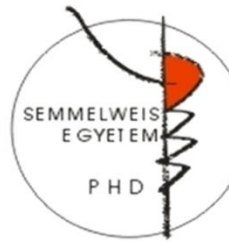


B₁₂ vitamin tartalmú, bukkális gyógyszerhordozó rendszer formulálása, mikro- és makroszerkezetének vizsgálata

Doktori értekezés

Szabó Barnabás

Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelkó Romána, egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Révész Piroska, egyetemi tanár, D.Sc.

Dr. Stampf György, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ludányi Krisztina, egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Homonnay Zoltán, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest

2012

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Irodalmi háttér	7
1.1. B ₁₂ vitamin élettana, indikációi és alkalmazásának lehetőségei	7
1.1.1. A B ₁₂ felfedezése	7
1.1.2. A B ₁₂ szerkezete és tulajdonságai	7
1.1.3. A B ₁₂ bioszintézise	8
1.1.4. A B ₁₂ élettani szerepe	9
1.1.5. A B ₁₂ hiánybetegsége, a "vészes" vérszegénység	10
1.1.6. Terápiás lehetőségek	12
1.2. Bukkális hordozórendszerek	13
1.3. Mikroszerkezeti vizsgálatok	24
1.3.1. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)	25
1.3.2. Raman spektroszkópia	25
1.3.3. Pozitron annihilációs módszerek	27
1.3.3.1. Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (PALS)	27
1.3.3.2. Doppler-szélesedés mérése (DB)	37
1.3.3.3. Gyakorlati, gyógyszerészeti alkalmazások	39
1.4. Makroszerkezeti vizsgálatok	40
2. Célkitűzések	41
3. Módszerek	42
3.1. Felhasznált hatóanyag	42
3.2. Felhasznált segédanyagok	42
3.3. Mintakészítés	44
3.3.1. Hidrogélek előállítása	44

3.3.2.	Szabadfilm előállítás öntéssel technikával.....	44
3.3.3.	Liofilizált filmek előállítása fagyasztva szárítás technikával.....	45
3.3.4.	Minták tárolása	45
3.4.	Vizsgálati módszerek	45
3.4.1.	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)	45
3.4.2.	Viszkozitás meghatározása	46
3.4.3.	Hidrogének pH-jának meghatározása.....	46
3.4.4.	Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia	47
3.4.4.1.	Kompatibilitás vizsgálat PALS módszerrel.....	47
3.4.4.2.	Gél-film átmenet vizsgálata PALS módszerrel	47
3.4.4.3.	Szabadfilmek és ostyák mérése PALS módszerrel.....	48
3.4.4.4.	Doppler-szélesedés (DB) mérése	48
3.4.5.	Mikrohullámú kezelés.....	49
3.4.6.	Raman térképezés (Raman Mapping).....	49
3.4.7.	Mikroszkópos képek készítése	49
3.4.7.1.	Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)	49
3.4.7.2.	Kisteljesítményű, digitális mikroszkópos képek készítése.....	49
3.4.8.	Mechanikai tulajdonságok vizsgálata	50
3.4.9.	In vitro kioldódás vizsgálat	51
3.4.9.1.	Kioldódás vizsgálat és mintavétel.....	51
3.4.9.2.	Kioldódott hatóanyag mennyiségének meghatározása	51
3.4.9.3.	A kioldódási görbék hatóanyagleadási modellekkel való jellemzése ...	51
3.4.10.	Ex vivo kioldódás vizsgálat	52
4.	Eredmények.....	54
4.1.	Preformulációs vizsgálatok eredményei	54
4.2.	A heterogenitás vizsgálatának eredményei	66

4.3. Az előállított gyógyszerformák vizsgálatának eredményei	75
5. Következtetések.....	94
6. Összefoglalás	96
7. Summary.....	97
8. Irodalomjegyzék.....	98
9. Saját publikációk jegyzéke.....	108
9.1. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények.....	108
9.2. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó, teljes terjedelemben megjelent kongresszusi előadások.....	108
9.3. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények	109
10. Köszönetnyilvánítás	110

Rövidítések jegyzéke

3D – 3 dimenziós, térbeli

A – terület (*area*)

AAS – atomabszorpciós spektroszkópia (*atom absorbtion spectrometry*)

AES – atomemissziós spektroszkópia (*atom emission spectrometry*)

AFM – atomi erő mikroszkópia (*atomic force microscopy*)

API – aktív komponens, hatóanyag (*active pharmaceutical ingredient*)

ATR – Gyengített teljes reflexió (*attenuated total reflectance*)

B₁₂ – B₁₂ vitamin, ciano-kobalamin (*cyanocobalamine*)

BCS – Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (*biopharmaceutics classification system*)

CP – Carbopol 71G polimer

DB – Doppler-szélesedés (*Doppler-broadening*)

DSC – differenciál pásztázó kalorimetria (*differential scanning calorimetry*)

ESR – elektronspin rezonancia (*electron spin resonance*)

e^+ – pozitron

e^- – elektron

F – erő (*force*)

FTIR – Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (*Fourier transform infrared spectroscopy*)

G – α -L-guluronsav

HIV – emberi immun-alulműködést kiváltó vírus (*human immunodeficiency virus*)

HPGe – nagy tisztaságú germánium (*high purity germanium*)

IBD – gyulladással járó bélbetegség (*inflammatory bowel disease*)

i.m. – izomba adott (intramuszkuláris)

IR – „vörösön inneni”, infravörös (*infrared*)

i.v. – vénába adott (intravénás)

k – kioldódási sebességi konstans

K&P – Korsmeyer és Peppas (kinetikai modell)

$\log P$ – a megoszlási hányados (partition coefficient) logaritmus

M – β -D-mannuronsav

MCC – mikrokristályos cellulóz (*microcrystalline cellulose*)
MCM – metil-malonil-koenzim-A mutáz enzim
MET – metionin aminosav (S-metil-homocisztein)
MPa – megapascal
MRI – képképző magmágneses rezonancia spektroszkópia (*magnetic resonance imaging*)
MRM – (*multiple reaction monitoring*)
MS – tömegspektrometria, tömegspektrométer (*mass spectrometry, mass spectrometer*)
 $M_t - t$ időpontig felszabadult hatóanyag-mennyiség
MTR – 5-metil-tetrahidrofolát-homocisztein-metiltranszferáz enzim
 M_∞ – az elméleti végtelen időpontig felszabadult hatóanyag-mennyiség
 n – a diffúzió transzport-mechanizmusát jellemző állandó
 n^0 – neutron
NIR – közeli infravörös spektroszkópia (*near infrared spectroscopy*)
NMR – magmágneses rezonancia spektroszkópia (*nuclear magnetic resonance*)
ODT – szájon szétoldó tabletta (*orally disintegrating tablet*)
o-Ps – orto-pozitronium (azonos spinű elektronból és pozitronból álló kvázi-atom)
PALS – Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (*positron annihilation lifetime spectrometry*)
PET – pozitron-emissziós tomográf (*positron emission tomography*)
p-Ps – para-pozitronium (ellentétes spinű elektronból és pozitronból álló atom)
PS – törési szilárdság (*puncture strength*)
 p^+ – proton
 R – az üregek átlagos sugara (*radius*)
RBC – vörösvértest (*red blood cell*)
RH – relatív páratartalom (*relative humidity*)
RPM – percenkénti fordulat (*revolutions per minute*)
RP-LC – fordított fázisú folyadékkromatográfia (*reverse-phase liquid chromatography*)
 R_0 – a látszólagos falvastagság
 S – eredő spin
SA – nátrium-alginát, az alginsav nátriumsója (*sodium alginate*)
SEM – Pásztaó elektron mikroszkópia (*scanning electron microscopy*)

SucCoA – szukcinil-koenzim-A

$t_{1/2}$ – felezési idő

τ_3 – o-Ps élettíde

ún. – úgy nevezett

USA – Amerikai Egyesült Államok (United States of America)

UV – ibolyántúli, ultraibolya (*ultraviolet*)

1. Irodalmi háttér

1.1. B₁₂ vitamin élettana, indikációi és alkalmazásának lehetőségei

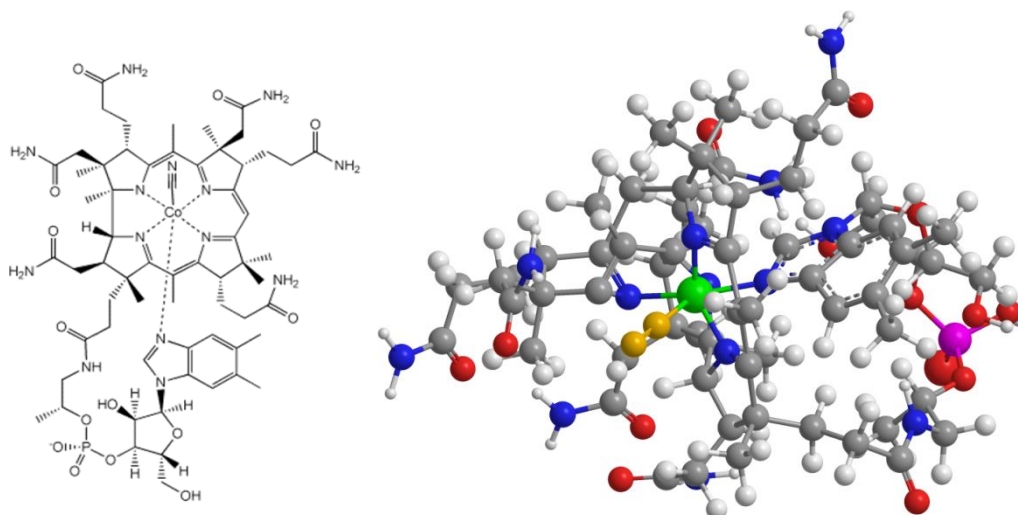
1.1.1. A B₁₂ felfedezése

A B₁₂ vitamin felfedezéséhez a vérszegénység gyógymódjának keresése vezetett. Az 1920-as években George Hoyt Whipple kutyán végzett kísérletekben bizonyította a nyers máj jótékony hatását a kóros vérszegénységben, később George Richards Minot és William Parry Murphy a nyers májból izoláltak vasat, amellyel Whipple kísérleteit reprodukálni tudták. Emberben a vas hatástalannak bizonyult, azonban 1926-ban a máj egy másik összetevőjének hatásosságát írták le, munkájukért 1934-ben megosztott orvosi Nobel-díjat kaptak. A B₁₂-vitamint csak 1948-ban izolálta Mary Shaw Shorb, Karl August Folkers és Alexander Robertus Todd, 3 dimenziós szerkezetét (1. ábra) Dorothy Hodgkin (született: Dorothy Crowfoot) igazolta kristály-röntgendiffrakciós módszerrel 1956-ban, amelyért 1964-ben (Marie Curie és Irène Joliot-Curie után harmadik nőként) kémiai Nobel-díjat kapott.

1.1.2. A B₁₂ szerkezete és tulajdonságai

A kobalaminok (így a B₁₂-vitamin is) porfirin, tehát tetrapirrol-származékok, korrinvázas vegyületek, amelyek központi szerkezeti eleme a hemhez és a klorofillhez hasonló. A porfirinek központi atomja általában (kivétel például a klorofill Mg-magja) valamilyen vegyértékváltó átmeneti- (tehát d-mezőbeli) fémion, pl. vanádium (hemovanádium), nikkell (F430 metil-koenzim M reductáz), vas (hem) vagy éppen mangán (pinnaglobin), a kobalaminok esetében pedig (ahogy nevük is mutatja) kobalt.

A porfirinhez képest a korrin-gyűrű eggyel kevesebb szénatomot (-CH₂-, metilén-csoportot) tartalmaz (1. ábra 2D-s ábrázoláson a központi atomtól balra hiányzik a metilén-csoport) ezzel megbontja a szimmetriát és a konjugált kötésű központi gyűrűt [www.chm.bris.ac.uk] láncá degradálja.



1. ábra A ciano-kobalamin szerkezete a hagyományos 2 dimenziós és 3 dimenziós ábrázolásban

(A jobb oldali (3D) képen a központi Co-atom a szokásostól eltérő világoszöld, míg a koordinációs-szférájában található cianid-ion aransárga színnel szerepel a könnyebb áttekinthetőség miatt, a többi atom színezése a hagyományos: Hidrogén-fehér, Oxigén-piros, Nitrogén-kék, Foszfor-lila.)

A B₁₂ vitamin kiváló vízoldékonyságú (10,2-10,7 mg/ml [Wang és mtsai 2007]), nagy lipofilitása (logP = 3,57 [Mylan és Howard 1995]) ellenére nagy molekulatömege (M = 1355,37 g/mol) miatt rosszul felszívódó, a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) III. osztályába tartozó hatóanyag. A kobalt korrin- komplexének, így a B₁₂-nek is mélyvörös a színe.

1.1.3. A B₁₂ bioszintézise

Kobalaminokat már az első fotoszintetizáló élőlények csoportjába tartozó *spirulina* nemzetség (ciano-baktériumok, sokáig hibásan kékmoszatok) is termeltek, amelyek a ciano-kobalammal azonos biológiai aktivitást mutattak. A baktériumok számára a levegő N₂-jének megkötéséhez szükséges a kobalt-központú vegyület, a folyamat közben az aerob (oxidációs folyamatukhoz O₂ szükséges) élővilág kialakulásához és fennmaradásához szükséges O₂-t bocsátanak ki. Anaerob baktériumokban a kobalaminok és így a B₁₂ vitamin a Cl₂ felvételben és anyagcserében

vesznek részt [Brennan és Sanford 2002]. A B₁₂ az emberi szervezet és a legtöbb állati szervezet számára esszenciális, a szükséges mennyiséghez a táplálékfelvétellel kell hozzájutnunk, de ez nem jelenti azt, hogy az emberi szervezet nem képes előállítására. A vastagbélben élő egyes baktérium-törzsek (és más baktériumok pl. a hastífuszt okozó *Salmonella typhimurium* is [Jeter és mtsai 1984]) képesek a B₁₂ bioszintézisére, azonban mivel a vitamin főként a vékonybélben, a csípőbél (*ileum*) alsó felében szívódik fel, így az előállított mennyiséget nem tudjuk hasznosítani, a széklettel kiürül szervezetünkéből.

A ciano-kobalamin az emberi szervezetben metabolizálódik és a kiindulási vegyülettel azonos biológiai szerepű metil-, adenzil-, illetve hidroxil-származékká alakul. A hidroxil-származék rendkívül nagy cianid-ion affinitással rendelkezik, ezért cianid-mérgezés esetén is alkalmazzák.

1.1.4. A B₁₂ élettani szerepe

A B₁₂ élettani feladata a metil-malonil-koenzim-A mutáz enzim (MCM) koenzimeként a propionil-, illetve metil-malonil-koenzim-A-ból szukcinil-koenzim-A-t (SucCoA) előállítani. A MCM vesz részt az elágazó láncú aminosavak, így az izoleucin, valin, treonin, metionin, a DNS-t felépítésében részt vevő timin, a koleszterin és a páros szénatomszámú zsírsavak lebontásában és a SucCoA-n keresztül a Szent-Györgyi-Krebs-ciklusba (más néven citromsav-ciklus, német nyelvterületen csak Krebs-ciklus) való kapcsolásában.

Az 5-metil-tetrahidrofolát-homocisztein-metiltranszferáz enzim (MTR) koenzimeként az 5-metil-tetrahidrofolát demetilézésével, a metionin (MET) homociszteinből kiinduló bioszintézisében is részt vesz [Berg és mtsai 2002]. A MET az emberi szervezet számára esszenciális, de létfontosságú, fehérje-alkotó aminosav (amelyet alkohol- és opiát-elvonási terápiában is alkalmaznak táplálék-kiegészítőként), amelyet hal, hús és egyes növényi magvak (pl. szezám-mag [El Tinay és mtsai 1976]) tartalmaznak nagyobb mennyiségben. A bioszintézis megléte és a MET esszenciális volta látszólag ellentmondás, amely feloldható a homocisztein eredetének vizsgálatával. A MET-bioszintézis alapját képező homociszteint a szervezet MET-ből állítja elő, így a

visszaalakítás tulajdonképpen a homocisztein egyik eliminációs módja (a másik út a transzszulfuráció, amelynek B₆-vitamin a kofaktora)[www.medlist.com].

1.1.5. A B₁₂ hiánybetegsége, a "vészes" vérszegénység

Az emberi szervezet B₁₂-vitamin igénye 0,4 (csecsemők) - 2,8 (szoptatós anyák) µg/nap [Meltzer 2003] között változik, mivel vízben jól oldódó vitamin, biológiai felezési ideje plazmában (amelyben normál koncentrációja 200-900 pg/ml) kb. 5 nap [Adams 1963], azonban az egészséges emberi máj 2 évre elegendő mennyiséget képes tárolni. A B₁₂ hiánybetegsége a "vészes" vérszegénység (*anaemia perniciosa*), amelyet a XIX. században lefolyása során drámaian, akár a normál érték tizedére csökkenő vörösvértest-számra utalva neveztek "vészes"-nek. A vérszegénység (*anaemia*) leggyakoribb oka a vöröscsontvelő-sejtek osztódásának, a vörösvértestek (*erythrocyták* vagy magyarul *eritrociták*, RBC) termelésének (*erythropoesis*) nem megfelelő működését okozó vas-, ritkább esetekben a B₁₂-, a folsav- (B₉-vitamin) vagy a B₁₂ felszívódását segítő, a gyomor-nyálkahártya fedő- (ún. *parietalis*-) sejtejében termelődő, apoeritein nevű fehérje (*intrinsic faktor*) hiánya. Szintén vérszegénységet okoz, a vörösvértestek fokozott lebontása (valamilyen gyógyszer, anyagcserezavar, szerzett vagy örökletes betegség hatására).

A B₁₂ hiányát (vérszint 100 pg/ml alatt vagy 100-400 pg/ml között magas homocisztein vagy metil-malonilsav szinttel [Snow 1999]), amelyben főként 60 éven felüliek és nők szenvednek, több tényező is okozhatja, azonban az esetek jelentős részében nem azonosítható a kiváltó ok [Carmel 2008]. A B₁₂ nem áll rendelkezésre a szükséges mennyiségben, ha az állati eredetű ételt kizáró étrend nem párosul, a szükséges vitaminok pótlásával (pl. dúsított élesztő, gabonafélék, húshelyettesítők [American Dietetic Association and Dietitians of Canada 2003] vagy táplálék kiegészítők fogyasztásával). Szintén hiánytünetet okoz, ha a vitamin nem képes felszívódni, pl. a csípőből egy részének eltávolítása miatt [Commonwealth of Massachusetts, 2007], illetve ha az intrinsic faktor-hiány alakul ki a gyomor eltávolítása vagy idült (krónikus) gyulladása esetén [Doscherholmen és Swaim 1973].

A B₁₂-hiány következtében az említett RBC-szám csökkenésen túl, magas metilmalonilsav-, illetve homocisztein-szint alakul ki, ezek következménye kimerültség,

légszomj, szédülés, sápadtság, gyors szívverés (*tachycardia*), lépnagyobbodás, sárgaság (citromsárga bőr), gyomor-, bél-, szájnyálkahártya- és nyelvgyulladás (*glossitis*), hajhullás, ritkább esetben enyhe hőemelkedés. A B₁₂-hiány kiválthat más betegségeket, amelyek közül fontos megemlíteni a hiperkróm- vagy megaloblasztos vérszegénységet (*hyperchrom anaemia*), illetve a gerincvelő szubakut kombinált degenerációját (*funicularis myelosis*). Előbbi esetében a RBC-ek nagyobbak és "túlfestődnek", bennük a hemoglobin mennyisége több a normálisnál. Utóbbi esetében neurológiai tünetek, mozgásszervi panaszok, alsó végtagi-gyengeség, -érzékletlenség, -zsibbadás, súlyos esetben bénulás, erektilis diszfunkció, vizelet- és széklettartási problémák is jelentkezhetnek.

A "vészes" vérszegénység kezelhető nagy dózisú B₁₂-vel, adagolása az ekkora mennyiség felszívódásához szükséges intrinsic faktor hiányában, jellemzően intravénás (i.v.) vagy intramuszkuláris (i.m.) injekcióval történik. Kiegészítő kezelésként folsav (a homocisztein-szint csökkentésére), vas (a RBC termelés megnövekedett vas-igényére), réz (vas felszívódásának és a vérképzés fokozására), C-vitamin bevitelét és fehérje-, illetve energiadús táplálkozást (a felszívódás és a RBC-szintézis energia igényének biztosítására) javasolnak.

A B₁₂ vitamin-hiány sok betegségnek mellékhatása, mondhatni biomarkere. Ezek közül a legismertebb talán a bélférgesség, amely a fejlődő (gazdaságilag elmaradott, nem megfelelő higiénés körülményekkel rendelkező) államokban igen gyakori. A kutatások alapján, bár alapvetően élősök jelenlétéről van szó (amely sok esetben olyan súlyos tünetekkel párosul, mint a végbélviszketés, a végbéltájéki ekcéma, a kialvatlanság okozta neurózis, vérszegénység, súlyos szövődményként vakbélgyulladás (*appendicitis*) vagy a húgyutak gyulladása), azonban jótékony hatásai is ismertek. Ezek közül a legfontosabbak: az asztma, az 1. típusú diabétesz, a sclerosis multiplex, az IBD (gyulladásos bélbetegségek), a Crohn-betegség [Summers és mtsai 2005], szénanátha és sok más, főként autoimmun jellegű betegséggel kapcsolatban kimutatható gyógyító hatásuk. Tünetei, a tápanyag-elvonás következtében történő súlycsökkentés, étvágytalanság, a nyomelemek (főként vas), illetve a vitaminok (elsősorban a B₁₂) alacsony szérumszintje, amelyeket ezért a bélférgességgel kezelés során pótolni kell.

1.1.6. Terápiás lehetőségek

A B₁₂ vitamin terápia alkalmazásában komoly változások történtek az utóbbi években. Korábban azt mondhattuk, a "vészes" vérszegénység gyógyításában, a B₁₂ vitamin súlyos hiányában az izomba adott (i.m.) injekciós formát alkalmazzák széles körben [Andrés és mtsai 2007]. Mára azonban az injekciós készítmények száma drasztikusan lecsökkent, Magyarországon csak a Richter Gedeon 1000 µg/ml-es oldatos injekciója van forgalomban, de az Amerikai Egyesült Államokban (USA) is csak 1, receptre kapható, kizárólag B₁₂ hatóanyagú, formula maradt a gyógyszerpiacon (1 mg/ml Vibisone™ (App Pharm)). Korábban olyan nagy gyógyszergyárak rendelkeztek FDA engedéllyel B₁₂-injekció gyártáshoz és forgalmazáshoz, mint a Lilly (0,1 és 1 mg/ml, Betalin™), a Roche (Berocca PN™), a Watson Labs (0,1 és 1 mg/ml, Cobavite™), a Bayer (1 mg/ml, VI-TWEL™) vagy épp a Merck (1 mg/ml, Redisol™). Ezek a készítmények mind kikerültek a forgalomból, a Vibisone-on kívül csak olyan több hatóanyagú vitamininjekciók kaphatók B₁₂-tartalommal, mint a Sandoz Infuvite™ termékcsaládja vagy a Hospira M.V.I.™ termékei. A nem-parenterális gyógyszerek sincsenek nagy számban a piacon, Magyarországon a Feroglobin-B12™ (Vitabiotics) kemény kapszula, amely vérképzés elősegítéséhez alkalmazott komplex készítmény vérképzéshez B₆-, B₉-vitaminnal, vassal, cinkkel és rézzel, a Milgamma draszté (Wörwag Pharma) B₁-származékkal, az USA-ban pedig Nascobal® nazális spray. A jelenség oka néhány klinikai tanulmány, amelyek tanulsága szerint az orális (*per os*) forma lehet (nagyobb hatóanyag-tartalommal) ugyanolyan hatékony, mint i.m. adagolással [Butler és mtsai 2006], valamint a szublingvális formulák is felveszik a versenyt a *per os* adagolással [Sharabi és mtsai 2003, Yazaki és mtsai 2006].

Ezek a vizsgálatok elősegítették a kisebb költséggel előállítható intraorális formákat, amelyek recept nélkül kapható étrend-kiegészítőként kerültek forgalomba. A termékpaletta bemutatására néhány (50-nél több gyártó, több mint 150 készítménye közül), az Egyesült Államokban kapható termék és hatóanyagtartalma látható a 1. táblázatban. Ahogy a felsorolásból látható, a sokféle forma változatos hatóanyag-tartalommal rendelkezik, 5 (amely a napi szükséglet kétszerese) és 10000 µg / adag között. A 2500-10000 µg-os B₁₂-mennyiségű formulák komoly vetélytársaivá váltak az 1000 µg-os injekciónak, ráadásul szedésük nem invazív, fájdalommentes, valamint a

receptköteles szereknél olcsóbbak is. Bár a hatóanyagoknak nincs rossz íze, a fogyasztók megszerzésére a termékek általában valamelyik, B₁₂-höz hasonlóan piros színű gyümölcs aromájával készülnek, amelyet sokuk neve is tükröz.

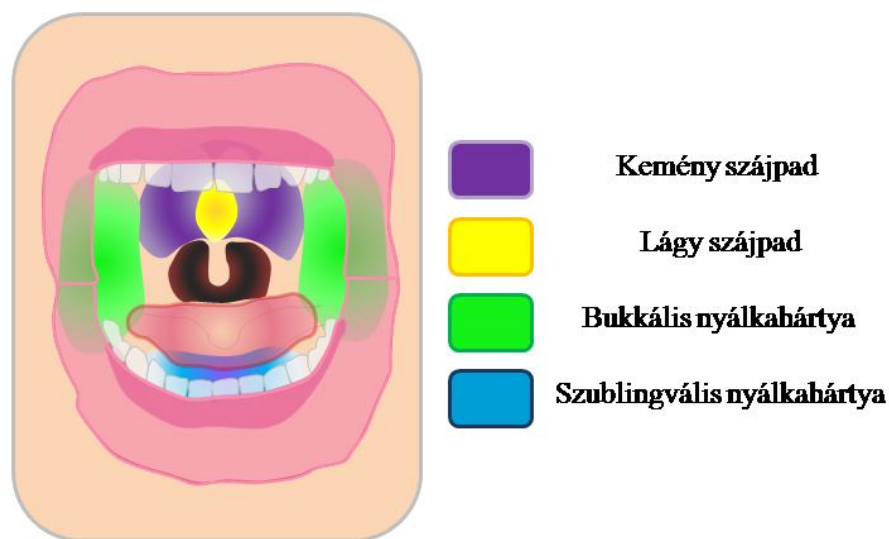
1. táblázat Néhány kereskedelmi forgalomban lévő, B₁₂-tartalmú étrend kiegészítő

Gyógyszerforma	Gyártó	Termék	Hatóanyag-tartalom / adag
oldat	TRC Nutritional Lab [®]	Oxy-Gen Liquid Antioxidant	6 µg (+1mg CoQ10)
oldat	Wellesse [®]	Liquid B-12 Natural Berry	1000 µg
oldat	1st Step [™]	For Energy Liquid B12 Tropical Blast	1000 µg
oldat	Vitacost [®]	Vitamin B-12 Methylcobalamin Raspberry	1000 µg
gél	Vitamin B-12	Nature Made	3000 µg
szubl. spray	Kal [®]	Vitamin B-12 Spray Natural Grape	2500 µg
orális lapka	Sheet Brand	Sheet [®] Energy	6 µg (+50 mg koffein)
szubl. tableta	FoodScience of Vermont [®]	Sublingual B12 Cherry	1000 µg (+ folsav)
szubl. tableta	Source Naturals [®]	B ₁₂	2000 µg
szubl. tableta	Superior Source [®]	No Shot Extra Strength B12, B6 and Folic Acid	10000 µg
orális tableta	Schiff [®]	Natural Vitamin B-12	250 µg
orális tableta	Vitacost [®]	Vitamin B12 Delayed Release	1000 µg
orális tableta	Vitacost [®]	Vitamin B-12 Cherry	500 és 1000 µg
orális tableta	TwinLab [®]	Mega B-12 Dots [™]	5000 µg
orális tableta	Country Life [®]	Vitamin B-12 Time Release	1000 µg
kapszula	Solgar [®]	Vitamin B12	500 µg
zselatin kapszula	Nature Made [®]	Vitamin B-12	3000 µg
lozenge*	Jarrow Formulas [®]	Methyl B-12	1000 és 5000 µg
lozenge*	Solaray [®]	Vitamin B-12	5000 µg

* A lozenge formák eredetileg olvasztásos, öntéses eljárással készült lassan oldódó, lokális hatású torokcukorkák voltak, melyek formájukról (lozenge= rombusz) kapták a nevüket. A modern formák már más alakúak is lehetnek, előállítási módjuk is változhat, a közös tulajdonságuk a szájban történő nyújtott hatóanyagleadás.

1.2. Bukkális hordozórendszerek

A szájüreg (*cavum oris*) a táplálkozás kezdeti lépésében játszik meghatározó szerepet. A táplálékot a fogak aprítják, majd a nyálmirigyek által termelt, enyhén lúgos folyadékkal falatot alkotva lenyelhetővé válik és folytatja útját a gasztrointesztinális rendszerben (GIT). A nyál (*saliva*) nem csak a falat-alkotásban, a nyálkahártyák nedvesen tartásában vesz részt, hanem baktericid hatása révén védi a szervezetet a kórokozóktól, a táplálékból feloldódott fluorid-tartalma pedig (a természetes kalcium- és foszfát-tartalommal) a fogak épségének megőrzésében is fontos szerepet játszik. A nyál emésztő- (főként szénhidrátbontó-) enzimeket tartalmaz, amelyek már a szájüregben megkezdik a táplálék egyes komponenseinek lebontását [Dévay és Antal 2009]. A szájüreg tápanyag-fellevő funkcióval is rendelkezik, nyálkahártyái erekkel sűrűn beszőttek, membránjai aktív transzport-mechanizmusokkal eresztik át pl. a glükóz molekuláit, a jellemző felszívódási mechanizmus mégis a passzív diffúzió. Az 2. ábra mutatja a főbb nyálkahártyák, köztük a kétoldali bukkális nyálkahártya elhelyezkedését a szájüregben.



2. ábra A szájüreg főbb nyálkahártyái

A bukkális nyálkahártya a szájüreg két oldalán, szimmetrikusan helyezkedik el, felszíne kb. 100-200 cm² [Smart 1993]. E felszívódási terület kihasználhatóságát a nyálkahártya állapota döntően befolyásolja. Sérülés esetén a membránon való átjutás, amennyiben még beszélhetünk membránról, felgyorsul, azonban ez, a gyógyszerelés szempontjából kedvező, hatása jelentősen csökkenti a szervezet védekezőképességét,

hiszen a nyílt seben keresztül a különböző mikroorganizmusok is a keringési rendszerbe juthatnak. Elegendő nedvesség hiányában, a felszívódás akár teljesen meg is szűnhet. Ez különösen nagy problémát jelent a termelődés akut alulműködése (szájszárazság - *xerostómia*) esetében, amelyet különböző gyógyszerek (mintegy 400-féle, köztük vérnyomáscsökkentők, antidepresszánsok) vagy betegségek (HIV; cukorbetegség; Sjörgeen-szindróma, amely egy viszonylag gyakori, könny- és nyálmirigyeket érintő autoimmun betegség) idézhetnek elő. A nyál túltermelődése (nyálfolyás - *ptyalismus*) szintén csökkenti a bevitel hatékonyságát, mivel leöblíti a terápiás rendszert és vele a hatóanyagot a gyomorba és a GIT további szakaszaiba, ahonnan sok hatóanyag nem megfelelően szívódik fel vagy a gyomorsav, illetve más enzimek bontják. A megnövekedett szekréciót gyógyszerek (pl. a zöldhályog kezelésében alkalmazott pilokarpin), betegségek (pl. a mandula-gyulladás, a tetanusz-fertőzés vagy a Tourette-szindróma), illetve különböző mérgezések (pl. gomba- vagy higanymérgezés) okozhatják.

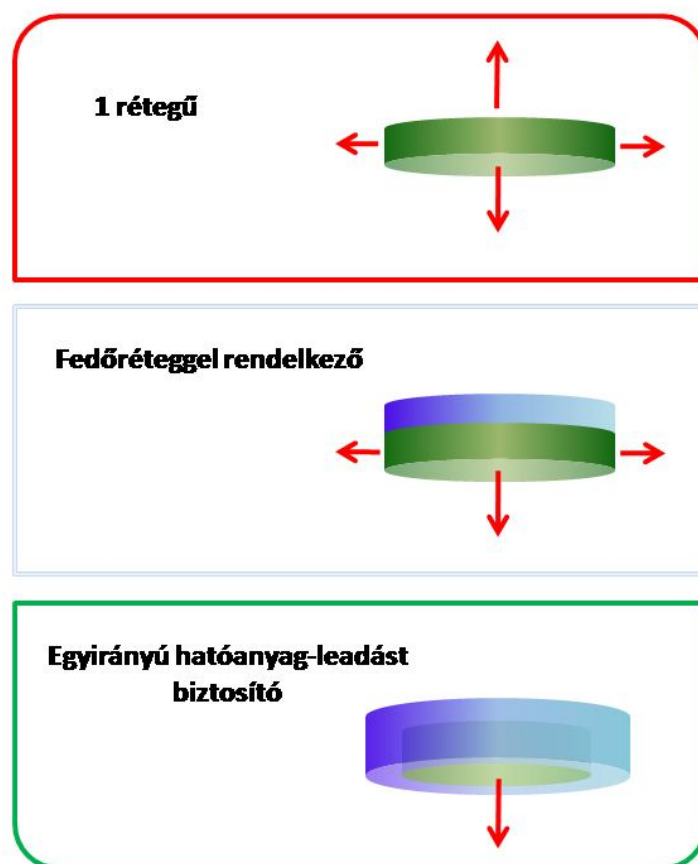
Az anatómiai bevezetés után, bukkális beviteli forma általános jellemzőit, a bukkális hatóanyag-leadó rendszerek szerkezeti csoportosítását, az ezeket felépítő segédanyagokat, hatóanyagokat, valamint a jelenleg kutatási fázisban, illetve már forgalomban lévő formulációkat mutatom be.

A bukkális gyógyszerbevitel előnye (a per os adagoláshoz képest) a gyorsabb hatást eredményező gyorsabb felszívódás és az ún. first pass metabolizmus elkerülése. A máj lebontó enzimein kívül a bukkális nyálkahártyán keresztül felszívódó hatóanyag a GIT rendszer metabolizáló tereit (a gyomorsavat, a gyomor enzimeit, az epét, a bélben található enzimeket) is elkerüli, így nagyobb arányban kerül aktív formában a hatáskifejtés helyére. A szájüregből felszívódó hatóanyag dózisa a fenti ok miatt kisebb lehet, mint per os adagolásnál (pl. a dopaminreceptor-blokkoló proklórperazin bukkális tablettája (BuccastemTM) 3 mg, míg a normál per os tablettá 5 mg hatóanyagot tartalmaz [Bond 1998]), illetve azonos dózisban hatékonyabb, mint a hagyományos beviteli formában (lidokain és az artikain bukkális formában [Aggarwal és mtsai 2009]). Ez a beviteli forma kísérletek alapján mind az alkalmazott hatóanyagok dózisában, mind felszívódási sebességében, a bukkális rendszerek több előnyével szintén rendelkező intranazális úton történő bevittel rokon [Schols-Hendriks és mtsai 1995].

A bukkális hordozórendszerek hátránya ugyanakkor a bevihető kis anyagmennyiség, a rövid és kis felületű felszívódási ablak, illetve, hogy csak olyan hatóanyag alkalmazható esetükben, amely passzív diffúzióval képes átjutni a membránon. További hátrány lehet, hogy a szájüregben viszonylag kicsi a folyadék térfogata (0,6-0,96 ml; 0,82-1,19 ml nők, illetve férfiak esetében [Lagerlof és Dawes 1984]), amelyben nagy koncentráció érhető el, így lokális mellékhatások léphetnek fel (pl. a hidrokortizon helyi fertőzést, a tesztoszteron íny-érzékenységet, -irritációt, keserű szájízt, a proklórperazin pedig szájszárazságot okozhat).

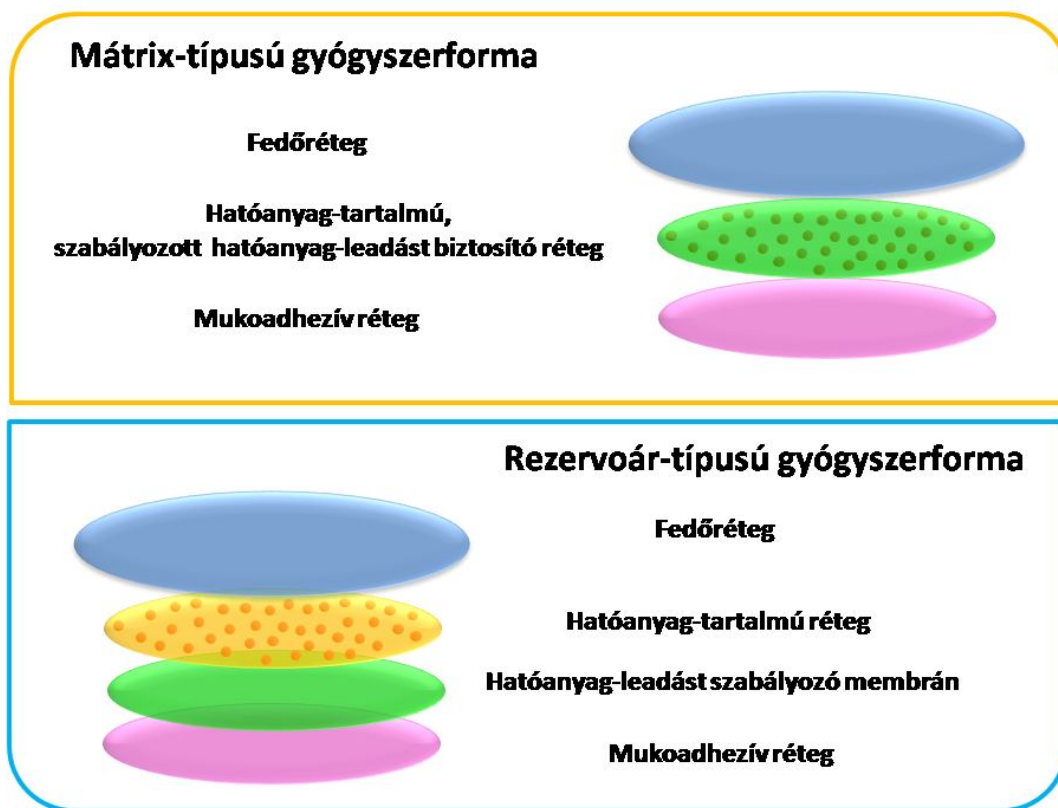
A gyógyszerformáknak számos követelménynek kell eleget tenniük, a hatékony bevétel érdekében a nyálkahártyához kell tapadniuk (mukoadhezivitás), a felszívódáshoz szükséges időt a szájüregben kell tölteniük és ez idő alatt minimalizálniuk kell a hatóanyag-vesztést (pl. lassan oldódó vagy inert fedőréteg alkalmazásával).

