

# **Polimer alapú gyógyszerhordozó nanoszerkezetek előállítása és jellemzése**

Diplomamunka  
Anyagtudomány Mesterszak

**TÓTH TÜNDE**

Témavezető: Dr. Kiss Éva, egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest  
Természettudományi Kar  
Kémiai Intézet  
Fizikai Kémiai Tanszék  
2017

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Kiss Évának, témavezetőmnek a munkám elkészítése során nyújtott segítségét és szakmai tanácsait, továbbá hogy lehetőséget adott a szakdolgozatom megírására a Határfelületi és Nanoszerkezetek Laboratóriumában.

Köszönet illeti Dr. Gyulai Gergőt, akinek mindig számíthattam segítségére, és akihez a munkám során felmerülő technikai és elméleti kérdésekkel egyaránt bizalommal fordulhattam.

Külön köszönet illeti Hórvölgyi Zoltánné Pető Idát a gyakorlati munkában nyújtott önzetlen segítségéért, tanácsaiért és türelméért.

Továbbá köszönettel tartozom a Határfelületi és Nanoszerkezetek Laboratórium valamennyi munkatársának a kellemes légkörért, amelyben munkámat végezhettem.

## Rövidítések jegyzéke

DLS	dinamikus fényszórás
PGA	poliglikolsav
PLA	politejsav
PLGA	tejsav-glikolsav kopolimer
PEO	poli(etilén-oxid)
PPO	poli(propilén-oxid)
PHBA	parahidroxi-benzoészav
THF	tetrahidrofurán

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés .....	5
2. Irodalmi áttekintés .....	6
2.1. Kolloidális gyógyszerhordozó rendszerek.....	6
2.2. Polimer alapú gyógyszerhordozó rendszerek előállítása .....	7
2.3. Poli(tejsav/glikolsav) alapú gyógyszerhordozók .....	8
2.4. Parahidroxibenzoesav észterei.....	10
2.5. Oldhatósági paraméter .....	14
3. Célkitűzés.....	16
4. Anyagok és módszerek .....	17
4.1. Felhasznált anyagok.....	17
4.1.1. A nanorészecskék előállításához használt anyagok.....	17
4.1.2. A kísérleti munka során alkalmazott egyéb anyagok .....	17
4.2. Kísérleti módszerek .....	17
4.2.1. Nanorészecskék előállítása .....	17
4.2.2. Méretmeghatározás .....	18
4.2.3. Hatóanyag-tartalom meghatározás .....	20
5. Eredmények és értékelésük.....	21
5.1. Poli(tejsav/glikolsav) részecskék jellemzése .....	21
5.2. Poli(tejsav/glikolsav) nanorészecskék hatóanyag-tartalmának meghatározása...	27
5.3. Oldhatósági paraméterek számítása .....	40
6. Összefoglaló.....	49
7. Summary.....	50
8. Irodalomjegyzék .....	51

## 1. Bevezetés

Napjainkban a gyógyszerfejlesztés, melynek célja a terápia tökéletesítése és a gyógyszeres kezelések biztonságának növelése, nagy jelentőséggel bír, hiszen egészségünk megőrzése, a betegségek megelőzése, illetve leküzdése mindannyiunk számára fontos. Számos kutatás irányul az eddig megismert hatóanyagoknál kevesebb mellékhatással rendelkező és hatékonyabb molekulák fejlesztésére, ám ezen gyógyszerjelölt molekulák közül sok lemorzsolódik az előzetes vizsgálatok során, hiszen kedvezőtlen felszívódási tulajdonságaik miatt nem fejtenék ki a kívánt hatást az emberi szervezetben.

Annak előrejelzésére, hogy egy molekula alkalmas lehet-e gyógyszerjelölt molekulának, Lipinski vezetett be egy empirikus szabályt (1997), melyet érdemes szem előtt tartani új gyógyszer-molekulák tervezésénél, hiszen azon vegyületek, melyek ennek megfelelnek, nagyobb valószínűséggel felelnek meg a klinikai teszteknek és kerülhetnek forgalomba. A Lipinski-féle szabály szerint tehát egy molekula felszívódási tulajdonságai kedvezőtlenek az emberi szervezetben, ha az alábbi feltételek közül [1] kettő egyidejűleg teljesül rá:

1. Több, mint 5 hidrogéndonor szubsztituens (OH, NH) tartalmaz.
2. Moláris tömege nagyobb, mint 500 Da.
3. Az n-oktanol – víz megoszlási hányadosa (logP) nagyobb, mint 5.
4. Több, mint 10 hidrogénakceptort (O, N, S) tartalmaz.

Azon molekuláknak, melyek bizonyos betegségeket hatékonyabban tudnának gyógyítani a jelenleg alkalmazott hatóanyagoknál, de nem felelnek meg a Lipinski-féle kritériumnak, a felszívódási tulajdonságait módosítani kell.

Gyógyszerhordozó rendszerek alkalmazása megoldást jelenthet erre a problémára, emiatt számos kutatás foglalkozik ezen rendszerek fejlesztésével.

Diplomamunkám során nanoprecipitációval állítottam elő poli(tejsav/glikolsav) (PLGA50:50) kopolimer felhasználásával gyógyszerhordozó nanorészecskéket, melyekbe különböző parabéneket, mint modell hatóanyagokat kapszuláztam. A parabénekből álló hatóanyagsorozatban kis mértékben változik a polaritás. Munkám során azt vizsgáltam, ennek milyen hatása van a kapszulázásra, milyen körülmények között alkalmazható gyógyszerhordozóként az adott kopolimer.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Kolloidális gyógyszerhordozó rendszerek

A kolloidkémia kutatási területei között a korszerű gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése egyre nagyobb jelentőséggel bír. Ezeknek a rendszereknek speciális feladatokat kell ellátniuk, melyek közül a szabályozott hatóanyag-leadás, illetve a célzott hatóanyag-transzport a legfontosabbak. Segítségükkel lehetővé válhat, hogy a már ismert hatóanyagok kisebb mennyiségekben, rövidebb ideig tartó kezeléssel, vagy ritkább adagolással ériék el a kívánt terápiás hatást.

A kolloidális gyógyszerhordozók jellemzően a nanométeres mérettartományba eső részecskék, amelyek előállíthatók szerves vagy szervetlen anyagok felhasználásával is. Kis méretüknek köszönhetően megváltoztatják a magukba zárt hatóanyag eloszlását az emberi szervezetben, felhalmozódnak a célszervben, ezáltal fokozzák a gyógyszer-molekula hatékonyságát. Továbbá ezen rendszerek alkalmazásával befolyásolhatjuk a hatóanyag molekulák oldhatósági tulajdonságait, mely fokozza hasznosulásukat a szervezetben [2].

A kolloidális gyógyszerhordozók felépülhetnek kisebb egységekből, molekulákból spontán asszociáció útján. Ilyenkor többnyire olyan szerkezetek keletkeznek, melyek rendelkeznek egy hatóanyag-szállításra alkalmas üreggel. Ilyen asszociátumok például a lipid molekulákból álló liposzómák, a blokk-kopolimerekből felépülő poliszómák, vagy a kolloid részecskékből létrejövő kolloszómák. Továbbá szervetlen anyagokból előállított nanorészecskéket is alkalmazhatunk gyógyszerhordozóként és egyéb orvosi segédanyagként egyaránt [2].

Ezekon kívül más, polimer alapú gyógyszerhordozó rendszereket is előállíthatunk, melyek egyaránt lehetnek polimer mikro-, és nanorészecskék, mikrogélek, dendrimerek, illetve polimer-hatóanyag konjugátumok is [2].

Ezen rendszerek előállításához számos polimer használható, ám célszerű biológiailag lebomló polimert választani, amely funkciója ellátása után képes teljesen kiürülni az emberi szervezetből. A legígéretesebbnek a poliészter típusú polimerek, ezek közül is a politejsav (PLA) és poliglikolsav (PGA), illetve ezek kopolimerjei, a PLGA-k tűnnek erre a célra.

## 2.2. Polimer alapú gyógyszerhordozó rendszerek előállítása

Napjainkban széles körben alkalmaznak polimer nanorészecskéket, nem csak orvosi eszközökben és gyógyszer szállító rendszerekben, hanem az elektronikában, különböző szenzorokban és a környezetszennyezés mérséklésében is. Változatos felhasználhatóságának köszönhetően az évek során számos eljárást dolgoztak ki polimer nanorészecskék előállítására [3].

Polimer nanorészecskék előállíthatók monomerek közvetlen polimerizációjával. Al-Khouri és munkatársai (1986) például olyan eljárást dolgoztak ki, mely során szubmikroszkópos méretű, lipofil oldószer cseppek felületén tudtak alkil-ciano-akrilát monomereket polimerizálni [4, 5]. A közvetlen polimerizációval előállított rendszerekben monomerek, vagy oligomerek maradhatnak, melyek a nanokapszulával és annak tartalmával, a hatóanyaggal reakcióba léphetnek [5].

Ennek elkerülésére számos olyan módszert dolgoztak ki, melyek során már kész polimerből is előállíthatók nanorészecskék. Az első, és az egyik legelterjedtebben alkalmazott ilyen eljárás az úgynevezett oldószer elpárologtatásos technika. Ehhez a polimert és a kapszulázandó anyagot illékony, vízzel nem elegyedő oldószerben oldják fel, majd ezt nagy sebességgel vizes fázishoz keverik, amely stabilizátorokat is tartalmaz. Az így létrehozott emulziót homogenizálják, majd a szerves oldószert mágneses kevertetés mellett elpárologtatják, ezzel polimer mikro-, vagy nanorészecskék szuszpenzióját hozva létre. Ebből a rendszerből centrifugálással és desztillált vízzel való atmoszárral a felületaktív anyagok eltávolíthatók. Ilyen módon leginkább hidrofób molekulák kapszulázhatóak [3].

Hidrofil molekulák is kapszulázhatóak, ehhez úgynevezett V/O/V, vagyis víz - az olajban - a vízben, kettős emulziót kell létrehozni. Ennek előállítása során először a hatóanyagot vízben feloldják, majd nagy sebességű kevertetés mellett a polimer vízzel nem elegyedő, szerves oldószerben elkészített oldatához adják. Majd ezt az emulziót stabilizátorokat is tartalmazó vizes fázishoz keverik, végül a szerves oldószert elpárologtatják [3, 6].

Mindkét technikával létrehozhatóak kis méretű és gömbalakú polimer részecskék, jellemzően a mikrométeres tartományba eső mérettel. A polimer részecskék tulajdonságai, mérete befolyásolható a felületaktív anyag, stabilizátor megválasztásával és annak koncentrációjával. A keverés is hatással van a kialakuló polimer részecskék méretére. Kettős emulziók készítésénél a második kevertetés ideje jelentősen

befolyásolja a részecskeméretet, hosszabb kevertetés mellett kisebb átmérőjű részecskék állíthatók elő [3].

A másik gyakran alkalmazott módszer polimer nanorészecskék előállítására az úgynevezett nanoprecipitáció, mely kidolgozása Fessi és munkatársai (1989) nevéhez köthető [10]. Az eljárás során a polimert vízzel elegyedő szerves oldószerben oldják, majd ezt kevertetés mellett, lassan nagy mennyiségű vizes fázishoz adagolják. A két fázis elegyítésekor a polimer oldószere átdiffundál a vizes fázisba, a polimer pedig kicsapódik, miközben a hatóanyagot magába zárja. A folyamat során tehát oldószercsere zajlik le, ami alatt spontán képződnek szűk méreteloszlású polimer nanorészecskék [3].

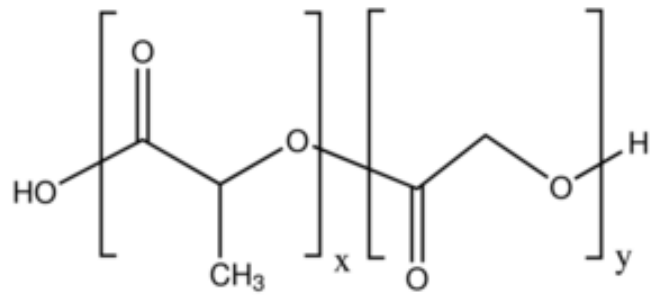
Ezzel a módszerrel egyszerűen, gyorsan és jól reprodukálható módon állíthatók elő polimer nanorészecskék. A keletkező részecskék felületi tulajdonságai a vizes fázishoz adott felületaktív anyaggal módosíthatók, amelynek bizonyos felhasználási területeken, például gyógyszerhordozó rendszerek előállításánál is fontos szerepe van [7, 8, 9]. Ezen kívül számos más körülmény befolyásolja a kialakuló részecskék méretét, ám ezek hatását még nem sikerült teljes mértékben tisztázni [11].

A kisózásos módszert, mellyel szintén polimer nanorészecskék állíthatók elő, Bindschaedler és munkatársai (1990) dolgozták ki [12]. Ennél az eljárásnál is vízzel elegyedő, szerves oldószerben oldják fel a polimert, amelyet elektrolitot tartalmazó vizes fázissal elegyítenek, mely hatására a szerves oldószer kicsapódik. Leggyakrabban magnézium-kloridot, kalcium-kloridot, és magnézium-acetátot használnak elektrolitként. A módszer előnye az emulziós eljárásokhoz képest, hogy nem tartalmaz felületaktív anyagokat, illetve klórozott oldószereket, ezáltal a toxicitás valószínűsége is kisebb [3].

### **2.3. Poli(tejsav/glikolsav) alapú gyógyszerhordozók**

A PLGA azon polimerek közé tartozik, melyek használatát terápiás eszközökben jóváhagyta mind az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal, mind az Európai Gyógyszer Ügynökség [13].



