD	RAMEB
Glükózegységek (db)	6	7	8	7	7	7
Moláris tömeg (g/mol)	972	1135	1297	1135,0 + n·(158,2)	1135,0 + n·(58,1)	1135,0 + n·(14,0)
Üreg átmérő (nm)	0,57	0,78	0,95	0,78	0,78	0,78
Üreg magasság (nm)	0,78	0,78	0,78	~0,78	~0,78	~0,78
Perem átmérő (nm)	1,37	1,53	1,69	~1,53	~1,53	~1,53
Oldhatóság (mg/ml) <sup>a</sup>	145	185	232	> 500	> 600	> 500
DS <sup>b</sup>	-	-	-	6,2 – 6,9	0,5-1,3	10,0-14,0

<sup>a</sup> Oldhatóság vízben ~25°C-on

<sup>b</sup> Szubsztituensek száma glükózegységenként

A pelleték és a koloidális hordozórendszer előállításához használt segédanyagokat, származási helyüket és szerepüket a formulálásban a **VI. táblázatban** tüntettem fel.

**VI. TÁBLÁZAT FELHASZNÁLT SEGÉDANYAGOK**

<b>Segédanyag</b>	<b>Márkajelzés</b>	<b>Gyártó</b>	<b>Szerepe a formulálásban</b>
Rétegzett és bevont pelleték előállítása			
MCC inert mag 500-710 µm	Ethispheres® 600	NPPPharm Ltd., Franciaország	Inert pelletmag
HPMC	Pharmacoat® 606	Shin-Etsu Chemical Ltd., Japán	Kötőanyag
Polimer diszperzió 30%	Eudragit® L 30 D-55	Evonik Industries AG, Németország	Vékonybélben oldódó polimer
Polimer diszperzió 30%	Eudragit® FS 30 D	Evonik Industries AG, Németország	Vastagbélben oldódó polimer
TEC	-	Fluka Chemie AG, Svájc	Lágyítószer
Mikronizált talkum	-	Sigma-Aldrich Ltd., Németország	Antiadhéziós anyag
Albumin nanorészecskék előállítása			
Albumin (BSA, ≥98%)	-	Sigma-Aldrich Ltd., Németország	Nanocarrier
Laktóz-monohidrát	Lactohale® LH 230	Friesland Foods Domo, The Netherland	Aerodinamikai tulajdonságok javítása
L-leucin	-	Sigma-Aldrich Ltd., Németország	Aerodinamikai tulajdonságok javítása

### 3.3. Oldószerek, vegyszerek és reagensek

Az analikai vizsgálatokhoz a megfelelő vízminőséget a Milli-Q víztisztító rendszer (Millipore, Németország) biztosította, valamint a következő HPLC tisztaságú vegyszereket a Sigma-Aldrich Ltd. (Németország / Anglia) beszállítótól szereztem be:

- Acetonitril (ACN)
- Amónium-acetát (AmmAc)
- Kloroform (CH<sub>3</sub>Cl)
- Metanol (MeOH)
- Trifluor-ecetsav (TFA)

A puffereket a Ph.Hg.VIII. szerinti előíratok alapján készítettem el (pH 1,0; 6,8; 7,2), melyekhez a következő anyagok kerültek felhasználásra a Molar Chemicals Kft. (Magyarország) beszállítótól:

- Sósav (HCl)
- Nátrium-hidroxid (NaOH)
- Kálium-dihidrogén-foszfát (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Végezetül az antioxidáns hatás vizsgálatához lila színű stabil szabadgyököt használtam (Sigma-Aldrich Ltd., Németország):

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>)



### 3.4. *Petroselinum crispum* kivonat előállítása

A kivonás hatásfokának javítására a szárított petrezselyem leveleket Retch Mixer Mill MM 400 (Retch GmbH, Németország) golyós malomban 10, 15 és 25 1/s frekvencián aprítottam 10 darab 1 cm átmérőjű golyóval 8x30 másodpercig, ellenőrizve, hogy maradt-e aprítatlan levél. A készülék egy aprítási folyamat során összesen 10 g levelet őrlött a megfelelő hatásfokkal. Összesen 35 g szárított levelet használtam fel. Az így kapott részecskeméret jellemző paramétereit ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$  és  $D_{90}$ ) Malvern Mastersizer 2000 lézer-diffraktométerrel analizáltam (Malvern Industries, Németország).

A kivonás módját, a kivonószert és szárazanyag-folyadék arányt irodalmi adatok ismerében választottam ki. A magas apigenin tartalom eléréséhez a kivonást folyamatos kevertetéssel végeztem fűthető mágneses keverőn 500 rpm fordulatszámon (ARE Heating magnetic stirrer, VELP Scientifica, Olaszország). Kivonószerként 50:50% (v/v) etanol:víz elegyet használtam fel és 1 g száraz növényi részhez 40 ml kivonószert adtam. Az időtartam és a hőfok optimalizálásához 25°C, 40°C, 60°C és 80°C fokon végeztem a kivonást 120 percig. Az apigenin tartalom megállapításához 15 percenként 1 ml mintát vettem, amit a továbbiakban savas hidrolízisnek vettem alá (0,5 ml tömény sósavat hozzáadva a kivett mintákhoz, majd 90°C-os vízfürdőbe helyezve és 1 órán keresztül történt a reakció). Ez az összapigenin tartalom meghatározásához, tehát a glikozidos kötések felbontásához volt szükséges. Annak érdekében, hogy esetleges bomlás nem történik-e az apigenin molekulával, ugyanilyen körülményeknek alávettem az apigenin törzsoldatot is. Az analitikai mérések előtt a mintákat 0,22 µm pórusátmérőjű Sartorius szűrőn szűrtem (Sartorius AG, Németország) az esetleges szennyeződések eltávolítása céljából. A hidrolízis hatásfokát HPLC-MS és HPLC-UV mérésekkel ellenőriztem. Az eredmények ábrázolása Origin 2015 szoftverrel történt (OriginLab Corporation, USA).

Még magasabb apigenin tartalom eléréséhez egy alap ( $\gamma$ -CD) és egy származék (HP- $\beta$ -CD) ciklodextrint adtam a kivonószert a becsült összapigenin mennyiségéhez mérten 1:1 molarányban.

### 3.5. Gyógyszertechnológiai módszerek

#### 3.5.1. Oldékonyság növelés ciklodextrinekkel

Az elővizsgálatokat és a fázisoldhatósági vizsgálatokat desztillált vízben (pH 5,7) valamint fiziológias pH értékeken vizsgáltam (pH 1,0 és 6,8). Az elővizsgálatok során 1:1 sztöchiometriát feltételezve  $C_{CD}=9,25$  mM koncentrációjú ciklodextrin oldatokhoz adtam hozzá az apigenint (5 mg).

A további kísérletekhez azokat a ciklodextrineket választottam, melyek az elővizsgálat során legjobban megnövelték az apigenin oldékonyság. A fázisoldhatósági vizsgálatok kivitelezésében Higuchi és Connors által leírt módszert követtem (231). Részletesen, 2 ml különböző pH-jú és  $C_{CD}=1,0-50,0$  mM koncentrációjú ciklodextrin oldatokhoz nagy feleslegben apigenint (5 mg) adtam. A termodinamikai egyensúly, így a zárványkomplex kialakulásához fontos, hogy az apigenin mennyisége feleslegben legyen. Ezt követően a mintákat 30 másodpercig vortexeltem (IKA<sup>®</sup> Vortex 2, IKA-Werke GmbH & Co, Németország) majd 25°C-on, sötét helyen tartottam védve az esetleges bomlástól. Az oldódási egyensúly beállítását ellenőriztem 1 és 3 nap után. A fel nem oldódott apigenint centrifugálással (5 percig, 14,000 rpm fordulatszámon, Herolab MicroCen 16 centrifuga, Németország) és szűréssel (0,22  $\mu$ m, Sartorius AG, Németország) távolítottam el. Az apigenin mennyiségét HPLC-UV módszerrel határoztam meg három párhuzamos mintával.

Az Api-CD komplexek stabilitási állandóinak ( $K_{1:1}$ ) kiszámításához a fázisoldhatósági vizsgálatok eredményei alapján a 3. egyenletet használtam, feltételezve, hogy a komplexképződés 1:1 arányú (231):



$$K_{1:1} = \frac{[\text{ApiCD}]}{[\text{Api}][\text{CD}]} \quad (2)$$

$$K_{1:1} = \frac{\text{slope}}{\text{intercept}(1-\text{slope})} \quad (3)$$

### 3.5.2. Bioaktív hatóanyag rétegzése inert pelletmagra és filmbevonás

A magas apigenin tartalmú kivonatból vákuum bepárlással eltávolítottam az etanolt (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Svájc), majd fagyasztva szárítással a további folyadékot (Finn-Aqua Lyovac GT3, Németország). A kivonat előfagyasztását követően (-20°C), a nedvesség eltávolítása vákuum alatt és a tálcák hőmérsékletének folyamatos monitorozásával 12 órán keresztül történt. A porózus terméket az előre elkészített HPMC (Pharmacoat® 606; 2,0%, m/m) kötőanyag oldatában feloldottam, majd inert MCC pelletmagra rétegeztem fluidizációs porlasztásos módszerrel (Aeromatic Strea I, Aeromatic-Fielder AG, Svájc). Ugyanezzel az eljárással rétegeztem tiszta apigenint neutrális magokra. A fluidizációs eljárás paramétereit **VII. táblázatban** tüntettem fel. A növényi kivonattal történő rétegzés során a kívánt apigenin tartalom körülbelül 5 mg apigenin/1 g pellet, a csak apigenint tartalmazó termékénél 20 mg/1 g pellet volt.

Az így kapott magas bioaktív hatóanyag tartalmú pelleteket a továbbiakban két részre osztottam. Az egyik részt Eudragit® L 30 D-55, a másik részt Eudragit® FS 30 D filmbevonatokkal láttam el a fent említett készülékkel, szintén fluidizációs alsó porlasztásos módszerrel. A művelet paramétereit **VII. táblázatban** láthatók. A bevonó diszperziókban a filmképző polimer koncentrációja mindkét esetben 25,8% (m/m), a lágyítószer az Eudragit® L 30 D-55 esetében 10% (m/m), az Eudragit® FS 30 D esetében 5% (m/m) volt. A lágyítószer csökkenti a minimális filmképződési hőmérsékletet (MFT) (232), mely az utóbbi esetében a ~14°C, ezért itt kevesebb lágyítószert alkalmaztam. Az antiadhéziós segédanyagként használt mikronizált talkum (< 10 µm) mindkét esetben 50% (m/m) volt a száraz polimer tartalomra vonatkoztatva. A filmképző polimereket 5% (m/m); 10% (m/m) és 15% (m/m) mennyiségben porlasztottam a magokra, hogy meghatározzam a minimálisan szükséges mennyiséget a megfelelő hatóanyag leadáshoz. Az filmvastagság eléréséhez szükséges polimer mennyiségét a tömegnövekedés monitorozásával számítottam ki.

## VII. TÁBLÁZAT FLUIDIZÁCIÓS ELJÁRÁS PARAMÉTEREI

Paraméterek	Hatóanyagrétegzés		Filmbevonás	
		Eudragit® L 30	Eudragit® FS 30	
Töltet tömeg (g)	300	150	150	
Fúvóka átmérője (mm)	1,2	1,2	1,2	
Belépő levegő hőmérséklete (°C)	45-47	39-41	28-31	
Kilépő levegő hőmérséklete (°C)	35-39	34-36	25-26	
Porlasztó levegő nyomása (bar)	0,8	0,8	0,8	
Fluid levegő áramlási sebessége (m <sup>3</sup> /h)	80-120	80-100	80-100	
Adagolási sebesség (g/perc)	5-7	5-10	2-4	
Szárítás hőmérséklete (°C)	45	45	30	
Szárítás ideje (perc)	15	15	15	

## 3.5.3. Albumin nanopartikulumok előállítás és porlasztva szárítása

Az albumin (BSA) nanopartikulumokat NAB technológiát (194) módosítva állítottam elő. Külön oldottam fel 1000 mg albumint 50 ml desztillált vízben és 100 mg apigenin 3 ml kloroformban ultrahangfürdő (5 perc) segítségével. Ezt követően a módosított NAB technológia során jeges hűtés mellett 4x5 percig ultrahangoztam a mintákat 2 perces intervallumokat tartva, hogy a leülepedő nagyobb részecskék is homogenizálásra kerüljenek (MSE Soniprep 150 Ultrasonic Processor, MSE Limited, Anglia). A kloroformot rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el 25°C-on (Rotavapor® R-10, BÜCHI Labortechnik AG, Svájc). A nanopartikulumokat szűrést követően (0,45 µm, Ficher Scientific Ltd, Anglia) vizsgáltam.

Optimalizálva a porlasztva szárítás folyamatát, az előzőleg előállított apigenin tartalmú BSA nanopartikulumokat laktóz-monohidráttal (1,1 g) és L-leucin aminosavval (0,99 g), valamint segédanyagok nélkül porlasztva szárítottam Büchi 290 Mini Spray Dryer (BÜCHI Labortechnik AG, Svájc) porlasztva szárító berendezéssel.

Az optimalizált műveleti paramétereket a **VIII. táblázatban** foglaltam össze. A porlasztva szárítást követően a kész terméket a készülékből jól zárható mintatartóba tettem és vákuum alatt tároltam a további felhasználásig.

**VIII. TÁBLÁZAT PORLASZTVA SZÁRÍTÁS PARAMÉTEREI**

<b>Paraméterek</b>	<b>Beállítások</b>
Fúvóka átmérője (mm)	0,1
Belépő levegő hőmérséklete (°C)	120
Kilépő levegő hőmérséklete (°C)	65-70
Szárító levegő áramlási sebessége (l/h)	600
Porlasztó levegő áramlási sebessége (m <sup>3</sup> /h)	35
Adagolási sebesség (ml/perc)	5

### 3.6. Vizsgáló módszerek

#### 3.6.1. Analitikai módszerek

##### 3.6.1.1. Nagy nyomású folyadékkromatográfia (HPLC)

Az apigenin tartalom meghatározására a **IX. táblázatban** összefoglalt analitikai módszereket fejlesztettem. Az apigeninből és glikozidjaiból (apiin, apigetrin) metanolos törzsoldatot (0,1 mg/ml) készítve kalibrációs egyeneseket vettem fel ( $R^2=0,999$ ). A kivonat, pelleték és ciklodextrinek apigenin tartalmának meghatározásához az I. módszert, nanopartikulumok esetében a II. módszert használtam. Az adatok kiértékelése HP Agilent ChemStation számítógépes szoftverrel történt (Agilent Technologies Inc., USA).

**IX. TÁBLÁZAT ANALITIKAI MÓDSZEREK**

<b>Analitikai módszer</b>	<b>I.</b>	<b>II.</b>
Készülék	Agilent 1100	Agilent 1260
Állófázis típusa	Supelco® C18 15cm x 4,6 mm, 3 µm	Phenomenex® C18 250 x 4,6 mm, 4 µm
Állófázis hőmérséklete (°C)	25	25
Mozgófázis összetétele	40:60% (v/v) ACN:0,1 M AmmAc	40:60% (v/v) ACN:0,1% TFA
Mozgófázis sebessége (ml/perc)	0,8	1,2
Injektálás térfogata (µl)	20	10
Detektálás hullámhossza (nm)	340	340
Detektálás ideje (perc)	7	10
Apigenin $t_R$ (perc)	6,4	8,3
Apiin $t_R$ (perc)	2,3	-
Apigetrin $t_R$ (perc)	2,6	-

### 3.6.1.2. Tömegspektrometria (MS)

A kivonat összapigenin tartalom meghatározásához a korábban említett hidrolízist alkalmaztam, amelynek hatásfokát tömegspektrométerrel ellenőriztem 1290 Agilent HPLC/6460 TripleQuad MS készüléken (Agilent Technologies Inc., USA). A tömegspektrometria alkalmas szerves és szervetlen anyagok minőségi és mennyiségi elemzésére is és egyike a legspecifikusabb és legjobb kimutatási határral bíró analitikai eljárásoknak. A mérések scan és product ion módban történtek, mely során teljes ionáram kromatogramot (TIC) vettem fel. Ez lehetővé teszi, hogy minden molekulát szelektíven érzékeljen a készülék, de egy általános ionizációs detektor által mért kromatogrammal egyenértékű. A minták mérése negatív üzemmódban elektroporlasztásos ionizációval ESI (-) történt, melynek hőmérséklete 300°C volt. A porlasztó- és szárítógáz áramlási sebesség 13 l/perc, míg a fragmentor feszültség 135 V volt. A detektor 60 és 800  $m/z$  értékek között detektált. Az azonosításokhoz standard törzsoldatokat használtam fel.

### 3.6.2. UV-látható és fluoreszcencia spektroszkópia

Az Api-CD zárványkomplexek abszorbancia spektrumát 250-400 nm tartományban vettem fel spektrofotométerrel (Metertech SP-8001, Metertech Inc., Tajvan). A minták pH értéke 6,8 volt és ugyanolyan koncentrációban tartalmzták a ciklodextrineket ( $C_{CD}=50,0$  mM). A mérés szobahőmérsékleten történt 20x hígítást követően.

Ugyanezen minták fluoreszcencia emissziós spektrumát 360-600 nm között mértem Fluoromax-3 spektrofluoriméterrel 345 nm gerjesztési hullámhosszon (Jobin Yvon-Horiba, Franciaország). Az adatgyűjtés 0,5 nm-erenként történt 0,2 másodperc integrálációs idővel. Az emissziós és gerjesztő rés nagysága 2 és 5 nm volt. A készülék automatikusan minden mintáról három spektrumot vett fel, melynek átlagát adta meg végeredményül. A spektrumok alapvonal korrekciója, 5 pontos lineáris simítása és a Raman-sávok kivonása a spektrumokból (390 nm környékén) SPSERV V3.14 szoftverrel történt (©Bagyinka Csaba MTA SzBK Biofizikai Intézet, Magyarország).

A fent említett készülékkel vizsgáltam a BSA oldat, az üres és az apigenin tartalmú nanopartikulumok fluoreszcencia spektrumát is. A beállítási paraméterek megegyeztek a fentiekben leírtakkal, kivéve a gerjesztési hullámhosszt (285 nm) és az emissziós spektrum mérési tartományát (300-450 nm). Minden mérés

szobahőmérsékleten zajlott. A háromdimenziós ábrázolás SURFER Version 10 szoftverrel történt (Golden Software, Inc., Colorado, USA). A 2D és 3D ábrázoláshoz végzett mérésekhez a gerjesztési hullámhosszakat 250 és 310 nm között 10 nm-enként változtattam, emissziót 265 és 450 nm között detektáltam, ügyelve arra, hogy az emissziós tartomány kezdő hullámhossza minden esetben 15 nm-rel hosszabb legyen, mint a gerjesztési hullámhossz.

### 3.6.3. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

A bioaktív hatóanyaggal rétegzett és intesztinoszolvens polimerekkel bevont pelleték FTIR analízisét Bruker Optics ALPHA FTIR spektrométerrel végeztem (Bruker Corporation, USA) 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  frekvencia tartományban, 4  $\text{cm}^{-1}$  felbontással. Az adatok kiértékelése Opus 7.5 szoftver segítségével történt (Bruker Corporation, USA).

A porlasztva szárított Api-BSA nanopartikulumokat PerkinElmer Spectrum 100 FTIR spektrométerrel vizsgáltam (PerkinElmer, USA) 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  frekvencia tartományban, 4  $\text{cm}^{-1}$  felbontással. Az adatok kiértékelése a készülékhez tartozó szoftverrel történt (PerkinElmer Spectrum Express, USA).

### 3.6.4. Nedvességtartalom meghatározása

A pelleték nedvességtartalmának ellenőrzésére infravörös sugárással fűthető szárító berendezést alkalmaztam, amely a tömegvesztés folyamatosan detektálásával állapítja meg a nedvességtartalmat és a szárítás végpontját 0,50%-os pontossággal (Precisa XM 60 HR, Precisa Gravimetrics AG, Svájc). A mérést 0,200 g mintán végeztem 70°C-on.

A porlasztva szárított mintákat ennél kisebb nedvességtartalom meghatározására alkalmazható automata Karl Fischer titrátort alkalmaztam (Metrohm 758 KFD Titirino, Metrohm AG, Svájc). A készülék kalibrációjához 10x10  $\mu\text{l}$  desztillált vizet használtam. A mérés Karl Fischer mérőoldattal történt, mely jódot is tartalmaz és a jód színének megjelenése jelzi a végpontot (biamperometriás végpontjezéssel működik a készülék). Analitikai mérlegben bemért 0,100 g minta mennyiséget vízmentes metanolban vizsgáltam. Minden esetben három mintát mértem, melyek átlagaként tüntettem fel az eredményt.



### 3.6.5. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM)

Az apigenin tartalmú rétegzett és bevont pelletek, valamint a porlasztva szárított nanopartikulumok morfológiájáról pásztázó elektronmikroszkópos készülékkel készültek a felvételek (FEI Inspect™ S50, USA). A mintákat kétoldali ragasztóval rögzítve, vékony arany réteggel történő bevonás után vizsgáltam 300-8000x nagyítást ( $\pm 2\%$  pontosság) és 20,00 kV gyorsító feszültséget alkalmazva.

### 3.6.6. Pelleték fizikai ellenőrző vizsgálatai

#### 3.6.6.1. Méret és szemcsealak vizsgálata képanalízissel

A rétegzett és bevont pelleték méretét és alakját vizsgálata Camsizer® képanalízálóval történt (Retch Camsizer® Dynamic Image Analyzer V.4.2.1., Németország). Megközelítőleg 4 g pellet került a készülék minta adagolójába, azt követően pedig a műszer kamerák segítségével rögzítette a szabadon eső részecskék alak paramétereit. A mérési tartomány  $30 \mu\text{m}$  -  $30 \text{ mm}$  között volt.

#### 3.6.6.2. Törési szilárdság, tömörödési tulajdonságok és gördülékenység mérése

Az inert, rétegzett és bevont magokból 20 db random kiválasztott pellet törési szilárdságát vizsgáltam 4500 g mérőcellával felszerelt TexturePro CT3 készülékkel (Brookfield Engineering Labs, Inc., USA). A mérés 4 mm átmérőjű lapos felszínű és henger alakú mérőfejjel történt, mely  $0,05 \text{ mm/s}$  sebességgel haladva törte szét a manuálisan aláhelyezett mintákat. Az erő-megtett út függvényeket, a töréshez szükséges erőt (F) és a pelleték átmérőjét (d) detektálta a készülék. A törési szilárdságot ( $\sigma$ ) a 4. egyenlettel segítségével számítottam ki (233):

$$\sigma = \frac{1,6 * F}{\pi * d^2} \quad (4)$$

A töltött és tömörített halmazsűrűség értékeket STAV 2003 Stampfvolumeter (J. Engelsmann AG., Németország) készülékkel határoztam meg. Pontosan mért 50,0 g pelletet töltöttem a készülék kalibrált mérőhengerébe (250 ml) és leolvastam a töltött halmaztérfogatot. Ezt követően a tömörített halmazsűrűség meghatározásához térfogatállandóságig tömörítettem a pelleteket (1250 leütés), három párhuzamos mérést végezve. A halmazsűrűség adatokat a térfogat értékek (töltött és tömörített) és a pontos tömeg ismeretében számítottam ki.

A gördülékenységre jellemző Hausner faktort (HR) és Carr-féle indexet (CI, %) 5. és 6. egyenlettel alapján határoztam meg:

$$HR = \frac{\rho_{\text{tömörített}}}{\rho_{\text{töltött}}} \quad (5)$$

$$C.I. [\%] = \frac{\rho_{\text{tömörített}} - \rho_{\text{töltött}}}{\rho_{\text{töltött}}} \times 100 \quad (6)$$

További méréseket végezve, a gördülékenységre jellemző kifolyási időt (s) és a kifolyt halmaz lejtőszögét ( $\alpha$ ) PTG készülékkel (PharmaTest Ptg, Németország) mértem, melynek nyílása 8 mm átmérőjű volt.

### 3.6.6.3. Közeli infravörös spektroszkópai mérések (NIR)

A minták közeli infravörös spektrumának felvételére Hitachi U-3501 UV/VIS/NIR spektrofotométert (Hitachi, Japán) használtam. A készülék PbS detektorral és integráló gömbbel (d=60 mm) rendelkezik. A mérés során a reflektált fény mennyiségét 500-1500 nm hullámhossz tartományban, 2 nm lépésközzel és 500 nm/perc sebességgel detektálta a készülék. A kiértékelést UV Solutions programmal (Hitachi, Japán) végeztem. A spektrumok feldolgozása során a zaj csökkentésére N-pont simítást, Savitzky-Golay algoritmust alkalmaztam, majd a spektrum második deriváltját is számoltattam a programmal az alapvonalbeli eltérések miatt.

### 3.6.6.4. Hatóanyagtartalom mérése és kioldódás vizsgálatok

A hatóanyagtartalom meghatározáshoz analitikai pontossággal mért 1,000 g pelletet vizsgáltam. A bioaktív hatóanyagréteg metanolban történő oldása után a fent leírt HPLC-UV módszerrel határoztam meg az apigenin tartalmát. A növényi kivonatot tartalmazó minták hidrolízisnek vettem alá az összapigenin tartalom meghatározásához.

Az apigenin felszabadulását a rétegzett pelletékből pH 1,0; pH 6,8 és pH 7,2 pufferekben vizsgáltam. Mivel a vízdékony kötőanyag azonnali hatóanyagleadást biztosít, 30 másodpercenként vettem mintát a közegből 5 percen keresztül.

Az intesztinoszolvens bevonattal ellátott pelleték kioldódás vizsgálatát forgókosaras módszerrel végeztem Hanson SR8-Plus™ (Hanson Research, USA) kioldódás vizsgáló készülékben, 100 rpm forgási sebességgel,  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on 900 ml kioldóközegben. A mérés különböző pH értékeken (pH 1,0; pH 6,8 és pH 7,2) és állandó

térfogatban történt és meghatározott időpontokban 1 ml mintát vettem. Szimulálva a gasztrointesztinális rendszer körülményeit, az Eudragit® L bevont pelletek esetében a 2 órán keresztül pH 1,0 értéken, majd 1 órán keresztül pH 6,8 értéken történt a kioldódás. Az Eudragit® FS polimerrel rendelkező magok esetében a savas körülmények után 3 óráig pH 6,8, majd 1 óráig pH 7,2 értéken vizsgáltam a kioldódást. Az apigenin tartalom meghatározását HPLC-UV készüléssel történt, a már említett módszer szerint. A mintelőkészítés során növényi kivonatot tartalmazó mintákat hidrolízisnek vettem alá. A csak apigeninnel rétegzett mintákat pedig metanollal kétszeresére hígítottam, elősegítve ezzel az oldódást.

### 3.6.7. Albumin nanopartikulumok vizsgálatai

#### 3.6.7.1. Részecskeméret és zeta potenciál meghatározása

A részecskék méretét, polidiszperzitás indexét (PDI) és zeta potenciálját Zetasizer Nano ZS készülékkel határoztam meg (Malvern Instruments Ltd., Anglia). A készülék a dinamikus fényszóródás mérés elvén alapul. Minden mérést három párhuzamos mintával végeztem 25°C-on. Az eredményeket három mérés átlagaként adtam meg.

#### 3.6.7.2. Hatóanyagtartalom és bezárási hatásfok meghatározása

A részecskék apigenin tartalmának meghatározására DMSO:MeOH 50:50% (v/v) elegyét alkalmaztam. A pontos koncentrációt szűrést követően (0,22 µm, Sartorius AG, Németország) határoztam meg a fent említett HPLC-UV módszerrel. A hatóanyagtartalmat (DL) és a bezárási hatásfokot (EE) a 7. és 8. egyenletekkel számoltam ki, ahol a bezárt apigenin mennyiségét ( $W_{\text{encapsulated}}$ ) osztottam el az összes bemért anyagmennyiséggel ( $W_{\text{total}}$ ), valamint a összes bemért apigenin mennyiséggel ( $W_{\text{theoretical}}$ ):

$$DL = \frac{W_{\text{encapsulated}}}{W_{\text{total}}} \times 100 \quad (7)$$

$$EE = \frac{W_{\text{encapsulated}}}{W_{\text{theoretical}}} \times 100 \quad (8)$$

### 3.6.7.3. Röntgen por-diffrakció (XRPD)

A porlasztva szárított albumin nanopartikulumok diffraktogramjait MiniFlex600 (Rigaku Corporation, Japan) típusú röntgen-pordiffraktométerrel határoztam meg. A mintákat 25°C-on analizáltam a következő beállításokkal: detektálási tartomány  $2\theta=2^\circ - 40^\circ$ , detektálás sebessége  $2^\circ/\text{perc}$  és  $0,05^\circ$  lépésköz.

### 3.6.7.4. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

A porlasztva szárítással készült albumin mintákat DSC készülékkel is vizsgáltam (DSC Q2000 module; TA Instruments, Anglia). Az indiummal történő kalibrálást követően 3-5 mg minta mennyiségeket mértem be analitikai mérlegen hermetikusan zárható alumínium mintatartókba (TA Instruments, Anglia). 25°C-ra történő temperálást követően  $10^\circ\text{C}/\text{perc}$  sebességgel fűtötte a mintákat 400°C-ig. A kiértékelés TA Instruments Data Analysis szoftverrel történt.

### 3.6.7.5. Lézer diffrakciós szemcseméret eloszlás vizsgálata

A részecskeméret analíziséhez Sympatec HELOS lézer diffraktométert használtam (Sympatec GmbH System-Partikel-Technik, Németország). A kalibrációt követően, a pormintákat 4-5 bar nyomású sűrített levegővel porlasztotta a készülék a lézer detektorhoz (agglomeráció megszüntetése céljából). Az optikai lencsék a detektorra fókuszálva gyűjtötték be a szórt fényt a  $0,45\text{--}87,5\ \mu\text{m}$  közötti mérési tartományban. A részecskeméret eloszlás jellemző paramétereit ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ) valamint a térfogat mediánnak megfelelő aerodinamikai átmérőt (VMD) is megadta a készülék. Az eredményeket három párhuzamos minták mérését követően, átlagolva adtam meg.