A bukkális gyógyszerformák alapvető szerkezetük alapján 3 osztályba sorolhatók [Verma és mtsai 2011], lehetnek 1 rétegűek (1. osztály), fedőréteggel rendelkezők (2. osztály), illetve egyirányú hatóanyag-leadást biztosító formák (3. osztály). A 3 osztály szerkezetét mutatja be a 3. ábra. Fontos szempont, hogy ez az osztályozás nem különbözteti meg a különböző gyógyszerformákat (tabletta, film, gél, oldat).



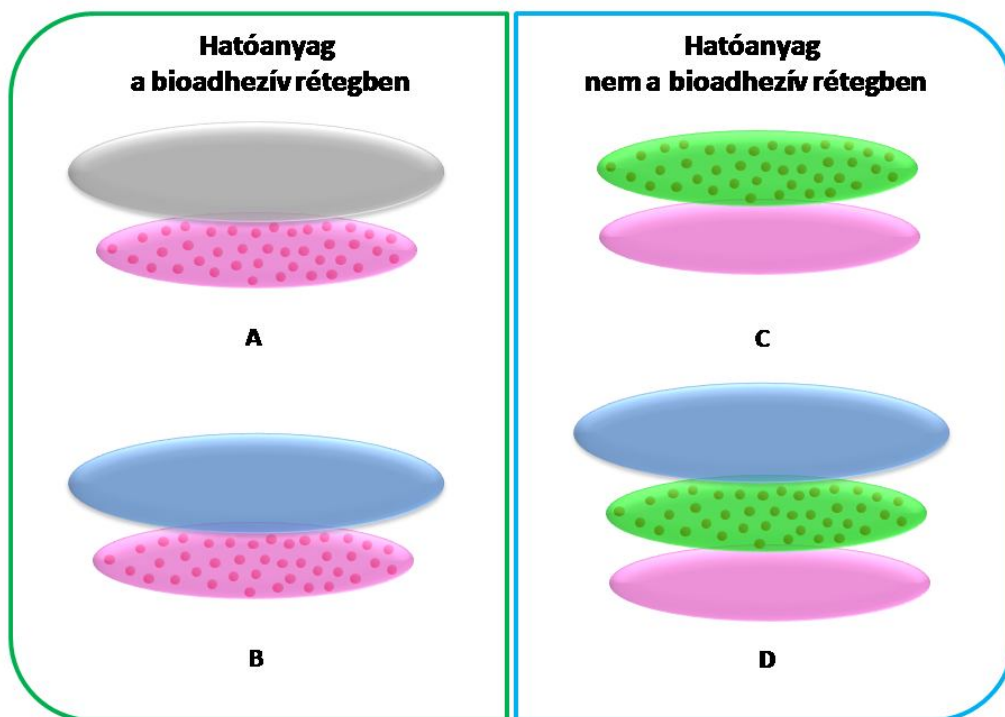
3. ábra A bukkális gyógyszerformák szerkezeti osztályai

További osztályozási lehetőséget biztosít a szilárd gyógyszerformák mátrix-, illetve rezervoár-típusra bontása. A mátrix-típusú gyógyszerformák esetében a hatóanyag szabályozott leadásáról a réteg gondoskodik, amely az aktív komponenst (API) tartalmazza, míg a rezervoár-típusba sorolandó formulák egy (vagy több) szabályozó membránt tartalmaznak a hatóanyag-tartalmú rétegen kívül (4. ábra).



4. ábra A mátrix- és a rezervoár-típusú gyógyszerformák általános szerkezete

Mindkét típust további, kisebb csoportokba oszthatjuk a hatóanyag-leadó rendszerek az aktív komponenst tartalmazó réteg, a fedőréteg és a nyálkahártyához való tapadást biztosító réteg elhelyezkedése szerint. E csoportosítás csak a 2. és a 3. osztályra értelmezhető, az 5. ábrán a fedőréteggel rendelkező, mátrix-gyógyszerformák csoportjait mutatom be. A rezervoár-típusú és a 3. osztályba tartozó formák hasonló módon bonthatók csoportokra.



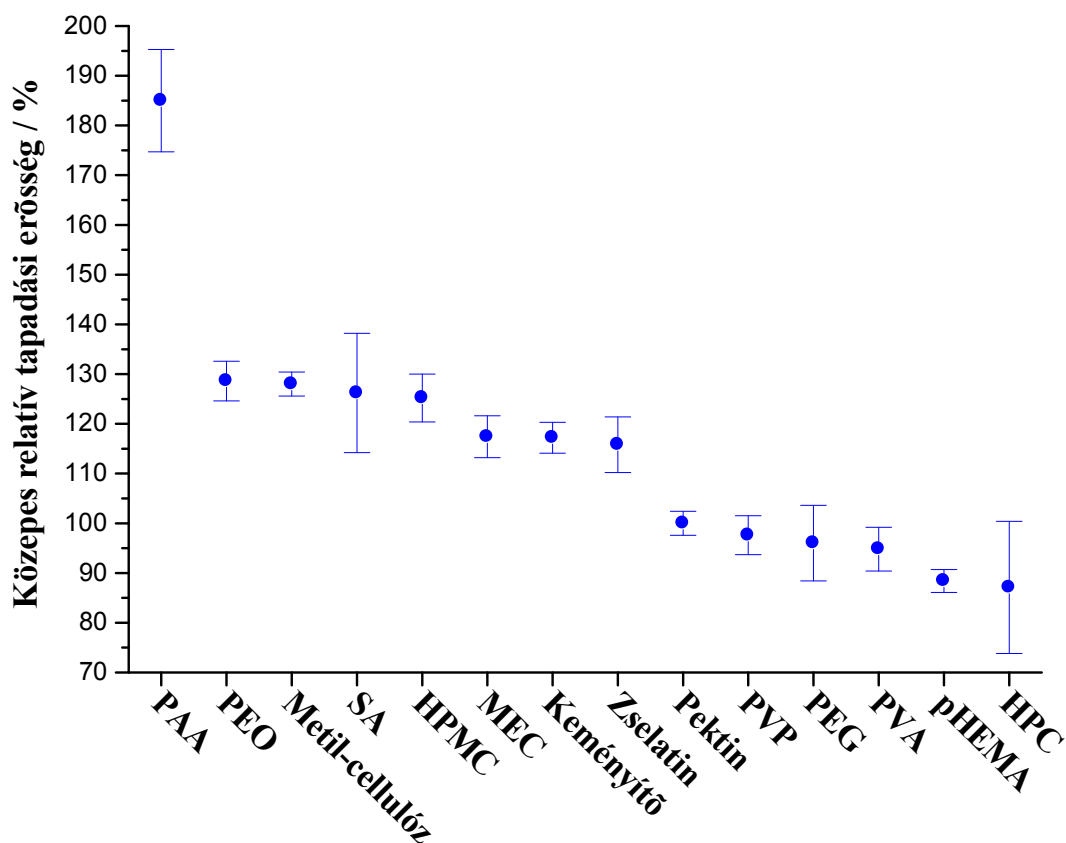
5. ábra A fedőréteggel ellátott, mátrix-gyógyszerformák további szerkezeti csoportosítása

(A - inert segédanyaggal, B - vízzáró réteggel védett mukoadhezív mátrixú, C - fedőréteg nélküli, D - fedőréteggel rendelkező, nem mukoadhezív mátrixú tabletta)

A leggyakrabban alkalmazott bukkális gyógyszerformák a filmek, tapaszok, tabletták (minitabletták), pelletek, mikroszemcsék és kapszulák, valamint a gélek és az oldatok (cseppentővel vagy szórófejjel). Fontos a bukkális gyógyszerformákat fogalmilag elkülönítenünk az intraorális gyógyszerformáktól, utóbbiaknak természetesen a bukkális formák részhalmozát képezik, de sok olyan formuláció intraorális, amelynek a felszívódási helye nem a bukkális szájnyálkahártya, csak a formula szétesésének/oldódásának helye a szájüreg (szájban széteső tabletták ún. ODT-k, vagy gyorsan oldódó filmek/lapkák [Kállai és mtsai 2012]).

A gyógyszerformák közös tulajdonsága, a fenti osztályozásból, csoportosításból következő anyagi összetétel, tehát minden formának tartalmaznia kell egy mátrixot, amelyben diszpergáljuk (az esetenként bevont, membránnal ellátott) hatóanyagot, legalább egy szabályozó réteget és egy mukoadhezív réteget. Sok esetben, pl. a nem-

szilárd bukkális formuláknál ezt a 3 funkciót egy fázis látja el. A szabályozó réteg általában valamilyen porózus, esetenként nedvesség hatására duzzadó, de mindenképpen erodálódó réteg, amely általában összetett polimer-rendszer (valamilyen segédanyaggal, pl. lágyítókkal formulálva). A mukoadhezivitás biztosítása és ezzel a gyógyszerforma lokalizálása a szájüregben, a tartózkodási idő növelésére is egy megoldandó technológiai probléma. A nyálkahártyához tapadás kémiai feltételeit a következőképpen foglalhatjuk össze: szükséges megfelelő felületi feszültség, sok hidrofil (-OH, -COOH) funkciós csoport, anionos töltés, flexibilitás illetve lehetőség szerint nagy molekulatömeg [Peppas és Buri 1985; Roy és Prabhakar 2010]. A legfontosabb mukoadhezív polimereket és a pektinhez viszonyított, közepes kötődési erősségüket a 6. ábra mutatja.



6. ábra Mukoadhezív polimerek és kötődési erősségük [Hunt és mtsai 1987]

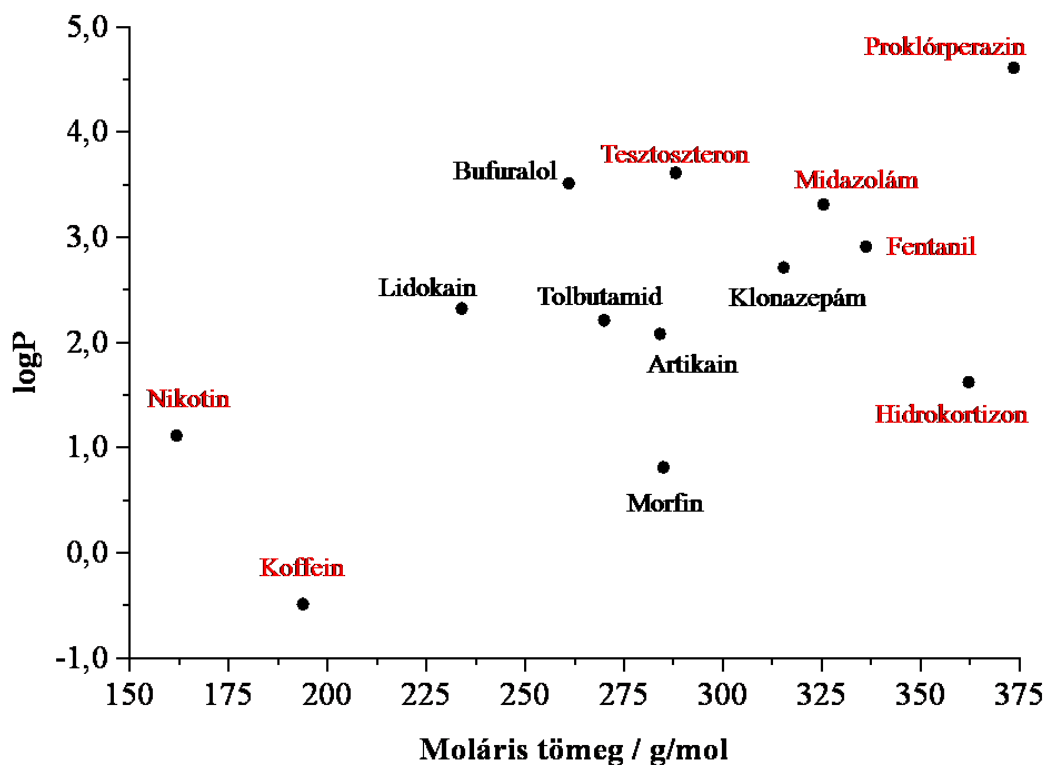
(rövidítések: PAA- poliakrilsav, PEO- poli-etilénoxid, SA- nátrium alginát, HPMC- hidroxipropil-metilcellulóz, MEC- metil-etilcellulóz, PVP- poli-vinilpirrolidon, PEG- poli-etilén-glikol, PVA- poli-vinilalkohol, pHEMA- poli-hidroximetil-akrilsav, HPC- hidroxipropil-cellulóz)

A mukoadhezivitás és amennyiben nem valamilyen nyálkahártyához tapad a formuláció, a bioadhezivitás (pl. transzdermális tapaszok esetében) mérésére sok módszer található az irodalomban [Mathiowitz és mtsai 1999, Latheeshjhal és mtsai 2011], de az általánosan alkalmazott módszer valamilyen *ex vivo* membránhoz, nyálkahártyákhoz, szövethez való tapadási erő mérése. A mérés alapvető lépései szinte minden ilyen módszernél azonosak, az *ex vivo* szövetet és a gyógyszerformát is rögzítjük (pl. egy állomány-elemző (*texture analyser*) készülék mintatartójához, illetve mozgó részéhez), majd a mintát meghatározott folyadék pontos mennyiségével nedvesítjük adott ideig, létrehozuk a kapcsolatot a minta és a membrán között (fontos a "ragasztás" ereje és időtartama is), majd mérjük a szétválasztáshoz szükséges erőt [Verma és mtsai 2011]. A mukoadhezivitás meghatározásával jellemezhető a bukkális formuláció jósága, persze a hatékonyság nem csak a tapadási tulajdonságok javításával, hanem különböző segédanyagok hozzáadásával, lágyítókkal és penetráció-fokozókkal [Senel és Hincal 2001] is növelhető.

A bukkális formulációk hatóanyagának a következő elvárások elvárásoknak kell megfelelniük: kis moláris tömeg ($M < 500$ g/mol), jó a lipidoldékonyság, stabil a szájüreg fiziológiás pH-ján, szagtalan és íztelen. A bukkális nyálkahártyán keresztül az aktív komponens főként passzív diffúzióval juthat át, ezért fontos az első két paraméter. A rossz íz a bukkális beviteli formáknál különösen fontos, hiszen ezek a gyógyszerformák tartózkodnak a leghosszabb ideig a szájüregben, így ezek hatnak a legtovább a nyelv ízlelőbimbóira. Ha a szájüregben rossz szagú (például a cukorbetegség kezelésében használt metformin [Shuster 2010]) komponens szabadul fel azt a szaglószerünk közelsége miatt fokozottan észleljük pl. egy gyomorban vagy főként egy bélbe oldódó formulációhoz képest. Ha a hatóanyagok rossz íze vagy szaga van, az a gyógyszerforma hatását ugyan nem csökkenti, de a termék értékét, a beteg-együttműködést, valamint ezzel együtt a terápia hatékonyságát igen. Természetesen nem vethető el minden olyan gyógyszer-jelölt molekula, amelynek rossz íze van, vannak ízfedési technikák, amelyek sok esetben sikerrel alkalmazhatók [Szakonyi és Zelkó 2012]. Az ízfedés, mint kutatási-fejlesztési irány, fontosságát mutatja, hogy olyan fejlett és költséges technológiák jelentek meg a kereskedelmi forgalomban, mint például

az elektromos nyelv [Zheng és Keeney 2006, Lorenz és mtsai 2009, www.alpha-mos.com].

Néhány, jelenleg kísérleti szakaszban vagy már forgalomban lévő hatóanyag [Obradovic és Hidalgo 2008] molekulatömegét és logP (a anyagok oktanol-víz megoszlási állandójának logaritmus, amely a passzív membránpenetráció egy jó definiált paramétere) értékét mutatja be az 7. ábra.



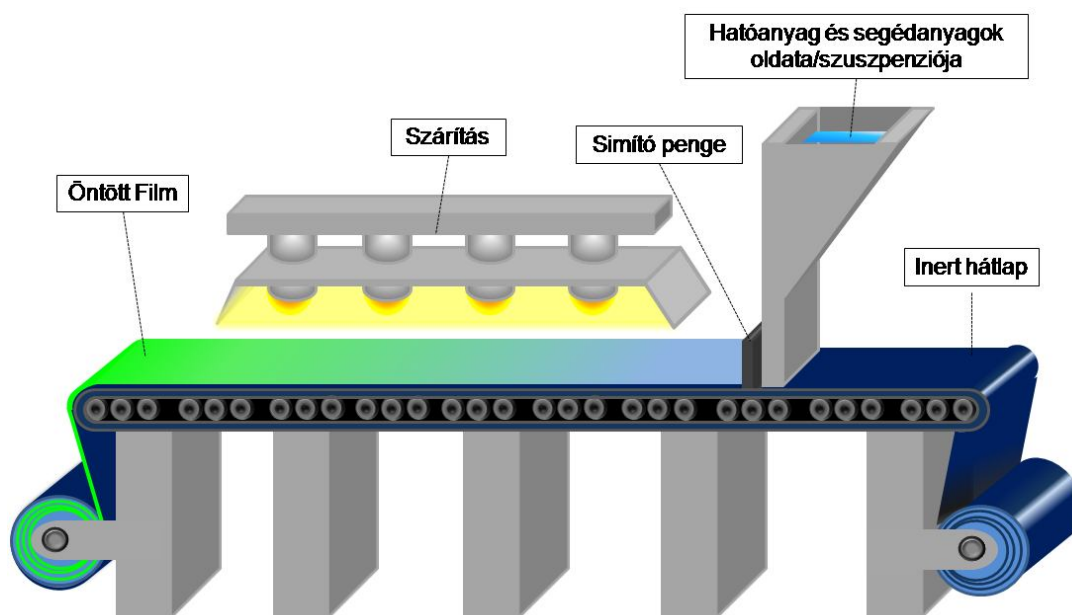
7. ábra Néhány bukkális formulációjú hatóanyag M , valamint logP értékei (a piros színnel kiemelt hatóanyagok forgalomban vannak bukkális gyógyszerformában)

A bukkális formulációjú hatóanyagok többsége ideális tulajdonságokkal rendelkezik, az ábrán látható összes anyag teljesíti a Lipinski-szabályok [Lipinski és mtsai 1997, Lipinski 2000, Owens 2003] ábrázolt részét ($M < 500$ g/mol; $\log P < 5$). Vannak azonban kivételek, olyan vizsgált vegyületek, amelyek (általában) egy tulajdonsága nem megfelelő (ilyen például az aciklovir ($M=225,2$ g/mol), amely nem eléggé lipofil ($\log P = -1,6 - -2,2$), a kutya-modellen folytatott kísérletek tanulsága szerint mégis felszívódik a szájüregből [Değim és mtsai 2006]), mégis hatékonyak lehetnek. Egy másik intenzíven kutatott hatóanyag az inzulin, amely túl nagy méretű, nem elég

lipofil, mégis a cukorbetegség (*diabetes mellitus*) egyre nagyobb betegpopulációjának nyomására, ezzel a felvevőpiac rohamos bővülésével, kísérletek szinte minden beviteli formával sikeresen, vagy részben sikeresen folynak. Bukkális úton történő beviteli formája jelenleg klinikai vizsgálatok alatt áll (Fázis 3., Ora-Lyn[®], Generex Biotech.), de megfelelő intraorális forma sincs még, elméleti megvalósíthatósága ellenére, elérhető áron történő előállítására még komoly fejlesztéseket igényel [Heinemann és Jacques 2009].

A forgalmazott bukkális gyógyszerformák többsége tabletta (pl. a Fentora[™] - fentanil-citrát [www.fentora.com]; Hydrocortisone Muco-Adhesive Buccal Tablets - hidrokortizon; Buccastem[™] - proklórperazin; Striant[™] - tesztoszteron [www.striant.com, Bologna és mtsai 1999]; Suscard[™] – nitroglicerin), lozenge (Actiq[™] - fentanil-citrát [www.actiq.com]; Commit[™] - nikotin), folyadék (Epistatus[®] és Buccolam[®] - midazolám-maleát, illetve midazolám-HCl) vagy valamilyen film (Onsolis[™] - fentanil-citrát [www.onsolis.com]; Sheets[™] Energy Strip – koffein, E-, B₆-, B₁₂- vitamin) [Batchelor 2004, Szabó, Hetényi és mtsaik 2011]. A tablettákat általában közvetlen préssel, míg a filmeket liofilizálással, öntéses technikával, porlasztással vagy extrúzióval állítják elő.

A filmek előállítására leggyakrabban használt, módszer az öntéses (*solvent casting*) vagy más néven oldószer-elpárolgatásos (*solvent evaporation*) eljárás, amelynek ipari megvalósítási sémáját a 8. ábra mutatja be.



8. ábra A film-képzés öntéses eljárása [Kállai és mtsai 2012]

1.3. Mikroszerkezeti vizsgálatok

A hagyományos értelemben vett mikroszerkezet az anyag azon szerkezete, amely mikroszkóp alatt, 25x-nél nagyobb nagyítás alkalmazásával látható [American Society for Metals 1985]. Tágabb értelemben vett mikroszerkezeti vizsgálatnak tekinthetünk minden olyan módszert, beleértve az olyan modern mikroszkópiás technikákat, mint a pásztázó elektron-mikroszkópia (SEM) vagy az atomi-erő mikroszkópia (AFM), amely a vizsgált anyagot atomjainak, ionjainak, molekuláinak (így pl. a polimer láncok), tehát a kémiai kötéseinek szintjén, több nagyságrenddel a mikrométer-tartomány alatt vizsgálja. Ezt figyelembe véve a kötések gerjesztésén alapuló módszerek, a látható (pl. az atomabszorpciós spektroszkópia - AAS; az atomemissziós spektroszkópia - AES), az infravörös (Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia - FTIR; közeli infravörös spektroszkópia - NIR) és az ultraibolya (UV- (ibolyántúli-) spektrofotometria) tartományba eső "színmérés" mind-mind mikroszerkezeti módszerek. Ugyancsak a minta mikroszerkezetét jellemezhetjük a más hullámhosszúságú elektromágneses hullámokkal (pl. röntgen-sugárzással vagy épp rádióhullámokkal (elektronspin rezonancia - ESR, magmágneses rezonancia spektroszkópia - NMR, illetve orvosi alkalmazása a képalkotó magmágneses rezonancia spektroszkópia - MRI)) történő gerjeszthetőség mérésével. Mikroszerkezeti módszerek a rugalmas (röntgen-, elektron-, neutron-diffrakciós) és a rugalmatlan szóráson (Raman, fluoreszcencia) alapuló a technikák is. Az említett módszerek csoportjába ritkán sorolják be a differenciál pásztázó kalorimetriát (DSC [Watson és Watson 1962]), azonban elvét tekintve, e hőelnyelésen alapuló módszer is az anyag elektromágneses sugárzással történő kölcsönhatását méri és fő felhasználási területe is az anyagok elemi celláinak vizsgálata, azok különböző kristályos vagy amorf formáinak azonosítására. A jelen disszertáció alapját képezi, az anyagok ún. szabadterfogatát mérő, pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (PALS) névre hallgató módszer, amely az általánosan alkalmazott porozitásmérésekhez (a higanyos porozitásmérés, illetve a BET módszer [McMillan és Teller 1951, Jiang és mtsai 2008]) hasonló, de azoknál pontosabb eredményt ad [Sebe és mtsai 2012].

A fejezet további részében az alkalmazott, mikroszerkezet-meghatározó technikák elvét ismertetem, előbb a rutinszerűen használt, gazdag irodalommal

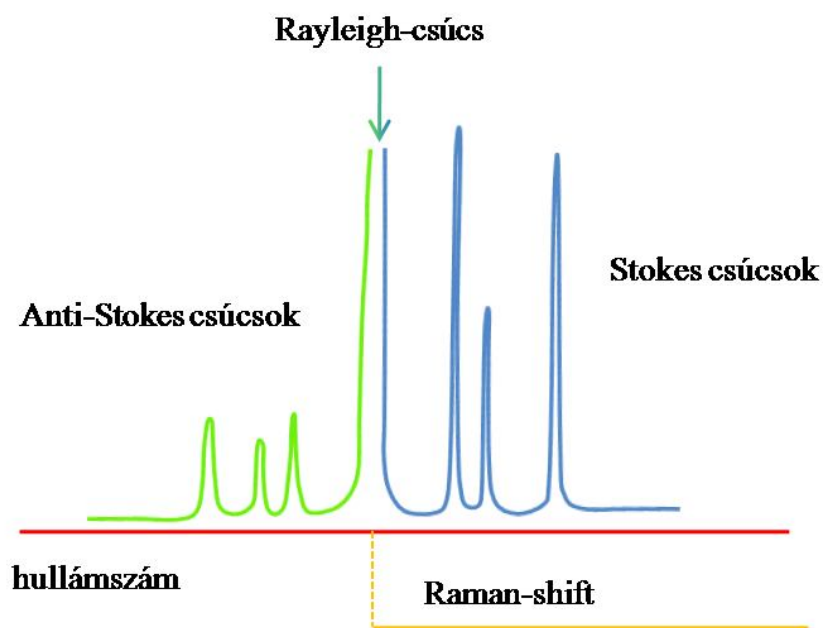
rendelkező módszereket röviden, majd a kevésbé ismert, korlátozottabb számú irodalmi forrásból megismerhető, a disszertáció gerincét adó, PALS-módszert elméleti háttérével, részletesen.

1.3.1. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

Az infravörös spektroszkópia infravörös tartományba eső (10^2 - 10^4 cm^{-1} hullámszám, $3 \cdot 10^{12}$ - $3 \cdot 10^{14}$ Hz frekvencia) elektromágneses hullámok molekulákban való elnyelődését vizsgálja. Ebben a tartományban a vegyületben található kötések rezgési és nyújtási frekvenciáit találjuk, így az ezeket gerjeszteni képes (azonos frekvenciájú) sugárzás a vizsgált anyagban elnyelődik, míg a más frekvenciájú sugárzások intenzitása (a szóródási veszteségtől eltekintve) nem változik. A szerves vegyületek esetében karakterisztikus frekvencia- (és így hullámszám-) tartományok jelölhetőek ki, amelyek egy kötés-típusra vagy funkciós-csoportra jellemzőek, így az ismeretlen anyagok funkciós csoportjai azonosíthatók. A spektrum kialakulása, felépítése meglehetősen egyszerű, a különböző hullámhosszúságú monokromatikus fénynyalábok áthatolóképességét (általában százalékos transzmittancia) mérjük és ábrázoljuk a sugárzás hullámszámának függvényében.

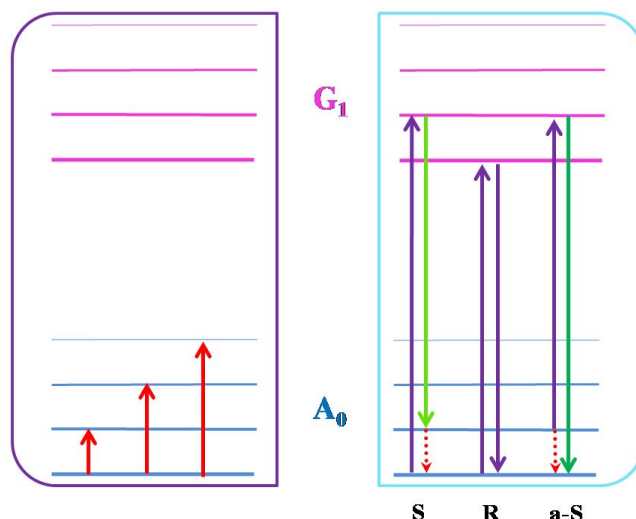
1.3.2. Raman spektroszkópia

A Raman-spektroszkópia elvét tekintve jelentősen eltér az FTIR-től. Ez a módszer a rugalmatlan fényszórás jelenségét használja ki, monokromatikus fényrel besugározva a mérendő mintát, a forrásból érkező nyaláb irányára merőlegesen detektáljuk a szórt sugárzást. A Raman-spektrum, az FTIR-énél kicsivel bonyolultabb, a besugárzás hullámhosszánaál megjelenő, rugalmas szórásból adódó (ún. Rayleigh-) csúcs két oldalán, attól egyenlő távolságra található (Stokes és Anti-Stokes) csúcspárokból áll (9. ábra).



9. ábra A Raman-spektrum szerkezete

Az alkalmazott forrás itt jóval nagyobb energiájú (pl. esetünkben 785 nm hosszúságú fény, ami kb. 12740 cm^{-1} hullámszámot jelent), de az anyagokra jellemző eltolódások (ún. Raman-shift) általában mégis az IR-nél alkalmazott $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ tartományba esnek, a csúcsok mérésének elvét a 10. ábra mutatja. Az ábrán csak a legkisebb IR csúcsnak megfelelő Raman-csúcs megjelenése látható, természetesen amennyiben a többi rezgési átmenet is Raman-aktív, azok is megjelennek a spektrumban.



10. ábra Az IR csúcsok (bal oldalon, piros nyilak) és a Raman-eltolódás (jobb oldalon, piros szaggatott nyilak) elvi háttere
 (az A_0 az alapállapotot, a G_1 a gerjesztett állapotot, az S a Stokes-csúcsot, az R a Rayleigh-csúcsot, az $a-S$ pedig az Anti-Stokes-csúcsot jelöli)

A Raman-spektrometria a gyógyszer- és anyagtudomány kedvelt módszere, kiválóan alkalmas a minta egy kiválasztott pontjának elemzésére, illetve anyageloszlás feltérképezésére egy vizsgálandó felszínen (ún. Raman-térképezés technika [Stuart és mtsai 2012, Zoubir 2012]).

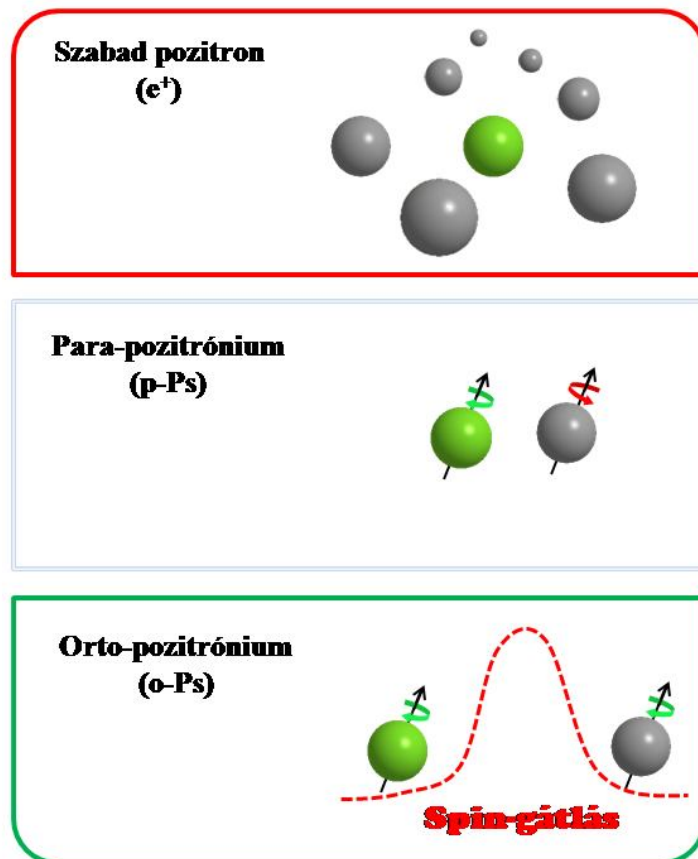
1.3.3. Pozitron annihilációs módszerek

1.3.3.1. Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (PALS)

A PALS egy 70 éves [Behringer és Montgomery 1942], modern vizsgálati módszerek között fiatalnak számító módszer (tömegspektrometria - 1899, röntgenkrisztallográfia - 1914, Raman-spektroszkópia - 1928, NMR - [Rabi és mtsai 1938], cirkuláris dikroizmus- [Greenfield és Fasman 1969], MRI - 1974). Elméleti alapja megegyezik korunk egyik ismert orvosi képző eljárásával, a metabolizmus vizsgálatok során használt PET-tel (*positron emission tomography*), amelyet bár 31 évvel az első PALS-mérések után alkalmaztak először (Michael Phelps 1973-ben

[Raiche és mtsai 1975]), mégis a működő berendezések számában 100-szorosan tútesz a PALS módszeren.

A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia a módszer nevéből adódóan pozitronok, annihilációjukat megelőző, élettartamát méri. A pozitron (e^+) az elektron (e^-) antirészecskéje [Anderson 1933], így minden mérhető tulajdonságában (töltés nagysága, tömege, perdülete stb.) megegyezik az elektronnal, kivéve a töltését. Pozitív töltése nem befolyásolja nagyban a tulajdonságait, ahogy világunkban a hidrogén-atomban a pozitív töltésű proton kerül "kering" a negatív töltésű elektron, úgy, a mi világunktól semmilyen lényeges tulajdonságában nem különböző (hiszen a világunk is csak azért nevezhető anyagnak, mert 10^6 db antirészecskére ($10^6 + 1$) db anyagi részecske jut), antivilágban az antihidrogénben a negatív töltéssel rendelkező antiproton körül egy pozitív töltésű antielektron, azaz pozitron mozog. Különlegessége inkább az antianyag voltából fakad, mint töltéséből. Míg az elektron a többi elektronnal Coulomb-kölcsönhatásba lépve taszítja őket, addig a pozitron nemcsak vonzza őket, hanem sikeres találkozásuk esetén egyesül az elektronnal, amely a két részecske megszűnését eredményezi két vagy három γ -foton (nagyenergiájú, perdülettel (ún. spin), nyugalmi tömeggel sem rendelkező, semleges töltésű elemi részecske) keletkezése közben. A pozitron anyagi világunkban meglehetősen rövid életű, 3 alapvetően különböző formában van jelen (11. ábra): szabad pozitronként, para-pozitroniumként (p-Ps), illetve orto-pozitroniumként (o-Ps).



11. ábra A pozitron állapotai az anyagban

A pozitronium (Ps) egy könnyű hidrogénatomként képzelhető el, amelyben az elektron nem egy proton körül [Born és Oppenheimer 1927], hanem egy a protonnál 1840-szer könnyebb, de ugyancsak pozitív töltésű részecskével közös tömegközéppont körül kering. A kétféle Ps-atom a két részecske két lehetséges kötött állapotára utal, spinjük szerint az elektron-pozitron pár vagy azonos, $(+1/2)$ és $(+1/2)$ vagy $(-1/2)$ és $(-1/2)$, vagy ellentétes spinnel kapcsolódik, ebből adódóan a két forma tulajdonságai eltérőek. A 0 eredő spinnel (S) rendelkező részecskepár (p-Ps) vákuumban 125 ps alatt annihilálódik, míg a $S = \pm 1$ állapot (o-Ps) ennél 1000-szer tovább, 142 ns-ig észlelhető, szintén nagyvákuumban. Itt érdemes megjegyezni, hogy a szabad pozitron tökéletes vákuumban (ahol rajta kívül semmi sincs), ugyanolyan stabil, mint a proton vagy az elektron. A két (mivel a spinállapotok száma $2S+1$, o:p = 3:1 arányban képződő [Suzuki és mtsai 2003]) pozitronium forma nem csak különböző élettartammal jellemezhető, de az annihilációjuk eredménye is más, a p-Ps esetében 2, míg az orto-forma esetén 3 foton keletkezik (a természet ezzel a 3. fotonnal ellensúlyozza az annihiláció spin-tiltott voltát).

Anyagi rendszerekben az annihilációig eltelt időtartam hossza a pozitron (imént tárgyalt háromféle) állapotától és a minta lokális elektronsűrűségétől függ. A p-Ps önannihilációja a vákuumban megfigyelt 100-150 ps körüli életidővel jellemezhető, míg a szabad pozitronnál ennél valamivel hosszabb, 200-500 ps-os élettartamot figyelhetünk meg. A két forma pusztán életidők alapján nem mindig megkülönböztethető. Nagy elektron-sűrűségű, mint amilyenek a fémek, vagy más könnyen elmozdítható elektronokat tartalmazó (elektromos vezetők) és sok kristályos rendszerben az o-Ps forma életideje sem haladja meg az 500-600 ps-ot, így általában csak 1-2 diszkrét élettartamot mérünk (τ_1 , τ_2). Nem vezető anyagokban, amilyenek a gyógyszerészeti segéd- és hatóanyagok is, az élettartam-spektrumban megjelenik egy (vagy több) hosszabb (τ_3) komponens, amely az o-Ps életideje. Aerogélekben és zeolitokban, amelyek extrém rendezett és (elektronsűrűség szempontjából) "üres" struktúrák az o-Ps élettartam akár a 100 ns-ot is megközelítheti, de a jellemző érték 800 (kristályos anyagok pl. szacharóz) és 2500 ps (amorf porózus anyagok, pl. Mg-sztearát) közötti. Ez a "hosszú" idő már elegendő arra, hogy az 0,116 nm átmérőjű [McCullagh és mtsai 1995] o-Ps felderítse környezetét, bejárja az anyag olyan szubnano-tartományú üregeit is, amelyek a porozitásvizsgálatok szondái (H₂, He, N₂) számára méretükből adódóan láthatatlanok [Duke és mtsai 2008]. Az üreg "falát" elérve, ahol nagyobb az elektronsűrűség, egy környezeti elektronnal ún. pick-off, tehát „felkapásos” annihilációban megsemmisül [Sato és mtsai 2008].

