



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Kristályos hányad meghatározásának jelentősége nagy hatóanyag-tartalmú szálak fejlesztésénél

TDK dolgozat

Szász Adrienn

Témavezetők:

Dr. Szabó Edina

tudományos munkatárs

Dr. Nagy Zsombor Kristóf

egyetemi docens

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Szakirodalmi áttekintés.....	4
2.1. Amorf szilárd diszperziók.....	4
2.1.1. A gyógyszerészeti amorf szilárd diszperziók tulajdonságai	4
2.1.2. Amorf szilárd diszperziók előállítása	5
2.1.3. Amorf szilárd diszperziók előállítása elektrosztatikus szálképzéssel	7
2.2. Nagy hatóanyag-tartalmú amorf szilárd diszperziók.....	8
2.3. A stabil amorf szilárd diszperziók fejlesztésének analitikai vonatkozásai	10
2.4. Célkitűzés.....	13
3. Felhasznált anyagok	14
3.1. Felhasznált hatóanyag	14
3.2. Alkalmazott segédanyagok	14
3.2.1. Elektrosztatikus szálképzésnél használt polimer	14
3.2.2. Elektrosztatikus szálképzésnél használt oldószerek.....	15
4. Alkalmazott kísérleti módszerek, eszközök.....	16
4.1. Az elektrosztatikus szálképzésre alkalmazott berendezés	16
4.2. Az előállított termékek vizsgálatára használt módszerek.....	16
4.2.1. Pásztázó elektronmikroszkópia.....	16
4.2.2. Polarizációs fénymikroszkópia	16
4.2.3. Kioldódás vizsgálat	17
4.2.4. Differenciális pásztázó kalorimetria.....	17
4.2.5. Termogravimetriás analízis.....	18
4.2.6. Por-röntgendiffrakció	18
4.2.7. Raman-spektroszkópia	18
5. Kísérletek leírása és értékelése	20

5.1.	Előkísérletek	20
5.1.1.	Optimális oldószer-párosítások keresése	20
5.1.2.	A minták analitikai vizsgálatai.....	22
5.2.	Szisztematikus hatóanyag-tartalom növelés	23
5.2.1.	Az oldatok előállítása és számképzése	23
5.2.2.	Az előállított szálak vizsgálata.....	26
5.2.3.	Kristályos hányad meghatározása	29
	Összefoglalás	33
6.	Irodalomjegyzék.....	34

1. Bevezetés

A gyógyszeriparban napjainkban a potenciális gyógyszerjelöltek száma jelentősen megnövekedett, köszönhetően a modern hatóanyag keresési módszereknek, mint például a kombinatorikus kémiának vagy a nagy áteresztőképességű szűrésnek. Az újonnan felfedezett gyógyszervegyületek azonban gyakran alacsony vízoldhatóságúak, így a hatóanyagok oldódási tulajdonságainak javítása a gyógyszerkészítmény fejlesztés egyik fő feladata.

Az amorf szilárd diszperziók (ASD) kialakítása egy ígéretes módszer a rossz vízoldhatóságú hatóanyagok formulációjára. Az ASD rendszerekben egy vagy több hatóanyag van általában valamilyen polimer mátrixban homogénen elosztatva és bennük a hordozó mellett a hatóanyag is amorf állapotban van. Az amorf formával az egyensúlyi oldhatóságot meghaladó kioldódás érhető el és ez a legtöbb esetben a biológiai hasznosulás növekedését eredményezi. Az ASD-k fejlesztésekor azonban számos kihívással kell szembenéznie a kutatóknak, például a nagy hatóanyag-tartalmú ASD-k fizikai stabilitási problémájával, hiszen a későbbi felhasználás és tárolás során a gyógyszerhatóanyag kristályos formájának újbóli kialakulásának elkerülése a cél. A hatóanyag-tartalom nagymértékű növelésére az ipari alkalmazhatóság szempontjából van szükség, ez azonban nagy eséllyel inhomogenitások kialakulásához, lokális kristályos nyomok megjelenéséhez vezethet. Az ASD-k stabilitásának feltérképezése, valamint a kristályos nyomokat és inhomogenitásokat kiszűrő analitikai vizsgálatok kidolgozása megkönnyítené a jövőbeli fejlesztéseket, ezért kutatómunkám során ezzel a témával foglalkoztam.

Fő feladatomban volt a nagy hatóanyag-tartalmú stabil ASD-s rendszerek előállítása, valamint a kristályos nyomok hatásának vizsgálata. Célkitűzéseim közé tartozott, hogy megalapozzam a hatóanyag-tartalmú szálak várható fizikai stabilitásának előrejelzését, ezzel segítve egy hatékonyabb készítményfejlesztési stratégia kidolgozását. Ehhez az eredmények jó kiindulópontként szolgálhatnak, ezzel is elősegítve a stabilitás jellemzésére használt módszerek méretnövelés során történő alkalmazását, ipari hasznosíthatóságát.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Amorf szilárd diszperziók

2.1.1. A gyógyszerészeti amorf szilárd diszperziók tulajdonságai

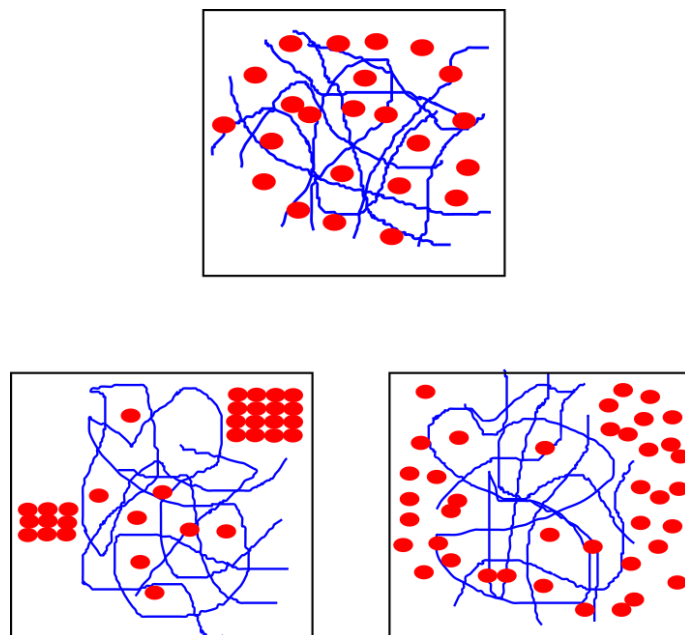
Egy orálisan bevehető gyógyszerkészítmény esetén a hatóanyag szervezetben történő biológiai hasznosulását döntően a gasztrointesztinális traktusban történő kioldódása, majd felszívódása határozza meg. Ezt alapul véve Amidon és munkatársai 1995-ben létrehozták a Biofarmáciai Osztályozási Rendszert (angolul Biopharmaceutical Classification System, BCS), melyben a kategóriák kialakítását az oldhatóság és permeabilitás határozza meg¹. A fejlesztés alatt álló gyógyszerjelöltek ~90%-a tartozik a BCSII-es és BCSIV-es csoportba, melyekbe a rossz vízoldhatóságú hatóanyagok sorolhatók².

Gyógyszeripari alkalmazhatóság szempontjából egy ígéretes megoldás a BCS II és BCS IV kategóriába tartozó hatóanyagok rossz vízoldhatóságának kiküszöbölésére az amorf szilárd diszperziós (angolul Amorphous Solid Dispersion, ASD) rendszerek alkalmazása. Ezen rendszerek alapját egy inert hordozóba vagy mátrixba ágyazott egy vagy több hatóanyag molekula adja³. Az ASD-k egy vagy több vízben rosszul oldódó hatóanyagot és egy vagy több hidrofíl hordozót, például polimert vagy más egyéb típusú segédanyagot tartalmaznak⁴.

Az amorf forma egyik nagy előnye, hogy gyorsabban és nagyobb mértékben oldódik a kristályos formával összehasonlítva, hiszen nem szükséges a kristályrács felszakításához energiát befektetni, így lecsökken az energiagát, amit le kell leküzdenie a molekuláknak az oldódás során⁵. A hatóanyag-polimer közötti kölcsönhatások, például hidrogén-kötés (H-kötés), van der Waals erők, elektrosztatikus, ionos vagy hidrofób kötések következtében a hatóanyag mobilitása lecsökken a hordozó mátrixban, ezzel pedig a rendszer nagyobb fokú stabilitással jellemezhető^{6,7}. A stabilitáshoz a polimer ezen kívül is hozzájárul, a magas üvegesedési hőmérséklettel rendelkező polimer egy lágyító hatáson megy keresztül, amíg a hatóanyag üvegesedési hőmérséklete megnő, ezáltal nő az energiaigény az amorf-kristályos átalakuláshoz. A nagy fajlagos felület szintén hozzájárul a gyorsabb oldódási sebességhez, emellett vízoldható polimerek alkalmazásával a gyógyszerhatóanyag nedvesíthetősége is javul⁵.

A felsorolt előnyök mellett az amorf forma kialakításával nem várt nehézségekbe ütközhet a készítményfejlesztés. Az ASD-k fizikai stabilitásának fenntartása, és ezáltal a

hatóanyag újra kristályosodásának megakadályozása egy fontos szempont, hiszen különböző szabályozási irányelvek írják elő általánosan egy gyógyszer stabilitási profiljának kialakítását⁸.



1. ábra: Az ASD-k három lehetséges szerkezete⁷

Az ASD-k instabilitása az 1. ábrán látható szerkezeti különbségekre vezethető vissza. Az ideális struktúra az ábra felső részén látható, amikor a hatóanyag molekulárisan teljesen diszpergálva van a polimer mátrixban, ez pedig általában alacsony hatóanyag-tartalmaknál vagy magasabb hőmérsékleten valósul meg⁷. Az ábra bal oldalán alul egy hatóanyag-polimer rendszer látható, ahol már végbement a kristályos hatóanyag kialakulása, mert a túltelített oldatból a hatóanyag hajlamos kicsapódni, a koncentrációja az adott hőmérsékleten megegyezik az egyensúlyi koncentrációval. Ha a kristályosodási folyamat nagyobb energiagáttal rendelkezik és lassabb a fázisszeparációhoz képest, akkor egy a jobb oldalon alul látható metastabil állapot jön létre, a rendszer amorf hatóanyagban gazdag egységeket tartalmaz a polimer mátrixban diszpergálva, mely idővel átkristályosodik. Az ideális szerkezet előállítása és fenntartása elengedhetetlen a stabil ASD-k előállításához, a megfelelő segédanyagok és formulálási módszerek alkalmazása jelentős hatással van a minőségre⁹.

2.1.2. Amorf szilárd diszperziók előállítása

Az ASD-k leggyakoribb előállítási módszerein belül két fő kategóriát különböztetünk meg, az olvadékos eljárásokat és az oldószer alapú technikákat, emellett egy harmadik kategória, a mechanokémiai aktiválási módszerek is használatosak¹⁰. Az olvadékos eljárások

lényege, hogy a hatóanyagot a hordozóval együtt mindkét anyag olvadáspontja vagy üvegesedési hőmérséklete fölé melegítik, ezen a hőmérsékleten keverik, majd a keletkezett oldadékot lehűtik¹¹. Az oldószer alapú módszerek lényege, hogy a hatóanyagot és hordozót egy közös oldószerben vagy oldószerkeverékben feloldva a keletkezett oldatból az oldószer vagy oldószerkeveréket elpárologtatják. Az adott készítményfejlesztési feladathoz legjobban illő módszer kiválasztásakor figyelembe kell venni mind az előnyöket, mind a hátrányokat, így a továbbiakban ezeket ismertetem részletesebben.

A kétféle módszer családot összehasonlítva az oldadék alapú legfontosabb előnye az oldószermentesség, így a folyamat során az oldószer eltávolításához köthető nehézségek elkerülhetők, egy környezetbarát, gazdaságos és maradék oldószer mentes termék állítható elő¹². A módszer további előnye, hogy folyamatos alkalmazása is megvalósítható, ami hatékony méretnövelést tesz lehetővé, az intenzív keverés hatására pedig a terméket nagymértékű homogenitás jellemzi. A használt polimer többfunkciós segédanyagként igen költséghatékonyá teszi az eljárást, a termodinamikai stabilitás pedig csökkenti a kristályosodás valószínűségét. A módszer legnagyobb hátránya, hogy az alkalmazott magas hőmérséklet következtében gyakran fellép a hatóanyag molekula degradációja, így a hőstabilitás kérdése kulcsfontosságú¹³. Emellett oldadék állapotban a polimer hordozónak megnő a viszkozitása, emiatt romlik a hatóanyag-polimer rendszer keverhetősége, ami inhomogenitáshoz vezethet.

