

# **Az egyensúlyi oldhatóságot befolyásoló tényezők vizsgálata a helyes meghatározási gyakorlat fejlesztése érdekében**

Doktori értekezés

**Dr. Csicsák Dóra**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Völgyi Gergely, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Jójártné Dr. Laczkovich Orsolya, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Alberti-Dér Ágnes, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Zelkó Romána, Ph.D., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Rozmer Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2023

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>6</b>
1. Bevezetés.....	8
1.1. Az oldhatóság fogalma.....	9
1.1.1. Termodinamikai oldhatóság (S) .....	9
1.1.2. Intrinsic oldhatóság ( $S_0$ ) .....	9
1.1.3. Kinetikai oldhatóság ( $S^{APP}$ ) .....	10
1.2. Az oldhatóság meghatározásának módszerei .....	10
1.2.1. Kinetikai oldhatóság meghatározására alkalmas módszerek.....	11
1.2.1.1. UV-spektrofotometriás módszer .....	11
1.2.1.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC).....	12
1.2.1.3. Turbidimetriás eljárás.....	12
1.2.1.4. „Zero intercept” módszer (ZIM) .....	12
1.2.1.5. Nefelometriás eljárás.....	12
1.2.2. Termodinamikai oldhatóság meghatározására alkalmas módszerek.....	13
1.2.2.1. Hagyományos telítéssel rázó-töltéses eljárás.....	13
1.2.2.2. Miniaturizált telítéssel rázó-töltéses eljárás.....	13
1.2.2.3. „Generator column” módszer.....	13
1.2.2.4. $\mu$ DISS módszer .....	14
1.2.2.5. Facilitált kioldódás (FDM).....	14
1.2.2.6. „Dissolution template titration” (DTT).....	14
1.2.2.7. CheqSol .....	15
1.3. Oldhatóságot befolyásoló tényezők.....	15
1.3.1. pH.....	16
1.3.2. Pufferösszetétel.....	17
1.3.3. Hőmérséklet.....	17
1.3.4. Anyagszerkezet.....	18
1.3.5. Részecskeméret .....	18
1.3.6. Ionerősség, ellenion-hatás .....	19
1.4. Oldhatóság növelésének lehetőségei .....	20
1.4.1. Részecskeméret-csökkentés.....	20
1.4.1.1. Top-down technikák.....	21
1.4.1.1.1. Mechanikus részecskeméret csökkentés.....	21

1.4.1.1.2.	Nagynyomású homogenizálás .....	22
1.4.1.2.	Bottom-up technikák .....	22
1.4.1.2.1.	Hidroszolos technika.....	22
1.4.1.2.2.	Kicsapás olvadékból .....	23
1.4.1.2.3.	Kicsapás szuperkritikus fluid technológiával .....	23
1.4.1.2.4.	Kicsapás oldószer eltávolítással.....	24
1.4.2.	Kristályszerkezet módosítása .....	24
1.4.2.1.	Polimorf módosulatok előállítása.....	24
1.4.2.2.	Amorf módosulatok alkalmazása .....	25
1.4.2.2.1.	Amorfizálás kis molekulatömegű anyagokkal.....	25
1.4.2.2.2.	<i>In situ</i> amorfizáció .....	26
1.4.2.3.	Kokristályok kialakítása .....	26
1.4.3.	Hordozóban történő diszpergálás .....	27
1.4.3.1.	Szilárd diszperziók .....	27
1.4.3.2.	Szilárd oldatok.....	28
1.4.3.3.	Eutektikumok .....	28
1.4.4.	Komplekképzés .....	28
1.4.4.1.	Halmazott komplexek .....	28
1.4.4.2.	Inklúziós komplexek .....	29
1.4.4.3.	Hármas komplexek.....	29
1.4.5.	Származékképzés.....	30
1.4.5.1.	Prodrug előállítása.....	30
1.4.5.2.	Sóképzés.....	30
1.4.6.	Segédanyagok alkalmazása .....	31
1.4.6.1.	Felületaktív anyagok .....	31
1.4.6.2.	Koszolvensek .....	32
1.4.6.3.	Hidrotropizálás .....	32
2.	Célkitűzés .....	34
3.	Módszerek .....	36
3.1.	Felhasznált anyagok .....	36
3.1.1.	Felhasznált anyagok szűrők vizsgálatához .....	36
3.1.2.	Felhasznált anyagok polimorf módosulatok vizsgálatához .....	36
3.1.3.	Felhasznált anyagok mikronizált és nanonizált minták vizsgálatához .....	36
3.2.	Egyensúlyi oldhatóság meghatározása .....	37

3.2.1.	Egyensúlyi oldhatóság meghatározása szűrők vizsgálatához.....	37
3.2.2.	Polimorf módosulatok egyensúlyi oldhatóságának meghatározása .....	39
3.2.3.	Mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának meghatározása .....	40
3.3.	Szilárd fázisú analízis .....	41
3.3.1.	Porröntgen-diffrakció (XRPD).....	41
3.3.2.	Raman-spektroszkópia.....	42
3.3.3.	IR-spektroszkópia.....	42
3.4.	Részecskeméret-eloszlás analízise .....	43
3.4.1.	Lézerdiffrakció .....	43
3.4.2.	Pasztázó elektronmikroszkópos mérések .....	43
4.	Eredmények .....	44
4.1.	Szűrők alkalmazásának hatása hatóanyagok egyensúlyi oldhatóságára.....	44
4.1.1.	diklofenák -nátrium .....	45
4.1.2.	Hidroklorotiazid .....	46
4.1.3.	Papaverin-hidroklorid.....	47
4.1.4.	Progeszteron .....	48
4.2.	Polimorfok egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata.....	48
4.2.1.	Venlafaxin-hidroklorid .....	49
4.2.2.	Oxitetraciklin-hidroklorid.....	50
4.2.3.	Karvedilol .....	52
4.3.	Mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata.....	53
4.3.1.	Papaverin-hidroklorid.....	56
4.3.2.	Furoszemid .....	57
4.3.3.	Nifluminsav .....	58
5.	Megbeszélés.....	59
5.1.	Szűrők alkalmazásának hatása az egyensúlyi oldhatóságra .....	59
5.1.1.	Diklofenák-nátrium .....	59
5.1.2.	Hidroklorotiazid .....	61
5.1.3.	Papaverin-hidroklorid.....	64
5.1.4.	Progeszteron .....	66
5.2.	Polimorfok egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata.....	67
5.2.1.	Venlafaxin-hidroklorid .....	67
5.2.2.	Oxitetraciklin-hidroklorid.....	70

5.2.3.	Karvedilol .....	71
5.3.	Mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata .....	77
5.3.1.	Papaverin-hidroklorid .....	78
5.3.2.	Furoszemid .....	80
5.3.3.	Nifluminsav .....	83
6.	Következtetések .....	86
7.	Összefoglalás .....	90
8.	Summary .....	91
9.	Irodalomjegyzék .....	92
10.	Saját publikációk jegyzéke .....	99
10.1.	Disszertáció alapját képező közlemények .....	99
10.2.	Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk .....	99
11.	Köszönetnyilvánítás .....	101

## Rövidítések jegyzéke

ATR – gyengített totálreflexió

BCS – Biofarmáciai Osztályozási Rendszer

BR – Britton-Robinson

DMSO – dimetil-szulfoxid

DTGS – deuterizált triglicin-szulfát

FaSSIF – étkezés előtti szimulált bélnedv

FDM – facilitált kioldódás módszer

FeSSIF – étkezés utáni szimulált bélnedv

FTIR – Fourier transzformációs infravörös (spektroszkópia)

FUR – furozemid

HH – Henderson-Hasselbalch

HPLC – nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

HTS – nagy áteresztőképességű vizsgálat

IR – infravörös (spektroszkópia)

LADME – liberáció, abszorpció, disztribúció, metabolizmus, exkréción

MS – tömegspektrometria

nanoPVA – PVA segédanyaggal nanonizált minta

nanoPVPK – PVP-K25 segédanyaggal nanonizált minta

NIF – nifluminsav

OTC – oxitetraciklin

PAP – papaverin

PES – poliéterszulfon

PTFE – politetrafluoretilén

PVA – polivinilalkohol

PVDF – polivinilidén-fluorid

PVP-K25 – polivinilpirrolidon K25

SEM – pásztázó elektronmikroszkóp

SGF – szimulált gyomornedv

SIF – szimulált bélnedv

SSF – telítéssel rázótolcsérés (eljárás)

UV – ultraibolya (spektroszkópia)

XRPD – porröntgen-diffrakció

ZIM – zero intercept módszer

## 1. Bevezetés

Egy gyógyszer a szervezetbe kerülés során számos folyamaton megy keresztül, melyek mind befolyásolják a készítmény biohasznosulását. Ezen folyamatokat összegzően a LADME néven említhetjük, ez magában foglalja a gyógyszerformából történő hatóanyagfelszabadulást, a membránon keresztül történő abszorpciót, a szervezetben történő eloszlást, vagyis disztribúciót, a metabolizmust és az eliminációt(1).

Orális gyógyszeralkalmazás esetén, amely a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerbeviteli mód, mindezen folyamatok kritikusak a biohasznosulás szempontjából, míg más adagolási módokkal egyes lépések korlátozó szerepe kiküszöbölhető – példaként említhető az intravénás gyógyszeralkalmazás, mely esetében a membránon keresztül történő abszorpció a hatóanyag közvetlen véráramba juttatásának köszönhetően nem limitáló tényező. Az orális adagolású gyógyszerformából történő felszabadulás során a hatóanyag oldott állapotba kerül, mely egyrészt elengedhetetlen a megfelelő felszívódáshoz, másrészt a hatás kifejtéséhez szükséges a receptor környezetében a megfelelő koncentráció elérése. A felszívódás a szervezetben leggyakrabban passzív diffúzióval történik, így ebben a lépésben a molekula oldhatóságán túlmenően annak lipofilitása is kulcsszerepet játszik(2, 3).

Ezen ismeretek alapján megállapítható, hogy a szervezetben történő biohasznosulást nagyban befolyásolják a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságai, úgymint vízoldhatósága és orális alkalmazás esetén membránpermeabilitása. Az említett paraméterek ismerete a gyógyszerkutatás korai fázisában nagyban segítheti a molekula szervezetbeni viselkedésének előrejelzését, melynek segítségével csökkenthető a nem megfelelő biohasznosulású molekulák késői kutatási fázisba kerülése, jelentősen csökkentve ezzel a gyógyszerfejlesztés költségeit(4, 5). Az említett paraméterek ismeretének jelentőségét mutatja, hogy ezek képezik a gyógyszer-molekulák Biofarmáciai Osztályozási Rendszerbe (BCS) történő besorolásának alapját. Oldhatóságuk és permeabilitásuk alapján négy osztályba sorolhatjuk a hatóanyagokat. Az I. osztályba tartozó vegyületeket jó oldhatóság és permeabilitás, míg a II. osztályba tartozó hatóanyagokat a jó permeabilitás mellett, rossz vízoldhatóság jellemzi. A III. osztály tagjai jó vízoldhatóság mellett rossz permeabilitással rendelkeznek, végül a IV. osztályba a rossz vízoldhatósággal és permeabilitással jellemezhető vegyületek tartoznak. Egy



vegyületet akkor tekinthetünk a BCS alapján jó oldhatósággal rendelkezőnek, ha a legmagasabb elérhető dózis teljes mennyisége feloldódik 250 mL pufferoldatban, a pH 1,2-6,8 tartományban(6). Napjainkban az új gyógyszerjelölt molekulák döntő többsége a II. vagy IV. osztályba tartozik, amely komoly kihívást jelent a megfelelő készítmények előállításának szempontjából(7, 8). Különböző formulációs technikákkal javítható a molekulák oldhatósága illetve permeabilitása, mivel azonban ezek konszekutív folyamatok, fontos, hogy az egyik paraméter javítása ne eredményezze a másik romlását(9). Nagy jelentősége van tehát a gyógyszerfejlesztés során annak, hogy pontosan ismerjük mind a hatóanyag oldhatóságát, mind pedig permeabilitását, valamint az ezeket befolyásoló tényezőket, hogy ezek változtatásával optimális szervezetbeni hasznosulást érhesünk el.

### **1.1. Az oldhatóság fogalma**

Egy adott anyag oldhatóságát telített oldatának koncentrációjával jellemezhetjük, azonban az oldhatóság megnevezés többféle fogalmat is takarhat, ezek a következők:

#### **1.1.1. Termodinamikai oldhatóság ( $S$ )**

Egy adott anyag termodinamikai oldhatóságának egy heterogén rendszer (oldat és oldandó anyag) telített oldatfázisának koncentrációját nevezzük, amennyiben a rendszer termodinamikai egyensúlyban van. Telített oldatról akkor beszélhetünk, ha egységnyi idő alatt ugyanannyi anyag oldódik be, mint amennyi kiválik, tehát a koncentráció időben állandó. A termodinamikai oldhatóság értéke adott nyomáson és hőmérsékleten konstans, anyagi minőségre jellemző.

#### **1.1.2. Intrinsic oldhatóság ( $S_0$ )**

Az intrinsic oldhatóság fogalma szorosan kapcsolódik a termodinamikai oldhatóság fogalmához. Azon molekulák egyensúlyi oldhatósága, melyek rendelkeznek ionizálható funkciók csoporttal, pH függő. Intrinsic oldhatóságnak egy adott vegyület azon pH-n mért egyensúlyi oldhatóságát nevezzük, ahol a molekula makroszkopikus szinten semleges (töltésmentes vagy ikerionos) formában van jelen.

### 1.1.3. Kinetikai oldhatóság ( $S^{APP}$ )

A kinetikai oldhatóság az egyensúlyi oldhatóságtól eltérően, egy termodinamikai egyensúlyban nem lévő rendszerben mérhető oldatkonzentráció, abban az időpillanatban, amikor először történik csapadékkiválás. Definíciójából is következik, hogy egy adott vegyület kinetikai oldhatósága általában magasabb, mint egyensúlyi oldhatósága, mivel egy termodinamikai egyensúlyban nem lévő rendszerről beszélünk.

## 1.2. Az oldhatóság meghatározásának módszerei

Az oldhatóság meghatározására számos módszer alkalmazható, kiválasztáskor azonban figyelembe kell venni, hogy az adott vegyület kinetikai vagy termodinamikai oldhatósága a meghatározni kívánt paraméter. A gyógyszerkutatást és –fejlesztést tekintve az a tendencia figyelhető meg, hogy a korai kutatási szakaszban a kinetikai oldhatóság megismerése elegendő lehet, mivel jó közelítést ad a molekula oldhatóságáról különböző közegekben, illetve meghatározására viszonylag gyors és nagy áteresztőképességű (HTS) módszerek állnak rendelkezésre. Tekintettel arra, hogy ilyenkor akár több száz gyógyszerjelölt molekula karakterizálása válhat szükségessé, a mérési idő és a módszer kapacitása kritikus paraméternek tekinthető. Amennyiben a molekula a gyógyszerkutatás korai szakaszain túljutva a fejlesztési szakaszba kerül, a pontos termodinamikai oldhatóság ismerete elengedhetetlenné válik a megfelelő formuláció kifejlesztésének szempontjából, mivel ez segíti a végleges gyógyszerforma és a dózis kiválasztását(10, 11). A kinetikai illetve egyensúlyi oldhatóság meghatározására leggyakrabban alkalmazott módszereket az 1. táblázat tartalmazza(12-14).

**1. táblázat.** *Oldhatóság meghatározására alkalmas módszerek és áteresztőképességük*

Oldhatóság típusa	Módszer	Áteresztőképesség
Kinetikai	UV-spektrofotometria	nagy
	HPLC	közepes
	Turbidimetriás eljárás	közepes
	„Zero intercept” módszer (ZIM)	alacsony
	Nefelometriás eljárás	nagy
Termodinamikai	Telítéssel rázótolcséres módszer	alacsony
	Miniatürizált telítéssel rázótolcséres eljárás	alacsony/közepes
	„Generator column” módszer	közepes
	Kioldódás alapú – $\mu$ DISS	alacsony/közepes
	Kioldódás alapú – facilitált kioldódás	alacsony
	Potenciometriás módszer – DTT	alacsony
Potenciometriás módszer – CheqSol	alacsony	

**1.2.1. Kinetikai oldhatóság meghatározására alkalmas módszerek**

A kinetikai oldhatóság meghatározására alkalmas módszerek közös jellemzője, hogy a kérdéses vegyületet nem szilárd formában keverik az oldószerhez, hanem egy vízzel elegyedő szerves oldószerrel – leggyakrabban dimetil-szulfoxid (DMSO) – készült törzsoldat részleteit adagolják a közeghez, melyben a kinetikai oldhatóságot meghatározni kívánják. Az eljárásokat a detektálási mód szerint csoportosíthatjuk.

**1.2.1.1. UV-spektrofotometriás módszer**

UV-spektrofotometriás módszer esetén a már említett módon, DMSO-ban oldott hatóanyag meghatározott részleteit juttatjuk az oldószerhez. Ahhoz, hogy a módszer nagy áteresztőképességűnek minősüljön, a mérést 96-lyukú plate-eken, kis térfogatok alkalmazásával kell végrehajtani. Mivel ezen detektálási módhoz tiszta oldatra van szükség, az anyagkiválás után a szilárd anyag felesleg szűréssel kerül eltávolításra, majd a tiszta oldat abszorbanciáját határozzuk meg. Ahhoz, hogy az abszorbanciából pontos koncentrációértéket kapjunk, előzetes kalibráció szükséges. Ennek során a meghatározni kívánt hatóanyag ismert koncentrációjú törzsoldatának részleteit adagoljuk az oldhatósági vizsgálatban használt oldószerhez, a kapott koncentráció-abszorbancia adatpárok közötti lineáris összefüggés segítségével pedig kiszámítható a szűrt minták koncentrációja.

### 1.2.1.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A HPLC segítségével történő detektálás esetén az oldatkészítés megegyezik az UV-spektrofotometriás módszernél leírtakkal. A mérés fordított fázisú rendszerben történik, és az előzőekhez hasonlóan a pontos koncentrációmeghatározáshoz előzetes kalibráció szükséges, a lineáris korreláció a kromatogramon megjelenő csúcsok görbe alatti területe és a koncentráció között állítható fel. Összehasonlítva az UV-spektrofotometriás mérésekkel, a módszer nem tekinthető nagy áteresztőképességűnek, mivel az elúció miatt hosszabb mérési időre van szükség(10, 15, 16).

### 1.2.1.3. Turbidimetriás eljárás

A turbidimetriás eljárás szintén UV detektáláson alapuló módszer, azonban ebben az esetben nincs szükség előzetes kalibrációra. A mérés során az UV-spektrofotometriás módszer kalibrációjához hasonlóan a DMSO-ban oldott hatóanyag részleteit adagoljuk a vizsgálni kívánt közeghez. Amikor az anyag eléri a maximális koncentrációt, megjelennek a szilárd részecskék az oldatban, ez pedig fényszóródást eredményez, ami az UV spektrum alapvonalának megemelkedésében jelentkezik. Bár a módszer egyszerűen kivitelezhető, a nehéz standardizálás és a DMSO limitált térfogata (max. 1%) miatt kevésbé elterjedt(3).

### 1.2.1.4. „Zero intercept” módszer (ZIM)

A ZIM egy viszonylag új detektálási lehetőség a kinetikai oldhatóság meghatározására. Turbidimetriás eljáráson alapul, azonban az egyszerű alapvonal emelkedésen túlmenően pontosabb detektálást tesz lehetővé. A mérés során UV-szondák segítségével detektáljuk a minta spektrumát az egyes törzsoldatrészletek hozzáadása után, ezután számítógépes program segítségével a minták spektrumának második deriváltját elemezzük. A második derivált spektrum anyagra jellemzően egy bizonyos hullámhossznál 0 értéket vesz fel ( $\lambda_{ZIM}$ ), mely a koncentrációtól független. A szilárd anyag megjelenése a rendszerben a  $\lambda_{ZIM}$  megváltozását eredményezi, ez tekinthető tehát a mérés végpontjának(13).

### 1.2.1.5. Nefelometriás eljárás

Ezen módszer is az oldatban megjelenő szilárd fázis detektálásán alapul, azonban itt nem UV abszorpciót, illetve az UV spektrum megváltozását mérjük, hanem a lézer nefelométer segítségével az oldatban megjelenő szilárd részecskék fényszóródását. A

módszer gyors és jól reprodukálható, azonban kisméretű részecskék esetében az érzékenysége romlik(15, 16).

## **1.2.2. Termodinamikai oldhatóság meghatározására alkalmas módszerek**

### **1.2.2.1. Hagyományos telítéssel rázótelítéses eljárás**

A telítéssel rázótelítéses eljárás (saturation shake-flask method, SSF) az egyensúlyi oldhatóság meghatározásának klasszikus eszköze, az újabb módszereket ezzel az eljárással szemben validálják. A mérés során először a vizsgálni kívánt anyagot feleslegben adjuk a közegként választott pufferoldathoz, majd az így előállított szuszpenziót az egyensúly beállásáig kevertetjük vagy rázatjuk. A hatóanyagok többségénél az egyensúly elérése 24 órán belül bekövetkezik, azonban előfordul, hogy több napra vagy akár hétre van szükség ennek létrejöttéhez. Ezt követően a fázisok szétválasztására van szükség, melyre az elsődlegesen ajánlott módszer a szuszpenzió üleptetése, amennyiben ez nem lehetséges, úgy centrifugálást vagy szűrést kell alkalmaznunk. A telített oldat koncentrációját leggyakrabban UV-spektrofotometriás méréssel határozzák meg, de HPLC vagy tömegspektrometria (MS) is alkalmas lehet erre a célra. Bár maga a módszer idő- és anyagigényes, azonban egyszerű és pontos, így jól reprodukálható eredményeket kapunk. Továbbá a hátrányként felróható nagy anyagigény pozitívumaként említhető, hogy a jelentősebb szilárd anyag felesleg lehetővé teszi a szilárd fázis analízisét a mérés végén, ami szintén fontos információkat hordozhat magában(17-19).

### **1.2.2.2. Miniaturizált telítéssel rázótelítéses eljárás**

Ahogy a módszer neve is mutatja, ezen eljárás a hagyományos telítéssel rázótelítéses eljárás miniaturizált változata. Az egyensúly elérése időigényes folyamat, így a mérési idő nem csökken, emiatt a módszer nem tekinthető nagy áteresztőképességűnek, azonban a kis térfogat jelentősen javítja a módszer anyagigényét. Ennek köszönhetően a módszer jól alkalmazható többek között a különböző segédanyagok oldhatóságára gyakorolt hatásának vizsgálatára. A nehézséget a stabil pH beállítása jelentheti a kis térfogat miatt, főleg jól oldódó anyagok esetében(17, 20, 21).

### **1.2.2.3. „Generator column” módszer**

Ezen eljárás során a szilárd anyag és az oldószer érintkeztetése merőben más módon történik, mint a rázótelítéses mérések esetében. A hatóanyag szerves oldószerrel készült

oldatával bevonják egy szilárd hordozó (pl. üveggyöngy) felszínét, majd az oldószert elpárologtatják. Ezután az oszlopba töltött hordozón vizet áramoltatnak keresztül. A nagy érintkezési felületnek köszönhetően az áramló oldószer gyorsan telítődik a hatóanyaggal, ezután a koncentráció HPLC segítségével határozható meg. A módszer gyors és jól alkalmazható nemionizálható vegyületek oldhatóságának meghatározására, azonban az esetleges oldószermaradványok hibát okozhatnak a mérésben(14).

#### **1.2.2.4. $\mu$ DISS módszer**

Egy vegyület oldódását valós időben nyomon követhető megállapítható, mikor éri el a kioldódási görbe a plató szakaszt, vagyis áll be az egyensúly a rendszerben – erre nyújt lehetőséget a kis térfogatú kioldódásvizsgáló rendszer, a  $\mu$ DISS Profiler (Pion Inc, Billerica, USA). A készülék *in situ* UV szondák segítségével valós időben képes követni egy hatóanyag oldódását, amennyiben pedig a mérést anyagfelesleg jelenlétében végezzük, úgy meghatározható az egyensúlyi oldhatóság is. A szilárd anyag jelenléte által okozott hibát a készülék szoftvere matematikai korrekciókkal képes kiküszöbölni. Mint a korábbiakban tárgyalt UV-spektrofotometriás mérések esetében, így itt is előzetes kalibráció szükséges ahhoz, hogy a mérési eredményeinkből pontos koncentráció adatokat kapjunk(22, 23).

#### **1.2.2.5. Facilitált kioldódás (FDM)**

Ezen módszer jól alkalmazható olyan anyagok esetében, melyek rosszul nedvesednek, lassan érik el az egyensúlyt vagy rendkívül rossz oldhatósággal rendelkeznek. A módszer alapja, hogy a szilárd anyag felesleg mellett kis mennyiségben (maximum 2 v/v%) megjelenik a rendszerben egy harmadik fázis, egy vízzel nem elegyedő szerves oldószer (pl. izooktán). A rossz vízoldhatóságú anyagok jól oldódnak a szerves oldószerekben, majd megoszlási hányadosuknak megfelelően telítik a vizes fázist. Mindaddig, amíg mindhárom fázis jelen van a rendszerben, a szerves oldószer jelenléte nem befolyásolja az egyensúlyi oldhatóságot(24).

#### **1.2.2.6. „Dissolution template titration” (DTT)**

Az említett eljárás potenciometriás titráláson alapul, ebből is kiderül, hogy csak ionizálható molekulák oldhatóságának meghatározására alkalmazható, azon belül is csak intrinszc oldhatóság meghatározására. Első lépésként megadjuk az adott anyag  $pK_a$

értékét, majd a  $\log P$  értékének ismeretében kiszámítható egy becsült intrinsíc oldhatóság az alábbi összefüggés alapján (1. egyenlet):

$$\log S_0 = 1,17 - 1,38 \cdot \log P \quad (1)$$

Ez alapján számítható egy teoretikus titrálási görbe, mely támpontként szolgál a mérés kivitelezéséhez. A tényleges titrálás során csökken a molekula ionizáltsága, amint elérjük azt a pH-t, ahol a molekula nemionizált formában van jelen, az anyag kicsapódik. A kicsapódás torzulást okoz a titrálási görbén, ezt tudjuk detektálni(25).

### 1.2.2.7. CheqSol

A rövidítés a „chasing equilibrium solubility”, vagyis az „egyensúlyi oldhatóság kergetése” kifejezésből származik. Az előző módszerhez hasonlóan itt is egy potenciometriás titrálást végzünk, azonban a csapadék megjelenését egy UV-szonda segítségével detektáljuk. A csapadékkiválást követően a pH finom fel és le módosításával a rendszert a telítetlen és a túltelített állapot között változtatjuk, kikényszerítve ezzel az egyensúly beállítását. Az eljárás korlátai hasonlóak a DTT módszerhez: csak ionizálható molekulák esetén alkalmazható és kizárólag intrinsíc oldhatóság meghatározására alkalmas(26).

## 1.3. Oldhatóságot befolyásoló tényezők

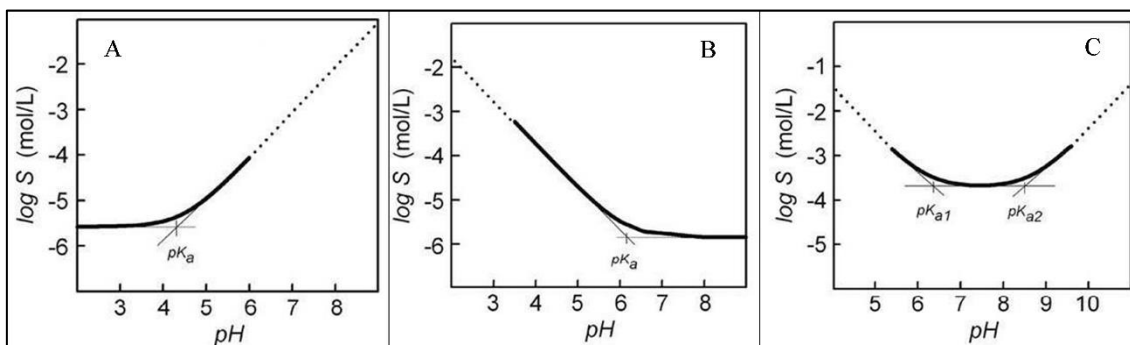
Az oldhatóságot számos tényező befolyásolhatja, melyeket mind számításba kell venni a hatóanyag- és formulációfejlesztés során. A legfontosabb faktorokat a 2. táblázat foglalja össze(27).

**2. táblázat.** *Az egyensúlyi oldhatóságot befolyásoló tényezők*

pH
Közeg (puffer) összetétele
Hőmérséklet
Anyagszerkezet (kristályos, amorf, polimorfia)
Részecskeméret
Ionerősség

### 1.3.1. pH

A gyógyszermolekulák döntő többsége rendelkezik valamilyen ionizálható csoporttal, ami savi, bázikus vagy amfoter karaktert kölcsönöz a vegyületeknek. Ezen molekulák oldhatósága szorosan összefügg a közeg pH értékével, mivel ez utóbbi a molekula karakterének és  $pK_a$  értékének függvényében befolyásolja az ionizáltsági állapotot. A töltéssel rendelkező, ionizált részecskék polaritása nagymértékben megnő a semleges részecskéhez képest, így előbbi a „hasonló hasonlót old” elv alapján jobban oldódik poláris oldószerekben, mint amilyenek a vizes pufferek is. A semleges részecske oldhatósága vizes közegben nagyságrendekkel rosszabb, az oldhatóság pH függését az 1. ábra szemlélteti egy savi (A), egy bázikus (B) és egy amfoter karakterű (C) vegyület példáján. Az ionizálható csoporttal nem rendelkező molekulák oldhatóságát a pH nem befolyásolja.



**1. ábra.** Az oldhatóság pH függése savi (A), bázikus (B) és amfoter (C) vegyület esetén(28)

Egy ionizálható csoporttal rendelkező molekula oldhatósága adott pH-n az intrinsic oldhatóság és a vegyület  $pK_a$  értékének ismeretében a Henderson-Hasselbalch összefüggés (HH) alapján megbecsülhető, természetesen a molekula sav-bázis karakterének figyelembevételével. Az alábbi összefüggések érvényesek egyértékű savi karakterű vegyületek (2. egyenlet), egyértékű bázisok (3. egyenlet) és két ionizálható csoportos amfoter vegyületek (4. egyenlet) esetén:

$$S_{pH} = S_0 \cdot (10^{-pK_a + pH} + 1) \quad (2)$$

$$S_{pH} = S_0 \cdot (10^{+pK_a - pH} + 1) \quad (3)$$

$$S_{pH} = S_0 \cdot (10^{-pK_{a2} + pH} + 10^{+pK_{a1} - pH} + 1) \quad (4)$$

A gyakorlatban előfordulnak eltérések a HH összefüggés által becsült értéktől, ez általában só- vagy aggregátumképződésnek köszönhető(19, 28, 29).



### 1.3.2. Pufferösszetétel

A gyakorlatban számos különböző pufferoldatot használhatunk vizes közegként oldhatóság meghatározására attól függően, hogy milyen pH-n szeretnénk végezni a méréseket. A gyógyszerkutatás során szükség lehet egy hatóanyag teljes pH-oldhatóság profiljának megismerésére, azonban leggyakrabban bioreleváns, azaz az emésztőrendszer különböző szakaszait modellező pufferek használatosak – ilyen az éhomi gyomrot szimuláló, pH 1,2 szimulált gyomornedv (SGF), az éhomi vékonybelet modellező pH 6,5 foszfátpuffer vagy az étkezés utáni vékonybélre jellemző pH 5,0 acetátpuffer. A különböző pufferek más és más pH tartományban alkalmazhatóak, érdemes tehát úgy megválasztani a közeget, hogy az adott puffer kapacitása a maximum közelében legyen a méréshez alkalmazott pH-n. Fontos továbbá megemlíteni, hogy a szervezetben érvényes viszonyokat legpontosabban modellező biomimetikus pufferek – az étkezés előtti bél pH-ját szimuláló FaSSIF és az étkezés utáni bél pH-jának megfeleltethető FeSSIF – a pH beállításán túl a bélnedvre jellemző komponenseket, többek között epesavakat és lecitint tartalmaznak. Ezen felületaktív anyagok mennyisége a pufferekben meghaladja a kritikus micellaképződési koncentráció értékét, a kialakult micellák belső, hidrofób részüknek köszönhetően segíthetik a lipofil anyagok oldhatóságának növekedését(30, 31).

### 1.3.3. Hőmérséklet

Az oldódás hőmérsékletfüggése a termodinamikai törvényszerűségek segítségével magyarázható. Az oldódás, mint termodinamikai folyamat, akkor megy önként végbe, ha a rendszerben a szabadentalpia-változás ( $\Delta G$ )  $< 0$ . A szabadentalpia-változást a Gibbs-egyenlet (5. egyenlet) alapján a rendszer entalpiaváltozása ( $\Delta H$ ), entrópiaváltozása ( $\Delta S$ ) és a hőmérséklet ( $T$ ) befolyásolja.

$$\Delta G = \Delta H - T * \Delta S \quad (5)$$

Az oldódás folyamán az entrópia általában növekszik, mivel a szilárd anyagot összetartó kötések felszakadásával nő a rendszer rendezetlensége. Ahhoz, hogy a szilárd anyag részecskéi közti kötések felszakítsuk, energia szükséges. Ha a szolvatációs energia kisebb, mint a kristályszerkezetet összetartó rácsenergia, akkor az oldódás endoterm folyamat, vagyis hőt von el a környezetétől. Fordított esetben, amikor a szolvatációs energia nagyobb, mint a rácsenergia, akkor az oldódás exoterm folyamat, vagyis hő szabadul fel az oldódás során. Ezen ismeretek fényében értelmezhető a hőmérséklet

hatása az oldhatóságra: endoterm oldódás esetén a hőmérséklet növelése segíti az oldódást, növeli az oldhatóságot. Exoterm oldódás esetén a hőmérséklet növelése hátrányosan hat a vegyület oldhatóságára. Azon vegyületek oldhatóságát a hőmérséklet növelése nem változtatja, amelyek esetében a oldódás nem jár hőmérséklet-változással(32).