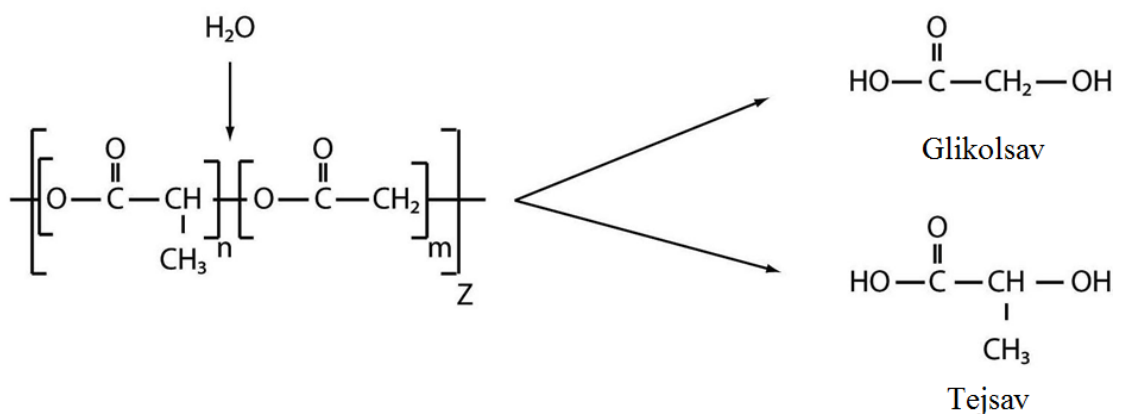


1. ábra: PLGA szerkezeti képlete

A PLGA, melynek szerkezeti képlete az 1. ábrán látható, egyaránt előállítható random-, és blokk-kopolimer formájában. A polimerizáció alatt az egymást követő monomer egységek észter kötésekkel kapcsolódnak, így a termék PLGA egy lineáris, alifás poliészter.

A PLGA lebontható, észter kötése víz jelenlétében felszakadnak. A folyamatot savak, bázisok, valamint enzimek katalizálják. A lebomláshoz szükséges idő a monomerek arányától és eloszlásától függ, minél nagyobb a polimerben a PGA mennyisége, annál gyorsabban bomlik.

A PLGA-ból az emberi szervezetben enzimkatalizált hidrolízis során glikolsav és tejsav keletkezik (2. ábra). Ezen vegyületek a szervezet számára nem toxikusak, metabolizálhatóak. A lebomlási idő a monomerek arányával befolyásolható, ennek köszönhetően igen elterjedt az orvosi gyakorlatban, előszeretettel használják például felszívódó cérnaként, vagy protézisekben. Gyógyszerhordozóként lehetővé teszi a szabályozott hatóanyag-leadást is [2].

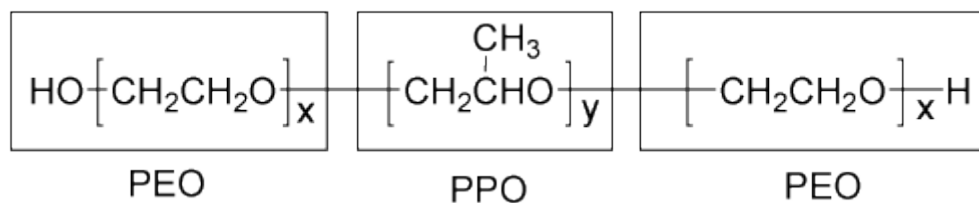


2. ábra: PLGA hidrolízise

A PLGA további előnye, hogy változatos szerkezetű és méretű gyógyszerhordozók hozhatók létre a felhasználásával, például mikrogömbök, mikrokapszulák, nanorészecskék, filmek, pelyhek, vagy implantátumok [2]. A méret szerepe is jelentős, hiszen ettől függ, hogy mely szervben fognak felhalmozódni a gyógyszer szállító részecskék. Például a vér-agy gáton csak a 100 nm-nél kisebb részecskék juthatnak át, tehát csak ilyen méretű részecskék lehetnek alkalmasak egyes idegrendszeri betegségek lokális gyógyítására szolgáló hatóanyag célbajuttatására. Ezzel szemben a 300 nm-nél nagyobb részecskék már a lépben halmozódnak fel, míg a mikrométeres nagyságrendbe eső részecskék segítségével a hatóanyag célzottan a tüdőbe juttatható [2].

A gyógyszerhordozó részecskék polaritása is fontos paraméter, használatukat felületi hidrofobitásuk is korlátozhatja. Kísérletek szerint a hidrofil felületi tulajdonságú részecskék tovább maradnak a véráramban, ezáltal lehetőségük van a megfelelő célszervbe eljutni, és ott leadni a hatóanyagot.

A PLGA részecskék felülete hidrofób, emiatt vizes közegben hajlamosak aggregációra, mely korlátozza alkalmazhatóságukat. Ahhoz, hogy növelni tudjuk biokompatibilitását és a véráramban való tartózkodási idejét, felületmódosításra van szükség. Többek között a Pluronic márkaneven forgalmazott PEO-PPO-PEO, vagyis poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli(etilén-oxid) blokk kopolimerek (3. ábra) is alkalmazhatók erre a célra. A hidrofób PPO szegmens segítségével a polimer rögzül a PLGA részecske felületén, míg a PEO láncok hidrofil tulajdonságúvá teszik a PLGA felületét. A Pluronic adszorpciós réteg sztérikus stabilitást is ad a PLGA részecskéknek [7, 8, 9].

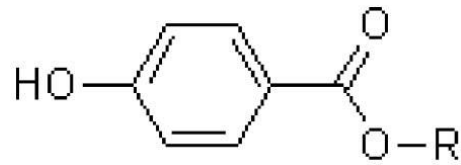


3. ábra: Pluronicok általános szerkezeti képlete

## 2.4. Parahidroxi-benzoésav észterei

Munkám során a PLGA részecskékbe kapszulázott hatóanyagként parahidroxi-benzoésav (PHBA) észtereit (4. ábra), mint modellanyagokat, használtam. A PHBA

egy vízben kevésbé, szerves oldószerekben viszont jól oldódó kristályos anyag. Mikrobaellenes hatású vegyület, a szervezetben nem halmozódik, a vese kiválasztja. A PHBA észtereinek, az úgynevezett parabéneknak mikrobaellenes hatása jobb, mint az eredeti savé, ezen vegyületeket széles körben alkalmazzák tartósítószerként [14].

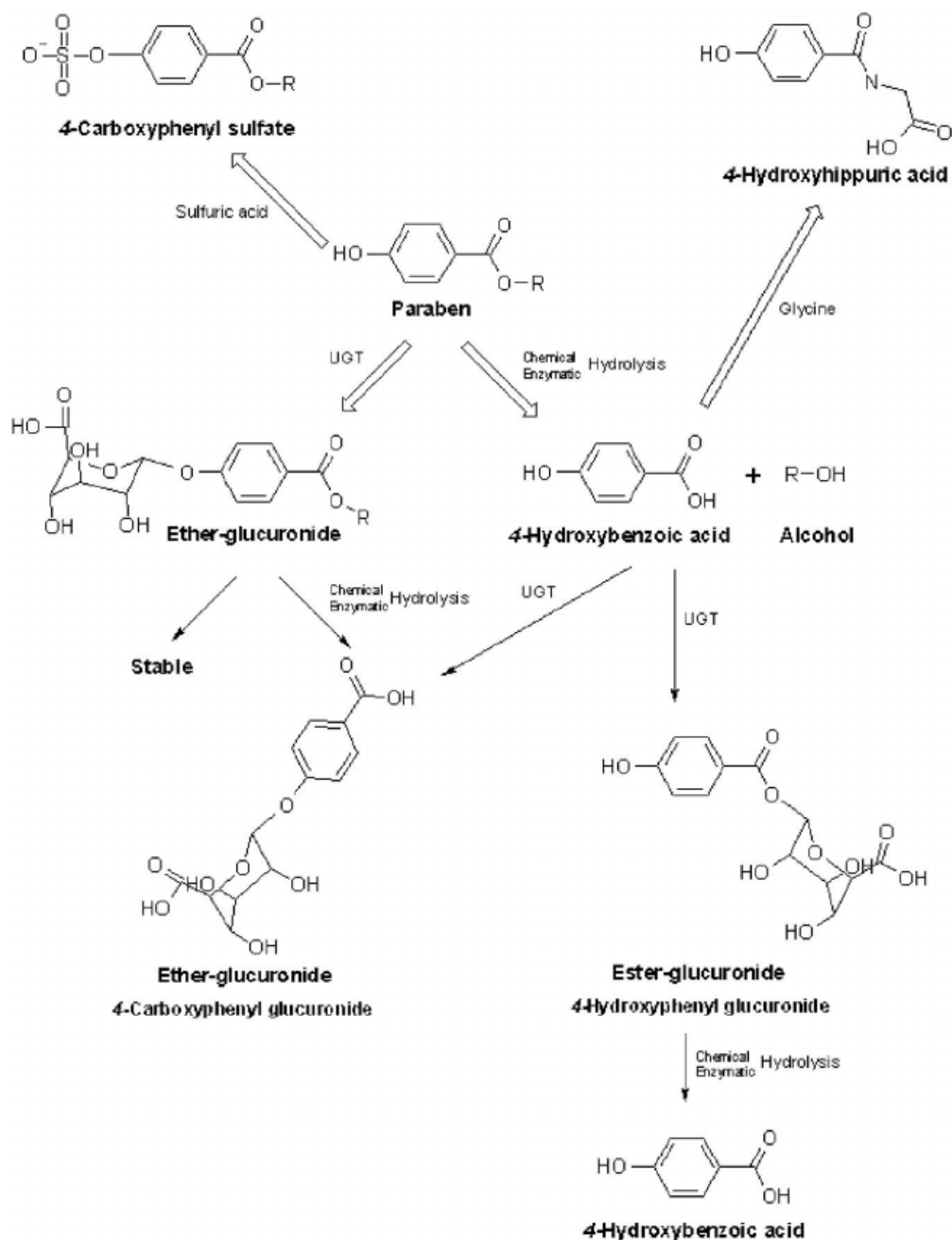


4. ábra: A parahidroxi-benzoésav észter szerkezeti képlete

A parabéneket az 1920-as évektől kezdve használják különböző kozmetikumok és testápolási termékek, továbbá élelmiszerek és gyógyszerek tartósítására. Tartósító hatásukat a hosszabb alkilánc elősegíti, ám a kisebb szénatomszámú vegyületeket részesítik előnyben, vízben való kedvezőbb oldhatóságuk miatt [14, 15].

Széles körben való elterjedésük oka, hogy mind állatokon, mind embereken végzett vizsgálatok alapján kimutatták, hogy nem toxikusak, gyorsan metabolizálódnak, majd távoznak a szervezetből. A legújabb kutatások szerint viszont a hormonháztartást megzavaró, ösztrogénhatású, valamint allergén mellékhatásaik is lehetnek, emiatt a kozmetikai szerek és élelmiszerek csak egy megengedett határérték alatt tartalmazhatják ezeket az anyagokat [15].

A parabének az emberi szervezetben átalakulnak (5. ábra), elsősorban parahidroxi-benzoésavvá hidrolizálnak, amelyet szulfáttal, glükuroniddal vagy glicinnel való egyesülés után a vese kiválaszt [14].



5. ábra: Parabének metabolizációja [12]

A leggyakrabban alkalmazott parabének közül a metil-4-hidroxibenzoát alkalmas mikrobiális fertőzések, penész-, élesztő- és kis mértékben a baktériumképződés megelőzésére, ezért gyakran alkalmazzák tartósítószerként gyógyszerekben. Továbbá élelmiszeradalékként előfordulhat sütőipari termékekben, üdítőkben, befőttekben, illetve széles körben alkalmazzák kozmetikai termékekben is [16].

Az etil-4-hidroxibenzoátot különböző penész-, és élesztőgombák elleni adalékanyagként használják, egyaránt megtalálható gyógyszeripari és kozmetikai

termékekben is. Élelmiszeripari alkalmazását viszont korlátozza, hogy a tartósító hatás eléréséhez szükséges mennyiségben befolyásolja az élelmiszerek ízét.

A propil-4-hidroxibenzoátot számos vízalapú krémekben, samponban, tusfürdőben alkalmazzák tartósítószerként, hiszen nem toxikus és bőrirritáló hatása sincsen. A gyógyszeripar és az élelmiszeripar szintén használja tartósításra ezt a PHBA-észtert [17].

A butil-4-hidroxibenzoát szintén gombaölő hatású, előfordulhat fertőtlenítő krémekben, antibiotikumokban, fájdalomcsillapítóknak. Továbbá egyes élelmiszerek tartósítására is használják.

A heptil-4-hidroxibenzoát felhasználása a többi parabénhez hasonló, tartósítószerként egyaránt megtalálható élelmiszerekben, bizonyos kozmetikai szerekben, illetve különböző gyógyszerekben is.

A parabének homológ sort alkotnak, kísérleti munkám során emiatt esett a választás erre a vegyületcsaládra, mint modellhatóanyagra. Az adalékanyagként leggyakrabban használt, E-számmal is rendelkező parabénnel végeztem kísérleteimet, ezek néhány fontos tulajdonsága az *1. táblázatban* szerepel [18, 19].

parabén	M (g/mol)	logP	oldhatóság vízben 25°C-on (g/l)
metil	152,15	1,96	2,500
etil	166,18	2,47	0,885
propil	180,20	3,04	0,500
butil	194,23	3,57	0,207
heptil	236,31	4,83	0,020

*1. táblázat:* Parabének moláris tömeg (M), oktanol/víz megoszlási hányados (logP) és vízben való oldhatóságainak értékei

A biológiailag aktív molekulák egyik legfontosabb jellemzője az úgynevezett lipofilitás, mely a vegyületek apoláris környezethez való affinitását jellemzi. Ez nagymértékben befolyásolja a vegyület felszívódását, eloszlását, kiürülését, ezáltal viselkedését a szervezetben. Egy molekula lipofilitása számszerűen jellemezhető az oktanol/víz oldószer párra vonatkozó megoszlási hányados (P), illetve annak logaritmusával [20].

Egy megoszlási folyamat során az anyag megoszlík két, egymással nem elegyedő, de érintkező oldószer között. Az anyagnak a két, egymással nem elegyedő oldószerben mért aktivitásainak arányát nevezzük megoszlási hányadosnak, mely adott hőmérsékleten és nyomáson az egyensúly beállása után állandó értéknek tekinthető [20]. A gyógyszermolekulák minősítésénél használt megoszlási hányadost leíró összefüggés:

$$\log P_{okt/víz} = \log \left( \frac{[oldott\ anyag]_{oktanol}}{[oldott\ anyag]_{víz}} \right)$$

A gyógyszermolekulák abszorpciója a szervezetben tehát nagyban függ a logP értéktől [20].

A nanoprecipitációval előállított PLGA gyógyszerhordozókról, bár számos kutatás témája, még nem alakult ki egy áttekinthető kép azt illetően, hogy pontosan milyen módon állítható elő a kívánt tulajdonságú rendszer. Ennek oka, hogy számos paraméter befolyásolja a nanoprecipitáció során kialakuló részecskék összetételét és tulajdonságait. A parabének családja, egymástól kis mértékben eltérő tulajdonságaiknak köszönhetően, alkalmas lehet annak vizsgálatára, hogy a hatóanyag tulajdonságai hogyan befolyásolják a PLGA-ba való kapszulázhatóságot.