Az oldószer alapú technológiák használata során a gyártási hőmérsékletek nem magasak, a szerves oldószerek párolgása alacsony hőmérsékleten történik, így a hőre érzékeny hatóanyagok és segédanyagok is feldolgozhatók ilyen eljárásokkal¹¹. A megfelelő oldószer kiválasztása, amiben a hatóanyag és a hordozó is oldódik, kihívást jelenthet. A módszer további hátránya, hogy a maradék oldószer eltávolítása, a gyógyszerkönyvi előírások által szabályozott határértékek betartása utólagos szárítási lépést tesz indokolttá, ami az előállítási költségeket és időt nagyban megnövelheti¹⁴. A maradék oldószer tartalom emellett befolyásolhatja a hatóanyag oldhatóságát a polimerben, valamint a molekuláris mozgékonytságot és folyadék-folyadék fázisszeparációt¹⁵ idézhet elő. Ennek az az oka, hogy a visszamaradó nedvesség gyengítheti a hatóanyag-polimer kölcsönhatást, az oldószer lágyító hatása pedig csökkentheti az üvegesedési hőmérsékletet, ezáltal növelve a mobilitást¹⁶.

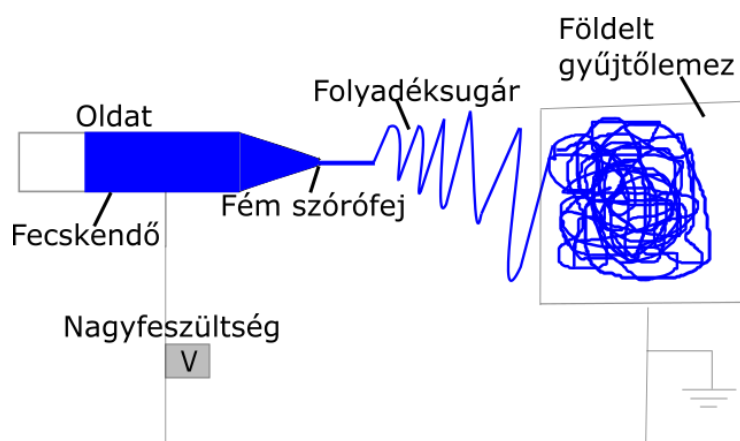
A munkám során használt elektrosztatikus szálképzés is az oldószeres módszerek közé sorolható. Az eljárás során az alacsony forráspontú oldószerek elpárologtatása az elektrosztatikus erőter alkalmazásának következtében majdnem teljes és pillanatszerű, ezáltal

az előnyök kihasználása mellett a módszer említett hátrányai is kiküszöbölhetők. Az eljárás részletesebb bemutatását a következő fejezet foglalja majd magában.

2.1.3. Amorf szilárd diszperziók előállítása elektrosztatikus szálképzéssel

Az ASD-k előállítására használt elektrosztatikus szálképzés egy igen sokoldalú eljárás, amely többféleképpen is megvalósítható, például oldószer, olvadék, emulzió vagy szuszpenzió felhasználásával¹⁷. A leginkább elterjedt módszer manapság a gyógyszeripari kutatásokban az oldószer alapú elektrosztatikus szálképzés.

Az általam is használt, úgynevezett egytűs elektrosztatikus szálképzés (angolul Single-Needle Electrospinning, SNES) (2. ábra) során egy biológiailag aktív hatóanyagot és polimer segédanyagot tartalmazó, optimális viszkozitású oldatot állítunk elő¹⁸. Ehhez elengedhetetlen, hogy egy jól szálképezhető hordozót alkalmazzunk, a hatóanyag-polimer rendszer pedig kompatibilis legyen az oldószerrel. Az előállított oldatot egy kapilláris csőben adagoljuk, állandó egyenletes sebességgel egy adagoló pumpa segítségével. A kapilláris cső egy nagyfeszültségre kapcsolt fém szórófejhez kapcsolódik, amellyel szemben egy adott távolságban egy földelt gyűjtőlemez helyezkedik el, itt a pozitív pólushoz a fém tű, a negatívhoz pedig a gyűjtő van csatlakoztatva¹⁹. A fém tű és a földelt gyűjtő közé nagyfeszültség kapcsolása elektromosan töltött oldatot képez a szórófej hegyénél, a potenciálkülönbség hatására az oldat polarizálódik. A szórófejből kilépő oldat töltött folyadékcseppje kicsúcsosodik, egy úgynevezett Taylor-kúpot vesz fel, a szálképzés pedig megindul, ha a felületi feszültséget legyőzik az elektrosztatikus erők¹⁸. A Taylor-kúp formából egy folyamatos áramlású folyadéksugár lép ki a gyűjtőlemez irányába, a folyadéksugár elvékonyodik és szálszerű szerkezete lesz, eközben pedig a használt oldószer vagy oldószerkeverék elpárolog a szálak struktúrájának köszönhető nagy fajlagos felület következtében. Ezek a nagy fajlagos felülettel jellemezhető szálak a földelt gyűjtőlemezen szálak szövet réteggé összegyűlnek, és a gyártási eljárás végén erről könnyen eltávolíthatók hosszirányú makroszkópikus kiterjedésük miatt. Az ASD-k előállítására ez a módszer azért megfelelően alkalmazható, mert a szálak gyűjtő felé haladása során a szerves, illékony oldószer pillanatszerűen elpárolog, így nincs idő a kristályosodásra és az amorf forma jön létre.



2. ábra: Az egytűs elektrosztatikus szálképzés sematikus ábrája

2.2. Nagy hatóanyag-tartalmú amorf szilárd diszperziók

Manapság számos publikáció megtalálható a szakirodalomban, amely beszámol az ASD-s rendszerek sikeres előállításáról. Ennek ellenére a készítményfejlesztési stratégiák többsége még nem teljesen tervezett, az adott gyógyszerhatóanyaghoz leginkább alkalmazható ASD formulálási módszer, valamint a segédanyag választás legtöbbször a korábban már kipróbált néhány rendszer tapasztalatait veszi alapul²⁰. A fejlesztés során kulcskérdés a stabil ASD-s rendszerek előállítása, hiszen ez teszi lehetővé gyógyszerészeti alkalmazását. A már említett paraméterek jelentősen befolyásolhatják az ASD-k stabilitását, ilyenek például az üvegesedési hőmérséklet, molekuláris mozgékonyosság és a polimer-hatóanyag kölcsönhatások.

Az iparban a stabilitás kérdése mellett egyéb szempontokat is érdemes szem előtt tartani, például a választott formulálási módszer termelékenységét, az előállított szálak termék feldolgozhatóságát és a későbbi felhasználhatóságot. A nagy hatóanyag-tartalmú ASD-k (angolul High Drug Loading ASD, HDL ASD, 50 m/m % hatóanyag-tartalom felett²⁰) előállítása számos előnnyel járhat a „hagyományos” ASD-kkel szemben, például a dózis méretének csökkentése és ezáltal a terápiás megfelelés, a beteg együttműködés növekedése²¹. Ezen rendszereknél a fő problémát mégis az előzőekben már felvetett stabilitás okozza, hiszen a hatóanyag hányadának növelésével az esetleges inhomogenitások és fázisszeparáció befolyásolják a minőséget.

Általánosan a polimerben diszpergált gyógyszerhatóanyag fizikai stabilitását többféle mechanizmus okozza, például a hatóanyag oldhatósága és keverhetősége a polimer hordozóban, a polimer-hatóanyag közti kölcsönhatások okozta hatóanyag mobilitás csökkenés,

valamint a polimer szerkezete miatti sztérikus gátlás²². Egy adott rendszerre igaz lehet, hogy sokszor több mechanizmus együttes hatása segíti elő a fizikai stabilitást, noha ezek a mechanizmusok a fejlesztések korai szakaszában nem meghatározottak. Az elérhető legnagyobb hatóanyag-tartalom meghatározását célozzák különböző vizsgálati módszerek, melyek segítségével információ szerezhető a HDL ASD-k megvalósíthatóságáról.

Az empirikus módszereket, melyek során különböző polimerek segítségével eltérő polimer-hatóanyag rendszereket vagy egy adott polimer és hatóanyag felhasználásával egy koncentráció tartományt állítanak elő, általánosan alkalmazzák például az oldhatóság, stabilitás és kioldódás összehasonlítására²². Egy másik vizsgálati módszer, hogy a kristályosodási kinetika használatával meghatározható a legalacsonyabb polimer koncentráció, ami a HDL ASD rendszer stabilizálásához elengedhetetlen. A polimer változtatásával azonban a kinetika is változik, ezért további adatok szükségesek a megfelelő polimer koncentráció becsléséhez, nem általánosíthatóak a mérési eredmények minden hatóanyag-polimer rendszerre. A mobilitás vizsgálatára egy úgynevezett szélessávú dielektromos spektroszkópia használható, mely során α -relaxációk és ezt elősegítő másodlagos relaxációk mérésével következtetni lehet a hatóanyag nukleáció és kristályosodás mértékére. Emellett például a modulált DSC²³, a ^{13}C NMR²⁴ és a dinamikus mechanikai elemzés²⁵ is alkalmazható erre a célra. A polimer sűrűségének hatását vizsgálva a mobilitásra és viszkozitásra szintén a hatóanyag-tartalom és a stabilitás kapcsolata deríthető fel.

A HDL ASD-k fejlesztése az előzőek alapján látható, hogy nem egy egyszerű feladat, azonban különböző stratégiák felhasználásával a kutatómunka megkönnyíthető. A nagy gyógyszerterhelést elkerülve a polimer mennyiségének csökkentését segítheti a térhálósítás, mely javítja a polimer stabilizáló hatását²⁶. A térhálósítási eljárás során polimer láncok egymáshoz kötésével egy többdimenziós kiterjedés alakul ki, mely egy hálózat szerkezetet eredményez. Ez a folyamat a polimer típusától függően többféleképpen is megvalósítható, például kémiai úton, termikusan, fizikailag vagy γ -besugárzással. A polimer térhálósodása a mechanikai szilárdság, viszkozitás és üvegesedési hőmérséklet növekedését okozza, ezzel hatékonyan csökkentve a molekuláris mozgékonyt, amely többek között a kristályosodási hajlammal függ össze.

A kémiai térhálósítás igen jól használható térhálósított hidrogélek előállítására²⁷, melyek nagy mennyiségű folyadék felvételére képesek, azonban az ilyen rendszerek nagy hátránya, hogy a vizes közegben oldhatatlanná válhatnak. A termikus úton végrehajtott térhálósítás előnye, hogy nem szükséges térhálósító ágens alkalmazni, azonban a termikusan instabil

vegyületeknél korlátozott ez a módszer²⁸. További előnyök közé sorolható, hogy a kémiai úthoz képest 50 m/m %-nál magasabb hatóanyag-tartalmak is elérhetőek, valamint folyamatos feldolgozási lehetőséget is biztosít a magasabb hőmérséklet miatt például olvadék extrudálással²⁹. A technológia fő befolyásoló paraméterei között a megfelelő térhálósítási körülmények, az alkalmazott polimerek típusa és összetétele szerepel, melyek gondos megválasztásával a HDL ASD-k előállítása a jövőben jól tervezhetővé válik.

