

# DOKTORI PhD ÉRTEKEZÉS

Fodorné Kardos Andrea

Pannon Egyetem

2023

Édesapámnak

Pannon Egyetem

Vegyésmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola

Anyagtudományok és technológiák tudományág

## DOKTORI PhD ÉRTEKEZÉS

Funkcionális mikro- és nanorészecskék létrehozása szférikus  
agglomerációval és emulziós módszerrel

Készítette: Fodorné Kardos Andrea

DOI:10.18136/PE.2024.872

Témavezető: Dr. Feczko Tivadar

tudományos főmunkatárs

Veszprém

2023

**Funkcionális mikro- és nanorészecskék létrehozása szférikus agglomerációval és emulziós módszerrel**

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskolája keretében

Anyagtudományok és technológiák tudományágban

Írta: Fodorné Kardos Andrea

Témavezető/i: Dr. Feczko Tivadar

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

Dr. Feczko Tivadar  
(témavezető/k)

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve ..... igen /nem

.....

(bíráló)

Bíráló neve ..... igen /nem

.....

(bíráló)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján ..... %-ot ért el.

Veszprém,

.....

(a Bíráló Bizottság elnöke)

A doktori (PhD) oklevél minősítése .....

Veszprém,

.....

(az EDHT elnöke)

## Tartalomjegyzék

<b>1 Bevezetés</b> .....	<b>2</b>
<b>2 Irodalmi áttekintés</b> .....	<b>3</b>
2.1 Szemcseképzés a hatékonyság növelése céljából.....	3
2.2 A fázisváltó hőtároló anyagok (PCM-ek) rövid bemutatása .....	4
2.3 Mikrokapszulázási módszerek .....	5
2.4 Szemcseképzés szférikus agglomerációval .....	7
2.4.1 Oldószerrendszerek kialakítása .....	9
2.4.2 Hídfolyadék megválasztása.....	9
2.4.3 Mechanizmusok .....	10
2.4.4 Szemcseméretet befolyásoló tényezők.....	16
2.5 Szemcseképzés emulziós módszerekkel .....	21
2.5.1 Emulziós oldószer-elpárologtatásos módszerek.....	21
2.5.2 Szemcseméretet befolyásoló paraméterek .....	24
2.5.3 Kapszulázási hatékonyságot befolyásoló paraméterek .....	27
2.5.4 Hexadekán tartalmú mikroszemcsék tulajdonságait befolyásoló előállítási paraméterek.....	33
2.6 Célkitűzések .....	34
<b>3 Felhasznált anyagok</b> .....	<b>35</b>
3.1 Szemcsék előállításának részletes leírása.....	36
3.1.1 A kitozán szemcsék előállítása.....	36
3.1.2 Timsó agglomerátumok preparálása .....	37
3.1.3 A n-hexadekán tartalmú etil-cellulóz mikrorészecskék előállítása ....	38
3.1.4 Az IFN-béta tartalmú nanoszemcsék előállítása .....	38
<b>4 Mérési módszerek</b> .....	<b>42</b>
4.1 Oldhatósági vizsgálatok .....	42
4.2 Szemcseméret-eloszlás meghatározása .....	42
4.3 Zeta-potenciál mérése .....	43
4.4 Morfológia, pásztázó elektronmikroszkóp.....	43
4.5 FTIR .....	44
4.6 Termogravimetriás mérések.....	44
4.7 Differenciális pásztázó kalorimetria.....	44
4.8 Röntgendiffrakciós mérések.....	44
4.9 Vezetőképességi mérések.....	45
4.10 Felületi feszültség mérések .....	45
4.11 A PLGA polimer utólagos felületmódosítása .....	46
4.12 Fehérjekoncentráció meghatározása .....	47
4.12.1 HSA koncentrációjának meghatározása Bradford módszerrel.....	47

4.12.2	A fehérje kapszulázási hatékonyság meghatározása micro BCA módszerrel .....	48
4.13	IFN-béta-tartalom meghatározása ELISA módszerrel .....	48
4.14	BSA és IFN-béta tartalmú részecskék in vitro leadási kinetikai vizsgálata .....	49
4.15	Sejt vizsgálatok .....	50
4.15.1	Fluoreszcens festékkel való jelzés .....	50
4.15.2	Májsejtek izolálása .....	51
4.15.3	Sejtek általi nanorészecske felvétel és citotoxicitás vizsgálatok.....	51
4.16	In vivo toxicitás vizsgálatok.....	52
<b>5</b>	<b>Eredmények és értékelésük.....</b>	<b>53</b>
5.1	HSA tartalmú kitozán-PSS polimer szemcsék előállítása.....	53
5.1.1	Az oldószerrendszer felépítése.....	53
5.1.2	Az agglomerátumok előállítása.....	58
5.1.3	Kísérletek etanol rossz oldószerrel.....	58
5.1.4	Kísérletek etanol-etilacetát rossz oldószer eleggyel.....	61
5.1.5	Morfológia, szemcseméret .....	63
5.1.6	Fehérjetartalom meghatározása.....	67
5.1.7	A PSS és a kitozán töltésarányának szerepe a szemcsképzésben....	69
5.1.8	Keverési sebesség és idő hatása .....	69
5.1.9	Mechanizmus felállítása.....	73
5.2	Timsó agglomerátumok előállítása .....	75
5.2.1	Az oldószerrendszer felépítése.....	76
5.2.2	Timsó agglomerátumok előállítása .....	77
5.2.3	Morfológia, szemcseméret analízis .....	85
5.2.4	A timsó agglomerálásakor előállított különböző minták előállítási körülményeinek összefoglalása.....	93
5.2.5	A timsó agglomerátumok jellemzése .....	94
5.3	Hexadekán tartalmú mikroszemcsék morfológiájának tanulmányozása	104
5.3.1	Mikrorészecskék előállítása egyszerű emulziós módszerrel.....	105
5.3.2	A határfelületi feszültség mérés eredményei .....	106
5.3.3	Szétterülési együtthatók meghatározása .....	110
5.3.4	A porozitás modellezése .....	113
5.4	IFN-béta tartalmú PLGA és PEG_PLGA nanorészecskék előállítása ....	127
5.4.1	Előállítási körülmények kidolgozása .....	127
5.4.2	A nanorészecskék előállítása BSA modell hatóanyagból .....	128
5.4.3	IFN-béta tartalmú nanorészecskék előállítása.....	134
<b>6</b>	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>147</b>
<b>7</b>	<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>149</b>
<b>Tézisek</b>	<b>.....</b>	<b>159</b>

<b>8 Melléklet .....</b>	<b>165</b>
8.1 PSS oldhatósága víz–etanol–etil-acetát oldószerhármásban.....	165
8.2 Kitozán-HSA_PSS szemcsék morfológiája .....	168
8.3 Kitozán-HSA-PSS szemcsék fehérje tartalmának meghatározása.....	170
8.4 Kitozán, HSA és PSS oldatok töltés mennyiségének meghatározása .....	171
8.4.1 Toluidinkékes titrálás .....	171
8.4.2 A PSS és a kitozán töltésarányának meghatározása.....	171
8.5 Tímó agglomerátumok DSC diagramjai.....	175
8.6 Felületenergia-görbék .....	178
8.6.1 További felületenergia-görbék PMAA emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezésére .....	178
8.6.2 További felületenergia-görbék PVA emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezésére.....	179
8.6.3 További felületenergia-görbék Tween 80 emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezésére .....	180

## Kivonat

A szemcséképzési módszerek közül mind a gyógyszerhatóanyagok, mind a fázisváltó hőtároló anyagok esetében megfelelő hatékonyságnövelést érhetünk el mikrokapszulázással.

Kidolgoztam egy új típusú szférikus agglomerációs módszert vízoldható hatóanyagra, amellyel humán szérum albumin mikrokapszulázását oldottam meg kitozán és nátrium-polisztirol-szulfonát polimerek kombinált kémiai és antiszolvens precipitációja révén.

Szférikus agglomerációval állítottam elő  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -ból fázisváltó hőtároló sóhidrát kapszulamagokat különböző oldószerrendszerekben. Szférikus agglomerációs mechanizmussal nem teljesen szférikus és kevésbé stabil, de 12 kristályvizes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ -ként azonosítható agglomerátumok állíthatók elő. Emulziós oldószer-diffúziós mechanizmussal stabilabb és szinte tökéletesen gömb alakú agglomerátumok alakulnak ki, azonban összetételüket tekintve a 12 kristályvizes timsón kívül további négy K- és/vagy Al-tartalmú só ( $\text{Al}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O})$ , vízmentes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  és vízmentes  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) tartalmaznak.

Hexadekán fázisváltó hőtároló anyag tömbfázisából mikrokapszulázással nagy hőátadó felülettel rendelkező, több területen is alkalmazható szemcsézett anyag készült. Vizsgálataim megmutatták, hogy a folyamat során kialakuló felületi feszültség-viszonyok határozzák meg mind a nem egyensúlyi morfológiát, mind a kialakuló héj szerkezet porozitásának mértékét.

Emulziós oldószer-elpárologtatásos módszerrel összetett emulzióban poli(tejsav-glikolsav) és poli(tejsav-glikolsav)-polietilén-glikol biokompatibilis hordozóanyagokkal interferon-béta tartalmú nanorészecskéket állítottam elő injekciós alkalmazáshoz. Kidolgoztam a megfelelő szemcseméret (160–170 nm) és kapszulázási hatékonyság (80–90%) eléréséhez szükséges emulzió összetételeket és előállítási paramétereiket.



## Abstract

Among the particle formation methods, both for drugs and for phase change materials, the microencapsulation can provide a suitable improvement of efficiency. I have developed a new type of spherical agglomeration method for water-soluble drug by solving the microencapsulation of human serum albumin by combined chemical and antisolvent precipitation of chitosan and sodium polystyrene sulfonate polymers.

Spherical agglomeration of  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  was used to prepare phase change heat storage salt hydrate capsule cores in different solvent systems. Spherical agglomeration mechanism can produce agglomerates that are not fully spherical and less stable, but can be identified as  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . More stable and almost perfectly spherical agglomerates are obtained by the emulsion solvent diffusion mechanism, but regarding their composition they contain four additional K and Al salts, namely  $\text{Al}(\text{SO}_2)(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O})$ , anhydrous  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  and anhydrous  $\text{K}_2\text{SO}_4$  salts in addition to the potash alum.

A microencapsulated granular material with a high heat transfer area has been produced from bulk phase of a hexadecane phase change material. My investigations have shown that the surface tension relations that develop during the process determine both the formation of the non-equilibrium morphology and the degree of porosity of the resulting shell structure.

Using an emulsion solvent evaporation method, I prepared interferon-beta containing nanoparticles in a double emulsion with biocompatible poly(lactic acid-glycolic acid) and poly(lactic acid-glycolic acid)-polyethylene glycol copolymer carriers for injectable application. Emulsion compositions and processing parameters were developed to achieve the required particle size (160–170 nm) and encapsulation efficiency (80–90%).

## Zusammenfassung

Unter den Partikelbildungsmethoden, sowohl für Arzneimittel als auch für Phasenwechselmaterialien, kann die Mikroverkapselung eine geeignete Verbesserung der Effizienz bieten.

Ich habe eine neue Art von sphärischer Agglomerationsmethode für wasserlösliche Arzneimittel entwickelt, indem ich die Mikroverkapselung von menschlichem Serumalbumin durch kombinierte chemische und lösungsmittelfreie Ausfällung von Chitosan- und Natriumpolystyrolsulfonat-Polymeren gelöst habe.

Die kugelförmige Agglomeration von  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  wurde zur Herstellung von Kapselkernen aus Phasenwechsel-Wärmespeichersalzhydraten in verschiedenen Lösungsmittelsystemen verwendet. Der Mechanismus der sphärischen Agglomeration kann zu Agglomeraten führen, die nicht vollständig kugelförmig und weniger stabil sind, aber als  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  identifiziert werden können. Stabilere und nahezu perfekt kugelförmige Agglomerate werden durch den Emulsions-Lösungsmittel-Diffusionsmechanismus erhalten, enthalten aber hinsichtlich ihrer Zusammensetzung vier zusätzliche K- und Al-Salze, nämlich  $\text{Al}(\text{SO}_2)(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O})$ , wasserfreies  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  und wasserfreies  $\text{K}_2\text{SO}_4$ -Salz zusätzlich zum Kalialaun.

Aus der Bulk-Phase eines Hexadecan-Phasenwechselmaterials wurde ein mikroverkapseltes Granulat mit einer hohen Wärmeübertragungsfläche hergestellt, das in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden kann. Meine Untersuchungen haben gezeigt, dass die Oberflächenspannungsbeziehungen, die sich während des Prozesses entwickeln, sowohl die Bildung der Nichtgleichgewichtsmorphologie als auch den Grad der Porosität der resultierenden Schalenstruktur bestimmen.

Unter Verwendung einer Emulsions-Lösungsmittel-Verdampfungsmethode habe ich interferon-beta haltige Nanopartikel in einer Doppelemulsion mit biokompatiblen Poly(milchsäure-glykolsäure)- und Poly(milchsäure-glykolsäure)-Polyethylenglykol-Copolymer-Trägern zur injizierbaren Anwendung hergestellt. Es wurden Emulsionszusammensetzungen und Verarbeitungsparameter entwickelt, um die erforderliche Partikelgröße (160–170 nm) und Verkapselungseffizienz (80–90%) zu erreichen.

## Rövidítésjegyzék

<b>BSA</b>	marha szérum albumin	<b>NHS</b>	N-hidroxi-szukcinimid
<b>CTAB</b>	cetil-trimetil-ammónium-bromid	<b>PCM, phase change material</b>	fázisváltó hőtároló anyag
<b>DCM</b>	diklór-metán	<b>PEG</b>	polietilén-glikol
<b>EC</b>	etil-cellulóz	<b>PEG_PLGA_1</b>	RGP d5055 jelű poli(tejsav-glikolsav)-polietilén-glikol
<b>EDC</b>	N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid	<b>PEG_PLGA_2</b>	RGP t50106 jelű poli(tejsav-glikolsav)-polietilén-glikol
<b>EGTA</b>	etilén-glikol-bisz(β-amino-etil-éter) - N,N,N',N' -tetraecetsav	<b>PLGA_1</b>	RG 752H jelű poli(tejsav-glikolsav)
<b>ESD</b>	emulziós oldószer-diffúzió	<b>PLGA_2</b>	RG 504H jelű poli(tejsav-glikolsav)
<b>EtOAc</b>	etil-acetát	<b>PLGA_3</b>	Resomer 502H jelű poli(tejsav-glikolsav)
<b>EtOH</b>	etanol	<b>PLGA_4</b>	Resomer 0254 RG: 50:50 H jelű poli(tejsav-glikolsav)
<b>HD</b>	n-hexadekán	<b>PMAA</b>	poli(metil-metakrilsav) Na sója
<b>HSA</b>	humán szérum albumin	<b>PSS</b>	nátrium-polisztirol-szulfonát
<b>IFN-béta</b>	interferon-béta-1a	<b>PVA</b>	poli(vinil-alkohol)
<b>IPA</b>	izopropil-alkohol	<b>SA</b>	szférikus agglomeráció
<b>tímsó</b>	$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	<b>v/o</b>	víz-olaj emulzió
		<b>v<sub>1</sub>/o/v<sub>2</sub></b>	víz-olaj-víz összetett emulzió

## 1 Bevezetés

A funkcionális részecskék olyan szilárd vagy félszilárd részecskék, melyek alkalmazásuk során valamilyen aktív szerepet töltenek be, hatást gyakorolnak a környezetükre. Sok esetben tulajdonságaik megváltoztatásával megfelelő módon reagálnak a körülményekre, környezetük megváltozására. Gyakran kompozit részecskék, azaz különböző minőségű anyagrészekből tevődnek össze, és a funkciójuknak megfelelő összetett struktúrájuk van.

A kutatócsoportunk munkái két nagyobb tématerület mentén szerveződnek. Egyrészt a gyógyszerhatóanyagok formulálása, másrészt a fázisváltó hőtároló anyagok kapszulázása köré. A dolgozat különböző témáit a szemcseképzés, szemcseformálás köti össze. A különböző célok eléréséhez nem feltétlenül kell mindig szférikus szemcse, sokszor elegendő például a nanoszemcse vagy nanoszemcsés struktúra kialakítása, azonban a szférikus forma bizonyos előnyöket hordozhat magában.

Egy korábbi GVOP pályázat keretein belül „Nanoszerkezetű kompozit gyógyszerformák kifejlesztése fehérjék terápiás hatékonyságának növelésére” volt a megfogalmazott cél. Egyik megvalósítási lehetőségként a gyógyszeriparban is ismert módszerrel, szférikus agglomerációval állítottam elő fehérje tartalmú nanoszerkezetű mikrorészecskéket. Ezzel a munkával a gyógyszerhatóanyag formulálás tekintetében összefüggő, és mégis teljesen más céllal végzett feladat volt az interferon-béta kapszulázása a szklerózis multiplex tüneteinek enyhítésére. Fehérjék mikrokapszulázását szubmikronos méretben jó hatékonysággal az összetett emulziós oldószer-elpárologtatásos módszerrel lehet megvalósítani.

„Megújuló termikus energia hasznosítására alkalmas új hőtároló anyag kifejlesztése mikrokapszulázással” elnevezésű TÁMOP projektünkben építőipari alkalmazás céljával fejlesztettünk szférikus  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  fázisváltó hőtároló magokat, amelyek alapját képezik egy megfelelő, víz- és gázzáró polimerhéjjal rendelkező mag-héj szerkezetű fázisváltó hőtároló mikrokapszulának. Sóhidrát golyók előállítására a vízdoldhatóságuk miatt alkalmas módszer az egy lépésben végrehajtott kicsapás és agglomerálás, azaz a műveleti szempontból könnyen kivitelezhető szférikus agglomeráció. Míg a szférikus agglomerációval előállítható pár száz  $\mu m$ -es szemcsék gyógyszeripari és akár építőipari felhasználására is lehetőség van, addig az emulziós oldószer-elpárologtatásos módszer amellet, hogy vízdoldható és nem vízdoldható anyagok kapszulázására is alkalmas, mikro- és nanorészecskék létrehozására is megfelelő módszer. A paraffin típusú fázisváltó hőtároló anyagot (PCM) tartalmazó szemcsék emulziós módszerrel készültek.

## 2 Irodalmi áttekintés

### 2.1 Szemcseképzés a hatékonyság növelése céljából

Napjaink legnagyobb kihívásai közé tartozik az alapanyagok és az energia gazdaságosabb felhasználása akár az újrahasznosításuk révén, akár úgy, hogy már használatukkor hatékonyabb működésre bírjuk azokat. A dolgozatban szereplő két tématerület, a gyógyszerhatóanyagok és a hőenergia tárolására alkalmas fázisváltó hőtároló anyagok alkalmazása terén is a kutatók fontos kihívásokkal szembesülnek.

A gyógyszer hatóanyagok esetében hatékonyabb működést eredményez a célzott és/vagy kontrollált hatóanyag-leadás. A nyújtott hatóanyag-leadással pl. csökkenthető az injekciós adagolások száma, ami a kisebb mennyiségű hatóanyagbevitel mellett még a betegek komfortérzetét is növeli. A hatékonyságuk ezen kívül javítható pl. fizikai-kémiai stabilitásuk, ill. a vérben tapasztalható élettartamuk növelése révén, vagy a felszívódásuk mértékének javítása útján. A cél elérhető egyrészt a hatóanyag kémiai módosításával, másrészt a hatóanyagok mikrokapszulázása segítségével, vagy akár az így készült mikrorészecskék felületmódosításával [1, 2]. A mikrokapszulázással a hatóanyag megvédhető a gyors degradációtól, és egyúttal megoldható a rossz ízük elmaszkírozása is.

A kapszulázással készült mikro- és nanorészecskék alkalmas kontrollált hatóanyag-leadású hordozóanyagok lehetnek. A részecskék előállítására, vagyis a hatóanyagok polimerbe való becsomagolására, számos mikrokapszulázási eljárás ismeretes, de minden esetben a kiválasztott módszer függ a polimer és a hatóanyag természetétől, a tervezett használat módjától és a terápia kívánatos időtartamától. A szemcseképzés során nem változhat sem a hatóanyag stabilitása, sem az aktivitása. A szemcséknek szabadon folyónak kell lennie, aggregáció nélkül. Magas kell, hogy legyen a kapszulázási hatékonyság, és mindezt reprodukálható minőségben és hatóanyag-leadási profillal kell elérni [3].

$$\text{kapszulázási hatékonyság (\%)} = \left( \frac{\text{a hordozó polimerbe bekapszulázott hatóanyag}}{\text{kiindulási hatóanyag mennyiség}} \cdot 100 \right) \%$$

A fázisváltó hőtároló anyagoknál is a hatékonyabb működés a cél. Mivel tömbfázisban a szilárd-folyadék-szilárd fázisátmenet lassú a rossz hővezetés és a kis fajlagos felület miatt, ezért a felület növelésének, vagyis az ezzel együtt járó hatékonyság

javulásnak egyik legjobb módja szemcsézett hőtároló anyag kialakítása mikrokapszulázás útján. Emellett – pl. a sóhidrátok esetében – a kapszulákban a vízvesztés irreverzibilitása is megakadályozható. A felhasználás szempontjából pedig fontos lehet a körülvevő közegtől való elhatárolás is, ami segíthet a kapszulázott anyag esetleges környezetével szembeni reaktivitásának csökkentésében vagy kiküszöbölésében és a ciklikus stabilitásának javításában [4].

## **2.2 A fázisváltó hőtároló anyagok (PCM-ek) rövid bemutatása**

A felesleges hőenergia tárolása révén a fázisváltó hőtároló rendszerek segítségével energiát takaríthatunk meg, így csökkentve az energiafelhasználás környezetterhelő hatását. A látens hőtárolás a hőenergia tárolásának egyik leghatékonyabb módja. Az érzékelhető hőtől eltérően a látens hő a szilárd-folyadék fázisátmenet hőtartalom-változása révén fajlagosan sokkal nagyobb hőmennyiség tárolását teszi lehetővé, mintha az anyagnak csak a hőmérséklete változna meg, és emellett a hő tárolása és leadása közötti hőmérsékletkülönbség is kisebb. A PCM-ek tehát látenshő-tároló anyagok. A fázisváltó hőtároló anyagok három csoportját különböztetjük meg: szerves PCM-ek, szervesetlen sók és az eutektikumok. A legtöbb szerves PCM nem korrozív, kémiaileg inert, stabil és újrahasznosítható. Nagy tömegegységre jutó látens hővel, alacsony gőznyomással rendelkeznek, emellett a sóhidrátokkal ellentétben kisebb mértékű a túlhűlésük, kongruensen olvadnak és nincs szükségük oltókristályra a kristályosodáshoz. A paraffinok sokoldalú PCM-ek, mivel széles hőmérséklet-tartományban olvadnak és szilárdulnak meg, így olvadáspontjuktól függően széles körűen alkalmazhatók. Hátrányaik közé tartozik az alacsony hővezető képesség, a gyúlékonyság és a fázisátalakulás során bekövetkező nagy térfogatváltozás. E problémák megoldására az egyik hatékony eszköz lehet a mikrokapszulázásuk. A mikrokapszulázott n-hexadékan (HD) alacsony olvadáspontja miatt például intelligens textíliákban használható fel.

Az egyik legkedvezőbb tulajdonságú környezetbarát kapszulázó polimer, az etilcellulóz (EC) amelyet elsősorban a gyógyszertechnológiában használnak, pl. a hatóanyag-leadás módosítására, a gyógyszerhatóanyagok hatékonyságának fokozására, mikrokapszulák tömörítésére, a toxicitás csökkentésére, valamint a stabilitás és feldolgozhatóság javítására. Ezen túl ismertek bizonyos íz- és szagmaszkoló, táplálkozástudományi, mezőgazdasági, fogászati, nyomdai, ruházati és kozmetikai

alkalmazásai is [5]. Mivel az EC lágy polimer, jó filmképző tulajdonsággal, átlátszó, rugalmas, valamint magas és alacsony hőmérsékleten is megőrzi nagy szilárdságát és szívósságát, így kedvező falanyag lehet PCM-tartalmú mikrokapszulák előállításához [6, 7]. Noha növényi olajokat már mikrokapszuláztak etilcellulózzal [8, 9], azoknak a kutatásoknak a célja teljesen más volt, így az energiatároló képességet nem vizsgálták. Phadungphatthanakoon és munkatársai [10] n-eikozán PCM mikrokapszulázását mutatták be EC és metilcellulóz keverékével. E tanulmányok [8-10] alapján az etilcellulózzal megjósolható, hogy megfelelő héjanyag a HD mikrokapszulázáshoz.

### **2.3 Mikrokapszulázási módszerek**

A mikrokapszulázás megvalósítására különböző technikák alkalmazhatók, de nincs kapszulázási módszer, amely minden helyzetre használható lenne. Az előállítási módszert elsősorban a hatóanyagok hidrofób-hidrofil jellege, a felhasználási területe és módja szerint választjuk meg. A mikrokapszulázás módszerei csoportosíthatók kémiai, fizikai, fizika-kémiai és mikrofluid módszerekre [11]. A mikrokapszulázás megvalósításához többek között az emulziós elpárologtatásos módszereket, polimerizációt, precipitációt, koacervációt, porlasztva szárítást, szférikus agglomerációt stb. alkalmaznak.

A gyógyszerhatóanyagok területén a koacervációt elsősorban vízoldható hatóanyagok kapszulázására használják, úgymint peptidek, proteinek és vakcinák. A héj két ellentétes töltésű polielektrolit reakciójakor lejátszódó fáziszeváráció révén alakul ki a kapszulázandó maganyag körül. A folyamat nagyon összetett, mivel a lejátszódása számos kinetikai paraméter hatásának összességétől függ [12]. Az így készített szemcsék nagymértékű agglomerációra hajlamosak [13]. A módszer előnye az alkalmazhatósága szempontjából, hogy a felhasználandó oldószerrel szemben nincsenek szigorú követelmények [13]. A fázisvártó hőtároló anyagok kapszulázásánál azonban kifejezetten hátrányos, hogy a koacervációval előállított kapszulák héja nem éri el a kívánatos erősséget, és viszonylag nagy a porozitása is [14].

A porlasztva szárítás az egyik leghatékonyabb és legmegfelelőbb technika szférikus szemcsék előállítására szűk szemcseméret tartományban, kontrollálható morfológiával és összetétellel, emellett magas kitermelési aránnyal. A betáplált szárítandó anyag lehet oldat, szuszpenzió, emulzió. Az előállítható szemcsék mérete 10–50 mikrométertől kezdve 2–3 mm-ig is terjedhet. A nano porlasztva szárító készülékekkel néhány

mikrométeres és szubmikrométeres szemcsék is képződnek [11]. Az eljárás viszonylag gyors, könnyű nagyítani, enyhe kísérleti körülmények között használható, és az alkalmazhatósága kevésbé függ a hatóanyag és a polimer oldhatósági viszonyaitól, mint egyéb módszerek esetében [15]. Jól bejáratott, régóta ismert módszer, mind a vegyiparban, mind az élelmiszer- és gyógyszeriparban egyaránt [16]. Az elérhető kapszulázási hatékonyság igen magas. Men és szerzőtársai munkájukban bemutatták, hogy a porlasztva szárítással kapott PLGA polimer szemcséknek (1–15  $\mu\text{m}$ ) jóval magasabb volt a kapszulázási hatékonysága és kisebb a szemcsemérete, mint a PLA polimer koacervációjával nyert szemcséké (20–90  $\mu\text{m}$ ) [17]. A technika hátrányaként említhető meg a képződött szemcsék agglomerációja, a készülék falához való tapadása és a nagy energiaigénye. Segédanyagokkal (pl. mannitol) a tapadás mértéke csökkenthető [18]. Az így előállítható mikroszemcsék mérete kb. 1–100  $\mu\text{m}$ -ig terjedhet [19]. A technika a meglévő előnyei ellenére sem alkalmas a fázisváltó anyagok kapszulázására, mivel ebben az esetben mag-héj szerkezetű mikroszemcsékre van szükségünk. A porlasztva szárítással nagyrészt mátrix szerkezetű szemcsék állíthatók elő, ill. a szárítás során a fázisváltó anyag egy része a szemcse külső felére kerülhetne, ezzel veszteséget okozva.

Az oldószer elpárologtatásos, a koacervációs és a polimerizációs módszerek egyik legnagyobb hátránya a toxikus oldószerek használata, melyek maradványai nem kívánatosak a mikroszemcsékben. A szuperkritikus folyadékok speciális tulajdonságai - mint összenyomhatóságuk, a sűrűségük kismértékű változása a hőmérséklettel és a nyomással, stb. - az oka annak, hogy szívesen használják azokat más oldószerek helyett [11]. Legelterjedtebben  $\text{CO}_2$ -ot használnak, ami 0 °C és 80 bar felett folyadék, és így oldószerként alkalmazható. Nem gyúlékony, nem toxikus és olcsó. A szuperkritikus folyadék technológia egy vonzó alternatíva, mivel mind az alkalmazott oldószer, mind a módszer környezetbarátabb az egyéb ismert módszerek többségénél. Különösen az élelmiszeriparban népszerű, mert egyszerű lépésekből áll, kevés az oldószermaradék, és alacsony hőmérsékleten dolgozhatunk vele. Ennek ellenére nem tud nagyobb mértékben elterjedni, mert a szuperkritikus folyadékban a hatóanyagok és a polimerek oldhatósága korlátozott, tehát a módszer csak kevés, specifikus esetre használható, széles körben nem [20].



A polimerizációs módszerek során a monomer polimerizálásával vizes szuszpenziót állítanak elő. A hatóanyagot egyrészt kapszulázhatják már a polimerizáció alatt, másrészt a polimerizáció befejezése után adszorbeálhatják a polimer felületére [21]. Az in situ polimerizáció a karbamidnak vagy a melaminnak egy folytonos vizes fázisban lejátszódó kondenzációs reakciója formaldehiddel. A módszer hátrányai, hogy a szemcsék aggregálódhatnak, az alacsony hőmérséklet miatt lassú a folyamat, ill. a formaldehid emberi szervezetre való toxikussága sem elhanyagolható szempont [14]. Az így előállítható mikroszemcsék mérete kb. 1–1000  $\mu\text{m}$ -ig terjed. A határfelületi polimerizáció legfőképpen folyadék halmazállapotú maganyag kapszulázására alkalmas eljárás. A határfelületi polimerizációs technikák egyfajta polikondenzációs reakciók, amelyekben a nagyon reaktív monomereket (izocianátot és amint) két egymással nem elegyedő folyadékban oldják. A legtöbb esetben olaj-víz vagy víz-olaj határfelületen zajlik a polimerizáció. A termék kisméretű mikrokapszula vékony héjjal. Sikeresen alkalmazták pl. gyomirtószer, rovarirtók kapszulázására. [14].

Jelen munkában a mikrokapszulázást szférikus agglomerációval és emulziós oldószer-elpárologatással végeztem.

### **2.4 Szemcsképzés szférikus agglomerációval**

Kawashima definíciója szerint a szférikus agglomeráció egy olyan agglomerációs eljárás, amely során a kristályos hatóanyagot egy lépésben kristályosítják és agglomerálják, annak oldhatóságának, folyási tulajdonságainak és összenyomhatóságának javítása céljából. [22]

A szférikus kristályosítás során finomszemcsés, esetleg tús kristályok irányított agglomerációját (összenövesztését) végzik úgy, hogy a szemcsék szuszpenziójához a szuszpendáló folyadékkal nem elegyedő, de a szemcséket jól nedvesítő folyadékot (hídfolyadékot) adnak. Az elképzelések szerint a szemcsék felülete oldódik a hídfolyadékban, és ezek az oldódó részek (kristályosítási) gócként viselkedve szférikus agglomerátumokká kötik össze a szemcséket. Kawashima és munkatársai [23] az elsők között dolgoztak ki egy olyan módszert, amellyel egy lépésben végrehajtható a kristályosítás és az agglomeráció. Szalicilsavat kristályosítottak etanolból, mint jó oldószerből, vízzel, mint kicsapó, azaz rossz oldószerrel, a három oldószer elegyéből felszabaduló kloroform hídfolyadékkal. A szalicilsav kristályokat jól nedvesítő

kloroformból annyit adtak a tús szalicilsav kristályokat tartalmazó szuszpenzióhoz, hogy az oldószerkeleggyel nem elegendő kloroform elegendő legyen a kristályok agglomerálásához. A szférikus agglomeráció módszerét klasszikusan a szemcsés anyagok szűrhetőségének javítására dolgozták ki. A szférikus agglomeráció különösen tús formában kristályosodó hatóanyagok esetében nagymértékben javíthatja a hatóanyag részecskék fizikai tulajdonságait, mint pl. a folyási tulajdonságokat. A szférikus agglomerációs technikát még gyakrabban használják az oldhatóság és/vagy a szilárd anyag oldódási sebességének növelésére különösen vízoldhatalan hatóanyagokra. Cui és munkatársai [24] ill. Tapas és szerzőtársai [25] szerint a hidrofil polimereknek szférikus agglomerációval történő mikrorészecskékbe való beépítésével a hatóanyag oldhatósága szignifikánsan növekszik. A módszer tehát eredményes a különböző gyógyszerhatóanyagok biológiai elérhetőségének növelésében mivel a kis vízoldhatóságú és lassú kioldódási profilú hatóanyagok oldhatóságát javítja. A szférikus agglomerátumok mérete általában pár száz  $\mu\text{m}$ -tól akár néhány mm-ig is növekedhet. Így olyan gyógyszerhatóanyag formálására mindenképp megfelelő módszer lehet, amelynél célunk a tablettában való alkalmazás. A fejlesztések az évek során abba az irányba folytatódtak, hogy az így nyerhető szemcséket különböző kioldódási profilú összetett rendszerekké alakították, sőt a nanoszemcsék előállítását is megoldották. Az eljárás során a hatóanyag és a kapszulázó polimer együttes kicsapásával különböző szerkezetű, szférikus kompozit részecskéket, szférikus nanomátrixokat, szférikus és lyukas mikrogömböket állítottak elő. [26].

Kawashima első, 1986-ban a Science-ben megjelent cikke után [23], szférikus agglomerációval, mint ígéretes gyógyszerhatóanyag formuláló módszerrel több hatóanyagra dolgoztak ki eljárásokat a tablettázhatóság vagy éppen az oldhatóság javítása céljából. A megfelelő módszer kidolgozása azonban sokszor hosszadalmas munka volt, ezért többen általános érvényű összefüggéseket kerestek, melyeket kisebb terjedelmű összefoglaló cikkekben tárgyaltak. A több kisebb összefoglaló cikk után 2018-ban jelent meg Pitt és munkatársai nagyobb lélegzetvételű munkája, melynek egy részében leírtak adták a gerincét az egyszerű szférikus kristályosítási mechanizmussal képződött hatóanyag szemcséket tárgyaló irodalmi összefoglalómnak [27].

### 2.4.1 Oldószerrendszerek kialakítása

Egy adott anyag szférikus agglomerátumának előállítása csak akkor lehet sikeres, ha az oldószernek bizonyos kombinációját alkalmazzuk. Nagyon körültekintően kell megválasztani az oldószerrendszert, arra törekedve, hogy a kristályosodás mértékét maximalizálni tudjuk, az agglomeráció fokát pedig optimális értéken tartjuk. Nocent és munkatársai [28] a hatóanyag jó és rossz oldószerének kiválasztásához, az oldhatóságára nézve határértékeket adtak meg. Az USP besorolás definíciója szerint tökéletesen oldhatónak kell lennie a jó oldószerben és gyakorlatilag oldhatatlannak a rossz oldószerben. Az oldószer relatív koncentrációja szintén fontos paraméter. A fázisdiagram összeállítása a jó és a rossz oldószerre, valamint a híd-folyadékra hasznos eszköz lehet az oldószer (tér-fogatarányukra nézve) megfelelő összetételének kiválasztásában. A fázisdiagram készítését több szerző – leginkább gyógyszerhatóanyagok szférikus agglomerációjának kivitelezéséhez – alkalmazta, mint a szférikus agglomerálás kidolgozásának első és fontos lépését, pl. szalicilsav, tolbutamid, acebutalol hidroklorid, febufen, ketoprofen, benzoésav, simvastatin és etodolak esetében [29, 30, 31].

### 2.4.2 Híd-folyadék megválasztása

A híd-folyadékoknak a kivált szilárd részecskékre nézve jól nedvesítőknak kell lenniük és nem elegyedőnek vagy csak részben elegyedőnek a rossz oldószerre nézve. A megfelelő híd-folyadék kiválasztásához Amaro-Gonzales és Biscans [32] kifejlesztettek egy módszert az úgynevezett Washburn teszttel, ami a szilárd anyaggal töltött oszlopban a nedvesítő folyadék kapilláris emelkedésének mérésén alapul. A vizsgált lehetséges híd-folyadékok közül a saját rendszerükben a n-hexánt találták a legalkalmasabbnak, a hatóanyagukkal szemben mért legalacsonyabb nedvesedési szöge miatt. A választásukat és így a módszer alkalmazhatóságát később kísérletileg is megerősítették. Thati és Rasmuson a benzoésavra végeztek hasonló vizsgálatokat [29]. További kritérium a híd-folyadékra nézve, hogy a híd-folyadék és a rossz oldószer közötti határfelületi feszültségnek nagynek kell lennie. Habár a felületaktív anyagok használata növeli az elsődleges kristályok nedvesedését, így gyakran csökkenti a határfelületi feszültséget, ez azonban egyúttal gyengíti a kötések erősségét.

A fázisdiagramok ismeretében a jól megválasztott oldószer-összetétel és híd-folyadék mellett a keletkezett agglomerátumok minősége javítható, optimalizálható a művelet

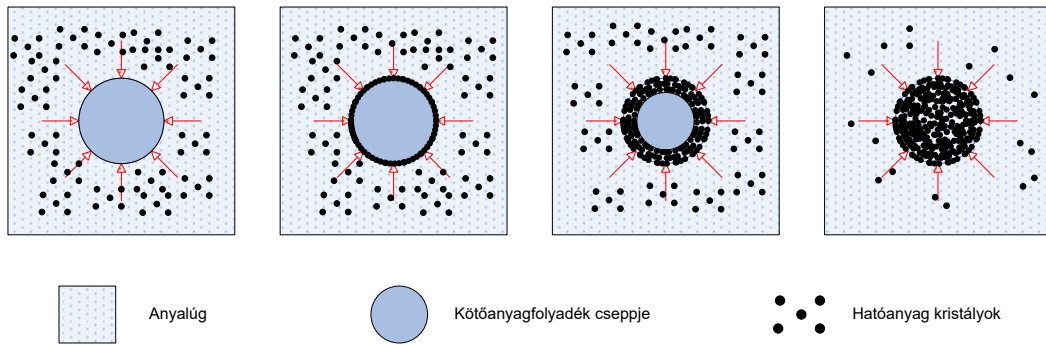
során beállított paraméterekkel, mint pl. az oldószer adagolás módja, a híd-folyadék mennyisége és adagolási módja, a keverési sebesség, a hőmérséklet és a tartózkodási idő.

Miközben a sokszor fáradságos munkával kialakított oldószerrendszerben előállították az agglomerátumokat, és vizsgálták a tulajdonságait a műveleti paraméterek függvényében, többen igyekeztek az agglomerátumok kialakulásának mechanizmusát is feltárni, abban a reményben, hogy így tervezhetőbbé válnak a szférikus agglomeráció körülményei.

### 2.4.3 Mechanizmusok

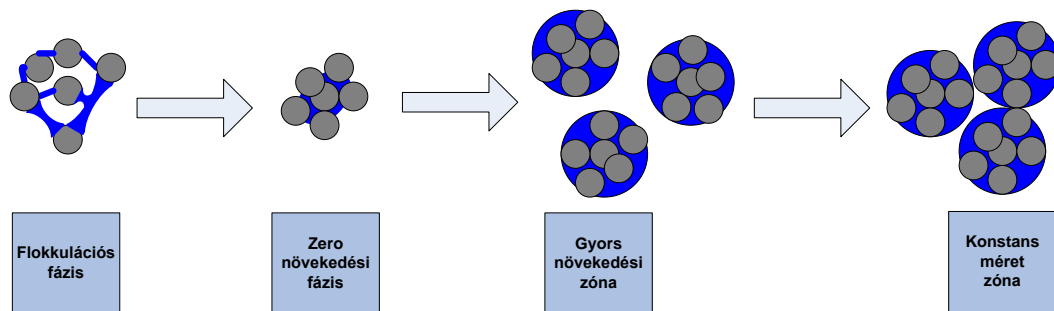
Chow és Leung feltételezték [33], hogy a szuszpenzióból történő szférikus agglomeráció a szilárd kötőhidak kialakulásával a részecskék érintkezési pontjain, a részecskék részleges feloldódásával és újra kristályosodásával történik. Általános irányelveket fogalmaztak meg a különböző típusú szilárd anyagok agglomerálásához a folyamat felhasználásának segítésére, de mechanizmust még nem vázoltak fel.

Amaro-González és munkatársai két mechanizmust is leírtak az SA folyamatra, amelyek lejátszódása az elképzeléseik szerint a híd-folyadék cseppméretétől függ [32]. Ha nagyobb a híd-folyadék cseppmérete, mint a folyadékban elszuszpendált kristály mérete, akkor a bemerülés vagy immerziós mechanizmusról beszélünk, amely során a nedvesítés után a kristályok bevonják a cseppeket, majd behatolnak a cseppekbe, ott végül kristályosodási gócpontot jelentenek a további kristályosodáshoz. Ezek az agglomerátumok többé-kevésbé megőrzik a gömbszerkezetet. Abban az esetben, ha kisebbek a híd-folyadék cseppek, mint a kristályok, akkor a cseppek vonják be a kristályokat, amelyet követően lejátszódik az agglomeráció szabálytalan alakú flokkulátumokat eredményezve. Az immerziós mechanizmus első fázisában a kristályos részecskék ütköznek a kötőfolyadék cseppel. A következő fázisban a kötőfolyadék cseppek felületét bevonják a kristályok, ezt követően részlegesen, majd végül teljesen belemérülnek a kristályok a kötőfolyadék cseppbe. A folyamat lépéseit 2.1. ábrán szemléltettem.



2.1. ábra. Az immerziós mechanizmus lépéseinek szemléltetése

A híd-folyadék hatására bekövetkező agglomeráció leírására Bemer egy másik mechanizmust javasolt, amelynek a következő 4 fő lépése van: flokkulálás, zero növekedési fázis, gyors növekedési fázis és az egyensúlyi fázis [34]. A flokkulálás fázisában a híd-folyadék hozzáadásakor laza flokkulátumok (laza aggregátumok) keletkeznek. A flokkulálás után a híd-folyadék mennyisége lecsökken, így a szemcseméret nagyjából változatlan marad, ezért ezt a szakaszt a zero növekedési szakasznak nevezték el. A flokkulátumokból egyrészt a felületre mozgó híd-folyadék, másrészt a keverés hatására a flokkulátumok összecsapzódnak, és nagyobb méretű agglomerátumokká szilárdulnak. Ez a gyors növekedési fázis. Majd a megfelelő érintkezési idő után beáll az egyensúly, ahol nem vagy csak kicsit változik a szemcseméret (2.2. ábra). Ez az elmélet az Amaro-Gonzales munkájában említett flokkulátum kialakulás részletesebb leírásának tekinthető.



2.2. ábra. A Bemer által javasolt mechanizmus lépései

Igekami és munkatársai [35] egy szteroid hatóanyag száraz inhalációs formájának előállítására javasoltak egy szférikus agglomerációs módszert, és tanulmányozták a kristálynövekedés kinetikáját a folyamat során. Az agglomerátumok szemcseméretének időbeni változásának leírására javasoltak egy modellt, amely szerint kezdetben a

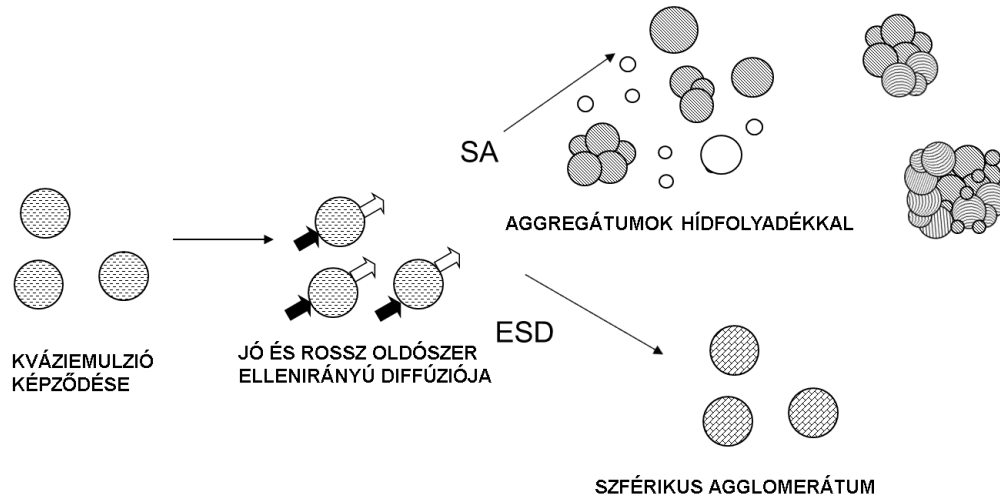
hídfolyadékban oldódó kristályok diffúzió-kontrollált újrakristályosodása játszódik le, majd a képződött kristályok fúziója révén jönnek létre az agglomerátumok.

A kristályosítandó anyag oldatából egylépésben elállított agglomerátumok képződésére további két mechanizmus-leírás született. A körülményeket tekintve hasonló módon előállított agglomerátumok tulajdonságaiban meglepő módon egyes esetekben jelentős eltérések tapasztalhatók. Kawashima és szerzőtársai [30] ezek magyarázatára írták le a leginkább ismert két mechanizmust, a szférikus agglomerációt (SA) és az emulziós oldószer-diffúziós folyamatot (ESD) (2.3. ábra).

Aszkorbinsavat kristályosítottak etil-acetát-víz oldószerrendszerben. Az aszkorbinsav jó oldószere a víz, a rossz oldószere az etil-acetát. 50 °C-on elkészítették az aszkorbinsav telített oldatát, majd 5 °C-ra lehűtött etil-acetátot öntöttek hozzá kevertetés mellett. Attól függően, hogy milyen térfogatarányban keverték össze az aszkorbinsav vizes oldatát etil-acetáttal, különböző tulajdonságú agglomerátumokat kaptak. Vizes oldat:etil-acetát 1:100 térfogataránya mellett az oldószerek elegyednek, kialakul egy olyan kvázi-emulzió, amely oldószercseppjében megindul az aszkorbinsav kristályosodása még azelőtt, hogy az oldat és az oldószer teljesen elkeverednének egymással. A kristályos anyag így teljes egészében a csepp belsejében válik ki. A vizes oldat:etil-acetát 4:150 térfogataránya mellett az oldószerek nem elegyednek egymással, csak keveréssel fenntartható emulzió cseppek alakulnak ki, amelyek dinamikus mozgásban vannak. A jó és a rossz oldószerek ellenirányú diffúziója révén itt is megtörténik a kristályosodás. Az oldószerrendszerből felszabaduló víz, mint hídfolyadék hatására, pedig lezajlik a kristályok véletlenszerű agglomerációja. Adott keverési idő alatt az ütközések és a nyíróerők hatása dinamikus egyensúlyhoz vezet az agglomeráció és a szétesés között, amely egyensúlyi átlagos szemcseméretet és közel gömbformát eredményez.

Az irodalmakban sokszor nevezik magát a módszert kissé félrevezető módon kvázi-emulziós oldószer-diffúziós módszernek, mert abból indulnak ki, hogy az első lépésben minden esetben kialakul egy kvázi-emulzió és az ellenáramú oldószer diffúzió révén megtörténik a kristályosodás. Kawashima azonban akkor beszél kvázi-emulzióról, amikor a jó és rossz oldószer elegyedő arányánál a jó oldószerben oldott anyag cseppet alkot a rossz oldószerrel. Ez alapján sokkal több cikkben beszélnek valójában az SA

(szférikus agglomerációs) mechanizmussal, mint az ESD (az emulziós oldószer-diffúziós) mechanizmussal készült szemcsékről.



2.3. ábra. Az SA és az ESD mechanizmus, amellyel a szférikus kristályosítás lejátszódhat

Az SA és ESD mechanizmus lejátszódásának, utóbbi esetben a kvázi-emulzió kialakulásának feltételét Kawashima és munkatársai a hatóanyag, a hatóanyag jó oldószere és rossz oldószere közötti kölcsönhatások erőssége alapján magyarázzák.

A szférikus agglomerációkor a jó és a rossz oldószer egymással korlátlanul elegyedik, és a kölcsönhatás közöttük erősebb kell, hogy legyen, mint az oldott anyag és a jó oldószer között. Ez a rossz oldószer hozzáadása után a kristályok azonnali kicsapódását eredményezi. A híd folyadék pedig agglomerátumokká köti össze a kristályokat egymással. A kristályok felületén maradó kevés jó oldószer-maradék is viselkedhet kötőfolyadékként egymáshoz ragasztva a kristályokat.

Egy – a Kawashima értelmezésében – ESD mechanizmus szerint lejátszódó folyamat első lépésében a kristályosítandó anyag oldatát eloszlatják egy rossz oldószerben. Ha a kölcsönhatás erősebb a hatóanyag és az oldószere között, mint a jó és a rossz oldószer között, kváziemulzió-cseppek alakulnak ki a rossz oldószerben. A kialakuló folyadék-cseppek határfelületén keresztül ellenirányú diffúzió történik. A rossz oldószer koncentrációjának növekedése a csepp belsejében csökkenti az oldott anyag oldhatóságát, amely előidézi a kristályosodást a cseppen belül. Ha polimer is jelen van a hatóanyag oldatában, akkor együtt válhat ki a kristályokkal, mint egy mátrixanyag a kompozit szemcsében.

Espitalier és munkatársai [36] tanulmányozták a kvázi-emulziós módszerrel előállított szférikus agglomerátumaik képződésének mechanizmusát. Az oldószerrendszerükben acetont alkalmaztak jó oldószerként és poli(vinil-alkohol) (PVA) felületaktív anyagot tartalmazó víz szolgált rossz oldószerül. Vizsgálták a cseppméret és a fázisok kezdeti hőmérsékletének hatását. Megállapították, hogy az elsődleges agglomerátumok további agglomerációja a különböző cseppekből nem volt megfigyelhető, amely tapasztalat arra utal, hogy a hatóanyag kiválás kizárólag az emulziócseppekben történt meg.

Készült néhány tanulmány, amelyben a megfelelően megválasztott paraméterek segítségével az adott hatóanyagot mind az SA, mind az ESD mechanizmus szerint előállították szférikus agglomerátum formájában. Összehasonlították a kétféle mechanizmushoz szükséges feltételeket és a kapott termékek tulajdonságait. Morishima és munkatársai bucillamin hatóanyag szférikus agglomerátumait állították elő etanol-víz rendszerben ESD mechanizmussal és a nem elegendő víz-etanol-diklór-metán rendszerben pedig SA mechanizmussal [37].

Sano és munkatársai [30] tolbutamid hatóanyag szférikus kristályosítását vizsgálták szintén mindkét mechanizmus szerint. Az SA mechanizmus lejátszódásakor az oldószerrendszert úgy állították össze, hogy az első lépésben kikristályosodó hatóanyaghoz hozzáadott etanol-izopropil-acetát elegy, mint híd-folyadék nem elegyedett a szuszpenzióval. Az ESD esetében pedig az agglomerátumok az egymással elegyedő dimetil-formamid és víz keverékében képződtek. Az SA mechanizmus lejátszódásakor a hozzáadott felületaktív anyag csökkentette az agglomerátumok kötése-erősségét, míg az ESD esetében a kvázi-emulzió fenntartásához elengedhetetlenül szükséges volt a jelenléte. Az ESD módszerrel kapott agglomerátumok tömörebbek és nagy mechanikai szilárdságúak lettek, amellett, hogy nagyobb fokú szfericitást is mutattak, mint az SA módszerrel előállítottak. Az SA módszerrel előállított agglomerátumokat porózusabb szerkezet és valamivel nagyobb felület jellemezte, amely tulajdonságok eredményeképpen a hatóanyag könnyebben kioldódott ezekből a szemcsékből, mint a tömörebbekből. Kawashima és munkatársai [38] is megfigyeltek ilyen típusú eltérést a szemcsék tulajdonságaiban a tranilast hatóanyag szférikus kristályosításakor. Morishima és munkatársai [39] részletesen tanulmányozták a kétféle technikával előállított bucillamin hatóanyag tartalmú szférikus agglomerátumok tablettázhatóságát befolyásoló tulajdonságokat is. Az SA mechanizmus szerint képződött agglomerátumok az

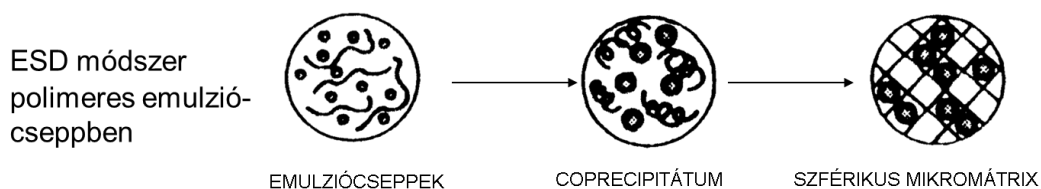


összenyomási vizsgálatok során nagyobb fokú képlékeny alakváltozást mutattak az egyedi kristályhoz képest, de az ESD-vel készült agglomerátumok még ennél is jobb tulajdonságokkal rendelkeztek, ami hasonló a Maghsoodi [40] által leírt tapasztalatokhoz.

Az ESD folyamatnál több esetben nehéznek bizonyult az emulzió fenntartása megfelelő emulgeátor alkalmazása nélkül. Az én munkáimban, egyik esetben sem volt szükség emulgeátor alkalmazására. Az SA folyamatot a kivitelezhetőség szempontjából sokkal rugalmasabbnak találták, mivel egyszerűbb oldószerrendszert igényel, és finoman hangolható a kezdeti szemcseméret is és az agglomerátumok tulajdonságai is. A híd-folyadék kiválasztása ugyanakkor sokszor időigényes munkafolyamat.

A polimerrel együtt agglomerálás az egyszerű SA módszerrel nehezebben megoldható, ha az összetevők különbözőképpen nedvesednek, ezért ilyen esetben inkább az ESD módszert alkalmazzák, annak ellenére, hogy az együtt agglomerálás általában csak adott jó és rossz oldószer térfogataránynál történik meg. Perumal és munkatársai [41] kimérték a fázisdiagramot ibuprofen, etanol és Eudragit összetevőkre azzal a céllal, hogy megtalálják azt az összetétel-tartományt, ahol az ibuprofen mikrokapszulázható Eudragit polimerrel. A megfelelő tartományon kívül az Eudragit egy tömbfázisban válik ki, nem képződnek szemcsék. Vizsgálták a képződött részecskék szemcseméretének a keverési sebesség függvényében való változását, és annak csökkenését tapasztalták. A tapasztalatuk segített a későbbiekben a saját rendszeremben lejátszódó folyamatok mechanizmusának felállításában. Megállapították, hogy a fázisdiagram ismerete segítségünkre lehet a kívánatos hatóanyagleadási profil kialakításában is.

A polimer jelenlétében történő szférikus agglomerációkor, miközben a hatóanyag rossz oldószerében feloldott polimert a hatóanyag oldatához adagoljuk, mikrokapszulázás történik, különböző szférikus kompozit részecskék alakulhatnak ki, úgymint szférikus nanomátrix, szférikus és lyukas mikrogömbök (2.4. ábra).



2.4. ábra. A polimeres szférikus agglomeráció lépései

A polimeres szférikus kristályosítási technikát Cui és munkatársai [42] alkalmazták akril polimer mikrorészecskék fejlesztésére, kontrollált hatóanyagleadás céljából. A

modellanyagként használt acebutolol hidroklorid elsősorban vízoldható, de etanolban is oldódik bizonyos mértékben. Az agglomerátum így a hatóanyag etanos oldatából kiindulva víz híd folyadék segítségével létrehozható. A modell hatóanyagot és az Eudragit RS100 polimert feloldották acetonnal és etanolban, ez utóbbi tartalmazott egy kevés vizet és ezt az összetett oldószerkeletet használták jó oldószerként. Az így készült polimer oldatot, benne a hatóanyaggal, öntötték kevertetés mellett ciklohexánba, mint rossz oldószerbe, ezzel kialakítva a kvázi-emulziót. A cseppek a hatóanyag kiválásával és a polimer egyidejűleg történő koacerválódásával szilárdultak meg. Nagyobb etanol mennyiség mellett csökkent a híd folyadékként viselkedő víz mennyisége, amely külön-külön diszpergált hatóanyagot és polimer port eredményezett. A túl nagy víz térfogatarány mellett pedig nem szilárdultak meg a viszkózus cseppek. A kialakuló agglomerátumok porozitása és a hatóanyag nagymértékű vízoldhatósága miatt az utólagos bevonat nélküli szemcsék nem tudtak nyújtott hatóanyagleadást biztosítani. Az agglomerátumokra rávihető volt olyan bevonat réteg, amely már biztosította a nyújtott hatóanyagleadást. Mint a példában is egy több oldószer, hatóanyagot és polimert is tartalmazó rendszerben a megfelelő összetétel meghatározása összetett feladat és várhatóan igen szűk az összetétel-tartomány, ahol a kívánt minőségű szférikus agglomerátumokat nyerhetjük. Ezen az irodalmi példán keresztül szerettem volna érzékeltetni, hogy esetemben is milyen összetett rendszert kellett kikísérletezni, és ennek megfelelően a szférikus agglomerátumok előállítására a példához hasonlatosan csak igen szűk koncentrációtartomány alkalmas.

Az irodalomban fellelhető azon publikációknak, amelyek a szemcsék előállítása mellett a szemcsék tulajdonságainak vizsgálatán keresztül a képződés mechanizmusával is foglalkoznak komoly jelentősége van a szférikus agglomerációs kísérletek tervezhetőségében. Egyrészt a szükséges termék tulajdonságoknak, másrészt az összetevők oldhatóságának és egymással való kompatibilitásának kell meghatározni, hogy a két módszer közül melyiket választjuk a szférikus agglomerátumok előállításához.

### **2.4.4 Szemcseméretet befolyásoló tényezők**

A felhasználás szempontjából az egyik fontos tulajdonsága az előállított szemcséknek a szemcseméretük, ezért érdemes áttekinteni az irodalmat abból a szempontból, hogy hogyan befolyásolhatjuk a képződött agglomerátumoknak a méretét.

#### 2.4.4.1 A híd-folyadék-adagolás módjának befolyásoló szerepe

A híd-folyadék adagolási sebességének növelésével csökken az agglomerátumok szemcsemérete. A nagyobb adagolási sebesség nagyobb túltelítést eredményez, és így kisebb szemcseméret érhető el. A gyors adagolás és a gyors keverés a híd-folyadék kisebb cseppekben történő eloszlásával eredményezi a szám szerint több, de kisebb méretű agglomerátum képződését.

Sano és munkatársai azt tapasztalták, hogy olyan anyagnál, aminek több polimorf módosulata lehetséges, függ a képződött polimorf típusa a híd-folyadék adagolásának módjától, vagyis az oldószer-összetételtől a gócképződés pillanatában [43]. Az agglomerátumok méretére a legnagyobb hatással bíró paraméter a híd-folyadék mennyisége, ennek a fontosságára Blandin és szerzőtársai közleménye hívta fel a figyelmet [44]. Munkájukban a műveleti paraméterek hatását vizsgálták a végső agglomerátum átlagméretére. A vizsgált rendszerükre, vagyis szalicilsav kloroform-víz rendszerben való agglomerálására felállítottak egy empirikus összefüggést, amely alapján a híd-folyadék:szilárd anyag aránya a legmeghatározóbb paraméter az agglomeráció folyamatában.

A korábbi tanulmányokban Kawashima és munkatársai [45] megfigyelték, hogy a növekvő híd-folyadék aránnyal növekedés tapasztalható az agglomerátumok méretében. Usha és munkatársai hármasszó oldószerrendszert alkalmaztak az aceklofenák hatóanyag szférikus kristályosítására, amelyben az aceton volt a jó oldószer, a diklór-metán a híd-folyadék és a víz a rossz oldószer [46]. A hatóanyag aceton–diklór-metán oldószerkeverékkel készült oldatát nagyobb mennyiségű vízbe öntve folytonos keverés mellett megtörtént a kristályosodás. Mind a híd-folyadék mennyisége, mind a keverési sebesség kritikus paraméternek bizonyult a kristályosodás szempontjából. A nem elegendő híd-folyadék a kristályoknak a nem megfelelő nedvesedéséhez vezet, ezért szabálytalan alakú és kisebb méretű agglomerátumokat kaptak, míg a túl sok diklór-metán nagy és szabálytalan agglomerátumokat eredményezett. A mostanában született tanulmányok a híd-folyadék térfogatának arányát veszik figyelembe a szilárd anyag térfogatához képest. Ennek az aránynak a szférikus agglomerációhoz megfelelő tartománya nagymértékben függ a tanulmányozott rendszertől, melynek határait tapasztalati úton határozzák meg. Megmutatták, hogy létezik a térfogataránynak egy kritikus tartománya. A kritikus tartomány alatti mennyiségben alkalmazva a

hídfolyadékot, vagyis kevés nedvesítő folyadék esetében, nem történik agglomeráció, míg nagyobb térfogataránynál a termék lágú és krémszerű állagú lesz. Csak a tartományon belül maradva valósítható meg az agglomeráció sikeresen [47].

Kawashima és munkatársai [23] írták le, hogy a kritikus hídfolyadék/szilárd anyag arány (BSR = bridging liquid/solid ratio) tartományon belül a szalicilsav agglomerátumok mérete jellemzően nőtt a növekvő BSR értékkel. Ugyanerre a következtetésre jutottak Subero, Thati, Blandin és szerzőtársaik [32, 29, 44, 48]. Azt is megállapították, hogy a növekvő BSR az agglomerátumok deformáltságához vezet. Thati [29] azonban olyat is tapasztalt, hogy a BSR növelése sokkal szférikusabb agglomerátumokat eredményezett, ill. az agglomerátumokat összekötő erő is növekedett. Ez akkor következhet be, ha kritikus tartományon belül változtatjuk a BSR arányt. Subero [48] kísérleteiben a kötőfolyadék arányának a kritikus tartományon belüli növelése a szalicilsav agglomerátumok méretének szűkebb eloszlását eredményezte.

A BSR hatása hasonlatos lehet a kötőanyag/szilárd anyag arány szerepéhez a granulálásban. Ha nem elegendő a kötőanyag, akkor kevésbé vagy egyáltalán nem történik meg a granulálás. Ha túl sok a kötőanyag, akkor zagy (sűrű szuszpenzió) képződhet [49].

Kawashima és munkatársai [50] azt is leírták, hogy a kisebb szemcsék kevesebb hídfolyadékot igényelnek nagyobb agglomerátum előállításához, mivel a vonzó kölcsönhatások nagyobbak a kisebb szemcsék és hídfolyadék között, mint a nagyobb szemcsék esetében.

### **2.4.4.2 A hőmérséklet hatása**

A hőmérsékletnek szignifikáns hatása van az agglomerátumok méretére. A hőmérsékletnek kevés kivételtől eltekintve jelentős hatása van az anyagok oldhatóságára, és így a különböző oldószerrendszerekben kialakuló túltelítésre. Következésképpen a hőmérsékletnek hatása van a kezdeti kristályosodásra, majd a kialakuló elsődleges szemcsék tulajdonságaira, és ebből adódóan a szférikus agglomerálódás folyamatának alakulására is. Alacsonyabb hőmérsékleten a magasabb túltelítés elősegíti a göcképződést kisebb kristályokat eredményezve, míg magasabb hőmérsékleten a kisebb túltelítés a kristálynövekedésnek kedvez.

A hőmérséklet kezdeti emelkedésével csökken az agglomerátumok szemcsemérete. A további hőmérsékletemeléssel az agglomerátumok mérete növekszik, és az eloszlás is megváltozik. Az oldott anyag oldhatóságváltozása mellett a különböző oldószerrendszerekben bizonyos összetételeknél az oldószer oldhatósága is változhat a hőmérséklettel [27].

Ha a hőmérséklet emelkedésével a híd-folyadék oldhatósága csökken az oldószerrendszerben, és ezzel egy időben a kivált anyag mennyisége is csökken, akkor a látszólag több híd-folyadék a kevesebb szilárd anyagot nagyobb agglomerátumokká ragasztja össze [50, 51]. Egyúttal az agglomerátumok szfericitása növekszik, és ez a tömbfázis sűrűségének a csökkenését eredményezi.

A kicsapáson alapuló szférikus agglomeráció esetében hőmérséklet-különbség alkalmazása a jó oldószer és a kicsapószer között növeli a kezdeti túltelítés mértékét, ami kisebb szemcseméretet eredményez. A saját munkámban a  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  oldhatóságának hőmérsékletfüggését én is kihasználtam a kezdeti túltelítés növelésére.

Minél nagyobb a szilárd anyag szemcse koncentrációja, annál gyorsabb az agglomeráció folyamata a nagyobb számú sikeres ütközések miatt, ami a végső agglomerátum méretének növekedését eredményezi. Egy adott szemcse koncentráció fölött már nincs további változás a végső méretben.

A szilárd anyag koncentrációjának növekedésével a végső termék porozitása csökken. Az ütközések számának növekedésével növekszik a termék tömörsége. Subero és munkatársai [48] készítettek egy tanulmányt, amelyben a közönséges kereskedelmi forgalomban elérhető szalicilsav részecskéket hasonlították össze az általuk kicsapással előállított szemcsékkel. A kereskedelmi forgalomban lévő szemcsék jellemzően nagyobbak, mint a precipitáltak, ezzel együtt nagyrészt tús morfológiájúak. A kereskedelmi forgalomból származó részecskéket nem lehetett ugyanúgy agglomerálni, mint az általuk precipitáltakat. Az agglomerátumok kisebbek és kevésbé szférikusak lettek. Véleményük szerint azért, mert a tús kristályokat nehezebb agglomerálni, mint a szimmetrikusabb szemcséket. Emellett a nagyobb kezdeti részecskeméret kisebb felületet eredményez, amely csökkenti az ütközések hatékonyságát és növeli az agglomerátumok deformáltságát.