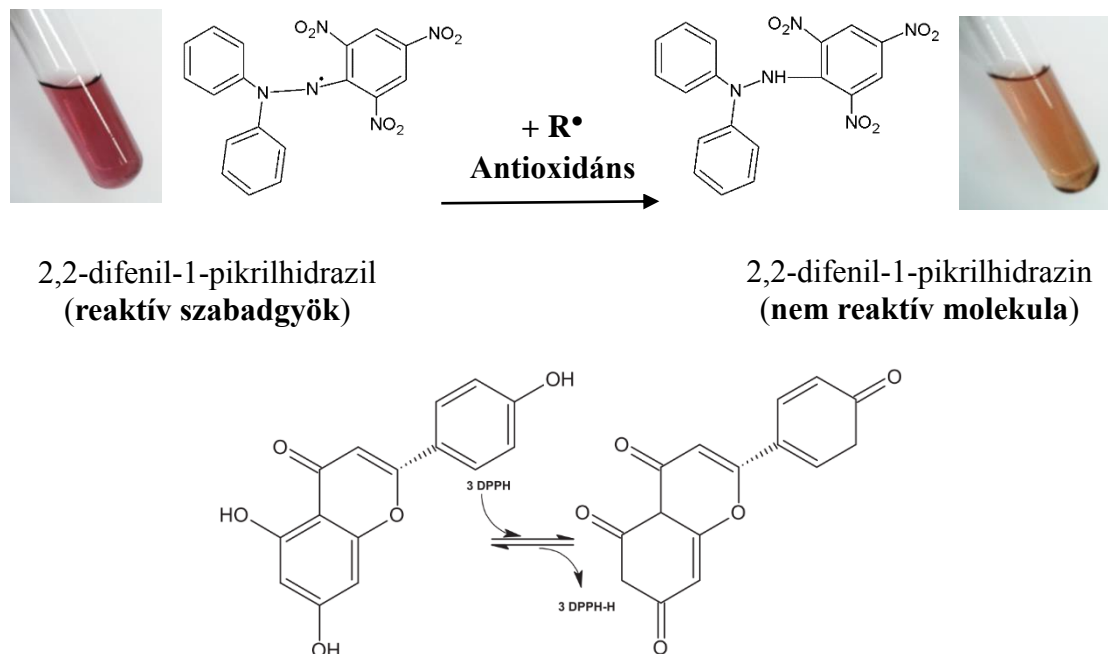
### 3.6.7.6. In vitro aerodinamikai tulajdonságok vizsgálata

Az inhalációra szánt nanopartikulumok aerodinamikai tulajdonságainak meghatározásához a Gyógyszerkönyvben is hivatalos kaszkád impaktort alkalmaztam (Next Generation Impactor, NGI, Copley Scientific, Anglia). A berendezés tartalmazott egy mesterséges szájrészt, előszeparátort és szűrőt. A tüdő egyes részeit szimuláló felfogó tányérokat a mérés megkezdése előtt 1%-os szilikon olaj oldattal vontam be a részecskék megfelelő tapadásának érdekében.  $3 \times 10$  mg mennyiségű port kemény zselatin kapszulákba töltöttem, melyeket a mérés kezdetén az inhalációs készülék kilyukasztott.

Ezt követően 60 l/perc áramlási sebességgel történt a minta beszívása az impaktorba vákuum pumpa segítségével. Az egyes részeket és a tányérokat DMSO:MeOH (50:50%, v/v) elegyével kvantitatívan mérőlombikokba (10 vagy 25 ml) mostam, majd szűrés után meghatároztam az apigenin tartalmat a fent említett HPLC-UV módszerrel. A mérésre és az aerodinamikai tulajdonságokra jellemző paramétereket a kapott eredményekből számítottam. Minden vizsgálatot háromszor végeztem el.

### 3.7. Antioxidáns hatás vizsgálata

Az antioxidáns hatás vizsgálatokhoz kereskedelmi forgalomban kapható, lila színű stabil szabadgyököt használtam. Ez egy gyors és könnyen összehasonlítható vizsgálat, de a hátrányai közé tartozik, hogy érzékeny pH-ra és interakcióba léphet polimerekkel (234). A szabadgyök és az antioxidáns közötti reakciót színváltozás mutatja, mely spektrálisan mérhető 517 nm-en. A reakció általános mechanizmusát a **15. ábra** szemlélteti. A szabadgyök gátlása az antioxidáns molekula elérhető H donor képességére, vagyis a hidroxil csoportok számára, kötések erősségére és sztérikus okokra vezethető vissza. Általános esetben egy apigenin molekula 3 DPPH• szabadgyököt képes „semlegesíteni” (**15. ábra**).



**15. ÁBRA** REAKCIÓ ÁLTALÁNOS MECHANIZMUSA (FENT) ÉS A SZABADGYÖK REAKCIÓJA AZ APIGENIN MOLEKULÁVAL (LENT)

A méréshez Hatano és társai (235) által leírt módszer alkalmaztam, kisebb változtatásokkal. Minden esetben frissen készítettem 0,1 mM metanos DPPH• törzsoldatot, mert fényérzékeny és bomlásra hajlamos. Hígítási sort készítve (0,01-0,1 mM) a törzsoldatból kalibrációs egyenest vettem fel, ábrázolva a koncentráció és az abszorbancia értékeket ( $R^2 > 0,999$ ). A továbbiakban ennek segítségével határoztam meg a mintákban el nem reagált DPPH• pontos koncentrációját. Az antioxidáns hatást, a gátolt szabadgyök %-os mennyiségével fejeztem ki (I, %) a 9. egyenletet alkalmazva, ahol az  $A_0$  a kezdeti DPPH• törzsoldat abszorbanciáját és az  $A_s$  a minta abszorbanciáját jelöli.

$$I (\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (9)$$

Standardként 0,1 mg/ml apigenin törzsoldatot használtam fel. A reakció pontos időtartamának meghatározására 15 percnként mértem az standard abszorbancia értékét, amíg az nem változott tovább. Így megállapítottam, hogy 60 perc szükséges a végpont eléréséhez. A segédanyagok esetleges befolyásoló hatása miatt, minden anyagra külön is elvégeztem a vizsgálatot, három párhuzamos mintával.

A növényi kivonatot vizsgálva, 0,1 ml kivonathoz és standard oldatokhoz 0,9 ml metanolt, majd 2 ml 0,06 mM DPPH• reagenst adva vizsgáltam az előállítás során alkalmazott paraméterek befolyásoló hatását a kivonat antioxidáns hatására.

A multipartikulumok esetében 1 g rétegzett pellet apigenin tartalmát 100 ml metanolban oldottam, hogy a teljes apigenin mennyiség feloldódjon. Ezt követően 1 ml mintát adva DPPH• reagenshez (2 ml, 0,06 mM) végeztem a mérést. A minták összehasonlítására 1 ml apigenin törzsoldatot és 1 ml *P. crispum* kivonatot használtam.

A ciklodextrin zárványkomplexek vizsgálata során, 1 ml mintát adtam 2 ml 0,06 mM DPPH• reagens oldatához. 10 másodperces vortex (IKA® Vortex 2, IKA-Werke GmbH & Co, Németország) kevertetés után mértem a mintákat a leírtak szerint. A összehasonlíthatóság érdekében mindegyik minta 50 mM ciklodextrint tartalmazott (desztillált vízben), a standard 0,1 ml apigenin törzsoldat volt.

Az „üres” és apigenin tartalmú nanopartikulumokat összehasonlítottam a porlasztva szárított minták antioxidáns hatásával. A bemérésnél ügyeltem, hogy apigenin mennyisége minden mintánál 0,1 mg/ml legyen az összehasonlíthatóság érdekében. Ezt követően szintén 2 ml 0,06 mM DPPH• reagenssel végeztem a vizsgálatokat.

## 4. EREDMÉNYEK

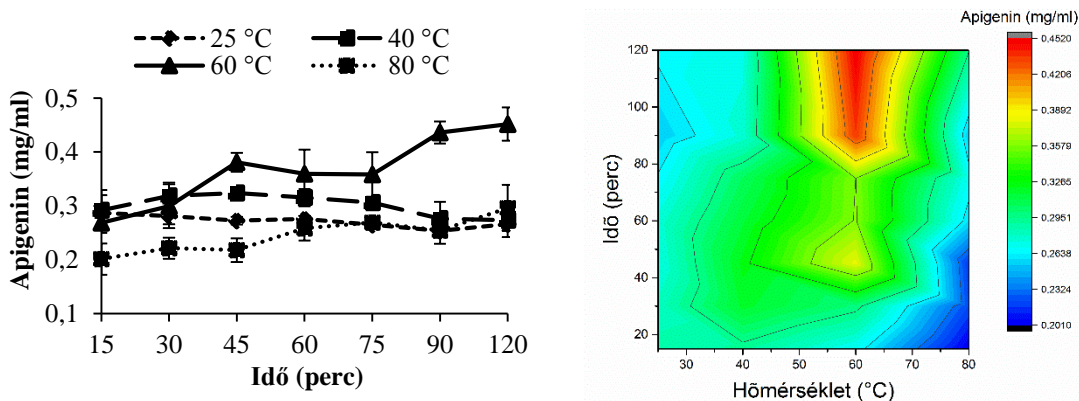
### 4.1. *Petroselinum crispum* kivonat előállítása és antioxidáns hatásának vizsgálata

A *kivonási hatásfokot* növelni lehet a növényi rész aprításával, ezért őrlést alkalmaztam a száraz *P. crispum* levelek méretcsökkentésére. A golyósmalomban őrlött levelek részecskeméretét a **X. táblázat** szemlélteti. Látható, hogy a legkisebb méretet a 25 1/s frekvencián történő őrlés eredményezi, ezért a kivonás optimalizálásához a továbbiakban ezt használtam.

**X. TÁBLÁZAT** AZ ŐRÖLÉS HATÁSA A LEVÉL DROG MÉRETÉRE

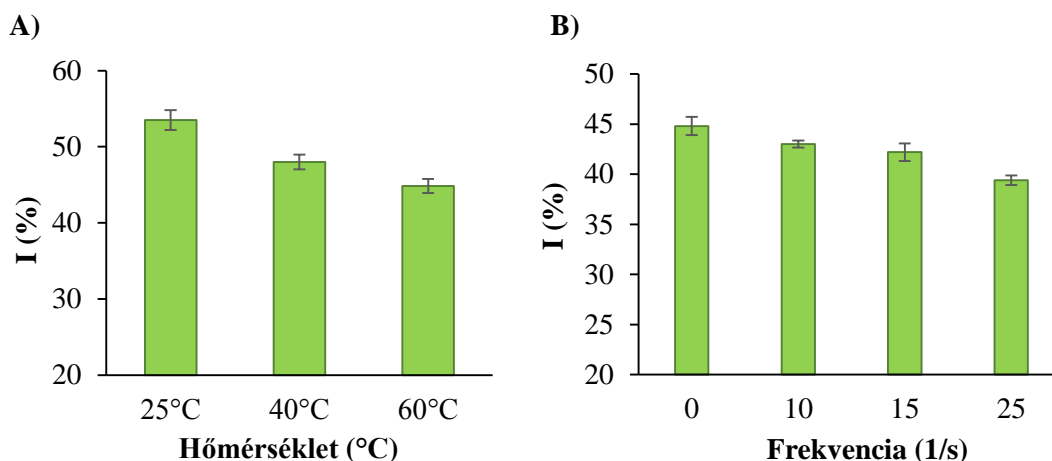
Frekvencia (1/s)	D <sub>10</sub> (mm)	D <sub>50</sub> (mm)	D <sub>90</sub> (mm)
10	0,192 ± 0,011	0,451 ± 0,015	3,227 ± 0,026
15	0,154 ± 0,020	0,295 ± 0,012	1,634 ± 0,021
25	0,141 ± 0,013	0,238 ± 0,018	0,509 ± 0,014

A növényi kivonatokban a hatóanyagok aránya és mennyisége jelentősen függ a növény genotípusától, a termesztés körülményeitől és a kivonási technikától is, továbbá a extrakció hőfokának és az oldószer polaritásának nagy jelentősége van a flavonoid glikozidok arányában és mennyiségében (236). Luthria és munkatársai vizsgálták a kivonás módjának és az oldószer polaritásának hatását a *P. crispum* levél flavonoid tartalmára és az apigenin glikozidok összetételére. A konvencionális kivonási módszerek közül a kevertetés bizonyult a leghatékonyabbnak, a flavonoid tartalmat illetően pedig kivonószerként az 50:50% (v/v) etanol:víz elegy (237). Ezért ezt a módszert választottam és optimalizáltam a kivonás hőfokát és időtartamát az összapigenin tartalmat mérve. A **16. ábrán** látható, hogy jó hatásfokot 60°C-on már 90 perc alatt lehetett elérni.



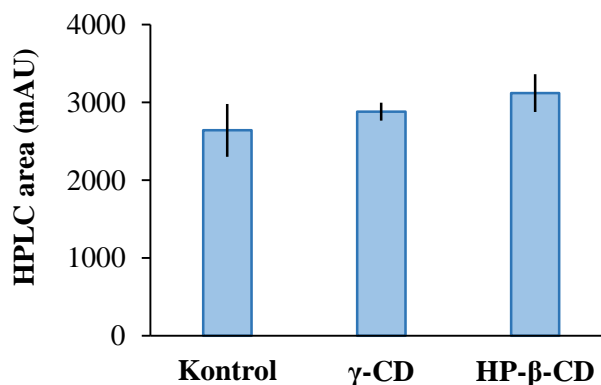
**16. ÁBRA** APIGENIN KIVONÁSÁNAK OPTIMALIZÁLÁSA *P. CRISPUM* LEVÉLBŐL

Továbbiakban vizsgáltam a kivonás hőfokát (nem őrölt levél) és az őrlés hatását (60°C-on) a növényi kivonat antioxidáns tulajdonságára, melyet a **17. ábra** szemléltet. Megállapítható, hogy habár az antioxidáns kissé csökkent, egyik paraméter sem befolyásolta jelentős mértékben a kivonat szabadgyökfogó kapacitását.



**17. ÁBRA** HŐMÉRSÉKLET (A) ÉS ŐRLÉS (B) HATÁSA AZ *P. CRISPUM* ANTIOXIDÁNS HATÁSÁRA

Ezt követően kísérletet tettem az extrakció hatásfokának javítására egy alap és egy származék ciklodextrin hozzáadásával. Választásom azért esett erre a két CD-re, mert a  $\gamma$ -CD nagyobb belső üreggel, míg a HP- $\beta$ -CD jobb H-híd kötési képességekkel rendelkezik. A **18. ábrán** látható, hogy egyik CD hozzáadásával sem nőtt szignifikánsan az apigenin mennyisége a kivonatban. Mivel kevés a szabad aglikon, valószínűsíthető, hogy az apigenin glikozidok nagy és poláris cukorrésze gátolja a zárványkomplex kialakulását (238). Tehát ezek az eredmények nem indokolják a CD-ek segédanyagként történő alkalmazását a kivonás során.

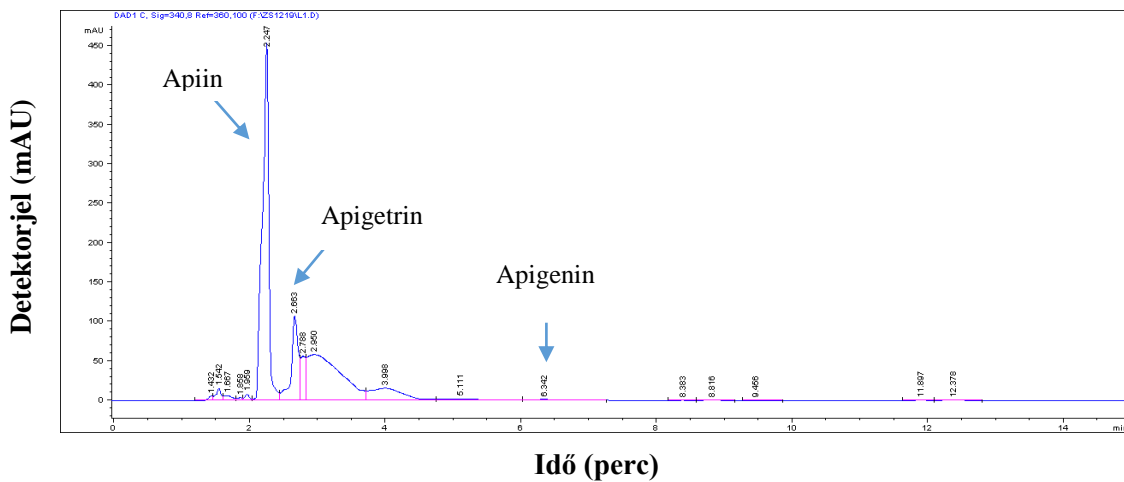


**18. ÁBRA** CIKLODEXTRINEK ALKALMAZÁSA KIVONÁS SORÁN

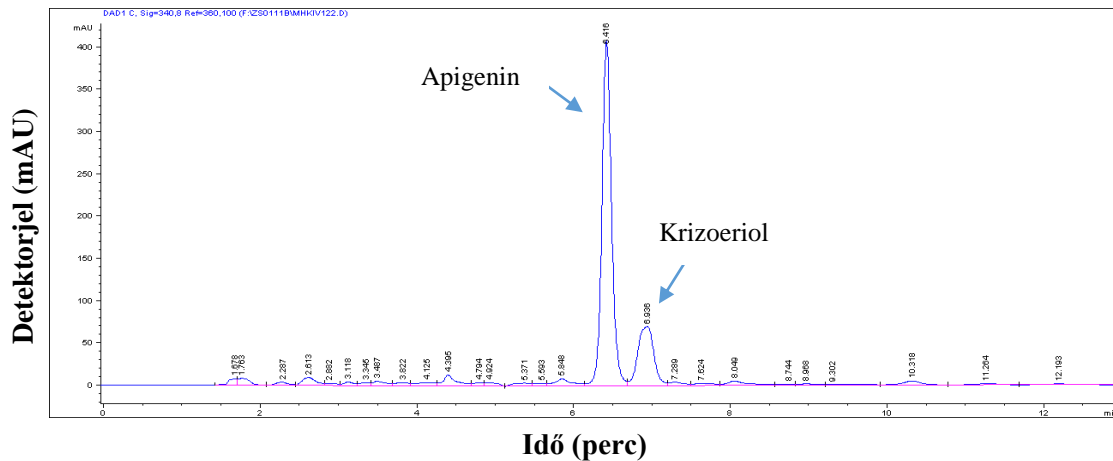


#### 4.2. A hatóanyagtartalom kimutatása

Az előállított *P. crispum* kivonatban található összapigenin tartalom mérésére a már leírt, kísérletesen optimalizált I. számú *HPLC-UV* analitikai módszert használtam. A mennyiségi meghatározáshoz külső standard módszert alkalmaztam. A kalibráló egyenes jó linearitást mutatott ( $R^2=0,999$ ) a vizsgált 0,01-0,1 mg/ml koncentráció tartományban. Az glikozidos kötések felbontásához savas hidrolízisnek vettem alá a mintákat, melynek hatékonyságát *HPLC-MS* módszerrel is ellenőriztem. A növényi kivonatok nem hidrolizált és hidrolizált **kromatogramjait a 19. A és B ábra** szemlélteti.



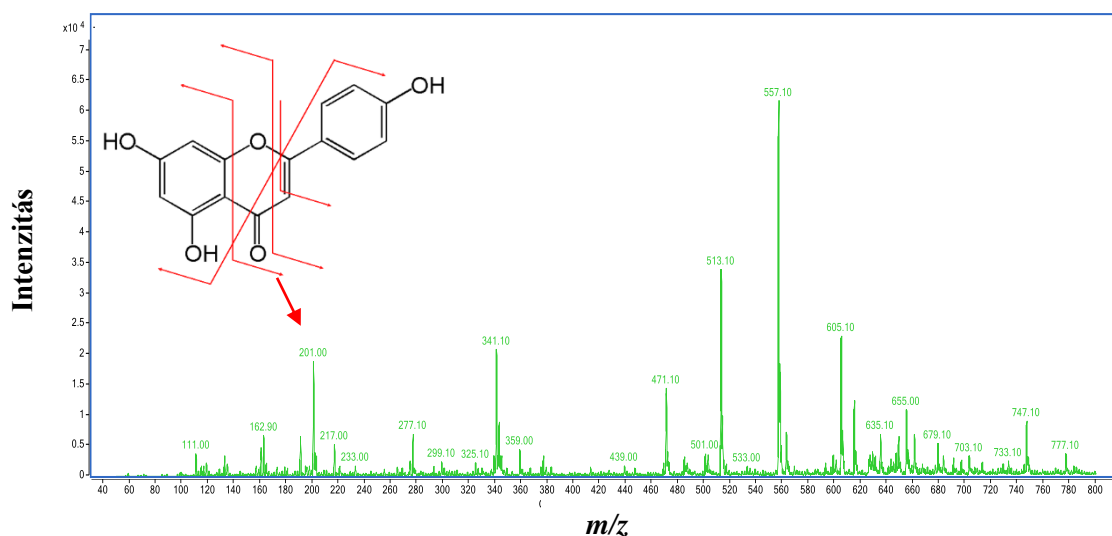
19. A) ÁBRA FŐKÉNT APIGENIN GLIKOZIDOKAT TARTALMAZÓ NÖVÉNYI KIVONAT



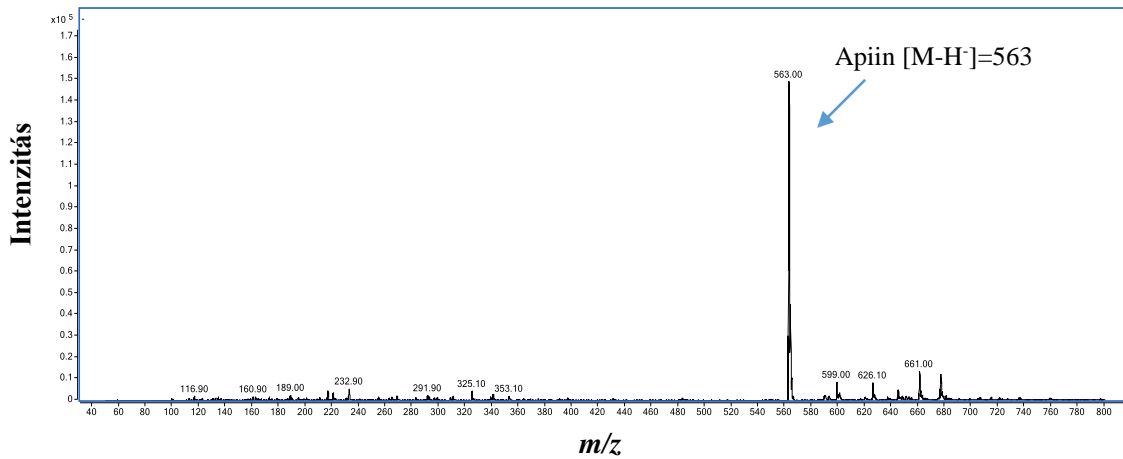
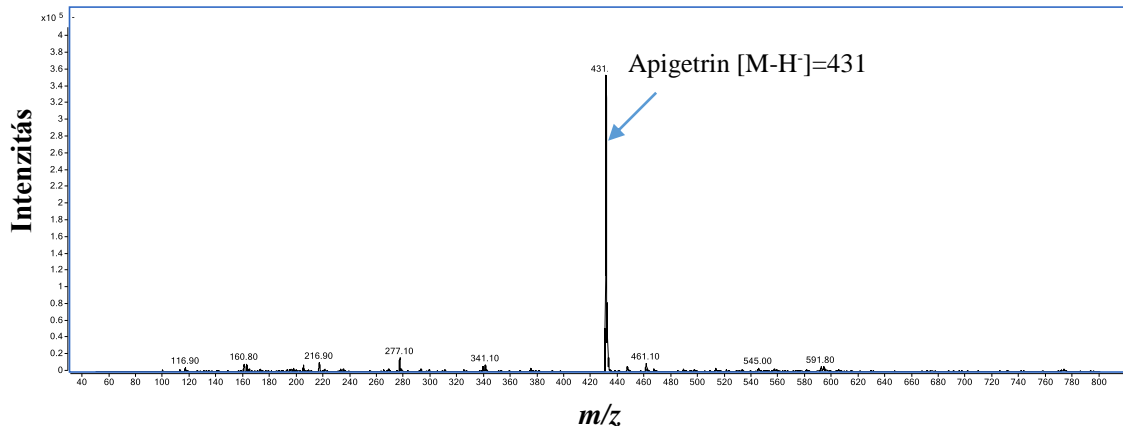
19. B) ÁBRA HIDROLÍZIST KÖVETŐEN FŐKÉNT APIGENINT TARTALMAZÓ KIVONAT

A *tömegspektrometriás mérés* lehetővé tette az egyes glikozidok és az aglikon molekulatömeg szerinti azonosítását, melyhez standard anyagok törzsoldata mellett irodalmi adatokat is felhasználtam. A minták gázhalmazállapotba kerülését követően, a molekulák ionizálódnak és fragmentálódnak, majd ionok töltésegységre jutó tömegük

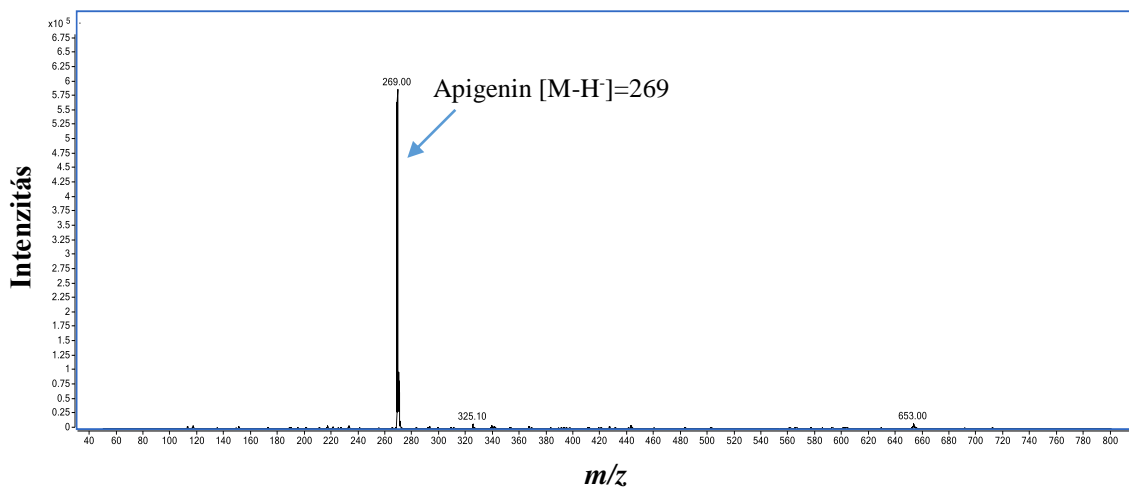
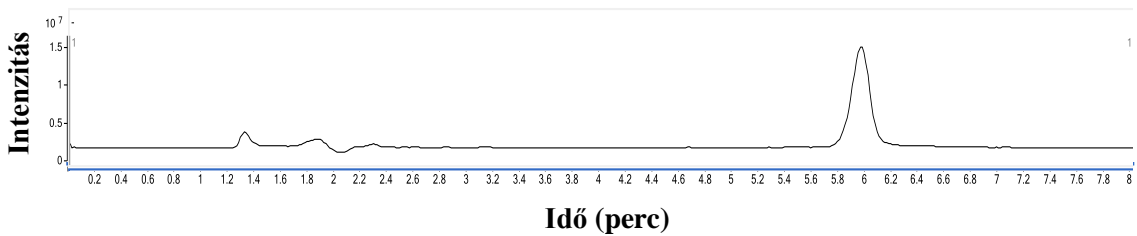
( $m/z$ ) szerint elválasztásra kerülnek a készülékben. A polifenolok esetében negatív elektroporlasztásos ionizáció (ESI(-)) alkalmazható, melynek során deprotonált molekulatömegek ( $[M-H]^-$ ) kerülnek detektálásra (239). Az így keletkezett, *nem hidrolizált növényi kivonat* tömegspektrumán megjelentek a glikozidokra jellemző molekulatömegek, mint az apiin ( $[M-H]^- = 563$ ) és az apigetrin ( $[M-H]^- = 431$ ). Ezzel szemben a *hidrolizált kivonatban* csak az apigeninre ( $[M-H]^- = 269$ ) és a glükóz molekulára ( $[M-H]^- = 160$ ) jellemző molekulatömegek voltak mérhetőek, tehát megállapítható, hogy a hidrolízis sikeres volt. Ahogy a **19. B ábrán** is látható, az apigenin után egy másik anyag is jól elválasztható. Molekulatömege alapján sikerült azonosítani, hogy ez az anyag a krizoeriol ( $[M-H]^- = 299$ ), egy másik flavonoid, melynek szerkezete hasonló az apigeninéhez, azzal a különbséggel, hogy a B gyűrűjében C3' pozícióban metoxycsoportot tartalmaz. A további elektronionizáció folytán a molekulák fragmensekre bomlanak, melyek tömege a molekula tömegének és szerkezetének függvénye. Így a tömegspektrum adataiból a komponensek szerkezetére is következtetni lehet. Az apigenin molekula főként a 117, 151, 197 és 201  $m/z$  értékekre fragmentálódik (237; 239; 240), melyeket detektálni lehet mind a nem hidrolizált, mind a hidrolizált növényi kivonatban. A növényi kivonat tömegspektrumát az apigenin molekula fragmentálódási mechanizmusával a **20. A ábra** szemlélteti (241). Az apigenin total ion (TIC) kromatogramja és a glikozidok tömegspektrumai is a jellemző tömegekkel a **20. C** és **B ábrán** láthatóak.