2.3. A stabil amorf szilárd diszperziók fejlesztésének analitikai vonatkozásai

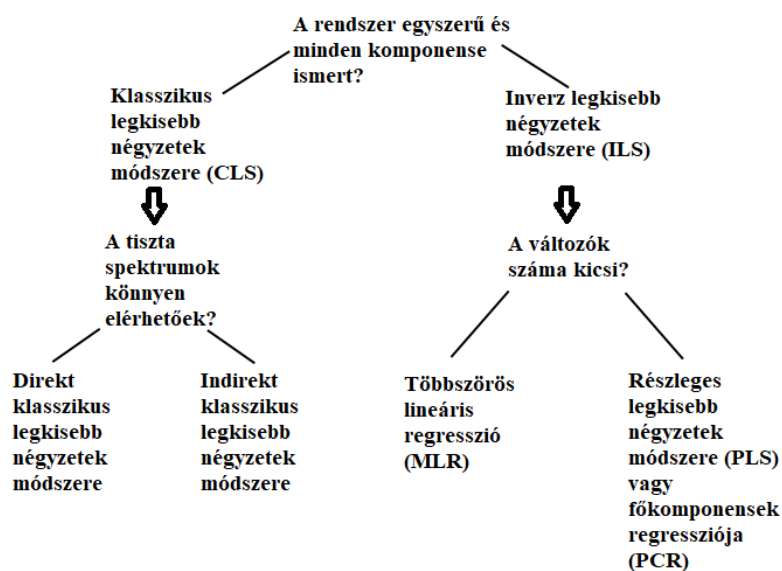
Az ASD-k fejlesztése során rendkívül fontos a választott gyártási eljárás mellett a használható analitikai vizsgálatok feltérképezése is.

A kristályos jelleg detektálására a szakirodalomban általánosan használt módszerek az ASD-k esetén a por-röntgendiffrakció (XRPD) és differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)³⁰. Ezen vizsgálati módszerek egymás fontos kiegészítő mérései, ha önállóan alkalmazzák őket, akkor különböző bizonytalanságok maradhatnak az ASD-s rendszerekkel kapcsolatban. A kristályos anyag jelenlétére az XRPD esetén úgynevezett Bragg-csúcsok utalnak, míg a DSC görbén egy endoterm olvadási csúcsban jelentkezik, mindkettő egy adott polimorfra jellemző. A DSC mérések során a minta melegítés hatására újra kristályosodhat, ez pedig egy endoterm csúcsban nyilvánul meg. A módszer felhasználható üvegesedési hőmérséklet meghatározásra, mely összefüggésben állhat az ASD stabilitásával^{31,32}. A kristályos anyagok kimutatására a DSC mérés érzékenyebb, mint a körülbelül 5 %-os detektálási határral rendelkező XRPD, azonban utóbbi egy roncsolásmentes módszer, mellyel a minták szobahőmérsékleten értékelhetők termikus hatások nélkül³⁰. Az XRPD egy másik limitáló tényezője, hogy a mintában esetlegesen jelenlévő amorf-amorffáziszeperációt nem képes észlelni, a DSC-vel viszont különböző üvegesedési átmenetek formájában kimutatható.

A kristályosság kimutatására a polarizációs fénymikroszkópia egy nagyon érzékeny kvalitatív módszer³³, hiszen az elkészült felvételeken már igen kis koncentrációban jelenlévő kristályosság esetén is kettős törés látható, mely színessé teszi a minta adott pontjait. A transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) is használható a kristályos tartalom nagy felbontású azonosítására, mert képes a mintavastagság változásának, ezáltal elektronszóródást indukáló régióinak megkülönböztetésére, amelyek kristályos egységekre utalhatnak³⁴.

A kristályos nyomok kvantitatív meghatározásához továbbá a Raman-spektroszkópia alkalmazható, mely viszonylag jó kimutatási határral rendelkezik, már igen kis mennyiségű lokális kristályos nyom kimutatásához megfelelő^{10,35}. Emellett kemometriai számítási

módszerekkel kiegészítve a Raman-spektroszkópiás méréseket az adatelemzés mennyiségi meghatározást tesz lehetővé. A Raman-spektroszkópia számos előnnyel rendelkezik más módszerekkel összevetve, például a segédanyagok gyengébb jelet adnak a hatóanyagoknál, így ezek Raman-jelei könnyebben azonosíthatók akár alacsonyabb koncentrációknál is. Ezen eltérés oka, hogy a használt segédanyagok általában nem aromásak és nem kristályosak, míg a hatóanyagok többnyire aromás, kristályos vegyületek, melyek erős Raman-szóródást mutatnak³⁶. A módszer további előnye, hogy roncsolásmentes és kevés minta előkészítés szükséges hozzá. A kapott adatokat egyváltozós elemzéssel kiértékelve kis spektrális különbségek megkülönböztetése nem lehetséges, így az utóbbi években a többváltozós vagy kemometriai elemzés került előtérbe. Előnye, hogy egyszerre több minta komponens is mérhető, a kis szignifikáns különbségeket képes detektálni és nem okoz gondot az átlapoló csúcsok értelmezése sem³⁷. Ezzel szemben hátránya, hogy az adatok félreértelmezése gyakoribb, hiszen ez egy komplex és kevésbé intuitív módszer, mint az egyváltozós elemzés.



3. ábra: A megfelelő többváltozós adatelemzési módszer kiválasztásának lépései³⁷

A 3. ábrán az említett többváltozós adatelemzési módszerek közüli választás lépései láthatóak, melyek alapján eldönthető, hogy az adott rendszerhez milyen módszer illeszthető. Munkám során a klasszikus legkisebb négyzetek (angolul Classical Least Squares, CLS) módszert alkalmaztam, így a továbbiakban erről írnék részletesebben. A CLS módszer alkalmazásával például a Raman-spektrumok esetén lehetővé válik a spektrális koncentrációk becslése, melyhez a modell a referencia spektrumok lineáris kombinációját használja³⁸. A direkt

és indirekt CLS között az egyik különbség, hogy az előbbi tiszta komponenseket használ a kalibrációhoz, míg utóbbi keverékeket, melyekben az összes komponens és koncentráció ismert. A módszer viszonylag egyszerű, kevés mintára van szükség a modell felállításához, de az összes komponens és azok koncentrációjának ismerete, emellett a zavarok kiküszöbölése létfontosságú.

2.4. Célkitűzés

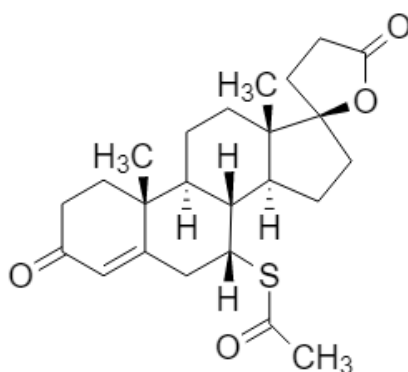
A szakirodalmi áttekintés alapján jól látható, hogy az oldószeres elektrosztatikus szálképzés ígéretes módszer lehet nagy hatóanyag-tartalmú ASD-k előállításához a gyógyszeripari fejlesztések során. Ehhez azonban elengedhetetlen a hatóanyag-tartalmú szálak stabilitását befolyásoló paraméterek, valamint a stabilitás feltérképezéséhez használható analitikai módszerek ismerete és mélyebb megértése. Ezek nélkül a méretnövelés és a technológia ipari alkalmazása nehézkes lehet.

Ezt figyelembe véve kutatómunkám fő célja az ASD-s rendszerek instabilitását okozó kristályos nyomok kvantitatív és kvalitatív meghatározása volt. Munkám során ennek érdekében több analitikai vizsgálati módszert is alkalmaztam, hogy a minták morfológiájáról, amorf jellegéről, kioldódási tulajdonságairól és a bennük esetlegesen kialakult inhomogenitásokról információt szerezzek. Ezen kívül továbbá célkitűzéseim közé tartozott az is, hogy az alkalmazott analitikai vizsgálatokat a jövőben a méretnövelés során is használjam.

3. Felhasznált anyagok

3.1. Felhasznált hatóanyag

Kutatómunkám során modell hatóanyagként a spironolaktont (SPIR) választottam, amely egy vérnyomáscsökkentőként is alkalmazható, aldoszteron antagonistá vizelethajtó. A hatóanyag a BCSII kategóriába sorolható, vízben való oldhatósága $28 \mu\text{g/ml}^{39}$. Kísérleteimhez a Richter Gedeon Nyrt. (Budapest, Magyarország) által gyártott mikronizált kristályos SPIR-t használtam, melynek olvadáspontja 211°C volt¹⁰. A hatóanyag molekula szerkezete a 4. ábrán látható.



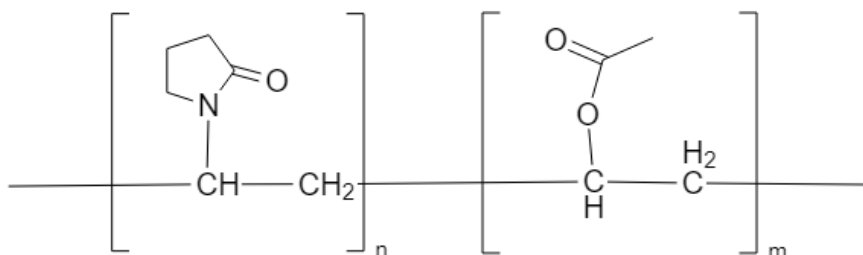
4. ábra: A spironolakton (SPIR) szerkezeti képlete

3.2. Alkalmazott segédanyagok

3.2.1. Elektrosztatikus szálképzésnél használt polimer

A hatóanyag amorf formájának stabilizálásához az elektrosztatikus szálképzés során hordozóként poli(1-vinilpirrolidon-ko-vinil-acetát) polimert (PVP VA64) (Kollidon® VA64, BASF, Németország) használtam, melyben a vinilpirrolidon és a vinil-acetát monomerek aránya 6:4 volt. A polimert a gyógyszeripar számos célra hasznosítja, felhasználható például granulálási segédanyagként, tablettáknál és kapszuláknál kötőanyagként, vagy tablettá bevonási segédanyagként. A PVP VA64 jó vízoldhatósággal jellemezhető, ezért gyakran használják ASD-k előállítására is⁴⁰. Emellett a $\sim 106^\circ\text{C}$ -os üvegesedési hőmérséklete is kedvező

az amorf hatóanyagok stabilizálásnak szempontjából. A polimer szerkezeti képletét az 5. ábra mutatja be.



5. ábra: A PVP VA64 polimer szerkezete

3.2.2. Elektrosztatikus szálképzésnél használt oldószerek

Az elektrosztatikus szálképzéshez szükséges oldatok előállításához különböző oldószerek elegyeit használtam, melyek fontosabb jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Az alkalmazott oldószerek

Kémiai elnevezés (Rövidítés)	Gyártó	Tisztaság [%]	Forráspont [°C]	Molekula tömeg [g/mol]	Maradék-oldószer gyógyszeripari határértéke [ppm] ⁴¹	Sűrűség [g/cm ³]	Hiv.
Aceton (Ac)	Lach-Ner Kft.	99,98	56,05	58,08	5000	0,784	⁴²
Diklórmétán (DCM)	Merck Kft.	≥99,5	40	84,93	600	1,32	^{43,44}
Etanol (EtOH)	Lach-Ner Kft.	99,8	78,5	46,07	5000	0,789	⁴²
Etil-acetát (EtOAc)	Lach-Ner Kft.	≥99,5	77	88,11	5000	0,895	⁴²

4. Alkalmazott kísérleti módszerek, eszközök

4.1. Az elektrosztatikus szálképzésre alkalmazott berendezés

Az ASD-k előállítására a szakirodalmi áttekintésben is szereplő SNES módszert alkalmaztam. Különböző oldószerek elegyeinek felhasználásával állítottam elő a hatóanyagot és a polimert tartalmazó oldatokat. majd azokat egy fecskendőbe töltöttem és egy szilikon csövön keresztül egy fém tűhöz (szórófejhez) adagoltam 10 ml/h sebességgel, egy SEP-10S Plus típusú infúziós pumpa (Aitecs, Vilnius, Litvánia) alkalmazásával. A szórófej egy nagyfeszültségű generátorral (Unitronik Kft., Nagykanizsa, Magyarország) volt összekötve, melyen 17-17,5 kV feszültségértékeket állítottam be. A potenciálkülönbség kialakulásához a szórófejjel szemben, körülbelül 15 cm távolságra egy földelt alumínium gyűjtőlemezt tettem. Az elektrosztatikus szálképzéseket szobahőmérsékleten, valamint légköri nyomáson végeztem.