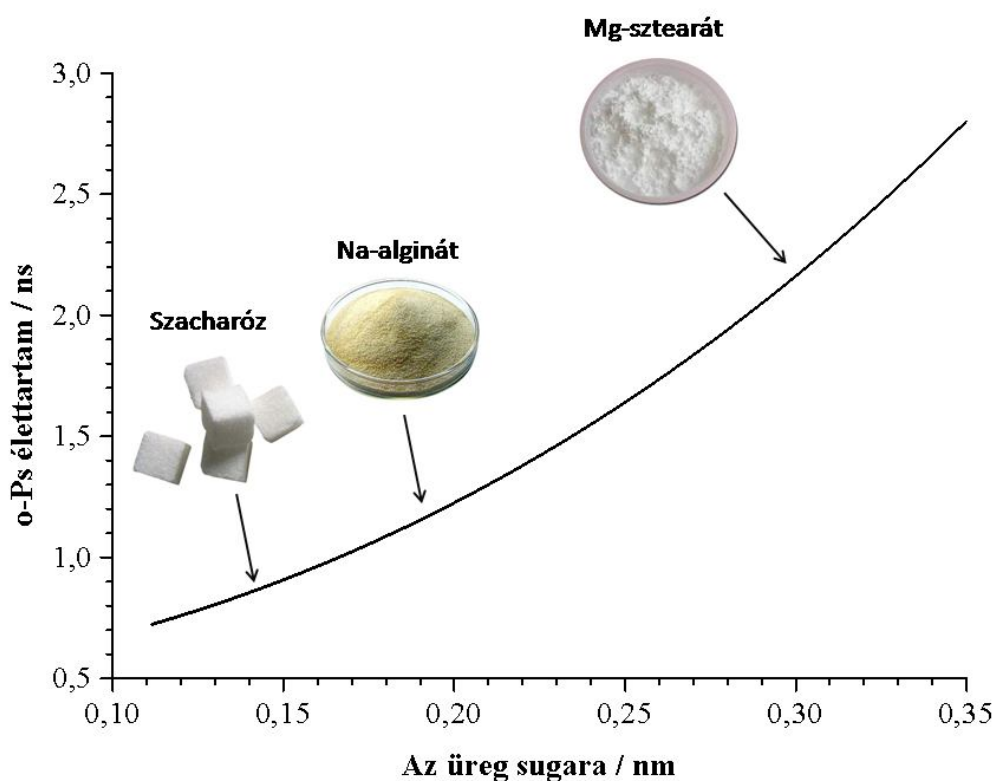
A leírt jelenség alapján kapcsolatot teremthetünk a mért o-Ps élettartam és az üregméret (*free holes*) vagy, ahogy gyakran nevezzük, a szabadterefogat (*free volume*) között. A más módszerek (elsősorban a BET) alapján történő kalibráció [Lowell 1979, Dutta és mtsai 2005] során az alábbi (E1) összefüggést találták az életidő és a szabadterefogat között:

$$\tau_3^{-1} = \lambda \cdot \left[1 - \frac{R}{R+R_0} + \frac{1}{2\pi} \cdot \sin \left(\frac{2\pi R}{R+R_0} \right) \right] \quad (\text{E1})$$

[Paranhos és mtsai 2007], ahol a τ_3 az o-Ps élettartam, a $\lambda = 2 \text{ ns}^{-1}$ az Ps átlagos annihilációs sebessége az elektronok rétegében [Mills 1981], az R az üregek átlagos sugara, az R_0 pedig a látszólagos falvastagságot leíró, anyagsoportra jellemző állandó,

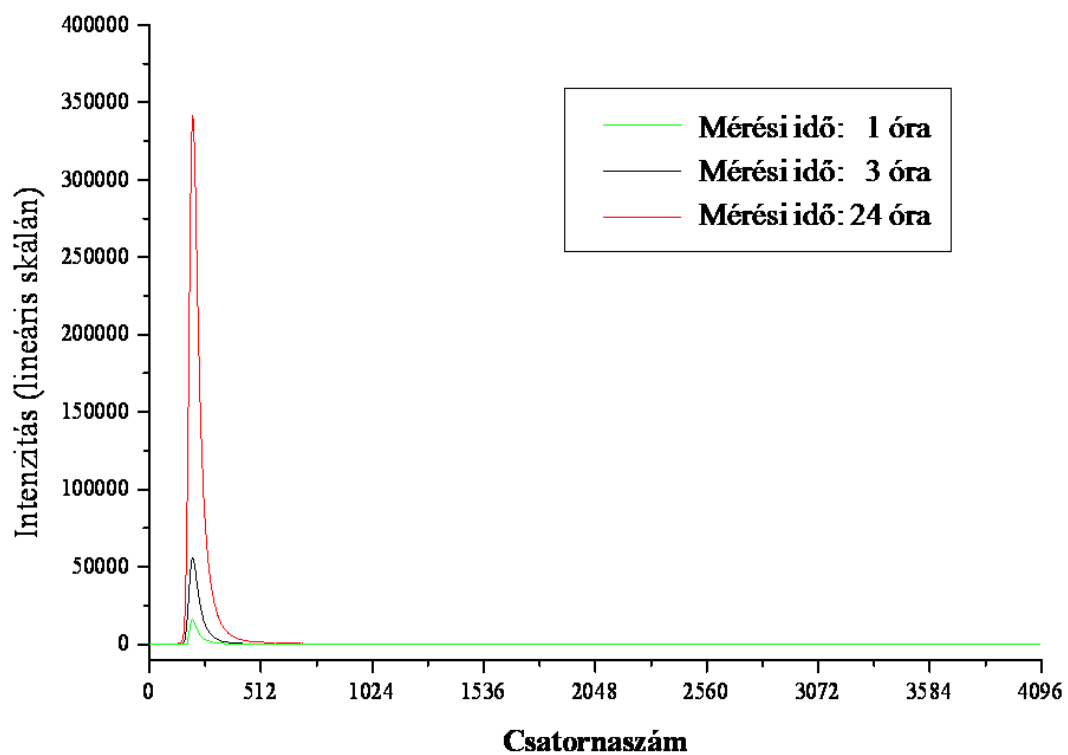
ami a porózus anyagok esetén $1,66 \text{ \AA}$ (ami SI egységben $1,66 \cdot 10^{-10} \text{ m}$, azaz $0,166 \text{ nm}$) [Nakanishi és mtsai 1988].

A gyógyszerészeti alkalmazásokban vizsgált tartományban az üregméretek alakulása az 12. ábrán látható. Az üregméretek meghatározásával az anyagi rendszerek összehasonlíthatóakká válnak, a módszer segítségével, a mikroszerkezetet befolyásoló, hatások követhetőek, így a nedvesedés, duzzadás, oldódás, illetve többkomponensű rendszereknél az összetevők közötti kölcsönhatások tanulmányozhatóak.

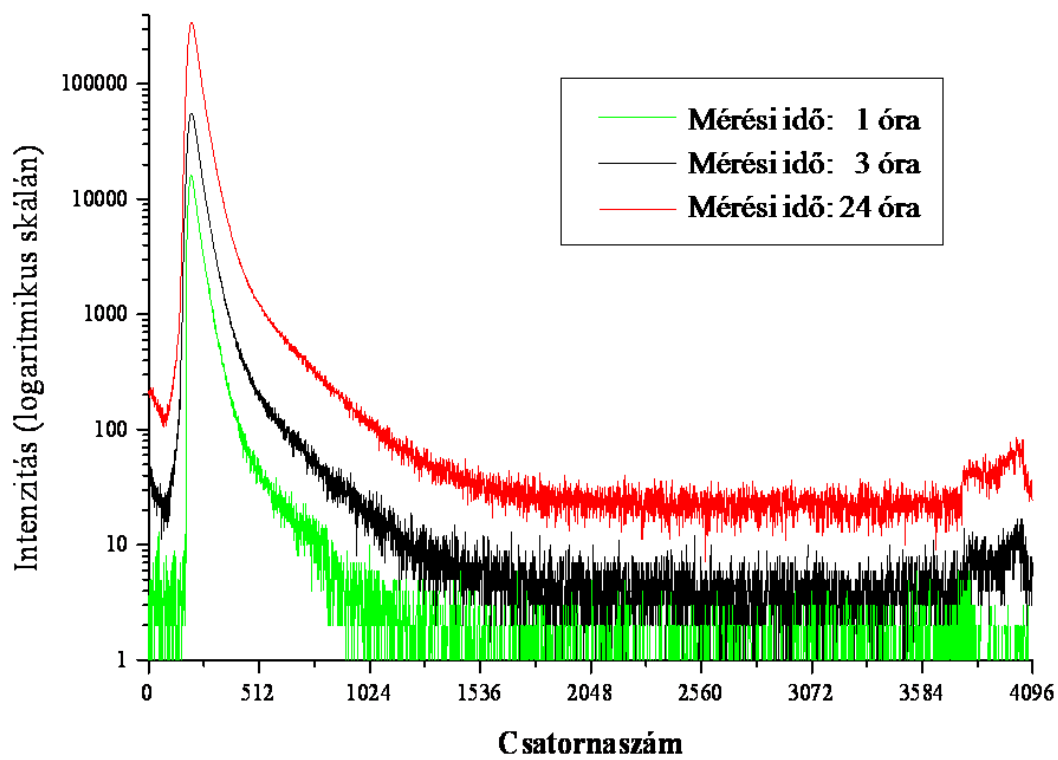


12. ábra: Az üregméret és az o-Ps élettartam közötti összefüggés

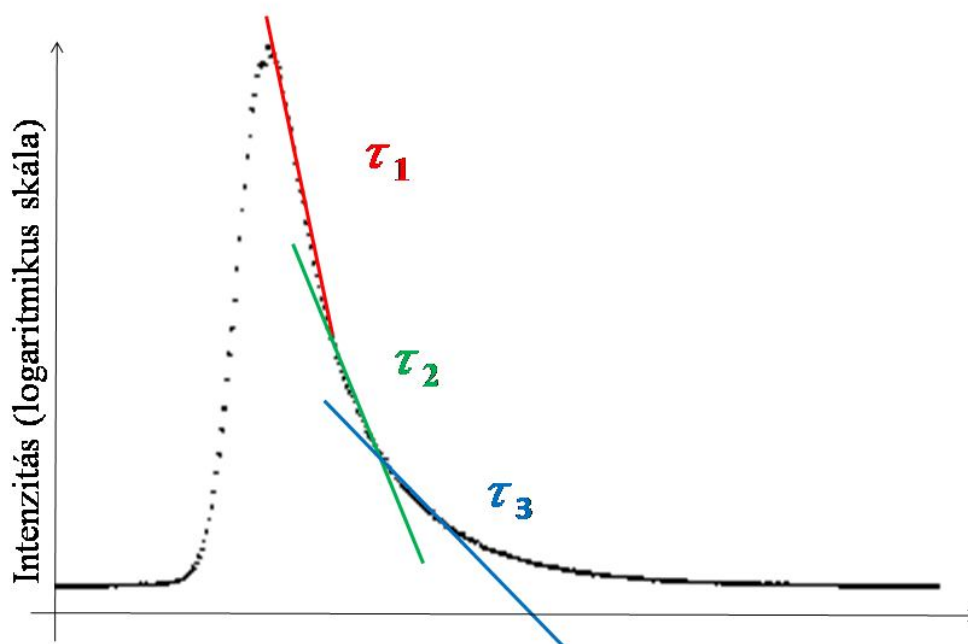
A nyers adatokból az üregméretekhez nem minden esetben egyszerű eljutni. A spektrométerhez kapcsolódó számítógépről a 13. és a 14. ábrán ábrázolthoz hasonló adatsorokhoz juthatunk. A kiértékeléshez a görbe csúcstól jobbra eső oldalát használjuk. A két ábrázolt (13-14. ábra) adatsor-hármas teljesen azonos, csak a grafikonok y-tengelyének skálázása más, a 13. ábrán a közel lineáris intenzitás-arányok követhetők, míg az logaritmikus y-tengellyel (14. ábra) az alapvonal és így a mérés pontosságának alakulása látható, illetve így magyarázható, a gyakorlati megvalósításban alkalmazott 3 órás mérésidő.



13. ábra A mért intenzitás alakulása különböző mérési idők esetén



14. ábra A mért háttér különböző mérési idők esetén



15. ábra A nyers adatgörbe felbontása 3 diszkrét élettartamra

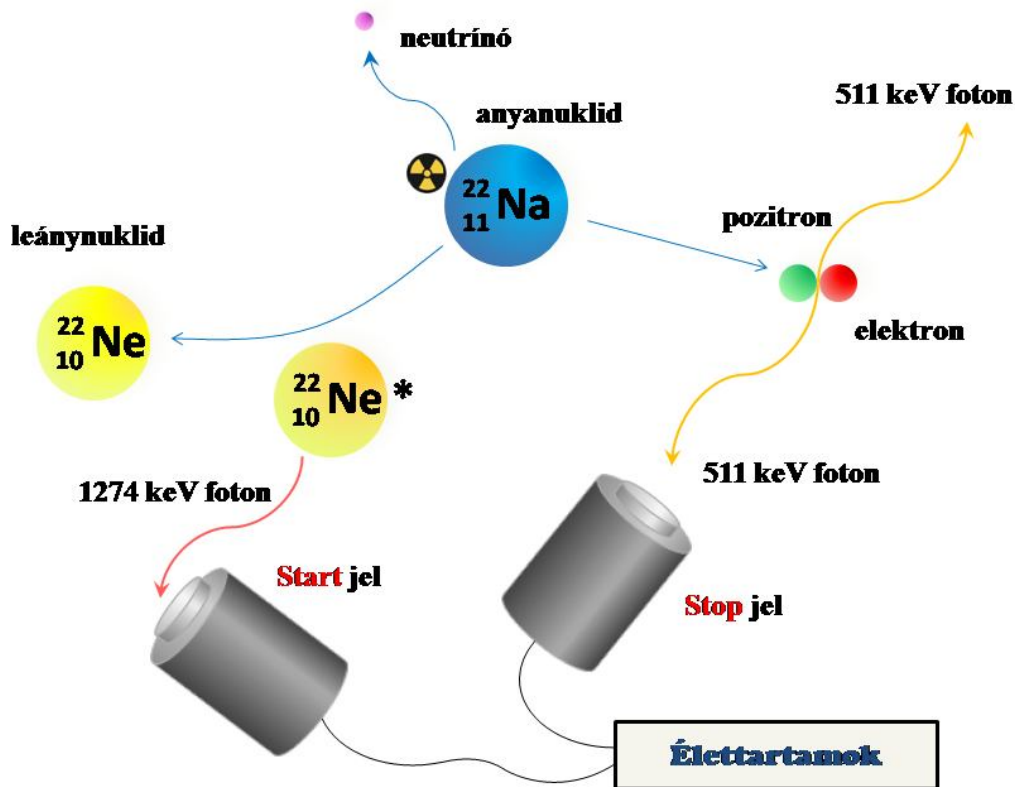
[Sebe és mtsai 2012]

Az adatsorokat egy egyszerű szoftver segítségével értékelhetjük, amely a görbe exponenciális függvényekre való bontását jelenti. Az illesztett függvények száma általában 2-3, de hosszabb mérési idő alkalmazásával akár 4-5 exponenciálisra bontható adatsorokat kaphatunk, így a radioaktív bomlásoknál megismert módon (az E2 egyenlet alapján) élettartam értékekhez juthatunk. A felbontás logaritmikus skálán jól vizualizálható, ezt mutatja be a 15. ábra.

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-\lambda t} \quad (E2),$$

ahol N_t és N_0 a bomló atomok száma egy kiválasztott 0 és t időpillanatban, a λ a bomlási állandó.

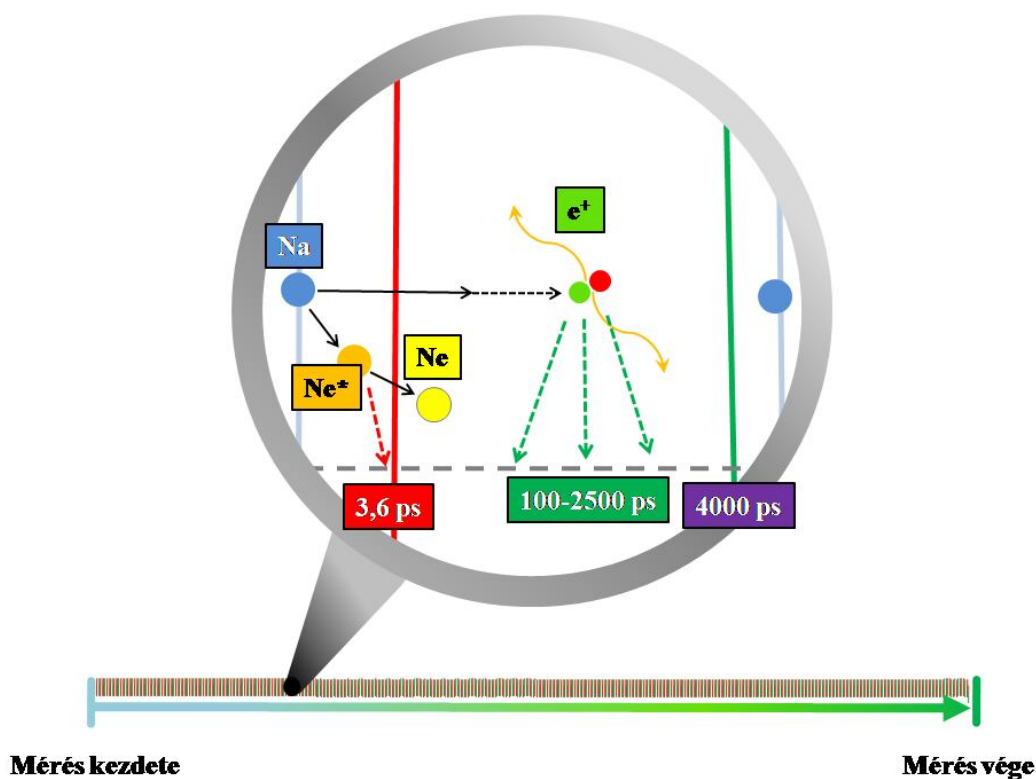
Az elméleti megfontolások után lássuk a gyakorlati megvalósítást. Az említett rövid életük miatt a pozitronok felhalmozása és szállítása nem megoldható, így olyan forrást kell keresnünk, amelyben folyamatosan (vagy szakaszosan) keletkeznek pozitronok. Ilyen források az ún. β^+ -bomló atommagok (a β^+ a pozitront jelöli, ahogy radioaktivitással foglalkozók körében az elektron is inkább β^- -részecske). A pozitronforrások általában (más radioaktív magokhoz képest mindenképpen) ártalmatlanok, a PALS mérésekhez alkalmazott forrás-aktivitás 10^5 Bq nagyságrendű, ami nagyon kicsi (Az emberi test 35-98 Bq/ttkg aktivitású sugárzást bocsát ki a természetes ^{40}K izotópnak köszönhetően [Gomaa és mtsai 2008], így egy átlagos 15-41 fős tantermi előadás már ugyanolyan radioaktív, mint az esetünkben alkalmazott forrás), ráadásul a e^+ közepes behatolási mélysége 100 μm körüli érték, így a bőrrel közvetlenül érintkező forrás is csak a felső, elszarusodó hámrétegben (amelynek vastagsága kb. 0,2 mm) okozhat károsodást. Többféle β^+ -sugárzó magot (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{124}I [Bailey és mtsai 2005], illetve ^{44}Ti [Antus és mtsai 2002], ^{58}Co [Kögel és mtsai 1997], ^{68}Ge [Calloo és Jaeger 2010]) is alkalmaznak a PET (amelyhez szintén pozitron-forrásra van szükség) és a PALS mérésekhez, ezek közül a legfontosabbak a PALS esetében a ^{22}Na [Jean és mtsai 2003], míg a PET-nél a ^{18}F . A ^{18}F drága, rövid felezési idejű ($t_{1/2} = 109,5$ perc), de nagy aktivitású forrás, amely in vivo alkalmazásnál, a szervezetből való gyors kiürülése és a rövid mérési idő miatt, előnyös, azonban a PALS mérésnél mindkét paramétere hátrányt jelent. A ^{22}Na ezzel szemben ($^{22}\text{NaCl}$ vagy $^{22}\text{Na}_2\text{CO}_3$ formában [Nagasaka és mtsai 2000]) olcsó, hosszú felezési idejű (2,6 év) és kis aktivitású. A hosszú felezési idő gazdaságossági okokból is előnyös, hiszen egy forrás akár 2-5 évig is használható nagyságrendi aktivitáscsökkenés nélkül. A kis aktivitás a későbbiekben ismertetett mérés menete szempontjából fontos. A 16. ábrán látható a PALS mérés általános mérési elve ^{22}Na pozitronforrás esetében.



16. ábra A PALS mérés általános mérési elve

[Szabó és Zelkó 2012]

Az ábrán látható módon a ^{22}Na gerjesztett állapotú ^{22}Ne -ra ($^{22}\text{Ne}^*$), pozitronra és egy neutrínóra bomlik, majd a $^{22}\text{Ne}^*$ alapállapotba relaxál ($t_{1/2} = 3,6$ ps), miközben egy 1274 keV energiájú foton szabadul fel, amelyet az egyik (általában BaF_2 -) detektor érzékel, ez a Start jel. Az emittált pozitron a fentebb részletezett állapotok egyikében annihilálódik, miközben tömegének (ami egyenlő az elektron tömegével) megfelelő, az Einstein-i, $E=mc^2$ alapján [Einstein 1905], két, egyenként 511 keV energiájú foton keletkezik, amelyek egyikét érzékeli a másik detektor, ez a Stop jel.



17. ábra A PALS mérés ismétlődő lépései

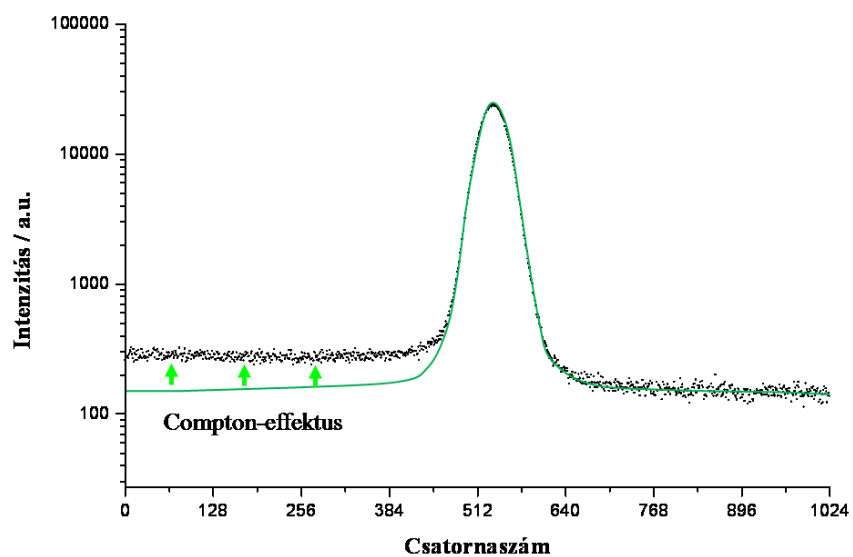
A PALS méréssel, amely kb. 10^{12} /óra, a 17. ábrán ábrázolt, ciklusból áll, a Start és Stop jelek között időtartamot mérjük. Mivel a forrás aktivitása 10^5 Bq nagyságrendű ($1 \text{ Bq} = 1/\text{s} = 1 \text{ részecske/másodperc}$), így belátható annak a valószínűsége, hogy egy pozitron Start jelével nyitott ciklust egy másik e^+ annihilációja zárja le, ezzel hamis adatot szolgáltatva, igen kicsi. A jellemző hasznos ciklusok száma 10^7 /óra, tehát a mérési idő alatt keletkező, mintegy 10^8 - 10^9 db pozitronnak alig az 1%-át érzékeljük. Ez nem a készülék hiányossága, hanem annak a jelenségnek a következménye, miszerint a (méréndő anyagnak megfelelő) várakozási idő alatt, esetünkben kb. 4000 ps, a Start jel után Stop jelet vár a mérő-rendszer, ha nem érkezik Stop jel, akkor csak ennyi idő után törli az és kezd újabb Start jelet várni. Emiatt, ha a Start és a Stop jel között újabb Start jel jelenik meg, azt nem érzékeljük. Az ilyen, nem teljes térszögű detektálásból következő, "hatástalan" mérési idők és az egy cikluson belül létrejövő pozitronok miatt kicsi az érzékelt események száma.

1.3.3.2. *Doppler-szélesedés mérése (DB)*

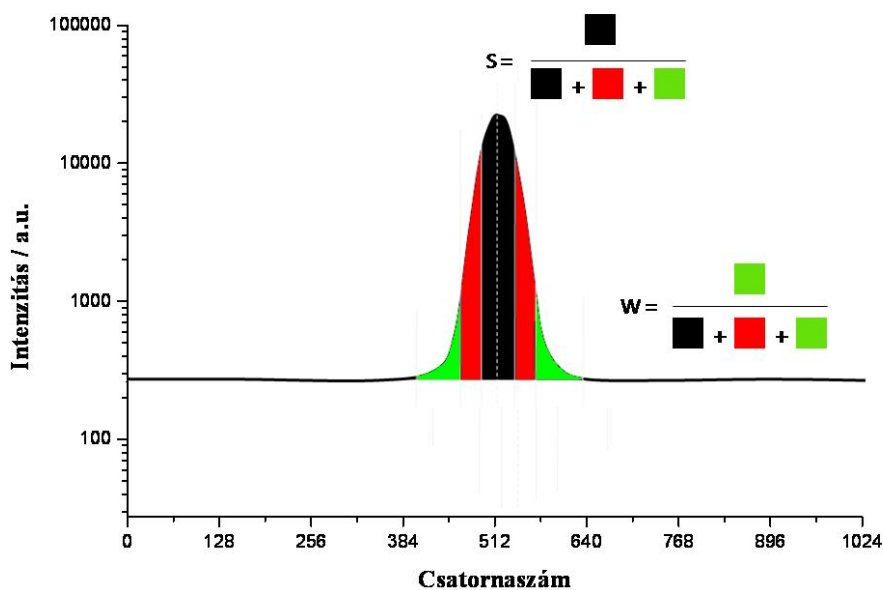
A Doppler-eltolódás a hétköznapi életben jól ismert, tudományosan 170 éve (kerek 100 évvel az első PALS alkalmazás előtt, 1842-ben Christian Doppler által [Eden 1988]) leírt hatás. A jelenség későbbi névadójává váló osztrák tudós először a csillagok színének változását magyarázta, majd 1845-ben hanghullámok segítségével igazolta elméletét [Schuster 2005], amely szerint az elektromágneses hullámok frekvenciáját (a fény színét, a hang magasságát) a forrásuk elmozdulása a megfigyelőhöz képest megváltoztatja, amennyiben a mozgás a terjedő hullámmal összemérhető sebességű. A csillagok színének változása alapján tehát megállapítható, hogy az égitestek milyen sebességgel távolodnak vagy épp közelednek hozzánk, megfigyelőkhöz. Az asztrofizikában ma is alkalmazzák a csillagok vörös- (távolodás), illetve kék-eltolódásának (közeledés) mérését a Világegyetem tágulásának leírására.

Hanghullámok esetén, amelyeknek Doppler-eltolódását a mindennapi életben is tapasztaljuk, a mozgó forrásnak 343,2 m/s-mal (a hang terjedési sebessége száraz, 20 °C-os levegőben, amelyet természetesen sok körülmény változtat kis mértékben [Cramer 1993], pl. 0°C-os levegőben ez az érték már csak 331,3 m/s [Wong 1986]) kell összemérhető sebességűnek lennie, ami pl. a hétköznapi közlekedési eszközök esetében teljesül is.

A Doppler-szélesedés (DB) a Doppler-eltolódás jelenségének következménye, mivel az annihilációban részt vevő elektronok kinetikus energiája összemérhető a tömegük energia-ekvivalensével ($E = mc^2$ alapján: $m_e = 510,99906 \pm 0,00015 \text{ keV}/c^2$), így az elektron, amely az annihilációs sugárzás forrása, kezdeti energiája az annihilációs fotonok energiáját is kis mértékben megváltoztatja.



18. ábra A DB spektrum



19. ábra A DB paramétere

Az energiaspektrum ebből következő kiszélesedését, azaz a DB adatsorát láthatjuk a 18. ábrán. A spektrum a Compton-szóródás következtében aszimmetrikus, a görbe csúcsánál kisebb energiákat előidézhethet a fotonok, elektronokkal való, ütközése, de annál nagyobb energiát nem. A jelenség a DB-re nincs hatással, így a kiértékelés során kétoldali háttér-levonással korrekcióba vehető. A korrigált Doppler-csúcsot 5

részre bontjuk a 19. ábra szerint, a középső (ábrán feketével), csúcsra szimmetrikus rész a kis energiájú elektronok annihilációinak következménye, míg a csúcstól távolabb eső pontok a nagyenergiájú elektronok kinetikus energiáit hordozzák magukban, megváltoztatva ezzel az 511 keV-os (kb. $8 \cdot 10^{-14}$ J) átlagos energiát.

A görbe parametrizálás után értékelhető ki, az ábrán látható módon számítható S- és W-paraméterek utalnak a minta "kémiai" szerkezetére az annihiláció helyén. Ha a mintában sok a kis kinetikus energiájú e^- (ezek a gyengén kötött vagy nem-kötő elektronpárok, mivel a viriál-tétel [Clausius 1870] értelmében a kinetikus energia a potenciális energia fele), akkor az S-paraméter nagy, a W pedig kicsi, míg kötésben lévő (pl. H-híd) elektronok esetén az S-paraméter kicsi és a W nagy. Ezzel a kémiaibb információt adó (elektron-szerkezettel összefüggő) módszerrel a fizikai jellegű üreghézag-érték meghatározás kiegészíthető, stabilitás-vizsgálatoknál az FTIR módszerhez hasonlóan megállapítható, hogy létrejött-e másodlagos kötés a komponensek között.

1.3.3.3. Gyakorlati, gyógyszerészeti alkalmazások

A PALS és a DB módszert a gyakorlatban főként fémek [Kawaguchi és Shirai 2002], félvezető anyagok [Abdul-Jabbar és mtsai 2012] rács-hibáinak keresésére, illetve műanyagok [Suzuki és mtsai 2000] vizsgálatára használják, esetenként a mérés külső körülményeinek, például hőmérséklet vagy fényhatás [Suzuki és mtsai 2003] változtatása során. Csak néhány kutatócsoport van, akik gyógyszerészeti polimerek, hordozó-rendszerek mikroszerkezeti leírására alkalmazták a módszert.

A közlemények többsége valamely, a gyógyszerforma kialakítása szempontjából fontos paraméter, így például a különböző összetevők alkalmazása [Szente és mtsai 2009, Papp és mtsai 2010] és aránya [Li és mtsai 2011], az alkalmazott oldószer [Bajdik és mtsai 2005] vagy segédanyag anyagi minősége [Minfeng és mtsai 2008, Bajdik és mtsai 2009] és mennyiségének [Zelkó és Süvegh 2002] függvényében tanulmányozta az o-Ps élettartamok, átlagos élettartamok, eloszlás-görbék, illetve a DB [Djourelou és mtsai 2007] jelenségét. Sok esetben hasznos vizsgálati módszerek bizonyultak ezek a módszerek a gyógyszerformák stabilitásának vizsgálatában is, eredményeiket összevetve a tárolás időtartamával [Kiss és mtsai 2006], a közeg páratartalmával [Zelkó és mtsai 2004] vagy termosztátot alkalmazva a mérés hőmérsékletével [Hamdy és mtsai 2001].

1.4. Makroszerkezeti vizsgálatok

A makroszkópos tulajdonságokat (pl. a halmazállapotot, szint, szilárdságot) az anyagokat felépítő atomok (elektromosan töltött formában ionok, atomcsoportokként molekulák) közötti kölcsönhatások természete és nagysága határozza meg. Ez alapján elmondható, hogy a makroszerkezeti tulajdonságok az anyag mikroszerkezetének következményei, gondos mikroszerkezeti vizsgálatokkal az anyagok felépítése alacsony szerveződési szinteken felderíthető, így a makroszerkezet (az alkotó atomok magasabb szintű szerveződése), illetve annak lényegi változásai előre jelezhetőek. Egy komplex, minden paraméterre kiterjedő vizsgálati módszer birtokában a makroszerkezet pontosan számítható lenne, ennek hiányában a különböző, előző fejezetben tárgyalt mikroszerkezet-vizsgáló módszerekkel kapott eredmények csupán párhuzamba állíthatók a makroszerkezeti mérésekkel, de azok egy részének elvégzése alól semmiképpen nem mentesítenek. A mikroszerkezeti vizsgálmódszerek kombinációjával nyert eredmények alapján a felhasználásnak megfelelően tervezhető a makroszerkezeti tulajdonság.

Gyógyszerészeti anyagok makroszerkezetének vizsgálata során többek között a halmazállapot (illetve ennek hőmérséklet-függése, valamint a görbe kitüntetett pontjai, az olvadás- vagy fagyáspont, a forráspont), a szag, a morfológia (alaktan), a sűrűség, a keménység és a rugalmasság meghatározása alapvető fontosságú.

Polimer rendszerek esetében a kémiai szerkezet (monomerek, keresztkötő ágensek, segédanyagok) általában jól definiált, azonban más anyagokkal (hatóanyaggal, segédanyaggal, nedvességgel) kölcsönhatásba lépve morfológiai és mechanikai tulajdonságaik alapvetően megváltozhatnak. A kölcsönhatások és ezzel a mérhető makroszkópos tulajdonságok megváltozása az anyagok közötti kötések kialakulására, átrendeződésére vagy éppen megszűnésére utalnak, amelyeket mikroszerkezet-vizsgáló módszerekkel vizsgálhatunk.

Konvencionális gyógyszerformák (pl. tabletták és pelletek) vizsgálata során a mechanikai ellenálló képesség (szilárdság, kopási veszteség) meghatározása a gyártás és az alkalmazás szempontjából is elengedhetetlen. Tabletták esetében a szilárdság-vizsgálat a törési-, míg például polimer filmek esetében törési, illetve szakítási szilárdság mérését jelenti.

2. Célkitűzések

Munkám célkitűzései a következők voltak:

- megfelelő segédanyag-rendszer kiválasztása bukkális film formulációhoz,
- a segédanyagok optimális arányának megállapítása,
- B₁₂ hatóanyag tartalmú bukkális filmek formulálása optimális segédanyag-rendszer felhasználásával,
- az előállított filmek mikro- és makroszerkezete közötti összefüggések keresése,
- a polimer-arány, a film előállítási módjának és a tárolás hatásának vizsgálata a hatóanyag-leadás profiljára.

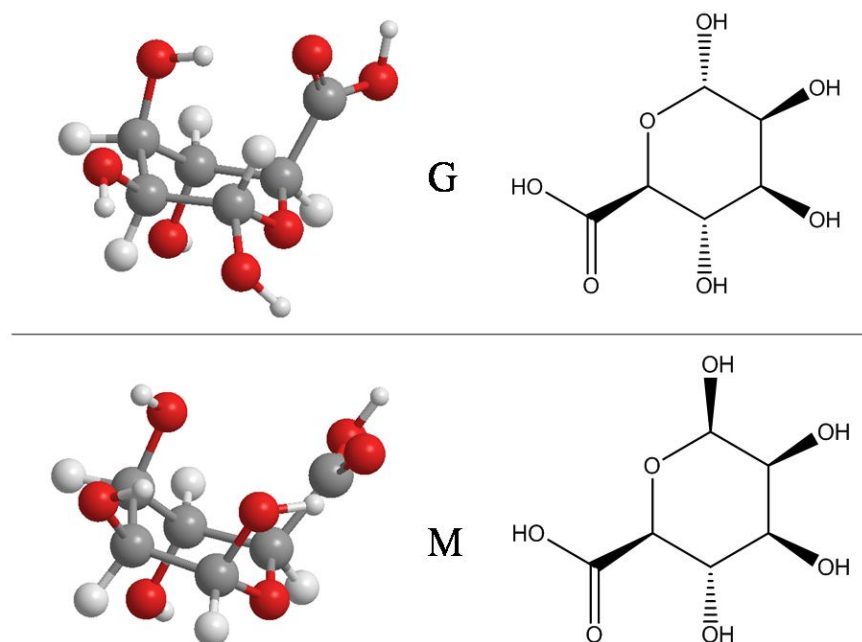
3. Módszerek

3.1. Felhasznált hatóanyag

Az alkalmazott hatóanyagot, a B₁₂-vitamint (CAS: 68-19-9), gyógyszerkönyvi minőségben a Richter Gedeon Nyrt. Termékfejlesztési Igazgatósága bocsátotta rendelkezésünkre.

3.2. Felhasznált segédanyagok

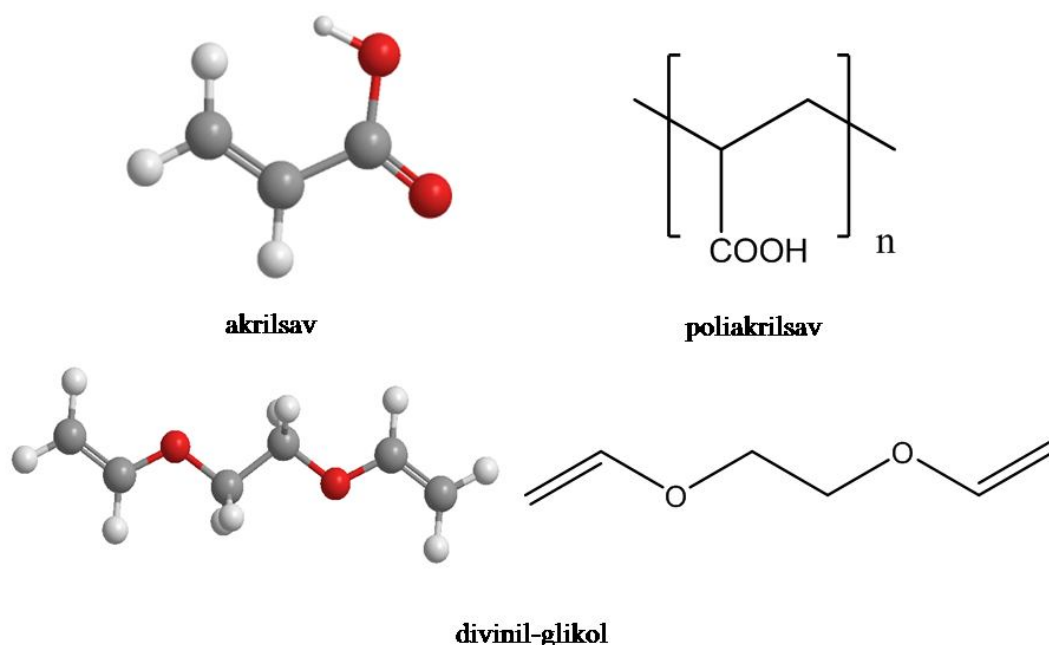
Munkám során az alkalmazott formulációk fő összetevője a Na-alginát (SA) polimer (Aldrich, gyártási szám: 0063ITB) volt. Ez a természetes forrásból származó, algákból kivonható poliszacharid, két monomer, a β -D-mannuronsav (M) és α -L-guluronsav (G), amely az M C₅ epimerje (az 5. szénatomon eltérő térállású OH-csoport), 1-4 glikozid-kötéssel kapcsolódó ko-polimerének Na-sója. A SA monomerjeinek 3 dimenziós és a gyűrűs szerkezetek oldalláncainak elhelyezkedését szemléltető, síkra vetített szerkezete látható a 20. ábrán.