## 2.5. Oldhatósági paraméter

Az oldhatósági paramétereket széles körben alkalmazzák különböző polimerek kompatibilitásának becslésére, polimerek és adalékanyagok elegyíthetőségének vizsgálatára, továbbá gyógyszermolekulák oldhatóságának előrejelzésére is különböző gyógyszerhordozó rendszerekben [21, 22].

Az oldhatósági paramétert elsőként Hildebrand definiálta a kohéziós energiasűrűség (CED) négyzetgyökeként:

$$\delta_t = (CED)^{1/2} = \left( \frac{\Delta H_v - RT}{V_m} \right)^{1/2}$$

A fenti kifejezésben szereplő  $\Delta H_v$  a párolgási szabadentalpia,  $R$  a gázállandó,  $T$  a hőmérséklet és  $V_m$  a moláris térfogat [21, 22].

Ezt a megközelítést eredetileg oldószerek, illetve folyadék halmazállapotú anyagok keverékeire használták. A Hildebrand-elméletet Hansen terjesztette ki összetettebb rendszerekre molekuláris kölcsönhatások figyelembe vételével. A teljes kohéziós

energiát ( $E_{koh}$ ) felbonthatjuk diszperziós erőkből eredő ( $E_d$ ), dipól-dipól kölcsönhatásból származó ( $E_p$ ), illetve hidrogénkötésekből eredő ( $E_h$ ) tagokra [21, 22].

$$E_{koh} = E_d + E_p + E_h$$

A fenti kifejezést a moláris térfogattal elosztva és négyzetre emelve megkapjuk a Hildebrand-elméletből származó teljes oldhatósági paramétert a Hansen által meghatározott parciális oldhatósági paraméterekkel kifejezve [21, 22].

$$\delta_t^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2$$

Számos megközelítés létezik az oldhatósági paraméterek megbecslésére, ezek az úgynevezett csoportjárulék módszerek. Mindegyik módszer közös elméleti alapja, hogy egy molekula teljes kohéziós energiasűrűsége additív tulajdonság, és a molekulán belüli funkciós csoportok hozzájárulásának összegeként adható meg [22].

A gyógyszeriparban leggyakrabban vizsgált kölcsönhatások az oldhatósághoz kapcsolódnak. Számos, az oldhatósági paraméterek elméletén alapuló közelítést fejlesztettek ki gyógyszermolekulák és polimerek elegyedésére vonatkozóan. A leggyakrabban használt elegyítésre vonatkozó feltétel az úgynevezett Greenhalgh-feltétel, a teljes oldhatósági paraméterek különbségét vizsgálja [22].

$$\Delta\delta_t = |\delta_{t2} - \delta_{t1}|$$

A közelítés szerint, ha a két vizsgált anyag oldhatósági paraméterének különbsége kisebb, mint  $7 \text{ MPa}^{1/2}$ , elegyednek egymással, ha nagyobb, mint  $10 \text{ MPa}^{1/2}$ , nem fognak elegyedni egymással. A feltételt számos kísérlet igazolja, ám annak érdekében, hogy jobban megértsük a különböző anyagok közti kölcsönhatásokat, a parciális oldhatósági paraméterek meghatározása lenne fontos, ám erre jelenleg kevés csoportjárulék módszer alkalmas [22].

### 3. Célkitűzés

Kísérleti munkám során nanoprecipitációval foglalkoztam, ezzel a módszerrel állítottam elő nanoméretű PLGA részecskéket, melyekbe parabéneket, mint modell hatóanyagot kapszuláztam.

A nanoprecipitáció során számos paraméternek lehet hatása a rendszer tulajdonságaira, emiatt még nem alakult ki átfogó kép arról, hogyan állítható elő a kívánt tulajdonságú rendszer ezzel az eljárással.

A választott hatóanyag sorozatban kis mértékben, monoton módon változik a polaritás, miközben a szerkezet meghatározó része változatlan. A parabének családjá ideális modellsorozat annak tanulmányozására, hogyan függ a kapszulázhatóság a hatóanyag molekula polaritásától.

A PLGA-t általában hidrofób anyagok kapszulázására ajánlják, de arról nincs említés az irodalomban, hogy ez a polaritást tekintve, számszerűen mit jelent.

Munkám célja, hogy az ezzel a hatóanyag sorozattal végzett kísérletek alapján fel tudjuk deríteni, hogy a vizsgált blokk-kopolimer milyen esetekben alkalmazható sikeresen gyógyszerhordozóként.

Az előállított rendszerekben a polimer részecskék méretét dinamikus fényszóródással, míg a polimer részecskék hatóanyagtartalmát és a kapszulázási hatékonyságot spektrofotometriás mérések segítségével határozom meg. Továbbá mérési eredményeimet elméleti megfontolások alapján, a molekulák oldhatósági paramétereinek összehasonlításával elemzem.



## **4. Anyagok és módszerek**

### **4.1. Felhasznált anyagok**

#### **4.1.1. A nanorészecskék előállításához használt anyagok**

- PLGA50 poli(D,L-tejsav/glikolsav) kopolimer, M = 40000-75000 g/mol, tejsav/glikolsav arány: 50-50%, Sigma-Aldrich, Németország
- Pluronic F127, M = 12600 g/mol, PEO-PPO-PEO blokk kopolimer, EO/PO/EO arány: 101/56/101 (HLB=22), BASF Hungaria Kft., Magyarország
- Tetrahydrofuran (THF), analitikai tisztaságú, Merck Kft., Magyarország
- Kétszer desztillált víz
- Metil-4-hidroxibenzoát, M = 152,15 g/mol, Sigma-Aldrich, Németország
- Etil-4-hidroxibenzoát, M = 166,17 g/mol, Sigma-Aldrich, Németország
- Propil-4-hidroxibenzoát, M = 180,20 g/mol, Sigma-Aldrich, Németország
- Butil-4-hidroxibenzoát, M = 194,23 g/mol, Sigma-Aldrich, Németország
- Heptil-4-hidroxibenzoát, M = 236,31 g/mol, Sigma-Aldrich, Németország

#### **4.1.2. A kísérleti munka során alkalmazott egyéb anyagok**

A kísérletekhez felhasznált üveg eszközöket hidrogén-peroxid és tömény kénsav frissen készített 1:2 arányú elegyével tisztítottam.

- Hidrogén-peroxid (30%), analitikai tisztaságú, Molar Chemicals Kft., Magyarország
- Kénsav (96%), analitikai tisztaságú, Merck Kft., Magyarország

## **4.2. Kísérleti módszerek**

### **4.2.1. Nanorészecskék előállítása**

A PLGA részecskéket nanoprecipitációval állítottam elő. Az eljárás során a polimert vízzel elegyedő szerves oldószerben kell feloldani, majd ezt vízhez csepegtetni. A stabilizátorként alkalmazott Pluronic F-127-et a vizes fázis tartalmazta. A PLGA50 oldószerének a THF-et választottam. A szerves és vizes fázisok arányát 1:10 értéknek választottam, a PLGA50 polimer felhasználásával 10 g/l-es oldatot készítettem, illetve

elkészítettem a Pluronic F-127 kétszer desztillált vizes, 1 g/l-es koncentrációjú oldatát is. A hatóanyagot a PLGA oldathoz adtam.

A bemért hatóanyag mennyiségét a hatóanyagok vízben való oldhatósága alapján határoztam meg (1. táblázat), úgy, hogy az összemérhető legyen az elkészítendő rendszerek polimertartalmával. A hatóanyagot a vizes fázisra nézve túltelítve adtam a rendszerhez, ezzel elősegítve annak a PLGA részecskékbe való kapszulázását.

Ezen megfontolások alapján tehát 30 mg-nyi hatóanyagot adtam 2 ml, 10 g/l koncentrációjú PLGA50 THF-es oldatához. Ez csak a metil-4-hidroxibenzoát esetén jelent az oldhatóságnál kisebb koncentrációt. Ezt az oldatot automata Hamilton-fecskendő segítségével (3 $\mu$ l/s-os adagolási sebességgel), kevertetés mellett (500 fordulat/perc sebességgel) 20 ml-nyi vizes fázishoz adagoltam. Az így elkészített szuszpenzióból a szerves oldószert kevertetés mellett egy éjszaka alatt elpárologtattam.

A THF elpárolgása után a mintákat centrifuga segítségével tisztítottam. Az előcentrifugálást 10 percen át végeztem 3000 rpm-en, hogy eltávolítsam a szuszpenzióból az esetlegesen aggregálódott PLGA részecskéket, illetve a kicsapódott hatóanyagot. Ezután a polimer nanorészecskéket tartalmazó felülúszót elválasztottam, és különböző fordulatszámokon további centrifugálásnak vettem alá, hogy meghatározhassak egy, a tisztításhoz ideális fordulatszámot.

#### 4.2.2. Méretmeghatározás

A PLGA részecskék méretét és polidiszperzitását dinamikus fényszórás méréssel (DLS) határoztam meg. A módszer az elektromágneses sugárzás és a kolloid részecskék közti kölcsönhatáson alapul. A részecskék folyamatos mozgásának következtében a szórt fény interferenciája állandóan változik, ezáltal a szórt fény intenzitása fluktuál. DLS mérések során az intenzitás-intenzitás autokorrelációs függvényt mérjük, melyből megkaphatjuk a térerő korrelációs függvényt:

$$g(\tau) = Ae^{-\Gamma\tau}$$

A képletben szereplő  $\tau$  a korrelációs idő,  $1/\Gamma$  pedig a relaxációs idő.  $\Gamma$  kifejezhető a  $\Gamma = Dq^2$  összefüggéssel, melyben  $D$  a kollektív diffúziós állandó,  $q$  pedig a szórási vektor.

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

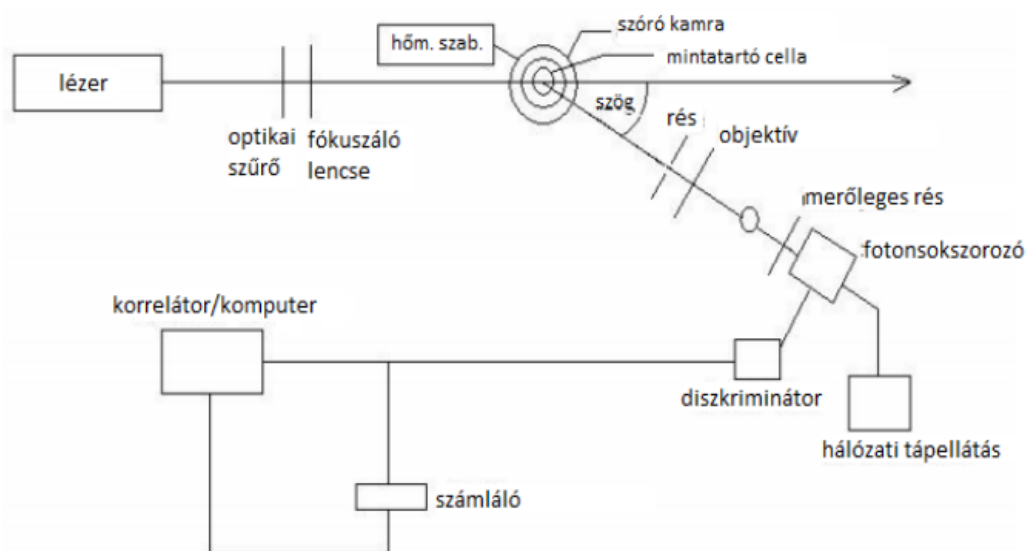
Az összefüggésben  $n$  az oldat törésmutatója,  $\lambda$  a megvilágító fény hullámhossza,  $\theta$  pedig a szórási szög.

A részecskeméret az Einstein-Stokes összefüggés szerint számolható:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d}$$

A képletben  $k_B$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet,  $\eta$  a viszkozitás,  $d$  pedig a részecskeátmérő.

A méréseket egy Brookhaven típusú fényszóródás mérő berendezéssel végeztem. A készülékben a fényforrás egy Omnichrome 543AP típusú argon-ion lézer, továbbá egy BI-200 SM típusú goniométerrel és BI-9000AT digitális autokorrelátorral van felszerelve. A szórt fény intenzitását 488 nm-en 90°-os szögnél detektáltam.



6.ábra: A fényszóródás mérő berendezés elvi vázlata

### 4.2.3. Hatóanyag-tartalom meghatározás

A PLGA részecskék hatóanyag-tartalmát spektrofotometriás mérésekkel határoztam meg. A részecskéket THF-ben oldottam fel, majd megmértem az oldatok abszorbanciáját. A méréseket Analytic Jena Specord 40 nevű UV-látható spektrofotométerrel végeztem.

Először a hatóanyagok különböző koncentrációjú THF-es oldataiból álló kalibráló sorozatot készítettem. A mérések során referenciaként tiszta THF-et használtam. Az első mérés során megállapítottam a hatóanyagokat tartalmazó oldatok maximális elnyelésének helyét. Ezután a méréseket 220-300 nm hullámhossztartományban végeztem el, majd az abszorpció – koncentráció összefüggés pontjaira egyenest illesztettem. A kalibrációs összefüggést mind az öt hatóanyagra meghatároztam. Minden minta esetén három párhuzamos mérést végeztem.

A PLGA részecskéket tartalmazó mintákból 2-2 ml-nyit 55°C-on tömegállandóságig szárítottam. Szárazanyagtartalmuk meghatározása után 2 ml THF-ben újra feloldottam a mintákat, majd felvettem abszorpciós spektrumukat. Ezután a kalibrációs egyenesek felhasználásával a hatóanyag-koncentráció meghatározható. Ebből a hatóanyag-tartalom és a kapszulázási hatékonyság számolható az alábbi összefüggések szerint:

$$\text{hatóanyag – tartalom} = \frac{m_{\text{hatóanyag a részecskékben}}}{m_{\text{PLGA részecskék}}}$$

$$\text{kapszulázási hatékonyság} = \frac{m_{\text{hatóanyag a részecskékben}}}{m_{\text{bevitt hatóanyag}}}$$

## 5. Eredmények és értékelésük

### 5.1. Poli(tejsav/glikolsav) részecskék jellemzése

A nanoprecipitációval előállított, PLGA részecskéket tartalmazó szuszpenziót a szerves oldószer elpárolgatása után előcentrifugáltam 3000 rpm-en 10 percen keresztül. A centrifugálás után a nanorészecskéket tartalmazó felülúszót elválasztottam. A rendszerben lévő szárazanyag nyomon követése céljából a kiülepedett anyagot, amely kicsapódott hatóanyagot, illetve aggregálódott részecskéket tartalmazhat, kiszárítottam, tömegét megmértem. A különböző parabéneket tartalmazó minták esetén e tömeg értékek a 2. táblázatban láthatók.

parabén	m ( mg )
metil	3,99
etil	10,26
propil	11,14
butil	10,65

2. táblázat: Metil-, etil-, propil-, és butil-parabén felhasználásával készített mintákban az előcentrifugálás utáni veszteség

Megfigyelhető, hogy a metil-4-hidroxibenzoátot tartalmazó rendszernél a veszteség tömege jóval kisebb, mint a másik három PHBA-észter esetén. A metil-parabén vízben való oldhatósága jelentősen nagyobb, mint a többi parabén származéké, a rendszer nem túltelített ezen anyagra nézve, emiatt nem csapódik ki annyi hatóanyag. A veszteség valószínűleg aggregálódott részecskéket tartalmaz.