4.2. Az előállított termékek vizsgálatára használt módszerek

4.2.1. Pásztázó elektronmikroszkópia

Az elektrosztatikus szálképzéssel előállított termékek morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal (angolul Scanning Electron Microscope, SEM) vizsgáltam, melyhez egy JEOL JSM-6380LA (JEOL, Tokió, Japán) típusú készüléket használtam. A minták előkészítése során a vizsgálandó anyagot egy kétoldalú szén ragasztószalaggal egy réz mintatartóra rögzítettem, majd elvégeztem az aranyozási lépést a berendezéshez tartozó JEOL 1200 (JEOL, Tokió, Japán) típusú aranyozó készülékkel. Erre azért volt szükség, hogy a vizsgálat során a SEM készülékben esetlegesen fellépő feltöltődést elkerüljük. Ezek után a mintatartót a mintával együtt a készülékbe helyeztem, és a szükséges beállítások elvégzését követően több felvételt készítettem különböző nagyításokban, 10 kV feszültség és nagyvákuum alkalmazása mellett. Az így elkészült felvételek a szálak minták átmérőjének megállapításához is alkalmasak voltak, melyhez a kutatócsoportunkban kidolgozott randomizált átmérő meghatározási módszert használtam⁴⁵.

4.2.2. Polarizációs fénymikroszkópia

A szálképzéssel előállított minták kristályos nyomainak detektálására egy Amplitval Carl Zeiss (Jéna, Németország) polarizált mikroszkópot használtam, ami egy OLYMPUS C4040 Z típusú kamerával volt felszerelve. A minták előkészítése során kis mennyiségű terméket egy üveg tárgylemezre helyeztem, majd szilikon olajat cseppentettem rá, hogy az agglomerátumok különálló részecskék formájában vizsgálhatóak legyenek. A mintákat ezután a mikroszkópba

helyeztem és alsó megvilágítás segítségével 6,3x-os és 12,5x-es objektívekkel vizsgáltam azokat. A kamerával készült képek összegyűjtése Olympus DP-Soft szoftverrel történt.

4.2.3. Kioldódás vizsgálat

A rossz vízdoldhatóságú SPIR-t ASD-s formába alakítva jelentősen javítható a kioldódása. Ennek vizsgálatára kioldódás tesztek hajtottam végre, egy Pharma Test PTWS-600 (Pharma Test Apparatebau AG, Hainburg, Ausztria) típusú készülék alkalmazásával. A kioldóhoz egy átfolyócellás rendszeren keresztül egy UV-VIS spektrofotométer (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) is kapcsolódott, mely lehetővé tette a kioldódás on-line mérését. Az oldott SPIR abszorbanciáját 243 nm hullámhosszon, 10 mm fényutas küvettákon keresztül vizsgálta az on-line csatolású spektrofotométer. A szoftver a kioldódás százalékos értékeit az előzetesen felvett kalibrációs görbe, a bemért tömegek és a mért abszorbancia értékek alapján számolta. A kioldódás vizsgálatok során az általam használt mérési elrendezés különlegessége volt, hogy a keverőlapátok mellett kosarakat is alkalmaztam, amik a lapát tengelyére rögzített műanyag spirális pálya következtében fel-le irányú mozgást is végeztek⁴⁶. A különböző összetételű minták összehasonlíthatósága érdekében a kosarakba egységesen 50 mg-os dózisokat mértem be, így a 10-30-50-70-90 % hatóanyag-tartalmú mintáimból rendre 500 mg, 166,7 mg, 100 mg, 71,4 mg és 55,6 mg mennyiségek voltak szükségesek. A mérések kezdetén a keverőlapátok fordulatszámát 50 fordulat/percre állítottam, a mintákat tartalmazó kosarakat pedig belehelyeztem az általam használt kioldó közegbe, ami 0,1 M koncentrációjú, 900 ml térfogatú és $37,0 \pm 0,5$ °C hőmérsékletű sósav volt. Minden minta esetén három párhuzamos mérést végeztem el.

4.2.4. Differenciális pásztázó kalorimetria

A minták amorf jellegét differenciális pásztázó kalorimetriával (angolul Differential Scanning Calorimetry, DSC) vizsgáltam egy Setaram DSC92 (Calure, Franciaország) típusú berendezéssel. A mérésekhez egy 100 µl-es alumínium mintatartóba a vizsgálandó mintákból 8-10 mg-os mennyiségeket mértem be, majd a készülékbe helyeztem. Az inert atmoszféra biztosításának érdekében a cellát átöblítettem nitrogénnel, a mérést 1,6 bar nyomású nitrogén atmoszférában végeztem el. Az alkalmazott hőprogram alapján a készülék kezdetben 1 percen keresztül szobahőmérsékleten, izoterm állapotban tartotta a mintát, majd 10 °C/min fűtési sebességgel emelte a hőmérsékletet egészen 250 °C-ig, eközben pedig rögzítette a hőáram értékeit.

4.2.5. Termogravimetriás analízis

Az előállított minták termogravimetriás analíziséhez (angolul Thermogravimetric Analysis, TGA) egy Q5000 TGA (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) típusú berendezést használtam. A mérendő mintákból 8-10 mg-os mennyiségeket mértem be előre letárazott platina tégelyekbe, majd behelyeztem a készülékbe és elindítottam a mérési programot. A készülék 10 °C/min fűtési sebességgel emelte a hőmérsékletet 25 °C és 105 °C között, majd 20 percen keresztül izoterm állapotban tartotta a mintát. Az alkalmazott atmoszféra inert, 25 ml/min áramlási sebességű nitrogén volt. Az adott mintát közvetlenül gyártás után és 1 héttel később, szobahőmérsékletű tárolást és szárítást követően is lemértem, hogy a minták tömegváltozásának lehetséges tendenciáit felderítsem.

4.2.6. Por-röntgendiffrakció

A mintákat por-röntgendiffrakciós módszerrel (angolul X-Ray Powder Diffraction, XRPD) is vizsgáltam, hogy az amorf rendszer kialakításának sikerességét vagy esetleges kristályos nyomok jelenlétét meg tudjam állapítani. A vizsgálatok elvégzéséhez egy X'PERT PRO MPD (Multi Purpose Diffractometer) PANalytical (Almelo, Hollandia) típusú készüléket használtam. A mérés előkészítésekor egy fémtokkal ellátott szilícium egykristály lapon egyenletesen eloszlatam a mintákat, majd a detektor és sugárforrás közé helyeztem a mintatartót. A mérést 4-44° közötti tartományban, 0,0167 mm-es lépésközzel lépésenként, 30 mA áramerősség és 40 kV feszültség mellett végeztem.

4.2.7. Raman-spektroszkópia

A szálképzéssel előállított mintákban esetlegesen megjelenő kristályos nyomok detektálásához Raman-spektroszkópiát alkalmaztam, melyhez kétféle berendezést is használtam. Az egyik módszernél Raman-térképezést hajtottam végre egy LabRAM (HORIBA Jobin Yvon, Edison, New Jersey, USA) típusú készülék segítségével, melyhez egy Olympus BX-40 optikai mikroszkóp és egy külső 785 nm-es dióda lézerforrás kapcsolódott. Az alkalmazott 950 barázda/mm-es optikai rács a Raman fotonok diszpergálását végezte, mielőtt azok elérték volna a CCD (Charge-Coupled Device) detektort. A mérésekhez a minták előkészítése során körülbelül 2 mm vastagságú pasztillákat préseltem egy Camilla OL95 (Manfredi, Torino, Olaszország) prés segítségével, 160 mg mennyiségű ASD-s szál bemérésével. A spektrumok felvétele 570-1765 cm⁻¹ hullámhossz tartományban, 4 cm⁻¹ felbontással történt 50x-es nagyítású objektív alkalmazása mellett. A térképek 41 x 41 pontot tartalmaztak, mindkét irányban 5 µm lépésközzel rögzítve. Minden mérési pontban 20

másodpercig tartott egy spektrumfelvétel, pontonként két spektrumot átlagoltam. A Raman térképek kiértékeléséhez a felvett spektrumokon különböző adatelőkészítéseket, például alapvonal korrekciót, simítást és normalizálást hajtottam végre a LabSpec 5.41 szoftver használatával. A Raman-térképek kiértékelése a klasszikus legkisebb négyzetek (angolul Classical Least Squares, CLS) módszerével történt, melyhez referenciaként a kristályos SPIR, amorf SPIR és a PVP VA64 spektrumait használtam.

A másik használt spektroszkópai műszer a Kaiser RamanRxn2[®] Hybrid in situ analizátor (Kaiser Optical Systems, Ann Arbor, USA) volt, amelyhez egy PhAT (Pharmaceutical Area Testing) szonda volt csatlakoztatva. Fényforrásként 400 mW-os, 785 nm-es dióda lézert (Invictus) alkalmaztam. A vizsgált Raman eltolódási tartomány 200 cm^{-1} és 1890 cm^{-1} között volt, 4 cm^{-1} -es felbontással. Reflexiós mérési módot használtam az előzőekben legyártott pasztillák és por formájú referenciák esetén. A megfelelő jel-zaj arány eléréséhez reflexiós módban 30 másodperces adatgyűjtési idő volt szükséges, 2 adatgyűjtés átlaga adta a spektrumot. Egy-egy mintával két ismételt mérést végeztem, a referenciáknál egy másik mérési pontot választottam, míg a pasztilláknál a két oldalról készült felvétel.

5. Kísérletek leírása és értékelése

5.1. Előkísérletek

5.1.1. Optimális oldószer-párosítások keresése

Kutatómunkám során korábbi eredményeimet figyelembe véve arra a következtetésre jutottam, hogy a különböző oldószerek felhasználásával előállított mintáknál a fő limitáló tényező a hatóanyag oldhatósága, ez pedig problémákat vet fel a hatóanyag-tartalom növelésének szempontjából. Ennek kiküszöbölésére az oldószerkeverégek alkalmazása tűnik ígéretes megoldásnak.

A hatóanyag oldhatóságát szobahőmérsékleten korábbi munkám során négy különböző szerves oldószerben állapítottam meg⁴⁷, az oldhatósági értékeket az alábbi 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A spironolakton oldhatósága a használt oldószerekben

Oldószer	Meghatározott oldhatóság [mg/ml]
Aceton	320
Diklórmétán	600
Etanol	30
Etil-acetát	40

A táblázat alapján látható, hogy a felsorolt oldószerek közül az aceton és diklórmétán esetén kiemelkedő hatóanyag koncentráció érhető el. Ezen két oldószer hátránya, hogy viszonylag alacsony forráspontjuk következtében nagy az illékonyaságuk, ami a gyártási eljárás során az oldat betöményedéséhez, ezáltal a szórófej furatának eltömődéséhez vezethet.

A minták előállítása során ezért figyelembe vettem mind az oldhatósági, mind a forrásponti adatokat és egy illékony, valamint egy kevésbé illékony oldószert mértem be 1:3, illetve 1:1 arányban. Az illékonyabb aceton és diklórmétán mellé kevésbé illékony oldószert párosítottam, így a lehetséges összetételek a következők voltak:

- aceton – etanol
- aceton – etil-acetát
- diklórmétán – etanol
- diklórmétán – etil-acetát

Az oldott szilárdanyag tartalmát 500 mg-ra rögzítettem 2 ml oldószerkeletben, így a koncentráció minden minta esetén egységesen 25 m/V % volt. A bemérések során a korábbi kutatásaimban már vizsgált 50 % SPIR-t és 50 % PVP VA64-et tartalmazó összetételt céloztam meg, hiszen ez már egy nagy hatóanyag-tartalomnak mondható, de a stabilitás szempontjából korábbi kísérleteimben még megfelelő arány volt.

Az 1:3 összetételű oldószerkelet minták előállítása során arra a következtetésre jutottam, hogy az etanolt tartalmazó minták esetében az oldatok koncentrációja túl alacsony a megfelelő szálképzéshez, mert porlasztott, apró szemcsék keletkeztek szálak helyett. Az oldott anyag mennyiségét emiatt 500 mg-ról 625 mg-ra növeltem az etanolt is tartalmazó oldószerkelet esetén, az előzőkhez hasonlóan 2 ml összes oldószer térfogatra vonatkoztatva a koncentráció így 31,25 m/V %-ra változott. A későbbiekben vizsgált minták végleges beméréseit az alábbi 3. táblázat tartalmazza.