#### 2.4.4.3 A keverési sebesség és a tartózkodási idő hatása

A keverési sebesség közvetlen hatással van a kialakuló agglomerátumokra a rendszerben fellépő hidrodinamikai erőkön keresztül. Elsődlegesen a keverési sebességnek legalább a megfelelő mértékű átkeveréshez elegendőnek kell lennie. A keverési sebesség növelésével az ütközési valószínűség nő, amely elősegíti az agglomerátumok növekedését. A túl nagy keverési sebesség az agglomerátumok tördelődéséhez vezethet. Ezek ismeretében ki kell választanunk egy keverési tartományt, amelyen belül több kísérletet elvégezve határozhatjuk meg a megfelelő keverési sebességet. A kezdeti keverési sebesség nagyon fontos. Subero és munkatársai [48] leírták a keverési sebesség hatását a hídfolyadék cseppméretére és eloszlására. A növekvő keverési sebességgel csökken a hídfolyadék cseppmérete, amely a kezdetben formálódó részecskék és agglomerátumok méretére is hatással van. A túl lassú keverés eredményeképpen összecsapzódhatnak a kristályok a megfelelően szétosztott hídfolyadék hiánya miatt. A keverési sebesség növelheti az ütközések számát és valószínűségét, de csökkentheti az érintkezési időt. A növekvő keverési sebességgel egyúttal csökken a szükséges hídfolyadék mennyisége, mivel homogénebb annak eloszlása. A keverési sebességgel növekvő agglomerátum-méret a viszonylag kis keverési sebesség tartományában figyelhető meg. Míg az agglomerátumok méretének csökkenése a viszonylag nagyobb keverési sebességek esetében figyelhető meg. Zhang és munkatársai [52] emellett szélesebb agglomerátum-méreteloszlást tapasztaltak a növekvő keverési sebességgel. Blandinék [44] a keverési sebességnek a porozitásra és az összenyomhatóságra vonatkozó hatásáról írtak. A keverő sebességét növelve az agglomerátum porozitása csökken, tömörebb lesz az agglomerátum, nagyobb nyomószilárdsággal. Az agglomerátum mérete fokozatosan nő a keverés időtartamával, majd eléri az egyensúlyi méretét és nem nő tovább. Ezzel együtt a porozitás csökken, a szfericitás nő.

Az egyéb tulajdonságokat befolyásoló műveleti paraméterek hatásait is összefoglalva a következőket állapíthatjuk meg. A hídfolyadék adagolásának módjával, ami meghatározza az oldószer-összetételét a göcképződés pillanatában, befolyásolhatjuk a képződött hatóanyag kristályok polimorf módusulatának típusát. A hőmérséklet növelésével az agglomerátumok szfericitása növekszik, és ez a tömbfázis sűrűségének csökkenését eredményezi. Minden olyan paraméterrel, amely a részecskék ütközésének

számát növeli, úgymint a nagyobb szilárd anyag koncentráció, a magasabb keverési sebesség és a hosszabb keverési időtartam, a végső termék porozitása csökken, vagyis növekszik a termék kompaktsága, ami nagyobb nyomószilárdsággal jár.

### **2.4.4.4 Az adalék anyagok szerepe a szemcseméret kialakításában**

Az adalékok közül a keresztköthető polimerek részt vehetnek a gélesítésben, és növelhetik a kötés mechanikai erősségét. A nedvesítő reagensek, úgymint a PEG vagy bizonyos polimerek, amelyek elektrosztatikus kölcsönhatásban vannak a kivált anyaggal, növelik a kötőerőket, mielőtt a folyadék hidak megszilárdulnak. A korábbi cikkekben egyrészt azzal a céllal használtak adalékokat, hogy pl. a kialakuló kiindulási emulziót stabilizálják, másrészt, hogy az oldószer diffúziót elősegítsék a jó és a rossz oldószer kölcsönhatásának befolyásolásával az adalék hatása révén. Emellett a hatóanyag kapszulázása céljából is alkalmaztak polimereket, hogy befolyásolni tudják a hatóanyagleadás sebességét. Ribardiere és munkatársai [31] háromféle polimer adalékanyag hatását tanulmányozták aceton-víz rendszerben kialakított mikrorészecskére. A polimer adalékanyagok jó és rossz oldószerben egyaránt oldódó, csak a jó oldószerben és végül egyikben sem oldódó komponenseket jelentettek. A legjobb eredményt a jó oldószerben oldódó etil-cellulózzal érték el, mellyel finoman szabályozni tudták az oldószer diffúzióját. Megállapították azonban, hogy a nagy viszkozitású polimer oldatok nem segítik az agglomerátumok kialakulását, sőt lassítják mind a kristályosodást, mind az agglomerációt.

## **2.5 Szemcseképzés emulziós módszerekkel**

### **2.5.1 Emulziós oldószer-elpárologtatásos módszerek**

Az egyszerű emulziós oldószer-elpárologtatásos mikrokapszulázás elsősorban a nem vízoldható hatóanyagokra használható megfelelő kapszulázási hatékonysággal. A vízoldható anyagok esetében ez a módszer kis hatékonyságú, ezért erre az esetre dolgozták ki az összetett emulziós módszert. A hatóanyag hidofil-hidrofób jellegétől függően döntjük el, hogy a polimer szerves oldószeres oldatával egyszerű, ill. összetett emulziót alakítunk-e ki.

Az egyszerű emulziós módszer kivitelezésekor a szerves oldószerben oldható anyagot a szintén szerves oldószerben oldható polimer oldatában oldjuk fel. Az így kialakított szerves fázist különböző felületaktív anyagok (pl. Tween 80, PVA, PMAA (poli(metakrilsav) Na-sója) vizes oldatában emulgeáljuk. Végül atmoszférikus nyomáson vagy vákuumban intenzív keverés mellett elpárologtatjuk (oldószer-elpárologtatásos) vagy nagy térfogatú vizes fázisba diffundáltatjuk (oldószer-diffúziós módszer) a szerves oldószert.

Az összetett emulzió készítésekor a vízzoldható hatóanyagot vízben vagy puffer oldatban oldjuk, és ezt az oldatot emulgeáljuk a polimer szerves oldószeres oldatában. Az így kialakított víz az olajban emulziót ismét emulgeáljuk, most egy külső felületaktív anyagot tartalmazó vizes fázisban, ezzel létrehozva az összetett emulziót. A szerves oldószert az egyszerű emulziós oldószer-elpárologtatásos módszernél említett módon távolítjuk el. Az emulziós módszerek előnye egyrészt az eljárás egyszerűségében rejlik, másrészt a kétféle módszer lehetővé teszi mind nanorészecskék, mind mikrorészecskék előállítását.

### **2.5.1.1 Az összetevők megválasztása**

A hatóanyag oldhatóságától függően annak mikrokapszulázásához választhatjuk az egyszerű, ill. összetett emulziós módszert. Nem vízzoldható anyag esetében a kapszulázáshoz mind a kapszulázó polimert, mind a hatóanyag és a polimer közös szerves oldószert úgy kell megválasztani, hogy az oldószer elpárolgása következtében kicsapódó polimer megszilárdulása kellően gyors legyen a sikeres mikrokapszulázáshoz. A kapszulázás eredményessége növelhető mag-héj szerkezet létrehozásával is.

A mag-héj szerkezet kialakítása, mint ahogy azt többek között Loxley és munkatársai [53] megmutatták pl. a folyadék állapotú paraffin kapszulázásakor, az egyszerű emulziós módszer esetében a különböző fázishatárokon kialakuló felületi feszültség viszonyoktól függ. Ezeknek a felületi feszültség viszonyoknak a tudatos alakítása nem egyszerű feladat, mert az alkalmazott felületaktív anyag minőségét és oldatának koncentrációját úgy kell megválasztani, hogy a PCM-mel kialakuló határfelületi feszültség a lehető legnagyobb legyen, amellett, hogy még kellő mértékben emulgeálni tudja a szerves fázist a vizes fázisban.



Bodmeier és munkatársai közleményükben [54] az oldószer kiválasztás szempontjait tárgyalják poli(tejsav) mikrorészecskék esetére, és az alábbiakban összefoglalt megállapításokat teszik. A mikrogömbök kialakulásához a polimer jó oldhatósága egy viszonylag nagy tenziójú szerves oldószerben még nem elegendő feltétel. Általánosságban az oldószernek minél nagyobb az oldási képessége, annál lassabb a polimer precipitációja és annál több rossz oldószerre lesz szükség a polimer kicsapásához. A polimer annál hosszabb ideig van oldott állapotban, és annál lassabban válik ki, minél jobb oldószerét alkalmazzuk. A polimer kiválás sebességét a szerves oldószer vizes oldhatósága is meghatározza. A PLA polimer esetében a diklór-metán a legalkalmasabb a cikkben vizsgált oldószerek közül. A diklór-metán vizes oldhatósága és a gőztenziója is a legnagyobb, azaz kisebb energia kell az elpárologtatáshoz. A kis vízoldhatóságú szerves oldószerek nagyon lassan diffundálnak át a vizes fázisba, így a hosszú idő alatt a hatóanyag is ki tud diffundálni a nem megszilárdult csepp felületén keresztül a külső fázisba. A polimer a jó oldószerében kiterjedt állapotban van, ezért megakadályozhatja a hatóanyag kidiffundálását a vizes közegbe. A hatóanyag jó oldószereként választott szerves fázisnak egyben a polimert is jól kell oldania, de csak annyira, hogy ne legyen nagyon lassú annak kiválása. Ennek megfelelően a polimer kicsapódásának sebessége oldószerkeverékekkel optimalizálható. Az oldószerkeverékben a kismennyiségű rossz oldószer segítheti a fázisszétválást, míg a vízzel elegyedő segédoldószer hatására gyorsabb lesz a polimer kicsapódás, így javítva a kapszulázási hatékonyságot. Ilyen segédoldószer lehet pl. az acetone.

A gyógyszerhatóanyagok mikrokapszulázásához választandó polimer esetében is több szempontot kell figyelembe venni. A polimernek kompatibilisnek kell lennie a maganyaggal, és nem szabad reagálniuk egymással [11]. Ismernünk kell a polimer tulajdonságait, miszerint milyen típusú és szemcseméretű részecske képzésére hajlamos. A polimerhéj anyagát aszerint kell megválasztanunk, hogy flexibilisnek, stabilnak, erősnek vagy permeábilisnak kell-e inkább lennie. Emellett fontos kérdés, hogy ha egy gyógyszerhatóanyag mikrokapszulázását tekintjük, milyen kioldódási profilt szükséges elérni az adott anyag hatékonyság növekedése szempontjából. Törekednünk kell olyan mátrixanyag használatára, ami nem toxikus, legalább biokompatibilis és lehetőleg biodegradábilis [55]. Vannak anyagok, amelyeknek rossz oldhatósága rossz biohasznosulást eredményez, ezért az oldhatóság növelés a feladat, míg a szervezet

védekezőrendszere által könnyen eliminálható anyagok esetében a nyújtott hatóanyagleadás a kitűzött cél. Általánosságban mind hidrofil, mind hidrofób polimer vagy ezek keveréke is alkalmazható kapszulázási eljárásokban. Egy permeálisabb polimerfilm esetében a hatóanyag molekula könnyebben diffundál ki a körülvevő közegbe, így gyorsabb lesz a diffúzió útján történő hatóanyagleadás [56]. A polimer kristályossága is befolyásolja, hogy milyen minőségű kapszulákat kapunk. A tesztoszteron propionát kapszulázására alkalmasabb az amorf poli(D, L tejsav), mint a kristályos poli(L-tejsav) [57]. A nagyobb molekulatömegű polimer a rosszabb oldhatósága miatt gyorsabban kicsapódik az oldószer elpárologatásával, és ez a gyors kiválás porózusabb szemcséket eredményez.

A fázisváltó hőtároló anyagok esetében a képződött polimerhéjnak vízzárónak és kellően erősnek, de emellett rugalmasnak kell lennie a különböző felhasználáskor fellépő mechanikai erők okozta behatások kiküszöbölésére.

Az emulzió előállításához és stabilizálásához elengedhetetlen a megfelelő tulajdonságokkal bíró emulgeátor oldatának használata. Az ideális emulgeálószer általában polimer vagy oligomer típusú vegyület, amely oldhatatlan a cseppben (a diszpergálandó közegben) és csak kevésbé oldódik a diszpergáló közegben. Minél nagyobb az emulgeátor koncentrációja, és ezzel együtt a külső vizes fázis viszkozitása, annál jobban stabilizálódik az emulziócsepp, és így kisebb lesz a részecske szemcsemérete. Az emulziócsepp stabilitását befolyásolja a kapszulázó polimer koncentrációja és molekulatömege is, amely hatással van a szerves fázis viszkozitására. Ennek megfelelően kell megválasztani az emulgeátor koncentrációját a megfelelő méretű és morfológiájú szemcse előállításához [58, 20].

### 2.5.2 Szemcseméretet befolyásoló paraméterek

Arshady és szerzőtársai 1990-ben megjelent összefoglaló cikkükben [59] hivatkoznak egy kvalitatív egyenletre, amellyel közelíthetjük a mikrogömbök szemcsemérete és az előállítási paraméterek közötti összefüggést.

$$\bar{d} \propto K \frac{D_v R v_d \gamma}{D_s N v_m C_s}$$

A mikrogömbök átlagos mérete ( $\bar{d}$ ) egyenes arányban van a reakcióedény átmérőjével ( $D_v$ ), a csepp fázis és a szuszpenziós közeg térfogatarányával ( $R$ ), a csepp fázis

kinematikus viszkozitásával ( $v_d$ ) és a két nem elegyedő fázis közötti felületi feszültséggel ( $\gamma$ ). Fordítottan arányos a keverő átmérőjével ( $D_s$ ), a keverési sebességgel ( $N$ ), ill. a keverési „energiával”, a diszpergálási közeg viszkozitásával ( $v_m$ ) és az emulgeátor koncentrációjával ( $C_s$ ). A  $K$  egyéb készülékfüggő paramétereket magába foglaló állandó.

A szemcseméretet nagyrészt az emulzióképzéskor kialakuló emulziócseppek mérete befolyásolja. Az emulziócseppek méretét csökkenthetjük, ha kis térfogatú a diszpergált fázis (csepp fázis), nagy a csepp fázis és a szuszpenziós közeg térfogataránya ( $R$ ) és emellett intenzív keverést alkalmazunk ( $N$ ). Intenzív keverésként használhatunk ultraturaxos homogenizálást (legalább 15 000 fordulat/percet), illetve ultrahangos kezelést. A szerves és a vizes fázis határán kialakuló határfelületi feszültséget ( $\gamma$ ) felületaktív anyagok jól megválasztott koncentrációjú oldatával ( $C_s$ ) csökkentve tovább csökkenthetjük az emulziócseppek méretét [60, 61]. Az emulziós rendszerekben az egyik leghatékonyabb emulgeátornak a PVA bizonyult [62].

A kapszulázó polimer koncentrációjának és molekulatömegének növelésével nő a csepp fázis viszkozitása ( $v_d$ ), vagyis nő a képződött mikroszemcsék mérete [63]. Ha a kapszulázási hatékonyság érdekében nagyobb polimer koncentrációt kell alkalmaznunk, akkor az egyéb paraméterek változtatásával érhetjük el az optimális szemcseméretet. Megoldás lehet pl., hogy az ultrahangos kezelés révén nagyobb energiát ( $N$ ) fektetünk be az emulzióképzéskor, így tördelve kisebb cseppekre a diszpergált fázist. Bár a külső folytonos fázis viszkozitásának adalékanyagokkal való növelésével csökkenthető lenne a szemcseméret, ezt a módszert nem szokás alkalmazni, mert később megnehezítené a szemcsék elválasztását [58].

A polimer/hatóanyag arány növekedésével is nő a szemcseméret – ugyancsak a polimer oldat viszkozitásának növekedése miatt – de ez a polimer oldat koncentrációjának növekedéséhez köthető elsősorban és kevésbé a hatóanyag koncentrációjának csökkenéséhez [56]. A polimer oldat viszkozitása befolyásolható a hőmérséklet változtatásával is. A hőmérsékletemelés hatására csökkenő viszkozitás nagyobb szemcseméretet is eredményezhet.

A folytonos fázis és a diszpergált fázis térfogatarányának ( $R$ ) növelésével könnyebben eloszlatható a diszpergált fázis, így kisebb emulziócseppek alakulhatnak ki. [62].

A reaktor felépítése is fontos paraméter a szemcsék kialakulásában. Az oldalán terelő lemezekkel ellátott hengeres reaktor használatával viszonylag kisebb méretű mikrokapszulákat és nagyobb termék mennyiséget lehet kinyerni. Ha oldallemezekkel látjuk el a reakcióedényt, akkor csökken a reaktor átmérője ( $D_v$ ), (amellyel egyenes arányosan változik a termék szemcsemérete), így kisebb cseppek jönnek létre. Emellett az oldallemezek csökkentik a keverés során kialakuló turbulenciát is a reakcióedényben, ez pedig növeli a cseppek stabilitását, vagyis csökkenti az összecsapódás mértékét [64].

A keverés az egyik legfontosabb paraméter a mikroszemcsék szemcseméretének szabályzásában. A keverés hatását több egyéb paraméter is befolyásolja, mint pl. a reaktor geometriája és a reaktor és a keverő átmérőjének aránya [58]. A keverési sebesség ( $N$ ) különösen akkor fontos, ha nem nanorészecskét állítunk elő ultrahangozással, hanem mikrorészecskéket keveréssel. A keverési sebesség növelésével csökken a szemcseméret.

A szemcsképzést emulzióból általában szobahőmérsékleten végezzük és atmoszférikus nyomáson. Az oldószer elpárologtatáskor alkalmazott nyomásértékek hatására vonatkozólag kevés tanulmány született, így nehéz egyértelmű következtetést levonni. Meng és szerzőtársai [65] szerint különböző nyomáson készített mikrorészecskék szemcsemérete hasonló, míg Chung és szerzőtársai [66] szerint csökkentett nyomáson kisebb szemcseméretű mikrorészecskék képződnek. Atmoszférikus nyomáson a képződött szemcsék porózusak és durva felületűek. Az oldószer elpárolgás sebessége csökkentett nyomáson túl gyors, így a polimernek nincs ideje kristályosodni, amorf polimer mátrix keletkezik, ebből kifolyólag a polimerszemcsék felülete látszólag simább, mint az atmoszférikus nyomáson létrehozott részecské [58].

Nanorészecskék előállíthatók a fenti módszerekkel, azzal a változtatással, hogy pl. a víz/olaj/víz ( $v_1/o/v_2$ ) összetett emulzióban az ultrahangos kezelés idejét és intenzitását a célnak megfelelően kell megválasztani. A korábban tárgyalt paraméterek hasonlóképpen befolyásolják a nanorészecskék szemcseméretét, mint a mikrorészecskékét. A fenti a szemcseméret alakulására vonatkozó összefüggések a kapszulázandó anyagtól függetlenül, ami lehet gyógyszerhatóanyag, vagy fázisváltó hőtároló anyag is ugyanúgy érvényesek.

A mikrorészecskék végső szemcsemérete a vizes szuszpenziójukban lejátszódó aggregáció mértékétől is függ, amit a kapszulázó polimerek hidrofób-hidrofil jellege

befolyásol. Az aggregáció megelőzésének egyik módja a hidrofób PLGA polimer hidrophil jellegűvé alakítása pegilálással, aminek hatékonyságát növeli a PEG származék molekulatömegének növelése, amellyel a védőréteg vastagsága növekedhet. A PLGA szemcsék sikeresen bevonhatók emellett pl. PLA-PEG kopolimerrel is [67].

### **2.5.3 Kapszulázási hatékonyságot befolyásoló paraméterek**

Az egyszerű emulziós technikával sikeresen mikrokapszulázhatók hidrofób hatóanyagok, de a hidrophil természetű bioaktív anyagok esetén a módszer hatékonysága jóval gyengébb. Bizonyos, elsősorban nagyméretű hidrophil anyagok kapszulázása összetett emulziós módszerrel történhet hatékonyan. A legfőbb probléma a vízoldható hatóanyagok gyors kidiffundálása a külső vizes fázisba, ami drámai mértékben csökkenti a kapszulázási hatékonyságot.

A kapszulázási hatékonyság növelése alapulhat a kapszulázandó hatóanyag oldhatóságának befolyásolásán, a hatóanyag és a kapszulázó polimerek különböző típusú kölcsönhatásán, és a külső vizes fázis irányába történő lassabb diffúzió, amelyet a közegek viszkozitásának növelésével lehet elérni.

A kapszulázási hatékonyság mértéke nagymértékben függ a hatóanyag vízoldhatóságától. Nagyobb vízoldhatóságú hatóanyagok esetében javítani lehet a kapszulázási hatékonyságot, pl. ha pH állítással elérhető a hatóanyag oldhatóságának csökkenése a külső vizes fázisban. Bodmeier és szerzőtársai munkájukban [54] leírták, hogy a kinidin-szulfát oldhatósága számottevően csökken, ezzel együtt a kapszulázási hatékonyság nő, ha a pH-t 7-ről 12-re növeljük. Tapasztalataik szerint a kinidin-szulfát kidiffundálása a külső vizes fázisba csak az emulzifikálás első 1 perce alatt zajlik, mivel a polimer gyors kicsapódása a felületre ezután megakadályozza a hatóanyag további kijutását, ezzel segítve a nagyobb kapszulázási hatékonyság elérését. A pH beállítás akkor is megoldás a kapszulázási hatékonyság javítására, ha ezzel a kapszulázó polimer viselkedése befolyásolható úgy, mint pl. poli(metil metakrilát) metakrilsavval alkotott kopolimere esetében [68].

PVP jelenlétében a külső vizes fázisban a kialakuló szemese hidrofób tulajdonságú, és ezzel együtt nagyobb az elérhető kapszulázási hatékonyság is [69]. Cohen és munkatársai fehérje PLGA polimerbe való kapszulázásakor külső fázisként diklór-

metánnal telített PVA oldatot alkalmaztak a szerves oldószer diffúziójának a visszaszorítására, lassítására és a kapszulázási hatékonyság növelése érdekében [70].

Az oldhatóság megszabja, hogy mennyi hatóanyag vihető be az adott oldószerrel, ill. annak is határa van, hogy mennyi hatóanyag fér el egy adott méretű kapszulában. A hatóanyag koncentrációjával növelhető a kapszulázott hatóanyag aránya, feltételezve, hogy a külső fázisban ennek vesztesége állandó. Nagy hatóanyag-bevitel esetén a kapszulák porózusabbak, és sokkal kevésbé lesznek szabályos alakúak [71, 72]. Egy permeábilisabb polimerből a hatóanyag molekula könnyen kidiffundál az őt körülvevő közegbe már az előállítási folyamat során is, melynek eredménye a kisebb kapszulázási hatékonyság [56].

Állandó vizes fázis térfogatnál a nagyobb polimer/szerves oldószer arány esetében, amely valójában nagyobb polimer koncentrációt és nagyobb oldat viszkozitást jelent, a tapasztalatok alapján nő a kapszulázott hatóanyagtartalom. Yang és munkatársai, illetve Andre-Abrant és szerzőtársai egyaránt megerősítették, hogy nagyobb polimer koncentrációt alkalmazva nagyobb kapszulázási hatékonyság érhető el [73, 63]. Adott kapszulázó polimer esetében a nagyobb molekulatömegű választva szintén nagyobb kapszulázási hatékonyság tapasztalható [74, 75]. A polimer/hatóanyag arány növekedésével nő a kapszulázási hatékonyság, mivel nő a polimer oldat viszkozitása, amely akadályozza a hatóanyag kiszökését a külső fázisba. A polimer és a hatóanyag koncentrációjának együttes emelkedése is nagyobb hatóanyagbezárást hoz [56].

Az atmoszférikus nyomáson készített szemcsék polimer mátrixanyaga kristályosabb, mint a csökkentett nyomáson előállítottaké [76]. Csökkentett nyomáson a mikrorészecskéket amorf polimer mátrix alkotja, amit azzal magyaráznak, hogy az oldószer elpárologtatás túl gyors ahhoz, hogy a polimer kikristályosodjon. A mikrorészecskéknél, amelyekben a polimer mátrix kristályos, a felületük durva, érdes, ezért gyors hatóanyagleadás jellemzi azokat, míg az amorf szerkezetű polimer mátrixból lassabb a hatóanyagleadás és nagyobb a kapszulázási hatékonyság is.

A PLGA termoplasztikus, alifás poliszter, biokompatibilis, biodegradábilis és jók a mechanikai tulajdonságai is. Többek között alkalmas vakcinák, peptidok, proteinek és mikromolekulák hordozó polimerjének [3]. A hatóanyag tulajdonságától függően választhatunk a sav láncvégű és az észter láncvégű PLGA polimerek közül. Savvégű polimerrel kialakítható ionos kölcsönhatás révén nagyobb kapszulázási hatékonyság

érhető el, míg a nem ionos hatóanyag esetében hatékonyabbak lehetnek az észtervégű polimerek. Elektrosztatikus kölcsönhatás révén tehát növelhető a kapszulázási hatékonyság, és ennek mértéke a helyettesítés mértékével beállítható. A doxorubicin hidroxil csoportja is köthető a PLGA karboxil végcsoportjához. Ez utóbbi módosítással a kioldódás lassítható, a nem konjugált hatóanyag 6x gyorsabban oldódik ki, mint a konjugált forma [77, 78]. Az észtervégű polimerek alkilcsoport különbözősége lehetőséget ad az optimális degradációs sebesség kialakítására.

A fázisváltó hőtároló anyag mikrokapszulázásakor más célokat fogalmazzunk meg, hiszen míg a gyógyszerhatóanyagoknak lassan, de távozniuk kell a kapszulákból addig a PCM-eket jó vízzáró, mag-héj szerkezetű kapszulákba célszerű bezárni. A kapszulázási hatékonyság mértéke a mag-héj szerkezet kialakulásától és a kialakuló héj porozitásától függ.

### 2.5.3.1 Leadási kinetika

A gyógyszerhatóanyag tartalmú mikrokapszuláknak a felhasználás szempontjából az egyik legfontosabb jellemzője a hatóanyag kioldódási profilja. A mai kor követelményeinek megfelelően már elvárás a gyógyszerkészítmények felé, hogy nyújtott hatóanyag leadással rendelkezzenek. A mikrokapszulákat a legtöbb esetben először in vitro körülmények között tesztelik, majd ha a formula ígéretesnek mutatkozik lehetőség szerint elvégzik az in vivo teszteket is. Az in vitro tesztek általában az izotónás körülményeknek megfelelően PBS oldatban történnek. Az analízis nehézségei miatt a vérplazmában való vizsgálatok nem igazán elterjedtek. A kioldódás mechanizmusát jelentős mértékben befolyásolja a szemcsék szerkezete.

A kioldódás a kezdeti kioldódáson túl végbemehet diffúzió útján, ill. a polimer bomlása révén vagy a kettő kombinációjával. A diffúzió lejátszódhat a mátrixanyagon vagy a polimerhéjon keresztül. Gyakran előfordul, hogy a hatóanyag kristályok egyrésze a polimer szemcsék felületére adszorbeálódik vagy gyengén kötődik. Ez okozhatja az úgynevezett „initial burst”-öt, a kezdeti nagy hatóanyagleadást [3]. Körültekintőnek kell lenni, nehogy a kezdeti kioldódás olyan nagymértékű legyen, hogy elérjen egy toxikus szintet [79]. A kioldódást a polimer oldaláról befolyásoló tényező a polimer mátrixnak a felületi eróziója, ami történhet adott pH-n bekövetkező oldódásként, sőt enzimbontás révén is. Hosszabb időintervallumon megtörténhet a polimer degradációja is pl. hidrolízis

útján. Ha a hatóanyag kidiffundálása a szemcséből gyorsabb, mint a polimer degradációja, akkor a leadás kinetikáját elsősorban a hatóanyag diffúziójának sebessége határozza meg.

Az oldószer elpárolgásának sebességétől nagymértékben függenek a képződött részecskék tulajdonságai. A nagyon gyors elpárolgás helyi átllyuggatódást eredményezhet a cseppeken és így a keletkező szemcsék sokkal porózusabbak lehetnek. Az extrakciós módszer esetében még gyorsabb az elpárolgás [63]. Szélsőséges esetben a porózus szemcsékből a hatóanyag akár ki is "folyhat".

A PLGA nanorészecskék porozitása szabályozható különböző adalékanyagok alkalmazásával. A pórusok képződését többféleképpen elősegíthetjük, mint pl. pórusképző adalékokkal, ozmózisnyomást indukáló reagensekkel és gáz-habképző reagensekkel. Ha az alkalmazott adalékanyagok, mint pl. a poloxamerek, zselatin, ciklodextrinek, mustárolaj, zsírsavak, PVP stb. gyorsabban jutnak ki a külső vizes fázisba a folyamat során, mint ahogy a PLGA polimerfilm megszilárdulna, pórusok jönnek létre a polimerfilmen [80]. Pórusok alakulhatnak ki NaCl, BSA, PBS jelenlétében is a külső és a belső fázis között fellépő ozmózis nyomáskülönbség miatt [81]. A polimerfilm porozitásán keresztül azonban beállíthatunk egy kívánatosan gyors hatóanyagleadást.

A leadási kinetika befolyásolható a részecske hidrofilitásának növelésével pl. felületmódosítás útján, másrészt a pH érzékeny kapszulázó polimer megfelelő pH-n való alkalmazásával. Más irányból nézve olyan pH érzékeny polimer választásával, amely az alkalmazás helyén oldódik, duzzad, degradálódik.

A PLGA polimert kismértékű immunogenitás jellemzi, biokompatibilis és megjósolható a degradációjának a kinetikája [82, 57]. A polimer általános tulajdonságai ismertek ugyan, de minden esetben számolnunk kell a hatóanyag hatásával ezekre a tulajdonságokra.

A PLGA polimereket tekintve a polimer lánc vizes környezetben az észterkötések hidrolízise útján történő hasadásával degradálódik [83]. A degradáció során a karboxil csoport végű láncok száma növekszik, ez katalizálja a bomlást [84]. A PLGA polimer hidrolízisen keresztül lejátszódó degradációjának mértékét és sebességét befolyásolja a választott polimer molekulatömege, a glikolsav:tejsav aránya, a kristályosság mértéke, a láncvégi csoportja és az üvegesedési hőmérséklete. A kisebb molekulatömegű polimerek



gyorsabban degradálódnak, bomlásukat a szemcsékbe diffundáló víz indítja el. Nagyobb molekulatömegű polimerek esetében a polimer eróziója lassabb folyamat, és így a polimer bevonaton keresztül a diffúzió útján lezajló kioldódás is lassabb.

A kopolimerben a monomerek aránya a polimer kristályosságán túl meghatározza a degradáció sebességét is. Általánosságban, minél nagyobb a glikolsav aránya a polimerben, annál gyorsabb a polimer bomlása. A tejsav sokkal inkább hidrofób karakterű, mint a glikolsav, így a tejsavban gazdagabb PLGA származék kevésbé hidrofíl, és így hidrolízis révén lassabban degradálódik. A PGA nagymértékben kristályos a metil csoportok hiánya miatt. Ha az adott PLGA származék 70%-nál kevesebb glikolsavat tartalmaz, akkor amorf természetű lesz, melynek az olvadáspontja a molekulatömegétől függ. A PLGA származékok üvegesedési hőmérséklete 37 °C felett van. A molekulatömeg és a tejsav mennyiség csökkenésével a polimerek üvegesedési hőmérséklete is csökken. Az üvegesedési hőmérsékletnek szignifikáns hatása van a polimerfilm vízfelvételének sebességére, amit nagymértékben befolyásol a polimerfilm üveg- vagy gumyszerű állapota. Sokkal gyorsabb a diffúzió a filmen keresztül, ha a polimer üvegesedési hőmérséklete 37 °C körül van, mintha jóval magasabb, mint pl. a PLGA 95:5 mintáknál (45°C) [85].

A kezdeti kioldódás kisebb mértékű, sőt el is tűnhet, a polimer és a hatóanyag közti kölcsönhatás miatt, úgy, mint pl. a PLGA szabad karboxilcsoport láncvége és a fehérje hatóanyagok esetében [86]. Előfordult olyan is, hogy pl. a pegilált poli(hexadecil-cianoakrilát)-hoz kovalensen kötött doxorubicin a kötés blokkoló hatása miatt elveszítette terápiás hatékonyságát [87].

A hatóanyag oldaláról meghatározó, a hatóanyag-polimer kölcsönhatás, a hatóanyag molekulatömege, a hatóanyag koncentrációja és a hatóanyag lgP-je [88]. A lgP a hatóanyag-molekula megoszlási hányadosa a vizes és a lipofil fázisok között. Az elméleti hatóanyagbevitel növelésének következménye a hatóanyagleadásra attól függ, hogy a hatóanyag a mikrorészecske belsejében vagy a felületén halmozódik fel. Ha a hatóanyag inkább a szemcse mátrixanyagában kapszulázódik, akkor kisebb mértékű kezdeti kioldódás tapasztalható, ha azonban a szemcse felületére rakódik le, megnövekszik a kezdeti hatóanyag felszabadulás. Feltételezhetően a nagyobb hatóanyag bevitel hatására nagyobb vízfelvételi kapacitása lesz a szemcséknek, ami gyorsabb polimer degradációhoz

vezet. Mao és munkatársai [88] vizsgálatai szerint a hatóanyag molekulatömegének növekedésével nő a kezdeti kioldódás mértéke és gyorsabb a további kioldódás is.

### 2.5.3.2 Felületmódosítás

A nanorészecskéket intravénás adagolás esetén könnyen felismeri az immunrendszer. A szemcseméretén kívül a felület hidrofóbicitása határozza meg a nanoszemcsék fehérje-adszorpciós képességét és ezzel együtt a nanorészecskéknél a vérből való kiürülését. A felületmódosítást kétféleképpen oldják meg, egyrészt a felület hidrofil polimerrel való bevonásával, ill. kopolimer előállításával, amelybe hidrofil egységeket építenek be [89]. Legelterjedtebben a PEG, poloxamer, poloxamin, Tween 80, lauril-éter és kitozán polimereket használják felületmódosításra. Ezek közül is leggyakrabban a pegilálást alkalmazzák. A PEG egy nem ionos, biokompatibilis, hidrofil polimer. A PEG láncnak a kapszulázó polimerhez kötése történhet kovalens kötés útján és a felületre adszorbeálva [90].

A pegilálás hatására kevesebb fehérje vagy enzim adszorbeálódik a felületen, ami a PLGA esetében lassítja a degradációt, mivel a PEG-gel funkcionizált szemcséket nem azonosítja idegen anyagként a szervezet. Li és munkatársai PEG-gel módosított PLGA nanorészecskébe kapszulázott BSA felezési idejét vizsgálták patkányokban, és azt tapasztalták, hogy az 13,6 percről 4,5 órára nőtt a PLGA-ban kapszulázott BSA-hoz képest [91]. A fehérje adszorpció mértéke és ezzel együtt a felületmódosítás hatékonysága is optimalizálható a PEG polimerszármazék molekulatömegével és felületi sűrűségével [92].

Torchilin és szerzőtársai PEG polimerrel borított nanorészecskék tulajdonságait tanulmányozták. A PEG védő hatását a flexibilis és hidrofil polimer kompakt konformációs felhőjének tulajdonították [93]. A minél hosszabb polimerlánc és azok minél nagyobb felületi sűrűsége szükséges a fehérje adszorpciójának visszaszorításához. A felületi borítottságnak nagyobb hatása van a van der Waals vonzóerőkre és a sztérikus taszításra, mint a lánc hosszúságának [20]. A PEG polimernek az optimális felületi sűrűsége fontos szerepet játszik a sztérikus gátlásban. A PEG láncok közötti távolságnak a molekulatömegtől függően van egy küszöbértéke (0,39 nm ( $M_w=200$ ) és 0,33 nm ( $M_w=400$ )), amin túl nem érdemes csökkenteni a közöttük lévő távolságot, növelve a borítottságot, mert nincs további szignifikáns hatása a fehérje adszorpciójának

megakadályozásában [94]. Kopolimer előállításával is elérhető felületmódosítás, ami a polimer degradáció megváltozásán keresztül befolyásolhatja a hatóanyag kioldódását. A PLA polimerbe PEG hidrophil polimerregység beépítésével nyert PLA-PEG-PLA kopolimerből [95] több hatóanyag oldódik ki a PEG mennyiségének és a molekulatömegének növekedésével. A hatóanyagleadás növekedését eredményezi a teljes kopolimer molekulatömegének csökkenése is. A PEG tartalom a kopolimerben mind a szemcse méretét, mind a degradációját befolyásolja.

A terápiás peptideket és polipeptideket gyakran kell adagolni, mert a biológiai felezési idejük rövid. A gyenge diffuzivitásuk és az alacsony megoszlási hányadosuk miatt gyenge a transzportjuk a biológiai membránokon keresztül. A karboxil végcsoporttal rendelkező PLGA származék segíti a magas fehérjebevitelt [96]. Az irodalomból származó információk alapján választottuk a savvégű, különböző monomer arányú és molekulatömegű PLGA polimerszármazékokat és PEG-gel módosított PLGA polimereket az interferon-béta mikrokapszulázására nyújtott hatóanyagleadás céljából.

### **2.5.4 Hexadekán tartalmú mikroszemcsék tulajdonságait befolyásoló előállítási paraméterek**

A fázisváltó hőtároló anyagok kapszulázásakor a felhasználás céljától függően elsősorban mag-héj szerkezet kialakítására törekednek. Ideális esetben a polimerhéjnak víz és gázzárónak kellene lennie. A HD tartalmú polimer szemcséket előállíthatnánk polimerizációval is, azonban Loxley és szerzőtársai [53] munkájából ismert, hogy folyadék halmazállapotú fázisváltó hőtároló anyag egyszerű emulziós módszerrel is kapszulázható mag-héj szerkezetben, ha sikerül a rendszerben biztosítani a megfelelő határfelületi feszültségeket. A kapszulák előállítása megoldható egy egyszerű olaj a vízben emulzió kialakításával, majd az oldószer elpárologtatásával, amely folyamat végén a polimer szemcsék szuszpenzióját kapjuk. A fázisváltó hőtároló anyag mikrokapszulák szemcsemérete és kapszulázási hatékonysága is az emulziós módszer jellemzőinek megfelelően alakul. A fajlagos hőtárolás szempontjából a kapszulázási hatékonyság a fontosabb tényező. Minél több a maganyag mennyisége a polimerhéjhoz képest, annál kisebb a kapszulázási hatékonyság, azonban annál nagyobb a fajlagos hőtárolási kapacitás, így a felhasználás alapján kell keresnünk egy optimumot.

## 2.6 Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki, hogy olyan nanoszerkezetű, kompozit szemcsét alakítsak ki humán szérum albumin modellanyagból szférikus agglomerációval, amely modellrendszere lehet a gyógyszerhatóanyag szemcséinek tablettában való alkalmazásához. Célom volt egyrészt a szférikus agglomerációnak, mint erre alkalmas módszernek a tanulmányozása, másrészt a választott modellanyagra a megfelelő oldószerrendszer kialakítása, és a lejátszódó mechanizmus tanulmányozása révén megfelelő szfericitással és gördülékenységgel rendelkező szemcsék előállítására.

Célul tűztük ki olyan módszerek kifejlesztését építőipari alkalmazáshoz, amelyekkel paraffin és sóhidrát alapú fázisváltó hőtároló anyag tartalmú mikrokapszulákat állíthatunk elő. Annak ellenére, hogy a sóhidrátoknak a paraffinokkal szemben olyan előnyös tulajdonságai vannak, mint pl. olcsóbbak és nem gyúlékonyak, a mai napig a meglévő megoldások mellett is jóval kevesebb példa van fázisváltó hőtároló anyagként való alkalmazásukra, mint a paraffinokéra. Feladatom volt ezért  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  sóhidrát szférikus agglomerációjával, olyan szférikus mag kialakítása, amely a későbbiekben vízzáró polimerhéjjal ellátva mag-héj szerkezetű mikrokapszulát eredményezhet.

Paraffin típusú, hexadekánt tartalmazó mag-héj szerkezetű mikrokapszulák előállítása volt a cél etil-cellulóz és poli(metil-metakrilát) polimerrel. Az irodalomban nagy számban találhatóak olyan megoldások, ahol a kapszulahéjat polimerizációval alakítják ki. A kivitelezhetőség szempontjából jóval egyszerűbb módszer az emulziós oldószer-elpárolgató technika. Feladatom volt mérésekkel igazolni, illetve magyarázni az emulziós oldószer-elpárolgató során kialakuló szemcsemorfológiát és a kapszulák héjában tapasztalt porozitást az irodalomból ismert közelítések alapján.

Célom volt továbbá interferon-béta mikrokapszulázása szklerózis multiplex tüneteinek enyhítésére, amely szemcsékre elvárt eredményként fogalmaztuk meg, hogy 200 nm átlag méretnél kisebb, keskeny méreteloszlású, jó kapszulázási hatékonyságú (>80 %) nanokompozit részecskéket állítsunk elő. A hatóanyagleadást tekintve pedig minimum egy héten át képesek legyenek nyújtott IFN-béta leadást biztosítani humán vérplazmában *in vitro* körülmények között. A megvalósításhoz a hatóanyag vízoldhatósága miatt az összetett emulziós módszert választottuk.

### 3 Felhasznált anyagok

A PSS-kitozán-HSA kompozit szemcsék előállításához alkalmazott vegyszerek közül a rákok páncéljából kivont kitozánt, amelynek a deacetilezési aránya  $\geq 85\%$ , a Sigmától vásároltuk. A nátrium-polisztirol-szulfonátot (PSS,  $M_w = 70\,000$ ) az Aldrichtól szereztük be. A humán szérum albumin (HSA) a Trigon Biotechnológiai Zrt. szíves ajándéka volt. Az abszolút alkoholt a Reanaltól, az etil-acetátot (EtOAc) és az ecetsavat a Spektrum 3D Kft.-től vásároltuk. Az összes alapanyag analitikai tisztaságú volt, és további tisztítást nem végeztem rajtuk. A vizes oldatok elkészítéséhez kétszer desztillált vizet használtam.

Az 1% (m/m)-os kitozán és 2% (m/m)-os PSS oldat elkészítéséhez a szilárd kitozánt és a PSS-t 4% (m/m)-os ecetsav oldatban oldottam fel. Foszfát pufferben oldott 3,8 mg/ml és 7,28 mg/ml töménységű HSA oldatot a Trigon Biotechnológiai Zrt.-től kaptunk ajándékba.

A sóhidrát szférikus agglomerátum előállításához szükséges puriss tisztaságú  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ -t (timsó) a Molar Chemicals Kft.-től szereztük be. A timsónak az oldatából való kicsapásához szükséges szerves oldószereket, a diklór-metánt (DCM), a hexánt (Hx) és az etanolt (EtOH) a Scharlau-tól, az izopropil-alkoholt (IPA) a Reanaltól vásároltuk.

A mag-héj szerkezetű szemcsék előállításához hasznos információt szolgáltató felületi feszültség viszonyok méréséhez alkalmazott vegyszerek a következők voltak: a felületaktív anyagok, mint a poli(vinil-alkohol) ( $M_w = 30\,000$ – $70\,000$  és 87–90%-ban hidrolizált) (PVA), Tween 80, poli(metilakrilsav) Na sója (PMAA) 30 % (m/m) oldata ( $M_w = 9\,500$ ) a Sigma Aldrichtól kerültek beszerzésre. A polimerfilm készítéséhez használt polimerek: a poli(metil-metakrilát) (PMMA,  $M_w \sim 15,000$ ) a Sigma Aldrichtól, az etil-cellulóz (EC, viscosity: 4mPa s, 5 wt% in 80:20 toluene/ethyl alcohol, 25 °C) a Dow Deutschland Anlagengesellschaft mbH (Németország)-tól származott.

Az interferon-béta-1a (IFN-béta) tartalmú nanorészecskék előállításának modellezéséhez a marha szérum albumin (BSA) a Trigon Biotechnológiai Kft. ajándéka volt. A (poli(tejsav-glikolsav) polimereket: a Resomer RG 502H (PLGA\_3), 0254 (PLGA\_4), RG504H (PLGA\_2), RG752H (PLGA\_1), RGP d5055 (PEG\_PLGA\_1) és RGP t50106 (PEG\_PLGA\_2) az Evonik (Németország) cégtől szereztük be. N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid (EDC) keresztkötő ágens, N-hidroxiszukcinimid

## Felhasznált anyagok

(NHS) stabilizátor, foszfát puffer tabletták és az etilén-glikol-bisz(béta-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav a Sigma Aldrich termékei. Az IFN-béta és a hozzátartozó ELISA kit a Fine Biotech (Kína) cégtől származik. A cyanine-5-amin (Cy5) festékanyagot a Lumiprobe (Németország) cégtől szereztük be. A micro BCA fehérjekoncentráció meghatározására alkalmas mintaelemző kitet az amerikai Pierce Biotechnology Inc.(US) cégtől vásároltuk. A pegiláláshoz az aminoPEG-et ( $M_w = 5000$ ) Nanocs Inc.-től (New York, NY, USA) szereztük be.

Polimer neve	Tejsav:glikolsav arány	Molekulatömeg	Viszkozitás adat
Res 0254 RG:50:50 H	50:50, sav végű		0,32 dL/g
Resomer RG 504 H	50:50, sav végű	$M_w=38\ 000-54\ 000$	0,45–0,6 dL/g
Resomer 5050 DLG PEG 6000	10% (m/m) PEG tartalom	$M_{n,PEG}= 6000$	0,67 dL/g
Resomer RG 502 H	50:50, sav végű	$M_w=7\ 000-17\ 000$	0,16–0,24 dL/g
RGP d 5055 (PEG_PLGA)	5% (m/m) PEG tartalom	$M_{n,PEG}=5000$	0,93 dL/g
Resomer RG 752H	75:25, sav végű	$M_w=4\ 000-15\ 000$	0,14–0,22 dL/g

### 3.1 Szemcsék előállításának részletes leírása

#### 3.1.1 A kitozán szemcsék előállítása

A víz–etanol–etil-acetát oldószerhármasához először 4 (m/m) %-os ecetsavban oldott 1% (m/m)-os kitozán, majd 3,8, ill. 72,8 mg/ml koncentrációjú HSA oldatot és 2% (m/m)-os PSS oldatot adtam. A kialakult kezdeti kvázi-emulzióból EtOH, ill. EtOH–EtOAc elegy hozzáadásával az oldószerre nézve homogén fázist hoztam létre. Végül az ebben az elegyben képződött gélszerű szemcséket további EtOH adagolásával szilárdítottam.

A kezdeti oldószer-összetételt 24,4 ml EtOAc, 4–6,4 ml EtOH és 6,45–7,45 ml kétszer desztillált víz összemérésével alakítottam ki. Az 1%-os kitozán oldatból 1,15–2,2 ml-t adagoltam az előző oldószerkeverékhez. A HSA-t 3,8, ill. 72,8 mg/ml koncentrációjú oldataiból egyenként 0,3 és 0,31 ml mennyiségben adtam hozzá a rendszerhez. A 2%-os

## Felhasznált anyagok

PSS oldat térfogata mindig megegyezett a kitozán oldat térfogatával. Az így kialakuló kvázi-emulzióhoz vagy abszolút EtOH-t vagy EtOH–EtOAc 1:0,96 arányú elegyét adagoltam, egy részletben vagy 5,5, ill. 12 ml/perc sebességgel. A keverési sebesség 200–500 fordulat/perc között változott, de általában 400 fordulat/perc volt. Az utolsó lépésben a gél szemcsék szilárdítása 0,55–1 ml EtOH-val történt. A keverések időtartama 15–45 perc volt. A 3.1 táblázatban a különböző módon előállított minták konkrét adatait tüntettem fel.

3.1. táblázat. Néhány kiválasztott szférikus kristályosítási kísérlet összetételei

Minta	EtOH	EtOAc	H <sub>2</sub> O	HSA oldat	Kitozán oldat	PSS oldat	Hozzáadott EtOH/EtOH és EtOAc elegy	További hozzáadott EtOH
	térfogata, ml							
I-09	6,34	24,2	6,56	0,3	1,14	1,14	3	
I-10	6,4	24,4	6,6	0,3	1,15	1,15	2,4	0,55
I-14	6,6	24,2	6,6	0,3	1,15	1,15	2,4	
II-25	4,0	24,0	7,45	0,31	2,1	2,1	12,04	3,12 és 0,715
II-26	4,0	24,0	7,45	0,31	2,1	2,1	15,225	0,73
II-28	4,0	24,0	6,45	0,31	2,1	2,1	11,61	0,675
II-29	4,0	24,0	6,95	0,31	2,1	2,1	13,395	0,71

### 3.1.2 Timsó agglomerátumok preparálása

A timsó szemcséket szférikus kristályosítással állítottam elő egy 100 ml-es duplafalú, termosztálható üvegreaktorban. A hőmérsékletet Julabo termosztáttal állítottam be 25 °C-ra. A szerves oldószer elpárolgását a folyamat során üveghűtő használatával akadályoztam meg.

A timsó agglomerátumok előállításához 40 °C-on telített kálium-alumínium-szulfát oldatot pipettáztam egy részletben („one shot”) a szerves oldószer elegybe. A telített sóoldatot 3,87 g só és 14,67 g desztillált víz összemérésével készítettem el, amelyet ezután 4 órán át 40 °C-ra termosztáltam. Négy különböző oldószerrendszerrel dolgoztam, amelyek H<sub>2</sub>O–EtOH–DCM és H<sub>2</sub>O–EtOH–Hx terner, ill. EtOH–H<sub>2</sub>O és IPA–H<sub>2</sub>O biner

## Felhasznált anyagok

rendszerek voltak. A só oldat térfogata 2,5 ml–6 ml-ig, az etanolé pedig 19,5–54,6 ml-ig változott. A kialakult szuszpenziót 20 percig kevertetem 500 fordulat/perc keverési sebesség mellett. Végül a szuszpenziót szűrtem és 2 x 5 ml etanollal mostam az analízisek elvégzéséhez. A 3.2. táblázat mutatja a szférikus agglomerátumok előállításakor alkalmazott elegyösszetételeket.

**3.2. táblázat. Szférikus kristályosítási kísérletek összetételei számszerű formában**

Minta	Só oldat térfogata, ml	EtOH térfogata, ml	Hx térfogata,	DCM térfogata, ml	IPA térfogata, ml
KAl_minta 1	4,8	19,5	0,0	31,5	0,0
KAl_minta 2	6,0	54,6	22,8	0,0	0,0
KAl_minta 3	4,0	36,0	0,0	0,0	0,0
KAl_minta 4	2,5	0,0	0,0	0,0	47,5

### 3.1.3 A n-hexadekán tartalmú etil-cellulóz mikrorészecskék előállítása

A hexadekán tartalmú etil-cellulóz mikrorészecskéket Dr. Feczko Tivadar állította elő egyszerű emulziós módszerrel. Az egyszerű emulziós módszer során 0,26–0,975 ml hexadekánt adott 200–250 mg etil-cellulóz polimert tartalmazó 5 ml diklór-metánhoz. Ezt követően a szerves fázist három különböző felületaktív anyaggal készített (2% (m/V)-os Tween 80, 2% (m/V)-os PVA, 1% (m/V)-os PMAA) vizes oldatokban (20-20 ml) mágneses keverővel 800 fordulat/perccel emulgeálta. Az oldószer elpárologtatása után Macherey-Nagel 640 d papír szűrőn szűrte a szemcséket a morfológia vizsgálata előtt.

### 3.1.4 Az IFN-béta tartalmú nanoszemcsék előállítása

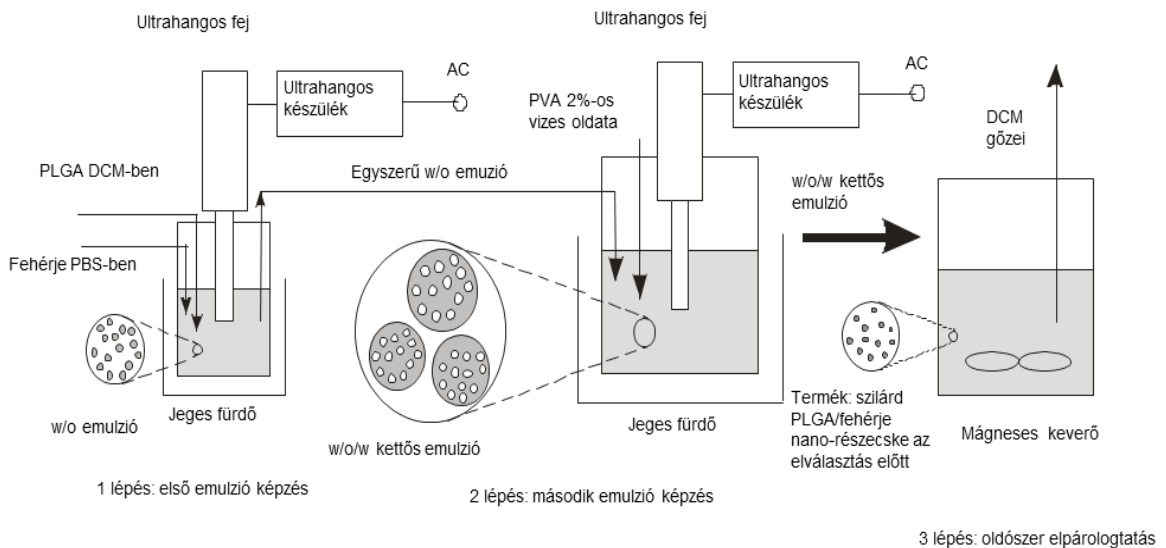
Az IFN-béta az egyik, széles körben alkalmazott gyógyszerhatóanyag a szklerózis multiplex kezelésére. Mivel a kívülről bejuttatott IFN-béta a szervezetből 24 órán belül eltűnik, ezért célunk olyan nyújtott IFN-béta hatóanyagleadású nanorészecske szuszpenzió előállítása volt, amely megfelelő alapanyaga lehet egy ritkábban adagolandó injekciós készítménynek a relapsussal-remisszióval járó szklerózis multiplex megbetegedés kezelésére.

A fehérjék hatékonyságnövelésének egyik régóta alkalmazott módja biodegradábilis polimerbe való mikrokapszulázásuk, összetett emulziós oldószer-elpárologtatásos/diffúziós



## Felhasznált anyagok

módszerrel, pl. PLGA hordozó polimerrel. A vízoldható hatóanyagok esetében a mikrokapszulázás a 3.1. ábrán látható sematikus rajzon követhető módon történik.



**3.1. ábra. PLGA és PEG\_PLGA nanorészecskék előállítása összetett emulziós oldószer-elpárolgatásos módszerrel**

IFN- $\beta$  tartalmú PLGA nanorészecskéket összetett emulziós módszerrel állítottam elő. A modell-, ill. a hatóanyagot PLGA és PEG\_PLGA polimerekbe kapszuláztam. A fehérje mikrokapszulázásának optimalizálásához a BSA modellanyagot feloldottam vízben és a polimer diklór-metános oldatával emulgeálva egyszerű, víz az olajban (v/o) emulziót alakítottam ki. Ezután ezt az egyszerű emulziót hozzámértem a PVA emulgeátort tartalmazó külső vizes fázishoz és ultrahang segítségével kialakítottam a  $v_1/o/v_2$  összetett emulziót. Végül elpárolgattam a szerves oldószert az összetett emulzióból, ennek folytán létrejöttek a PLGA/BSA alkotta nanorészecskék. A hatóanyagra az optimálisnak választott szemcseméret eloszlás és kapszulázási hatékonyság eléréséhez szükséges paramétereket használtam.

A kísérletekben a PLGA\_3 polimert 20 mg/ml koncentrációban alkalmaztam, a fehérjetartalom minden esetben 5 mg/ml volt. Három különböző emulzió összetépnél (3,1; 4,6; 5,1 ml), háromféle térfogatarány mellett, 90–180 másodperc időtartamú ultrahangos kezelésekkel készültek a minták.

A 3.3. táblázatban gyűjtöttem össze a BSA tartalmú részecskék előállítási paramétereit, amelyeket az optimalizálási kísérletek során használtam.

**3.3. táblázat. Előállítási körülmények a BSA-tartalmú PLGA és PEG\_PLGA részecskékhez**

Polimer	Polimer viszkozitás (dL/g)	w <sub>2</sub> /o térfogatarány	Ultrahangos fej mérete, mm	Ultrahangozás ideje (s)
PLGA_1	0,14–0,22	1:4	6	90
PLGA_3	0,16–0,24	1:2	3	180
PLGA_4	0,32	1:3	3	180
PLGA_2	0,45–0,60	1:6	6	110
PEG_PLGA_2	0,67	1:6	6	140
PEG_PLGA_1	0,93	1:4	6	90

Az IFN-béta tartalmú szemcsék előállítása az in vitro és in vivo kísérletekhez a 3.4. táblázatban összefoglalt lépéseknek megfelelően történt. A hatóanyag, patkány-IFN-béta szilárd, liofilizált formáját steril MilliQ vízzel feloldva törzsoldatot készítettem. 5 mg kapszulázó polimert 0,5 ml diklór-metánban oldottam fel, és ehhez hozzáadtam a 12 µg IFN-bétát tartalmazó 0,1 ml fehérje oldatot. Ultrahangos diszpergálással 30 s 30%-os (Sonics Vibra Cell VCX 130, 130 W, Sonics & Materials, Inc.) ultrahang amplitúdónál víz/olaj (v<sub>1</sub>/o) emulziót készítettem, majd ehhez 2 ml 2% (m/V)-os PVA oldatot adva, 80% ultrahang amplitúdónál, 1 perc ultrahangozási időt alkalmazva, kialakult a víz/olaj/víz (v<sub>1</sub>/o/v<sub>2</sub>) összetett emulzió. Elpárologtattam a rendszerből a diklór-metánt 800 fordulat/perces mágneses keverés (IKA Big Squid, IKA®-Werke GmbH & Co. KG) mellett, így létrejöttek a kompozit nanorészecskék. Felhasználás előtt a nanorészecskék szuszpenzióját 40 000 fordulat/perc (a rotor átlagos sugár méreténél RCF: 66 700 g) mellett 10 percig ultracentrifugával (Beckman Optima Max-E, Beckman Coulter Inc.) ülepittem, majd a tiszta felülúszót eltávolítva, 2 ml MilliQ vízben visszaszuszpendáltam a részecskéket. Újabb centrifugálással és a szuszpendáló közeg cseréjével mostam a szemcséket a PVA felületaktív anyagtól.

**3.4. táblázat. In vitro kísérletek előállítási receptjei**

	<b>PEG_PLGA_1</b>	<b>PLGA_1</b>
Belső vizes fázis	0,054 ml IFN oldat (20 µg /200 µl) 0,2 ml-re hígítva PBS oldattal	0,054 ml IFN oldat (20 µg /200 µl) 0,2 ml-re hígítva PBS oldattal
Szerves fázis	2 ml DCM, 20 mg RGP d 5055	2 ml DCM, 20 mg Resomer RG 572H
Külső vizes fázis	8 ml 2 % (m/V) PVA	8 ml 2 % (m/V) PVA
1. emulzió létrehozása	35 s, 30% 3 mm-es ultrahangos szondával	35 s, 30% 3 mm-es ultrahangos szondával
2. emulzió létrehozása	90 s, 70% 6 mm-es ultrahangos szondával	90 s, 70% 6 mm-es ultrahangos szondával
Oldószer elpárologtatás:	25 ml-es főzőpohárban 500 fordulat/perc keverési sebesség	25 ml-es főzőpohárban 500 fordulat/perc keverési sebesség

Az in vivo vizsgálatok elvégzéséhez szükség volt vak, azaz hatóanyagot nem tartalmazó részecskékre is. A vak részecskék előállítása nanoprecipitációs módszerrel történt. 5 mg PLGA\_1, ill. PEG\_PLGA\_1 típusú polimert feloldottam 0,5 ml acetonban. A 2–4 ml vizes fázist 1% (m/V)-os PVA oldat alkotta. Az oldatok elegyítése után, az acetont szobahőmérsékleten elpárologtattam. A nanorészecskéket 20 000 fordulat/percen (RCF: 16700 g) 25 percig centrifugáltam, és kétszer mostam MilliQ vízzel a PVA-tól. (Beckman Optima Max-E ultracentrifuga, Beckman Coulter Inc.)

## 4 Mérési módszerek

### 4.1 Oldhatósági vizsgálatok

PSS-kitozán-HSA kompozit szemcsék előállításához használt H<sub>2</sub>O–EtOH–EtOAc terner oldószerrendszer irodalomból ismert oldhatósági adatainak kiegészítésére egy egyszerű módszert választottam. Összemértem a megfelelő H<sub>2</sub>O–EtOH–EtOAc mennyiségeket az oldószerre nézve nem elegyedő tartományban, és egy ilyen oldószerkeveréknek az 5 ml-éhez kis lépésekben etanolt adagolva kerestem azt a végpontot, ahol a három oldószer keveréke még éppen elegyedik, vagyis nem tapasztalható semmilyen mértékű zavarosodás a kémcsőben. Utóbbi összetételt vettem a három oldószer egymásban való oldódásához szükséges összetételnek, vagyis az oldhatósági adatnak.

### 4.2 Szemcseméret-eloszlás meghatározása

A mikroméretű szemcsék szemcseméret-eloszlását lézer diffrakció elvén alapuló készülékekkel határoztam meg. A szemcséket a térfogat szerinti eloszlásból nyert átlag szemcsemérettel (D(4,3)) és a szemcseméret-eloszlás monodiszperzítésére utaló Span értékkel jellemeztem.

$$Span = \frac{D[V; 0,9] - D[V; 0,1]}{D[V; 0,5]}$$

ahol a D[V; 0,9], D[V; 0,1] és D[V; 0,5] azokat a méreteket jelöli, amelyek alatt a térfogatszerinti eloszlás alapján a szemcsék 90, 10 és 50 %-a található.

A PSS-kitozán-HSA rendszerben a szemcseméret eloszlás meghatározását Malvern-2600 szemcseméret-analizátorral végeztem. A szemcseméretet a szemcsék leszűrése és szárítása után a képződéskor kialakuló anyalúgnak megfelelő oldószer-összetételben újraszuszpendálva, szuszpenzió formájában mértem. A szemcsék stabilitását a szuszpenzió 400 fordulat/perc keverése mellett 5–20 percig vizsgáltam az eloszlás változását követve nyomon.

A timsó agglomerátumok szemcseméretének analízisekor a Malvern cég Mastersizer 2000 típusú szemcseméret analizátorát alkalmaztam. A szemcsék méretét azok leszűrése és szárítása után, EtOH-ban való újraszuszpendálását követően mértem. A szemcsék stabilitását a szuszpenzió 2000 fordulat/perc keverési sebesség mellett 5–10 percig végzett szemcseméret-analízise útján vizsgáltam. A Mastersizer 2000-es készülék a Mie-

elmélet alkalmazásával a szilárd anyag ( $n=1,456$ ) és a szuszpendáló közeg törésmutatójának figyelembevételével számítja a szemcseméret eloszlását.

Az IFN-béta tartalmú nanorészecskék szemcseméret-eloszlását Zetasizer Nano ZS készüléken dinamikus lézerefényszóródáson alapuló mérési módszerrel határoztam meg. A mért intenzitásokból, a törésmutató és az oldatok viszkozitás adatainak ismeretében, számítható a térfogati átlagszemcseméret és a polidiszperzitás indexszel (PdI) jellemezhető a minta szemcseméret-eloszlásának a szélessége.

A polidiszperzitási indexet a szoftver a mért értékek G1 korrelációs függvényének logaritmusára polinom függvényt illesztve

$$\ln[G1] = a + b \times t + c \times t^2 + d \times t^3 + e \times t^4 + \dots,$$

a lineáris ( $b$ ) és a négyzetes tag ( $c$ ) együtthatójából számítja a következő összefüggés alapján:  $PdI = 2c/b^2$  [97].

### **4.3 Zeta-potenciál mérése**

A zeta-potenciál mérését elterjedten használják a töltéssel rendelkező nanorészecske szuszpenziók stabilitásának jellemzésére. Egyenáramú erőterben mozgásra, ill. áramlásra kényszerítjük a részecskéket (elektroforézis). Az elektromosan töltött részecskék egyirányú mozgása elektromos potenciálkülönbséget hoz létre. Valódi koloid részecskék elektroforézise esetén a nanorészecskék mozgási sebességét a lézer-Doppler-effektus alapján határozzuk meg. Szolok esetében a szórt fény intenzitása valamilyen frekvenciával fluktuál, ami függ a részecske sebességétől. A készülék méri a frekvenciát, és számítja a sebességet. Az elektroforetikus mozgékonyság mérésével, a Henry-egyenlet alapján, számítható a zeta-potenciál [98]. Az IFN-béta tartalmú minták szuszpenziójának zeta-potenciálját Zetasizer Nano ZS készülékkel mértem, a PVA emulgeátortól való többszöri mosásuk és MilliQ vízben való diszpergálásuk után, eldobható, zeta-potenciál mérésére alkalmas küvettában.

### **4.4 Morfológia, pásztázó elektronmikroszkóp**

A mikroszemcsék morfológiáját egyrészt látható fény mikroszkópban vizsgáltam, amelynek a kameráját számítógéphez csatlakoztattam, másrészt Philips XL30 ESEM típusú pásztázó elektronmikroszkóp felvételei alapján elemeztem. A szemcsék az

elektronmikroszkópos mérés előtt aranyréteggel lettek bevonva. A mérés 20, ill. 25 keV gyorsító feszültséggel történt.

A nanorészecskék morfológiáját MilliQ vízzel PVA-tól alaposan mosott szuszpenziójuk egy cseppjét a mintatartón beszárítva, aranyozás nélkül, vizsgáltuk FEI Apreo típusú pásztázó elektronmikroszkóppal 20kV gyorsító feszültség mellett.

### **4.5 FTIR**

Az FTIR spektrumok Varian Scimitar FTS2000 spektrométerrel Pike GladiATR mintatartó egységben lettek felvéve folyékony nitrogénnel hűtött MCT detektorral.

### **4.6 Termogravimetriás mérések**

A kálium-alumínium-szulfát agglomerátumok termoanalitikai görbéi MOM Q-1500-D típusú szimultán (T, TG, DTG, DTA) derivatográfal készültek korund tégelyben, levegő jelenlétében és dinamikus fűtési körülmények között (10 °C/perc fűtési sebesség mellett) 30–1000 °C hőmérséklet tartományban.

### **4.7 Differenciális pásztázó kalorimetria**

A kálium-alumínium-szulfát agglomerátumok DSC felvételeit Setaram LabsysEvo TG-DTA/DSC analizátorral, nagy tisztaságú nitrogén atmoszférában (50 ml/perc áramlási sebesség mellett) 5 °C/perc állandó fűtési sebesség alkalmazásával, standard 100 µl-es alumínium tégelyben vették fel. Üres tégely szolgált referenciaként és a mérések hőmérséklet tartománya 30–300 °C volt.

### **4.8 Röntgendiffrakciós mérések**

A kálium-alumínium-szulfát agglomerátumok röntgendiffrakciós görbéinek felvétele Philips PW 3710 típusú diffraktométerrel történt. A készülék PW 3020 vertikális goniométerrel és grafit monokromátorral van felszerelve. A készülékben a röntgenső anódja: Cu, hullámhossza ( $K\alpha_1$ ): 1,54060 Å. A görbék felvétele folyamatos pásztázó üzemmódban, 0,02 fok/ perc sebességgel történt. Az adatgyűjtés és kiértékelés X'Pert Data Collector nevű programmal, míg az azonosítás és mikrostruktúra jellemzése a X'Pert Highscore Plus programmal zajlott.

#### 4.9 Vezetőképességi mérések

A vezetőképességi méréssel a kálium-alumínium-szulfát agglomerátumok víztartalmát határoztam meg. A méréseket Radelkis OK-114 konduktométerhez csatlakoztatott Radelkis 097P elektróddal végeztem. A konduktométer egy digitális multiméteren keresztül szolgáltatja a számítógépen rögzíthető adatokat. A kalibráláshoz a gyári 12 kristályvizes termék oldatát használtam 0,01–0,12 g/l koncentráció-tartományban. A mérési adatokra egy másodfokú polinomot illesztve kaptam meg a kalibráló görbét. A mérés duplafalú, termosztálható mérőedényben történt 25 °C-on és 500 fordulat/perc keverés mellett. Az agglomerátumokból 10–15 mg mintát 100 g vízben feloldva mértem az agglomerátumok beoldódása közben és azt követően az oldat vezetőképességét. A kalibráló görbe segítségével számítottam az agglomerátumok víztartalmát.