A további tisztítás optimalizálása céljából az előcentrifugált mintákból 2-2 ml-nyit öt különböző fordulatszám (11200 rpm, 12100 rpm, 13000 rpm, 13800 rpm és 14500 rpm) mellett 20 percen keresztül centrifugáltam. Ezután 1,5 ml-nyi felülúszót szedtem le a mintákról, a kiülepedett, részecskéket tartalmazó anyagot kétszer desztillált vízzel újra 2 ml-re egészítettem ki, majd ultrahangos fürdőben rediszpergáltam. Mind a felülúszókat, mind a részecskéket tartalmazó szuszpenziót DLS-sel vizsgáltam.

A 3. táblázatban, a hatóanyagot tartalmazó, különböző fordulatszámok mellett centrifugált minták felülúszóiban mért átlagos részecskeméret (d), polidiszperzitás (PD) és detektor beütésszám (A) értékek láthatóak.

<b>11200 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	99,8	0,13	45,8
etil	103,4	0,10	42,9
propil	102,5	0,11	37,3
butil	86,4	0,22	29,7
<b>12100 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	108,2	0,19	31,0
etil	134,7	0,11	55,3
propil	92,5	0,17	25,6
butil	128,5	0,20	64,0
<b>13000 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	107,0	0,17	37,8
etil	84,55	0,19	22,5
propil	85,0	0,21	22,8
butil	77,5	0,20	17,2
<b>13800 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	86,9	0,22	18,6
etil	104,1	0,22	31,3
propil	102,3	0,19	25,0
butil	70,7	0,18	15,0
<b>14500 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	154,4	0,14	28,2
etil	115,9	0,23	28,3
propil	115,8	0,14	83,2
butil	91,5	0,24	26,1

3. táblázat: Különböző fordulatszámok mellett centrifugált, metil-, etil-, propil-, és butil-parabént tartalmazó rendszerek felülúszóiban mért átlagos részecskeméret (d), polidiszperzitás (PD) és detektor beütésszám (A) értékek

A minták tisztítása során a nem kapszulázódott, oldott állapotban lévő hatóanyag, illetve a PLGA részecskék felületén nem adszorbeálódott Pluronic F-127 távolítható el a szuszpenziókból. Ennek megfelelően a mért polidiszperzitás értékekből is látható, hogy a felülűzők széles méreteloszlással rendelkező részecskéket tartalmaznak.

A rediszpergált mintákat is DLS segítségével vizsgáltam. Ezen mintákból 0,5 ml-t 2 ml-nyi kétszer desztillált vízzel hígítottam, az így kapott szuszpenziók esetén a különböző fordulatszámok mellett mért átlagos részecskeméret, polidiszperzitás, illetve detektor beütésszám értékeket a *4. táblázat* tartalmazza.

<b>11200 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	156,4	0,14	243,5
etil	173,7	0,09	259,6
propil	184,3	0,12	235,6
butil	197,8	0,08	172,6
<b>12100 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	158,1	0,09	213,6
etil	179,8	0,07	243,1
propil	185,3	0,08	212,5
butil	203,5	0,05	172,6
<b>13000 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	166,5	0,06	260,6
etil	171,4	0,10	215,1
propil	184,1	0,05	201,1
butil	198,9	0,06	170,9
<b>13800 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	161,2	0,04	197,2
etil	173,8	0,07	214,0
propil	187,0	0,07	243,2
butil	190,1	0,07	122,6
<b>14500 fordulat/perc</b>			
parabén	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
metil	162,3	0,10	192,4
etil	175,6	0,11	224,3
propil	188,1	0,04	237,5
butil	200,0	0,10	140,6

4. táblázat: Különböző fordulatszámok mellett centrifugált, metil-, etil-, propil-, és butil-parabént tartalmazó rendszerekben mért átlagos részecskeméret (d), polidiszperzitás (PD) és detektor beütésszám (A) értékek



A rediszpergált, PLGA részecskéket tartalmazó minták esetén megfigyelhető, hogy az átlagos részecskeméret a hatóanyag molekula oldalláncának növekedésével nő. Ez a tendencia mind az öt alkalmazott centrifugálási fordulatszám esetén érvényes. A metil-parabént tartalmazó PLGA részecskék átmérője átlagosan 160 nm, míg a butil-parabént tartalmazó részecskék átlagos átmérője már 200 nm körüli érték.

A mért detektor beütésszámokból a szolban lévő nanorészecskék koncentrációjára következtethetünk. Összehasonlítva a felülúszókban mért detektor beütésszámokat a rediszpergált részecskéket tartalmazó minták beütésszámaival, megállapítható, hogy a felülúszókban a koncentráció jóval kisebb, átlagosan  $\approx 1/30$ -a a rediszpergált részecskéket tartalmazó mintáénak. Tehát a tisztítás során a felülúszóban főleg Pluronic F-127, illetve oldott állapotban lévő hatóanyag található.

Általánosan elfogadott, hogy a 0,1 körüli, illetve annál kisebb polidiszperzitás értékek, esetén a méreteloszlást szűknek tekintjük. Ez a feltétel a legkisebb sebességű ülepitést (11200 fordulat/perc) kivéve minden mintára teljesül.

A különböző fordulatszámú centrifugálás után a kiülepedett, PLGA részecskéket tartalmazó anyag fordulatszámától függetlenül könnyen rediszpergálható volt. Ezt és a DLS-sel mért átlagos részecskeméret és polidiszperzitás értékeket figyelembe véve a minták tisztítását a továbbiakban 14500 rpm-es centrifugálás mellett végeztem.

A leginkább hidrofób parabén, a heptil-4-hidroxibenzoát alkalmazásakor az előbbieken ismertetett, 30 mg hatóanyagot tartalmazó recept nem volt alkalmas a nanorészecskés rendszer előállítására. A szerves fázis vizes fázisba történő adagolása közben a hatóanyag és vele együtt a polimer is kicsapódott. Ennek a heptil-4-hidroxibenzoát vízben való csekély (20 mg/l) oldhatósága lehetett az oka.

A hatóanyag mennyiségét emiatt csökkentettem, annak vizsgálatára pedig, hogy a hatóanyag mennyisége hogyan befolyásolja a kapszulázást, három recept szerint készítettem el a PLGA részecskéket. 1 mg, 3 mg, illetve 5 mg hatóanyagot adtam 1 ml 10 g/l koncentrációjú PLGA THF-es oldatához, majd ezt automata-adagoló Hamilton-fecskendő segítségével 10 ml, 1g/l koncentrációjú Pluronic F-127 kétszer desztillált vizes oldatához csepegtettem.

Az így elkészített mintákat egy éjszakán át kevertetem, majd a szerves oldószer elpárolgása után a szuszpenziókat előcentrifugáltam 3000 fordulat/perc sebességen 10 percen keresztül. A centrifugálás után a nanorészecskéket tartalmazó felülúszót elválasztottam. A kiülepedett anyagot kiszárítottam, tömegét megmértem. A különböző

mennyiségű heptil-4-hidroxi-benzoátot tartalmazó minták esetén e tömeg értékek az 5. táblázatban láthatók.

hatóanyag mennyisége (mg)	m ( mg )
1	2,95
3	3,23
5	4,59

5. táblázat: 1 mg, 3 mg és 5 mg heptil-4-hidroxi-benzoátot tartalmazó mintákban az előcentrifugálás után mért veszteség

A további tisztítás során az előcentrifugált mintákat 2 ml-es eppendorfkban 14500 rpm mellett 20 percen keresztül centrifugáltam. Ezután 1,5 ml-nyi felülúszót szedtem le a mintákról, a kiülepedett, részecskéket tartalmazó anyagot kétszer desztillált vízzel újra 2 ml-re egészítettem ki, majd ultrahangos fürdőben rediszpergáltam. Ezt összesen háromszor végeztem el.

A tisztított mintákban a polimer részecskék méretét és polidiszperzitását DLS-sel mértem meg. A mérés során 200 µl szolt adtam 10 ml kétszer desztillált vízhez. A mért átlagos részecskeátmérő, polidiszperzitás és detektor beütésszám értékek a 6. táblázatban szerepelnek.

hozzáadott hatóanyag (mg)	d (nm)	PD	A (10 <sup>3</sup> beütés/s)
1	194,2	0,08	30,1
3	184,5	0,08	23,4
5	183,1	0,09	24,9

6. táblázat: Különböző mennyiségű heptil-parabént tartalmazó mintákban DLS-sel mért átlagos részecske méret (d), polidiszperzitás (PD) és detektor beütésszám (A) adatok

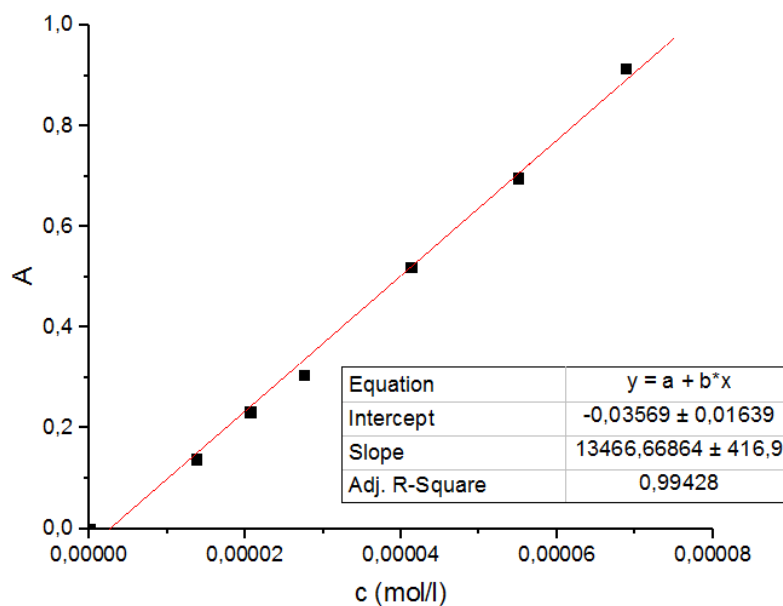
A polidiszperzításra mért értékek alapján megállapítható, hogy mindhárom mintában található PLGA részecskék méreteloszlása szűk.

Ha összehasonlítjuk a heptil-4-hidroxi-benzoátot tartalmazó PLGA részecskéken mért detektor beütésszám értékeket a másik négy hatóanyag hozzáadásával készített polimer részecskéken mért beütésszám adatokkal, akkor ezek koncentrációja hasonlóan becsülhető.

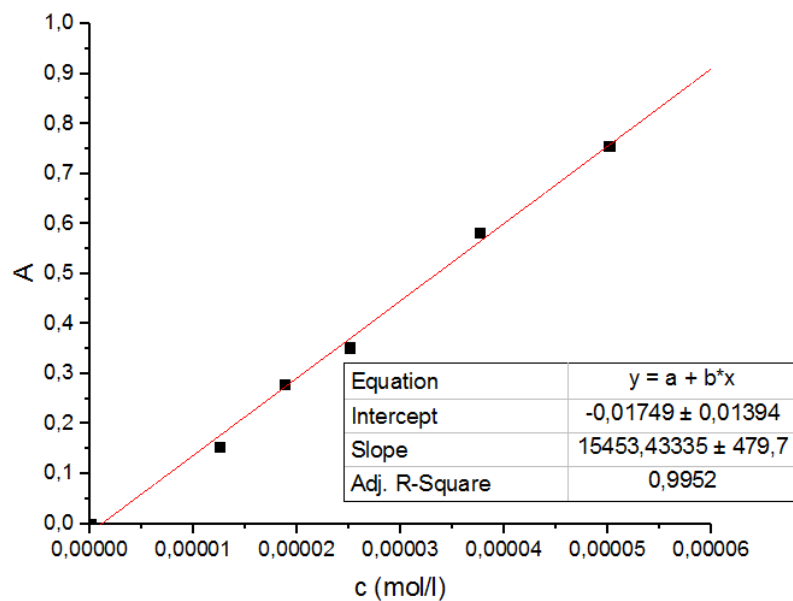
## 5.2. Poli(tejsav/glikolsav) nanorészecskék hatóanyag-tartalmának meghatározása

A polimer részecskék hatóanyag-tartalmának meghatározását spektrofotométer segítségével végeztem.

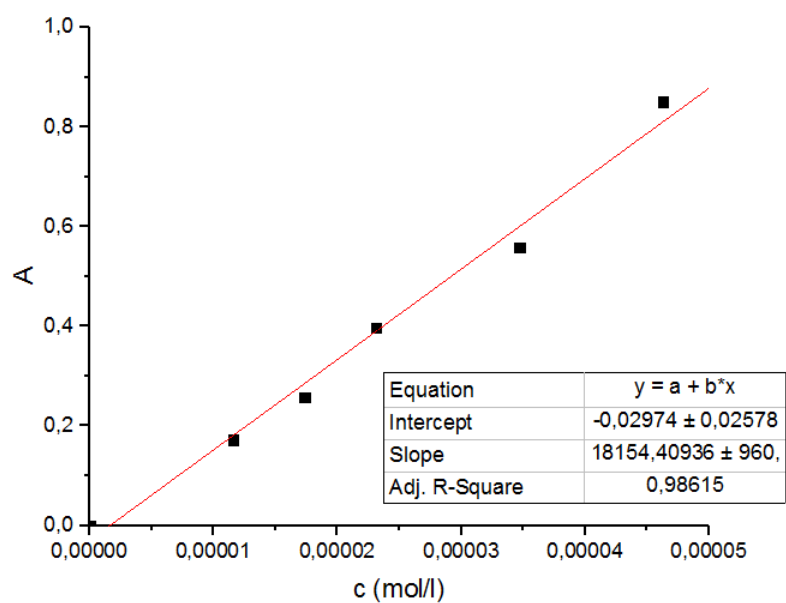
A PHBA-származékok koncentrációjának meghatározásához először kalibrációt végeztem. A parabéneket THF-ben oldottam fel, és különböző koncentrációjú oldatok abszorbanciáját mértem, majd ezeket az értékeket a koncentráció függvényében ábrázoltam. Az így kapott kalibrációs egyenesek a 7.-11. ábrákon láthatók.