#### **1.3.4. Anyagszerkezet**

Az adott hatóanyag kristályszerkezete is nagymértékben képes befolyásolni egy vegyület oldhatóságát. Az előzőekben már ismertettem az exoterm és az endoterm oldódás fogalmát, melyek során a rácsszerkezet, valamint az oldószer molekulái közti kötések felbontásához szükséges energia (endoterm folyamatok) és a szolvatációs energia (exoterm folyamat) nagysága és ezek egymáshoz való aránya adja meg az oldódás típusát. A rossz oldhatóság fakadhat a magas rácsenergiából, a gyenge szolvatációs készségből vagy ezen két tényező együtteséből. Egyazon anyag létezhet kristályos vagy amorf formában, sőt, a kristályos forma esetében is előfordulhatnak különböző polimorf módosulatok. A polimorf módosulatok eltérő kristályrácsuknak köszönhetően eltérő rácsenergiával rendelkeznek, így oldhatóságuk is különböző lesz. Fontos azonban figyelembe venni, hogy az egyes módosulatok oldószer jelenlétében gyakran mennek keresztül átalakulásokon: az instabilabb módosulat átalakulhat a stabilabbá, vagy közös hidrát illetve szolvát forma is keletkezhet. Előfordulnak azonban olyan esetek, amikor nem történik átalakulás, ilyenkor a két polimorf módosulat oldhatósága akár egy nagyságrenddel is eltérhet. Mivel az oldhatóság szoros összefüggést mutat a hatóanyagok biohasznosulásával, így ma már előírás a hatóanyagfejlesztés során a polimorf módosulatok felderítése és jellemzése. Amorf módosulatok esetén nem beszélhetünk szabályos kristályszerkezetéről, így a rácsenergia szerepe kikerül a változók közül. Ez megnövekedett oldhatóságot eredményez, azonban a rendezettség hiánya miatt az amorf rendszerek nagyfokú termodinamikai instabilitással rendelkeznek, ami oldatban stabilizálódni igyekszik, így az anyag kikristályosodik. Amennyiben azonban különböző segédanyagok segítségével sikerül megakadályozni a kristályosodást, úgy az amorf rendszerek magasabb egyensúlyi oldhatósággal rendelkezhetnek(33-35).

#### **1.3.5. Részecskeméret**

Egy adott hatóanyag oldhatóságának illetve kioldódásának részecskeméret-függése azon az ismereten alapul, hogy a részecskeméret-csökkentés során nő az oldószerrel

érintkező anyag felülete, így gyorsabb lesz az anyag oldódása. Ezt a jelenséget írja le a Noyes-Whitney összefüggés (6. egyenlet),

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = D \cdot A \left( \frac{c_s - c_x}{h} \right) \quad (6)$$

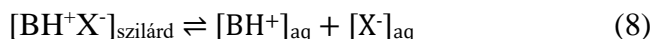
ahol  $\frac{\Delta c}{\Delta t}$  az időegység alatt bekövetkező koncentrációváltozás,  $D$  a diffúziós állandó,  $A$  a részecske felülete,  $c_s$  az egyensúlyi oldhatóság,  $c_x$  a koncentráció adott időpillanatban,  $h$  pedig a diffúziós távolság. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a kioldódás javulása mellett az egyensúlyi oldhatóság állandó marad, ez azonban megváltozik, amikor a részecskeméretet a nano mérettartományig csökkentjük. Ekkor az oldhatóság nem tekinthető többé termodinamikai paraméternek, és korrelál a részecskemérettel, ezt írja le az Ostwald-Freundlich összefüggés (7. egyenlet).

$$\log \frac{c_s}{c_\infty} = \frac{2\sigma V}{2,303RT\rho r} \quad (7)$$

A fentiekből látható, hogy az egyensúlyi oldhatóság ( $c_s$ ) és egy végtelenül nagy részecske oldhatóságának ( $c_\infty$ ) aránya összefüggést mutat a nanorészecske sugarának nagyságával ( $r$ )(36-38).

### 1.3.6. Ionerősség, ellenion-hatás

A pufferoldatok ionerőssége, ionösszetétele befolyásolhatja mind a semleges molekulák, mind a só típusú gyógyszerhatóanyagok oldhatóságát. Semleges karakterű vegyületek esetén a magasabb ionkoncentráció sok esetben rosszabb oldhatóságot eredményez, ez az úgynevezett „kisózás” jelensége. A poláris vízmolekulák könnyebben létesítenek kölcsönhatásokat a pufferben jelenlévő ionokkal, így magas ionerősség mellett a semleges molekulák oldhatósága csökken, mivel csökken azon vízmolekulák száma, amelyekkel kölcsönhatásba léphetnek. Kisebb ionerősség viszont éppen ellenkezőleg, segítheti a semleges molekulák oldódását, mivel csökkenti a zeta potenciál értékét, de még nem olyan mértékben, hogy az a hidrofób kölcsönhatásoknak kedvezzen. Só típusú vegyületek esetén az ellenion jelenléte befolyásolhatja az oldhatóságot. Mivel a sók disszociációja oldatban egyensúlyi folyamat, ha megnöveljük az ellenionok ( $[X^-]_{aq}$ ) mennyiségét az oldatban, akkor a reakció a szilárd só forma felé tolódik el (bázisok esetén: 8. egyenlet), így csökken a vegyület oldhatósága(32, 39, 40).



#### 1.4. Oldhatóság növelésének lehetőségei

Korábban már említésre került, hogy az új hatóanyagok döntő többsége a BCS II. vagy BCS IV. osztályba tartozik, így az oldhatóság növelése a gyógyszerfejlesztés egyik fő kihívásává vált. Éppen ezért ma már számos módszer áll rendelkezésünkre, melyek segítségével növelhető az ezen csoportokba tartozó vegyületek oldhatósága. Ezeket három fő csoportra oszthatjuk: fizikai, kémiai, és egyéb módszerek. Ezekben belül számos különböző oldhatóságnövelésre alkalmas technika áll rendelkezésre. A leggyakrabban alkalmazott módszereket a 3. táblázatban foglaltam össze(41, 42).

**3. táblázat.** *Oldhatóság növelésére alkalmazott technikák*

Fizikai módszerek	részecskeméret-csökkentés	mikronizálás
		nanoszuszpenziók
	kristályszerkezet módosítása	polimorf módosulat
		amorfizálás
	diszpergálás hordozóban	kokristály képzés
eutektikum képzés		
szilárd diszperzió szilárd oldat		
	komplekképzés	
Kémiai módszerek	származékképzés	prodrug előállítás
		sóképzés
Egyéb módszerek	segédanyagok alkalmazása	felületaktív anyagok
		koszolvensek
		hidrotropizálás

##### 1.4.1. Részecskeméret-csökkentés

Ugyan a név arra utalhat, hogy ebben az esetben nagyobb szemcseméretű anyagból állítunk elő kisebb részecskéket, azonban ez csak az egyik lehetőség – az ide sorolható technikákat nevezzük top-down módszereknek. A másik kategóriába a bottom-up módszerek tartoznak, ebben az esetben általában kicsapással állítjuk elő a kívánt méretű

részecskéket. Mérettartománytól függően mikro- vagy nanoméretű szemcsék állíthatók elő.

#### **1.4.1.1. Top-down technikák**

##### **1.4.1.1.1. Mechanikus részecskeméret csökkentés**

Mechanikus részecskeméret csökkentés alatt a különböző őrlési technikákat értjük. Ezek alkalmasak lehetnek mind mikro-, mind nanoméretű szemcsék előállítására. Attól függően, hogy az őrlés oldószer jelenlétében történik-e, beszélhetünk száraz és nedves őrlésről. A száraz őrlés az egyszerű és gyakran alkalmazott technikák közé tartozik, általában késes, sugár- vagy golyósmalomban történik. A folyamat során az anyag részecskéinek mérete csökken, így nő a felület, amely javítja az anyag és az oldószer kölcsönhatását. Fontos azonban kiemelni, hogy a felület növekedésével nő a részecskék felületi energiája is, ami az aggregáció kialakulásának kedvez, ezzel pedig pont az őrléssel elérni kívánt eredményt veszítjük el. Éppen ezért egy bizonyos mérettartomány alatt, mely függ az adott hatóanyag karakterisztikájától is, a kisebb, stabilan fennmaradó részecskeméret csak az őrlés során a hatóanyaghoz adott segédanyagok segítségével érhető el, melyek meggátolják a részecskék aggregációját. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy mikro mérettartományú részecskék előállítása megvalósítható segédanyag alkalmazása nélkül, azonban a szubmikron tartományba tartozó nanorészecskék előállításához szükség van segédanyagra. Ezek leggyakrabban hidrofíil polimerek, felületaktív anyagok vagy különböző szervesetlen vegyületek (pl. szilikátok). Mivel azonban ezek a segédanyagok is hatással lehetnek az adott vegyület oldhatóságára, így ezt a tényezőt külön figyelembe kell vennünk. A segédanyag jelenlétén túlmenően az adott malom tulajdonságai és beállításai is befolyásolják az őrlés hatékonyságát és a végső részecskeméretet. Golyósmalom esetén a golyók nagysága, sűrűsége és keménysége, valamint a malom fordulatszáma is hatással van a termék tulajdonságaira. Sugármalom esetén, mely elsősorban mikro mérettartományú részecskék előállítására alkalmas, a beáramló levegő nyomása és sebessége lehet a meghatározó tényező. Mind a golyós, mind pedig a sugármalom alkalmas lehet nedves őrlésre is, ennek előnye, hogy az oldószer jelenléte még kisebb részecskeméret elérését teszi lehetővé, így ezt a technikát általában nanorészecskék előállítására használják. Különösen jól alkalmazható ez a módszer nagy nedvességtartalmú anyagok esetében(43, 44).

#### **1.4.1.1.2. Nagynyomású homogenizálás**

Ezen technika elsősorban nanoszuszpenziók előállítására alkalmas. Mint már korábban említettem, nanorészecskék előállításához szükség van stabilizátorokra, így az erre a célra alkalmas segédanyagok és a hatóanyag szuszpenziója szolgál kiindulási formulációként. A homogenizátor kialakításától függően beszélhetünk mikrofluidizátorokról, ahol a részecskék egymással történő nagy sebességű ütközése okozza a részecskeméret csökkenést, illetve úgynevezett szórófejes homogenizálásról, amikor a szuszpenziót nagy nyomással kényszerítik át egy kis fúvókán, emiatt következik be a töredezés. Mikrofluidizáció esetén a készülék cellájának alakja határozza meg a méretcsökkenéshez vezető erőket: Z alakú cella esetén a részecskék az oda-vissza irányváltásnak köszönhetően egymásnak ütköznek. Ez az ütközés, valamint a fellépő nyíróerő okozza a szemcsék aprózódását. Y alakú cella esetén a két sugárra osztódott, nagy sebességű részecskék frontális ütközése vezet ugyanerre az eredményre. Hátránya ennek a módszernek, hogy nagyszámú ismétlés szükséges a megfelelő méret eléréséhez, így meglehetősen időigényes. A szórófejes eljárásnál a méretcsökkenés oka a nyomásváltozásban rejlik: amikor a szuszpenziót nagy sebességgel egy kis nyíláson kényszerítjük át, a statikus nyomás lecsökken, ennek következtében a szuszpenzió forráspontja is alacsonyabb lesz, a forrás következtében pedig gázbuborékok képződnek. A résen túljutva a hirtelen megnövekedett nyomásnak köszönhetően ezek a gázbuborékok felrobbannak, az így felszabaduló energia okozza a részecskeméret-csökkenést. A végső részecskeméret függ az alkalmazott nyomástól és a homogenizálási ciklusok számától. A módszer előnye, hogy egy meghatározott ciklus után a részecskeméret nem csökken tovább, így nagy homogenitású részecskehalmaz érhető el a módszer alkalmazásával(37, 45).

#### **1.4.1.2. Bottom-up technikák**

Ebbe a csoportba olyan technikák tartoznak, melyek során a részecskék szabályozott körülmények között képződnek oldat fázisból általában kicsapással vagy oldószer elpárologtatással.

##### **1.4.1.2.1. Hidroszolos technika**

A hidroszoloknak, vagyis a rosszul oldódó hatóanyagok vizes szuszpenzióinak előállítása a legrégebb óta alkalmazott és legegyszerűbb módszer nanoszuszpenziók gyártására, habár ez a módszer elsősorban laboratóriumi méretben és körülmények között

alkalmazható. Előállításuk három fő lépésre bontható: első lépésként oldjuk a hatóanyagot a megfelelő oldószerben (általában vízben), majd egy másik oldószerrel, ami lecsökkenti a molekula oldhatóságát, kicsapjuk az oldatból. Harmadik lépésként stabilizáló anyagok hozzáadása szükséges, amelyek megakadályozzák az aggregációt. Az első hidroszolok esetében erre a célra makromolekulákat választottak, mint a zselatin vagy a celullóz, ma már azonban számos más segédanyag is rendelkezésre áll. A hidroszolokat lehetséges szilárd állapotban is tárolni, ehhez az előállított nanoszuszpenziók oldószereit liofilizálással vagy porlasztva szárítással távolítják el(46).

#### **1.4.1.2.2. Kicsapás olvadékból**

Az olvadékból történő kicsapás egy gyors módszer nanoszuszpenziók előállítására. Ebben az esetben a hatóanyag egy megfelelő segédanyaggal előállított olvadéka szolgál kiindulási formulációként. Az olvadék ultraszonikáltatása közben történő hűtés szubmikron méretű, szűk mérettartományba eső részecskéket eredményez. Fontos, hogy szonikáltatás nélküli hűtés esetében nem nanoméretű, hanem akár mm nagyságú kristályok keletkeznek, így ez a lépés kritikus a módszer esetében. További kritikus paraméter a rövid előállítási idő, ugyanis a hosszabb reakcióidő lehetőséget ad a nagyobb kristályok kialakulására. E technológia fontos előnye, hogy könnyen folyamatossá tehető, ami jelentős tényező a modern gyártási technológiák esetén(47).

#### **1.4.1.2.3. Kicsapás szuperkritikus fluid technológiával**

Szuperkritikus folyadék állapotban a hőmérséklet és a nyomás is meghaladja adott anyag esetében a kritikus értéket, így egy olyan oldószer áll rendelkezésre, melynek fizikai-kémiai tulajdonságai átmenetet képeznek a folyadékok és a gázok tulajdonságai között. Előnyük, hogy eltávolításuk a nyomás változtatásával egyszerűen megvalósítható, így nem maradnak oldószermaradványok a formulációban. Leggyakrabban szuperkritikus szén-dioxidot használnak az ilyen eljárások során. A szuperkritikus folyadék lehet oldószer, ebben az esetben a hatóanyag feloldását követően egy kis résen keresztül levegőbe vagy egy másik folyadék fázisba engedik az elegyet. A hőmérséklet és a nyomás megváltozása a szuperkritikus folyadék gáz halmazállapotúvá válását eredményezi, így a hatóanyag kicsapódik. A részecskeméretet az említett két paraméter változtatásával lehet befolyásolni. A másik folyadékban történő kicsapás azért előnyösebb, mint a levegőben történő, mert meggátolja a kicsapódó részecskék ütközését és így esetleges aggregációjukat. Más esetben a szuperkritikus folyadék lehet kicsapószer

is: ekkor a szerves oldószerben oldott hatóanyagot elegyítjük szuperkritikus széndioxiddal nagy nyomáson, melynek hatására az addig oldott állapotban lévő hatóanyag kicsapódik(37, 48).

#### **1.4.1.2.4. Kicsapás oldószer eltávolítással**

A két leggyakrabban alkalmazott módszer ezen a kategórián belül a porlasztva illetve a fagyasztva szárítás. Ezen módszerek a 3. táblázatban található csoportosítást alapul véve átmeneti módszereknek tekinthetőek, mivel az eljárások során általában nemcsak nanoméretű részecskék keletkezése a jellemző, hanem a kristályszerkezet is módosul, a termékek amorf karakterrel rendelkeznek. A porlasztva szárítás során általában szerves oldószerben oldjuk a hatóanyagot, majd ezt magas hőmérsékletű térbe porlasztjuk, ahol az oldószer elpárolgásával visszamarad a szilárd anyag. Az elpárologtatás sebességével befolyásolható a részecskeméret: a gyorsabb oldószer eltávolítás a nagyobb, míg a lassabb, egyenletesebb elpárologtatás a kisebb részecskék kialakulásának kedvez. A fagyasztva szárítás vagy liofilizálás is alkalmas módszer nanorészecskék előállítására. Ezt a módszert gyakran alkalmazzák szilárd diszperziók előállítására is (Isd.: 1.4.3.1. fejezet), amelyek abban különböznek a nanorészecskéktől, hogy segédanyagot is tartalmaznak. A gyakorlatban ez a szigorú megkülönböztetés a két termék között elmosódni látszik az utóbbi időben. Liofilizálás során a lefagyasztott oldatból az oldószert a nyomás csökkentésével szublimálják, így szilárd termék marad vissza. Ezen eljárás során is gyakran megfigyelhető a hatóanyag amorfizálódása(46, 49).

#### **1.4.2. Kristályszerkezet módosítása**

Ebbe a csoportba azon technikák sorolhatók, melyek során a hatóanyag kémiai összetétele nem változik, csak annak kristályszerkezete. A megváltozott kristályszerkezet megváltozott kötőerőket jelent, ez pedig befolyásolhatja a vegyület oldhatóságát.

##### **1.4.2.1. Polimorf módosulatok előállítása**

Egy adott anyag polimorf módosulatai olyan anyagok, amelyek szabályos kristályszerkezettel rendelkeznek, de ezen kristályszerkezetek eltérőek. Általános szabály, hogy a termodinamikailag legstabilabb módosulat rendelkezik a legmagasabb rácsenergiával, ebből következően ennek lesz a legalacsonyabb az egyensúlyi oldhatósága, belőle az egyes polimorf módosulatok átkristályosítással alakíthatók ki. Ezek kisebb rácsenergiával rendelkeznek, metastabil állapotúak. Az 1.3.4 fejezetben



leírásra került, milyen átalakulásokon mehetnek keresztül a polimorfok oldószerrel érintkezve. A leggyakrabban előforduló esetekben, amikor az egyik módosulat a stabilabbá alakul, vagy közös stabil módosulat képződik, az átalakulás sebessége befolyásolható lehet különböző segédanyagok alkalmazásával, ami előnyösen hathat a formuláció biohasznosulására. Átalakulást nem szenvedő polimorf módosulatok esetén az alacsonyabb rácsenergiával rendelkező módosulat magasabb oldhatósága kerülhet kihasználásra a gyógyszerfejlesztés során, ez a különbség akár tízszeres is lehet. Ma már előírás a hatóanyagfejlesztés során a polimorf módosulatok szűrése a ritonavir elhíresült esete óta, amely a piacról történő visszavonást eredményezett, mivel kiderült, hogy a forgalomban lévő készítményben lévő módosulat átalakulhat az addig ismeretlen, stabilabb módosulattá, és így már nem lesz megfelelő a biohasznosulása. A modern technikáknak köszönhetően ma már megvalósítható a folyamatos, szabályozott kristályosítás, amely kiválóan alkalmas polimorf módosulatok előállítására. Ennek során az oldatból történő kristályosítás sebességét, amely befolyásolhatja a termék szerkezetét, a hűtés mértékének változtatásával lehet kontrollálni. Az oldat fázist a kristályosítás során leggyakrabban UV-spektrofotometriás vagy FTIR módszerrel lehet monitorozni, míg a szilárd fázisban bekövetkező változások követésére többek között a röntgenspektroszkópia alkalmas. Komoly szerepe van a folyamatos kristályosítás esetén a Raman spektroszkópiának, mivel ennek segítségével az oldat és a szilárd fázis is monitorozható(50-53).

#### **1.4.2.2. Amorf módosulatok alkalmazása**

Az amorf módosulatok szabályos kristályráccsal nem rendelkező anyagok, ennek következtében oldhatóságuk sokkal magasabb, mint a kristályos módosulatoké. Ennek köszönhetően az amorfizálás egy hatékony oldhatóságnövelő technika lehet, azonban a kristályosodás megelőzésének érdekében ezeket a rendszereket stabilizálni szükséges. A legrégebben ismert amorf rendszerek az amorf szilárd diszperziók, ezeket részletesen az 1.4.3.1 fejezet tárgyalja. Rendelkezésre állnak azonban egyéb technikák is amorf hatóanyagok előállítására.

##### **1.4.2.2.1. Amorfizálás kis molekulatömegű anyagokkal**

Ez a módszer abban különbözik a későbbiekben 1.4.3.1. fejezetben bemutatásra kerülő szilárd diszperzióktól, hogy nem egy nagy molekulatömegű mátrixban oszlatjuk el a hatóanyagot, hanem kis molekulatömegű segédanyagokkal (vagy másik

hatóanyaggal) történik az amorfizáció. Előnye ennek a technikának, hogy a rendszert több intermolekuláris kötőerő stabilizálja, mint a szilárd diszperziókat, így kisebb az esélye a kristályosodásnak. Előállításuk történhet őrléssel, oldószer elpárologtatással vagy szuperkritikus folyadék technológia alkalmazásával(54).

#### **1.4.2.2. *In situ* amorfizáció**

Az *in situ* amorfizáció egy új technológia amorf hatóanyagot tartalmazó készítmények előállítására. Az eljárás lépéseinek sorrendje módosul az eddigiekhez képest: nem az előzetesen előállított amorf hatóanyagból készítünk gyógyszerformulációt, hanem a kristályos hatóanyagból előállított készítményen belül amorfizáljuk a hatóanyagot külső behatások segítségével. Az első ilyen eljárás mikrohullámú besugárzás segítségével történt, indometacin és polimer tartalmú tabletták esetében. Sikerült teljesen amorf hatóanyagtartalmú készítményt előállítani, azonban ehhez az eljáráshoz szükség van olyan lágyító segédanyagra a tablettán belül, amely képes elnyelni a mikrohullámú sugárzást. Mivel ez leggyakrabban víz alkalmazását jelenti, melynek jelenléte megnöveli a hidrolitikus reakciók veszélyét, így igény merült fel egy olyan eljárás kidolgozására, mely vízmentes közegben történik. Így került kifejlesztésre a lézersugárzás által közvetített amorfizáció. Ezt a módszert celecoxib tartalmú tablettákon fejlesztették ki. Az amorfizáció elérésének érdekében a tabletták segédanyagként fototermikus nanorészecskéket tartalmaznak, melyek képesek elnyelni a lézertényt. Megfelelő ideig tartó besugárzás és nanorészecske-koncentráció esetén teljes amorfizáció volt elérhető a tablettán belül(55, 56).

#### **1.4.2.3. Kokristályok kialakítása**

A kokristályok összetétele hasonló a kis molekulatömegű vegyületekkel történő amorfizálás során előállított formuláció összetételéhez. A hatóanyag és a segédanyag vagy másik hatóanyag szabályos kristályszerkezetű terméket képez, amelyet másodlagos kötőerők stabilizálnak. Emiatt nem minden vegyület alkalmas kokristály képzésre. Általánosságban elmondható, hogy a molekulának rendelkeznie kell legalább egy H-híd kialakítására alkalmas csoporttal, illetve a kokristályt képező anyagok  $pK_a$  értékének hasonlóknak kell lennie. Előállításukra számos módszer alkalmazható, ezeket két nagy csoportra oszthatjuk: oldószer-alapú és szilárd fázisú technikák. Az első csoportba tartozik az oldószer elpárologtatással történő előállítás, az oldatból történő kicsapás más oldószerrel, illetve a hűtési kristályosítási technikák. Szilárd fázisból történő előállításuk

történhet a hatóanyag és a segédanyag együtt őrlésével, vagy pedig olvadékból történő kikristályosítással(57).

### **1.4.3. Hordozóban történő diszpergálás**

Az ide sorolható módszerek során a hatóanyagot különböző módszerekkel nagyobb mennyiségű hordozóban oszlatják el, mely karakterének köszönhetően javíthatja a molekula oldhatóságát (szilárd diszperziók, oldatok), vagy olyan kölcsönhatások alakulhatnak ki a segédanyag és a hatóanyag között, melyek csökkentik az elegy olvadáspontját, ezáltal szobahőmérsékleten változik a formuláció halmazállapota (eutektikumok).

#### **1.4.3.1. Szilárd diszperziók**

A szilárd diszperziók abban különböznek a későbbiekben ismertetésre kerülő szilárd oldatoktól, hogy a hatóanyag a hordozóban nem molekuláris, vagyis oldott állapotban található, hanem amorf vagy kristályos részecskék formájában. Az első szilárd diszperziók esetében kristályos hatóanyagot diszpergáltak kristályos hordozó közegben, ma már azonban az amorf ható- illetve segédanyag kombinációk is ismertek. Előállításuk leggyakrabban oldószer eltávolítással történik: a hatóanyagot és a segédanyagot, melyben azt eloszlatni kívánjuk, oldjuk a választott oldószerben, majd valamilyen módszerrel ez utóbbit eltávolítjuk. Korábban már említésre kerültek olyan, erre a célra alkalmas technikák, mint a liofilizálás vagy a porlasztva szárítás. Ezek a módszerek ebben az esetben is alkalmazhatók, és gyakran eredményezik azt, hogy amorf karakterű termék képződik. A karakter függ az alkalmazott segédanyag jellegétől is, amorf polimerek alkalmazása esetén várhatóan amorf terméket kapunk. Gyakran alkalmazott technika szilárd diszperziók előállítására az elektrosztatikus szálképzés. Ekkor a nagyfeszültség alá helyezett oldatban a polimer segédanyag pozitív töltésű lesz és potenciálkülönbség alakul ki közte és a semleges gyűjtőfelület között. Amennyiben ez a potenciálkülönbség elér egy kritikus értéket, megindul a szálképzés úgy, hogy a szálképző berendezés hegyéből egy vékony folyadéksugár képződik, és a termék az oldószer elpárolgása közben vékony szálként gyűlik össze a gyűjtőfelületen. Előnye ennek a módszernek, hogy amorf, nanoszálás terméket lehet vele előállítani(58, 59).

### 1.4.3.2. Szilárd oldatok

Szilárd oldatok esetében a hatóanyag oldott állapotban található meg a hidrofíll karakterrel rendelkező, így jó vízoldhatóságú hordozóban. A klasszikus szilárd oldatok kristályos szerkezettel rendelkeznek. Ebben az esetben a hatóanyag molekulái a kristályos hordozó rácsközötti terében helyezkednek el, vagy pedig egyes molekulák helyettesíthetők az oldószer molekulákkal a kristályrácsban. Amorf szilárd oldatok esetében a hatóanyagmolekulák rendszertelenül helyezkednek el az amorf hordozón belül. Előállításuk a szilárd diszperzióhoz hasonlóan történhet oldószerben történő oldással, majd annak eltávolításával, vagy pedig olvadék extrúziós eljárással, amennyiben a hatóanyag és a segédanyag olvadék formában elegyedik egymással. Ekkor az anyagok olvasztását és elegyítését követően az extrúder a kívánt formára (granulátum, tableta, por, stb.) alakítja a terméket(60, 61).

### 1.4.3.3. Eutektikumok

Az eutektikus elegyek legismertebb definíciója szerint az eutektikumok olyan keverékek, amelyek olvadáspontja alacsonyabb, mint az őt alkotó komponensek olvadáspontja. Ez a gyakorlatban sokszor olyan szinten látványosan jelentkezik, hogy két anyag keveréke szobahőmérsékleten elfolyósodik. Előállításukhoz általában hidrofíll hordozóval elegyítik a hatóanyagot, de láthatunk például az irodalomban hatóanyag-hatóanyag eutektikum képzésére is. A tapasztalatok azt mutatják, hogy az eutektikumok jobb oldhatósággal rendelkeznek, mint a kristályos hatóanyag önmagában. Ennek oka nem tisztázott teljes mértékben, a hidrofíll segédanyag jelenlétének túl szerepet játszhat a jobb nedvesíthetőség, a kisebb részecskeméret vagy a megváltozott termodinamikai tulajdonságok is(62, 63).

### 1.4.4. Komplexképzés

Komplexnek nevezzük kettő vagy több anyag meghatározott sztöchiometriájú asszociációját. A kémiában a komplexeknek számos fajtája ismert, oldhatóság növelés tekintetében azonban az úgynevezett halmozott komplexeknek, illetve a ciklodextrinokkal alkotott kettős és hármas komplexeknek van jelentősége.

#### 1.4.4.1. Halmozott komplexek

Az elnevezés arra utal, hogy az ilyen típusú komplexek kialakulásakor a molekulák hidrofób régiói átfednek („halmozódnak”), így kevésbé érintkeznek a vízmolekulákkal. Mivel a molekulák poláris részei könnyebben kölcsönhatásba lépnek a vízzel, így javul a

vegyület oldhatósága. Az ilyen komplexek kialakulása gyakran passzív folyamat, nemvizes közegben a molekulák között nem jön létre kölcsönhatás, azonban víz közvetítésével megtörténik a komplexálódás. Sanghvi és munkatársai a nikotinamid komplexképző képességét vizsgálták különböző gyógyszerhatóanyagokkal, és igazolták a komplexek szerkezetét, valamint a komplexképződés oldhatóságnövelő hatását(64, 65).

#### **1.4.4.2. Inklúziós komplexek**

Inklúziós komplexeknek a különböző hatóanyagok ciklodextrinokkal alkotott komplexeit nevezzük. A ciklodextrinek olyan gyűrűs oligoszacharidok, melyek külső, poláris felszínüknek köszönhetően jól oldódnak vízben, belső, apolárisabb üregük pedig képes a lipofil karakterű molekulákkal kölcsönhatásba lépni. Az így kialakult komplex, és ezáltal a molekula vízoldhatósága akár nagyságrendekkel is javulhat. Fontos azonban, hogy a hatóanyag és a ciklodextrin közötti stabilitási állandó is befolyásolja a készítmény biohasznosulását. Ha erős a kölcsönhatás, és a molekula nem szabadul fel a komplexből, az nehezítheti a passzív diffúzióval történő felszívódást. A három természetes eredetű ( $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$ ) ciklodextrinen kívül ma már számos módosított származék is elérhető, így könnyen ki lehet választani az adott molekula fizikai-kémiai tulajdonságaihoz leginkább megfelelő ciklodextrint. A komplexek előállítására számos módszer áll rendelkezésre. Legegyszerűbb esetben a két anyagot szilárd formában szárazon, vagy minimális oldószer jelenlétében pasztaként elegyítjük, majd utóbbi esetben az oldószer eltávolítása után granuláljuk a terméket. Más esetben a ciklodextrin oldatában oldjuk a hatóanyagot, majd valamilyen választott módszerrel (porlasztva vagy fagyasztva szárítás, elpárologtatás) eltávolítjuk az oldószert az elegyből. Szintén oldatból történő előállítási módszer, ha kicsapószer hozzáadásával csapadékként leválasztjuk a komplexet(66-68).

#### **1.4.4.3. Hármas komplexek**

A hármas komplexek szerkezete hasonló az inklúziós komplexek szerkezetéhez, azonban egy harmadik segédanyag segít a további stabilizációban. Bázikus karakterű hatóanyagok esetében általában savas karakterű segédanyagot, pl. citromsavat vagy borkősavat, savas karakterű hatóanyagok esetében pedig valamilyen bázikus karakterű segédanyagot (pl. trietanolamin) alkalmaznak. Elterjedt továbbá az aminosavak, valamint a különböző vízoldékony polimerek (Soluplus, PVP) híg oldatának ilyen célra történő alkalmazása is. Előállításukra az inklúziós komplexek előállításának ismertetésekor

bemutatott technikák alkalmasak, az egyetlen különbség a harmadik segédanyag alkalmazása a stabilabb komplex létrejöttének érdekében(69, 70).

#### **1.4.5. Származékképzés**

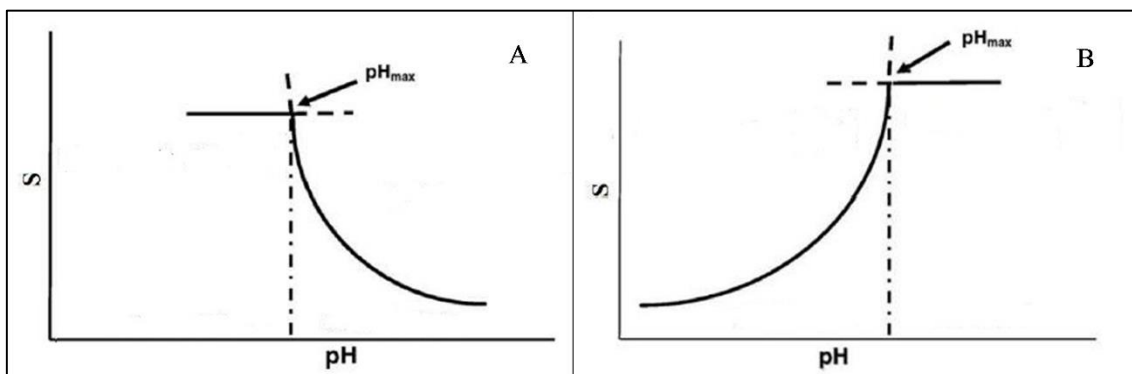
##### **1.4.5.1. Prodrug előállítása**

Prodrugnak nevezzük az olyan molekulákat, melyeknek önálló farmakológiai hatásuk nincs, azonban a szervezetben átalakulnak az aktív, hatás kifejtésére képes formává. Tény, hogy a prodrug technológiát leggyakrabban rosszul felszívódó poláris vegyületek lipofilitásának, ezáltal felszívódásának javítására alkalmazzák, de lehet cél a *first-pass* metabolizmus elkerülése is. Ugyanakkor fontos technika lehet az oldhatóság növelésére is rosszul oldódó, lipofil molekulák esetében. Ezen stratégia esetén a molekulára olyan funkciós csoportokat kapcsolnak, amelyek polaritásuknál fogva növelik a vegyület oldhatóságát, a szervezetben azonban valamilyen enzimátikus vagy egyéb módon eltávolításra illetve átalakításra kerülnek. Ez nem feltétlenül jelenti ionizálható funkciós csoport kapcsolását: például a szulindák molekulában található szulfoxid csoport polaritásának köszönhetően nagyban megnöveli a molekula oldhatóságát, a szervezetben ez a funkció pedig a hatékony, szulfid formává alakul. Ionizálható csoportokat tekintve igen gyakori a foszforsav-észterek vagy –amidok alkalmazása prodrugként oldhatóságnövelés céljából: előbbire példaként említhető a fozempranevir vagy a foszfenitoin, míg utóbbira egy közismert példa a foszaprepitant. Ezen vegyületek alkalmazása a vízoldhatóságot kb. tízszeresére képes növelni, ugyanakkor a felszívódásuk csökkenhet. A szervezetben azonban a foszfátáz enzimek lehasítják a foszfát csoportot, az így keletkező aktív molekula felszívódása pedig már sokkal kedvezőbb. Foszfátésztereken túl egyéb észter típusú funkciós csoportokat is alkalmazhatunk oldhatóság növelésére, például cukor-, cukoralkohol- vagy aminosav-észtereket. Ilyen hatóanyag a valaciklovir, mely az aciklovir valin-észtere(71-73).