20. ábra A SA monomerjeinek 3D és síkra vetített szerkezete

A SA jó filmképző tulajdonságú, biodegradábilis, közepes mértékben mukoadhezív, vízben duzzadó, sárga színű, részben (< 5%) kristályos szerkezetű, gyógyszerhordozó rendszerekben gyakran használt polimer [Tønnesen és Karlsen 2002].

Megfelelő bukkális formuláció kialakításához a SA nyálkahártyához való kötődését javítani kell, így az előállított formulák a SA-on kívül Carbopol 71G NF (CP) polimert (Noveon, gyártási szám: TW56GAJ066) is tartalmaztak. A Carbopol polimerek poliakrilsav származékok, amelyekben a lineáris polimerszálak között divinil-glikollal (vagy valamilyen polialkenil-éterrel) keresztkötéseket alakítottak ki. A monomer és a divinil-glikol keresztkötő ágens szerkezete látható a 21. ábrán.



21. ábra Az akrilsav, a poliakrilsav és a divinil-glikol szerkezete

A CP mukoadhezivitása a SA-nál (és szinte minden más polimernél) nagyobb (6. ábra: CP=PAA), azonban vízben (duzzadva) lassan oldódik, így a csak CP-t tartalmazó formuláció hatóanyagleadása a SA-CP kompozitnál lassabb.

A fenti polimereken kívül a preformulációs vizsgálatokhoz Carbopol Ultrez 10NF (Lubrizol, gyártási szám: 0100648897) polimert és magnézium-sztearátot (Hunгарopharma, gyártási szám: 60502D) használtam.

3.3. Mintakészítés

3.3.1. Hidrogélek előállítása

A hidrogélek előállításához a hatóanyagból 1 mg/ml-es törzsoldatot készítettem desztillált vízzel, majd különböző összetételű minták (2. táblázat) előállításához szükséges vízmennyiség 2 ml-e helyett 2 ml B₁₂ törzsoldatot alkalmaztam. A polimerek szükséges mennyiségét B₁₂ oldatban oldottam, duzzasztottam és a géleket 48 órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten, mágneses keverőn.

2. táblázat A minták polimer-összetétele

Minta azonosító	SA / m/m%	CP / m/m%
1	3,0	-
2	3,0	0,15
3	3,0	0,25
4	4,5	-
5	4,5	0,15
6	4,5	0,25
7	6,0	-
8	6,0	0,15
9	6,0	0,25

3.3.2. Szabadjelme előállítás öntéses technikával

A szabadjelme (vagy más néven öntött jelme) előállítását oldószer-elpárologtatásos módszerrel (*solvent cast method*) végeztem úgy, hogy a hidrogélek 1,80 g-jait 4x4 cm-es szilikon lapkákra (KaiserFlex Red, W. F. Kaiser u. Co. GmbH, Germany) öntöttem, amelyekre előzőleg 32 mm belső átmérőjű, fémhengereket helyeztem el, hogy a különböző folyási tulajdonságokkal rendelkező gélekből azonos alapterületű jelmeeket kaphassak. A jelmeek száradása 22 ± 2 °C hőmérsékletű, 55 ± 5% relatív páratartalmú közegben 48 óra alatt ment végbe.

3.3.3. Liofilizált filmek előállítása fagyasztva szárítás technikával

A liofilizált filmek (vagy más néven ostyák) készítéséhez az öntött filmeknél használt hidrogélek szintén 1,80 g-jait 32 mm belső átmérőjű alumínium infúziós zárókupakokba öntöttem, 12 óra alatt fagyasztószekrényben $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on megfagyasztottam, majd Scanvac CoolsafeTM (CoolSafe 55, ScanLaf A/S, Lyngø, Denmark) típusú fagyasztva-szárító berendezésben, a tálcák hőmérsékletét $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ról fokozatosan $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig emelve, 24 óra alatt liofilizáltam. A fagyasztva-szárítás folyamata közben a minta hőmérséklete a kezdeti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ról $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra emelkedett, a mintatér nyomása $0,7\text{ Pa}$ -ig, a kondenzátor hőmérséklete pedig $-96\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig csökkent.

3.3.4. Minták tárolása

A preformulációs vizsgálatok során a segédanyagokat, a hatóanyagot, illetve fizikai keverékeket, a formulációs vizsgálatoknál a szabadfilm és a liofilizált ostya mintákat 4 hétig, a mikrohullámú kezelés után a segédanyagokat 1 hétig, $40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, $75 \pm 5\%$ relatív páratartalmú közegben tároltam stabilitásvizsgáló kamrában (Sanyo Type 022, Leicestershire, UK). A disszertáció további részében a "tárolás után", "tárolt minták" stb. kifejezések mindig az itt leírt tárolási körülményeket jelentik.

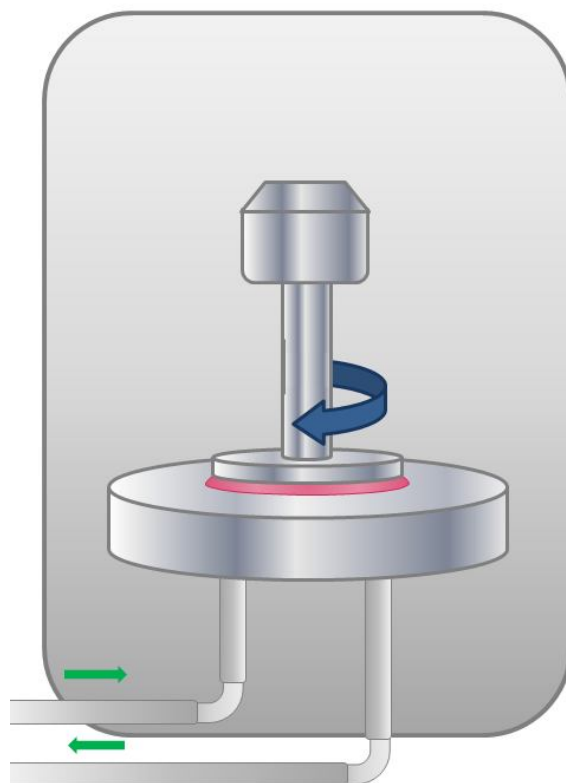
3.4. Vizsgálati módszerek

3.4.1. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

A vizsgálatokat FTIR 4200 (Type A) (Jasco International Co. Ltd, Tokyo, Japan) készülékkel, gyengített totálreflexiós (ATR Pro-470H) mérőfejjel és porok esetében porfeltéttel, filmeknél pedig elasztikus mintához alkalmas feltéttel végeztem. A készülék mérési tartománya $300\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, spektrális felbontása 4 cm^{-1} , mintánként 100 spektrumot vettem fel. A kapott adatsorokat xls-formátumba exportáltam, MicroCalTM (Northampton, USA) OriginTM 4.10 szoftverrel értékeltem.

3.4.2. *Viszkozitás meghatározása*

A gélek viszkozitását AR 2000 Rotational Rheometer típusú reométerrel (TA Instruments, New Castle, USA) mértem, az alkalmazott forgó mérőfej átmérője 40 mm volt. A mérést az 22. ábrán látható elrendezésben végeztem el, a teflon borítású, 25 °C-ra termosztált mintatartón a mérendő gélek vastagságát 1000 μm -re állítottam be, a forgás sebességét 6 szinten, 7,409-74,09/s között változtattam.



22. ábra A viszkozitás meghatározásának mérési elrendezése

3.4.3. *Hidrogélek pH-jának meghatározása*

A hidrogélek pH-ját "pH 210 Microprocessor pH Meter" (Hanna Instruments, USA) típusú kombinált üvegelektrodos pH-mérő műszerrel határoztam meg.

3.4.4. *Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia*

Doktori munkám során különböző alakú és halmazállapotú mintákkal végeztem PALS analízist, az ebben a fejezetben tárgyalt mérési körülmények közül a pozitronforrás, az elektronika, a detektorok, illetve a kiértékeléshez alkalmazott szoftverek minden mérési módnál azonosak voltak. A PALS méréshez körülbelül $3 \cdot 10^5$ Bq erősségű, két Kapton fólia közé csomagolt (ún. szendvics-elrendezés) hordozómentes, szilárd $^{22}\text{NaCl}$ pozitronforrást használtam, amelyet $7,4 \cdot 10^7$ Bq/ml aktivitású $^{22}\text{NaCl}$ oldatból készítettünk az oldószer (desztillált víz) elpárologtatásával. A relaxációs és az annihilációs fotonokat egy-egy BaF_2 detektor érzékelt, amelyek jeleit Ortec[®] elektronika (gyors-gyors koincidenciakörrel [Mackenzie 1983]) alakította élettartam spektrummá. Az élettartam spektrumokat diszkrét életidőkre bontottam Resolution [Kirkegaard és mtsai 1981] programmal. Pontosabb eredmények elérése érdekében a párhuzamos mérések adatsorait kiértékelés előtt összegeztem.

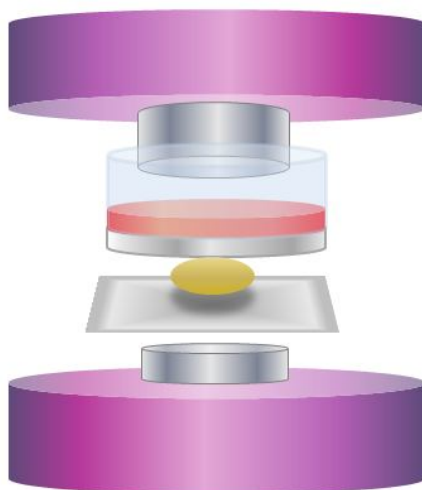
3.4.4.1. *Kompatibilitás vizsgálat PALS módszerrel*

A preformulációs vizsgálatok során a hatóanyag és a segédanyagok, valamint az 1:1 arányú keverékek szilárd fázisát mértük PALS módszerrel tárolás nélkül, illetve a 4 hetes tárolási periódus alatt hetente. A forrást mindkét oldalról 1-1 mm vastagon beborítottam a mérendő anyag porával, az így kapott mintákat alufóliába csomagoltam, mintánként 3, egyenként 3600 másodperc időtartamú mérést végeztem.

3.4.4.2. *Gél-film átmenet vizsgálata PALS módszerrel*

A hidrogélek PALS vizsgálata során a minták 3,6 g-ját 2 cm magas, 3,8 cm belső átmérőjű, alulról 7 μm vastagságú alufóliával borított üveghengerbe öntöttem. A pozitronforrást egy 2 mm vastagságú alumínium lemez és az üveghenger közé helyeztem. A két detektort függőleges helyzetbe állítottam, az alsó detektorra helyeztem az alumínium lemezen lévő forrást és a mintát, majd a felső detektort a folyadék felszínétől 5 mm magasságig engedtem le, így biztosítva a maximális érzékelési hatékonyságot megfelelő száradási sebesség mellett (23. ábra). A méréseket légkondicionált laboratóriumban végeztem (hőmérséklet: 22 ± 2 °C, RH: 55 ± 5 %), a

száradás ideje alatt 24, egyenként 3600 másodperc időtartamú mérést végeztem. A preformulációs PALS mérésekkel ellentétben a hidrogének vizsgálata során az egyedi adatsorokat összegzés nélkül értékeltem ki, hiszen ezek a minták időbeli szerkezetváltozását jellemzik.



23. ábra A gél-film átmenet vizsgálatának PALS mérési elrendezése
[Szabó és mtsai 2012]

3.4.4.3. Szabadfilmek és ostyák mérése PALS módszerrel

A szabadfilmek és az ostyák PALS vizsgálatához az 5.2.1. fejezetben részletezett pozitronforrást, mérőműszert és detektor-elrendezést alkalmaztam. A szabadfilm minták vastagsága (25-45 μm) túl kicsinek bizonyult a mérés maximális hatékonyságú elvégzéséhez, mivel a PALS mérés aktív térfogata kb. 100 μm , ezért az öntéses eljárással készült mintákat 4 rétegben helyeztem a forrás mindkét oldalára. A liofilizált minták 1-2 mm-es vastagsága miatt elegendő volt egy-egy réteg ostya használata, azonban a minták kis sűrűsége következtében az észlelt annihilációs események száma a szabadfilmeknél észlelhetőnél kisebb, $7\text{-}8 \cdot 10^5$ volt.

3.4.4.4. Doppler-szélesedés (DB) mérése

A Doppler-szélesedés mérést folyékony N_2 -nel hűtött, nagy tisztaságú germánium (HPGe) detektorral végeztem. A mérési idő 10800 s volt, a pozitronforrás és a csomagolás módja is megegyezett a PALS méréskor használttal.

3.4.5. Mikrohullámú kezelés

A mikrohullámú kezelést Milestone Multisynth AFC-FO 300 típusú mikrohullámú reaktorban, 10 ml térfogatú reaktoredényben, 1,0-1,0 g mérendő anyaggal végeztem. A készülék maximális teljesítménye 800 W, maximális hőmérséklete 300 °C, az alkalmazható legnagyobb nyomás 20 bar ($2 \cdot 10^6$ Pa). A kezeléseket két teljesítmény-programmal végeztem, 400 W állandó teljesítmény alkalmazva 4 percig (Program 1), illetve 800 W változó teljesítménnyel ugyancsak 4 percig (Program 2). A "Program 1" módszerrel kapott mintahőmérséklet-görbét adtam meg a "Program 2" esetében, ennek elérésére a készülék automatikusan változtathatta az alkalmazott teljesítményt.

3.4.6. Raman térképezés (Raman Mapping)

A Raman térképezés méréseit Horiba Jobin Yvon Labram micro-Raman készülékkel végeztük, 785 nm hullámhosszúságú (vörös) diódalézerrel, és 50-szeres nagyítású objektívvel. A 210x210 μm -es mintaterületet 10 μm -es lépésközzel térképeztük fel, minden pontban 12 db 10 másodperces spektrumot vettem fel 320 - 1542 cm^{-1} hullámszám-tartományban, ezek átlagolásával készült a végleges spektrum. A spektrumokra lineáris alapvonalat illesztettem, az intenzitásokat normáltam, majd a legkisebb négyzetek módszerével becsültem az összetevők mennyiségét, a felvett egyedi spektrumok alapján.

3.4.7. Mikroszkópos képek készítése

3.4.7.1. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A liofilizált mintákat, arannyal történő bevonás után, kétoldalú ragasztóval rögzítettem a mintatartóhoz. A méréseket 15 kV gyorsító feszültséggel, 10,0 mm-es munkatávolsággal és 35-szörös nagyítással végeztem Philips XL 30 (Amsterdam, The Netherlands) típusú pásztázó elektronmikroszkóp segítségével.

3.4.7.2. Kisteljesítményű, digitális mikroszkópos képek készítése

A kisteljesítményű (20-200-szoros nagyítás) digitális mikroszkópos képeket Digimicro 2.0 Scale (DNT[®], Dietzenbach, Germany) típusú mikroszkóppal készítettem.

A mikroszkópot USB-kábel segítségével csatlakoztattam a számítógéphez, ahol MicroCapture v2.0 szoftver segítségével tudtam VGA-felbontású (640x480 pixel) képeket készíteni, illetve nagyított élőképen követni a mérések menetét.

3.4.8. Mechanikai tulajdonságok vizsgálata

A minták mechanikai tulajdonságait két különböző gyártmányú állományelemző készülékkel vizsgáltam.

A TA.XT[®]plus (Stable Micro System Ltd., UK) állományelemzővel 5000 g-os mérési cellával mértem a szabadfilmek és a liofilizált minták törési szilárdságát. A készüléket, a filmek méréséhez egyedileg gyártott, de a gyári feltétellel geometriailag azonos, 8 mm belső átmérőjű feltétellel, 5 mm átmérőjű henger alakú rozsdamentes acél kutaccsal működtettük. 0,01 mm/s mérési sebesség mellett rögzítettem az erőelmozdulás görbék adatpontjait, majd az alábbi (E3) egyenlet alapján számítottam a törési szilárdságot (PS):

$$PS = \frac{F}{A} \quad (E3),$$

,ahol F a töréshez szükséges erő (Newton egységben), az A pedig a mért minta (alap) területe, amely ennél a feltétnél 50,3 mm² volt, a PS -t N/mm², azaz megapascal (MPa) egységben kaptam meg. Az adatgyűjtést és a készülék irányítását Texture Expert (Stable Micro System Ltd., UK) szoftverrel végeztem.

A Brookfield LFRAC3-4500 típusú állományelemző készülék (Brookfield Eng. Lab. Inc., USA) 0 - 4500 g-os mérési tartománnyal rendelkezett, amelyen belül 0,5 g-os pontossággal határozta meg az alkalmazott erőt. A filmek méréséhez film-rögzítő feltétet (Brookfield TA-FS Film Support Fixture, belső átmérő: 10 mm) és TA-8 (6,35 mm átmérőjű, gömb alakú, rozsdamentes acél) kutacsot (*probe*-ot) alkalmaztam. A PS -t az első módszernél leírt (E3) egyenlettel számoltam, az A minden mintánál 78,5 mm² volt. A készülék vezérlését, az adatok tárolását, kiértékelését Brookfield TexturePro CT (V1.4 Build 17) szoftverrel valósítottam meg.

Az exportált adatokat mindkét esetben MicroCal[™] (Northampton, USA) Origin[™] 4.10 programmal ábrázoltam.

3.4.9. *In vitro* kioldódás vizsgálat

3.4.9.1. *Kioldódás vizsgálat és mintavétel*

Az *in vitro* kioldódás vizsgálatot Hanson SR-8 Plus kioldódás vizsgáló fürdőben végeztem, egyszerre 6, 3-3 párhuzamos méréssel, USP-2 (lapátos) módszerrel, 50/perc (50 RPM) keverési sebességgel, $37 \pm 0,5$ °C hőmérsékletre temperált, 300 ml térfogatú, pH=6,8-as gyógyszerkönyvi (Ph. Hg. VIII.) foszfátpuffert alkalmazva kioldóközegként. A kioldódás 15., 30., 45., 60. és 90. percében 500 µl mintát vettem automata pipettával, a puffer pótlása nélkül. A mintákat 2,5 ml-es folyadék-kromatográfiás üvegcsébe töltöttem és lezártam.

3.4.9.2. *Kioldódott hatóanyag mennyiségének meghatározása*

A kioldódott hatóanyag mennyiségének meghatározását Agilent Infinity 1260 folyadékkromatográfival, Agilent 6460 Triple Quad tömegspektrométerrel (MS) végeztem. Az fordított fázisú folyadékkromatográfiás (RP-LC) elválasztást 30 µl minta injektálásával, 0,5 ml/perc áramlási sebességű, 90% ioncserélt vízben 0,1 mol/dm³ HCOOH (hangyasav) és 10% acetonitrilt tartalmazó mozgófázissal (ún. eluenssel), 50 mm hosszú, 2,1 mm belső átmérőjű, 3,5 µm szemcseméretű, 25 °C-os oszloptérben elhelyezett, C18 Poroshell 120EC kromatográfiás oszlopon valósítottam meg. A detektálás Jet Stream elektropray ionforrással, MRM módszerrel, pozitív ionizációs módban, $m/z = 678,5$ ($[M/2+H]^+$) prekursor ionnal, 135 V fragmentor-feszültséggel, $m/z = 146,9$ termék ionnal történt. A kiértékelést Agilent MassHunter B.02.00 programmal végeztem.

3.4.9.3. *A kioldódási görbék hatóanyagleadási modellekkel való jellemzése*

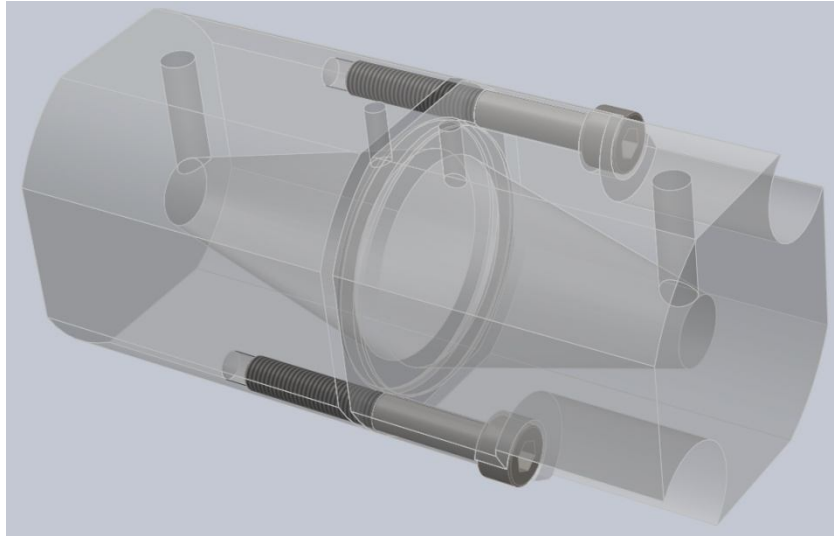
A hatóanyag kioldódási mechanizmusának meghatározására az öntött filmek és az ostyák kioldódás-görbéit az alábbi, irodalomban "power law"-ként is ismert, leíróik után Korsmeyer-Peppas (K&P-) összefüggés [Peppas 1983, Ritger és Peppas 1987, Siepmann és Peppas 2001] segítségével vizsgáltam:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (\text{E4}),$$

ahol M_t és M_∞ a kioldódott hatóanyag összegzett (kumulatív) mennyisége t időpillanatban és a végtelen időpontban (amely a teljes hatóanyag-mennyiséget jelenti). A k a sebességi állandó, amely a hatóanyag-polimer rendszer szerkezetétől és geometriájától függ. Az n a diffúzió transzport-mechanizmusát jellemző állandó, értéke nem Fick-féle kinetika esetében 0,5 és 1,0 közé esik, míg Fick-törvénnyel leírható diffúzió esetén 0,5 körüli. Nulladrendű kinetikáról (*case II transport*) beszélhetünk, ha az $n=1$, illetve ún. szuper-nulladrendről, ha az n értéke nagyobb, mint 1 [Singh és mtsai 2008]. A modell 60%-os kioldódásig a minta geometriájától függetlenül alkalmazható [Singh és mtsai 2011], 60%-nál nagyobb értékek esetében azonban az illeszkedés jósága a gyógyszerforma alakjától függ, pl. az alaplap sugaránál sokkal nagyobb magasságú henger alakú minták esetében nem megfelelő [Kosmidis és mtsai 2003]. A kinetikai paramétereket 3 párhuzamos mérés eredményeinek átlagából számítottam MicrosoftTM Excel 2007 program segítségével.

3.4.10. *Ex vivo kioldódás vizsgálat*

Az *ex vivo* kioldódás vizsgálatához egyedi készüléket terveztem, amely egy vertikális Franz-cellának vagy egy egyszerűsített Ussing-kamrának tekinthető [Bor-Caymaz és mtsai 2011, Patel és mtsai 2012]. A készülék modellje a 24. ábrán látható.



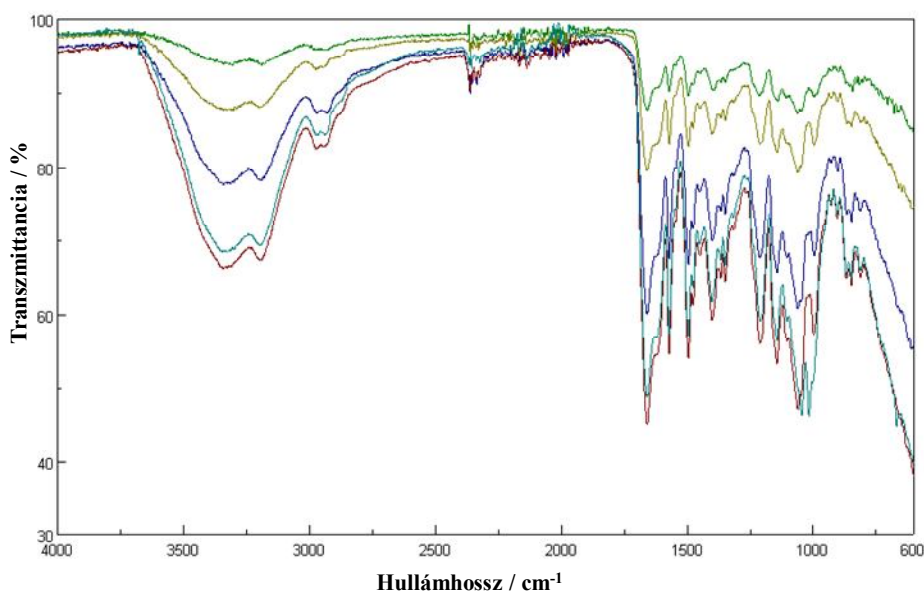
24. ábra Az ex vivo kioldódás vizsgáló készülék 3D-s terve

A készülék két, az összeillesztést segítő részeket leszámítva, egyforma részből áll. Mindkét rész kb. 10 ml-es belső térfogatú, tetején 2-2 kivezetést tartalmaz, amely esetleges későbbi áramlás-modellezést, illetve a mintavétel célját szolgálja. Az ún. donor (amely a vizsgált gyógyszerformát tartalmazza) és az akceptor-tér közé valamilyen biológiai (esetünkben sertés szájnyálkahártya-) membránt helyezve, a készülék gumigyűrűs szigetelésének köszönhetően vízhatlanul, két csavarral egymáshoz rögzíthető, így, akár az egész készüléket vízfürdőben termosztálva, elvégezhető benne a penetrációs, hatóanyag-átjutási kísérlet. A vizsgálatokat ebben az esetben is gyógyszerkönyvi pH=6,8 foszfátpuffer alkalmazásával végeztem, az átjutott hatóanyag-mennyiséget az akceptor-térből az in vitro kioldódás-vizsgálatnál (5.2.8.2. fejezet) leírt HPLC-MS/MS módszerrel határoztam meg.

4. Eredmények

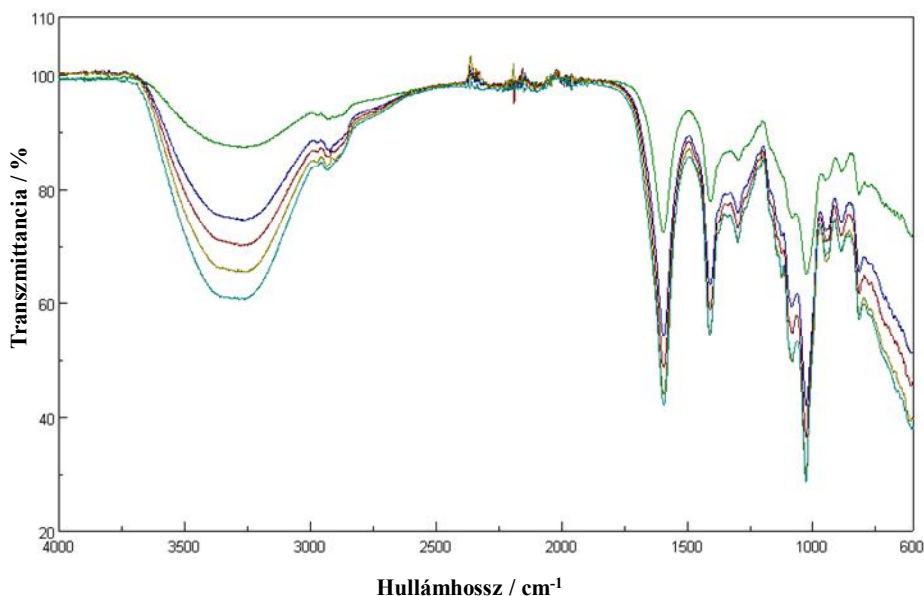
4.1. Preformulációs vizsgálatok eredményei

A preformulációs vizsgálatokat, amelyek segítségével a segéd- és a hatóanyagok között esetlegesen kialakuló interakciók deríthetők fel, az FTIR vizsgálatokkal kezdtem. A segédanyag, a hatóanyag és a fizikai keverékek 4 hetes tárolása során hetente mértem a minták FTIR-spektrumát. A mérési eredmények az alábbi (25-29.) ábrákon láthatók.



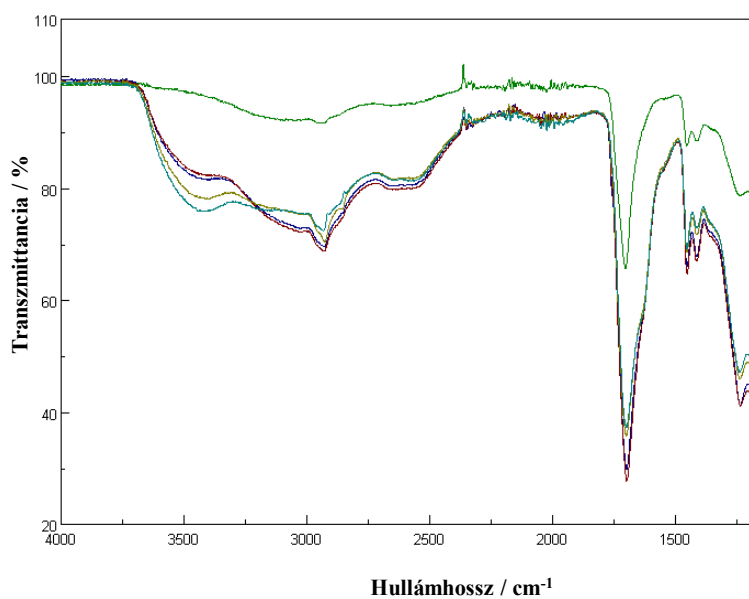
25. ábra B₁₂ hatóanyag FTIR spektrumai: tárolás nélkül, 1 hét, 2 hét, 3 hét, 4 hét tárolás után

A hatóanyag tárolása közben nem tapasztaltunk változást az FTIR spektrumban, a tárolási körülmények között a hatóanyag stabilnak bizonyult.

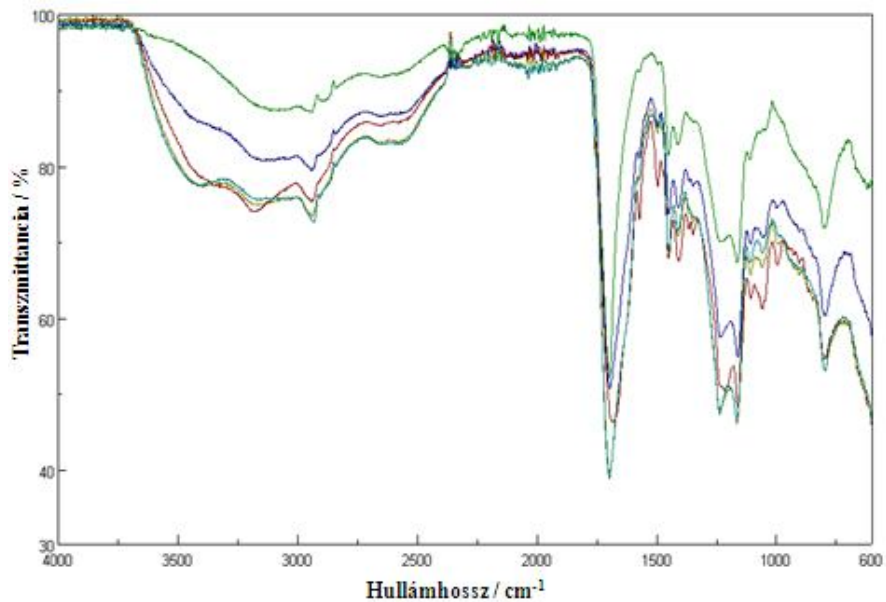


26. ábra SA segédanyag FTIR spektrumai: tárolás nélkül, 1 hét, 2 hét, 3 hét, 4 hét tárolás után [Szabó és Zelkó 2011]

Az alkalmazott segédanyagok közül az SA FTIR spektrumán látható a legjobban a segédanyag vízfelvétele. A 3500 cm⁻¹ körüli tartományban a tárolás során növekvő intenzitású vízcsúcs jelenik meg. A 0 és 1 hetes minta közötti jelentősnek mondható intenzitáskülönbségek az FTIR intenzitás-bizonytalanságából fakadnak. Ugyanabban a mintában is változhatnak az intenzitások, hiszen a kristályok, szemcsék elhelyezkedésétől kezdve, a minta térfogatán át, a mérőfej mintára zárásának erősségéig sok, nehezen kontrollálható tényező befolyásolja a mért csúcsintenzitásokat. Az azonban jól látható, hogy az egyes csúcsok intenzitásaránya állandó marad.

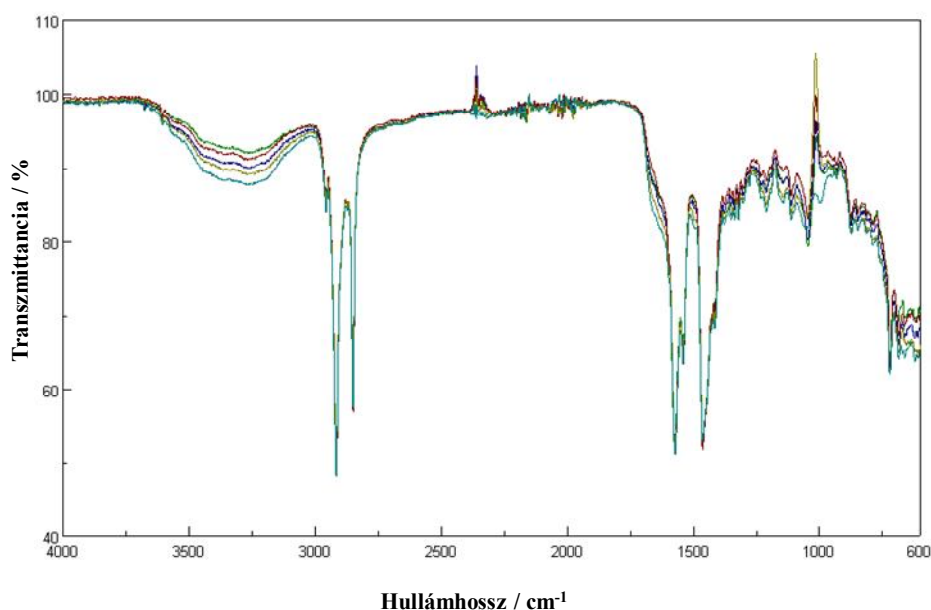


27. ábra CP segédanyag FTIR spektrumai: **tárolás nélkül, 1 hét, 2 hét, 3 hét, 4 hét** tárolás után [Szabó, Süvegh és Zelkó 2011]



28. ábra Carbopol Ultrez 10NF segédanyag FTIR spektrumai: **tárolás nélkül, 1 hét, 2 hét, 3 hét, 4 hét** tárolás után [Szabó, Süvegh és Zelkó 2011]

A 27. és a 28. ábrákon látható spektrumok összehasonlításából elmondható, hogy a hasonló szerkezetű Carbopol polimerek különböző vízfelvételi tendenciát mutatnak, míg a Carbopol 71G (CP) egy hét tárolás során nagy mennyiségű vizet vesz fel, majd ezt követően víztartalma csak lassan nő, addig a Carbopol Ultrez 10NF a tárolás első két hetében hasonló mennyiségű vizet köt meg, a vízfelvétel üteme ezután lassul le.



29. ábra B₁₂ hatóanyag és Mg-sztearát segédanyag keverékének FTIR spektrumai:

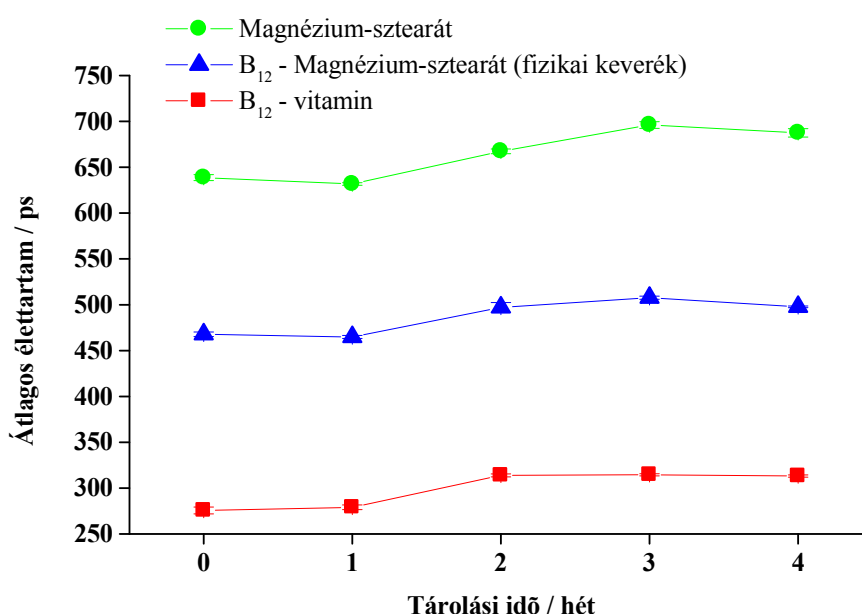
tárolás nélkül, 1 hét, 2 hét, 3 hét, 4 hét tárolás után

A Mg-sztearát kontrollként szerepel a mérési sorozatban, jól látható, hogy a hatóanyaggal alkotott keveréke kis mennyiségű vizet köt meg (amely valószínűleg a nagy páratartalmú közegben a felületi nedvesedés jele), de nem jelenik meg új csúcs, nincs intenzitás-változás sem. Az FTIR vizsgálatok lezárása után a különböző minták PALS elemzését végeztem el.