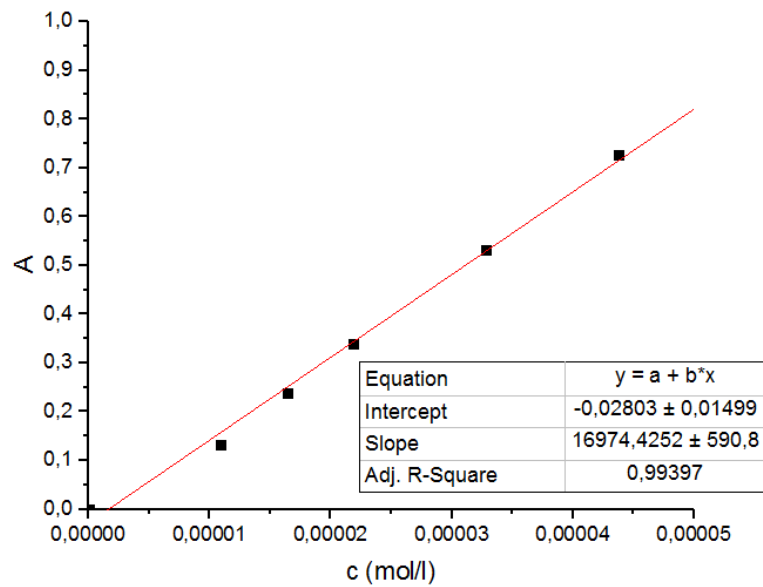
7. ábra: Metil-4-hidroxibenzoát kalibrációs egyenese THF-ben  $\lambda = 256$  nm-en



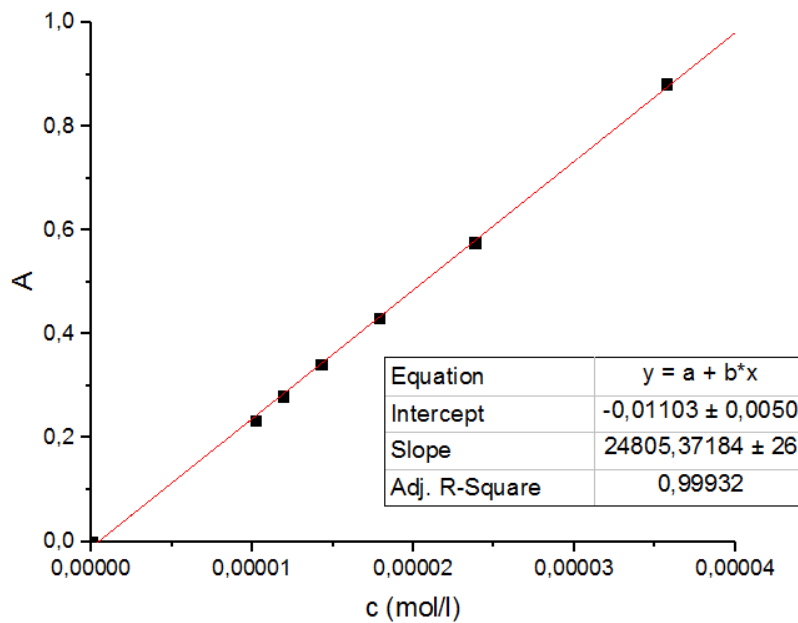
8. ábra: Etil-4-hidroxibenzoát kalibrációs egyenese THF-ben  $\lambda = 256$  nm-en



9. ábra: Propil-4-hidroxibenzoát kalibrációs egyenese THF-ben  $\lambda = 256$  nm-en



10. ábra: Butil-4-hidroxibenzoát kalibrációs egyenese THF-ben  $\lambda = 256$  nm-en



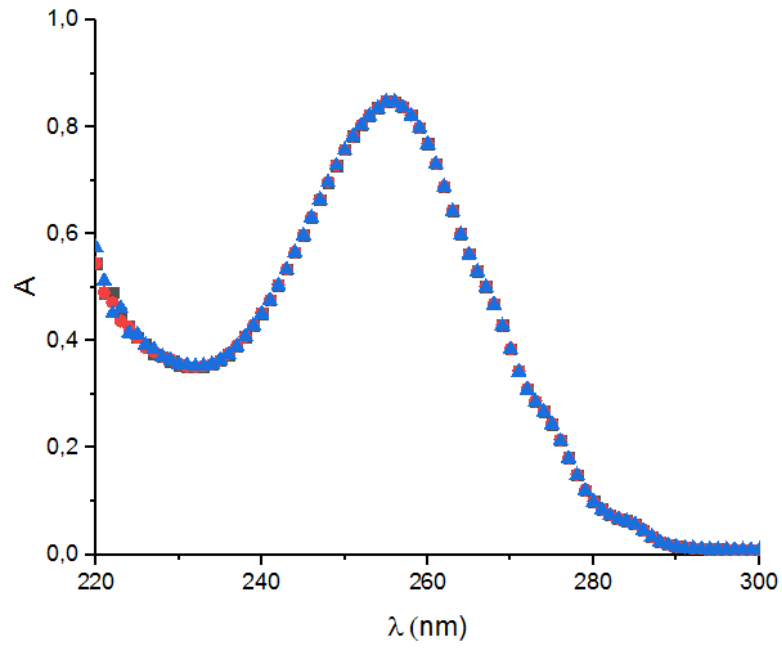
11. ábra: Heptil-4-hidroxibenzoát kalibrációs egyenese THF-ben  $\lambda = 256$  nm-en

A tisztított minták szárazanyag tartalmának meghatározásához egy-egy mintából 2-szer 2 ml-nyit szárítószekrényben 55°C-on tömegállandóságig szárítottam. Az így kapott szárazanyagokat a 7. táblázat mutatja:

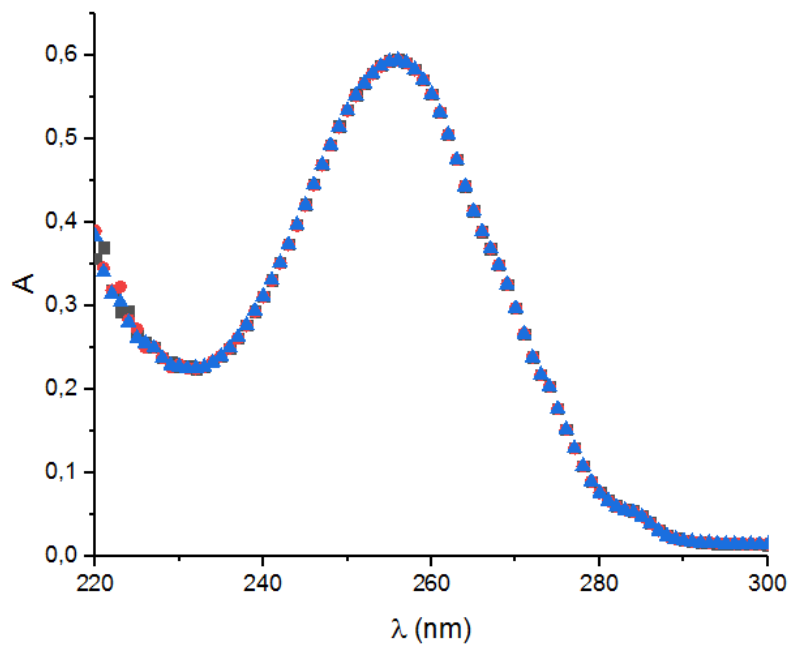
parabén	tömeg (mg)	tömeg átlaga (mg)
metil	2,12	2,11 ± 0,02
	2,09	
etil	2,16	2,18 ± 0,02
	2,19	
propil	2,14	2,16 ± 0,02
	2,18	
butil	1,82	1,80 ± 0,02
	1,78	

7. táblázat: Metil-, etil-, propil-, és butil-parabén hozzáadásával előállított minták szárazanyaga

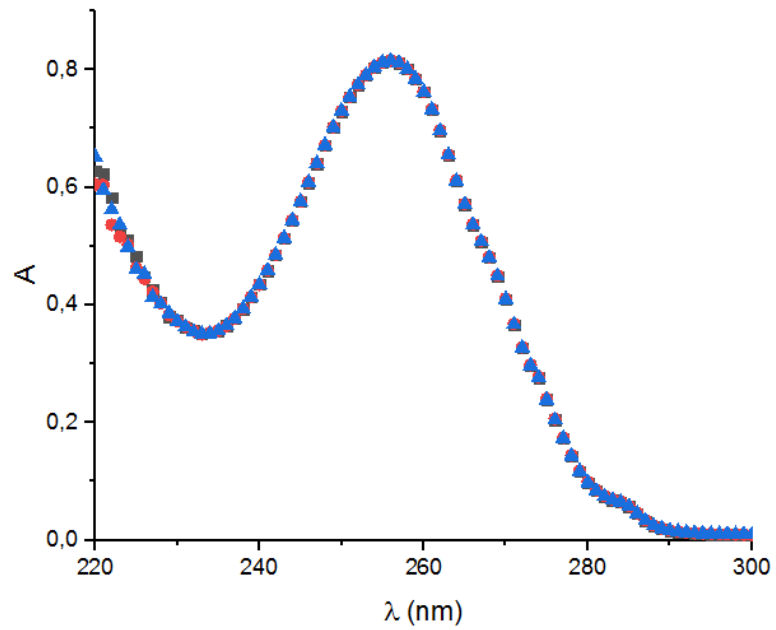
A kiszárított mintákat 2 ml THF-ben oldottam fel, majd megmértem abszorbanciájukat és a kalibrációs egyenesek segítségével meghatároztam az egyes minták koncentrációját. A mért spektrumokból mintánként egy-egy a 12.-15. ábrákon látható, továbbá a 8. táblázat tartalmazza az egyes mintákban a hatóanyag koncentrációját, valamint a minták hatóanyag-tartalmát, és a kapszulázási hatékonyságot.



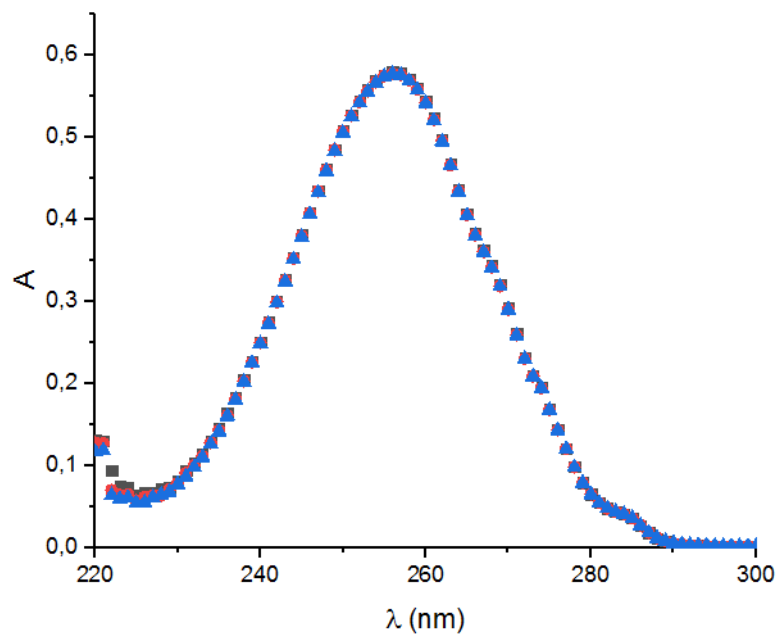
12. ábra: Metil-4-hidroxibenzoátot tartalmazó PLGA THF-es oldatának spektruma (kétszeres hígítás mellett)



13. ábra: Etil-4-hidroxibenzoátot tartalmazó PLGA THF-es oldatának spektruma (kétszeres hígítás mellett)



14. ábra: Propil-4-hidroxi-benzoátot tartalmazó PLGA THF-es oldatának spektruma



15. ábra: Butil-4-hidroxi-benzoátot tartalmazó PLGA THF-es oldatának spektruma  
(négyeszeres hígítás mellett)



parabén	c ( $10^{-4}$ mol/l)	hatóanyag-tartalom (%)	kapszulázási hatékonyság (%)
metil	$1,36 \pm 0,97$	$1,96 \pm 0,14$	$1,38 \pm 0,10$
etil	$0,85 \pm 0,08$	$0,85 \pm 0,08$	$0,94 \pm 0,09$
propil	$0,47 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,02$
butil	$1,37 \pm 0,14$	$2,96 \pm 0,30$	$1,77 \pm 0,18$

8. táblázat: Metil-, etil-, propil-, és butil-parabént tartalmazó PLGA THF-es oldatának koncentrációja, valamint a részecskék hatóanyag-tartalma, és a kapszulázási hatékonyság

A PLGA nanorészecskék hatóanyag-tartalma 0,8-3% közötti érték. A hatóanyag polaritásának változásával monoton tendencia nem figyelhető meg. A legnagyobb, 3%-os hatóanyag-tartalom a négy közül a leginkább hidrofób butil-parabénre adódott. Az ilyen módon kapszulázott és vízben diszpergált hatóanyag-koncentráció nem éri el a vízben való oldhatóságot, tehát ezeket a hatóanyagokat ilyen módon nem érdemes kapszulázni. Ezt az 1% körüli, nagyon csekély kapszulázási hatékonyság is alátámasztja. A minták PLGA tartalma a bevitt PLGA mennyiségéhez viszonyítva 85 és 105% közötti, ami arra utal, hogy a minták nem teljes kiszáradása tömegmérési pontatlanságot okozott.