##### **1.4.5.2. Sóképzés**

Ionizálható csoportokkal rendelkező molekulák esetén lehetőség van sók képzésére: bázikus karakterű hatóanyagok savakkal, savas karakterű hatóanyagok pedig bázisokkal képesek sókat kialakítani. Ezen sók oldhatósága a pH függvényében vizsgálva eltérést mutat a HH összefüggéshez képest: egy anyagra jellemző pH érték felett (savak), vagy alatt (bázisok) a rendszerben a só forma jelenléte dominál, a telített oldat a só szilárd formájával tart egyensúlyt. Ez a jellemző pH érték a  $pH_{max}$ . Ezen a pH-n éri el a vegyület

a maximális oldhatóságát. A bázisok illetve savak oldhatóságának pH függését a 2. ábra szemlélteti: az A panelen egy bázis és sójának pH függő oldhatósága látható, a  $pH_{max}$  alatti pH értékeknél a só formával tart egyensúlyt a rendszer, ez okozza a HH egyenlet által becsült értékektől való eltérést, a plató szakasz megjelenését. Savak esetében az ionizáltsági állapotnak köszönhetően ez a tendencia ellentétesen változik a pH függvényében (B panel).



**2. ábra.** Bázis és sójának (A) illetve savnak és sójának (B) pH függő oldhatósága(74)

A  $pH_{max}$  értéke függ az adott vegyület  $pK_a$  értékétől, az adott szabad sav vagy bázis oldhatóságától, illetve a képződő só oldhatóságától. Ez utóbbi a sótól függően változhat, így az egyes hatóanyagok esetén megválasztható a megfelelő biohasznosulás és a formuláció tekintetében legjobb só forma. Előállításuk leggyakrabban kicsapással történik: a szabad sav vagy bázis oldatát elegyítik a sóképző oldatával, majd vagy elpárologtatják az oldószert, hogy visszamaradjanak a sókristályok, vagy kicsapószert adnak az oldathoz, a kicsapódó kristályokat pedig elválasztják a folyadék fázistól(74-76).

#### 1.4.6. Segédanyagok alkalmazása

Az eddig felsorolt módszereken túl lehetőség van különböző szolubilizáló ágenseket adni az oldószerhez, ami így növelheti a vegyületek oldhatóságát. Ilyenek lehetnek a felületaktív anyagok, koszolvensek vagy a hidrotropizáló anyagok.

##### 1.4.6.1. Felületaktív anyagok

A felületaktív anyagok olyan molekulák, amelyek hidrofób és hidrofil régiókkal is rendelkeznek, vizes közegbe kerülve pedig a kritikus micellaképzési koncentráció felett – amely a monomerek telített oldatának koncentrációja – micellaképzésre hajlamosak. Ezen micellák belső, apoláris része magába zárja a lipofil molekulákat, ennek köszönhetően azok koncentrációja az oldat fázisban megnövekszik. Gyakorlatban

alkalmaznak nemionos anyagokat (pl. szorbitol, poliszorbát), illetve anionos (pl. nátrium-laurilszulfát) vagy kationos (pl. cetrimónium-bromid) tenzideket is ilyen célra. Az oldhatóság növelési képességüket tekintve nincs általános sorrend ezen anyagok között, ezen tulajdonság nagyban függ az alkalmazott hatóanyag tulajdonságaitól(77, 78).

#### **1.4.6.2. Koszolvensek**

Koszolvenseknek nevezzük a vízzel elegyedő szerves oldószereket, amelyek a vízhez képest apolárisabb karakterrel rendelkeznek. A vizes oldószer és a koszolvens elegyítése során megbomlanak a vizes közegben jellemző stabil hidrogénkötések, így összességében egy kevésbé poláris oldószerkelet jön létre, melyben a „hasonló hasonlót old elv” alapján javul a lipofil vegyületek oldhatósága. Koszolvensként a leggyakrabban glicerint, etanolt, polietilén-glikolt vagy propilén-glikolt alkalmaznak. Komoly hátránya azonban a koszolvensek alkalmazásának, hogy toxikusak lehetnek, így mennyiségük limitált egy adott gyógyszerkészítményben. Ezen túlmenően egy vizes oldószer-koszolvens rendszerben oldott vegyület vizes közegű oldószerrel történő hígítása során könnyen kicsapódhat az anyag, ez a kicsapódás pedig egyrésztől kontrollálatlan, így nem befolyásolható, hogy milyen lesz a termék részecskemérete illetve kristályszerkezete, másrésztől egy parenterális gyógyszerkészítmény esetén súlyos embóliakockázatot jelent a szilárd anyag megjelenése a véráramban(65, 79).

#### **1.4.6.3. Hidrotropizálás**

A hidrotrop anyagok hasonlóan növelik az oldhatóságot, mint a koszolvensek, azonban ebben az esetben nem szerves oldószereket alkalmazunk erre a célra, kiküszöbölve ezzel az előző fejezetben említett problémákat. A hidrotrop anyagok változatos szerkezeti csoportokba sorolhatók, szerves sók (pl. nátrium-benzoát, nátrium-szalicilát), aromás vegyületek (pl. rezorcin, pirogallol, para-amino-benzoésav) és alkaloidok (pl. koffein, nikotin) egyaránt megtalálhatóak köztük. Az oldhatóságnövelő mechanizmus szerkezettől független, a molekulák önasszociációján és az asszociátumok hatóanyaggal történő kölcsönhatásán alapszik. A felületaktív anyagokhoz hasonlóan itt is van egy minimális koncentráció (a minimális hidrotrop koncentráció), amely felett megindul az aggregáció és ezzel megjelenik a szolubilizáló hatás. Ez a koncentráció az adott anyagra jellemző mennyiség. Ezen túlmenően egyes hidrotropok segíthetnek megakadályozni az oldószermolekulák közötti hidrogénkötések kialakulását, ezzel megváltoztatva az oldószer tulajdonságait. Az ilyen hidrotropokat nevezzük



kaotrópoknak. Más esetben a hidrotropok az apoláris kölcsönhatások kialakulását segítik, csökkentve ezzel a minimális hidrotrop koncentrációt. Ezeket nevezzük kozmotrópoknak, az optimális hatás elérésének érdekében gyakran alkalmazzák ezek kombinációját.(80, 81).

## 2. Célkitűzés

Doktori munkám célja volt az egyensúlyi oldhatóságot befolyásoló tényezők szisztematikus vizsgálata, és ezen változók figyelembevételével olyan helyes mérési gyakorlatok (good practice) fejlesztése különböző modellvegyületek segítségével, amelyek alkalmazása segíti és javítja a pontos és reprodukálható eredmények elérését.

Munkám első részében a telítéssel rászórt módszer gyakorlatát vizsgáltuk felül. Ezen eljárás régóta ismert és széles körben alkalmazott módszer az egyensúlyi oldhatóság meghatározására, validált protokollját Baka és munkatársai 2008-ban megjelent tanulmányukban közölték. Eszerint a telített oldat koncentrációjának meghatározása előtt az oldat és a szilárd fázis elválasztása szükséges, melyre a szedimentáció a javasolt eljárás. Ez azonban nem minden esetben kivitelezhető, ekkor centrifugálást vagy szűrést alkalmazhatunk fázisszeperáció céljából. A gyakorlatban ez utóbbi a leggyakrabban alkalmazott eljárás. Anyagát, pórusátmérőjét, felépítését tekintve számos különböző szűrő érhető el a kereskedelmi forgalomban, azonban kevés irányelv áll rendelkezésre a megfelelő szűrő kiválasztásához. Munkám egyik célja éppen ezért annak vizsgálata volt, hogy a különböző karakterisztikájú szűrők alkalmazása mennyiben befolyásolhatja az egyensúlyi oldhatóság értékét ionizált és nem ionizált állapotú molekulák esetén(18, 82, 83).

Munkám folytatásában különböző, az egyensúlyi oldhatóságot befolyásoló tényezők és az oldhatóság növelésére alkalmazott módszerek esetében kívántunk áttekintést nyújtani az oldhatósági mérés helyes gyakorlatáról. Elsőként három különböző hatóanyag – venlafaxin, oxitettraciklin és karvedilol – polimorf módosulatainak oldhatóságát határoztuk meg. Annak ismeretében, hogy a polimorf módosulatok oldatba kerülve átalakulásokat mehetnek keresztül, a méréseket kiegészítettük szilárd fázisú analízissel, valamint annak érdekében, hogy megállapítsuk az adott hatóanyag esetén az egyensúly eléréséhez szükséges időt, az oldhatósági mérés kezdetétől valós időben történt a koncentrációváltozás követése, amennyiben az oldat koncentrációja ezt lehetővé tette.(35, 84).

Ezt követően egy oldhatóság növelésére alkalmazott módszer, a részecskeméret-csökkentés egyensúlyi oldhatóságra gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Különböző sav-bázis karakterű modellanyagok mikronizált és nanonizált formáinak előállítását követően

vizsgáltuk azok pH-függő oldhatóságát. Mivel a nanonizált minták előállításához szükség volt polimer segédanyagokra, így munkám ezen része egy komplex vizsgálat volt a részecskeméret, pH, biomimetikus közeg és formulációs polimerek oldhatóságot befolyásoló hatásáról. Ezen ismeretek fényében pedig javaslatot kívántunk tenni a helyes mérési gyakorlatra és a szükséges kiegészítő műszeres technikák alkalmazására.

### **3. Módszerek**

#### **3.1. Felhasznált anyagok**

##### **3.1.1. Felhasznált anyagok szűrők vizsgálatához**

A modell hatóanyagként használt diklofenák-nátriumot, papaverin-hidrokloridot, hidroklorotiazidot és progeszteront a Sigma-Aldrich gyártótól szereztük be. Az oldhatósági mérésekhez használt Britton-Robinson (BR) pufferek előállításához a Gyógyszerkönyv előírásainak megfelelő minőségű desztillált vizet használtunk. A további, pufferkészítéshez szükséges vegyszerek – tömény ecetsav, foszforsav, bórsav és nátrium-hidroxid – mind analitikai minőségűek voltak. A vizsgálat során használt szűrők különböző forgalmazóktól származtak: a hidrofíl karakterű poliéterszulfon (PES) membránszűrőt (Millex-GP, pórusátmérő: 0,22  $\mu\text{m}$ , szűrő átmérője: 2,5 cm) és a polivinilidén-fluorid (PVDF) membránszűrőt (Millex-GV, pórusátmérő: 0,22  $\mu\text{m}$ , szűrő átmérője: 2,5 cm) a Millipore gyártotta, a nylon szűrők (Millex-GV, pórusátmérő: 0,45  $\mu\text{m}$ , szűrő átmérője: 2,5 cm) a VWR vállalatától származtak. A hidrofób politetrafluoretilén (PTFE) membránszűrőt (FilterBio, pórusátmérő: 0,45  $\mu\text{m}$ , szűrő átmérője: 2,5 cm) a Labex Kft.-től vásároltuk, míg az analitikai szűrőpapírt (MN-640dd, pórusátmérő: 0,45  $\mu\text{m}$ , szűrő átmérője: 5,0 cm) a Macherey-Nagel gyártótól szereztük be.

##### **3.1.2. Felhasznált anyagok polimorf módosulatok vizsgálatához**

A munka során a vizsgált hatóanyagok – venlafaxin-hidroklorid, oxitetracliklin-hidroklorid és karvedilol – kereskedelmi forgalomban elérhető módosulatait a Sigma-Aldrich gyártótól vásároltuk. A hatóanyagok polimorf módosulatait szabadalmi illetve irodalmi adatok alapján állítottuk elő. A venlafaxin-hidroklorid esetén az US6924393B2 szabadalom, az oxitetracliklin-hidroklorid esetén Burger és munkatársainak munkája (1986), míg a karvedilol esetén Pataki és munkatársainak munkája (2012 és 2013) szolgált útmutatásként az előállításához(85-88). Minden esetben igazoltuk a módosulatok szerkezetét porröntgen-diffrakciós (XRPD) mérésekkel. Az oldhatósági méréseket BR tompítóoldatok alkalmazásával végeztük, az ezekhez szükséges vegyszerek analitikai minőségűek voltak, az oldáshoz használt desztillált víz gyógyszerkönyvi minőségű volt.

##### **3.1.3. Felhasznált anyagok mikronizált és nanonizált minták vizsgálatához**

A modell hatóanyagként szolgáló nifluminsavat a Sigma-Aldrich gyártótól, a papaverin-hidrokloridot a Molar Chemicals Kft.-től, a furozemidet pedig a TCI Europe

forgalmazótól szereztük be. Ezekből a kereskedelmi forgalomban kapható hatóanyagokból a részecskeméret-csökkentett mintákat a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézetében állították elő számunkra, száraz őrléses technikával, golyósmalomban (Retsch Ball Mill). A fordulatszám 400 rpm, az őrlési idő 2 óra volt mind a mikronizált, mind a nanonizált hatóanyagok esetében. A különbséget a nanonizált minták előállításánál alkalmazott polimer segédanyag jelentette, amely az aggregáció megelőzésére szolgált. Az erre a célra használt polivinilalkoholt (PVA) és polivinilpirrolidon K25-öt (PVP-K25) a Sigma-Aldrich szolgáltatta számunkra. A biomimetikus közegek előállításához használt SIF (simulated intestinal fluid, szimulált bélnedv) port a biorelevant.com-ról rendeltük. Az egyéb, pufferkészítéshez alkalmazott vegyszerek – sósav, nátrium-hidroxid pellet, nátrium-klorid, tömény ecetsav, nátrium-dihidrogén-foszfát – analitikai minőségűek voltak.

## **3.2. Egyensúlyi oldhatóság meghatározása**

### **3.2.1. Egyensúlyi oldhatóság meghatározása szűrők vizsgálatához**

A minták egyensúlyi oldhatóságának meghatározása a Baka és munkatársai által standardizált SSF módszert követve történt, minden esetben legalább 3 párhuzamos mérés kivitelezésével(18). A minták oldására BR tompítóoldatokat használtunk, 2-11 közötti pH tartományban. Minden ionizálható hatóanyag esetén 3 különböző pH-n végeztük el az oldhatósági méréseket, melyek az alábbi szempontok szerint választottunk meg. Az első puffer pH értékénél közel 100%-ban az adott molekula ionizált formája volt jelen. A második puffer pH-ja megegyezett az adott vegyület  $pK_a$  értékével, vagyis a molekulák 50%-a volt ionizált állapotban. A harmadik esetben pedig a molekulák közel 100%-a nemionizált formában volt jelen a rendszerben. Az egyes hatóanyagok esetén alkalmazott pontos pH értékeket a 4. táblázat tartalmazza. Az ionizálható csoporttal nem rendelkező progeszteron esetében a méréseket kizárólag pH=7,4 BR pufferben végeztük el, mivel esetében a pH változtatása nem befolyásolja az egyensúlyi oldhatóságot. A BR pufferek előállításához először egy alapoldatot készítettünk, mely bórsavat, foszforsavat és ecetsavat tartalmaz egyaránt 0,04 M koncentrációban. A mérésekhez használt pufferek pH-ját 0,2 M NaOH hozzáadásával állítottuk be.

**4. táblázat.** *Az ionizálható csoporttal rendelkező modellanyagok egyensúlyi oldhatóságának meghatározására alkalmazott BR tompítóoldatok pH-ja*

	pH		
	100% nemionizált forma	50% ionizált, 50% nemionizált forma	100% ionizált forma
diklofenák-Na	2,0	4,0	10,0
hidroklorotiazid	6,0	8,8	11,0
papaverin-HCl	10,0	6,4	3,0

A szilárd anyagot feleslegben adtuk az oldószerhez, majd a kapott szuszpenziót Heidolph MR 1000 mágneses keverőn 6 órán át kevertettük, ezt követően pedig 18 órán át üleptítettük, amíg a rendszer elérte az egyensúlyi állapotot. A szuszpenziókat a mérés teljes időtartama alatt  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ -on termosztáltuk. A kevertetés első órája után ellenőriztük a rendszer pH-ját, és amennyiben az eltért a kiindulási értéktől, 0,02 M NaOH vagy HCl hozzáadásával visszaállítottuk azt az eredeti értékre. Az üleptítés letelte után mintát vettünk az oldat tisztájából, majd szükség esetén hígítást követően felvettük az UV-abszorpciós spektrumát. Ahhoz, hogy a különböző szűrők esetleges befolyásoló hatását vizsgálni tudjunk, ugyanezen oldatokat szűrtük a különböző membránszűrőkön és az analitikai szűrőpapíron keresztül. A vizsgált membránszűrők között volt hidrofil karakterű (PVDF, PES), hidrofób tulajdonságú (PTFE) és nylonból készült szűrő is. Hatszor  $600 \mu\text{L}$  oldatrészletet szűrtünk át a membránszűrőkön, az első és az utolsó részletből végeztük a koncentrációmeghatározást. Az analitikai szűrőpapírt előzetesen a méréshez alkalmazott puffer 5 mL részletével nedvesítettük át.

Az üleptítés illetve szűrés után az oldatok koncentrációjának meghatározása UV spektrofotometriás módszerrel történt, Jasco V-550 spektrofotométer segítségével. Ahhoz, hogy a mért abszorbancia értékekből ki tudjuk számítani az oldatok koncentrációját, minden alkalmazott pufferoldat esetén meghatároztuk az adott vegyület fajlagos abszorbanciáját (1 g/100 mL koncentrációjú oldat abszorbanciája 1 cm fényúthossznál adott hullámhosszon és hőmérsékleten) a molekula elnyelési maximumának hullámhosszán. Ehhez ismert koncentrációjú törzsoldatból hígítási sort készítettünk, majd 12-18 ponton mértük az oldatok abszorbanciáját. Az abszorbancia-koncentráció adatpárookra illesztett egyenes meredekségéből megkaptuk a vegyület

fajlagos abszorbanációjának értékét adott pH-n és hullámhosszon a Lambert-Beer összefüggés alapján (9. egyenlet),

$$A = A_{1cm}^{1\%} * c * l \quad (9)$$

ahol  $A$  a mért abszorbanancia,  $A_{1cm}^{1\%}$  a vegyület fajlagos abszorpciós koefficiense,  $c$  a koncentráció (g/100 mL),  $l$  a fényúthossz.

### 3.2.2. Polimorf módosulatok egyensúlyi oldhatóságának meghatározása

A három modellvegyület különböző polimorf módosulatainak oldhatósági vizsgálatait szintén BR pufferoldatokban végeztük, széles pH tartományban, minimum 3 párhuzamos méréssel. A venlafaxin-hidroklorid két módosulatának egyensúlyi oldhatóság mérése 7,5-12 közötti pH tartományban zajlott, az oxitetraciklin-hidroklorid módosulatok esetében a vizsgált tartomány pH 4 és 7,4 között volt. A karvedilol oldhatóságának meghatározását pH 3 és 10 közötti intervallumban végeztük el, a savas pH tartományban nemcsak a korábban ismertetett BR pufferekben, hanem olyan módosított összetételű BR tompítóoldatokban is, melyek ionerősségét kálium-kloriddal 0,15 M-ra állítottuk be. Mindhárom hatóanyag egyensúlyi oldhatóságának meghatározását  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ -on termosztált körülmények között végeztük.

Mivel ismert, hogy a polimorf módosulatok oldószer jelenlétében átalakulásokon mehetnek keresztül, amely megnyújthatja az egyensúly elérésének idejét, így a venlafaxin-hidroklorid és a karvedilol esetében az egyensúly beállítását valós időben követtük *in situ* UV-szondák segítségével,  $\mu\text{DISS Profiler}^{\text{TM}}$  készüléken. Az említett átalakulások miatt a mintákat szilárd fázisú analitikai módszerekkel is elemeztük, ezek bemutatására a 3.3. fejezetben kerül sor. A  $\mu\text{DISS Profiler}^{\text{TM}}$  készülék egy spektrofotométerhez optikai szálakon csatlakozó UV szondákból áll, melyek közvetlenül az oldatba merülnek, így megvalósítható a valós idejű spektrumfelvétel. A szondák végén található fejek cseréjével változtatható a fényúthossz (2-5-10-20 mm), így azt a várható koncentrációnak megfelelően tudjuk megválasztani. A műszerhez tartozó számítógépes program (AuPRO<sup>TM</sup>) segítségével beállítható a spektrumfelvétel gyakorisága, illetve mivel az oldhatósági mérések során tiszta oldatok helyett szuszpenziókkal dolgozunk, a részecskék jelenlétének köszönhető alapvonal-emelkedés kiküszöbölésének érdekében lehetőség van a spektrumok második deriváltjainak segítségével történő kiértékelésre, így mi is ezt választottuk munkánk során. Ahhoz, hogy a felvett spektrumokból

koncentráció adatokat kapjunk, ebben az esetben is előzetes kalibráció szükséges, amelyet a mérésre alkalmazott közegben és a méréshez használt szondafejjel kell elvégezni. Kivitelezését tekintve egy tömény, DMSO-val készített, ismert koncentrációjú törzsoldat részleteit adagoljuk a pufferoldathoz, és minden részlet után felvesszük az oldat spektrumát. A törzsoldat koncentrációját úgy szükséges megválasztani, hogy a DMSO mennyisége a kalibráció teljes tartományában 1% alatt maradjon a vizes pufferben. Venlafaxin esetében a mérési protokoll a hagyományos SSF módszerhez hasonlóan alakult: a mintákat 6 órán át kevertettük, majd ezt követte a 18 órás szedimentációs periódus. Ez alatt az idő alatt a következő időközönként vettük fel az anyag oldatának spektrumát: 0 és 2 óra között 1 percenként, 2 és 6 óra között 10 percenként, ezt követően pedig a mérés végéig fél óránként. A karvedilol esetében az egyensúly eléréséhez hosszabb mérési idő volt szükséges, így a mintákat 60 órás kevertetést követően 6 órán keresztül ülepítettük, a spektrumokat pedig a következő protokoll szerint vettük fel: 0 és 1 óra között 30 másodpercenként, 1 és 6 óra között 1 percenként, ezt követően pedig 24 óráig 2 percenként. A továbbiakban 12 óránként történt mérési pont felvétele egészen az egyensúly beállításáig.

Az oxitetraciklin-hidroklorid esetében a vegyület rendkívül magas oldhatósága miatt az UV szondákkal történő valós idejű követés nem volt lehetséges, így az egyensúlyi oldhatóság meghatározása a 3.2.1. fejezetben leírt SSF protokoll szerint történt. Az oldódás valós idejű követését az izoelektromos pontnak megfelelő, pH 5,0 közegben ATR-UV szonda segítségével tudtuk megvalósítani, amelynek a végén egy zafirkristály található, működése pedig a gyengített totálreflexió elvén alapul. Ez a felépítés lehetővé teszi az UV szondákkal nem mérhető, tömény oldatok koncentrációmeghatározását, mivel a mintának csak nagyon vékony, pár  $\mu\text{m}$  vastag rétegén halad át a fény(89). A spektrumfelvételek gyakorisága megegyezett a venlafaxin-hidroklorid minták mérése esetén alkalmazott mérési protokollal.

### **3.2.3. Mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának meghatározása**

A minták egyensúlyi oldhatóságát a kevertetési és szedimentációs idő tekintetében a 3.2.1. fejezetben ismertetett SSF módszer szerint határoztuk meg, a fajlagos abszorpciós koefficiens meghatározása adott közegben és hullámhosszon szintén az itt leírtak szerint zajlott. Az egyensúly beállítását ismételt mintavételekkel ellenőriztük, ennek köszönhetően néhány esetben, amikor szükséges volt, 24 óránál hosszabb mérési időt alkalmaztunk. A



méréseket  $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ -on termosztált körülmények között végeztük, modellezve ezzel a testhőmérsékletet. A minták oldhatóságának meghatározását kétféle közegben végeztük el. Először kizárólag a pH beállításával modelleztük a gyomor-bél traktusban uralkodó viszonyokat, míg a második esetben már a bélnedv komponenseinek szolubilizáló hatását is szimuláltuk(22, 90, 91). Ehhez előállítottuk a pH 6,5 foszfátpuffert (FaSSIF blank), amelynek pH-ja megfeleltethető az étkezés előtti vékonybél pH értékének, valamint a pH 5,0 acetátpuffert (FeSSIF blank), amely az étkezés utáni vékonybél pH értékét szimulálja. Ezekből a pufferekből a gyártó előírásai alapján SIF por hozzáadásával állítottuk elő a biomimetikus közegeket (FaSSIF és FeSSIF full).

Mivel a nanonizált minták előállításához szükség volt polimer segédanyagok alkalmazására, így a mikronizált és kereskedelmi forgalomban kapható minták egyensúlyi oldhatóságának meghatározását elvégeztük ezen segédanyagok jelenlétében is, mert a segédanyagok szintén befolyásolhatják a vegyületek oldhatóságát(92). Minden minta esetében segédanyag jelenlétében illetve anélkül is legalább 3 párhuzamos mérést végeztünk. A minták vizsgálatának részét képezte a szilárd fázisú analízis az esetleges átalakulások nyomon követésének érdekében, illetve az oldhatósági mérések végén a szuszpenziók részecskeméret-analízise, ezek a 3.3. és 3.4. fejezetekben kerülnek ismertetésre.

### **3.3. Szilárd fázisú analízis**

A szilárd fázisú analízist a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szerves Kémia és Technológia Tanszékén, valamint a Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén végeztük.

#### **3.3.1. Porröntgen-diffrakció (XRPD)**

XRPD méréseket alkalmaztunk a polimorf módosulatok vizsgálatokor a kereskedelmi forgalomban kapható hatóanyagból előállított másik módosulat szerkezetének igazolására, valamint az oldhatósági mérések végén a szilárd fázis szerkezetének felderítésére és ezzel az esetleges átalakulások nyomon követésére. Ez utóbbihoz az ülepített minták szilárd fázisának kis részletét egy tárgylemezre cseppentettük, majd szobahőmérsékleten megszáritottuk. A részecskeméret-csökkentett minták esetében is ezzel a módszerrel vizsgáltuk a kereskedelmi forgalomban kapható

anyaghoz viszonyítva a mikronizált és a nanonizált mintákat, felderítve ezzel, hogy az őrlés okozott-e változást a minták kristályszerkezetében. Továbbá ezen minták esetében is vizsgáltuk az oldhatóság végén a szilárd fázisban bekövetkező esetleges változásokat. A mintavétel a polimorf módosulatok mérésénél bemutatott módon történt. A mérések egy PANalytical X'Pert ProMDP röntgen-diffraktométer segítségével történtek, Cu-K $\alpha$  sugárzás (1.524 Å) és nikkel szűrő alkalmazásával. Az alkalmazott feszültség 40 kV, az áramerősség 30 mA volt. A minták analízise jellemzően minden vizsgált anyag esetén olyan  $2\theta$  tartományban történt, ahol az adott anyagra jellemző karakterisztikus csúcsok megfigyelhetők voltak.

### 3.3.2. Raman-spektroszkópia

A polimorf módosulatok vizsgálatára a porröntgen-diffrakciós mérések mellett Raman-analízist is végeztünk. Ehhez egy Horiba Jobin-Yvon LabRAM Raman spektrométert használtunk, amelyet egy Olympus 97 BX-40 optikai mikroszkóphoz kapcsolva tudtuk a mintákat analizálni. A besugárzás egy 785 nm hullámhosszú diódalézerrel történt, 10-szeres nagyítású objektív alkalmazása mellett. A lézersugarat az objektíven keresztül a mintára fókuszáltuk, majd a mintán szóródott fénysugarakat ugyanezen objektív gyűjtötte össze. Az összegyűjtött sugárzás először egy szűrőhöz került, amely eltávolította a Rayleigh-fotonokat, ezt követően pedig egy konfokális lyukon (500  $\mu\text{m}$ ) és a bemeneti résen (100  $\mu\text{m}$ ) vezettük át. Végül egy rácsos monokromátor eloszlatta a Rayleigh-fotonokat, mielőtt a sugárzás elérte volna a detektort. Minden egyes spektrumot a 300-1600  $\text{cm}^{-1}$  tartományban gyűjtöttünk össze, a későbbiekben pedig ennek a spektrumnak azt a részletét ábrázoltuk, ahol az anyagra jellemző karakterisztikus csúcsok megjelennek. Az XRPD mérésekhez hasonlóan itt is összehasonlítottuk az oldhatósági mérések végén vett szilárd minták Raman-spektrumát a kiindulási módosulatok Raman-spektrumaival, így nyilvánvalóvá váltak a mérés során történt átalakulások.

### 3.3.3. IR-spektroszkópia

Infravörös tartományban (4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ ) történő analízist alkalmaztunk az oxitetraciklin-hidroklorid polimorfok esetében a kiindulási módosulatok vizsgálatára. Burger és munkatársai (1986) ezt a módszert alkalmazták a minták analizésére, így nekünk is szükségünk volt erre a módszerre, hogy bizonyítsuk a pontos reprodukálhatóságot. A mérésekhez egy Bruker Tensor 37-es típusú Fourier

transzformációs infravörös (FTIR) spektrofotométert használtunk, amely egy DTGS (deuterizált triglicin-szulfát) detektorral rendelkezik, melynek felbontása  $4\text{ cm}^{-1}$ . A mérésekhez a mintákat kiszárított kálium-bromiddal porítottuk, majd pasztillává préseltük.

### **3.4. Részecskeméret-eloszlás analízise**

A mikronizált és nanonizált minták vizsgálatakor elvégeztük mind az előállított minták, mind pedig az oldhatósági mérések végén a szuszpenziók részecskeméret-analízisét. A lézerdiffrakciós mérések a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézetében, a pásztázó elektronmikroszkópos mérések pedig a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézetében zajlottak.

#### **3.4.1. Lézerdiffrakció**

A kereskedelmi forgalomban elérhető és mikronizált minták, valamint az oldhatósági mérések végén a szuszpenziók átlagos részecskeméretét illetve részecskeméret-eloszlását lézerdiffrakciós mérésekkel határoztuk meg. Ehhez a Mastersizer 2000 készüléket használtuk, valamint a hozzá tartozó Mastersizer Hydro 2000 SM kistérfogatú diszpergáló egységet. A mérés során a mintákat 100 mL desztillált vizet tartalmazó diszpergáló egységbe juttattuk, ahol 1500 rpm fordulatszámú kevertetést alkalmaztunk. Ez az egység juttatta a mintákat a lézer-diffraktométerbe, ahol minden mintáról 3 párhuzamos mérés készült, egyenként 20 másodperces mérési idővel. Ez a készülék által javasolt optimális mérési idő, amely alatt a nagyobb, lassabb mozgású részecskék is biztosan a detektor látóterébe kerülnek. Általános mérési módban megnövelt érzékenység mellett történtek a mérések, ez a beállítás alkalmas ugyanis olyan rendszerek mérésére, amelyek nem szabályos alakú részecskéket is tartalmaznak.

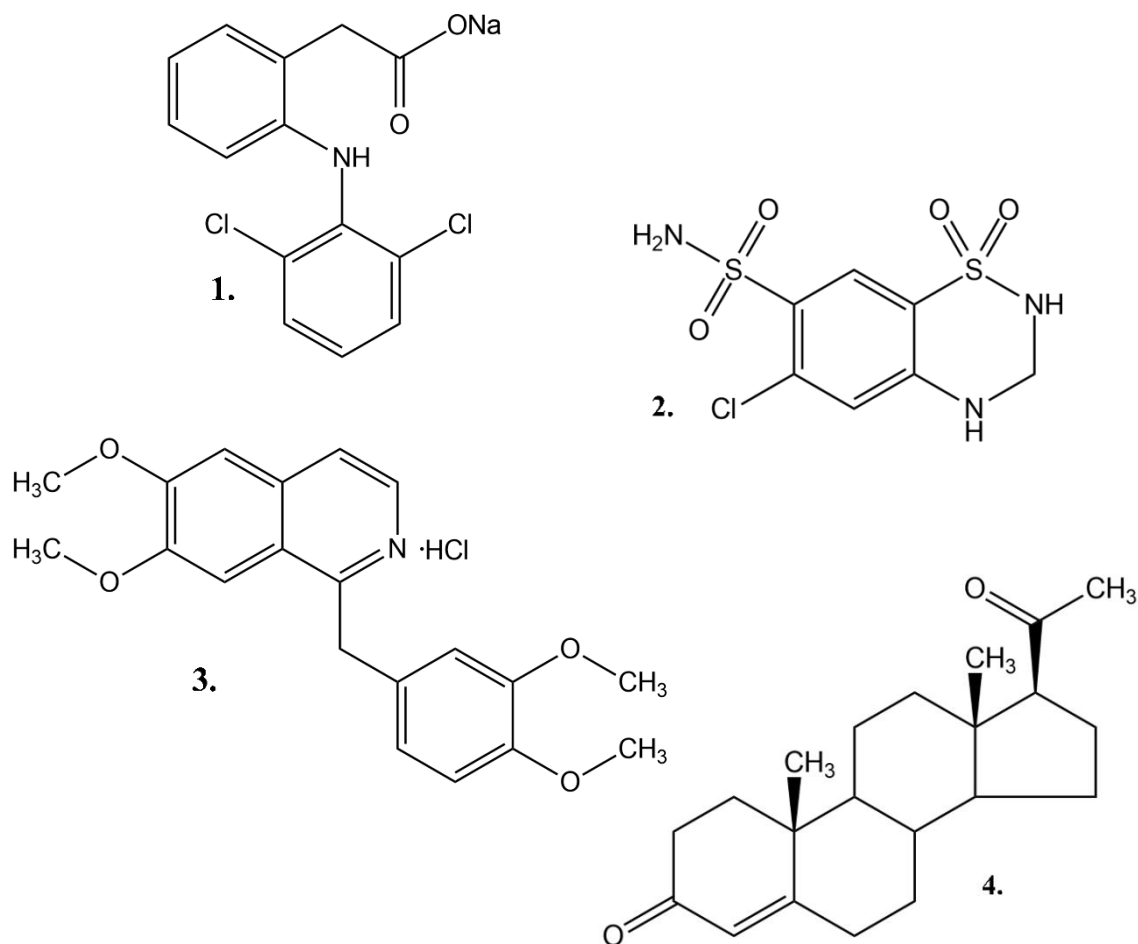
#### **3.4.2. Pásztázó elektronmikroszkópos mérések**

Az őrléssel előállított nanorészecskék méretét pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) mérésekkel tudtuk meghatározni. Ehhez egy Hitachi S4700 típusú elektronmikroszkóppal 10 kV feszültség mellett képeket készítettünk, majd a képeket az Image J szoftverrel (1.50i; Java 1.6.0\_20 [32-bit]; Windows NT) analizálva körülbelül 500 nanorészecske adataiból megkaptuk a nanorészecskék átlagos méretét.