#### 4.10 Felületi feszültség mérések

A folyadék-levegő határfelületi feszültség méréséhez a mérendő folyadékot beletöltjük egy fecskendőbe és átnyomjuk egy ismert átmérőjű tűn keresztül. A kialakuló csepp árnyékának fényképét rögzítjük. Egy folyadék felületi feszültsége meghatározható az adott közegben kialakuló csepp alakjából. Ez a közeg lehet a levegő, de lehet akár egy másik, a mérendő folyadéknál nagyobb sűrűségű folyadék is. A csepp alakját befolyásolja a csepp térfogata, sűrűsége és a felületi feszültsége. A számításokhoz szükség van a folyadékok és a levegő sűrűség ( $\rho$ ), ill. a levegő felületi feszültség adatára.

A csepp belsejében nyomás keletkezik a belső és a külső fázis közötti határfelületi feszültség ( $\gamma$ ) eredményeként. A  $\Delta P$  nyomáskülönbség, a csepp  $r_1$  és  $r_2$  felület görbületi sugarai és a határfelületi feszültség közötti összefüggést a Young-Laplace egyenlet írja le:

$$\Delta P = P_{belső} - P_{külső} = \gamma \cdot \left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) = \Delta P_0 - \Delta \rho g z,$$

ahol  $\rho$  a sűrűség,  $g$  a nehézségi gyorsulás és  $z$  a folyadék oszlop magassága.

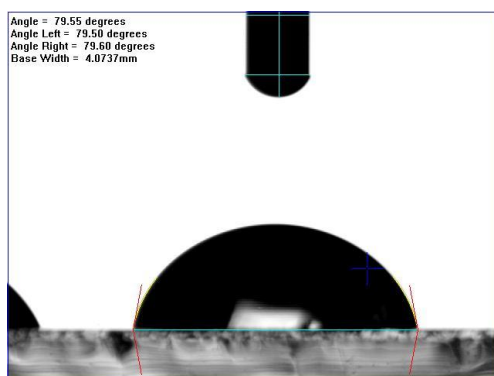
A Young-Laplace egyenlet a csepp formáját egy  $\beta$  formafaktorról figyelembe véve az alábbi alakra hozható:

$$\gamma = \frac{(\Delta \rho) \cdot g \cdot R_0^2}{\beta},$$

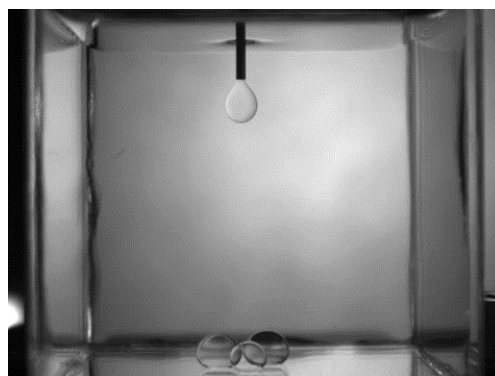
amiből a szoftver a csepp görbületét ( $R_0$ ) és a körvonalát iterációval határozza meg, majd számítja a formafaktor értékét és a határfelületi feszültséget.

A folyadék-szilárd határfelületi feszültség méréséhez a polimerfilmeket 4, 5 és 8% (m/V)-os diklór-metános EC oldatból készítettem. Előzetesen etanollal letisztított, üveg mikroszkóplemezt merítettem a polimer oldatba, 5 percig vártam, hogy az oldat megfelelőképpen nedvesítse a mikroszkóplemezt, majd 1 ml/perc sebességgel leengedtem az oldatot a lemezről. A frissen készült filmet egy éjszakán át szárítottam szobahőmérsékleten [99].

A felületi feszültség méréseket FTA 1000 B tenziométerrel végeztem. A folyadékok folyadék-levegő határfelületi feszültsége függő csepp módszerrel, míg az EC filmen kialakuló folyadék-szilárd határfelületi feszültség a kontaktszög méréséből határozható meg (4.1. ábra).



4.1. ábra. A nedvesedési szög meghatározása ülő csepp módszerrel (szemléltető fotó)



4.2. ábra. A folyadék-folyadék határfelületi feszültség meghatározása függő csepp módszerrel (szemléltető fotó) [100]

A mérések során 1 és 2% (m/V)-os PVA, ill. Tween 20-as oldattal dolgoztam, míg a PMAA oldat esetében csak 1% (m/V)-nál végeztem kísérleteket. A folyadék-folyadék határfelületi feszültség meghatározására alkalmas speciális tartozék hiányában egy kvarc küvettát használtam. A küvettát feltöltöttem a kisebb sűrűségű hexadékánnal, majd ebbe a folyadékba a méréshez használatos tűt beelógotva, óvatos adagolás mellett, lényegében a kialakuló függő csepp paramétereit megmérve, számítható a folyadék-folyadék határfelületi feszültség is (4.2. ábra).

### 4.11 A PLGA polimer utólagos felületmódosítása

1,5 ml nanorészecske diszperziót 66 700 g-n 10 percig 20 °C-on centrifugáltam, majd a szuszpendáló közeget 1,5 ml MilliQ-ra cserélve visszadiszpergáltam a mintát. Újabb centrifugálás után a közeget 1 ml PBS (pH=7,8) pufferre cseréltem. Ezután elkészítettem



a keresztkötő reagens oldatot, EDC (4 mg/ml) és NHS (4 mg/ml) együttes feloldásával PBS-ben. A mosás után nyert 1 ml nanorészecske szuszpenzióhoz hozzáadtam 0,5 ml keresztkötő oldatot és 1 órán át inkubáltam a veszteség csökkentése érdekében magában a centrifugacsőben. Az inkubálás az IFN-béta hatóanyag bomlását megelőzendő a hűtőben történt. A reakció lejátszódása után újabb centrifugálással és mosással eltávolítottam a reagens feleslegét. A következő lépéshez a szemcséket ismét pufferben szuszpendáltam. 14 mg amino-PEG-et feloldottam 0,5 ml pufferben, hozzáadtam a nanorészecske diszperzióhoz és 2 órán át inkubáltam hűtőben. A reakció lejátszódása után újabb centrifugálással és mosással eltávolítottam a reagens feleslegét. A pegilált szemcséket 1,5 ml pufferben szuszpendáltam vissza. A további felhasználása ebben a formában történt.

### **4.12 Fehérjekoncentráció meghatározása**

#### **4.12.1 HSA koncentrációjának meghatározása Bradford módszerrel**

A PSS-kitozán-HSA szférikus szemcsék kapszulázási hatékonyságát a felülúszó fehérje tartalmának meghatározásával, az ún. Bradford módszerrel végeztem. A választásom azért esett a Bradford módszerre, mert a reagens a Coomassie Blue 250 G festékanyag foszforsavas és etanos oldatából áll. A szűrlet vizsgálatakor így nem vártunk nagyobb eltérést a módszer alkalmazásában, hiszen a szűrletben is víz, etanol és bizonyos mennyiségű etil-acetát található. Savas körülmények között a Coomassie G-250 kationos, nagyrészt a kétszeresen protonált formája van jelen és vörös színű, míg semleges pH-n a festék zöld, az anionos formája pedig kék. A fehérjék bázikus aminosavaihoz (elsősorban arginin, lizin és hisztidin) kötődik, azon belül is legfőképpen az argininhez. Mivel a kék anionos forma mennyisége arányos a mintában lévő fehérje mennyiségével, a mintában lévő fehérje mennyisége közvetlenül meghatározható az abszorpció 595 nm-nél történő mérésével. A Coomassie G-250 semleges zöld formája a fehérjéhez nem kötődik és nem is zavarja a mérést, mivel  $A_{\max}$  értéke 650 nm-nél jelenik meg.

#### **4.12.2 A fehérje kapszulázási hatékonyság meghatározása micro BCA módszerrel**

Az átlagszemcseméretben és kapszulázási hatékonyságban is megfelelő IFN-béta nanorészecskék előállításához szükséges paraméterek optimalizálásához modellanyagként BSA-t alkalmaztam. A modell kísérletekben a BSA kapszulázási hatékonyságának meghatározására a nagy érzékenységű micro BCA módszert választottam.

A kísérletekben alkalmazott liofilizált természetes humán IFN-béta stabilizálás céljából HSA-t is tartalmaz. Így a kapszulázási hatékonyság előzetes becslésére is jól használható módszer az összes kapszulázott fehérje mennyiségének mérése micro BCA módszerrel.

A micro BCA kit fehérjére nézve viszonylag híg oldatok koncentrációjának meghatározására alkalmas (0,5–20 µg/ml). A módszer elve az, hogy a Cu<sup>2+</sup> ionok fehérjék jelenlétében lúgos közegben Cu<sup>+</sup> ionokká redukálhatók, amelynek 1 mólja 2 mol [2,2'-bikinolin]-4,4'-dikarbonsavval képzett komplexe élénk lila színreakciót ad. A vízoldható komplex 562 nm-nél intenzív fényelnyelést mutat ( $\epsilon = 7700 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ ), a fehérjekoncentrációja a felvett kalibráló egyenes alapján számítható [101].

#### **4.13 IFN-béta-tartalom meghatározása ELISA módszerrel**

A minták analízisét a nem kapszulázott hatóanyag, illetve a hatóanyagleadási vizsgálatokban a kibocsátott humán IFN-béta mennyiségének meghatározására a specifikusan erre a fehérjére kidolgozott ELISA teszttel végeztem. Az ELISA (enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat) szilárd fázison lejátszódó színreakció, ahol a reakciót enzimmel kapcsolt antitest segítségével követjük nyomon.

A tesztben alkalmazott módszer a direkt biotin-avidin ELISA teszt. A biotin-avidin rendszer növeli a reakciók érzékenységét. A módszer alapváltozatában az IgG-t biotinálják, a sztreptavidint pedig enzimmel konjugálják. Az eljárás röviden a következő: a mikrotitráló lemez IFN-béta 1a-ra specifikus antitesttel van befedve. A referenciákat és a mintákat felpipettázzuk a mikrotitráló lemezre, ahol kötődik a specifikus antitesthez, majd mosással eltávolítjuk a nem kötött antigént. A mikrotitráló lemezre mérjük a biotinnal konjugált antitestet, ami szintén IFN-bétára specifikus. A következő lépésben avidinnal konjugált tormaperoxidázt adunk a mintákhoz, majd inkubáljuk. 3,3',5,5'-

tetrametil-benzidin szubsztrát oldatot mérve a lemezre, azokban a mintatartókban, amelyekben IFN-béta van, a biotin konjugált antitest és az enzim konjugált avidin színváltozást eredményez. Az enzim-szubsztrát reakció kénsav hozzáadásával leállítható. A színváltozás spektrofotometriásan  $450 \pm 10$  nm-en mérhető. Az IFN-béta koncentrációt a 0–500 pg/ml koncentrációtartományban felvett kalibráló görbe alapján számítottam.

### **4.14 BSA és IFN-béta tartalmú részecskék *in vitro* leadási kinetikai vizsgálata**

A leadási kinetika méréséhez a PVA oldatban kapott nanorészecske szuszpenziókat MilliQ vízzel mostam az emulgeátor eltávolítása céljából. A mosás a következőképpen történt: a PVA-s szuszpenziót ultracentrifugával (66 700 g-n, 10 perc, 20 °C-on) centrifugáltam, a felülúszót maradéktalanul eltávolítottam és a szemcséket MilliQ vízben újra szuszpendáltam. A mosást háromszor ismételtam.

A MilliQ vízben szuszpendált nanoszemcsékből vett mintát a megfelelő koncentrációra hígítottuk PBS pufferral, ill. az adott mennyiségű szuszpenziót bemértem a vérplazmába vagy a lecentrifugált szemcséket szuszpendáltam fel vérplazmában. A mintakészítés minden munkafázisát steril körülmények között végeztem (Laminar box AVC UFT), továbbá baktericid Na-azidot (0,03% m/V) adtam a mintákhoz. A leadási kinetikát humán vérplazmában 37 °C-on inkubátorban (G24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, USA)) rázatva vizsgáltam.

Az IFN-béta bomlási kinetikájának vizsgálatához  $52,3 \mu\text{g ml}^{-1}$  koncentrációjú IFN-béta oldatot készítettem PBS-ben és 4 napig követtem a fehérjekoncentráció változását micro BCA módszer alkalmazásával.  $0,55 \text{ ml}$   $28 \mu\text{g}$  IFN-bétát tartalmazó PBS oldatot készítettem, majd 1, 2, 4, 8, 24, 48 és 96 h-nál  $0,05 \text{ ml}$  mintát vettem, amiből microBCA módszerrel határoztam meg a fehérjekoncentrációt. Az előre meghatározott időpontokban vett minták analízise a színreakciónak megfelelően 562 nm-en történt. A BSA tartalmú nanorészecskéket mostam és 0,03% (m/V) nátrium-azidot tartalmazó PBS-ben diszpergáltam, a nanorészecskék koncentrációja  $5\text{--}6 \text{ mg ml}^{-1}$  volt. Az IFN-béta tartalmú nanorészecskéket a BSA tartalmú részecskékhez hasonlóan mosás után szuszpendáltam humán vérplazmában ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$  koncentrációban). A mintákat forgó keverővel (Bio RS-24 mini- Rotator, Biosan, Lettország) függőleges forgatással 30 fordulat/perc sebességgel keverttem, és inkubáltam 37 °C-on G24 Environmental inkubátor rázógéppben (New

Brunswick Scientific, USA). Előre meghatározott időközönként mindegyik mintából 0,5 ml-t ultracentrifugáltam (Beckman Optima Max-E) 10 percig 66 700 g-nél. A BSA koncentrációját micro BCA vizsgálattal követtem nyomon a nanorészecskék centrifugálással való eltávolítása után a felülúszóban. Az IFN-bétát szintén a felülúszóban elemeztem ELISA teszttel.

A BSA tartalmú minták kioldódási vizsgálatait a következőképpen végeztem. 10 mg PLGA\_1, ill. PEG\_PLGA\_1 polimerbe 60 µg BSA-t kapszuláztam. A diklór-metán elpárolgatása után a mintát 66 700 g-n 10 percig 20 °C -on centrifugáltam, majd levettem a felülúszót és mostam a szemcséket milliQ vízzel. Majd újra centrifugáltam, és a szemcséket felfuszpendáltam 800 µl 0,03% (m/V) azidot tartalmazó PBS oldatban. A kioldódott fehérje vizsgálatához 1, 3, 5, 8, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 h időszakok elteltével 0,06 ml mintát vettem. A minták 15 000 fordulaton 30 percig tartó centrifugálása után a 0,05 ml felülúszót levéve, a fehérjetartalmat micro BCA módszerrel határoztam meg.

Az IFN-béta tartalmú részecskék kioldódási vizsgálatait pedig az alábbi módon hajtottam végre. 10 mg PLGA\_1, ill. PEG\_PLGA\_1 polimerbe 5,4 µg IFN-bétát kapszuláztam. A szemcsék pufferben készített szuszpenziójából 168 µl-t hígítottam 9 ml-re 0,03% azidot tartalmazó vérplazmával. A leadási kísérlet során a megfelelő időpontokban 0,6 ml mintát vettem. 20 °C-on 66 700 g-n 10 percig centrifugáltam és 0,5 ml felülúszót analízisre félreraktam. Majd 0,5 ml friss vérplazmával visszapótoltam a mintát.

### **4.15 Sejt vizsgálatok**

#### **4.15.1 Fluoreszcens festékekkel való jelzés**

A sejtfelvétel nyomon követéséhez a nanorészecskéket fluoreszcens festékekkel festettük, melyet Cy5-amin kovalens rögzítésével valósítottunk meg. 2 mg/ml nanorészecske szuszpenzióhoz a polimerhez viszonyítva 50:1 molarányban adtuk hozzá az EDC keresztkötő reagenst és ugyanilyen arányban az NHS stabilizátort. A polimer karboxilcsoportjai az 1 h inkubálás során (25 °C, 600 fordulat/perc rázatás, Eppendorf minishaker) aktiválódnak. A felülúszót a felesleges reagenssel 20 perc 20 000 g fordulatszámra való centrifugálás (Eppendorf 5424 R, Hamburg, Germany) után eltávolítottuk. A részecskéket azonos térfogatú MilliQ vízben visszadiszpergáltuk, az

előző módon centrifugáltuk, és a felülúszót eltávolítottuk. Ezt a mosási lépést még egyszer megismételtük, majd a nanorészecskéket 1 ml foszfát pufferben (pH=7,4) szuszpendáltuk fel. A nanorészecske diszperzióhoz 0,02 ml 0,5 mg/ml koncentrációjú Cy5-amint tartalmazó foszfát puffert (pH=7,4) adtunk hozzá, és 1 órán át inkubáltuk, 25 °C 600 fordulat/perc rázatás mellett. A nanorészecskék aktivált karboxil csoportjai a fluoreszcens festék aminos csoportjaival kovalens kötést létesítenek. A felülúszót a korábban leírt centrifugálási és mosási lépések során eltávolítottuk, és a nanorészecskéket 1 ml PBS-ben visszadiszpergáltuk.

### **4.15.2 Májsejtek izolálása**

A hepatocita sejteket egyrészt Wistar patkányokból izolálták kollagenáz perfúziós módszerrel a Toxi-Coop Zrt.-nél [102]. A májsejteket a májkapuén keresztül öblítették át  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes, EGTA-t (0,5 mM) tartalmazó, majd EGTA mentes oldattal (Earle's balanced salt solution). Végül kollagenázt (IV-es típus, 0,25 mg/ml) és 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -t tartalmazó perfúziós oldattal (pH 7,4) 37 °C-on.

Másrészt a Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében Dr. Monostory Katalin csoportjában, májdarabokból kis sebességen (50 g-n) végzett centrifugálással izolálták a májsejteket, majd szuszpendálták sejttenyésztő tápközegben [103].

### **4.15.3 Sejtek általi nanorészecske felvétel és citotoxicitás vizsgálatok**

A sejtek általi felvétel- és a citotoxicitás vizsgálatokat szintén a Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében Dr. Monostory Katalin csoportjában végezték.

0,5 ml tápoldatban  $2 \times 10^5$  hepatocita sejtet tartalmazó mintához 100 µg 50 µl PBS-ben diszpergált Cyanin-5-tel jelölt nanorészecskét adtak 37 °C-on nedves, 5%  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazó atmoszférában. Meghatározott mintavételi időpontokban (10, 20, 30, 60, 120, 180, 240 perc) mintát vettek, és a sejtek által történő nanorészecske felvételt fluoreszcensen aktivált sejtek számlálására alkalmas készülékkel végezték (FACS, Beckman Coulter, Cytoflex S). A hepatociták viabilitását tripán kék festődés módszerével vizsgálták. Az elemzéseket 3 különböző állapotú hepatocitáival is elvégezték.

#### **4.16 In vivo toxicitás vizsgálatok**

##### Minták előkészítése

A kísérleteket végző Toxi-Coop Zrt.-nél az IFN-béta hatóanyagot oldat és nanorészecskék formájában 0,12 µg IFN-béta/állat dózisban 0,2 ml PBS oldatban/szuszpenzióban szubkután a kísérletsorozat elején injektálták az állatokba. A vak nanorészecskék szuszpenziója a hatóanyagot tartalmazó nanokompozitokkal azonos tömegű (0,25–0,3 mg/állat), az IFN-bétától eltekintve azonos módon előállított nanorészecskét tartalmazott szintén 0,2 ml PBS-ben.

Mintavétel: ~0,5 ml vér, centrifugálva

Mintavételi időpontok: 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 2 nap, 3, nap, 4 nap, 6 nap, 8 nap, 10 nap, 12 nap, 14 nap

Nekropszia: 15. nap, szövet- és szervvizsgálat

## **5 Eredmények és értékelésük**

### **5.1 HSA tartalmú kitozán-PSS polimer szemcsék előállítása**

Természetes interferon alfa hatóanyag polimer mátrixban való szférikus agglomerációját HSA-val végzett kísérletekkel modelleztem, mert maga a kinyert természetes interferon oldat is túlnyomórészt HSA fehérjét tartalmaz, ezért a hatóanyag polimerrel való együttes kicsapásakor az oldhatósági viszonyokat a hatóanyag szempontjából elsősorban a HSA határozza meg. A klasszikus szférikus kristályosítás során általában vízben rosszul oldódó, tús formában kristályosodó anyagokat agglomerálnak. A feladat a klasszikustól eltérően vízoldható anyag formulálása volt. A munka célja kitozán polimerrel végzett szférikus agglomerizációs módszer kidolgozása volt fehérjehordozó mikrogömb előállítására.

Az irodalomból [42] tudjuk, hogy a polimeres szférikus kristályosítás kivitelezéséhez szükség van a polimer(ek) oldhatóság adataira az alkalmazott oldószerkeletben. Ismerni kell azt az összetétel-tartományt, ahol a polimer(ek) koacervát cseppeket alkot(nak). A komplex koacerváció során a polimer cseppek szorosan körbeveszik a maganyagot, majd deszolvatáció vagy hő stb. hatására megkeményedik a polimerfilm. A polimer megszilárdulásával létrejön a szemcse, így ezen a koacervát-tartományon belül található az az összetételek, ahol a kívánt minőségű szférikus agglomerátumokat nyerhetjük. Több oldószert, hatóanyagot és polimert is tartalmazó rendszerben a megfelelő összetételek kijelölése tehát meglehetősen összetett feladat és Kawashima és munkatársai tanulmánya alapján [42] várhatóan igen szűk az a tartomány, amelyben a létrejövő összetételek megfelelnek a szférikus agglomerátumok kialakulásához.

#### **5.1.1 Az oldószerrendszer felépítése**

A vízoldható hatóanyagunk miatt a szférikus agglomerációhoz a rossz oldószer szerves oldószer kell, hogy legyen. Az alkalmazott szerves oldószert körültekintően kellett megválasztani egyrészt, mert a fehérje típusú hatóanyag szerves oldószerek hatására irreverzibilisen kicsapódhat, másrészt egy gyógyszer hatóanyag formálásakor a toxicitás elkerülésének nagy jelentősége van. A hatóanyag polimeres oldatából szerves oldószer hatására a hatóanyag és a polimer együttes kicsapódása következhet be és így mikromátrixot vagy más néven mikrogömböket kaphatunk. Az agglomerátumok

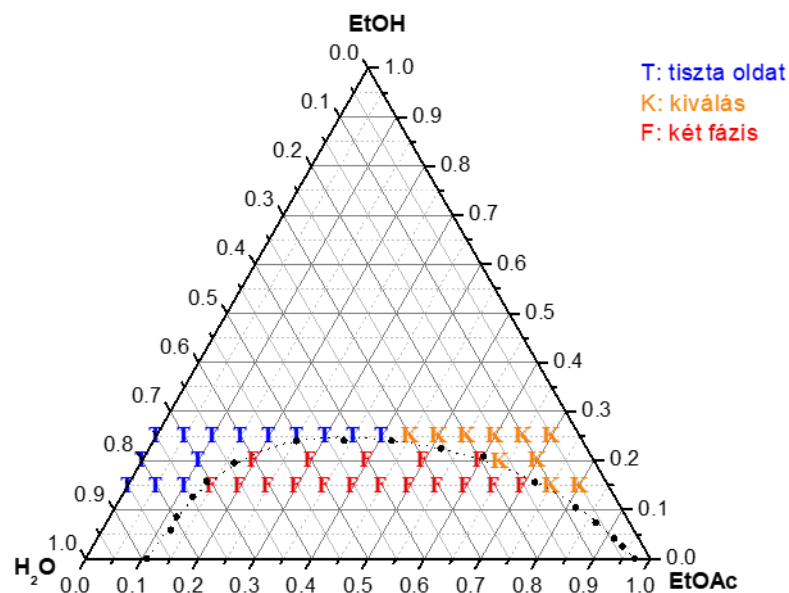
előállításához tehát ennek megfelelő oldhatóságú polimert kellett választanom, ezért hordozó polimerként a kitozán mellett döntöttem. A kitozán és a HSA egyaránt pozitív töltésű savas pH-n, ezért feloldhatók egymás mellett ecetsavas oldatukban. Az így kialakuló ecetsavas oldat pH-ja 3,3, amely pH-n a HSA konformációjában bár történhet kisebb mértékű változás az irodalmak szerint [104], az interferon-alfa savas pH-n is stabil. A pH-t egészen 3,1-ig csökkentve nincs szignifikáns változás a konformációban. [105] Az emberi vérből származó természetes interferon előnyei közé tartozik, hogy a tapasztalatok szerint a jelenlévő HSA megvédelmezi az interferon-alfát bizonyos fizikai hatásoktól. Az etanol hatására lejátszódó kicsapás során pedig a kitozán védheti meg a fehérjét a denaturálódástól, ill. mátrixanyagként magába is zárhatja. Mindemellett a kitozán egy természetes poliszacharid, amely nem toxikus, biokompatibilis, biodegradálható és a szerves oldószerek nem oldják. A kitozán oldat a viszkozitásából adódóan kismértékben stabilizálhatja a kialakuló kvázi-emulziót. Az oldhatóságok [106] és az alacsony toxicitás figyelembevételével az etanol mellett az etil-acetátot választottuk az agglomeráláshoz rossz oldószernek. A H<sub>2</sub>O-EtOH-EtOAc oldószerrendszerre ismertek az egyensúlyi oldhatósági adatok [107]. A H<sub>2</sub>O-EtOH-EtOAc oldószerrendszerben bizonyos összetételeknél két fázis alakul ki, amelyek keverés nélkül szételegyednek. A kváziemulzió-cseppekben a kristályosodás eredményeképpen szférikus agglomerátumok jöhetnek létre. További kompozit alkotóként nátrium-[poli-(sztirolszulfonát)]-ot alkalmaztam, mert a kitozánnal kialakuló ionos kölcsönhatás révén segíti a szemcseképzést.

### 5.1.1.1 A fázisdiagramok meghatározása

A három oldószer elegyedésének mértékét a különböző oldószer-összetételeknél a fázisegyensúlyi görbe, vagyis a konód – amely elválasztja a heterogén kétfázisú és a homogén egyfázisú régiókat a fázisdiagramon belül – és a binódák írják le. A kitozánt és a PSS-t külön-külön, míg a kitozánnak és a HSA-nak az együttes viselkedését vizsgáltam a H<sub>2</sub>O-EtOH-EtOAc háromkomponensű oldószerrendszerben a nem elegyedő régióban, és az egyensúlyi oldhatósági görbe környezetében. A vizes és a szerves fázis egyensúlyi, ill. oldhatósági adatai az irodalmakból származnak [107,108]. A szférikus agglomerációhoz a megfelelő kiindulási oldószer-összetétel kiválasztása azok közül az oldószer elegyek közül történt, amelyben a kitozán és a HSA együttesen is feloldódik.



Míg az agglomerálás lejátszódása olyan oldószer-összetételek esetén várható, amelyekben a kitozán kicsapódik, és hordozó mátrixa lehet a HSA hatóanyag. A kitozán oldhatóságának vizsgálatakor a vizes fázist fele részben 1%-os kitozán oldat alkotta, fele részben pedig kétszer desztillált víz. Három különböző etanol térfogat% tartalom (25, 20, 15%) mellett kerestem egyrészt azokat az oldószer összetételeket, ahol a kitozán nem válik ki, másrészt azokat, ahol a csapadékképzés révén kialakulhatnak az agglomerátumok (5.1. ábra). A kékszínű T karakterrel jelöltem azokat az összetételeket, amelyeknél az oldat tiszta, egy fázis marad. Sárgaszínű K betűvel, ahol kicsapódás tapasztalható és piros F karakterrel a kicsapódás nélküli két oldószerfázisra szételegyedő összetételeket jelöltem.



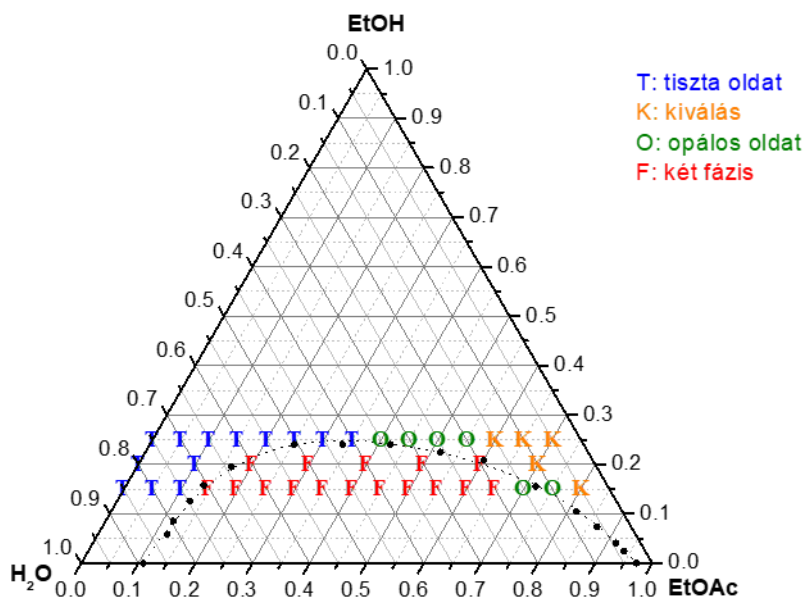
5.1. ábra. 1%-os kitozán oldat oldhatósági tulajdonságai víz–etanol–etil-acetát oldószerhármásban térfogattörteteket ábrázolva

Csapadékkiválás egyértelműen a magasabb etil-acetát koncentrációknál 85–90% (V/V), a fázishatár közelében és az elegyedő fázisban figyelhető meg. 25% (V/V) EtOH tartalom mellett ez a csapadékkiválás az EtOAc koncentrációja  $\geq 45\%$  (V/V)-nál történt meg, míg 15% és 20% (V/V) EtOH koncentrációnál már alacsonyabb 10 és 15% etil-acetát mennyiség is elegendő volt a kicsapódáshoz. Azoknál az oldatösszetételeknél, ahol két oldószerfázis van jelen, bár csapadékkiválás nem tapasztalható, a kitozán a két folyadékfázis közötti határfelületen megmerevedett polimerfilm formájában halmozódik fel.

A kitozán oldhatóság vizsgálatakor alkalmazott oldószer-összetételekben tanulmányoztam a PSS oldhatóságát is (5.2. ábra). A vizes fázist fele részben 2%-os PSS

## Eredmények és értékelésük

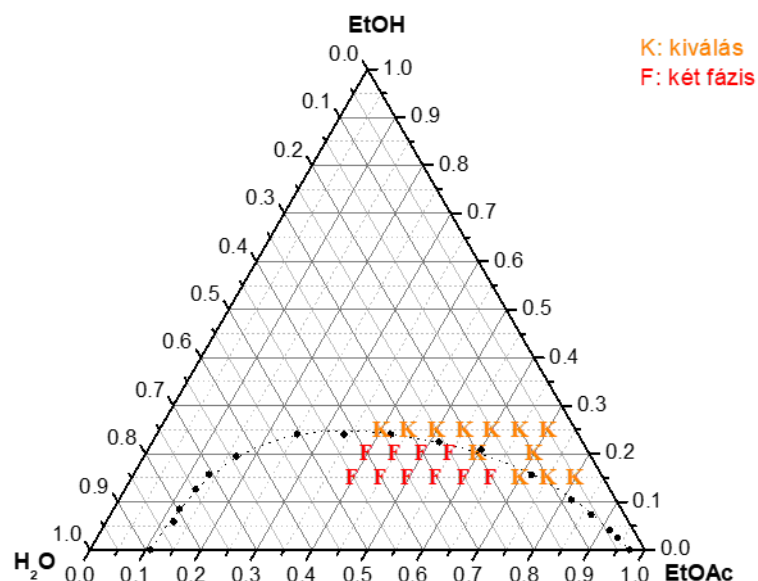
oldat alkotta, fele részben pedig kétszer desztillált víz. Az önmagában jelenlévő PSS hasonlóan viselkedett, mint a kitozán, ugyanúgy a nagy EtOAc koncentrációknál volt megfigyelhető a kiválás, mint a kitozánál. Az eltérés abban mutatkozott meg, hogy néhány összetételnél nem egyértelmű csapadékképződést tapasztaltam, hanem csak kisebb mértékű opálosodás látszott az elegyekben. Az 5.2. ábrán az opálosodás jelzésére zöld O betűt használtam.



5.2. ábra. 2%-os PSS oldat oldhatósági tulajdonságai víz–etanol–etil-acetát oldószerhármásban térfogattörtben ábrázolva

A PSS az oldószerhármásban mutatott oldhatóságát külön vizsgálatokkal összesen 33 összetételnél határoztam meg (M.1. táblázat), mely adatokat a Statistica programmal értékeltem ki. A mért és számított pontokra a legjobb korrelációt a full cubic típusú leírással kaptam. A részletes adatokat és az ezekből készült 3D-s ábrát a mellékletben tüntettem fel. (Melléklet 8.1. pontjában, M.2., M.3. ábrák)

A kitozán és a HSA együttes viselkedésének nagyon fontos szerepe van az oldószerkegy megfelelő kiindulási összetételének kiválasztásában. A mérésekben a vizes fázist fele részben 1%-os kitozán oldat, fele arányban kétszeresen desztillált víz és HSA oldat alkotta. A kitozán és a PSS polimereknél tapasztaltak alapján a kitozán és a HSA együttes viselkedését, az EtOAc koncentrációja  $\geq 40\%$  (V/V)-nál, vagyis már egy szűkebb összetétel-tartományban vizsgáltam (5.3. ábra).



5.3. ábra. 1%-os kitozán és 38 g/l HSA oldat együttesen jelentkező oldhatósági tulajdonsága víz–etanol–etil-acetát oldószerhármasban térfogattörtben ábrázolva

A HSA hozzáadásával az együttes oldhatóság mindhárom etanol térfogat%-nál csökkent. A kitozánnál megfigyeltekhez képest HSA jelenlétében legalább 5% (V/V)-kal kisebb EtOAc tartalom mellett már csapadékképződés történik, vagyis pl. 10% EtOH tartalomnál már 70% EtOAc mennyiség mellett a nem elegyedő fázis tartományán belül is van csapadékkiválás. A kitozán kiválásakor hidrogél alakul ki, amely az üvegedényekhez nagy affinitást mutat. A szemcsék jobb kezelhetősége érdekében a kitozánt „keresztkötöttem” PSS-sel. A polimerek keresztkötésének másik előnye, hogy a HSA is megvédhető az oldószer okozta denaturálódástól.

A két polimer között fellépő nagy elektrosztatikus kölcsönhatás révén a 2%-os PSS és az 1%-os kitozán ecetsavas oldatok összekeverése esetén mindig tapasztaltam bizonyos mértékű csapadékleválást. Megvizsgáltam, hogy a különböző oldószerösszetételeknél is igaz-e, hogy mindig csapadékleválással jár a két oldat elegyítése. Az összes vizsgált összetételnél csapadékkiválást észleltem. Elmondható, hogy ha önmagában a kitozán és a PSS jelenlétében az összes vizsgált összetételnél csapadékleválás figyelhető meg, akkor a HSA hozzáadásával (amely ecetsavas oldatában a kitozánhoz hasonlóan pozitív töltésű) is várhatóan csapadékképződés történik. Így a szemcsképzéskor a kitozán-HSA tartalmú két-fázisú rendszerhez a megfelelő mennyiségű 2%-os PSS oldatot adva várhatóan mindig lejátszódik a csapadékképződés.

### 5.1.2 Az agglomerátumok előállítása

A fázisdiagramok meghatározásával sikerült leszűkíteni azt a koncentrációtartományt, amelyben az agglomerátumok kialakulását vártam. A különböző oldószer-összetételeknél jelentkező fázisváltozások alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a szférikus agglomerációhoz a kiindulási összetételt a nem elegyedő fázisból kell választanom. Egyrészt azért, mert a vizes fázist a szerves fázisban eldiszpergálva kvázi-emulziót hozhatok létre, és az agglomeráció pl. etanol adagolására a nem elegyedő fázisban indulhat meg. Másrészt ebben az összetétel-tartományban nem kell tartani a HSA denaturálódásától. Mivel a csapadékképződés elsősorban a fázishatáron és az elegyedő régióban történik meg, ezért ezek az összetételek lehetnek alkalmasak az agglomerátumok kialakítására. Több mint 60 kísérletet végeztem az adott tartományban az agglomerátumok előállítására. A kísérletek során a szűk tartományon belül mozogva, nem elsősorban az összetétel határozta meg a kapott agglomerátumok minőségét, hanem több különböző paraméter együttes hatására jöhetett létre a megfelelő mértékben szférikus kompozit szemcse.

### 5.1.3 Kísérletek etanol rossz oldószerrel

Az előállítási kísérletek során több lépésben elegyítettem a hatóanyag és a polimerek vizes oldatát az alkalmazott szerves oldószerekkel a különböző oldószer-összetételek kialakításához, amelyekben a folyamatok az oldhatósági viszonyoknak megfelelő mértékben és sebességgel játszódtak le.

Kiinduló lépésként összemértem a reaktorban a kétfázisú H<sub>2</sub>O-EtOH-EtOAc oldószer elegyet (1. lépés), amelyhez hozzáadtam az 1%-os ecetsavas kitozán oldatot (2. lépés), majd a HSA oldatot (3. lépés). Általában 10 perc keverés után hozzápipettáztam a 2%-os PSS oldatot (4. lépés), ezzel létrehozva a korábban meghatározott tartományon belül lévő kétfázisú kiindulási elegyet. A kísérletek során a bemérések eddig a pontig mindig hasonlóan történtek. A további lépésekben az elegyedő fázis eléréséhez szükséges EtOH, ill. EtOH-EtOAc elegy adagolásának (5. lépés) módját változtatva vizsgáltam a kialakuló szemcsék morfológiáját. A 6. lépésben pedig további etanollal szilárdítottam a szemcséket.

Az 5.1. táblázatban láthatók a több mint 60 kísérletből kiválasztott 16 kísérletnek az előállítási paraméterei, úgymint a víz, mint jó oldószer és az etanol mennyisége térfogattörtben kifejezve a szerves fázisban a 4., 5. és a 6.-dik előállítási lépésben.

## Eredmények és értékelésük

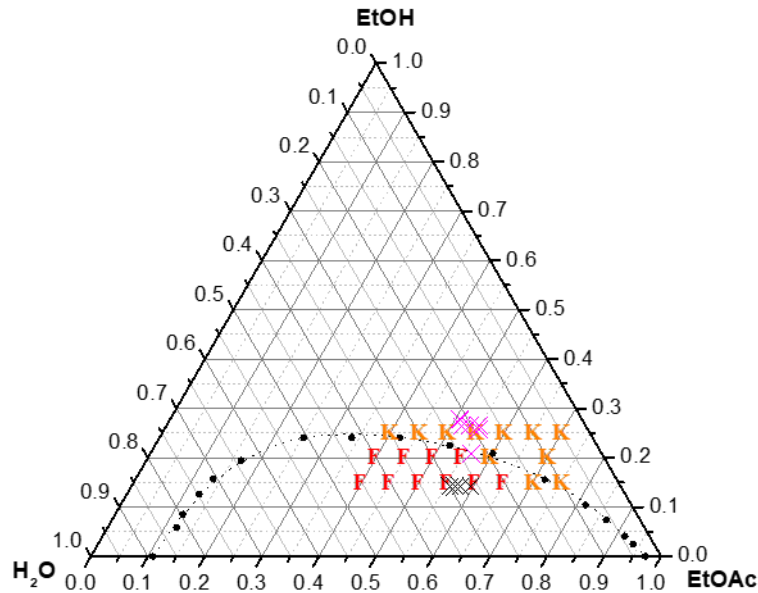
Ezenkívül a rossz oldószer adagolási módját, a térfogati átlag szemcseméretet és az eloszlás szélességét (Span), végül az utolsó oszlopban az agglomerátumokat minőségük szerint rangsorolva tüntettem fel. A sorszám szerint az egyes a leghabályosabb agglomerátumot, míg az A jelzés az adott csoporton belül a jó stabilitású szemcsét jelenti, míg pl. a 4B szabálytalan alakú és rossz stabilitású szemcséket jelöl.

**5.1. táblázat. Néhány jellemző kísérlet eredményei és előállítási körülményei a morfológiai tulajdonságok alapján rangsorolva,  $\Phi$  a térfogattörtet jelöli**

Kísérlet	4 lépés után		5 lépés után		6 lépés után		EtOH adagolási módja <sup>1</sup>	D(4,3), $\mu\text{m}$	Span	Minőség
	Jó oldószer $\Phi$	EtOH $\Phi$	Jó oldószer $\Phi$	EtOH $\Phi$	Jó oldószer $\Phi$	EtOH $\Phi$				
I-10	0,230	0,208	0,217	0,264	0,214	0,277	F1b	278	1,2	1A*
II-25	0,299	0,143	0,230	0,208	0,214	0,277	F4	286	1,0	1A
II-28	0,281	0,143	0,217	0,264	0,214	0,277	F2	324	0,8	1A
II-29	0,291	0,142	0,217	0,264	0,214	0,277	F2	301	0,9	1A
II-26	0,299	0,143	0,217	0,264	0,214	0,277	F2	309	0,9	1A
II-2	0,299	0,143	0,217	0,264	0,215	0,274	F2	260	1,0	1B
II-21	0,281	0,143	0,217	0,264	0,214	0,277	F3	244	1,0	1B
II-20	0,299	0,143	0,217	0,264	0,214	0,277	F2	261	1,0	2B
I-14	0,230	0,208	0,217	0,264	0,212	0,287	F1b	306	0,8	3A
II-3	0,281	0,143	0,203	0,265	0,201	0,274	F3	234	0,9	4A
II-4	0,263	0,142	0,188	0,265	0,186	0,274	F3	290	0,9	4A
II-23	0,299	0,143	0,203	0,265	0,201	0,274	F3	282	1,0	4A
II-24	0,299	0,143	0,191	0,257	0,189	0,265	F2*	277	1,0	4A
II-27	0,299	0,143	0,214	0,277	0,213	0,281	F3	175	0,8	4A
II-1	0,291	0,142	0,203	0,265	0,208	0,274	F3	243	1,2	4B
I-9	0,230	0,208	0,214	0,279	0,214	0,279	F1a	183	1,5	5B

<sup>1</sup> Adagolási módszer: F1 – etanol adagolása a konóda eléréséig + további EtOH, F2 - EtOH:EtOAc keverék adagolása a konóda eléréséig + további EtOH egy vagy két részletben, F3 - EtOH:EtOAc keverék adagolása közel a konóda összetételhez, de alatta maradva, + további EtOH, F4 - EtOH:EtOAc keverék + további EtOH a konóda eléréséig + újabb részlet EtOH, \*: a konódát a nagyobb EtOAc koncentrációknál elérve, a: egy részletben, b: kettő vagy több részletben adagolva. Jó oldószer a H<sub>2</sub>O, rossz oldószer EtOH és EtOAc különböző keverékei

Szemléltetésképpen az 5.4. ábrán is feltüntettem a 16 kísérlet 4. lépés, majd 5. lépés utáni összetételeit.

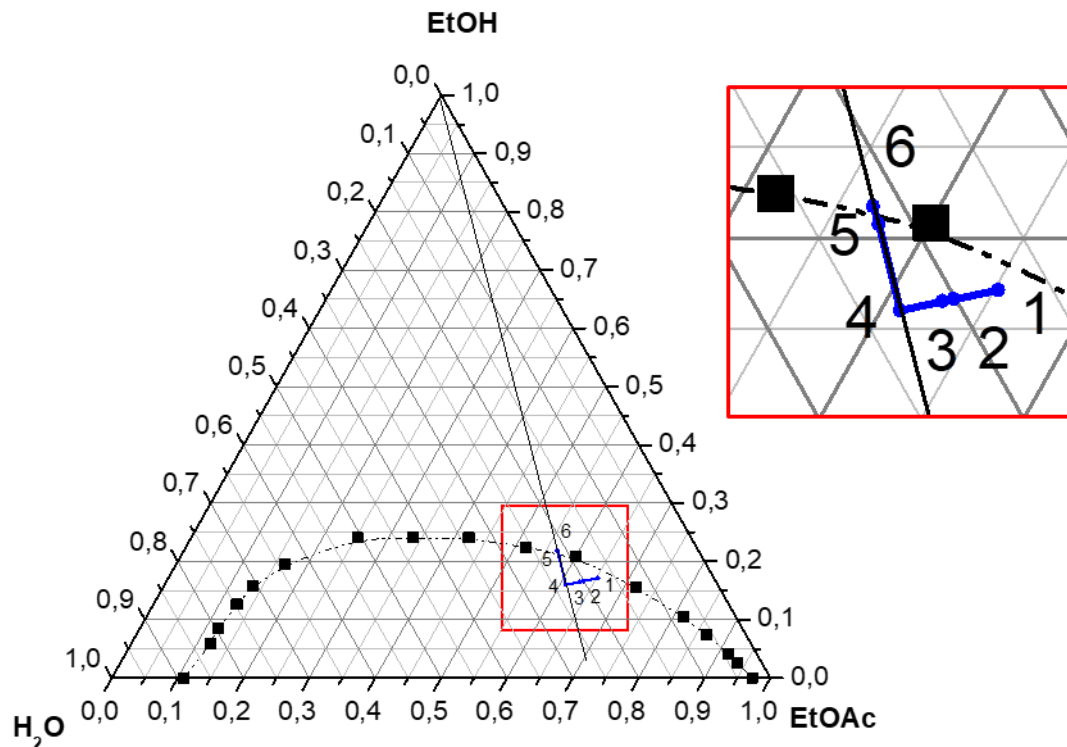


**5.4. ábra.** A kiválasztott 16 kísérlet összetételei: 4. lépés (fekete kereszt) és 5. lépés után kialakuló összetételek (lila kereszt)

Az egy részletben adagolt etanollal túl gyorsan kialakul az egyfázis, és nem képződnek agglomerátumok (I-9 minta). Bebizonyosodott, hogy nagy jelentősége van, hogy milyen módon érjük el a nem elegyedő fázist az elegyedő fázistól elválasztó egyensúlyi oldhatósági görbe, vagyis konóda által meghatározott összetételt. Egyértelműen látszott, hogy a konóda közeli összetételekben még nem szilárdulnak meg a szemcsék teljesen, ezért további etanol adagolása vált szükségessé.

Az I-10 jelzésű minta készítésekor az etanolt két részletben adagoltam, az elsőt a konóda által meghatározott összetételig, majd további etanolt adtam a már félig kialakult szemcsékhez a megszilárdításuk érdekében. A szemcsék morfológiáját tekintve ez a módszer eredményezte a leginkább szférikus agglomerátumokat. Ha az utolsó lépésben az optimálisnál több etanolt mértem a szemcsékhez, akkor a szférikus szemcsék további összeagglomerálódása volt megfigyelhető (I-14 minta).

Az 5.5. ábrán látható összetétel változások után alakultak ki az I-10 minta szférikus szemcséi.



5.5. ábra. I-10 minta előállításának lépései és az összetétel változása. 1 kezdeti összetétel, 2 kitozán oldat hozzáadása után, 3 HSA oldat hozzáadása után, 4 PSS oldat hozzáadás után, 5 első részlet EtOH után, 6 második részlet EtOH után

Az etanol rossz oldószerrel végzett kísérletekben tehát a legjobbnak mondható minta az I-10 volt. Ebben a mintában azonban a bemért szilárd anyag tartalom igen csekélynek bizonyult (46 mg), ezért erőfeszítéseket tettem arra, hogy a kiindulási összetételt bizonyos mértékben megváltoztatva, és így a kinyerhető szilárd anyag mennyiségét közel kétszeresére növelve is szférikus agglomerátumokat kapjak.

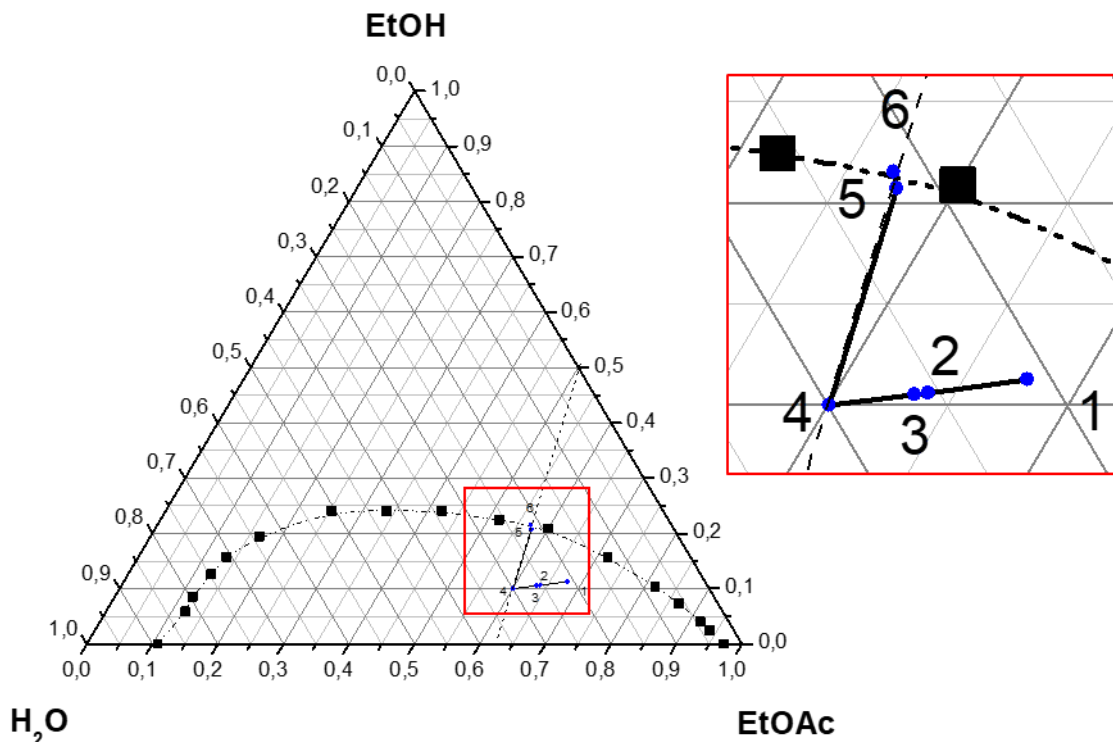
#### 5.1.4 Kísérletek etanol–etilacetát rossz oldószer eleggyel

Az eltérő kiindulási összetétel azt a változást hozta magával, hogy a kívánt végösszetétel eléréséhez már nem tisztán etanolt, hanem EtOH–EtOAc megfelelő térfogatarányú keverékét kellett alkalmaznom. Az eltérő előállítási módszer eredményeképpen kevésbé szférikus szemcséket kaptam. További kísérletek voltak szükségesek az I-10 mintánál kialakult morfológia eléréséhez.

Az 5.1. táblázatban a II-sel jelölt kísérletek zajlottak EtOH–EtOAc elegy adagolásával és nagyobb szilárd anyag tartalom mellett. Az I-10 minta készítésekor tapasztaltak alapján fontosnak tartottam arra törekedni, hogy az eltérő kiindulási

## Eredmények és értékelésük

oldószer-összetétel ellenére az EtOH–EtOAc elegy összetételét és mennyiségét úgy válasszam meg, hogy a korábban megfelelőnek ítélt, határpont közeli, majd végösszetételt érhessem el vele. A megfelelő morfológia kialakulásához több adagolási módszert kipróbáltam. A II. sorozat mintáinál kétszer annyi hatóanyagot és ennek megfelelően kétszer annyi polimert mértem be az I-10-hez képest több vízzel, elsősorban az etanol tartalom rovására. A II-1, II-2 és II-3 mintáknál a kezdeti víztartalmat változtattam kis mértékben, ugyanazt az EtOH–EtOAc oldószerelegyet és etanol mennyiséget alkalmazva. Az 5.1. táblázatban látható, hogy ebben az esetben is az az összetételű minta lett a legjobb minőségű, amelynél az oldhatósági görbéhez közeli összetétel a legközelebb volt az I-10 minta összetételéhez, vagyis a II-2. Az 5.6. ábrán a II-2 minta összetétel változása követhető nyomon.



**5.6. ábra. A II-2 minta előállításának lépései és az összetétel változása. 1: kezdeti összetétel, 2: kitozán oldat hozzáadása után, 3: HSA oldat hozzáadása után, 4: PSS oldat hozzáadás után, 5: EtOH–EtOAc elegy után, 6: utolsó részlet EtOH után**

A táblázatban a II sorozat mintái a II-1, II-2 és II-3 minták különböző variációi. A II-21 minta előállításánál alig van különbség a 4. lépés utáni összetételben, míg az 5. és 6. lépés utániban nincs is, mégis az EtOH–EtOAc mennyisége és összetétele miatt eltérő az utolsó lépésben szükséges etanol térfogata is. A kialakuló morfológia ugyan elfogadható,



de mivel az etanolt az EtOH–EtOAc elegy hozzáadása után még két lépésben adagoltam, ezért kevésbé stabil szemcséket kaptam.

A II-2 és II-3 mintáknál vagy a szemcsék alakja, vagy a stabilitása, a II-1 mintánál egyik sem volt megfelelő.

Ellenben a morfológiáját és stabilitását tekintve az I-10 tulajdonságainak a II-25 minta felelt meg legjobban, amelynél a II-2-es kiinduló összetételéből az I-10-es kiindulási összetételén keresztül haladva jutottam el az I-10-es határközeli és végösszetételéhez. Az átlagos szemcseméret és a szemcseméret eloszlás szélessége is nagy hasonlóságot mutatott a két minta esetében. Kijelenthető, hogy nagy jelentősége van annak, elsősorban az oldószer-összetétel szempontjából, milyen utat jár be a minta a kiindulási összetételtől a végösszetétel eléréséig.

### **5.1.5 Morfológia, szemcseméret**

#### **5.1.5.1 Morfológia**

A minták előállításának különböző módozatait nehéz lett volna bemutatni a morfológiára való utalások nélkül, hiszen a módszer alkalmasságát pontosan a szemcsék alakja határozza meg. Az 5.1. táblázatban szereplő, a morfológiát és stabilitást leíró kategóriákat egyrészt látható mikroszkópos és SEM felvételek alapján, másrészt a szemcseméret eloszlás mérésekor tapasztalt szemcseméret eloszlás változása szerint állítottam fel. A felállított kategóriák jellemző képviselőiről egy-egy látható mikroszkópos képet az 5.2. táblázatban (az összesről a Melléklet 8.2. M.4. táblázatban), ill. 4 pásztázó elektronmikroszkópos képet pedig az 5.7. ábrán mutatok be.

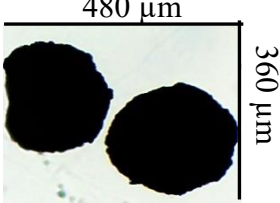


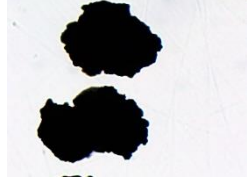
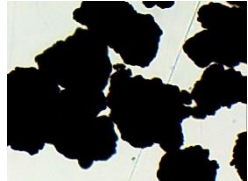
Az 5.7. a-d ábrán 4 nagyon jellegzetes minta elektronmikroszkópos képe látható. A felvételek az I-9, I-10, I-14 és a II-2 mintákról készültek. A kategória besorolásban az I-9 az 5A jelzést kapta, mert rossz stabilitású és laza csomók, mállási törmelékek jellemzik. Az I-10 minta az 1A jelzéssel a jó stabilitású és majdnem szférikus szemcsék közé tartozik. Végül az I-14 mintát a 3A jelzéssel jó stabilitású, de összeolvadt agglomerátumokként írhatom le.

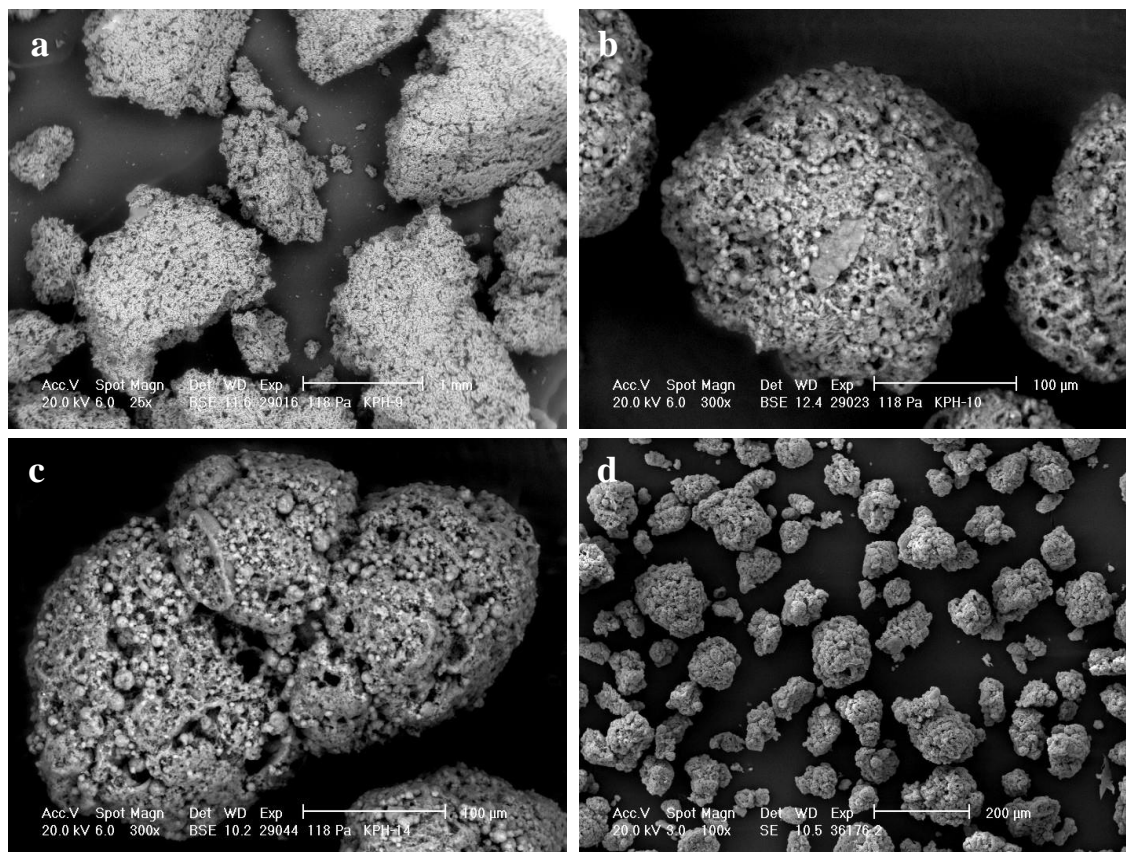
Az 5.7.a ábrán az etanol egy részletben való adagolásával nyert részecskék láthatók, ebben az esetben az 5. és 6. lépés összeolvad. Ez instabil és nem teljesen agglomerált csomók és mállási törmelékek keletkezését eredményezte viszonylag széles

## Eredmények és értékelésük

méreteloszlással. Ez a nem elegyedő fázisban jelenlévő cseppekből történő viszonylag gyors vízelvonással és ennek hatására a maradék szilárd anyag gyors kiválásával magyarázható. Így nem maradt elegendő idő a kötőhidak és a szférikus agglomerátumok megfelelő kialakulására, ezért a kapott részecskék törékenyek és hajlamosak a szétesésre. Az 5.7. b. és c. ábrán bemutatott termékeket (I-10. és I-14. minták), a rossz oldószer (ezekben a kísérletekben az etanol) két részletben való adagolásával kaptam, így elegendő időt hagytam az agglomerációra és a szemcsék kikerekedésére. Ezek a termékek meglehetősen stabilnak bizonyultak és majdnem gömb alakúak.

**5.2. táblázat. Néhány jellemző kísérlet morfológiai tulajdonságainak bemutatása fénymikroszkópos felvételekkel (kamera által készített kép 10X nagyításnál 480  $\mu\text{m}$  X 360  $\mu\text{m}$  nagyságú, míg az 4X nagyításnál 1200X900  $\mu\text{m}$ .)**

Kísérlet	Minőség	Jellemzők	Mikroszkópos felvételek	Nagyítás
II-26	1A	Jó stabilitású és majdnem szférikus szemcse		10X
II-2	1B	Rossz stabilitású, de majdnem szférikus szemcse		4X
II-20	2B	Jó stabilitású, de kevésbé szférikus szemcse		4X
II-3	4A	Jó stabilitású, de szabálytalan alakú szemcsék		10X
II-1	4B	Rossz stabilitású és szabálytalan alakú szemcsék		10X



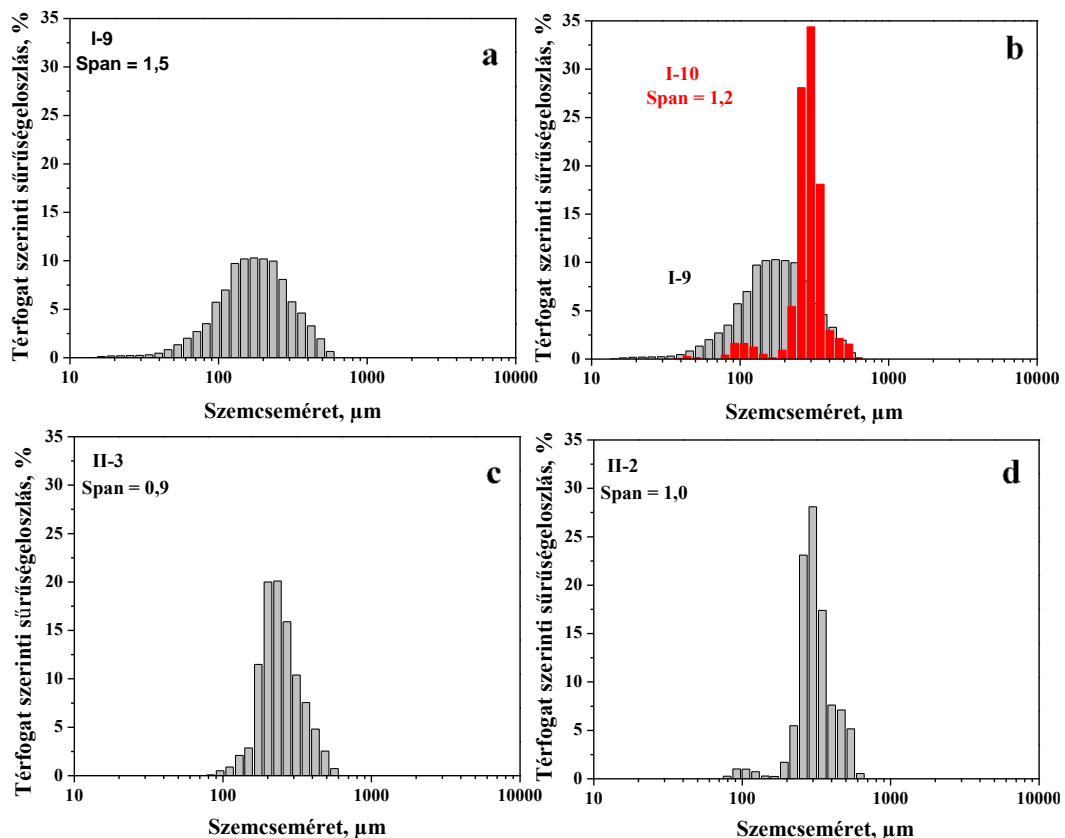
5.7. ábra. Négy jellemző termék pásztázó elektronmikroszkópos képe, a: I-9, b: I-10, c: I-14, d: II-2

A rossz oldószer összetételének is van némi hatása a termék minőségére: az I. csoportban a kísérletekben tiszta etanolt adagoltam mind az 5-dik, mind a 6-dik lépésben, amely általában szférikusabb formát eredményezett a II. csoport termékeihez képest, ahol az 5. lépésben etanol helyett 1: 0,96 arányú EtOH–EtOAc elegyet használtam. Az etil-acetát rosszabb oldószere az oldott anyagoknak, mint az etanol, ennek megfelelően ebben a szakaszban a folyadékhidakban maradt rendelkezésre álló oldott anyagok gyorsabban csapódtak ki, vagyis a kötőhidak a gömb alak kialakulása előtt megszilárdultak, amely merev agglomerátumokat eredményezett utólagos formálódás nélkül (5.7. d. ábra).

Az agglomerátumok további összeagglomerálódása/ összeolvadása látható az 5.7. c ábrán. Az I-14. kísérlet során valószínűleg a kisebb etil-acetát tartalom és a magasabb etanol arány miatt az agglomerátumok lágyabbak lettek és így lehetőség nyílt a másodlagos agglomerációra.

### 5.1.5.2 Szemcseméret

A kiválasztott 16 minta térfogati átlag szemcsemérete nagyrészt 234–324  $\mu\text{m}$  között változik, kivéve a II-27 és az I-9 mintákat, amelyeknek átlagmérete jóval kisebb, 175  $\mu\text{m}$  és 183  $\mu\text{m}$  (5.1. táblázat). Utóbbi két termék esetében az etanolt, ill. az EtOH–EtOAc elegyet és a plusz etanolt egy részletben adtam a rendszerhez, vagyis az 5. és 6. lépést összevontam. Mindkét esetben kevésbé tapadtak össze a kristályok a gyors vízlevonás következtében. A szemcseméret eloszlások szélességét jellemző Span értékek 0,8 és 1,5 között változnak. Szélesebb eloszlást természetesen azok a termékek mutatnak, amelyeknél részleges az agglomeráció, mint a korábban említett I-9 és a II-27 minta. Az 5.8. ábrán feltüntettem 4 jellemző minta szemcseméret eloszlását. Az 5.8. a-d ábrákból látszik, hogy a termékek méreteloszlásai általában közel log-normál típusúak, az alacsonyabb mérettartományokat nem figyelembe véve, ahol nem agglomerált részecskék vagy törmelék volt jelen.



5.8. ábra. 4 jellemző minta szemcseméret eloszlása: I-9, I-10, II-2, II-3 minták térfogat szerinti sűrűségeloszlása

Összehasonlítva az I-9 és az I-10 kísérletek méreteloszlását, amelyeket az 5.8. b ábrán együtt tüntettem fel, az nyilvánvaló, hogy az I-10 kísérletben kapott terméknek lényegesen keskenyebb az eloszlása (Span = 1,2), mint az I-9 kísérlet esetében (Span = 1,5), amelynek az oka a rossz oldószer egy, ill. két részletben való hozzáadása a rendszerhez.

Az 5.8. d ábrán a II-2 termék eloszlása nagyobb hasonlóságot mutat az I-10 mintával, mint a másik két terméké. Ez a tapasztalat egybecseng a hasonló morfológiai tulajdonságokkal is. Az agglomerátumok egyéb előállítási körülményei nem eredményeznek olyan szisztematikus eltéréseket az átlag szemcseméretben és a Span értékekben, amely további összefüggésekre mutatna rá.

### 5.1.6 Fehérjetartalom meghatározása

A reaktor kísérletek során képződött szemcsék leszűrésekor nyert anyalúg visszamaradt HSA tartalmát az általam módosított Bradford módszerrel határoztam meg. A kalibráló sor felvételekor először a fehérje oldatot adtam a reagenshez, majd az anyalúgban kialakuló oldószerarány beállításához a megfelelő mennyiségű és összetételű oldószerkeletet, mivel így elkerülhettem a szerves oldószerkeverék hatására lejátszódó fehérjekiválást. A megfelelő összetételű oldószerkeletet HSA nélküli vak részecskék előállításakor nyertem. Az így kapott szűrlet színeképét kivonva egy 190 µg/ml HSA tartalmú szűrlet színeképéből, a különbségspektrum maximuma 590 nm-nél van (M.5. ábra). A szűrlet etanol–etil-acetát tartalma ugyan befolyásolja a Bradford reagens színeképét, de a különbségspektrumából látható, hogy a lényegesen megváltozott csúcsarányok ellenére, a reagens protonátlan formájához kötött fehérje jelenlétére ebben az esetben is az 590 nm-nél megjelenő abszorbancia többlet utal. A kalibrálósor egyenes egyenletével számítható a fehérjekoncentráció a fehérje jelenlétében elvégzett szemcseképzéskor kapott szűrletben is. A kalibráló görbe és a színeképek a 8.3 Mellékletben az M.6. ábrán kerülnek bemutatásra.