**20. A) ÁBRA** NÖVÉNYI KIVONAT TÖMEGSPEKTRUMA ÉS AZ APIGENIN FRAGMENTÁLÓDÁSI MECHANIZMUSAI



20. B) ÁBRA AZ APIGETRIN ÉS AZ APIIN TÖMEGSPEKTRUMAI



20. C) ÁBRA AZ APIGENIN TIC KROMATOGRAMJA ÉS TÖMEGSPEKTRUMA

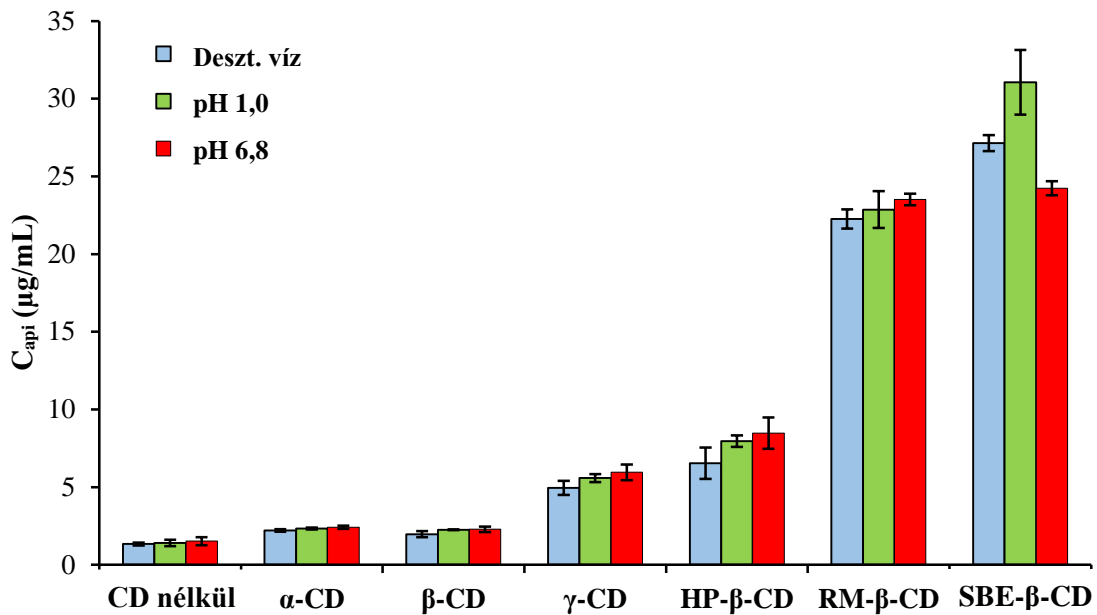
### 4.3. Gyógyszertechnológiai módszerek

#### 4.3.1. Oldékonyság növelés ciklodextrinekkel

##### 4.3.1.1. Elővizsgálatok és fázis-oldhatósági vizsgálatok eredményei

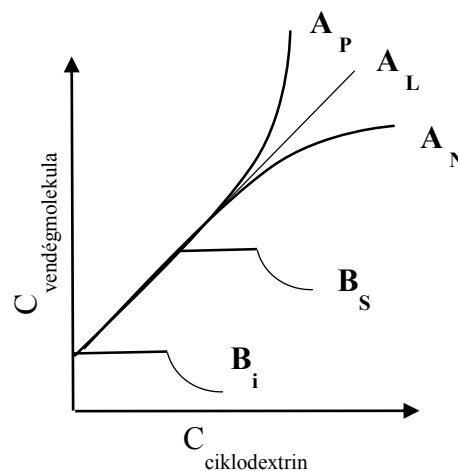
Az elővizsgálatok során különböző alap és származék CD-t vizsgáltam az apigenin oldékonyságának elősegítésére. Az apigenin oldékonysága különböző pH értékeken (CD nélkül) megegyezett az irodalomban leírtakkal (25). Az alap CD-k közül leginkább a  $\gamma$ -CD növelte meg az oldékonyságot, feltehetően a nagyobb belső gyűrűátmérő miatt ( $\alpha$ -CD: 0,57 nm <  $\beta$ -CD: 0,78 nm <  $\gamma$ -CD: 0,95 nm) (150; 159). A  $\beta$ -CD származékai jobban elősegítették az oldhatóságot, melyek közül a HP- $\beta$ -CD-hez képest mintegy háromszoros mértékben hatékonyabban a RM- $\beta$ -CD és a SBE- $\beta$ -CD (**21. ábra**). Ezek eredmények összhangban voltak a korábban publikált adatokkal (98; 99). A származék CD-ek hatékonyságára a magyarázat nem csupán az, hogy például HP- $\beta$ -CD hidroxipropil csoportjai több H-híd kötést képesek kialakítani, hanem kevésbé hajlamosak aggregációra. Tehát több szabad CD molekula képes zárványkomplext képezni vendégmolekulákkal mert a komplexképzés nem csupán a belső üreg geometriájának függvénye, hanem a CD molekulák közötti interakció is jelentősen befolyásolja (243). Továbbá az újabb derivátumok, mint az ionos SBE- $\beta$ -CD, ahol szulfonát csoportok nátriumsója butil láncon keresztül kapcsolódik a  $\beta$ -CD-hez, vagy a metilcsoportokkal szubsztituált nem-ionos RM- $\beta$ -CD származék, hatékonyabbnak bizonyultak a HP- $\beta$ -CD-nél az apigenin esetében is (167).

Az apigenin gyenge savas karakterű molekula, ezért a pH növekedésével nő az oldékonysága (pH 1,0: 1,43  $\mu$ g/ml, pH 6,8: 1,56  $\mu$ g/ml) (25). Két ionizációs lépést különböztetünk meg, az első az A gyűrűn lévő C7-OH csoporton következik be, míg a második a B gyűrű C4'-OH csoportján (225). Ezért a vizsgált 6,8 pH értéken az első ionizációs lépésnél monoanion molekulák körülbelül 8%-ban találhatóak az oldatban (C7-OH  $pK_{a1}=7,86$ ), ahol a neutrális és az ionos formák között egyensúly alakul ki (244). Ezzel magyarázható, hogy a vizsgált pH 6,8 értéken mindegyik CD esetében nagyobb oldódást tapasztaltam, kivéve a SBE- $\beta$ -CD-nél, ahol pedig taszítás léphet fel a negatív szulfo csoportok és az apigenin monoanion formája között. Az elővizsgálatok segítségével megállapítottam, hogy a  $\gamma$ -CD, HP- $\beta$ -CD, RM- $\beta$ -CD és SBE- $\beta$ -CD ciklodextrinek növelik meg jobban az oldhatóságot, ezért ezekkel végeztem el a fázis-



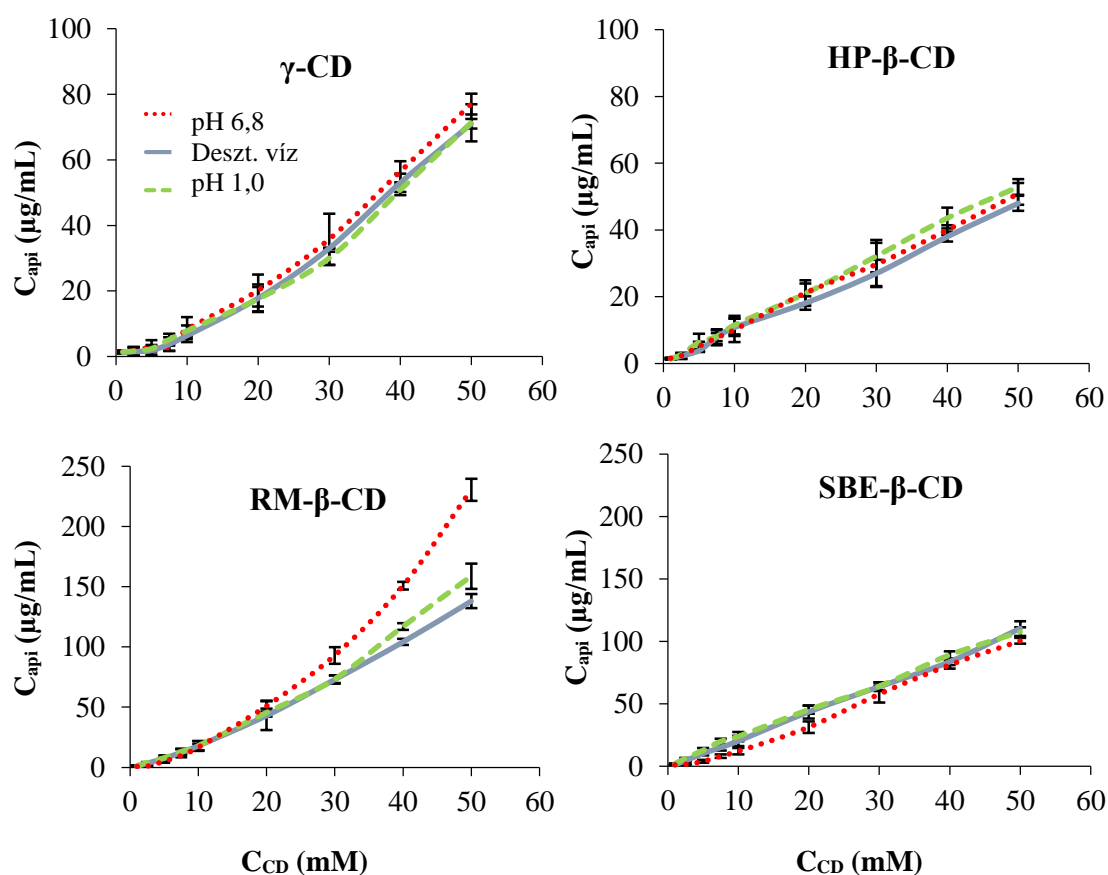
21. ÁBRA ELŐVIZSGÁLATOK CIKLODEXTRINEKKEL KÜLÖNBÖZŐ PH ÉRTÉKEKEN

oldhatósági vizsgálatokat. Ez a módszer széles körben alkalmazott a CD zárványkomplexek sztöchiometriájának megállapítására, melyet Higuchi és Connors 1965-ben publikált először (231). A komplexált hatóanyag koncentrációját ábrázolva a komplexképző CD koncentrációjának függvényében különböző lefutású izotermákat eredményezhet. Ezen belül megkülönböztetünk A és B csoportokat, melyek feloszthatóak további alcsoportokra (22. ábra). Ha a kialakult komplex oldódik a közegben, akkor az “A” típus a jellemző. Amennyiben a függvény egyenes lefutású ( $A_L$  szubtípus), akkor közvetlenül megállapítható, hogy 1:1 sztöchiometriájú a komplex (150). Továbbá a tengelymetszet és a meredekség értékeiből kiszámítható az adott komplexek stabilitási állandója is. Ez az állandó jellemzi a zárványkomplex erősségét, a vendégmolekula tulajdonságait és meghatározza, hogy a molekulák hányad része található szabad, illetve komplex formában. Továbbá a vendégmolekula felszabadulása a komplexekből lesz a hatóanyag felszívódásának sebességmeghatározó lépése (150). A “B” típus oldhatatlan komplexekre utal (157).



22. ÁBRA FÁZIS OLDHATÓSÁGI DIAGRAMOK

Az Api-CD komplexképződést különböző fiziológiás pH értéken és széles koncentráció tartományban vizsgáltam ( $C_{CD}=1,0-50,0$  mM). A szolubilizált apigenin pontos mennyiségét HPLC-UV módszerrel, kalibrációs egyenes felvétele útján határoztam meg. A különböző CD-ekhez tartozó fázisoldhatósági függvényeket a **23. ábra** szemlélteti. Látható, hogy a HP- $\beta$ -CD és a SBE- $\beta$ -CD profiljai lineáris lefutásúak, az  $A_L$  altípushoz tartoznak, tehát 1:1 sztöchiometriájú komplexképződés feltételezhető. Ezt az eredményt irodalmi adatok is alátámasztják, miszerint a flavonoidok gyakran 1:1 arányú zárványkomplex képzésére hajlamosak (245). Továbbá más publikáció is igazolja, hogy az apigenin 1:1 arányú komplexet alkot a HP- $\beta$ -CD-nel (98). Ezzel szemben a  $\gamma$ -CD és a RM- $\beta$ -CD esetében egy pozitív izotermát kaptam, mely magasabb komplexképződésre utal (pl.: 1:2 Api:CD). A pH 6,8-as közegben még nagyobb oldódás elősegítést tapasztaltam, kivéve a SBE- $\beta$ -CD esetében. A HP- $\beta$ -CD zárványkomplex lérejöttek a neutrális forma kedvezőbb, tehát a pH 1,0 közegben eredményezett nagyobb apigenin koncentrációt.



**23. ÁBRA** FÁZISOLDHATÓSÁGI IZOTERMÁK KÜLÖNBÖZŐ PH ÉRTÉKEKEN VIZSGÁLVA 25°C-ON

A stabilitási konstans értékeket ( $K_{1:1}$ ) az 1:1 sztöchiometriájú komplexek fázisoldhatósági adataiból határoztam meg. A számított állandókat a **XI. táblázat** mutatja, a pH minkét esetben befolyásolta az értékeket. Ahogy már az elővizsgálatokban is megállapítható, a pH 6,8 közeg nem kedvez az Api-SBE- $\beta$ -CD komplex kialakulásának, ezért gyengébb a stabilitási állandó értéke, mint desztillált víz esetén. Általánosan elmondható, hogy az ionizált molekulák komplexképzése gyengébb (246; 247). Valamint egy másik hasonló flavonoid, a naringenin esetében is a pH növekedésével nőtt a flavonoid látszólagos oldhatósága, de gyengébb stabilitású komplexek létrejöttét idézte elő (248). Ez a tendencia a HP- $\beta$ -CD esetében is megfigyelhető. A pH 1,0 közeg pedig a hidrofób interakciók következtében az Api-HP- $\beta$ -CD létrejöttének a legkedvezőbb. A SBE- $\beta$ -CD esetében hőmérséklet növelésével nő az apigenin látszólagos oldékonysága (242).

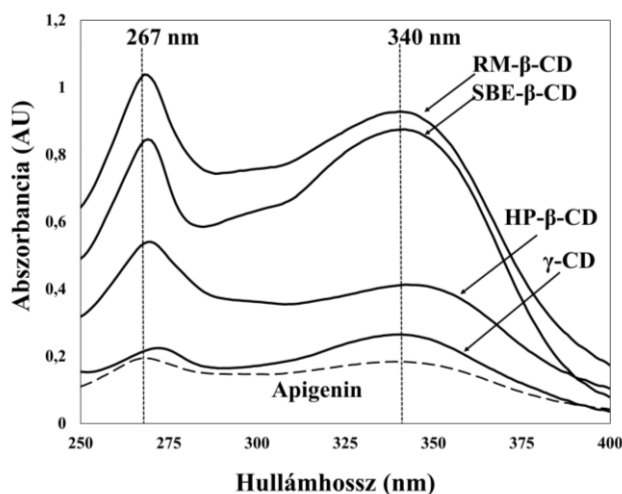
**XI. TÁBLÁZAT STABILITÁSI ÁLLANDÓK ÉRTÉKEI KÜLÖNBÖZŐ pH ÉRTÉKEKEN**

<b>Apigenin — HP-<math>\beta</math>-CD</b>				
	Meredekség ( $\times 10^{-3}$ )	Tengelymetszet ( $\times 10^{-6}$ )	$K_{1:1}$ ( $\text{mol}^{-1}\text{L}$ )	$R^2$
<b>Deszt. víz</b>	3,60	4,90	773,348	0,9914
<b>pH 1,0</b>	3,90	5,00	783,054	0,9991
<b>pH 6,8</b>	3,80	5,10	747,940	0,9992
<b>Apigenin — SBE-<math>\beta</math>-CD</b>				
<b>Deszt. víz</b>	8,10	5,00	1633,229	0,9989
<b>pH 1,0</b>	7,90	6,00	1327,151	0,9985
<b>pH 6,8</b>	7,60	7,00	1094,029	0,9982

4.3.1.2. *UV-látható és fluoreszcencia spektroszkópiai mérések*

A CD-ek képesek megváltoztatni a vendégmolekula fizikai-kémiai tulajdonságait, így abszorbancia és fluoreszcencia spektrumait is (247; 249). Az apigenint, a flavonoidokra jellemző módon, két abszorpciós maximum jellemzi: az egyik 267 nm (I. sáv), a másik 340 nm (II. sáv) hullámhosszon található (mint már részleteztem a 3.1.1 részben). A  $\gamma$ -CD és származék CD-ekkel zárványkomplexet képző apigenin UV abszorbancia spektruma látható 6,8 pH-jú közegben a **24. ábrán**. A vizsgált CD

koncentrációja ugyanolyan volt, de az apigenin mennyisége eltérő, a különböző komplexképzési hajlam következtében. A komplexképződés  $\gamma$ -CD-nel 5 nm-es batokrómm eltolódást eredményezett és az I. sáv intenzitása is alacsonyabb volt, mint a II. sáv intenzitása. Ebből arra következtettem, hogy az apigenin molekula a A+C gyűrűn lévő kromofór csoportja a  $\gamma$ -CD üregében található. Hasonlóképpen a luteolinhoz, melynek szintén főként A+C gyűrűje található CD-ben (98). Ezzel szemben a  $\beta$ -CD származékai esetében csak 1-2 nm-es eltolódás látható az I. sávban, tehát feltehetően inkább az apigenin B gyűrűjével lépnek kapcsolatba. Ezt támasztja alá az az eredmény is, hogy a II. sáv intenzitása jelentősen lecsökkent az I. sávhoz képest a HP- $\beta$ -CD és RM- $\beta$ -CD esetében. A SBE- $\beta$ -CD látszólag egyforma arányban lép kölcsönhatásba a molekula A+C vagy B gyűrűivel.

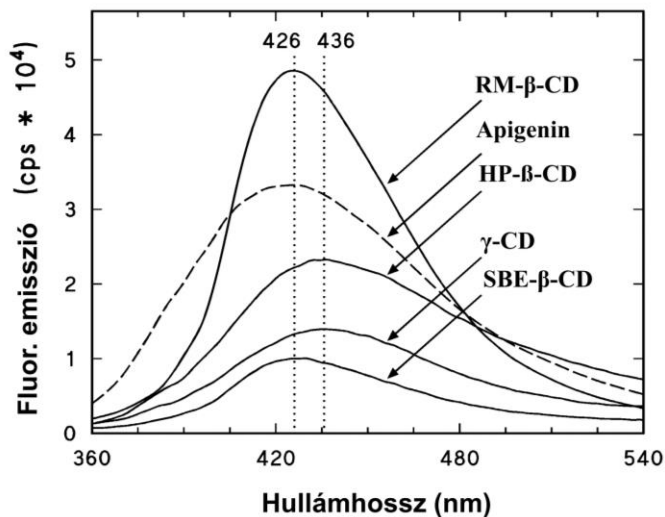


#### 24. ÁBRA APIGENIN ÉS ZÁRVÁNYKOMPLEI ABSZORBANCIA SPEKTRUMAI

Az apigenin egy olyan autofluoreszcens molekula, mely fluoreszcencia emissziós intenzitása a pH növekedésével nő, tehát a deprotonálás növeli az emissziót (225; 228). Ezért a komplexek vizsgálata a pH 6,8-as közegben történt 345 nm gerjesztési hullámhosszal (25. ábra). Az Api-CD zárványkomplexek fluoreszcencia emissziós spektrumán látható, hogy 345 nm-en történő gerjesztéssel egy emissziós maximum jelentkezik 426 nm-en. Az irodalmi adatoktól történő eltérést az eltérő közeg okozza, ugyanis a polifenolok spektrális tulajdonságait jelentősen befolyásolja a közeg pH-ja és az oldószer polaritása (225; 228). A  $\gamma$ -CD és a HP- $\beta$ -CD jelenlétében a spektrum emissziós maximuma 436 nm-re tolódott, míg nem változott a SBE- $\beta$ -CD és a RM- $\beta$ -CD esetében. Tehát a CD-ek is befolyásolják a fluoreszcens vendégmolekulák emissziós spektrumát (250). Az emissziós maximum eltolódása arra utal, hogy a vendégmolekula

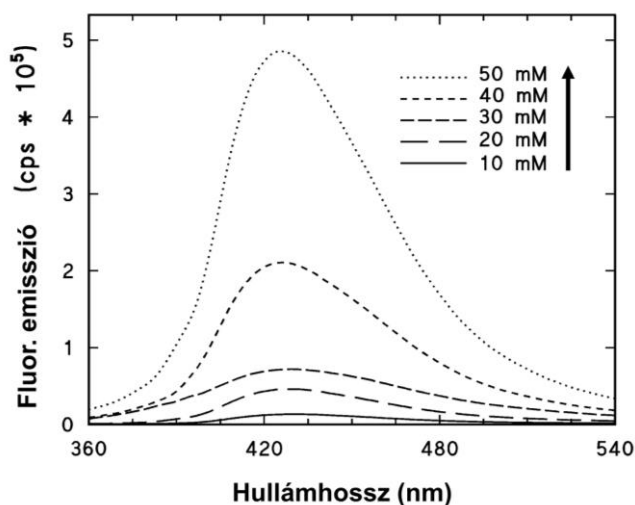


egy része vagy egésze CD üregében helyezkedik el. A csúcs batokróm eltolódása a H-híd kötések jelenlétét jelzi az apigenin és CD-ek hidroxil csoportjai között (251; 252). A fluoreszcencia emisszió intenzitásának csökkenése is arra utal, hogy a kromofór csoportok érintettek a zárványkomplex képzésben, inkorporálódnak a CD üregében



**25. ÁBRA** APIGENIN ÉS ZÁRVÁNYKOMPLEXEINEK FLURESZCENCIA EMISSZIÓS SPEKTRUMAI

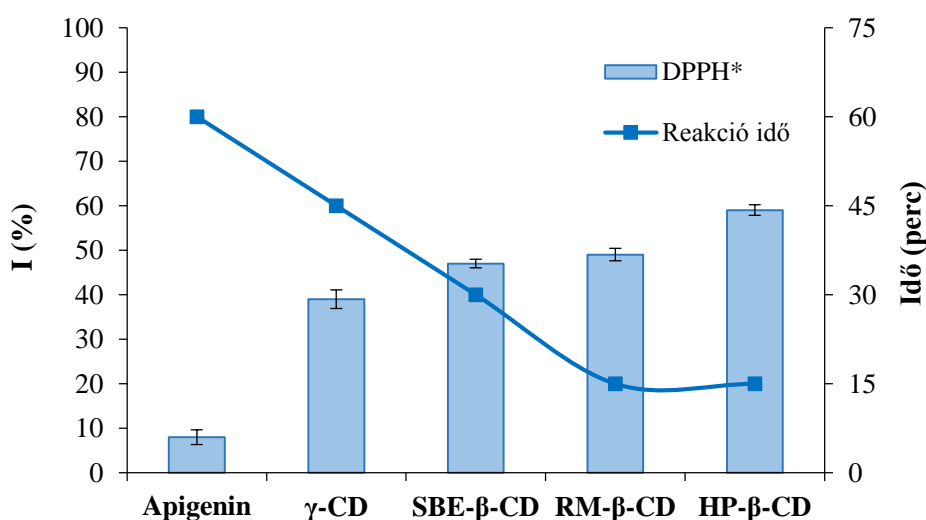
és/vagy H-híd kötést is kialakítottak. Továbbá az a jelenség is magyarázatul szolgálhat, hogy a neutrális molekulák száma nő, míg a deprotonált molekulák száma csökken ezért csökken az intenzitás is (225). Ezt erősíti meg a γ-CD, SBE-β-CD és a HP-β-CD Api-CD-ekkel képzett zárványkomplexek spektruma, melyek intenzitása jóval kisebb, mint az apigenin oldatáé. A RM-β-CD növelte a fluoreszcencia intenzitását, valószínűleg a jelentős oldékonyság növelés következtében (26. ábra).



**26. ÁBRA** APIGENIN FLURESZCENCIA EMISSZIÓ SPEKTRUMA NÖVEKVŐ KONCENTRÁCIÓJÚ CD ESETÉBEN

4.3.1.3. *Antioxidáns hatás vizsgálata*

A zárványkomplexek okozta antioxidáns hatást és a szabadgyök gátlásához szükséges időt (tehát amikor már nem csökken tovább az abszorbancia) a **27. ábra** mutatja. Látható, hogy az apigenin standardhez képest mindegyik Api-CD komplex erősebb szabadgyökfogó hatással rendelkezik, mely a nagyobb apigenin koncentráció és feltehetően a megnövekedett H-donor aktivitás eredménye. A ciklodextrinnek oldatai nem okoznak színváltozást. A zárványkomplexek kialakulásakor H-híd kötések alakulnak ki, melyek legyengíti az intramolekuláris H-híd kötést, így nő a molekula H donor aktivitása (253). Következésképpen a legnagyobb antioxidáns kapacitással az Api-HP- $\beta$ -CD komplex rendelkezik. A RM- $\beta$ -CD hidrofób metilcsoportjai negatívan befolyásolják a H-híd kötések kialakulását, így a H-donor aktivitást is ezen kívül a metilcsoportok szterikus gátlása is feltételezhető. Hasonlóképpen a  $\gamma$ -CD és a SBE- $\beta$ -CD esetében is, ahol a nagyobb belső üreg és a butil láncok is okozhatják szabadgyökfogó hatás kisebb mértékét. Továbbá ez magyarázatul szolgálhat arra, hogy a reakció végpontjához szükséges idő egyes komplexek kialakulásával egyre csökken, és végül 15 percet ér el a RM- $\beta$ -CD és HP- $\beta$ -CD esetében. Ez arra enged következtetni, hogy az apigenin antioxidáns hatása jelentősen függ az oldékonyságától, komplexáltságától és szterikus okotól.



**27. ÁBRA** APIGENIN ÉS ZÁRVÁNYKOMPLEXEK ANTIOXIDÁNS HATÁSA

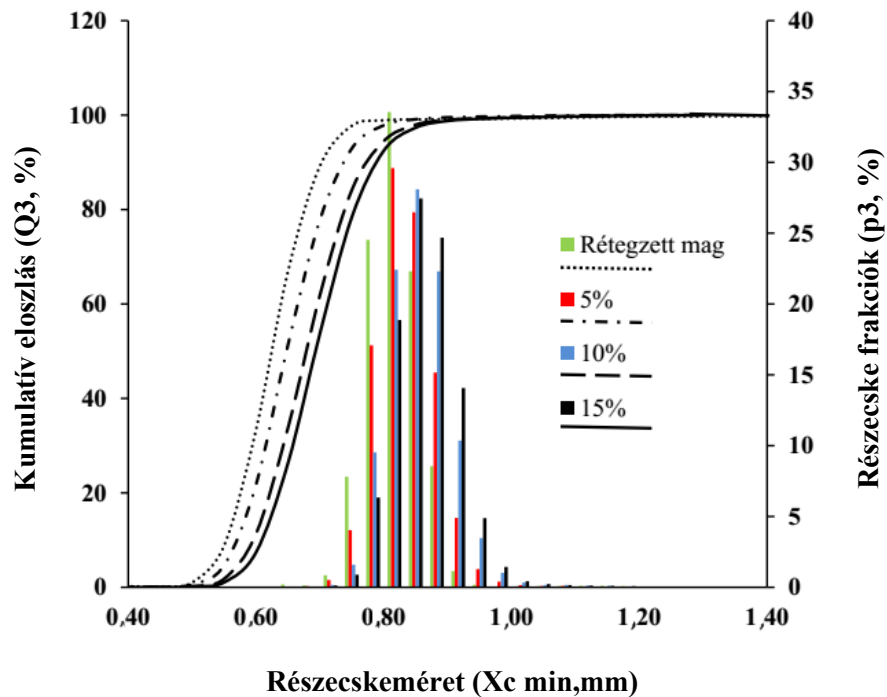
## 4.3.2. Multipartikulumok minőségi paraméterei

## 4.3.2.1. Méret és szemcsealak vizsgálata képanalízissel, morfológia

Retch Camsizer<sup>®</sup> képanalizáló készülék gyorsan és pontosan meghatározza a szemcsék alaki paramétereit. A rétegzett és bevont *pelletek szemcseméretét és szemcseméret eloszlását* a **XII. táblázat** és a **28. ábra** szemlélteti. Látható, hogy a rétegzett magok szűk méreteloszlást mutatnak, többségük 0,6-0,7 mm tartományban található, azonban növényi kivonattal rétegzett magok kissé nagyobb méretűek. Az inert mag kedvező szfericitás (gömbalakúság, kerekdedség) értékén ( $1,00 \pm 0,002$ ) nem rontott számottevően sem a növényi kivonattal, sem az apigeninnel történő rétegzés. Megállapítható, hogy a rétegzett magok ideális szemcsealakkal rendelkeznek, ezért alkalmasak a polimerrel történő bevonáshoz. Ahogy várható volt, a polimertartalom növekedésével nő részecskeméret is és a gömbalak megmaradt.