## 4. Eredmények

### 4.1. Szűrők alkalmazásának hatása hatóanyagok egyensúlyi oldhatóságára

Ahhoz, hogy a szűrők esetleges egyensúlyi oldhatóságra gyakorolt hatását vizsgálni tudjuk, először meghatároztuk az összes hatóanyag oldhatóságát a validált SSF módszerrel, vagyis ülepitést alkalmaztunk fázisválasztásként. Az így kapott értékek jól reprodukálhatóak voltak alacsony szórással, valamint jó egyezést mutattak az irodalmi adatokkal (26, 93, 94). A későbbiekben az ülepitéses fázisválasztással nyert referenciaértékekhez hasonlítottuk a szűréssel kapott oldhatóságértékeket. A vizsgálathoz választott négy modellvegyület – diklofenák-nátrium, hidroklorotiazid, papaverin-hidroklorid és progeszteron – szerkezeti képlete a 3. ábrán látható.



**3.ábra.** Szűrők vizsgálatához választott modellvegyületek szerkezete. 1: diklofenák-nátrium, 2: hidroklorotiazid, 3: papaverin-hidroklorid, 4: progeszteron

#### 4.1.1. Diklofenák-nátrium

A diklofenák egy egyértékű savi karakterű molekula,  $pK_a$  értéke 3,99, lipofilitása meglehetősen magas ( $\log P = 4,51$ )(95, 96). A mérésekhez a molekula nátrium sóját használtuk kiindulási vegyületként. A különböző pH-jú pufferoldatokban mért egyensúlyi oldhatóság értékeket az 5. táblázat tartalmazza. Ebben szerepel az ülepitéses fázisválasztással meghatározott referenciaadat, valamint a membránszűrők esetében az első valamint az utolsó, hatodik szűrt oldatrészlet koncentrációja. Analitikai szűrőpapír esetében használat előtt csak pufferrel átnedvesítettük azt, több részletben történő szűrés nem történt.

**5. táblázat.** *A diklofenák egyensúlyi oldhatósága a különböző pH-jú pufferekben*

pH			2,0	4,0	10,0
$S_{pH}$ ülepités $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )			1,63 $\pm$ 0,08	2,55 $\pm$ 0,03	16152 $\pm$ 757
$S_{pH}$ szűrők $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	PVDF	1. részlet	1,52 $\pm$ 0,05	1,63 $\pm$ 0,11	8196 $\pm$ 3092
		6. részlet	-	-	10321 $\pm$ 626
	PES	1. részlet	0,82 $\pm$ 0,05	1,20 $\pm$ 0,08	13028 $\pm$ 1254
		6. részlet	-	-	13456 $\pm$ 616
	PTFE	1. részlet	1,30 $\pm$ 0,04	2,41 $\pm$ 0,18	11505 $\pm$ 532
		6. részlet	-	-	11581 $\pm$ 206
	Nylon	1. részlet	n.m.	n.m.	13661 $\pm$ 1829
		6. részlet	-	-	16025 $\pm$ 734
Analitikai szűrőpapír			2,67 $\pm$ 0,05	2,63 $\pm$ 0,15	14929 $\pm$ 649

n.m.: nem mérhető koncentráció

A diklofenák oldhatósága pH 2,0 közegben, ahol a molekula közel 100%-ban nemionizált formában van, illetve pH 4,0 közegben, ahol a molekulák 50%-a ionizált, rendkívül alacsony. Ennek köszönhetően ezekben az esetekben nem lehetett több részletben történő szűrést alkalmazni, mivel a teljes oldatmennyiségre szükség volt a koncentráció meghatározásához. Lúgos, pH 10,0 közegben megfigyelhető a tendencia, hogy az első oldatrészletek koncentrációja a szűrők adszorpciós képességének okán alacsonyabb, mint a 6. részlet szűrése utáni koncentráció, így a későbbiekben a 6. szűrés utáni mért koncentrációkat hasonlítottuk össze a referenciaértékkel.

#### 4.1.2. Hidroklorotiazid

A hidroklorotiazid két ionizálható csoporttal rendelkező, gyenge savi karakterű molekula, melynek lipofilitása rendkívül alacsony ( $\log P = -0,03$ ), ebből következően a vegyület intrinsic oldhatósága meglehetősen magas lesz. A savi funkciót a molekulában található két szulfonamid csoport szolgáltatja, ezek közül a gyűrűbe zárt csoport rendelkezik az erősebb savi karakterrel, míg a gyűrűhöz kapcsolódó némileg gyengébb savnak minősül ( $pK_{a1} = 8,75$  és  $pK_{a2} = 9,88$ ) (96, 97). Ebből következően a molekula ionizáltsági állapota lehet töltésmentes ( $H_2A$ ), egyszeresen negatív töltésű ( $HA^-$ ) vagy kétszeresen negatív töltésű ( $A^{2-}$ ). Az általunk vizsgált 3 különböző pH érték mindegyikénél eltérő a különböző ionizáltsági állapotú részecskék aránya: amíg a pH 6,0 tompítóoldatban mért érték megfeleltethető a molekula intrinsic oldhatóságának, addig a pH 8,8 közegben a molekulák 45%-a nemionizált formában van, az egyszeresen negatív töltésű részecske aránya 51%, a kétszeresen negatív töltésű részecskéé 4%. A harmadik, pH 11,0 pufferben a kétszeresen negatív töltésű forma jelenléte dominál (93%), kis mértékben (7%) pedig az egyszeresen negatív töltésű részecske is jelen van az oldatban. A hidroklorotiazid esetében mért egyensúlyi oldhatóság értékeket a 6. táblázat foglalja össze, a 4.1.1. fejezetben bemutatott diklofenákhöz hasonlóan külön részletezve a különböző szűrők esetén kapott eredményeket.

**6. táblázat.** *A hidroklorotiazid oldhatósága különböző pH-jú pufferekben*

pH		6,0	8,8	11,0	
$S_{pH}$ ülepítés ± SD (µg/mL)		556 ± 13	923 ± 20	59637 ± 1139	
$S_{pH}$ szűrők ± SD (µg/mL)	PVDF	1. részlet	524 ± 2	781 ± 11	35928 ± 1524
		6. részlet	571 ± 12	878 ± 24	38650 ± 2235
	PES	1. részlet	428 ± 10	828 ± 39	40449 ± 2134
		6. részlet	531 ± 4	921 ± 17	44971 ± 3657
	PTFE	1. részlet	554 ± 7	911 ± 17	58020 ± 7638
		6. részlet	568 ± 4	906 ± 13	59816 ± 781
	Nylon	1. részlet	n.m.	290 ± 19	70195 ± 2541
		6. részlet	570 ± 32	822 ± 30	70928 ± 3149
Analitikai szűrőpapír		462 ± 4	711 ± 6	61662 ± 673	

n.m.: nem mérhető koncentráció

A vegyület jó oldhatóságának köszönhetően ebben az esetben külön tudtuk mérni a szűrt oldatrészletek koncentrációját, azonban előfordult olyan eset, amikor a szűrő adszorpciós tulajdonsága miatt az első szűrt részletben található hatóanyagmennyiség a mérési határ alatt volt. Az első és hatodik részlet közötti koncentrációkülönbség a diklofenákhhoz hasonlóan itt is megfigyelhető, így az utóbbit hasonlítottuk össze a referenciával.

#### 4.1.3. Papaverin-hidroklorid

A papaverin egy egyértékű bázikus molekula ( $pK_a = 6,36$ ), amely magas lipofilitással rendelkezik ( $\log P = 2,95$ ) (96, 97). Ennek ellenére jó UV-abszorpciós tulajdonságának köszönhetően külön meg tudtuk határozni az első és a hatodik szűrt részlet koncentrációját a membránszűrőkkel történő szűrés során. Munkánkhoz kiindulási anyagként a vegyület hidroklorid sóját használtuk. Bázikus karakteréből kifolyólag a vegyület oldhatósága pH 10 közegben volt a legalacsonyabb, ahol a molekula nemionizált formában van jelen az oldatban. Ahogy a pH csökkenésével nő az ionizált molekulák aránya, úgy javul az anyag oldhatósága is. A papaverin esetében mért egyensúlyi oldhatóság értékeket a 7. táblázatban mutatom be.

7. táblázat. A papaverin egyensúlyi oldhatósága különböző pH-jú pufferekben

pH		10,0	6,4	3,0	
$S_{pH}$ ülepités $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )		$17,3 \pm 1,4$	$22,8 \pm 0,8$	$39060 \pm 1312$	
$S_{pH}$ szűrők $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	PVDF	1. részlet	$2,8 \pm 2,6$	$0,4 \pm 0,1$	$35973 \pm 363$
		6. részlet	$16,4 \pm 1,9$	$21,7 \pm 0,3$	$36298 \pm 1414$
	PES	1. részlet	n.m.	n.m.	$37110 \pm 12533$
		6. részlet	$13,9 \pm 1,2$	$10,1 \pm 0,4$	$37291 \pm 3818$
	PTFE	1. részlet	$10,4 \pm 0,4$	$20,8 \pm 0,7$	$38368 \pm 1116$
		6. részlet	$14,2 \pm 0,4$	$24,1 \pm 0,3$	$36803 \pm 801$
	Nylon	1. részlet	n.m.	$4,2 \pm 0,7$	$33825 \pm 212$
		6. részlet	$10,8 \pm 0,4$	$9,5 \pm 0,8$	$36633 \pm 566$
Analitikai szűrőpapír		$15,1 \pm 1,4$	$13,8 \pm 0,2$	$33352 \pm 1061$	

n.m.: nem mérhető koncentráció

Ahogy az előbbieken tárgyalt két modellanyagnál, úgy a papaverin esetében is csak a hatodik szűrt részlet koncentrációját hasonlítottuk össze a szedimentációs fázisválasztással kapott értékkel, ugyanazon okból kifolyólag.

#### 4.1.4. Progeszteron

Az ionizálható molekulákon kívül meghatároztuk a sav-bázis szempontból semleges, lipofil karakterű ( $\log P = 3,48$ ) progeszteron egyensúlyi oldhatóságát is(96). Nemionizálható molekuláról lévén szó, a pH nem befolyásolja a vegyület oldhatóságát, így méréseinket kizárólag pH 7,4 közegben végeztük el, eredményeinket a 8. táblázat tartalmazza.

**8. táblázat.** *A progeszteron egyensúlyi oldhatósága pH = 7,4 BR pufferben*

pH		7,4	
$S_{pH}$ ülepités $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )		7,95 $\pm$ 0,21	
$S_{pH}$ szűrők $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	PVDF	1. részlet	n.m.
		6. részlet	4,63 $\pm$ 0,53
	PES	1. részlet	-
		6. részlet	-
	PTFE	1. részlet	5,05 $\pm$ 0,20
		6. részlet	7,26 $\pm$ 0,61
	Nylon	1. részlet	n.m.
		6. részlet	4,37 $\pm$ 0,42
Analitikai szűrőpapír		7,77 $\pm$ 0,41	

n.m.: nem mérhető koncentráció

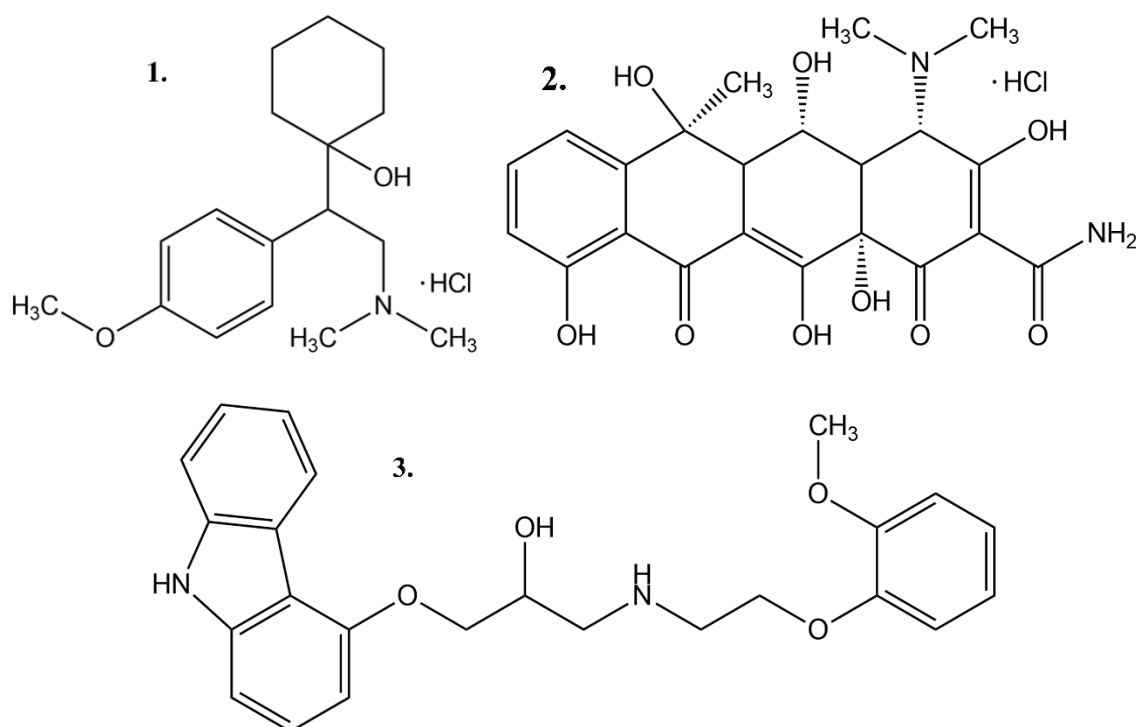
A progeszteron esetében is a hatodik szűrlet koncentrációját hasonlítottuk a referenciához, az első részlet koncentrációja több esetben is a mérési határ alatt volt a membránszűrőkön adszorbeálódott anyagmennyiség miatt.

#### 4.2. Polimorfok egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata

Ma már ismert tény, hogy a hatóanyagok döntő többsége egynél több polimorf módosulattal rendelkezik. Ezen polimorf módosulatok eltérő kristályszerkezetük miatt eltérő fizikai-kémiai tulajdonsággal rendelkezhetnek: különbözhet többek között az olvadáspontjuk vagy az oldhatóságuk is. Ez utóbbi nagyságrendnyi különbséget is jelenthet abban az esetben, ha az egyes módosulatok oldószer jelenlétében nem mennek keresztül semmilyen átalakuláson, hanem megőrzik eredeti kristályszerkezetüket. Amennyiben az anyag kristályszerkezetében átalakulás következik be, úgy nem látunk



különbséget az egyes polimorf módosulatok egyensúlyi oldhatóságában. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezekben az esetekben ténylegesen nem a kiindulási anyag koncentrációját mérjük, hanem az átalakulás során keletkezett termékét(84). Munkánk során három különböző hatóanyag polimorf módosulatainak oldhatóságát vizsgáltuk, megfigyelve a szilárd fázisban esetlegesen bekövetkező változásokat is. A három választott modellanyag – venlafaxin-hidroklorid, oxitetraciklin-hidroklorid és karvedilol – szerkezete a 4. ábrán látható.



**4. ábra.** Polimorfok egyensúlyi oldhatóságának vizsgálatához választott modellanyagok szerkezete. 1: venlafaxin-hidroklorid, 2: oxitetraciklin-hidroklorid, 3: karvedilol

#### 4.2.1. Venlafaxin-hidroklorid

A venlafaxin-hidroklorid egy 2. generációs antidepresszáns hatóanyag, amelyet a készítmények racemát formában tartalmaznak. Sav-bázis tulajdonságát tekintve a venlafaxin terciér aminocsoportja révén bázikus karakterű molekula ( $pK_a = 9,63$ )(98). A mérési pH tartományt úgy választottuk meg, hogy azon belül a molekula ionizáltsági állapota nagymértékben változzon. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a vegyület két polimorf módosulatban létezik. Ugyan a Form I. a stabilabb módosulat (olvadáspont: 210-212°C), de a jobb formulációs tulajdonságai (nagyobb részecskeméret, jobb

száradási képesség) miatt a Form II. (olvadáspont: 208-210°C) alkalmazása preferált a gyógyszeriparban(99). A módosulatok mért egyensúlyi oldhatósági adatait a 9. táblázatban foglaltam össze.

**9. táblázat.** *A két venlafaxin-hidroklorid polimorf egyensúlyi oldhatósága különböző pH-jú BR pufferoldatokban*

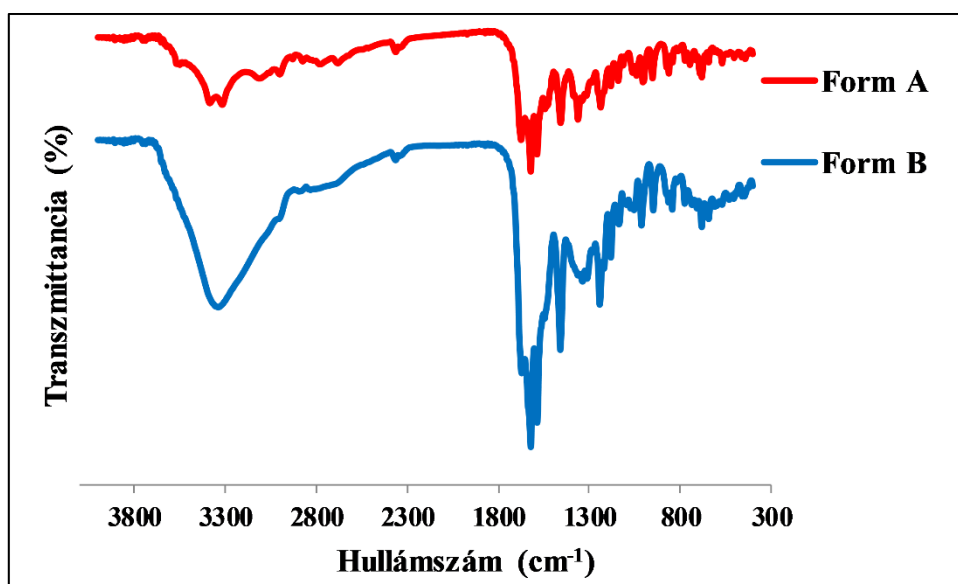
<b>Form I.</b>		<b>Form II.</b>	
<i>pH</i>	<i>S<sub>pH</sub> ± SD (mg/mL)</i>	<i>pH</i>	<i>S<sub>pH</sub> ± SD (mg/mL)</i>
7,50	59,35 ± 8,23	7,54	54,32 ± 4,43
7,70	32,08 ± 2,60	7,60	45,67 ± 2,34
7,83	23,34 ± 0,45	7,67	38,35 ± 2,99
8,30	8,655 ± 0,267	7,78	26,79 ± 0,27
8,34	7,194 ± 0,043	8,20	8,175 ± 1,061
8,37	7,495 ± 0,601	8,40	7,689 ± 0,345
8,43	6,983 ± 0,103	8,52	5,506 ± 0,104
8,47	6,364 ± 0,071	8,58	4,985 ± 0,053
9,30	0,948 ± 0,031	8,64	4,587 ± 0,013
9,50	0,796 ± 0,094	8,70	3,809 ± 0,104
9,72	0,574 ± 0,011	9,45	0,831 ± 0,027
9,76	0,507 ± 0,004	9,76	0,567 ± 0,014
9,81	0,559 ± 0,062	9,96	0,544 ± 0,011
9,96	0,570 ± 0,013	10,06	0,495 ± 0,052
10,34	0,521 ± 0,186	10,26	0,523 ± 0,037
10,41	0,454 ± 0,011	10,41	0,498 ± 0,034
11,51	0,275 ± 0,004	11,62	0,296 ± 0,025
12,11	0,292 ± 0,007	12,01	0,285 ± 0,004

A mérések során 24 órán keresztül valós időben monitoroztuk a koncentrációváltozást, amiből megállapítható volt, hogy az egyensúly beállása ezen időtartamon belül bekövetkezik. Mivel a valós idejű követés miatt a pH utólagos módosítására a mérés 1. órája után nincs lehetőség, így a táblázatban a mérések végén mért tényleges pH értékeket tüntettük fel.

#### 4.2.2. Oxitetraciklin-hidroklorid

Az oxitetraciklin-hidroklorid egy régóta ismert antibiotikum, melynek alkalmazása a rezisztencia elterjedése miatt visszaszorulóban van, bár a fejlődő országokban illetve az állatgyógyászatban ma is alkalmazzák. A vegyület három ionizálható csoportos amfoter molekula: két savi ( $pK_{a1} = 3,23$  és  $pK_{a2} = 7,22$ ), valamint egy bázikus ( $pK_{a3} = 8,82$ )

funkciós csoportja van(100). A molekula izoelektromos pontja pH 5,2-nél található, itt mérhetjük a vegyület intrinsic oldhatóságát. Az irodalomban számos oxitettraciklin polimorf ismert, ezek közül azonban csak kettő – Form A és B – található meg a gyógyszerkészítményekben(101). Ezek már küllemükben is eltérnek egymástól: a Form A barnássárga, míg a Form B egy élénk sárga színű szilárd anyag. A kettő közül a Form A tekinthető a termodinamikailag stabil módosulatnak (olvadáspont: 204°C), a Form B egy higroszkópos, metastabil polimorf (olvadáspont: 180-195°C). A vizsgálatainkhoz igazolnunk kellett a módosulatok szerkezetét, ehhez az eredeti, Burger és munkatársai (1986) által leírt IR spektroszkópiás azonosítást alkalmaztuk(85). A különbség a két módosulat között a Form B higroszkópos tulajdonsága miatt annak spektrumában megjelenő, intenzív vízjel 3400-3600  $\text{cm}^{-1}$  között. Az IR spektrumokat az 5. ábrán tüntettem fel.



**5. ábra.** A két vizsgált oxitettraciklin polimorf IR spektruma

Burger és munkatársainak munkája után számos jelentős áttekintés született az oxitettraciklin polimorfok vizsgálatával kapcsolatban, melyekben megjelenik az az idézet az eredeti közleményből, mely szerint „a Form A oldhatósága 28-szor alacsonyabb a Form B oldhatóságánál”(51, 85, 102). Fontos kiemelni, hogy az eredeti, 1986-os közleményben ez az oldhatóságbeli különbség izopropil-alkoholban volt mérhető, azonban a későbbiekben ezt a különbséget mint vizes közegű oldhatóságkülönbséget idézték, így megvizsgáltuk, hogy vizes közegű pufferek alkalmazásánál is fennáll-e ez a jelenség. Az oxitettraciklin-hidroklorid egyensúlyi oldhatóságának meghatározását a

venlafaxinhoz hasonlóan olyan pH tartományban végeztük el, ahol a molekula ionizáltsági állapota szignifikánsan változik a pH változtatásával. Az eredményeket a 10. táblázat tartalmazza.

**10. táblázat.** *Oxitetraciklin polimorfok egyensúlyi oldhatósága különböző pH-jú BR pufferooldatokban*

<i>pH</i>	<i>S<sub>pH</sub> ± SD (µg/mL)</i>	
	<b>Form A</b>	<b>Form B</b>
4,0	345 ± 7	325 ± 22
5,0	328 ± 5	298 ± 5
6,5	668 ± 36	693 ± 10
7,4	1721 ± 40	1816 ± 60

A minták egyensúlyi oldhatóságának meghatározása a korábban ismertetett SSF protokoll szerint történt. E mellett pH 5,0 közegben ATR-UV szonda segítségével valós időben követtük a koncentrációváltozást, ami igazolta, hogy az egyensúly beállása mindkét módosulat esetében 24 órán belül bekövetkezik.

#### 4.2.3. Karvedilol

A karvedilol egy nem szelektív  $\beta$ -receptor-blokkoló hatóanyag, melyet széles körben használnak, legfőképpen magas vérnyomás kezelésére. Sav-bázis tulajdonságát tekintve egyértékű bázis ( $pK_a = 8,06$ ), így a bioreleváns pH tartományban ionizálódik a pH változásával(103). Az irodalomban számos polimorf módosulata ismert, munkánk során a termodinamikailag stabil Form I.-et (olvadáspont: 123-126°C) és a forgalomban lévő készítményekben található Form II.-t (olvadáspont: 114-115°C) vizsgáltuk (elnevezés: Pataki és munkatársai, 2012)(86). A minták egyensúlyi oldhatóságát széles pH tartományban határoztuk meg BR tompítóoldatokban. A savas pH tartományban, ahol a molekula ionizálódik és sóképzésre hajlamos, kálium-kloridot tartalmazó BR pufferekben (BR + KCl) is elvégeztük a méréseket. Eredményeinket a 11. táblázatban foglaltam össze. Mivel a BR tompítóoldat nem tartalmaz kloridionokat, csak foszfát-, borát- és acetátionokat, így vizsgálni tudtuk a puffer ellenion tartalmának hatását a vegyület oldhatóságára és sóképzési hajlamára. A koncentrációváltozást a molekula oldhatóságának köszönhetően minden pH-n valós időben tudtuk követni, így biztosítva, hogy valóban azt a koncentrációt közöljük egyensúlyi oldhatóságként, ahol a rendszer már elérte azt.

**11. táblázat.** *Karvedilol polimorfok egyensúlyi oldhatósága BR és BR + KCl pufferekben, különböző pH értékeknél*

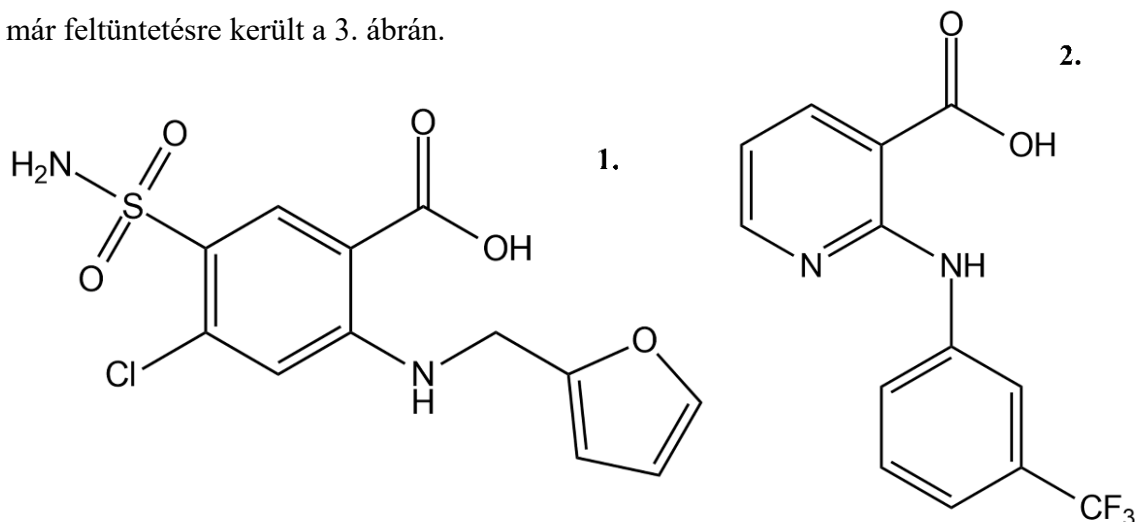
Minta	pH	$S_{pH} \pm SD$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) BR	pH	$S_{pH} \pm SD$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) BR+KCl
<b>FORM I.</b>	3,38	437,84 $\pm$ 32,64	3,08	13,54 $\pm$ 0,45
	4,16	342,37 $\pm$ 2,68	4,09	14,54 $\pm$ 1,22
	5,08	165,49 $\pm$ 8,54	5,05	12,76 $\pm$ 1,34
	6,05	71,06 $\pm$ 2,45	6,06	18,05 $\pm$ 1,84
	6,57	35,63 $\pm$ 1,84		
	6,99	11,75 $\pm$ 0,20		
	8,02	2,59 $\pm$ 0,19		
	8,95	1,23 $\pm$ 0,15		
	9,98	1,21 $\pm$ 0,06		
<b>FORM II.</b>	3,30	491,42 $\pm$ 18,79	3,12	13,01 $\pm$ 1,10
	4,17	334,77 $\pm$ 6,96	4,10	14,09 $\pm$ 0,71
	5,12	158,22 $\pm$ 7,34	5,08	15,19 $\pm$ 1,96
	6,12	68,19 $\pm$ 2,50	6,06	18,01 $\pm$ 1,82
	6,62	46,91 $\pm$ 0,68		
	6,99	22,04 $\pm$ 0,21		
	8,06	4,61 $\pm$ 0,55		
	8,96	2,38 $\pm$ 0,85		
	9,84	2,23 $\pm$ 0,38		

A minták többségének több mint 24 órára volt szüksége az egyensúly eléréséhez, így ezen vegyület esetében a hagyományos 24 órás SSF protokoll alkalmazása szignifikáns hibát okozott volna az egyensúlyi oldhatóság értékekben.

#### 4.3. Mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata

A részecskeméret-csökkentés az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a hatóanyagok kioldódásának és oldhatóságának javítására. Korábban ismertettem, hogy számos módszer áll rendelkezésre méretcsökkentett minták előállítására. Munkánk során mi az egyik legegyszerűbb és leggyorsabb módszerrel, a száraz őrléssel állítottuk elő a vizsgált hatóanyagok mikronizált és nanonizált formáit, és vizsgáltuk ezt követően azok egyensúlyi oldhatóságát. A nanonizáláshoz PVA illetve PVP-K25 polimer segédanyagokat alkalmaztunk, modellhatóanyagként pedig papaverin-hidrokloridot, furoszemidet és nifluminsavat választottunk, eltérő sav-bázis tulajdonságaik miatt.

Utóbbi két vegyület szerkezete a 6. ábrán látható, a papaverin szerkezete a korábbiakban már feltüntetésre került a 3. ábrán.



**6. ábra.** A furoszemid (1.) és a nifluminsav (2.) szerkezeti képlete

Mindhárom vegyület esetében rendelkezésünkre állt a kereskedelmi forgalomban kapható hatóanyag, valamint annak mikronizált, illetve PVA-val és PVP-K25 segédanyaggal nanonizált formája. Ezen segédanyagokat a kereskedelmi forgalomban kapható és a mikronizált mintákhoz is hozzáadtuk, és mint 1:1 tömegarányú fizikai keveréket vizsgáltuk annak érdekében, hogy esetleges oldhatóságra gyakorolt hatásukat feltárni tudjuk. A jobb érthetőség érdekében a vizsgált formulációkat és a továbbiakban a szövegben használt megnevezésüket a 12. táblázatban tüntettem fel.

**12. táblázat.** A vizsgált formulációk és dolgozatban használt megnevezésük

Vizsgált formulációk összetétele	Megnevezés
kereskedelmi forgalomban elérhető hatóanyag, segédanyag hozzáadása nélkül	kiindulási
kereskedelmi forgalomban elérhető hatóanyag és PVA segédanyag 1:1 arányú keveréke	kiindulási+PVA
kereskedelmi forgalomban elérhető hatóanyag és PVP-K25 segédanyag 1:1 arányú keveréke	kiindulási+PVPK
mikronizált minta, segédanyag hozzáadása nélkül	mikronizált
mikronizált minta és PVA segédanyag 1:1 arányú keveréke	mikronizált+PVA
mikronizált minta és PVP-K25 segédanyag 1:1 arányú keveréke	mikronizált+PVPK
PVA segédanyaggal nanonizált minta	nanoPVA
PVP-K25 segédanyaggal nanonizált minta	nanoPVPK

A minták előállítás után lézerdiffrakciós mérésekkel vizsgáltuk a kereskedelmi forgalomban kapható és a mikronizált minták részecskeméret eloszlását. Ennek eredménye azt mutatta, hogy már a kereskedelmi forgalomban kapható minták

részecskemérete is az 1 mm alatti tartományba esett, azonban őrléssel szignifikáns részecskeméret-csökkenést lehetett elérni. A papaverin (PAP), furoszemid (FUR) és nifluminsav (NIF) minták részecskeméret eloszlását a 13. táblázat tartalmazza, a  $d = 0,1$ ;  $0,5$  és  $0,9$  értékek feltüntetésével. Ezen értékek megmutatják  $\mu\text{m}$ -ben kifejezve a részecskeméret-tartománynak azon felső határát, amely alá a részecskék 10%-a ( $d = 0,1$ ), 50%-a ( $d = 0,5$ ) illetve 90%-a ( $d = 0,9$ ) esik.

**13. táblázat.** *Kiindulási és mikronizált minták részecskeméret-eloszlása*

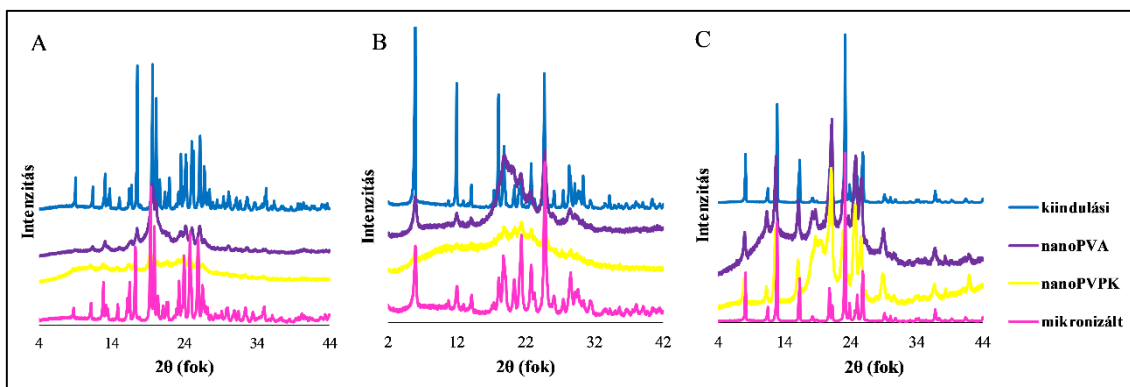
		d=0,1 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,5 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,9 ( $\mu\text{m}$ )
PAP	kiindulási	153,97	488,62	887,93
	mikronizált	101,71	263,70	596,47
FUR	kiindulási	7,36	62,46	294,13
	mikronizált	14,97	58,94	148,10
NIF	kiindulási	71,45	183,25	579,83
	mikronizált	38,91	110,46	224,97

A nanonizált minták méretanalízise SEM mikroszkópos felvételek számítógépes analízisével történt, az átlagos részecskeméret és annak szórása a 14. táblázatban látható, a hatóanyag és a nanonizáláshoz használt segédanyag megnevezésével.