A vizsgált mintában (I-24) a bevitt fehérje mennyisége alapján a szűrletben maximálisan 384 µg/ml fehérje lenne kimutatható. Ennek a szűrletnek a spektrumát a fehérje nélkül képződött szemcsék szűrletének spektrumával, ill. a minta összes fehérje mennyiségének 99%, 95%, 90%, ill. 50%-át tartalmazó, ismert fehérje tartalmú szűrletek színeképeivel hasonlítottam össze. Az egyenes paramétereivel számítható az ismeretlen fehérje tartalmú minta HSA koncentrációja, ami az I-24 termékre 10 µg/ml értéknek

## Eredmények és értékelésük

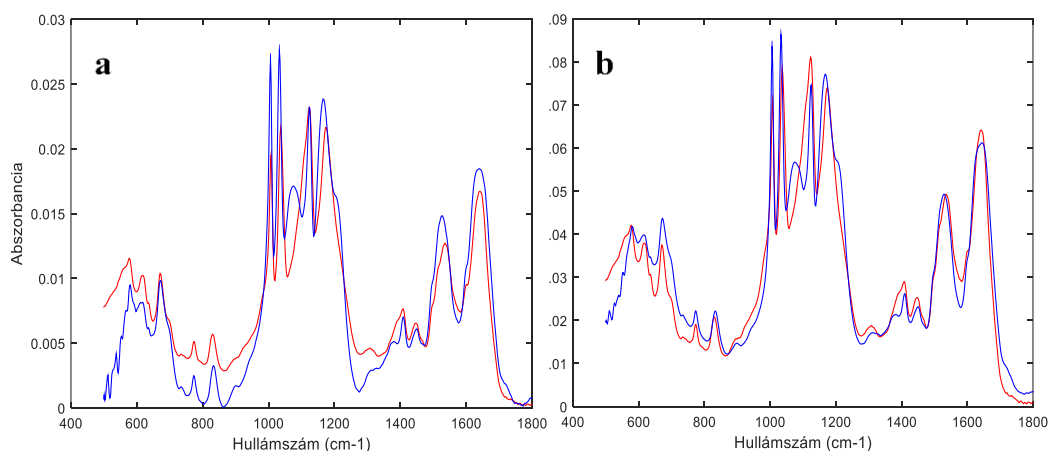
adódott. A meghatározás pontossága kb. 5 µg/ml. Ez alapján a bevitt összes fehérje mennyiségének legalább 95%-a a szemcsében van.

A szemcsék fehérjetartalmának meghatározásához a szemcséket fel kellett oldanom. Ez CTAB 0,005 M-os oldatában sikerült. A szemcsék fehérje tartalmának meghatározására sajnos a Bradford reagens így már nem volt alkalmas a jelenlévő, a kompozitot alkotó polimerek mérést zavaró hatása miatt. A Bradford módszer helyett a fehérjetartalom meghatározására az infravörös spektroszkópiát választottam, ahol a szemcséket nem kell feloldani, szilárd formában is vizsgálhatók.

Az I-10 és a II-26 mintáknak a szilárd formában felvett FTIR spektrumai közelíthetők a kompozit alkotók spektrumainak lineáris kombinációjával, az illesztést a legkisebb négyzetek módszerével végezhajtv. A jobb illeszkedés érdekében a számítást az úgynevezett „fingerprint” tartományra végeztük el. Az FTIR vizsgálatok alapján a HSA:kitozán:PSS aránya megfelel a kompozitban a bemért kompozitalkotók arányának.(5.3. táblázat)

**5.3. táblázat. Az I-10 és II-26 minták kompozit alkotóinak tömegszázalékos aránya a bemérés és a szilárd anyag FTIR vizsgálata alapján**

Kompozit- alkotók	I-10 minta		II-26 minta	
	bemért tömegarány	számított tömegarány	bemért tömegarány	számított tömegarány
kitozán	0,252	0,189±0,005	0,246	0,256± 0,010
PSS	0,501	0,557±0,002	0,490	0,486±0,004
HSA	0,248	0,253±0,003	0,263	0,258± 0,007



**5.9. ábra. Az I-10 (a) és II-26 (b) minták mért és a kompozit alkotók színképeiből illesztett szilárd anyag FTIR felvételei**

## Eredmények és értékelésük

Az illesztések eredménye az 5.9. a és b ábrákon látható külön-külön. A kék vonal jelzi a mért színeképet, a piros vonal pedig a lineáris kombinációval nyert színeképet. Megfigyelhető, hogy a II-26 minta esetében jobb illeszkedés mellett, kisebb hibával kaphatók vissza a bemért tömegarány értékek.

### **5.1.7 A PSS és a kitozán töltésarányának szerepe a szemcseképzésben**

A kitozán és a HSA közös ecetsavas oldatában lévő pozitív töltésű csoportokat semlegesíthetjük az ecetsavas oldatában teljesen deprotonált polisztirol-szulfonát csoportokkal. A semlegesítés folyamata követhető toluidinkék festék jelenlétében. A mérések részletei, elemzése és a kapott eredmény a Melléklet 8.4. fejezetében található.

A mérések majd a számítások alapján a KPH-10 minta esetében a bemért 1,15 ml 1% kitozán és 0,3 ml HSA oldatokban lévő töltések kiegyenlítéséhez szükséges PSS oldat mennyisége 0,81 ml, amelynek közel másfélszeresét 1,15 ml 2% oldatot alkalmazva állítottuk elő a szférikus agglomerátumokat. A töltés kiegyenlítéshez szükséges mennyiség meghatározása alapján az alkalmazott PSS ellenionnal egyértelműen elérhettük a töltések semlegesítését.

### **5.1.8 Keverési sebesség és idő hatása**

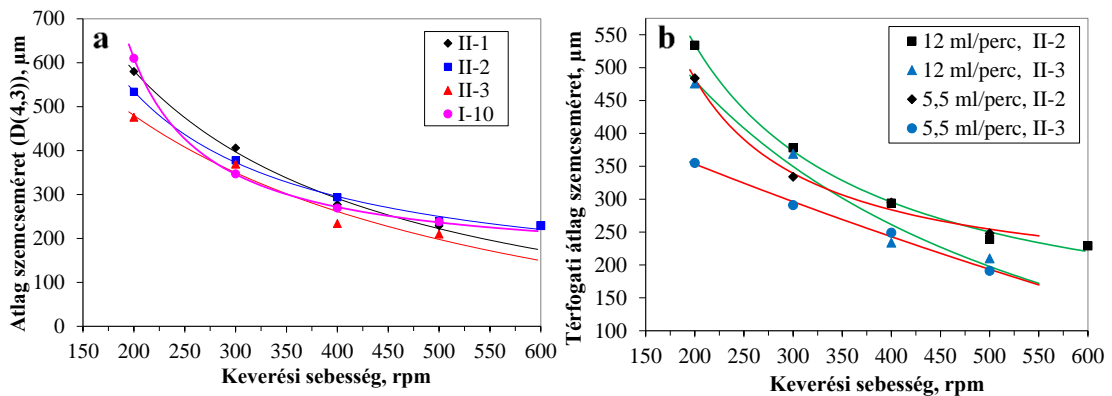
#### **5.1.8.1 A keverési sebesség hatása**

Morishima és szerzőtársai a munkájukban [37] a két különböző mechanizmussal előállított bucillamin hatóanyag szférikus agglomerátumait jellemezték. Tanulmányozták a keverési idő, sebesség és a hídanyag mennyiségének hatását a kialakuló agglomerátumok szemcseméretére.

Az általam előállított termékek minőségében tapasztalt, és korábban részletezett különbségek miatt, vizsgáltam többek között a keverési sebesség hatását az átlag szemcseméretre, egyrészt az etanol hozzáadásával kapott mintára (I-10), másrészt az EtOH-EtOAc elegy adagolásával nyert különböző kiindulási összetételből előállított mintákra (II-1, II-2, II-3).

Az 5.10.a ábrán megfigyelhető, hogy mind a négy minta esetén a keverési sebesség növelésével csökken a szemcsék átlag szemcsemérete. Kváziemulzió cseppek kialakulásakor a keverési sebesség növelésével a cseppek mérete csökken és ezzel együtt

a cseppekben kristályosodó szemcsék átlag szemcsemérete is csökken. A kialakuló szemcsék átlag szemcseméretét ez alapján a kétfázisú elegyben kialakuló cseppek mérete befolyásolja attól függetlenül, hogy tisztán etanolt egy részletben vagy EtOH-EtOAc elegyet adagoltam 12 ml/perccel. A különbség, hogy etanolt vagy EtOH-EtOAc elegyet adagoltam abban jelentkezik, hogy az etanol hozzáadásakor a szemcseméretnek a keverési sebesség függése meredekebb lefutású görbe (lila görbe) szerint változik, mint a másik három minta esetében.



5.10. ábra. A keverési sebesség hatása az I-10, II-1, II-2, II-3 minták átlag szemcseméretére 5,5 és 12 ml/perc adagolási sebesség mellett

Mivel a szemcsék több lépésben alakulnak ki, ezért több különböző paraméter együttes hatása befolyásolja a végső agglomerátum méretét. Mint korábban a morfológia tárgyalásánál megállapítottam a szerves oldószer hatására történő vízelvonás sebessége jelentős befolyásoló tényező. A négy különböző mintánál a legnagyobb különbség az átlag szemcseméretben a legkisebb keverési sebesség mellett (200 fordulat/perc) tapasztalható, ekkor jelentkezik legnagyobb mértékben a vízelvonás sebességében fellépő különbség. Habár az I-10 mintánál a legkisebb a 4. lépés után (etanol, EtOH-EtOAc elegy hozzáadása előtt) a víz aránya, mégis ekkor kaptam a legnagyobb átlag szemcseméretű agglomerátumokat ugyancsak 200 fordulat/perc-nél. Ez azzal magyarázható, hogy a kialakuló emulziócsepp méretén túl, a kristályosodás sebességében tapasztalható különbség is szerepet játszik a keletkező agglomerátumok méretében. A négy keverési sebesség közül a legkisebbnél (200 rpm) alakulhatnak ki a legnagyobb cseppek, amelyek etanol hozzáadására gyorsabban szilárdulnak, mint EtOH-EtOAc elegy adagolásánál. Ez a tény is hozzájárul ahhoz, hogy az I-10 minta átlagszemcsemérete a legnagyobb ennél az adagolási sebességnél. A 6. lépés (a végső etanol mennyiség hozzáadása) után igen

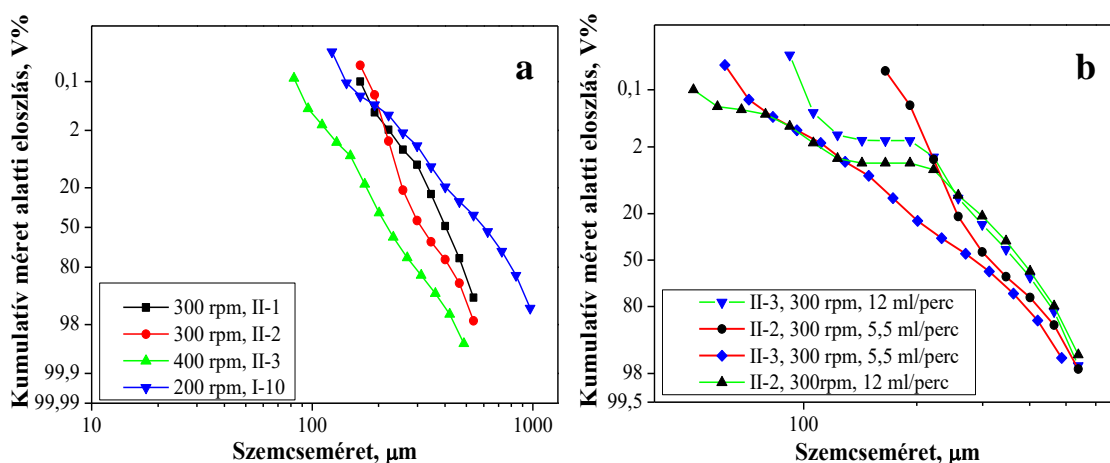


csekély a különbség a víz, ill. a szerves oldószer térfogat%-aiban a minták között, de mégis tapasztalható olyan összefüggés, hogy az átlagszemcseméret a víz arányának csökkenésével csökken. Az I-10 és II-2 minta összetétele azonos, ennek megfelelően a mért átlagszemcseméretük is szinte megegyezik. A II-1 és a II-3 minta víz aránya az előzőkhöz képest sorrendben csökken, és ezzel összhangban a szemcseméret is csökken. 500 fordulat/percnél már egyértelműen a gyorsabb keverési sebesség eredményeképpen létrejövő kisebb kváziemulzió-cseppek határozzák meg a mintákban lévő agglomerátumok méretének viszonyát. Ezen tapasztalatok alapján az oldószer-összetételnek és a vízelvonás sebességének egyaránt szerepe van abban, hogy milyen méretű agglomerátumok alakulnak ki.

Az 5.10.b ábrán a II-2 és II-3 minták átlag szemcseméreteinek alakulása látható a korábbi 12 ml/perc adagolási sebesség mellett és egy közel fele akkora elegy adagolási sebességnél, 5,5 ml/percnél. Mind a 4 esetben az előbbiekhöz hasonlóan az átlag szemcseméretnek különböző görbékkel jellemezhetően, de csökkenő tendenciát mutattak a keverési sebesség növelésével. A kék pontok a II-3, a feketék a II-2 mintához tartoznak. A piros görbék az 5,5 ml/perc, míg a zöld görbék a 12 ml/perc adagolási sebességhez tartozó adatokat kötik össze. A kisebb keverési sebességeknél (200, 300 rpm) a kisebb adagolási sebesség kisebb átlag szemcseméreteket eredményez. Ez az ábra is azt mutatja, hogy az adagolási sebességen keresztül a vízelvonás sebességének a lassabb keverésnél van nagyobb jelentősége.

A kimért keverési sebesség tartományban mind a négy mintánál található egy olyan keverési sebesség, amely mellett a kumulált méret alatti szemcseméret eloszlás kiegyenesedik, vagyis közelíti a log-normál eloszlást (5.11.a ábra).

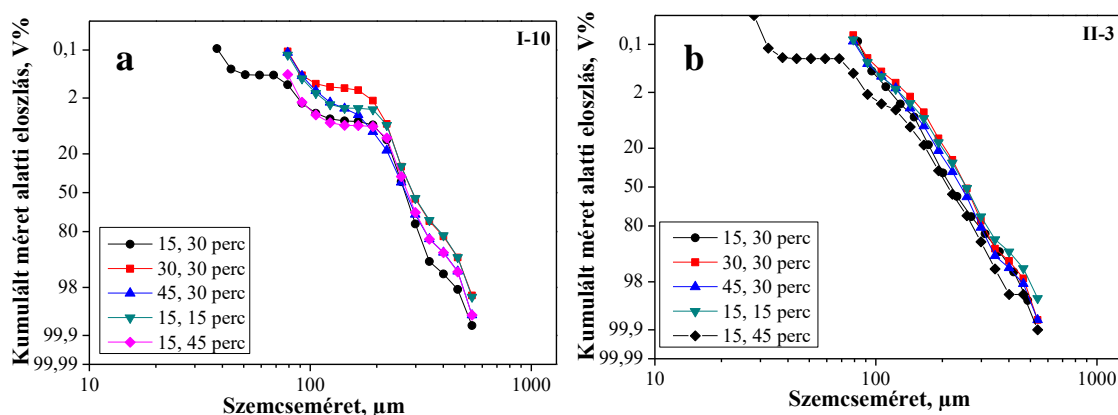
Az 5.11.b ábrán két különböző EtOH-EtOAc oldószerelegy adagolással készült termék, a II-2 és a II-3 minták, 5,5 ml/perc és 12 ml/perc adagolási sebesség mellett és 300 rpm keverési sebesség alkalmazásakor kialakuló kumulált méret alatti eloszlása látható. Mindkét esetben a lassabb adagolási sebesség mellett egyenesedik ki az eloszlás, vagyis amikor több ideje van az agglomerátumoknak a formálódásra, akkor kapunk egyenletesebb méreteloszlású termékeket.



5.11. ábra. A keverési sebesség hatása az I-10, II-1, II-2, II-3 minták szemcseméret eloszlására 5,5 és 12 ml/perc adagolási sebesség mellett

### 5.1.8.2 A keverési idő hatása

Morishima és munkatársai [37] az agglomerátumok képződési mechanizmusának felderítéséhez, majd jellemzéséhez a keverési idő hatását vizsgálták mind az átlag szemcseméretre, mind a szemcseméret eloszlásra. Megállapították, hogy ha az agglomerátum képződés SA mechanizmussal játszódik le, akkor a méreteloszlás a megfelelő mennyiségű hídanyag adagolásakor a keverési idő növelésével válik log-normál eloszlásúvá, míg az ESD mechanizmus esetében nem tapasztalunk változást az eloszlásban. Amikor a megfelelőnél több hídanyagot alkalmaztak akkor a keverési idővel nőtt a szemcseméret is. A klasszikustól eltérően az én rendszeremben nem önmagában a hídanyag mennyisége befolyásolja a többlépcsős agglomerálódást, hanem a rossz oldószer és a jó oldószer aránya és az ezáltal kialakuló vízvesztés sebessége. Az I-14 minta kialakulásakor tapasztaltam a gömbök további összeagglomerálódását. A keverési idő hatásának vizsgálatára a PSS hozzáadása után a következő két lépést követően a rossz oldószerek adagolásával kapott elegyekben változtattam a keverési időket. Mind az etanol vagy EtOH-EtOAc elegy adagolás után mind az utolsó lépésben adagolt etanol hozzáadása után 15, 30, 45 perces utókezelési reakcióidőket választottam. Az 5.12. a, b. ábrán az I-10 és a II-3 minták kumulált méret alatti eloszlása látható a különböző keverési idők mellett.



**5.12. ábra.** A keverési idők hatása az I-10, II-3 minták szemcseméret eloszlására 12 ml/perc adagolási sebesség mellett

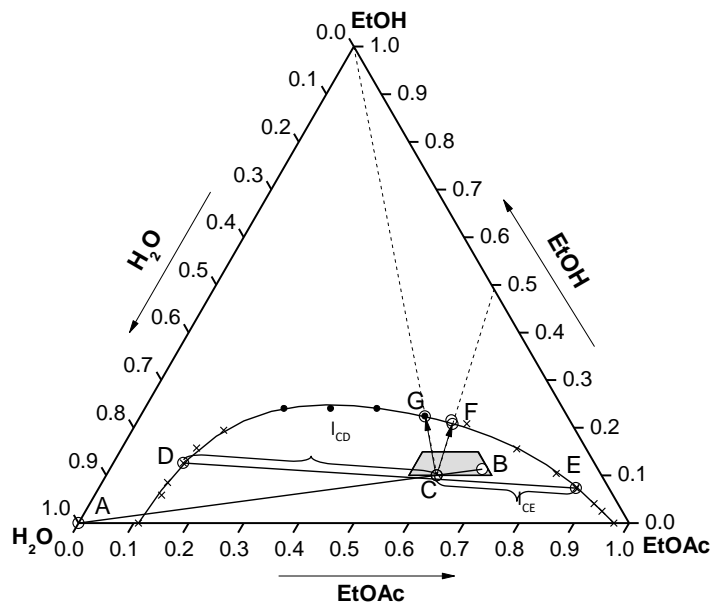
A II-3 mintánál az eloszlásgörbék kezdettől fogva log-normál eloszlást mutatnak, kivéve a 15 és 45 perc keverési idők mellett, ahol az utólagos aprózódás jelei láthatók az eloszláson. Az I-10 minta eloszlásgörbéiben (400 fordulat/percnel) a 300 µm körüli csúcson kívül a kisebb méreteknél is megjelenik egy frakció az eloszlásban. A keverési idő változásával azonban nem tapasztaltam az eloszlás kiegyenesedését. Mint korábban említettem a keverési sebesség változtatásával érjük el a log-normál eloszlást.

### 5.1.9 Mechanizmus felállítása

A kísérletek eredményeképpen meghatároztam a H<sub>2</sub>O-EtOH-EtOAc oldószerkelet fázisdiagramján egy területet (trapéz), amely azokat az összetételeket reprezentálja, ahonnan kiindulva etanol vagy EtOH-EtOAc oldószerkelet adagolásával szférikus agglomerátumok képződnek (5.13. ábra).

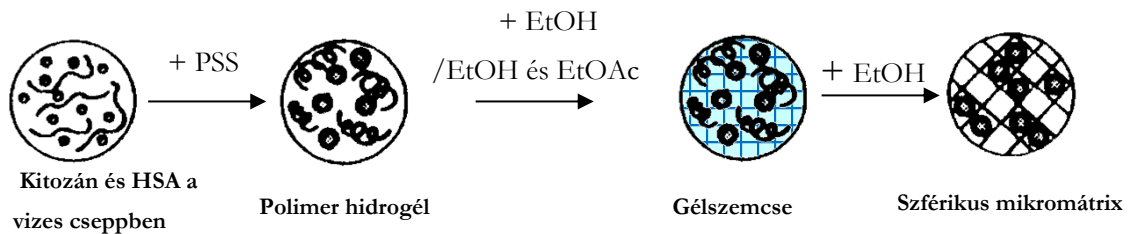
A C pontból etanol adagolásával a G pontba jutva kapjuk az I-10 minta képződéséhez szükséges összetételt, a C pontból EtOH-EtOAc elegy adagolásával az F pontba érve pedig képződik a II-3 minta.

HSA – kitozán – PSS kompozit mikrorészecskéket készítettem H<sub>2</sub>O-EtOH-EtOAc háromkomponensű oldószerrendszerben a kitozán és a nátrium-polisztirol-szulfonát kémiai reakciója és ezeknek a polimereknek az oldószeres kicsapása útján, amely folyamatok szférikus agglomerációval kombinálódtak.



5.13. ábra. Az összetételváltozások a szférikus agglomeráció során

A keverési sebesség és az idő szemcseméret eloszlásra gyakorolt hatásait, ill. Kawashima és szerzőtársainak [30, 35, 37] az agglomerátumok kialakulására és a különböző agglomerálódási mechanizmusokra tett megállapításait összevetve az általam tapasztaltakkal az 5.14. ábrán bemutatott folyamatot valószínűsítem.



5.14. ábra. Az agglomerátumok kialakulásának módját valószínűsítő mechanizmus

A kiindulási oldatösszetétel kialakítása után a keverési sebesség hatására és az oldott anyagok jelenléte révén kialakul egy kvázi-emulzió, amelynek cseppmérete csak részben ugyan, de meghatározza a kialakuló agglomerátumok szemcseméretét. A cseppben együtt van jelen a kitozán és a HSA. A PSS hozzáadásával a kitozán-PSS kölcsönhatása miatt hidrogél jön létre a cseppen belül. Az oldószeres adagolásával folyamatosan csökken a vizes fázis mennyisége és a cseppek mérete. A határfelületre érve eltűnik a vizes fázis és az oldószerre nézve egy fázis alakul ki, amelyben gélszemcsék vannak jelen. További

alkohol adagolására a felületen adszorbeált vízből további oldott anyag válik ki, amely tovább szilárdítja a gélszemcséket, ill. agglomerátumokká ragasztja össze (5.14. ábra).

A módszer érdekessége és újszerűsége, hogy a feladatomban vízoldható hatóanyag szférikus agglomerációja volt, míg általában vízben rosszul oldódó hatóanyagok formálására használják az eredeti módszert. Gyakran szuszpenzióból történik az agglomeráció, esetemben a kiindulási összetételben kétfázisú elegy van, amelyben a kváziemulzió-cseppeket nem szükséges felületaktív anyaggal stabilizálni. A hídfolyadék esetenként többkomponensű oldószer elegyből felszabaduló valamilyen szerves oldószer. A rendszeremben egyrészt vízlevonás hatására lejátszódó kristályosodás eredményeképpen alakulnak ki az agglomerátumok. Oldatból történő kristályosítással egyidejűleg lejátszódó agglomerációkor gyakran használják ki a hőmérséklet különbség okozta oldhatóság különbséget a túltelítés növelésére. Az általam kidolgozott előállítást szobahőmérsékleten végeztem. Végül az oldószer-összetétel megváltozáson túlmenően a PSS, mint kicsapószer is segíti a kristálykiválást.

### **5.2 Timsó agglomerátumok előállítása**

Funkcionális mikrorészecskék létrehozására a második példa, egy fázisváltó hőtároló kapszula maganyagának szférikus kristályosítással történő előállítása. A feladat ebben az esetben is vízoldható anyag, mégpedig K-timsó kristályok szférikus kristályosítása volt. A szférikus kristályosításhoz, mint korábban említettük választanunk kell egy oldószerrendszert, ahhoz egy jó oldószert, amelyben az oldott anyag viszonylag nagy koncentrációban feloldható, ha szükséges bizonyos mértékű hőmérsékletemelés segítségével. Szükség van egy rossz oldószerre, amely hatására a kristályos anyag a jó oldószeres oldatából kicsapódik. Általában, a klasszikus szuszpenzióból való szférikus agglomerációhoz hasonlóan a fentiek mellett szükség van egy a rossz oldószerrel nem elegyedő, az adott kristályokat jól nedvesítő, úgynevezett hídfolyadékra, amelyben a kristályok felülete feloldódik és az így kialakuló kristályosítási göcök szférikus agglomerátummá kötik össze a szemcséket. Az agglomerátumok ezeknek az oldószereknek a fázisdiagramjukon meghatározott, megfelelő összetételeinek alkalmazásával állíthatók elő.

### 5.2.1 Az oldószerrendszer felépítése

Sóhidrátok esetében és ez igaz a timsóra is, a sónak vízben igen magas az oldhatósága, már akár szobahőmérsékleten is (10,83 g kristályvizes só/100 g oldószerben), ami még tovább növelhető a hőmérséklet emelésével, így jó oldószerének kézenfekvő választás a víz. A timsó kisózásához számos szerves oldószer megfelelő lehet. Etanol és aceton alkalmazásával több irodalomban találkozhatunk [109, 110]. Az irodalomban megtalálható timsó oldhatósági adatok alapján [109] az etanolt választottam a só rossz oldószeréül. Vízoldható anyagok esetében a híd folyadék általában maga a só oldata lehet. A sót vizes oldatából etanollal kicsapva a kristályosodást követő bizonyos mértékű agglomerációt tapasztalhatunk, ez azonban ekkor még nem szabályozottan lejátszódó, így nem is szférikus agglomerációhoz vezet. A tapasztalatok alapján szükségünk lehet egy másik rossz oldószerre, amely segítségével létrehozható egy oldószerrendszer, amelyben a só szférikusan agglomerálódik.

Értelemszerű megoldásnak látszott a korábbi munkámban alkalmazott H<sub>2</sub>O-EtOH-EtOAc terner oldószerkelet. Az eredmény azonban nem a várakozásoknak megfelelő volt. A magyarázat a későbbi kísérletek eredményeiben rejlett. A H<sub>2</sub>O-EtOH-EtOAc oldószerrendszerben a három oldószer elegyedése kisebb etanol térfogat%-os összetételnél következik be, mint amennyi etanol szükséges a timsó kvázi-emulzióban való kristályosodásához.

A harmadik oldószer kiválasztását végül két feltétel befolyásolta. Az egyik arra vonatkozott, hogy a maganyag előállítása után a képződött anyalúg csekély mértékű változtatással a maganyag mikrokapszulázásakor is felhasználható legyen. A másik feltétel pedig az volt, hogy az így összeállított oldószerhármásra lehetőség szerint rendelkezésre álljanak fázisegyensúlyi adatok az irodalomban. A kiválasztott oldószerkelet közül a diklór-metán jó oldószer, a hexán pedig rossz oldószer a mikrokapszulázáshoz felhasználni tervezett polimereknek, az etil-cellulóznak és a poli(metil-metakrilát)-nak. A mikrokapszulázáshoz egyrészt a nagyobb mennyiségű diklór-metánba lehetne beoldani a kapszulázó polimereket és szilárd/olaj/víz emulzióból oldószer elpárologtatással kialakítani a polimerhéjat a maganyag körül. Másrészt hexán jelenlétében koacervációval lenne kapszulázható a maganyag. Ezen megfontolásokon túl, ennek a két oldószernek a kiválasztása mellett szólt még az a tény is, hogy mindkét oldószerhármásra megtalálhatók az irodalomban az egyensúlyi fázisdiagramok [111, 112].

A H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx terner oldószerrendszerrel végzett kísérletek világítottak rá arra a lehetőségre, miszerint a víz-etanol, ill. a sóra nézve az irodalmi adatok alapján hasonló timsó oldhatósági viszonyokat mutató víz-izopropil-alkohol biner rendszerek is alkalmasak lehetnek a timsó szférikus agglomerátumainak előállítására.

### 5.2.2 Timsó agglomerátumok előállítása

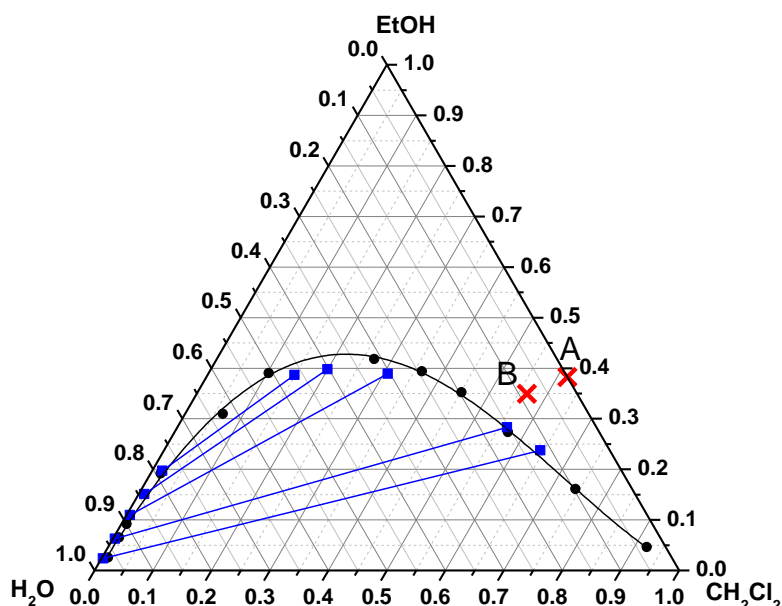
Az oldószerrendszerek kiválasztása után kísérleteket végeztem, mind a H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM, mind a H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx oldószerrendszerben.

#### 5.2.2.1 Kísérletek víz-etanol-diklór-metán oldószerrendszerben

Az 5.15 ábrán látható a H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM terner oldószerrendszer fázisdiagramja térfogattörtek formájában feltüntetve. A teli pontok jelzik az egyensúlyi oldhatósági adatokat, a kék, teli négyzetek a binódák adatait [111]. Az oldhatósági görbe alatt elhelyezkedő térfogatarányoknál az oldószerkeverékek összetétele az egyensúly beállta után két egymással egyensúlyban lévő (ezek a binódák két végpontjában elhelyezkedő összetételek) elegyre válnak szét. Az oldhatósági görbe feletti térfogatarányoknál a három oldószer elegyedik egymással. Kísérleteket végeztem a nem elegyedő és az elegyedő fázisok határán, 24–56% (V/V) diklór-metán tartalom mellett. A kísérletek során a cél olyan oldószer-összetétel kikísérletezése volt, amely esetében a kialakuló kezdeti túltelítés elegendően magas ahhoz, hogy a kristályok nagyszámú gócot képezzenek, de maradjon még hajtóerő az agglomeráció lejátszódásához.

A korábbi tapasztalataimból kiindulva az volt az elképzelés, hogy a terner oldószerrendszerben víz az olajban típusú kvázi-emulziót hozzak létre és ebben a kvázi-emulzióban történő kristályosodás eredményeképpen jöjjenek létre a szférikus agglomerátumok a HSA-kitozán-PSS- kompozit szemcsékhez hasonlóan.

A kiindulási összetételek a kétfázisú oldószerteremtományba estek (5.4. táblázat). A diklór-metán kiindulási V/V%-a 30% és 39%, az etanolé 24–40%, a hozzáadott vízé 18% és 27% volt. A sóoldat térfogathányada 0,09–0,35 között változott. A kristályosodáshoz és az egyfázis eléréséhez (az oldószerkeverékek elegyedéséhez) etanol adagolására volt szükség.



5.15. ábra. Víz–etanol– diklór-metán oldószerszármazékok fázisegyensúlyi diagramja

5.4. táblázat. Szférikus kristályosítási kísérletek összetételei víz–etanol–diklór-metán oldószerszármazékokban

Minták neve	DCM térfogattört a folyamat végén, (kiindulási térfogattört)	Etanol térfogattört a folyamat végén, (kiindulási térfogattört)	Só oldat térfogattört a folyamat végén, (kiindulási térfogattört)	Víz térfogattört a folyamat végén, (kiindulási térfogattört)	+ etanol térfogata, ml	adalék anyag és a mennyisége, g
KAI02	0,24 (0,3)	0,48 (0,35)	0,28 (0,35)		9,695	-
KAI03	0,28 (0,39)	0,45 (0,25)	0,13 (0,18)	0,13 (0,18)	3,75	-
KAI05	0,27 (0,39)	0,47 (0,24)	0,06 (0,09)	0,19 (0,27)	16,75	0,1 g etil- cellulóz
KAI07	0,27 (0,39)	0,49 (0,25)	0,06 (0,09)	0,19 (0,27)	18,75	0,06 g sztearinsav
KAI20	0,27 (0,31)	0,47 (0,4)	0,26 (0,29)		6,75	-
KAI22-KAI26	0,56	0,35	0,09		-	-

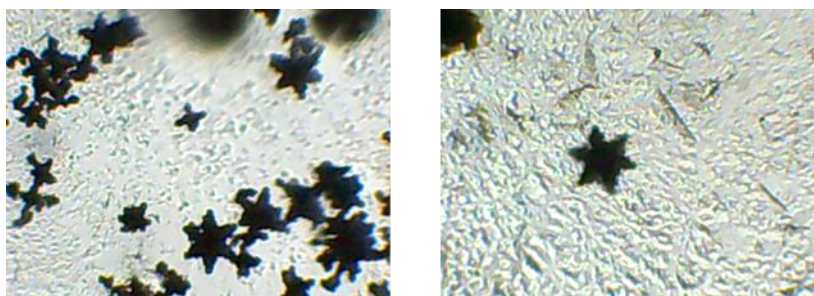
A HSA-kitozán-PSS rendszerben tapasztaltakból kiindulva feltételeztem, hogy a timsó oldhatósága szobahőmérsékleten is elegendően magas lehet ahhoz, hogy megfelelő körülmények között a kialakuló túltelítés hatására kialakuljanak a szférikus



agglomerátumok. A KA102 minta esetében a szerves oldószerkelegyhez vizes fázisként szobahőmérsékleten telített timsó oldatot adtam, majd az elegyedő fázis kialakulását etanol hozzáadásával értem el. Ennek a kísérletnek az eredményeképpen sok apró kristály keletkezett nagyon kevés agglomerátum mellett.

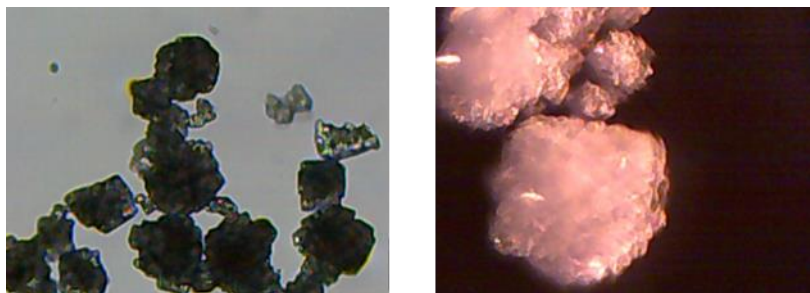
Következő lépésként a cseppben való kristályosodást azzal próbáltam elérni, hogy a sóoldat adagolása előtt kialakítottam a szerves oldószerkelegyben a vizes cseppet és ehhez a kétfázisú oldószerkelegyhez adagoltam a sóoldatot (KA103). Így már több agglomerátum keletkezett, de ezek még alakatlanok voltak, tehát a két fázis kialakítása nem segítette a megfelelő agglomerátumok keletkezését.

Kísérleteztem a kezdetben kialakuló kétfázisú rendszerben a vizes cseppek bizonyos mértékű stabilizálásával, annak érdekében, hogy a kristályok a cseppben váljanak ki, vagy esetleg a csepp határozza meg az alakjukat az agglomerálódás során. Kétféle adalékot alkalmaztam. Egyrészt etil-cellulózt (KA105), másrészt sztearinsavat (KA107). Etil-cellulóz esetében az etil-cellulóz különálló cseppeket alkotott a rendszerben. A sztearinsav jelenléte azonban érdekes eredményre vezetett, mert így a só nehezebben vált ki a rendszerből és a kedvezményezett növekedési irány miatt hatágú csillag formában (5.16. ábra).



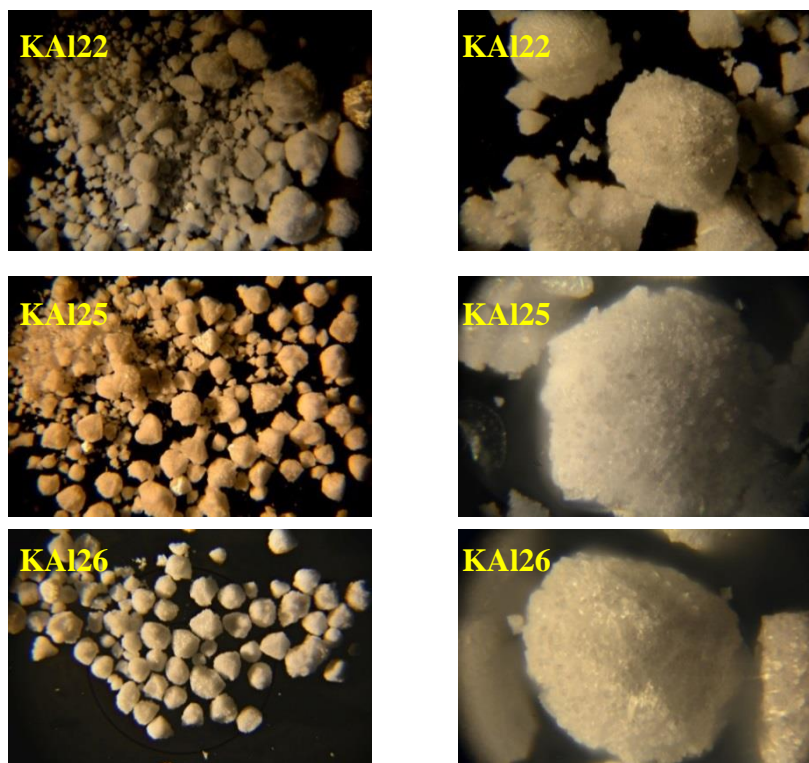
5.16. ábra. A KA107 jelzésű összetétel terméke sztearinsav jelenlétében

35 °C-on telített oldattal elvégezve a kísérletet (KA120) nagyon széles mérettartományban képződtek agglomerátumok. Ez volt az első olyan kísérlet, amelyben sikerült kevés és közel gömb alakú agglomerátumot előállítani (5.18. ábra). Mivel a sóoldat koncentrációjának növelésével a korábbi kísérletekhez képest látványosabb változást sikerült elérnem a termék minőségében, ezért az oldószer-összetételben is nagyobb mértékű változtatást hajtottam végre a túltelítés további növelése érdekében. A fentebb említett kísérleteknél a diklór-metán V/V% 24–28%-ig változott.



5.17. ábra. A KAl20 jelzésű termék fénymikroszkópos felvételei

A KAl22, KAl25 és KAl26 mintáknál a diklór-metán V/V%-át 56%-ra növeltem és három nagyon hasonló kiindulási sókoncentrációnál (14,39 g, 14,84 g és 14,37 g kristályvízmentes só/ 100 g vízben) végeztem el a kísérleteket. A kiindulási szobahőmérsékletű, 25 °C-os szerves oldószer keverékhez 40 °C-os túltelített sóoldatot adtam egy lépésben. A termékekről készült fénymikroszkópos felvételek az 5.18. ábrán láthatóak. A KAl22 mintától a KAl26 felé haladva egyre kevesebb a törmelék és egyre nagyobb mértékű az agglomeráció, tehát a KAl26 mintánál optimális a sókoncentráció (14,37 g kristályvízmentes só/ 100 g vízben) és az ebből adódó kezdeti túltelítés.

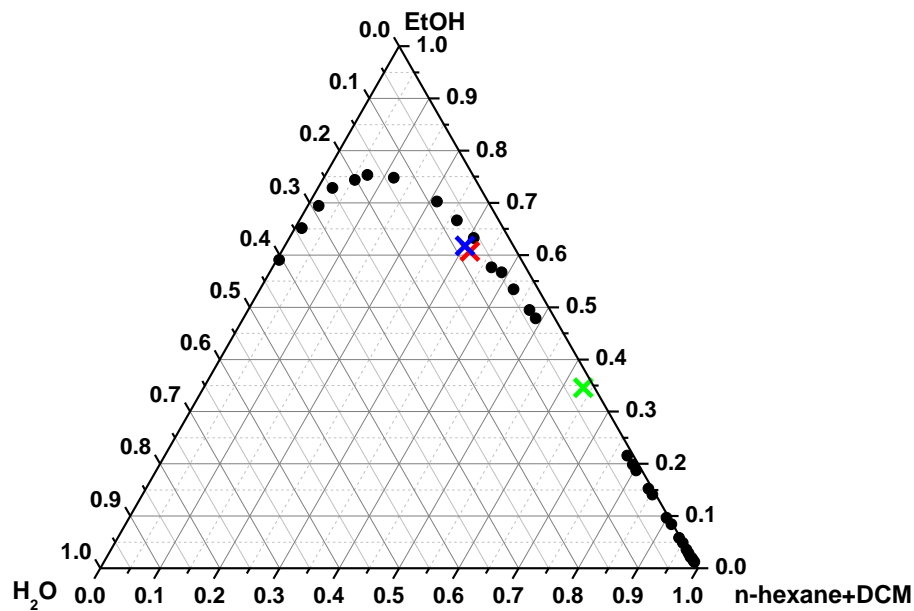


5.18. ábra. 56% (V/V) diklór-metán tartalom és a három különböző kezdeti só koncentráció mellett képződött termékek látható fénymikroszkópos felvételei, a kamera által készített kép a kisebb nagyításnál 3890  $\mu\text{m}$  X 2580  $\mu\text{m}$  nagyságú, míg a nagyobb nagyításnál 540  $\mu\text{m}$  X 358  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.2.2 Kísérletek a víz-etanol-hexán oldószerkeletben

A H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM oldószerrendszerben végzett kísérletek tapasztalatai alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a kellően stabil agglomerátum kialakításához más oldószerrendszerre lesz szükségem. Abból az elképzelésből kiindulva, hogy a kezdeti oldószerrendszert esetleg fel lehessen használni a sómagok későbbi kapszulázására, a diklór-metán oldószerrel hexánra cseréltem. A H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM rendszerben alkalmazott vizes oldat V/V%-os összetételéből (8,6%) kiindulva a H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx rendszerben 7,19 V/V%-os vizes oldat tartalom mellett végeztem az agglomerálási kísérleteket. Lényeges különbség, hogy az előbbinél, ahol az EtOH:DCM hányada 34,95% és 56,45% volt, az EtOH:Hx hányada nagyjából fordított, 65,5% és 27,3% volt. Utóbbi összetételnél a H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM rendszertől eltérő módon tömör, sima felületű szférikus szemcsék alakultak ki. A kísérletek tehát szabályos sógömbök képződését eredményezték, amelyek különböző mértékben összetapadtak a mosás, szűrés és száradás után.

A megfelelő szférikus gömbök sikeres előállítása után az volt a vizsgálat célja, hogy milyen körülmények között csökkenthető a szabályos sógömbök utólagos agglomerációja. Kétféle adalék anyaggal kísérleteztem. Az egyik, az irodalomból [113, 114] ismert utólagos agglomeráció csökkentésére alkalmas magnézium-sztearát volt. A másik „adalék”, a H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM rendszer tulajdonságait figyelembe véve a diklór-metán volt, mert a diklór-metános rendszerben nem túl erős kötőhidakkal agglomerálódtak a szemcsék. A magnézium-sztearát jelenlétében végzett kísérletekben a felületaktív tulajdonsággal rendelkező sztearát hatására a kváziemulzió-cseppek mérete ugyan csökkent, de egyidejűleg az agglomerálódás mértékét nem sikerült csökkenteni. Nagyon sok apró és nagyon aggregálódott sógömb képződött (KA137). Az adalékok mellett végzett kísérletek összetételeit az 5.19. ábrán és 5.5. táblázatban tüntettem fel.



5.19. ábra. A víz-etanol-hexán oldószerhármassal együtt tartalmazó oldószerkeverékben végzett kísérletek anyalúg összetétele a hexán és a diklór-metán mennyiségét együtt számolva

A piros X-el jelzett anyalúg összetétel esetében (KA139) 2% (V/V) diklór-metán jelenlétében kialakult a kvázi-emulzió, a szemcsék nagyobbak lettek, de a várakozásokkal ellentétben a diklór-metán hatására még inkább összeagglomerálódtak a kialakuló gömböcskék. A kék X-el jelölt összetételnél (5.19. ábra, KA144) 3% (V/V) diklór-metán hozzáadására apró gömbök képződtek, amelyeket összeragasztott a diklór-metános mosás. A zöld X-el megadott összetételnél (5.19. ábra, KA141) egyrészt a sóoldat térfogat%-a jóval kisebb, mint a korábbiaknál, csak 1,87%, másrészt a magnézium-sztearát jelenléte miatt nagyon apró gömböcskék képződnek, amelyek nagymértékben agglomerálódnak. A KA145 mintánál 56% (V/V) diklór-metán helyett 28% (V/V) diklór-metán és 28% (V/V) hexán jelenlétében már megjelennek a gömböcskék, míg a KA146 mintánál a 48% (V/V) diklór-metán és 8% (V/V) hexán tartalomnál már nincsenek gömbök, de a kristályos agglomerátumok sem állnak össze a KA126 mintánál tapasztalt közel szférikus formává.

**5.5. táblázat Szférikus kristályosítási kísérletek összetételei víz-etanol-hexán-diklór-metán oldószerrendszerben**

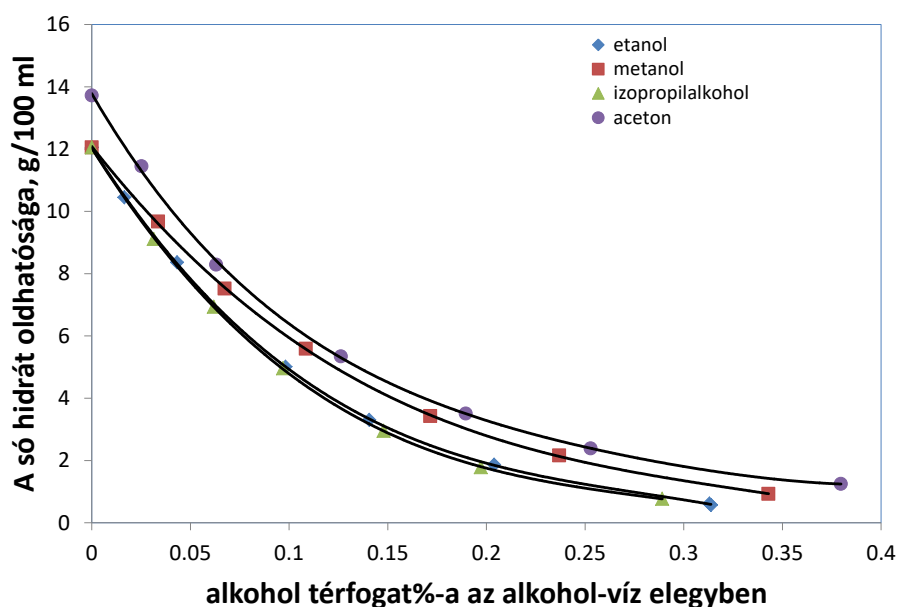
Minták száma	Hexán térfogattört	Etanol térfogattört	Sóoldat térfogattört	Diklór-metán térfogattört	Egyéb körülmény
KAI30	0,27	0,65	0,07		-
KAI31	0,27	0,65	0,07		500 helyett 350 fordulat/perc
KAI37	0,27	0,65	0,07		0,002g Mg-sztearát
KAI39	0,30	0,61	0,08	0,02	
KAI41	0,64	0,35	0,02		0,0015g Mg-sztearát
KAI44	0,27	0,61	0,08	0,03	diklór-metános mosás
KAI45	0,28	0,36	0,09	0,28	etanolos mosás
KAI46	0,08	0,36	0,09	0,48	etanolos mosás
KAI55	0,27	0,66	0,07		nagy térfogatú etanollal mosás

A hexán és a diklór-metán együttes alkalmazásakor az arányok változtatása a következő eredményeket hozta. A hexán a diklór-metános rendszerben csökkenti az oldhatóságot, de kevésbé szférikus szemcséket eredményez. A diklór-metán a hexános rendszerben segíti a víz elkeveredését, egyre kisebb gömböcskék képződnek, de nem csökkenti az agglomerálódási hajlamukat.

A szemcsék előállításánál fontos paraméternek bizonyult a termék szűrésének és anyalúgtól való mosásának módja. A tapasztalatok alapján a szemcsék szűrés előtti ülepítése, az anyalúg leöntése, majd a legvégén nagyobb mennyiségű etanollal való mosása a legmegfelelőbb módja a szemcsék utólagos kezelésének. A továbbiakban a H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx rendszerben a legjobb, nagy mennyiségű etanollal való mosással nyert mintát KAI61 mintaként fogom említeni.

### 5.2.2.3 Különböző alkohol-víz elegyekben végzett kísérletek eredményei

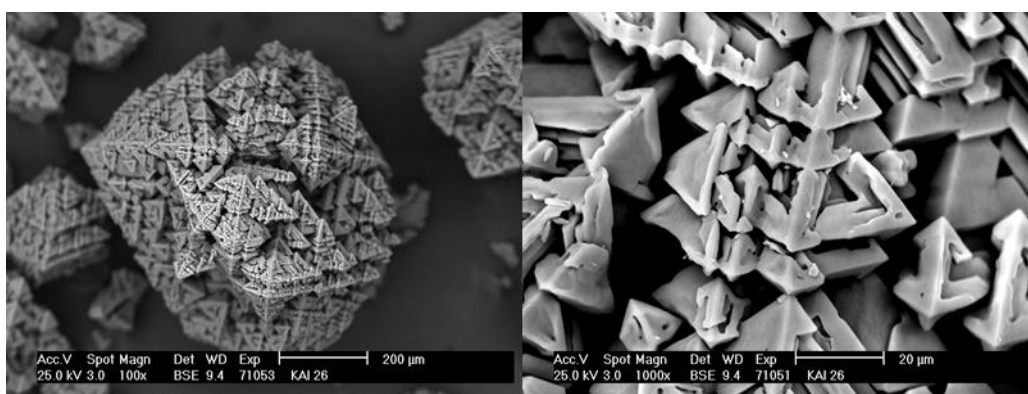
A H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM és a H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx terner oldószerrendszerben végzett kísérletek eredményeit összehasonlítva lehetőségként felmerült az oldószerrendszerek víz-alkohol rendszerre való egyszerűsítése. Mivel a H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx rendszerben 62% (V/V)-ban van jelen az etanol, míg a H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM elegyben 38%-ban, ezért feltételezésem szerint a különböző tulajdonságú szemcsék kialakulásában döntő szerepe van az etanol mennyiségének. A feltételezés bizonyítására kísérletet végeztem 90 és 50% (V/V)-os etanol-víz elegyben. Előbbiben szférikus agglomerátumok képződtek (KA166) a H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx elegyhez hasonlóan. Utóbbiban a kristályok a vízből kristályosításkor megszokott kristályformájukat vették fel. Az irodalom alapján összehasonlítható a KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O sóhidrát oldhatósága etil-, metil-, és izopropil-alkoholban, valamint acetonban (5.20. ábra). Az adatok alapján ugyancsak előrelátható volt, hogy az etil-alkohol mellett – a hasonló oldhatósági viszonyok miatt – az izopropil-alkoholban is képződhetnek szférikus agglomerátumok. 95 térfogat% izopropil-alkohol jelenlétében a 40°C-os telített sóoldatból szintén szférikus agglomerátumok jöttek létre (KA163 jelzésű minta).



5.20. ábra. Timsó oldhatósága különböző víz-szerves oldószer keverékekben Mullin és munkatársai munkája nyomán [109]

### 5.2.3 Morfológia, szemcseméret analízis

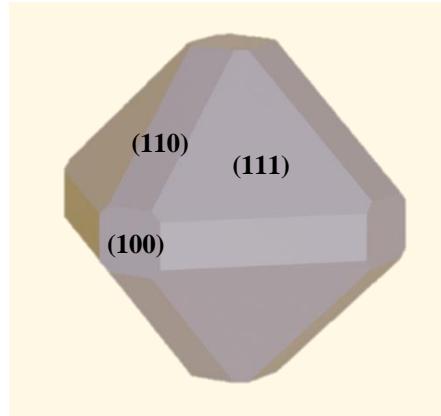
A H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM terner oldószerrendszerben előállított timsó agglomerátumokról a fénymikroszkópos felvételek alapján megállapítottam, hogy valószínűleg egyszerű szférikus agglomerációval, az úgynevezett SA mechanizmussal képződhetnek. Ennek megerősítésére pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk. Az elektronmikroszkópos képen (5.21. ábra) jól látható, hogy az agglomerátumok kb. 10–20 µm-es oktaéderek sokaságából épülnek fel, amelyek egy kristálylap éle mentén szerveződve nőnek össze.



5.21. ábra. A víz–etanol–diklór-metán hármas oldószerrendszerben készült KAl<sub>26</sub> minta elektronmikroszkópos felvétele

Brunsteiner és munkatársai [115] közleményükben vizsgálták a timsó kristály három erre alkalmas és jellemző kristálylapján, nevezetesen az (111), (110) és (100) kristálylapokon, a kialakuló agglomerációs kötéseket. Az 5.22. ábrán láthatóak az oktaéder megfelelő lapjai. A kötéseket az (111) kristálylapra vonatkoztatott relatív kristálynövekedési sebesség függvényében ábrázolva megállapították, hogy az agglomerációs kötések nagyobbak a kisebb méretű kristálylapoknál, mint a nagyobb felületűeknél. A folyadékhidakon keresztül érintkezésbe kerülő gyorsabb növekedésű és kisebb felületű kristálylapok között a kialakuló taszító erők kisebbek és a vonzó erők nagyobbak, mint a lassabb növekedésű nagyobb felületű lapoknál. A kristálylapok közötti agglomerációs erősség különbsége arra utal, hogy maga az agglomerációs kötés mikroszkópikus természete eltér a különböző kristálylapok között. Valószínűtlen, hogy az agglomerációs kötés teljesen amorf és izotrópikus lenne, inkább részlegesen kristályosak lehetnek a kristálylapok által meghatározott módon. Ez a megállapításuk részben megerősíti a korábbi feltételezéseket, miszerint a híd-folyadékban oldódik a

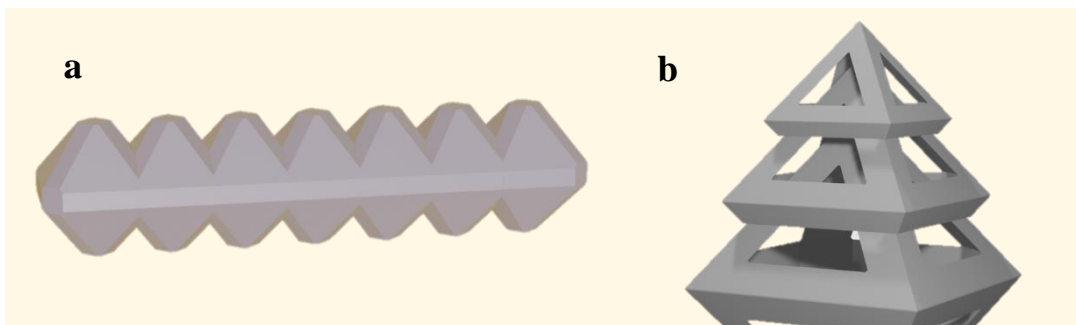
szemcsék felülete, és ezek az oldódó részek kristályosítási gócként viselkedve kötik össze a szemcséket szférikus agglomerátumokká, így ebből adódóan részben kristályos karakterűnek kell lennie a kötőhidaknak.



5.22. ábra. A timsó kristályok megfelelő kristálylapjai

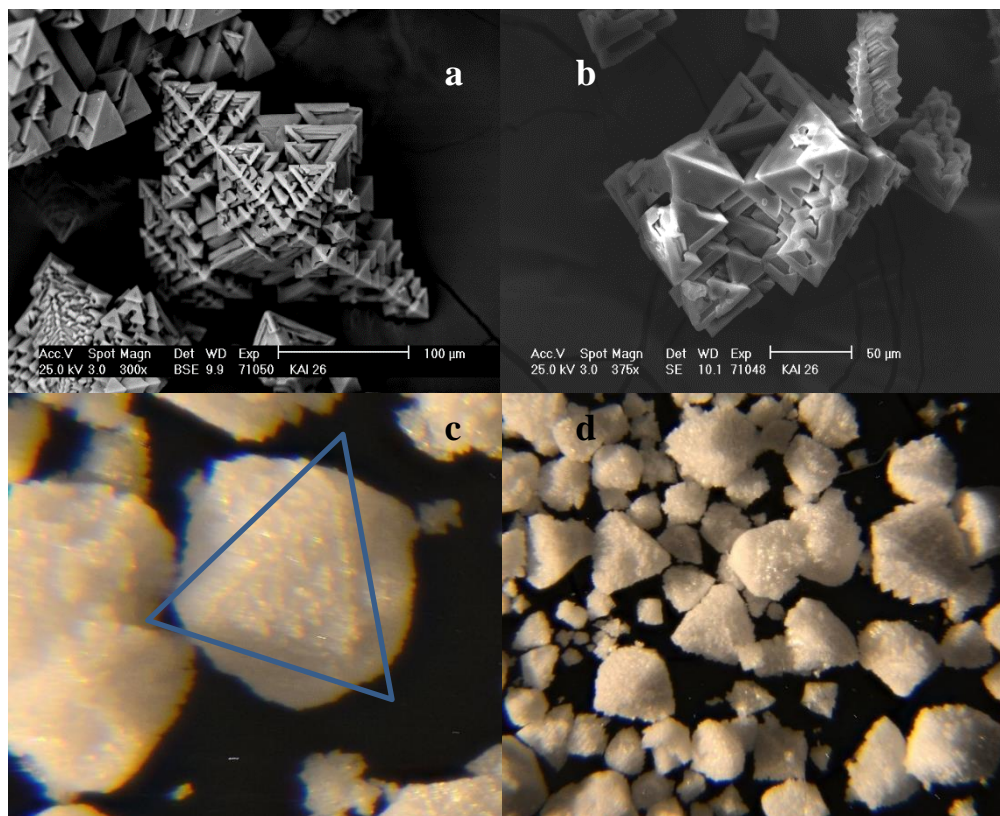
A Blender szoftverrel készült modell alapján (5.23. a ábra) a kisebb egységek az oktaéderek legkisebb méretű, (100) lapján keresztül összenőve rajzolják ki az (110) éleket, ahogyan ez az 5.24. a ábrán a SEM felvételen látható. Az élek felépülése mellett a diklór-metános közegben a legkisebb felület felvételére törekvő kristályok ugyan agglomerálódhatnak az (111) lapokon keresztül is, de ezek a kötések nem lesznek elég erősek, ezért aprózódhatnak a szemcsék szuszpenziójukban már kevertetés hatására is.

Az 5.24. c ábrán, a fénymikroszkópos képen makroszkópikus méretben kirajzolódó háromszög is arra utal, hogy az erősebb agglomerációs kötések nem az (111) lap, hanem az (100) és (110) lapok kapcsolódásával jöhetnek létre. Az 5.21. ábrán lévő SEM felvétel alapján félbevágott lyukas oktaéderek is láthatók az agglomerátumok építőkövei között. Ezt a jelenséget is magyarázhatjuk úgy, hogy az (111) lap a leglassabban növekvő, így helyenként ki sem tudja nőni magát az élek gyors növekedése mellett.



5.23. ábra. Blender szoftverrel készült modellek





5.24. ábra. A timsó kristályok agglomerálódásának szemléltetése fénymikroszkópos és SEM felvételeken.

A morfológia alapján következtetést vonhatunk le a képződés mechanizmusát illetően. Mivel nem egy kompakt, szabályos szférikus szemcsét láthatunk a felvételeken, ezért megállapítható, hogy a kristályosodás nem cseppen belül zajlott le. Sokkal inkább sok kisméretű kristály utólagos agglomerációjával, amely mechanizmus általában kevésbé szabályos szemcséket eredményez. Ez pedig nem más, mint az SA mechanizmus. Az SA mechanizmus lejátszódásának feltétele, hogy a jó és a rossz oldószer között erősebb legyen a kölcsönhatás, mint az oldott anyag és a jó oldószer között. Esetünkben ez azt jelenti, hogy az etanol és a víz között erősebb a kölcsönhatás, mint a só és a víz között. Ismerve azt a tényt, hogy az etanol és a víz között erős hidrogénhidkötések alakulnak ki, elfogadható az a feltételezés, hogy ezt az erős kölcsönhatást a diklór-metán nem bontja meg, mert valószínűleg az etanol a szabadon maradó metil csoportja révén lép kölcsönhatásba a diklór-metánnal.

Ennek megfelelően a sóoldattal adagolt víz nagy hányada elegyedik az etanol–diklór-metán keverékében, így a só jelentős része dehidratálódik, és azonnal kicsapódik. A visszamaradt oldattal, mint hídfolyadékkal létrejönnek az agglomerátumok, amelyek

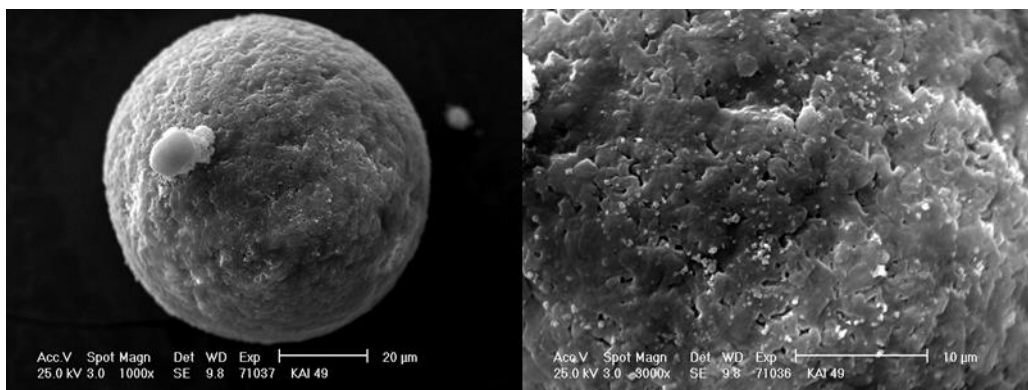
többek között annak is köszönhetik közel szférikus alakjukat, hogy a diklór-metán által teremtett oldószer közegben rosszul nedvesednek, és ezért az oldószerrel a lehető legkisebb érintkezési felületre, azaz gömb alakra törekednek.

A képződött agglomerátumok jellemzésére a morfológián kívül az elsődleges vizsgálat a szemcseméret analízis. A preparálás után a mintákat alkohollal mostam, majd szűrtem és száradás után, etanolban újrászuszpendálva határoztam meg a szemcseméret eloszlásukat. A KA126 minta kezdeti szemcseméret eloszlása az 5.26. ábrán látható. Az SA módszert alkalmazva a térfogati átlag szemcseméret, vagyis a  $D(4,3) = 684 \mu\text{m}$ -nek adódik. Az előállított agglomerátumok etanolban diszpergálva, pár percnyi keverés után, kisebb egységekre estek szét, ami arra utal, hogy nem volt megfelelően erős a kötőerő a kristályok között. A kötőerő nagysága jelentősen függ attól is, hogy az anyagra – adott oldószerközegben – milyen a gócképződési és a kristálynövekedési sebességek aránya. Timsó esetében a tapasztalatok alapján a kezdeti nagy túltelítés nagyrészt gócképződést eredményez, és nem marad elegendő só a rendszerben az erősebb kötőhidak kialakulására. Az irodalomban [32] leírt példákban, a vízben nagyon jól oldódó anyagokat szuszpenziójukból agglomerálják megfelelő töménységű  $\text{CaCl}_2$  oldatot használva kötőfolyadéként. Oldatukból való szférikus kristályosításukra általános recept nem található a szakirodalmi forrásokban. Érthető is, mert ionos kristályos anyagok esetében nem nagyon található másik olyan oldószer, amelyben annyira jól nedvesednének és oldódnának a kristályok, hogy bekövetkezne a szférikus agglomeráció.

A kristályos termékek tulajdonságait elsősorban a szilárd anyag és az oldószer egymásra hatása pl. nedvesítés, oldhatóság határozza meg. A túltelítés mértéke pedig – a gócképződés és kristálynövekedés sebességarányának módosításán keresztül – közvetlen hatással van a kristályos anyag morfológiájára (polimorfia, szemcseméret, szemcseméret eloszlás) és agglomerálódási képességére [116, 117, 118]. Ugyancsak Brunsteiner és munkatársainak [115] mérései szerint timsó esetében a túltelítés mértékével közel egyenes arányban nő az agglomeráció erőssége  $S$  (túltelítés)=0,05–0,2 tartományban.

A  $\text{H}_2\text{O}$ -EtOH-Hx oldószerhármásban előállított timsó-agglomerátumokról a fénymikroszkópos felvételekből megállapítottam, hogy valószínűleg kvázi-emulziós folyamat révén ESD mechanizmussal képződhettek. Az elektronmikroszkópos felvételek (5.25. ábra) az elképzelésemet megerősítették, mivel a képen jól látható, hogy az

agglomerátumok szabályos gömb alakúak, felületük sima és nem jelenik meg a timsóra jellemző kristályszerkezet.