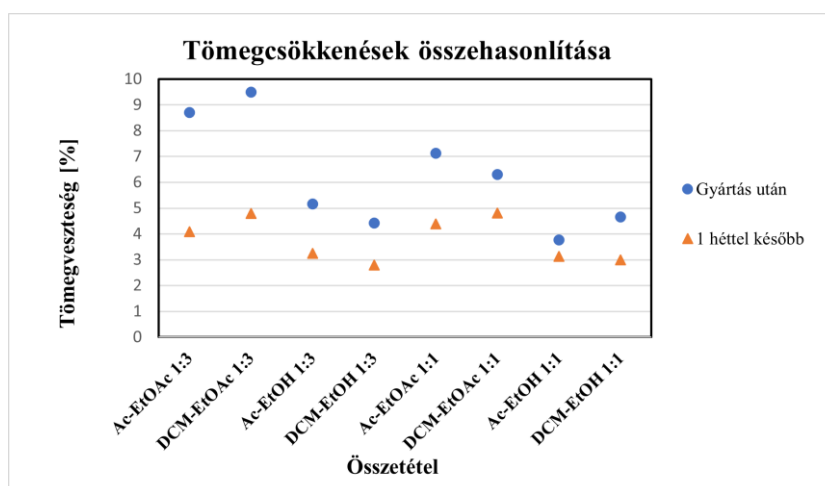
3. táblázat Az elkészített oldatok, 1:3 (felül), és 1:1 oldószer arány (alul)

Oldószerkelet	m/m % o.anyag	m/m % hatóanyag	m(hatóanyag) [g]	m/m % polimer	m(polimer) [g]	Termelékenység [%]
Ac -EtOH	28,40	50	0,3125	50	0,3125	13,81
Ac -EtOAc	22,38		0,25		0,25	_*
DCM -EtOH	25,31		0,3125		0,3125	51,66
DCM -EtOAc	19,98		0,25		0,25	_*
Ac -EtOH	28,43	50	0,3125	50	0,3125	54,75
Ac -EtOAc	22,95		0,25		0,25	50,00
DCM -EtOH	22,86		0,3125		0,3125	47,68
DCM -EtOAc	18,42		0,25		0,25	38,10

* A megjelölt mintáknál a fém gyűjtőlemezre helyezett alufóliáról az előállított termék nehezen volt eltávolítható, így a termelékenységet nem sikerült meghatározni.

5.1.2. A minták analitikai vizsgálatai

A különböző oldószerkelegyek felhasználásával előállított 50% hatóanyag-tartalmú szálakat többféle módszerrel vizsgáltam, munkám első lépéseként termogravimetriás méréseket végeztem a szálas mintákkal. Ezen vizsgálat segítségével a maradék oldószer tartalomról lehet következtetéseket levonni. A módszer hátránya, hogy tendenciák vizsgálatára, esetleges összehasonlítására alkalmazható csak, pontos mennyiségi meghatározást nem tesz lehetővé. Ennek oka, hogy a berendezés nem képes különbséget tenni a szálképzés során alkalmazott szerves oldószer és a polimer által megkötött víz távozása között, a tömegcsökkenés értéke ezen két mennyiség összegeként szerepel a mérési eredményekben. Ellenben előnye, hogy gyors és egyszerű vizsgálat, így munkám során emiatt választottam ezt a vizsgálati módszert. A vizsgálat során a mintákat gyártás után közvetlenül, valamint egy héttel később is lemértem, a két mérés között eltelt időben pedig szobahőmérsékleten tároltam és szárítottam a mintákat. A tömegváltozások összehasonlítása a következő, 6. ábrán látható.

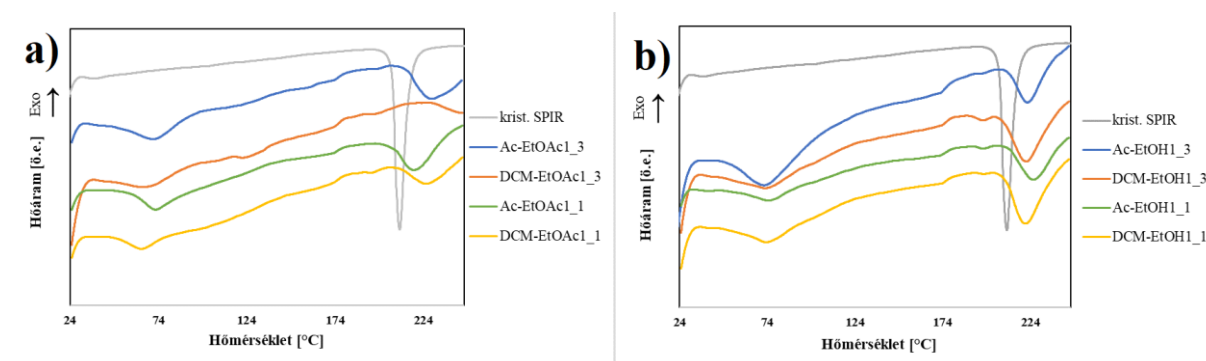


6. ábra: Termogravimetriás mérési eredmények

A pontok helyzete a vártnak megfelelően alakult, a szárítás során a szerves oldószer egy része elpárolgott, így a tömegcsökkenés kevesebbnek bizonyult 1 héttel később, mint gyártás után. Az összes minta 2,8-4,8 % tömegvesztésre állt be minden esetben az 1 hetes szárítást követően.

Következő lépésben az amorf jelleget DSC mérésekkel támasztottam alá, amit a 7. ábra szemléltet. Az eredmények alapján látható, hogy a kristályos hatóanyagra jellemző endoterm oladási csúcs 211 °C-nál nem jelentkezik az általam előállított mintákban, így ezek mindegyik esetben amorf formában lévő hatóanyagot tartalmaznak. A 70 °C körüli csúcsok a polimer által

megkötött víz jelenlétét jelzik¹⁰, míg a 220 °C körül megjelenő csúcsok a hatóanyag bomlására utalhatnak⁴⁸. A bomlási hőmérséklet eltolódás jelenségét már a szakirodalomban megtalálható publikációkban is vizsgálták, amelyek alapján az ASD-s rendszerekre jellemző, hogy a hatóanyag bomlása könnyebben bekövetkezhet akár alacsonyabb hőmérsékleten^{49,50}.



7. ábra: Az előkísérletek során előállított minták termogrammjai. Az a) etil-acetátot és b) etanolt tartalmazó oldószerkelegyes minták vizsgálati eredményeit ábrázolja

A szálas mintákon elvégzett termoanalitikai vizsgálati módszerek eredményei alapján elmondható, hogy a további vizsgálatokhoz célszerű 1:1 arányú összetételt tovább vinni. Az egyik szempont, amit figyelembe vettem, hogy a hatóanyag oldhatósága a 2. táblázat alapján jobbnak bizonyul a diklórmétánban, mint az acetónban. Az 1:1 arányú összetételek diklórmétánt is tartalmazó oldószerkelegyes mintái közül a termelékenységet tekintve a DCM-EtOH 1:1 minta nagyobb termelékenységgel rendelkezik. A termogravimetriás analízis során a két tömegcsökkenés különbsége igen kevésnek mondható 1,67 %, ennyi tehát az 1 hét alatt száradás során elpárolgó oldószer mennyisége. Az 1:1 összetételű minták DSC mérései nem mutatnak túl nagy különbségeket, csak az 1:3 összetételekkel összehasonlítva.

5.2. Szisztematikus hatóanyag-tartalom növelés

5.2.1. Az oldatok előállítása és szálképzése

Az előkísérletek eredményei alapján egy kitüntetett oldószerkelegyet választottam ki, a diklórmétán-etanol 1:1 arányú összetételét. A hatóanyag-tartalmat a szilárd komponensek tömegszázalékos arányára nézve 0-100 % között változtattam, így a teljes minta sorozat 0-10-30-50-70-90-100 % SPIR-t tartalmazott.

Kísérleteim során az oldószer mennyiségét 8 ml-re növeltem annak érdekében, hogy a kapott nagyobb mennyiségű szálas terméket többféle módszerrel és eszközzel vizsgálhassam. Az előkísérletek azt mutatták, hogy az etanolt is tartalmazó oldószerkelegyek esetén szükség van

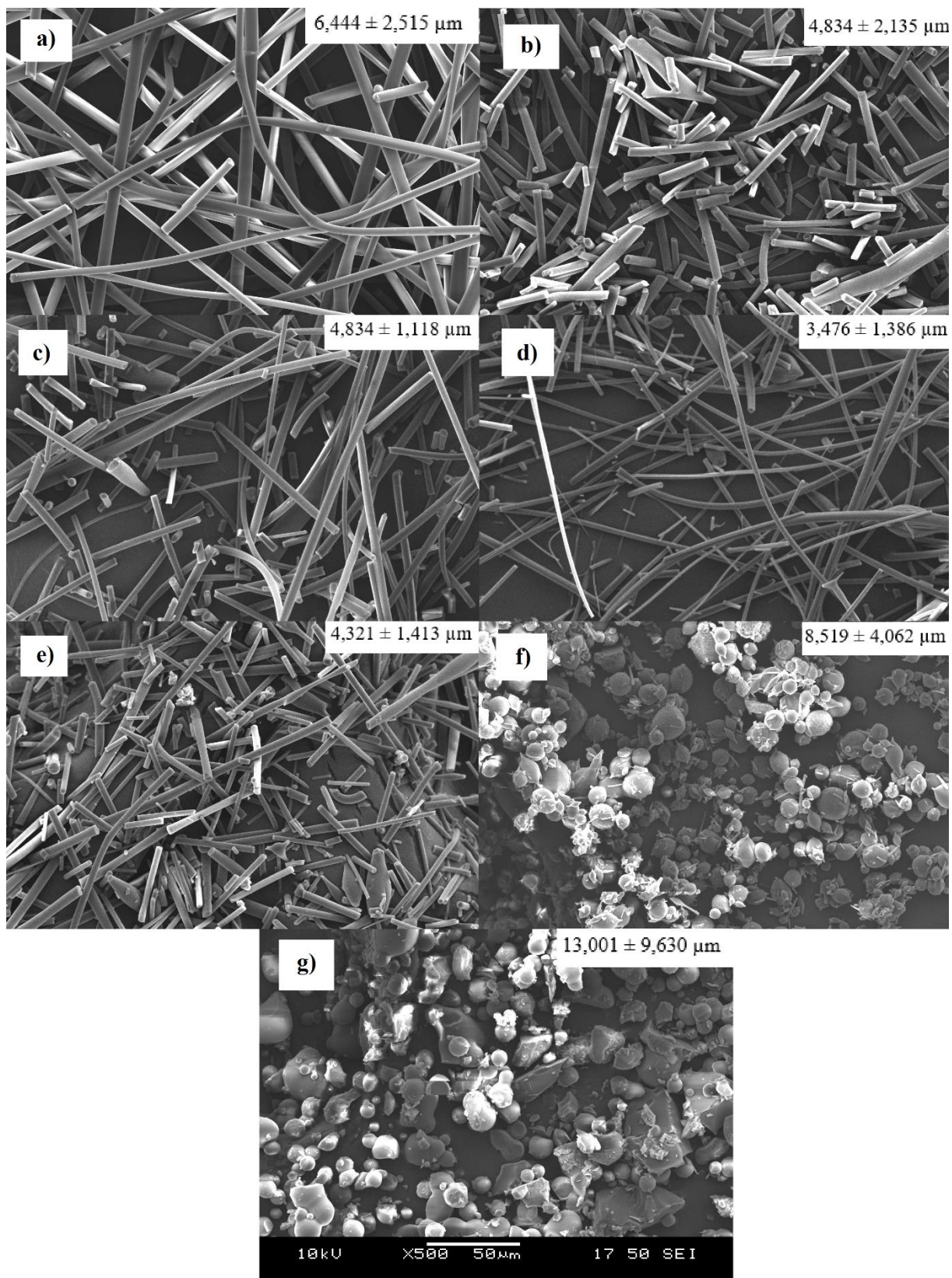
egy nagyobb, 31,25 m/V %-os koncentrációra ahhoz, hogy megfelelő, szálak terméket lehessen előállítani. Számítások alapján 8 ml oldószerhez, azaz 4 ml diklórmetán és 4 ml etanol elegyéhez 2500 mg szilárd anyagot mértem be a fentebb már leírt tömegszázalékos összetételek alapján. Általánosan elmondható, hogy a szálak képződését nagymértékben a polimer koncentráció befolyásolja, ennek ellenére az oldhatósági limitációkat is figyelembe véve a polimer koncentráció fixálása helyett a szilárd komponensek mennyiségét rögzítettem a minta sorozat előállításakor². Az ezzel kapcsolatos beméréseket a 4. táblázatban tüntettem fel.