**14. táblázat.** *Nanonizált minták átlagos részecskemérete*

Hatóanyag	PAP	PAP	FUR	FUR	NIF	NIF
Segédanyag	PVPK	PVA	PVPK	PVA	PVPK	PVA
<b>Átlagos részecskeméret (nm)</b>	288,3	225,4	305,8	229,8	212,2	743,3
<b>Szórás</b>	$\pm 116,1$	$\pm 96,9$	$\pm 104,7$	$\pm 67,3$	$\pm 47,2$	$\pm 720,9$

Ahhoz, hogy meggyőződjünk róla, hogy az előállítás során nem változott meg a modellanyagok kristályszerkezete, mind a kereskedelmi forgalomban kapható hatóanyagokat, mind pedig a mikronizált és a nanonizált mintákat XRPD mérésekkel analizáltuk (papaverin és nifluminsav:  $4^\circ$  és  $45^\circ$   $2\theta$  között, furoszemid:  $2^\circ$  és  $45^\circ$   $2\theta$  között), ennek eredménye látható a 7. ábrán.



**7. ábra.** Kereskedelmi forgalomban kapható, mikronizált és nanonizált papaverin-hidroklorid (A), furoszemid (B) és nifluminsav (C) XRPD diffraktogramjai

Mindhárom hatóanyag esetében hasonló tendencia figyelhető meg: az ábrán rózsaszínnel jelölt mikronizált minta diffraktogramján ugyanazon karakterisztikus csúcsok jelennek meg, mint a kézzel jelölt kereskedelmi forgalomban kapható minták diffraktogramján, ez alapján megállapítható, hogy a mikronizálás hatására nem történt átalakulás. A polimer segédanyaggal történő nanonizálás viszont minden esetben amorfizációt idézett elő, ezt az alapvonal-emelkedés jelzi. Mivel azonban a főbb karakterisztikus csúcsok így is megjelennek a mintákban, így nem jelenthetjük ki, hogy amorf terméket eredményezett a nanonizálás, csak részleges amorfizációról beszélhetünk.

A formulációk oldhatóságát pH 6,5 FaSSIF blank és FaSSIF full, valamint pH 5,0 FeSSIF blank és FeSSIF full közegekben határoztuk meg, ezek eredményeit hatóanyagokénti bontásban ismertetem.

#### 4.3.1. Papaverin-hidroklorid

A papaverin, mint egyértékű bázis, jobb oldhatósággal rendelkezik savas pH-n. Ebből következik, hogy pH 5,0 FeSSIF blank és full pufferekben, ahol a molekulák 95,8%-a protonált formában van jelen az oldatban, a vegyület oldhatósága magasabb lesz, mint pH 6,5 közegben, ahol a molekuláknak csak kb. 50%-a protonált. Az általunk mért egyensúlyi oldhatóság értékeket a 15. táblázat mutatja be.



**15. táblázat.** *Papaverin-hidroklorid minták oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben*

	$S_{pH} \pm SD$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>FaSSIF blank</i>	<i>FaSSIF full</i>	<i>FeSSIF blank</i>	<i>FeSSIF full</i>
kiindulási	26,07 $\pm$ 0,21	54,22 $\pm$ 0,40	433,54 $\pm$ 2,35	1194,24 $\pm$ 100,37
kiindulási+PVA	26,13 $\pm$ 0,51	53,45 $\pm$ 1,54	423,66 $\pm$ 2,04	1159,00 $\pm$ 74,96
kiindulási+PVPK	27,66 $\pm$ 0,35	55,07 $\pm$ 0,68	434,69 $\pm$ 20,52	1295,25 $\pm$ 80,20
mikronizált	26,62 $\pm$ 0,70	55,28 $\pm$ 0,19	402,70 $\pm$ 7,13	1176,00 $\pm$ 37,00
mikronizált+PVA	25,72 $\pm$ 0,11	54,11 $\pm$ 0,67	430,98 $\pm$ 12,91	1259,50 $\pm$ 8,50
mikronizált+PVPK	28,24 $\pm$ 0,41	55,51 $\pm$ 1,93	474,47 $\pm$ 5,54	1425,50 $\pm$ 41,60
nanoPVA	29,18 $\pm$ 1,94	56,50 $\pm$ 0,47	504,63 $\pm$ 5,77	1273,50 $\pm$ 66,26
nanoPVPK	35,66 $\pm$ 0,96	61,24 $\pm$ 0,49	736,97 $\pm$ 46,22	1456,75 $\pm$ 72,44

#### 4.3.2. Furoszemid

A furoszemid egy kétértékű savi karakterű molekula, amely egy karboxilcsoporttal ( $pK_{a1} = 3,53$ ) és egy szulfonamid csoporttal ( $pK_{a2} = 10,15$ ) rendelkezik(97). Mivel ez utóbbi rendkívül gyenge sav, az általunk vizsgált közegekben nem ionizálódik, az oldhatóságbeli különbséget a két vizsgált pH-n kizárólag a karboxilcsoport ionizációja okozza. Ez a csoport pH 6,5 közegben 100%-ban disszociált állapotban van, míg pH 5,0 esetén még a molekulák 3,3%-a teljesen nemionizált formában van jelen. Ahogy látható az eredményeket bemutató 16. táblázatból, ez nagyságrendbeli különbséget eredményez a furoszemid egyensúlyi oldhatóságában.

**16. táblázat.** *Furoszemid minták oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben*

	$S_{pH} \pm SD$ (mg/mL)			
	<i>FaSSIF blank</i>	<i>FaSSIF full</i>	<i>FeSSIF blank</i>	<i>FeSSIF full</i>
kiindulási	12,13 $\pm$ 0,82	10,70 $\pm$ 0,22	0,384 $\pm$ 0,016	0,539 $\pm$ 0,007
kiindulási+PVA	9,20 $\pm$ 0,31	11,54 $\pm$ 0,52	0,540 $\pm$ 0,012	0,533 $\pm$ 0,006
kiindulási+PVPK	11,54 $\pm$ 1,22	12,68 $\pm$ 0,64	0,420 $\pm$ 0,011	0,561 $\pm$ 0,002
mikronizált	17,67 $\pm$ 0,38	13,77 $\pm$ 0,74	0,569 $\pm$ 0,024	0,632 $\pm$ 0,010
mikronizált+PVA	11,79 $\pm$ 0,36	15,77 $\pm$ 0,72	0,549 $\pm$ 0,027	0,606 $\pm$ 0,011
mikronizált+PVPK	14,58 $\pm$ 0,49	20,92 $\pm$ 0,13	0,568 $\pm$ 0,012	0,687 $\pm$ 0,006
nanoPVA	20,36 $\pm$ 0,70	22,40 $\pm$ 0,79	0,602 $\pm$ 0,022	0,761 $\pm$ 0,016
nanoPVPK	19,23 $\pm$ 0,93	24,02 $\pm$ 0,63	1,535 $\pm$ 0,010	2,007 $\pm$ 0,025

### 4.3.3. Nifluminsav

A nifluminsav egy amfoter molekula, ezen karakterét a savas karboxil és a gyengén bázikus aminopiridinil csoportjának köszönheti ( $pK_{a1} = 2,26$  és  $pK_{a2} = 4,44$ ). A molekulák mikroállandóinak ismeretében kiszámítható, hogy az általunk alkalmazott közegek pH értékeinél milyen arányban fordulnak elő a különböző töltésű mikrorészecskék(104). FeSSIF blank és full pufferekben a molekulák 75,8%-a anionios, 20,6%-a ikerionos, 1,2%-a pedig semleges formában van jelen. Ezzel szemben pH 6,5 közegben a nifluminsav főként anionos formában van jelen (99,1%), ez a magyarázata a pH növekedésével megnövekvő egyensúlyi oldhatóságnak. Mért eredményeinket a 17. táblázat tartalmazza.

**17. táblázat.** Nifluminsav minták oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben

	$S_{pH} \pm SD$ (mg/mL)		$S_{pH} \pm SD$ ( $\mu$ g/mL)	
	<i>FaSSIF blank</i>	<i>FaSSIF full</i>	<i>FeSSIF blank</i>	<i>FeSSIF full</i>
kiindulási	1,31 $\pm$ 0,07	1,80 $\pm$ 0,13	69,58 $\pm$ 0,40	655,91 $\pm$ 7,59
kiindulási+PVA	1,12 $\pm$ 0,05	1,54 $\pm$ 0,17	70,86 $\pm$ 2,08	530,50 $\pm$ 28,32
kiindulási+PVPK	1,38 $\pm$ 0,10	2,45 $\pm$ 0,18	74,57 $\pm$ 1,20	629,00 $\pm$ 7,00
mikronizált	1,41 $\pm$ 0,07	1,83 $\pm$ 0,06	80,97 $\pm$ 3,05	574,74 $\pm$ 28,65
mikronizált+PVA	1,46 $\pm$ 0,04	1,69 $\pm$ 0,06	77,87 $\pm$ 0,65	573,86 $\pm$ 27,59
mikronizált+PVPK	2,12 $\pm$ 0,06	2,15 $\pm$ 0,04	92,05 $\pm$ 0,31	629,37 $\pm$ 13,58
nanoPVA	1,57 $\pm$ 0,07	1,87 $\pm$ 0,16	87,40 $\pm$ 3,40	650,94 $\pm$ 13,85
nanoPVPK	2,56 $\pm$ 0,13	3,49 $\pm$ 0,11	170,50 $\pm$ 8,50	813,45 $\pm$ 7,55

A jelentős oldhatóságkülönbség miatt a FaSSIF blank/full pufferekben a koncentrációt mg/mL, míg a FeSSIF blank/full pufferekben  $\mu$ g/mL mértékegységben fejeztem ki.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Szűrők alkalmazásának hatása az egyensúlyi oldhatóságra

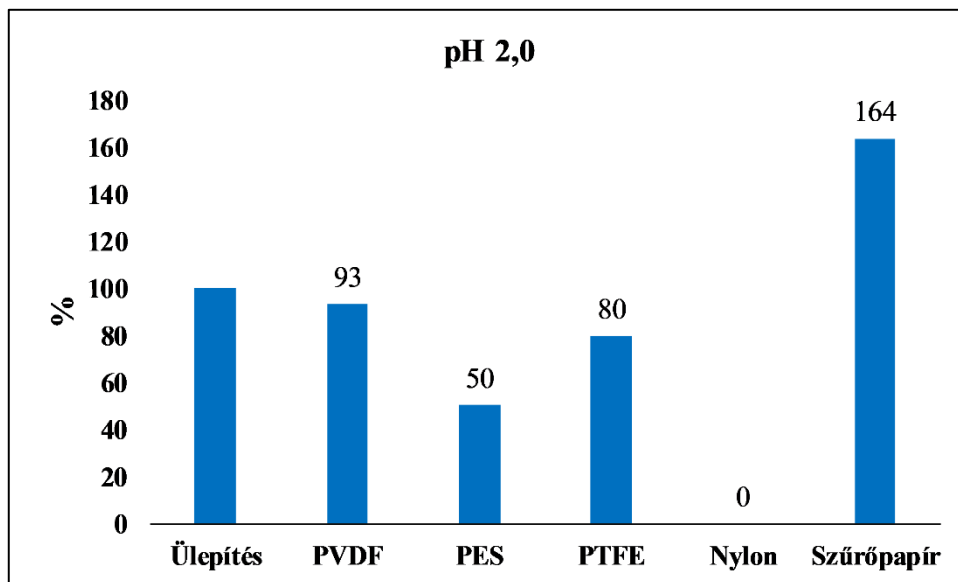
Azt, hogy a különböző szűrők alkalmazásának van-e hatása a mért egyensúlyi oldhatóságra úgy vizsgáltuk, hogy a szűrés után mért koncentrációt összehasonlítottuk a referenciaként megjelölt, szedimentációs fázisválasztást követő mérés során kapott koncentrációval. A különbséget %-ban adtuk meg, a 10. egyenlet alapján:

$$S_{\text{szűrés}}/S_{\text{üleptítés}} * 100 \quad (10)$$

Eredményeink azt mutatják, hogy a nem megfelelően kiválasztott szűrők alkalmazása szignifikáns hibát jelenthet az egyensúlyi oldhatóság meghatározása során. Tapasztalatainkat hatóanyagokénti bontásban ismertetem.

#### 5.1.1. Diklofenák-nátrium

A diklofenák oldhatósága pH 2,0 közegben volt a legalacsonyabb, itt a molekula intrinszc oldhatóságát tudtuk meghatározni, ami szedimentációt alkalmazva fázisválasztásként  $1,63 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ -nek adódott. Ehhez hasonlítottuk a különböző szűrők használata után mért koncentrációértékeket, ezt szemlélteti a 8. ábra.

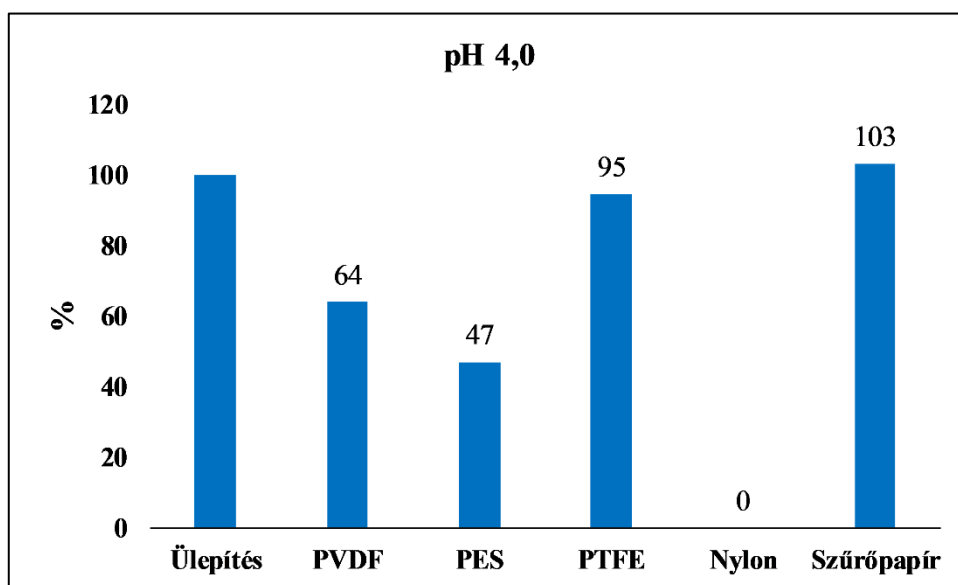


**8. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a diklofenák egyensúlyi oldhatóságára pH 2,0 oldatban

Ebben az esetben kizárólag a hidrofíl PVDF szűrő alkalmazása eredményezett elfogadható eredményt, a PES és PTFE szűrők esetében szignifikáns koncentrációcsökkenést figyelhetünk meg – előbbi esetében a koncentráció a felére

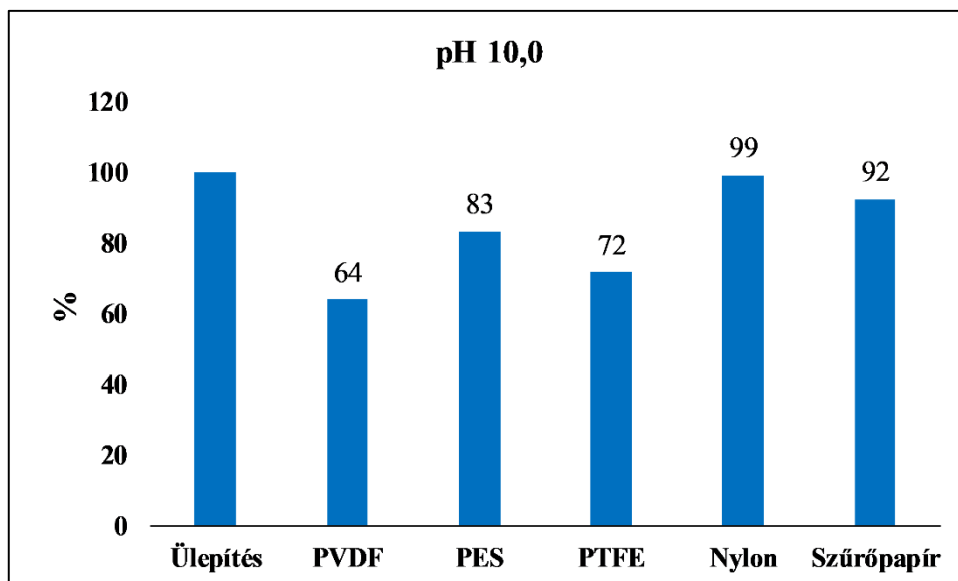
csökken. A nylon szűrő alkalmazása még ennél is nagyobb hibát okozott: gyakorlatilag nem jutott át rajta mérhető koncentrációjú diklofenák hatóanyag. Ezzel ellentétben az analitikai szűrőpapír alkalmazása után mért egyensúlyi oldhatóság értéke több mint másfélszerese a referenciának. Erre az lehet a magyarázat, hogy a savas pH-jú oldatban oldódnak a szűrőpapír egyes komponensei, amelyek szintén rendelkeznek UV abszorpcióval, így a ténylegesnél magasabb koncentrációértéket mérünk.

A molekula  $pK_a$  értékének megfelelő pH 4,0 oldatban, ahol a molekula már csak 50%-ban van nemionizált formában, a referenciaként szolgáló egyensúlyi oldhatóság  $2,55 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ . Ahogy az a 9. ábrán látszik, az előzőekkel ellentétben a PVDF szűrő alkalmazása szignifikáns hibát okozott az eredményben, 36%-kal alacsonyabb koncentrációt mértünk alkalmazása után. A hidrofil PES szűrő ebben az esetben is olyan nagy mennyiségű hatóanyagot adszorbeált, hogy a mért oldhatóság a felére csökkent, a nylon szűrő pedig ismét megkötötte a teljes anyagmennyiséget. A hidrofób PTFE és a szűrőpapír alkalmazása megfelelőnek bizonyult.



**9. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a diklofenák egyensúlyi oldhatóságára pH 4,0 oldatban

Lúgos, pH 10,0 közegben a diklofenák egyensúlyi oldhatósága drasztikusan megnő, ami a molekulák deprotonálódásának köszönhető. A referencia érték ebben a közegben négy nagyságrenddel magasabb a korábbiakhoz képest,  $16,15 \pm 0,76 \text{ mg/mL}$ , az ehhez hasonlított szűrés utáni oldhatóságértékeket a 10. ábra mutatja be.

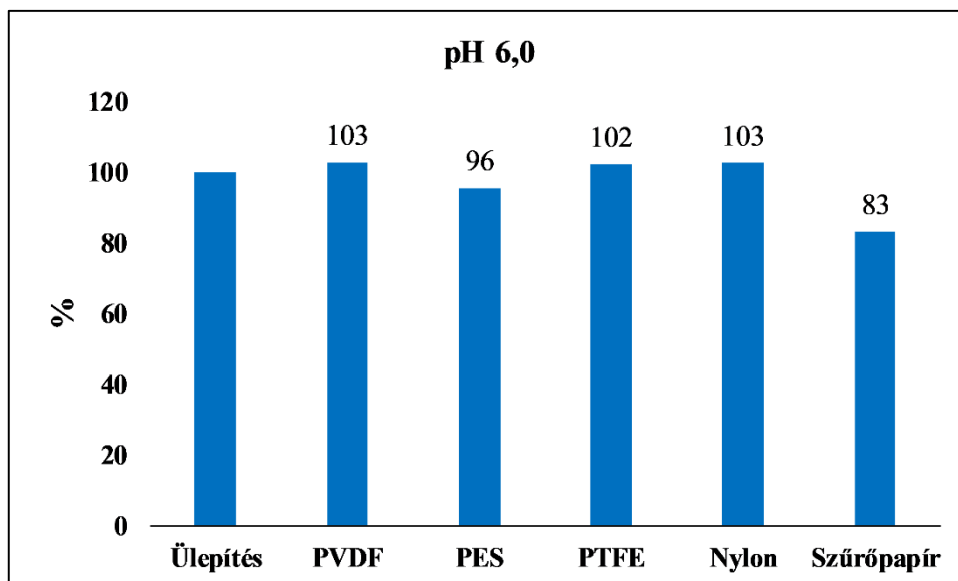


**10. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a diklofenák egyensúlyi oldhatóságára pH 10,0 oldatban

Meglepő módon ebben az esetben, a korábbiakban a teljes anyagmennyiséget adszorbeáló nylon szűrő működött a legjobban. Ennek magyarázata lehet, hogy a másik két pH-n az alacsony koncentráció miatt nem volt lehetőség külön oldatrészletek mérésére (csak 1. részlet), valamint nem értük el a membránszűrők telítését. Ebben a közegben viszont, ahol magas az oldatkoncentráció, telítődni tud a membrán, és mintát tudunk venni olyan oldatrészletből is (6. részlet), amelyet a már telített membránon szűrünk keresztül, így nem adszorbeálódik több anyag. A szűrőpapír alkalmazása szintén megfelelőnek bizonyult, így feltehetően a mérést zavaró komponensek csak savas pH-n oldódnak ki a papírból. A további, hidrofil és hidrofób membránszűrőkön egyaránt kevesebb hatóanyag jutott át, így szignifikánsan alacsonyabb koncentrációt mértünk. Legkevésbé megfelelőnek a PVDF szűrő bizonyult, itt 36% volt az anyagveszteség.

### 5.1.2. Hidroklorotiazid

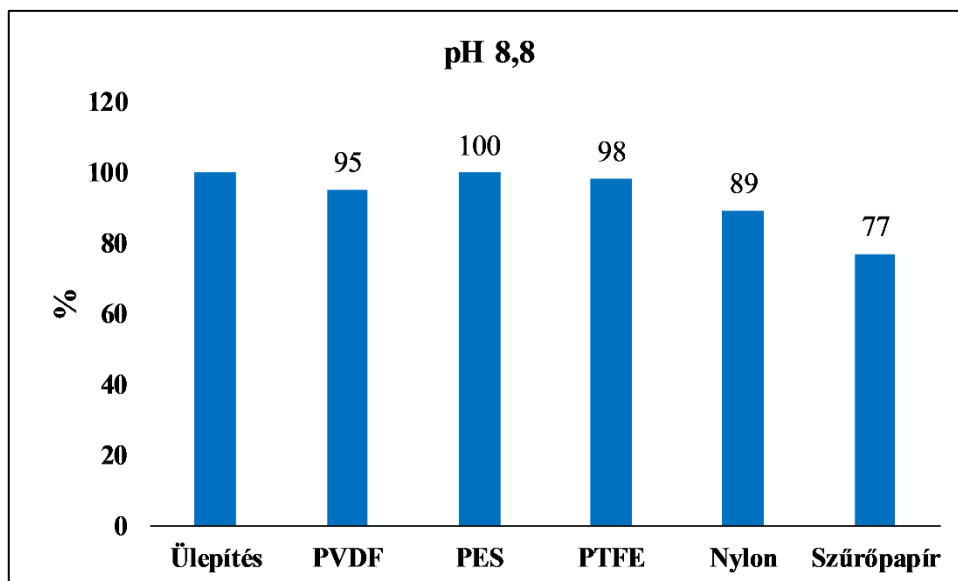
A hidroklorotiazid gyenge savi karakterének köszönhetően a molekula intrinsic oldhatóságát pH 6,0 pufferben határoztuk meg, a referenciaérték  $556 \pm 13 \mu\text{g/mL}$ -nek adódott, ehhez hasonlítottuk a szűrés után kapott értékeket (11. ábra).



**11. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatóságára pH 6,0 oldatban

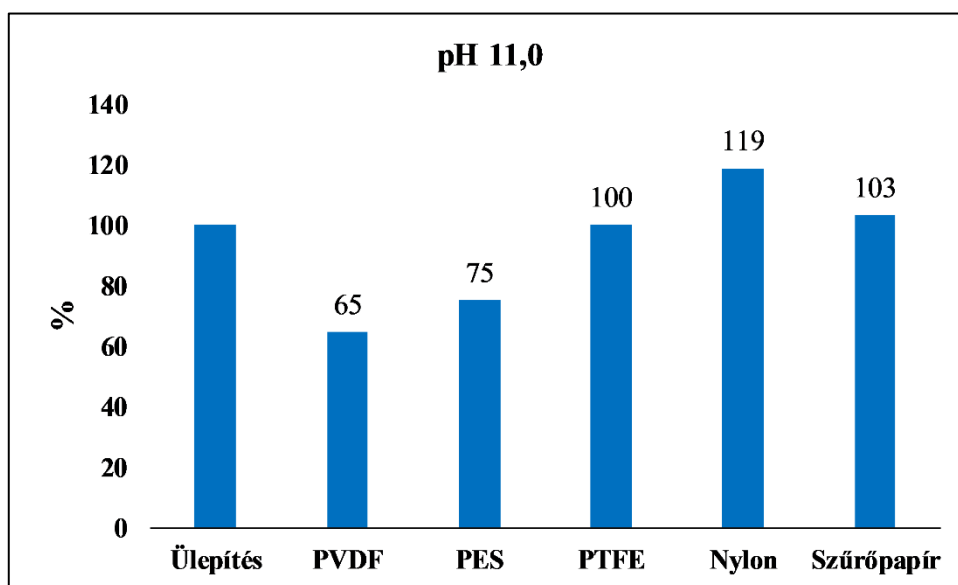
A 11. ábra szerint ebben az esetben az összes membránszűrő, hidrofil vagy hidrofób jellegétől függetlenül megfelelőnek bizonyult, mint fázisválasztási technika, néhány százalék különbség volt csak megfigyelhető a referenciához képest. A szűrőpapír meglehetősen nagy anyagmennyiséget adszorbeált, így 17%-kal alacsonyabb koncentrációt mértünk a tényleges egyensúlyi oldhatósághoz képest.

A pH 8,8 BR pufferben a molekulák közel 50%-a van ionizált formában, ennek következtében a vegyület oldhatósága javult, referenciaértékként  $923 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ -es egyensúlyi oldhatóságot határoztunk meg. A szűrés utáni értékek és a referencia összehasonlítása a 12. ábrán látható. A szűrőpapír a pH 6,0 közegben tapasztaltakhoz hasonlóan ebben az esetben is nagy adszorpciós hajlandóságot mutatott, valamint a nylon szűrő is megkötötte a hatóanyagmolekulák egy részét, 11%-kal alacsonyabb mért egyensúlyi oldhatóságot eredményezve. A PVDF, PES és PTFE szűrők alkalmazása nem okozott szignifikáns hibát az oldhatósági mérés eredményében.



**12. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatóságára pH 8,8 oldatban

A molekula teljes mértékben ionizált formájának oldhatóságát pH 11 közegben határoztuk meg (93%  $A^{2-}$ , 7%  $HA^{-}$ ), a referencia  $59,64 \pm 1,14$  mg/mL volt, ami ebben az esetben két nagyságrenddel magasabb, mint az előző két közegben mért oldhatóság. A szűrők összehasonlításából, amely a 13. ábrán látható, megállapítható, hogy a hidrofil PVDF és PES szűrők alkalmazása szignifikáns hibát eredményezett a mérési eredményekben – 35 illetve 25%-kal alacsonyabb oldhatóságot mértünk.

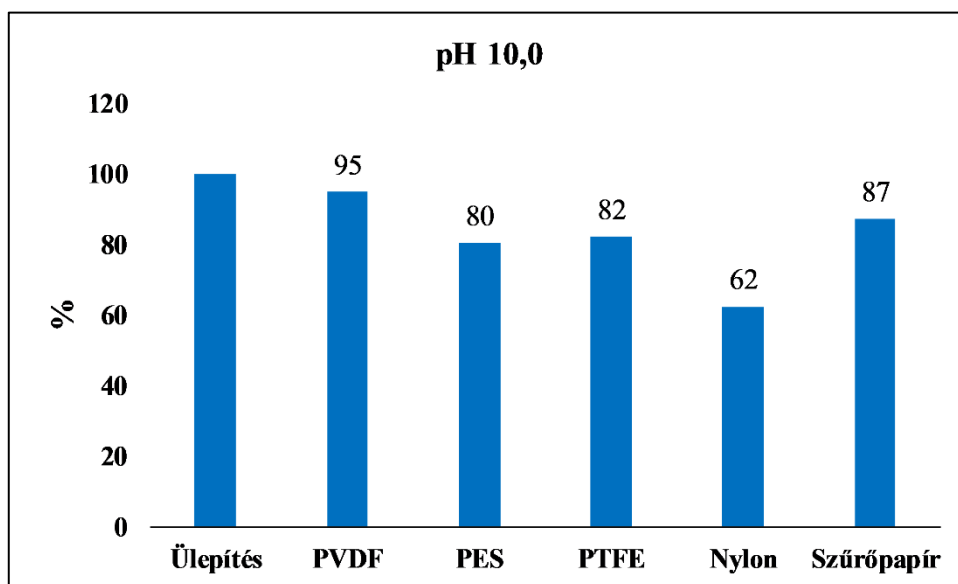


**13. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatóságára pH 11,0 oldatban

Ezzel szemben a nylon szűrő használatával a mért koncentráció 19%-kal volt magasabb. Erre a magyarázat hasonló lehet, mint amit a diklofenák pH 2,0 oldatának szűrőpapíron történő szűrésénél tapasztaltunk: a pufferoldat kioldja a szűrő egyes komponenseit illetve szennyeződések, melyek abszorbanciája zavarja a spektrofotometriás koncentrációmeghatározást. A hidrofób PTFE membránszűrő és a szűrőpapír alkalmazása ebben az esetben nem járt szignifikáns hibával.

### 5.1.3. Papaverin-hidroklorid

A papaverin bázikus molekula lévén pH 10,0 közegben szabad bázis formában van jelen, így közvetlenül mérhető az intrinsic oldhatósága, ami  $17,3 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ -nek adódott a szedimentációval történő fázisválasztás esetén. A szűrt oldatok koncentrációinak ezzel történő összehasonlítását illusztrálja a 14. ábra.

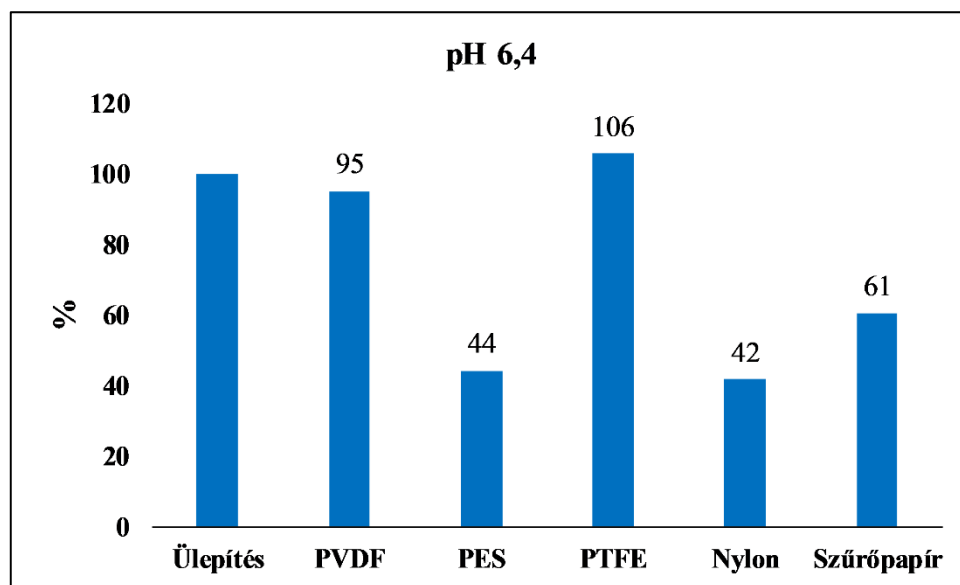


**14. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a papaverin egyensúlyi oldhatóságára pH 10,0 oldatban

Mint azt már korábban többször is megfigyelhettük, a nylon membránszűrő ebben az esetben is szignifikáns adszorpciós képességgel rendelkezett, 38%-kal alacsonyabb egyensúlyi oldhatóságot mértünk alkalmazása után. Ha nem is ilyen nagy mértékben, de a hidrofíl PES, a hidrofób PTFE és az analitikai szűrőpapír is koncentrációcsökkenést eredményezett, egyedül a PVDF szűrő bizonyult megfelelőnek a vizsgálat során.

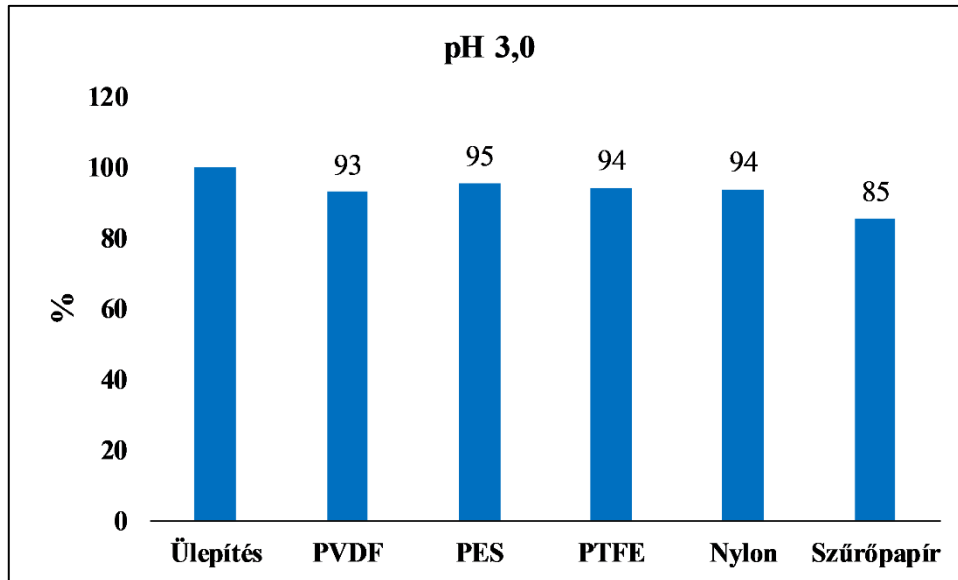


A molekula  $pK_a$  értékének megfelelő pH-jú pufferben is meghatároztuk szedimentációs elválasztással a referencia egyensúlyi oldhatóságot, ez  $22,8 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$  volt. A 15. ábrán láthatjuk, hogy a szűrők közül háromnál is – PES, nylon és szűrőpapír – közel felére csökkent a mért egyensúlyi oldhatóság értéke. A PTFE és a PVDF szűrők alkalmazása kismértékben változtatta csak meg a mért egyensúlyi koncentrációt, így alkalmazásuk megfelelőnek tekinthető ebben az esetben.