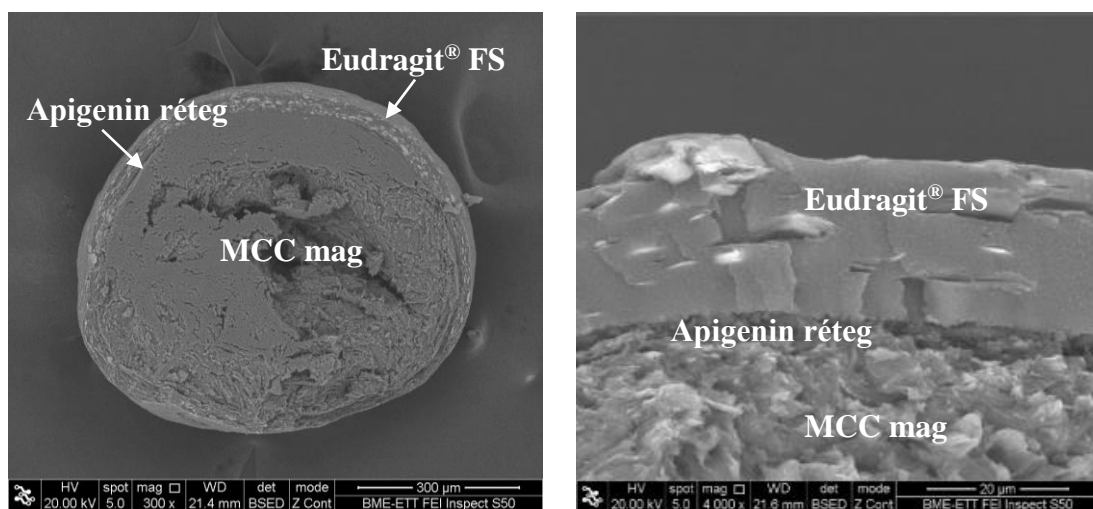
**XII. TÁBLÁZAT RÉTEGZETT ÉS BEVONT PELLETEK RÉSZECSEKEMÉRETE ÉS SZFERICITÁSA**

<i>Petroselinum crispum</i>							
	Eudragit <sup>®</sup> L bevont				Eudragit <sup>®</sup> FS bevont		
	<i>Rétegzett</i>	5%	10%	15%	5%	10%	15%
<b>D<sub>10</sub> (mm)</b>	0,554	0,573	0,596	0,610	0,571	0,589	0,593
<b>D<sub>50</sub> (mm)</b>	0,624	0,648	0,679	0,693	0,654	0,670	0,683
<b>D<sub>90</sub> (mm)</b>	0,703	0,735	0,772	0,888	0,780	1,025	1,086
<b><i>Szfericitás</i></b>	0,904			0,938	0,941		
<b>Apigenin</b>							
	Eudragit <sup>®</sup> L bevont				Eudragit <sup>®</sup> FS bevont		
	<i>Rétegzett</i>	5%	10%	15%	5%	10%	15%
<b>D<sub>10</sub> (mm)</b>	0,542	0,580	0,599	0,615	0,597	0,605	0,626
<b>D<sub>50</sub> (mm)</b>	0,612	0,667	0,688	0,717	0,681	0,705	0,715
<b>D<sub>90</sub> (mm)</b>	0,689	0,774	0,788	0,831	0,796	0,804	1,061
<b><i>Szfericitás</i></b>	0,965			0,949	0,950		



**28. ÁBRA** A NÖVÉNYI KIVONATTAL RÉTEGZETT ÉS EUDRAGIT<sup>®</sup> L POLIMERREL BEVONT PELLETEK RÉSZECSEMÉRET ELOSZLÁSA

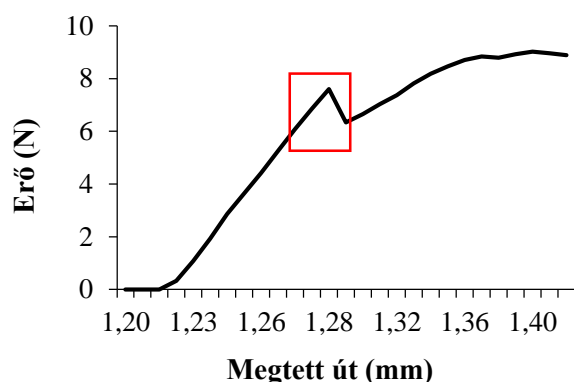
A pásztázó elektronmikroszkóppal készült felvételeken látszik a hatóanyag réteg és a polimer bevonat is (29. ábra).



**29. ÁBRA** EGY PELLETT KERESZTMETSZETI KÉPE 300X ÉS 4000X NAGYÍTÁSBAN

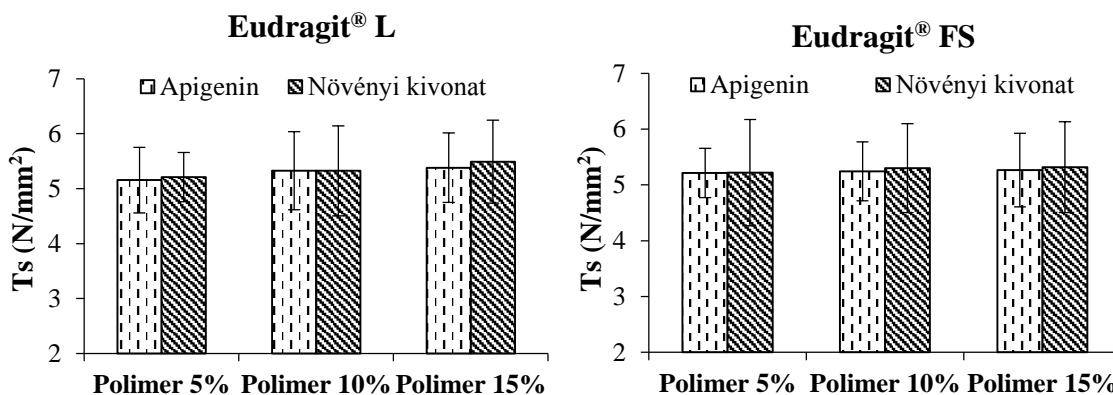
## 4.3.2.2. Törési szilárdság, gördülékenység és nedvességtartalom

A törési szilárdság vizsgálata során a töréshez szükséges erőt és a megtett utat detektálta a készülék (30. ábra). Az MCC alapú magok a vizsgálat ideje alatt folyamatosan deformálódtak, ezért a grafikonon az első töréspont után még további kisebb törések is megjelentek. Ez annak volt tulajdonítható, hogy az MCC egy plasztikus, vagyis könnyebben deformálható anyag. Ezért a törési szilárdság kiszámításához, a vizsgált pellet felszínén megjelenő hasadást, vagyis az első töréspontot vettem alapul (bekeretezett rész) (254).



30. ÁBRA EGY MCC PELLET TÖRÉSI SZILÁRDSÁGÁT JELLEMZŐ GRAFIKON

A rétegzés és a bevonás növelte a kiindulási mag törési szilárdságát, de szignifikáns különbség nem mutatkozott a bevonat polimertartalmát tekintve (31. ábra). A két típusú polimerrel bevont magok törési szilárdság értékeit összehasonlítva jól látható, hogy az Eudragit® FS magasabb értékekkel rendelkezik, mely a polimer jobb flexibilitásának köszönhető (XIII. táblázat).



31. ÁBRA TÖRÉSI SZILÁRDSÁG ÉRTÉKEK A POLIMERTARTALOM FÜGGVÉNYÉBEN

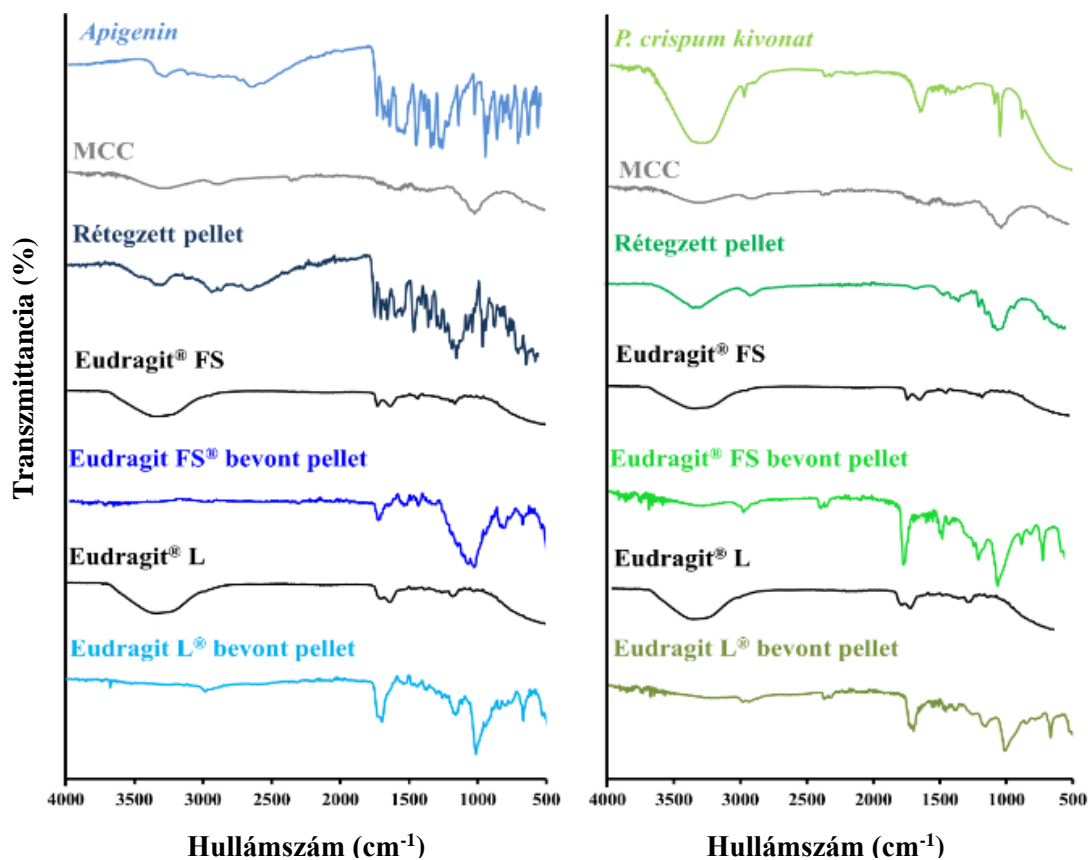
A pelletek töltött és tömörített halmazsűrűség adatai, valamint az ezekből számolt *gördülékenységre* jellemző értékeket a **XIII. táblázat** tartalmazza. A Hausner faktor megközelítőleg 1 és a Carr féle index 10 alatti értékei, ezen kívül a csúszóhatárszög  $25^\circ$  alatti számított paramétere a pelletek kedvező tulajdonságaira utalnak. Megállapítható, hogy a hatóanyagrétegzés és a polimerekkel történő bevonás nem rontott az inert pellet kedvező tulajdonságain és a nedvességtartalom is alacsony. A kellő mechanikai szilárdság és gördülékenység a tablettázhatóság szempontjából fontos és a fenti adatokból megállapítható, hogy a gyógyszerkönyvi előírásoknak megfelelően a formulált pelletek alkalmasak a további feldolgozáshoz.

### XIII. TÁBLÁZAT RÉTEGZETT ÉS BEVONT PELLETEK FIZIKAI PARAMÉTEREI

<b>Petroselinum crispum</b>				
Paraméterek			Eudragit® L	Eudragit® FS
	Inert mag	Rétegzett mag	15%	15%
Ts (N/mm <sup>2</sup> )	4,96 ± 0,49	5,22 ± 0,43	5,32 ± 0,82	5,49 ± 0,75
$\rho$ töltött (g/cm <sup>3</sup> )	0,81 ± 0,001	0,91 ± 0,001	0,84 ± 0,002	0,92 ± 0,003
$\rho$ tömörített (g/cm <sup>3</sup> )	0,86 ± 0,002	0,93 ± 0,003	0,86 ± 0,001	0,96 ± 0,001
HR	1,06	1,02	1,01	1,04
CI (%)	6,17	2,19	2,38	4,34
Kifolyási idő (s)	4,2	4,8	5,7	5,2
$\alpha$ (°)	18	19,1	22,7	21,8
Nedvességtartalom (%)	1,90 ± 0,38	2,56 ± 0,09	2,60 ± 0,09	2,49 ± 0,26
<b>Apigenin</b>				
Paraméterek			Eudragit® L	Eudragit® FS
	Inert mag	Rétegzett mag	15%	15%
Ts (N/mm <sup>2</sup> )	4,96 ± 0,49	5,11 ± 0,60	5,27 ± 0,66	5,38 ± 0,63
$\rho$ töltött (g/cm <sup>3</sup> )	0,81 ± 0,001	0,86 ± 0,002	0,86 ± 0,001	0,93 ± 0,001
$\rho$ tömörített (g/cm <sup>3</sup> )	0,86 ± 0,002	0,89 ± 0,001	0,89 ± 0,001	0,95 ± 0,003
HR	1,06	1,03	1,03	1,02
CI (%)	6,17	3,48	3,48	2,15
Kifolyási idő (s)	4,2	5,5	5,6	5,3
$\alpha$ (°)	18	21,3	21,2	21,0
Nedvességtartalom (%)	1,90 ± 0,38	2,59 ± 0,13	2,62 ± 0,11	2,41 ± 0,08

## 4.3.2.3. FTIR és NIR spektroszkópiai mérések

Az infravörös spektroszkópia egy non-destruktív optikai analitikai módszer, mely alkalmas egy vegyület szerkezetének azonosítására és gyógyszer technológiai részfolyamatok nyomon követésére is. A molekulák alapállapotú normál rezgési gerjeszthetők az infravörös tartományba eső elektromágneses sugárzással és így a molekulák funkciós csoportjaiban rezgési és rotációs változások következnek be, melynek elemzése elvégezhető a mérés során felvett spektrumok alapján. A fényintenzitás detektálása (abszorbancia/transzmittancia) a frekvencia (hullámszám) függvényében történik, ezáltal következtetni lehet a minta jellemzőire és funkciós csoportok jelenlétére (255). A FTIR készülék a mérés során a detektált fényintenzitás jeléből Fourier transzformáció segítségével adja meg a minta infravörös spektrumát. A készülék nagy felbontása miatt előnyös, ezért vizsgáltam a formulált apigenin tartalmú rétegzett és bevont pelleteket. A 32. ábra szemlélteti a segédanyagokra és a készítményekre jellemző spektrumokat.



32. ÁBRA APIGENINT (BAL) ÉS A NÖVÉNYI KIVONATOT (JOB) TARTALMAZÓ PELLETEK SPEKTRUMA, A POLIMER BEVONAT MINDEN ESETBEN 15%

Az FTIR mérés során alkalmazott frekvencia tartománya  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  között található (analitikai tartomány) és a molekulák rotációs-vibrációs rezgéseinek vizsgálatára alkalmas. Az apigenin spektrumát a szerkezetet ismeretében értékelve, a következő molekulára jellemző kötések vibrációi láthatóak: C-H:  $1450-1380\text{ cm}^{-1}$ , C=O:  $1730-1680\text{ cm}^{-1}$  és O-H:  $2710-2580\text{ cm}^{-1}$ . Ezen kívül az aromás gyűrűre jellemző C-C kötések rezgése  $1625-1585$  és  $1520-1480\text{ cm}^{-1}$ -nél és C-H kötés okozta  $835-690\text{ cm}^{-1}$  sáv is, továbbá az aromás gyűrűhöz kapcsolódó hidroxil csoportokra jellemző  $3660-3200\text{ cm}^{-1}$ -nél jelentkező csúcsok is megfigyeltek. A növényi kivonat ezzel szemben egy sok komponensű rendszer. A nagy intenzitású sáv megjelenése  $3300\text{ cm}^{-1}$  frekvencia értéknél a nagy víztartalomra utal. Aromás vegyületek jeleit erősítik a  $1400-1600\text{ cm}^{-1}$  és  $835-690\text{ cm}^{-1}$ -nél megjelenő csúcsok.

Az MCC magokat vizsgálva láthatjuk az O-H kötésre jellemző  $3600-3100\text{ cm}^{-1}$  és a C-H kötés okozta  $2900\text{ cm}^{-1}$  rezgéseket, valamint a cellulóz váz okozta vibrációkat is (C-C, C-O és C-OH)  $1310-1360\text{ cm}^{-1}$  és  $1000\text{ cm}^{-1}$  körüli frekvencia értékeknél.

A rétegzett pelleték spektrumát vizsgálva megállapítható, hogy az apigenin ujjlenyomat tartományát ( $1600\text{ cm}^{-1}$  alatt), valamint a kivonathoz kapcsolódó aromás csoportok kötései jellemző rezgések, mint a C-H:  $1470-1405\text{ cm}^{-1}$ ,  $3000-2825\text{ cm}^{-1}$  és  $835-690\text{ cm}^{-1}$  sávok megjelenése bizonyítja a hatóanyag tartalmú rétegeket MCC magon.

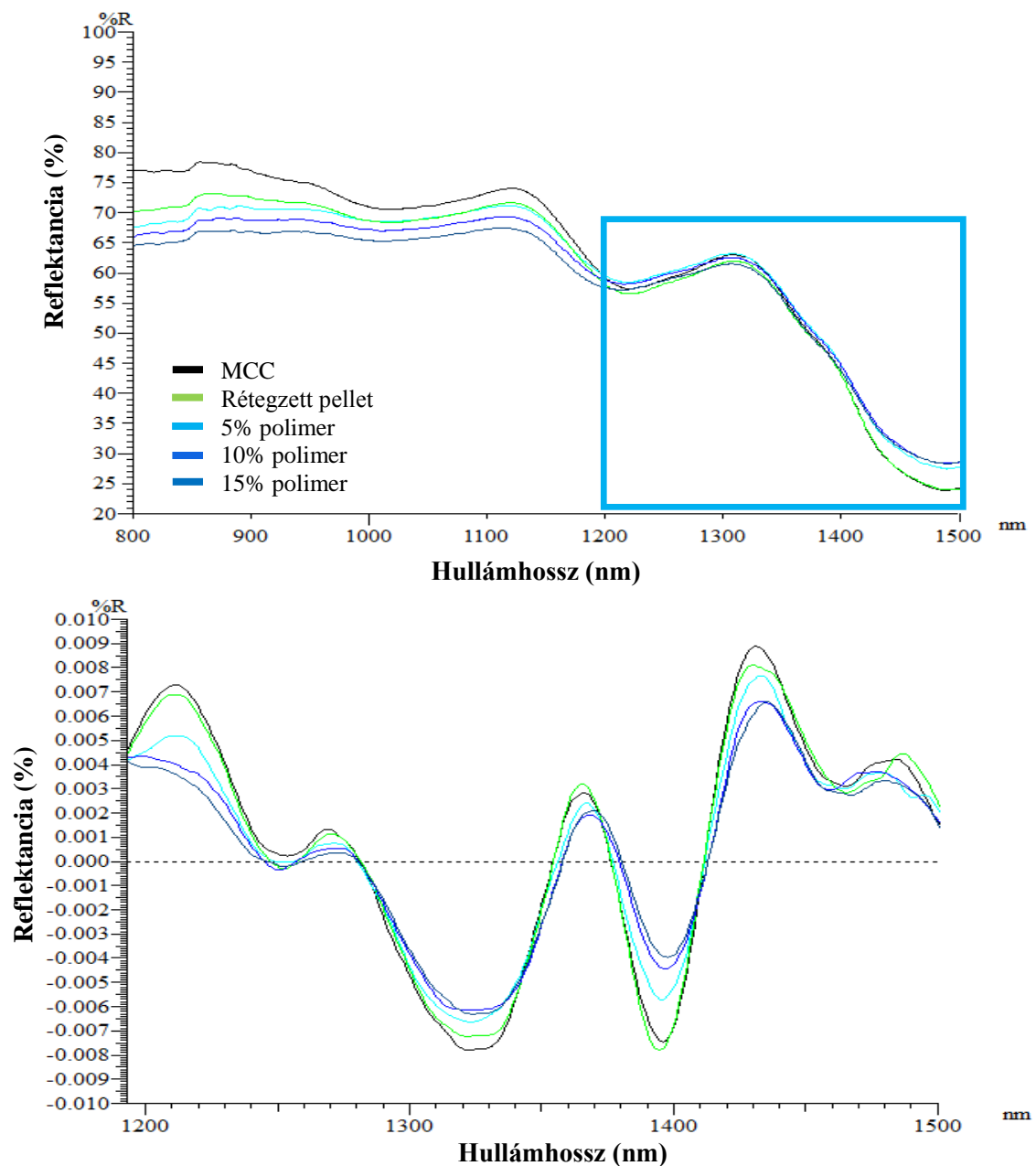
Az Eudragit® FS és Eudragit® L polimerek vizes diszperzióinak spektruma hasonló, hiszen hasonló szerkezetű akrilát kopolimerekről van szó. Szembetűnő a magas víztartalmat jelző  $3300\text{ cm}^{-1}$  frekvenciájú széles sáv, valamint C-H kötésekre jellemző csúcsok  $1400\text{ cm}^{-1}$  körül és a C=O kötésre jellemző  $1730-1680\text{ cm}^{-1}$  sáv.

Várakozásainknak megfelelően, a bevont pelletéken a polimer filmképződésével már eltűnik a polimer diszperzió víztartalmára utaló széles sáv és felerősödnek a kopolimerre jellemző molekulák rezgéseinek intenzitásai. Továbbá az apigenin karakterisztikus rezgései és a kivonatban található aromás rezgések jelei is láthatóak, hiszen az infravörös gerjesztő sugárzás képes áthatolni a filmbevonaton.

A minták gyors és szintén roncsolásmentes vizsgálatát teszi lehetővé a *NIR készülék*, mely nem a mintán áthaladó fényt (transzmittancia), hanem a szilárd minta felületéről visszaverődő fény intenzitását (reflektancia) méri a hullámhossz függvényében. Az ún. diffúz reflektancia mérése során a fény behatol a mintába és ott egy része elnyelődik, másik része pedig több irányba szóródva visszaverődik, melyet a



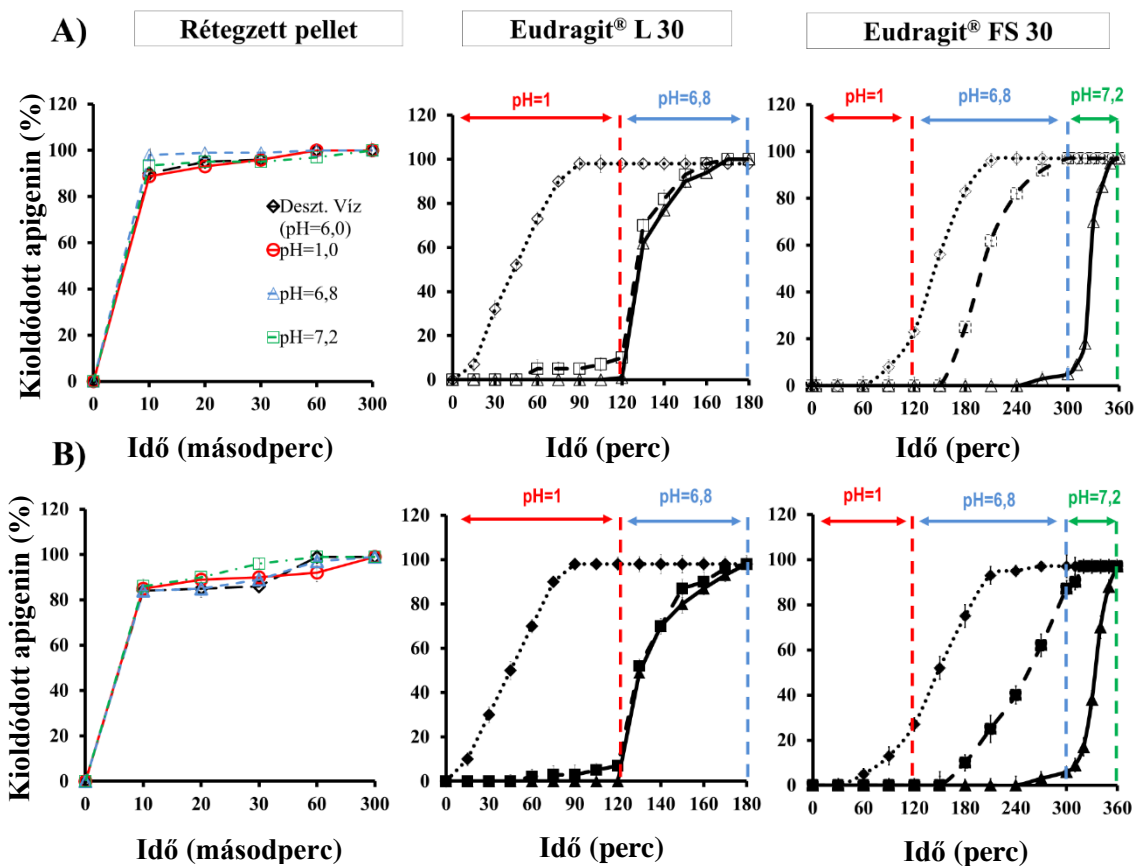
készülék egy integrálgömb segítségével összegyűjt és detektál (256). Ilyen NIR készülék segítségével vizsgáltam a hatóanyagrétegzés és filmbevonás folyamatát. A **33. ábrán** látható a magok diffúz reflektancia és annak második derivált spektrumai. Ahogy nő az inert magot körbevevő rétegek száma, úgy csökken az MCC-re jellemző kémiai jelek intenzitása, mely segítségével a polimer filmrétegek vastagságának növekedése jól nyomonkövethető, azonban akrilát polimerek között nem lehet szignifikáns különbséget kimutatni.



**33. ÁBRA** NÖVÉNYI KIVONATTAL RÉTEGZETT, 5-10-15 % EUDRAGIT® L POLIMER BEVONATTAL RENDELKEZŐ MCC PELLETEK NIR SPEKTRUMAI, A BEKERETEZETT RÉSZ A MÁSODIK DERIVÁLTAT JELÖLI (LENT)

## 4.3.2.4. Rétegzett pelletek hatóanyagtartalma és kioldódás vizsgálatok

A biológiailag aktív anyaggal rétegzett, de filmbevonat nélküli pelletek hatóanyag tartalmának meghatározását desztillált vízben és különböző fiziológiás pH értékű közegben végeztem el (34. ábra). Megállapítható, hogy a vízdékony kötőanyag (HPMC), melyet a rétegzéshez használtam fel, azonnali hatóanyagkioldódást biztosít az MCC magokról és a hatóanyag teljes mennyisége felszabadul 5 perc alatt. Továbbá nem történt okklúzió az inert magok felületén, így az MCC alkalmas hordozónak bizonyult (257). A tervezett hatóanyagtartalmat sikerült biztosítani fluidizációs rétegzéssel, mely az apigeninnel rétegzett pelletek estében 98%-nak (19,6 mg/g), a növényi kivonatot tartalmazó magok esetében 96% -nak (4,8 mg/g) bizonyult. Megállapítható továbbá, hogy a kioldóközeg pH értéke nem befolyásolta a kioldódást. Így mindkét esetben magasabb apigenin bevittelt tenne lehetővé a készítmény, mint amit egy átlagos étkezéssel lehetne biztosítani az apigenin dózist figyelembe véve. A növényi kivonatot más hatóanyagai révén szinergista hatás is érvényesülhetne.

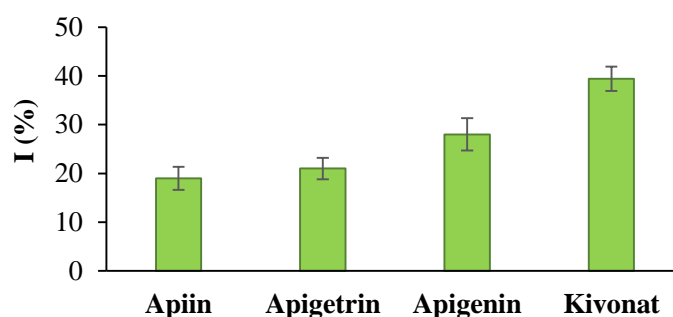


34. ÁBRA NÖVÉNYI KIVONATTAL (A) ÉS APIGENINNEL (B) RÉTEGZETT PELLETEK KIOLDÓDÁS VIZSGÁLATAI. POLIMER 5 % (ROMBUSZ), 10% (NÉGYZET), 15% (HÁROMSZÖG)

Eudragit<sup>®</sup> L és Eudragit<sup>®</sup> FS 30 filmképző polimereket leggyakrabban a módosított hatóanyagleadás elérésére alkalmazzák. Ezek az anionos metakrilsav kopolimerek karboxil csoportokat tartalmaznak, ezáltal oldódásuk pH függő. A savas közegben ionizálatlan karboxil csoportok csak magasabb pH értékek felett ionizálódnak, vagyis oldódik a polimer. A karboxil csoportok száma is befolyásolja a polimer oldódását, így az pH 5,5 (Eudragit<sup>®</sup> L) és pH 7 (Eudragit<sup>®</sup> FS) esetén következik be (182). A hatóanyag felszabadulást a polimer rétegvastagsága és a kioldóközeg pH-ja is befolyásolja, így az előzetes várakozásnak megfelelően az apigenin tartalmú bevont pelleték esetében is ezt tapasztalható. A különböző mennyiségű polimerrel (5%, 10%, 15%) bevont pelletékből történő apigenin kioldódás **34. ábrán** látható. Megállapítható, hogy 5% Eudragit<sup>®</sup> L polimer tartalom nem, de 10% feletti filmképző bevonat már biztosítja a gasztrerezisztens tulajdonságot. Ez utóbbi esetben ugyanis kevesebb, mint 10% hatóanyagleadás történt pH 1,0 kioldóközegben, mely a megfelelő polimer mennyiségnek volt köszönhető. A 6,8 pH értékű foszfát pufferben 20 perc alatt az apigenin 70-82% felszabadult és 60 perc alatt elérte a 100%-ot. Irodalmi adatok alapján a pelleték tranzit ideje a vékonybélben akár 3 óra is lehet (258), ezért az Eudragit<sup>®</sup> FS esetében pH 6,8-as közegben 3 óráig történt a hatóanyagkioldódás vizsgálata. Azt az eredményt kaptam, hogy a megfelelő vastagbélben történő hatóanyagleadást csak 15% Eudragit<sup>®</sup> FS biztosította, mert 5% polimertartalom esetében megközelítőleg 30% apigenint (pH 1,0), valamint a 10% polimertartalom esetében több, mint 90% apigenint mértem pH 6,8-as kioldóközegben. Egy óráig nyomonkövetve a kioldódást pH 7,2 pufferben azt tapasztaltam, hogy a fél óra alatt az apigenin glikozidok 70%-a, valamint az aglikon 40%-a oldódott ki és 1 óra alatt a teljes hatóanyag mennyisége is. Ez az eredmény jól korrelál irodalmi adatokkal, miszerint 15% Eudragit<sup>®</sup> FS volt megfelelő a hatóanyagok vastagbélbe történő eljuttatásához (259; 260). Ezzel szemben Kaledaite és mtsai növényi hatóanyag tartalmú pelleték esetében 20% Eudragit<sup>®</sup> FS polimertartalom volt megfelelő és 40% hatóanyag oldódott ki 30 perc alatt (185), hasonlóan az eredményeimhez. Méréseim során 10 perc  $T_{lag}$  időt tapasztaltam ennél a polimernél pH 7,2 közegben de különböző pH értékeket publikáltak erre vonatkozóan: a pH 6,8 (185) és pH 7,5 (261), de az általános küszöb értéknek a pH 7,2 bizonyult (260) és a kioldódás megkezdéséhez szükséges idő ( $T_{lag}$ ) 20 perc (259) vagy 30 perc volt (260).