A PALS vizsgálat kitűnően alkalmas a hatóanyag-segédanyag interakció gyors felderítésére. A hagyományos PALS módszerrel kapott élettartó értékeket intenzitásukkal

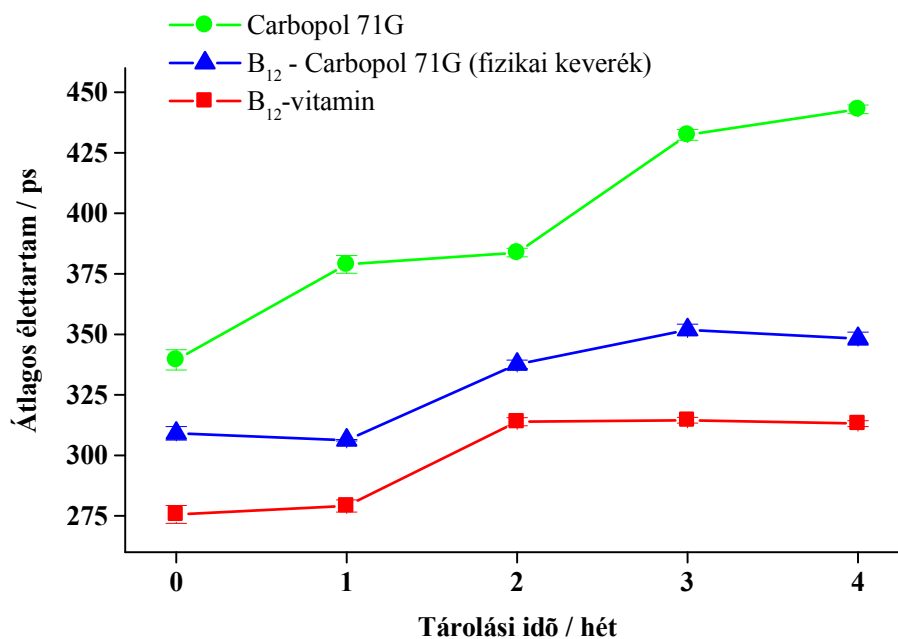
súlyozva átlagoltuk, majd ezt az átlagos élettartamot ábrázolva a tárolási idő függvényében az 30-33. ábrán látható görbéket kaptam.

A Mg-sztearát, ahogy az FTIR vizsgálatok során is, kontrol mintaként szerepel, a hidrofób segédanyag és a vízben jól oldódó, hidrofil hatóanyag között nem vártunk interakciót. A 30. ábrán látható adatok ennek megfelelőek, a fizikai keverék pontjai a hatóanyag és a segédanyag mérési pontjainak átlagánál jelentkeztek Ez a jelenség igazolta, hogy a pozitron statisztikusan annihilálódott egyik, illetve másik fázisban, a fizikai keverék a tárolás időtartama alatt mindvégig a két alkotó különálló fázisaként viselkedett.

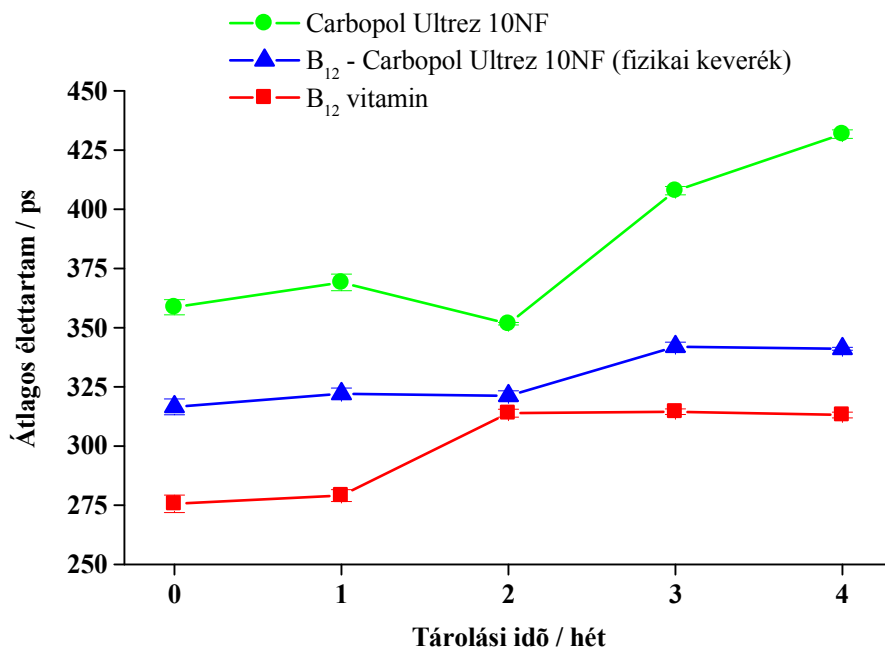


30. ábra Átlagos élettartam értékek B₁₂– Mg-sztearát rendszer esetében

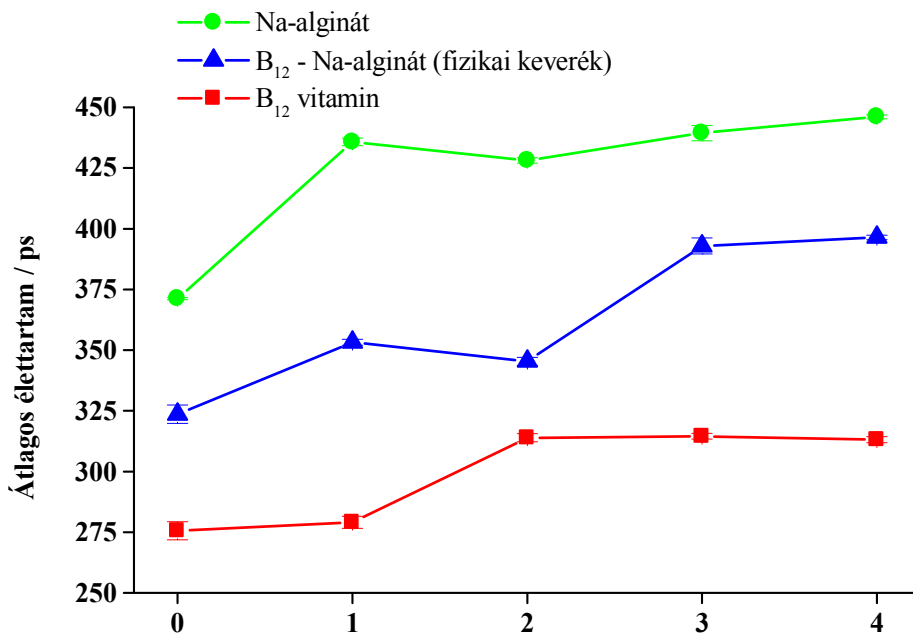
A két Carbopol polimer esetében az interakció jól megfigyelhető, a 31. és a 32. ábrán a fizikai keverék átlagos élettartam értékei nem az összetevők pontsorozatának felénél jelentkeznek, hanem fokozatosan az alsó harmad felé tolódnak. A két segédanyag esetén csak a folyamat időbelisége különbözik, a gyártó által lassan nedvesedőnek leírt Carbopol Ultrez 10NF-nek két hét alatt alakítja ki az interakciót, míg a CP polimer már a tárolás első hetének végére kapcsolatba lép a B₁₂-vel. A SA esetében az interakció gyenge, amit az átlagtól való eltéréshez szükséges hosszú idő és a megváltozás váltakozó előjele is mutat (33. ábra).



31. ábra Átlagos élettartam értékek B₁₂ - Carbopol 71G (CP) rendszer esetében
[Szabó, Süvegh és Zelkó 2011]



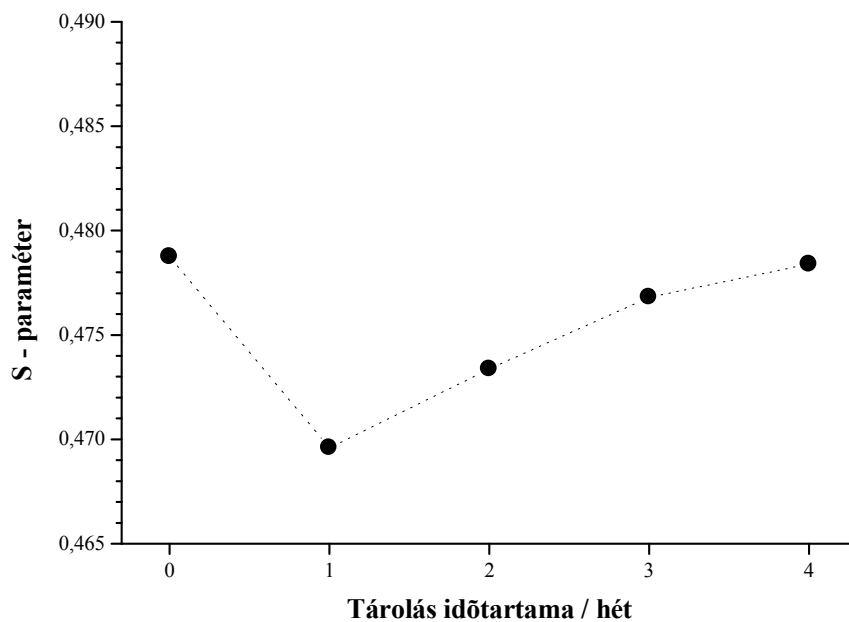
32. ábra Átlagos élettartam értékek B₁₂ - Carbopol Ultrez 10NF rendszer esetében
[Szabó, Süvegh és Zelkó 2011]



33. ábra Átlagos élettartam értékek B₁₂ - Na-alginát (SA) rendszer esetében

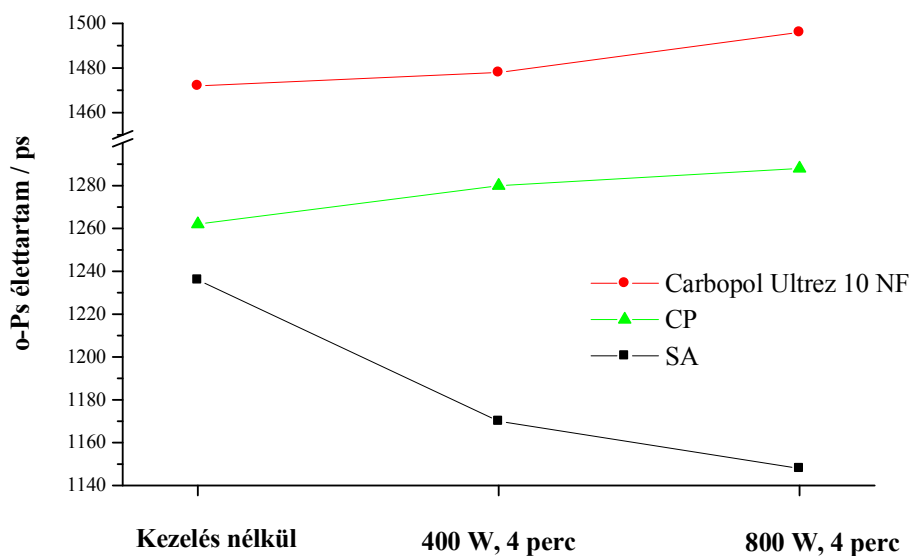
Az átlagidőkből tehát megállapítható, hogy a módszer Mg-sztearát esetében nem mutat interakciót, a Carbopol polimerek eltérő nedvesedési sebességét érzékeli, a SA esetében a CP-nél gyengébb, de mérhető interakciót mutat a hatóanyaggal a fizikai keverékek 4 hetes tárolása alatt.

A Carbopol 71G (CP) esetében a hagyományos PALS vizsgálatot DB méréssel is kiegészítettem, amelynek eredményeit a 34. ábra mutatja. Az S-paraméter kezdeti csökkenése a segédanyag nemkötő elektronpárjainak (amelyek a tipikus kis energiájú elektronok) csökkenő arányát jelzi, amely a tárolás első hetében bekövetkező vízfelvételre utal. A görbe az első héten emelkedni kezd, ami a kialakult H-híd kötések gyengülését jelzi, a PALS értékekkel összhangban (31. ábra), a polimer duzzadására utal.



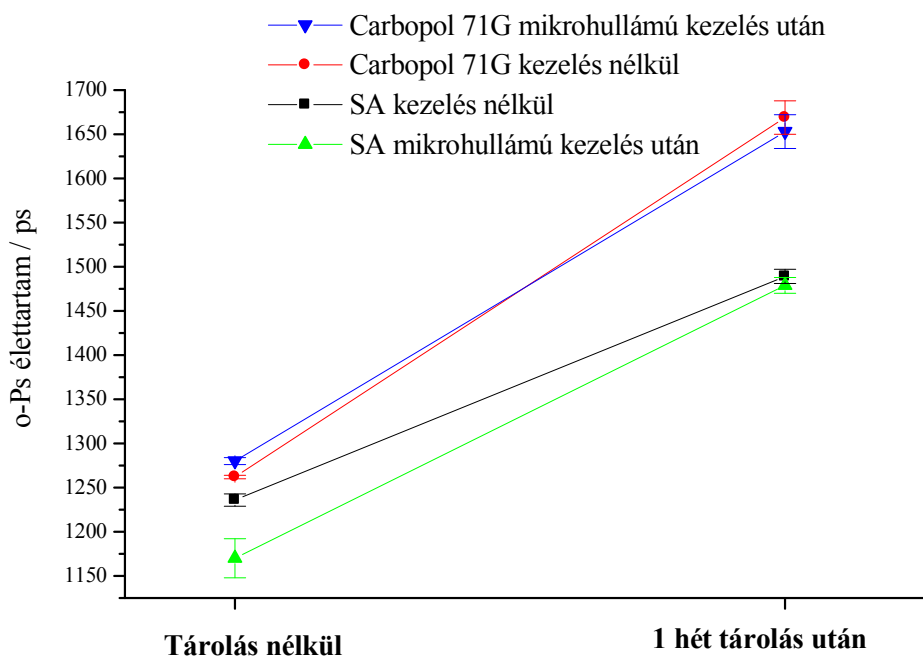
34. ábra A CP polimer S-paraméterének (DB mérés) változása a tárolás során
 [Szabó, Süvegh és Zelkó 2011]

A segédanyagok esetleges degradációjának, szerkezetváltozásának vizsgálatára (a 3.4.5. fejezetben részletezett) mikrohullámú kezelést alkalmaztam. A segédanyagok mikroszerkezetének válaszát a mikrohullámú besugárzásra a 35. ábra illusztrálja. A CP és a vele rokon szerkezetű Carbopol Ultrez 10NF polimer növekvő élettartamokat, míg a SA segédanyag o-Ps élettartamai csökkenő tendenciát mutatnak. A jelenség lehetséges magyarázata az anyagok különböző struktúrájában keresendő, a SA részben kristályos, így vízvesztés hatására a kristályos szerkezete összeomlik, kisebb élettartamokkal jellemezhető formává alakul, míg a Carbopol polimerek az alkalmazott hőhatásra megtartják eredeti szerkezetüket, üregeik az őket részben kitöltő víz távozása után nagyobbaknak látszanak a PALS módszer nukleáris kutacsának (*nuclear probe*) szempontjából.



35. ábra Mikrohullámú kezelések hatása a különböző polimerek o-Ps élettartam értékeire [Szabó, Molnár és mtsaik 2011]

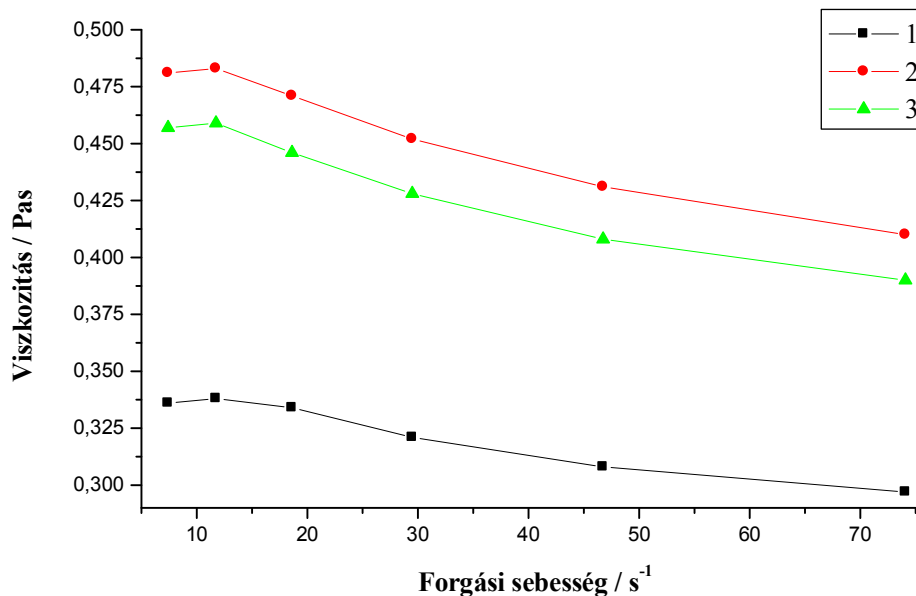
A folyamat, mint azt a 36. ábra is mutatja teljes mértékben reverzibilis, a szerkezetek már egy hét tárolás hatására is "regenerálódnak", így ezzel a technikával érdemi változást nem tudtam elérni a formulációs lépések során.



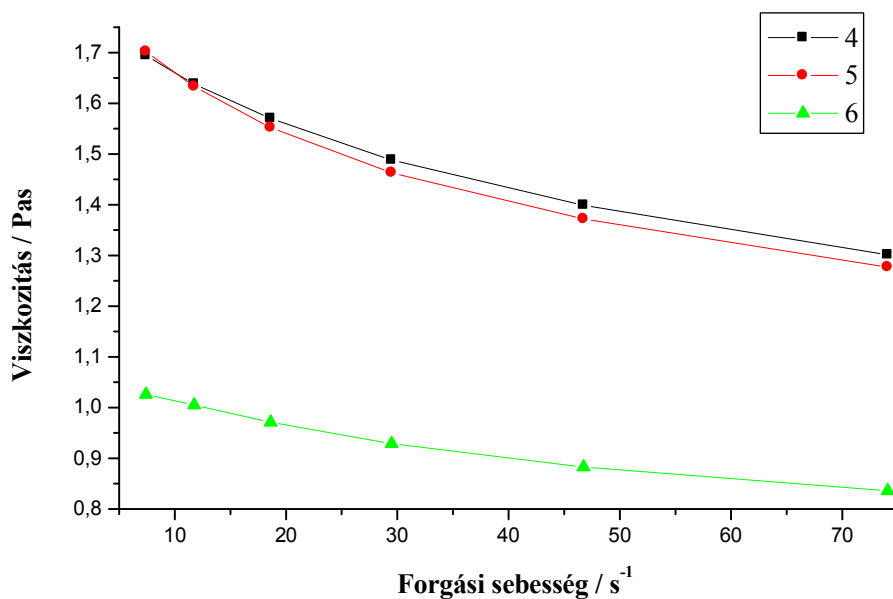
36. ábra Mikrohullámú kezelések reverzibilitásának vizsgálata, o-Ps élettartamok alapján [Szabó, Molnár és mtsaik 2011]

A preformulációs vizsgálatok alapján a SA-t megfelelő hordozóanyagának ítéltém, míg a két Carbopol polimer közül a CP-t választottam a további, formulációs vizsgálatokhoz.

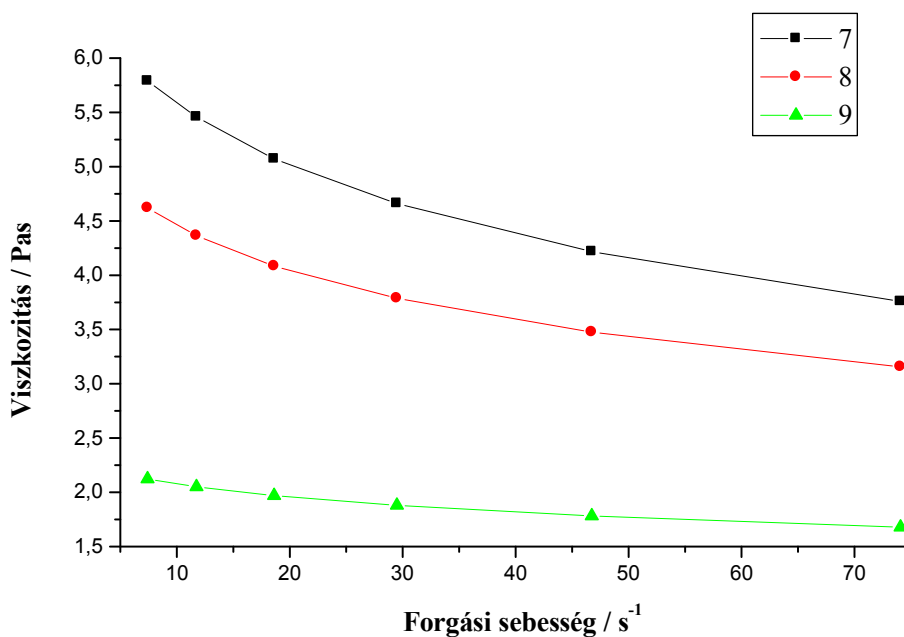
A segédanyagok kiválasztása után elkészítettem az 3.3.1. fejezetben részletezett összetételű hidrogéleket. A jól láthatóan eltérő folyási tulajdonságokkal rendelkező gélek vizsgálatát viszkozitás-méréssel kezdtem. A 37-39. ábrákon látható viszkozitás-görbéket az 3.4.2. fejezetben leírt módszerrel mértem. Összességében elmondható, hogy a mérőfej forgási sebességének növelésével a viszkozitás minden összetétel esetében csökkent, ami metodika jóságát és a gélek hasonló reológiai tulajdonságát bizonyítja, hiszen nagy viszkozitású, főként a filmképző polimerek géljeinek esetében gyakran előfordul, hogy a mérés közben a gél beszárad, amit a növekvő viszkozitás-értékek is jeleznek.



37. ábra A 3,0 % SA-t tartalmazó összetételek viszkozitás-értékei a nyírási sebesség függvényében



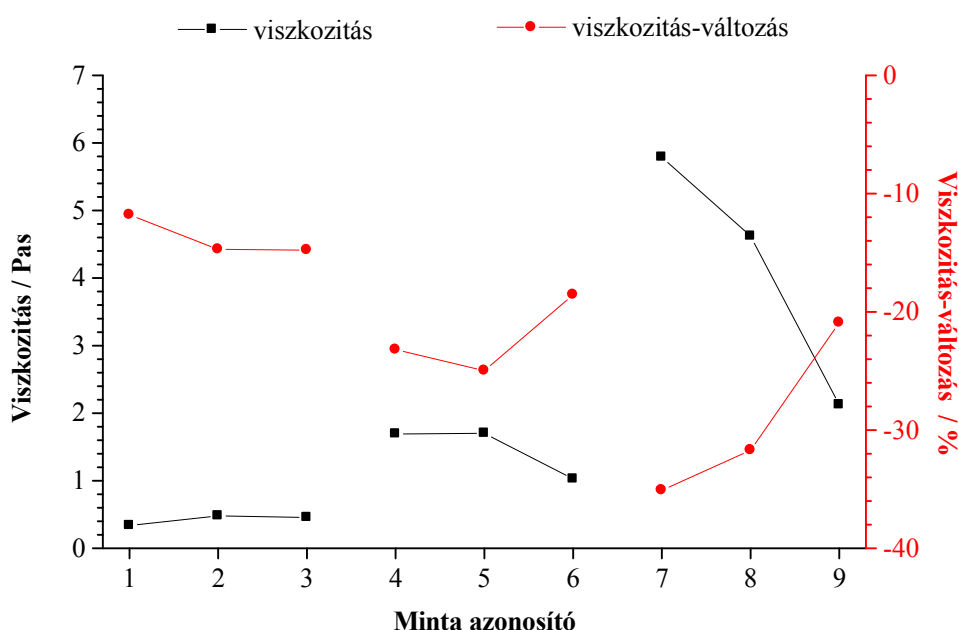
38. ábra A 4,5 % SA-t tartalmazó összetételek viszkozitás-értékei a nyírási sebesség függvényében



39. ábra A 6,0 % SA-t tartalmazó összetételek viszkozitás-értékei a nyírási sebesség függvényében

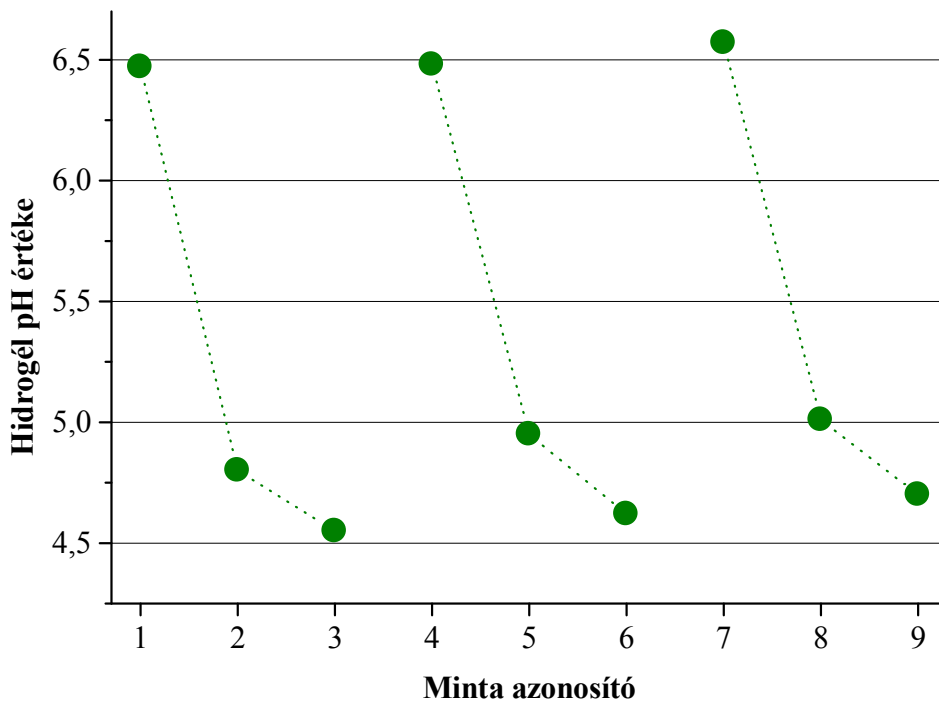
A kezdeti (7,409/s forgási sebességnél) viszkozitás-értékeket és ezek megváltozását a legnagyobb forgási sebesség (74,09/s) elérésekor ábrázolva, a csökkenő

tendenciánál többet is megtudunk a hidrogélek viszkozitásáról. Látható az 41. ábrán, hogy a viszkozitás értékek és változásuk szinte pontosan tükörképi párként ábrázolhatók, a 3,0% SA összetételknél a viszkozitás enyhén nő a növekvő CP mennyiséggel (amely könnyen magyarázható a növekvő összpolymer-koncentrációval), a viszkozitás-változása hasonló mértékben, de negatív irányba nő. A 4,5% SA-t tartalmazó mintákban a viszkozitás maximumgörbét ír le, a viszkozitás-változás ugyancsak maximumgörbét mutat, csak negatív-irányba. Végül a 6,0%-os SA összetételek meredeken csökkenő viszkozitását, hasonló ütemben csökkenő különbség jellemzi a kezdeti értékhez képest.



40. ábra A különböző összetételű hidrogélek viszkozitás értékei (a legkisebb alkalmazott forgási sebesség esetében) és változásuk a legnagyobb sebességnél a legkisebbhez képest

A viszkozitás értékek változásának okát keresve, az akrilsav-származék (CP) pH-hatásának kizárására, megmértem a gélek pH-értékét (módszer: 3.4.3. fejezet). A mérési eredmények azt mutatják, ahogy egy só (SA) erősebb sav hatására (CP) részlegesen protonálódik, miközben a gél pH-ja a sav hozzáadása miatt csökken, de ez a jelenség a viszkozitás-változásokat nem magyarázza. A kémhatás savas irányba való eltolódása a sav mennyiségének növelésére nő, míg nagyobb sómennyiség esetében csökken a puffer-hatás miatt. Ez a tendencia látható az 41. ábrán.

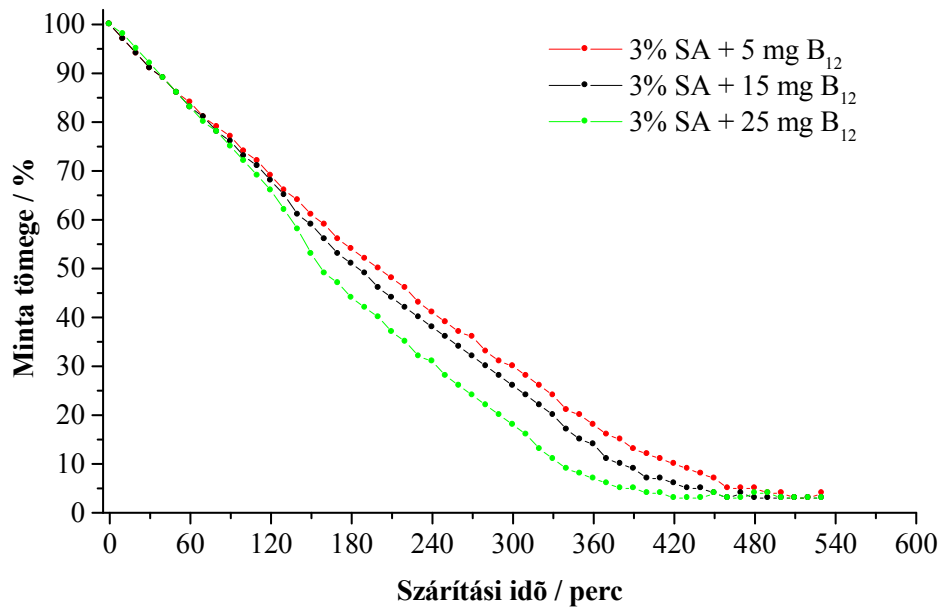


41. ábra A különböző összetételű hidrogélek pH-értékei

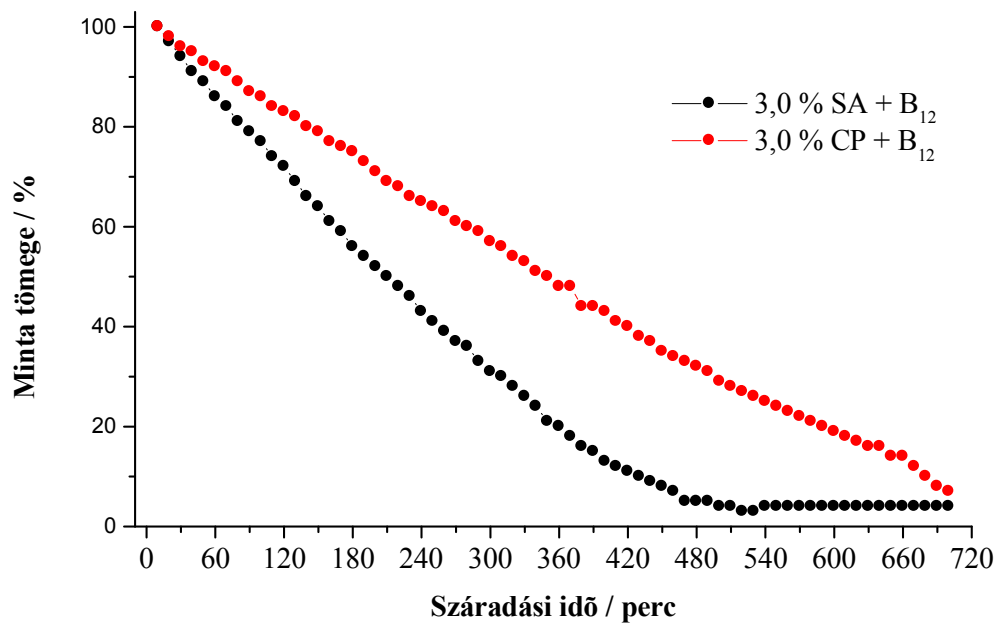
A preformulációs szakasz mintáinak viszkozitásban és pH-értékben mutatkozó, várttól eltérő viselkedése indokolta a SA-CP kompozitok szerkezet-változásának további vizsgálatát a CP hatásának magyarázatára.

4.2. A heterogenitás vizsgálatának eredményei

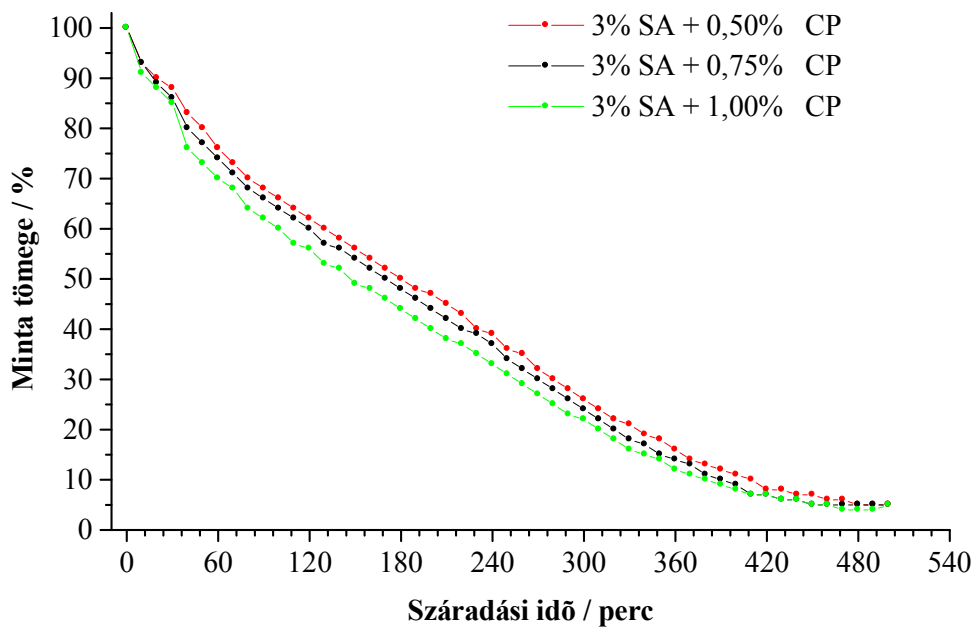
Az interakciók felderítésére különböző CP-tartalmú, de azonos SA mennyiséget (3,0 m/m%) tartalmazó hidrogélekből öntött filmeket állítottam elő. A gél-film átmenet kinetikájának vizsgálatára 10 percenként mértem a rendszerek tömegének változását. Az eredmények a 42-44. ábrákon láthatók. Azt tapasztaltam, hogy a SA-alapú minták száradását mind a B₁₂ (42. ábra), mind kis mennyiségű CP polimer hozzáadása (44. ábra), bár nem szignifikánsan, de gyorsítja, annak ellenére, hogy a CP polimer száradása jóval lassabb, mint a SA-é (43. ábra).



42. ábra A 3,0 % SA-t tartalmazó összetételek száradási görbéi különböző B₁₂ mennyiség esetén

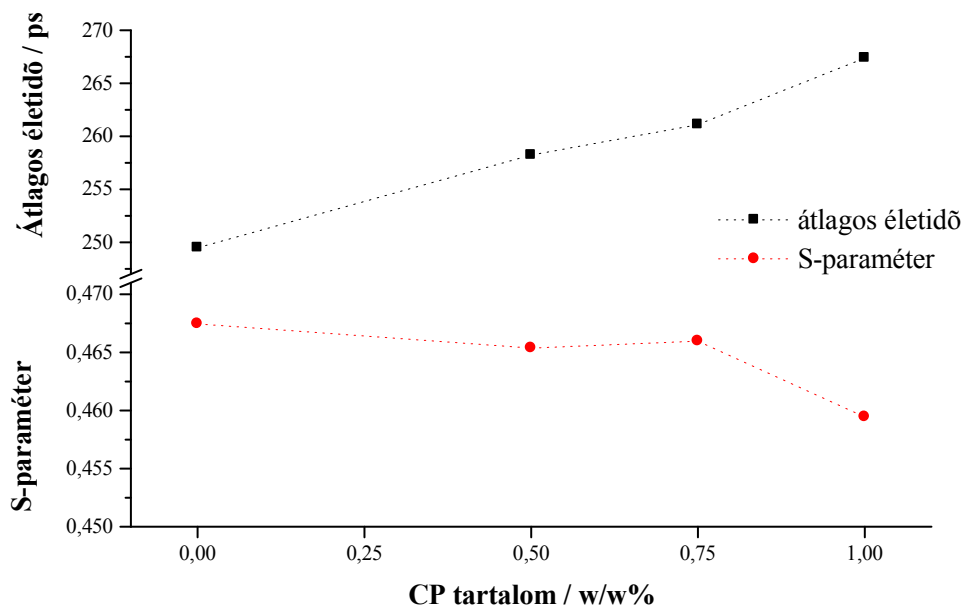


43. ábra A 3,0 % SA-t és a 3,0% CP-t tartalmazó összetételek száradási görbéi azonos mennyiségű B₁₂ jelenlétében



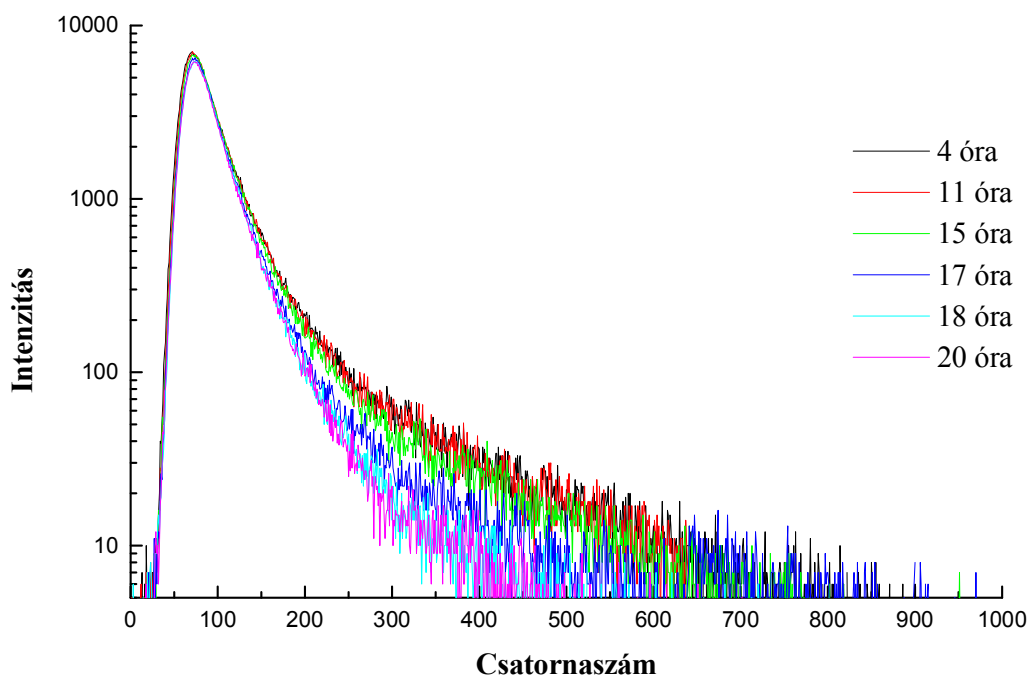
44. ábra A 3,0 % SA-t tartalmazó összetételek száradási görbéi különböző CP mennyiség esetén

A SA-CP kompozitok esetében a kialakuló filmek átlagos életidejét és Dopplerszélesedését is mértem (45. ábra). A PALS és a DB eredmények a száradási görbékből levont tendenciákat nem támasztották alá egyértelműen, hiszen az átlagos élettartamok nőttek, ami a polimer-rendszer duzzadására utal, a DB S-paraméterének csökkenése azonban a kötött állapotban lévő elektronok arányának növekedését jelzi, ami zártabb szerkezetre, kevesebb szabad vízkötőhelyre utal. A duzzadtabb szerkezet ellentmond a száradási görbék értékelésével, míg a kisebb S-paraméter alátámasztja a tömegmérésnél tapasztaltakat.