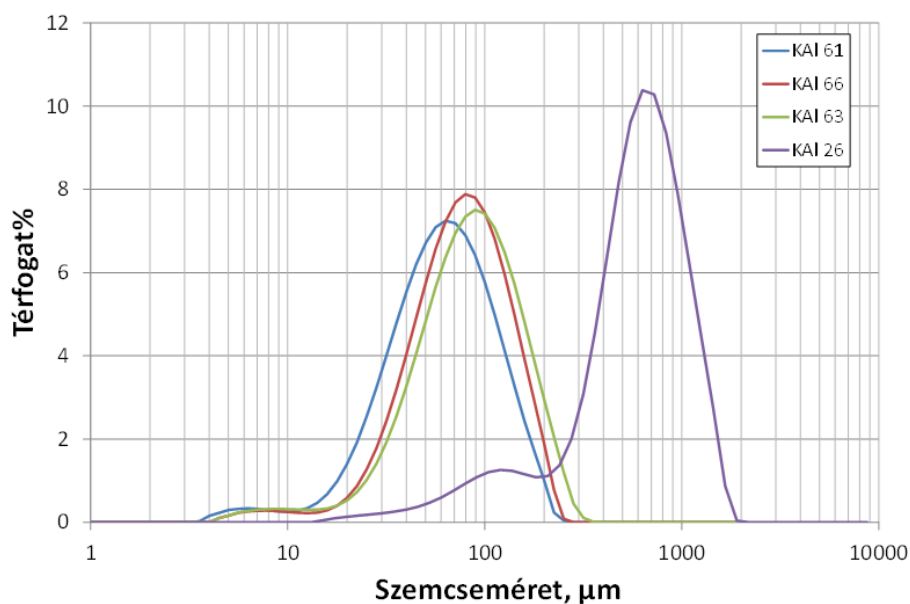
**5.25. ábra.** A víz-etanol-hexán oldószerhármásban készült KAl61 minta elektronmikroszkópos felvétele

Az agglomeráció abban az esetben játszódik le ESD mechanizmussal, ha a jó oldószer és a só között erősebb a kölcsönhatás, mint a rossz oldószer és a jó oldószer között. Az etanol és a víz között ebben a rendszerben is erős a kölcsönhatás és a víz és a só között is hasonlóan erős, mint a diklór-metános rendszerben. A hexán jelenléte okozza, hogy az agglomeráció más mechanizmussal játszódik le, mint a diklór-metános rendszerben. A hexánt is tartalmazó oldószerkeverékben az etanol térfogat%-os aránya nagyobb, mert azonos vizes oldat térfogat% mennyiség esetén az oldószer egyensúly miatt ebben a rendszerben több etanolra van szükség az elegyedő fázis kialakulásához. Az etanol nagyobb térfogat%-os jelenléte miatt a timsó oldhatósága biztosan kisebb, mint a diklór-metános rendszerben. A sóoldat emulziócseppeket alkot a szerves oldószerfázisban legalább annyi időre, amíg a só a cseppek belső kristályosodva kiválik, és ennek eredményeképpen kapjuk a tökéletesen szférikus szemcséket.

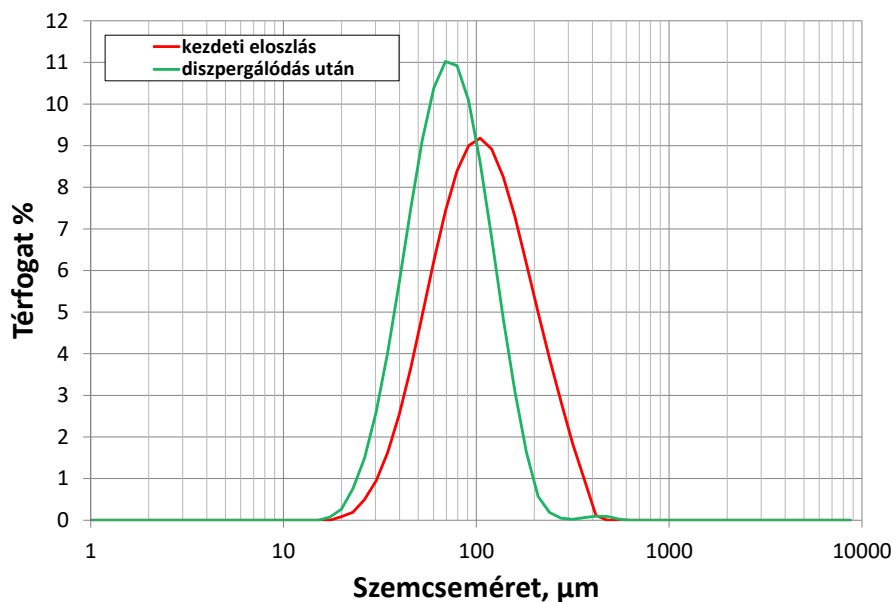
A képződött agglomerátumokat elsődlegesen szemcseméret analízissel jellemezhetjük. A H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx oldószerhármásban képződött agglomerátumok szemcseméretét etanolban diszpergálva határoztuk meg. A kezdeti értékhez képest 5–10 perces keverés után az átlag szemcseméret csekély mértékű csökkenését tapasztaltuk (5.27. ábra). Ezt elsősorban a szűrést követő száradáskor, a gyenge kötőerők révén kialakuló asszociátumok szétesése okozza. A száradási agglomeráció megszűnése után hosszabb keverés ellenére is stabil marad a minta szemcseméret eloszlása. Ez annak

## Eredmények és értékelésük

köszönhető, hogy a szemcsék nem kisméretű, apró kristályok laza agglomerátumai, hanem tömörek és egységesek.



**5.26. ábra.** A különböző oldószerkezegekben készült agglomerátumok szemcseméret eloszlás görbéi, KAI26: víz-etanol-diklór-metán (lila), KAI61: víz-etanol-hexán (kék), KAI63: víz-izopropilalkohol (zöld), KAI66: víz-etanol oldószerkezegekben (piros)



**5.27. ábra.** A KAI49-es minta szemcseméret eloszlás görbéi a mérés kezdetekor és diszpergálódás után

A hexános rendszerben az ESD módszerrel nyert szemcsék átlag szemcsemérete 66  $\mu\text{m}$ -nek adódott (5.26. ábra). Az etanol-víz és izopropil-alkohol-víz oldószerrendszerekben a hexános rendszerben képződött szemcsékkal megegyező morfológiájú szemcsék alakultak ki 79  $\mu\text{m}$  és 89  $\mu\text{m}$  átlag szemcsemérettel. Morishima [37] és szerzőtársai kísérleteiben a bucillamin hatóanyag agglomerációja az általunk tapasztaltakhoz hasonlóan a  $\text{H}_2\text{O}$ -EtOH-DCM SA mechanizmussal, míg etanol-víz oldószerkeverékben ESD mechanizmussal játszódtott le.

### 5.2.3.1 A keverési sebesség hatásának vizsgálata

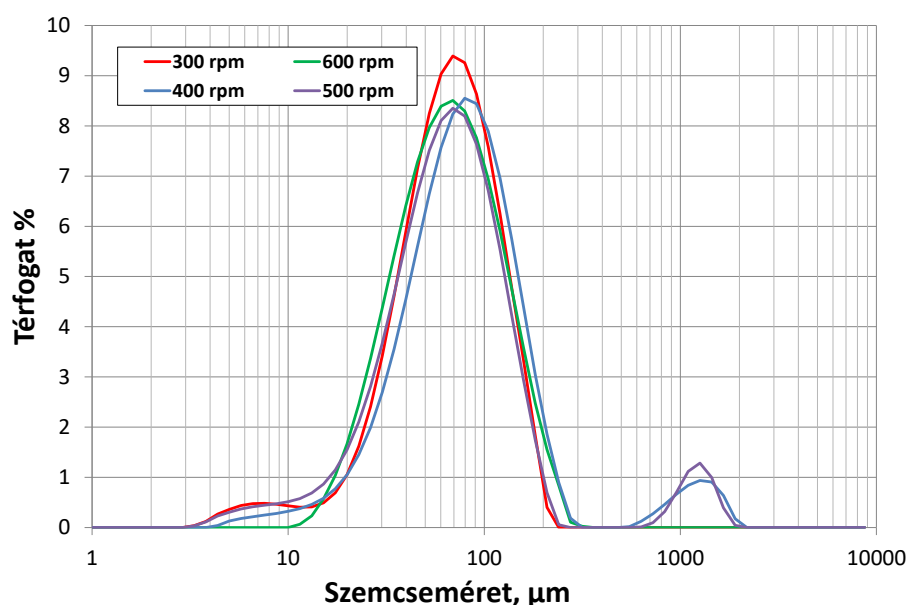
A  $\text{H}_2\text{O}$ -EtOH-Hx oldószerrendszerben azonos összetételek mellett megvizsgáltam a keverési sebesség hatását a szemcseméret eloszlására. Az 5.6. táblázatban láthatók 300–600 fordulat/perc keverési sebességek mellett a térfogati átlag szemcseméret adatok közül a  $D(4,3)$  és a  $D(0,5)$  értékek. A  $D(0,5)$  azt a méretet jelenti a térfogati eloszlásban, amelynél a szemcsék 50%-a kisebb. Az 5.28. ábrán pedig a térfogati eloszlás görbék láthatók. Megállapítható, hogy a keverési sebesség változtatása adott összetételek mellett számottevő változást nem okoz a szemcseméret eloszlásban, különösen a  $D(0,5)$  értékekben.

5.6. táblázat. KA156-58 minták szemcseméret adatai a keverési sebesség függvényében

Minta név	Keverési sebesség, ford./perc	$D(0,5)$ , $\mu\text{m}$	$D(4,3)$ , $\mu\text{m}$
KA156	300	70,7	78,2
KA158	400	83,4	150,9
KA130	500	70,4	136,7
KA157	600	70,0	82,2

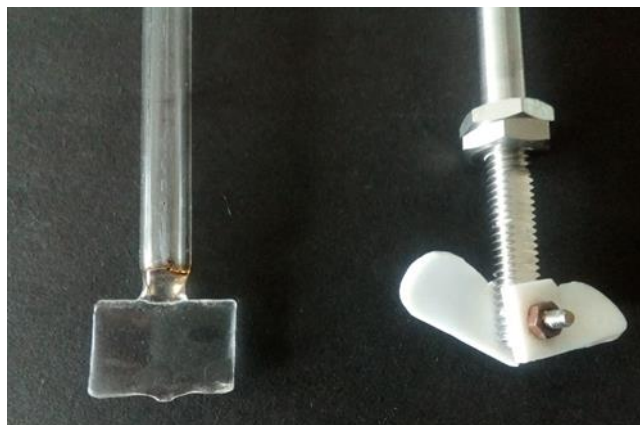
Az 1000  $\mu\text{m}$  környékén időnként megjelenő csúcs a szemcsék szűrése során, a nehézkes mosás miatt, különböző mértékben kialakuló összetapadás és száradási agglomeráció miatt lép fel. Ennek a csúcsnak a megjelenése a  $D(4,3)$  adatokat befolyásolja határozottabban, ezért tapasztalható nagyobb eltérés ezek értékeiben. A

tapasztalat abból a szempontból meglepő, hogy Kawashima és munkatársai által leírt eredményekben a kváziemulzió-cseppek képződése és abban való kristályosodás esetében a nagyobb keverési sebesség kisebb átlag szemcseméretet eredményez, ami a HSA-kitozán-PSS rendszerben is megfigyelhető volt. A H<sub>2</sub>O-EtOH-Hx rendszerben annyira gyors a kristályosodás, hogy a kváziemulzió-cseppek méretét elsősorban a térfogatarány határozza meg és nem a keverési sebesség hatására kialakult egyensúlyi cseppméret. Abban a térfogatban, amelyben a kísérletek zajlottak a keverési sebesség nem változtatható olyan széles tartományban, hogy annak a hatása is megjelenjen a szemcseméretben.



5.28. ábra. Keverési sebesség hatása a szemcseméreteloszlásra

A H<sub>2</sub>O-EtOH-DCM oldószerrendszerben a nagyobb fokú szfericitás elérése érdekében az egyszerű lapátkeverő helyett kísérleteket végeztünk egy saját készítésű keverőfejjel (5.29. ábra). A tapasztalatok azt mutatták, hogy az új típusú, kétágú propeller keverő hatékonyabb keverést képes biztosítani, mint a lapát keverő, ez azonban már nem az agglomerátumok felépülésének, hanem a szemcsék tördelődésének kedvez jobban.



5.29. ábra. A kísérletek során alkalmazott lapát, ill. kétágú propeller keverő

#### 5.2.4 A timsó agglomerálásakor előállított különböző minták előállítási körülményeinek összefoglalása

A timsó szférikus agglomerációját négy különböző oldószerrendszerben sikerült megoldanom. A szférikus agglomerátumok sikeres előállításához az oldószerkeleg összetételének biztosítania kell a magas kezdeti túltelítést, azaz a sóhidrát nagyon alacsony oldhatóságát a rossz oldószerben. A szilárdulási, kristályosodási sebességnek pedig olyan gyorsnak kell lennie, hogy a vízcseppeknek ne álljon elegendő idő a rendelkezésére a szerves oldószerkelegben való elkeveredésre.

A timsó oldhatósága vízben már 40 °C-on kellően magas ahhoz, hogy a 25 °C-os oldószerkeleggel 5–10% (V/V)-ban elkeverve kialakuljon a szükséges mértékű kezdeti túltelítés ( $S=1,7$ ). A timsó oldhatósága EtOH-H<sub>2</sub>O és IPA-H<sub>2</sub>O elegyben szinte azonos, külön-külön 90 és 95% (V/V) rossz oldószer jelenlétében előállíthatók az agglomerátumok. Az etil-alkohol mellett jelenlévő egyéb rossz oldószer esetében 90–95% közötti oldószertartalom mellett, 91,4 és 92,8%-nál képződtek a szemcsék. Az agglomerátumok előállításához szükséges oldószer-összetételeket az 5.7. táblázatban gyűjtöttem össze.

A sóhidrát szférikus agglomerátumait szférikus agglomerációval (SA) és kvázi-emulziós (QESD) módszerekkel egyaránt sikeresen elkészítettem. Az SA módszerrel előállított agglomerátumok dodekahidrát formában kristályosodnak, de kevésbé stabilak és kevésbé gömbölyűek, mint a többi. A QESD módszerrel előállított agglomerátumok stabilabbak, szinte tökéletesen gömb alakúak, és nem jelenik meg a timsóra jellemző kristályszerkezet. Az 5.7. táblázatban szereplő mintákra a szárazanyag kitermelési %-ok

a következőképpen alakulnak. A KA126 minta esetében 108%, ami a felületen megkötött vízből adódhat. A KA1 61, 63 és 66-os mintáknál pedig külön-külön 77,8; 88,2 és 67,2%.

**5.7. táblázat. A sikeresen előállított szférikus agglomerátumok oldószer összetételei**

Minták	Sóoldat térfogata, ml	EtOH térfogata, ml	Hexán térfogata, ml	Diklór- metán térfogata, ml	IPA térfogata, ml	Sóoldat V/V%-a
KA126	4,8	19,5	-	31,5	-	8,6
KA161	6,0	54,6	22,8	-	-	7,2
KA166	4,0	36,0	-	-	-	10,0
KA163	2,5	-	-	-	47,5	5,0

Nocent és munkatársai [28] is vízoldható hatóanyag (salbutamol-szulfát) oldatából állítottak elő etil-acetáttal szférikus szemcséket kvázi-emulziós módszerrel. A gyakorlati tapasztalatoknak megfelelően nagyon szűk koncentrációtartományban sikerült végrehajtaniuk az emulziócseppekben való kristályosítást. Az általam használt 95%-hoz képest is nagyobb szerves oldószer jelenlétre (99%-ra) volt szükségük és emellett megfelelő tulajdonságú emulzifikáló ágenszt is alkalmazniuk kellett a kvázi-emulzió kialakulásához. Egyéb esetekben nem képződött emulziójuk, ill. nem kristályosodott ki az anyaguk, inkább gélszerű terméket kaptak.

A kidolgozott módszer előnye, hogy a timsó kristályosodási tulajdonságainak köszönhetően az EtOH-H<sub>2</sub>O és IPA-H<sub>2</sub>O oldószerkeletben sincs szükség emulgeálószerre a kvázi-emulzió kialakulásához.

### 5.2.5 A timsó agglomerátumok jellemzése

Az előállított agglomerátumoknak a későbbi felhasználás szempontjából, mint fázisváltó hőtároló anyagnak, fontos az összetételére és a termikus tulajdonságaira vonatkozó kísérletek elvégzése. A sóhidrát típusú fázisváltó hőtároló anyagok esetében a legfontosabb a kristályvíztartalmuk, és az azzal összefüggő termikus tulajdonságaik meghatározása. Az előbbi kétféleképpen, egyrészt vezetőképességi, másrészt termogravimetriás mérések adataiból számítottam. A kapott eredmények alapján szükség volt a szemcsék közelítő anyagösszetételének röntgendiffrakciós analízissel történő meghatározására is. A termikus tulajdonságokat termogravimetriás és differenciális pásztázó kalorimetriás mérésekkel jellemeztem.



### 5.2.5.1 A timsó szemcsék kristályvíz tartalmának meghatározása

Az agglomerált sóhidrát minták kristályvíz tartalma jó közelítéssel becsülhető vezetőképességi mérésekből. A mintákat milliQ vízben feloldva és az oldatuk vezetőképességét mérve meghatározható a  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  tartalmuk. Kalibráló görbe használatával számítható a szemcsék közelítő átlagos kristályvíz-tartalma. A referencia  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ismert koncentrációjú oldatainak (0,01–0,12 g/l) vezetőképesség adataiból nyert kalibráló görbét (5.30. ábra) másodfokú polinommal közelítve:

$$y = 7,6362 \times 10^{-7} \cdot x^2 + 4,1445 \times 10^{-4} \cdot x - 9,7531 \times 10^{-4},$$

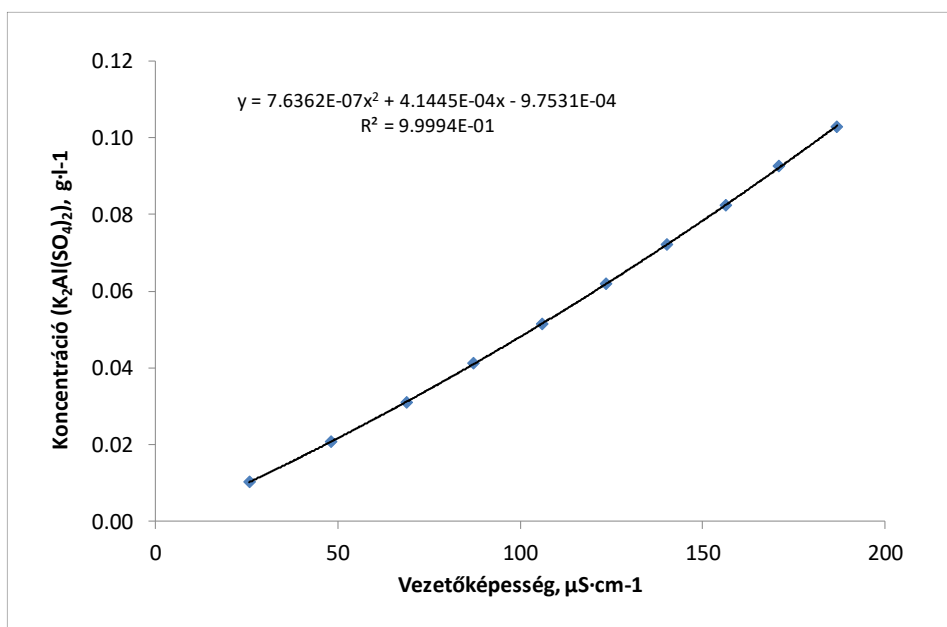
a kapott paraméterek felhasználásával számítható a minták  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  tartalma. Ezekből az adatokból megkaphatjuk a minták % (m/m)-ban kifejezett víztartalmát.

$$S\% = \frac{y}{(m \times 10)}$$

$$S\% = \frac{y}{(m \times 10)}$$

$$W\% = 100 - S\%,$$

ahol  $m$  az agglomerált minta tömege (g) 100 g desztillált vízben,  $y$  a só koncentráció (g/l),  $S\%$  a só tartalom,  $W\%$  pedig a víztartalom % (m/m)-ban.



5.30. ábra. Kalibráló görbe a  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  oldatok koncentrációjának meghatározásához vezetőképességi adatok alapján

## Eredmények és értékelésük

Az 5.8. táblázatban a minták vezetőképességi mérései alapján számított víztartalma és összehasonlításképpen a TG mérésekből kapott eredmények, valamint az azokból számított átlagos kristályvíztartalmak találhatóak.

A timsó elméleti kristályvíztartalma 45,5% (m/m), ill. 1 mol  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ -ra 12 mol víz jut. Az 5.8. táblázatból jól látható, hogy a Referencia (gyári 12 kristályvizes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ ) minta esetében az elméleti 45,5%-hoz képest abszolút értékében kb. 1,5%-kal nagyobb víztartalmat kaptunk. Ez az érték a KA126 minta esetében (diklór-metános) kb. 2,5%-kal nagyobb. Ez alapján a KA126 mintát 12 kristályvizes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ -ként azonosítottuk.

**5.8. táblázat. A timsó agglomerátumok %-os víztartalom W (vezetőképesség), TG (termogravimetriás) mérés alapján és átlagos kristályvíz tartalma**

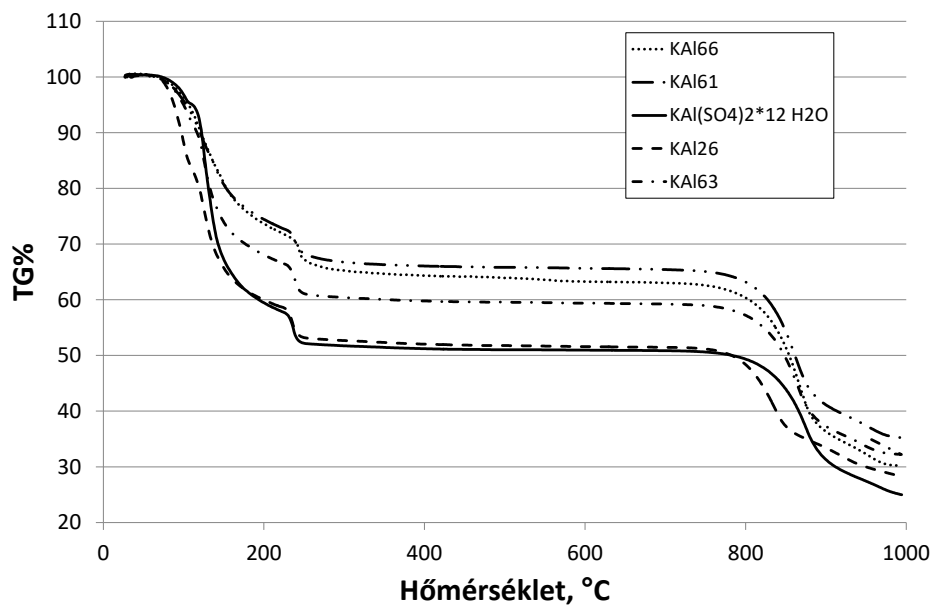
Minták	W %, m/m%	TG% (50–300 °C)	$n_w$
Referencia	47,0%	46,0%	12,2
KA126	48,0%	46,1%	12,3
KA163	44,7%	39,0%	9,2
KA161	37,8%	33,6%	7,3
KA166	38,8%	31,8%	6,7

Az oszlopban lefelé haladva a %-os víztartalom az elméletinél kisebb értékeket mutat, ami azt jelzi, hogy a többi termék nem tisztán 12 kristályvizes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ . A feltételezésemet termogravimetriás és röntgendiffrakciós mérésekkel igyekeztem igazolni.

### 5.2.5.2 Termogravimetria

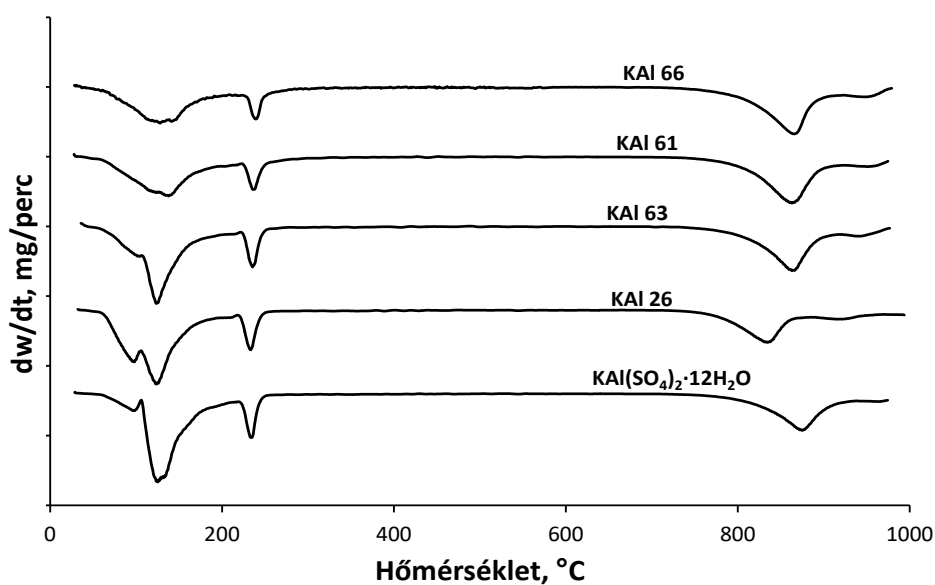
A Referencia minta a termogravimetriás görbéje szerint az irodalomban leírtaknak megfelelően [119, 120] három lépésben veszíti el a kristályvizét 300 °C-ig, majd 800 °C felett bomlik. A három lépés nem különíthető el (5.31. ábra). Az általunk mért termogravimetriás görbék szerint a Referencia mintánk 30 és 210 °C között átlagosan 9,3 mol vizet veszít az 1 mol  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ -ra eső 12 molból két lépésben. A maradék 250 °C körül egy lépésben távozik. Hasonló módon viselkedett a KA1 26-os jelzésű minta. A Referencia minta 250 °C-ig 45,5% (m/m) vizet veszít az elméleti víztartalmának megfelelően. A többi mintánál a termogravimetriás görbéjük alapján a vezetőképességi

adatokhoz hasonlóan kisebb mennyiségű víztartalmat mértem (5.8. táblázat). Ennek az analízisnek az eredménye is azt bizonyítja, hogy a KAl26 mintán kívül a többi agglomerátum nem tiszta 12 kristályvizes KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.



5.31. ábra. Timsó agglomerátumok TG görbéje a hőmérséklet függvényében

A DTG termogramokon (5.32. ábra) is átlapoló csúcsok jelennek meg. A Referencia és a többi minta is három összeolvadó lépésben veszti el a kristályvizét kb. 250 °C-ig. A KAl26 mintánál a kettős csúcs eltérő alakot mutat a Referencia mintához képest, míg a 860 °C körüli csúcs 830 °C-ra tolódik. Az eltérések valószínűleg az eltérő morfológiának köszönhetők.

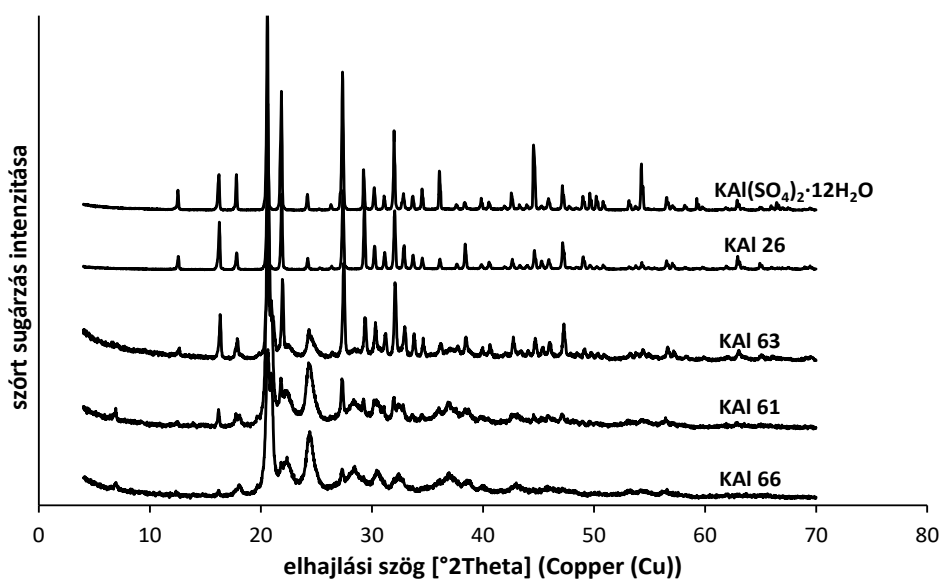


5.32. ábra. Timsó agglomerátumok termogravimetriás, DTG görbéje

Az ábrán felfelé haladva, a különböző oldószerrendszerekből kristályosított mintáknál (KA163, KA161, KA166), a 90 °C körüli kettős csúcs egyre kisebb és egyre inkább összemosódott. Ez utóbbi tapasztalat amorf fázis jelenlétét sugallja. A kb. 250 °C-nál megjelenő csúcs mindegyik mintában megjelenik, de egyre kisebb intenzitással. A termogravimetriás % (m/m) adatokból számítható egy átlagos kristályvíztartalom, ami a Referenciára és a KA126 mintára visszaadja a 12-es értéket, a többi mintánál azonban, a táblázatban lefelé haladva csökkenő értéket mutat. Ez alapján is megállapítható, hogy a KA163, KA161, KA166 minták nem tisztán timsót tartalmaznak, ezért a kristályvizes  $KAl(SO_4)_2$ -ra számított kitermelési %-ok kisebbnek adódnak, mert a kikristályosodott szárazanyagban kevesebb a kristályvíz.

### 5.2.5.3 Agglomerátumok összetételének meghatározása XRD mérések alapján

A röntgendiffrakciós mérések alapján megállapítható, hogy a korábban a vezetőképességi és a termogravimetriás mérésekből 12 kristályvizes  $KAl(SO_4)_2$ -ként jellemzett KA126 minta, a kristályszerkezetét tekintve is ténylegesen tiszta  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ -ként azonosítható. A Referencia minta diffraktogramját (5.33. ábra) összehasonlítva a különböző oldószerrendszerekből előállított agglomerátumok görbéivel a Referencia minta csúcsintenzitásai láthatóan nagyobbak. Mint ismeretes a kristályosság (kristály/kristallit méret) növekedésével csökken a diffrakciós csúcsok félértékszélessége és egyúttal nő a csúcsmagassága.



5.33. ábra. Timsó agglomerátumok XRD görbéi

Az 5.33. ábrán lefelé haladva a KA163, KA161 és KA166 görbéket követve, a csúcsok egyre kevésbé élesek, és ezzel együtt egyre nagyobb a zaj. Ez a változás azt a feltételezést erősíti, hogy az utóbbi minták kevésbé kristályosak, a szerkezetük részben amorf, vagyis bizonyos mennyiségben amorf fázis van jelen a mintákban. Erre utaló jeleket már a TG görbéken is láthattunk.

A pordiffrakciós módszerek hatékonyan használhatók mind fázisanálízisre, mind mikroszerkezet vizsgálatra. A fázisanálízis módszerével egy vagy több kristályos fázist azonosíthatunk be egy polikristályos mintában. Mikroszerkezet vizsgálat alkalmával a diffrakciós vonalak alakjából (vonalprofil analízis) a polikristályos minta krisztallitméret eloszlását, ill. a mintában lévő kristályhibák típusát és mennyiségét határozhatjuk meg.

A fázisok azonosítása elsősorban adatbázisbeli pordiffrakciós referenciakártya adatok alapján, ennek hiányában az egykristály diffrakciós adatbázisokból elérhető szimulált porfelvételek segítségével történhet. Az előismeretek hasznosak a mintákban várhatóan előforduló összetevőkről, legalább a fő komponens(ek)ről. A Rietveld-analízis a minta porfelvételéből, a csúcsintenzitás arányokra való illesztéssel adja meg a fázisarányokat. A meghatározás annál megbízhatóbb, minél inkább teljesül, hogy a mért nagyintenzitású csúcsok, de lehetőleg a referencia kártyán szereplő összes jelentős intenzitással bíró rácstávolságok (Å), a mérési hibákon belüli egyezést mutatnak a kísérleti értékekkel [121].

Az összetevők azonosítására alkalmas X'Pert Highscore Plus szoftver segítségével a KA161, KA163, KA166 mintákban a timsón kívül további 4 kristályos só mutatható ki az 5.9 táblázatban látható % (m/m)-os arányban. Ezek a kristályos sók a következők: rostite ( $\text{Al}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), alunogen ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ ), vízmentes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  és vízmentes  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Az alunogen a természetben is gyakran társul a kristályos  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ -tal és a rostite-tal a kialakulásukkor fennálló pH-tól függően [122].

Az intenzitás csökkenés mellett a diffrakciós vonalak kiszélesedése is megfigyelhető a KA161, KA166 és KA163 mintáknál. Ez a vonalszélesedés jelzi a jelenlévő kristályos fázisok mikrostrukturái közötti különbségeket. A mikrostrukturákat a különböző kristályos fázisokra számított átlagos krisztallit mérettel jellemeztük. A számított adatokat az 5.10. táblázat mutatja.

5.9. táblázat. A KAl61, KAl63, KAl66 minták közelítő összetétele röntgen mérések alapján

Összetevők	KAl61	KAl66	KAl63
	tömeg, %		
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	74	59	74
$\text{Al}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	13	26	9
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$	4	5	10
$\text{K}_2\text{SO}_4$	7	4	5
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O}$	2	6	2

5.10. táblázat. A KAl61, KAl63, KAl66 minták átlagos kristallit méretei

Minták	Átlagos kristallit méret, Å				
	Timsó 5,45 Å (210) vonalára	Rostite 4,26 Å (220) vonalára	Alunogen 3,97 Å (1-31) vonalára	Vízmentes KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 3,63 Å (011) vonalára	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3,17 Å (102) vonalára
KAl66	3489	530	69	124	83
KAl61		441	63	121	41
KAl63	2360	505	66	136	133

#### 5.2.5.4 DSC analízis

A sóhidrátok melegítése során mind az olvadási entalpia, mind a kristályvíz távozásával járó hőmennyiség megjelenik a DSC görbéken.

Kishimura és munkatársai [123] Raman és a Röntgen színekép alapján kimérték, hogy az amorf hidrátált  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  már 75 °C-on kezd kialakulni. A 6 mol kristályvíz eltávózása után egyszerre van jelen a mintában kristályos és amorf timsó. Majd további vízvesztés mellett lejátszódik az amorf timsó átalakulása kristályos  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ -tá. 250 °C-on a minta egésze kristályos, vízmentes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ . A röntgendiffrakciós spektrumban 180 °C-on jelenik meg látható mértékben a tiszta, kristályos vízmentes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  egyik jellemző csúcsa, amelynek a teljes spektruma 250 °C-on felvett röntgenméréssel azonosítható.

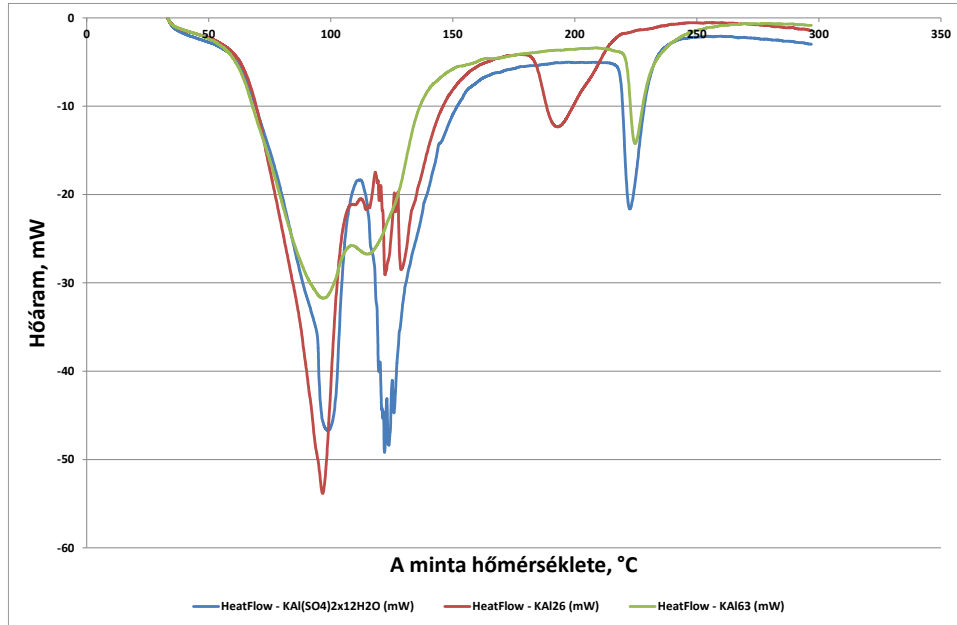
A tiszta  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  termogramján, ahogy már az előbbieken említettem az irodalmi adatokkal egyezően három endoterma látható. A tiszta timsó olvadáspontja nem határozható meg pontosan, hiszen kb.  $60\text{ }^\circ\text{C}$ -tól már kezdi elveszíteni a kristályvizének egy részét, ami így valójában  $90\text{ }^\circ\text{C}$  körül megolvad, és annak egy része már nem  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Az első endotermát jobban megnézve megfigyelhető, hogy az tulajdonképpen másik két endoterma átfedéséből keletkezik. Ezek közül az első a kristályvíz távozásának felel meg, a második pedig maga a részben megmaradt kristályos,  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  olvadási entalpiája. Az endotermák nem különülnek el egymástól, de egy töréspont, kb.  $92\text{--}93\text{ }^\circ\text{C}$ -nál észrevehető (5.34. ábra).

Az agglomerátumoknál a timsó-tartalom mind a vezetőképességi, mind a TG mérések alapján kisebb, vagyis egyéb anyagok is megjelennek szennyezőként, amik maszkírozzák a jelenlévő timsó olvadáspontját, így az itt kapott entalpiák inkább dehidratációs entalpiák mintsem olvadási entalpiák.

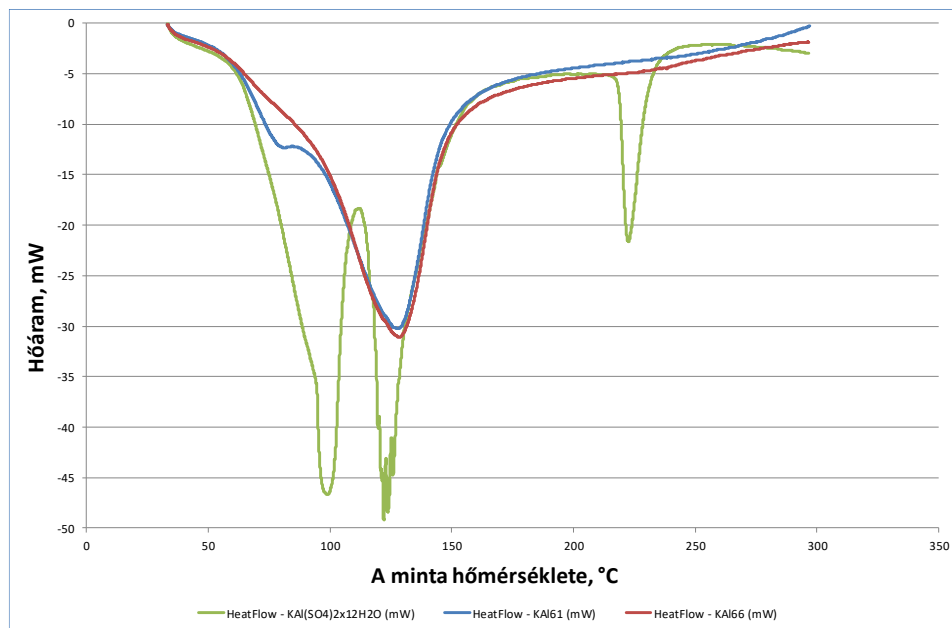
A Referencia anyagnál, ill. a KA126-os és KA163-as agglomerátum mintáknál nagyjából azonos hőmérsékleten jelennek meg az endotermák. Sőt a Referencia és a KA126 mintáknál hasonló entalpia értékek adódnak a nagyobb összeolvadó endotermára és a második élesebb endotermára egyaránt. Azonban a harmadik lépcső endotermája KA126 minta esetében kisebb hőmérsékletnél jelentkezik és elnyújtottabb, mint a Referencia minta esetében (5.34. ábra). A szoftver által rajzolt DSC diagramok a mellékletben kerülnek bemutatásra (8.5. fejezet).

Tieger és munkatársai [124] a bosutinib különböző szolvatált formáit többek között DSC-vel is vizsgálták és a következő megállapításokat tették. A kristályvízvesztési folyamatok lehetnek széles endotermák a széles energia tartománynak megfelelően, amely szükséges a kristályvíz-tartalomnak a mintákból való eltávozásához. Mindamellet ezek az endotermák nagyon éles csúcsok is lehetnek, abban az esetben, ha az oldószer molekulák nagyon stabilan kötődnek a kristályrácsba. Így a kristályvíz-molekulák a távozási hőmérsékletük alapján, a kristályrácsban való kötődési erősségük szerint rangsorolhatók. Mivel a vízvesztés folyamata kinetikailag kontrollált, ezért a kinetikai paramétereket befolyásoló tényezők, mint az anyag részecskeméret-eloszlása, ill. a kísérleti változók, mint relatív páratartalom és felfűtési sebesség egyaránt hatással vannak arra, hogy mennyire elnyúltan távozik a kristályvíz. Mindezek ellenére természetesen a

## Eredmények és értékelésük



5.34. ábra. Timsó agglomerátumok DSC görbéje, kék vonal jelzi a Referencia minta, piros a KAl26 és zöld a KAl63 minta görbáját



5.35. ábra. Timsó agglomerátumok DSC görbéje, zöld vonal jelzi a Referencia minta, kék a KAl61 és a piros a KAl66 minta görbáját

kristályszerkezet a domináns faktor. A KAl26-os mintánál a kialakuló, nem teljesen szabályos oktaéderek kristályszerkezetéből, ill. azok szemcseméretéből is adódhatnak az eltérő szerkezetű endotermák. A KAl63 mintánál a három lépcső a röntgendiffrakciós adatokból nyerhető timsó-tartalommal arányosan kisebb mérhető hőmennyiséget mutat.



A minták mindegyike esetében a mérhető átlagos víztartalom molekulánként minimum 6. Vagyis mindegyik mintában megtörténik a minimum 50%-ban jelenlévő kristályos timsó egy részének átalakulása amorf timsóvá. Ennek megfelelően mérhetőek különböző hőtartalmú átlapoló csúcsok szobahőmérséklet és 180 °C között. A Referencia, KA126, KA163 minták esetében a 180–250 °C közötti csúcs is megjelenik. Ha már van átlagosan legalább 8 mol kristályvíze a mintának, már megjelenik az előbbi csúcs, amihez az amorf timsó teljes egészében kristályos  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ -tá átalakulása tartozik (5.34. ábra). A KA161 és KA166-os mintáknál azonban ez a csúcs már nem jelenik meg (5.35. ábra).

A mért hőeffektus és a minták kristályvíz tartalma közötti összefüggés lineáris korrelációt mutat. Ha képzünk egy arányt a minták átlagos kristályvíz tartalma és a Referencia minta kristályvíz tartalma között, akkor ezzel a faktorról számolva, becsülhető a minták vízvesztésük és a megolvadásuk során mért hőmennyiségének értéke (a Referencia minta DSC görbéjéből meghatározható összes hőmennyiségre vonatkoztatva). A korreláció a mért és a számított hőmennyiség adatok között megfelelő, bár a számított értékek valamivel nagyobbak, mint a mértek. Az adatok az 5.11. számú táblázatban találhatóak. A kalkulált hőmennyiség adatokat összevetve a röntgendiffrakciós adatokból számított kristályos timsótartalommal, a KA163 minta esetében mutatja a legjobb egyezést (739,7 J/g, ill. 727,3 J/g). A másik két mintánál a röntgendiffrakciós görbék alapján az amorf fázis aránya nagyobb, mint a KA163 minta esetében. A mérésből mennyiségileg nem mondható meg mennyi a kristályos fázis aránya, ebből adódóan a mennyiségi adatok az agglomerátumok összetételére nézve kevésbé pontosak. Egyrészt ez a tény eredményezi, hogy a számítással meghatározott timsótartalomhoz képest jelentősen kisebb hőtartalom mérhető. Másrészt a DSC méréseknél a minta mennyisége sokkal kisebb és a fűtési sebesség is sokkal lassabb, mint a TG mérések alkalmával. Ezek a különbségek is indokolhatják a számított és a mért hőmennyiségek közötti különbséget.

A kétféle mechanizmussal készült szemcsék közül az SA mechanizmussal előállított szemcsék megfelelően nagy fajlagos hőtartalmat mutattak, de nem szférikus formájúak, míg az ESD mechanizmussal készültek majdnem tökéletesen szférikusak azonban jóval kisebb fajlagos hőtartalom jellemzi azokat. A felhasználás szempontjából természetesen a hőtartalom a fontosabb tulajdonság.

5.11. táblázat. Mért és számított hőmennyiség adatok

Minták	Hő-tartalom, J/g	Hőtartalom aránya a referenciához képest, %	Átlagos kristály-víz tartalom a Referenciához képest	Hőtartalom az átlagos kristályvíz tartalomból számítva, J/g
Referencia (48 °C–260 °C)	999,6			
KA126 (44 °C–235 °C)	947,8	95%	1,0049	1004,5
KA163 (42 °C–280 °C)	727,3	73%	0,7522	752,0
KA161 (41 °C–215 °C)	522,7	52%	0,5969	596,7
KA166 (44 °C–215 °C)	478,4	48%	0,5478	547,6

### 5.3 Hexadekán tartalmú mikroszemcsék morfológiájának tanulmányozása

Hexadekán fázisváltó hőtároló anyag poli(metil-metakrilát) és etil-cellulóz polimerekbe való mikrokapszulázásával – olaj a vízben emulziós oldószer-elpárolgatásos módszerrel – nyert szemcséinek morfológiáját SEM felvételek segítségével tanulmányoztam.

A mikrokapszulák morfológiáját az előállítás során létrejövő határfelületi energiák határozzák meg. Torza és munkatársai [125] három nem elegyedő folyadék esetére írták le az emulzióképződés során kialakuló csepp egyensúlyi morfológiáját befolyásoló szétterülési együtthatókkal levezethető egyenleteket. Ezt a közelítést alkalmazták Loxley és munkatársai [53] is azzal a különbséggel, hogy az előbbi összefüggéseket három nem elegyedő fázisként, két folyadék és egy szilárd fázisra írták le, és ezek segítségével adták meg a szétterülési együtthatókat. Esetünkben is két folyadékra, a hexadekánra és az emulgeátor oldatra, ill. egy szilárd fázisra, a polimerfilmre írhatók fel és mérhetők ki a határfelületi feszültségek.

A várható egyensúlyi morfológia előrejelzéséhez szükséges a hexadekán és a különböző emulgeátor oldatok levegővel szembeni határfelületi feszültségének pl. függő csepp módszerrel való meghatározása, majd ennek az értéknek az ismeretében mérhető, majd számítható a hexadekán-emulgeátor oldatok folyadék-folyadék határfelületi feszültsége is. Végül a kapszulázó polimerből létrehozott filmrétegen vizsgálva mind a hexadekán, mind az emulgeátor oldatok szétterülését, mérhető a létrejövő cseppnek a felülettel bezárt szöge, az úgynevezett kontaktszög. Az így kapott adatok analízisével megjósolható a szemcsék egyensúlyi morfológiája.

### 5.3.1 Mikrorészecskék előállítása egyszerű emulziós módszerrel

Egyszerű emulziós módszer alkalmazásakor két nem elegendő fázist érintkeztetünk egymással felületaktív anyag jelenlétében. Mivel jelen esetben olaj a vízben emulzió előállítása a cél, ezért az ismert besorolás alapján (5.12. táblázat) magas HLB (hidrofil-lipofil egyensúly) értékkel jellemezhető felületaktív anyag használata szükséges.

5.12. táblázat. Felületaktív anyagok csoportosítása felhasználásuk és HLB értékük alapján [126]

HLB értékek	Felületaktív anyag tulajdonságai
0–3	habosodás gátló
4–6	víz az olajban emulzió emulgeátora
7–9	nedvesítő összetevő
8–18	olaj a vízben emulzió emulgeátora
10–18	vízoldhatóvá tesz

A táblázat alapján a felületaktív anyag HLB-paraméterének célszerű a 8–18 tartományba esnie. A nem ionos felületaktív anyagok közül ilyen értékeket mutatnak a Tween 80 (HLB = 15), Triton X-100 (HLB = 13,4) és a szemcseképzés területén igen gyakran alkalmazott PVA (HLB = 18) emulgeátorok. L.F. Woodard és R.L. Jasman munkája alapján önmagában a hexadekán emulgeálásához a HLB 11,8 érték a legmegfelelőbb [127]. Ionos felületaktív anyagként, a poli(metilakrilsav) Na-sóját (PMAA) választottuk Loxley és munkatársai [53] által leírt kedvező tulajdonságai alapján. Mivel a tervezett felhasználás miatt a kapszulázó polimert nagy mennyiségben kell alkalmazni, ezért a jó mechanikai tulajdonságokkal rendelkező, de a tömeggyártáshoz kellően olcsó poli(metil-metakrilát)-ot és etil-cellulózt választottuk. A kapszulázó polimer és a hexadekán fázisváltó anyag szerves oldószeres oldatát fenti felületaktív anyagok oldatával mágneses keverés útján emulgeáltuk. A szerves oldószert szobahőmérsékleten elpárologtattuk. A kapott szuszpenziók szemcséinek morfológiáját SEM felvételek segítségével vizsgáltuk és összevetettük a szétterülési együtthatók értékei szerint prognosztizálható morfológiákkal.

### 5.3.2 A határfelületi feszültség mérés eredményei

#### 5.3.2.1 A folyadék-levegő és a folyadék-folyadék határfelületi feszültség mérés eredményei

Első lépésként tehát meghatároztam a hexadekán és az emulgeátor oldatok levegővel szemben mérhető felületi feszültségét függő csepp módszerrel. A hexadekánra és az általunk alkalmazott emulgeátor oldatokra meghatározott folyadék-levegő határfelületi feszültség értékeket és az irodalomban ezekhez fellelhető összehasonlító adatokat az 5.13. táblázatban tüntettem fel. Az értékek hibán belüli egyezést mutatnak.

5.13. táblázat. HD és a felületaktív anyagok folyadék-levegő határfelületi feszültsége

Folyadék összetétel	Folyadék-levegő határfelületi feszültség, mN/m, saját mérési eredmény	Folyadék-levegő határfelületi feszültség, mN/m, irodalmi adatok
HD	26,94±0,02	27,2 [128]
1% PMAA	73,34±0,3	
1% PVA	48,72±0,38	48,6 [129]
2% PVA	46,82±0,26	46,1
1% Tween 80	46,16±0,23	
2% Tween 80	43,21±0,33	
2% Triton X-100	31,45±0,11	31,4 [130]

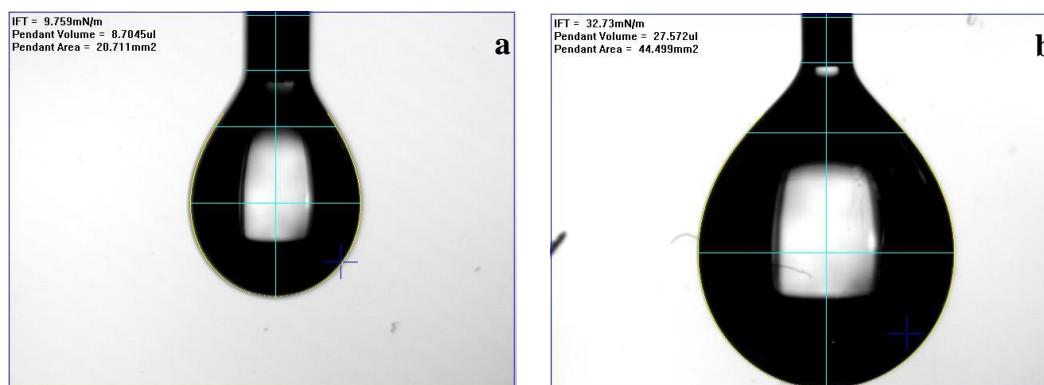
A folyadék-folyadék határfelületi feszültség mérését visszavezettem a folyadék-levegő határfelületi feszültség mérésének módszerére. Az emulgeátor oldatok és a hexadekán közötti folyadék-folyadék határfelületi feszültség meghatározásához a függő cseppet a kisebb sűrűségű folyadéokban, esetünkben a hexadekánban hoztam létre. A számításhoz a hexadekán előzetesen meghatározott adatait helyettesítjük be a levegő adatainak helyére.

Az 5.13. és az 5.14. táblázatokban látható, hogy mind a folyadék-levegő, mind a folyadék-folyadék határfelületi feszültségre mért értékek tendenciájukban a várakozásnak megfelelőek.

**5.14 táblázat. A hexadekán és az emulgeátor oldatok közötti folyadék-folyadék határfelületi feszültség**

Folyadék-folyadék összetétel	Folyadék-folyadék határfelületi feszültség $\gamma_{12}$ , mN/m
HD	26,94±0,02
1% PMAA-HD	32,51±1,12
1% PVA-HD	18,57±0,43
2% PVA-HD	16,29±0,34
1% Tween 80-HD	11,73±0,049
2% Tween 80-HD	9,78±0,13
2% Triton-HD	1,8 (nagy hibával)

A felületaktív anyagok nagyobb koncentrációjú oldatai kisebb felületi feszültség értékeket mutattak. PVA emulgeátornál a 2%-os oldat levegővel szemben mért felületi feszültsége nem csökken lényegesen az 1%-os oldathoz képest, azonban az anyagi minőség jelentős különbséget eredményez. 2%-os oldatok esetében a PVA levegővel szemben mért határfelületi feszültségéhez (46,82 mN/m) képest a Triton X-100 2% oldata lényegesen kisebb, 31,45 mN/m értéket adott. A kisebb felületi feszültségű oldatok, mint pl. a Tween 80 oldata, nagyobb mértékben csökkentették a hexadekánal kialakított felületükön a határfelületi feszültséget, a levegővel szembeni értékről (26,94 mN/m-ről) 9,78 mN/m-re.



**5.36. ábra. 2% Tween-HD (a) és 1% PMAA-HD (b) rendszerekben a függő cseppek árnyékának analizálható fényképei**

Az 5.36. ábrán szemléltetésképpen a 2%-os Tween 80 (a) és az 1%-os PMAA (b) oldatok hexadekánban kialakuló cseppjének árnyékképe látható. A PMAA oldatának folyadék-levegő határfelületi feszültsége szinte megfelel a tiszta vízének (73,34 mN/m), így a hexadekánnal mért határfelületi feszültség (32,51 mN/m) nagyobb, mint a hexadekánnak levegővel szemben mért értéke (26,94 mN/m). Ennek az volt a következménye, hogy a méréshez egy kisebb átmérőjű tűt kellett alkalmaznom, hogy az így létrejövő csepp beférjen a kamera által alkotott képbe. A 2%-os Tween 80-nal kialakuló előbbinél sokkal kisebb határfelületi feszültség (9,78 mN/m) a képen látható jóval kisebb cseppméretben nyilvánult meg.

### 5.3.2.2 A szilárd-folyadék határfelületi feszültség mérés eredményei

A polimerfilm-emulgeátor oldat, polimerfilm-hexadekán szilárd-folyadék határfelületi feszültségek a folyadékok polimerfilmen való szétterüléséből, a folyadékcseppek polimerfilmen kialakuló kontaktszögéből ( $\theta$ ) számíthatók. A számításokhoz szükség van jelen esetben az etil-cellulóz polimer szilárd-levegő határfelületi feszültség adatára ( $\gamma_{S/V}$ ), amely az irodalomból 32 mN/m [131].

$$\gamma_{L/V} \cdot \cos(\theta) = \gamma_{S/V} - \gamma_{S/L},$$

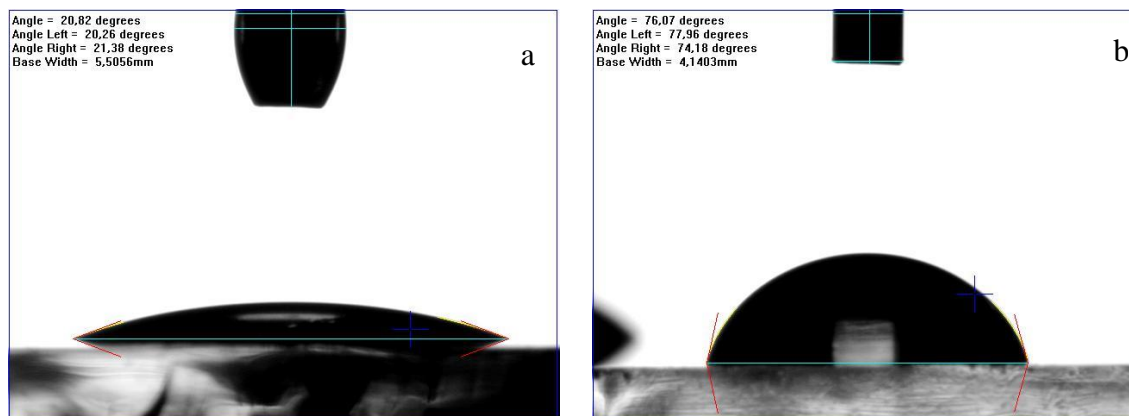
ahol a  $\gamma_{L/V}$  a folyadék-levegő határfelületi feszültség,  $\gamma_{S/L}$  a szilárd-folyadék határfelületi feszültség adat. Az 5.15. táblázatban összevethetők a különböző összetételű oldatokból készült polimerfilmekken kialakuló hexadekán csepp nedvesedési szögei.

**5.15. táblázat. A hexadekánnak a különböző polimerfilmekken, köztük a 4 %-os etil-cellulóz és 4 %-os PMMA polimerek közös oldatából készült kevert filmen kialakuló nedvesedési szöge és az abból számított szilárd-folyadék határfelületi feszültség adatok**

Polimerfilm-HD	Szilárd-folyadék nedvesedési szög	Szilárd folyadék felületi feszültség, $\gamma_{13}$ mN/m
4% EC-HD	21,5±0,71	6,93
4% EC (C)-HD	20,8±1,03	6,82
5% EC-HD	22,2±0,21	7,06
8% EC-HD	20,4±0,18	7,06
kevert film-HD	21,0±0,25	6,85

## Eredmények és értékelésük

A mérések szerint a hexadekán a film minőségétől szinte függetlenül, hasonló mértékben nedvesíti mind az etil-cellulóz filmeket, mind a kevert filmet. Az 5.37. ábrán a 4%-os EC (C) nanorészecskéket tartalmazó filmjén a hexadekán (a) és 2%-os PVA oldat (b) ülőcseppek szétterülésének különbsége figyelhető meg. Mindkét folyadék nedvesíti a filmet, a hexadekán mondhatni lapos, domború lencse alakot vesz fel, míg a 2%-os PVA oldat sokkal nagyobb szöget zár be a filmmel.



5.37. ábra. 4% EC(C) filmen a HD (a) és 2%-os PVA oldat (b) ülőcseppje

Minél töményebb oldatából készült az etil-cellulóz film, a felületaktív anyag oldata annál jobban nedvesíti a felületet, azonos felületaktív anyag minőség és koncentráció mellett annál kisebb kontaktszög mérhető.(5.16. táblázat). A legnagyobb különbség az 1 %-os PMAA oldatnál tapasztalható, míg a legkisebb a 2 %-os Triton X-100-as oldatánál figyelhető meg.

5.16. táblázat. Az emulgeátor oldatok különböző polimerfilmen kialakuló nedvesedési szöge és az abból számított szilárd-folyadék határfelületi feszültség adatok

A polimerfilmek és a felületaktív anyagok oldatának összetétele	Szilárd-folyadék nedvesedési szög, °	Szilárd-folyadék felületi feszültség, $\gamma_{23}$ mN/m
4 % EC (C)-1% PMAA	70,6±2,01	7,63
5 % EC-1% PMAA	67,3±0,44	3,73
8 % EC-1% PMAA	66,6±1,89	2,83
kevert film-1% PMAA	72,5±2,6	9,99
4 % EC (C)- 2% PVA	76,3±1,75	20,94
5 % EC-2% PVA	73,1±0,83	18,40

A polimerfilmek és a felületaktív anyagok oldatának összetétele	Szilárd-folyadék nedvesedési szög, °	Szilárd-folyadék felületi feszültség, $\gamma_{23}$ mN/m
8 % EC-2% PVA	<b>72,8±1,08</b>	<b>18,19</b>
kevert film-1 % PVA	72,8±1,2	17,60
4 % EC-1% Tween 80	72,1±1,02	17,83
5 % EC-2% Tween 80	71,8±0,84	18,53
4% EC- 2% Triton X-100	<b>42,9±2,04</b>	<b>8,98</b>
8 % EC-2 % Triton X-100	<b>42,4±1,52</b>	<b>8,79</b>

Annak megfelelően, hogy a Triton X-100 oldatának a legkisebb a levegővel szembeni határfelületi feszültsége és legnagyobb mértékben csökkenti a hexadékan felületi feszültségét, a polimerfilmmel szemben mért határfelületi feszültsége is a legkisebb. A többi emulgeátor oldat nagyon hasonló kontaktszög értékeket mutat egymáshoz képest és különböző filmekken is.

### 5.3.3 Szétterülési együtthatók meghatározása

Ha két nem elegyedő folyadék cseppjeit (1: hexadékan és 2: emulgeátor oldata) egy harmadik szintén nem elegyedő fázissal (3. fázis: etil-cellulóz polimerfilm) érintkezésbe hozzuk, a végső egyensúlyi morfológiát a fázisok közötti különböző határfelületi feszültségek határozzák meg ( $\gamma_{12}$ ,  $\gamma_{23}$  és  $\gamma_{13}$ ). A  $S_i$  szétterülési együtthatók az egyes fázisokhoz a következőképpen definiálhatók:

$$S_1 = \gamma_{23} - (\gamma_{12} + \gamma_{13}),$$

$$S_2 = \gamma_{13} - (\gamma_{23} + \gamma_{12}),$$

$$S_3 = \gamma_{12} - (\gamma_{23} + \gamma_{13}),$$

ahol  $\gamma_{12} = \gamma_{\text{HD/Emulgeátor}}$ ,  $\gamma_{13} = \gamma_{\text{HD/ECfilm}}$ , és  $\gamma_{23} = \gamma_{\text{ECfilm/Emulgeátor}}$  és amelyre érvényes, hogy  $\gamma_{12} > \gamma_{23}$ , és  $S_1 < 0$ , így csak három lehetséges kombinációja van  $S_i$  előjelének, vagyis

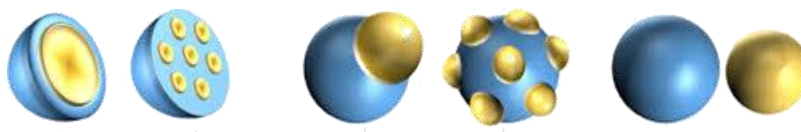
$S_1 < 0$ ;  $S_2 < 0$ ;  $S_3 > 0$  mag-héj szerkezet,

$S_1 < 0$ ;  $S_2 < 0$ ;  $S_3 < 0$  makk szerkezet,

$S_1 < 0$ ;  $S_2 > 0$ ;  $S_3 < 0$  külön álló cseppek



alakulnak ki (5.38. ábra).



5.38. ábra. A mag-héj, a makk szerkezet és a különálló cseppek

Elvégezve a Torza és munkatársai [125] által kidolgozott, a határfelületi feszültségek meghatározásán alapuló analízist, arra az eredményre jutottam, hogy a szétterülési együttható értékek széles tartományban változnak a különböző emulgeátorok alkalmazásától függően. A várakozásoknak megfelelően a Triton X-100 használatakor, amikor a hexadekán-emulgeátor oldat folyadék-folyadék határfelületi feszültség a legkisebb, akkor adódik az  $S_3$  szétterülési együttható értékére a legnagyobb negatív érték. Míg a PMAA esetében, ahol a folyadék-folyadék határfelületi feszültség a legnagyobb, az  $S_3$  értéke már pozitív értéket vesz fel. Az  $S_3$  pozitív értéke azt jelenti, hogy az analízis szerint a PMAA emulgeátor hatására várható legnagyobb valószínűséggel a mag-héj szerkezet kialakulása. A Triton X-100, Tween 80 és a PVA emulgeátorok úgy befolyásolják az  $S_3$  szétterülési együttható értékét, hogy az elemzés szerint makk formájú részecske keletkezése a legvalószínűbb.(5.17. táblázat)

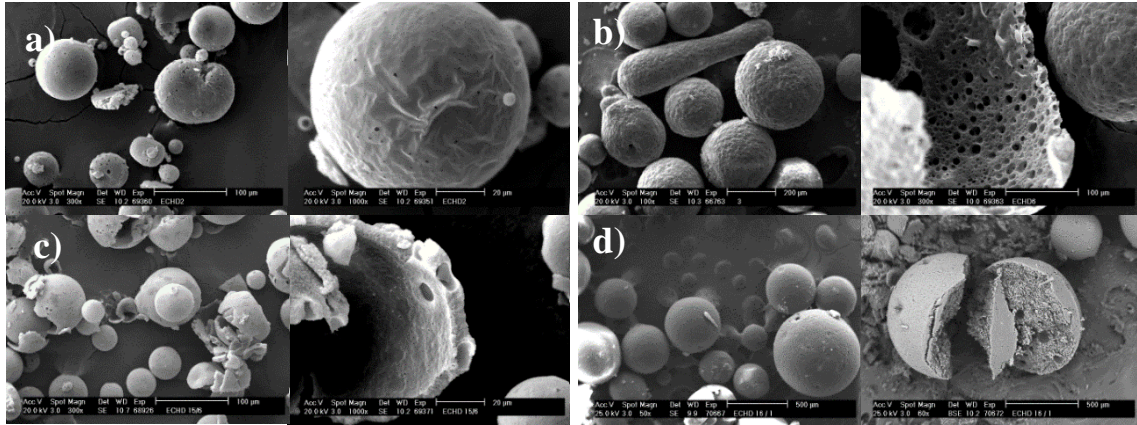
5.17. táblázat. Az általunk vizsgált rendszerekben a számításokból adódó szétterülési együttható értékek

A polimerfilmek és a felületaktív anyagok oldatának összetétele	$S_3$	$S_2$	$S_1$	egyensúlyi morfológia
4 % EC (C)-1% PMAA	18,06	-33,32	-31,70	mag-héj
5 % EC-1% PMAA	21,72	-29,18	-35,84	mag-héj
8 % EC-1% PMAA	22,94	-28,59	-36,43	mag-héj
kevert film-1% PMAA	15,68	-35,65	-29,37	mag-héj
4 % EC (C)- 2% PVA	-11,47	-30,41	-2,17	makk
5 % EC-2% PVA	-9,17	-27,64	-4,94	makk
8 % EC-2% PVA	-8,64	-27,73	-4,85	makk
kevert film-1 % PVA	-5,87	-29,32	-7,82	makk

## Eredmények és értékelésük

<b>A polimerfilmek és a felületaktív anyagok oldatának összetétele</b>	<b>S3</b>	<b>S2</b>	<b>S1</b>	<b>egyensúlyi morfológia</b>
4 % EC-1% Tween 80	-13,03	-22,63	-0,83	makk
5 % EC-2% Tween 80	-15,81	-21,25	1,69	makk
4% EC- 2% Triton X-100	-14,11	-3,85	0,25	makk
8 % EC-2 % Triton X-100	-14,05	-3,53	-0,07	makk

Az elektronmikroszkópos felvételek tanúsága szerint azonban mind a négy emulgeátor esetében a szemcsék mag-héj felépítésűek lettek (5.39. ábra). A kialakult héj szerkezetében, amely meghatározza a szemcse hatékonyságát, a PMAA szemcséken tapasztalható a legkisebb mértékű lyukacsosság, tehát ebben az esetben képződik valódi mag-héj szerkezet. A Tween 80-nal és a PVA-val készült szemcsékre, ahol az analízis nem jósol mag-héj felépítést, a héj valójában a szétterülési együttható nagyobb negatív értékével összhangban, még inkább porózus szerkezetű, tehát ebben az értelemben nem tekinthető valódi mag-héj szerkezetnek. Több szerző tárgyalja, hogy ugyan különböző paraméterek hatására, de ennek az analízisnek az eredménye nem mindig egyezik meg a tapasztalt morfológiákkal [132, 133]. Az elemzés alapján kapott legvalószínűbb morfológia a határfelületi energiák alapján számított egyensúlyi morfológia. Az elemzés azonban nem számol egyéb fontos befolyásoló tényezőkkel, mint pl. a mag és a héj anyagának térfogataránya, a párologtatás sebessége, a felületaktív anyagok molekuláinak szerkezetirányító hatása vagy éppen a polimerfilm viszkozitása. Esetünkben a szemcsék a folyamat során nem érik el az egyensúlyi morfológiájukat. A kezdetben kialakuló emulziócseppben a diklór-metán távozásával csökken az etil-cellulóz oldhatósága, az így kialakuló etil-cellulózban gazdag koacervátum cseppek pedig elég mobilisak ahhoz, hogy a felületre vándoroljanak és összeolvadjanak. Tween 80 és a Triton X-100 használatakor azonban a nedvesedési viszonyok miatt nem tudnak egybefüggő héjat képezni. A diklór-metán folyamatos távozásával a héjanyag növekvő viszkozitása azonban gátolja a maganyagnak nagyobb cseppben való felületre jutását és a makk szerkezet kialakulását. Tween 80 alkalmazásakor kisebb olajcseppek mégis kijuthatnak a szemcse felületére.