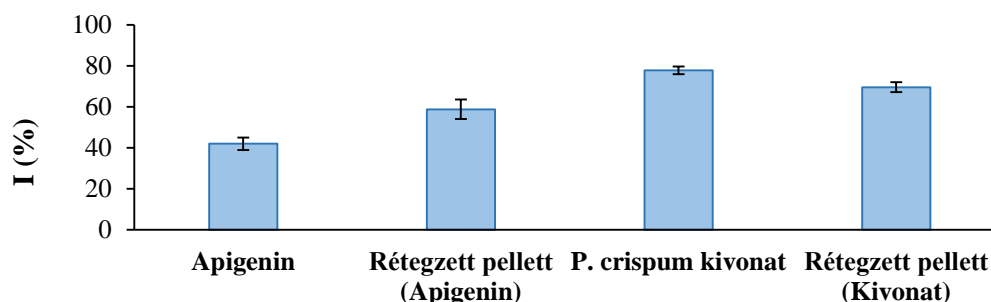
4.3.2.5. *Antioxidáns hatás vizsgálata*

Növényi hatóanyagok antioxidáns hatásának vizsgálatára az általam alkalmazott DPPH• módszert széles körben használják, mert könnyen elvégezhető, reprodukálható és összehasonlítható mérést tesz lehetővé (262; 263). Mivel az antioxidáns hatás függ a H-donor aktivitástól, így a hidroxiláltság fokától és sztérikus tulajdonságoktól is (264), ezért az apigenin aglikon molekula erősebb antioxidáns mint a glikozidjai, de gyengébb a sok komponensű növényi kivonathoz képest (**35. ábra**). Tehát minél nagyobb a szabadgyök gátlása (I,%), annál erősebb a minta antioxidáns hatása.



**35. ÁBRA** AZ APIGENIN ÉS GLIKOZIDJAI VALAMINT A *P. CRISPUM* KIVONAT ANTIOXIDÁNS HATÁSA

Az apigenin tartalmú és növényi kivonattal rétegzett pelletek szabadgyökfogó hatását a **36. ábra** szemlélteti. A rétegzett pelleteket összehasonlítva megállapítható, hogy a növényi kivonat megtartotta az erősebb antioxidáns hatását pelletekre történő rétegzés során is, de feltehetően a bomlékony antioxidáns vegyületek (pl.: karotinoidok) koncentrációjának lecsökkenése folytán gyengébb a hatású a kivonathoz képest. Így, habár a növényi kivonattal rétegzett pelletek kevesebb apigenint tartalmaznak, jobb hatásfokkal rendelkeznek, mint a csak apigenint tartalmazó magok. A standard oldathoz képest a nagyobb koncentrációnak köszönhetően a csak apigeninnel rétegzett magok erősebb antioxidáns tulajdonsággal rendelkeznek.

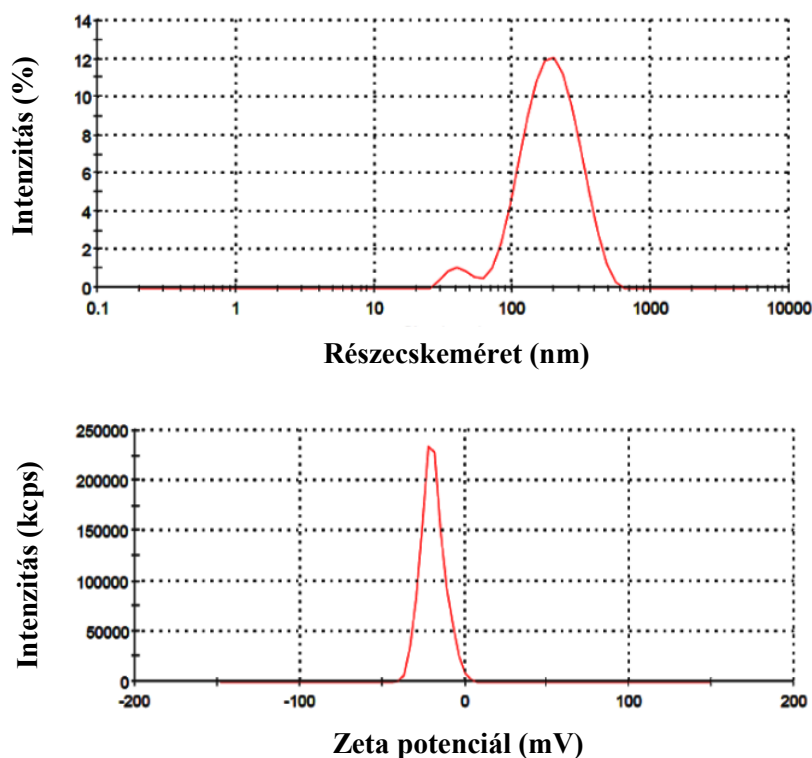


**36. ÁBRA** APIGENIN TARTALMÚ ÉS NÖVÉNYI KIVONATTAL RÉTEGZETT PELLETEK SZABADGYÖKFOGÓ HATÁSA

## 4.3.3. Albumin nanopartikulumok előállítása és jellemzése

## 4.3.3.1. Részecskeméret és zeta potenciál meghatározása

Az albumin széleskörűen vizsgált és alkalmazott protein hordozórendszer a gyógyszer-molekulák farmakokinetikai profiljának javítására és célzott hatóanyag bevitelre. Munkám során módosított NAB technológiát alkalmaztam az apigenin tartalmú BSA nanopartikulumok előállításához. A részecskék mérete kis mérettel ( $376 \pm 7,824$  nm) és alacsony PDI értékkel ( $0,285 \pm 0,01$ ) rendelkeztek (**37. ábra**). A PDI egy 0-tól 1-ig terjedő mutatószám és a vizsgált rendszer polidiszperzitását jelöli. Minél közelebb van az értéke 0-hoz, annál homogénebb a rendszer, tehát a minták monodiszperznek tekinthetők. A mérések átlagaként kapott zeta potenciál érték  $-19,20 \pm 0,818$  mV-nak bizonyult, így stabilnak is mondhatók. Irodalmi adatok szerint, ha a zeta potenciál érték (+/-)  $\sim 20$ - $30$  mV akkor a rendszer kolloidikai szempontból stabil, mert a részecskék közötti tasztítás akadályozza az aggregálódást (265).



**37. ÁBRA** API-BSA NP RÉSZECKEMÉRETE (R.NM) (FENT)  
ÉS ZETA POTENCIÁLJA (mV) (LENT)

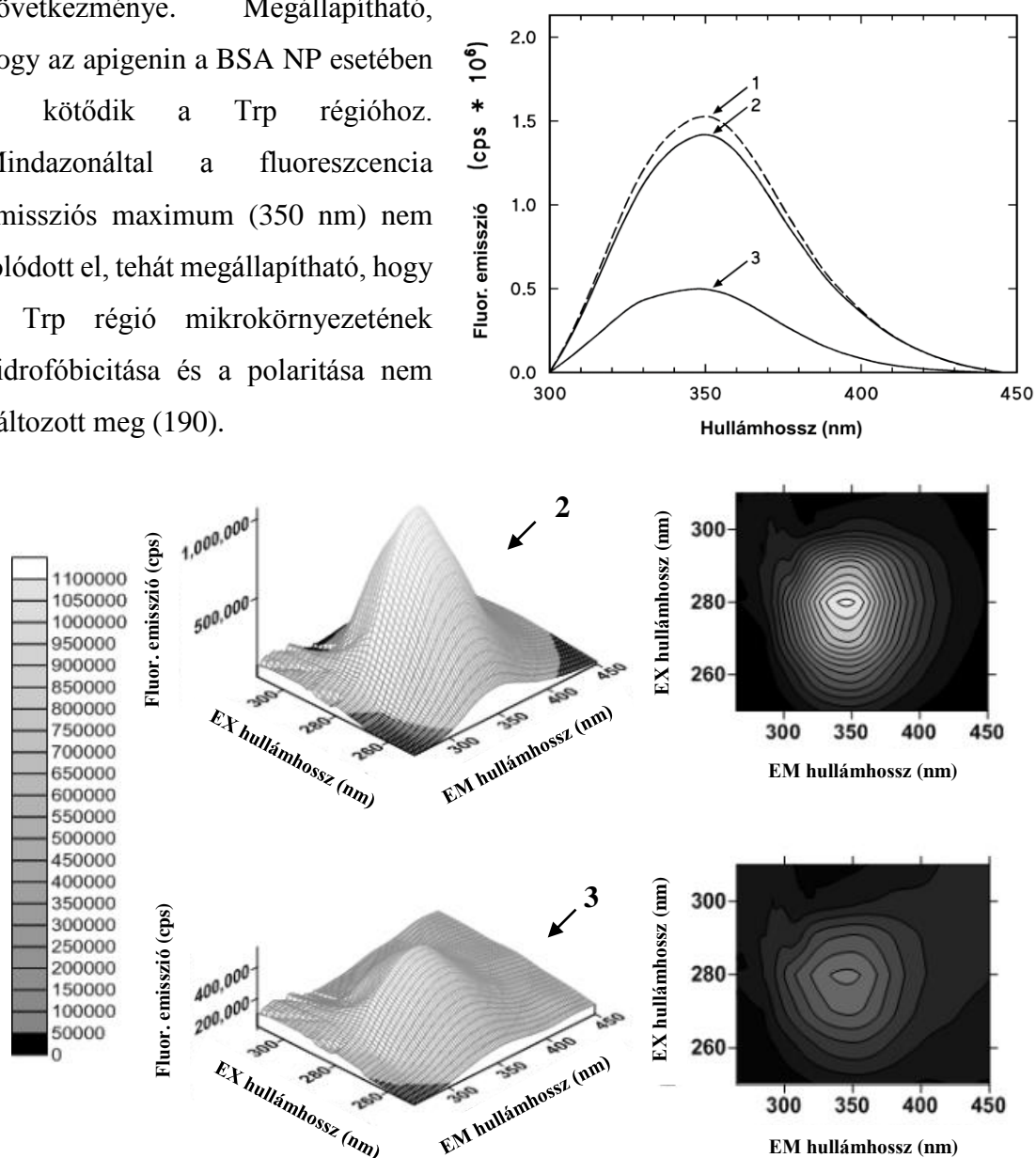
#### 4.3.3.2. *Hatóanyagtartalom és bezárési hatásfok meghatározása*

Magas bezárési hatásfokot ( $82,61 \pm 4,56\%$ ) és hatóanyagtartalmat ( $7,51 \pm 0,415\%$ ) értem el. Hasonló adatok találhatóak a flavonoid tartalmú albumin nanopartikulumok előállítására vonatkozóan. Például kurkumin tartalmú HSA NP előállítása során  $7,2 \pm 2,5\%$ -os a hatóanyagtartalmat mértek (202), kvercetin bezárási hatásfoka BSA NP-ba 85% volt (266), illetve szkutellarin tartalmú BSA NP bezárási hatásfoka 64,46%, míg hatóanyagtartalma 6,73%-nak bizonyult (201).

#### 4.3.3.3. *Fluoreszcencia spektroszkópia vizsgálatok*

Ismeretes, hogy a szérumban található triptofán régiók (HSA: Trp-214, BSA: Trp-134 és Trp-212), melyek a kötőhelyek felépítésében fontos szerepet játszanak, fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkeznek, azaz adott hullámhosszúságú fényrel gerjesztve fluoreszcencia emissziót bocsátanak ki. Ha a Trp régió molekuláris mikrokozma megváltozik, az a fluoreszcencia jel intenzitásának csökkenését eredményezi, ezért ennek nyomonkövetésével lehet következtetni a vendégmolekulák kötődésére is. A fluoreszcencia emisszió kioltása sokféle inter- és intramolekuláris folyamatok eredményeként jöhet létre, például a fehérje konformációjának megváltozása vagy egy komplex kialakulása folytán. A fluoreszcencia kioltás lehet statikus vagy dinamikus. A statikus kioltás folyamán a kioltó molekula egy stabil, nem fluoreszcens komplexet képez a fluorofór molekulával, míg a dinamikus kioltás során a kioltó molekula ütközik a fluorofór molekulával, így elősegíti annak nem fluoreszkáló, alapenergiaállapotba történő visszajutását (267). Az apigenin kötődése a szérumban albuminhez fluoreszcencia mérésekkel már bizonyított. A flavonoidot növekvő koncentrációban adva szérumban albumin (HSA vagy BSA) oldathoz csökkenti annak fluoreszcencia emisszió intenzitását (26; 268-271). Kisebb apigenin koncentrációban valószínűleg statikus kioltás következik be, mely komplex kialakulására utal, míg nagyobb apigenin koncentrációban akár dinamikus kioltás is előfordulhat (271). Mindazonáltal mindegyik publikáció azt erősítette meg, hogy az apigenin az albumin II A szubdoménhez kötődik elektrosztatikus és hidrofób kötésekkel, melynek következtében megváltozik a Trp régió konformációja (26; 268; 270), de a protein másodlagos szerkezete nem változik meg. A pH és az ionerősség befolyásolhatja a kötődés paramétereit ezáltal a kioltást is (272).

Azonban albumin nanopartikulumok viselkedését és az apigenin kötődését a NP-hoz fluoreszcencia mérésekkel még nem vizsgálták. Ezért apigenin tartalmú BSA NP előállítva, spektrofluoriméterrel mértem BSA oldat (1), BSA NP (2) és Api-BSA NP (3) fluoreszcencia emisszió intenzitását, melyet a **38. ábra** szemléltet. Látható, hogy az oldathoz és a hatóanyag nélküli nanorészecskékhez képest is az apigenin jelenléte jelentős mértékben csökkentette az albumin fluoreszcencia intenzitását. Az oldat és a NP intenzitásbeli különbsége feltehetően a fehérje konformáció változásának következménye. Megállapítható, hogy az apigenin a BSA NP esetében is kötődik a Trp régióhoz. Mindazonáltal a fluoreszcencia emissziós maximum (350 nm) nem tolódott el, tehát megállapítható, hogy a Trp régió mikrokörnyezetének hidrofóbicitása és a polaritása nem változott meg (190).



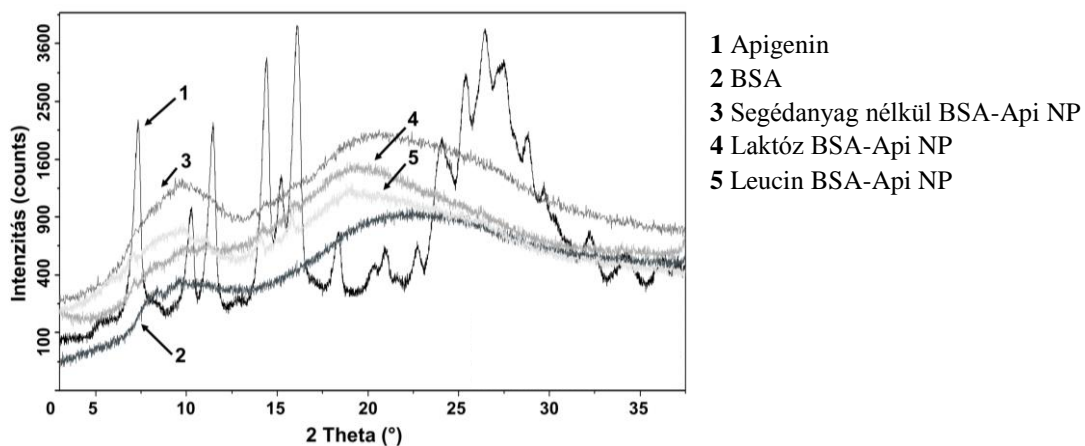
**38. ÁBRA** API-BSA NP FLUORESCENCIA EMISSZIÓS SPEKTRUMAI 2D ÉS 3D ÁBRÁZOLÁSBAN

#### 4.3.3.4. Nedvességtartalom meghatározása

A vizsgálataimat kis vízmennyiség meghatározására is alkalmas Karl Fischer titrátorral végeztem. Mindhárom készítmény alacsony víztartalommal volt jellemezhető, és a következő sorrendet követte: leucint tartalmazó ( $4,11 \pm 0,21\%$ , m/m), segédanyagot nem tartalmazó ( $4,55 \pm 0,49\%$ , m/m), laktózt tartalmazó ( $5,8 \pm 0,36\%$ , m/m). Látható, hogy ugyanolyan körülmények között előállított készítmények nedvességtartalma eltérő, mert a segédanyagok típusa és mennyisége befolyásolja. Magas hőmérsékletű levegővel alacsony víztartalom érhető el, de hőérzékeny anyagok esetén (pl.: inzulin) a szárítás optimális hőmérséklete  $\sim 60-65^\circ\text{C}$  (273). A porlasztva szárított amorf állapotú laktóz már 30%-os páratartalom felett könnyen kristályos állapotúvá válik (274), míg a leucin alacsony higroszkópicitással rendelkezik (275; 276). Az általam használt beállítási paraméterekkel ( $\sim 65^\circ\text{C}$  kilépő levegő) megfelelőnek bizonyult a készítmények nedvességtartalma és a legalacsonyabb víztartalommal a leucint tartalmazó készítmény rendelkezett. A nedvességtartalom az inhalációra szánt készítmények jelentős paramétere, hiszen nagy mértékben befolyásolja a részecskék aggregációra való hajlamát és stabilitását, így a készítmény aerodinamikai tulajdonságait.

#### 4.3.3.5. Röntgen por-diffrakció (XRPD)

Egy anyag szerkezetének vizsgálatára, így amorf vagy kristályos állapotának megállapítására az XRPD a legmegfelelőbb módszer (277). A **39. ábrán** az apigenin hatóanyag diffraktogramja látható összehasonlítva a készítményekével. Megállapítható, hogy az apigenin kristályos állapotára jellemző csúcsok nem jelennek meg a porlasztva szárított készítmények diffraktogramjain, tehát azokra az amorf állapot jellemző.

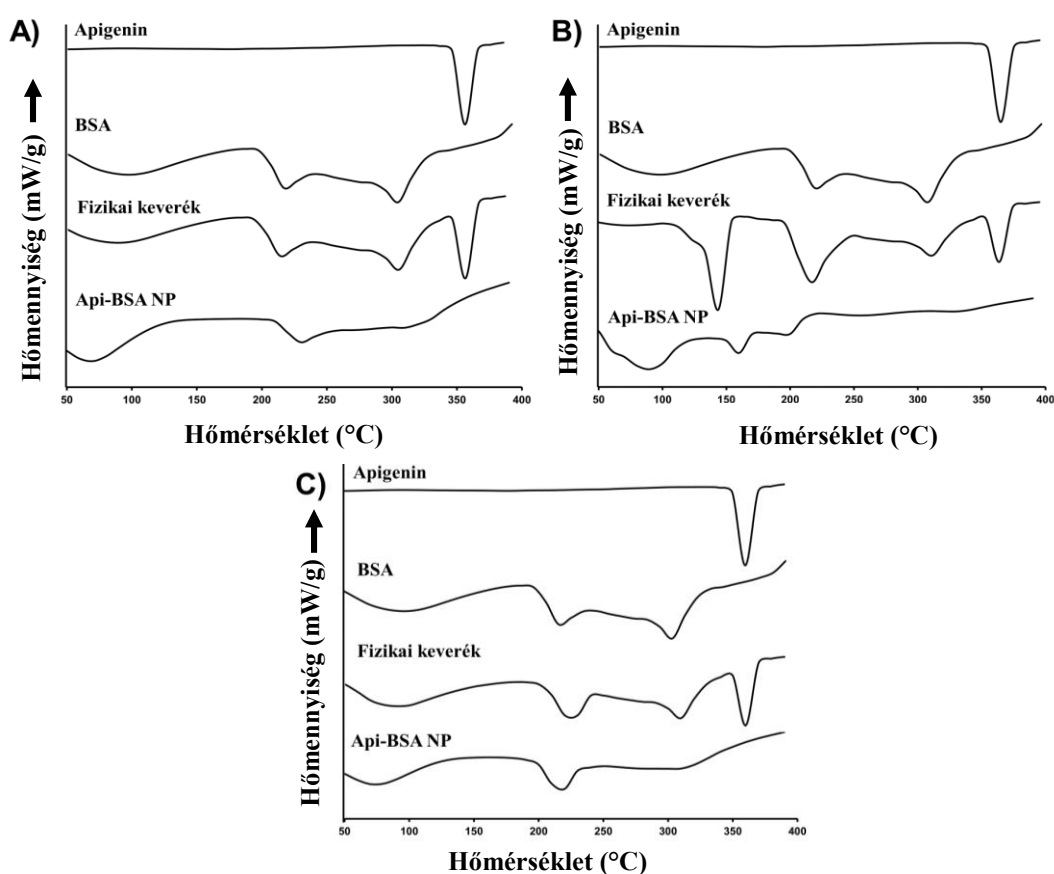


**39. ÁBRA** APIGENIN ÉS BSA NP KÉSZÍTMÉNYEK XRPD DIFFRAKTOGRAMJAI



4.3.3.6. *Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)*

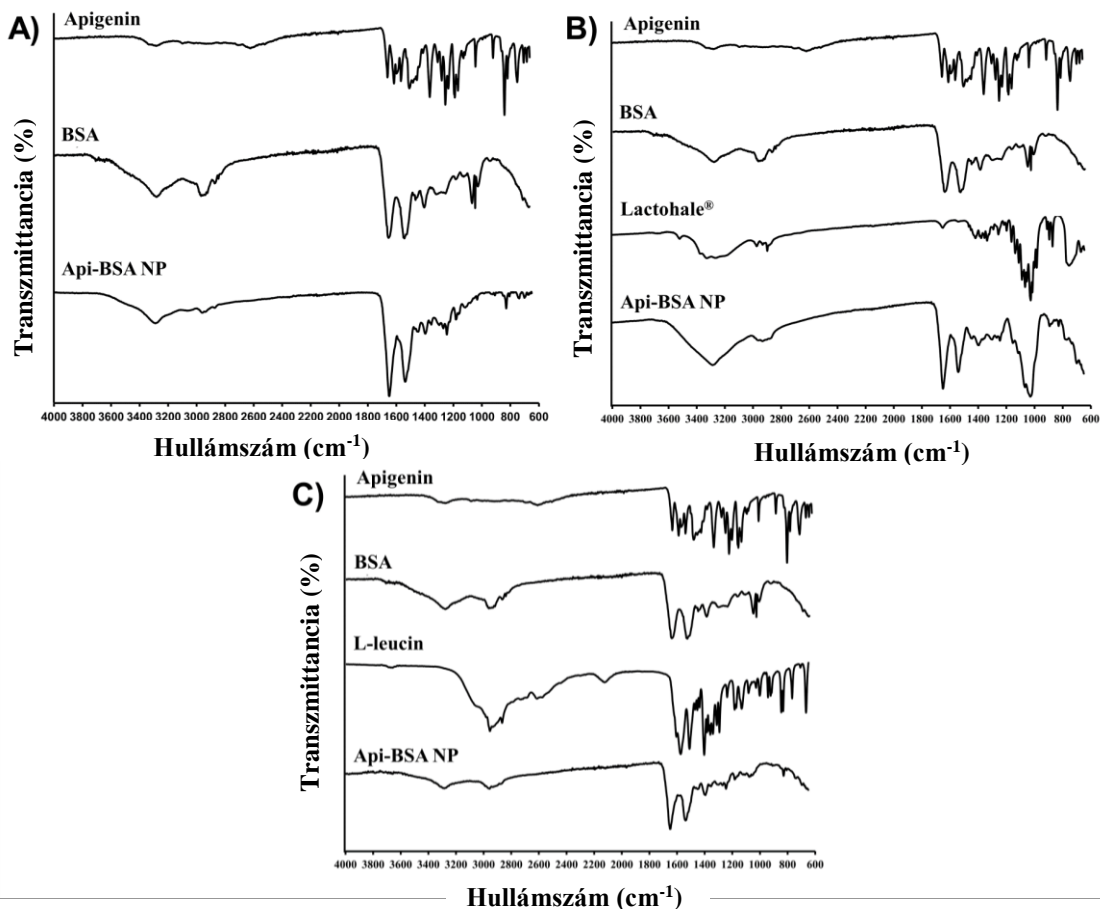
A DSC mérés alkalmas az anyagokban a hőközlés hatására lejátszódó folyamatok vizsgálatára, így azok tulajdonságaira és interakcióira lehet következtetni. Az apigenin, segédanyagok fizikai keverékei és a készítmények DSC termogramjait a **40. ábra** szemlélteti. A tiszta apigenin olvadáspontja az irodalmi adatokkal egyezően 360°C-nak bizonyult, melyet a keskeny endoterm csúcs jelöl (A). A BSA termogramján ezzel szemben két kiszélesedő csúcs látható (220°C és 310°C), mely a protein szerkezetéből és denaturációjából fakad. A fizikia keverékeknél az apigenin csúcsa jól látható, a kristályos struktúrára utalva, valamint kötődés sem feltételezhető az albuminnal. A fizikai keverékeket vizsgálva továbbá megállapítható, hogy a kristályos laktóz jelenlétét mutató endoterm csúcs 140°C-nál látható (B) (278), míg a jelentkező csúcs 200-230°C-nál leucin kistályokra utal (C) (279). A porlasztva szárított Api-BSA NP termogramjai alapján megállapítható, hogy az apigenin nanorészecskékbe zárva található, mert 360°C-nál egyik esetben sem található csúcs. Továbbá vízvesztésre utaló széles csúcs tapasztalható 50-120°C között és oxidációt jelez az BSA felfelé ívelő termogramja.



**40. ÁBRA** KÉSZÍTMÉNYEK DSC TERMOGGRAMJAI SEGÉDANYAG NÉLKÜL (A) LAKTÓZZAL (B) LEUCINNEL (C)

## 4.3.3.7. FTIR spektroszkópiai mérések

Mint már említettem az FTIR spektroszkópia alkalmas gyógyszer technológiai részfolyamatok nyomon követésére. Az **41. ábra** látható a három porlasztva szárított nanorészecskét tartalmazó készítmények spektruma összehasonlítva szintén a hatóanyaggal és a segédanyagokkal. Az apigenin spektrumát már elemeztem a 4.3.2.3. fejezetben. A szérum albumin spektrumán a fehérje szerkezetéből adódóan,  $1635\text{ cm}^{-1}$  hullámhossznál amid I (C=O kötés) és  $1530\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ -nél jellemzően amid II sávok, vagyis C-N és N-H kötésekre utaló rezgések láthatóak. Továbbá szintén a N-H kötésre ( $3276\text{ cm}^{-1}$ ) és alifás aminok jelenlétére utalnak a C-N vibrációk  $1057\text{ cm}^{-1}$ -nél. A segédanyag nélkül porlasztva szárított minták spektrumán jól látszódnak az albuminra jellemző amid sávok, mely megerősíti az eddigi vizsgálatokat, hogy az apigenin a nanopartikulumban zárva található. Jelenlétére  $830\text{ cm}^{-1}$  frekvencián megjelenő aromás csoport jele, továbbá az alifás aminra jellemző sáv hiánya a BSA konformáció változására utal (A).

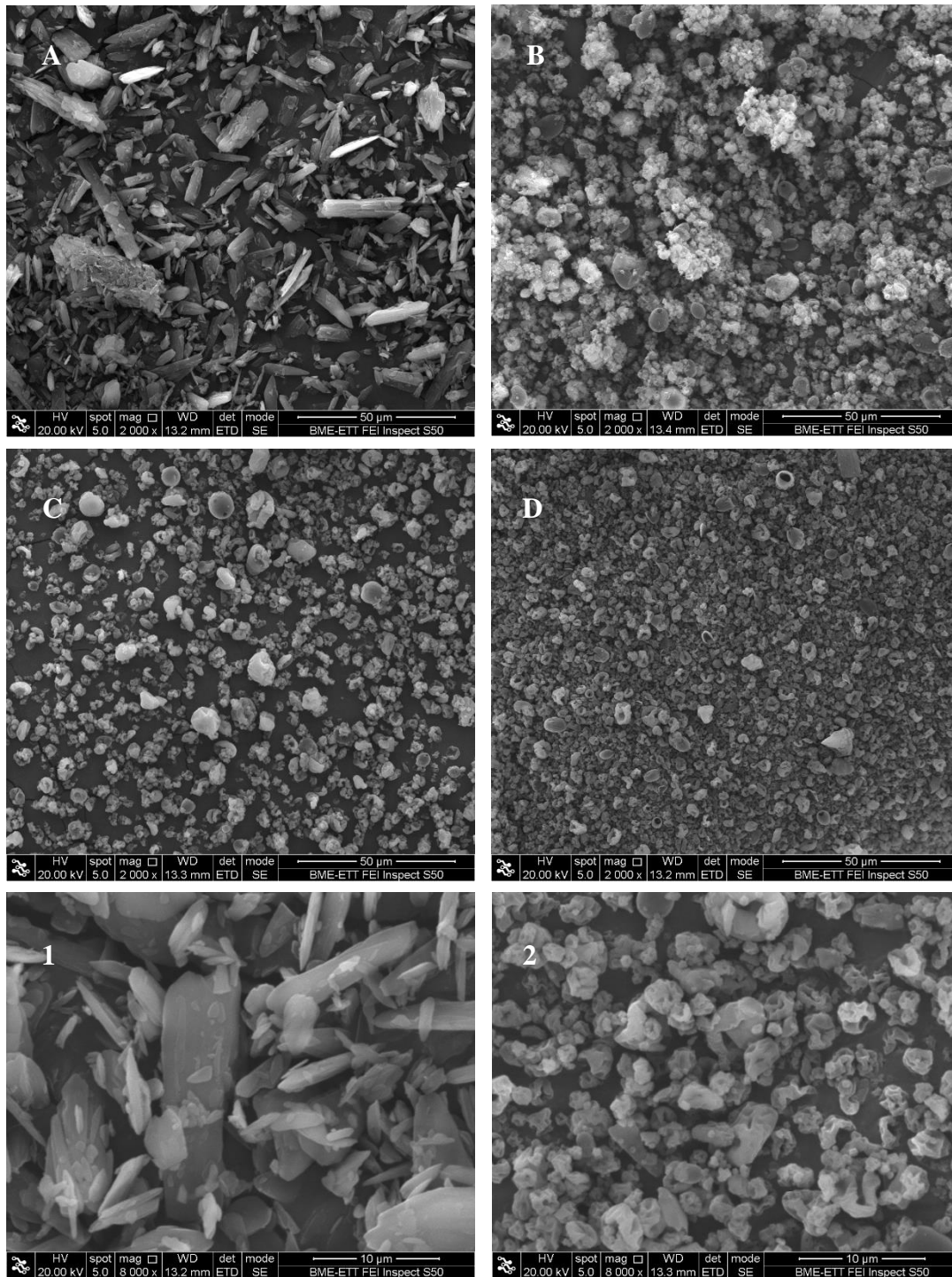


**41. ÁBRA** KÉSZÍTMÉNYEK FTIR SPEKTRUMAI SEGÉDANYAG NÉLKÜL (A) LAKTÓZZAL (B) LEUCINNEL (C)

A laktóz-monohidráatot tartalmazó készítmény spektrumát a **(B)** szemlélteti. A laktózban található hidroxilcsoportok rezgési  $3300\text{ cm}^{-1}$  frekvencián találhatóak, míg a C-O-C szerkezetre a glükóz és galaktóz molekulákban a  $1200\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$  tartományban megjelenő csúcsok jelölik. A kristályvíztartalmat pedig  $1654\text{ cm}^{-1}$ -nél jelentkező gyenge intenzitású sáv mutatja. A laktózzal formulált Api-BSA NP készítményben szintén a fehérje amid rezgési a dominánsak, de a laktózzal utaló széles sáv ( $1200\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$ ) is megjelenik. Közelebbről megvizsgálva ezt a régiót kevesebb kis csúcs látható, mely arra utal, hogy a laktóz amorf állapotban található (280). A nagy intenzitású jel  $3300\text{ cm}^{-1}$  frekvencián a készítmény víztartalmára utalhat, mely a nedvességtartalom mérések folyamán a laktóz tartalmú készítménynél bizonyult a legmagasabbnak. A leucin elágazó lánccal aminosav, mely alifás C-H kötésének rezgése  $2970\text{-}2910\text{ cm}^{-1}$  és C-N kötéshez tartozó  $1250\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ , míg a  $\text{NH}_2$  kötés  $1595\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  frekvencián jelenik meg (281). A porlasztva szárított minta spektrumán az albumin elfedi erre az aminosavra jellemző sávokat **(C)**.