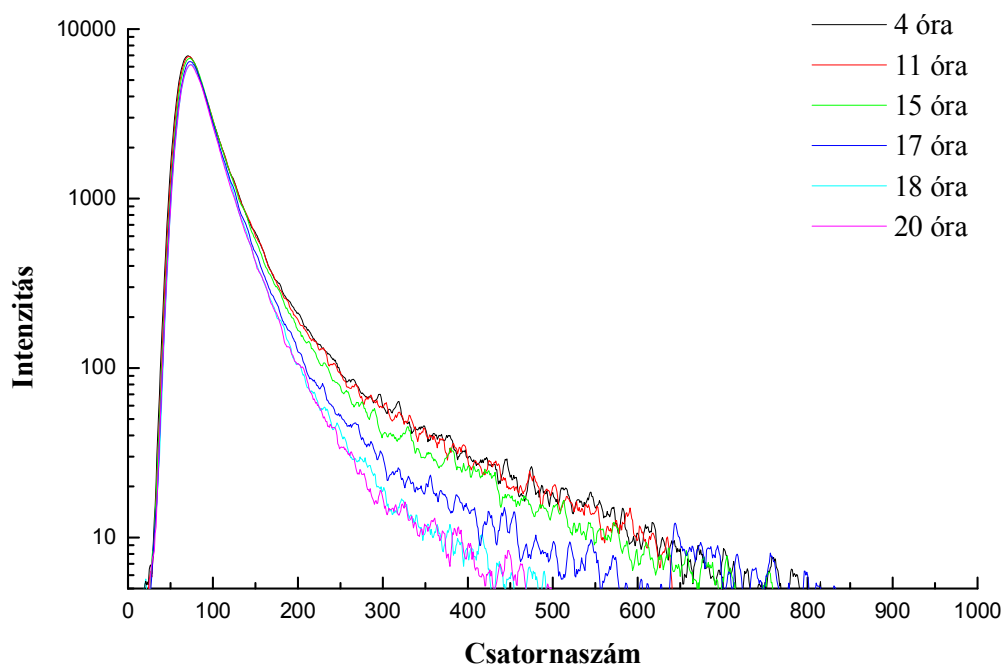
45. ábra A 3,0 % SA-t tartalmazó összetételek átlagos élettartamai és a DB S-paramétere különböző CP mennyiség esetén

Az ellentét feloldására a PALS módszer egy új, irodalomban még nem leírt mérési módszerét alkalmaztam. Az elgondolásom az volt, hogy a PALS mérést kevesebb külső paraméter befolyásolja, ezért könnyebben parametrizálható, mint a tömegmérés. Az alkalmazott mérési elrendezés az 3.4.4.2. fejezetben, a 23. ábrán, míg a 46. ábrán egy a "valós idejű" PALS módszerrel mért adatsor látható. Az 1 órás mérések rövidegsége (1.3.3.1. fejezet és a 14. ábra alapján) és főként a hagyományos mérésnél nagyobb távolság a detektorok között, amely a detektorok által lefedett térszöget és a detektálás hatékonyságát is csökkenti, együttesen eredményezik a viszonylag nagy szórást, amely az adatsor első 1000 csatornájának ábrázolásán jól látható.



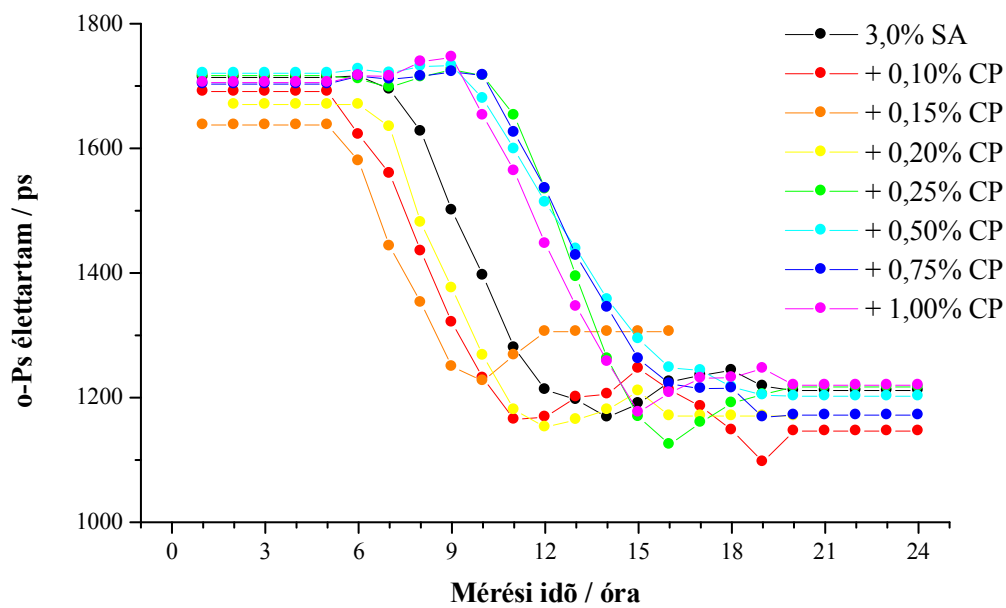
46. ábra A 3,0 % SA-t tartalmazó (1-es) minta PALS adatsorai a 24 órás mérés különböző időpontjaiban (4096 mérési csatornából 1-1000-ig ábrázolva)

Az ábrázolt adatokat úgy választottam ki, hogy a már a nyers adatok ábrázolásán is látható legyen a gél-film átmenet. A 46. ábrán is megfigyelhető, de a 47. ábrán, a mérési pontok (Savitzky-Golay módszerű) 11 pontos simítása után szembetűnő az átmenet helye: a 4 és 11 órás adatsorok szinte teljesen együtt futnak, a 15. órában már látszik a csúcs jobb oldalának eltolódása az alacsonyabb intenzitások felé, a 15, 17 és 18 órás adatok között fokozatos, de szabad szemmel is jól látható változás történik a csúcs alakjában, amely a 18. órától a 24. óráig már nem változik tovább (ahogy azt a 18. és 20. órában felvett spektrum mutatja).

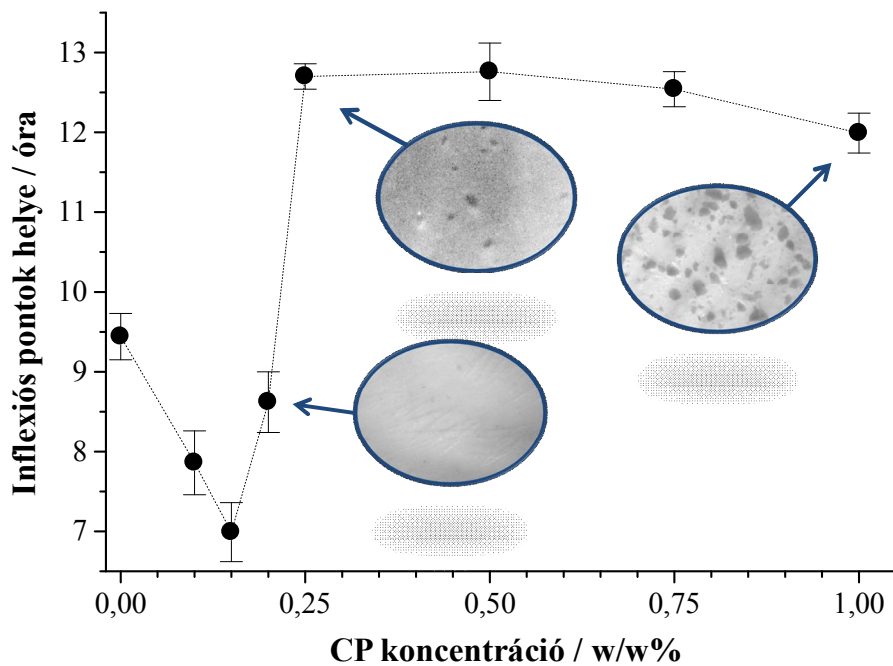


47. ábra A 3,0 % SA-t tartalmazó (1-es) minta PALS adatsorai 11 pontos simítás után a 24 órás mérés különböző időpontjaiban (4096 mérési csatornából 1-1000-ig ábrázolva)

Az eredeti görbéket a leírt módon (3.4.4.2. fejezet) kiértékeltem, majd a kapott o-Ps élettartamokat ábrázoltam az idő függvényében. A látható szigmoid jellegű görbék azonban túlságosan szórtak ahhoz, hogy függvény lehessen illeszteni rájuk, ezért ebben az esetben is simítást alkalmaztam, a 48. ábra a 9 pontos (Savitzky-Golay) simítás után mutatja a mérési eredményeket. Ezekre a görbékre már jó illeszkedéssel tudtam szigmoid-függvényt illeszteni, a görbék inflexiós pontjait foglaltam össze az 49. ábrán. A CP hozzáadás kis mennyiségben gyorsítja a száradást, valószínűleg a CP elfoglalja a SA szabad vízkötő helyeit, így a hidrogélek nedvességtartalma gyorsabban tud távozni. Ez a hatás SA:CP=12:1 polimeraránytól megszűnt, a CP feltehetően túl nagy mennyiségben van jelen a kompozitban, a minta heterogénné válik, amit a B₁₂ vitamin vörös színe jól láthatóvá tesz; a filmekben apró piros pöttyök jelennek meg (49. ábra, kis képek). Ezzel a módszerrel sikerült egyértelműen bizonyítani, hogy a tömegmérés bizonytalansága miatt jutottunk helytelen feltételezésre, a PALS és DB eredményei helyesnek bizonyultak.



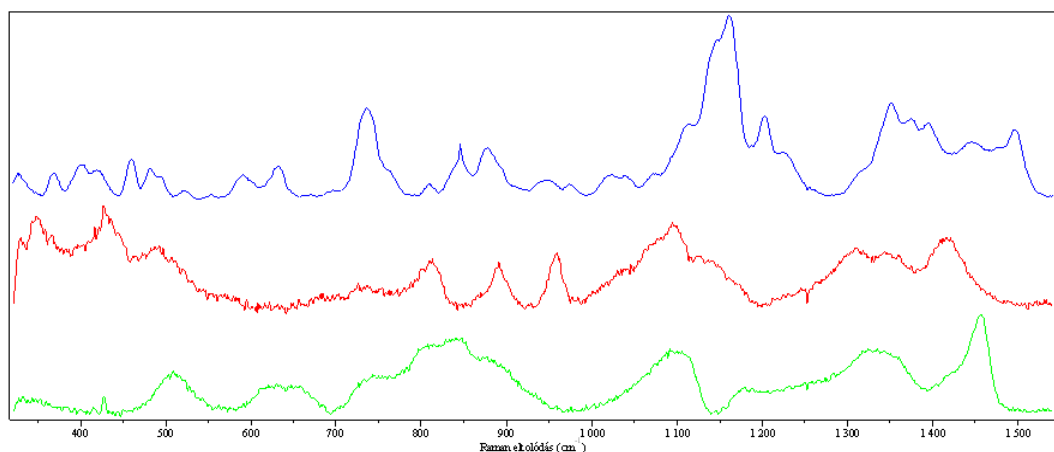
48. ábra A 3,0 % SA-t tartalmazó minták o-Ps élettartamai a 24 órás mérés különböző időpontjaiban [Szabó és mtsai 2012]



49. ábra A 3,0 % SA-t tartalmazó minták o-Ps élettartam-görbéire illesztett szigmoid-görbék inflexiós pontjai a CP koncentráció függvényében és a filmek mikroszkópos képei [Szabó és mtsai 2012]

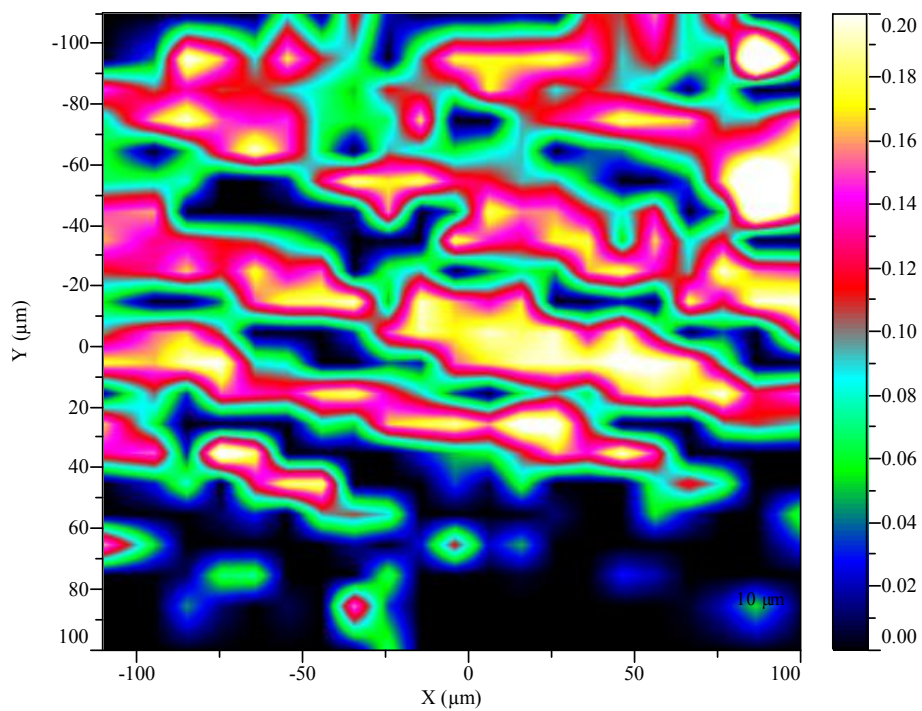
A CP mennyiségének és a száradás sebességének összefüggése leírhatóvá vált a "valós idejű" PALS méréssel, azonban a pöttyök összetételét nem ismertem. A piros pöttyök megjelenésének vizsgálatára Raman térképet készítettem, ezzel kívántam bizonyítani azt az elképzelést, miszerint a CP a kompozitból kiválva, önálló fázist alkot (amely kifejezés természetesen, mivel egyensúlyi folyamatokról beszélünk, csak egy "SA a CP-ben" fázis megjelenését jelenti a "CP a SA-ban" fázis mellett).

A Raman térképezés a 3.4.6. fejezetben leírtak szerint végeztem el. Az 50. ábrán láthatóak a polimerek és a hatóanyag Raman spektrumai. Ezen spektrumok alapján becsültem a komponensek mennyiségét a formulációs kísérletek legnagyobb CP:SA arányú, 3-as (3,0% SA és 0,25% CP) összetétele esetében. A CP polimer és a hatóanyag eloszlását a szabadfilm térképezett régiójában az 51., illetve az 52. ábra mutatja. Összevetve ezeket az ábrákat azonnal láthatóvá válik, hogy a hatóanyag ugyan nem kizárólag a nagy CP-tartalmú mérési pontokban van jelen, de rendeződése a mintában jól követi a CP-rendeződését, ezzel magyarázva a filmek pöttyösödését. Tehát a mérés eredményeként elmondhatom, hogy a B₁₂ jó vízoldható hatóanyagként követi a víz áramlását a gél-film átmenet során és koncentrálnodik a film leglassabban száradó pontjaiban, amelyek a már említett "SA a CP-ben" fázissal azonosíthatók..

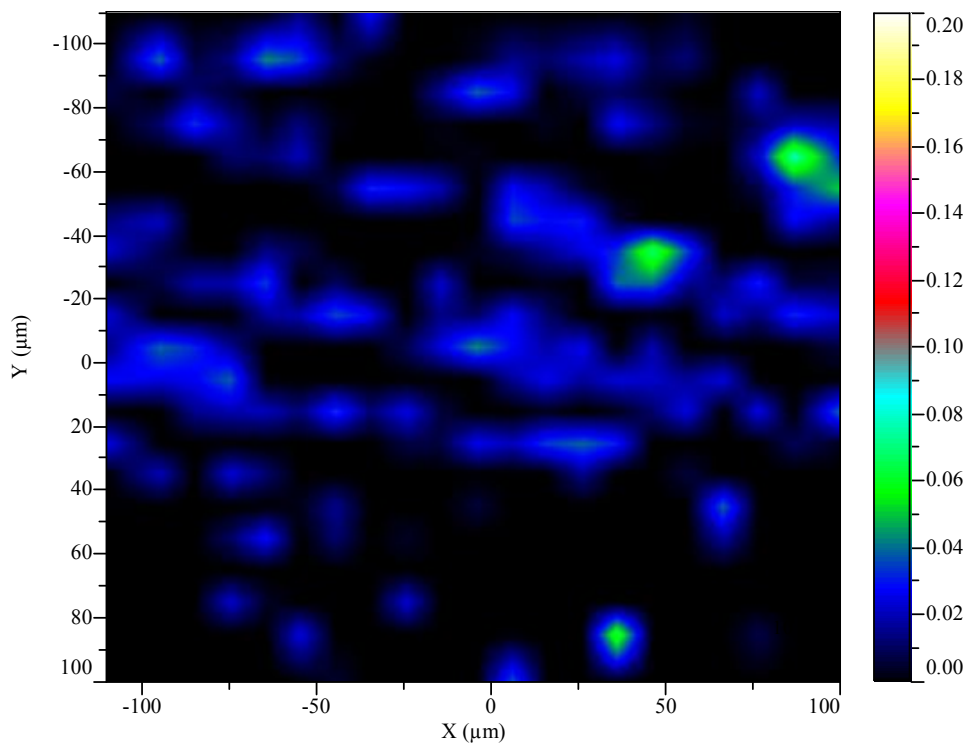


50. ábra A SA, CP segédanyagok és a hatóanyag Raman-spektrumai

[Sebe és mtsai 2012]



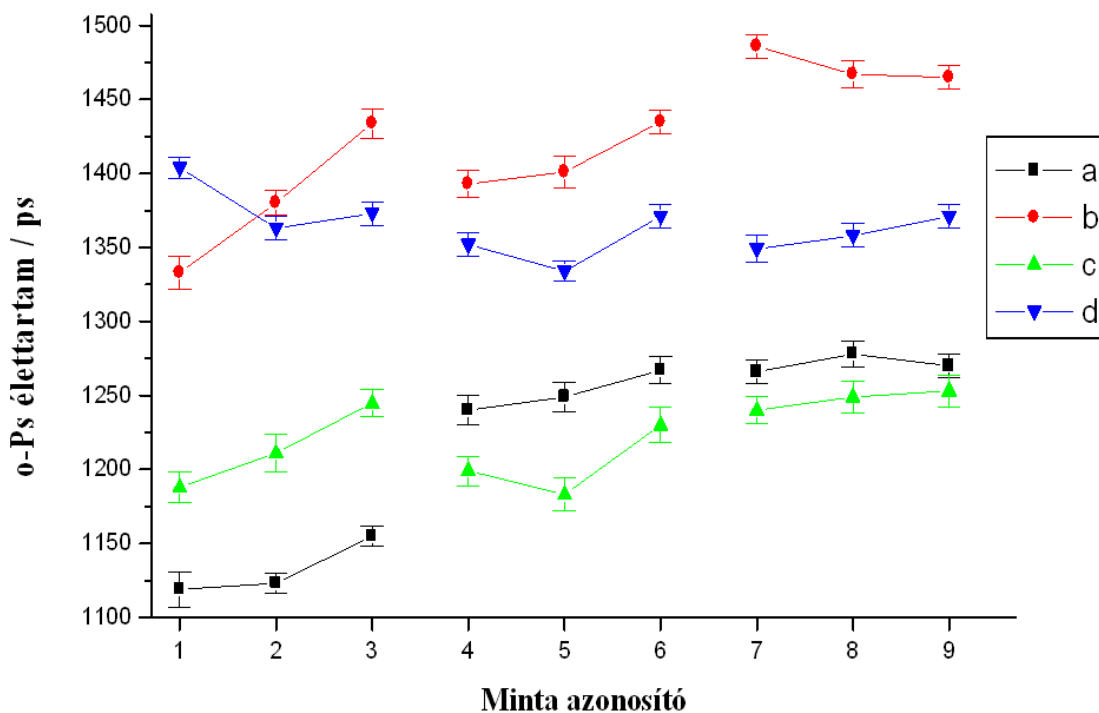
51. ábra A CP segédanyag becsült mennyiségi-eloszlása RAMAN-térkép alapján
 [Sebe és mtsai 2012]



52. ábra A hatóanyag becsült mennyiségi-eloszlása RAMAN-térkép alapján
 [Sebe és mtsai 2012]

A gél-film átalakulás vizsgálatával bizonyított heterogén rendszer kialakulása segített kiválasztani a formulációs lépésben alkalmazott minták összetételét. A Raman-térképpel vizsgált és a "valós idejű" PALS méréssel a legkisebb CP arányú heterogén rendszernek ítélt (későbbi 3-as) összetétel lett a legnagyobb relatív CP mennyiségű minta, ezzel a korlátozással alkottam meg az összetételek 3^2 faktoriális tervét. A 3-as összetétel, bár kis mértékben szabad szemmel is heterogénnek mutatkozott, a vizsgált minták közé került, ellenőrizendő, hogy ez a heterogenitás bármely későbbi vizsgálati módszerben, pl. a szilárdság mérésében kiugró értéket ad-e.

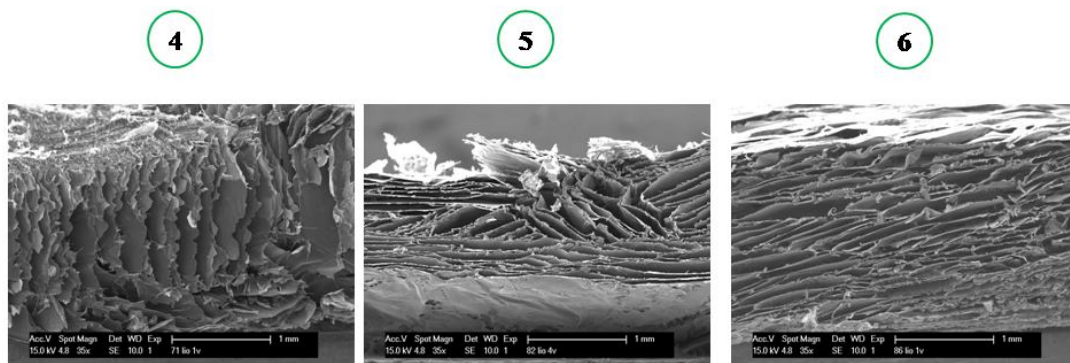
4.3. Az előállított gyógyszerformák vizsgálatának eredményei



53. ábra Az 1-9. összetételű az öntött és a liofilizált filmek o-Ps élettartamai tárolás nélkül és 4 hét tárolás után (a – öntött filmek, b – öntött filmek tárolás után, c – liofilizált filmek, d – liofilizált filmek tárolás után)

Ahogy a preformuláció során a fizikai keverékek esetében, úgy az elkészített filmeknél és ostyáknál mértem o-Ps élettartamokat, amelyeket az 53. ábrán ábrázoltam. A tendenciák a tárolás nélküli (az ábrán feketével jelölve) filmek esetében jól

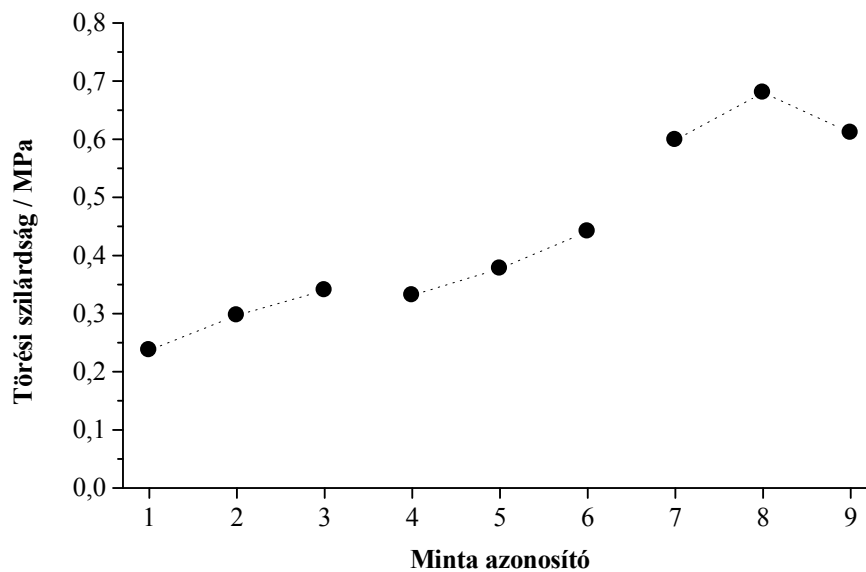
megfigyelhetők, a SA-tartalom növelésével az üregméretek nőnek, a CP hozzáadása a polimertartalom növelésével növeli az o-Ps élettartamokat, ez a hatása a növekvő SA-mennyiséggel (csökkenő CP:SA aránnyal) csökken. Hasonló tendenciát mutatnak a tárolt filmek is, csak duzzadásuk következtében nagyobb élettartam-tartományban. Az ostyák a filmekhez hasonló szerkezettel jellemezhetőek, ami azt jelzi, hogy bár a makroszerkezetük jelentősen különbözik, mikroszerkezetüket tekintve csak kis mértékben térnek el az öntött filmektől. A liofilizált minták PALS-görbéin anomálishan kis o-Ps értékkel jelenik meg az 5-ös összetétel.



54. ábra A 4-5-6. összetételű ostyák SEM fotói

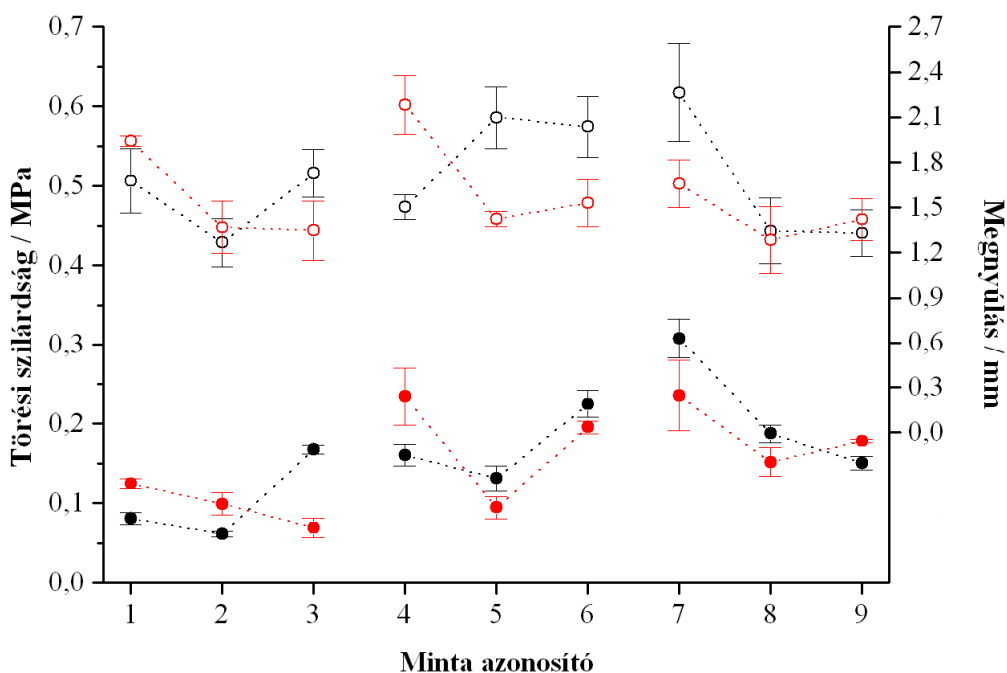
[Hetényi és mtsai 2012]

A 4,5 m/m% SA-t tartalmazó ostyákról keresztmetszeti képet is készítettem SEM módszerrel, 35-szörös nagyítással, amelyek az 54. ábrán láthatók. A képeken megfigyelhető, hogy az 5-ös összetételű ostya sokkal kevesebb, de vastagabb rétegből épül fel, amely tény alátámasztja a PALS mérésnél tapasztaltakat.



55. ábra A különböző összetételű öntött filmek törési szilárdsága

Az 55. ábrán láthatóak a TA.XT[®] plus készülékkel végzett törési szilárdságmérés eredményei. Jól látható mind a 3 CP koncentráció esetében a növekvő SA mennyiség hatására monoton növekvő szilárdság. A CP hozzáadására a 3,0% és a 4,5% SA-t tartalmazó minták esetén kis mértékű növekedést láthatunk, a 6,0%-os sorozatból azonban jelentősen kilóg a középső pont. A Brookfield készülékkel megismételt mérések adatai az 56. ábrán láthatók.



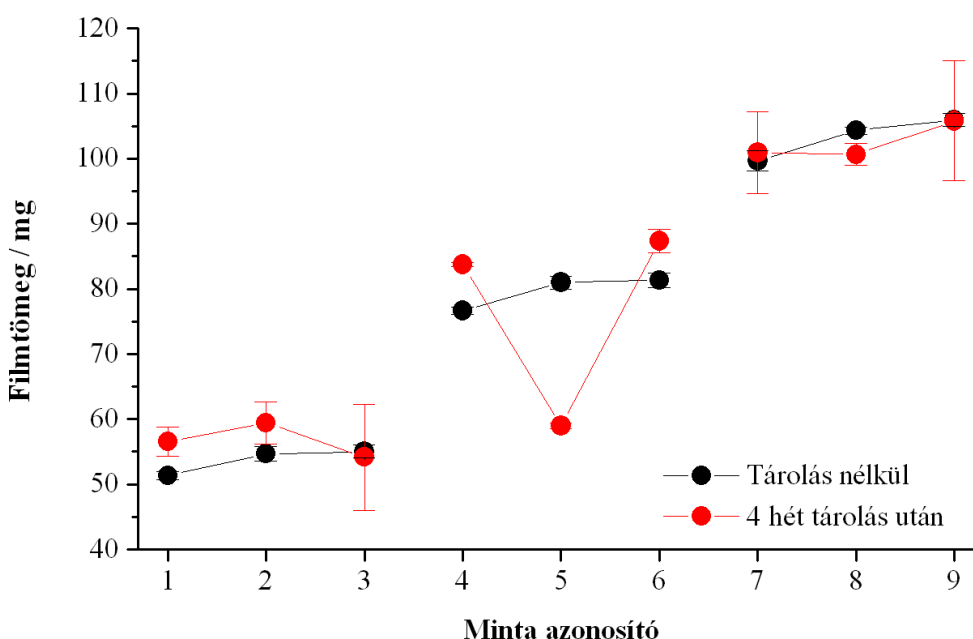
56. ábra Tárolt és tárolás nélküli öntött filmek törési szilárdsága és megnyúlása
 (Jelölések: tömör szimbólumok: törési szilárdság; üres szimbólumok: megnyúlás;
 színezés: **tárolás nélküli** és **4 hét tárolás utáni** minták)

A tendenciák az első sorozathoz hasonlóak. Az ábra alsó részén látható (tömör szimbólumokkal) a törési szilárdság értékek között ugyanúgy megfigyelhető az SA és CP mennyiség hatása is, ami meglepő, hogy a 9-es összetétel itt már a 0,25% CP-t tartalmazó (3., 6., 9. minta) sorozatból is kilóg, nem csak a 6,0% SA-t (7., 8., 9.) tartalmazóból.

A méréseket mindkét módszerrel elvégeztem a liofilizált minták esetében is, de annak ellenére, hogy az ostyáknál nem mutatkoztak olyan mérési problémák, mint a szabadfilmeknél (minta behúzódása, a rögzítés mentén szakadás), mégis nagyon nagy szórással mértem. Az jelenség okának feltárására a mintát mérés közben alulról, az 3.4.7.2 fejezetben leírt digitális mikroszkóppal figyeltem meg. Azt tapasztaltam, hogy a szórás nem a rögzítés hibája, hanem az alkalmazott módszeré, a TA-8 kutacs (d = 6,25 mm) túl kicsi az ostyák méréséhez. A liofilizált minták szerkezete annyira laza és inhomogén, hogy a kis kutacs egyszer megfeszíti az egész mérendő mintát, így valós szilárdságot mérünk, máskor pedig becsúszik két réteg közé, így szinte 0 (1,0 N körüli) erővel átjut a mintán. Az említett két eset természetesen csak a két véglet, a mérések

során egy minta akár 4-5 különböző szilárdság értéket is produkált, így ezzel a módszerrel pontosan nem határozható meg az ostyák szilárdsága, ezeket az eredményeket nem értékeltük.

Az 55-56. ábrák közötti különbség a rögzítő feltét és a kutacs különbözőségéből és a mérések számából adódik, A TA.XT[®]plus készülékkel csak 1-2 párhuzamos mérést végeztem, míg a Brookfield készülékkel 9 párhuzamost tudtam mérni, így szórást is számíthattam. Egy érdekes jelenség látható az 56. ábrán, az 5-ös szerkezet igen törekenynek mutatkozik a hasonló összetételű mintákhoz képest. Ennek okát kutatva a filmek tárolás közbeni tömegét mértem.

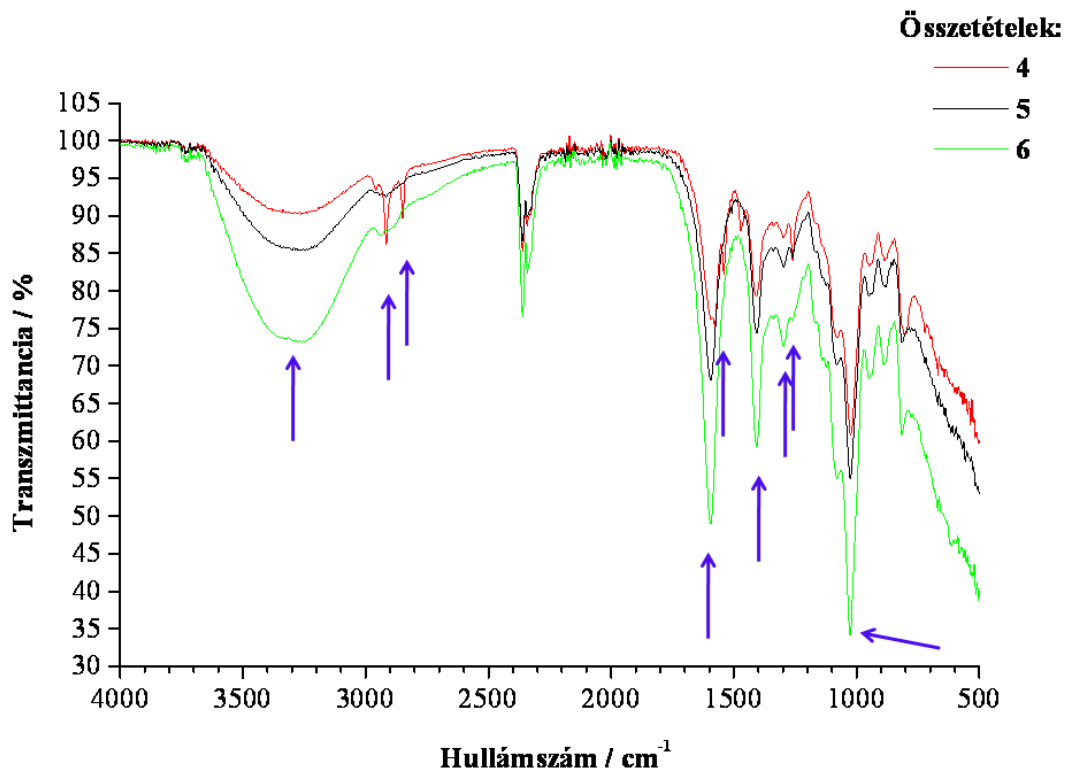


57. ábra A szabadfilmek tömege tárolás előtt és után

Az 57. ábrán látható módon a más összetételű szabadfilmek tömege tárolás hatására nem változik, vagy kicsivel nő, míg a 4,5% SA-t és 0,15% CP-t tartalmazó minta jelentős tömegvesztést mutat, tehát nagymennyiségű szerkezeti vizet veszít valószínűsíthetően a két polimer interakciója miatt, ami összhangban PALS mérésnél tapasztalt kiugró élettartammal. Elmondható tehát, hogy ennél a mintánál egy kisebb nedvességtartalmú, kompaktabb polimerszerkezet alakul ki.

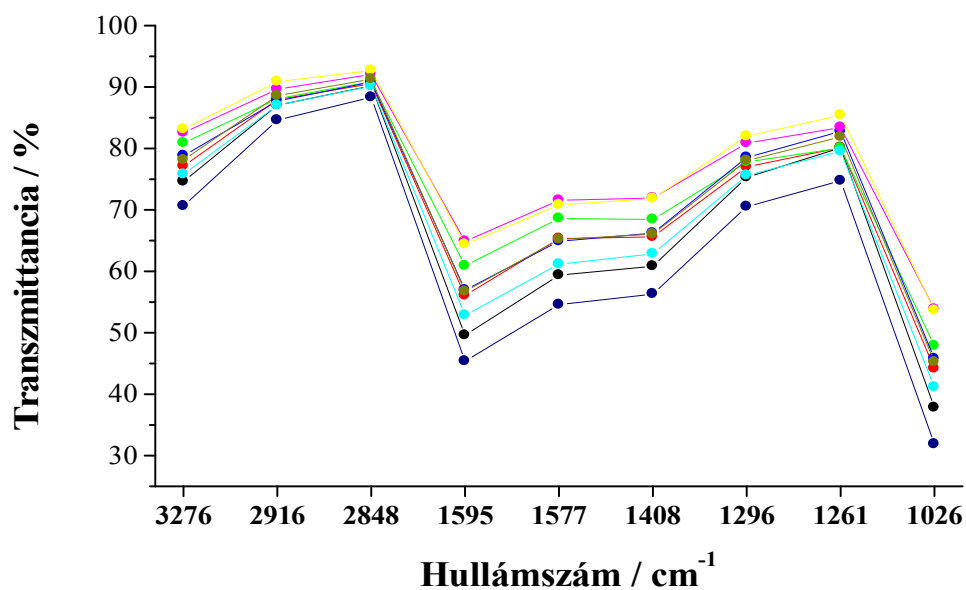
A jelenség azonosítására a liofilizált- és az öntött filmek esetében is elvégeztem az FTIR vizsgálatokat a frissen készített és a 4 hétig tárolt minták esetében is. A nagy számú minta következtében az összetételek együttes ábrázolása átláthatatlan spektrum-

rengeteget okozott volna, így az áttekintő ábrákon csak a karakterisztikus csúcsokat ábrázoltam.