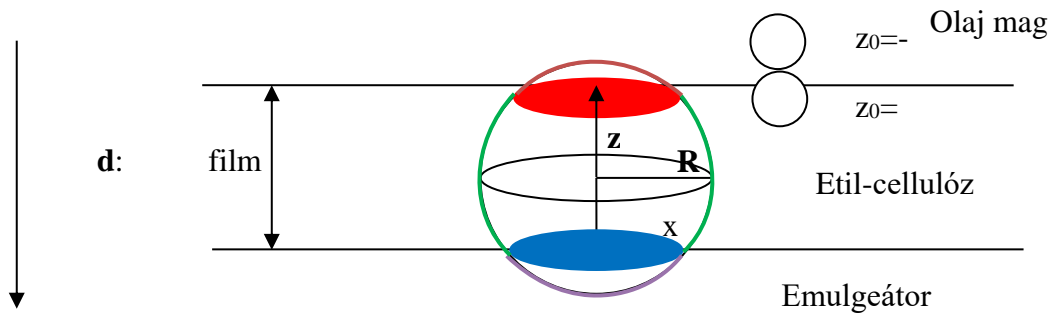
**5.39. ábra.** A négy különböző emulgeátor oldattal képződött szemcsék morfológiája és a héjak porozitása SEM felvételek alapján, PVA (a), Tween 80 (b), PMAA (c), Triton X-100 (d)

A felületi feszültség szerepét a különböző porozitású héjak kialakulásában Bolognesi és munkatársainak [134] közelítése alapján modelleztük. Egy a mikrométeres vízcsepp oldatrétegbe való merülésének felületi, ill. a határfelületi feszültségeken alapuló modelljét használták a polisztirol (PS) felületén egy vagy több rendezett rétegből álló porózus szerkezet kialakulásának leírására. Ezt a modellt dolgoztuk át úgy, hogy a mi esetünkben az olajcsepp polimerfilmbe való bemerülését, és onnan az esetleges polimerfilm külső felületére való kerülésének felületi energia viszonyait modelleztük/írtuk le.

### 5.3.4 A porozitás modellezése

Ha azt feltételezzük, hogy a polimer szemcse átmérője lényegesen nagyobb, mint a film porozitását okozó olajcseppek átmérője, akkor az energetikai leírásnál jó közelítést adhat, ha a gömbhéj alakú filmet egy azonos vastagságú síknak tekintjük (5.40. ábra). Így a gömb alakúnak feltételezett olajcsepp filmen való áthaladása során bekövetkező felületváltozások könnyen számolhatók, amikből a határfelületi feszültségek ismeretében a csepp „mozgatásával” járó felületienergia-változást az alábbi módon lehet leírni.

Az 5.40. ábrán a  $z$  a gömb középpontjának az olaj és etil-cellulóz film határától való távolsága,  $x$  pedig a gömb középpontjának távolsága az etil-cellulóz film és az emulgeátor oldat alkotta határfelülettől. Az egyszerűbb kezelhetőség érdekében célszerű az olajcsepp sugarával,  $R_0$ -val redukált koordinátákat bevezetni. Legyen  $x_0 = x/R_0$  és  $z_0 = z/R_0$ , így  $x_0 = (d-z)/R_0$ , ahol  $d$  a polimerfilm vastagsága. Az így felírt koordináták a következő határértékeket vehetik fel:  $-1 \leq z_0 \leq 1$  és  $-1 \leq x_0 \leq 1$ .



5.40. ábra. Az olajcsepp mozgásának modellje a kapszula olajmagjából az etil-cellulóz filmbe

Ha az olajcsepp az 5.40. ábrán feltüntetett nyíl irányában halad, akkor a felületváltozást, és így az energiaváltozást is a következő 5 tag összegeként írhatjuk fel:

$\Delta E_1 = +\gamma_{oo} \cdot 2 \cdot \pi \cdot R_o^2 \cdot (1 - z_0)$ , mivel olaj/olaj határfelület nincs, ezért ez a tag mindig 0.

$\Delta E_2 = +\gamma_{oEC} \cdot 2 \cdot \pi \cdot R_o^2 \cdot [(1 + z_0) - (1 - x_0)] = \gamma_{oEC} \cdot 2\pi \cdot R_o^2 \cdot (z_0 + x_0)$ , a cseppnek a filmen való áthaladásakor kialakuló, majd megszűnő, az ábrán zöld körvonallal jelölt felületek.

$\Delta E_3 = -\gamma_{oEC} \cdot \pi \cdot R_o^2 \cdot (1 - z_0^2)$ , az olajcsepp és a polimerfilm között megszűnő – az ábrán piros színnel jelölt – kör alakú felület.

$\Delta E_4 = +\gamma_{oEm} \cdot 2 \cdot \pi \cdot R_o^2 \cdot (1 - x_0)$ , az olajcsepp a filmen túljutva „belelóg” az emulgeátor oldatba, és létrejön egy gömbsapka alakú felület.

$\Delta E_5 = -\gamma_{ECEm} \cdot \pi \cdot R_o^2 \cdot (1 - x_0^2)$ , a polimerfilm és az emulgeátor oldat határán megszűnik egy kör alakú felület.

A  $\gamma_{oEc}$  az olaj és az etil-cellulóz film határfelületi feszültsége, a  $\gamma_{oEm}$  az olaj és az emulgeátor oldat határfelületi feszültsége, a  $\gamma_{ECEm}$  az etil-cellulóz film és az emulgeátor oldat határfelületi feszültsége.

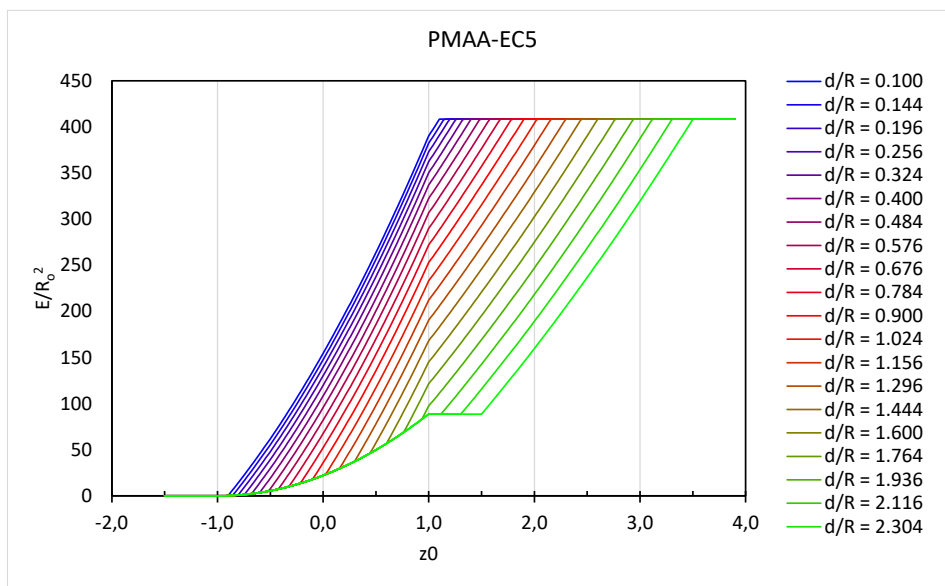
Az olajcseppnek a létrejövő és a megszűnő felületeinek leírására a gömbszelet felszínét használtuk fel. Gömbszelet felszíne =  $2\pi Rm + \pi\rho^2$ , ahol **m** a gömbszelet magassága, **ρ** a gömbszelet alját alkotó kör sugara.

$$A_{k\ddot{o}ralap} = \pi \cdot R_o \cdot (1 - z_0^2)$$

$$A_{sapka} = 2\pi \cdot R_o^2 \cdot (1 - z_0)$$

### 5.3.4.1 PMAA emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezése

A modell teljesítőképességének bizonyítására a felületi feszültség adatokból számítottam a felületenergia-változás alakulását a csepp olajmagból való kiszakadására és a polimerfilmen való áthaladására 4 különböző emulgeátor esetében. Bár a kialakuló polimerfilm közelítő vastagsága az olaj és a polimer mennyiségének arányából számítható, ill. a SEM felvétel alapján becsülhető, az olajmagból „kiszakadó” olajcseppek változó méretűek lehetnek. A modellezés során ezért célszerű volt a felületenergia-változását a korábban bevezetett  $z_0(z/R_0)$  redukált koordináta mentén számítani. Az energiatagok mind a  $d$ -től, mind az  $R_0$ -tól függenek, de megvizsgálva az egyes energiatagokat, szembetűnő, hogy mindegyikből kiemelhető az  $R_0^2$ . Ezt felhasználva az energia értéke helyett a – csak  $d/R_0$ -tól függő –  $\Delta E/R_0^2$ -et ábrázoltam a  $z_0$  függvényében. Így a különböző emulgeátorokkal kialakuló rendszerekben könnyebben összehasonlíthatók a változások. A PMAA emulgeátor hatását a kiválasztott  $d/R_0$  arányokra – vagyis a filmvastagság és az olajcsepp sugarának arányára – modellezve kaptuk az alábbi 5.41. ábrán látható felületenergia-görbéket.

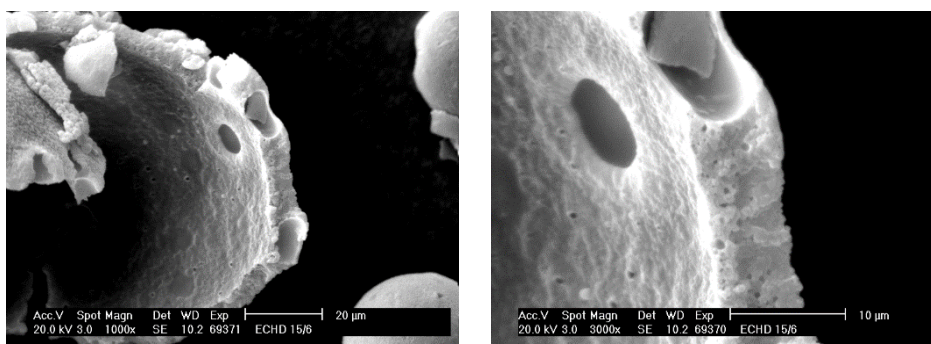


5.41. ábra. Felületenergia-görbesereg  $d/R_0$  függvényében ábrázolva

Az 5.41. ábrán a sötétkék színtől a zöld felé haladva növekszik a  $d/R_0$  aránya. Minél kisebb ez az arány annál erőteljesebb a felületenergia-növekedés  $z_0$  függvényében. Ez azt jelenti, hogy a kék színű görbénél olyan nagy az energiagát, hogy egyáltalán nem valószínű az olajcsepp átjutása a polimerfilmen keresztül az emulgeátor oldatba. A  $d/R_0$

arány növekedésével (zöld görbe) már kisebb energiagátat kell legyőznie a cseppnek, hogy a filmbe belépjen és esetleg kis mélységben benne is ragadjon (vízszintes szakasz a görbén). Ahhoz, hogy a filmből kilépjen az emulgeátor oldatba újabb nagy energiagátat kellene átlépnie, amihez már kisebb valószínűséggel elegendő a rendszerrel közölt keverési energia.

Az 5.39. c ábrán látható PMAA-EC5 – PMAA emulgeátorral és 5% etil-cellulóz polimerrel készült – minta elektronmikroszkópos képei közül kiválasztottam kettőt, amin egy eltört szemcse héjszerkezete tanulmányozható (5.42. ábra).



5.42. ábra. PMAA-EC5 minta egyik szemcséjének héjszerkezete

A képen, a skála alapján a kb. 100 µm-es szemcse héja kb. 7 µm vastagságú. A héjon megfigyelhető több 5 µm körüli bemélyedés a filmbe, ill. egy hosszában nézve kb. 8 µm-es lyuk, amely a 7 µm-es filmet nem lyukasztja át teljesen, csak lyukat üt benne. A PMAA-EC5 mintára meghatározható egy  $d/R_{mért}$  arány, ami a kísérletben az összemért polimer és olaj térfogatarányából számítható, feltételezve, hogy az olaj egy magot alkot, amit körbe vesz egy polimerhéj.

$$\frac{d}{R_{mért}} = 1 - \left(1 - \frac{V_{EC}}{V_{EC} + V_{HD}}\right)^{1/3},$$

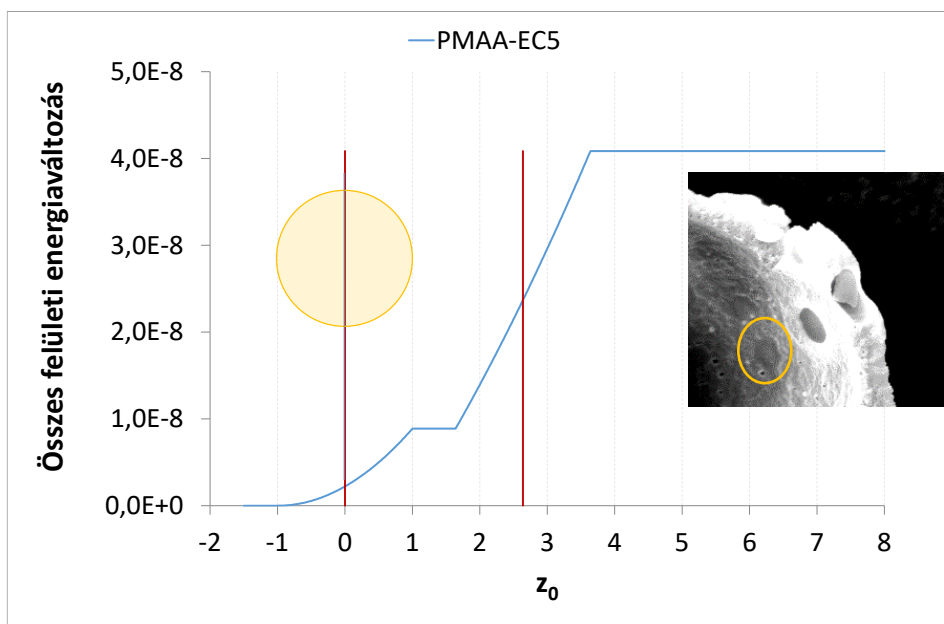
ahol  $d$  a gömbhéj (polimerfilm) vastagsága,  $R_{mért}$  a  $D(4,3)$  szemcseméret fele,  $V_{EC}$  a bemért etil-cellulóz polimer térfogata,  $V_{HD}$  a bemért hexadekán térfogata.

Ebből az arányból számítható egy átlagos filmvastagság a szemcseméret analízissel meghatározott  $D(4,3)$  átlagszemcseméret segítségével. A választott szemcsénk mérete 100 µm és a számított héjvastagság 6,54 µm, amely jó egyezést mutat a SEM alapján a 100 µm méretű szemcse héjvastagságára tett becslésünkkel (5.18. táblázat). Ez arra utal, hogy a PMAA-EC5-ös minta esetében elfogadható a megállapítás, hogy a szemcsék maghéj szerkezetűek. A következő táblázatban néhány kiválasztott szemcse különböző módon meghatározott, illetve számolt geometriai méreteit tüntettem fel.

5.18. táblázat. Néhány, SEM-felvételek alapján választott, szemcse geometriai adatai

Minta neve	$d/R_{\text{mért}}$ a polimer és az olaj mennyiség aránya alapján	A filmvastagság $d/R_{\text{mért}}$ arány és az átlagszemcseméret alapján, $\mu\text{m}$	Polimerfilm vastagsága SEM alapján, $\mu\text{m}$	SEM felvételen a szemcse mérete, $\mu\text{m}$	Választott szemcse számított héj vastagsága, $\mu\text{m}$
PMAA-EC5	0,0654	2,79	7	100	6,54
PVA-EC4	0,0924	2,50	10	120	11,09
Tween80-EC4	0,1580	27,02	10	185	29,24
Triton-EC8	0,1580	38,25	1,5	625	98,78

Az 5,3  $\mu\text{m}$  méretű olajcsepre, ami  $d/R_0$  arányra 2,64-ot jelent, a modellezésből az 5.43. ábrán látható felületenergia-görbe adódik. A függőleges vonalak mutatják az egységnyi olajcsepp mérethez viszonyított filmvastagságot. Ennél a  $d/R_0$  aránynál tehát az adott méretnél a csepp, ha le is küzdi a kezdeti energia szükségletet, csak benyomni tudja a filmet vagy esetleg kis mértékben előre haladni a filmben és ott megragadni, de kilyukasztani nem.



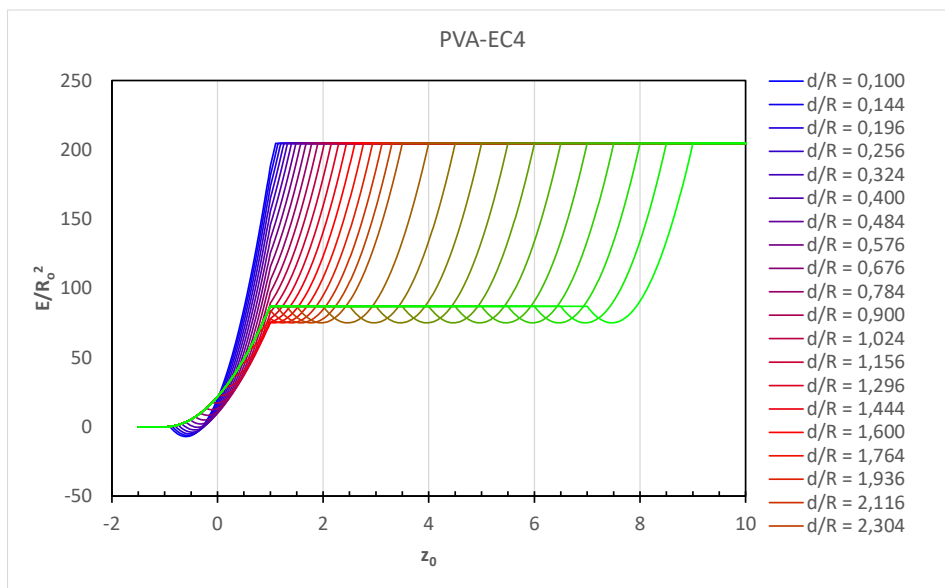
5.43. A héjszerkezetben a kb. 5  $\mu\text{m}$  bemélyedésekhez tartozó felületenergia-görbe

A Melléklet 8.6.1. pontjában további két olajcsepp mérethez tartozó felületenergia-görbével szemléltetem a modell hatékonyságát.

Mint a fenti példán és a mellékletben található példákon keresztül bemutattam a PMAA-EC5 mintára, a matematikai leírás jól modellezi, magyarázza a kialakuló héjnak a SEM felvételeken tapasztalható kismértékű porozitását és megerősíti a mag-héj szerkezetét a szemcséknek.

### 5.3.4.2 PVA emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezése

A PVA emulgeátorok hatásait a PMAA-hoz hasonlóan különböző  $d/R_0$  arányoknál modelleztük. Az ehhez számított felületenergia-görbék láthatók az 5.44. ábrán.



5.44. ábra. A különböző  $d/R_0$  értékekre számolt felületenergia-görbék HD-EC-PVA rendszerben

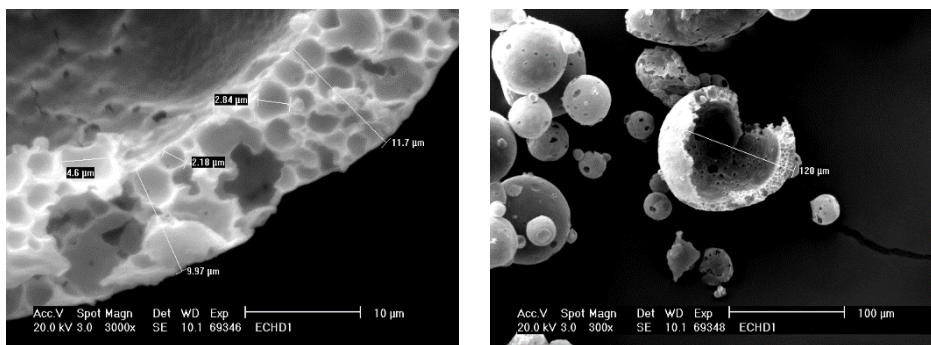
A PMAA-ra végzett számításokból nyert görbesereggel összehasonlítva elmondható, hogy PVA emulgeátor alkalmazásakor már jellegében is más görbéket kapunk. Ha  $d/R_0$  kisebb, mint 0,5 (sötétkék görbék), akkor az olajcsepp a filmbe nyomódás után elér egy energiaminimumot. Ezzel egyidejűleg a csepp a PVA-s fázist is eléri, bár a középpontja még nem jut el az olaj-film határfelületig sem, mégis átlyukasztja a filmet. Ahhoz, azonban hogy a csepp teljesen áthaladjon rajta, nagy energiagátat kellene legyőznie. Ilyen esetre lehetnek példák az 5.45. ábrán látható kisméretű szemcséken lévő viszonylag nagy lyukak.

A  $d/R_0$  arány növekedésével a kezdeti energiaminimum megszűnik, és az olajcseppeknek nagy energiagátat kell leküzdeniük ahhoz, hogy kijussanak az emulgeátor oldatba. A  $d/R_0$  arány további növekedésével, a zöld görbék felé haladva, a cseppek egy,



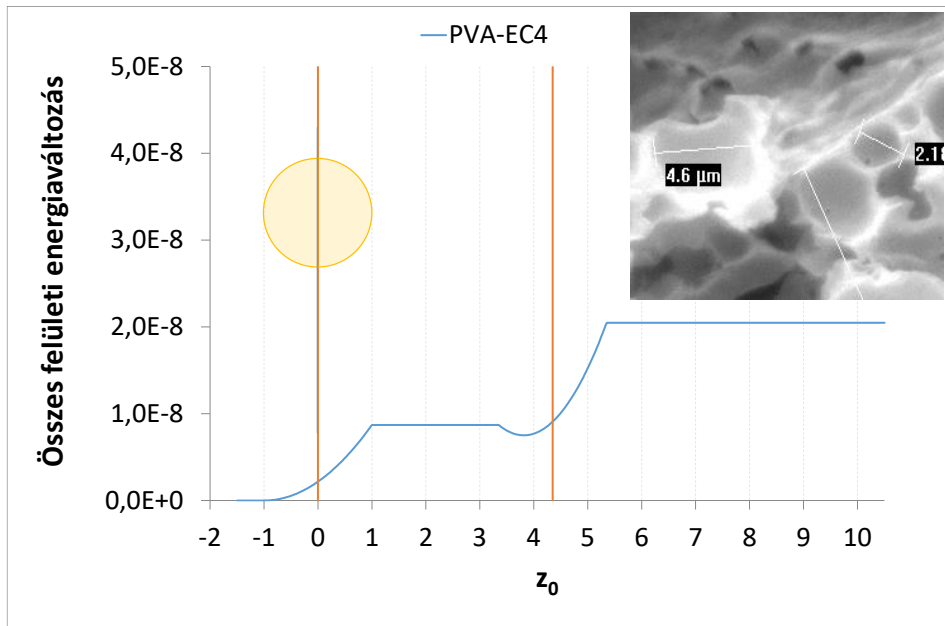
a korábbinál kisebb energiagátat kell átlépnie a polimerfilmbe jutásához, ezzel együtt nő ennek a valószínűsége. Az emulgeátor oldatba kerüléséhez azonban újabb az előbbinél valamivel nagyobb energiagátat kellene egy második lépcsőben legyőznie úgy, hogy mindeközben a polimerfilm szilárdulásával nő a közeg viszkozitása, ami csökkenti a csepp előre haladásának az esélyét. Tehát  $\sim 0,5$ -nél nagyobb  $d/R_o$  aránynál nem valószínű a héj átlyukadása.

Az 5.39. a ábrán látható PVA-EC4-es (4%-os etil-cellulóz oldattal készült) minta további elektronmikroszkópos képei közül kiválasztottam kettőt, amin egy 120  $\mu\text{m}$ -es eltört szemcse átlagosan 10  $\mu\text{m}$  vastagságú héjszerkezete tanulmányozható (5.45. ábra). A választott szemcsének mérete tehát 120  $\mu\text{m}$  és az ehhez –az összetétel alapján– számított héjvastagság 11  $\mu\text{m}$  lsd. 5.18. táblázat), amely jó egyezést mutat a SEM alapján meghatározottal. Ez arra utal, hogy a PVA-EC4-es minta esetében is elfogadható a megállapítás, hogy a szemcsék mag-héj szerkezetűek.



5.45. ábra PVA-EC4 minta egyik 120  $\mu\text{m}$ -es szemcséjének héjszerkezete

A SEM felvételen a filmvastagság a 120 mikrométeres szemcseméret esetében tehát 10  $\mu\text{m}$  körüli. A 4,6  $\mu\text{m}$  és a két átlagban 2,51  $\mu\text{m}$  átmérőjű lyukhoz a  $d/R_o$  érték 4,35-nek és 8-nak adódott. A képen látható 4,6  $\mu\text{m}$ -es lyuk esetében az olajcsepp benyomja a filmet, de nem kerül beljebb a filmben és nem is lyukasztja ki a túloldalra, azaz megragad az első energiagátnál (5.46. ábra).



5.46. ábra. A héjszerkezetben a 4,6 μm-es olajcsepphez tartozó felületenergia-görbe

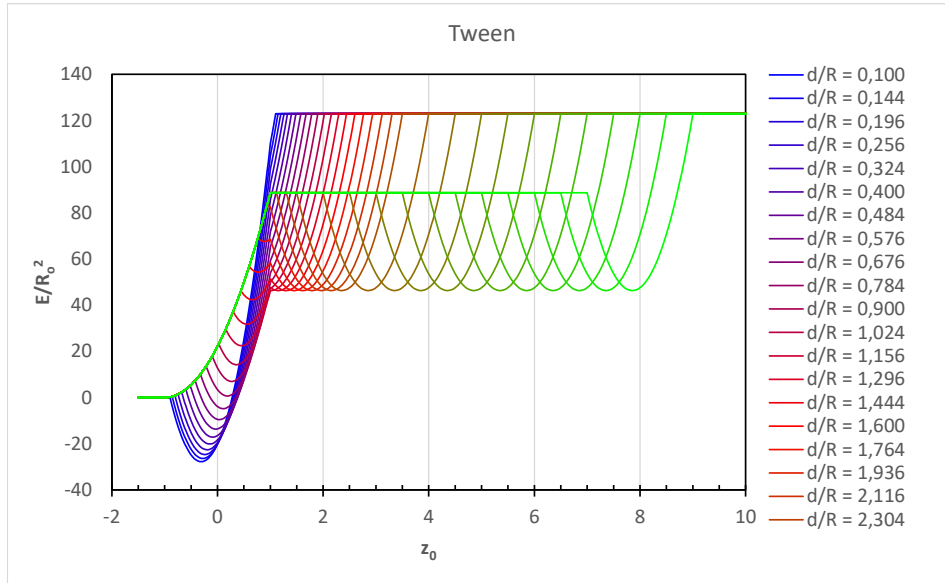
A felületenergia-görbén megfigyelhető, hogy a korábbiakhoz hasonló nagyságrendű energiát kell befektetni ahhoz, hogy az olajcsepp a filmbe bekerüljön. Ha már bekerül, el is juthat a filmen belül mélyebbre (vízszintes szakasz), de egy energiaminimum után újabb energiabefektetés kellene, hogy a filmen túlra kerüljön. Ebből adódóan a héj maga porózus, és kis valószínűséggel ugyan, de átlukadhat.

A porózus héj kialakulásához szükséges olajcsepp méret és az ahhoz tartozó felületi-energia görbékre egy másik példa szintén a Melléklet 8.6.2 pontjában található.

PVA emulgeátor alkalmazásakor is mag-héj szerkezetű szemcséket kapunk, talán kicsit nagyobb mértékben porózus héjjal, mint PMAA esetében, de még mindig kis valószínűséggel átlukadó héjjal.

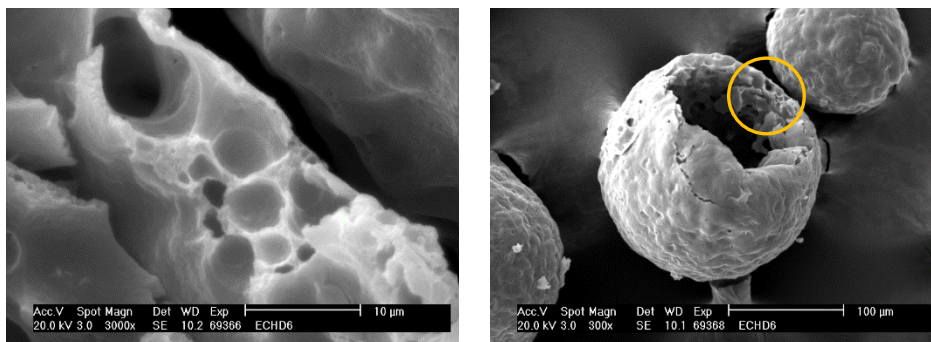
### 5.3.4.3 Tween 80 emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezése

A Tween 80 emulgeátornak a hatását az előzőkhöz hasonlóan különböző  $d/R_0$  arányoknál modelleztük, az ehhez számított felületenergia-görbék láthatók az 5.47. ábrán.

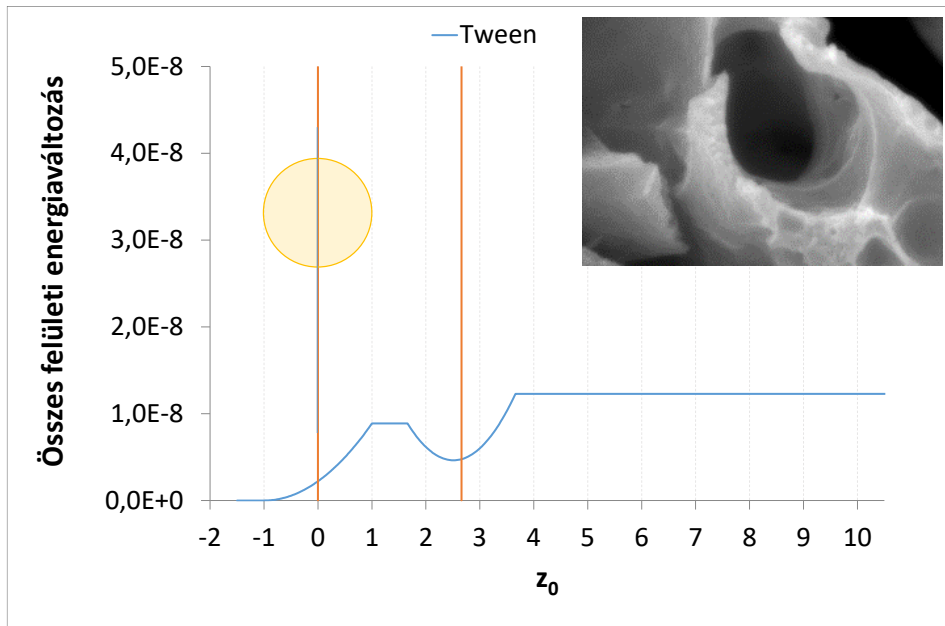


5.47. ábra. Felületenergia-görbesereg  $d/R_0$  függvényében ábrázolva HD-EC-Tween rendszerben

A legszembevetőbb különbség a korábban tárgyalt emulgeátorokkal kapott energia görbeseregekhez képest, hogy kis  $d/R_0$  aránynál a kialakuló minimum határozottabb, nagyobb negatív értéket vesz fel, míg nagy  $d/R_0$  aránynál a film és az emulgeátor határán kialakuló minimumból való kijutáshoz kisebb energia szükséges. Kisebb  $d/R_0$ -nál az olajcseppnek energia nyereséggel jár, ezért kedvezőbb, ha belép a filmbe. Nagyobb  $d/R_0$ -nál, ha az olajcsepp eljut a film és az emulgeátor oldat határára, ott a kialakuló energiaminimum miatt megragadhat a film legszélén vagy kis energiabefektetéssel kijuthat az emulgeátor oldatba. Az 5.48. ábrán Tween 80 emulgeátor mellett előállított, kb. 185  $\mu\text{m}$ -es szemcse és annak héjszerkezete látható. A SEM felvétel alapján a héjvastagság kb. 10  $\mu\text{m}$ -es.



5.48. ábra. Tween80-EC4 minta egyik 185  $\mu\text{m}$  méretű szemcséjének héjszerkezete



5.49. ábra. A héjszerkezetben a 7,5 µm-es olajcsepphez tartozó felületenergia-görbe

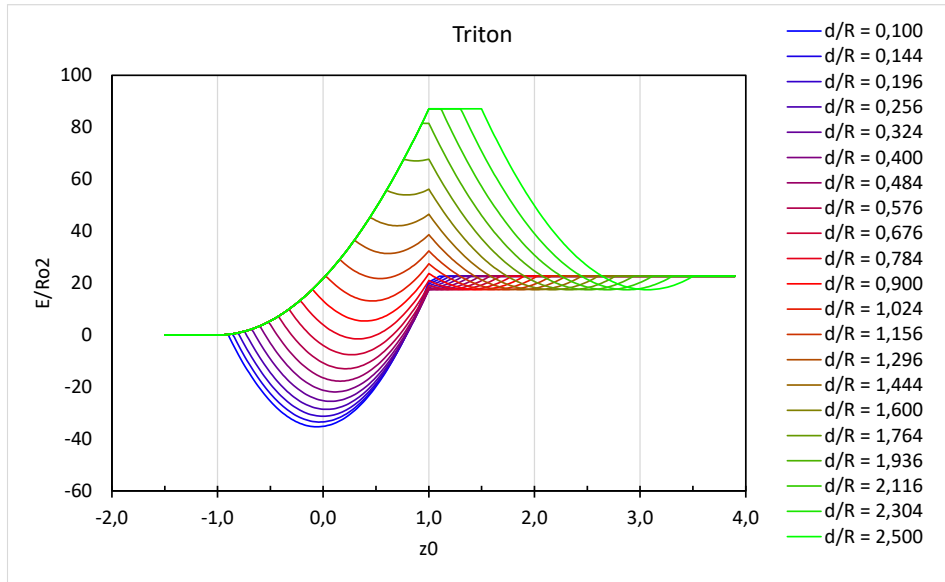
A héjban kb. 2–8 µm-es lyukak figyelhetők meg, így a számításokat három különböző – 7,5, 5 és 2,5 µm-es – olajcseppre egyenként elvégeztem. A számított felületenergia-görbék láthatóak az 5.49. ábrán és a Melléklet 8.6.3 pontjában.

Mind a három olajcsepp méret esetében az energiagörbék hasonló lefutást mutatnak. Egyetlen különbség, hogy az olajcsepp és a filmvastagság arányától függően hosszabb vagy rövidebb utat kell megtennie az olajcseppnek a polimerfilmben ahhoz, hogy a film emulgeátor felőli oldalához érjen és az ottani energiaminimumban megrekedjen. Mivel a 2,5 µm-es olajcseppnek hosszabb utat kellene megtennie a filmben, mint a nagyobb cseppeknek, ezért ez a kisebb csepp megragad a film belső fala felőli oldalán, míg a nagyobb cseppek könnyebben elérhetik a film másik oldalát. Sőt kitölthetik a film szinte teljes vastagságát, így a nagyobb cseppeket csak egy 1–2 mikronos film választja el attól, hogy a filmet átlukasztva kijussanak az emulgeátor oldalba.

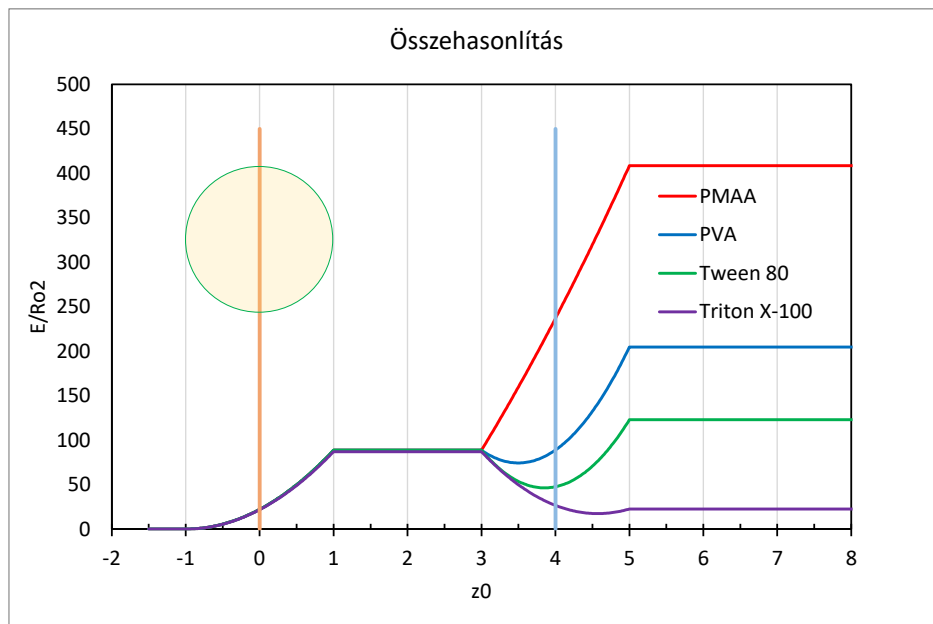
Az 5.17. táblázatban feltüntetett  $S_3$  szétterülési együttható alapján a Tween80-EC4 minta egyensúlyi morfológiája a makk szerkezet lenne, mégis mag-héj szerkezetű szemcséket kaptunk, bár nagyobb mértékben porózus héjjal, mint PVA esetében. Sőt az 5.39. b ábrán látható lyukacsos szerkezetű héj bizonyítja, hogy a modellezés eredményének megfelelően Tween 80 emulgeátor alkalmazásával kellően nagy olajcsepp esetében – a polimerfilm és az emulgeátor határfelületén lévő energiaminimumba kerülve– a vékony film teljesen át is lyukadhat.

### 5.3.4.4 Triton X-100 emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezése

Triton X-100 emulgeátor oldatra az 5.50. ábrán látható görbesereg nyerhető a modellezés eredményeképpen.



5.50. ábra. Felületenergia-görbesereg  $d/R_o$  függvényében ábrázolva

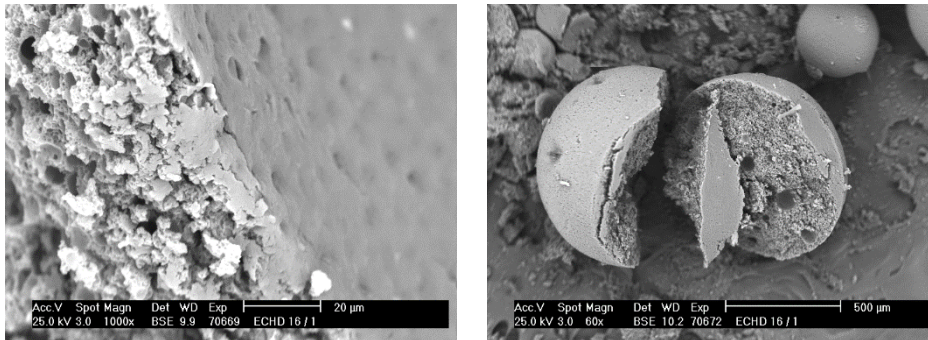


5.51. ábra. Az energiagörbék a 4 különböző emulgeátor használata esetén  $d/R_o = 4$ -nél, ami pl. 10  $\mu\text{m}$ -es héjvastagság mellett 5  $\mu\text{m}$ -es olajcsepp vizsgálatát jelenti

Az előző modellezési eredményekhez viszonyítva a kis  $d/R_o$  esetében számított energianyereség értéke még nagyobb, a filmbe jutás valószínűsége még jobban

megnövekszik. Ha a  $d/R_0$  1 közelében van, akkor a csepp a minimális energiagátat átlépve könnyedén áthaladhat. A nagyobb  $d/R_0$ -nál látszólag nagy energiagátat kell legyőznie a cseppeknek, de ha megnézzük a négy emulgeátorra kapott görbéket egymással összehasonlítva (5.51. ábra), akkor látható, hogy ez a gát azonos a többi emulgeátor oldatra számolt eredménnyel. Ugyanakkor az is szembeütő, hogy ha az olajcsepp bejut a filmbe, akkor energetikailag kedvezményezett, hogy az tovább haladjon az emulgeátor oldalába.

Ezen az ábrán azonban az is szembeötlő, hogy Triton X-100 alkalmazásakor a polimerfilmben az emulgeátor felőli oldalon olyan mértékben lecsökken a felületi energia, hogy a szemcséket sokkal lyukacsosabb szerkezetűnek várnánk. A SEM felvétel tanúsága szerint azonban bármennyire szivacsos szerkezetű a szemcse mégsem átluggatott, ellenben nagyon vékony a polimerfilm (5.51. ábra).

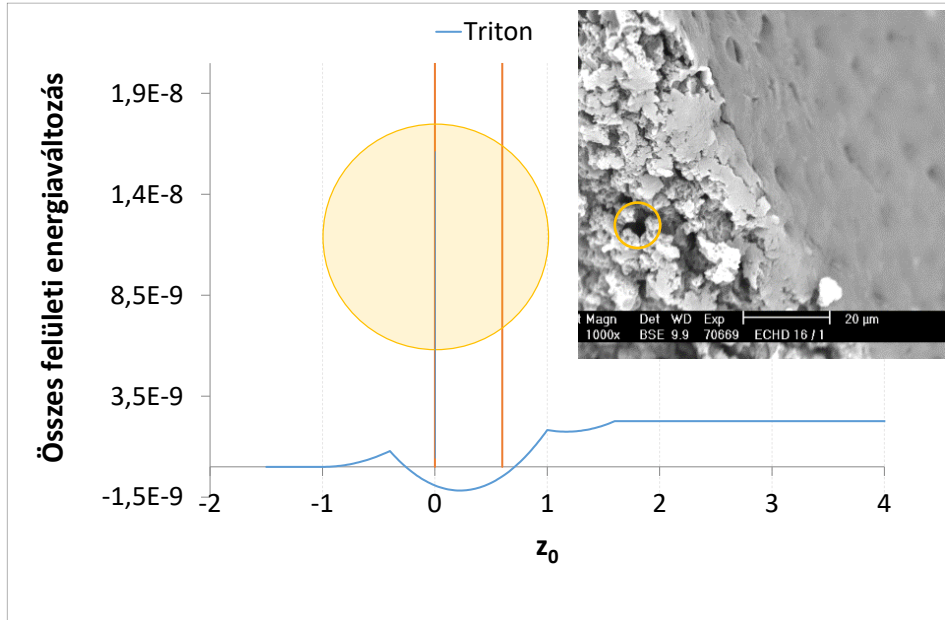


**5.52. ábra.** Triton-EC8 minta egyik 625 µm-es szemcséjének és a héjszerkezetének a SEM felvétele

A Triton X-100-as használatakor alkalmazható legkevésbé a Loxley-ék által kidolgozott modell a szemcsék morfológiáját tekintve. Egyrészt a Triton-polimerfilm és Triton-hexadékan közötti határfelületi feszültség értékek alapján azt várnánk, hogy a tapasztaltnál jóval kisebb átlagméretű szemcsék alakulnak ki. A szétterülési együtthatók értékei pedig azt sugallják, hogy nagyon nagy valószínűséggel makk szerkezetű szemcséknek kellene képződniük. Ezzel szemben a négy különböző emulgeátorral készült minta közül a legnagyobb átlagszemcseméretű és emellett szivacsos gömb morfológiájú részecskék a Triton X-100 használata esetén jöttek létre.

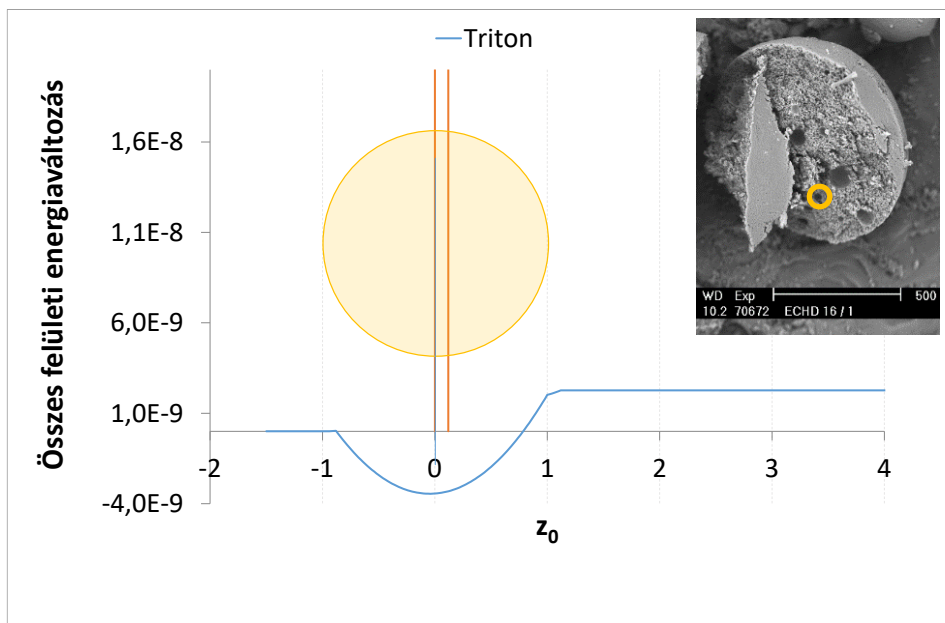
A SEM felvétel alapján a filmvastagság nem vastagabb, mint 1,5 µm. Az 5.52. ábrán látható több 5 µm-es csepp, míg a szemcse belsejében több nagyobb olajcsepp található, ez utóbbi akár 25 µm-es is lehet. Az 5 µm-es csepp egyértelműen bejuthat a 1,5 µm-es filmbe, mivel a többi emulgeátorhoz képest itt abszolút értékben nagyobb

energiaminimum alakulhat ki. Bár az olajcseppek a szemcse felszínét át is lyukaszthatják, ezen a szemcsén csak átütődéseket okoztak, mert a képlékeny héjnak volt lehetősége részlegesen visszaépülni (5.53. ábra).



5.53. ábra. A héjszerkezetben az 5 µm-es olajcsepphez tartozó felületienergia-görbe

A szemcse belsejében lévő 25 µm-es cseppre számolva még mélyebb energiagödör adódik, eszerint a legkedvezőbb elhelyezkedése a cseppnek a filmben van (5.54. ábra).

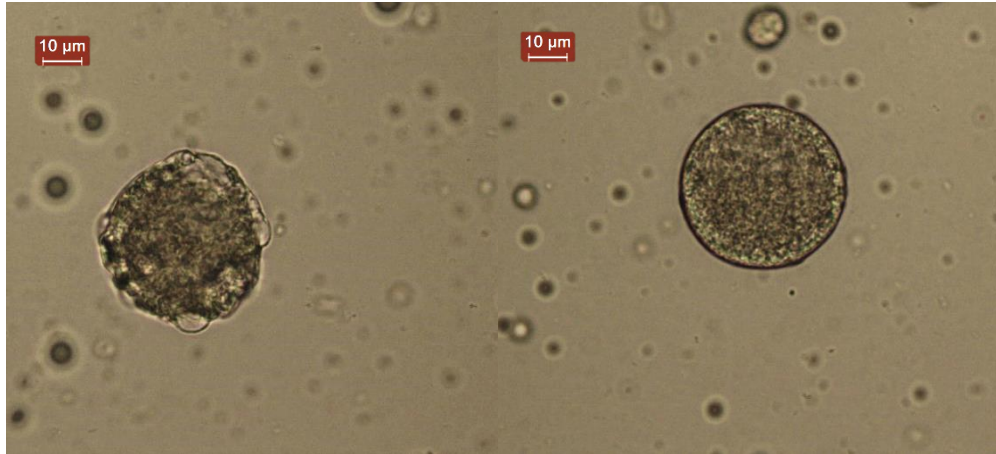


5.54. ábra. A héjszerkezetben a 25 µm-es olajcsepphez tartozó felületienergia-görbe

A vizsgált mintára a korábban meghatározott szétterülési együttható értékek ugyan az elméletben leírtaknak megfelelő előjelűek, azonban mind az  $S_1$ , mind az  $S_2$  értéke viszonylag kis negatív értéket mutat. Az 5.17. táblázatban szerepel egy-egy olyan Tween 80 és Triton X-100 emulgeátorok segítségével készített minta is, amelyekre  $S_1$  értéke kis pozitív érték, ami az elmélet szerint nem lehetséges. Hasonló tapasztalatról számoltak be Aveyard és munkatársai, akik hexadékan egyensúlyi szétterülési együtthatóját határozták meg  $C_nE_m$  ( $n=10,12,14$ ;  $m=5,7,9$ ) típusú emulgeátorokat, pl. polioxietilén(5) dodecilétert tartalmazó vizes fázison [135]. Az általuk kapott értékek is  $0\pm 0,3$  mN/m között változtak. Megállapításuk szerint ezek a kis, 0 körüli értékek azt jelentik, hogy a számítások alapján valójában nem lehet megjósolni, hogy elterül-e a hexadékan az emulgeátor oldaton vagy sem. Vizuálisan azonban megfigyelhető a hexadékan elterülése. Ez a megfigyelés is azt sugallja, hogy érdemes felvetni annak a lehetőségét, hogyha a kis negatív értékű  $S_1$  szétterülési együttható pozitív lenne, akkor az elmélet szerint az egyensúlyi morfológia elérése a cseppek szétválását eredményezhetné. A szétterülési együtthatók közel 0 körüli értéke a Loxley-féle közelítésben sem értelmezhető egyértelműen, ezért mind a morfológia, mind a porozitás tekintetében a becslésnek nagyobb a bizonytalansága, mint az  $S>0$  vagy  $S<0$  esetekben. Elképzelésem szerint az emulzió képződésekor nagyon kis méretű polimer oldat cseppek alakulnak ki, bennük még kisebb olajcseppekkel. Az idő előrehaladtával és az oldószer elpárolgásával együtt egyes olajcseppek elindulnak a polimerfilmen keresztül az emulgeátor oldat felé. Az olajcseppeknek a polimerben elfoglalt helyzete (mag-héj vagy makk) a csepp és a polimerfilm méretarányától függően időben különböző szakaszban lehet. Az oldhatóság csökkenésével és a növekvő viszkozitással a polimer-cseppek elkezdnek összecsapzódni, így hozva létre a rendkívül porózus polimer szemcséket a pórusokban megragadó olajcseppekkel.

A feltételezést alátámasztandó az 5.55. ábrán bemutatom a megszilárdulás előtti polimer cseppeket, melyek kisebb méretűek (kb.  $42\ \mu\text{m}$ ), mint amelyeneket a minta átlag szemcsemérete ( $D(4,3)=484,5\ \mu\text{m}$ ) indokol és emellett mátrix szerkezetű szemcsék kialakulását mutatja.





5.55. ábra Triton-EC8 mintának megfelelő összetételű emulzióban kialakuló polimer cseppek

A modellezés eredményeit összefoglalva elmondható, hogy az etil-cellulóz szemcsék szerkezete legbiztosabban abban az esetben jósolható meg, ha mag-héj szerkezetűek. A polimerhéj porozitása pedig megfelelő olaj-polimer térfogatarány alkalmazásával a minimálisra csökkenthető.

Mind az elméleti számítások, mind a kísérleti tapasztalatok alapján a PMAA-val készített kompozitok mutatták a legjobb tulajdonságokat a morfológia és a látens hőtárolási kapacitás tekintetében. A PMAA-val készült kapszulák mag-héj szerkezetűek, a héj nem mutat porozitást és ennek megfelelően az előállított kompozitból még magas (3:1) hexadekán/etil-cellulóz arány mellett sem tapasztalható hexadekán szivárgás.

#### **5.4 IFN-béta tartalmú PLGA és PEG\_PLGA nanorészecskék előállítása**

##### **5.4.1 Előállítási körülmények kidolgozása**

A hatóanyaggal végzendő kísérletekhez választott humán IFN-béta liofilizátum jelentős mennyiségű HSA is tartalmazott, amelynek a hatóanyag stabilitását növelő szerepe van. A liofilizátumban emellett adalékként használnak még mannitot, mint a liofilizálásnál alkalmazott stabilizátort. A mannit egy cukoralkohol, amely megvédi a fehérjéket az aggregációtól liofilizáláskor, ill. a denaturálódástól emulzifikálás során. Előnyös tulajdonságai miatt a modellfehérje kapszulázásakor is alkalmaztam a hatásainak tanulmányozása céljából. A modell kísérletekhez a nanorészecskékbe kapszulázandó BSA mennyiségét tehát az IFN-béta liofilizátumnak a hatóanyag és a HSA tartalmából számoltam. Korábbi tapasztalataink alapján megfelelő hatékonyságú fehérje

kapszulázáshoz a részecskék fehérjetartalma maximum 10 % (ideálisan  $\leq 5$  %) lehet az alkalmazott hordozó polimerre [136, 137, 138]. A gyakorlati alkalmazás szempontjából fontos szempont, hogy a nanorészecskék mérete 200 nm-nél nem lehet nagyobb annak érdekében, hogy a szerkezet makrofágjai által történő bekebelezést legyen esélyük elkerülni. A fehérjék mikrokapszulázása területén szerzett korábbi tapasztalatok alapján választottuk meg a polimer és az emulgeátor koncentrációt, és az olajos és vizes fázisok térfogatarányát. Az ultrahangos kezelés időtartamát igyekeztem minél rövidebbre venni, hogy a hatóanyagot a lehető legkisebb mértékű stresszhatásnak tegyem ki, így mérsékelve az interferon-béta ultrahang kezelésre bekövetkező esetleges aktivitás csökkenését.

### 5.4.2 A nanorészecskék előállítása BSA modell hatóanyagból

A modell kísérleteket a szokásosnál kisebb térfogatban és mennyiségekkel végeztem, ezért a szemcseméretet és a kapszulázási hatékonyságot befolyásoló, az irodalomból jól ismert paramétereket (pl. ultrahangozás körülményei) a kisebb térfogatokhoz kellett igazítani.

Az előkísérletek során 3 ml össztérfogat, (szerves:vizes fázis 1:2 térfogataránynál) 10 mg/ml polimer koncentráció és 30–90 s ultrahangozás mellett nem sikerült megfelelő stabilitású és cseppméret eloszlású emulziót előállítani, így a szuszpenziók nagyfokú polidiszperzitást mutattak.

A kapszulák átlag szemcseméretének optimalizálására és az egyenletesebb eloszlás elérése érdekében több kísérletet végeztem a korábbiakhoz képest fele akkora polimer koncentráció (5 mg/ml) mellett, különböző felületaktív anyag koncentrációt alkalmazva. A lehető legrövidebb idejű, de a leghatékonyabb és mégis kíméletes ultrahangozás eléréséhez fontos volt az optimális geometriai elrendezés alkalmazása. A folyadékoszlop magasságát úgy kell megválasztani, hogy az ultrahangozáskor használt üvegedény átmérője lehetőség szerint megegyezzen a folyadékoszlop magasságával, vagyis izometrikus legyen az elrendezés. Az ultrahangos szonda átmérőjét a folyadék össztérfogata szerint, a bemerülési mélységét a szerves-vizes fázis arányának megfelelően kell beállítani. A tapasztalatok alapján homogénebb végső szemcseeloszlás akkor érhető el, ha az ultrahangos szondát, a folyadékoszlopot tekintve – a szerves és vizes fázis térfogatarányát figyelembe véve – 1:2 aránynál kb. a folyadékoszlop közepén, míg 1:3 aránynál annak felső harmadánál helyezük el.

## Eredmények és értékelésük

Az optimális geometriai elrendezés és 1 perces ultrahang alkalmazásával 5 mg/ml PLGA\_3 és a PEG\_PLGA\_1 kapszulázó polimerek esetében a részecskék térfogati átlag szemcsemérete 103,0 nm, illetve 116,5 nm lett. Azonban a fehérje-kapszulázási hatékonyság jóval alacsonyabb volt a vártnál, mégpedig 45, illetve 28%.

A kapszulázási hatékonyság szoros összefüggést mutatott a szemcsemérettel, vagyis minél kisebb a szemcseméret, annál alacsonyabb a kapszulázási hatékonyság. A PVA-koncentráció növelésével, amely elősegíti a kisebb emulziós cseppek képződését, a részecskeméret határozottan csökkent, ezzel egyidejűleg a kapszulázási hatékonyság is csökkent. A polimer koncentrációja meghatározza a polimer oldat viszkozitását, és a nagyobb viszkozitás nagyobb részecskék képződését eredményezi ugyanazon ultrahangos kezelés alkalmazásával. Emellett a szerves fázis viszkozitásának növelése csökkenti a fehérje diffúzióját a külső vizes fázisba a polimerfilm megkeményedése előtt, mellyel nő a kapszulázási hatékonyság.

A kapszulázás hatékonyságát jelentősen befolyásoló paraméterek a felületaktív anyag és a polimer koncentrációja voltak. A kapszulázás hatékonyságának javítása érdekében több különböző paramétert módosítottam. Az előkísérletek azt mutatták, hogy a mannit nem befolyásolta a kapszulázási hatékonyságot.

Az irodalomból ismert tény, hogy a vízoldható hatóanyag kapszulázása során alkalmazott külső vizes fázis emulgeátor tartalma segítheti a hatóanyag kijutását a külső vizes fázisba, ezzel csökkentve a kapszulázási hatékonyságot. 5–10 mg/ml polimer koncentráció és különböző fehérjetartalom mellett, 1–3 % PVA koncentrációnál végzett kísérletekben a kapott minták kapszulázási hatékonysága kisebb PVA koncentráció mellett nagyobb lett, 51,4%-tól 87,3%-ig változott. Azonban nem mehetünk el amellett az egyidejűleg tapasztalható tény mellett, hogy a kisebb emulgeátor koncentráció nagyobb átlagos méretű szemcséket eredményezett. A térfogati átlag szemcseméret 114 nm-től 198 nm-ig változott.

A kapszulázási hatékonyság növekedésben lényeges szerepe volt a polimer koncentráció növelésének. Ez azonban a szerves fázis viszkozitásának növekedésével a szemcseméretet is megnövelte. Így változtatni kellett az ultrahangozás körülményein és a szerves és vizes fázis térfogatarányán is.

A kísérletekben a PLGA\_3 polimert 20 mg/ml koncentrációban alkalmaztam, a fehérjetartalom minden esetben 5 mg/ml volt. Három különböző emulzió össztérfogatnál

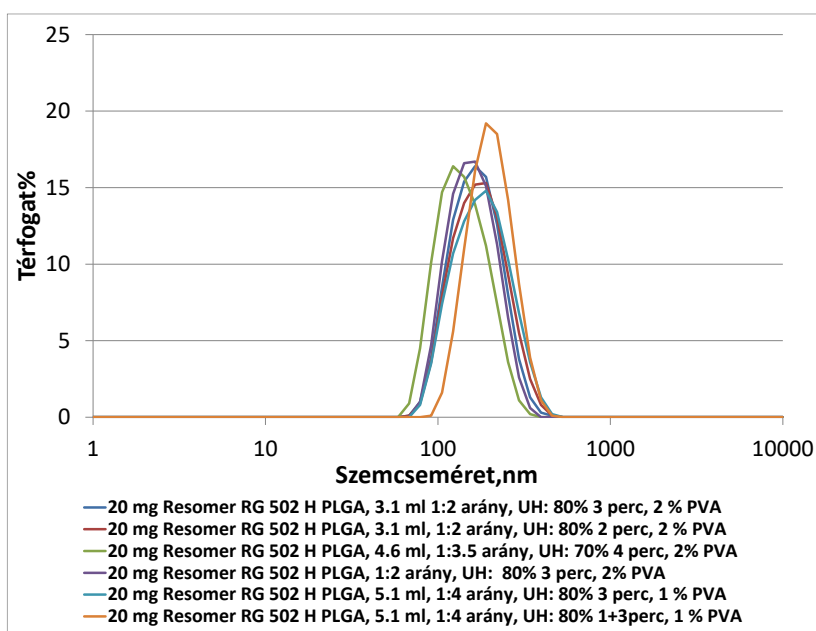
## Eredmények és értékelésük

(3,1; 4,6; 5,1 ml), háromféle térfogatarány mellett, különböző időtartamú ultrahangos kezelésekkel készültek a minták (5.19. táblázat).

Az 5.19. táblázatban szereplő minták szemcseméret eloszlásai az 5.56. ábrán láthatók. Az átlagos szemcseméret 145–207 nm-ig változott, a kapszulázási hatékonyság minden esetben magas lett, nagyobb, mint 87 %.

5.19. táblázat. 20 mg PLGA\_3 polimerrel készült minták adatai

PVA%	Térfogat-arány(o/w <sub>2</sub> )	UH ideje, perc	UH amplitúdója,%	D(4,3), nm	PdI	Kapszulázási hatékonyság, %
2	1:2	3	80%	165	0,056	89,3
2	1:3,5	4	70%	145	0,063	87,0
1	1:4	3	80%	189	0,093	89,8
1	1:4	4	80%	207	0,055	95,2
2	1:2	3	80%	174	0,074	87,7
2	1:2	2	80%	182	0,084	88,7



5.56. ábra. 20 mg PLGA\_3 (Resomer RG 502 H) polimer mennyiségnél elérhető szemcseméret eloszlás görbék

20 mg/ml koncentrációban alkalmazva a PLGA\_3 hordozópolimert a kapszulázási hatékonyság elérte a 85% -ot, míg a részecskeméret 174 nm-re nőtt. Ennél a magas

## Eredmények és értékelésük

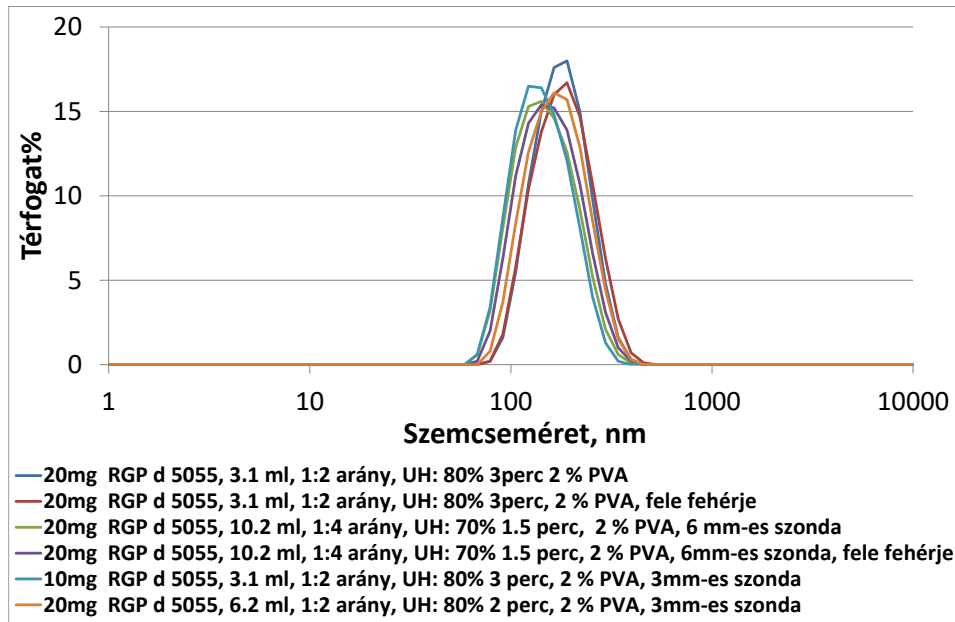
polimer koncentrációnál 3 perces ultrahangos kezelést kellett alkalmazni még a kis össztérfogat mellett is (3,1 ml).

A PEG\_PLGA\_1 polimer viszkozitása négyszer nagyobb, mint a PLGA\_3 polimeré. A viszkozitás felére csökkentése érdekében az előállítást kétszer nagyobb szerves fázis térfogattal végeztem, ami a 20 mg polimer tartalmat tekintve 10 mg/ml polimer koncentrációt jelentett. A szerves és a külső vizes fázis arányát pedig 1:4-re emeltem. A nagyobb emulzió végtérfogat (10,2 ml) lehetővé tette a 6 mm-es ultrahangos szonda alkalmazását, amelynek a használata 10 ml folyadék mennyiség esetén már ajánlott, így elegendőnek bizonyult a 1,5 perces ultrahangos kezelés. Az így kapott térfogati átlag szemcseméret 164 nm, a fehérje kapszulázási hatékonysága pedig 80,1 % volt (5.20. táblázat).

**5.20. táblázat. A PEG\_PLGA\_1-gyel végzett kísérletek paraméter adatai**

<b>Fehérje-tartalom, mg</b>	<b>Polimer mennyiség, mg</b>	<b>Térfogat -arány (o/w<sub>2</sub>)</b>	<b>UH idő, perc</b>	<b>UH amplitúdó</b>	<b>UH szonda mérete, mm</b>	<b>D(4,3), nm</b>	<b>PdI</b>	<b>Kapszulázási hatékonyság, %</b>
0,5	20	1:2	3	80%	3(2362)	183	0,05	79,3
0,25	20	1:2	3	80%	3(2252)	189	0,05	83,8
1	20	1:4	1,5	70%	6(1685)	154	0,07	58,8
0,5	20	1:4	1,5	70%	6(1706)	164	0,07	80,1
0,5	20	1:2	2	80%	3(1363)	175	0,06	78,1
0,5	10	1:2	3	80%	3(2236)	150	0,05	70,5

Az 5.20. táblázatban szereplő minták adataihoz tartozó szemcseméret eloszlásokat az 5.57. ábrán tüntettem fel.



5.57. ábra. 20 mg/ml PEG\_PLGA\_1 (RGP d 5055 pegilált PLGA) hordozó polimerrel készült minták szemcseméret eloszlás görbéi

Miután a legkisebb viszkozitású PLGA\_1 polimerrel és a PEG\_PLGA\_1 polimerrel sikerült megtalálni az optimális szemcseméret eloszláshoz és kapszulázási hatékonysághoz szükséges paraméterhalmazt, a tapasztalatok felhasználásával további három polimerrel állítottam elő nanoszemcséket.