**15. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a papaverin egyensúlyi oldhatóságára pH 6,4 oldatban

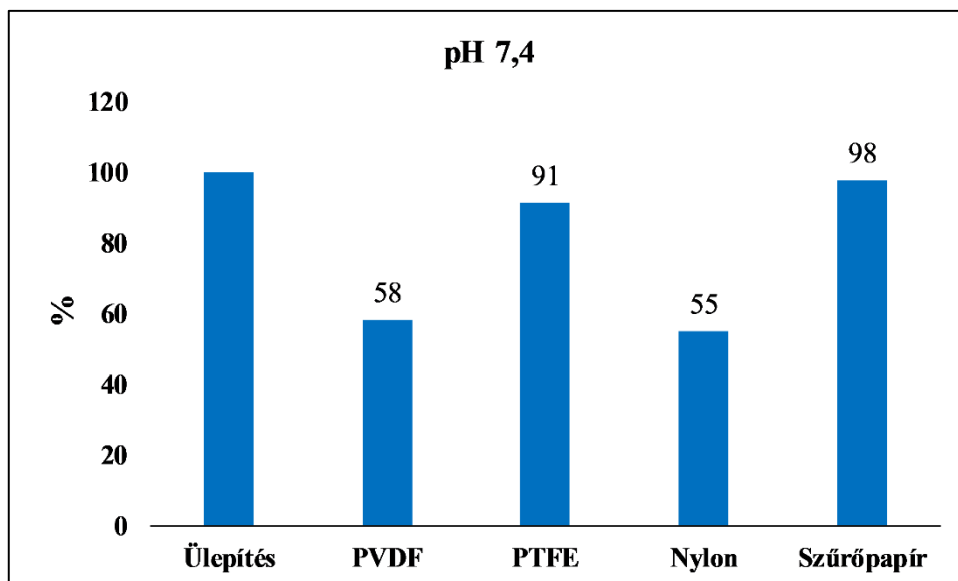
A papaverin pH 3,0 közegben teljesen ionizált formában van jelen, a referenciaként használt egyensúlyi oldhatósága,  $39,06 \pm 1,31 \text{ mg/mL}$ . Ehhez hasonlítva a szűrés után kapott értékeket, egyik membránszűrő esetében sem tapasztalhatunk 5%-nál nagyobb eltérést. A hidrophil szűrők meglepően kis adszorpciós készsége az ionizált molekula iránt a papaverin magas lipofilitásával magyarázható. A szűrőpapír, mint már több esetben is, adszorbeálta az oldott anyag egy részét, így 15%-kal alacsonyabb egyensúlyi oldhatóságot mértünk használata után. Az összehasonlítás a 16. ábrán látható.



**16. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a papaverin egyensúlyi oldhatóságára pH 3,0 oldatban

#### 5.1.4. Progeszteron

A progeszteron egy lipofil, ionizálható csoporttal nem rendelkező molekula, egyensúlyi oldhatóságként ülepítéses fázisválasztással  $7,95 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$ -es koncentrációt mértünk. Lipofil karakterét ismerve meglepő, hogy a hidrofób PTFE szűrő kevésbé adszorbeálta a hatóanyagot, 10% alatt maradt a hiba mértéke. Szintén várakozáson felüli eredményt sikerült elérni az analitikai szűrőpapír alkalmazásával, mindössze 2%-kal volt alacsonyabb a szűrés után mért egyensúlyi oldhatóság a referenciához képest. PVDF és nylon szűrő alkalmazása esetén azonban majdnem a felére csökkent a mért koncentráció, ami szignifikáns adszorpcióra utal. Ezeket a különbségeket a 17. ábra mutatja be.



**17. ábra.** Szűrők alkalmazásának hatása a progeszteron egyensúlyi oldhatóságára pH 7,4 oldatban

Eredményeink bizonyítják, hogy a szűrők alkalmazása nagymértékben befolyásolhatja az egyensúlyi oldhatóság mért értékét. Munkánk ugyanakkor segíthet a megfelelő szűrő kiválasztásában adott hatóanyag és közeg esetén. A részletes következtetéseket a 6. fejezetben írom le.

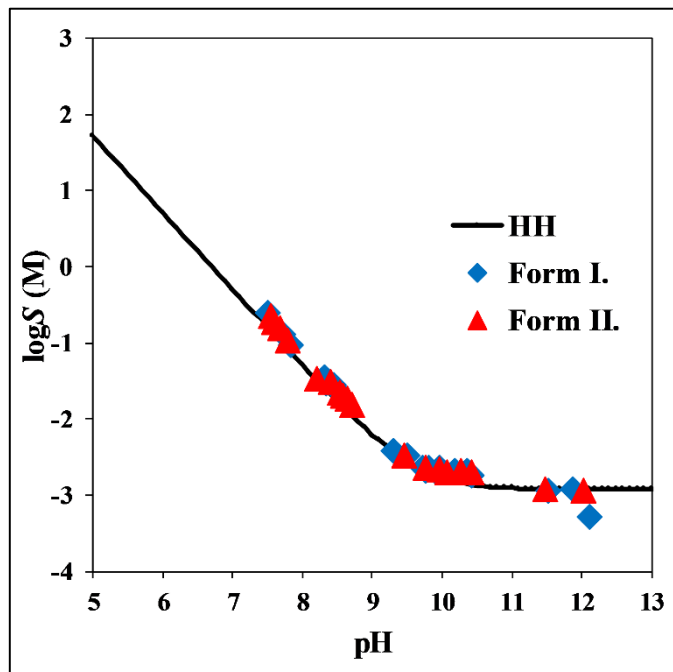
## 5.2. Polimorfok egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata

A polimorfok egyensúlyi oldhatóságának meghatározása számos kihívást rejt magában, elsősorban az oldat fázis jelenlétében történő átalakulások és ezen átalakulások időtartama miatt. Éppen ezért esetükben nem elegendő az oldat koncentrációjának meghatározása, számos kiegészítő mérés szükséges. Munkánk során három modellanyag irodalomban már ismert polimorf módosulatának egyensúlyi oldhatóság-pH profilját vizsgáltuk, ezek eredményét ismertetem a következőkben.

### 5.2.1. Venlafaxin-hidroklorid

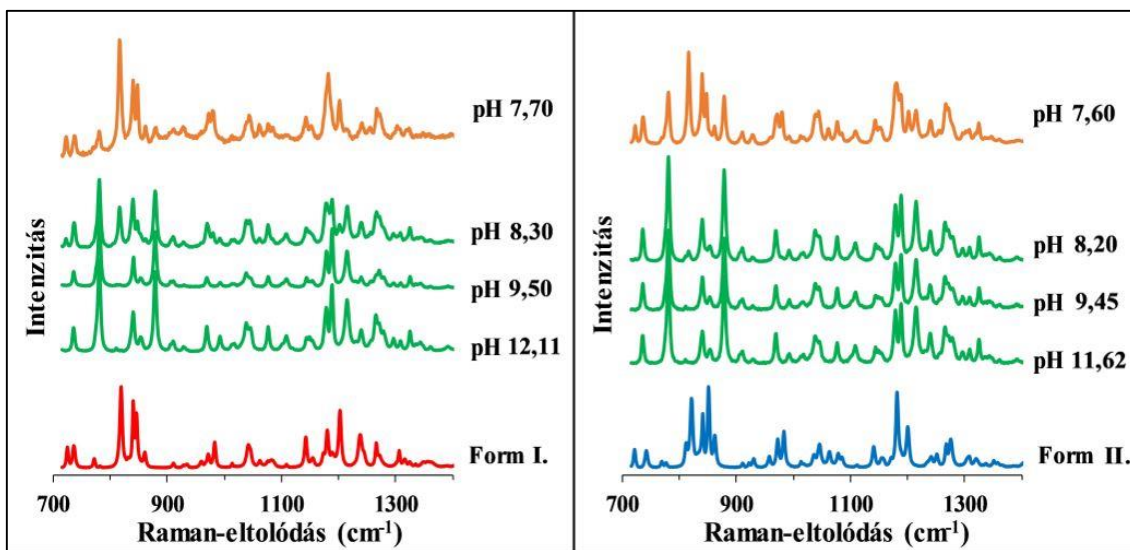
A bázikus karakterű venlafaxin hidroklorid sójának oldhatósága pH-függő, a  $pK_a$  értékének megfelelő pH 9,6 közegben 50-50%-ban van jelen az oldatban a protonált és a semleges forma, ezen érték felett a töltés nélküli, alatta pedig a protonált molekulák lesznek túlsúlyban. A két módosulat oldhatóság-pH profilját a 18. ábra szemlélteti olyan módon, hogy a mérési adatainkat ráillesztettük a vegyület számolt HH görbéjére annak

érdekében, hogy lássuk, van-e eltérés a számított értékektől. A HH összefüggést az egyes pH értékeknél a vegyület intrinsic oldhatóságának és  $pK_a$  értékének ismeretében számítottuk ki a 3. egyenlet alapján.

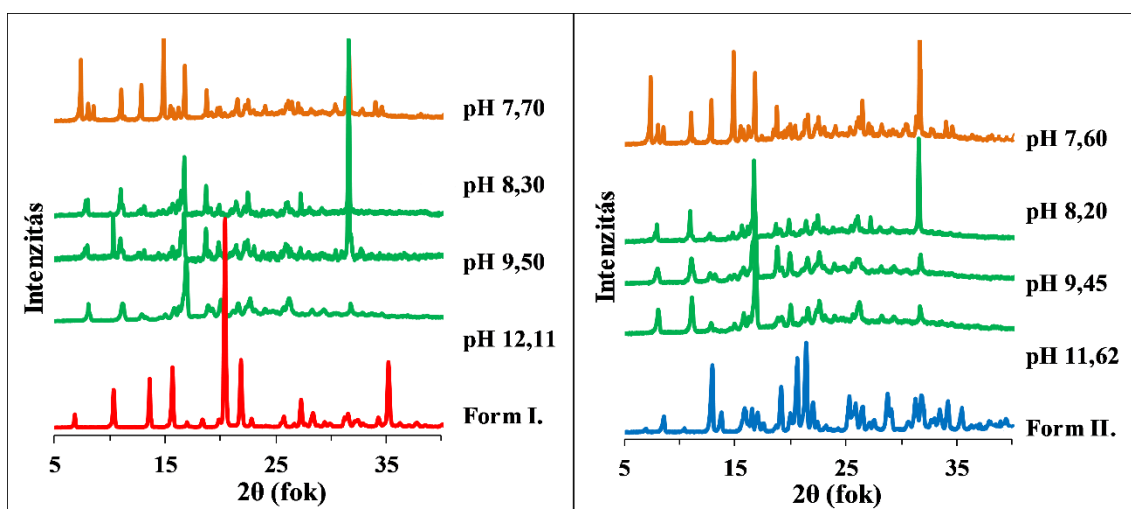


**18. ábra.** Venlafaxin-hidroklorid polimorfok pH-oldhatóság összefüggése a számított HH görbéhez viszonyítva

A molekula oldhatóságát pH 7,5 – 12 tartományban vizsgáltuk. 7,5-nél alacsonyabb pH-n, ahol a só jelenléte jellemző az oldatban, az oldhatóságot nem vizsgáltuk, mivel olyan magas érték (> 500 mg/mL), hogy a telített oldat nemideális oldatnak tekinthető. Látható, hogy a mérési adatok jól illeszkednek az elméleti HH görbére, valamint az is megfigyelhető, hogy ez a párhuzam a kiindulási módosulattól független. Ez arra enged következtetni, hogy az oldhatósági mérés során átalakulás történik a hatóanyag kristályszerkezetében, és vagy a termodinamikailag kevésbé stabil Form II. alakul át a stabilabb Form I. módosulattá, vagy pedig egy közös módosulat képződik mindkét polimorfból. Ahhoz, hogy a keletkező terméket azonosítani tudjuk, felvettük az oldhatósági mérés végén vett szilárd minták Raman-spektrumát illetve XRPD diffraktogramját ( $4^\circ$  és  $42^\circ$   $2\theta$  között), ezeket a 19. és 20. ábra szemlélteti.



19. ábra. A venlafaxin-hidroklorid kiindulási Form I. és Form II. módosulatának, valamint az oldhatósági mérések végén izolált szilárd minták Raman-spektrumai



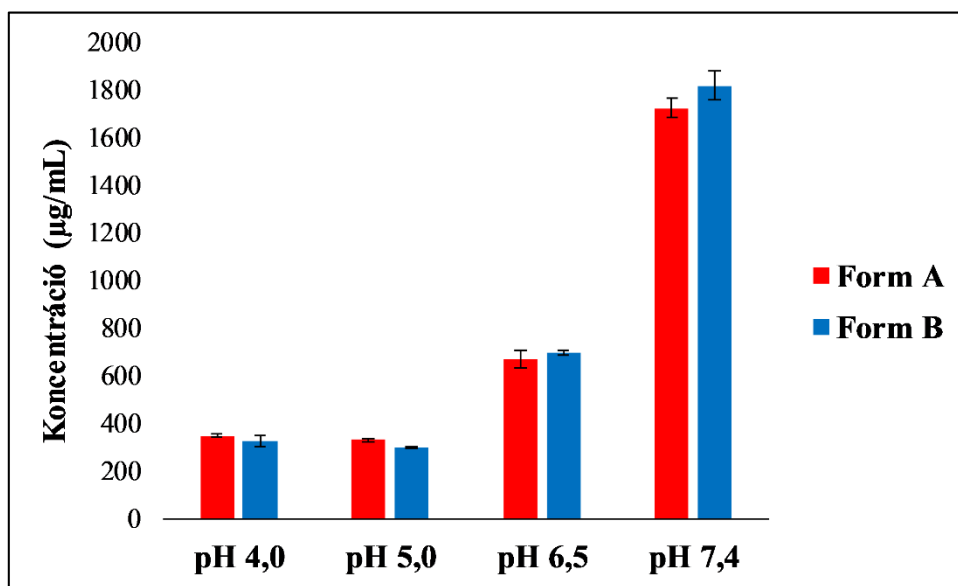
20. ábra. A venlafaxin-hidroklorid kiindulási Form I. és Form II. módosulatának, valamint az oldhatósági mérések végén izolált szilárd minták XRPD-diffraktogramjai

Mind a Raman, mind pedig a XRPD mérések eredményeiből látható, hogy az oldhatósági mérések végére a kiindulási módosulatok kristályszerkezete megváltozik, és a pH-től függően különböző termék keletkezik. A pH 7,5 – 8 között keletkező termék szerkezetét (19. illetve 20. ábrán narancssárga színel jelölve) a Cambridge szerkezeti adatbázisa (Cambridge Structural Database) alapján nem tudtuk azonosítani, azonban az US20030114536A1 szabadalomban közölt spektrummal egyezést mutatott a termék. Ez alapján ebben a pH tartományban mindkét vizsgált polimorf módosulatból ugyanaz a közös termék, venlafaxin-hidroklorid monohidrát keletkezik. Magasabb pH tartományban (19. illetve 20. ábrán zölddel jelölve) szintén mindkét kiindulási

módosulatból ugyanaz a termék keletkezik. Ezt az adatbázisban megtalálható karakterisztikus csúcsok helye alapján a szabad venlafaxin bázis Form I. polimorf módosulataként azonosítottuk. Ezen megfigyelések segítségével megmagyarázható, hogy a két kiindulási venlafaxin polimorf egyensúlyi oldhatósága azért egyezik meg, mert a mérés ideje alatt oldószer jelenlétében pH-tól függően különböző, de adott pH-n azonos közös termék képződik belőlük, így a mérés végén ugyanannak a terméknek az egyensúlyi oldhatóságát határozzuk meg.

### 5.2.2. Oxitetraciklin-hidroklorid

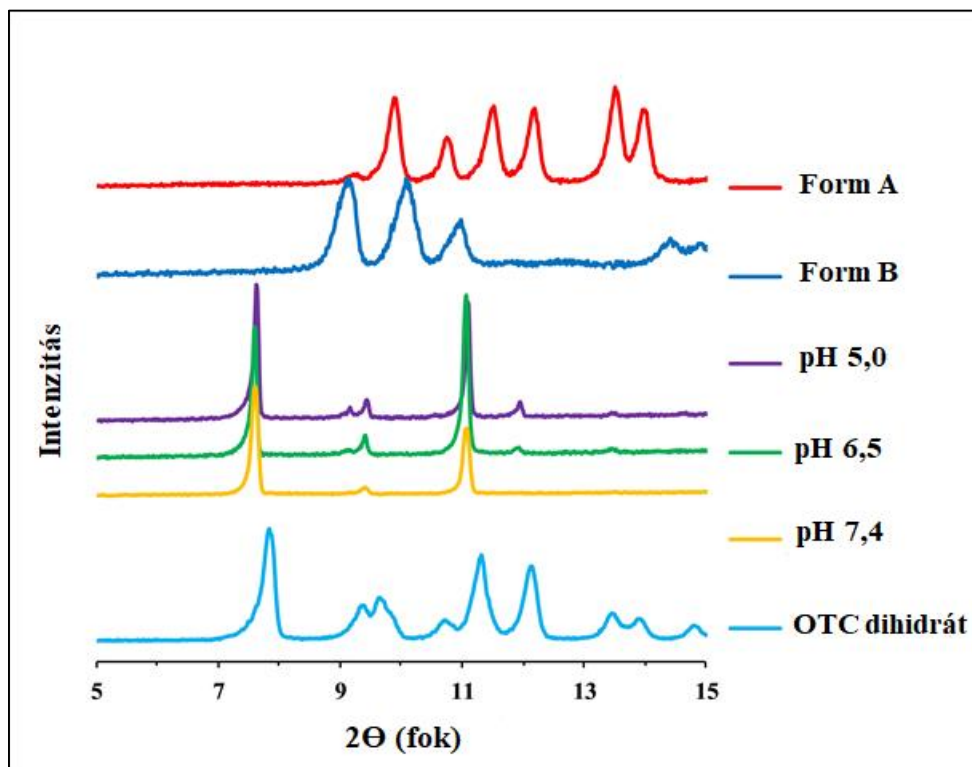
Az oxitetraciklin-hidroklorid oldhatóságának pH-függése a vegyület amfoter jellegéből adódik, izoelektromos pontja, ahol a molekula intrinsic oldhatóságát tudjuk meghatározni, pH 5,2-nél található. Ennél alacsonyabb illetve magasabb pH-k felé nő az oldhatóság, a sav-bázis funkciós csoportok ionizációjának köszönhetően. A pH 4,0 és 7,4 között kapott eredményeink nem tükrözik a korábbiakban irodalomból idézett 28-szoros különbséget, a két módosulat oldhatósága között nem volt szignifikáns különbség, ezt szemlélteti a 21. ábra.



**21. ábra.** Oxitetraciklin-hidroklorid polimorfok (Form A és Form B) egyensúlyi oldhatóságának összehasonlítása pH 4,0 – 7,4 tartományban

Ezen eredmény a venlafaxin-hidroklorid esetében tapasztaltakhoz hasonlóan arra enged következtetni, hogy a két polimorf az oldhatósági mérés végére átalakul, és egy közös módosulat keletkezik belőlük. Ennek bizonyítására elvégeztük a kiindulási módosulatok és az oldhatósági mérések végén vett szilárd minták XRPD analízisét (4° és

20° 2 $\Theta$  között), ennek eredménye a 22. ábrán látható. Megfigyelhetjük, hogy az oldhatósági mérések végén vett minták karakterisztikus csúcsai nem mutatnak egyezést sem az ábrán pirossal jelölt Form A, sem a sötétkékkel jelölt Form B csúcsaival. Megállapítható viszont, hogy minden vizsgált pH esetében ugyanaz a termék képződik. Ezt az adatbázis alapján oxitetraciklin (OTC) dihidrátként azonosítottuk, diffraktogramja világoskék színnel szerepel az ábrán.



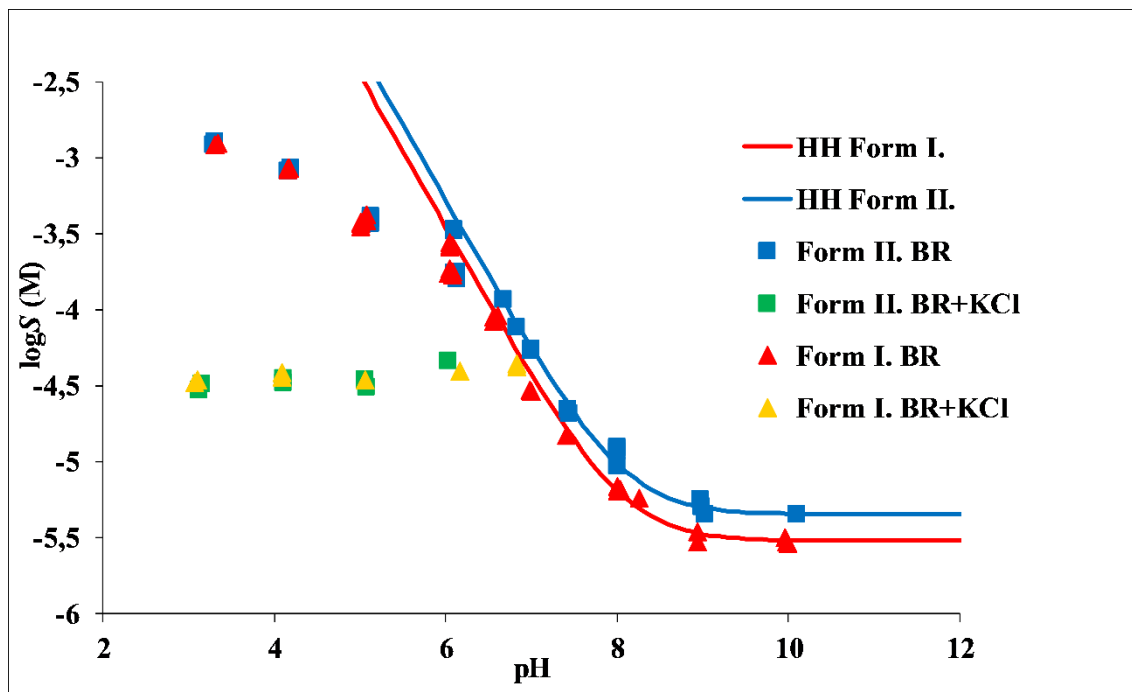
**22. ábra.** A kiindulási OTC-HCl Form A és Form B, az oldhatósági mérések végén vett szilárd minták, valamint az OTC dihidrát röntgen diffraktogramjai

Eredményeink alapján elmondható, hogy a venlafaxin-hidrokloridhoz hasonlóan ebben az esetben is az oldószer jelenlétében bekövetkező kristályszerkezetbeli változások miatt a kiindulási módosulattól független az egyensúlyi oldhatóság értéke, ugyanis mindkét esetben az oxitetraciklin-dihidrát egyensúlyi oldhatóságát mérjük.

### 5.2.3. Karvedilol

A két különböző karvedilol polimorf egyensúlyi oldhatóságának meghatározását 3-tól 10-ig terjedő pH tartományban végeztük el. A karvedilol, mint bázikus molekula ( $pK_a = 8,06$ ), pH 6 alatt döntő többségében protonált formában lesz jelen az oldatban, így sóképzésre hajlamos, míg pH 8 felett döntően a szabad karvedilol bázis jelenléte dominál.

A két vizsgált módosulat (Form I. és Form II.) oldhatóság – pH összefüggését illusztrálja a 23. ábra, melyen a két módosulat különböző pufferoldatokban mért egyensúlyi oldhatósága van feltüntetve az elméleti HH görbéhez hasonlítva.

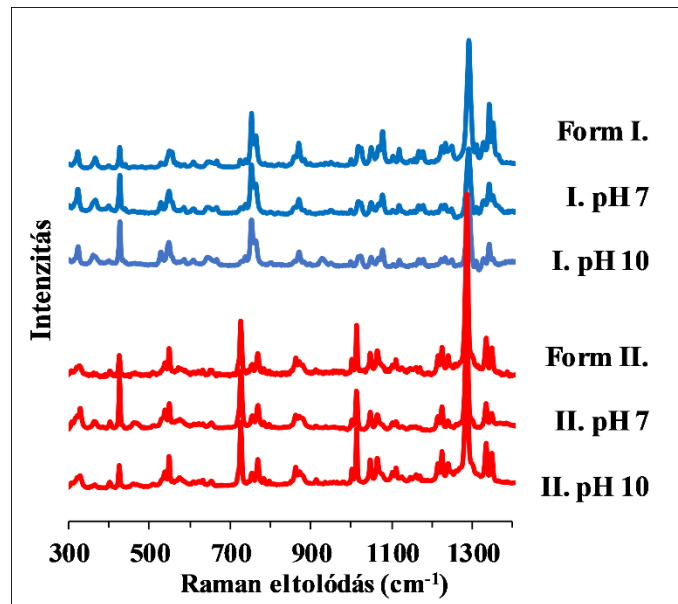


**23. ábra.** Vizsgált karvedilol polimorfok oldhatóság-pH összefüggése BR és BR+KCl pufferekben (a pontok a mérési eredményeket jelzik, a vonalak az elméleti HH görbéket)

Ahogy az már korábban az egyensúlyi oldhatóság adataiból is kiderült, a sóképzési tartomány eléréseig a két módosulat egyensúlyi oldhatóságában szignifikáns különbség mutatkozik. Mivel a két vegyület intrinsic oldhatósága is különböző, így a két módosulatot két különböző elméleti HH görbével tudjuk jellemezni: az ábrán a pirossal jelöltet a Form I. intrinsic oldhatóságával, a kéket pedig a Form II. adataival számoltuk. Ez azt vetíti előre, hogy a korábban vizsgált két hatóanyag polimorf módosulaitól eltérően a karvedilol polimorfok nem alakulnak át oldószer jelenlétében, hanem megőrzik eredeti kristályszerkezetüket az oldhatósági mérés végéig. Ezzel szemben, ha a pH 6,0 alá eső sóképzési tartományt vizsgáljuk, látható, hogy ugyanazon pufferekben a két módosulat egyensúlyi oldhatósága megegyezik, viszont az eltérő összetételű pufferekben tapasztalt különbség arra utal, hogy mindkét kiindulási módosulatból közös só képződik, amely függ a tompítóoldat ellenion összetételétől. Ahhoz, hogy ezen feltevéseinket alátámasszuk, Raman és XRPD méréseket ( $4^\circ$  és  $42^\circ$   $2\theta$  között) végeztünk az oldhatósági mérések végén izolált szilárd fázisból. A bázikus tartományban (pH 7,0 – 10,0), ahol a



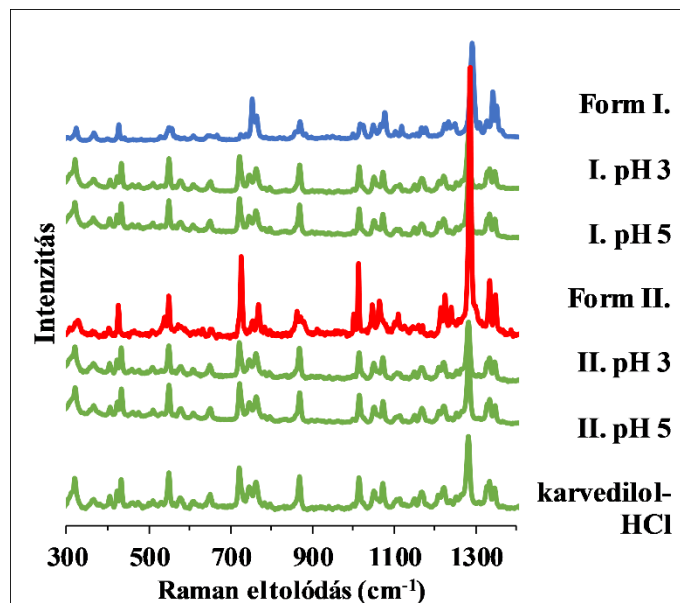
módosulatok egyensúlyi oldhatósága között különbség mutatkozott, a szilárd fázisú Raman mérések eredményeit a 24. ábra szemlélteti.



**24. ábra.** A karvedilol kiindulási Form I. és Form II. módosulatok, valamint az oldhatósági mérések (pH 7,0 – 10,0) végén izolált szilárd fázis Raman spektruma

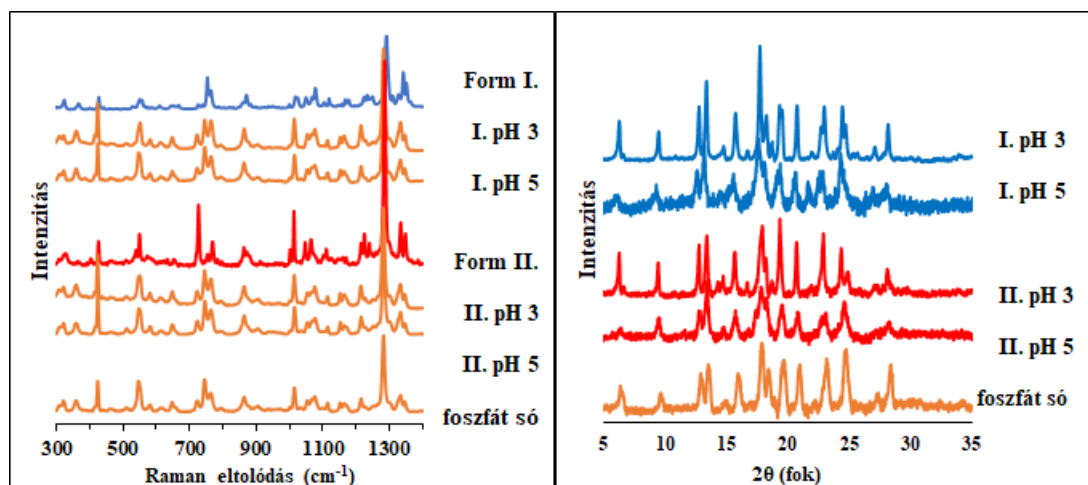
A Raman mérések eredményei egyértelműen alátámasztják azt a feltevésünket, hogy a polimorfok nem szenvednek átalakulást oldószer jelenlétében, ugyanis az oldhatósági mérés végén vett minták Raman spektrumai megegyeznek a kiindulási módosulatok spektrumával.

Savas (pH 3,0 – 5,0) tartományban a mért egyensúlyi oldhatóság értékek eltérnek a HH összefüggés által becsült értékektől, ennek oka a sókiválás. A két különböző pufferben az oldhatósági eredmények alapján két különböző só képződik, ezek azonosítása szintén szilárd fázisú analízissel történt meg. Nem meglepő módon a kálium-kloridot is tartalmazó pufferből karvedilol-hidroklorid só vált ki, ez látható a 25. ábrán.



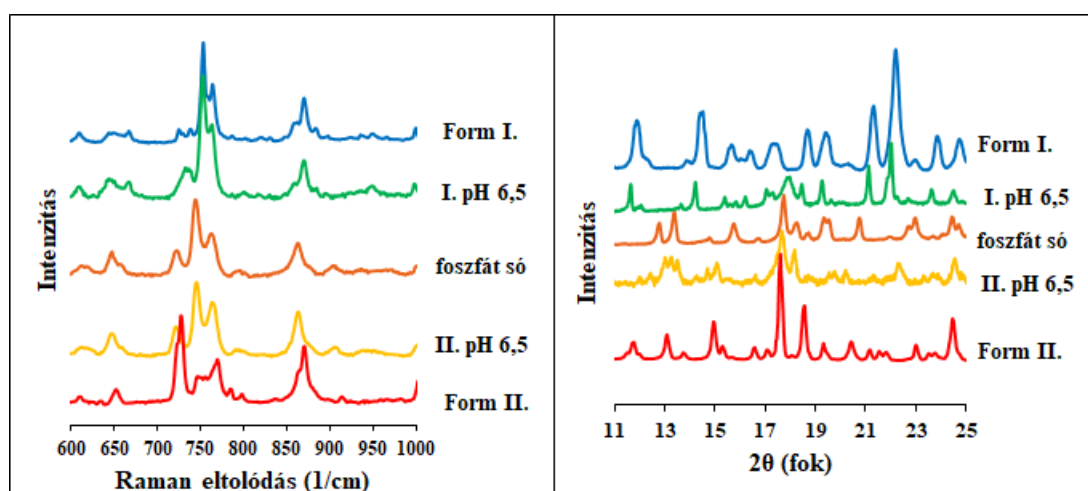
**25. ábra.** A kiindulási Form I. és Form II. módosulatok, a karvedilol-hidroklorid só, valamint az oldhatósági mérések (pH 3,0 – 5,0; BR+KCl) végén izolált szilárd fázis Raman spektruma

A kálium-klorid nélkül készült BR puffer esetén nem találtunk ilyen egyértelmű magyarázatot a só szerkezetére. A Raman mérések annyi információt szolgáltatottak, hogy a kivált só karvedilol-foszfát, azonban a foszfát sók sokfélesége miatt XRPD analízist is végeztünk (4° és 42° 2 $\theta$  között), hogy pontosan meg tudjuk állapítani a só szerkezetét. Ezen eredmények alapján már azonosítani tudtuk a terméket, mivel a mintáink karakterisztikus csúcsai megegyeztek a WO2008093350A1 szabadalomban leírt karvedilol-dihidrogénfoszfát-anhidrát (későbbiekben ezt említjük foszfát sóként) diffraktogramjának karakterisztikus csúcsaival(105). A Raman és XRPD mérések eredményei a 26. ábrán láthatóak.



**26. ábra.** A kiindulási Form I. és Form II. módosulatok, a karvedilol-dihidrogénfoszfát-anhidrát só, valamint az oldhatósági mérések (pH 3,0 – 5,0; BR) végén izolált szilárd fázis Raman spektruma és XRPD diffraktogramja

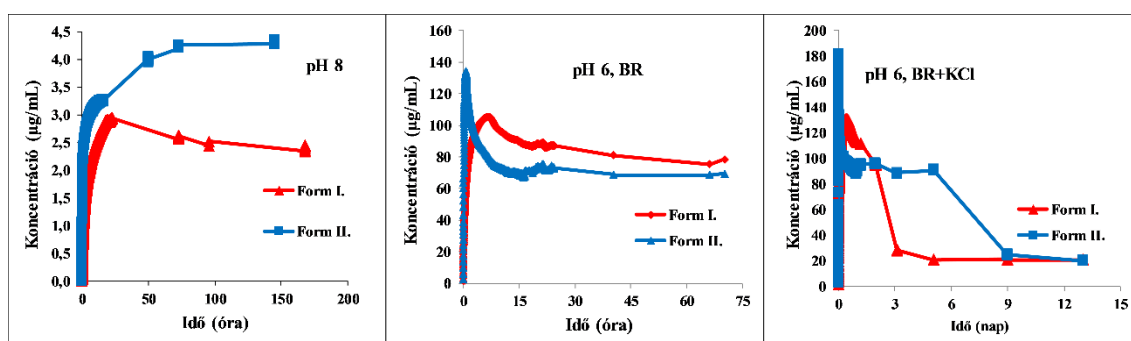
Nem beszéltünk még a köztes pH 6,0 – 6,5 pH tartományban végzett mérésekről és tapasztalataikról. A pH 6,5 BR pufferben végzett mérések végén vett minták eltérő mértékű átalakuláson mentek keresztül a szilárd fázisú mérések alapján. Látható a 27. ábrán, hogy a Form II. módosulat és a mérés végén vett minta spektruma teljesen eltérő, utóbbi a foszfát só spektrumával mutat egyezést. Ezzel szemben a Form I. módosulat oldhatósági méréseinek végén vett minta Raman spektrumán a foszfát sóra jellemző karakterisztikus csúcsokon kívül megjelenik egy, a kiindulási módosulatra jellemző karakterisztikus csúcs is. Ugyanez a jelenség figyelhető meg a minták XRPD diffraktogramján is.