58. ábra A 4-5-6. összetételű 4 hétig tárolt filmek FTIR spektrumai és a későbbi értékeléshez kiválasztott csúcsok (kék nyilakkal jelölve)

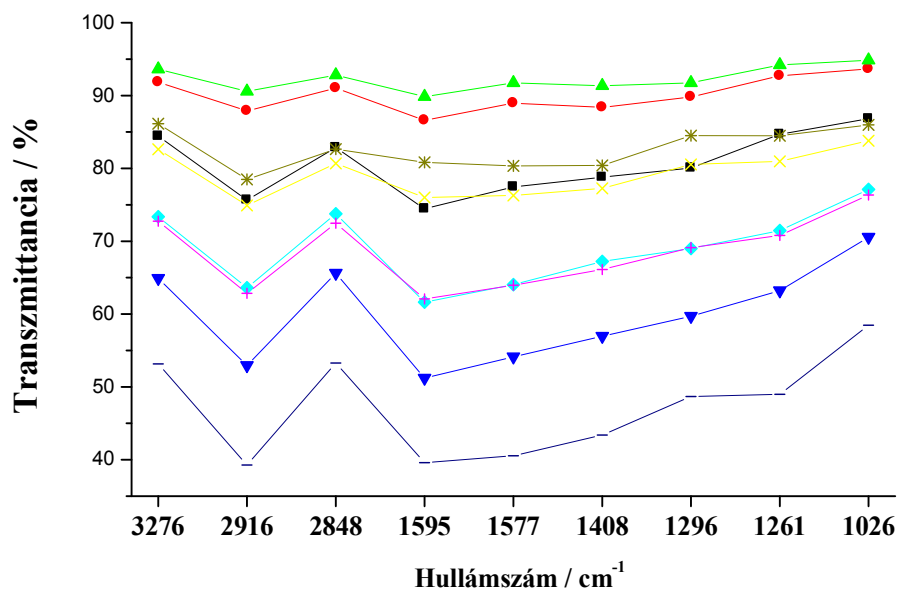
Az 58. ábrán látható 3 tárolt minta spektrumaiból megkerestem azokat a jellegzetes csúcsokat, amelyek intenzitás-aránya jelentősnek mondhatóan eltér a különböző mintákban és ezeket intenzitásaikkal külön ábrákon ábrázoltam. Az ezzel a módszerrel összeállított spektrum-kivonatok láthatók az 59-62. ábrákon.



59. ábra A nem tárolt ostyák FTIR csúcsainak intenzitás-értékei

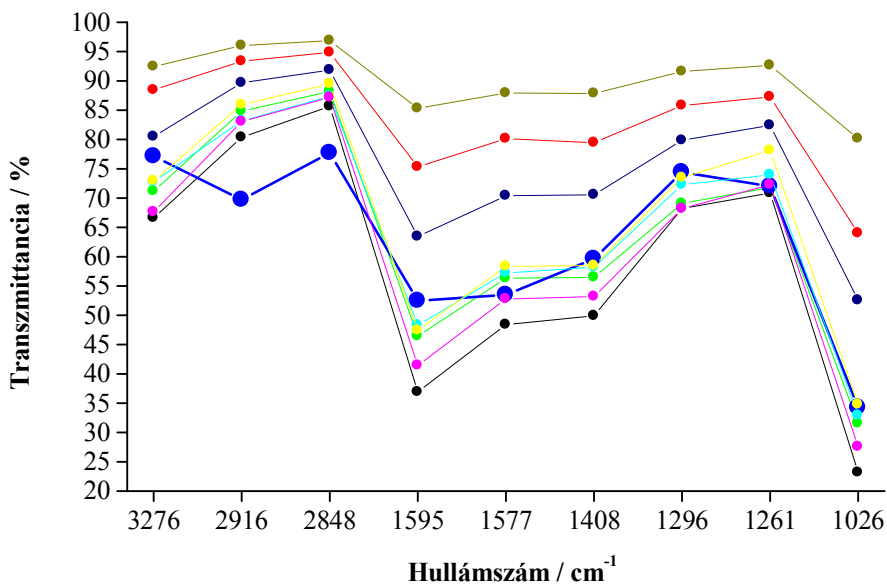
(Színek: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9-es minta)

A 59. ábrán ábrázoltam a liofilizált filmek (ostyák) esetében a kiválasztott 9 FTIR csúcsot. Jól látható, hogy bár a minták intenzitásai különböznek, az arányaik mégis állandónak mondhatók, amit a görbék közel párhuzamos lefutása is mutat. Ez a tapasztalat megerősíti a fagyasztva-szárítás módszerének elméletét, miszerint a fagyasztott mintából úgy távozik az oldószer, jelen esetben a víz, hogy az oldott anyagok, polimerek szerkezete ezt nem követi, az oldat fázishoz hasonló szerkezet alakul ki, amelyben az összetevők molekulái túl messze vannak egymástól, így számottevő interakció nem jöhet létre közöttük.



60. ábra A 4 hétig tárolt ostyák FTIR csúcsainak intenzitás-értékei
 (Színek: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9-es minta)

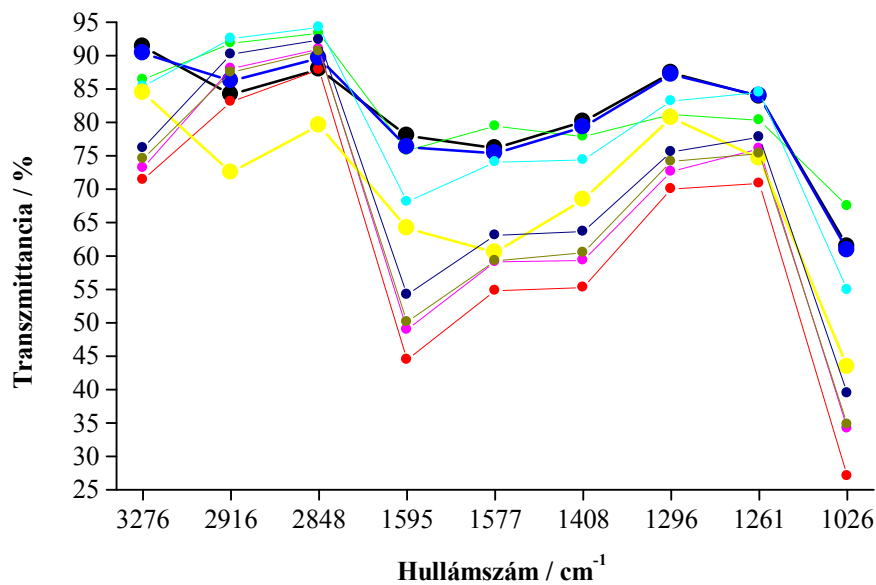
A 60. ábrán láthatók a 4 hétig tárolt ostyák kivonatolt görbéi. A 3000 cm^{-1} és 1300 cm^{-1} környéken megjelenő vízcsúcs magyarázza a görbe ellaposodását. A szerkezeteken csak apró változások láthatók, az 1-es összetételű ostya kicsivel kisebb intenzitárányval jellemezhető 2848 cm^{-1} csúcsot mutat.



61. ábra A nem tárolt filmek FTIR csúcsainak intenzitás-értékei
 (kék, nagyobb pontokkal kiemelve a 4-es számú összetétel,
 színek: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9-es minta)

A 61. ábrán látható, frissen készített filmek görbéin sincsenek markáns, összetétel-függésre mutató jelek. Egyedül a 4-es minta mutat szokatlan viselkedést, az 2916-2848 cm^{-1} -nél található csúcs a többi összetételnél hangsúlyosabb, mint az 1296 cm^{-1} -es csúcs, amely kismértékben csökkenő intenzitást mutat.

A 62. ábra már több tárolt ostya eltérő viselkedését jelzi, a CP-mentes összetételek (tehát az 1., 4., 7. minták) mind a tárolatlan 4-es mintához hasonló változásokon mentek át. Az 1296 cm^{-1} -nél jelentkező csúcs eltűnése a CP segédanyag hiányából adódik, az intenzitásnövekedés a 2900 cm^{-1} környéki kisebb csúcsokban pedig a SA-B₁₂ interakciót jelzi, amelynek hiánya a többi mintánál a korábbi (PALS és Raman) eredményeket alátámasztva az erősebb CP-B₁₂ kölcsönhatás jelenlétét bizonyítja.

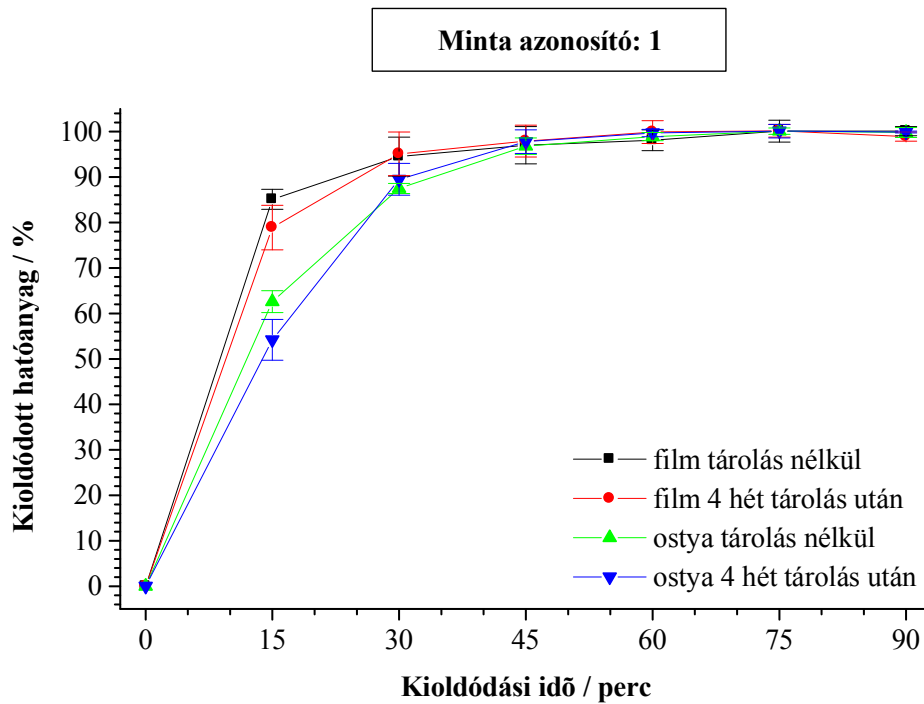


62. ábra A 4 hétig tárolt filmek FTIR csúcsainak intenzitás-értékei

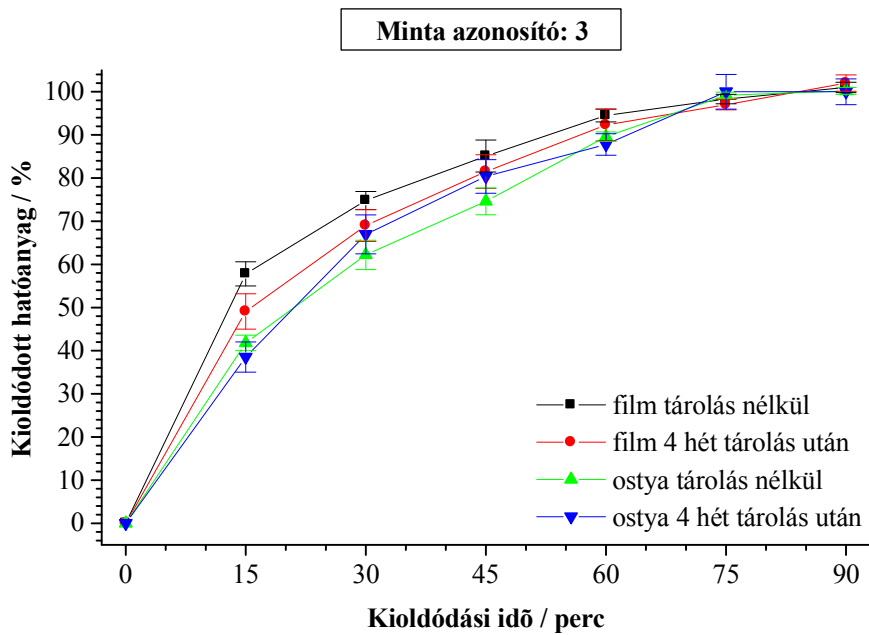
(Színkódok: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9-es minta, nagyobb pontokkal kiemelve az 1, 4 és a 7-es összetételű minta görbéje)

Az FTIR eredmények az 5. minta anomális szerkezetét nem igazolták, de a heterogenitás-vizsgálatok PALS és Raman méréseit alátámasztották, így összetettebb képed adva a polimer-hatóanyag interakciókról.

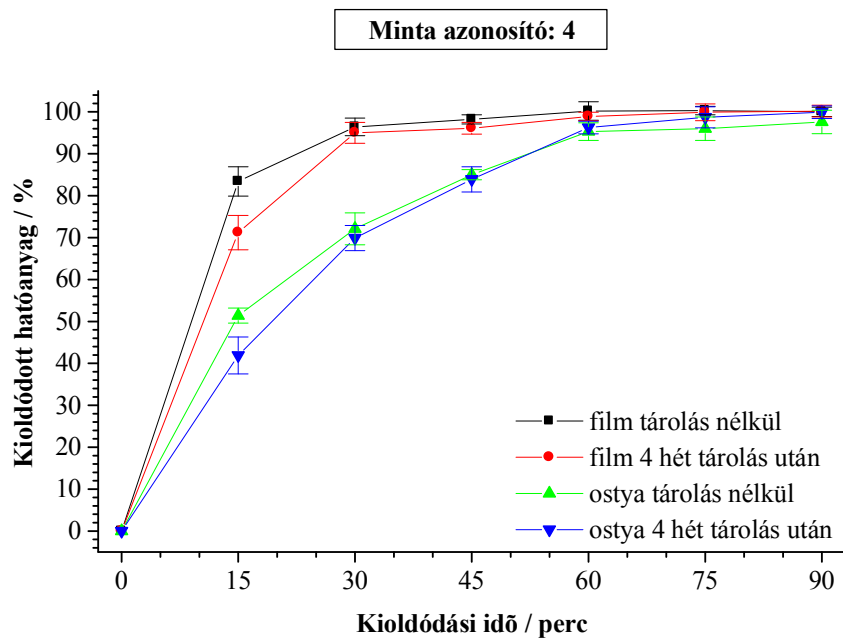
Az 63-69. ábrákon a különböző összetételű hidrogélből előállított filmek és ostyák kioldódás görbéi láthatóak közvetlenül az előállítás után (liofilizált minták esetében 12 órás exikátorban szárítás után) és 4 hét tárolás után. Az ábrákon látható, pontokat összekötő vonalak, csak a szem vezetésére szolgálnak. Minden ábra felső részén látható a mintakészítésnél bevezetett minta azonosító.



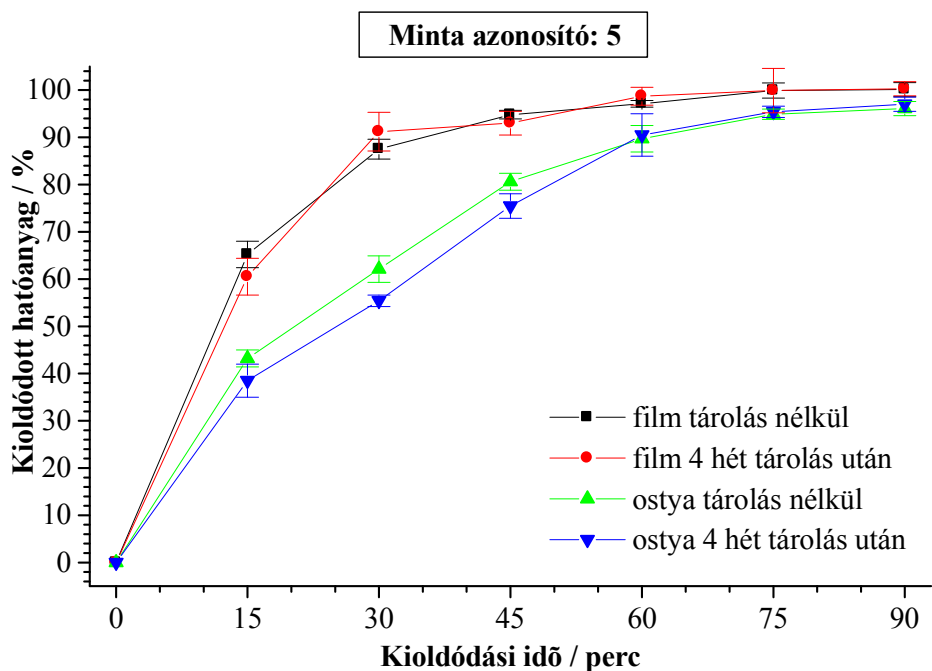
63. ábra Az 1-es összetételű (3% SA) filmek és ostyák kioldódás-görbéi



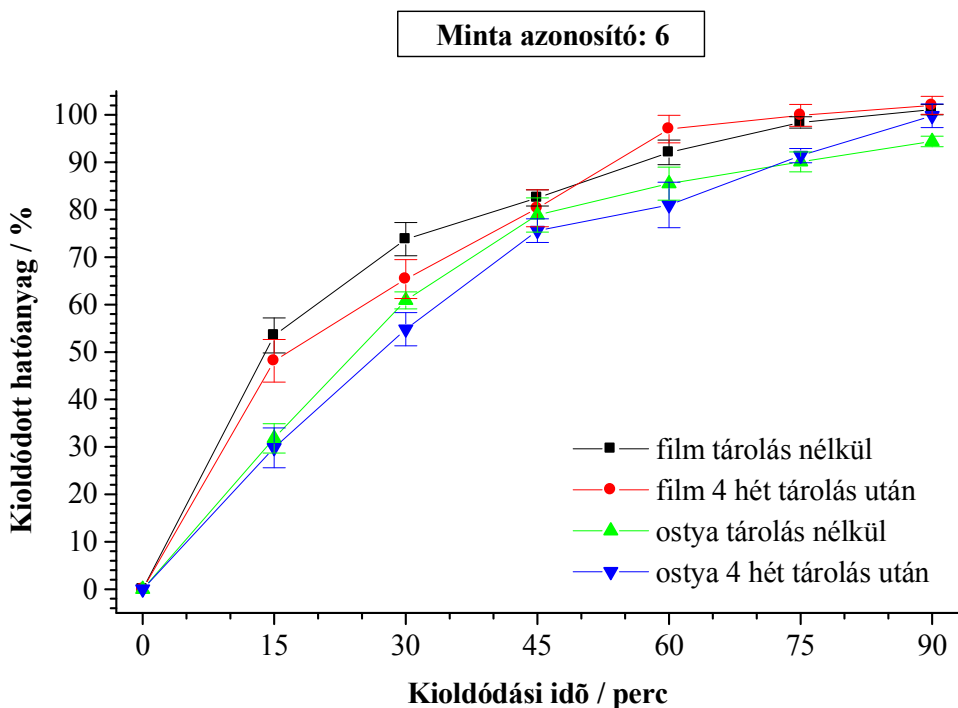
64. ábra A 3-as összetételű (3% SA + 0,25% CP) filmek és ostyák kioldódás-görbéi



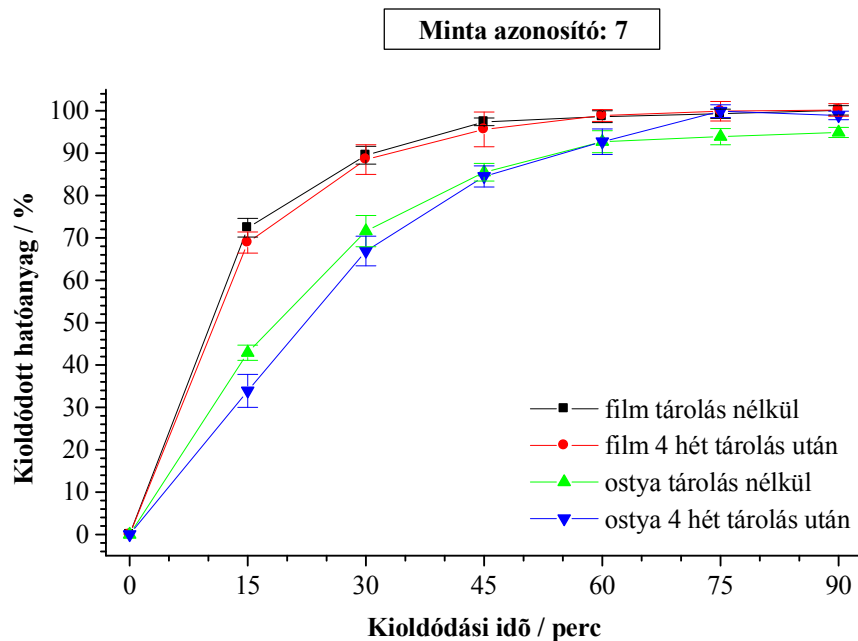
65. ábra A 4-es összetételű (4,5% SA) filmek és ostyák kioldódás-görbéi



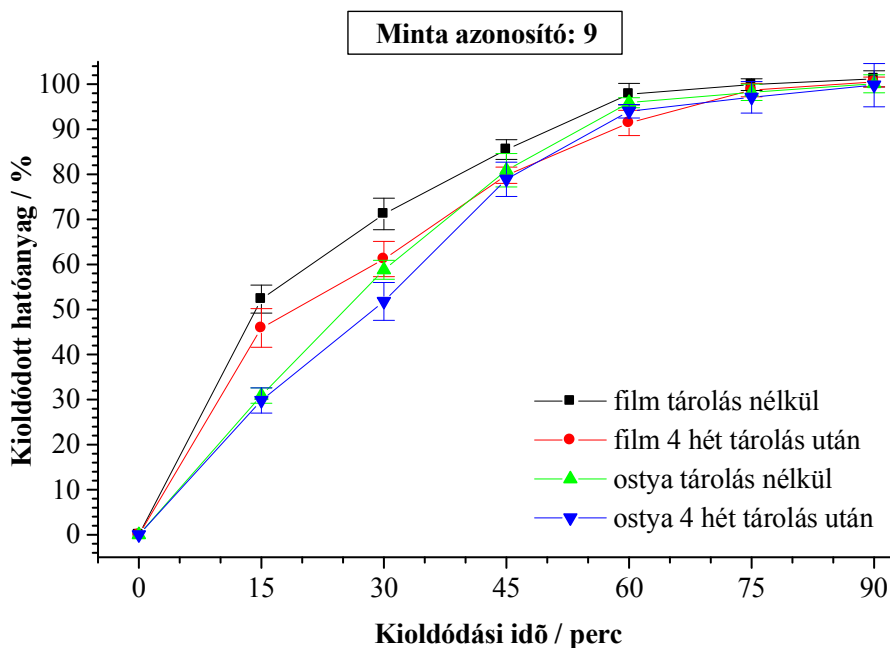
66. ábra Az 5-ös összetételű (4,5% SA + 0,15% CP) filmek és ostyák kioldódás-görbéi



67. ábra A 6-os összetételű (4,5% SA + 0,25% CP) filmek és ostyák kioldódás-görbéi



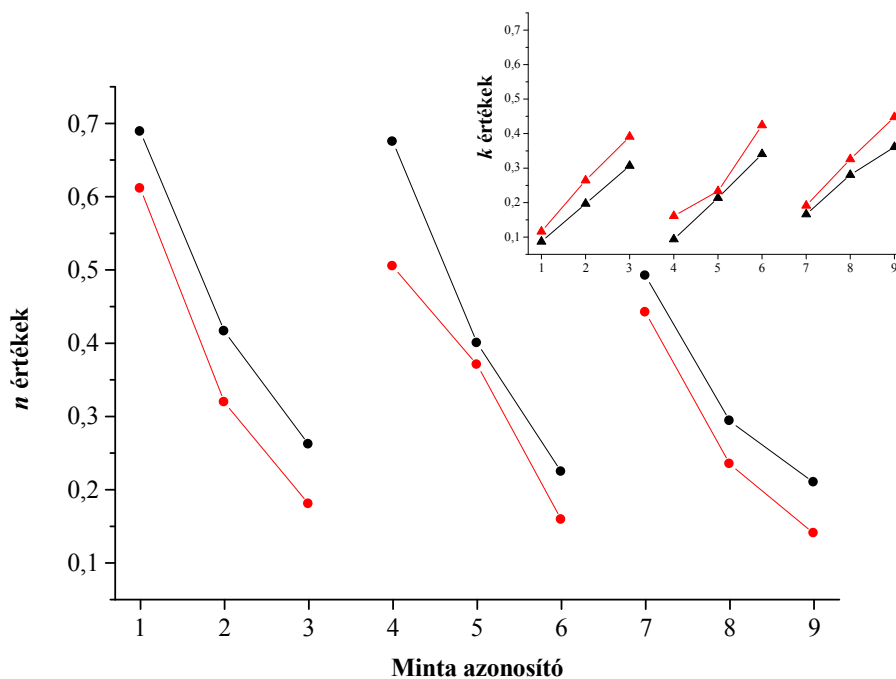
68. ábra A 7-es összetételű (6% SA) filmek és ostyák kioldódás-görbéi



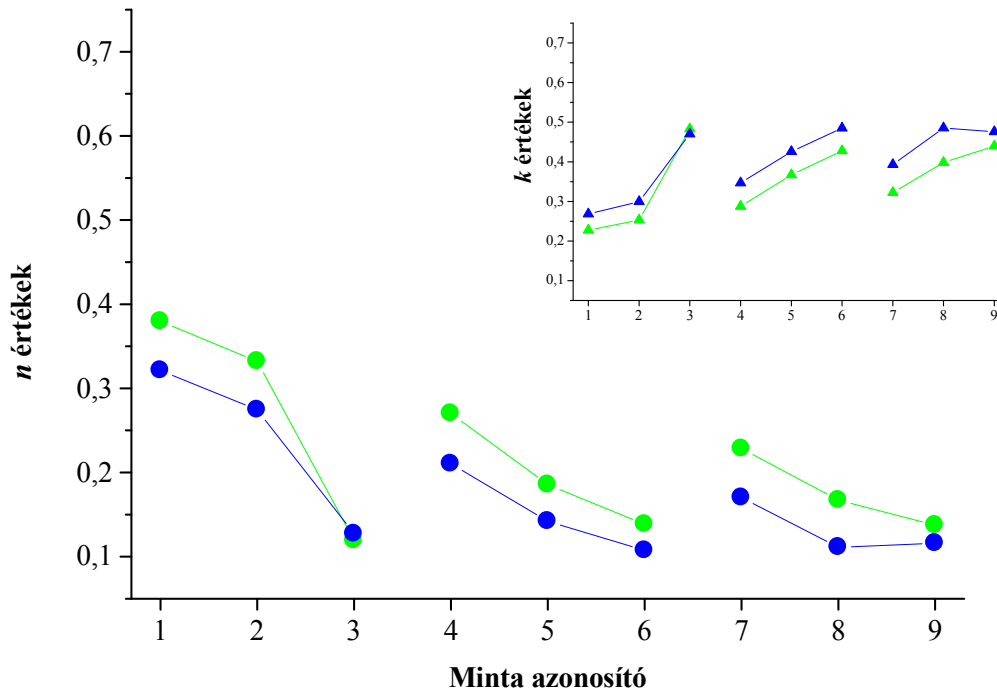
69. ábra A 9-es összetételű (6,0% SA + 0,25% CP) filmek és ostyák kioldódás-görbéi

A kioldódási görbék alapján megállapítható, hogy a tárolás hatására, kisebb-nagyobb mértékben ugyan, de csökkent a kioldódás sebessége. Hasonlóképpen általános érvényű megállapítás az is, hogy a liofilizálás, az így készült minták jelentősen nagyobb fajlagos felülete ellenére, szintén lassabb kioldódást eredményez, mint az öntéses

eljárás. A görbék lefutása hasonló a filmek és az ostyák esetében, azon az ábrák összevetéséből észrevehető, hogy míg a 1, 4, 7 jelű mintáknál (csak SA-t tartalmaznak) a különbség viszonylag nagy a két film-forma között, addig ez a különbség a CP hatására lecsökken, szinte teljesen eltűnik (3, 6, 9 összetétel). Az 5-ös összetétel ebből a szempontból is kitűnik, bár CP-t tartalmaz, mégis görbéi teljesen külön futnak, ahogy azt a CP-mentes minták esetében láthattuk, ez szintén egy stabilabb, kompakt polimerszerkezetre utal. A fenti, kioldódási-profilokat szemléltető ábrákon a tárolás és a liofilizálás okozta változások jól láthatóak, de nehezen azonosítható a CP polimer hatása, így a görbéket a 3.4.8.3 fejezetben ismertetett módon parametrizáltuk, a E4 egyenlet k és n paraméterének alakulását mutatja tárolás nélküli és tárolt filmek esetében az 70., ostyáknál az 71. ábra, az illeszkedés (R^2) filmek esetében 0,9917-0,9992 közé, az ostyáknál pedig 0,9667-0,9969 közé esett.

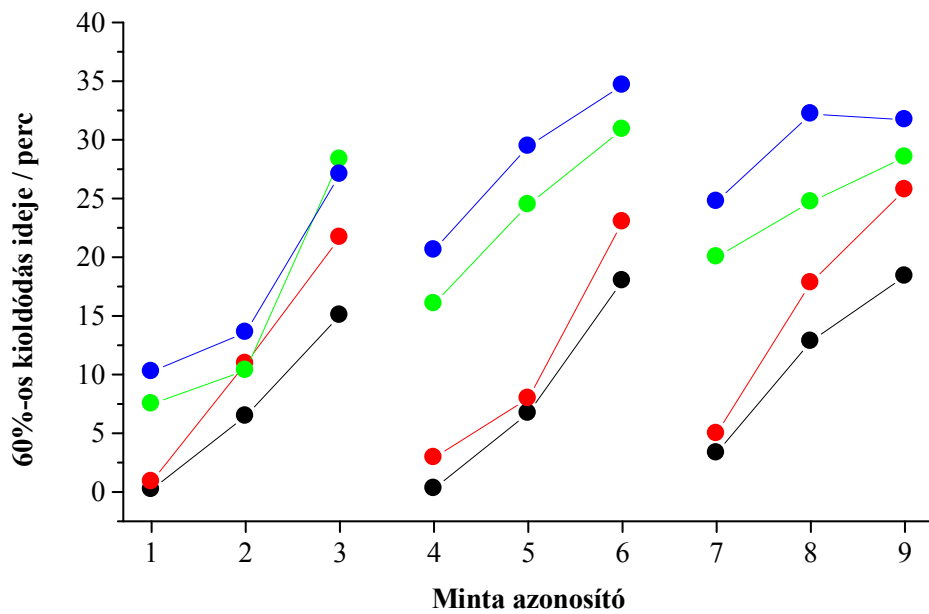


70. ábra A kioldódási, K&P-modell n és k paraméterei öntött filmek esetében (tárolás nélkül és **4 hét tárolás után**)



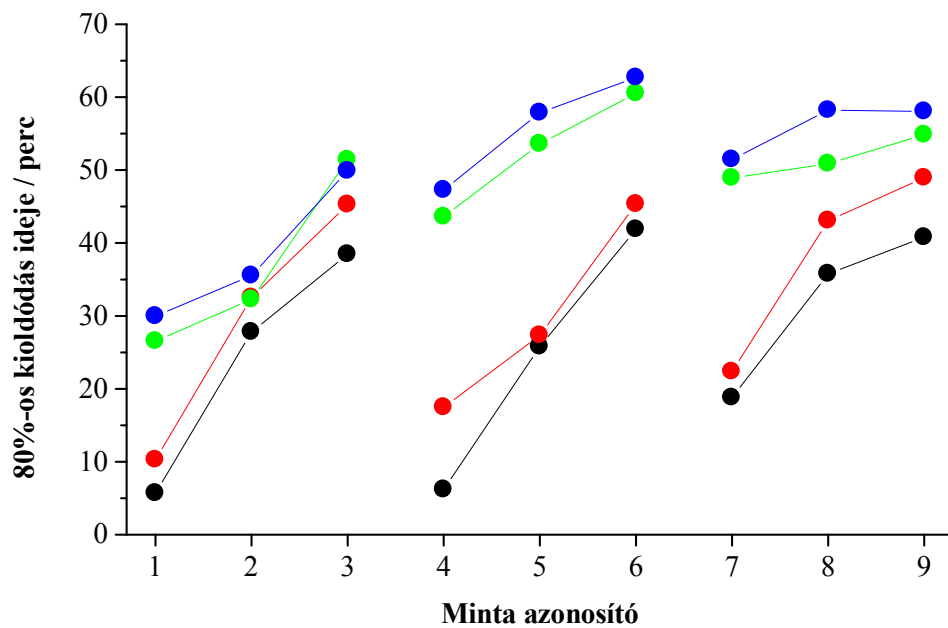
71. ábra A kioldódási, K&P-modell n és k paramétereit ostyák esetében (tárolás nélkül és 4 hét tárolás után)

A K&P modell a k értékei csak azonos n -ek esetében hasonlítható össze, mivel ez nem áll fenn, az n paraméter alakulása alapján annyit állíthatok, hogy a vizsgált rendszereknél a diffúzió a kioldódást meghatározó tényező. A kioldódás sebessége a k sebességi konstanssal önmagában nem, de az illesztett görbék segítségével jellemezhető. Ezek alapján a 60, illetve a 80%-os kioldódáshoz szükséges időtartamok a 72-73. ábrán láthatók. A 74. ábrán látható, 45 perc alatt kioldódott hatóanyag mennyiséggel korreláltatva elmondható, hogy az számított és a mért kioldódás-profilok tendenciájukban megegyeznek.



72. ábra A kioldódás sebességének változása, a 60%-os kioldódáshoz szükséges idővel kifejezve

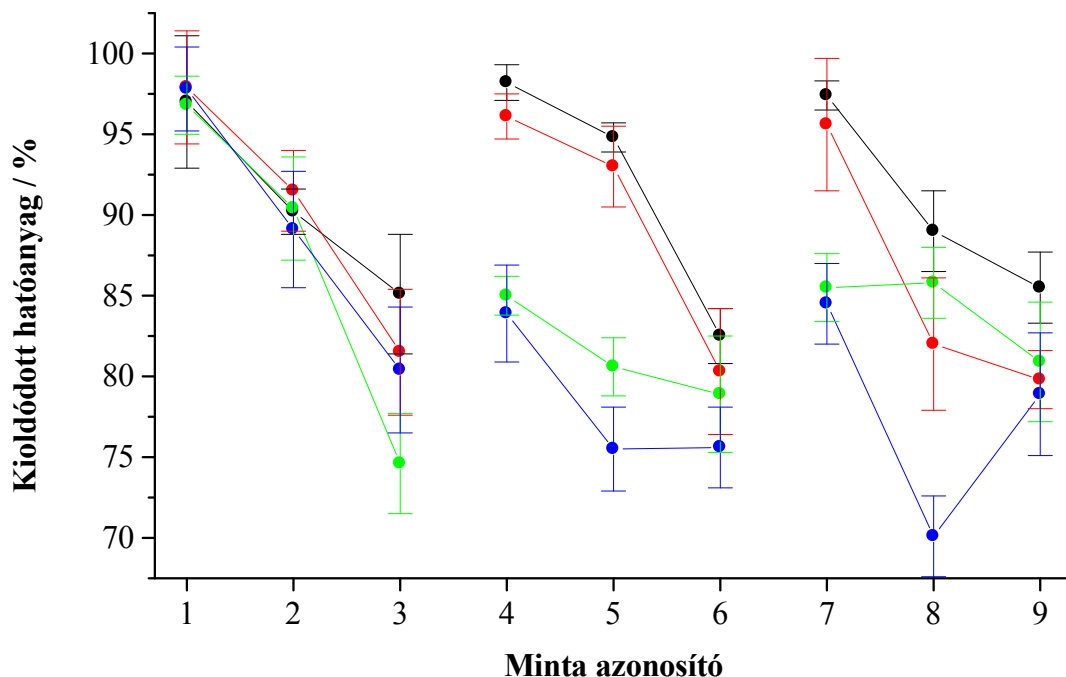
(színek: tárolás nélküli film, tárolt film, tárolás nélküli ostya, tárolt ostya)



73. ábra A kioldódás sebességének változása, a 80%-os kioldódáshoz szükséges idővel kifejezve

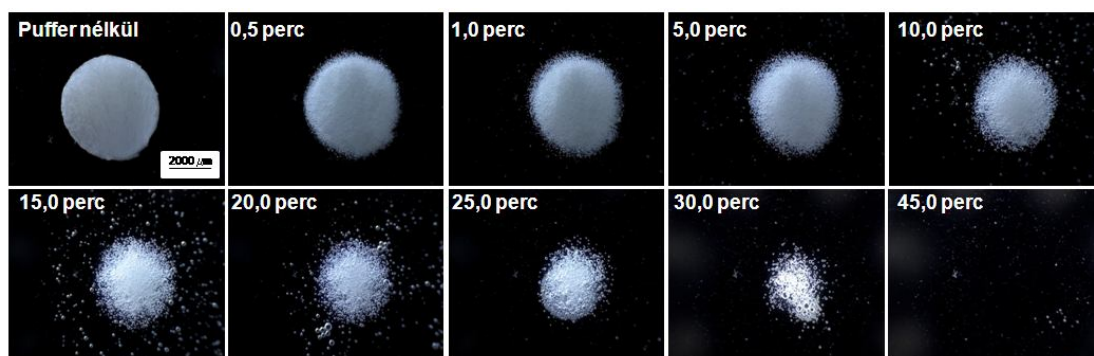
(színek: tárolás nélküli film, tárolt film, tárolás nélküli ostya, tárolt ostya)

Összevetve a 72. és a 73. ábrát elmondható, hogy a tendenciák alapvetően azonosak, ami a különböző n értékek ellenére a görbék hasonlóságát igazolja. A fenti ábrákat a 74. ábrán látható, 45 perc alatt kioldódott hatóanyag mennyiséggel összevetve elmondható, hogy a számított és a mért kioldódás-profilok tendenciájukban megegyeznek, ami a modell jóságát bizonyítja.