4. táblázat: Szisztematikus hatóanyag-tartalom növelés

Minta azonosító	m/m % oldott anyag	m/m % hatóanyag	m(hatóanyag) [g]	m/m % polimer	m(polimer) [g]	Termelékenység [%]
polimer referencia	22,86	0	0	100	0,625	-
10 %		10	0,25	90	2,25	83,55
30 %		30	0,75	70	1,75	76,96
50 %		50	1,25	50	1,25	72,48
70 %		70	1,75	30	0,75	69,80
90 %		90	2,25	10	0,25	62,22
hatóanyag referencia		100	0,625	0	0	-

A 0 % és 100 % hatóanyag-tartalmú minták esetén nem volt szükség nagyobb mennyiségre, hiszen ezek csak referenciaként szerepelnek, így ezeket 2 ml oldószerből állítottam elő, termelékenységet nem határoztam meg.

A minták morfológiáját pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek segítségével vizsgáltam, mely felvételeket a 8. ábra foglalja össze.



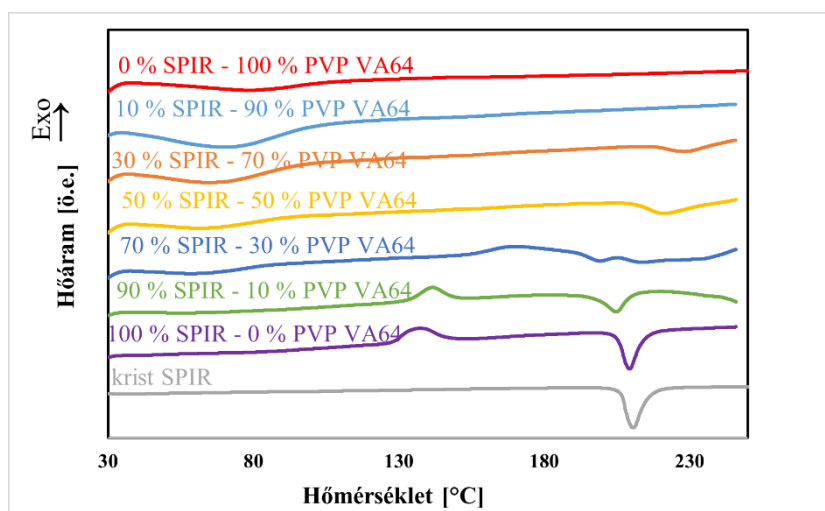
8. ábra: A mintákról készült pásztázó elektronmikroszkópos felvételek 500x nagyításban. Az a) 0 %, b) 10 %, c) 30 %, d) 50 %, e) 70 %, f) 90 % és g) 100 % hatóanyagot tartalmazó minták felvételeit ábrázolja

A 8. ábra alapján jól látható, hogy a hatóanyag-tartalom fokozatos növelésével, a 90 %-ot elérve már inkább porlasztott szemcsék keletkeznek. A módszereknél már említett randomizált szálátmérő meghatározást ezen felvételek alapján elvégeztem a 0-100 % hatóanyagot tartalmazó minta sorozatnál, az eredményei a felvételek jobb sarkában láthatóak. A meghatározott szálátmérők 10-70 % hatóanyag-tartalom esetén közel azonosnak mondhatók, a szórás értékek sem túl nagyok. Ezzel szemben a 90 %-os minta jól láthatóan nem szálasképző termék, ezzel az összetétellel már csak elektrosztatikus porlasztást sikerült megvalósítani. A porlasztott szemcsék átmérője, valamint a szemcsék átmérőinek szórása is nagyobb értéket vesz fel a többi mintával összehasonlítva.

A e) jelöléssel ellátott 70 % SPIR-t tartalmazó minta esetén sikerült megvalósítani a szakirodalmi áttekintésben felvett HDL ASD-s rendszer előállítását. Ennél a hatóanyagnál úgy tűnik, hogy a szilárd komponensek mennyiségének rögzítésével egészen nagy hatóanyag-tartalmú szálak is előállíthatók. Ez egy igen nagy eredménynek tekinthető, hiszen a SPIR nem egy nagyon nagy molekulatömegű hatóanyag, és szerkezetéből adódóan nem is képes a polimerrel erős másodrendű H-hidas kötést kialakítani a rendszer stabilitásának érdekében^{20,22}.

5.2.2. Az előállított szálak vizsgálata

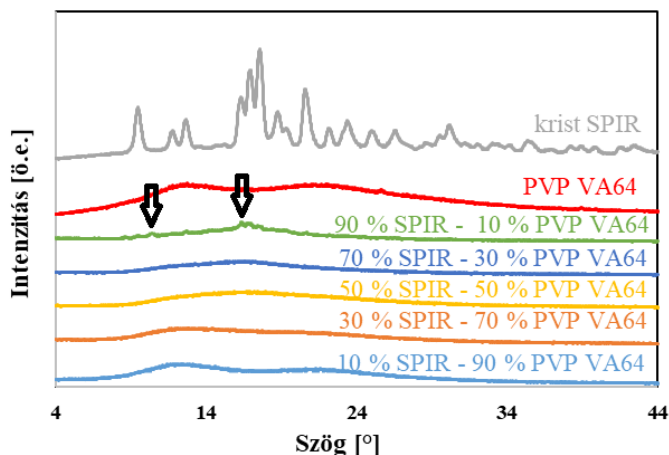
Munkám következő lépésében XRPD és DSC mérésekkel vizsgáltam, hogy sikeres volt-e az ASD-k előállítása. A DSC mérések esetén 0-100 % hatóanyag-tartalomig ábrázoltam a mintákat, emellett referenciaként a kristályos SPIR-t tüntettem fel (9. ábra).



9. ábra: Az előállított minták termogrammjai

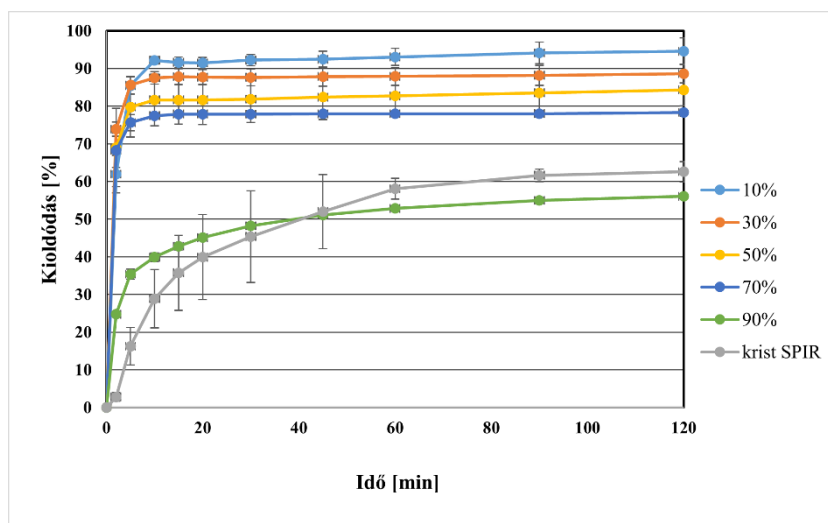
A 60 és 70 °C közötti csúcsok megjelenését a polimer által megkötött víz jelenléte okozhatja¹⁰, amely a 90 és 100 % hatóanyag-tartalmú mintákban nem figyelhető meg, hiszen ezekben a polimer már igen kis mennyiségben van jelen a minta teljes tömegéhez viszonyítva. Ezen két minta termogrammján látható, hogy egy exoterm csúcs is megjelenik 130-140 °C közelében, amely az anyag hidegkristályosodását jelezheti. A 100 %-os minta érdekessége, hogy a termogrammján egy éles endoterm olvadási csúcs látható 211 °C körül, míg a 90 %-os mintánál ez kisebb mértékben, eltolódva van jelen. Ezek a csúcsok a SPIR hatóanyag olvadáscsúcsához tartoznak és a kristályos hányad jelenlétére utalnak ezekben a mintákban. Ezen két minta esetén inkább a kristályos forma dominál, így a bomláshoz tartozó csúcsok magasabb hőmérsékleten jelentkeznének. A 70 %-os mintánál két endoterm csúcs is látható egymás mellett, az első a hatóanyag olvadását, a második pedig valószínűleg a bomlását jelzi.

Az XRPD mérések esetén a mintákat 0-90 % hatóanyag-tartalom között ábrázoltam, ezek mellett pedig a kristályos SPIR-t tüntettem fel. A SPIR esetében jól láthatóak a kristályos anyagokra jellemző éles diffrakciós csúcsok, míg a 0 % hatóanyag – 100 % polimer esetén ez nem figyelhető meg. Az általam előállított minták közül a 90 %-os minta mutat némi kristályos jelleget, a többi diffraktogrammon nincsenek jelen az éles diffrakciós csúcsok. Ez arra utal, hogy sikeres volt az ASD-k előállítása, a hatóanyag amorf formában van a szálakban (10. ábra). Fontos megemlíteni, hogy feltehetően az XRPD módszer detektálási tartománya alatt a többi mintában is lehetnek kristályos nyomok. Tehát valószínűleg nemcsak a 90% minta tartalmaz kristályos nyomokat, tekintve, hogy a DSC eredmények alapján már a 70%-os mintáról is elmondható ez. Az eredmények jól szemléltetik az alkalmazott módszerek közti különbségeket és az XRPD módszer limitációit.



10. ábra: Az előállított minták diffraktogramjai különböző összetételeknél

A fentebbi vizsgálatokat követően a következő lépésben kioldódási vizsgálatokat végeztem. Ezzel célom volt, hogy megállapítsam, javult-e az ASD-s forma hatására a kiindulási hatóanyag oldhatósága. A vizsgálatokhoz három párhuzamos mérést vettem alapul, majd ezen mérések átlagát ábrázoltam a következő diagramon (11. ábra).



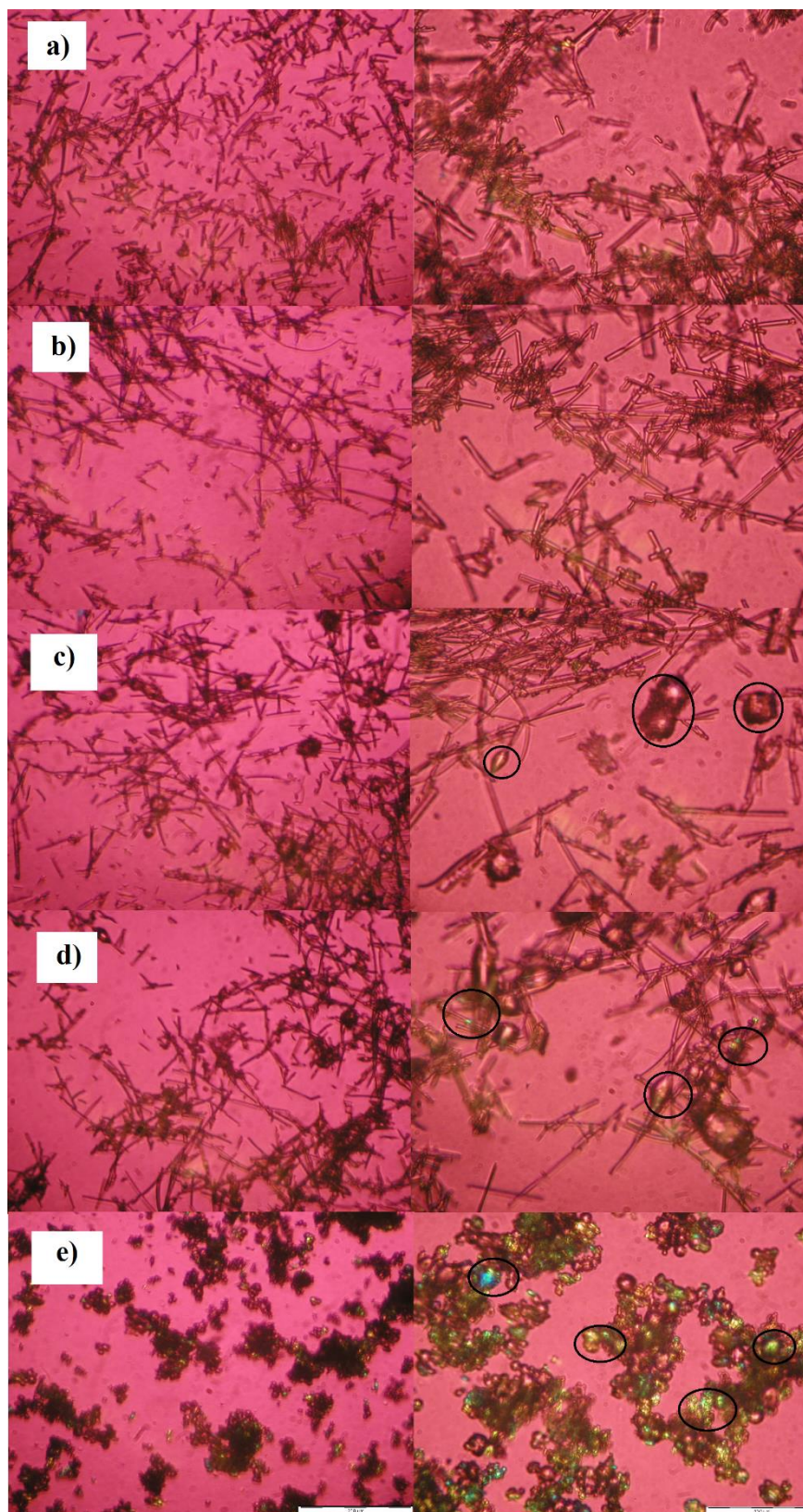
11. ábra: A kioldódási vizsgálatok eredményei