**27. ábra.** A kiindulási Form I. és Form II. módosulatok, a karvedilol-dihidrogénfoszfát-anhidrát só, valamint az oldhatósági mérések (pH 6,5; BR) végén izolált szilárd fázis Raman spektruma és XRPD diffraktogramja

Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a Form I. módosulat és a foszfát só oldhatósága ezen a pH-n olyannyira közel esik egymáshoz, hogy a Form I. nem tud 100%-ban átalakulni só formává, így egy keverékként van jelen az oldhatósági mérés végén. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy a  $pH_{max}$  értéke kismértékben eltérő a két polimorf esetében.

Említettük korábban, hogy az oldhatósági méréseket valós idejű követés mellett végeztük. Ennek a karvedilol esetében kiemelt jelentősége volt, ugyanis csak a savas pH tartományban (3,0 – 5,0) érte el a rendszer az egyensúlyi koncentrációt 24 óra alatt. A bázikus tartományra jellemző pH 8,0 közegben a Form II. esetében állt be gyorsabban az egyensúly, de ez is több mint két napot vett igénybe. Form I. esetében ugyanez az időtartam több mint 6 nap volt. Kálium-kloridot nem tartalmazó pH 6,0 BR pufferben mindkét módosulathoz több mint két napra volt szüksége az egyensúly eléréséhez. Ez az időtartam kálium-klorid tartalmú pH 6,0 BR pufferoldatban még hosszabbnak bizonyult: a Form I. esetében 6 napra, a Form II. esetében még ennél is több, közel két hétre volt szükség az egyensúly beállításához. Az egyensúly beállítását és az ahhoz szükséges időt a 28. ábra szemlélteti.



**28. ábra.** Karvedilol polimorfok koncentráció-idő diagramja pH 8,0 és pH 6,0 (BR és BR+KCl) közegekben

A karvedilol hatóanyag esetén tehát a hagyományos 24 órás mérési protokoll alkalmazása szignifikáns hibát okozott volna: pH 8,0 közegben a Form I. esetében 14%-kal, a Form II. esetében 30%-kal mértünk volna magasabb egyensúlyi oldhatóságot, ha a koncentráció leolvasását 24 óra után végezzük el. A kálium-kloridot nem tartalmazó, pH 6,0 BR pufferben ez a hiba 20,9% lett volna a Form I. és „mindössze” 7,6% a Form II. esetében. Ha azonban kálium-klorid is jelen van a rendszerben, ez az érték még nagyobb: több mint 500%-kal magasabb a koncentráció a Form II. esetében 24 óra után, mint a

tényleges egyensúlyi oldhatóság, a Form I. esetében pedig még ennél is több, 600% ez a különbség.

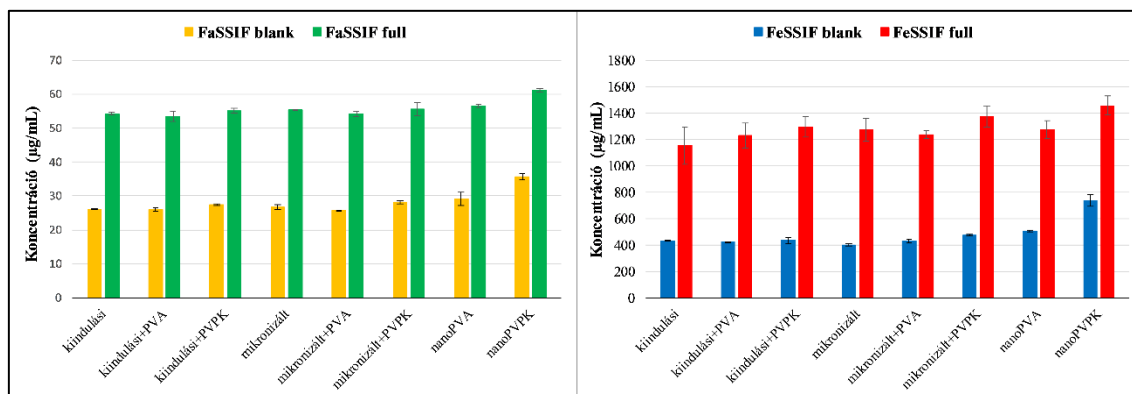
A fenti vizsgálatok eredményei jól szemléltetik a polimorf módosulatok egyensúlyi oldhatóságának meghatározása közben fellépő nehézségeket. Modellvegyületeink közötti átalakulást szenvedett oldószer jelenlétében, a harmadik esetben azonban nem történt változás a kiindulási módosulatok kristályszerkezetében. Megállapítható tehát, hogy az átalakulás anyagfüggő. Ahhoz azonban, hogy tudjuk, bekövetkezik-e változás, ki kell egészíteni az oldhatósági méréseket szilárd fázisú analízissel. Bemutattuk továbbá, hogy az átalakulások időigényes folyamatok lehetnek, így az egyensúly elérésének detektálását nagyban segíti az *in situ* UV-szondákkal történő valós idejű követés.

### **5.3. Mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata**

Munkám harmadik részében száraz őrléssel előállított, mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának vizsgálatával foglalkoztam. Ahhoz, hogy minél jobban modellezzük a szervezetbeni fiziológiás körülményeket, a méréseket többféle bioreleváns közegben végeztük, 37°C-on. Mivel a nanonizált minták segédanyagai befolyásolhatják az egyensúlyi oldhatóságot, így azok hatását is vizsgáltuk. Ennek köszönhetően ez a fejezet az említett faktorok (részecskeméret-csökkentés, pH, szolubilizáló ágensek, polimer segédanyagok) komplex vizsgálatát ismerteti hatóanyagokénti bontásban.

### 5.3.1. Papaverin-hidroklorid

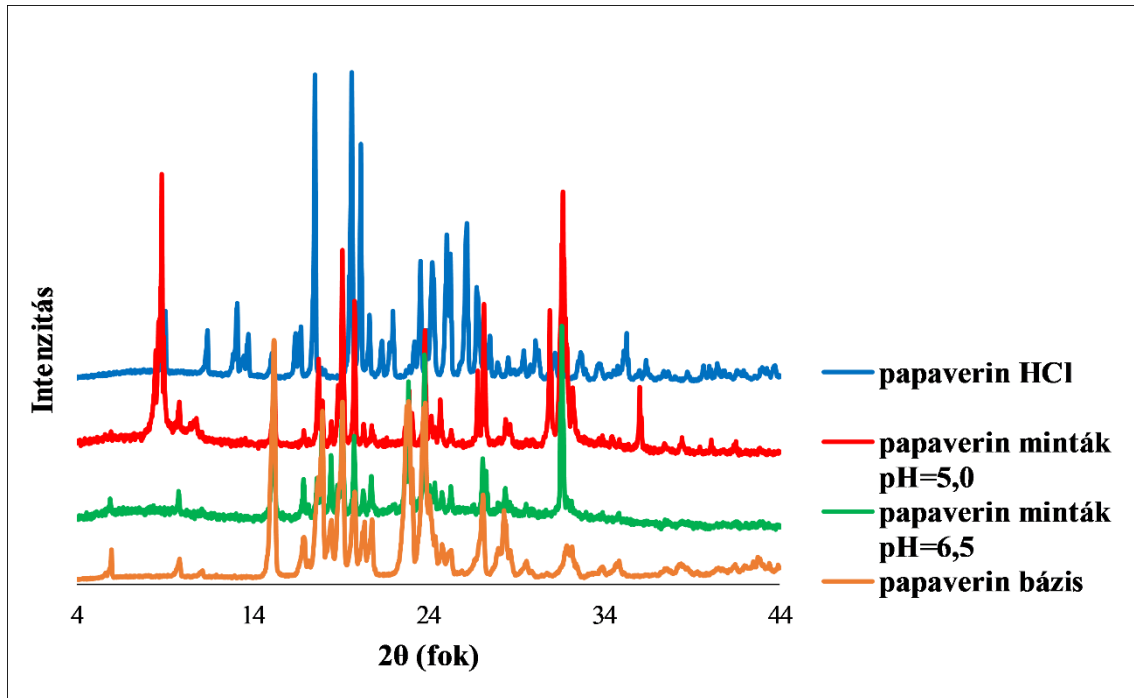
A vizsgált papaverin-hidroklorid formulációk különböző közegekben mért egyensúlyi oldhatóságainak összehasonlítása a 29. ábrán látható.



**29. ábra.** A vizsgált papaverin-hidroklorid formulációk egyensúlyi oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben

Bázikus jellegének köszönhetően a papaverin-hidroklorid oldhatósága magasabb lesz pH 5,0 közegekben, a molekulák nagyobb mértékű ionizációja következtében. Az eredményekből megállapítható, hogy a mikronizálás a vártnak megfelelően nem változtatta meg a molekula egyensúlyi oldhatóságát. A PVA-val nanonizált minta esetében sem nőtt az egyensúlyi oldhatóság. Ezzel szemben a PVP-K25-tel nanonizált minta oldhatósága szignifikánsan megnőtt az összes vizsgált közegben a többi formulációhoz képest. Ennek magyarázata feltételezhetően a PVP-K25 segédanyag és a nanonizálás együttes hatásának köszönhető, előbbi ugyanis a kiindulási és a mikronizált mintához hozzákeverve is képes volt kismértékben megnövelni az egyensúlyi oldhatóságot. A FaSSIF illetve FeSSIF közeg szolubilizáló hatását tekintve látható, hogy ezen pufferek alkalmazása a blank közegekhez képest szignifikáns oldhatóságnövekedést eredményez.

Az oldhatósági mérések végén elvégeztük a minták XRPD analízisét ( $4^\circ$  és  $45^\circ$   $2\theta$  között), ennek eredménye a 30. ábrán látható.



**30. ábra.** Az oldhatósági mérések végén vett minták, valamint a papaverin bázis és a papaverin-hidroklorid XRPD diffraktogramja

A diffraktogramok azt mutatják, hogy míg pH 6,5 közegben a kiindulási papaverin-hidroklorid teljesen átalakul papaverin bázissá, addig pH 5,0 pufferekből vett minták szilárd fázisában még megjelennek a hidroklorid sóra jellemző karakterisztikus csúcsok is, így ebben az esetben a só és a szabad bázis keveréke van jelen a mérés végén. A nanonizált minták az oldhatósági mérések végére elvesztették a kezdetben jellemző részlegesen amorf karakterüket, így diffraktogramjuk megegyezett a kiindulási illetve a mikronizált minták diffraktogramjaival, emiatt minden pH-ról csak egy diffraktogramot tüntettem fel a jobb áttekinthetőség érdekében.

Azért, hogy lássuk, a vizsgált formulációk részecskeméret-eloszlása változik-e az egyensúlyi oldhatóság mérésének végére, elvégeztük a mérés végén a szuszpenziók részecskeméret-analízisét lézerdiffrakció segítségével, ennek eredményét a 13. táblázathoz hasonlóan a  $d = 0,1$ ;  $0,5$  és  $0,9$  értékek felhasználásával ismertetem, ezt tartalmazza a 18. táblázat.

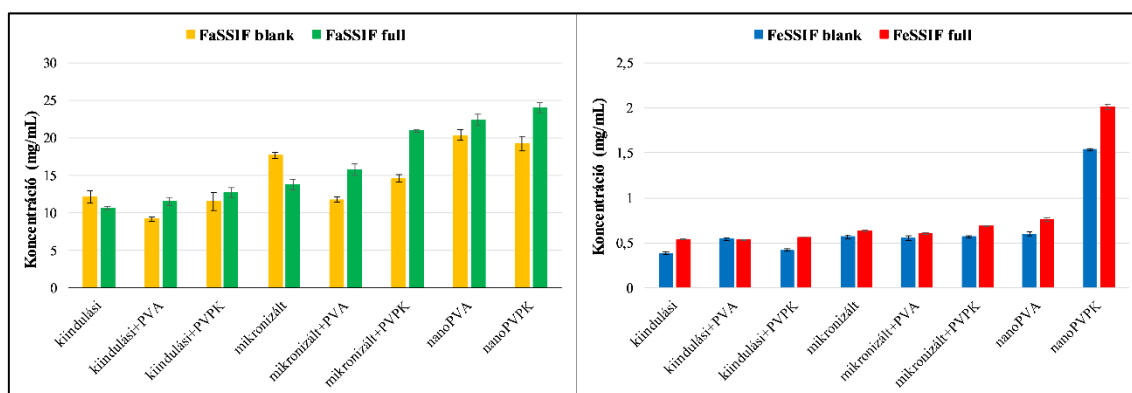
**18. táblázat.** A vizsgált papaverin-hidroklorid formulációk részecskeméret-eloszlása az oldhatósági mérések végén

	pH 6,5			pH 5,0		
	d=0,1 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,5 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,9 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,1 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,5 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,9 ( $\mu\text{m}$ )
PAP						
kiindulási	7,96	33,39	98,40	4,60	49,42	189,96
kiindulási+PVA	6,75	23,57	85,95	5,40	34,02	126,18
kiindulási+PVPK	10,92	28,29	57,42	21,55	53,25	98,98
mikronizált	13,22	38,17	76,99	8,22	66,08	129,94
mikronizált+PVA	7,14	21,37	46,42	8,35	40,53	91,06
mikronizált+PVPK	10,43	27,87	57,36	18,90	47,35	88,34
nanoPVA	12,56	55,80	143,53	23,90	80,71	160,25
nanoPVPK	7,77	37,98	113,67	29,73	62,00	120,43

A részecskeméret-analízis szerint a nanonizált részecskék a mérés végére nem maradnak a szubmikron tartományban, aggregáció figyelhető meg, ami néhány esetben nagyobb végső részecskeméretet eredményez, mint ami a kiindulási vagy mikronizált minták esetében jellemző. A kiindulási és mikronizált minták esetében a mérés végére kisebb átlagos részecskeméret jellemző, mint a mérés előtt megfigyelhető volt. Továbbá esetükben a segédanyag fizikai keverékként történő hozzáadása gátolja az aggregációt, így PVA vagy PVP-K25 jelenlétében kisebb részecskeméret figyelhető meg, mint ezek hiányában. Az ionizáltsági állapot is befolyásolhatja a végső részecskeméretet: pH 5,0 közegben, ahol a molekulák nagyobb része van protonált formában, nagyobb átlagos részecskeméret figyelhető meg.

### 5.3.2. Furoszemid

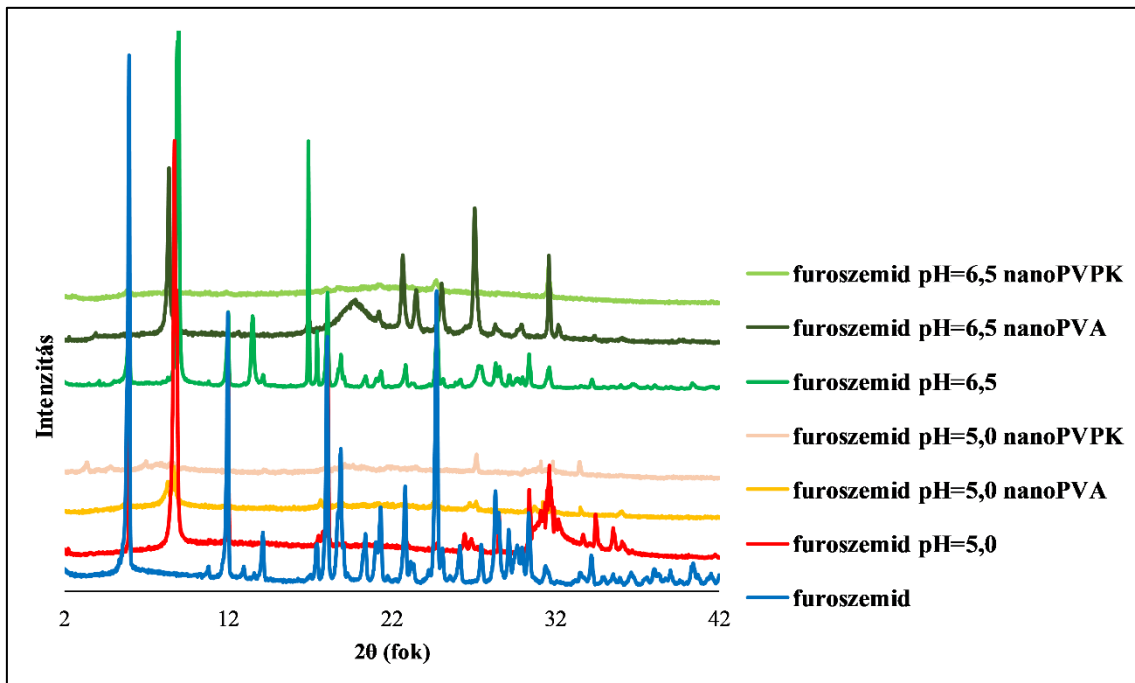
A furoszemid formulációk esetében mért egyensúlyi oldhatóság értékek összehasonlítása a 31. ábrán látható.

**31. ábra.** A vizsgált furoszemid formulációk egyensúlyi oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben



Korábban már említettük, hogy a furoszemid molekula gyenge savi karakterének és ionizáltsági állapotának köszönhetően a pH 5,0 és pH 6,5 közegben mért oldhatósági eredmények között egy nagyságrendnyi különbség van, ez jól megfigyelhető a fenti összehasonlító ábrán. Ha a biomimetikus közeg szolubilizáló hatását vizsgáljuk, látható, hogy FaSSIF közegben, ahol a molekula egyébként is rendkívül magas oldhatósággal rendelkezik, a SIF por szolubilizáló hatása nem érvényesül. FeSSIF közegben, ahol a molekulák egy része semleges formában van jelen, már megfigyelhetünk oldhatóságnövelő hatást. A polimer segédanyagok tekintetében FaSSIF blank/full közegekben nem láttunk jelentős oldhatóságra gyakorolt befolyásoló hatást, ezzel szemben FeSSIF full közegben a PVP-K25 kismértékben növelte a kiindulási és a mikronizált minta oldhatóságát. A nanonizálás FaSSIF közegekben mindkét segédanyag alkalmazása mellett növelte a furoszemid egyensúlyi oldhatóságát, azonban közel sem annyira kiemelkedően, mint az a PVP-K25-tel nanonizált minta esetében FeSSIF közegekben megfigyelhető: itt négyszeres oldhatóságnövekedést tapasztaltunk.

A szilárd fázisban bekövetkező változások követésének érdekében ebben az esetben is végeztünk XRPD méréseket ( $2^\circ$  és  $42^\circ$   $2\theta$  között), ennek eredményét a 32. ábra szemlélteti.



**32. ábra.** Az oldhatósági mérések végén vett minták, valamint a furoszemid XRPD diffraktogramja

A kiindulási és mikronizált minták segédanyag jelenlétében és anélkül is megőrizték kristályos szerkezetüket, és a mérés végén ugyanazon karakterisztikus csúcsok voltak megfigyelhetők a diffraktogramjaikon, így ezeket a papaverin-hidrokloridhoz hasonló módon mindkét pH esetén egy közös diffraktogrammal jellemeztük a 32. ábrán. A nanonizált minták diffraktogramjait külön tüntettük fel, mivel látható, hogy megőrizték részlegesen amorf karakterüket az oldhatósági mérés végére is. Emiatt, az esetükben tapasztalt oldhatóságnövekedés nem tulajdonítható kizárólagosan a nanonizálásnak, mivel ismert tény, hogy az amorfizálás is növeli a vegyületek oldhatóságát(106). Ezen túlmenően látható az ábrán, hogy mindkét pH-nál a kiindulási szabad sav nátrium sóvá alakul, ezt jelzi a 8,8  $2\Theta$ -nál megjelenő és 5,9  $2\Theta$ -nál eltűnő karakterisztikus csúcs(107).

A részecskeméret-eloszlás vizsgálatát a furoszemid formulációk esetében is lézerdiffrakcióval végeztük el az oldhatósági mérések végén kapott szuszpenziókból. Ennek eredményeit foglaltam össze a 19. táblázatban.

**19. táblázat.** *A vizsgált furoszemid formulációk részecskeméret-eloszlása az oldhatósági mérések végén*

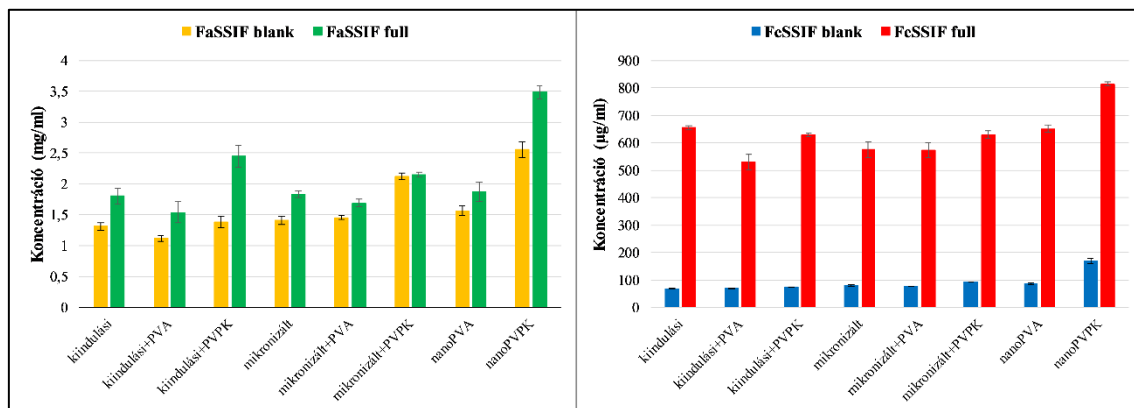
	pH 6,5			pH 5,0		
	d=0,1 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,5 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,9 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,1 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,5 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,9 ( $\mu\text{m}$ )
kiindulási	4,72	14,63	35,04	16,24	51,23	110,56
kiindulási+PVA	8,46	35,98	97,24	8,40	31,78	83,27
kiindulási+PVPK	6,04	34,83	94,75	9,53	35,88	88,28
FUR mikronizált	3,05	10,16	25,98	1,90	7,36	24,69
mikronizált+PVA	1,91	5,10	11,12	3,41	14,05	91,50
mikronizált+PVPK	1,51	1,75	9,51	2,29	16,92	50,15
nanoPVA	4,56	22,61	66,78	7,18	32,44	89,24
nanoPVPK	0,34	0,78	2,16	1,45	75,81	305,43

A két pH-n mért részecskeeloszlás értékeket vizsgálva elmondható, hogy a magasabb pH-jú közegben kisebb átlagos részecskeméret jellemző. Ez feltételezhetően az anionos részecskék aggregációt csökkentő tulajdonságának köszönhető. Ugyanezen közegben a nanonizált minták közül a PVP-K25-tel nanonizált minta részben a szubmikron tartományban marad, azonban a részecskék kb. 40%-a ebben az esetben is meghaladja az 1  $\mu\text{m}$ -es méretet, ami aggregációra utal. A PVA-val nanonizált minta esetén hasonló jelenség nem volt megfigyelhető, a minta nem maradt a szubmikron

tartományban, ahogyan a pH 5,0 közegben vizsgált nanonizált minták sem, segédanyagtól függetlenül. A mikronizált és a kiindulási minták részecskemérete csökkent az oldhatósági mérés végére, segédanyag jelenlétében illetve anélkül is.

### 5.3.3. Nifluminsav

A nifluminsav formulációk oldhatósági eredményeinek összehasonlítása a 33. ábrán látható.

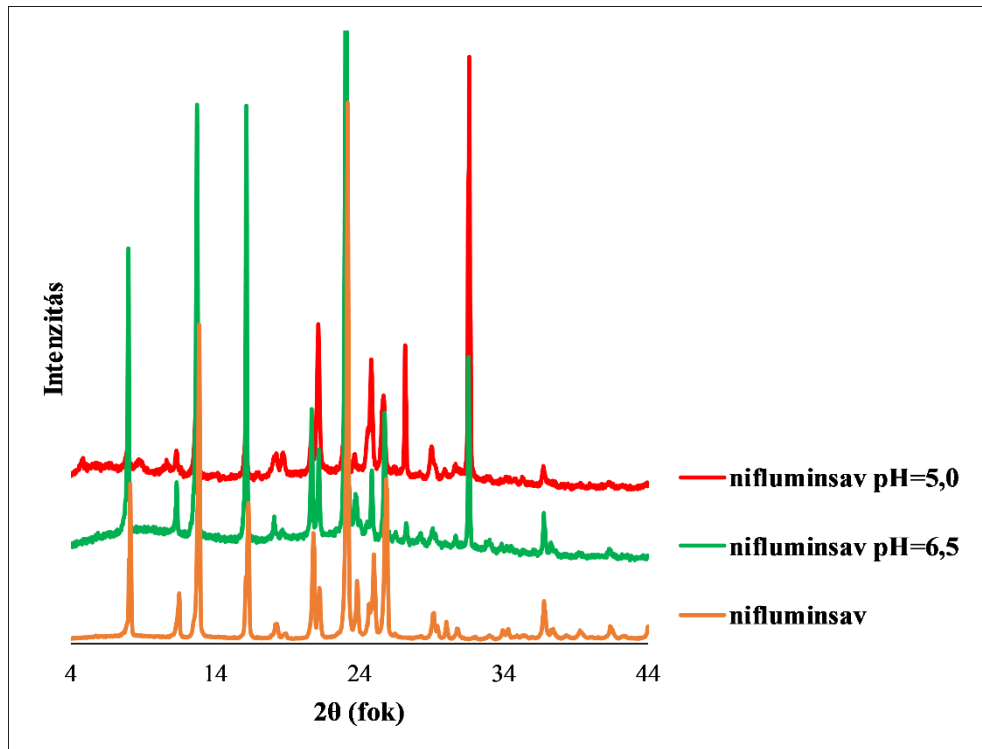


**33. ábra.** A vizsgált nifluminsav formulációk egyensúlyi oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben

A molekula ionizáltsági állapotának megfelelően pH 6,5 közegben a nifluminsav oldhatósága körülbelül húszszorosa a pH 5,0 közegben mérhetőnek. Ez a jó oldhatóság a furoszemidhez hasonlóan a SIF por szolubilizáló hatásának csekély érvényesülését okozza. A polimer segédanyagok közül a PVP-K25 mind a kiindulási, mind pedig a mikronizált minta egyensúlyi oldhatóságát szignifikánsan megnövelte. Az ezzel a segédanyaggal nanonizált minta oldhatósága FaSSIF blank és full közegben is kiemelkedően magas volt, erre ismét csak a segédanyag és a nanonizálás együttes hatása lehet a magyarázat. FeSSIF blank közegben a segédanyagoknak nem volt szignifikáns hatása a kiindulási és a mikronizált minta oldhatóságára, a nanonizált minták közül is csak a PVP-K25-tel nanonizált minta oldhatósága mutatott növekedést. Szembetűnő viszont a FeSSIF full közegben lévő SIF por szolubilizáló hatása: a molekulák oldhatósága drasztikusan megnőtt a FeSSIF blank közegben mért értékekhez képest.

A szilárd fázis analízisére szolgáló XRPD mérések ( $4^\circ$  és  $45^\circ$   $2\theta$  között) eredményei a 34. ábrán láthatóak. Ezen megfigyelhető, hogy sem a FaSSIF, sem a FeSSIF közegekből vett szilárd anyag esetében nem változik a minták diffraktogramja, így kijelenthetjük, hogy a nifluminsav nem alakul át sóvá vagy polimorf módosulattá a mérés

végére. Mivel azt tapasztaltuk, hogy a nanonizált minták részben amorf karaktere a mérés végére eltűnik, és ugyanazon karakterisztikus csúcsok figyelhetők meg a diffraktogramjukon, mint a kiindulási vagy a mikronizált minták diffraktogramjain, így az ábrán ebben az esetben sem tüntettük fel őket külön-külön.



**34. ábra.** Az oldhatósági mérések végén vett minták, valamint a niifluminsav XRPD diffraktogramja

A niifluminsav formulációk oldhatósági méréseinek végén kapott részecskeméret-eloszlás értékeket a 20. táblázat tartalmazza.

**20. táblázat.** A vizsgált niifluminsav formulációk részecskeméret-eloszlása az oldhatósági mérések végén

	pH 6,5			pH 5,0			
	d=0,1 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,5 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,9 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,1 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,5 ( $\mu\text{m}$ )	d=0,9 ( $\mu\text{m}$ )	
NIF	kiindulási	19,07	58,55	128,24	56,21	151,25	488,95
	kiindulási+PVA	8,29	38,74	112,33	9,97	47,10	126,18
	kiindulási+PVPK	11,39	42,73	95,69	13,60	66,44	164,08
	mikronizált	8,59	32,98	96,05	16,57	71,37	164,93
	mikronizált+PVA	4,71	18,60	94,05	7,61	52,11	147,07
	mikronizált+PVPK	1,94	3,53	11,09	2,73	15,18	64,21
	nanoPVA	10,52	47,76	121,88	10,71	50,03	137,71
	nanoPVPK	1,98	3,34	9,48	1,33	5,26	17,26

A furoszemidhez hasonlóan pH 6,5 közegben a molekulák negatív töltése miatti gátolt aggregáció okán kisebb az átlagos részecskeméret, mint pH 5,0 közegekben. Ugyanez a gátolt aggregáció figyelhető meg, ha a kiindulási és a mikronizált minták segédanyag jelenlétében és anélkül végzett oldhatósági mérések eredményeit elemezzük: a polimer segédanyag jelenléte gátolja az aggregációt, így jelenlétük a rendszerben kisebb átlagos részecskeméretet eredményez. Ahhoz azonban a nifluminsav esetén sem elég erős ez a gátló hatás, hogy a nanonizált mintákat a szubmikron tartományban tartsa, a mérés végére felfedezhetőek az aggregáció jelei.

A három modellvegyület kereskedelmi forgalomban kapható, mikronizált és nanonizált formáival végzett mérések eredményei megmutatják, hogy mind a részecskeméret-csökkentés, mind a polimer segédanyagok, mind pedig az oldószerként alkalmazott közeg pH-ja és összetétele is befolyásolhatja egy hatóanyag egyensúlyi oldhatóságát. Ennek következtében mindenképpen szükséges ezen paramétereket a mérés céljának megfelelően megválasztani, a változásokat pedig monitorozni. A részletes következtetések a 6. fejezetben találhatóak.

## 6. Következtetések

Doktori munkám során áttekintettem az egyensúlyi oldhatóság mérésének számos olyan buktatóját, melyek figyelmen kívül hagyása a mérés megtervezése során szignifikáns hibát eredményezhet az egyensúlyi oldhatóság értékében.

Munkám első részében a különböző szűrők egyensúlyi oldhatóságra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Ennek során négy modellanyag felhasználásával több, mint 250 oldhatósági mérést végeztünk el, melyek alapján kijelenthetjük, hogy a szűrés csak akkor szolgáltat torzítatlan eredményt, amennyiben megfelelő szűrőt választunk az oldat és a szilárd fázis elválasztására. Elsődlegesen választandó fázisválasztási módszerként továbbra is az üleptetés javasolt, szűrők alkalmazása kizárólag abban az esetben ajánlott, ha bizonyos okok miatt a szedimentáció nem kivitelezhető (pl. rosszul ülepedő hatóanyagok). Amennyiben ez a helyzet áll fenn, a szűrő megválasztásakor figyelembe kell vennünk az adott hatóanyag poláris/apoláris jellegét. Eredményeinkből látható, hogy a membránszűrők és az analitikai szűrőpapír is hajlamos az oldott molekulák adszorbeálására, ugyanakkor a szűrő könnyen telíthető az adott anyaggal, és ebben az esetben egy későbbi oldatrészletből végzett koncentrációmérés nem jár szignifikáns hibával. Alacsony koncentrációjú oldatok vagy a szűrő anyaga iránt nagy affinitással bíró hatóanyagok esetében azonban ez a telítés nem mindig következik be. Fontos kiemelni azt is, hogy szűrés alkalmazása esetén is ki kell várni az egyensúly beállításához szükséges időt, hogy elkerüljük a túltelített oldatok képződését. Összességében arra a megállapításra jutottunk, hogy a semleges molekulákat vagy a molekula nemionizált formáját tartalmazó telített oldatok szűrésekor hidrofil anyagú szűrő alkalmazása javasolt. Ezzel szemben, ha az oldatban túlnyomórészt a molekula ionizált formája van jelen, hidrofób szűrő a megfelelő választás.