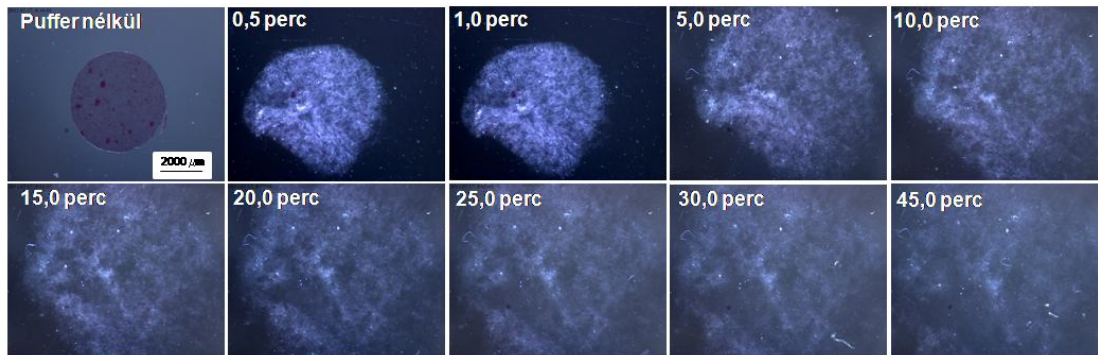


74. ábra A kioldódás sebességének változása, a 45 perc alatt kioldódó hatóanyag mennyiségével kifejezve

(színek: tárolás nélküli film, **tárolt film**, **tárolás nélküli ostya**, **tárolt ostya**)



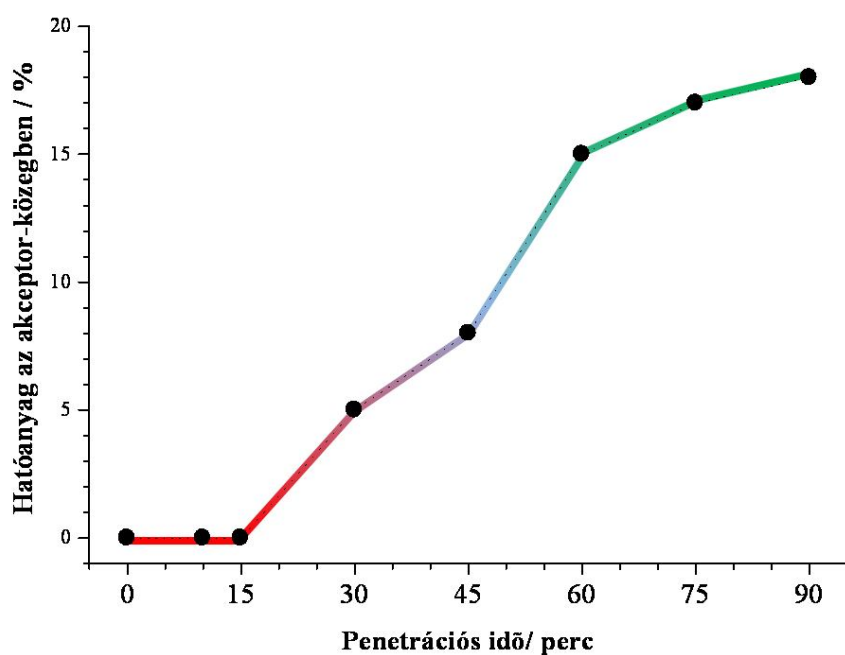
75. ábra A lyofilizált film viselkedése a kioldó közegben



76. ábra Az öntött film viselkedése a kioldó közegben

A film és az ostya forma a (fényképezésnél alkalmazott 5 ml) kioldó közegben más dinamikával oldódik, amely részben magyarázza az eltérő kioldódási-sebességet. Az 75. és a 76. ábrák összehasonlításából látható, hogy míg a filmek felülete rendkívül gyorsan nedvesedik, szerkezetük nagy mennyiségű vizet felvéve duzzad, addig az ostyák a felületükön képződő buborékok és a réteges szerkezetük miatt lassan nedvesednek, 10-15 perc után kezdenek apró darabokra dezintegrálódni.

Az *in vitro* kioldódás-vizsgálatok eredményei csak akkor használhatók fel sikeresen, ha összefüggésbe hozhatók az *in vivo* hatóanyag-leadási profilokkal, illetve, ha *in vivo* a hatóanyag átjut a bukkális nyálkahártyán. Ez utóbbi tényét a 3.4.10 fejezetben ismertetett, általunk tervezett és legyártott készülékkel próbáltuk bizonyítani sertés-szájnyálkahártyák felhasználásával. Az első mérés eredménye látható az alábbi, 77. ábrán. A B₁₂ vitamin lassan, de átjut a nyálkahártyán, ami biztató a további kísérletekre nézve, azonban a vizsgálati módszer sok problémát vetett fel. A kapott nyálkahártya igen vastag (6-10 mm) volt, ezért a hatóanyagoknak az emberi szájnyálkahártyánál (2,0-4,3 mm [van Loon LAJ és mtsai 1989]) jóval vastagabb szöveten kellett átjutnia, ezzel magyarázható, hogy penetrálódott hatóanyag csak kb. 20 percnél kezd mérhetővé válni az akceptor-közegben.



77. ábra Az ex vivo vizsgálat kioldódás görbéje

A jelenlegi módszernél a kevertetés, a minta bevitele nem standardizált, ezért a kezdeti vizsgálatok eredményei csak a munka célkitűzésének alátámasztására szolgálnak, a módszer fejlesztése, optimalizálása nem képezi a disszertáció tárgyát.

5. Következtetések

SA-CP különböző arányú keverékeiből sikerült öntéses és fagyasztva szárítás eljárással bukkális filmet formulálni. A formuláció potenciálisan alkalmas a választott modellhatóanyag, a vízdékony B₁₂, terápiás dózisu bevitelére.

Az értekezés új tudományos eredményei:

- Neminvazív mikroszerkezet vizsgáló módszerek (FTIR és PALS) kombinációjával értékeltük a B₁₂ és a hordozó polimerek, másodlagos kölcsönhatásokat érintő, a gyógyszerforma stabilitását befolyásoló interakcióit. A rokon szerkezetű Carbopol polimerek közül a két módszer lehetőséget biztosított, a bukkális formulációhoz előnyös, gyorsan nedvesedő és a mukoadhezivitást biztosító típus kiválasztására. (1)
- A SA-CP kompozitoknál meghatározott arány biztosított homogén filmet, ennek meghatározására, a gél-film átmenet vizsgálatára a valós idejű PALS mérést alkalmaztam, először a szakirodalomban. (3)
- Vizsgáltam a homogén, öntéses és liofilizált filmek felhasználás szempontjából meghatározó, mikro- és makroszerkezeti tulajdonságait. Megállapítottam, hogy a mikro- és makroszerkezeti tulajdonságok együtt változtak az összetétel függvényében. A mikroszerkezet vizsgáló módszerek alátámasztották az anomális makroszerkezeti viselkedést mutató összetétel azonos alap-, de eltérő szupramolekuláris szerkezetét.
- A CP mennyiségének, a tárolás időtartamának növelése, valamint a liofilizálás csökkentette a hatóanyag felszabadulás sebességét. A kioldódási-modell (K&P-modell) kinetikai paramétereinek változása a mikroszerkezeti vizsgáló módszerek eredményeivel összhangban volt.

Az eredmények gyakorlati alkalmazhatósága:

- A készítmény-fejlesztés, a kockázatértékelés szempontjából kritikus, lépéseiben
 - kompatibilitás, stabilitás – a hagyományos szerkezetvizsgáló módszerek számára láthatatlan szabadtérfogat-változás követésével, a dolgozatban alkalmazott PALS és a hozzá kapcsolódó technikák, egyedülálló módszerek bizonyultak.
- A PALS technikával kapott mérési eredmények összefüggését elemezve a mechanikai tulajdonságokkal, kezelés, tárolás hatására bekövetkező változásokkal, kioldódási profilokkal, megállapítható, hogy a PALS hasznos módszere lenne a gyógyszerforma-fejlesztésnek, annak szinte valamennyi fázisában.

6. Összefoglalás

A bukkális gyógyszerformák alkalmazása számos előnnyel jár, mivel a nyálkahártya erekkel gazdagon átszőtt és permeábilis, a farmakon alkalmas szisztémás kezelésre is. Ez igen kedvező, mert az innen felszívódott hatóanyag kikerüli a májat, valamint az emésztőrendszer bontó enzimeit sem hatnak rá.

Értekezésem célkitűzése ezért olyan bukkális film formulálása volt, amely hatékonyan képes a hatóanyag szájüregből történő felszívódását biztosítani.

Modell hatóanyagként a vízoldható, B₁₂ vitamint választottam, amelynek rossz *per os* biohasznosíthatósága indokolja az injekciós formát kiváltó, neminvazív bukkális formulációban való alkalmazását.

A preformulációs vizsgálatok során nemdestruktív spektroszkópiai módszerekkel (infravörös és pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiával (PALS)) vizsgáltam a hatóanyag és a potenciális segédanyagok interakcióját. Az eredmények alapján kiválasztottam a megfelelő mukoadhezivitású és filmképző tulajdonságú, nátrium-alginát és Carbopol polimereket. A homogén film formulálásához szükséges polimer-arányt valósídejű PALS módszerrel határoztam meg. A 9 különböző összetételű B₁₂ tartalmú filmet öntéssel és fagyasztva szárításos eljárással állítottam elő. A filmek mikro- és makroszerkezeti (mechanikai és hatóanyag-leadási) tulajdonságait vizsgáltam.

Megállapítottam, hogy a mikro- és makroszerkezeti tulajdonságok együtt, hasonló tendenciával változtak az összetétel függvényében. A mikroszerkezet vizsgáló módszerek alátámasztották az anomális makroszerkezeti viselkedést mutató összetétel azonos alap-, de eltérő szupramolekuláris szerkezetét. A Carbopol polimer mennyiségének, a tárolás időtartamának növelése, valamint a liofilizálás csökkentette a hatóanyag felszabadulás sebességét. A hatóanyag-leadás modellezésére alkalmazott Korsmeyer-Peppas kioldódási-modell kinetikai paramétereinek fenti változása a mikroszerkezeti vizsgáló módszerek eredményeivel összhangban volt.

A gyógyszerforma terápiás alkalmazhatóságához szükséges makroszerkezeti tulajdonságok a mikroszerkezeti tulajdonságok ismeretében tervezhetőek.

7. Summary

Application of buccal dosage forms has several advantages, as buccal route can be used for systemic delivery because the mucosa has a rich blood supply and it is relatively permeable. This route of drug delivery is of special advantages, including the bypass of first pass effect and the avoidance of presystemic elimination within the GIT.

Therefore the objective of my thesis was to formulate buccal films which can effectively provide an effective absorption of the active agent from the buccal cavity.

The selected model drug was the water soluble vitamin B₁₂ which poor oral bioavailability justifies its use in non-invasive buccal formulation to replace the injection dosage form. In the course of the preformulation studies the possible interactions between the drug and the potential excipients were investigated by non-destructive spectroscopic methods (infrared and positron annihilation lifetime spectroscopy (PALS)). Based on the results, I have selected sodium alginate and Carbopol polymers of required mucoadhesive and film forming behavior. In order to obtain homogeneous film formulations, the required ratio of the two polymers in the formulation was determined by real-time PALS method. The 9 homogeneous films of various compositions containing vitamin B₁₂ were prepared by cast and freeze-drying process. I have examined the micro- and macro-structural (mechanical and drug release) properties of the films.

It was found that along with the macro-structural changes of the films the micro-structural properties were changed depending on the composition, but not in continuous way. The micro-structural examinations confirmed the same basic but different supramolecular structure of composition showing anomalous macro-structural behavior. The higher the amount of Carbopol polymer and the longer the duration of storage, along with the freeze drying process, decreased the rate of drug release. The above changes of the kinetic parameters of Korsmeyer-Peppas drug release model were in full compliance with the results of the micro-structural methods.

The macro-structural properties of buccal films required for the therapeutic use can be designed based on their micro-structural characteristics.

8. Irodalomjegyzék

Abdul-Jabbar NM, Bourret-Courchesne ED, Wirth BD. (2012) Single crystal growth of $\text{Ga}_2(\text{Se}_x\text{Te}_{1-x})_3$ semiconductors and defect studies via positron annihilation spectroscopy. *J Cryst Growth*, 352: 31-34.

Adams JF. (1963) Biological Half-life of Vitamin B12 in Plasma. *Nature* 198: 200.

Aggarwal V, Jain A, Kabi D. (2009) Anesthetic efficacy of supplemental buccal and lingual infiltrations of articaine and lidocaine after an inferior alveolar nerve block in patients with irreversible pulpitis. *J Endod*, 35: 925-929.

American Dietetic Association and Dietitians of Canada. (2003) Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: vegetarian diets. *J Am Diet Assoc*. 103: 748-765.

Andrès E, Federici L, Affenberger S, Vidal-Alaball J, Loukili NH, Zimmer J, Kaltenbach G. (2007) B12 deficiency: a look beyond pernicious anemia. *J Fam Pract*, 56: 537-542.

Anderson CD. (1933) The positive electron. *Phys Rev*, 43: 491-494.

Antus B, Yao Y, Song E, Liu S, Lutz J, Heemann U. (2002) Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy. *Transpl Int*, 15: 494-501.

ASM Handbook Committee. Metallography and Microstructures In: American Society for Metals. Metals Handbook (Ninth Edition, Volume 9). Metals Park, Ohio, 1985: 12.

Bailey DL, Townsend DW, Valk PE, Maisey MN. Positron Emission Tomography, Springer, Singapore, 2005.

Bajdik J, Marciello M, Caramella C, Domján A, Süvegh K, Marek T, Pintye-Hódi K. (2008) Evaluation of surface and microstructure of differently plasticized chitosan films. *J Pharm Biomed Anal*, 49: 655-659.

Bajdik J, Regdon Jr G, Marek T, Erős I, Süvegh K, Pintye-Hódi K. (2005) The effect of the solvent on the film-forming parameters of hydroxypropyl-cellulose. *Int J Pharm*, 301: 192-198.

Batchelor H. Novel bioadhesive formulation in drug delivery; The Drug Delivery Company Report, 2004: 16-19.

Behringer R, Montgomery CG. (1942) The angular distribution of positron annihilation radiation. *Phys Rev*, 61: 222-224.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry* (5th edition). W. H. Freeman and Company, New York, 2002.

Bologna WJ, Levine HL, Cartier P, de Ziegler D. (1999) Bioadhesive progressive hydration tablets and methods of making and using the same. US Patent: 6,248,358

Bond CM. (1998) Comparison of buccal and oral prochlorperazine in the treatment of dizziness associated with nausea and/or vomiting. *Curr Med Res Opin*, 14: 203-212.

Bor-Caymaz C, Bor S, Tobey NA, Abdunour-Nakhoul S, Orlando RC. (2011) Effects of ethanol and extract of cigarette smoke on the rabbit buccal mucosa. *J Oral Pathol Med*, 40: 27-32.

Born M, Oppenheimer R. (1927) Quantentheorie der Molekeln. *Ann Phys-Leipzig*, 84: 457-484.

Brennan RA, Sanford RA. (2002) Continuous steady-state method using Tenax for delivering tetrachloroethene to chloro-respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 63: 1464-1467.

Butler CC, Vidal-Alaball J, Cannings-John R, McCaddon A, Hood K, Papaioannou A, McDowell I, Goringe A. (2006) Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency: a systematic review of randomized controlled trials. *Fam Pract*, 23: 279-285.

Calloo J, Jaeger H. Bulletin of the American Physical Society, Joint Fall 2010 Meeting of the APS Ohio Section and AAPT Appalachian and Southern Ohio Section, 2010.10.08-09.

Carmel R. (2008) How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Blood*, 112: 2214-2221.

Clausius R. (1870) On a mechanical theorem applicable to heat. *Philos Mag (Series 4)*, 40: 122-127.

Commonwealth of Massachusetts, Betsy Lehman Center for Patient Safety and Medical Error Reduction. Expert Panel on Weight Loss Surgery, Executive Report, 2007.

Cramer O. (1993) The variation of the specific heat ratio and the speed of sound in air with temperature, pressure, humidity, and CO₂ concentration. *J Acoust Soc Am*, 93: 2510-2516.

Değim T, Eğlen B, Ocak O. (2006) A sustained release dosage form of acyclovir for buccal application: an experimental study in dogs. *J Drug Target*, 14: 35-44.

Dévay A, Antal I. *A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2009.

Djourelou N, Ateş Z, Güven O, Misheva M, Suzuki T. (2007) Positron annihilation lifetime spectroscopy of molecularly imprinted hydroxyethyl methacrylate based polymers. *Polymer*, 48: 2692-2699.

Doscherholmen A, Swaim WR. (1973) Impaired assimilation of egg Co 57 vitamin B 12 in patients with hypochlorhydria and achlorhydria and after gastric resection. *Gastroenterology*, 64: 913-919.

Duke MC, Pas SJ, Hill AJ, Lin YS, da Costa JCD. (2008) Exposing the molecular sieving architecture of amorphous silica using positron annihilation spectroscopy. *Adv Funct Mater*, 18: 3818-3826.

Dutta D, Chatterjee S, Pillai KT, Pujari PK, Ganguly BN. (2005) Pore structure of silica gel: a comparative study through BET and PALS. *Chem Phys*, 312: 319-324.

Eden A. *Christian Doppler: Leben und Werk*. Landespressebureau, Salzburg, 1988.

Einstein A. (1905) Ist die Trägheit eines Körpers von seinem Energiegehalt abhängig? (*Does the inertia of a body depend upon its energy-content?*) *Ann Phys-Leipzig*, 18: 639-641.

El Tinay AH, Khattab AH, Khidir MO. (1976) Protein and oil positions of sesame seed. *J Am Oil Chem Soc*, 53: 648-653.

Gomaa MA, Al-Gohary MI, Rashad SM, Ali EM, Morsi TM: IX. Radiation Physics and Protection Conference, Cairo, Egypt (2008)

Greenfield N, Fasman GD. (1969) Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry-US*, 8: 4108-4116.

Heinemann L, Jacques Y. (2009) Oral Insulin and Buccal Insulin: A Critical Reappraisal. *J Diabetes Sci Technol*, 3: 568-584.

Hetényi G, Tóth G, Sebe I, Szabó B, Zelkó R. Correlation between the drug release profiles and the characteristics of buccal polymer films. *PhysChem Forum '12*, Budapest, 2012.04.18-19.

Hunt G, Kearney P, Kellaway IW. Mucoadhesive polymers in drug delivery systems. In: Johnson P, Lloyed-Jones JG (Eds.). *Drug Delivery System: Fundamental and Techniques*. Ellis Horwood, Chichester, 1987:180.

<http://www.actiq.com/> (2012. szeptember 16.)

http://www.alpha-mos.com/products_technology/electronic_tongue.php
(2012. szeptember 11.)

<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/vitb12/b12.htm> (2012. szeptember 22.)

<http://www.medlist.com/HIPPOCRATES/IV/6/359.htm> (2012. szeptember 07.)

<http://www.fentora.com/> (2012. szeptember 16.)

<http://www.onsolis.com/> (2012. szeptember 16.)

<http://www.striant.com/> (2012. szeptember 16.)

<https://www.uhra.herts.ac.uk/dspace/bitstream/2299/6166/1/905436.pdf>
(2012. szeptember 23.)

Jean YC, Mallon PE, Schrader DM (Eds.). *Principles and Applications of Positron and Positronium Chemistry*. World Scientific, Singapore, 2003.

Jeter RM, Olivera BM, Roth JR. (1984) *Salmonella typhimurium* synthesizes cobalamin (vitamin B12) de novo under anaerobic growth conditions. *J Bacteriol.* 149: 206-213.

Jiang J-X, Su F, Trewin A, Wood CD, Niu H, Jones JTA, Khimyak YZ, Cooper AI. (2008) Synthetic Control of the Pore Dimension and Surface Area in Conjugated Microporous Polymer and Copolymer Networks. *J Am Chem Soc*, 130: 7710-7720.

- Kállai N, Sebestyén Z, Szabó B, Simon V, Antal I, Zelkó R. (2012) Intraorális gyógyszerformák fejlesztési lehetőségei. *Acta Pharm Hung*, 82: 95-104.
- Kawaguchi Y, Shirai Y. (2002) Fatigue Evaluation of Type 316 Stainless Steel Using Positron Annihilation Lineshape Analysis and $\beta^+-\gamma$ Coincidence Positron Lifetime Measurement. *J Nucl Sci Technol*, 39: 1033-1040.
- Kirkegaard P, Eldrup M, Mogensen OE, Pedersen NJ. (1981) Program System for Analysing Positron Lifetime Spectra and Angular Correlation Curves. *Comput Phys Commun*, 23: 307-335.
- Kiss D, Süvegh K, Marek T, Dévényi L, Novák Cs, Zelkó R. (2006) Tracking the physical aging of poly (ethylene oxide): A technical note. *AAPS PharmSci*, 7: Article 95.
- Kögel G, SPM-Group. (1997) The München scanning positron microscope. *Appl Surf Sci*, 116: 108-113.
- Kosmidis K, Rinaki E, Argyrakis P, Machenas P: (2003) Analysis of Case II drug transport with radial and axial release from cylinders. *Int J Pharm*, 254: 183-188.
- Lagerlof F, Dawes C. (1984) The Volume of Saliva in the Mouth Before and After Swallowing. *J Dent Res*, 63: 618-621.
- Latheeshjlal L, Phanitejaswini P, Soujanya Y, Swapna U, Sarika V, Moulika G. (2011) Transdermal Drug Delivery Systems: An Overview. *IJPTR*, 3: 2140-2148.
- Li Y, Jia H, Cheng Q, Pan F, Jiang Z. (2011) Sodium alginate–gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity. *J Membr Sci*, 375: 304-312.
- 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 Del Rev*, 23: 3-25.
- Lipinski CA. (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol*, 44: 235-249.

- Lorenz JK, Reo JP, Hendl O, Worthington JH, Petrossian VD. (2009) Evaluation of a taste sensor instrument (electronic tongue) for use in formulation development. *Int J Pharm*, 367: 65-72.
- Lowell S. *Introduction to Powder Surface Area*, Wiley, New York, 1979.
- MacKenzie IK. Experimental methods of annihilation time and energy spectrometry. In: Brandt W. Dupasquier A (Eds.): *Positron Solid-State Physics*, North Holland, Singapore, 1983.
- Mathiowitz E, Chickering III DE, Lehr C-M. *Bioadhesive Drug Delivery Systems: Fundamentals, Novel Approaches, and Development*. Taylor and Francis, London, 1999.
- McCullagh CM, Yu Z, Jamieson AM, Blackwell J, McGervey JD. (1995) Positron Annihilation Lifetime Measurements of Free Volume in Wholly Aromatic Copolyesters and Blends. *Macromolecules*, 28: 6100-6107.
- McMillan WG, Teller E. (1951) The Assumptions of the B.E.T.. *Theory J Phys Chem*, 55: 17-20.
- Meltzer DE. *Biochemistry, The Chemical Reactions of Living Cell*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2003.
- Mills AP Jr. (1981) Observation of the Positronium Negative Ion. *Phys Rev Lett*, 46: 717-720.
- Minfeng Z, Xudong S, Yun W, Xiandong Y, Huiquan X, Baoyi W, Chenze Q. (2008) Correlations between the free-volume properties and the miscibility of chitosan/polar polymers blend membranes. *Rad Phys Chem*, 77: 1062-1068.
- Mohamed HFM, El-Sayed AMA, Abd-Elsadek GG. (2001) Effect of temperature on ortho-positronium in poly(methyl methacrylate). *Polym Degrad Stabil*, 71: 93-97.
- Meylan WM, Howard PH. (1995) Atom fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci*, 84: 83-92.
- Nakanishi H, Wang SJ, Jean YC. Microscopic surface tension studied by positron annihilation. In: Sharma SC (ed.). *Positron Annihilation Studies of Fluids*. World Scientific, Singapore, 1988: 292.

- Nagasaka B, Eguchi T, Nakayama H, Nakamura N, Ito Y. (2000) Positron annihilation and ^{129}Xe NMR studies of free volume in polymers. *Rad Phys Chem*, 58: 581-585.
- Obradovic T, Hidalgo IJ. *In Vitro Models for Investigations of Buccal Drug Permeation and Metabolism, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*, Springer, 2008
- Owens J. (2003) Chris Lipinski discusses life and chemistry after the Rule of Five. *Drug Discov Today*, 8: 12–16.
- Papp J, Szente V, Süvegh K, Zelkó R. (2010) Correlation between the free volume and the metoprolol tartrate release of Metolose patches. *J Pharm Biomed Anal*, 51: 244-247.
- Paranhos CM, Soares BG, Machado JC, Windmüller D, Pessan, LA. (2007) *Eur Polym J*, 43: 4882-4890.
- Patel VF, Liu F, Brown MB. (2012) Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. *J Cont Rel*, 161: 746-775.
- Peppas NA. (1983) A Model of Dissolution-Controlled Solute Release from Porous Drug-Delivery Polymeric Systems. *J Biomed Mater Res*, 17: 1079-1087.
- Peppas NA, Buri P. (1985) Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J Cont Rel*, 2: 257-275.
- Phelps ME, Coleman RE. (2000) Nuclear Medicine in the New Millennium. *J Nucl Med*, 41: 1-4.
- Rabi II, Zacharias JR, Millman S, Kusch P. (1938) "A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment". *Phys Rev*, 53: 318-327.
- Raiche ME, Larson KB, Phelps ME, Grubb RI, Welch MJ, Ter-Pogossian MM. (1975) In vivo measurement of brain glucose transport and metabolism employing ^{11}C -glucose. *Am J Physiol*, 288: 1936-1948.
- Ritger PL, Peppas NA. (1987) A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable device. *J Cont Rel*, 5: 37-42.
- Roy SK, Prabhakar B. (2010) Bioadhesive Polymeric Platforms for Transmucosal Drug Delivery Systems – a Review. *Trop J Pharm Res*, 9: 91-104.
- Sato K, Murakami H, Ito K, Hirata K, Kobayashi Y. (2008) Proceedings of the 37th Polish Seminar on Positron Annihilation. *Acta Phys Pol*, 113.

Schols-Hendriks MWG, Lohman JJHM, Janknegt R, Korten JJ, Merkus FWHM, Hooymans PM. (1995) Absorption of clonazepam after intranasal and buccal administration. *Br J Clin Pharmacol*, 39: 449-451.

Schuster PM. *Moving the Stars - Christian Doppler: His Life, His Works and Principle, and the World After*. STARNA GmbH Living Edition, Pöllauberg, 2005.

Sharabi A, Cohen E, Sulkes J, Garty M. (2003) Replacement therapy for vitamin B12 deficiency: comparison between the sublingual and oral route. *Br J Clin Pharmacol*, 56: 635-638.

Shuster J. (2010) ISMP Adverse Drug Reactions. *Hosp Pharm*, 45: 448-452.

Sebe I, Szabó B, Zelkó R. (2012) A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása. *Acta Pharm Hung*, 82: 23-32.

Sebe I, Szabó B, Farkas I, Süvegh K, Zelkó R. Prediction of the characteristics of polymer films from the real-time PALS study of hydrocolloid gel-film transition. *Phys Chem Forum '12, Budapest*, 2012.04.18-19.

Senel S, Hincal AA. (2001) Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *J Cont Rel*, 72: 133-144.

Siepmann J, Peppas NA. (2001) Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliver Rev*, 48: 139-157.

Singh S, Jain S, Muthu MS, Tiwari S, Tilak R. (2008) Preparation and evaluation of buccal bioadhesive films containing clotrimazole. *AAPS PharmSci*, 9: 660-667.

Singh J, Gupta S, Kaur H. (2011) Prediction of In vitro Drug release mechanisms from extended release matrix Tablets using SSR/R2 Technique. *Trends in App Sci Res*, 6: 400-409.

Smart JD. (1993) The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*, 11: 253-270.

Snow CF. (1999) Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency. *Arch Intern Med*, 159: 1289-1298.

Stewart S, Priore RJ, Nelson MP, Treado PJ. (2012) Raman Imaging. *Annu Rev Anal*, 5: 337-360.

- Summers RW, Elliott DE, Urban Jr. JF, Thompson R, Weinstock JV. (2005) Trichuris suis therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54: 87-90.
- Suzuki N, Hirade T, Saito F, Hyodo T. (2003) Study of ion-irradiated polystyrene using slow positron beam, *Rad Phys Chem*, 68: 647-649.
- Suzuki T, Ito Y, Kondo K, Hamada E, Ito Y. (2000) Radiation effect on positronium formation in low temperature polyethylenes. *Rad Phys Chem*, 58: 485-489.
- Szabó B, Hetényi G, Majoros K, Miszori V, Kállai N, Zelkó R. (2011) Bukkális hatóanyag-leadó rendszerek formulálásának és ex vivo vizsgálatának lehetőségei. *Acta Pharm Hung*, 81: 165-172.
- Szabó B, Molnár M, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Tracking of the microwave induced supramolecular structural changes of polymers with positron annihilation lifetime spectroscopy. *Eur J Pharm Sci*, 44: (S1) 196-197.
- Szabó B, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Effect of storage on microstructural changes of Carbopol polymers tracked by the combination of positron annihilation lifetime spectroscopy and FT-IR spectroscopy. *Int J Pharm*, 416: 160-163.
- Szabó B, Süvegh K, Zelkó R. (2012) Real-time positron annihilation lifetime spectroscopy for the detection of the hydrocolloid gel-film transition of polymers. *Polym Test*, 31: 546-549.
- Szabó B, Zelkó R. Polimer segédanyagok szerkezetváltozásának vizsgálata nem-invazív spektroszkópiai módszerekkel. *Semmelweis Egyetem PhD Napok, Budapest, 2011.04.14-15.*
- Szabó B, Zelkó R. Polimer gyógyszerhordozók makro- és mikroszerkezetének összefüggése a gyógyszerforma tulajdonságaival. *Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '12, Debrecen, 2012.09.13-14.*
- Szakonyi G, Zelkó R. (2012) Ízfedési lehetőségek szilárd gyógyszerformák esetén. *Acta Pharm Hung*, 82: 81-90.
- Szente V, Süvegh K, Marek T, Zelkó R. (2009) Prediction of the stability of polymeric matrix tablets containing famotidine from the positron annihilation lifetime distributions of their physical mixtures. *J Pharm Biomed Anal*, 49: 711-714.

- Tønnesen HH, Karlsen J. (2002) Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 28: 621-630.
- van Loon LAJ, Krieg SR, Davidson CL, Bos JD. (1989) Quantification and distribution of lymphocyte subsets and Langerhans cells in normal human oral mucosa and skin. *J Oral Pathol Med*, 18: 197-201.
- Verma S, Kaul M, Rawat A, Saini S. (2011) An overview on buccal drug delivery system. *IJPSR*, 2: 1303-1321.
- Wang X, Wei L, Kotra LP. (2007) Cyanocobalamin (vitamin B₁₂) conjugates with enhanced solubility. *Bioorgan Med Chem*. 15: 1780-1787.
- Watson ES, Watson ES. (1962) Differential microcalorimeter. US Patent: 3,263,484
- Wong GSK. (1986) Speed of sound in standard air. *J Acoust Soc Am*, 79: 1359-1366.
- Yazaki Y, Chow G, Mattie M. (2006) *J Altern Complem Med*, 12: 881-885.
- Zelkó R, Orbán Á, Süvegh K, Riedl Z, Rácz I. (2002) Effect of plasticizer on the dynamic surface tension and the free volume of Eudragit systems. *Int J Pharm*, 244: 81-86.
- Zelkó R, Süvegh K. (2004) Comparison of the enthalpy recovery and free volume of polyvinylpyrrolidone during anomalous glassy to rubbery transition. *Eur J Pharm Sci*, 21: 519-523.
- Zelkó R, Szabó B. Tracking of the stability of biopolymers and delivery systems by positron annihilation lifetime spectroscopy. In: BS Gyarmati, A Sudár, A Szilágyi (Eds.) *Advanced Macromolecular Systems Across the Length Scales*, Budapest University of Technology and Economics, Budapest, 2012: 94.
- Zheng JY, Keeney MP. (2006) Taste masking analysis in pharmaceutical formulation development using an electronic tongue. *Int J Pharm*, 310: 118-124.
- Zoubir A (Ed.). *Raman Imaging*. In: *Techniques and Applications Series: Springer Series in Optical Sciences*, Vol. 168, Springer, Singapore, 2012.

9. Saját publikációk jegyzéke

9.1. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. Szabó B, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Effect of storage on microstructural changes of Carbopol polymers tracked by the combination of positron annihilation lifetime spectroscopy and FT-IR spectroscopy. *Int J Pharm*, 416: 160-163.

2. Szabó B, Hetényi G, Majoros K, Miszori V, Kállai N, Zelkó R. (2011) Bukkális hatóanyag-leadó rendszerek formulálásának és ex vivo vizsgálatának lehetőségei. *Acta Pharm Hung*, 81: 165-172.

3. Szabó B, Süvegh K, Zelkó R. (2012) Real-time positron annihilation lifetime spectroscopy for the detection of the hydrocolloid gel-film transition of polymers. *Polym Test*, 31: 546-549.

4. Sebe I, Szabó B, Zelkó R. (2012) A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása. *Acta Pharm Hung*, 82: 23-32.

5. Kállai N, Sebestyén Z, Szabó B, Simon V, Antal I, Zelkó R. (2012) Intraorális gyógyszerformák fejlesztési lehetőségei. *Acta Pharm Hung*, 82: 95-104.

9.2. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó, teljes terjedelemben megjelent kongresszusi előadások

1. Szabó B, Molnár M, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Tracking of the microwave induced supramolecular structural changes of polymers with positron annihilation lifetime spectroscopy. *Eur J Pharm Sci*, 44: (S1) 196-197.

9.3. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

1. Vajdai A, Szabó B, Süvegh K, Zelkó R, Újhelyi G. (2012) Tracking of the viability of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteria population in polyvinylalcohol nanofiber webs by positron annihilation lifetime spectroscopy. *Int J Pharm*, 429: 135-137.
2. Télessy IG, Balogh J, Szabó B, Csempez F, Zelkó R. (2012) Kinetic stability of all-in-one parenteral nutrition admixtures in the presence of high dose Ca²⁺ additive under clinical application circumstances. *Nutr. J.* 11: 32.
3. Szabó A, Szabó B, Balogh E, Zelkó R, Antal I. (2012) Módosított hatóanyagleadású intraartikuláris készítmények. *Acta Pharm Hung*, 82: 69-74.

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Prof Dr. Zelkó Románának**, hogy sokakkal ellentétben nem csak „a zavartalan munkavégzés lehetőségét” köszönhetem neki, hanem minden bátorítását, segítségét, útmutatását és szünni nem akaró lelkesését minden új, felmerülő ötlettel, témával, érdekes eredménnyel kapcsolatban. Továbbá köszönöm azt a sok kis különfeladatot, amelyekből sokat tanultam, a tanácsokat (különösen a 200 Ft-os szabályt), amelyek mind-mind közelebb vittek e munka megírásához.

Köszönöm minden munkatársamnak, együttműködő partneremnek, hogy szaktudásuk legjavát adták bele a közös munkába: Dr. Kállai Nikolettnek a mikroszkópos képeket, a közös cikkeket és méréseket és az újabb és újabb ötleteket, kiaknázatlan kutatási témákat, Némethné Gabriellának, akihez bármilyen problémámmal bizalommal fordulhattam, a minden területen nyújtott segítségét, Dr. Süvegh Károlynak (ELTE) a PALS módszerbe való bevezetést, a problémák gyors megoldását és a közös ötleteléseket, Dr. Zsidai Lászlónak (Szent István Egyetem) az ex vivo-készülék tervezését és kivitelezését, Dr. Nagy Zsombor Kristófnak (BME) a viszkozitásmérésekben nyújtott segítségét, Farkas Istvánnak (BME) a Raman-térképeket, Prof. Dr. Dévényi Lászlónak (BME) a SEM fotókat. Továbbá köszönöm Kállai Zoltánnak az egyedi mérőfeltét elkészítéséért, a németországi „tanulmányút” biztosítását, Dr. Klebovich Imrének, Dr. Antal Istvánnak és Dr. Dredán Juditnak a SE Gyógyszerészi Intézet készülékeinek rendelkezésemre bocsájtását, Tóth Gergőnek a HPLC-MS/MS méréseket, Sebe Istvánnak a PALS mérésekben nyújtott jobb- és néha balkezét is. Köszönöm Dr. Balogh Emesének és Dr. Stampf Györgynek, hogy segítségükkel a liofilizálás folyamatát is elsajátíthattam, Molnár Márknak (ELTE) a mikrohullámú kezelés elvégzését, szaklaborosainknak, Hetényi Gergelynek, Patai Klaudiának és Miszori Veronikának a kioldódás-vizsgálatokban, ex vivo kísérletekben és a mintakészítésben tanúsított fáradhatatlan munkájukat, továbbá Oliver Luhnnek (Südzucker AG, Offstein, Germany) a Stable Micro Texture Analyser használatát, a Harsona Print Kft.-nek (Herceghalom, Magyarország) a gél-film átmenet vizsgálatához szükséges alufólia-ajándékot.

Köszönöm **Prof. Dr. Noszál Bélának**, hogy lehetőséget biztosított nekem a SE-Richter együttműködésben való részvételre, valamint főnökeimnek és kollégáimnak a **Richter Gedeon Nyrt.**-ben, Dr. Thaler Györgynek, Dr. Csernák Lászlónak és Dr. Bódis Attilának, Szakonyi Gergelynek, Sinka Melindának, Ruszkai Ákosnak, Sente Virágnak és Sáska Zsófiának, hogy ötleteikkel, építő kritikájukkal hasznos és biztos mederbe terelték témámat, valamint Erdős Évának és Gémesi Ildikónak, akik nélkül elvesztem volna a bürokrácia útvesztőjében.

Az anyagi, eszköz- és munkaerőbeli támogatást köszönöm Semmelweis Egyetem Magiszter Projekt-jének (TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0013).

Külön köszönöm Dósa Katalinnak, hogy lehetetlent nem ismerve kutatott fel minden hasznosnak, érdekesnek tűnő irodalmat, illetve Villányi Attilának, aki kitartó nevelő munkájával elindított természettudományos kutatói pályán.

Végezetül megköszönöm családomnak, főként szüleimnek, hugomnak és nagyszüleimnek, valamint barátaimnak, akik közül sokak nevét már fentebb kiemeltem, hogy sokszor önzetlenül, lemondások árán is támogattak ebben a dolgos időszakban, megteremtve ezzel a lehetőséget a kiegyensúlyozott, hatékony munkára.

Nélkületek nem sikerült volna!