A PLGA\_2 polimer viszkozitása kb. 2,5-szerese a PLGA\_3 polimerének, így elméletileg hasonló ultrahang-energiával elérhetjük a kívánt szemcseméretet, ha 1:2 térfogatarány helyett 1:6-os arányt választunk. Ezt az elképzelést kísérletileg is alátámasztottam, 168 nm átlag szemcseméret mellett 87,3 % kapszulázási hatékonyságot értem el (5.21. táblázat). A PLGA\_4 polimer viszkozitása másfélszerese a PLGA\_3 polimerének. Így 1:2 térfogatarány helyett 1:3 térfogatarány mellett kivitelezve a kísérletet ismét sikerült alacsony, 162 nm átlag szemcseméretű kapszulákat készíteni, amelyekben a kapszulázási hatékonyság eléri a 87%-ot.

A PEG\_PLGA\_2 polimer viszkozitása alig tér el a PLGA\_2 polimerétől. Az össztérfogatban és a térfogatarányban történő változtatás és a kicsivel több bevitt ultrahang-energia eredményeképpen 174 nm átlag szemcseméretű kapszulákat kaphatunk 69%-os kapszulázási hatékonysággal. Ez utóbbi újabb példa arra, hogy pegilált PLGA használatával kisebb kapszulázási hatékonyság érhető el, mint nem pegilált PLGA-val.

5.21. táblázat. Hat különböző hordozó polimerrel készült nanoszemcsék előállítási paraméterei

Polimer	Viszkozitás, dL/g	Össztérfogat, ml	Térfogat arány (o/w <sub>2</sub> )	Bemerülési mélység, cm	Ultraszhang fej átmérője mm	Amplitúdó, %	Idő, s	Kapsz. hatékonyság, %	Térfogati átlag szemcseméret, nm
				<b>Ultraszhang</b>					
PLGA_3	0,16–0,24	3,1	1:2	0,75	3	80	180	86,6	173
PEG_PLGA_2	0,67	10,2	1:4	1,25	6	70	90	78,0	157
PLGA_2	0,45–0,6	7,1	1:6	0,6	6	70	107	87,3	168
PLGA_4	0,32	4,1	1:3	0,6	3	80	180	86,9	162
PEG_PLGA-1	0,93	7,1	1:6	0,6	6	70	136	69,0	174
PLGA_1	0,14–0,22	10,2	1:4	1,25	6	70	90		144

A PLGA\_1 polimer bomlási sebessége lassabb a tejsav monomer nagyobb arányban való jelenléte miatt, ezért a nyújtott hatóanyagleadás szempontjából a PLGA polimereket tekintve ez a polimer lehet a legígéretesebb. A viszkozitása 0,14–0,22 dL/g, ami nagyon hasonló a PLGA\_3 polimeréhez. Így annak érdekében, hogy az ultrahangozás idejét 3 percről 1,5 percre lehessen csökkenteni, a térfogatarányt 1:4-re növeltem, a 3 mm-es fej helyett pedig a 6 mm-eset használtam. Az átlag szemcseméret 173 nm-ről 144 nm-re csökkent.

Az 5.21. táblázatnak megfelelően a modell hatóanyag, BSA 0,5 mg-jából foszfát puffer izotóniás sóoldatában 10 mg mannit hozzáadásával 0,1 ml oldatot készítettem. A hat különböző kapszulázó polimert feloldottam 1 ml diklór-metánban, és ehhez hozzáadtam az 5 mg/ml-es fehérjeoldatot. Ultrahangos diszpergálással (20–35 s) 30 %-os ultrahang amplitúdónál víz/olaj emulziót készítettem, majd ehhez 2–8 ml 2% (V/W) PVA oldatot adva, 70, ill. 80%-os ultrahang amplitúdónál, különböző ultrahangozási időt (1–4 perc) alkalmazva, létrehoztam a 3,1–10,2 ml össztérfogatú víz/olaj/víz összetett emulziót. Kb. 1 óra alatt elpárologtattam a rendszerből a diklór-metánt 500–800 fordulat/perces mágneses keverés mellett, ezáltal létrejöttek a BSA modell hatóanyag tartalmú kompozit nanorészecskék.

A kísérletek eredményeképpen tehát rendelkezésünkre áll az az optimálisnak tekinthető paraméter együttes, amellyel a kívánt szemcseméret eloszlású és IFN-béta

tartalmú gyógyszerhordozó nanorészecske előállítható. A kísérletek bizonyították, hogy ha már kezünkben van adott polimerre egy paraméterhalmaz, a hordozó polimer megváltoztatásakor a polimerek viszkozitás aránya határozza meg a megválasztandó szerves és vizes fázis térfogatarányát. 20 mg/ml polimerkoncentráció esetén ezzel elérhető a térfogati átlag szerinti 160 nm-es szemcseméret, ami biztosítja a magas kapszulázási hatékonyságot is.

### 5.4.3 IFN-béta tartalmú nanorészecskék előállítása

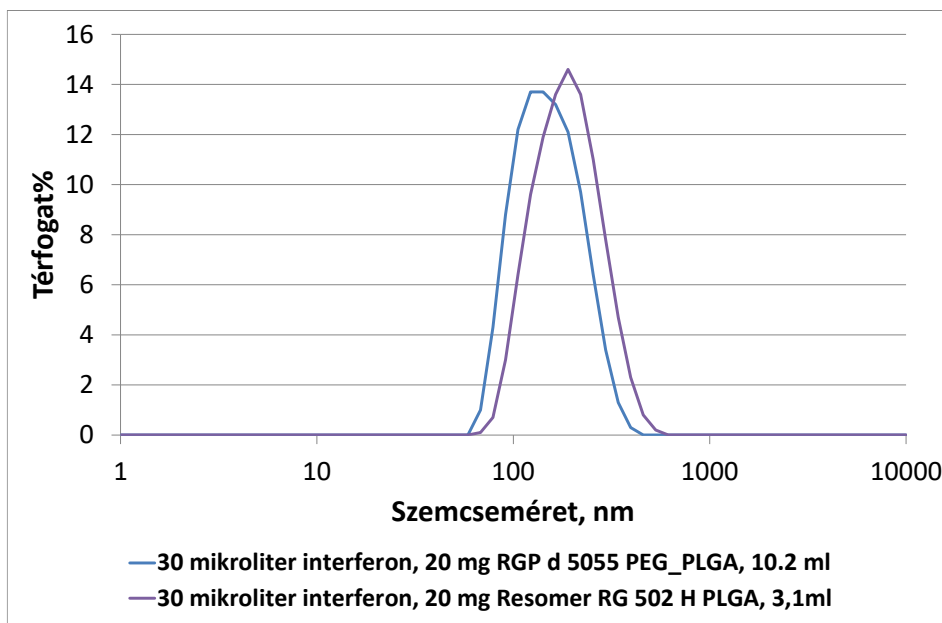
A modellanyaggal optimalizált paraméterek mellett elkészítettük az IFN-béta tartalmú mintákat az alábbi receptek szerint.

Receptek:

	<b>1–3. minta</b>	<b>4. minta</b>
Belső vizes fázis	0,01; 0,03; 0,05 ml IFN-béta oldat 0,1 ml-re hígítva PBS oldattal	0,03 ml IFN-béta oldat 0,2 ml-re hígítva PBS oldattal
Szerves fázis	1 ml DCM, 20 mg PLGA_3	2 ml DCM, 20 mg PEG_PLGA_1
Külső vizes fázis	2 ml 2% PVA	8 ml 2% PVA
1. emulzió létrehozása	20 s, 30% 3 mm-es ultrahangos szondával	35 s, 30% 3 mm-es ultrahangos szondával
2. emulzió létrehozása	180 s, 80% 3 mm-es ultrahangos szondával	90 s, 70% 6 m-es ultrahangos szondával
Oldószer elpárologtatás:	5 ml-es főzőpohárban 800 ford./perc keverési sebesség	25 ml-es főzőpohárban 500 ford./perc keverési sebesség

A négy mintából a szemcseméret eloszlását tekintve a két legkisebb PDI-vel (PDI= 0,09) rendelkező nanorészecske szuszpenziót kiválasztottam és meghatároztam mind az összfehérje, mind az IFN-béta kapszulázási hatékonyságát (5.58. ábra).





5.58. ábra Az 5.22. táblázatban szereplő IFN-béta tartalmú minták szemcseméret eloszlás görbéi

A 0,25 mg bemért fehérje mennyiséggel készült minták szemcseméret adatai és kapszulázási hatékonyság értékei az 5.22. táblázatban található. A modellanyaggal végzett kísérletekben tapasztalt szemcsemérethez és kapszulázási hatékonysághoz hasonló értékek az IFN-béta hatóanyagra is elérhetőnek bizonyultak.

5.22. Az IFN-béta tartalmú minták szemcseméret adatai és kapszulázási hatékonyság értékei

Minta-szám	Poli-mer	Bemért fehérje mennyiség, mg	Fehérje kapszulázási hatékonyság, %	IFN-béta kapszulázási hatékonyság, %	Átlag szemcse-méret, nm	PdI
2.	PLGA_3	0,25	85,1±0,18	90,2±4,4	198±4,4	0,09±0,02
3.	PEG_PLGA_1	0,25	80,7±0,68	91±1,4	162±4,4	0,09±0,01

A minták kapszulázási hatékonyságát IFN-bétára nézve ELISA teszttel határoztuk meg. Az IFN-béta kapszulázási hatékonysága valamelyest magasabb lett, mint az összes fehérje kapszulázási hatékonysága, igaz, hogy a PLGA esetén a méretnövekedés nem elhanyagolható.

## Eredmények és értékelésük

A fenti előkísérletek után PLGA\_1 polimerből is előállítottam az IFN-béta tartalmú nanorészecskéket, majd az ebből készült nanoszemcsék egy részét amino-PEG-gel pegiláltam. Az így készült mintákat szemcseméret analízissel, zeta potenciál adatokkal és a kapszulázási hatékonyságukkal jellemeztem. Az 5.23. táblázatban foglaltam össze a humán IFN-bétát tartalmazó polimerszemcse szuszpenziók jellemző adatait. Az átlag szemcseméretük 142,9 nm-től 179,3 nm-ig változtak, 0,1 körüli PDI értékkel. A pegilálással az átlag szemcseméret 36 nm-rel nőtt.

5.23. táblázat: Az in vitro vizsgálatokhoz előállított szemcsék adatai

Minta neve	IFN kapszulázási hatékonyság (%)	Átlag szemcseméret (nm)	PdI	Zeta Potential (mV)
PLGA_1-humán IFN-béta	98	142,9	0,093	-18,1
PEG_PLGA_1-humán IFN-béta	94	167,6	0,106	-12,3
Amino-PEG-gel borított PLGA_1-humán IFN-béta	-	179,3	0,091	-17,7

A nanoszemcse szuszpenziók stabilitását általában a zeta-potenciáljuk meghatározásával jellemezzük, bár egyértelműen értékelhető eredménnyel csak a töltéssel stabilizált részecskék esetében szolgál. Egy szuszpenzió akkor tekinthető elektrosztatikusan stabilizáltnak, ha a zeta-potenciál abszolút értéke nagyobb, mint 25 mV. A PLGA\_1\_IFN és a PEG\_PLGA\_1\_IFN nanorészecskék zeta potenciál értékei (-17,7 mV és -18,8 mV) nem feltétlenül utalnak stabil szuszpenziókra. Ennek ellenére a szemcsék aggregációját nem tapasztaltam, ami elsősorban a PVA-nak a szemcsék felületére való adszorpciójából adódó sztérikus taszításnak köszönhető. Huang és munkatársai [139] megállapították, hogy a zeta potenciál értéke függ a hordozópolimer koncentrációjától. Az általuk mért PLGA (50:50, (Mw): 30,000–60,000) 10 mg/ml-es oldatára kapott -15 mV-os érték összhangban van az általunk mért értékekkel, ugyancsak 10 mg/ml polimer koncentráció alkalmazása mellett.

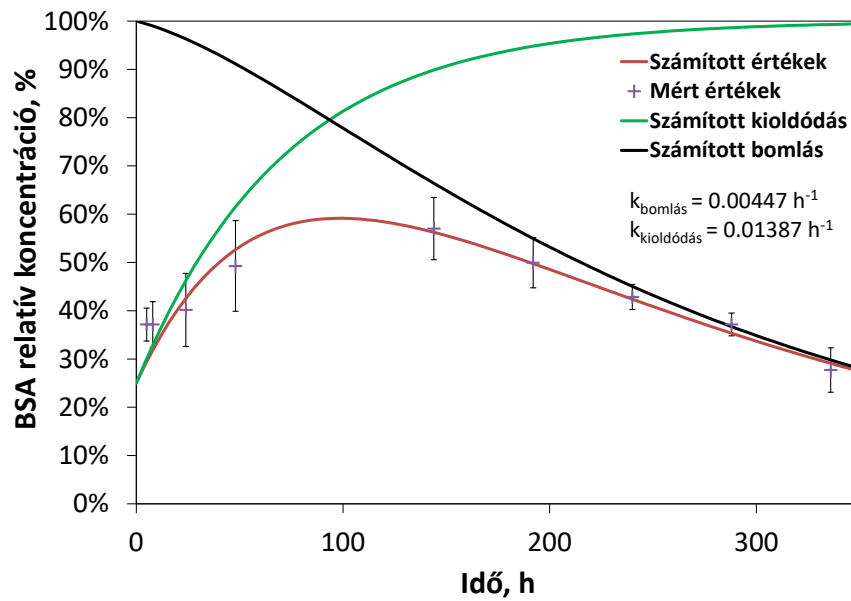
#### **5.4.3.1 Humán IFN-béta tartalmú nanorészecskék in vitro kinetikájának vizsgálata humán vérplazmában**

A szemcseméret-eloszlás és kapszulázási hatékonyság eredmények alapján a BSA megfelelő modellanyagnak bizonyult az IFN-béta hatóanyag viselkedésének tanulmányozására PLGA hordozópolimerek esetében. BSA-val modelleztem a fehérje kioldódását is PLGA\_1 és PEG\_PLGA\_1 polimerszemcsékből. BSA esetében a leadási kísérleteket PBS-ben végeztem azért, hogy a fehérjetartalmat meghatározhassam micro BCA módszerrel. A kioldódást 2 héten keresztül követtem.

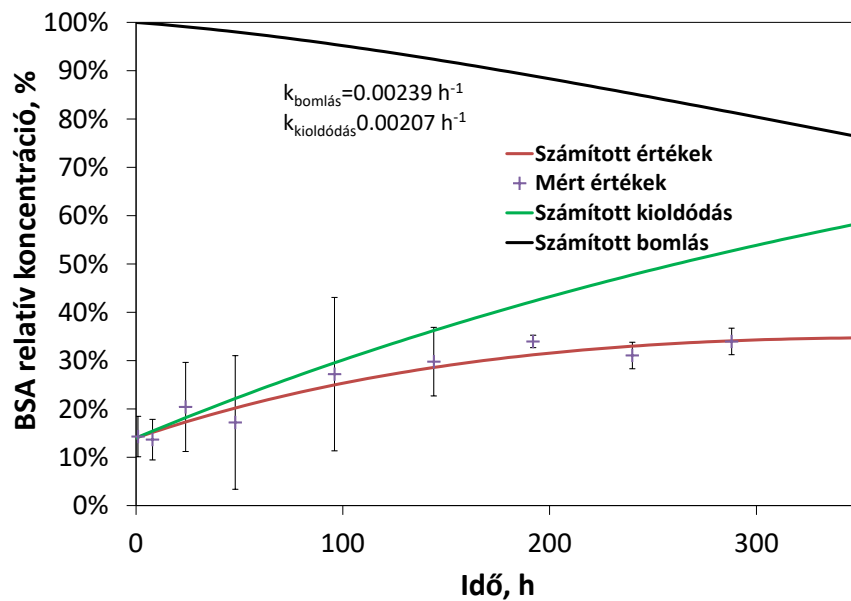
A BSA tartalmú minták előállításakor 10 mg PLGA\_1, ill. PEG\_PLGA\_1 polimerbe 60 µg BSA-t kapszuláztam. A fehérjetartalmat a felülúszóból határoztam meg és a mintavétel után nem pótoltam vissza közeget. A mérés eredményeként nem a klasszikus telítési görbelefutást kaptam. A mért fehérjetartalom elér egy maximumot, majd csökkenő tendenciát mutat. Ez a tapasztalat azt jelzi, hogy a kioldódás mellett párhuzamosan a fehérje bomlása is lejátszódik. Így a kapott mérési adatokat – mind a szemcsék fehérje leadására, mind a fehérje bomlási folyamatára nézve – elsőrendű kinetikát feltételezve ModelMaker szoftver segítségével illesztettem.

Az 5.59. ábrán látható egyrészt a PLGA\_1 szemcsék fehérje leadására számított telítési görbe (zöld görbe) másrészt a fehérje bomlására kapott kinetikai görbe (fekete görbe). Ezeket a folyamatokat együttesen figyelembe véve kapjuk a mérési pontjainkat modellező görbét. A BSA bomlása közel kétszer olyan gyors PLGA\_1 polimer esetében ( $0,00447 \text{ h}^{-1}$ ), mint PEG\_PLGA\_1 polimernél ( $0,00239 \text{ h}^{-1}$ ). Előbbi 96 h-nál és 57%-nál maximumot mutat, míg utóbbinál egy plató alakul ki 27%-nál (5.60. ábra).

A lassú fehérje bomlásra magyarázatul szolgálhat Fu és szerzőtársainak munkája [140], amelyben mérésekkel igazolták, hogy a PLGA polimer bomlásával savas mikroklíma alakul ki a kapszulázott hatóanyag környezetében. Fehérjék esetében ez lassú és kismértékű bomláshoz vezethet. A BSA adott kísérleti körülmények között stabil, bomlásához a PLGA kismértékű degradációja teremti meg a feltételeket.

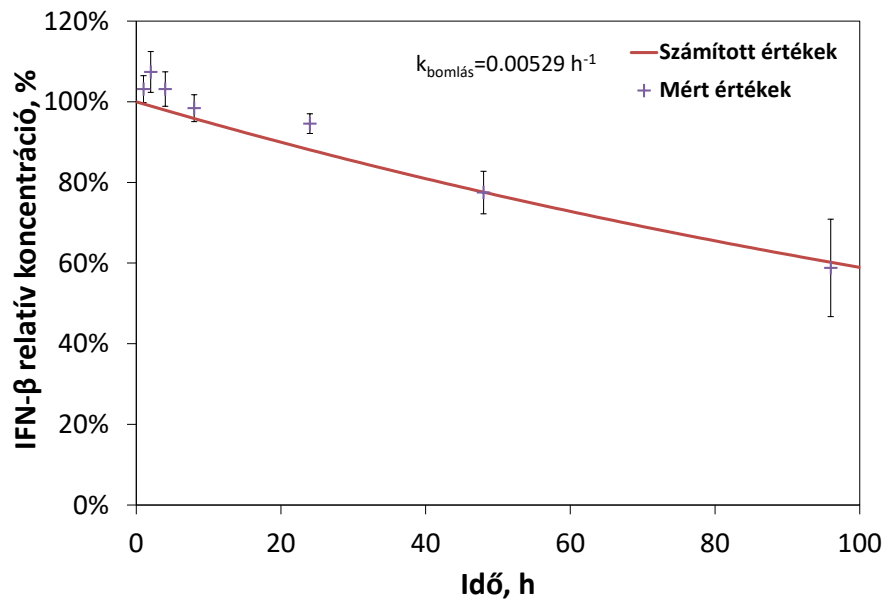


5.59. ábra. BSA modellanyag koncentrációjának változása PLGA\_1 polimerből való kioldódásakor



5.60. ábra. BSA modellanyag koncentrációjának változása PEG\_PLGA\_1 polimerből való kioldódásakor

Mivel a BSA modellanyagra kimérhető volt a bomlási folyamat sebességi állandója a fehérje kioldódási vizsgálatok során, ezért méréseket végeztem az IFN- $\beta$  bomlási sebességi együtthatójának meghatározására is. 52,3  $\mu\text{g/ml}$ -es IFN- $\beta$  oldat koncentrációjának változását mértem 37 °C-on PBS pufferben 4 napon át. Az IFN- $\beta$  bomlási folyamata 0,00529  $\text{h}^{-1}$  elsőrendű sebességi együtthatóval jellemezhető (5.61. ábra).

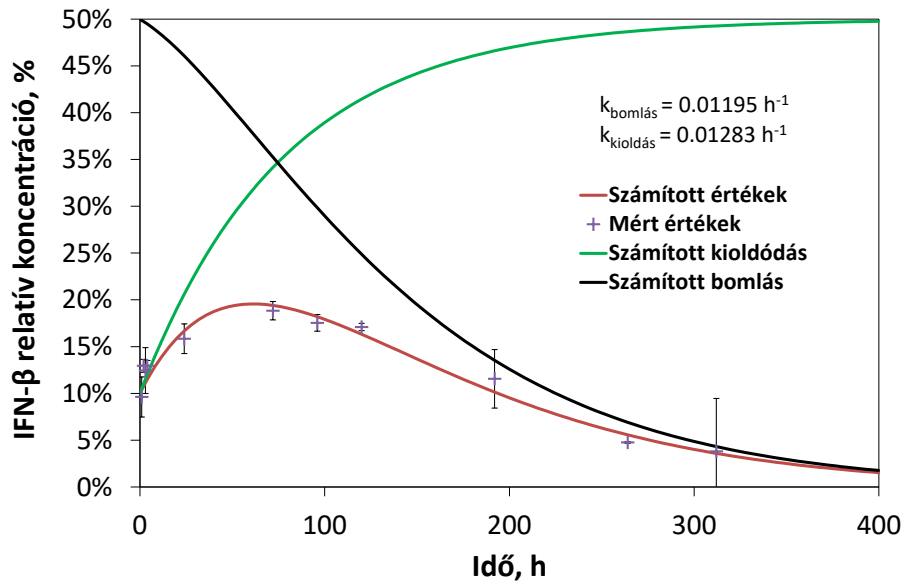


5.61. ábra. IFN-béta oldat koncentrációjának időbeli változása PBS-ben

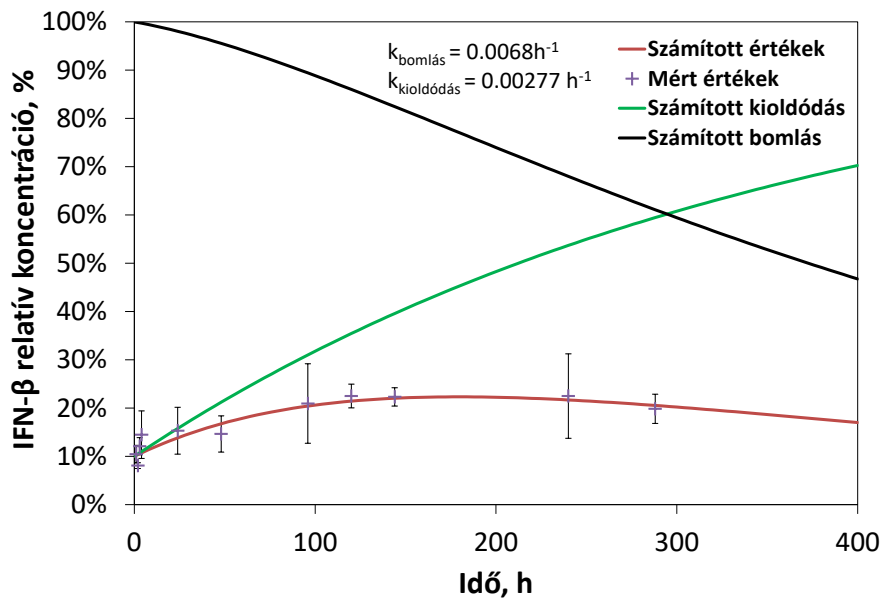
Az IFN-béta tartalmú kompozitrészecskék kioldódási vizsgálatához PLGA\_1, ill. PEG\_PLGA\_1 jelű polimerekkel készült mintákat használtam. A fehérjetartalmat a felülúszóból határoztam meg és a mintavétel után visszapótoltam a kivett közeget. A BSA-hoz hasonlóan a mért adatokból a szemcsék fehérje leadására és bomlására egyaránt elsőrendű kinetikai görbét illesztve határoztam meg a kioldódási és bomlási együtthatókat mindkét polimerre. A két tag kombinációjával a mérési adatok megfelelő pontossággal írhatók le (5.62. ábra, 5.63. ábra).

Az 5.62. ábra látható egyrészt a PLGA\_1-IFN-béta szemcsék IFN-béta leadására számított telítési görbe (zöld görbe) másrészt a bomlására kapott kinetikai görbe (fekete görbe). Ezeknek a folyamatoknak a kombinációjából kapjuk a mérési pontjainkat modellező piros görbét.

Az IFN-béta bomlása kétszer olyan gyors PLGA\_1 polimer esetében ( $0,01195\text{h}^{-1}$ ), mint PEG\_PLGA\_1 polimernél ( $0,0068\text{h}^{-1}$ ). Előbbi 60 h-nál és 19%-nál maximumot mutat, míg utóbbinál egy plató alakul ki kb. 22%-nál (5.63. ábra.).



5.62. ábra. IFN-béta koncentrációjának változása PLGA\_1 polimerből való kioldódásakor



5.63. ábra. Az IFN-béta koncentrációjának változása PEG\_PLGA\_1 polimerből való kioldódása során

Az 5.24. táblázatban összefoglaltam mind a BSA modell hatóanyagra, mind az IFN-bétára kapott bomlási és kioldódási sebességi együtthatókat. Mivel a várakozások szerint a kioldódásnak főként a polimer minőségétől kell függenie, ugyanakkor a bomlás sebessége a hatóanyag sajátja, érdemes ezeket külön tárgyalni. A kioldódás sebessége mindkét vizsgált hatóanyagra a PLGA\_1 polimer esetében 5–6-szor olyan nagy, mint a

PEG\_PLGA\_1-nél, ugyanakkor független a hatóanyagtól. A bomlási folyamatok sebességei mindkét polimernél az IFN-bétára kb. kétszer nagyobbak, mint a BSA-ra. Szembetűnő azonban, hogy a bomlás látszólag nem független a polimertől. A PLGA\_1 polimer esetében kétszer olyan gyors az IFN-béta bomlása, mint a PEG\_PLGA\_1-ben. Mivel a bomlási folyamatban valószínű, hogy a polimerek nem vesznek részt, így az eltérések oka inkább a polimerek okozta eltérő közegben keresendő. Bár minden mérést PBS pufferben végeztem, mint korábban említettem az irodalomból ismert, hogy a PLGA mikrokörnyezetében a pH savas irányba eltolódik, ami befolyásolhatja a hatóanyagok bomlását [141].

**5.24. táblázat. A hatóanyag bomlási és kioldódási sebességi együtthatói PLGA\_1 és PEG\_PLGA\_1 polimerekre**

Hatóanyag	Bomlási sebességi együtthatók, h <sup>-1</sup>	Bomlási sebességi együtthatók, h <sup>-1</sup>		Kioldási sebességi együtthatók, h <sup>-1</sup>	
		PLGA_1	PEG_PLGA_1	PLGA_1	PEG_PLGA_1
IFN	0,00529	0,01195	0,0068	0,01283	0,00277
BSA		0,00447	0,00239	0,01387	0,00207

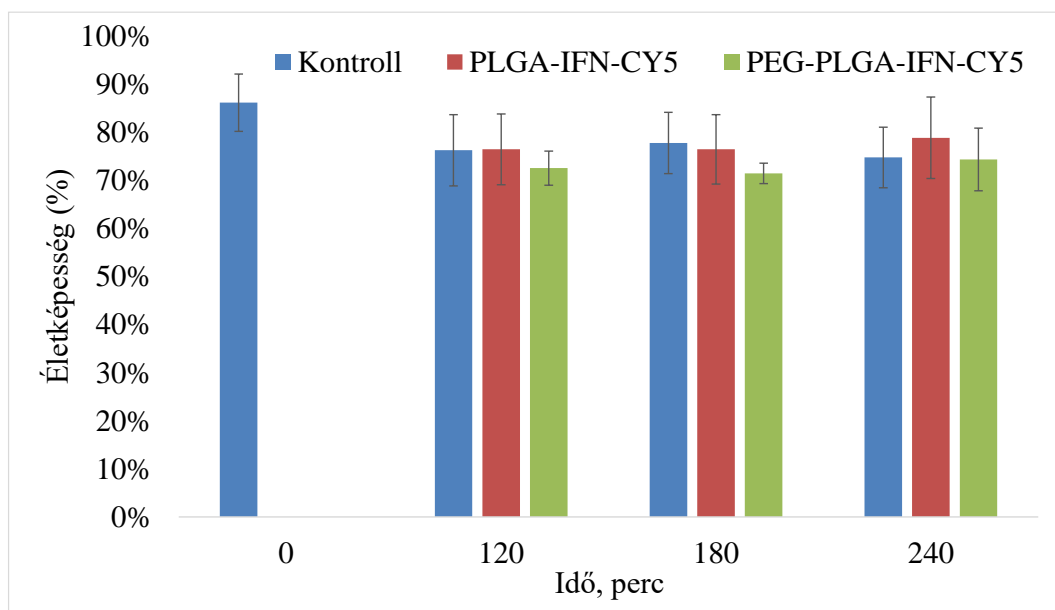
#### **5.4.3.2 IFN-béta tartalmú PLGA és PEG\_PLGA nanorészecskék in vitro és vivo toxicitásának vizsgálata**

Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a különböző célokkal készült funkcionizált nanorészecskék toxicitás vizsgálatai. Az évtizedek óta biodegradábilisként és biokompatibilisként ismert polimerekkel készült szemcséket is vizsgálják, hogy a hatóanyag változtat-e a toxicitását vagy a morfológia milyen mértékben befolyásolja a sejtfelvételkor azok életképességét. A szemcséknek szánt funkciók alapján különböző izolált sejteken végeznek in vitro toxicitás vizsgálatokat. Emellett a részecskék szemcseméret eloszlása alapján a felhalmozódásuk legvalószínűbb helye szerint választanak sejt kultúrákat a további toxicitás vizsgálatokhoz.

Nekünk is lehetőségünk nyílt citotoxicitás vizsgálatokat végeztetni a Természettudományi Központ Enzimológiai Intézetében Dr. Monostory Katalin csoportjával PLGA\_1 és PEG\_PLGA\_1 polimerekkel készült IFN-béta tartalmú szemcsékre. A mintáink szemcseméret eloszlásai alapján átlag 150 nm-es szemcsék

leginkább a májban, a lépben dúsulhatnak fel, ennek megfelelően a részecskék toxicitását májsejteken tanulmányoztuk.

A 4 órás primer hepatocitákon végzett citotoxicitás vizsgálatban mind a PLGA\_1-IFN-béta, mind a PEG\_PLGA\_1-IFN-béta nanorészecskék esetén a kontroll (kezeletlen) sejtekhez hasonló viabilitási értékeket tapasztaltunk, azaz a nanorészecskék a hepatocitákra a vizsgálat ideje alatt nem gyakoroltak toxikus hatást (5.64. ábra).



5.64. ábra. Viabilitás adatok

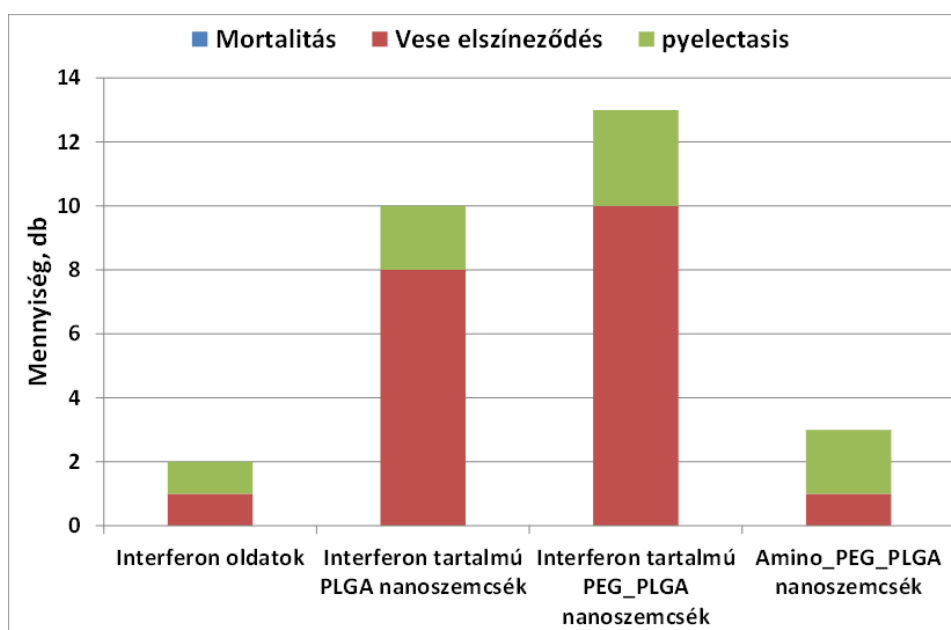
Az in vitro mérésekben csak kiválasztott sejteken tanulmányozhatjuk az esetleges toxikus hatásokat, ezért in vivo vizsgálatokat is végeztettünk patkányokon. A patkány-IFN-béta tartalmú PLGA\_1 és PEG\_PLGA\_1 részecskékkel két független toxicitási kísérletsorozat is lezajlott. Az 5.25. táblázatban szereplő különféle minták hatását tanulmányozhattuk.

A vizsgálatot végzők egyes egyedeknél vese elszíneződést, ill. vesetágulatot (úgynevezett pyelectasist) tapasztaltak. A halvány vese kifejezést arra az állapotra használják, amikor a vese nem a normális piros színű, hanem az elégtelen vérellátás miatt vérszegény/vértelen. Az oszlopdigramokon az esetszámokat tüntettem fel. Látható, hogy mortalitás nem történt, vese elszíneződést tapasztaltunk nagyobb számban (5.65. ábra). Először 11 állat volt érintett az összesen 30 nanoszemcsével kezelt állat közül. Másodszor 13 állat volt érintett az összesen 30 nanoszemcsével kezelt állat közül. Mindkét esetben hasonló mértékben tapasztaltunk toxicitást.



**5.25. táblázat Az in vivo toxicitási vizsgálatokban szereplő minták**

1. kísérletsorozat	2. kísérletsorozat
Abszolút kontroll (kezeletlen)	Abszolút kontroll (kezeletlen)
PI 1: patkány IFN-béta (Ra-IFN) oldattal kezelt	PI 8: patkány IFN-béta oldattal kezelt
PI 2: PLGA_1-BSA vak (a hatóanyagot nem tartalmazó) nanorészecskékkel kezelt	PI 9: humán IFN-béta oldattal kezelt
PI 3: PEG_PLGA_1-BSA vak (a hatóanyagot nem tartalmazó) nanorészecskékkel kezelt	PI 10: nanoprecipitációval előállított PEG_PLGA_1 vak (a hatóanyagot nem tartalmazó) nanorészecskékkel kezelt
PI 4: utólag PEG-gel borított PLGA_1-BSA vak (a hatóanyagot nem tartalmazó) nanorészecskékkel kezelt	PI 11: PLGA_1-humán IFN nanorészecskékkel kezelt
PI 5: PLGA_1-BSA-Ra-IFN nanorészecskékkel kezelt	PI 12: PEG_PLGA_1- humán IFN nanorészecskékkel kezelt
PI 6: PEG_PLGA_1-BSA-Ra-IFN nanorészecskékkel kezelt	PI 13: PLGA_1- Ra- IFN nanorészecskékkel kezelt
PI 7: utólag PEG-gel borított PLGA_1-BSA-Ra-IFN nanorészecskékkel kezelt (Amino_PEG_PLGA)	PI 14: PEG_PLGA_1- Ra- IFN nanorészecskékkel kezelt

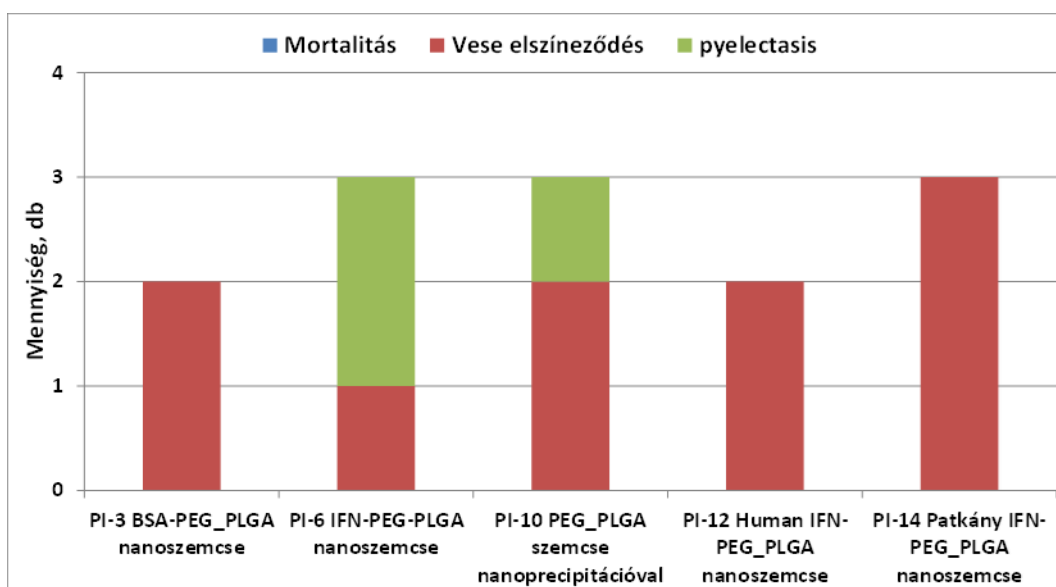


**5.65. Toxicitás adatok a két független in vivo toxicitási vizsgálatra**

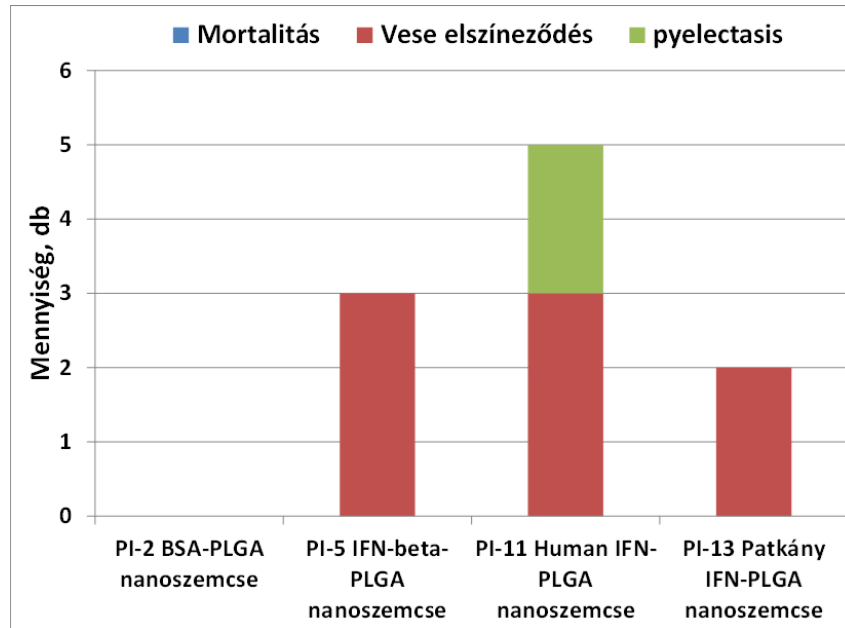
## Eredmények és értékelésük

A két kísérletsorozatban összesen 14 mintát vizsgáltunk. Az alkalmazott minták jellemzői az 5.25. táblázatban vannak feltüntetve. Mindegyik minta egy-egy 5 fős patkánycsoporton volt tesztelve. Mindkét kísérletsorozatban volt kezeletlen mintacsoport és IFN-béta oldattal kezelt. A hatóanyagra vak nanoszemcsét tartalmazó minták egyrészt nanoprecipitációval, másrészt emulziós módszerrel készültek. Az első sorozatban a hatóanyagra nézve vak minták tartalmaztak BSA-t, a második sorozatban már nem. Az első sorozatban vizsgáltuk az utólagosan pegilált PLGA\_1 polimerrel készült szemcséket is, a másodikban már csak PLGA\_1-gyel és a PEG\_PLGA\_1-gyel előállított szemcsék hatását tanulmányoztuk.

Toxicitás jeleit egyedül a Ra\_IFN oldattal és a BSA tartalmú Amino\_PEG\_PLGA-val készült mintákkal kezelt állatoknál nem tapasztaltunk. A BSA tartalmú PEG\_PLGA\_1 nanorészecske esetében 5 állatból 1-nél tapasztaltunk vese elszíneződést és pyelectasist. A kétféle veseelváltozás közül nagyobb számban fordult elő vese elszíneződés, mint vesetágulat. Humán IFN-béta tartalmú részecskénél egyaránt észlelhetünk vese elszíneződést és 3 alkalommal vesetágulatot, ill. humán IFN-béta oldat hatására is 1 állatnál mindkét elváltozás megfigyelhető volt. A patkány IFN-béta tartalmú nanoszemcsék mind BSA-val, mind BSA nélkül toxikusnak bizonyultak, nagyrészt vese elszíneződést tapasztaltunk (5.66. és 5.67. ábra).



5.66. ábra. Toxicitás adatok a két független in vivo toxicitási vizsgálatból PEG\_PLGA nanorészecskékre



5.67. ábra. Toxicitás adatok a két független in vivo toxicitási vizsgálatból a PLGA nanoszemcsékre

A sejtek nanorészecske felvételére és a citotoxicitás vizsgálatára elsősorban in vitro körülmények között számos tanulmány található. Általánosan elmondható, hogy a nanorészecskék eloszlása a különböző szervekben egyrészt a méretüktől, másrészt a felületi töltésüktől függ, ami szoros összefüggésben van egy könnyen mérhető jellemzőjükkel, a szuszpenziójuk zeta potenciál értékével [142].

A nanorészecskék méretének felső korlátja a megcélzott sejtreceptoroktól függően változhat, de egy 200 nm-nél nagyobb átmérőjű nanorészecske aktiválja a retikuloendoteliális rendszert, ami gyorsan eltávolítja a véráramból, így felhalmozódnak a májban és a lépben [143, 144]. Moghimi és munkatársai javasoltak egy 150 nm maximális mérethatárt a gömb alakú nanorészecskékre a lépben történő szűrés elkerülése érdekében [145]. A pegilált PLGA nanorészecskék hosszabb ideig képesek keringeni a vérben, mint a nem pegilált PLGA szemcsék, de ez még nem akadályozza meg a nanorészecskék megkötését a májban, csak módosítani tudja a sejtek eloszlását. Valójában a pegilált PLGA szemcsék csökkent Kupffer sejtfelvétele és a mérete (150-200 nm), amely lehetővé teszi az átjutást a fenestrált sinusoidalis endotheliumon. A nanorészecske ezután elérheti a Disse teret, majd kölcsönhatásba léphet a hepatocitákkal. A hepatociták kulcsszerepet játszanak a test méregtelenítésében. Az irodalom szerint a felületaktív anyag nélkül, nanoprecipitációval készült, üres PLGA nanorészecskéket (szemcsemérete:  $178 \pm 70$  nm, zeta potenciál:  $-31,5 \pm 1,4$ ) a patkány májsejtek in vitro

94,2%-ban veszik fel 1h inkubáció után [146]. A pegilált arany nanorészecskéket vizsgálva a fenestrált glomeruláris endotélia átlagos pórusátmérője 80–100 nm-nek adódott [147].

A vesékben a peritubuláris kapillárisoknál a részecskék felhalmozódása nem mutat egyértelmű összefüggést a mérettel, míg a vesetestekben ugyanez erősen méretfüggő. A legkisebb részecskéket kimutatták a peritubuláris kapillárisokban, míg a vesesejtekben gyakorlatilag nem voltak jelen. A 10 nm-es nanorészecskék nagyobb mértékű felhalmozódását figyelték meg a vesékben, mivel a nagyobb nanorészecskék a lépben és májban dúsulnak fel, ezért kevesebb nagyméretű részecske jut el eleve a veséig [147].

Kimutatták, hogy  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék hosszú tartózkodása a vesében a sejtek zsugorodását okozhatja a vesesejtek túlzott nanorészecske-felvétele miatt [148]. Finom részecskékkel kezelt nőstény egerekben a vese tubulus megtelt fehérje folyadékokkal és a vesék hisztopatológiai tanulmányozása során a vese glomerulusának súlyos duzzanatát figyelték meg [149].

Feltételezhetjük tehát, hogy az átlag 150–170 nm-es részecskéink 200 nm-nél nagyobb frakciója a májban, a 150 nm-es részecskék egyrésze a lépben dúsulhat fel. A májban, a lépben nem történt hisztopatológiai elváltozás, ezért elképzelhető, hogy a nagyobb részecskék, agglomerátumok bekerülve a véráramba a jelenlévő, a diszpergálódásukat segíteni tudó fehérjék hatására kisebb szemcsékre estek szét és nem szűrte ki azokat a máj és a lép. Másrészt az is elképzelhető, hogy az ekkora szemcsék ténylegesen nem okoznak elváltozásokat. A vesékben azonban tapasztaltunk toxicitásra utaló jeleket, amelyek az előbbieket szerint adódhatnak a nagyobb mennyiségben felhalmozódott 50 nm alatti szemcsék jelenlétéből. A Liao és munkatársai [150] ennek megfelelő tapasztalatról akkor számoltak be, amikor intravénásan adagoltak MeO-PEG\_PLGA-PEG-OMe triblock kopolimer nanorészecskéket és azok szemcsemérete  $\leq 50$  nm volt. A PEG lánc bomlástermékei lehetnek toxikusak, így a nanorészecskék szemcseméretéből adódó esetleges toxikus hatást felerősíthetik a PEG lánc bomlástermékei.

## 6 Összefoglalás

A dolgozatban gyógyszerhatóanyagok és fázisváltó hőtároló anyagok mikrokapszulázását tanulmányoztam az alkalmazási területük bővítése és a hatékonyságuk növelése céljából.

Kidolgoztam egy a klasszikustól eltérő eljárást, amellyel kiterjesztettem a szférikus agglomeráció módszerét a vízoldható hatóanyagok területére. Víz–etanol–etil-acetát oldószerhármias kétfázisú oldószerkeletében kitozán és nátrium-polisztirol-szulfonát polielektrolitok kémiai és antiszolvens precipitációját kombinálva új típusú nanoszerkezetű mikrorészecskéket hoztam létre humán szérum albumin kapszulázására. Klasszikus és IR technikával meghatároztam azt a szűk összetétel-tartományt az alkalmazott oldószerhármásra nézve, ahol a kezdeti kétfázisú elegyből kiindulva etanol hozzáadásával szférikus agglomerátumok nyerhetők. A mikrorészecskék morfológiáját befolyásoló paraméterek hatásának vizsgálatával egy valószínűsíthető mechanizmust vázoltam fel a szemcsék kialakulására.

A timsó kristályokból egyszerű szférikus agglomerációval és emulziós oldószer-diffúziós módszerrel is sikerült szférikus agglomerátumokat előállítani, amelyek jellemzésére SEM felvételek, vezetőképességi, TG és DSC mérések történtek. Rávilágítottam arra, hogy a két különböző mechanizmussal képződött agglomerátumoknak különböző mind az átlagos kristályvíz-, mind a timsótartalmuk. A DSC mérések alapján megállapítható volt, hogy a mért kristályvíz mennyiséggel, ill. a Röntgen diffrakciós mérések alapján meghatározott termék összetétellel összhangban lévő timsó-tartalommal arányos a termékek vízvesztése és megolvadása során mérhető hő mennyisége.

Tanulmányoztam egyszerű emulziós oldószer-elpárologtatásos módszerrel készült n-hexadekán fázisváltó hőtároló anyagot tartalmazó poli(metil-metakrilát) és etil-cellulóz mikrorészecskék morfológiáját. A szétterülési együtthatók meghatározásával megállapítottam, hogy poli(vinil-alkohol) és Tween 80 emulgeátorok alkalmazásakor az n-hexadekán-tartalmú polimer kapszulák – az előállításuk időtartama alatt – nem érik el az egyensúlyi morfológiájukat, így alakulhatnak ki a mag-héj szerkezetű szemcsék. Az alkalmazott paraffin-polimer tömegarányoknál az eltérő felületfeszültség-viszonyok miatt a szemcsék héjszerkezete különböző mértékben porózus. Modelleztem a felületi

## Összefoglalás

feszültség szerepét a különböző porozitású héjak kialakulásában, és összevettem a képződött szemcsék pásztázó elektron mikroszkóppal tapasztalható morfológiájával.

Az interferon-béta hatóanyag mikrokapszulázását emulziós oldószer-elpárologtatásos módszerrel hajtottam végre. Az utóbbi módszerrel sikeresen állítottam elő (poli(tejsav-glikolsav)-humán interferon-béta és (poli(tejsav-glikolsav)-polietilén-glikol-humán interferon-béta nanorészecskéket 80–90% kapszulázási hatékonysággal és térfogati átlag szerinti 160–170 nm-es szemcsemérettel. Kioldási vizsgálatokkal igazoltam, hogy az előállított nanorészecskék minimum egy héten át képesek nyújtott interferon-béta hatóanyagleadást biztosítani humán vérplazmában in vitro körülmények között.

## 7 Irodalomjegyzék

1. Zhou, W.; Gao, P.; Shao, L.; Caruntu, D.; Yu, M.; Chen, J.; O'Connor, C. J. Drug-loaded, magnetic, hollow silica nanocomposites for nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2005) **1**(3), 233-237. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.06.005>
2. Torchilin, V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2009) **71**(3), 431-444. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.026>
3. Jain, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* (2000) **21**(23), 2475-2490. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00115-0)
4. Li, M. G.; Zhang, Y.; Xu, Y. H.; Zhang, D. Effect of different amounts of surfactant on characteristics of nanoencapsulated phase-change materials. *Polymer Bulletin* (2011), **67** (3), 541-552. <https://doi.org/10.1007/s00289-011-0492-1>
5. Rogers, T. L.; Wallick, D. Reviewing the use of ethylcellulose, methylcellulose and hypromellose in microencapsulation. Part 1: materials used to formulate microcapsules. *Drug Dev Ind Pharm* (2012), **38** (2), 129-157. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.590990>
6. Zhang, G. H.; Bon, S. A. F.; Zhao, C. Y. Synthesis, characterization and thermal properties of novel nanoencapsulated phase change materials for thermal energy storage. *Solar Energy* (2012), **86** (5), 1149-1154. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2012.01.003>
7. Lin, Y.; Zhu, C.; Alva, G.; Fang, G. Microencapsulation and thermal properties of myristic acid with ethyl cellulose shell for thermal energy storage. *Applied Energy* (2018), **231**, 494-501. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.09.154>
8. Mirabedini, S. M.; Dutil, I.; Farnood, R. R. Preparation and characterization of ethyl cellulose-based core-shell microcapsules containing plant oils. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2012), **394**, 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.11.028>
9. Badulescu, R.; Vivod, V.; Jausovec, D.; Voncina, B. Grafting of ethylcellulose microcapsules onto cotton fibers. *Carbohydrate Polymers* (2008), **71** (1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.028>
10. Phadungphatthanakoon, S.; Poompradub, S.; Wanichwecharungruang, S. P. Increasing the thermal storage capacity of a phase change material by encapsulation: preparation and application in natural rubber. *ACS Appl Mater Interfaces* (2011), **3** (9), 3691-3696. <https://doi.org/10.1021/am200870e>
11. Bah, M. G.; Bilal, H. M.; Wang, J. Fabrication and application of complex microcapsules: a review. *Soft Matter* (2020) **16**(3), 570-590. <https://doi.org/10.1039/C9SM01634A>
12. Nihant, N.; Grandfils, C.; Jérôme, R.; Teyssié, P. Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide) IV. Effect of the processing parameters on coacervation and encapsulation. *Journal of Controlled Release* (1995) **35**(2), 117-125. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00026-5](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00026-5)
13. Wu, X. S. Synthesis, Characterization, Biodegradation, and Drug Delivery Application of Biodegradable Lactic/Glycolic Acid Polymers: Part III. Drug Delivery Application. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* (2004) **32**(4), 575-591. <https://doi.org/10.1081/BIO-200039635>
14. Smith MC (2009) Microencapsulated phase change materials for thermal energy storage. PhD thesis. The University of Auckland. <http://researchspace.auckland.ac.nz/handle/2292/5603>. Accessed 17 July 2013
15. Arpagaus, C., Schwartzbach, H., 2008. Scale-up from the Büchi Mini Spray Dryer B-290 to the Niro MOBILE MINOR, best@buchi Information Bulletin, Number 52/2008
16. Wang, B.; Zhang, W.; Zhang, W.; Mujumdar, A. S.; Huang, L. Progress in Drying Technology for Nanomaterials. *Drying Technology* (2005) **23**(1-2), 7-32. <https://doi.org/10.1081/DRT-200047900>
17. Men Y, Corradin G, Thomasin C, Merkle HP, Gander B. Immunopotential of a synthetic antigen by incorporation into biodegradable microspheres. *Proceedings of the International Symposium on Control. Rel. Bioact. Mater.*, (1994), **21**,. 50-51.

18. Takada, S.; Uda, Y.; Toguchi, H.; Ogawa, Y. Application of a spray drying technique in the production of TRH-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers. *PDA J Pharm Sci Technol* (1995) **49**(4), 180-184.
19. Lengyel, M.; Kállai-Szabó, N.; Antal, V.; Laki, A. J.; Antal, I. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica* (2019) **87**(3). <https://doi.org/10.3390/scipharm87030020>
20. Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* (2001) **70**(1), 1-20. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4)
21. Kumar, B.; Jalodia, K.; Kumar, P.; Gautam, H. K. Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (2017) **4**, 260-268. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.019>
22. Javadzadeh, Y., Vazifehasl, Z., Dizaj, S. M., & Mokhtarpour, M. (2015). Spherical Crystallization of Drugs. InTech. doi: 10.5772/59627
23. Kawashima, Y.; Okumura, M.; Takenaka, H. Spherical crystallization: direct spherical agglomeration of salicylic Acid crystals during crystallization. *Science* (1982) **216**(4550), 1127-1128. <https://doi.org/10.1126/science.216.4550.1127>
24. Cui, F.; Yang, M.; Jiang, Y.; Cun, D.; Lin, W.; Fan, Y.; Kawashima, Y. Design of sustained-release nitrendipine microspheres having solid dispersion structure by quasi-emulsion solvent diffusion method. *Journal of Controlled Release* (2003) **91**(3), 375-384. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00275-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00275-X)
25. Tapas, A. R.; Kawtikwar, P. S.; Sakarkar, D. M. Spherically agglomerated solid dispersions of valsartan to improve solubility, dissolution rate and micromeritic properties. *International Journal of Drug Delivery* (2010) **2**, 304-313. <https://doi.org/10.5138/IJDD.2010.0975.0215>.
26. Wang, B.; Chen, G.-x.; Mao, Z.; Zhang, Y.; Yu, D. D.; Gao, C. Preparation and cellular uptake of PLGA particles loaded with lamivudine. *Chinese Science Bulletin* (2012) **57**, 3985-3993. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5419-1>
27. Pitt, K.; Peña, R.; Tew, J. D.; Pal, K.; Smith, R.; Nagy, Z. K.; Litster, J. D. Particle design via spherical agglomeration: A critical review of controlling parameters, rate processes and modelling. *Powder Technology* (2018) **326**, 327-343. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.11.052>
28. Nocent, M.; Bertocchi, L.; Espitalier, F.; Baron, M.; Couarraze, G. Definition of a Solvent System for Spherical Crystallization of Salbutamol Sulfate by Quasi-Emulsion Solvent Diffusion (QESD) Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2001) **90**(10), 1620-1627. <https://doi.org/10.1002/jps.1112>
29. Thati, J.; Rasmuson, Å. C. Particle engineering of benzoic acid by spherical agglomeration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2012) **45**(5), 657-667. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.006>
30. Sano, A.; Kuriki, T.; Kawashima, Y.; Takeuchi, H.; Hino, T.; Niwa, T. Particle Design of Tolbutamide by the Spherical Crystallization Technique. III. : Micromeritic Properties and Dissolution Rate of Tolbutamide Spherical Agglomerates Prepared by the Quasi-Emulsion Solvent Diffusion Method and the Solvent Change Method. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* (1990) **38**(3), 733-739. <https://doi.org/10.1248/cpb.38.733>
31. Ribardiere, A.; Tchoreloff, P.; Couarraze, G.; Puisieux, F. Modification of ketoprofen bead structure produced by the spherical crystallization technique with a two-solvent system. *International Journal of Pharmaceutics* (1996) **144**, 195-207. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04746-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04746-1)
32. Amaro-González, D.; Biscans, B. Spherical agglomeration during crystallization of an active pharmaceutical ingredient. *Powder Technology* (2002) **128**(2), 188-194. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(02\)00196-1](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(02)00196-1)
33. Chow, A. H. L.; Leung, M. W. M. A study of the Mechanisms of Wet Spherical Agglomeration of Pharmaceutical Powders. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (1996) **22**(4), 357-371. <https://doi.org/10.3109/03639049609042001>
34. G. G. Bemer, Agglomeration in Suspension: A study of mechanisms and kinetics. Delft University of Technology, Delft (1979).