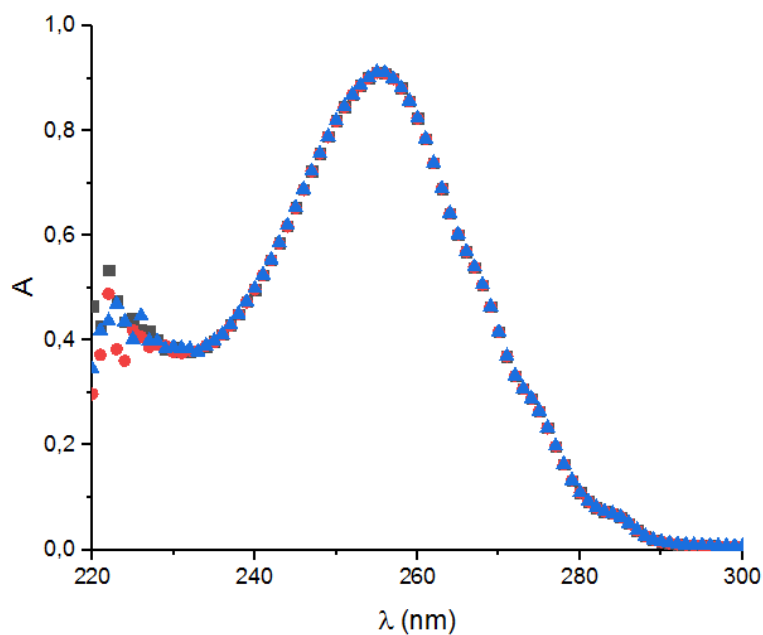
A heptil-4-hidroxibenzoátot tartalmazó polimer részecskék hatóanyag-tartalmának meghatározását is spektrofotometriás módszerrel végeztem.

A különböző mennyiségű heptil-4-hidroxibenzoát hozzáadásával készített, tisztított minták szárazanyag tartalmának meghatározásához egy-egy mintából 2-szer 2 ml-nyit szárítószekrényben 55°C-on tömegállandóságig szárítottam. Az így kapott szárazanyagokat a 9. táblázatban tüntettem fel.

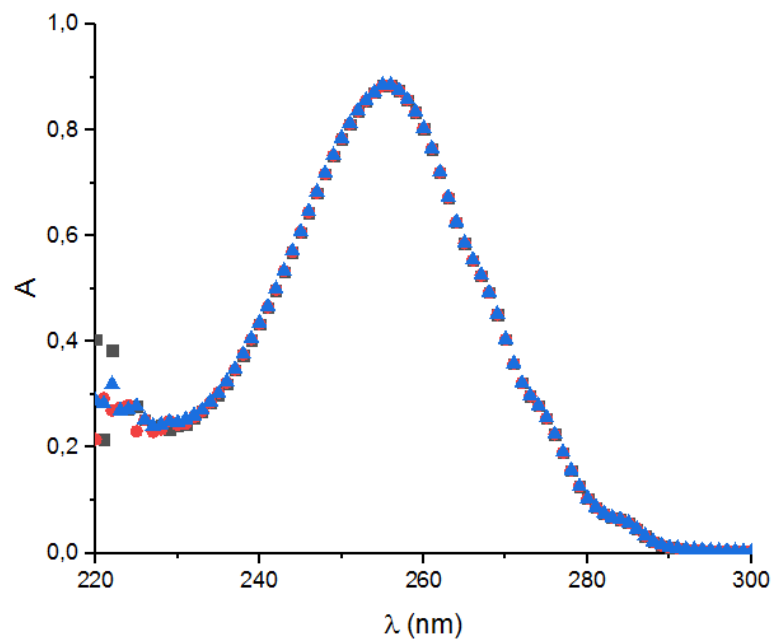
hozzáadott hatóanyag mennyisége (mg)	tömeg (mg)	tömeg átlaga (mg)
1	1,56	1,56 ± 0,01
	1,55	
3	1,72	1,71 ± 0,01
	1,70	
5	1,83	1,82 ± 0,01
	1,81	

9. táblázat: 1, 3 és 5 mg heptil-parabén hozzáadásával előállított minták szárazanyaga

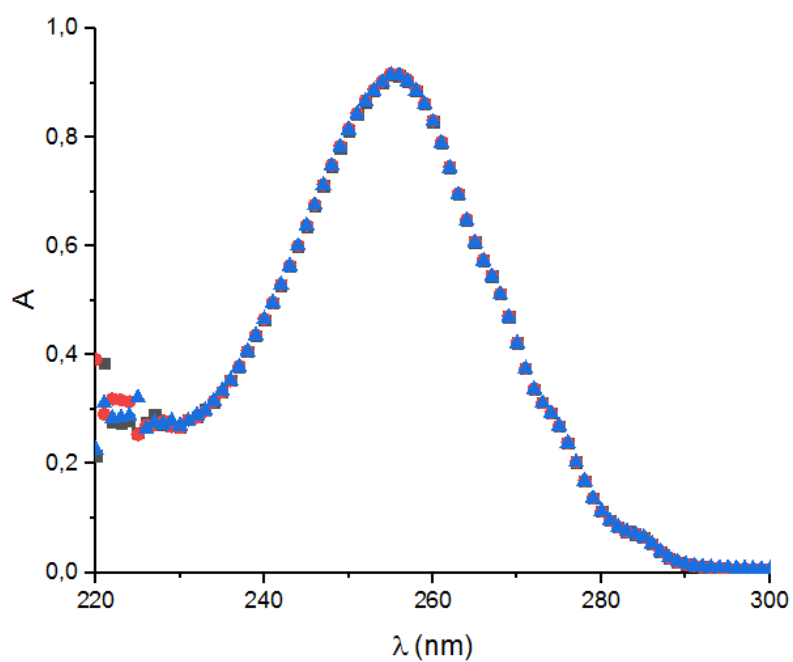
A kiszárított mintákat 2 ml THF-ben oldottam fel, majd megmértem abszorbanciájukat és a kalibrációs egyenes segítségével meghatároztam az egyes minták koncentrációját. A mért spektrumok a 16.-18. ábrákon láthatók, továbbá a 10. táblázat tartalmazza az egyes mintákra számolt koncentrációkat, hatóanyag-tartalmakat és a kapszulázási hatékonyságot.



16. ábra: 1 mg heptil-4-hidroxibenzoát hozzáadásával előállított PLGA THF-es oldatának spektruma (kétszeres hígítás mellett)



17. ábra: 3 mg heptil-4-hidroxibenzoát hozzáadásával előállított PLGA THF-es oldatának spektruma (négyeszeres hígítás mellett)



18. ábra: 5 mg heptil-4-hidroxibenzoát hozzáadásával előállított PLGA THF-es oldatának spektruma (hatszoros hígítás mellett)

bevitt heptil-parabén mennyisége (mg)	c ( $10^{-4}$ mol/l)	hatóanyag-tartalom (%)	kapszulázási hatékonyság (%)
1	$0,72 \pm 0,03$	$2,18 \pm 0,09$	$17,01 \pm 0,71$
3	$1,43 \pm 0,03$	$3,95 \pm 0,09$	$11,26 \pm 0,24$
5	$2,07 \pm 0,02$	$5,36 \pm 0,06$	$9,78 \pm 0,09$

*10. táblázat:* 1, 3 és 5 mg heptil-parabént tartalmazó PLGA THF-es oldatának koncentrációja, valamint a részecskék hatóanyag-tartalma, és a kapszulázási hatékonyság

A háromféle recept szerint előállított mintákon elvégzett mérési eredményeket összevetve megállapítható, hogy a hatóanyag mennyiségének növelésével a PLGA nanorészecskék hatóanyag-tartalma is nőtt.

A mért eredmények megerősítése céljából még egy mintasorozatot készítettem a különböző parabének felhasználásával. A metil-, etil-, propil-, és butil-4-hidroxibenzoát esetén használt recepten nem változtattam, tehát ezen modell hatóanyagokból 30 mg-ot oldottam 2 ml, 10 g/l koncentrációjú PLGA 50:50 THF-es oldatában, amelyet 20 ml, 1 g/l-es Pluronic F127 kétszer desztillált vizes oldatához csepegtettem. A különböző mennyiségű heptil-4-hidroxibenzoát hozzáadásával készült mintákra kapott eredmények alapján ebből a hatóanyagból 10 mg-ot oldottam 10 g/l-es, 2 ml-nyi PLGA 50:50 THF-es oldatában, amelyet szintén 20 ml, 1 g/l-es Pluronic F127 kétszer desztillált vizes oldatához csepegtettem.

Az így elkészített szuszpenziókat a szerves oldószer elpárologtatása után előcentrifugáltam 3000 rpm-en 10 percen keresztül. A centrifugálás után a nanorészecskéket tartalmazó felülúszót elválasztottam. A rendszerben lévő szárazanyag nyomon követése céljából a kiülepedett anyagot, amely kicsapódott hatóanyagot, illetve aggregálódott részecskéket tartalmazhat, kiszárítottam, tömegét megmértem. A különböző parabéneket tartalmazó minták esetén e tömeg értékek a *11. táblázatban* láthatók.

parabén	m ( mg )
metil	5,12
etil	13,12
propil	15,03
butil	14,09
heptil	6,18

*11. táblázat:* Metil-, etil-, propil-, butil- és heptil-parabén felhasználásával készített mintákban az előcentrifugálás utáni veszteség

A tisztított minták szárazanyag tartalmának meghatározásához egy-egy mintából 2-szer 2 ml-nyit szárítószekrényben 55°C-on tömegállandóságig szárítottam. Az így kapott szárazanyagokat a *12. táblázat* tartalmazza.

parabén	tömeg (mg)	tömeg átlaga (mg)
metil	1,77	1,75 ± 0,03
	1,72	
etil	1,86	1,83 ± 0,03
	1,80	
propil	1,78	1,79 ± 0,01
	1,79	
butil	1,18	1,21 ± 0,03
	1,24	
heptil	1,63	1,68 ± 0,05
	1,72	

*12. táblázat:* Különböző parabének hozzáadásával előállított minták szárazanyaga

A kiszárított mintákat 2 ml THF-ben oldottam fel, majd megmértem abszorbanciájukat és a kalibrációs egyenesek segítségével meghatároztam az egyes minták koncentrációját. A *13. táblázat* tartalmazza az egyes mintákra számolt koncentrációkat, hatóanyag-tartalmakat, illetve a kapszulázási hatékonyságot.

parabén	c ( $10^{-4}$ mol/l)	hatóanyag-tartalom (%)	kapszulázási hatékonyság (%)
metil	$1,89 \pm 0,06$	$3,29 \pm 0,12$	$1,92 \pm 0,06$
etil	$1,06 \pm 0,05$	$1,93 \pm 0,11$	$1,17 \pm 0,06$
propil	$0,68 \pm 0,03$	$1,37 \pm 0,06$	$0,82 \pm 0,04$
butil	$0,99 \pm 0,04$	$3,18 \pm 0,15$	$1,28 \pm 0,05$
heptil	$1,81 \pm 0,03$	$5,09 \pm 0,27$	$8,55 \pm 0,14$

13. táblázat: Különböző parabének hozzáadásával előállított PLGA THF-es oldatának koncentrációja, valamint a részecskék hatóanyag-tartalma, és a kapszulázási hatékonyság

A második mintasorozat jellegében ugyanazt mutatja, mint az első. Mindkét mintasorozat esetén a hatóanyag koncentrációjára és a hatóanyag-tartalomra kapott értékek az etil-4-hidroxibenzoát hozzáadásával készült polimer részecskékben kis mértékben csökkennek, majd a butil-4-hidroxibenzoátot tartalmazó mintától újra nőni kezdenek.

A második mintasorozatnál a PLGA 60-80%-ából képződött az adott mérettartományba eső nanorészecske. A metil-, etil-, és propil-parabént tartalmazó PLGA részecskék hatóanyag-tartalmára nagyobb értékeket kaptam, ez az eltérés valószínűleg abból ered, hogy az első sorozatnál a minták nedvességet szívhattak magukba.

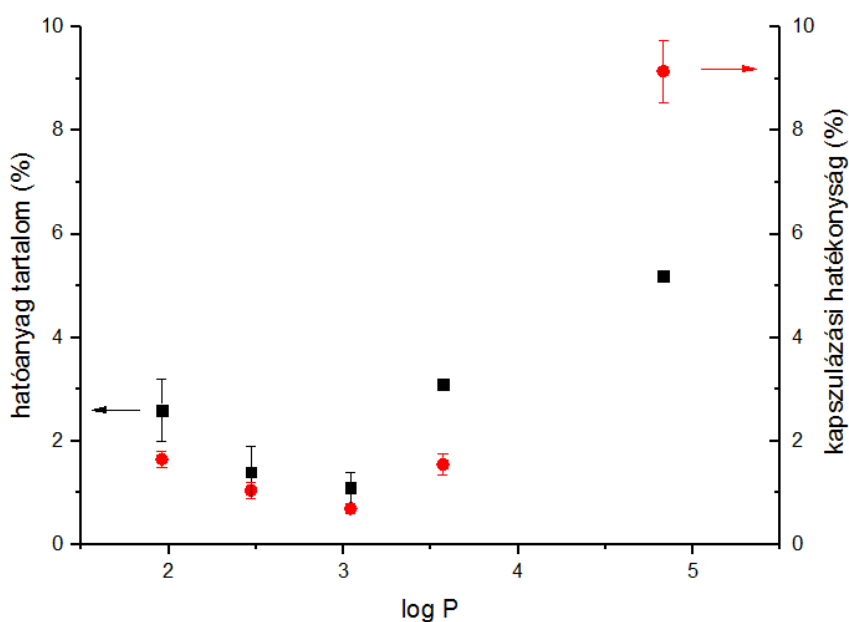
Az adott sorozatból a leginkább hidrofób heptil-parabént valóban érdemes is nanorészecskébe kapszulázni, mivel a vizes rendszerben diszpergált formában lévő hatóanyag-koncentráció az oldhatóságát jóval meghaladja, annak nagyjából 2,5-szeresének adódik.