Az eredmények alapján jól látható, hogy az előállított ASD-s forma segítségével azonnali hatóanyagleadást sikerült elérni az esetek többségében, 30 percen belül a hatóanyag közel 80 %-a felszabadult a 90 % hatóanyag-tartalmú mintát leszámítva. Kutatómunkám egyik célját, a kioldódási tulajdonságok javítását ezen eredmények alapján sikeresen elértem 90 %-nál

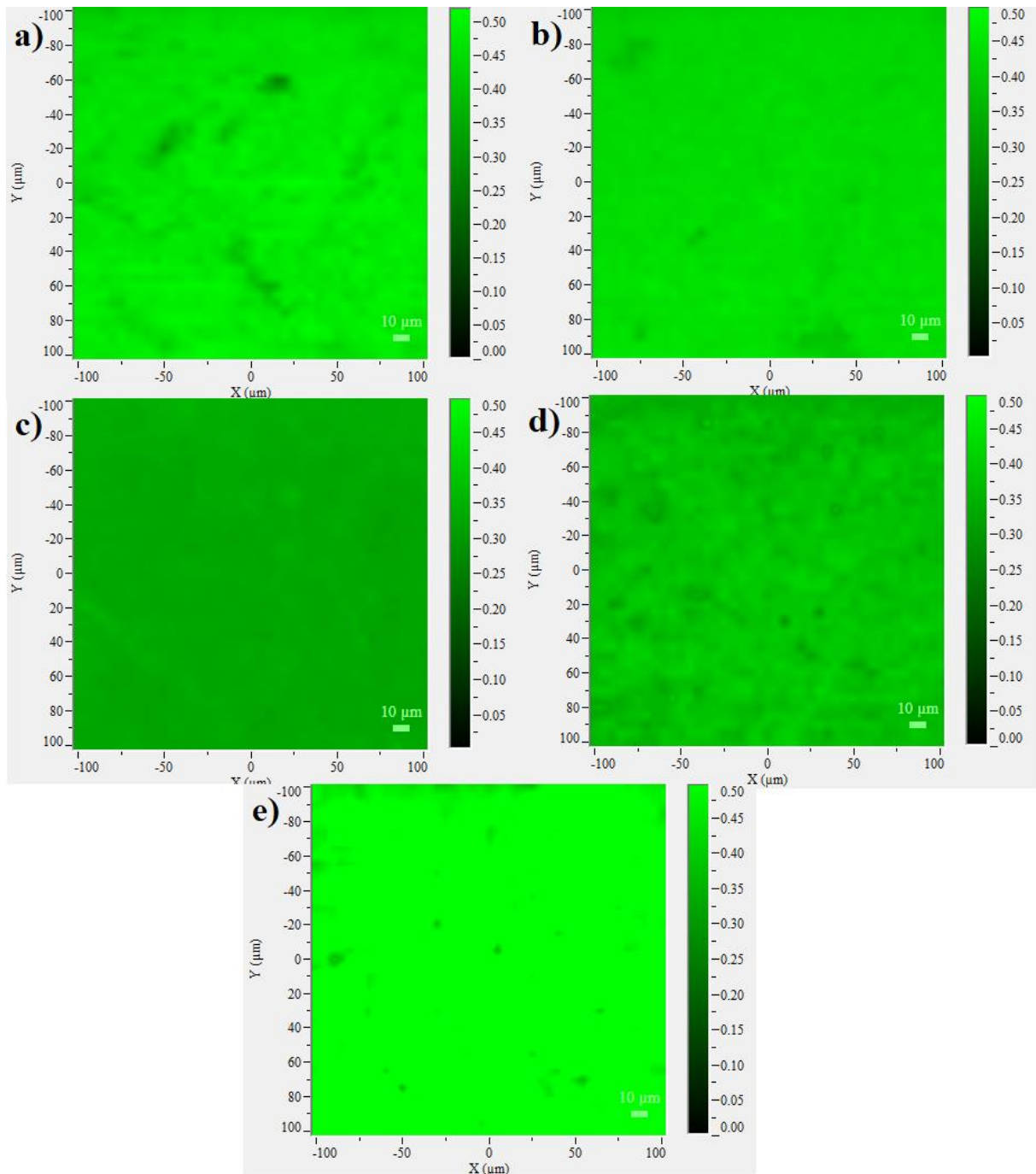
alacsonyabb hatóanyag-tartalmak esetén. A többi mintánál minden esetben sikerült a kristályos hatóanyagnál nagyobb kioldódást elérnem.

5.2.3. Kristályos hányad meghatározása

Munkám folytatásaként a mintákban esetlegesen megjelenő kristályos nyomok detektálásával és kvantitatív elemzésével foglalkoztam. A kristályos hányad kvalitatív elemzéséhez polarizációs mikroszkópos felvételeket készítettem (12. ábra). A felvételeken jól kivehetőek a szálas szerkezetek a különböző mintáknál, azonban az 50 %-os és afeletti hatóanyag-tartalmaknál megjelennek már kristályos nyomok a 12,5x nagyítású képeken, a kettős törés következtében színesek lesznek a minta adott pontjai. A 90 %-os minta egyértelműen kristályos, szálas szerkezet nem látható a képeken. A mérés kisebb mértékű pontatlansággal rendelkezik, hiszen a felvételt egy kiragadott minta részletről készítettem, a minta egészében pedig inhomogenitások léphetnek fel. Az azonban jól látható, hogy a kioldódás tesztek eredményeivel összefüggnek a polarizációs mikroszkópos felvételek. Azok a minták, ahol a polarizációs fénymikroszkóp kristályos nyomokat detektál, a kioldódás is csökken. Ez arra utalhat, hogy a mintában jelen lévő kristályos nyomok a kioldódás során a hatóanyag kioldóközegben történő kicsapódását indukálhatják¹⁰.



12. ábra: Polarizációs mikroszkóppal készült felvételek, bal oldalon 6,3x, jobb oldalon 12,5x nagyítással. Az a) 10 %, b) 30 %, c) 50 %, d) 70 % és e) 90 % hatóanyag-tartalmú minták felvételeit ábrázolja

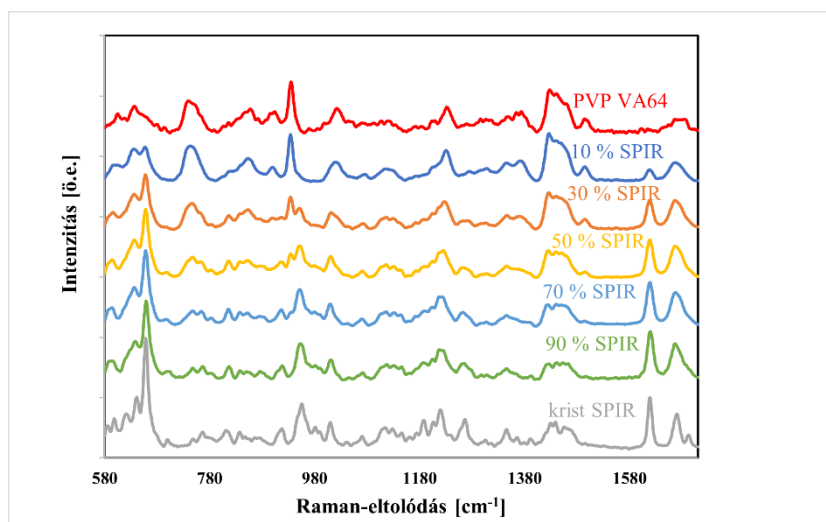


13. ábra: Az elkészített Raman térképek. Az a) 10 %, b) 30 %, c) 50 %, d) 70 % és e) 90 % hatóanyag-tartalmú eredményeit ábrázolja

Az amorf-kristályos hányad kvantitatív meghatározását először Raman-térképezéssel végeztem, amelyhez három referencia spektrumát használtam, a kristályos SPIR-t, amorf SPIR-t és a PVP VA64 polimert. Az elkészített Raman térképeket a 13.ábra tartalmazza.

A térképek értékelése során azzal a problémával szembesültem, hogy a használt referencia spektrumokkal a modell túl nagy hiba százalékokat mutatott, így a kristályos hányadot lokálisan nem tudtam megállapítani CLS módszerrel. A jövőben ismételt mérések elvégzésével tervezem felderíteni a mérési vagy kiértékelési hiba lehetséges okait.

Ezt követően a reflexiós Raman-szondás méréseket is elvégeztem a 10-90 % hatóanyag-tartalmú mintáimmal, referenciaként pedig a kristályos SPIR-t és PVP VA64 polimert ábrázoltam (14. ábra). A spektrumok alapján megállapítható, hogy az 1685 cm^{-1} és 1705 cm^{-1} közötti csúcs, ami a kristályos hatóanyagban megjelenik, az az általam előállított mintákban nem látható. Egyedül a 90% hatóanyag-tartalmú minta spektrumában található ott egy inflexiós pont, ami utalhat a kristályos nyomokra. Összességében elmondható, hogy az általam használt mérési paraméterekkel hiába mér nagyobb mintafelületet a Raman-szonda, nehezen észlelhető a spektrumokban a kristályos nyomokra utaló jelek. Ahhoz, hogy a Raman-szondás mérésekből CLS módszerrel meg tudjuk határozni a kristályos hányadot ebben az esetben is szükség lenne az amorf hatóanyag referencia spektrumára. Mivel jelen kutatásban még csak egy felmérése volt annak, hogy a Raman-szondával egy pontból felvett spektrum milyen eredményt ad, így ennél a módszernél pontos mennyiségi meghatározást még nem végeztem el. Jövőbeli terveim között azonban szerepel ennek a módszernek is a mélyebb vizsgálata, hiszen a Raman-szondás mérések időigénye lényegesen kisebb, mint a Raman-térképezésé. Mindemellett pedig folyamatos rendszerek mellé is társítható, így a jövőben hasznos lehet ennek a vizsgálatnak a bővítése.



14. ábra: A Kaiser Raman mérések eredményei

Összefoglalás

Manapság a gyógyszeriparban egyre több rossz vízoldhatósággal jellemezhető hatóanyagmolekula jelenik meg, melyek forgalomba hozatalához a hagyományostól eltérő készítményfejlesztési stratégia kidolgozása szükséges. A kioldódási tulajdonságok javítását célzó fejlesztések alkalmazása elengedhetetlen ahhoz, hogy a biológiai hasznosulásukat növelni lehessen. Az egyik ilyen fejlesztési módszer a kutatómunkám során is alkalmazott elektrosztatikus szálképzés, mely kiválóan használható amorf szilárd diszperziók előállítására.