Munkám folytatásaként a különböző polimorf módosulatok egyensúlyi oldhatóságának mérésekor felmerülő problémákat vizsgáltuk. Mint ismeretes, a polimorf módosulatok oldószer jelenlétében átalakulásokon mehetnek keresztül, éppen ezért egyensúlyi oldhatóságuk meghatározását mindenképp ki kell egészíteni a szilárd fázis analízisével. Erre a célra a Raman-spektroszkópia, a porröntgen-diffrakció vagy az IR-spektroszkópia is alkalmas lehet. A vizsgált modellanyagok közül a venlafaxin-hidroklorid két polimorf módosulatának egyensúlyi oldhatósági analízisét pH 7,5 – 12,0

tartományban végeztük el. A szilárd fázisú Raman és XRPD mérések segítségével tudtunk magyarázatot találni arra, hogy miért egyezik meg az egyensúlyi oldhatóság a különböző kiindulási módosulatok esetén. Megállapítottuk, hogy a Form I. és Form II. is ugyanazon terméké alakul át az oldhatósági mérés végére, a terméket pedig pH-tól függően szabad venlafaxin bázis Form I. módosulataként, vagy venlafaxin-hidroklorid monohidrátként tudtuk azonosítani a Cambridge szerkezet adatbázis illetve szabadalmi adatok alapján. A közös forma kialakulása vizes közegben magyarázatot adhat arra, miért lehet a termodinamikailag kevésbé stabil Form II. módosulatot alkalmazni a gyógyszerkészítmények előállításánál során, kihasználva így annak technológiai szempontból kedvező tulajdonságait. Továbbá fontos kiemelni, hogy az oldhatóság változását UV-szondák segítségével valós időben követtük, így biztosan megállapítható volt az egyensúly beálláshoz szükséges idő. Az oxitetraciklin A és B polimorf módosulatának vizsgálatakor a venlafaxin-hidrokloridhoz hasonló viselkedést tapasztaltunk, vagyis a két különböző kiindulási módosulatból közös termék keletkezett, tehát azonos egyensúlyi oldhatóságot mértünk mindkét kiindulási anyag esetén. A közös terméket XRPD mérések és adatbázis segítségével oxitetraciklin-dihidrátként azonosítottuk. Eredményeink továbbá tisztázták az eredeti, Burger és munkatársai (1986) által közölt 28-szoros oldhatóságkülönbség körül kialakult hibás nézeteket: munkacsoportjuk ezeket az oldhatóságkülönbségeket nemvizes közegben, izopropanolban mérte, vizes közegben az említett dihidrát forma kialakulása miatt ez a jelenség nem megfigyelhető. Izopropanolban a metastabil forma sokkal jobban oldódik és nem megy végbe átalakulás, ez lehet az oka a szokatlanul nagy különbségnek. Harmadik modellvegyületünk, a karvedilol az előző két módosulathoz képest eltérő viselkedést mutatott. Bázikus pH tartományban, ahol a molekula túlnyomórészt semleges formában van jelen, a két módosulat egyensúlyi oldhatósága között jelentős, kétszeres eltérést tapasztaltunk. Ez azt vetíti előre, hogy a módosulatok nem alakulnak át oldószer jelenlétében. Ezt a feltevést Raman és XRPD mérésekkel alá is támasztottuk. Ez magyarázatul szolgál arra, hogy miért alkalmazható a termodinamikailag instabilabb Form II. módosulat a készítmények előállítására – mivel nem történik átalakulás, a magasabb oldhatóság miatt jobb biohasznosulás érhető el alkalmazásakor. Savas pH tartományban, ahol a molekula protonált állapotban van, sóképződés figyelhető meg, a só típusa függ az oldószerként alkalmazott közeg ellenion tartalmától: amíg kloridionokat is

tartalmazó közegből karvedilol-hidroklorid, addig kloridionokat nem tartalmazó közegből karvedilol-dihidrogénfoszfát-anhidrát válik le mindkét kiindulási módosulat esetén. A három molekula közül ebben az esetben mutatkozott meg leginkább az oldhatóság valós idejű követésének jelentősége: mind bázikus tartományban, mind a köztes, pH 6,0 – 6,5 tartományban hosszú időre van szükség az egyensúly beállításához. Ahogy bemutattuk, szélsőséges esetben akár 600%-os eltérés is lehet a 24 óra után mért oldatkonzentráció és a tényleges egyensúlyi oldhatóság között. Éppen ezért rosszul oldódó, BCS II. osztályú hatóanyagok esetében különösképpen javasolt az egyensúlyi oldhatóság ilyen módon történő meghatározása.

Munkám harmadik, befejező részében a részecskeméret-csökkentés, valamint ehhez kapcsolódóan a pH, biomimetikus közeg és a nanonizáláshoz használt segédanyagok egyensúlyi oldhatóságra gyakorolt hatását vizsgáltuk három modellhatóanyag (papaverin-hidroklorid, furoszemid, nifluminsav) és a belőlük előállított formulációk segítségével. Eredményeink igazolták, hogy a mikronizálás nem változtatja meg a hatóanyagok egyensúlyi oldhatóságát, a nanonizálás azonban képes növelni azt, de ezt a hatást befolyásolja, hogy milyen polimer segédanyagot alkalmazunk a nanoformuláció előállításához. Az általunk vizsgált két segédanyag közül jellemzően a PVP-K25 hozzáadásával nanonizált forma oldhatósága növekedett meg szignifikáns mértékben. Ez a segédanyag kismértékben, a kereskedelmi forgalomban kapható és a mikronizált minták oldhatóságát is képes volt megnövelni, amennyiben fizikai keverékként adtuk hozzá az oldathoz, azonban soha nem olyan mértékben, mint amilyen mértékben az ezen segédanyaggal történő nanonizálás növelte azt. A másik vizsgált segédanyaggal, a PVA-val történő nanonizálás a legtöbb esetben nem gyakorolt pozitív hatást az egyensúlyi oldhatóságra. Erre a magyarázat az, hogy a PVP-K25 többféle kölcsönhatás (H-híd és apoláris kötések) kialakítására képes a modellanyaggal és az oldószerrel, mint a PVA, amely esetében csak H-híd kialakulása valószínűsíthető. A segédanyagoknak az oldhatóságra gyakorolt hatáson kívül a részecskeméret befolyásolásában is szerepe volt: jelenlétük gátolta az aggregációt, így kisebb átlagos részecskeméret volt megfigyelhető a mérés végén a kiindulási és mikronizált minták esetében is, amennyiben a polimerek jelen voltak az oldatban. A PVP-K25 ebből a szempontból is előnyösebbnek bizonyult. Munkánk során vizsgáltuk még a biomimetikus közeg alkalmazásának hatását a hatóanyagok egyensúlyi oldhatóságára. Ezt a témát több



ellentmondás övezi, bizonyos tanulmányok süükségtelennek tartják az alkalmazását, míg mások kifejezetten javasolják. A mi eredményeink konklúziója az, hogy a biomimetikus közeg alkalmazásának jelentős oldhatóságnövelő hatása van, ez a hatás azonban kevésbé kifejezett, ha egy molekula ionizált formája van jelen az oldatban, mivel ekkor a pH hatása erősebb, mint a SIF por szolubilizáló tulajdonsága.

## 7. Összefoglalás

Doktori munkám során áttekintést kívántam nyújtani az egyensúlyi oldhatóságot befolyásoló tényezőkről, mind a hagyományos rázótölcséres módszer felülvizsgálatával, mind pedig olyan egyéb módszerek beiktatásával a mérési protokollokba, amelyek bizonyos tényezők fennállása esetén segítik, hogy pontos és reprodukálható eredményt kapjunk.

A hagyományos rázótölcséres módszer felülvizsgálata során sor került a szűrés egyensúlyi oldhatóságra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Ennek során megállapítottuk, hogy a szűrő megválasztása kritikus lehet a pontos egyensúlyi oldhatósági adat szempontjából, és javaslatot tettünk a megfelelő szűrő kiválasztására. Szintén az SSF módszerhez kapcsolódó vizsgálat volt az egyensúly beálláshoz szükséges idő vizsgálata. Megállapítottuk, hogy a korábbiakkal összhangban leggyakrabban elegendő a 24 óra az egyensúly elérésére, azonban a BCS II. osztályú, rossz oldhatósággal rendelkező hatóanyagok kivételt jelenthetnek, így esetükben javasolt az oldhatóság valós idejű követése UV-szondák segítségével.

Polimorf módosulatok egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata során felhívtuk a figyelmet a szilárd fázisú analízis fontosságára, mivel az átalakulások következtében ennek segítségével tudjuk megállapítani, hogy milyen polimorf módosulat oldhatóságát határoztuk meg. Raman-spektroszkópia, XRPD mérések és IR-spektroszkópia egyaránt alkalmas lehet erre a célra.

A mikronizált és nanonizált hatóanyagok vizsgálata egy komplex vizsgálatot eredményezett a részecskeméret-csökkentés, pH, szolubilizáló szerek és polimer segédanyagok oldhatóságra gyakorolt hatásáról. Javaslatot tettünk arra, mikor érdemes mindenképpen biomimetikus közeget alkalmazni az oldhatósági mérések közegeként ahhoz, hogy minél jobban megközelítsük a hatóanyag gasztrointesztinális rendszerbeni oldhatóságának értékét. Felhívtuk a figyelmet a megfelelő segédanyag kiválasztásának fontosságára a nanonizált minták előállításakor, kétféle, a gyógyszertechnológiában gyakran használt polimer segédanyag vizsgálatával. Ezen túlmenően kijelenthetjük azt, hogy részecskeméret-csökkentés alkalmazásakor az oldhatósági méréseket mindenképp ki kell egészíteni a mérés előtt és után végzett szilárd fázisú analízissel, valamint a részecskeméret-eloszlás meghatározásával annak érdekében, hogy pontosan tudjuk követni az oldhatósági mérés alatt lejátszódó változásokat.

## 8. Summary

In my PhD work I wanted to provide an overview about the factors affecting the equilibrium solubility by reviewing the traditional SSF method and by incorporating other methods into the measurement protocols, which help to obtain more accurate and reproducible results in the presence of certain factors.

During the revision of the traditional SSF method, the effect of filtration as a phase separation technique on equilibrium solubility was examined. We concluded that the choice of the filter can be critical in terms of the exact concentration determination, and we proposed the selection of the appropriate filter for molecules in different ionization states. The study of the time needed to reach equilibrium was also related to the SSF method. We found in accordance with the previous studies, that 24 hours is most often enough to reach the equilibrium, however, BCS II. classified drugs with poor solubility can be exceptions, so in their case it is recommended to follow the solubility in real time with *in situ* UV probes, in order to determine the exact equilibrium solubility.

During the examination of the equilibrium solubility of polymorphic forms, we drew attention to the importance of solid-phase analysis, because as a result of the transformations, it helps to determine the identity of the exact compound which is present in solution at the end of the solubility measurement. Raman spectroscopy, XRPD measurements and IR spectroscopy can be suitable for this purpose.

The investigation of the equilibrium solubility of micronized and nanonized active pharmaceutical ingredients in biorelevant and biomimetic media resulted in a complex study about the effect of the particle size reduction, pH, solubilizing agents and polymer excipients on solubility. We have made a recommendation for when it is worth using a biomimetic medium as a solvent for solubility measurements to get the closest result to the solubility of the compound in the gastrointestinal system. We drew attention to the importance of choosing the right excipient for the production of nanonized samples by examining two types of polymer excipients, which are often used in pharmaceutical technology. In addition, we can state that when applying particle size reduction, the solubility measurements must be complemented with solid phase and particle size analysis before and after the measurement, in order to be able to accurately follow the changes that take place during the solubility measurement.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Cascone S, Lamberti G, Marra F, Titomanlio G, d'Amore M, Barba AA. (2016) Gastrointestinal behavior and ADME phenomena: I. In vitro simulation. *J Drug Deliv Sci Tech*, 35: 272-283.
2. Curatolo W. (1998) Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings. *Pharm Sci Tech Today*, 1: 387-393.
3. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 23: 3-25.
4. Varma MV, Gardner I, Steyn SJ, Nkansah P, Rotter CJ, Whitney-Pickett C, Zhang H, Di L, Cram M, Fenner KS, El-Kattan AF. (2012) pH-Dependent Solubility and Permeability Criteria for Provisional Biopharmaceutics Classification (BCS and BDDCS) in Early Drug Discovery. *Mol Pharm*, 9: 1199-1212.
5. Jambhekar SS, Breen PJ. (2013) Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. *Drug Discov Today*, 18: 1173-1184.
6. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. (1995) A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification - the Correlation of in-Vitro Drug Product Dissolution and in-Vivo Bioavailability. *Pharm Res*, 12: 413-420.
7. Bergström CAS, Box K, Holm R, Matthews W, McAllister M, Mullertz A, Rades T, Schafer KJ, Teleki A. (2019) Biorelevant intrinsic dissolution profiling in early drug development: Fundamental, methodological, and industrial aspects. *Eur J Pharm Biopharm*, 139: 101-114.
8. Heimbach T, Fleisher D, Kaddoumi A. Overcoming Poor Aqueous Solubility of Drugs for Oral Delivery. In: Stella V, Borchardt R, Hageman M, Oliyai R, Maag H, Tilley J (szerk.), *Prodrugs: Challenges and Rewards, Part 1*, Springer, New York, 2007: 157-215.
9. Dahan A, Beig A, Lindley D, Miller JM. (2016) The solubility-permeability interplay and oral drug formulation design: Two heads are better than one. *Adv Drug Deliv Rev*, 101: 99-107.
10. Alsenz J, Kansy M. (2007) High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 546-567.
11. Di L, Fish PV, Mano T. (2012) Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discov Today*, 17: 486-495.
12. Konczol A, Dargo G. (2018) Brief overview of solubility methods: Recent trends in equilibrium solubility measurement and predictive models. *Drug Discov Today Technol*, 27: 3-10.
13. Kádár S, Tózsér P, Nagy B, Farkas A, Nagy ZK, Tsinman O, Tsinman K, Csicsák D, Völgyi G, Takács-Novák K, Borbás E, Sinkó B. (2022) Flux-Based Formulation Development-A Proof of Concept Study. *AAPS J*, 24: 22
14. Reza J, Trejo A, Vera-Avila LE. (1999) Generator column determination of water solubilities for saturated C-6 to C-8 hydrocarbons. *Int J Env Anal Chem*, 73: 281-295.

15. Pan L, Ho Q, Tsutsui K, Takahashi L. (2001) Comparison of chromatographic and spectroscopic methods used to rank compounds for aqueous solubility. *J Pharm Sci*, 90: 521-529.
16. Hoelke B, Gieringer S, Arlt M, Saal C. (2009) Comparison of Nephelometric, UV-Spectroscopic, and HPLC Methods for High-Throughput Determination of Aqueous Drug Solubility in Microtiter Plates. *Anal Chem*, 81: 3165-3172.
17. Veseli A, Zakelj S, Kristl A. (2019) A review of methods for solubility determination in biopharmaceutical drug characterization. *Drug Dev Ind Pharm*, 45: 1717-1724.
18. Baka E, Comer JEA, Takács-Novák K. (2008) Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *J Pharm Biomed Anal*, 46: 335-341.
19. Avdeef A, Fuguet E, Llinàs A, Ràfols C, Bosch E, Völgyi G, Verbić T, Boldyreva E, Takács-Novák K. (2016) Equilibrium solubility measurement of ionizable drugs – consensus recommendations for improving data quality. *ADMET & DMPK*, 4: 117-178.
20. Glomme A, Marz J, Dressman JB. (2005) Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *J Pharm Sci*, 94: 1-16.
21. Bergström CAS, Luthman K, Artursson P. (2004) Accuracy of calculated pH-dependent aqueous drug solubility. *Eur J Pharm Sci*, 22: 387-398.
22. Fagerberg JH, Tsinman O, Sun N, Tsinman K, Avdeef A, Bergström CAS. (2010) Dissolution Rate and Apparent Solubility of Poorly Soluble Drugs in Biorelevant Dissolution Media. *Mol Pharm*, 7: 1419-1430.
23. Tsinman K, Avdeef A, Tsinman O, Voloboy D. (2009) Powder Dissolution Method for Estimating Rotating Disk Intrinsic Dissolution Rates of Low Solubility Drugs. *Pharm Res*, 26: 2093-2100.
24. Higuchi T, Shih FML, Kimura T, Rytting JH. (1979) Solubility Determination of Barely Aqueous-Soluble Organic-Solids. *J Pharm Sci*, 68: 1267-1272.
25. Avdeef A. (2007) Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 568-590.
26. Stuart M, Box K. (2005) Chasing equilibrium: Measuring the intrinsic solubility of weak acids and bases. *Anal Chem*, 77: 983-990.
27. Stegemann S, Leveiller F, Franchi D, de Jong H, Linden H. (2007) When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. *Eur J Pharm Sci*, 31: 249-261.
28. Avdeef A. (2001) Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem*, 1: 277-351.
29. Völgyi G, Baka E, Box KJ, Comer JEA, Takács-Novák K. (2010) Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch relationship. *Anal Chim Acta*, 673: 40-46.
30. Galia E, Nicolaidis E, Horter D, Lobenberg R, Reppas C, Dressman JB. (1998) Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res*, 15: 698-705.
31. Levis KA, Lane ME, Corrigan OI. (2003) Effect of buffer media composition on the solubility and effective permeability coefficient of ibuprofen. *Int Pharm*, 253: 49-59.

32. Szabó K. Többkomponensű rendszerek. In: Szabo K (szerk.), Fizikai kémia. Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Budapest, 1995: 77-113.
33. Van den Mooter G. (2012) The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. *Drug Discov Today Technol*, 9: e71-e174.
34. Pudipeddi M, Serajuddin ATM. (2005) Trends in solubility of polymorphs. *J Pharm Sci*, 94: 929-939.
35. Threlfall TL. (1995) Analysis of Organic Polymorphs - a Review. *Analyst*, 120: 2435-2460.
36. Eslami F, Elliott JAW. (2014) Role of Precipitating Solute Curvature on Microdrops and Nanodrops during Concentrating Processes: The Nonideal Ostwald-Freundlich Equation. *J Phys Chem B*, 118: 14675-14686.
37. Wais U, Jackson A, W., He T, Zhang H. (2016) Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles. *Nanoscale*, 8: 1746-1769.
38. Leleux J, Williams RO. (2014) Recent advancements in mechanical reduction methods: particulate systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 40: 289-300.
39. Turner A. (2003) Salting out of chemicals in estuaries: implications for contaminant partitioning and modelling. *Sci Total Env*, 314: 599-612.
40. Bogunia M, Makowski M. (2020) Influence of Ionic Strength on Hydrophobic Interactions in Water: Dependence on Solute Size and Shape. *J Phys Chem B*, 124: 10326-10336.
41. Savjani K, Gajjar A, Savjani J. (2012) Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*, 2012: 195727.
42. Godse SZ, Patil MS, Kothavade SM, Saudagar RB. (2013) Techniques for solubility enhancement of Hydrophobic drugs: A Review. *J Adv Pharm Educ Res*, 3: 403-414.
43. Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim J, Kim H, Cho J, Yun G, Lee J. (2014) Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian J Pharm Sci*, 9: 304-316.
44. Loh ZH, Samanta AK, Heng PWS. (2015) Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian J Pharm Sci*, 10: 255-274.
45. Keck CM, Muller RH. (2006) Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm*, 62: 3-16.
46. Chan HK, Kwok PCL. (2011) Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 406-416.
47. Antunes ABD, De Geest BG, Vervaet C, Remon JP. (2013) Solvent-free drug crystal engineering for drug nano- and micro suspensions. *Eur J Pharm Sci*, 48: 121-129.
48. Ainurofiq A, Putro DS, Ramadhani DA, Putra GM, Santo LDD. (2021) A review on solubility enhancement methods for poorly water-soluble drugs. *J Rep Pharm Sci*, 10: 137-147.
49. Jakubowska E, Lulek J. (2021) The application of freeze-drying as a production method of drug nanocrystals and solid dispersions-A review. *J Drug Deliv Sci Tech*, 62: 102357
50. Saifee M, Inamdar N, Dhamecha D, Rathi A. (2009) Drug Polymorphism: A Review. *International Journal of Health Research*, 2: 291-306.

51. Censi R, Di Martino P. (2015) Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. *Molecules*, 20: 18759-18776.
52. Bauer J, Spanton S, Henry R, Quick J, Dziki W, Porter W, Morris J. (2001) Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism. *Pharm Res*, 18: 859-866.
53. Fevotte G. (2007) In situ raman spectroscopy for in-line control of pharmaceutical crystallization and solids elaboration processes: A review. *Chem Eng Res Des*, 85: 906-920.
54. Kim DH, Kim YW, Tin YY, Soe MTP, Ko BH, Park SJ, Lee JW. (2021) Recent Technologies for Amorphization of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics*, 13: 1318
55. Doreth M, Hussein MA, Priemel PA, Grohganz H, Holm R, de Diego HL, Rades T, Lobmann K. (2017) Amorphization within the tablet: Using microwave irradiation to form a glass solution in situ. *Int J Pharm*, 519: 343-351.
56. Hempel NJ, Merkl P, Asad S, Knopp MM, Berthelsen R, Bergström CAS, Teleki A, Sotiriou GA, Lobmann K. (2021) Utilizing Laser Activation of Photothermal Plasmonic Nanoparticles to Induce On-Demand Drug Amorphization inside a Tablet. *Mol Pharm*, 18: 2254-2262.
57. Batisai E. (2021) Solubility Enhancement of Antidiabetic Drugs Using a Co-Crystallization Approach. *Chemistryopen*, 10: 1260-1268.
58. Dhobale AV, Dhembre GN, Shaikh KU, Shaikh IA, Bavage NB, Kulkarni AS. (2018) Solubility Enhancement Techniques - a Review. *Indo Am J Pharm Sci*, 5: 2798-2810.
59. Sareen S, Mathew G, Joseph L. (2012) Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. *Int J Pharm Investig*, 2: 12-17.
60. Leuner C, Dressman J. (2000) Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 47-60.
61. Shah S, Maddineni S, Lu JN, Repka MA. (2013) Melt extrusion with poorly soluble drugs. *Int J Pharm*, 453: 233-252.
62. Cherukuvada S, Nangia A. (2014) Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chem Comm*, 50: 906-923.
63. Bazzo GC, Pezzini BR, Stulzer HK. (2020) Eutectic mixtures as an approach to enhance solubility, dissolution rate and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm*, 588: 119741
64. Sanghvi R, Evans D, Yalkowsky SH. (2007) Stacking complexation by nicotinamide: A useful way of enhancing drug solubility. *Int J Pharm*, 336: 35-41.
65. Jagtap S, Magdum C, Jadge D, Jagtap R. (2018) Solubility Enhancement Technique: A Review. *J Pharm Sci Res*, 10: 2205-2211.
66. Patil JS, Kadam DV, Marapur SC, Kamalapur MV. (2010) Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: a review. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2: 29-34.
67. Kiss E, Szabó VA, Horváth P. (2019) Simple circular dichroism method for selection of the optimal cyclodextrin for drug complexation. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 95: 223-233.
68. Rawat S, Jain SK. (2004) Solubility enhancement of celecoxib using beta-cyclodextrin inclusion complexes. *Eur J Pharm Biopharm*, 57: 263-267.

69. Wang D, Li H, Gu J, Guo T, Yang S, Guo Z, Zhang X, Zhu W, Zhang J. (2013) Ternary system of dihydroartemisinin with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and lecithin: simultaneous enhancement of drug solubility and stability in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal*, 83: 141-148.
70. Taupitz T, Dressman JB, Buchanan CM, Klein S. (2013) Cyclodextrin-water soluble polymer ternary complexes enhance the solubility and dissolution behaviour of poorly soluble drugs. Case example: itraconazole. *Eur J Pharm Biopharm*, 83: 378-387.
71. Muller CE. (2009) Prodrug Approaches for Enhancing the Bioavailability of Drugs with Low Solubility. *Chem Biodivers*, 6: 2071-2083.
72. Sanches BMA, Ferreira EI. (2019) Is prodrug design an approach to increase water solubility? *Int J Pharm*, 568: 118498
73. Stella VJ, Nti-Addae KW. (2007) Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 677-694.
74. Serajuddin ATM. (2007) Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 603-616.
75. Stahl PH, Wermuth CG. Selected Procedures for the Preparation of Pharmaceutically Acceptable Salts. In: Stahl PH, Wermuth CG (szerk.), *Handbook of Pharmaceutical Salts : Properties, Selection, and Use*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 2008: 250-264.
76. Skorepova E, Bim D, Husak M, Klimes J, Chatziadi A, Ridvan L, Boleslayska T, Beranek J, Sebek P, Rulisek L. (2017) Increase in Solubility of Poorly-Ionizable Pharmaceuticals by Salt Formation: A Case of Agomelatine Sulfonates. *Cryst Growth Des*, 17: 5283-5294.
77. Balakrishnan A, Rege BD, Amidon GL, Polli JE. (2004) Surfactant-mediated dissolution: Contributions of solubility enhancement and relatively low micelle diffusivity. *J Pharm Sci*, 93: 2064-2075.
78. Seedher N, Agarwal P. (2009) Various Solvent Systems for Solubility Enhancement of Enrofloxacin. *Indian J Pharm Sci*, 71: 82-87.
79. Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, Porter CJH. (2013) Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol Rev*, 65: 315-499.
80. Kim JY, Kim S, Papp M, Park K, Pinal R. (2010) Hydrotropic solubilization of poorly water-soluble drugs. *J Pharm Sci*, 99: 3953-3965.
81. Choudhary A, Nayal S. (2019) A review: Hydrotropy a solubility enhancing technique. *Pharm Innov J*, 8: 1149-1153.
82. Fu Q, Kou LF, Gong C, Li M, Sun J, Zhang D, Liu MN, Sui XF, Liu K, Wang SL, He ZG. (2012) Relationship between dissolution and bioavailability for nimodipine colloidal dispersions: The critical size in improving bioavailability. *Int J Pharm*, 427: 358-364.
83. Chen XQ, Venkatesh S. (2004) Miniature device for aqueous and non-aqueous solubility measurements during drug discovery. *Pharm Res*, 21: 1758-1761.
84. Pangarkar P, Tayade A, Uttarwar S, Wanare R. (2013) Drug polymorphism: An overview. *Int J Pharm Tech*, 5: 2374-2402.
85. Burger A, Ratz A, Brox W. (1986) Die polymorphen Arzneistoffe des Europäischen Arzneibuches, 3. Mitteilung. [1]: oxytetracyclinhydrochlorid. *Pharm Acta Helv* 67: 98-106.



86. Pataki H, Markovits I, Vajna B, Nagy ZK, Marosi G. (2012) In-Line Monitoring of Carvedilol Crystallization Using Raman Spectroscopy. *Cryst Growth Des*, 12: 5621-5628.
87. Pataki H, Csontos I, Nagy ZK, Vajna B, Molnár M, Katona L, Marosi G. (2013) Implementation of Raman Signal Feedback to Perform Controlled Crystallization of Carvedilol. *Org Process Res Dev*, 17: 493-499.
88. <https://patents.google.com/patent/US6924393B2/en>.
89. Simon LL, Pataki H, Marosi G, Meemken F, Hungerbuhler K, Baiker A, Tummala S, Glennon B, Kuentz M, Steele G, Kramer HJM, Rydzak JW, Chen ZP, Morris J, Kjell F, Singh R, Gani R, Gernaey KV, Louhi-Kultanen M, O'Reilly J, Sandler N, Antikainen O, Yliruusi J, Frohberg P, Ulrich J, Braatz RD, Leyssens T, von Stosch M, Oliveira R, Tan RBH, Wu HQ, Khan M, O'Grady D, Pandey A, Westra R, Delle-Case E, Pape D, Angelosante D, Maret Y, Steiger O, Lenner M, Abbou-Oucherif K, Nagy ZK, Litster JD, Kamaraju VK, Chiu MS. (2015) Assessment of Recent Process Analytical Technology (PAT) Trends: A Multiauthor Review. *Org Process Res Dev*, 19: 3-62.
90. Clarysse S, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Augustijns P. (2011) Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids. *Eur J Pharm Sci*, 43: 260-269.
91. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. (2008) Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Pharm Res*, 25: 1663-1676.
92. Kurakula M, Rao GSNK. (2020) Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. *J Drug Deliv Sci Tech*, 60: 102046
93. Avdeef A. Solubility. In: Avdeef A (szerk.), *Adsorption and Drug Development*, second ed. Wiley-Interscience, New York, 2012: 251-318.
94. Takács-Novák K, Urac M, Horváth P, Völgyi G, Anderson BD, Avdeef A. (2017) Equilibrium solubility measurement of compounds with low dissolution rate by Higuchi's Facilitated Dissolution Method. A validation study. *Eur J Pharm Sci*, 106: 133-141.
95. Sallmann AR. (1985) The History of Diclofenac. *Semin Arthritis Rheum*, 15: 57-60.
96. Avdeef A. Octanol-Water Partitioning. In: Avdeef A (szerk.), *Absorption and Drug Development*, second ed. Wiley-Interscience, New York, 2012: 175-209.
97. Sun N, Avdeef A. (2011) Biorelevant pK(a) (37 degrees C) predicted from the 2D structure of the molecule and its pK(a) at 25 degrees C. *J Pharm Biomed Anal*, 56: 173-182.
98. Avdeef A. pK<sub>a</sub> determination. In: Avdeef A (szerk.), *Absorption and Drug Development*, second ed. Wiley-Interscience, New York, 2012: 32-158.
99. Roy S, Bhatt PM, Nangia A, Kruger GJ. (2007) Stable polymorph of venlafaxine hydrochloride by solid-to-solid phase transition at high temperature. *Cryst Growth Des*, 7: 476-480.
100. Tam KY, Takács-Novák K. (2001) Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. *Anal Chim Acta*, 434: 157-167.

101. Toro R, de Delgado GD, Bahsas A, Delgado JM. (2007) The presence of polymorphism in oxytetracycline hydrochloride shown by X-ray powder diffraction techniques. *Z Kristallogr Suppl.* 26: 563-568.
102. Singhal D, Curatolo W. (2004) Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* 56: 335-347.
103. Borbás E, Tózsér P, Tsinman K, Tsinman O, Takács-Novák K, Völgyi G, Sinkó B, Nagy ZK. (2018) Effect of Formulation Additives on Drug Transport through Size-Exclusion Membranes. *Mol Pharm.* 15: 3308-3317.
104. Takács-Novák K, Avdeef A, Box KJ, Podányi B, Szesz G. (1994) Determination of protonation macro- and microconstants and octanol/water partition coefficient of the antiinflammatory drug niflumic acid. *J Pharm Biomed Anal.* 12: 1369-1377.
105. <https://patents.google.com/patent/WO2008093350A1/en>.
106. Hancock BC, Parks M. (2000) What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm Res.* 17: 397-404.
107. Khandavilli UBR, Gangavaram S, Goud NR, Cherukuvada S, Raghavender S, Nangia A, Manjunatha SG, Nambiar S, Pal S. (2014) High solubility crystalline hydrates of Na and K furosemide salts. *Crystengcomm.* 16: 4842-4852.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1. Disszertáció alapját képező közlemények

**Csicsák D**, Szolláth R, Kádár SZ, Ambrus R, Bartos CS, Balogh E, Antal I, Köteles I, Tózsér P, Bárdos V, Horváth P, Borbás E, Takács-Novák K, Sinkó B, Völgyi G. (2023) The Effect of the Particle Size Reduction on the Biorelevant Solubility and Dissolution of Poorly Soluble Drugs with Different Acid-Base Character. *Pharmaceutics*, 15: 278

**Csicsák D**, Borbás E, Kádár SZ, Tózsér P, Bagi P, Pataki H, Sinkó B, Takács-Novák K, Völgyi G. (2021) Towards more accurate solubility measurements with real time monitoring: a carvedilol case study. *New J Chem*, 45: 11618-11625.

Tempfli D, Borbás E, Pataki H, **Csicsák D**, Völgyi G, Sinkó B, Takács-Novák K. (2020) Revisit of solubility of oxytetracycline polymorphs. An old story in the light of new results. *Eur J Pharm Sci*, 149: 105328

Takács-Novák K, Tempfli D, **Csicsák D**, Völgyi G, Borbás E, Nagy ZSK, Sinkó B. (2019) Solubility analysis of venlafaxine hydrochloride polymorphs by shake-flask method and real time monitoring. *Acta Pharm Hung*, 89: 88-96.

Völgyi G, **Csicsák D**, Takács-Novák K. (2018) Right filter-selection for phase separation in equilibrium solubility measurement. *Eur J Pharm Sci*, 123: 98-105.

### 10.2. Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

Tózsér P, Kovács LL, Kádár SZ, **Csicsák D**, Sóti P, Völgyi G, Sinkó B, Nagy ZSK, Borbás E. (2023) The Effect of Surfactants and pH Modifying Agents on the Dissolution and Permeation of Pimobendan, *Period Polytech Chem Eng*, doi: 10.3311/PPch.20970

Kádár SZ, **Csicsák D**, Tózsér P, Farkas A, Pálla T, Mirzahosseini A, Tóth B, Tóth G, Fiser B, Horváth P, Madarász J, Avdeef A, Takács-Novák K, Sinkó B, Borbás E, Völgyi G. (2022) Understanding the pH Dependence of Supersaturation State - A Case Study of Telmisartan. *Pharmaceutics*, 14: 1635

Kádár SZ, Tózsér P, Nagy B, Farkas A, Nagy ZSK, Tsinman O, Tsinman K, **Csicsák D**, Völgyi G, Takács-Novák K, Borbás E, Sinkó B. (2022) Flux-Based Formulation Development-A Proof of Concept Study. *AAPS J*, 24: 22

Szabó ZI, Orbán GY, Borbás E, **Csicsák D**, Kádár SZ, Fiser B, Dobó M, Horváth P, Kiss E, Budai L, Dobos J, Pála T, Órfi L, Völgyi G, Tóth G. (2021) Inclusion complexation of the anticancer drug pomalidomide with cyclodextrins: fast dissolution and improved solubility. *Heliyon*, 7: e07581

Borbás E, Kádár SZ, Tsinman K, Tsinman O, **Csicsák D**, Takács-Novák K, Völgyi G, Sinkó B, Pataki H. (2019) Prediction of Bioequivalence and Food Effect Using Flux- and Solubility-Based Methods. *Mol Pharm*, 16: 4121-4130

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Völgyi Gergely egyetemi docensnek azt, hogy bátorított a Ph.D. munka megkezdésére, és azt, hogy az évek során végig támogatott, tanácsaival és tudásával biztosította munkám menetét, személyiségével pedig azt, hogy mindezen munkát jó hangulatban és szeretettel végezzem.

Köszönöm Takácsné Dr. Novák Krisztina professzorasszonynak, hogy tanácsaival irányította a kutatómunkámat, és neki köszönhetően felbecsülhetetlen tudásra és tapasztalatokra tettem szert, amit máshonnan nem biztos, hogy így meg tudtam volna szerezni.

Szeretném megköszönni Kádár Szabina okleveles gyógyszervegyészmérnök irántam tanúsított végtelen türelmét és azt, hogy megosztotta velem tudását, aminek köszönhetően más perspektívából tanultam meg elemezni a dolgokat.

Köszönettel tartozom Jaksáné dr. Borbás Enikőnek, hogy a munkám kezdetén segített beletanulni a módszerekbe, az eredmények kiértékelésébe, és azért, hogy mindig kiállt értem, ha a helyzet úgy kívánta.

Köszönet illeti a Budapesti Műszaki Egyetem összes munkatársát, akik segítettek az ott végzett mérések kivitelezésében és értékelésében.

Köszönöm dr. Schantzl Dóra gyógyszerésznek és Teitelbaum Ágnes technikusnak az oldhatósági mérések kivitelezésében nyújtott pótolhatatlan segítségüket.

Köszönöm dr. Ambrus Ritának, a Szegedi Tudományegyetem docensének a mikronizált és nanonizált minták előállítását, valamint a SEM analízis kivitelezését.

Köszönettel tartozom Bertalanné dr. Balogh Emesének a lézerdiffrakciós mérésekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm Bárdos Vivinek, hogy munkámnak csaknem a kezdetétől biztosította a jó hangulatot és a támogatást, hogy ne veszítsem el a hitemet.

Köszönettel tartozom Istvánnak, Esztinek, Tominak és a Gyógyszerészi Kémiai Intézet összes munkatársának a kezdeti barátságos fogadtatásért, és későbbiekben fennálló családias légkör megteremtéséért, ami nélkülözhetetlen volt munkám során.

Végül pedig szeretném megköszönni Családomnak, Páromnak és barátaimnak, hogy végig támogattak a disszertáció megírása alatt és az azt megelőző néha rögös úton.