A két mintasorozaton végzett mérések eredményei alapján az egyes parabének felhasználásával készített polimer nanorészecskék átlagos hatóanyag-tartalmát és kapszulázási hatékonyság értékeit a 14. táblázatban összesítettem. Továbbá az egyes

parabének logP értékeinek függvényében az átlagos hatóanyag-tartalmat és kapszulázási hatékonyságot a 19. ábrán ábrázoltam.

parabén	logP	hatóanyag-tartalom (%)	kapszulázási hatékonyság (%)
metil	1,96	2,63 ± 0,67	1,69 ± 0,31
etil	2,47	1,39 ± 0,54	1,06 ± 0,12
propil	3,04	1,08 ± 0,30	0,69 ± 0,13
butil	3,57	3,07 ± 0,11	1,53 ± 0,25
heptil	4,83	5,23 ± 0,14	9,17 ± 0,62

14. táblázat: Az egyes parabének logP értékei, illetve a két mintasorozat alapján mért átlagos hatóanyag-tartalom és kapszulázási hatékonyság értékek



19. ábra: Az egyes parabének felhasználásával készített polimer nanorészecskék átlagos hatóanyag-tartalma (fekete négyzet) és az átlagos kapszulázási hatékonyság (piros kör) a parabének logP értékének függvényében

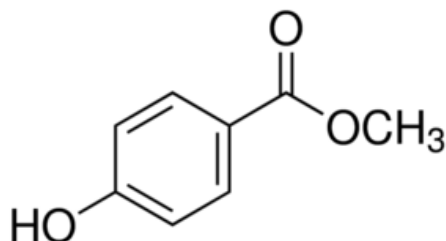
A két mintasorozaton végzett mérések eredményei szerint mind az öt modell hatóanyag kapszulázható PLGA nanorészecskékbe. A polimer részecskék hatóanyag-tartalma ezen polimer és a parabének esetén jellemzően 1-2%, míg a kapszulázási hatékonyság 2% alatti érték. Ettől lényegesen eltérő kapszulázhatóságot a hatóanyag sorozatban a legnagyobb hidrofobitású heptil-parabén esetére kaptam. A hatóanyag-

tartalom 5% feletti, míg az ehhez tartozó kapszulázási hatékonyság is nagymértékben növekedett, közelíti a 10%-ot. Más mértékű hatóanyag-bevitelt alkalmazva a kapszulázhatósági hatékonyság tovább növelhető (10. táblázat).

### 5.3. Oldhatósági paraméterek számítása

Az, hogy milyen hatékonysággal sikerül kapszulázni egy molekulát, feltehetően kapcsolatban van a polimer és a molekula kölcsönhatásával, ezért a hatóanyagok és a polimer hordozó kompatibilitásának értelmezéséhez számításokat is végeztem. Háromféle számolási módszer szerint határoztam meg a kísérletek során használt anyagok oldhatósági paramétereit. Ezek a Fedors-, van Krevelen-, és Hansen-Beerbower módszerek voltak.

A Fedors-féle számolási módszerrel a parciális oldhatósági paraméterek nem határozhatók meg, az egyes molekularészletekhez tartozó  $\Delta U$  belső energia értékek adottak, illetve a molekularészletek moláris térfogata [22]. Ezek alapján a metil-4-hidroxibenzoátra az oldhatósági paraméter a következőképpen számolható:



20. ábra: A metil-4-hidroxibenzoát szerkezeti képlete

$$\delta_{Fedors} = \left( \frac{\sum \Delta U}{\sum V} \right)^{1/2} = \left( \frac{84410}{113,9} \right)^{1/2} = 27,22 \text{ MPa}^{1/2}$$

A van Krevelen-féle számolási módszerrel a parciális oldhatósági paraméterek is kiszámolhatók, adottak a diszperziós ( $F_d$ ), a dipól-dipól kölcsönhatásból származó ( $F_p^2$ ) és a hidrogénkötésekből eredő ( $F_h$ ) erők is [22]. Ezek alapján pedig az oldhatósági paraméter is kiszámolható. Metil-4-hidroxibenzoátra tehát az alábbi módon számolhatók a teljes és a parciális oldhatósági paraméterek [24].

$$\delta_{van\ Krevelen} = (\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2)^{1/2}$$



$$\delta_d = \left( \frac{\sum F_d}{\sum V} \right) = \left( \frac{2290}{113,9} \right) = 20,11 \text{ MPa}^{1/2}$$

$$\delta_p = \left( \frac{(\sum F_p^2)^{1/2}}{\sum V} \right) = \frac{708,66}{113,9} = 6,22 \text{ MPa}^{1/2}$$

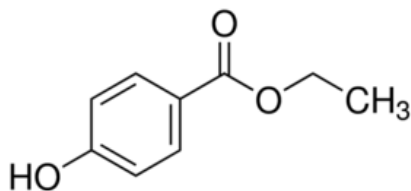
$$\delta_h = \left( \frac{\sum F_h}{\sum V} \right)^{1/2} = \left( \frac{237,05}{113,9} \right)^{1/2} = 1,44 \text{ MPa}^{1/2}$$

$$\delta_{\text{van Krevelen}} = 21,10 \text{ MPa}^{1/2}$$

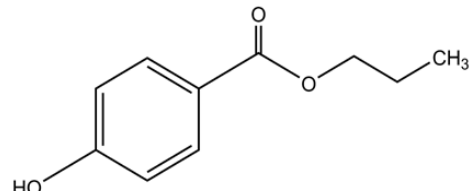
A Hansen-Beerbower-módszer alkalmazásával is számolhatóak parciális oldhatósági paraméterek, ám az ehhez szükséges értékek nem minden molekularészlet esetén adottak [21]. Így a metil-4-hidroxibenzoátra csak a teljes oldhatósági paramétert tudtam számolni az alábbiak szerint.

$$\delta_{\text{Hansen\&Beerbower}} = \sqrt{\frac{\sum \Delta V \delta^2}{\sum \Delta V}} = 12,32 \text{ cal/mol}^{1/2} = 25,20 \text{ MPa}^{1/2}$$

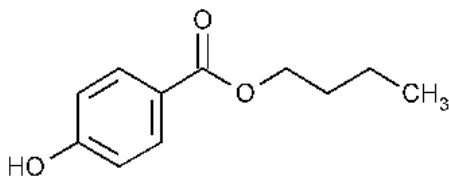
Az előbbi képletek alapján a többi PHBA-észterre is kiszámolhatóak az oldhatósági paraméterek. A 21.-24. ábrákon az etil-, propil-, butil-, és heptil-parabének szerkezeti képlete látható, a számolások eredményeit pedig a 15. táblázatban foglaltam össze.



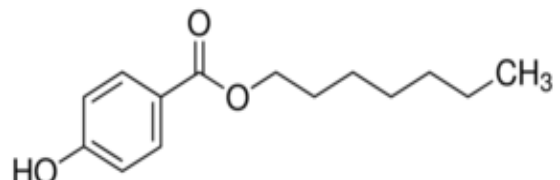
21. ábra: Etil-parabén szerkezeti képlete



22. ábra: Propil-parabén szerkezeti képlete



23. ábra: Butil-parabén szerkezeti képlete

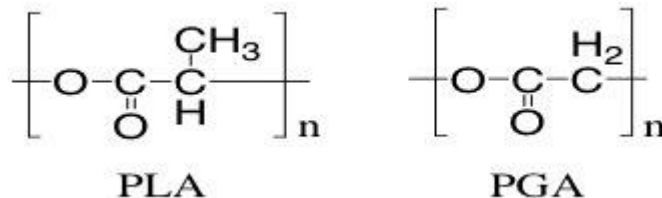


24. ábra: Heptil-parabén szerkezeti képlete

parabén	$\delta_{\text{Fedors}}$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_d$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_p$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_h$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_{\text{vanKrevelen}}$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_{\text{H\&B}}$ (MPa <sup>1/2</sup> )
metil	27,22	20,11	6,22	1,44	21,10	25,20
etil	26,22	19,69	5,45	1,35	20,47	24,49
propil	25,40	19,37	4,85	1,27	20,01	23,90
butil	24,73	19,11	4,37	1,21	19,64	23,40
heptil	23,28	18,57	3,37	1,06	18,90	22,29

15. táblázat: A parabénekre számolt oldhatósági paraméterek a Fedors-módszer szerint, a parciális oldhatósági paraméterek és a teljes oldhatósági paraméter a van Krevelen-féle módszer és a teljes oldhatósági paraméter a Hansen-Beerbower-féle számolási mód szerint

A fent említett számolások polimerekre is elvégezhetőek. Kiszámoltam a PLA-ra és a PGA-ra (szerkezeti képletük a 25. ábrán látható) vonatkozó oldhatósági paramétereket, ez alapján a kopolimer oldhatósági paramétere is megadható.



25. ábra: PLA és PGA szerkezeti képlete

Az általam használt PLGA50:50 kopolimer nem blokk-kopolimer, így a kopolimerre számolt oldhatósági paraméterek a PLA-ra és PGA-ra kapott értékek átlagaként adható meg.

A Fedors-, és Hansen-Beerbower-módszer szerinti teljes oldhatósági paramétereket, illetve a van Krevelen-módszer szerint számolt parciális oldhatósági paraméter értékeket, illetve a teljes oldhatósági paramétert a 16. táblázat tartalmazza a PLA-ra és PGA-ra, illetve a teljes oldhatósági paramétert a PLGA 50:50 kopolimerre.

A molekulák felépítéséből adódó fokozatos polaritásváltozás jól tükröződik a számított oldhatósági paraméter értékekben mindhárom módszer esetén. Ugyanakkor egy-egy molekulára a számítás módjától függően több egységnyi eltérés is adódott. A

PLGA kopolimerre a három módszerrel kapott oldhatósági paraméter értékek közel azonosak.

	$\delta_{Fedors}$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\delta_d$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\delta_p$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\delta_h$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\delta_{vanKrevelen}$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\delta_{H\&B}$ ( $MPa^{1/2}$ )
PLA	22,75	17,62	9,70	11,77	23,30	22,75
PGA	25,94	19,35	14,37	14,33	28,04	25,93
PLGA 50:50	24,35	-	-	-	25,67	24,34

16. táblázat: PLA-ra, PGA-ra, illetve PLGA50:50-re számolt oldhatósági paraméterek a Fedors-módszer szerint, a parciális oldhatósági paraméterek és a teljes oldhatósági paraméter a van Krevelen-féle módszer és a teljes oldhatósági paraméter a Hansen-Beerbower-féle számolási mód szerint

Az oldhatósági paraméterek ismeretében megbecsülhető, hogy a parabének elegyednek-e a PLGA50:50 kopolimerrel. Az elegyedés feltétele a Greenhalgh-féle, tapasztalatok alapján megadott közelítés szerint [22]:

$$\Delta\delta_t = |\delta_{t2} - \delta_{t1}|$$

$$\Delta\delta_t < 7 \text{ MPa}^{1/2}$$

E szerint a feltétel szerint, ha a két vizsgált anyag oldhatósági paramétereinek különbsége kisebb, mint  $7 \text{ MPa}^{1/2}$ , elegyednek egymással, továbbá ha nagyobb, mint  $10 \text{ MPa}^{1/2}$ , biztosan nem fognak elegyedni egymással. A köztük lévő tartományban bizonyos anyagok elegyednek, míg mások nem elegyednek egymással [21].

Ezen számolások után a különböző módszerek szerint meghatározott, parabénekre vonatkozó és a PLGA50:50 kopolimerre számolt oldhatósági paramétereket a Greenhalgh-feltétel szerint hasonlítottam össze, a számolások eredményét a 17. táblázatban foglaltam össze.

parabén	$\Delta\delta_t \text{ Fedors}$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\Delta\delta_t \text{ van Krevelen}$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\Delta\delta_t \text{ H\&B}$ ( $MPa^{1/2}$ )
metil	2,87	4,57	0,86
etil	1,87	5,20	0,15
propil	1,05	5,66	0,44
butil	0,38	6,03	0,94
heptil	1,07	6,77	2,05

17. táblázat: Az egyes parabének különböző módon számolt oldhatósági paramétereinek összehasonlítása a PLGA50:50 kopolimer háromféle módszer szerint számolt oldhatósági paraméterével

Polimerek oldhatósági paramétere kísérletileg, viszkozitás méréssel is meghatározható. Ehhez a polimert tiszta oldószerben, vagy oldószerek keverékében kell duzzasztani, majd a kapott oldat viszkozitását megmérni. A polimer legjobb oldószerében mérhető a legnagyobb viszkozitás, ilyenkor a polimer és az adott tiszta oldószer, vagy oldószerkeverék oldhatósági paramétere megegyezőnek tekinthető. Madsen és munkatársai által PLGA 50:50-re mért oldhatósági paraméter:  $\delta=20,43 MPa^{1/2}$  [23].

A hatóanyagokra számolt oldhatósági paramétereket összehasonlítottam a PLGA50:50 mért oldhatósági paraméterével az előbbi feltétel szerint. Az eredményeket a 18. táblázat tartalmazza.

parabén	$\Delta\delta_t \text{ Fedors}$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\Delta\delta_t \text{ van Krevelen}$ ( $MPa^{1/2}$ )	$\Delta\delta_t \text{ H\&B}$ ( $MPa^{1/2}$ )
metil	6,79	0,67	4,77
etil	5,79	0,04	4,06
propil	4,97	0,42	3,47
butil	4,30	0,79	2,97
heptil	2,85	1,53	1,86

18. táblázat: A PLGA50:50-re mért és a parabénekre számolt oldhatósági paraméterek összehasonlítása a Greenhalgh-féle közelítés szerint

A három módszer szerint számolt oldhatósági paramétereket és a polimer mérésrel meghatározott oldhatósági paraméterét összehasonlítva megállapítható, hogy a polimer valamennyi hatóanyaggal párosítva eleget tesz az elegyedésre vonatkozó Greenhalgh-feltételnek.

Ugyanakkor a PLGA számolással kapott oldhatósági paramétereinek és a mérésrel meghatározott érték között jelentős különbség figyelhető meg. Az oldhatósági paraméter viszkozitásméréssel történő meghatározása során nem lehetünk biztosak benne, hogy megtaláljuk a polimer legjobb olószert, így ezzel a módszerrel alábecsüljük azt.

Bár a különböző eljárások szerint számolt oldhatósági paraméterek különbségei egymástól eltérőek, mindhárom számolási eljárással kapott eredmények eleget tesznek a Greenhalgh-feltételnek. A számolási eredmények alapján tehát megállapítható, hogy a PLGA50:50 kopolimer alkalmazható különböző parabének kapszulázására, ahogy ezt a kísérleti eredmények is igazolták.

Anyagok elegyíthetőségét a szabadentalpia-változás előjele, illetve nagysága határozza meg, amelyről a Greenhalgh-feltétel nem állít semmit. Az elegyedés szükséges feltétele, hogy az elegy szabadentalpiája kisebb legyen a komponensek szabadentalpiájánál. A szabadentalpia-változás ( $\Delta G_m$ ) az elegyítési entalpia ( $\Delta H_m$ ) és entrópia ( $\Delta S_m$ ) változásából származik.