#### 4.3.3.8. *Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM)*

Ismeretes, hogy a porlasztva szárítás során képződő termékek morfológiáját az anyag oldékonysága és a segédanyagok jelenléte is befolyásolja (275; 276). A porlasztva szárított NP morfológiai vizsgálatára SEM analízis alkalmaztam, melyet a **42. ábra** szemléltet. A kiindulási hatóanyag, az apigenin, tű alakú kristályok formájában található **(A)**, de ezzel szemben a segédanyag nélkül előállított Api-BSA nanorészecskék szférikusak, sima vagy redőzött felszínnel rendelkeznek **(B)**. A laktózt tartalmazó készítményben erősebben redőzött, nagyobb partikulumok is láthatóak **(C)**. A leucin pedig elősegítette kisebb és erősen redőzött részecskék kialakulását. Ez a leucin alacsony oldékonyságának köszönhető, mert porlasztva szárítás során körbeveszi a nanopartikulumok felszínét és akadályozza a víz diffúzióját **(D)** (282; 283). Ez a felszín elősegíti az inhalációs készítmények diszpergáltságát és így a belégzés folyamatát, mert lecsökkenti az interpartikuláris kohéziót (pl.: van der Waals erők) (284).



**42. ÁBRA** AZ APIGENIN (A) ÉS A KÉSZÍTMÉNYEK ELEKTRONMIKROSKÓPOS KÉPE 2000X NAGYÍTÁSBAN SEGÉDANYAG NÉLKÜL (B) LAKTÓZZAL (C) LEUCINNEL (D) ÉS 8000X NAGYÍTÁSBAN APIGENIN (1) ÉS LEUCIN KÉSZÍTMÉNY (2)

## 4.3.3.9. Lézer diffrakciós szemcseméret eloszlás vizsgálata

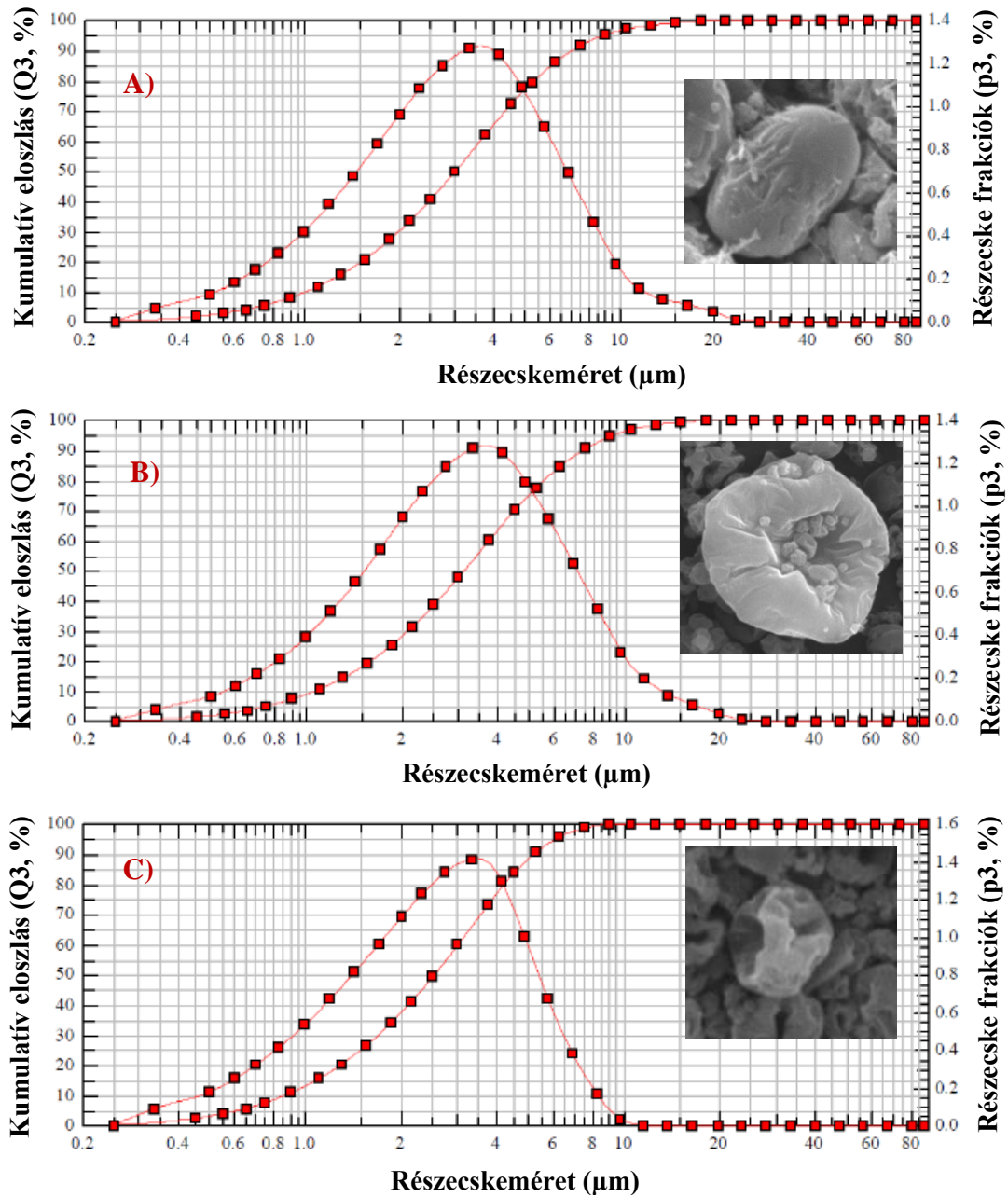
Inhalációra szánt porok legmeghatározóbb paraméterei a részecskék mérete, geometriája és felületi tulajdonságaik a hatás helyére történő eljutás szempontjából (285). A porlasztva szárított nanopartikulumok szemcseméretét és szemcseméret eloszlását Sympatec HELOS lézer diffraktométerrel vizsgáltam. A **XIV.táblázat** mutatja a készítmények részecskeméretét és térfogatmediánnak megfelelő aerodinamikai átmérőjét (VMD), a részecskeméret eloszlást pedig **43. ábra** szemlélteti. Látható, hogy a legkisebb mérettel a leucinnel készült minták rendelkeznek és a három készítmény közül ez lenne a legalkalmasabb az apigenin eljuttatására az alsó légutakba is. Ugyanis csak az 1-5 µm kötötti aerodinamikai átmérővel rendelkező részecskék képesek a tüdőben deponálódni. A 1-3 µm kötöttiek érik el a bronchiolusokat és 0,5-1 µm az alveolusokat (286). A 0,5 µm alatti részecskék tehetetlenségüknél fogva kilégzésre kerülnek, míg az 5 µm feletti a szájüregben szedimentálódnak és az ún. mukociliáris clearance hatására tovább szállítódnak a garatba. Ezt a tisztulási folyamatot a csillószőrös hámsejtek hajtják végre a természetes védekező mechanizmus részeként, melyhez hozzátartozik a tüdő alveolusaiban makrofágok által végzett fagocitózis is, ami a 1,5-3 µm nagyságú partikulumokat érinti. A részecskék méretére vonatkozó paramétereket és a rájuk ható erőket a **XV. táblázat** foglaltam össze (287; 288).

**XIV. TÁBLÁZAT NANOPARTIKULUMOK SZEMCSEMÉRET ELOSZLÁSA**

	<b>Segédanyag nélkül</b>	<b>Lactohale®</b>	<b>L-leucin</b>
<b>D<sub>10</sub> (µm)</b>	1,033 ± 0,032	1,020 ± 0,070	0,843 ± 0,680
<b>D<sub>50</sub> (µm)</b>	3,030 ± 0,092	3,107 ± 0,102	2,473 ± 0,300
<b>D<sub>90</sub> (µm)</b>	7,110 ± 0,306	7,117 ± 0,337	5,287 ± 0,670
<b>VMD (µm)</b>	3,707 ± 0,135	3,743 ± 0,221	2,907 ± 0,299

**XV. TÁBLÁZAT RÉSZECSEKÉKRE HATÓ ERŐK**

<b>Légutak részei</b>	<b>Részecske méret (µm)</b>	<b>Mechanizmus</b>
Felső légutak	5-10	Impaktálódás
Alsó légutak	1-5	Gravitációs szedimentálódás
Bronchiolusok	1-3	Gravitációs szedimentálódás
Alveolusok	0,5-1	Brown mozgás



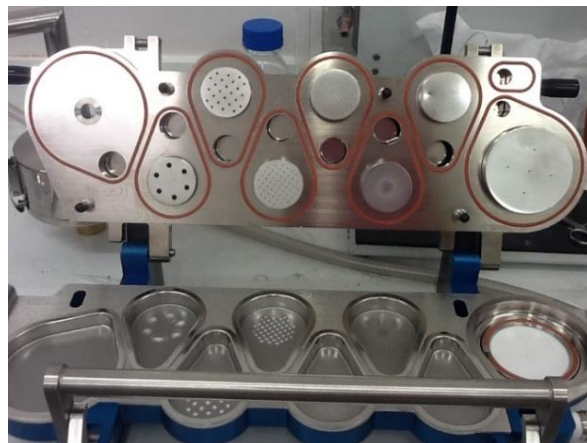
**43. ÁBRA** LÉZER DIFFRAKCIÓS SZEMCSEMÉRET ELOSZLÁS SEGÉDANYAG NÉLKÜL (A) LAKTÓZZAL (B) LEUCINNEL (C)

4.3.3.10. *In vitro* aerodinamikai tulajdonságok vizsgálata

Az inhalációra szánt nanorészecskék *in vitro* aerodinamikai tulajdonságainak meghatározásához a Gyógyszerkönyvben is hivatalos 7 fokozatú kaszkád impaktort (NGI) alkalmaztam, 60 l/perc térfogatárammal. Felépítését a **44. ábra** szemlélteti. A készülék működési elve, hogy a mozgásban lévő és részecskéket tartalmazó levegő áramába különböző átmérőjű nyílásokkal rendelkező kollektorok helyezkednek el. Így a részecskék különböző formájuk és méretük, valamint tehetetlenségük következtében a kollektorokba kerülnek (289). A készülék egyes fokozatainak ún. részecskeátmérő küszöbértékeit (cut-off diameter), ami azt jelenti, hogy 50%-ban fogják fel a részecskéket a **XVI. táblázat** tartalmazza.

**XVI. TÁBLÁZAT** NGI EGYES FOKOZATAINAK RÉSZECSEÁTMÉRŐI

Fokozatok	Átmérő küszöbérték (µm)
1	8,06
2	4,46
3	2,82
4	1,66
5	0,94
6	0,55
7	0,34

**44. ÁBRA** NGI KÉSZÜLÉK

A vizsgált Api-BSA NP aerodinamikai tulajdonságait **XVII. táblázat** szemlélteti. Megállapítható, hogy a kapszulák portartalmának több, mint 90%-a visszanyerhető (RD). Tehát a mérés mindegyik esetben megfelelő adatokkal szolgált, mert az elfogadható tartomány 75-125% közé esik. Továbbá az emittált dózis (ED), mely fontos mutatószám a készítmény alkalmazhatóságát illetően (275; 283), mindhárom esetben 90% feletti volt,

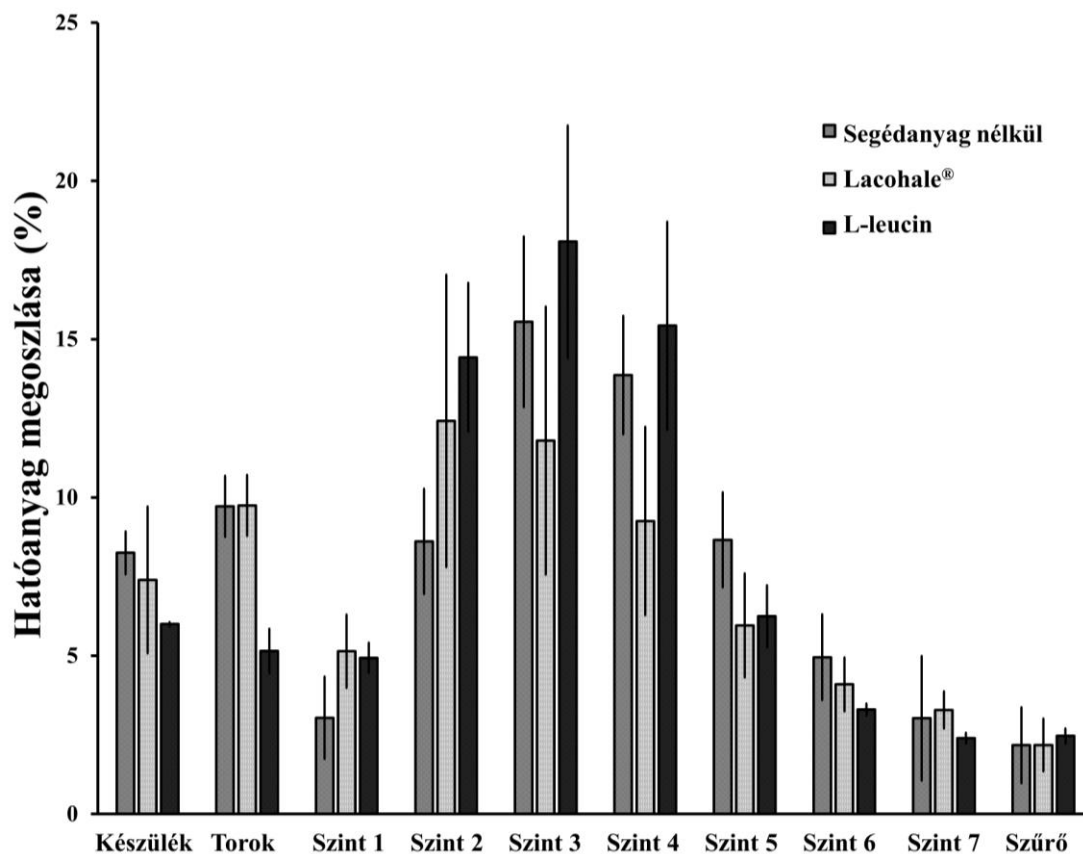
tehát a kapszula tartalma könnyen bekerül a készülékbe a levegőáram hatására. A finom részecske frakció (FPF) értéke, tehát az a hányad, amely az alsó légutakba bekerül és a terápiás hatékonyságot biztosítja, a pulmonális készítmények egyik legfontosabb aerodinamikai jellemzője. Értéke 50% körül kedvező tulajdonságokra utal, de minél magasabb, annál hatékonyabb a készítmény (287). Látható, hogy az általam előállított minták közül a várakozásoknak megfelelően a leucin tartalmú rendelkezett a legmagasabb FPF értékkel, de a többi készítmény is valószínűsíthetően bejutna a respiratorikus régióba. Ezt követően számításokat végeztem a minták tömegmediánnak megfelelő aerodinamikai átmérőjére (MMAD) és a geometriai szórására (GSD) vonatkozóan. Általánosságban elmondható, hogy ha az MMAD értéke 5 µm alatti akkor a készítmény kedvező diszperzibilitásának következtében bejut az alsó légutakba, az optimális értéke 2-3 µm (287). Látható, hogy mindhárom esetben az MMAD értékek az optimális tartományban találhatók és jól korrelálnak a lézer diffrakciós mérések során kapott értékekkel. Továbbá a GSD értékek, melyek az inhalációs porok részecskeméret eloszlását jelölik (290), a megfelelő szűk tartományban találhatóak (< 3 µm).

#### XVII. TÁBLÁZAT NANOPARTIKULUMOK AERODINAMIKAI TULAJDONSÁGAI

	Segédanyag nélkül	Lactohale®	L-leucin
<b>RD (%)</b>	99,100 ± 5,012	94,700 ± 4,091	96,300 ± 2,161
<b>ED (%)</b>	91,862 ± 2,735	93,950 ± 1,046	95,183 ± 0,667
<b>FPF (%)</b>	65,617 ± 3,422	58,463 ± 6,031	66,090 ± 2,777
<b>MMAD (µm)</b>	3,210 ± 0,069	3,130 ± 0,001	2,123 ± 0,098
<b>GSD (µm)</b>	2,823 ± 0,113	2,270 ± 0,212	1,887 ± 0,063

Az **45. ábra** mutatja az *in vitro* mérés során vizsgált apigenin megoszlását az inhalátor készülékben és az NGI szintjei között. A készítmények hasonlóan jó megoszlást mutatnak, mely a továbbiakban megerősíti magas az emittált dózist is. Továbbá az alveoláris régiókba történő eljutás feltételezhető, ugyanis részecskék nagy része a 2-4 szint között található. Jól látható, hogy a laktózt tartalmazó készítmény inkább a 2 szint, míg a leucint tartalmazó a 3-4 szintél ér el maximumot, tehát jobb aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkezik. Ezt irodalmi adatok is megerősítik, miszerint a leucint alkalmazva javította a naringin flavonoid (291) aerodinamikai tulajdonságait is.

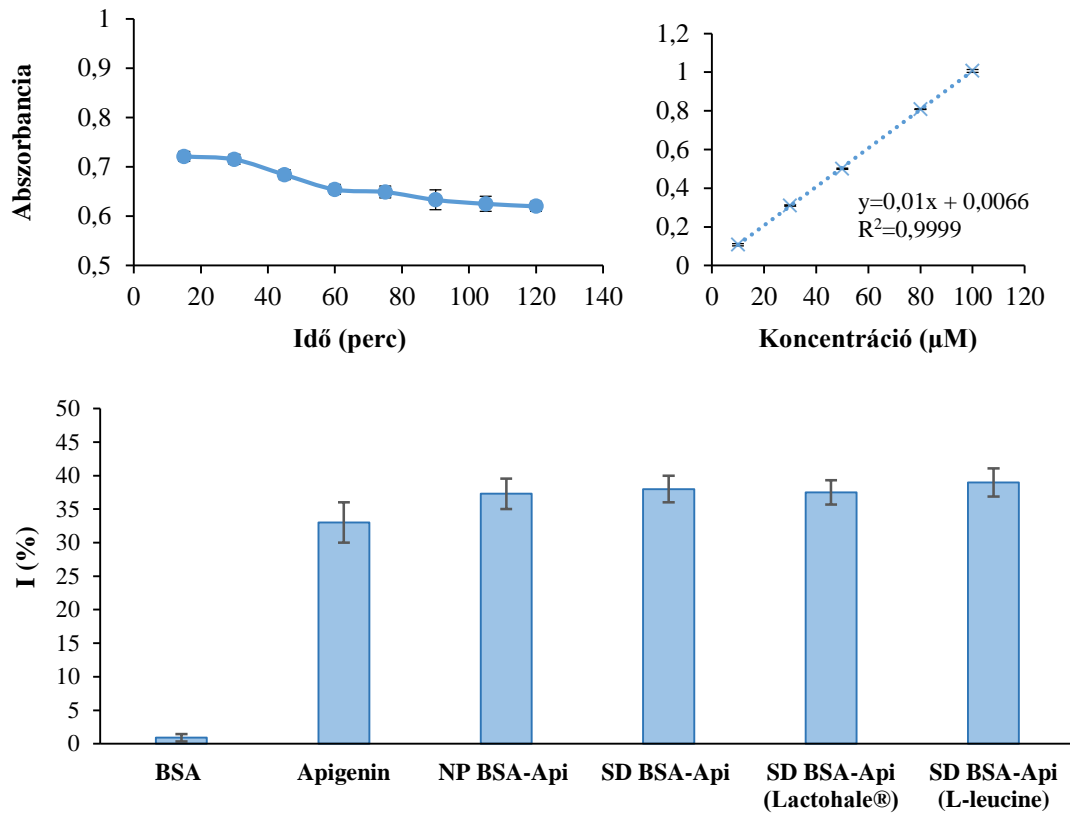




45. ÁBRA KÉSZÍTMÉNYEK MEGOSZLÁSA AZ NGI SZINTJEI KÖZÖTT

#### 4.3.3.11. Antioxidáns vizsgálat

Az apigenin koloidális hordozórendszerekbe formulálva is megőrzi szabadgyökfogyó képességét, melyre több példát is találhatunk az irodalomban. Mivel várhatóan lassabb kinetika jellemzi a reakciót mint oldott formában, ezért hosszabb ideig végeztem a vizsgálatokat. Azt az eredményt kaptam, hogy 60 perc után is még kissé csökkent az abszorbancia, tehát még zajlott a reakció. A mérés végpontját 120 percnél állapítottam meg és az oldatban maradt szabadgyök pontos koncentrációját az **46. ábrán** látható kalibráló egyenessel határoztam meg. Megállapítható, hogy az apigenin albumin nanopartikulumban zárva és a BSA nanorészecskék porlasztva szárítását követően is megtartották antioxidáns hatásukat. Látható továbbá, hogy a szérumban albumin is rendelkezik gyenge szabadgyökfogyó képességgel, melyet irodalmi adatok is alátámasztanak (292). Az eredményekből megállapítottam, hogy az albumin az apigenin szabadgyökfogyó képességét nem gátolja, hanem elősegíti. Mérési eredményeimet irodalmi adatok is alátámasztják, miszerint az albumin képes megőrizni a rutin és kempferol (200), valamint a kvercetin (199) antioxidáns kapacitását is.



**46. ÁBRA** AZ APIGENIN-BSA NP REAKCIÓKINETIKÁJA, DPPH<sup>•</sup> KALIBRÁCIÓS EGYENES (FENT) ÉS A KÉSZÍTMÉNYEK ANTIOXIDÁNS HATÁSA (LENT)

## 5. MEGBESZÉLÉS

A bioaktív hatóanyagok kivonása során az extrakció hőfokának és az oldószer polaritásának nagy jelentősége van a flavonoid aglikon és glikozidjainak mennyiségében. Ezért első lépésként optimalizáltam az apigenin kivonásának körülményeit szárított *P. crispum* levélből és ellenőriztem a hőmérséklet és az őrlés hatását az antioxidáns kapacitásra. Megállapítható, hogy habár az antioxidáns kissé csökkent, egyik paraméter sem befolyásolta jelentős mértékben a kivonat szabadgyökfogó aktivitását. Az így előállított *P. crispum* kivonatban található összapigenin tartalom mérésére optimalizált HPLC-UV analitikai módszert használtam. A savas hidrolízisnek alávetett minták tömegspektrometriás mérésével igazoltam az apigenin aglikon jelenlétét a kivonatban.

Az apigenin oldékonyságának javítására alap és származék ciklodextrineket használtam fel. Különböző fiziológiás pH értékeken vizsgáltam a kialakult zárványkomplexek sztöchiometriáját és stabilitási állandóit fázis-oldhatósági vizsgálatok segítségével, melyek egyértelmű kísérleti bizonyítékot szolgáltatnak az apigenin és a ciklodextrinek között lejátszódó zárványkomplekképződésre. Az oldhatósági izotermák lineáris szakaszai arra engednek következtetni, hogy egyes CD-eknél széles koncentráció tartományban is 1:1 sztöchiometriájú, ún. „host-guest” típusú zárványkomplexek keletkeznek. Azonban a közeg pH értéke, ionerőssége, az apigenin molekula ionizáltsági foka és másodlagos kötőerők létrejötte is jelentősen képesek befolyásolni a komplekképzési hajlamot. Eredményeim továbbá alátámasztják, hogy a származék CD-ek hatékonyabban képesek megnövelni az apigenin oldékonyságát és képesek fokozni az antioxidáns hatását feltehetőleg a létrejövő H-híd kötések ezáltal a megnövekedett H donor aktivitás következtében. Következésképpen a legnagyobb antioxidáns kapacitással az Api-HP-β-CD komplex rendelkezik.

Különböző bevonattal rendelkező, ezáltal helyspecifikus hatóanyagleadást biztosító apigenin-tartalmú multipartikuláris pelleteket állítottam elő, melyek megfelelnek a gyógyszerkönyvi előírásoknak. Az MCC inert pelletmagok alkalmas hordozónak bizonyultak az apigenin és a növényi kivonat számára is. A növényi kivonat rétegzése sem rontott az inert pelletmag kedvező tulajdonságain. Alacsony nedvességtartalommal jellemezhetőek a pelletek, megfelelő mechanikai szilárdság és gördülékenység a további kapszulázás vagy tablettázás szempontjából fontos paraméterek. Az apigenin módosított leadása biztosítható Eudragit® L és Eudragit® FS

polimerekkel. Az filmbevonattal rendelkező pelletek kioldódás vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy a növényi kivonatban található, vízben jól oldódó apigenin glikozidok kioldódási profilja kissé gyorsabb, mind az Eudragit® L esetében, mind az Eudragit® FS esetében a vízben rosszul oldódó apigenin aglikonhoz képest. 10% Eudragit® L polimerrel történő bevonás már biztosította gasztrorezisztens bevonatot, míg a célzott vastagbélben történő kioldódást csak a 15% Eudragit® FS polimer mennyiség. Az antioxidáns hatás vizsgálata is alátámasztja mindkét készítmény hatékonyságát *in vitro*.

Fiziológiás körülményekből adódóan a tüdő rendkívül kedvező beviteli kapu, inhalációval lokális és szisztémás hatás egyaránt megvalósítható. Hordozórendszerként egy biodegradábilis fehérjét, a szérum albumint használtam fel, mely lehetővé tenné az apigenin hatásának fokozottabb kifejtését. Apigenin tartalmú albumin nanorészecskéket állítottam elő és vizsgáltam a részecskeméretet, zeta potenciált és a hatóanyag tartalmat. Az elvégzett vizsgálatokból megállapítható, hogy az apigenint sikeresen lehet formulálni szérum albumin nanorészecskébe, így várhatóan nő az oldékonysága ezáltal a biohasznosíthatósága a szervezetben. Továbbá fluoreszcencia vizsgálatokkal igazoltam, hogy az apigenin az albumin fehérje II A szubdomén kötőhelyénél helyezkedik el a nanorészecskében is, csakúgy mint oldatban és a szervezetben.

Ezt követően a nanopartikulumokat porlasztva szárítottam segédanyag nélkül, tradicionális (hordozó alapú) és új típusú (hordozómentes) segédanyagokkal. Az általam előállított száraz-porinhalációs készítmények optimális aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkeztek *in vitro*. A nanopartikulumok segédanyag nélkül történő porlasztva szárítást követően is megfelelő paraméterekkel rendelkeznek a pulmonális hatóanyag bevitelhez, melyet a felhasznált segédanyagok közül az új típusú L-leucin hatékonyabban segített elő. Ebből következik, hogy akár segédanyag nélkül is a célzott hatóanyagleadás megvalósítható. Az apigenin antioxidáns hatását nem befolyásolta a formulálás.

Az eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy a választott multipartikuláris rendszerek segítségével mind helyspecifikus, mind a célzott hatóanyagleadás megvalósítható. Emellett egyik rendszer sem csökkentette az apigenin szabadgyökfogó képességet, ezáltal a terápiás hatást sem gátolják a formulálási eljárások.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

### 1. Oldékonyság növelés ciklodextrinekkel

- Az alap- és származék ciklodextrineket vizsgálva arra a következtetésre jutottam, hogy a származék ciklodextrinek jelentősebb mértékben képesek növelni az apigenin vízdékonyságát.
- A  $\beta$ -CD ionos és nem ionos származékai közül leginkább a RM- $\beta$ -CD képes megnövelni az apigenin koncentrációját vizes oldatban, mintegy 150-szeres oldékonyság növelés érhető el pH 6,8 értékű közegben (~0,230 mg/ml).
- Megállapítottam, hogy az apigenin 1:1 arányú komplexet képez SBE- $\beta$ -CD és HP- $\beta$ -CD származék ciklodextrinekkel.
- Spektroszkópiai mérések azt igazolják, hogy az apigenin molekula kromofór része a ciklodextrinek üregében helyezkedik el és másodlagos kötőerők is szerepet játszanak a zárványkomplex kialakulásában.
- A komplexképződésnek következtében jelentősen nőtt az antioxidáns hatás, mely a nagyobb koncentráció és a megnövekedett H-donor aktivitásnak is köszönhető.

### 2. Módosított hatóanyagleadás multipartikuláris pelletekkel

- Munkám során igazoltam, hogy a mikrokristályos cellulóz inert pelletmag alkalmas hordozója az apigenin és az apigenin tartalmú növényi kivonat számára is (~20 mg/1 g pellet és ~5 mg/1 g pellet).
- Egyaránt kedvező fizikai paraméterekkel rendelkeznek a rétegzett és a filmbevonattal rendelkező magok, mind szemcsealak, szemcseméret eloszlás és a mechanikai tulajdonságok tekintetében. Alacsony nedvességtartalom jellemzi a pelleteket és a kedvező gördülékenységi adatok jó kapszulázhatóságra utalnak.
- A filmbevonat nélküli pelletek esetében azonnali kioldódás valósul meg HPMC kötőanyag révén az inert pelletek felületéről, a közeg pH-jától függetlenül.
- 10% (m/m) Eudragit<sup>®</sup> L 30 vagy 15% (m/m) Eudragit<sup>®</sup> FS 30 filmképző polimer bevonat képes biztosítani a módosított hatóanyagleadást.
- A növényi kivonatban található, vízben jól oldódó apigenin glikozidok kioldódási profilja kissé gyorsabb, mindkét polimer esetében a vízben rosszul oldódó apigenin aglikonhoz képest.