A nagy hatóanyag-tartalmú amorf szilárd diszperziók előállítása célszerű az ipari alkalmazhatóság szempontjából, az ilyen rendszerek egyik központi kérdése azonban a fizikai stabilitás, hiszen ez befolyásolja a tárolhatóságot, későbbi felhasználhatóságot. TDK dolgozatom célja ezért a nagy hatóanyag-tartalmú amorf szilárd diszperziók fizikai stabilitásának feltérképezése volt különböző analitikai vizsgálatok alkalmazásával.

Kísérleteim során spironolakton hatóanyagot tartalmazó amorf szilárd diszperziós rendszereket állítottam elő egytűs elektrosztatikus szálképzés segítségével. A különböző oldószerkelegyek alkalmazásának hatásait vizsgálva megállapítottam, hogy a diklórmétán és acetón 1:1 arányú elegye alkalmas akár 70 % hatóanyagot tartalmazó szálas amorf szilárd diszperziók előállítására. Annál nagyobb hatóanyag-tartalomnál a választott polimer mellett már csak elektrosztatikus porlasztás valósítható meg. A kioldódás tesztek eredményei azt mutatták, hogy 70% hatóanyag-tartalomig minden esetben sikerült a kioldódás javítása, azonban annak mértéke a hatóanyag-tartalom függvényében csökkenő tendenciát mutatott. Az alkalmazott analitikai módszerek rávilágítottak arra, hogy a minták tartalmaznak kristályos nyomokat, mely megmagyarázhatja a kioldódásokban megfigyelhető csökkenést.

A kutatómunka rávilágított arra, hogy lehetséges nagy hatóanyag-tartalmú szálat előállítani olyan hatóanyag-polimer rendszerrel is, ahol nem alakulhatnak ki intermolekuláris vagy intramolekuláris másodrendű kölcsönhatások, melyek stabilizálhatják a rendszert. A szálképzésénél limitáló tényező lehet a hatóanyag oldhatósága a választott oldószerkelegben, továbbá a kristályos hányad megjelenése és mennyisége korlátozhatja a felhasználhatóságot.

Jövőbeli terveim között szerepel, hogy a kristályos hányad hatását hosszútávú stabilitási tesztek elvégzése mellett is megvizsgáljam. Ezen felül pedig szeretném a jövőben fejleszteni a kristályos hányad meghatározására alkalmazott analitikai módszereket is.

6. Irodalomjegyzék

1. Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P. & Crison, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* **12**, 413–420 (1995).
2. Becelaere, J. *et al.* Stable amorphous solid dispersion of flubendazole with high loading via electrospinning. *J. Control. Release* **351**, 123–136 (2022).
3. Chiou, W. L. & Riegelman, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J. Pharm. Sci.* **60**, 1281–1302 (1971).
4. Vasconcelos, T., Marques, S., das Neves, J. & Sarmento, B. Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **100**, 85–101 (2016).
5. Démuth, B. *et al.* Downstream processing of polymer-based amorphous solid dispersions to generate tablet formulations. *Int. J. Pharm.* **486**, 268–286 (2015).
6. Baghel, S., Cathcart, H. & O'Reilly, N. J. Polymeric amorphous solid dispersions: a review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilization of biopharmaceutical classification system class II drugs. *J. Pharm. Sci.* **105**, 2527–2544 (2016).
7. Huang, Y. & Dai, W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharm. Sin. B* **4**, 18–25 (2014).
8. Sengupta, P., Chatterjee, B. & Tekade, R. K. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. *Int. J. Pharm.* **543**, 328–344 (2018).
9. Lin, X. *et al.* Physical stability of amorphous solid dispersions: a physicochemical perspective with thermodynamic, kinetic and environmental aspects. *Pharm. Res.* **35**, 1–18 (2018).
10. Szabó, E. *et al.* Comparison of amorphous solid dispersions of spironolactone prepared by spray drying and electrospinning: The influence of the preparation method on the dissolution properties. *Mol. Pharm.* **18**, 317–327 (2020).
11. Jermain, S. V, Brough, C. & Williams III, R. O. Amorphous solid dispersions and

- nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery--an update. *Int. J. Pharm.* **535**, 379–392 (2018).
12. Williams, M., Tian, Y., Jones, D. S. & Andrews, G. P. Hot-melt extrusion technology: optimizing drug delivery. *Eur. J. Parenter. Sci. Pharm. Sci.* **15**, 61 (2010).
 13. Vasconcelos, T., Sarmiento, B. & Costa, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov. Today* **12**, 1068–1075 (2007).
 14. Dohrn, S. *et al.* Solvent influence on the phase behavior and glass transition of Amorphous Solid Dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **158**, 132–142 (2021).
 15. Dohrn, S. *et al.* Thermodynamic modeling of solvent-impact on phase separation in amorphous solid dispersions during drying. *Mol. Pharm.* **17**, 2721–2733 (2020).
 16. Vasanthavada, M., Tong, W.-Q., Joshi, Y. & Kislalioglu, M. S. Phase behavior of amorphous molecular dispersions I: Determination of the degree and mechanism of solid solubility. *Pharm. Res.* **21**, 1598–1606 (2004).
 17. Avossa, J., Herwig, G., Toncelli, C., Itel, F. & Rossi, R. M. Electrospinning based on benign solvents: Current definitions, implications and strategies. *Green Chem.* **24**, 2347–2375 (2022).
 18. Vass, P. *et al.* Scale-up of electrospinning technology: Applications in the pharmaceutical industry. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **12**, e1611 (2020).
 19. Doğugan, Y. K., Demirural, A. & Baykara, T. Single-needle electrospinning of PVA hollow nanofibers for core-shell structures. *SN Appl. Sci.* **1**, 1–7 (2019).
 20. Tian, Y. *et al.* The design and development of high drug loading amorphous solid dispersion for hot-melt extrusion platform. *Int. J. Pharm.* **586**, 119545 (2020).
 21. Mudie, D. M. *et al.* Novel high-drug-loaded amorphous dispersion tablets of posaconazole; in vivo and in vitro assessment. *Mol. Pharm.* **17**, 4463–4472 (2020).
 22. Newman, A. & Zografi, G. Considerations in the development of physically stable high drug load API-polymer amorphous solid dispersions in the glassy state. *J. Pharm. Sci.* **112**, 8–18 (2023).
 23. Carpentier, L., Bourgeois, L. & Descamps, M. Contribution of temperature modulated

- DSC® to the study of the molecular mobility in glass forming pharmaceutical systems. *J. Therm. Anal. Calorim.* **68**, 727–739 (2002).
24. Kuwabara, K., Gan, Z., Nakamura, T., Abe, H. & Doi, Y. Molecular mobility and phase structure of biodegradable poly (butylene succinate) and poly (butylene succinate-co-butylene adipate). *Biomacromolecules* **3**, 1095–1100 (2002).
 25. Román, F., Colomer, P., Calventus, Y. & Hutchinson, J. M. Molecular mobility in hyperbranched polymers and their interaction with an epoxy matrix. *Materials (Basel)*. **9**, 192 (2016).
 26. Sahoo, A., Kumar, N. S. K. & Suryanarayanan, R. Crosslinking: An avenue to develop stable amorphous solid dispersion with high drug loading and tailored physical stability. *J. Control. Release* **311**, 212–224 (2019).
 27. Zahedi, P. & Lee, P. I. Solid molecular dispersions of poorly water-soluble drugs in poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**, 320–328 (2007).
 28. Kapourani, A. *et al.* High-drug-loading amorphous solid dispersions via in situ thermal cross-linking: unraveling the mechanisms of stabilization. *Mol. Pharm.* **18**, 4393–4414 (2021).
 29. Maniruzzaman, M. & Nokhodchi, A. Continuous manufacturing via hot-melt extrusion and scale up: regulatory matters. *Drug Discov. Today* **22**, 340–351 (2017).
 30. Dedroog, S., Pas, T., Vergauwen, B., Huygens, C. & den Mooter, G. Solid-state analysis of amorphous solid dispersions: Why DSC and XRPD may not be regarded as stand-alone techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **178**, 112937 (2020).
 31. Lehmkemper, K., Kyeremateng, S. O., Heinzerling, O., Degenhardt, M. & Sadowski, G. Long-term physical stability of PVP-and PVPVA-amorphous solid dispersions. *Mol. Pharm.* **14**, 157–171 (2017).
 32. Baird, J. A. & Taylor, L. S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 396–421 (2012).
 33. Moseson, D. E. *et al.* Amorphous solid dispersions containing residual crystallinity: Competition between dissolution and matrix crystallization. *AAPS J.* **23**, 69 (2021).

34. Tang, C. Y. & Yang, Z. Transmission electron microscopy (TEM). in *Membrane characterization* 145–159 (Elsevier, 2017).
35. Widjaja, E. *et al.* Detection of trace crystallinity in an amorphous system using Raman microscopy and chemometric analysis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **42**, 45–54 (2011).
36. Paudel, A., Rajjada, D. & Rantanen, J. Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **89**, 3–20 (2015).
37. Strachan, C. J., Rades, T., Gordon, K. C. & Rantanen, J. Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 179–192 (2007).
38. Bøtker, J. & Rantanen, J. Multivariate Analysis Supporting Pharmaceutical Research. in *Multivariate Analysis in the Pharmaceutical Industry* 175–184 (Elsevier, 2018).
39. Sutter, J. L. & Lau, E. P. K. Spironolactone. in *Analytical profiles of drug substances* vol. 4 431–451 (Elsevier, 1975).
40. Strojewski, D. & Krupa, A. Kollidon®VA 64 and Soluplus®as modern polymeric carriers for amorphous solid dispersions. *Polym. Med.* **52**, 17–27 (2022).
41. Guideline, I. C. H. Q3C (R5) on Impurities: Guideline for residual solvents. *ICH Harmon. Guidel.* 1–38 (2016).
42. Joshi, D. R. & Adhikari, N. An overview on common organic solvents and their toxicity. *J. Pharm. Res. Int* **28**, 1–18 (2019).
43. Young, J. A. Dichloromethane. *J. Chem. Educ.* **81**, 1415 (2004).
44. Gonçalves, F. *et al.* Dichloromethane: Revision and extension of ppT relationships for the liquid. *J. Chem. Thermodyn.* **43**, 105–116 (2011).
45. Balogh, A. *et al.* Melt-blown and electrospun drug-loaded polymer fiber mats for dissolution enhancement: a comparative study. *J. Pharm. Sci.* **104**, 1767–1776 (2015).
46. Nagy, Z. K. *et al.* High speed electrospinning for scaled-up production of amorphous solid dispersion of itraconazole. *Int. J. Pharm.* **480**, 137–142 (2015).
47. Szász, A. Oldószerrek hatásának vizsgálata elektrosztatikus szálképzéssel előállított spironolakton hatóanyagot tartalmazó mintáknál. (2022).

48. Szabó, E. *et al.* Scaled-up preparation of drug-loaded electrospun polymer fibres and investigation of their continuous processing to tablet form. *Express Polym. Lett.* **12**, 436–451 (2018).
49. Pas, T. *et al.* Preparation of amorphous solid dispersions by cryomilling: Chemical and physical concerns related to active pharmaceutical ingredients and carriers. *Mol. Pharm.* **17**, 1001–1013 (2020).
50. Liu, T. & Zhang, F. Modelling drug degradation of amorphous solid dispersion during twin-screw extrusion. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **190**, 197–205 (2023).

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetem kifejezni mindazok felé, akik segítettek és támogatták TDK dolgozatom elkészülését.

Elsők között szeretnék említést tenni témavezetőimről, Dr. Szabó Edina tudományos munkatársról és Dr. Nagy Zsombor Kristóf egyetemi docensről, akik végig segítettek és koordinálták munkámat, szakértelmükkel nagyon sok jó tanácsot adtak, előrelendítették szakmai fejlődésemet.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék munkatársainak, akikhez bármikor fordulhattam kérdéseimmel.

Az RRF-2.3.1-21-2022-00015 számú projekt az Európai Unió támogatásával valósult meg.