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

A polimer oldatok, illetve keverékek termodinamikai jellemzése Flory és Huggins nevéhez fűződik. Az úgynevezett Flory-Huggins-egyenlet szerint polimer elegyek esetén a szabadentalpia-változás az alábbi összefüggés szerint írható le [25].

$$\frac{\Delta G_m}{kT} = \frac{\varphi_1}{N_1} \ln \varphi_1 + \frac{\varphi_2}{N_2} \ln \varphi_2 + \chi \varphi_1 \varphi_2$$

A képletben szereplő mennyiségek közül  $\Delta G_m$  az elegyedési szabadentalpia-változás,  $k$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet,  $\varphi_1$  az egyik komponens,  $\varphi_2$  a másik komponens térfogati törtje,  $N_1$  pedig az egyik komponens polimerizációs foka, míg  $N_2$  a másik komponensé. Az egyenletben szereplő  $\chi$  paraméter az úgynevezett Flory-Huggins paraméter, mely az oldhatósági paraméterek segítségével fejezhető ki az alábbi módon [25].

$$\chi = \frac{V}{RT} (\delta_1 - \delta_2)^2$$

A képletben szereplő  $V$  az átlagos monomeregység-térfogat,  $R$  az egyetemes gázállandó,  $T$  pedig a hőmérséklet. Mivel az átlagos monomeregység-térfogat meghatározása nehézkes, megállapodás szerint  $100 \text{ cm}^3/\text{mol}$ , így  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on az összefüggés az alábbiak szerint módosul [25].

$$\chi = \frac{(\delta_1 - \delta_2)^2}{24,8}$$

Az alkalmazott polimerre és az egyes hatóanyagokra vonatkozó Flory-Huggins paramétereket a 19. táblázatban foglaltam össze.

parabén	$\chi_{Fedors}$	$\chi_{van Krevelen}$	$\chi_{H\&B}$
metil	0,33	0,84	0,03
etil	0,14	1,09	0,01
propil	0,04	1,29	0,01
butil	0,01	1,47	0,04
heptil	0,05	1,85	0,17

19. táblázat: A háromféle számolási módszer szerint meghatározott, PLGA-ra, illetve hatóanyagokra vonatkozó oldhatósági paraméterek alapján számolt Flory-Huggins paraméterek

Ezen összefüggések felhasználásával a  $\Delta G_m$  elegyedési szabadentalpia-változás kiszámítható. Ennek meghatározását a második mintasorozat eredményei alapján végeztem,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten. Az így becsült szabadentalpia-változás értékeket a 20. táblázatban összegeztem.

parabén	$\Delta G_m \text{ Fedors}$ ( $10^{-22}J$ )	$\Delta G_m \text{ van Krevelen}$ ( $10^{-22}J$ )	$\Delta G_m \text{ H\&B}$ ( $10^{-22}J$ )
metil	-4,76	-3,72	-4,92
etil	-2,91	-2,19	-3,01
propil	-2,98	-2,04	-3,01
butil	-4,04	-2,40	-4,01
heptil	-5,68	-2,39	-5,46

20. táblázat: A PLGA50:50-re és a parabénekre számolt elegyedési szabadentalpia-változás ( $\Delta G_m$ )

A háromféle számolási eljárás szerint meghatározott Flory-Huggins paraméterek felhasználásával számolt elegyedési szabadentalpia-változás értékek minden esetben negatívak. Ezen eredmények szerint a PLGA50:50 kopolimer és a parabének elegyedése termodinamikailag kedvező folyamat.

A korlátlan elegyedés szükséges feltétele a Flory-Huggins paraméter segítségével is megfogalmazható. Ha a Flory-Huggins paraméter ( $\chi$ ) kisebb a polimerelegy szételegyedésének kritikus pontjánál ( $\chi_{kr}$ ), melyet a komponensek polimerizációs foka határoz meg, akkor a két komponens a teljes koncentrációtartományban korlátlanul elegyedik egymással [25].

$$\chi_{kr} = \frac{1}{2} (N_1^{-1/2} + N_2^{-1/2})^2$$

A PLGA50:50 és az alkalmazott hatóanyagok esetén ez az érték:

$$\chi_{kr} = \frac{1}{2} (1^{-1/2} + 692,23^{-1/2})^2 = 0,54$$

A Fedors-, és a Hansen-Beerbower-módszer szerint számolt Flory-Huggins-paraméterek minden esetben kisebbek a kritikus értéknél, tehát ezen számolásokkal kapott eredmények szerint mind az öt hatóanyag korlátlanul elegyíthető PLGA50:50 kopolimerrel, a van Krevelen-féle eljárás viszont eltérő eredményt adott.

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy a parabének és a PLGA elegyíthetőségére vonatkozó számításaim szerint a polimerrel való kölcsönhatás kedvező, elegyíthetőek a komponensek, és ebben nagy eltérés az öt különböző parabént tekintve nincs. Az

oldhatósági paraméterrel kifejezett polaritás és ennek viszonya a PLGA polaritásához nem magyarázza a heptil-parabén kiemelkedően jó kapszulázhatóságát.

A csoportjárulék módszerek alkalmazásával megbecsülhetjük, hogy két anyag elegyíthető-e egymással, ám a különböző módszerek máshogy adják meg az oldhatósági paraméterek számolásához szükséges adatokat. Ez okozhatja, hogy más-más számolási eljárások alkalmazásával kapott oldhatósági paraméterek kissé eltérnek egymástól.



## 6. Összefoglaló

### Polimer alapú gyógyszerhordozó nanoszerkezetek előállítása és jellemzése

Tóth Tünde, anyagtudomány mesterszakos hallgató

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Kémiai Intézet, Fizikai Kémiai Tanszék

Témavezetők: **Dr. Kiss Éva**, egyetemi tanár  
Fizikai Kémiai Tanszék

Diplomamunkám során nanoprecipitációval állítottam elő polimer nanorészecskéket PLGA50:50 kopolimer felhasználásával. A részecskébe modell hatóanyagként parabéneket kapszuláztam. A választott hatóanyag sorozatban kis mértékben változik a polaritás, miközben a szerkezet meghatározó része változatlan marad. A parabének családja ideális modellsorozat annak tanulmányozására, hogyan függ a kapszulázhatóság a hatóanyag molekula polaritásától.

Az így előállított polimer nanorészecskéket centrifugálással tisztítottam. A hatóanyagot tartalmazó részecskék átlagos méretét, illetve polidiszperzitását DLS-sel határoztam meg. A polimer nanorészecskék hatóanyag-tartalmát és a kapszulázási hatékonyságot spektrofotometriás mérések segítségével határoztam meg.

A kísérleti eredmények értelmezésére az egyes parabének, illetve a PLGA50:50 kopolimer oldhatósági paramétereit is kiszámoltam, melyeket az elegyítésre vonatkozó Greenhalgh-feltétel szerint hasonlítottam össze. A számolások szerint kapott eredmények megfelelnek az elegyítésre vonatkozó, tapasztalatokon alapuló feltételnek. Ezen megfontolások alapján annyi állapítható meg, hogy a parabének elegyednek a választott polimerrel, tehát kapszulázhatók is. A feltétel viszont a keveredési szabadentalpia-változásról nem ad információt.

A mérési eredmények szerint is mind az öt modellhatóanyag kapszulázható PLGA nanorészecskébe. A polimer részecskék hatóanyag-tartalma ezen polimer és hatóanyag párosítások esetén 1-5% között változik. A legjobb hatóanyag-tartalom értékeket a leginkább hidrofób heptil-parabénre kaptam.

A kapszulázási hatékonyság csekély, ami azt jelenti, hogy az általam használt polimer és az ötféle parabén párosításával csak nagy veszteség mellett kapszulázható a hatóanyag, amely összefüggésben van a parabének viszonylag nagy vízdoldhatóságával. A heptil-parabén esetén viszont ugrásszerűen javul a kapszulázási hatékonyság, amely a 10%-os is eléri.

A kísérleti tapasztalatok alapján az ezzel a módszerrel előállított gyógyszerhordozó rendszerek hatékonyak lehetnek olyan betegségek kezelésében, melyeknél kis mennyiségű hatóanyag is elegendő, viszont azt célzottan kell a szervezetbe juttatni, például a rákos megbetegedések gyógyításában.

## 7. Summary

### **Preparation and characterization of polymer based drug delivery nanoparticles**

**Tünde Tóth**, MSc student in Material Science

Department of Physical Chemistry, Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University,  
Budapest

Supervisor: **Éva Kiss**, professor  
Department of Physical Chemistry

During my thesis work I prepared PLGA based drug loaded particles using the nanoprecipitation method. Parabens were chosen as model drugs, because the polarity of the molecules changes slightly while the main part of the structure stays the same. Due to this property, parabens can be used to examine the connection between encapsulation and the polarity of the drug molecule.

Centrifugation with optimized parameters was used for purification of the sol. Size and size distribution of the prepared PLGA particles were characterized by dynamic light scattering. Drug content of the nanoparticles was determined by UV-VIS spectroscopy.

In order to interpret the experimental results, I calculated the solubility parameters of the parabens and the PLGA copolymer. Greenhalgh's approach was used to estimate the miscibility between the parabens and the polymer. According to the results it can be stated that the parabens and PLGA50 can be mixed, although this approach does not give any information about the change in free enthalpy.

According to my results the drug content of the prepared polymer nanoparticles was between 1-5%. The highest drug content was measured during the encapsulation of heptylparaben, the most hydrophobic molecule applied.

Parabens can be encapsulated in PLGA50 with significant loss, which is related to the high water solubility of the paraben molecules. But when I used heptylparaben, the encapsulation efficiency increased greatly, it even reached 10%.

Using nanoprecipitation method, nanoparticles with narrow size distribution can be prepared, but a lot of parameters can influence the properties of the particles. Therefore several research groups try to investigate the effects of these parameters in order to prepare the required system.

Drug delivery systems prepared by this method can be effective for example in cancer treatment, when even a small amount of the drug, targeted to specific parts of the body, is satisfactory.

## 8. Irodalomjegyzék

- [1] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.-J. Feeny, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23 3-25 (1997)
- [2] Kiss É., Gyógyszerhordozó nanorészecskék, *Fizikai Szemle*, 12, 413-417 (2011)
- [3] J. P. Rao, K. E. Geckeler, Polymer nanoparticles, Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36 887–913 (2011)
- [4] N. Al-Khoury Fallouh, L. Roblot-Treupel, H. Fessi, J.P. Devissaguet, F. Puisieux, Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules, *International Journal of Pharmaceutics*, 28 125-132 (1986)
- [5] S.S. Guterrez, H. Fessi, G. Barratt, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study, *International Journal of Pharmaceutics*, 113 57-63 (1995)
- [6] K. Miladi, S. Sfar, H. Fessi, A. Elaissari, Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies, *Industrial Crops and Products*, 72 24–33 (2015)
- [7] É. Kiss, G. Gyulai, Cs. B. Péntzes, M. Idei, K. Horváti, B. Bacsa, Sz. Bősze, Tuneable surface modification of PLGA nanoparticles carrying new antitubercular drug candidate, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering. Aspects*, 458 178–186 (2014)
- [8] G. Gyulai, Cs.B. Péntzes, M. Mohai, F. Csempeš, E. Kiss, Influence of surface properties of polymeric nanoparticles on their membrane affinity, *European Polymer Journal*, 49 2495–2503 (2013)
- [9] G. Gyulai, A. Magyar, J. Rohonczy, J. Orosz, M. Yamasaki, Sz. Bősze, É. Kiss, Preparation and characterization of cationic Pluronic for surface modification and functionalization of polymeric drug delivery nanoparticles, *Express Polymer Letters*, 10 3, 216–226 (2016)
- [10] H. Fessi, F. Puisieux, J.Ph. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *International Journal of Pharmaceutics*, 55 R1-R4, (1989)

- [11] E. Lepeltier, C. Bourgaux, H. Amenitsch, V. Rosilio, S. Lepetre-Mouelhi, F. Zouhiri, D. Desmaële, P. Couvreur, Influence of the nanoprecipitation conditions on the supramolecular structure of squalenoyled nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 96 89–95 (2015)
- [12] C. Bindschadler, R. Gurney, E. Doelker, Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof, *United States Patent*, 4,968,350 (1990).
- [13] F.S.T. Mirakabad, K. Nejati-Koshki, A. Akbarzadeh, M.R. Yamchi, M. Milani, N. Zarghami, V. Zeighamian, A. Rahimzadeh, S. Alimohammadi, Y. Hanifehpour, S.W. Joo, PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 2, 517-535 (2014)
- [14] S. Abbas, H. Greige-Gerges, N. Karam, M.H. Piet, P. Netter and J. Magdalou, Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 25, 6, 568–577 (2010)
- [15] M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock, Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens), *Food and Chemical Toxicology*, 43 985–1015 (2005)
- [16] M.G. Sonia, S.L. Taylor, N.A. Greenberg, G.A. Burdock, Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature, *Food and Chemical Toxicology*, 40 1335–1373 (2002)
- [17] M.G. Sonia, G.A. Burdock, S.L. Taylor, N. A. Greenberg, Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature, *Food and Chemical Toxicology*, 39, 6, 513-32. (2001)
- [18] [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com), kémiai adatbázis
- [19] [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), kémiai adatbázis
- [20] É. Kiss, D. Schnöller, K. Pribranská, K. Hill, Cs.B. Péntes, K. Horváti, and Sz. Bősze, Nanoencapsulation of Antitubercular Drug Isoniazid and Its Lipopeptide Conjugate, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32 1728–1734 (2011)
- [21] C. M. Hansen, Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, Second Edition, CRC Press (2007)

- [22] T. Kitak, A. Dumicic, O. Planinšek, R. Šibanc, S. Srcic, Determination of Solubility Parameters of Ibuprofen and Ibuprofen Lysinate, *Molecules*, 20, 21549–21568 (2015)
- [23] C.G. Madsen, A. Skov, L. Jørgensen, S. Baldursdottír, N.J. Medlicott, Effect of Mixed Solvents on Polymer Conformation – Correlation between the Hildebrand/Hansen Solubility Parameters and the Intrinsic Viscosity of Polymer Solutions, *Annual Transactions of the Nordic Rheology Society*, 21, (2013)
- [24] J. Breitzkreutz, Prediction of Intestinal Drug Absorption Properties by Three Dimensional Solubility Parameters, *Pharmaceutical Research*, 15, 9 (1998)
- [25] Halász László, Zrínyi Miklós, Bevezetés a polimerfizikába, Műszaki Könyvkiadó (1989)