- Az antioxidáns hatás vizsgálata alátámasztja mindkét készítmény hatékonyságát *in vitro*.

### 3. Célzott hatóanyagleadás nanorészecskékkel

- Magas bezárási hatások, kedvező méret és zeta potenciál értékek következtében a szérumban albumin alkalmas biodegradálható hordozónak bizonyult az apigenin számára (~1,7 mg/ml).
- Fluoreszcencia vizsgálatok igazolták, hogy az apigenin az albumin fehérje II A szubdomén kötőhelyénél helyezkedik el a nanorészecskékben is.
- Porlasztva szárítást követően mindhárom szérumban albumin formula alacsony nedvességtartalmú és optimális aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkezik *in vitro*.
- Tehát a részecskék segédanyag nélkül is megfelelő paraméterekkel rendelkeznek a pulmonális hatóanyag bevitelhez, melyet a felhasznált segédanyagok közül a L-leucin hatékonyabban segített elő (~2 mg/ dózis).
- Az apigenin az antioxidáns hatását albumin nanorészecskékbe zárva is megtartotta.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban jelentős kihívást jelent a biológiai forrásból származó molekulák gyógyszerhordozó rendszerekbe történő formulálása. Miközben növekszik az igény a fitofarmakonok gyógyszeres terápiában történő alkalmazására, szervezetbe juttatásuk lehetőségeit korlátozza alacsony vízdékonyságuk és biohasznosíthatóságuk. Egy megfelelő gyógyszerhordozó rendszer kifejlesztése új távlatokat nyithat azáltal, hogy optimális formulálás révén biztosítja a hatóanyag megfelelő koncentrációját a hatás helyén. Az apigenin, mint bioaktív flavonoid számos igazolt, jelentős terápiás hatással rendelkezik, melyeket a káros szabadgyökök gátlásán keresztül fejt ki. Ugyanakkor rossz vízdékonysága, illetve bizonytalan felszívódása következtében kedvezőtlen a biológiai hasznosíthatósága.

Doktori munkám célja volt az apigenin vízdékonyságának növelése, illetve olyan gyógyszerhordozó rendszer formulálása volt, amely egyrészt szabályozott hatóanyag-felszabadulással rendelkezik, másrészt megőrzi antioxidáns aktivitását a szabadgyökökkel összefüggésbe hozható degeneratív betegségek megelőzése és kezelése számára. A hatóanyag oldódásának elősegítése céljából  $\beta$ -ciklodextrin származékokat alkalmazva jelentős javulás volt megfigyelhető az oldékonyságban és antioxidáns hatásban egyaránt.

Megfelelő adagolási forma céljából olyan multipartikuláris hordozórendszerek formulálási lehetőségeit vizsgáltam, amelyek magas hatóanyagtartalmuk mellett módosított hatóanyagleadással is rendelkeznek. Orális adagolásra szánt, különböző bevonattal rendelkező gyógyszeres pelleteket állítottam elő, amelyek helyspecifikus hatóanyagleadást biztosítanak és a bélben kialakult magasabb koncentráció következtében magasabb biohasznosíthatóság várható. A formulálás során a bioaktív hatóanyagot növényi extraktum formájában is feldolgoztam és a szinergista komponensek jelenlétében kialakult erősebb antioxidáns hatás kialakulása igazolt. Alternatív adagolás számára olyan száraz porinhalációs rendszert állítottam elő, amelyben az apigenint szérum albumin nanorészecskék hordozzák, ugyanakkor a porlasztva szárítást követően képződő szemcseaggregátumok az antioxidáns aktivitás megőrzése mellett megfelelő aerodinamikai tulajdonsággal rendelkeznek.

## 8. SUMMARY

Formulating bio-based molecules into drug delivery systems is a major challenge nowadays. While there is growing demand for the administration of phytopharmacocon in drug therapy, their low water solubility and bioavailability limit their absorption. The development of an effective drug delivery system can open up new prospects by ensuring the adequate concentration of the active substance at the site of action due to optimal formulation. Apigenin is a bioactive flavonoid that scavenges free radicals and has a number of verified substantial therapeutic effects. However, its bioavailability is unfavorable due to its low water solubility and uncertain absorption.

The purpose of my doctoral work was to enhance the water solubility of apigenin and the formulation of a drug delivery system with a controlled release of the active ingredient, which at the same time maintains its antioxidant activity for the prevention and treatment of degenerative diseases that can be associated with free radicals. Both solubility and the antioxidant effect were significantly greater when  $\beta$ -cyclodextrin derivatives were used in order to enhance the solubility of the active ingredient.

To obtain the adequate dosage form I examined the formulation potentials of multiparticulate drug delivery systems with both high active ingredient content and modified release. I prepared pellets for oral dosage with different types of polymer coating, ensuring site-specific active ingredient release and thus, due to the higher concentration in the intestines, higher bioavailability is to be expected. In the formulation process I prepared the active ingredient also as a vegetal extract and the formation of the stronger antioxidant activity has been confirmed with the synergistic components. As alternative dosage I created a dry-powder inhaler system where apigenin is binded to serum albumin nanoparticles and at the same time the beads aggregates created after spray drying maintain antioxidant activity and have the adequate aerodynamic characteristics.



## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Szőke É, Blázovics A, Kéry Á, Kursinszki L, Lemberkovics É, Then M, Alberti-Dér Á, Balogh Gy, Bányai P, Blazics B, Böszörményi A, Kalász H, Könczöl Á, Lugasi A, Szarka Sz, Szentmihályi K, Vasas G. Gyógynövény és Drogismeret Farmakognózia-Fitokémia, gyógynövények alkalmazása. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2012: 105-185.
2. Havsteen BH. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, 96: 67-202.
3. Hostetler G, Riedl K, Cardenas H, Diosa-Toro M, Arango D. Schwartz S, Doseff AI. (2012) Flavone deglycosylation increases their anti-inflammatory activity and absorption. *Mol Nutr Food Res*, 56: 558-569.
4. Chen XW, Serag ES, Sneed KB, Zhou SF. (2011) Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance. *Chem Biol Interact*, 192: 161-176.
5. Batra P, Sharma A. (2013) Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3: 439-459.
6. Beecher GR. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*, 133: 3248S-3254S.
7. Vogiatzoglou A, Mulligan AA, Lentjes MAH, Luben RN, Spencer JPE. (2015) Flavonoid intake in European adults (18 to 64 Years). *PLoS ONE*, 10: e0128132.
8. Thormann U, Hanggi R, Kreuter M, Imanidis G. (2015) Membrane transport of nobiletin conjugation products and use of the extract of *Chamomillae romanae flos* influence absorption of nobiletin in the Caco-2 model. *Eur J Pharm Sci*, 70: 92-106.
9. Hollman PC, Katan MB. (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, 51: 305-310.
10. Karakaya S, Nehir El S. (1999) Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food Chem*, 66: 289-292.
11. Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. (2007) A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 121: 2225-2232.

12. Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson SE, Cramer DW. (2009) Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer*, 124: 1918-1925.
13. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*, 20: 21-29.
14. Lugasi A HJ, Sági KV, Bíró L. (2003) The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biol Szeged*, 47: 119–125.
15. Bhagwat S, Haytowitz, D.B. Holden, J.M. (2014) USDA Database for the flavonoid content of selected foods, Release 3.1. USA: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. <http://www.ars.usda.gov/>
16. Haghi G, Hatami A, Safaei A, Mehran M. (2014) Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV. *Res Pharm Sci*, 9: 31-37.
17. Christensen LP, Brandt K. (2006) Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 41: 683-693.
18. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett*, 436: 71-75.
19. Berrin JG, Czjzek M, Kroon PA, McLauchlan WR, Puigserver A, Williamson G, Juge N. (2003) Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic beta-glucosidase. *Biochem J*, 373: 41-48.
20. Birt DF, Hendrich S, Wang W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 90: 157-177.
21. Németh K, Plumb GW, Berrin J-G, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell  $\beta$ -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*, 42: 29-42.
22. Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandström B, Dragsted LO. (1999) Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br J Nutr*, 81: 447-455.

23. Meyer H, Bolarinwa A, Wolfram G, Linseisen J. (2006) Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. *Ann Nutr Metab*, 50: 167-172.
24. Cao J, Zhang Y, Chen W, Zhao X. (2010) The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr*, 103: 249-255.
25. Zhang J, Liu D, Huang Y, Gao Y, Qian S. (2012) Biopharmaceutics classification and intestinal absorption study of apigenin. *Int J Pharm*, 436: 311-317.
26. Yuan JL, lv Z, Liu ZG, Hu Z, Zou GL. (2007) Study on interaction between apigenin and human serum albumin by spectroscopy and molecular modeling. *J Photochem Photobiol-A*, 191: 104-113.
27. Gradolatto A, Canivenc-Lavier MC, Basly JP, Siess MH, Teyssier C. (2004) Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metab Disp*, 32: 58-65.
28. Teng Z, Yuan C, Zhang F, Huan M, Cao W, Zhou S, Mei Q. (2012) Intestinal absorption and first-pass metabolism of polyphenol compounds in rat and their transport dynamics in Caco-2 cells. *PLoS One*, 7: e29647.
29. Jiang W, Xu B, Wu B, Yu R, Hu M. (2012) UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A9-overexpressing HeLa cells is an appropriate tool to delineate the kinetic interplay between breast cancer resistance protein (BCRP) and UGT and to rapidly identify the glucuronide substrates of BCRP. *Drug Metab Disp*, 40: 336-345.
30. Liu X, Tam VH, Hu M. (2007) Disposition of flavonoids via enteric recycling: determination of the UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) isoforms responsible for the metabolism of flavonoids in intact Caco-2 TC7 cells using siRNA. *Mol Pharm*, 4: 873-882.
31. Hu M, Chen J, Lin H. (2003) Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. *J Pharmacol Exp Ther*, 307: 314-321.
32. Mohammed RS, Abou Zeid AH, El Hawary SS, Sleem AA, Ashour WE. (2014) Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L. leaves. *Saudi J Biol Sci*, 21: 547-553.

33. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82: 513-523.
34. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24: 981-990.
35. Gülcin I. (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol*, 86: 345-391.
36. Leopoldini M, Pitarch IP, Russo N, Toscano M. (2004) Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. *J Phys Chem A*, 108: 92-96.
37. Romanova D, Vachalkova A, Cipak L, Ovesna Z, Rauko P. (2001) Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma*, 48:104-107.
38. Singh JP, Selvendiran K, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D. (2004) Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine*, 11: 309-314.
39. Patil SP, Jain PD, Sancheti JS, Ghumatkar PJ, Tambe R, Sathaye S. (2014) Neuroprotective and neurotrophic effects of apigenin and luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacology*, 86: 192-202.
40. Breinholt V, Lauridsen ST, Dragsted LO. (1999) Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*, 29: 1227-1240.
41. Yang J, Wang XY, Xue J, Gu ZL, Xie ML. (2013) Protective effect of apigenin on mouse acute liver injury induced by acetaminophen is associated with increment of hepatic glutathione reductase activity. *Food Funct*, 4: 939-943.
42. Loizzo MR, Pugliese A, Bonesi M, De Luca D, O'Brien N, Menichini F, Tundis R. (2013) Influence of drying and cooking process on the phytochemical content, antioxidant and hypoglycaemic properties of two bell *Capsicum annum* L. cultivars. *Food Chem Toxicol*, 53: 392-401.
43. Zhang JM, An J. (2007) Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45: 27-37.

44. MacIntyre DA, Lee YS, Migale R, Herbert BR, Waddington SN, Peebles D, Hagberg H, Johnson MR, Bennett PR. (2014) Activator protein 1 is a key terminal mediator of inflammation-induced preterm labor in mice. *Faseb J*, 28: 2358-2368.
45. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol*, 164: 6509-6519.
46. Rithidech KN, Tungjai M, Reungpathanaphong P, Honikel L, Simon SR. (2012) Attenuation of oxidative damage and inflammatory responses by apigenin given to mice after irradiation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 749: 29-38.
47. Basios N, Lampropoulos P, Papalois A, Lambropoulou M, Pitiakoudis MK, Kotini A, Simopoulos C, Tsaroucha AK. (2015) Apigenin attenuates inflammation in experimentally induced acute pancreatitis-associated lung injury. *J Invest Surg*, 2: 1-7.
48. Luan RL, Meng XX, Jiang W. (2016) Protective effects of apigenin against paraquat-induced acute lung injury in mice. *Inflammation*, 1: 1-7.
49. Patil RH, Babu RL, Naveen Kumar M, Kiran Kumar KM, Hegde SM, Nagesh R, Ramesh GT, Sharma SC. (2015) Anti-inflammatory effect of apigenin on LPS-induced pro-inflammatory mediators and AP-1 factors in human lung epithelial cells. *Inflammation*, 39: 138-147.
50. Hu W, Wang X, Wu L, Shen T, Ji L, Zhao X, Si CL, Jiang Y, Wang G. (2016) Apigenin-7-O-beta-d-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock. *Food Funct*, 7: 1002-1013.
51. Li R, Wang X, Qin T, Qu R, Ma S. (2016) Apigenin ameliorates chronic mild stress-induced depressive behavior by inhibiting interleukin-1 $\beta$  production and NLRP3 inflammasome activation in the rat brain. *Behav Brain Res*, 296: 318-325.
52. Patel D, Shukla S, Gupta S. (2007) Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol*, 30: 233-245.
53. Tong X, Pelling JC. (2013) Targeting the PI3K/Akt/mTOR axis by apigenin for cancer prevention. *Anticancer Agents Med Chem*, 13: 971-978.

54. Sharma NK. (2013) Modulation of radiation-induced and mitomycin C-induced chromosome damage by apigenin in human lymphocytes in vitro. *J Radiat Res*, 54: 789-797.
55. Rithidech KN, Tungjai M, Whorton EB. (2005) Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutat Res*, 585: 96-104.
56. Nichols JA, Katiyar SK. (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*, 302: 71-83.
57. Tong X, Mirzoeva S, Veliceasa D, Bridgeman BB, Fitchev P, Cornwell ML, Crawford SE, Pelling JC, Volpert OV. (2014) Chemopreventive apigenin controls UVB-induced cutaneous proliferation and angiogenesis through HuR and thrombospondin-1. *Oncotarget*, 5: 11413-11427.
58. Shukla S, Gupta S. (2010) Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res*, 27: 962-978.
59. Yang L, Allred KF, Dykes L, Allred CD, Awika JM. (2015) Enhanced action of apigenin and naringenin combination on estrogen receptor activation in non-malignant colonocytes: implications on sorghum-derived phytoestrogens. *Food Funct*, 6: 749-755.
60. Scherbakov AM, Andreeva OE. (2015) Apigenin inhibits growth of breast cancer cells: The role of ERalpha and HER2/neu. *Acta Naturae*, 7: 133-139.
61. Shukla S, Gupta S. (2006) Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther*, 5: 843-852.
62. Chung CS, Jiang Y, Cheng D, Birt DF. (2007) Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin. *Mol Carcinog*, 46: 773-782.
63. Rajesh G, Harshala S, Dhananjay G, Jadhav A, Vikram G. (2010) Effect of hydroxyl substitution of flavone on angiogenesis and free radical scavenging activities: a structure-activity relationship studies using computational tools. *Eur J Pharm Sci*, 39: 37-44.
64. Sun QW, Jiang SM, Yang K, Zheng JM, Zhang L, Xu WD. (2012) Apigenin enhances the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing

- ligand in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Mol Biol Rep*, 39: 5529-5535.
65. Chan LP, Chou TH, Ding HY, Chen PR, Chiang FY, Kuo PL, Liang CH. (2012) Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor- and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. *Biochim Biophys Acta*, 1820: 1081-1091.
66. Lima CF, Costa M, Proenca MF, Pereira-Wilson C. (2015) Novel structurally similar chromene derivatives with opposing effects on p53 and apoptosis mechanisms in colorectal HCT116 cancer cells. *Eur J Pharm Sci*, 72: 34-45.
67. Lu HF, Chie YJ, Yang MS, Lee CS, Fu JJ, Yang JS, Tan TW, Wu SH, Ma YS, Ip SW, Chung JG. (2010) Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung cancer A549 cells through Bax- and Bcl-2-triggered mitochondrial pathway. *Int J Oncol*, 36: 1477-1484.
68. Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Sakai T. (2006) The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Mol Cancer Ther*, 5: 945-951.
69. Pinheiro MM, Boylan F, Fernandes PD. (2012) Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: evidence for the involvement of apigenin. *Life Sci*, 91: 293-300.
70. Borghi SM, Carvalho TT, Staurengo-Ferrari L, Hohmann MS, Pinge-Filho P, Casagrande R, Verri WA Jr. (2013) Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *J Nat Prod*, 76: 1141-1149.
71. Ma X, He D, Ru X, Chen Y, Cai Y, Bruce IC, Xia Q, Yao X, Jin J. (2012) Apigenin, a plant-derived flavone, activates transient receptor potential vanilloid 4 cation channel. *Br J Pharmacol*, 166: 349-358.
72. Ren B, Qin W, Wu F, Wang S, Pan C, Wang L, Zeng B, Ma S, Liang J. (2016) Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 773:13-23.
73. Liu R, Zhang H, Yuan M, Zhou J, Tu Q, Liu JJ, Wang J. (2013) Synthesis and biological evaluation of apigenin derivatives as antibacterial and antiproliferative agents. *Molecules*, 18: 11496-11511.

74. Xu Y, Xin Y, Diao Y, Lu C, Fu J, Luo L, Yin Z. (2011) Synergistic effects of apigenin and paclitaxel on apoptosis of cancer cells. *PLoS One*, 6: e29169.
75. Hu XY, Liang JY, Guo XJ, Liu L, Guo YB. (2015) 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through mitochondrial membrane potential (DeltaPsim)-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 42: 146-153.
76. Watanabe N, Hirayama R, Kubota N. (2007) The chemopreventive flavonoid apigenin confers radiosensitizing effect in human tumor cells grown as monolayers and spheroids. *J Radiat Res*, 48: 45-50.
77. van Rijn J, van den Berg J. (1997) Flavonoids as enhancers of x-ray-induced cell damage in hepatoma cells. *Clin Cancer Res*, 3: 1775-1779.
78. Eumkeb G, Chukrathok S. (2013) Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine*, 20: 262-269.
79. Choudhury D, Ganguli A, Dastidar DG, Acharya BR, Das A, Chakrabarti G. (2013) Apigenin shows synergistic anticancer activity with curcumin by binding at different sites of tubulin. *Biochimie*, 95: 1297-1309.
80. Guo X, Liu J, Cai S, Wang O, Ji B. (2016) Synergistic interactions of apigenin, naringin, quercetin and emodin on inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation and pancreas lipase activity. *Obes Res Clin Pract*, 10: 327-339.
81. Si D, Wang Y, Zhou YH, Guo Y, Wang J, Zhou H, Li ZS, Fawcett JP. (2009) Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metab Dispos*, 37: 629-634.
82. Walle UK, Walle T. (2002) Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metab Dispos*, 30: 564-569.
83. Mandery K, Balk B, Bujok K, Schmidt I, Fromm MF, Glaeser H. (2012) Inhibition of hepatic uptake transporters by flavonoids. *Eur J Pharm Sci*, 46: 79-85.
84. Karkleliene R, Dambrauskiene E, Juskeviciene D, Radzevicius A, Rubinskiene M, Viskelis P. (2014) Productivity and nutritional value of dill and parsley. *Hort Sci*, 41: 131-137.



85. Mahmood S, Hussain S, Malik F. (2014) Critique of medicinal conspicuousness of Parsley(*Petroselinum crispum*): a culinary herb of Mediterranean region. *Pak J Pharm Sci*, 27: 193-202.
86. Farzaei MH, Abbasabadi Z, Ardekani MRS, Rahimi R, Farzaei F. (2013) Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *J Tradit Chin Med*, 33:815-826,
87. Bender DA. *Benders' dictionary of nutrition and food technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2006: 357.
88. Kleiner HE, Vulimiri SV, Miller L, Johnson WH, Whitman CP, DiGiovanni J. (2001) Oral administration of naturally occurring coumarins leads to altered phase I and II enzyme activities and reduced DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons in various tissues of SENCAR mice. *Carcinogenesis*, 22: 73-82.
89. Jia HJ, Aw WP, Hanate M, Takahashi S, Saito K, Tanakab H, Tomitac M, Kato H. (2014) Multi-faceted integrated omics analysis revealed parsley (*Petroselinum crispum*) as a novel dietary intervention in dextran sodium sulphate induced colitic mice. *J Funct Foods*, 11: 438-448.
90. Tang ELH, Rajarajeswaran J, Fung SY, Kanthimathi MS. (2015) *Petroselinum crispum* has antioxidant properties, protects against DNA damage and inhibits proliferation and migration of cancer cells. *J Sci Food Agr*, 95: 2763-2771.
91. Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C. (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular Mechanisms. *J Agr Food Chem*, 56: 4855-4873.
92. Ramkissoon JS, Mahomoodally MF, Ahmed N, Subratty AH. (2013) Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pac J Trop Med*, 6: 561-569.
93. Bahmani M, Shirzad H, Majlesi M, Shahinfard N, Rafieian-Kopaei M. (2014) A review study on analgesic applications of Iranian medicinal plants. *Asian Pac J Trop Med*, 7: 43-53.

94. Nair VY, Balakrishanan N, Santiago JVA. (2015) Petroselinum crispum extract attenuates hepatic steatosis in rats fed with fructose enriched diet. Bratisl Med J, 116: 547-553.
95. Aljanaby AAJJ. (2013) Antibacterial activity of an aqueous extract of Petroselinum crispum leaves against pathogenic bacteria isolated from patients with burns infections in Al-najaf Governorate, Iraq. Res Chem Intermed, 39: 3709-3714.
96. Sęczyk Ł, Wieca M, Gawlik-Dziki U, Luty M, Czyz J. (2015) Effect of fortification with parsley (Petroselinum crispum Mill.) leaves on the nutraceutical and nutritional quality of wheat pasta. Food Chem, 190: 419-428.
97. Pinho E, Grootveld M, Soares G, Henriques M. (2014) Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. Carbohydr Polym, 101: 121-135.
98. Kim H, Kim HW, Jung S. (2008) Aqueous solubility enhancement of some flavones by complexation with cyclodextrins. Bull Korean Chem Soc, 29: 590-594.
99. Li J. (2014) Study and characterization of the antioxidant activity of the inclusion complex of apigenin with  $\beta$ -cyclodextrin and HP- $\beta$ -cyclodextrin in solution. J Invest Biochem, 3: 107-111.
100. Banerjee K, Banerjee S, Das S, Mandal M. (2015) Probing the potential of apigenin liposomes in enhancing bacterial membrane perturbation and integrity loss. J Colloid Interface Sci, 453: 48-59.
101. Arsic I, Tadic V, Vlaovic D, Homsek I, Vesic S, Vesić S, Isailović G, Vuleta G. (2011) Preparation of novel apigenin-enriched, liposomal and non-liposomal, antiinflammatory topical formulations as substitutes for corticosteroid therapy. Phytother Res, 25: 228-233.
102. Pápay ZsE, Zariwala MG, Somavarapu S, Antal I. Drug delivery approaches for apigenin: A review. In Stacks NM (szerk.), Apigenin and naringenin natural sources, pharmacology and role in cancer prevention. Nova Science Publishers, New York, 2015: 1-21.
103. Pawlikowska-Pawlega B, Misiak LE, Zarzyka B, Paduch R, Gawron A, Gruszecki WI. (2013) FTIR, H-1 NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of

- flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1828: 518-527.
104. Shen LN, Zhang YT, Wang Q, Xu L, Feng NP. (2014) Enhanced in vitro and in vivo skin deposition of apigenin delivered using ethosomes. *Int J Pharm*, 460: 280-288.
  105. Munyendo WLL, Zhang Z, Abbad S, Waddad AY, Lv H, Baraza LD, Zhou J. (2013) Micelles of TPGS modified apigenin phospholipid complex for oral administration: preparation, in vitro and in vivo evaluation. *J Biomed Nanotechnol*, 9: 2034-2047.
  106. Guo Y, Luo J, Tan S, Otieno BO, Zhang Z. (2013) The applications of vitamin E TPGS in drug delivery. *Eur J Pharm Sci*, 49: 175-186.
  107. Zhang Z, Tan S, Feng SS. (2012) Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery. *Biomaterials*, 33: 4889-4906.
  108. Zhai Y, Guo S, Liu C, Yang C, Dou J, Lia L, Zhaia G. (2013) Preparation and in vitro evaluation of apigenin-loaded polymeric micelles. *Colloids Surf A*, 429: 24-30.
  109. Croy SR, Kwon GS. (2006) Polymeric micelles for drug delivery. *Curr Pharm Des*, 12: 4669-4684.
  110. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP. (2006) Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A*, 78: 620-628.
  111. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. (2009) Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *Int J Pharm*, 379: 201-209.
  112. Ding B, Chen H, Wang C, Zhai Y, Zhai G. (2013) Preparation and in vitro evaluation of apigenin loaded lipid nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol*, 13: 6546-6552.
  113. Liu R, Hu HY, Chen DW, Qiao MX, Liu D, Zhao XL. (2009) Preparation of apigenin solid lipid nanoparticles. *Shenyang Yao Ke Da Xue Xue Bao*, 26: 335-337.
  114. Hu H Y, Liu R, Liu D, Zhao X L, Chen D W. (2009) Studies on pharmacy characters and pharmacokinetics of oral apigenin loaded solid lipid nanoparticle. *Chin Pharm J*, 44: 448-451.

115. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. (2009) Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm*, 366: 170-184.
116. Das S, Das J, Samadder A, Paul A, Khuda-Bukhsh AR. (2013) Efficacy of PLGA-loaded apigenin nanoparticles in Benzo a pyrene and ultraviolet-B induced skin cancer of mice: Mitochondria mediated apoptotic signalling cascades. *Food Chem Toxicol*, 62: 670-680.
117. Das S, Das J, Samadder A, Paul A, Khuda-Bukhsh AR. (2013) Strategic formulation of apigenin-loaded PLGA nanoparticles for intracellular trafficking, DNA targeting and improved therapeutic effects in skin melanoma in vitro. *Toxicol Lett*, 223: 124-138.
118. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. (2012) PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J Control Release*, 161: 505-522.
119. Feng WM, Guo HH, Xue T, Wang X, Tang CW, Ying B, Gong H, Cui G. (2015) Anti-inflammation and anti-fibrosis with PEGylated, apigenin loaded PLGA nanoparticles in chronic pancreatitis disease. *RSC Adv*, 5: 83628-83635.
120. Rajendran I, Dhandapani H, Anantanarayanan R, Rajaram R. (2015) Apigenin mediated gold nanoparticle synthesis and their anti-cancer effect on human epidermoid carcinoma (A431) cells. *RSC Adv*, 5: 51055-51066.
121. Singh M, Harris-Birtill DCC, Markar SR, Hanna GB, Elson DS. (2015) Application of gold nanoparticles for gastrointestinal cancer theranostics: A systematic review. *Nanomedicine*, 11: 2083-2098.
122. Shegokar R, M ller RH. (2010) Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm*, 399: 129-139.
123. Kaptay G. (2012) On the size and shape dependence of the solubility of nanoparticles in solutions. *Int J Pharm*, 430: 253-257.
124. M ller RH, Gohla S, Keck CM. (2011) State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 78: 1-9.

125. Müller RH, Peters K. (1998) Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm*, 160: 229-237.
126. Petersen R. (2008) Nanocrystals for use in topical cosmetic formulations and method of production thereof. US Patent No. US9114077 A1.
127. Al Shaal L, Shegokar R, Muller RH. (2011) Production and characterization of antioxidant apigenin nanocrystals as a novel UV skin protective formulation. *Int J Pharm*, 420: 133-140.
128. Petersen R. (2009) Nanocrystals for use in topical cosmetic formulations and method of production thereof. US Patent No. US9114077 B2.
129. Mauludin R, Muller RH, Keck CM. (2009) Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int J Pharm*, 370: 202-209.
130. Scholz P, Keck CM. (2015) Flavonoid nanocrystals produced by ARTcrystal<sup>®</sup>-technology. *Int J Pharm*, 482: 27-37.
131. Zhang J, Huang Y, Liu D, Gao Y, Qian S. (2013) Preparation of apigenin nanocrystals using supercritical antisolvent process for dissolution and bioavailability enhancement. *Eur J Pharm Sci*, 48: 740-747.
132. Zhang J, Huang Y, Liu D, Gao Y, Qian S. (2013) Preparation of apigenin nanocrystals using supercritical antisolvent process for dissolution and bioavailability enhancement. *Eur J Pharm Sci*, 48: 740-747.
133. Kohli K, Chopra S, Dhar D, Arora S, Khar RK. (2010) Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discov Today*, 15: 958-965.
134. Narang AS, Delmarre D, Gao D. (2007) Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *Int J Pharm*, 345: 9-25.
135. Pouton CW. 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci*, 11: S93-S98.
136. Zhao L, Zhang L, Meng L, Wang J, Zhai G. (2013) Design and evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system for apigenin. *Drug Dev Ind Pharm*, 39: 662-669.

137. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. (2007) Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today*, 12: 1068-1075.
138. Chiou WL, Riegelman S. (1971) Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J Pharm Sci*, 60: 1281-1302.
139. Leuner C, Dressman J. (2000) Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 47-60.
140. Ding SM, Zhang ZH, Song J, Cheng XD, Jiang J, Jia XB. (2014) Enhanced bioavailability of apigenin via preparation of a carbon nanopowder solid dispersion. *Int J Nanomedicine*, 9: 2327-2333.
141. Li BY, Pinch H, Birt DF. (1996) Influence of vehicle, distant topical delivery, and biotransformation on the chemopreventive activity of apigenin, a plant flavonoid, in mouse skin. *Pharm Res*, 13: 1530-1534.
142. Li BY, Birt DF. (1996) In vivo and in vitro percutaneous absorption of cancer preventive flavonoid apigenin in different vehicles in mouse skin. *Pharm Res*, 13: 1710-1715.
143. Kesharwani P, Jain K, Jain NK. (2014) Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog Polym Sci*, 39: 268-307.
144. Gillies ER, Fréchet JMJ. (2005) Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today*, 10: 35-43.
145. Hawker CJ, Frechet JMJ. (1990) Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc*, 112: 7638-7647.
146. Tomalia DA, Naylor AM, Goddard WA. (1990) Starburst Dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angew Chem Int Ed*, 29: 138-175.
147. Liu M, Fréchet JMJ. (1999) Designing dendrimers for drug delivery. *Pharm Sci Tech Today*, 2: 393-401.
148. Vinš P, Vermachová M, Drašar P, del Barrio M, Jarne C, Cebollac VL, de Cózarab A, Zangid R, Cossío FP. (2013) Size and branching effects on the fluorescence of benzylic dendrimers possessing one apigenin fluorophore at the core. *Tetrahedron*, 69: 10361-10368

149. Szejtli J. (2004) Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem*, 76:1825-1845.
150. Brewster ME, Loftsson T. (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 645-666.
151. García-González L, Yépez-Mulía L, Ganem A. (2016) Effect of  $\beta$ -cyclodextrin on the internalization of nanoparticles into intestine epithelial cells. *Eur J Pharm Sci*, 81: 113-118.
152. Agüeros M, Zabaleta V, Espuelas S, Campanero MA, Irache JM. (2010) Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly(anhydride) nanoparticles. *J Control Release*, 145: 2-8.
153. Moya-Ortega MD, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Loftsson T. (2012) Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm*, 428: 152-163.
154. Aytac Z, Kuskü SI, Durgun E, Uyar T. (2016) Quercetin/beta-cyclodextrin inclusion complex embedded nanofibres: Slow release and high solubility. *Food Chem*, 197: 864-871.
155. Ueda H, Endo T. Large-ring Cyclodextrins. In Helena Dodziuk (szerk.), *Cyclodextrins and their complexes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2006: 370-380.
156. Loftsson T, Brewster ME. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci*, 85: 1017-1025.
157. Del Valle EMM. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*, 39: 1033-1046.
158. Szejtli J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Rev*, 98:1743-1754.
159. Loftsson T, Duchene D. (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*, 329:1-11.
160. Szejtli J, Sebestyén G. (1979) Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of beta-cyclodextrin. *Starch*, 31: 385-389.
161. Waalkens-Berendsen DH, Smits van Prooije AE, Bar A. (1998) Embryotoxicity and teratogenicity study with gamma-cyclodextrin in rabbits. *Regul Toxicol Pharmacol*, 27: 172-177.

162. Koutsou GA, Storey DM, Bar A. (1999) Gastrointestinal tolerance of gamma-cyclodextrin in humans. *Food Addit Contam*, 16: 313-317.
163. Abadie C, Hug M, Kübli C, Gains N. (1994) Effect of cyclodextrins and undigested starch on the loss of chenodeoxycholate in the faeces. *Biochem J*, 299: 725-730.
164. Irie T, Uekama K. (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci*, 86: 147-162.
165. Tötterman AM, Schipper NGM, Thompson DO, Mannermaa JP. (1997) Intestinal safety of water-soluble  $\beta$ -cyclodextrins in paediatric oral solutions of spironolactone: Effects on human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol*, 49: 43-48.
166. Kiss T, Fenyvesi F, Pasztor N, Feher P, Varadi J, Kocsan R, Szenté L, Fenyvesi E, Szabo G, Vecsernyes M, Bacskay I. (2007) Cytotoxicity of different types of methylated beta-cyclodextrins and ionic derivatives. *Pharmazie*, 62: 557-558.
167. Szenté L, Szejtli J. (1999) Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv Drug Deliv Rev*, 36:17-28.
168. Kiss T, Fenyvesi F, Bacskay I, Varadi J, Fenyvesi E, Iványi R, Szenté L, Tósaki A, Vecsernyés M. (2010) Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. *Eur J Pharm Sci*, 40: 376-380.
169. Antlspenger G, Schmid G. Toxicological Comparison of Cyclodextrins. In Szejtli J, Szenté L (szerk.), *Proceedings of the eighth international symposium on cyclodextrins*. Springer Netherlands, Dordrecht, 1996: 149-155.
170. Abdul S, Chandewar AV, Jaiswal SB. (2010) A flexible technology for modified-release drugs: multiple-unit pellet system (MUPS). *J Control Release*, 147: 2-16.
171. Doelker E. Multiparticulate oral drug delivery. In Ghebre-Selassie I (szerk.), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Marcel Dekker, New York, 1994: 93-94.
172. Antal I, Kállai N, Angyal N, Balogh E, Dredán J, Dévay A, Klebovich I. 2007. Development of modified release multiple unit dosage forms. *Eur J Pharm Sci*, 32: S10.
173. Stavros NP, Dimitrios MR. (2011) Pelletization processes for pharmaceutical applications: A patent review. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 5: 61-78.



174. Dixit R, Puthli S. (2009) Fluidization technologies: Aerodynamic principles and process engineering. *J Pharm Sci*, 98: 3933-3960.
175. Kallai N, Luhn O, Dredan J, Kovacs K, Lengyel M, Antal I. (2010) Evaluation of drug release from coated pellets based on isomalt, sugar, and microcrystalline cellulose inert cores. *AAPS PharmSciTech*, 11: 383-391.
176. Varum FJO, Merchant HA, Basit AW. (2010) Oral modified-release formulations in motion: The relationship between gastrointestinal transit and drug absorption. *Int J Pharm*, 395: 26-36.
177. Coupe A, Davis S, Wilding I. (1991) Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects. *Pharm Res*, 8: 360-364.
178. Devereux JE, Newton JM, Short MB. (1990) The influence of density on the gastrointestinal transit of pellets. *J Pharm Pharmacol*, 42: 500-501.
179. Lippold BC. *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms 2<sup>nd</sup> edition*, Marcel Dekker, New York, 1997: 219.
180. Michael J. Rathbone JH, Michael S. Roberts. *Modified-release drug delivery technology (drugs and the pharmaceutical sciences)*. Informa Healthcare, London, 2008: 131-133.
181. Siepmann F, Siepmann J, Walther M, MacRae RJ, Bodmeier R. (2008) Polymer blends for controlled release coatings. *J Control Release*, 125: 1-15.
182. Nollenberger K, Albers J. (2013) Poly(meth)acrylate-based coatings. *Int J Pharm*, 457: 461-469.
183. Pinto JF. (2010) Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. *Int J Pharm*, 395: 44-52.
184. Amidon S, Brown JE, Dave VS. (2015) Colon-targeted oral drug delivery systems: Design trends and approaches. *AAPS PharmSciTech*, 16: 731-741.
185. Kaledaite R, Bernatoniene J, Dvorackova K, Gajdziok J, Muselik J, Pečiūra R, Masteikova R. (2014) The development and in vitro evaluation of herbal pellets coated with Eudragit FS 30. *Pharm Dev Technol*, 20: 1-6.
186. Rabišková M, Bautzová T, Gajdziok J, Dvořáčková K, Lamprecht A, Pellequer Y, Spilková J. (2012) Coated chitosan pellets containing rutin intended for the treatment of inflammatory bowel disease: In vitro characteristics and in vivo evaluation. *Int J Pharm*, 422: 151-159.

187. Wang S, Wang Y, Luo Y, Liu Y, Su W. (2013) In vitro and in vivo evaluation of naringin sustained-release pellets compared with immediate-release tablets. *J Drug Deliv Sci Tech*, 23: 459-464.
188. Mudshinge SR, Deore AB, Patil S, Bhalgat CM. (2011) Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm J*, 19: 129-141.
189. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. (2013) Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release*, 166: 182-194.
190. Naveenraj S, Anandan S. (2013) Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. *J Photochem Photobiol C*, 14: 53-71.
191. Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. (2012) Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*, 157: 168-182.
192. Hu YJ, Liu Y, Sun TQ, Bai AM, Lü JQ, Pi ZB. (2006) Binding of anti-inflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin. *Int J Biol Macromol*, 39: 280-285.
193. Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P. (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, 57: 787-796.
194. Kratz F. (2008) Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release*, 132: 171-183.
195. Fu Q, Sun J, Zhang W, Sui X, Yan Z, He Z. (2009) Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 4: 262-272.
196. Kratz F. (2014) A clinical update of using albumin as a drug vehicle - a commentary. *J Control Release*, 190: 331-336.
197. Bolli A, Marino M, Rimbach G, Fanali G, Fasano M, Ascenzi P. (2010) Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochem Biophys Res Commun*, 398: 444-449.
198. Liu S, Guo C, Guo Y, Yu H, Greenaway F, Sun MZ. (2014) Comparative binding affinities of flavonoid phytochemicals with bovine serum albumin. *Iran J Pharm Res*, 13: 1019-1028.

199. Fang R, Hao R, Wu X, Li Q, Leng X, Jing H. (2011) Bovine serum albumin nanoparticle promotes the stability of quercetin in simulated intestinal fluid. *J Agr Food Chem*, 59: 6292-6298.
200. Fang R, Jing H, Chai Z, Zhao G, Stoll S, Ren F, Liu F, Leng X. (2011) Study of the physicochemical properties of the BSA: flavonoid nanoparticle. *Eur Food Res Technol*, 233: 275-283.
201. Wei Y, Li L, Xi Y, Qian S, Gao Y, Zhang J. (2014) Sustained release and enhanced bioavailability of injectable scutellarin-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Int J Pharm*, 476: 142-148.
202. Kim TH, Jiang HH, Youn YS, Park CW, Tak KK, Lee S, Kim H, Jon S, Chen X, Lee KC. (2011) Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity. *Int J Pharm*, 403: 285-291.
203. Kratz F, Elsadek B. (2012) Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release*, 161: 429-445.
204. Chen N, Brachmann C, Liu X, Pierce DW, Dey J, Kerwin WS, Li Y, Zhou S, Hou S, Carleton M, Klinghoffer RA, Palmisano M, Chopra R. (2015) Albumin-bound nanoparticle (nab) paclitaxel exhibits enhanced paclitaxel tissue distribution and tumor penetration. *Cancer Chemother Pharmacol*, 76: 699-712.
205. Muralidharan P, Malapit M, Mallory E, Hayes Jr D, Mansour HM. (2015) Inhalable nanoparticulate powders for respiratory delivery. *Nanomedicine*, 11: 1189-1199.
206. Malcolmson RJ, Embleton JK. (1998) Dry powder formulations for pulmonary delivery. *Pharm Sci Tech Today*, 1: 394-398.
207. Yang W, Peters JI, Williams RO. (2008) Inhaled nanoparticles—A current review. *Int J Pharm*, 356: 239-247.
208. Chvatal A, Benke E, Szabóné Révész P, Ambrus R. (2016) Új formulálási stratégiák a porinhalációs készítmények előállításában. *Gyógyszerészet*, 60: 197-206.
209. Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare, London, 2007: 1281.

210. Stegemann S, Kopp S, Borchard G, Shah VP, Senel S, Dubey R, Urbanetz N, Cittero M, Schoubben A, Hippchen C, Cade D, Fuglsang A, Morais J, Borgström L, Farshi F, Seyfang KH, Hermann R, van de Putte A, Klebovich I, Hincal A (2013) Developing and advancing dry powder inhalation towards enhanced therapeutics. *Eur J Pharm Sci*, 48: 181-194.
211. Weers JG, Miller DP. (2015) Formulation design of dry powders for inhalation. *J Pharm Sci*, 104: 3259-3288.
212. Shoyele SA, Cawthorne S. (2006) Particle engineering techniques for inhaled biopharmaceuticals. *Adv Drug Deliv Rev*, 58: 1009-1029.
213. Sung JC, Pulliam BL, Edwards DA. (2007) Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends in Biotechnol*, 25: 563-570.
214. Hyoung-Ryun P, Yu D, Jong Keun P, ; Ki-Min B. (2013) Spectroscopic properties of flavonoids in various aqueous-organic solvent mixtures. *Bull Korean Chem Soc*, 34: 211-220.
215. Bener M, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. (2010) Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods. *Ind Crops Prod*, 32: 499-506.
216. Erdogan GK, R. Eler A. (2010) Aluminium(III), Fe(II) complexes and dyeing properties of apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavone). *Main Group Met Chem*, 33: 283–300.
217. Xing TL, Wang F, Mao YY, Wang LP, Ye BX. (2009) Electrochemical behavior of apigenin at a glassy carbon electrode and its analytical application. *J Chin Chem Soc*, 56: 303-309.
218. Xiao M, Yan W, Zhang Z. (2010) Solubilities of apigenin in ethanol + water at different temperatures. *J Chem Eng Data*, 55: 3346-3348.
219. Li B, Robinson DH, Birt DF. (1997) Evaluation of properties of apigenin and [G-3H] apigenin and analytic method development. *J Pharm Sci*, 86: 721-725.
220. Ollila F, Halling K, Vuorela P, Vuorela H, Slotte JP. (2002) Characterization of flavonoid–biomembrane interactions. *Arch Biochem Biophys*, 399: 103-108.
221. Budavari S. *Merck Index - An encyclopedia of chemicals and drugs* 12th edition. Merck: Whitehouse Station, New York, 1996: 123-124.

222. Wang BJ, Yang S, Li D. (2008) Pre-formulation study on apigenin in solid lipid nanoparticles. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 05: 29-35.
223. Tungjai M, Poompimon W, Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa N, Mankhetkorn S. (2008) Spectrophotometric characterization of behavior and the predominant species of flavonoids in physiological buffer: Determination of solubility, lipophilicity and anticancer efficacy. *Open Drug Deliv J*, 2: 10-19.
224. Wesołowska O, Hendrich A, Łania-Pietrzak B, Wiśniewski J, Molnar J, Ocsovszki I, Michalak K. (2009) Perturbation of the lipid phase of a membrane is not involved in the modulation of MRP1 transport activity by flavonoids. *Cell Mol Biol Lett*, 14: 199-221.
225. Favaro G, Clementi C, Romani A, Vickackaite V. (2007) Acidochromism and ionochromism of luteolin and apigenin, the main components of the naturally occurring yellow weld: a spectrophotometric and fluorimetric study. *J Fluoresc*, 17: 707-714.
226. Xiao M, Shao Y, Yan W, Zhang Z. (2011) Measurement and correlation of solubilities of apigenin and apigenin 7-O-rhamnosylglucoside in seven solvents at different temperatures. *J Chem Thermodyn*, 43: 240-243.
227. Mabry T, Markham, KR, Thomas MB. *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin, 1970: 35-40.
228. Amat A, Clementi C, De Angelis F, Sgamellotti A, Fantacci S. (2009) Absorption and emission of the apigenin and luteolin flavonoids: a TDDFT investigation. *J Phys Chem A*, 113: 15118-15126.
229. Hostetler GL, Riedl KM, Schwartz SJ. (2013) Effects of food formulation and thermal processing on flavones in celery and chamomile. *Food Chem*, 141:1406-1411.
230. Srivastava JK, Gupta S. (2009) Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. *Mol Cell Pharmacol*, 1: 138-138.
231. Higuchi T, Connors KA. (1965) Phase solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum*, 4: 117-122.

232. Lin SY, Chen KS, Run-Chu L. (2000) Organic esters of plasticizers affecting the water absorption, adhesive property, glass transition temperature and plasticizer permanence of Eudragit acrylic films. *J Control Release*, 68: 343-350.
233. Cespi M, Bonacucina G, Misici-Falzi M, Golzi R, Boltri L, Palmieri GF. (2007) Stress relaxation test for the characterization of the viscoelasticity of pellets. *Eur J Pharm Biopharm*, 67: 476-484.
234. Sharma OP, Bhat TK. (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem*, 113: 1202-1205.
235. Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. (1988) Two new flavonoids and other constituents in licore root: their relative astringency and radical scavenging affects. *Chem Pharm Bull*, 36: 1090-2097.
236. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahenab F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng*, 117: 426-436.
237. Luthria DL, Mukhopadhyay S, Kwansa AL. (2006) A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *J Sci Food Agr*, 86: 1350-1358.
238. Mantegna S, Binello A, Boffa L, Giorgis M, Cena C, Cravotto G. (2012) A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chem*, 130: 746-750.
239. Plazonic A, Bucar F, Males Z, Mornar A, Nigovic B, Kujundzic N. (2009) Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 14: 2466-2490.
240. Justesen U. (2000) Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J Chromatogr A*, 902: 369-379.
241. Fabre N, Rustan I, de Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. (2001) Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid

- chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr*, 12: 707-715.
242. Li Z, Jia Y, Tian R, Zheng H, Zhang L. (2015) Investigation of inclusion complexes between apigenin and sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin. *CJPH*, 46: 488-491.
243. Bikadi Z, Kurdi R, Balogh S, Szeman J, Hazai E. (2006) Aggregation of cyclodextrins as an important factor to determine their complexation behavior. *Chem Biodivers*, 3: 1266-1278.
244. Tungjai M. PW, Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa N, Mankhetkorn S. (2008) Spectrophotometric characterization of behavior and the predominant species of flavonoids in physiological buffer: determination of solubility, lipophilicity and anticancer efficacy. *Open Drug Deliv J*, 2:10-19.
245. Danciu C, Soica C, Oltean M, Avram S, Borcan F, Csanyi E, Ambrus R, Zupko I, Muntean D, Dehelean CA, Craina M, Popovici RA. (2014) Genistein in 1:1 inclusion complexes with ramified cyclodextrins: theoretical, physicochemical and biological evaluation. *Int J Mol Sci*, 15: 1962-1982.
246. Arun R, Ashok Kumar CK, Sravanthi VVNSS. (2008) Cyclodextrins as drug carrier molecule: A review. *Sci Pharm*, 76: 567-598.
247. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. (2005) Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6: 329-357.
248. Tommasini S, Calabro ML, Raneri D, Ficarra P, Ficarra R. (2004) Combined effect of pH and polysorbates with cyclodextrins on solubilization of naringenin. *J Pharm Biomed Anal*, 36: 327-333.
249. Calabro ML, Tommasini S, Donato P, Stancanelli R, Raneri D, Catania S, Costa C, Villari V, Ficarra P, Ficarra R. (2005) The rutin/ $\beta$ -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *J Pharm Biomed Anal*, 36: 1019-1027.
250. Khalafi L, Rafiee M. (2013) Cyclodextrin based spectral changes. In *Tech Open*, 19: 472-493.
251. Enoch MV, Rajamohan R, Swaminathan M. (2010) Fluorimetric and prototropic studies on the inclusion complexation of 3,3'-diaminodiphenylsulphone with  $\beta$ -

- cyclodextrin and its unusual behavior. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 77: 473-477.
252. Çelik SE, Özyürek M, Tufan AN, Güçlü K, Apak R. (2011) Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 78: 1615-1624.
253. Liu M, Dong L, Chen A, Zheng Y, Sun D, Wang X, Wang B. (2013) Inclusion complexes of quercetin with three beta-cyclodextrins derivatives at physiological pH: spectroscopic study and antioxidant activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 115: 854-860.
254. Cespi M, Bonacucina G, Misici-Falzi M, Golzi R, Boltri L, Palmieri GF. (2007) Stress relaxation test for the characterization of the viscoelasticity of pellets. *Eur J Pharm Biopharm*, 67: 476-484.
255. Gendrin C, Roggo Y, Collet C. (2008) Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review. *J Pharmaceut Biomed*, 48: 533-553.
256. Antal I. (2001) A közeli infravörös spektroszkópia elméleti alapjai és alkalmazásának gyógyszerészeti lehetőségei. *Képzés egy életen át*, 1: 7-11
257. Rivera SL, Ghodbane S. (1994) In vitro adsorption-desorption of famotidine on microcrystalline cellulose. *Int J Pharm*, 108: 31-38.
258. Yuen KH. (2010) The transit of dosage forms through the small intestine. *Int J Pharm*, 395: 9-16.
259. Huyghebaert N, Vermeire A, Remon JP. (2005) In vitro evaluation of coating polymers for enteric coating and human ileal targeting. *Int J Pharm*, 298: 26-37.
260. Gao C, Huang J, Jiao Y, Shan L, Liu Y, Li Y, Mei X. (2006) In vitro release and in vivo absorption in beagle dogs of meloxicam from Eudragit FS 30 D-coated pellets. *Int J Pharm*, 322: 104-112.
261. Rudolph MW, Klein S, Beckert TE, Petereit HU, Dressman JB. (2001) A new 5-aminosalicylic acid multi-unit dosage form for the therapy of ulcerative colitis. *Eur J Pharm Biopharm*, 51: 183-190.
262. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*, 28: 25-30.



263. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235.
264. Yang J, Guo J, Yuan J. (2008) In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Sci Technol*, 41: 1060-1066.
265. Wu L, Zhang J, Watanabe W. (2011) Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 456-469.
266. Ant3nio E, Khalil NM, Mainardes RM. (2016) Bovine serum albumin nanoparticles containing quercetin: characterization and antioxidant activity. *J Nanosci Nanotechnol*, 16: 1346-1353.
267. Valeur B. Berberan-Santos MN. *Molecular fluorescence principles and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002: 73-124.
268. Zhao XN, Liu Y, Niu LY, Zhao C-P. (2012) Spectroscopic studies on the interaction of bovine serum albumin with surfactants and apigenin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 94: 357-364
269. Lin CZ, Hu M, Wu AZ, Zhu CC. (2014) Investigation on the differences of four flavonoids with similar structure binding to human serum albumin. *J Pharm Anal*, 4: 392-398.
270. Cao H, Liu Q, Shi J, Xiao J, Xu M. (2008) Comparing the affinities of flavonoid isomers with protein by fluorescence spectroscopy. *Anal Lett*, 41: 521-532.
271. Shang Y, Li H. (2010) Studies of the interaction between apigenin and bovine serum albumin by spectroscopic methods. *Russ J Gen Chem*, 80: 1710-1717.
272. Tang L, Jia W, Zhang D. (2014) The effects of experimental conditions of fluorescence quenching on the binding parameters of apigenin to bovine serum albumin by response surface methods. *Luminescence*, 29: 344-351.
273. Stahl K, Claesson M, Lilliehorn P, Linden H, Backstrom K. (2002) The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. *Int J Pharm*, 233: 227-237.
274. Wu L, Miao X, Shan Z, Huang Y, Li L, Pan X, Yao Q, Li G, Wu C. (2014) Studies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation. *Asian J Pharm Sci*, 9: 336-341.

275. Yang XF, Xu Y, Qu DS, Li HY. (2015) The influence of amino acids on aztreonam spray-dried powders for inhalation. *Asian J Pharm Sci*, 10: 541-548.
276. Aquino RP, Prota L, Auriemma G, Santoro A, Mencherini T, Colombo G, Russo P. (2012) Dry powder inhalers of gentamicin and leucine: formulation parameters, aerosol performance and in vitro toxicity on CuFi1 cells. *Int J Pharm*, 426: 100-107.
277. Newman AW, Byrn SR. (2003) Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. *Drug Discov Today*, 8: 898-905.
278. Gombás Á, Szabó-Révész P, Kata M, Regdon G, Jr., Erős I. (2002) Quantitative determination of crystallinity of  $\alpha$ -lactose monohydrate by DSC. *J Therm Anal Calorim*, 68: 503-510.
279. Raula J, Seppälä J, Malm J, Karppinen M, Kauppinen EI. (2012) Structure and dissolution of l-leucine-coated salbutamol sulphate aerosol particles. *AAPS PharmSciTech*, 13: 707-712.
280. Listiohadi Y, Hourigan J, Sleight R, Steele R. (2009) Thermal analysis of amorphous lactose and  $\alpha$ -lactose monohydrate. *Dairy Sci Technol*, 89: 43-67.
281. Němec I, Mička Z. (1999) FTIR and FT Raman study of L-leucine addition compound with nitric acid. *J Mol Struct*, 482–483: 23-28.
282. Lechuga-Ballesteros D, Charan C, Stults CL, Stevenson CL, Miller DP, Vehring R, Tep V, Kuo MC. (2008) Trileucine improves aerosol performance and stability of spray-dried powders for inhalation. *J Pharm Sci*, 97: 287-302.
283. Mangal S, Meiser F, Tan G, Gengenbach T, Denman J, Rowles MR, Larson I, Morton DA. (2015) Relationship between surface concentration of l-leucine and bulk powder properties in spray dried formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 94: 160-169.
284. Chew NY, Chan HK. (2002) The role of particle properties in pharmaceutical powder inhalation formulations. *J Aerosol Med*, 15: 325-330.
285. Yang MY, Chan JGY, Chan HK. (2014) Pulmonary drug delivery by powder aerosols. *J Control Release*, 193: 228-240.
286. Chow AL, Tong HY, Chattopadhyay P, Shekunov B. (2007) Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharm Res*, 24: 411-437.

287. Liang Z, Ni R, Zhou J, Mao S. (2015) Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. *Drug Discov Today*, 20: 380-389.
288. Heyder J, Gebhart J, Rudolf G, Schiller CF, Stahlhofen W. (1986) Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005–15  $\mu\text{m}$ . *J Aerosol Sci*, 17: 811-825.
289. Taki M, Marriott C, Zeng XM, Martin GP. (2010) Aerodynamic deposition of combination dry powder inhaler formulations in vitro: A comparison of three impactors. *Int J Pharm*, 388: 40-51.
290. Musante CJ, Schroeter JD, Rosati JA, Crowder TM, Hickey AJ, Martonen TB. (2002) Factors affecting the deposition of inhaled porous drug particles. *J Pharm Sci*, 91: 1590-1600
291. Prota L, Santoro A, Bifulco M, Aquino RP, Mencherini T, Russo P. (2011) Leucine enhances aerosol performance of naringin dry powder and its activity on cystic fibrosis airway epithelial cells. *Int J Pharm*, 412: 8-19.
292. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. (2008) The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*, 582: 1783-1787.

## 10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Értekezéshez kapcsolódó közlemények

#### Könyvfejezet

1. Pápay ZsE, Balogh E, Zariwala GM, Somavarapu S, Antal I. *Drug Delivery Approaches for Apigenin: A Review*. In Nilus M Stacks (szerk.), *Apigenin and Naringenin: Natural Sources, Pharmacology and Role in Cancer Prevention*. Nova Science Publishers, Hauppauge, 2015: 1-20. (ISBN:978-1-63463-987-3)

#### Folyóirat közlemények

2. Pápay ZsE, Kállai-Szabó N, Ludányi K, Klebovich I, Antal I. (2016) *Development of oral site-specific pellets containing flavonoid extract with antioxidant activity*. Eur J Pharm Sci, 95: 161-169.
3. Pápay ZsE, Kállai-Szabó N, Balogh E, Ludányi K, Klebovich I, Antal I. (2016) *Controlled release oral delivery of apigenin containing pellets with antioxidant activity*. Curr Drug Deliv, 13: 1-10.
4. Pápay ZsE, Sebestyén Z, Ludányi K, Kállai N, Balogh E, Kósa A, Somavarapu S, Böddi B, Antal I. (2016) *Comparative evaluation of the effect of cyclodextrins and pH on aqueous solubility of apigenin*. J Pharm Biomed Anal, 117: 210-216.
5. Pápay ZsE, Sornsute A, Merchant Z, Antal I, Somavarapu S. (2014) *Rossvízoldhatóságú flavonoidok oldékonyság növelésének lehetőségei*. Gyógyszerészet 87: (Suppl.1) S113.
6. Pápay ZsE, Antal I. (2014) *Study on the antioxidant activity during the formulation of biological active ingredient*. ESJ, 3: 252-257.
7. Pápay ZsE, Kósa A, Boldizsár I, Ruszkai Á, Balogh E, Klebovich I, Antal I. (2012) *Petroselinum crispum kivonatának gyógyszerészeti vonatkozásai és formulálási lehetőségei*. Acta Pharm Hung, 82: 3-14.

### Értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

8. Füredi P, Pápay ZsE, Kovács K, Dalmadi Kiss B, Ludányi K, Antal I, Klebovich I. (2016) *Development and characterization of the voriconazole loaded lipid-based nanoparticles*. J Pharm Biomed Anal, *In press*.
9. Antal I, Budai M, Dávid Á, Kállai N, Klebovich I, Ludányi K, Marton S, Mike-Kaszás N, Pápay ZsE, Plachy J, Sebestyén Z. *Kémiai ellenőrző vizsgálatok a*

*gyógyszertechnológiában: Egyetemi jegyzet IV. éves gyógyszerészhallgatók részére.*  
Antal István, Klebovich Imre, Ludányi Krisztina (szerk.), Semmelweis Kiadó,  
Budapest, 2012: 169. (ISBN:9789633312582)

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok mindazoknak, akik segítettek doktori munkám létrejöttét és támogattak az elmúlt évek alatt.

Elsősorban megköszönöm témavezetőmnek, dr. Antal Istvánnak, hogy lehetőséget teremtett számomra a doktori munkám elkészítésére és szakmai útmutatást adott. Köszönet illeti dr. Klebovich Imre professzor urat, aki magas színvonalú konferenciák szervezésével támogatta szaktudásom fejlődését. Köszönetet mondok konzulensemnek, dr. Balogh Emesének, valamint dr. Ludányi Krisztinának, dr. Kállai-Szabó Nikolettnek és dr. Sebestyén Zitának, hogy szakmai segítségükre és tanácsaikra mindig számíthattam. Ezen kívül megköszönöm dr. Budai Líviának, dr. Füredi Petrának és dr. Niczinger Noéminek, akik az elmúlt évek hétköznapi nehézségein is átsegítettek, vidámabbá tették a munkát és mindenben számíthattam rájuk.

Hálásan köszönöm dr. Böddi Bélának és dr. Kósa Annamáriának, hogy nagy szaktudásukkal segítségemre voltak a spektrofotometriás mérésekben és TDK-s hallgató korom óta támogatással és figyelemmel kísérték munkámat. dr. Satyanarayana Somavarapunak is hálával tartozom, aki lehetőséget adott, hogy külföldi tanulmányutamat sok munkával és hasznosan tölthessem el, szakmai segítséget nyújtott és számos műszeres vizsgálatot lehetővé tett. Továbbá megköszönöm dr. Zsigmond Zsoltnak, hogy segítséget nyújtott Camsizer<sup>®</sup> készülék használata során, dr. Kovács Róbertnek a pásztázó elektronmikroszóp felvételeket és a Cyclolab Kft-nek a ciklodextrineket.

Végül, de nem utolsó sorban megköszönöm családomnak, akik nagy türelmükkel, biztatásukkal és szeretetükkel mellettem álltak.