35. Ikegami, K.; Kawashima, Y.; Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Isshiki, N.; Momose, D.-i.; Ouchi, K. Primary crystal growth during spherical agglomeration in liquid: Designing an ideal dry powder inhalation system. *Powder Technology* (2002) **126**(266-274). [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(02\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(02)00064-5)
36. Kawashima, Y.; Imai, M.; Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Kamiya, K.; Hino, T. Improved flowability and compactibility of spherically agglomerated crystals of ascorbic acid for direct tableting designed by spherical crystallization process. *Powder Technology* (2003) **130**(1), 283-289. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(02)00206-1)
37. Morishima, K.; Kawashima, Y.; Kawashima, Y.; Takeuchi, H.; Niwa, T.; Hino, T. Micromeritic characteristics and agglomeration mechanisms in the spherical crystallization of buccillamine by the spherical agglomeration and the emulsion solvent diffusion methods. *Powder Technology* (1993) **76**(1), 57-64. [https://doi.org/10.1016/0032-5910\(93\)80041-8](https://doi.org/10.1016/0032-5910(93)80041-8)
38. Kawashima, Y.; Niwa, T.; Takeuchi, H.; Hino, T.; Itoh, Y.; Furuyama, S. Characterization of polymorphs of tranilast anhydrate and tranilast monohydrate when crystallized by two solvent change spherical crystallization techniques. *Journal of pharmaceutical sciences* (1991) **80**(5), 472-478. <https://doi.org/10.1002/jps.2600800515>
39. Kenji, M.; Yoshiaki, K.; Hirofumi, T.; Toshiyuki, N.; Tomoaki, H.; Yoichi, K. Tableting properties of buccillamine agglomerates prepared by the spherical crystallization technique. *International Journal of Pharmaceutics* (1994) **105**(1), 11-18. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90230-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90230-5)
40. Maghsoodi, M. How spherical crystallization improves direct tableting properties: a review. *Adv Pharm Bull* (2012) **2**(2), 253-257. <https://doi.org/10.5681/apb.2012.039>
41. Perumal, D. Microencapsulation of ibuprofen and Eudragit® RS 100 by the emulsion solvent diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics* (2001) **218**(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00686-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00686-4)
42. Cui, F.; Kawashima, Y.; Takeuchi, H.; Niwa, T.; Hino, T. Preparation of Controlled Releasing Acrylic Polymer Microspheres of Acebutolol Hydrochloride and Those Powder Coated Microspheres with Sodium Alginate in a Polymeric Spherical Crystallization System. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* (1996) **44**(4), 837-842. <https://doi.org/10.1248/cpb.44.837>
43. Sano, A.; Kuriki, T.; Handa, T.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y. Particle Design of Tolbutamide in the Presence of Soluble Polymer or Surfactant by the Spherical Crystallization Technique: Improvement of Dissolution Rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1987) **76**(6), 471-474. <https://doi.org/10.1002/jps.2600760612>
44. Anne-françoise, B.; Mangin, D.; Rivoire, A.; Klein, J. P.; Bossoutrot, J. M. Agglomeration in suspension of salicylic acid fine particles: Influence of some process parameters on kinetics and agglomerate final size. *Powder Technology* (2003) **130**, 316-323. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(02\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(02)00210-3)
45. Kawashima, Y.; Furukawa, K.; Takenaka, H. The physicochemical parameters determining the size of agglomerate prepared by the wet spherical agglomeration technique. *Powder Technology* (1981) **30**(2), 211-216. [https://doi.org/10.1016/0032-5910\(81\)80014-9](https://doi.org/10.1016/0032-5910(81)80014-9)
46. Usha, A. N.; Mutalik, S.; Reddy, M. S.; Ranjith, A. K.; Kushtagi, P.; Udupa, N. Preparation and, in vitro, preclinical and clinical studies of aceclofenac spherical agglomerates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2008) **70**(2), 674-683. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.06.010>
47. Kawashima, Y.; Naito, M.; Lin, S. Y.; Takenaka, H. An experimental study of the kinetics of the spherical crystallization of aylline sodium theophylline monohydrate. *Powder Technology* (1983) **34**(2), 255-260. [https://doi.org/10.1016/0032-5910\(83\)87058-2](https://doi.org/10.1016/0032-5910(83)87058-2)
48. Subero-Couroyer, C.; Mangin, D.; Rivoire, A.; Anne-françoise, B.; Klein, J. Agglomeration in suspension of salicylic acid fine particles: Analysis of the wetting period and effect of the binder injection mode on the final agglomerate size. *Powder Technology - POWDER TECHNOL* (2006) **161**, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2005.08.014>
49. Ritala, M.; Holm, P.; Schaefer, T.; Kristensen, H. G. Influence of Liquid Bonding Strength on Power Consumption During Granulation in a High Shear Mixer. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (1988) **14**(8), 1041-1060. <https://doi.org/10.3109/03639048809151919>
50. Kawashima, Y.; Capes, C. E. Further studies of the kinetics of spherical agglomeration in a stirred vessel. *Powder Technology* (1976) **13**(2), 279-288. [https://doi.org/10.1016/0032-5910\(76\)85014-0](https://doi.org/10.1016/0032-5910(76)85014-0)

51. Kawashima, Y.; Okumura, M.; Takenaka, H. The effects of temperature on the spherical crystallization of salicylic acid. *Powder Technology* (1984) **39**(1), 41-47. [https://doi.org/10.1016/0032-5910\(84\)85018-4](https://doi.org/10.1016/0032-5910(84)85018-4)
52. Zhang, H.; Chen, Y.; Wang, J.; Gong, J. Investigation on the Spherical Crystallization Process of Cefotaxime Sodium. *Industrial & Engineering Chemistry Research* (2010) **49**(3), 1402-1411. [10.1021/ie901001c](https://doi.org/10.1021/ie901001c)
53. Loxley, A.; Vincent, B. Preparation of Poly(methylmethacrylate) Microcapsules with Liquid Cores. *Journal of Colloid and Interface Science* (1998) **208**(1), 49-62. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5698>
54. Bodmeier, R.; McGinity, J. W. Solvent selection in the preparation of poly(dl-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics* (1988) **43**(1), 179-186. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(88\)90073-7](https://doi.org/10.1016/0378-5173(88)90073-7)
55. Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports* (2012) **64**(5), 1020-1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
56. Bolourchian, N.; Bahjat, M. Design and In Vitro Evaluation of Eudragit-Based Extended Release Diltiazem Microspheres for Once- and Twice-Daily Administration: The Effect of Coating on Drug Release Behavior. *Turk J Pharm Sci* (2019) **16**(3), 340-347. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2018.24861>
57. Tice, T. R.; Gilley, R. M. Preparation of injectable controlled-release microcapsules by a solvent-evaporation process. *Journal of Controlled Release* (1985) **2**, 343-352. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(85\)90056-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(85)90056-2)
58. Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics* (2008) **363**(1), 26-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>
59. Arshady, R. Albumin microspheres and microcapsules: Methodology of manufacturing techniques. *Journal of Controlled Release* (1990) **14**(2), 111-131. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(90\)90149-N](https://doi.org/10.1016/0168-3659(90)90149-N)
60. Sansdrap, P.; Moës, A. J. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* (1993) **98**(1), 157-164. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90052-H](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90052-H)
61. Carrio, A.; Schwach, G.; Coudane, J.; Vert, M. Preparation and degradation of surfactant-free PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release* (1995) **37**(1), 113-121. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00070-O](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00070-O)
62. Jeffery, H.; Davis, S. S.; O'hagan, D. T. The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics* (1991) **77**, 169-175. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90314-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90314-E)
63. André-Abrant, A.; Taverdet, J.-L.; Jay, J. Microencapsulation par évaporation de solvant. *European Polymer Journal* (2001) **37**(5), 955-963. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(00\)00197-X](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(00)00197-X)
64. Arshady, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. *Journal of Controlled Release* (1991) **17**(1), 1-21. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90126-X](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90126-X)
65. Meng, F. T.; Ma, G. H.; Liu, Y. D.; Qiu, W.; Su, Z. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bioactivity and high entrapment efficiency using W/O/W double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2004) **33**, 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.003>
66. Chung, T. W.; Huang, Y. Y.; Tsai, Y. L.; Liu, Y. Z. Effects of solvent evaporation rate on the properties of protein-loaded PLLA and PDLLA microspheres fabricated by emulsion-solvent evaporation process. *J Microencapsul* (2002) **19**(4), 463-471. <https://doi.org/10.1080/02652040210140706>
67. Stolnik, S.; Dunn, S. E.; Garnett, M. C.; Davies, M. C.; Coombes, A. G. A.; Taylor, D. C.; Irving, M. P.; Purkiss, S. C.; Tadros, T. F.; Davis, S. S. et al. Surface Modification of Poly(lactide-co-glycolide) Nanospheres by Biodegradable Poly(lactide)-Poly(ethylene glycol) Copolymers. *Pharmaceutical Research* (1994) **11**(12), 1800-1808. <https://doi.org/10.1023/A:1018931820564>
68. Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release* (1999) **57**(2), 171-185. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00116-3)

69. Conway, B. R.; Alpar, H. O. Single and Coencapsulation of Interferon- $\gamma$  in Biodegradable PLA Microspheres for Optimization of Multicomponent Vaccine Delivery Vehicles. *Drug Delivery* (1997) **4**(2), 75-80. <https://doi.org/10.3109/10717549709051876>
70. Cohen, S.; Yoshioka, T.; Lucarelli, M.; Hwang, L. H.; Langer, R. Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm Res* (1991) **8**(6), 713-720. <https://doi.org/10.1023/a:1015841715384>
71. Witschi, C.; Doelker, E. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *Journal of Controlled Release* (1998) **51**(2), 327-341. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00188-0)
72. Spenlehauer, G.; Veillard, M.; Benoît, J. P. Formation and Characterization of Cisplatin Loaded Poly(d,l-Lactide) Microspheres for Chemoembolization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1986) **75**(8), 750-755. <https://doi.org/10.1002/jps.2600750805>
73. C.-Y. Yang, S. Y. T. R. C. T. An enhanced process for encapsulating aspirin in ethyl cellulose microcapsules by solvent evaporation in an O/W emulsion. *Journal of Microencapsulation* (2000) **17**(3), 269-277. <https://doi.org/10.1080/026520400288256>
74. Herrmann, J.; Bodmeier, R. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (1998) **45**(1), 75-82. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00125-2)
75. Liu, R.; Wang, Y.; Ma, Y.; Wu, Y.; Guo, Y.; Xu, L. Effects of the molecular weight of PLGA on degradation and drug release in vitro from an mPEG-PLGA nanocarrier. *Chemical Research in Chinese Universities* (2016) **32**(5), 848-853. <https://doi.org/10.1007/s40242-016-6155-x>
76. Izumikawa, S.; Yoshioka, S.; Aso, Y.; Takeda, Y. Preparation of poly(l-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *Journal of Controlled Release* (1991) **15**(2), 133-140. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90071-K](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90071-K)
77. Wang, J.; Helder, L.; Shao, J.; Jansen, J. A.; Yang, M.; Yang, F. Encapsulation and release of doxycycline from electrospray-generated PLGA microspheres: Effect of polymer end groups. *International Journal of Pharmaceutics* (2019) **564**(1-9). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.023>
78. Yoo, H. S.; Lee, K. H.; Oh, J. E.; Park, T. G. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *Journal of Controlled Release* (2000) **68**(3), 419-431. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00280-7)
79. Yeo, Y.; Park, K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of Pharmacal Research* (2004) **27**(1), 1. <https://doi.org/10.1007/BF02980037>
80. Pharmaceutical Potential of Gelatin as a pH-responsive Porogen for Manufacturing Porous Poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) Microspheres. (2010, August 20). *Journal of Pharmaceutical Investigation*. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.4333/kps.2010.40.4.245>
81. Lee, J.; Oh, Y. J.; Lee, S. K.; Lee, K. Y. Facile control of porous structures of polymer microspheres using an osmotic agent for pulmonary delivery. *Journal of Controlled Release* (2010) **146**(1), 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.05.026>
82. Kitchell, J. P.; Wise, D. L. Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems. *Methods Enzymol* (1985) **112**, 436-448. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)12034-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)12034-3)
83. Lagreca, E.; Onesto, V.; Di Natale, C.; Manna, S.; Netti, P.; Vecchione, R. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery. *Progress in Biomaterials* (2020) **9**, 153-174. <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00139-y>
84. Lewis, D. H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. *Drugs and the pharmaceutical sciences* (1990) **45**, 1-41.
85. Vey, E.; Rodger, C.; Meehan, L.; Booth, J.; Claybourn, M.; Miller, A.; Saiani, A. The impact of chemical composition on the degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid copolymers cast films in phosphate buffer solution. *Polymer Degradation and Stability* (2012) **97**, 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.12.010>
86. Blanco, M. D.; Alonso, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (1997) **43**(3), 287-294. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00056-8)

87. Brigger, I.; Morizet, J.; Laudani, L.; Aubert, G.; Appel, M.; Velasco, V.; Terrier-Lacombe, M.-J.; Desmaële, D.; d'Angelo, J.; Couvreur, P. et al. Negative preclinical results with stealth® nanospheres-encapsulated Doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *Journal of Controlled Release* (2004) **100**(1), 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.019>
88. Mao, S.; Xu, J.; Cai, C.; Germershaus, O.; Schaper, A.; Kissel, T. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* (2007) **334**(1), 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.036>
89. Nagal, A., & Singla, R.K. (2013). Nanoparticles in Different Delivery Systems: A Brief Review.
90. Hans, M. L.; Lowman, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* (2002) **6**(4), 319-327. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00117-1)
91. Li, Y.-P.; Pei, Y.-Y.; Zhang, X.-Y.; Gu, Z.-H.; Zhou, Z.-H.; Yuan, W.-F.; Zhou, J.-J.; Zhu, J.-H.; Gao, X.-J. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *Journal of Controlled Release* (2001) **71**(2), 203-211. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00218-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00218-8)
92. Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2000) **18**(3), 301-313. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00156-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00156-3)
93. Torchilin, V. P. Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *Journal of Microencapsulation* (1998) **15**(1), 1-19. <https://doi.org/10.3109/02652049809006831>
94. Gessner, A.; Paulke, B. R.; Müller, R. H.; Göppert, T. M. Protein rejecting properties of PEG-grafted nanoparticles: influence of PEG-chain length and surface density evaluated by two-dimensional electrophoresis and biconchonic acid (BCA)-protein assay. *Pharmazie* (2006) **61**(4), 293-297.
95. Matsumoto, J.; Nakada, Y.; Sakurai, K.; Nakamura, T.; Takahashi, Y. Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* (1999) **185**(1), 93-101. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00153-2)
96. Couvreur, P.; Puisieux, F. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* (1993) **10**(2), 141-162. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90046-7](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90046-7)
97. Malvern Zeta sizer nano series, user manual. Malvern Panalytical. [https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/Zetasizer-Nano-user-manual-English-MAN0485-1-1\\_tcm50-11627.pdf](https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/Zetasizer-Nano-user-manual-English-MAN0485-1-1_tcm50-11627.pdf) Zeta sizer Nano ZS Copyright 2019 - Malvern Panalytical Ltd. is a Spertric company.
98. A nanotechnológia kolloidkémiai alapjai [elektronikus dok.] : egyetemi tananyag / írta Hórvölgyi Zoltán ; [közread. a] Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék
99. Oh, E.; Luner, P. E. Surface free energy of ethylcellulose films and the influence of plasticizers. *International Journal of Pharmaceutics* (1999) **188**(2), 203-219. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00224-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00224-0)
100. Camille Miller, Jaleel Bolden, Zane Corder, Charlene Higdon, Determining Surface Tension Using The Pendant Drop Method, Department of Chemistry and Physics Georgia Regents University, [https://augusta.openrepository.com/bitstream/handle/10675.2/552630/Bolden\\_Jaleel\\_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://augusta.openrepository.com/bitstream/handle/10675.2/552630/Bolden_Jaleel_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
101. TB380 BCA Protein Assay Kit User protocols, [https://www.merckmillipore.com/HU/hu/product/BCA-Protein-Assay-Kit,EMD\\_BIO-71285?bd=1#overview](https://www.merckmillipore.com/HU/hu/product/BCA-Protein-Assay-Kit,EMD_BIO-71285?bd=1#overview)
102. Bayliss, M.; Somers, G. In *Human Cell Culture Protocols*; Picot, J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005, <https://doi.org/10.1385/1-59259-861-7:249>
103. Ferrini, J. B.; Ourlin, J. C.; Pichard, L.; Fabre, G.; Maurel, P. Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol* (1998) **107**, 341-352. <https://doi.org/10.1385/0-89603-519-0:341>

104. Wallevik K. Reversible denaturation of human serum albumin by pH, temperature, and guanidine hydrochloride followed by optical rotation. *The Journal of biological chemistry*, (1973). **248**(8), 2650–2655.
105. Panjwani, N., Hodgson, D. J., Sauv e, S., & Aubin, Y.. Assessment of the effects of pH, formulation and deformation on the conformation of interferon alpha-2 by NMR. *Journal of pharmaceutical sciences*, (2010) **99**(8), 3334–3342. <https://doi.org/10.1002/jps.22105>
106. Kumar, S.; Koh, J. Synthesis, physicochemical and optical properties of chitosan based dye containing naphthalimide group. *Carbohydrate Polymers* (2013) **94**(1), 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.011>
107. Arce, A.; Alonso, L.; Vidal, I. Liquid-Liquid Equilibria of the Systems Ethyl Acetate + Ethanol + Water, Butyl Acetate + Ethanol + Water, and Ethyl Acetate + Butyl Acetate + Water. *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN* (1999) **32**(4), 440-444. <https://doi.org/10.1252/jcej.32.440>
108. Seidell, A. L. W. F. *Solubilities of inorganic and metal organic compounds; a compilation of quantitative solubility data from the periodical literature*; D. Van Nostrand Company, Inc.: New York, 1940. <https://ia902606.us.archive.org/26/items/solubilitiesino04seidgoog/solubilitiesino04seidgoog.pdf>
109. Mullin, J. W.; Sipek, M. Solubility and density isotherms for potassium aluminum sulfate-water-alcohol systems. *Journal of Chemical & Engineering Data* (1981) **26**(2), 164-165. <https://doi.org/10.1021/je00024a021>
110. Mydlarz, J.; Jones, A. G. Potassium sulfate water-alcohols systems: composition and density of saturated solutions. *Journal of Chemical & Engineering Data* (1990) **35**(2), 214-216. <https://doi.org/10.1021/je00060a036>
111. Merzougui, A.; Hasseine, A.; Kabouche, A.; Korichi, M. LLE for the extraction of alcohol from aqueous solutions with diethyl ether and dichloromethane at 293.15K, parameter estimation using a hybrid genetic based approach. *Fluid Phase Equilibria* (2011) **309**(2), 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.07.011>
112. Moriyoshi, T.; Uosaki, Y.; Sakamoto, T.; Hayashi, Y. (Liquid + liquid) equilibria of (water + ethanol + 2,6-dimethyl-4-heptanone) from 0.1 to 200 MPa at 298.15 and 323.15 K. *The Journal of Chemical Thermodynamics* (1989) **21**(2), 219-224. [https://doi.org/10.1016/0021-9614\(89\)90133-X](https://doi.org/10.1016/0021-9614(89)90133-X)
113. M. Bogataj, A. M. I. G. Z. R. P. B. S. S. The influence of magnesium stearate on the characteristics of mucoadhesive microspheres. *Journal of Microencapsulation* (2000) **17**(4), 499-508. <https://doi.org/10.1080/026520400405741>
114. Kawata, M.; Nakamura, M.; Goto, S.; Aoyama, T. Preparation and dissolution pattern of Eudragit RS microcapsules containing ketoprofen. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* (1986) **34**(6), 2618-2623. <https://doi.org/10.1248/cpb.34.2618>
115. Brunsteiner, M.; Jones, A. G.; Pratola, F.; Price, S. L.; Simons, S. J. R. Toward a Molecular Understanding of Crystal Agglomeration. *Crystal Growth & Design* (2005) **5**(1), 3-16. <https://doi.org/10.1021/cg049837m>
116. Mullin, J. In *Crystallization (Fourth Edition)*; Ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 2001, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-4833-2.X5000-1>
117. Farkas, B.; R ev esz, P., Krist alyosit ast ol a tablett az sig. Universitas-Szeged Kht.: 2007; p 376.
118. Simone, E.; Othman, R.; Vladisavljevi , G. T.; Nagy, Z. K. Preventing Crystal Agglomeration of Pharmaceutical Crystals Using Temperature Cycling and a Novel Membrane Crystallization Procedure for Seed Crystal Generation. *Pharmaceutics* (2018) **10**(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10010017>
119. Dai, J. F.; Ling, R. Q.; Wang, K. Z. Thermal Performance and Dehydration Kinetics of KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•12H<sub>2</sub>O as Phase Change Material. *Advanced Materials Research* (2012) **418-420**, 282-285. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.418-420.282>
120. Wojciechowska, R.; Wojciechowski, W.; Kami nski, J. Thermal decompositions of ammonium and potassium alums. *Journal of thermal analysis* (1988) **33**(2), 503-509. <https://doi.org/10.1007/BF01913929>

121. A röntgensugárzás, mint analitikai reagens, <http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/anal/Anyagtudomanyi-analitikai-vizsgalati-modszerek/Eloadasok/Ea-X-ray3-2018.pdf>
122. Košek, F.; Culka, A.; Žáček, V.; Laufek, F.; Škoda, R.; Jehlička, J. Native alunogen: A Raman spectroscopic study of a well-described specimen. *Journal of Molecular Structure* (2018) **1157**, 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.12.021>
123. Kishimura, H.; Imasu, Y.; Matsumoto, H. Thermal dehydration of potash alum studied by Raman spectroscopy and X-ray diffraction analysis. *Materials Chemistry and Physics* (2015) **149-150**, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.09.049>
124. Tieger, E.; Kiss, V.; Pokol, G.; Finta, Z.; Rohlíček, J.; Skořepová, E.; Dušek, M. Rationalization of the formation and stability of bosutinib solvated forms. *CrystEngComm* (2016) **18**(48), 9260-9274. <https://doi.org/10.1039/C6CE01834C>
125. Torza, S.; Mason, S. G. Three-phase interactions in shear and electrical fields. *Journal of Colloid and Interface Science* (1970) **33**(1), 67-83. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(70\)90073-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(70)90073-1)
126. [http://www.firp.ula.ve/archivos/historicos/76\\_Book\\_HLB\\_ICI.pdf](http://www.firp.ula.ve/archivos/historicos/76_Book_HLB_ICI.pdf)
127. Woodard, L. F.; Jasman, R. L. Stable oil-in-water emulsions: preparation and use as vaccine vehicles for lipophilic adjuvants. *Vaccine* (1985) **3**(2), 137-144. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(85\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0264-410X(85)90063-5)
128. Goebel, A.; Lunkenheimer, K. Interfacial Tension of the Water/n-Alkane Interface. *Langmuir* (1997) **13**(2), 369-372. <https://doi.org/10.1021/la960800g>
129. Marten, F. L. Vinyl Alcohol Polymers. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (2002), <https://doi.org/10.1002/0471238961.2209142513011820.a01.pub2>
130. Zhu, Y.; Xu, G.; Xin, X.; Zhang, H.; Shi, X. Surface Tension and Dilational Viscoelasticity of Water in the Presence of Surfactants Tyloxapol and Triton X-100 with Cetyl Trimethylammonium Bromide at 25 °C. *Journal of Chemical & Engineering Data* (2009) **54**(3), 989-995. <https://doi.org/10.1021/jc800788f>
131. Brandrup, J. I. E. H. G. E. A. *Polymer handbook, 4th edition*; Wiley: New York; Chichester, 2004. p 533.
132. Pisani, E.; Fattal, E.; Paris, J.; Ringard, C.; Rosilio, V.; Tsapis, N. Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the dichloromethane–water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* (2008) **326**(1), 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.07.013>
133. van Zyl, A. J. P.; Sanderson, R. D.; de Wet-Roos, D.; Klumperman, B. Core/Shell Particles Containing Liquid Cores: Morphology Prediction, Synthesis, and Characterization. *Macromolecules* (2003) **36**(23), 8621-8629. <https://doi.org/10.1021/ma034596x>
134. Bolognesi, A.; Mercogliano, C.; Yunus, S.; Civardi, M.; Comoretto, D.; Turturro, A. Self-Organization of Polystyrenes into Ordered Microstructured Films and Their Replication by Soft Lithography. *Langmuir* (2005) **21**(8), 3480-3485. <https://doi.org/10.1021/la047427u>
135. Aveyard, R.; Binks, B. P.; Fletcher, P. D. I.; MacNab, J. R. Interaction of Alkanes with Monolayers of Nonionic Surfactants. *Langmuir* (1995) **11**(7), 2515-2524. <https://doi.org/10.1021/la00007a034>
136. Shubhra, Q. T. H.; Feczko, T.; Kardos, A. F.; Tóth, J.; Mackova, H.; Horak, D.; Dósa, G.; Gyenis, J. Co-encapsulation of human serum albumin and superparamagnetic iron oxide in PLGA nanoparticles: Part II. Effect of process variables on protein model drug encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation* (2014) **31**(2), 156-165. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.814730>
137. Shubhra QTH, Mackova H, Horak D, Fodor-Kardos A, Toth J, Gyenis J, Feczko T: Encapsulation of human serum albumin in submicrometer magnetic poly(lactide-co-glycolide) particles as a model system for targeted drug delivery, *E-POLYMERS* **13** (1) pp. 310-318. <https://doi.org/10.1515/epoly.2013.13.1.310>
138. Feczko, T.; Tóth, J.; Dósa, G.; Gyenis, J. Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* (2011) **50**(8), 757-765. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.06.008>
139. Huang, W.; Zhang, C. Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation. *Biotechnology Journal* (2018) **13**(1), 1700203. <https://doi.org/10.1002/biot.201700203>

140. Fu, K., Pack, D. W., Klibanov, A. M., & Langer, R.. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharmaceutical research*, (2000) **17**(1), 100–106. <https://doi.org/10.1023/a:1007582911958>
141. Giteau, A.; Venier-Julienne, M. C.; Aubert-Pouëssel, A.; Benoit, J. P. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *International Journal of Pharmaceutics* (2008) **350**(1), 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.012>
142. Chiu, H. I.; Samad, N. A.; Fang, L.; Lim, V. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. *RSC Advances* (2021) **11**(16), 9433–9449. <https://doi.org/10.1039/D1RA00074H>
143. Kulkarni, S. A.; Feng, S. S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharm Res* (2013) **30**(10), 2512–2522. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0958-3>
144. Faraji, A. H.; Wipf, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2009) **17**(8), 2950–2962. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.043>
145. Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Andresen, T. L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2012) **52**, 481–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623>.
146. Cornu, R.; Rougier, N.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A.; Hamon, P.; Li, R.; Beduneau, A.; Martin, H. Interspecies differences in the cytochrome P450 activity of hepatocytes exposed to PLGA and silica nanoparticles: an in vitro and in vivo investigation. *Nanoscale* (2018) **10**(11), 5171–5181. <https://doi.org/10.1039/C8NR00226F>
147. Choi, C. H. J.; Zuckerman, J. E.; Webster, P.; Davis, M. E. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2011) **108**(16), 6656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103573108>
148. L'Azou, B.; Jorly, J.; On, D.; Sellier, E.; Moisan, F.; Fleury-Feith, J.; Cambar, J.; Brochard, P.; Ohayon-Courtès, C. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Part Fibre Toxicol* (2008) **5**, 22. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-5-22>
149. Wang, J.; Zhou, G.; Chen, C.; Yu, H.; Wang, T.; Ma, Y.; Jia, G.; Gao, Y.; Li, B.; Sun, J. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters* (2007) **168**(2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.12.001>
150. Liao, L.; Zhang, M.; Liu, H.; Zhang, X.; Xie, Z.; Zhang, Z.; Gong, T.; Sun, X. Subchronic toxicity and immunotoxicity of MeO-PEG-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-PEG-OMe triblock copolymer nanoparticles delivered intravenously into rats. *Nanotechnology* (2014) **25**(24), 245705. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/24/245705>
151. Nasti, A.; Zaki, N. M.; de Leonardis, P.; Ungphaiboon, S.; Sansongsak, P.; Rimoli, M. G.; Tirelli, N. Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation. *Pharmaceutical Research* (2009) **26**(8), 1918–1930. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9908-0>
152. Jachimska, B.; Wasilewska, M.; Adamczyk, Z. Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements. *Langmuir* (2008) **24**(13), 6866–6872. <https://doi.org/10.1021/la800548p>
153. Ding, H.; Park, S.-M. Electrochemistry of Conductive Polymers. *Journal of The Electrochemical Society* (2003) **150**(1), E33. <https://doi.org/10.1149/1.1525271>
154. Sorlier, P.; Denuzière, A.; Viton, C.; Domard, A. Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* (2001) **2**(3), 765–772. <https://doi.org/10.1021/bm015531+>
155. Ziólkowska, D.; Lamkiewicz, J.; Shyichuk, A. Determination of Sodium Dodecyl Sulfate by Means of Photometric Titration with o-Toluidine Blue Dye. *Journal of Surfactants and Detergents* (2018) **21**(5), 751–756. <https://doi.org/10.1002/jsde.12052>
156. Mahmoud, S.; Hamzaoui, A.; Wafa, E. Spectrophotometric study of the interaction of methylene blue with poly(styrene-co-sodium styrene sulfonate). *Mediterranean Journal of Chemistry* (2016) **5**, 493–506. <https://doi.org/10.13171/mjc54/01606170930/essafi>

157. Ying, G.-q.; Xiong, W.-y.; Wang, H.; Sun, Y.; Liu, H.-z. Preparation, water solubility and antioxidant activity of branched-chain chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers* (2011) **83**(4), 1787-1796. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.037>
158. Li, M. G.; Zhang, Y.; Xu, Y. H.; Zhang, D. Effect of different amounts of surfactant on characteristics of nanoencapsulated phase-change materials. *Polymer Bulletin* (2011), **67** (3), 541-552. <https://doi.org/10.1007/s00289-011-0492-1>
159. Rogers, T. L.; Wallick, D. Reviewing the use of ethylcellulose, methylcellulose and hypromellose in microencapsulation. Part 1: materials used to formulate microcapsules. *Drug Dev Ind Pharm* (2012), **38** (2), 129-157. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.590990>
160. Zhang, G. H.; Bon, S. A. F.; Zhao, C. Y. Synthesis, characterization and thermal properties of novel nanoencapsulated phase change materials for thermal energy storage. *Solar Energy* (2012), **86** (5), 1149-1154. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2012.01.003>
161. Lin, Y.; Zhu, C.; Alva, G.; Fang, G. Microencapsulation and thermal properties of myristic acid with ethyl cellulose shell for thermal energy storage. *Applied Energy* (2018), **231**, 494-501. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.09.154>
162. Mirabedini, S. M.; Dutil, I.; Farnood, R. R. Preparation and characterization of ethyl cellulose-based core-shell microcapsules containing plant oils. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2012), **394**, 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.11.028>
163. Badulescu, R.; Vivod, V.; Jausovec, D.; Voncina, B. Grafting of ethylcellulose microcapsules onto cotton fibers. *Carbohydrate Polymers* (2008), **71** (1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.028>
164. Phadungphatthanakoon, S.; Poompradub, S.; Wanichwecharungruang, S. P. Increasing the thermal storage capacity of a phase change material by encapsulation: preparation and application in natural rubber. *ACS Appl Mater Interfaces* (2011), **3** (9), 3691-3696. <https://doi.org/10.1021/am200870e>
165. Yousef, J.; Zhila, V.; Solmaz Maleki, D.; Masumeh, M. In *Advanced Topics in Crystallization*; Yitzhak, M., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2015, DOI:10.5772/59627 10.5772/59627.



## Tézisek

- 1) a. Kidolgoztam egy olyan, a klasszikustól eltérő, szférikus agglomerációs módszert nanoszerkezetű szemcsék előállítására, amely alkalmas új, vízoldható fehérje típusú gyógyszer (természetes interferon) kitozán és nátrium-polisztirol-szulfonát polimerekbe való kapszulázására. A folyamatban oldószercserés és kémiai precipitáció kombinációja játszódik le. A módszer megvalósításához nincs szükség sem felületaktív anyag jelenlétére, sem hőmérséklet különbség alkalmazására.
- 1 b. Meghatároztam a 10–15% (V/V) EtOH és 65–70% (V/V) EtOAc mennyiség által leírt szűk összetétel-tartományt a vízzel alkotott oldószerszármazékokra nézve, ahol a kiindulási kétfázisú elegyből kiindulva etanol, ill. etanol–etil-acetát elegy hozzáadásával szférikus agglomerátumokat kaptam. Kísérletileg igazoltam, hogy a folyamat részlépéseiben kialakuló oldószerszármazékok jelentős hatással vannak a kialakuló agglomerátumok morfológiájára. [S1]
- 2) Kétféle, szférikus agglomerációs, illetve emulziós oldószerszármazékos módszerrel sikerült  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  szférikus agglomerátumait előállítani.  
Szférikus agglomerációs mechanizmussal nem teljesen szférikus és kevésbé stabil,  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -ként azonosítható agglomerátumok állíthatók elő.  
Emulziós oldószerszármazékos mechanizmussal stabilabb, és szinte tökéletesen gömb alakú agglomerátumok képződnek, azonban összetételüket tekintve nem tisztán 12 kristályvizes timsót tartalmaznak. A timsón kívül további 4 kristályos só mutatható ki: rostite ( $\text{Al}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), alunogen ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ ), vízmentes  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  és vízmentes  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .  
A különböző átlagos kristályvíz-, ill. timsóttartalmú mintáknak a vízvesztésük és a megolvadásuk során mérhető hő mennyisége arányos a kristályvíz-, ill. timsóttartalommal. [S2]

- 3) Megállapítottam, hogy n-hexadekán fázisváltó hőtároló anyagot tartalmazó poli(metil-metakrilát) és etil-cellulóz hordozó polimerekkel, emulziós oldószer-elpárolgatásos módszerrel, polivinil-alkohol vagy Tween80 emulgeátorok alkalmazása mellett, létrehozott mikrokapszulák a szétterülési együtthatók alapján nem érik el az egyensúlyi morfológiájukat. Az eltérő emulgeátor oldatok hatására kialakuló különböző felületi feszültség viszonyok a mag-héj szerkezet mellett a különböző mértékű porozitásban mutatkoznak meg. [S3]
  
- 4) Sikeresen állítottam elő humán interferon-béta hatóanyagot tartalmazó (poli(tejsav-glikolsav) és (poli(tejsav-glikolsav)-polietilén-glikol nanorészecskéket 80–90% kapszulázási hatékonysággal és térfogati átlag szerinti 160–170 nm-es átlagos szemcsemérettel. A nanorészecskék legalább egy héten át képesek voltak nyújtott interferon-béta hatóanyagleadást biztosítani humán vérplazmában *in vitro* körülmények között. Az interferon-béta hordozó nanorészecskék *in vitro* citotoxicitási vizsgálatokban nem mutattak citotoxicitást, azonban az *in vivo* kísérletekben a kétféle polimerrel készült nanorészecskék enyhe toxicitást váltottak ki a vesékben. [S4]

## Theses

- 1) a. I have developed a non-classical spherical agglomeration method for the preparation of novel nanostructured particles suitable for the encapsulation of water-soluble protein-type drug (natural interferon) in chitosan and sodium polystyrene sulfonate polymers. The process involves the combination of antisolvent and chemical precipitation. Neither the presence of a surfactant nor the application of a temperature difference is required to execute the method.
- 1) b. I determined the narrow composition range described by 10–15% (v/v) ethanol and 65–70% (v/v) ethylacetate for the solvent mixture with water, where spherical agglomerates containing HSA in a polymer matrix of chitosan and sodium polystyrene sulfonate were obtained from the initial two-phase mixture by the addition of ethanol or ethanol–ethyl acetate mixture. I have experimentally

demonstrated that the solvent compositions formed in the sub-steps of the process have a significant effect on the morphology of the resulting agglomerates. [S1]

- 2 I prepared spherical agglomerates of  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  by two different methods, namely spherical agglomeration and emulsion solvent diffusion.

By spherical agglomeration mechanism, less stable agglomerates, not fully spherical and identifiable as  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , can be produced.

By emulsion solvent diffusion mechanism, more stable and almost perfectly spherical agglomerates are formed, but they are not pure potash alum with 12 crystallization water in composition. In addition to potash alum, 4 other crystalline salts can be detected: rosite ( $\text{Al}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), alunogen ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ ), anhydrous  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  and anhydrous  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

The amount of heat measured during dehydration and melting of the samples with different average crystallization water and potash alum contents is proportional to the crystallization water and potash alum contents, respectively. [S2]

- 3 I stated that microcapsules formed with poly(methyl methacrylate) and ethyl cellulose carrier polymers containing n-hexadecane phase change material, using emulsion solvent evaporation method and polyvinyl alcohol or Tween80 emulsifiers do not reach their equilibrium morphology based on the spreading coefficients. The different surface tension conditions due to the different emulsifier solutions are revealed in the different degree of porosity in addition to the core-shell structure. [S3]

- 4 I successfully prepared interferon-beta containing nanoparticles of (poly(lactic acid-glycolic acid) and (poly(lactic acid-glycolic acid)-polyethylene glycol carrier with 80–90% encapsulation efficiency and volume average particle size of 160–170 nm. The nanoparticles were able to provide extended interferon-beta drug release in human blood plasma for at least one week under in vitro conditions. The interferon-beta carrying nanoparticles did not show cytotoxicity in in vitro cytotoxicity assays, however in in vivo experiments the nanoparticles formed with these two polymers induced mild toxicity in the kidneys. [S4]

## Publikációs lista

### Cikk referált nemzetközi folyóiratban (1. szerző) (A dolgozat alapját képező cikkek)

1. **[S1] Fodor-Kardos, A (Fodor-Kardos, Andrea);** Toth, J (Toth, Judit); Gyenis, J (Gyenis, Janos) Preparation of protein loaded chitosan microparticles by combined precipitation and spherical agglomeration Powder technology, Volume: 244 Pages: 16-25 (2013) DOI: 10.1016/j.powtec.2013.03.052 Impakt factor: 2,64, Q1
2. **[S2] Kardos, AF (Kardos, Andrea F.);** Toth, J (Toth, Judit); Trif, L (Trif, Laszlo); Gyenis, J (Gyenis, Janos); Feczko, T (Feczko, Tivadar) Preparation of spherical agglomerates from potash alum, RSC Advances Volume: 6 Issue: 7 Pages: 5466-5473 (2016) doi: 10.1039/c5ra18497e Impakt faktor: 3,228, Q1.
3. **[S3] Feczko, T (Feczko, Tivadar); Kardos, AF (Kardos, Andrea F.);** Nemeth, B (Nemeth, Bence); Trif, L (Trif, Laszlo); Gyenis, J (Gyenis, Janos), Microencapsulation of n-hexadecane phase change material by ethyl cellulose polymer Polymer bulletin, Volume: 71 Issue: 12 Pages: 3289-3304 (2014) DOI: 10.1007/s00289-014-1250-y Impakt factor: 1,33, Q2.
4. **[S4] Andrea Fodor-Kardos,** Ádám Ferenc Kiss, Katalin Monostory and Tivadar Feczko, Sustained in vitro interferon-beta release and in vivo toxicity of PLGA and PEG-PLGA nanoparticles, RSC Advances, 10, 27, (15893-15900), (2020) doi: 10.1039/C9RA09928J, Impakt faktor: 3,049, Q1.

### Előadás magyar nyelven teljes szöveges megjelenéssel:

1. **Fodorné, Kardos A;** Tóth, J; Hasznosné, Nezei M, Szférikus agglomeráció háromkomponensű oldószerkeletben, In: Nagy, Endre; Simon, Ferenc; Kiss, Katalin; Hegedűs, Imre (szerk.) Műszaki Kémiai Napok '08 = Conference of Chemical Engineering: conference proceedings, Veszprém, Magyarország: MTA VEAB, Veszprémi Egyetemi Kiadó, (2008) pp. 245-249. , 5 p.
2. **Fodorné Kardos Andrea,** Feczko Tivadar, Szabályozott hatóanyagleadású biokompatibilis és biológiailag lebontható interferon-béta tartalmú kompozit részecskék fejlesztése, MŰSZAKI KÉMIAI NAPOK 2017, Veszprém, 2017. április 25-27.

**Poszter idegen nyelven**

**Első szerzőként:**

1. **Fodor-Kardos, A** ; Tóth, J ; Hasznos-Nezdei, M, Precipitation of HSA loaded microspheres in a polymeric spherical crystallization system pp. 1-4.,In: Anon (szerk.) 6th World Congress on Particle Technology, Nürnberg, Németország : Nürnberger Messe- und Ausstellungsgesellschaft, (2010)

**Idegen nyelven tartott előadás teljes szöveges megjelenéssel**

1. **Fodor-Kardos, A** ; Feczkó, T, Preparation of interferon-beta loaded PLGA and PEG-PLGA nanoparticles ,In: 5th international symposium on reliable flow of particulate solids 2017, Skien Norway, (2017) pp. 1-6. Paper: 8A1 , 6 p.
2. **Andrea Fodor-Kardos**, János Gyenis, Preparation of potash alum PCM core by spherical agglomeration, The MacroJournals Conference on Medicine, Science, and Technology – Dubrovnik 2014, August 4-5th, 2014

**Szabadalom** Részvételi hányad: 10%

Feczkó, Tivadar ; **Fodorné, Kardos Andrea** ; Gyenis, János ; Németh, Bence ; Szemesné, Németh Ágnes ; Tóth, Judit

Kongruens fázisváltást biztosító hőtároló mikrokapszulák, eljárás előállításukra és alkalmazásuk  
2300796 , Benyújtás éve (szabadalom): 2014, Ügyszám: P1400593, Benyújtás országa:  
Magyarország

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Gyenis János professzor úrnak a sok-sok szakmai tanácsért, beszélgetésért, Dr. Feczko Tivadarnak, témavezetőmnek a szakmai útmutatásokért és a számomra biztosított lehetőségért a dolgozat megírására, és Dr. Tóth Juditnak, akivel a kezdetek óta együtt keressük a kérdésekre a válaszokat. Mindannyiójunktól nagyon sokat tanultam.

Szeretném megköszönni a kollégáknak, akik az évek során segítettek a munkámat. A kutatócsoportnak, amelynek örülök, hogy tagja lehetek. Az intézeti kollégáknak, köztük Tóth Évának, akiktől mindig kérhettem segítséget. Végül azoknak a kollégáknak, akik a különböző mérések kivitelezésében voltak segítségemre.

Hálával tartozom a szüleimnek az erejükön felüli támogatásukért, férjemnek, Fodor Lajosnak a szakmai segítség mellett a hátország biztosításáért és gyermekeinek a dolgozat megírására való inspirálásért.

## 8 Melléklet

### 8.1 PSS oldhatósága víz–etanol–etil-acetát oldószerhármásban

M.1. táblázat. Mért és számított PSS oldhatóságadatok, mg/ml

	Mért	Számított	Eltérés
1	3,8242	3,572866	0,25133
2	3,54289	3,135157	0,40773
3	3,47181	3,407337	0,06447
4	3,33366	3,287399	0,04626
5	3,17349	3,071856	0,10163
6	3,71208	3,509774	0,20231
7	1,60176	3,136701	-1,53494
8	0,60066	0,330294	0,27037
9	3,90029	3,43452	0,46577
10	2,65692	2,141617	0,51530
11	7,59506	9,368625	-1,77356
12	6,21683	6,702304	-0,48547
13	4,74642	4,671719	0,07470
14	3,8232	3,565358	0,25784
15	2,98408	2,921191	0,06289
16	1,7329	1,602702	0,13020
17	1,0956	0,9994915	0,09611
18	0,77485	0,6059932	0,16886
19	0,57643	0,3630057	0,21342
20	0,36146	0,1529782	0,20848
21	4,512058	4,584612	-0,07255

Melléklet

22	2,062666	2,493602	-0,43094
23	1,727983	1,249132	0,47885
24	0,03257079	-0,4945763	0,52715
25	2,892779	3,594394	-0,70162
26	4,516963	4,69499	-0,17803
27	5,874455	6,096559	-0,22210
28	7,074228	7,448688	-0,37446
29	7,956743	8,487906	-0,53116
30	18,25606	17,16464	1,09141
31	18,8239	18,03407	0,78983
32	59,76844	59,33419	0,43425
33	52,32207	52,8764	-0,55433

Az illesztés egyenletei:

$$\text{Full Cubic: } y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \delta_{12} x_1 x_2 (x_1 - x_2) + \delta_{13} x_1 x_3 (x_1 - x_3) + \delta_{23} x_2 x_3 (x_2 - x_3) + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$$

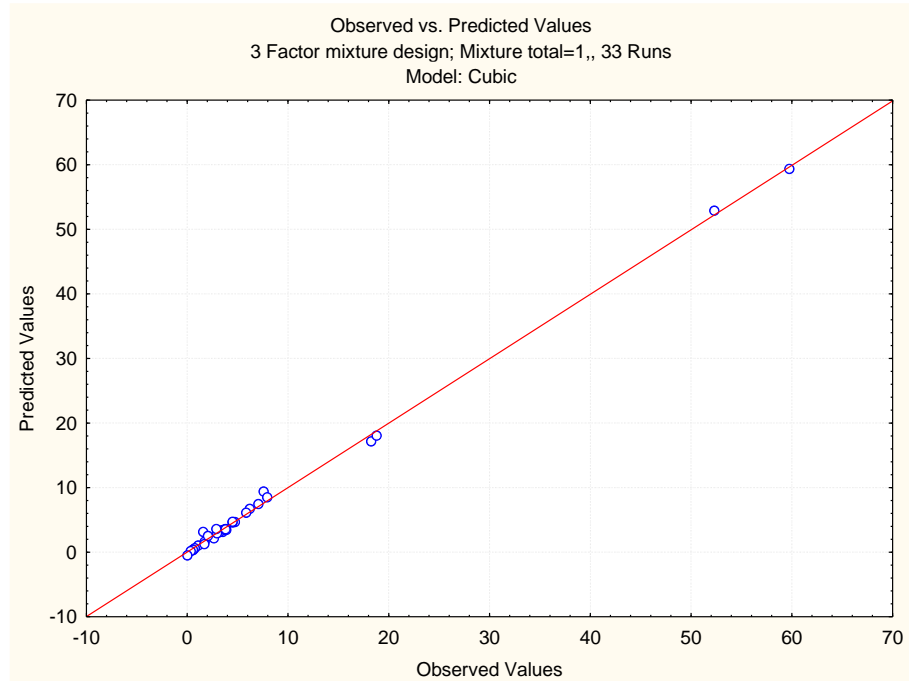
$$\text{Full Cubic: } y = \beta_1 x + \beta_2 y + \beta_3 z + \beta_{12} xy + \beta_{13} xz + \beta_{23} yz + \delta_{12} xy (x - y) + \delta_{13} xz (x - z) + \delta_{23} yz (y - z) + \beta_{123} xyz$$

A full cubic összefüggésből a következő konstansok számíthatók:

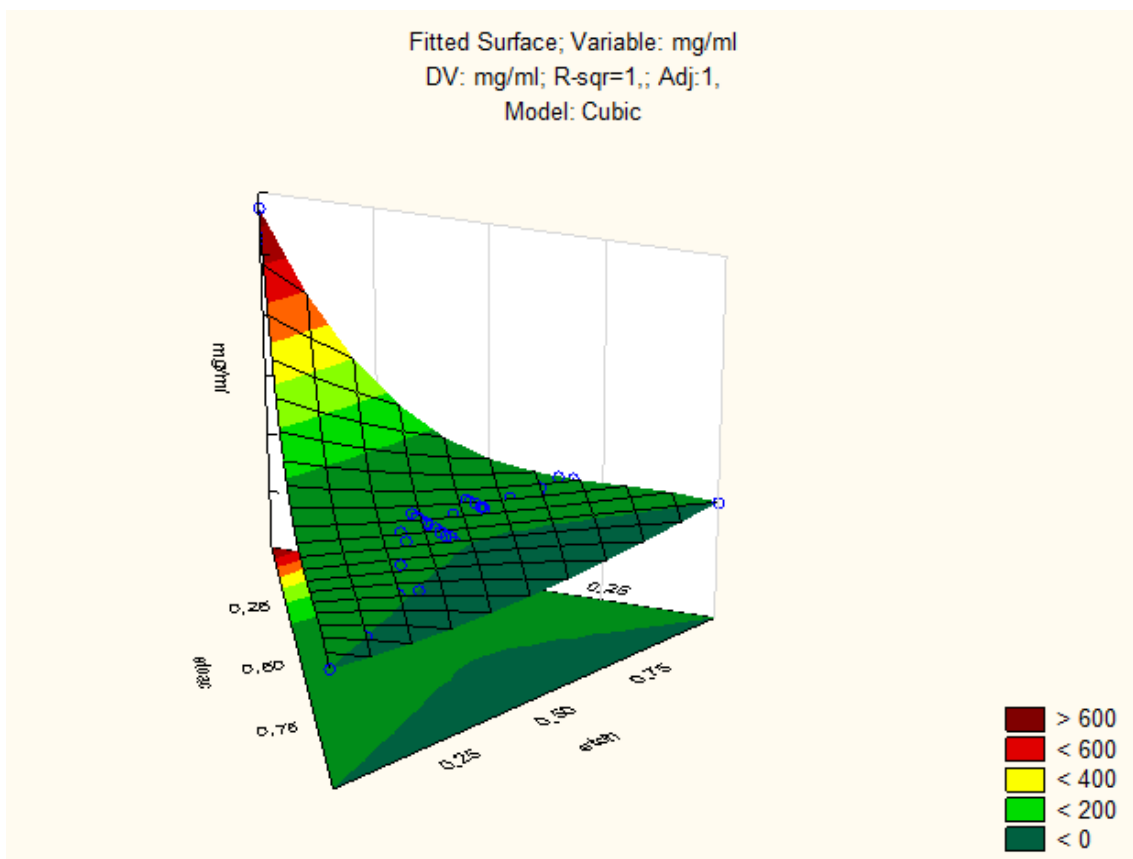
$$v = +749,98648661462 * x + 0,10883857620932 * y - 0,022193735636857 * z - 1453,0055084098 * x * y - 1383,3049840077 * x * z - 178,36934424274 * y * z + 2329,2799783984 * x * y * z - 1045,5564551518 * x * y * (x - y) - 826,16753142312 * x * z * (x - z) - 23,583348484285 * y * z * (y - z) + 0,$$



## Melléklet



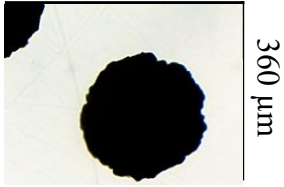
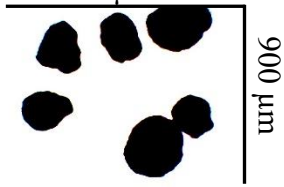
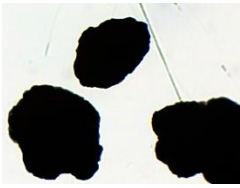
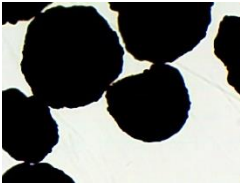
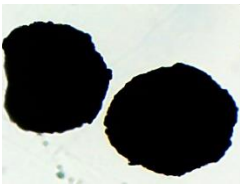


M.2. ábra. Mért és számított értékek, R-sqr=,9981



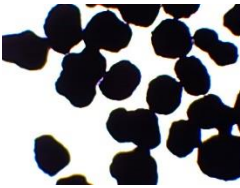

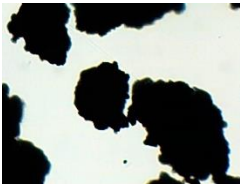
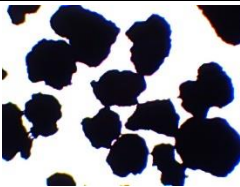

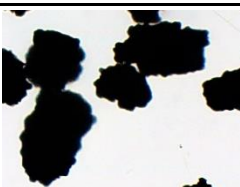
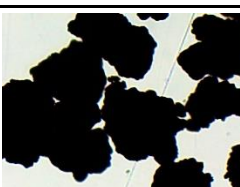
M.3. ábra. PSS oldhatóságának 3D-s ábrája mg/ml-ben víz-etanol-etil-acetát oldószerhármásban

## 8.2 Kitozán-HSA-PSS szemcsék morfológiája

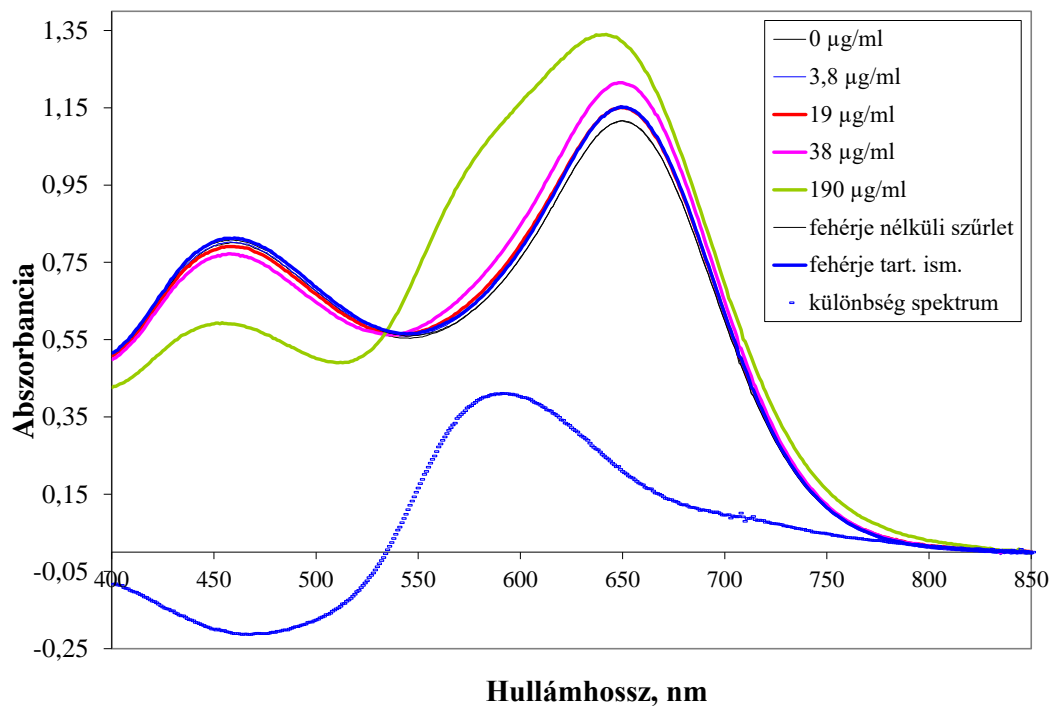
M.4. táblázat Kitozán- HSA- PSS szemcsék morfológiai tulajdonságainak bemutatása fénymikroszkópos felvételekkel

Kísérlet	Minőség	Jellemzők	Mikroszkópos felvételek	Nagyítás
I-10	1A*		<p>480 <math>\mu\text{m}</math></p> 	10X
II-25	1A	Jó stabilitású és majdnem szférikus szemcse	<p>1200 <math>\mu\text{m}</math></p> 	4X
II-28	1A			10X
II-29	1A			10X
II-26	1A			10X
II-2	1B	Rossz stabilitású, de majdnem szférikus szemcse		4X
II-21	1B			10X

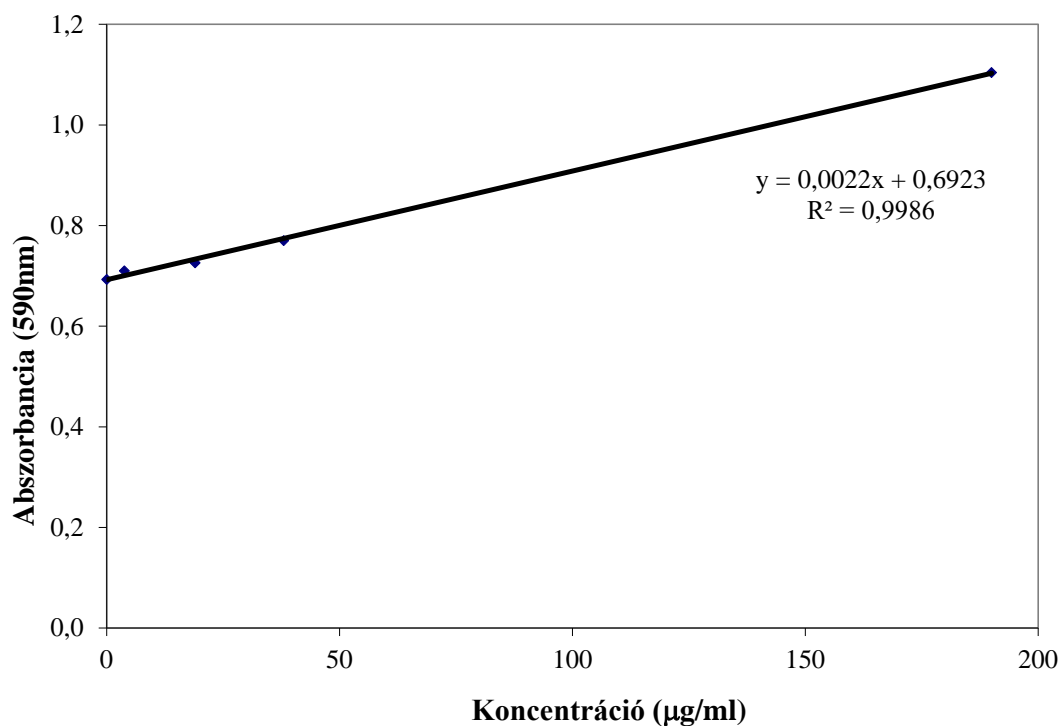
Melléklet

II-20	2B	Jó stabilitású, de kevésbé szférikus szemcse		4X
I-14	3A	Jó stabilitású, de összeolvadt agglomerátumok	SEM felvétel	
II-3	4A	Jó stabilitású, de szabálytalan alakú szemcsék		10X
II-4	4A			10X
II-23	4A			4X
II-24	4A			10X
II-27	4A			10X
II-1	4B	Rossz stabilitású és szabálytalan alakú szemcsék		10X
I-9	5B	Rossz stabilitású és laza csomók, mállási törmelékek	SEM felvétel	

### 8.3 Kitozán-HSA-PSS szemcsék fehérje tartalmának meghatározása



M.5. ábra. I-24 minta fehérjetartalmának meghatározása UV-VIS spektrumainak elemzéséből



M.6. ábra. I-24 minta fehérjetartalmának meghatározásához kalibrációs görbe

## **8.4 Kitozán, HSA és PSS oldatok töltés mennyiségének meghatározása**

### **8.4.1 Toluidinkékes titrálás**

A minták kitozánból és HSA-ból származó pozitív ionjainak kiegyenlítéséhez szükséges PSS mennyiségét toluidinkék oldat jelenlétében titrálással határoztam meg. A titrálendő minták úgy készültek, hogy az I-10 minta vizes fázisának komponensei közül csak kitozánt, ill. csak HSA-t, majd HSA-t és kitozánt együtt tartalmazó oldatot készítettem. Az így készült minták 0,2 ml-ét 20 ml-re felhígítottam, ezzel együtt a 2%-os PSS titráló oldat 0,2 ml-ét is 20 ml-re hígítottam 4%-os ecetsav oldattal. A titrálendő minták 20 ml-éből 2 ml mintát 60  $\mu$ l 0,03% (w/w)-os toluidinkéket tartalmazó oldat mellett titráltam.

Az abszorbancia változását az adagolt PSS oldat mennyiségének függvényében 600 és 635 nm-en olvastam le. A 635 és 600 nm-en mért abszorbancia különbségének változása 0,1-től -0,1-ig történik. A kitozánból, HSA-ból és a toluidinkékből származó pozitív ionok a PSS-hez kötődnek. Ahogy a PSS adagolásával a PSS elfogyasztja a kitozánból és a HSA-ból származó pozitív töltésű ionokat, úgy kötődik a PSS a toluidinkékhez. A toluidinkék kötődése PSS-hez színváltozással jár és a kapott titrálási lépcső az abszorbancia görbében a toluidinkék mérése PSS-el.

### **8.4.2 A PSS és a kitozán töltésarányának meghatározása**

Nasti és munkatársai munkája [151] nyomán toluidénkék (metakróm) indikátor mellett végzett titrálással határoztam meg, hogy adott kitozán és HSA tartalom mellett mennyi PSS-ből származó ellenionra van szükség az ecetsavas oldatukban jelenlévő pozitív töltések kiegyenlítésére.

A HSA izoelektromos pontja 5,1; molekulatömege 69 000 Da.  $\text{pH} < 5$ -nél a HSA pozitív töltést vesz fel, amelynek mennyisége monoton nő a csökkenő pH-val. Zeta potenciál mérésekből a Lorenz-Stokes összefüggés alapján a számított, nem kompenzált töltések száma becsülhető. A pozitív töltés maximuma a számítások szerint  $\text{pH} = 3$ -nál van és az értéke 7,9 [152]. Az 1%-os ecetsavas kitozán oldat pH-ja 3,3. A HSA a lehetséges maximális pozitív töltésszámhoz közeli töltés révén kötődhet.

## Melléklet

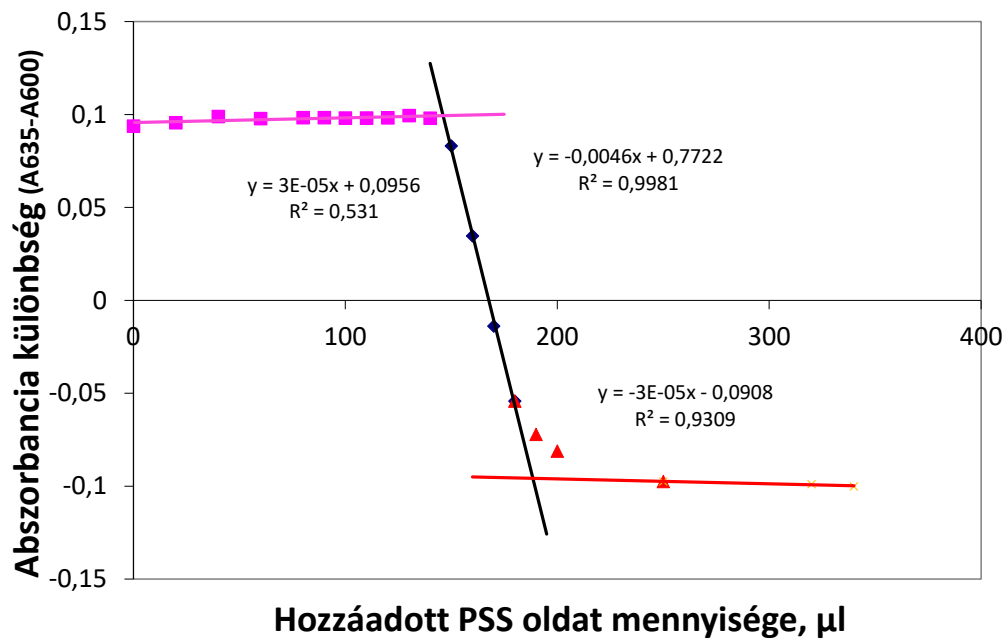
Ding és szerzőtársai munkája [153] megerősítette, hogy a 2%-os PSS oldatban  $\text{pH} = 2,67$ -nél szinte teljesen deprotonált formában van a polimer. A protonált és a deprotonált forma aránya  $\text{pH} = 1,96$ -nál 0,11, míg  $\text{pH} = 4$ -nél  $1,1 \cdot 10^{-3}$ .

A kitozán  $\text{pK}_a$  értéke kb. 6,3-nál van, ami szerint az ecetsav oldat  $\text{pH}$ -ján protonált állapotban vannak a deacetilezettségi %-tól függően jelenlévő amin csoportok. Egy a kereskedelmi forgalomban elérhető kitozán esetében a  $\text{pH}$ -t  $\text{pH} = 6$ -ról 4-re csökkentve, ha a polimer deacetilezettsége 88%, a töltéssűrűség (a töltéssel rendelkező monomerek száma) 59%-ról 88%-ra emelkedik [154].

Az irodalomban leírtak alapján tehát a kitozán és a HSA közös ecetsavas oldatában lévő pozitív töltésű csoportokat semlegesíthetjük az ecetsavas oldatában teljesen deprotonált polisztirol-szulfonát csoportokkal. A semlegesítés folyamata követhető toluidinkék festék jelenlétében.

Ziółkowska és munkatársai [155] nátrium-dodecil-szulfátot-ot titráltak toluidinkékkel. A toluidinkék vízben mért abszorbancia csúcsai 635 és 597 nm-nél vannak. A 635 nm-es csúcs a monomer csúcsa, az 597 nm a dimer csúcsa. Mahmoud és munkatársai PPS-Na kölcsönhatását vizsgálták a toluidinkékhez nagyon hasonló metilénkéssel UV-vis spektrofotometriásan [156]. A spektrális változások összehasonlíthatók a pozitív töltések PSS-sel titrálásakor tapasztaltakkal toluidinkék jelenlétében.

Titrálást végeztem kitozán és kitozán–HSA tartalmú oldatokban, ill. HSA tartalmú oldatokkal. Nasti és munkatársai munkája [151] alapján toluidinkék festék jelenléte mellett PSS oldat adagolásával a 635 és 600 nm-en mért abszorbanciák különbségét az adagolt térfogatok függvényében ábrázolva nyerjük a titrálási görbéket. A négy titrálási görbét összehasonlítva a lefutásuk jellege megegyezik. Egy jellemző titrálási görbe látható az M.7. ábrán.



M.7. ábra. Kitozán oldat titrálása PSS oldattal toluidinkék mellett

Mivel az abszorbanciaváltozás a toluidinkék PSS-hez kötődéséből adódik, ezért a kitozánra és a HSA-ra külön-külön és együttesen fogyó PSS mennyiségek a titrálási görbe kezdeti kis meredekségű szakaszára (lila pontok), ill. a toluidinkék színváltozását mutató meredek szakaszra illesztett egyenesek metszéspontjából (fekete vonal) határozhatók meg. Ennek analógiájára pl. a kitozánra és a toluidinkékre együttesen fogyó PSS mennyiség a titrálási görbe befejező, közel vízszintes szakaszának illesztésből kapott egyenes (piros vonal) és az előbbi (fekete) meredek szakasz metszéspontjából kapható meg.

Az ábrán lévő titrálási görbe kiméréséhez az I-10 mintának megfelelő vizes fázist úgy mértem össze, hogy tartalmazza az adott mennyiségű kitozánt HSA nélkül, 9,8 mg/ml koncentrációban, majd 100x-ára hígítottam és ezt az oldatot titráltam szintén 100x-ára hígított PSS oldattal. A lila és a fekete egyenesek metszéspontjaként 146,1 µl titer adódott. A fekete és piros metszévonal pedig 189,3 µl titernél található. A toluidinkékre számítható PSS titer tehát a két fogyás különbségeként 43,2 µl (M.8. táblázat). Ugyanezt a titrálást elvégeztem a kitozán és HSA együttes jelenléte esetében, ahol a kitozán 0,098 mg/ml, a HSA 0,0097 mg/ml koncentrációban volt jelen a 100x hígítás után. Az előzőkkel összhangban a toluidinkékre a fogyás különbségekből 45,4 µl-t kaptam. Nasti és munkatársai a toluidinkékes titrálást a kísérleteikben alkalmazott kitozán

deacetilezettségi fokának megállapítására használták. Az irodalomban ismert meghatározás és számolás [157] az általam használt kitozánra a gyártó által megadott nagyobb, mint 85%-os értékkel jó egyezést mutató 83%-ot adott. Ez az eredmény is azt bizonyítja, hogy a 4%-os ecetsav pH-ján a deacetilezettségi % szinte teljesen megegyezik a megadott értékkel.

**M.8. táblázat. A PSS oldat fogyása ( $\mu$ l) kitozán, kitozán-HSA és HSA oldatokra**

Titrálándók	PSS fogyás, $\mu$ l	Teljes fogyás, $\mu$ l	A teljes és a PSS fogyásból számított toluidinkék fogyása, $\mu$ l	Átlagos toluidinkék fogyással visszaszámolt PSS fogyás, $\mu$ l
Kitozán	146,1	189,3	43,2	
HSA	41,1	97,7	56,6	53
Kitozán_HSA együttesen	207,8	253,2	45,4	
2x mennyiségű HSA	77,6	130,1	52,5	86

A HSA oldatot önmagában mérve azonban már nem ennyire egyértelmű a helyzet. A HSA egyszeres mennyiség (0,0097mg/ml) vizsgálatánál a titrálási görbében tapasztalható egy ugrás a meredek szakaszon. A számolások is jelzik annak lehetőségét, hogy két egymásba olvadó lépcső írja le a pozitív töltések fogyásának folyamatát. Ha egy lépcsőként tekintünk a titrálási görbére, akkor a HSA-ra 41,1  $\mu$ l fogy, míg az össztiter 97,7  $\mu$ l-nek adódik. A különbség azonban nagyobb érték, mint amit korábban a toluidinkékre, mint titer meghatároztam. Ha a kitozános mérésekből a toluidinkékre kapott titereket átlagolom és így 44  $\mu$ l titerrel számolok, akkor a HSA-ra 53  $\mu$ l PSS kellene, hogy fogyjon. Sigmoid görbét illesztve a titrálási görbe első szakaszára 52,7  $\mu$ l-es értékkel az illesztés jóságára az  $R^2$ -re 0,996-ot kaptam. Valószínűsíthető, hogy a HSA töltéseinek semlegesítése két lépcsőben zajlik. Egy további mérést is elvégeztem kétszeres mennyiségű (0,018mg/ml) HSA jelenlétében. Ebben az esetben nem tapasztaltam többlépcsős titrálási görbét, így 44  $\mu$ l titerrel számolva a toluidinkékre a kapott 86  $\mu$ l kicsit több mint a kétszerese a korábban az egylépcsősnek tekintett görbéből számított 41,1  $\mu$ l-nek. A titrálások során az összetevők által a rendszerbe összesen adott pozitív töltések mennyisége nem egyértelműen additív. Különösen a HSA esetében ennek több

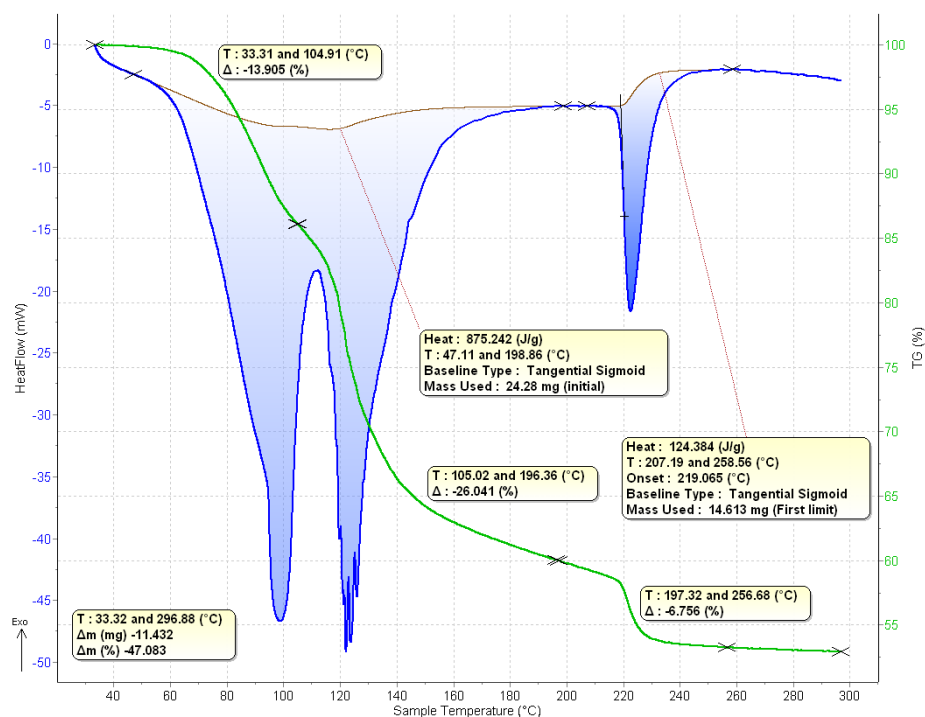


## Melléklet

oka is lehet, egyrészt a titrálás során a változó ionerősség is, másrészt a titrálás sebessége is befolyásolhatja a PSS számára elérhető töltések számát.

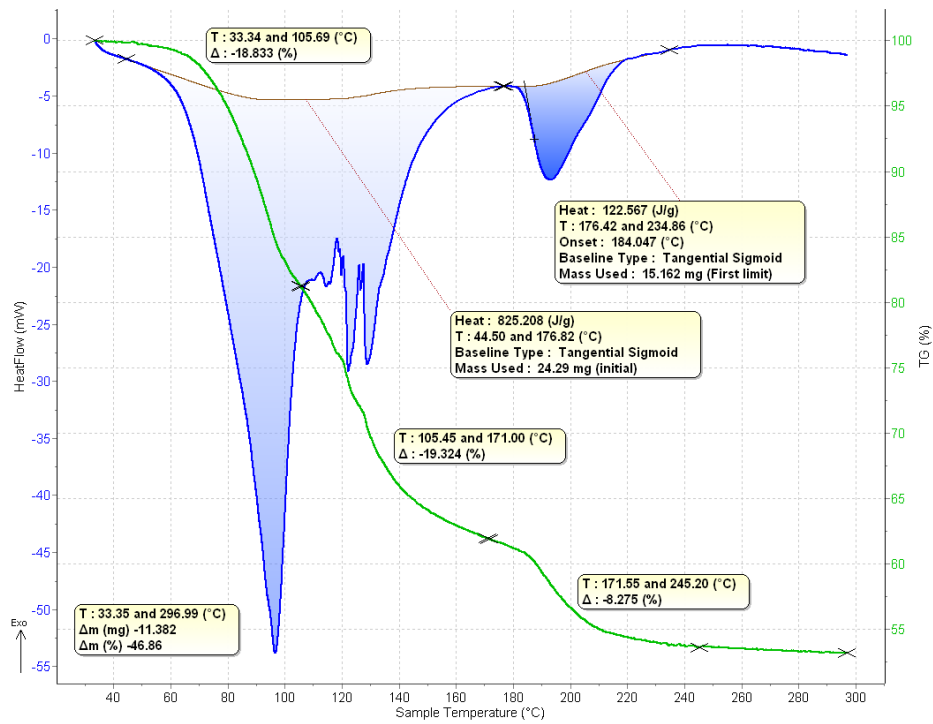
A mérések, majd a számítások alapján a KPH-10 minta esetében a bemért 1,15 ml 1% kitozán és 0,3 ml HSA oldatokban lévő töltések kiegyenlítéséhez szükséges PSS oldat mennyisége 0,81 ml, amelynek közel másfélszeresét 1,15 ml 2% oldatot alkalmazva állítottuk elő a szférikus agglomerátumokat. A töltés kiegyenlítés meghatározása során tapasztaltak szerint a megfelelő feleslegben alkalmazott PSS ellenionnal egyértelműen elérhettük a töltések semlegesítését.

### 8.5 Tímsó agglomerátumok DSC diagramjai

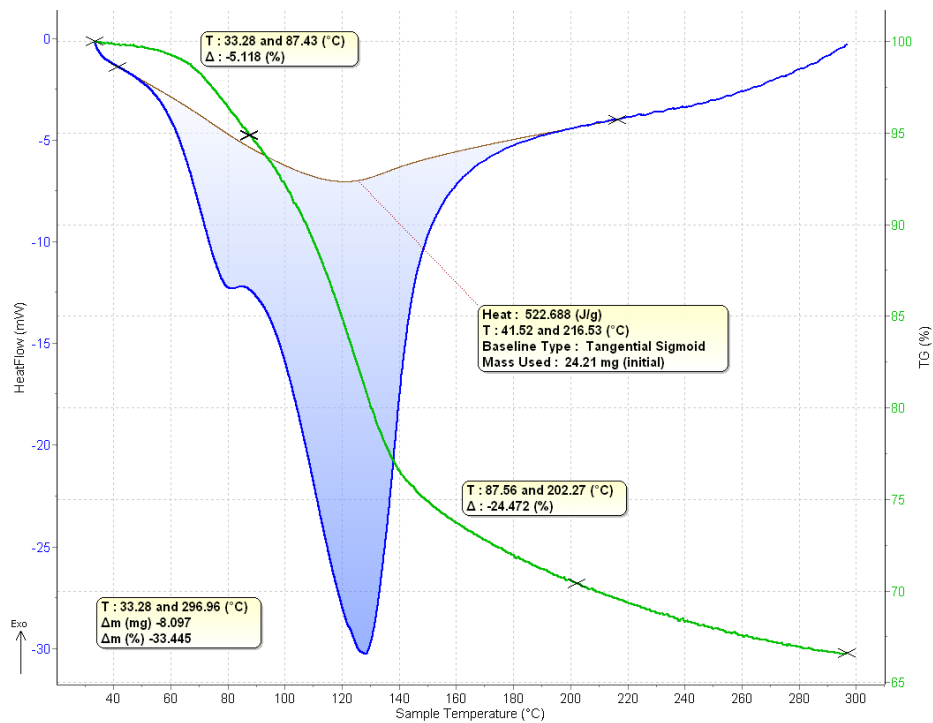


M.9. ábra.  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  DSC diagramja

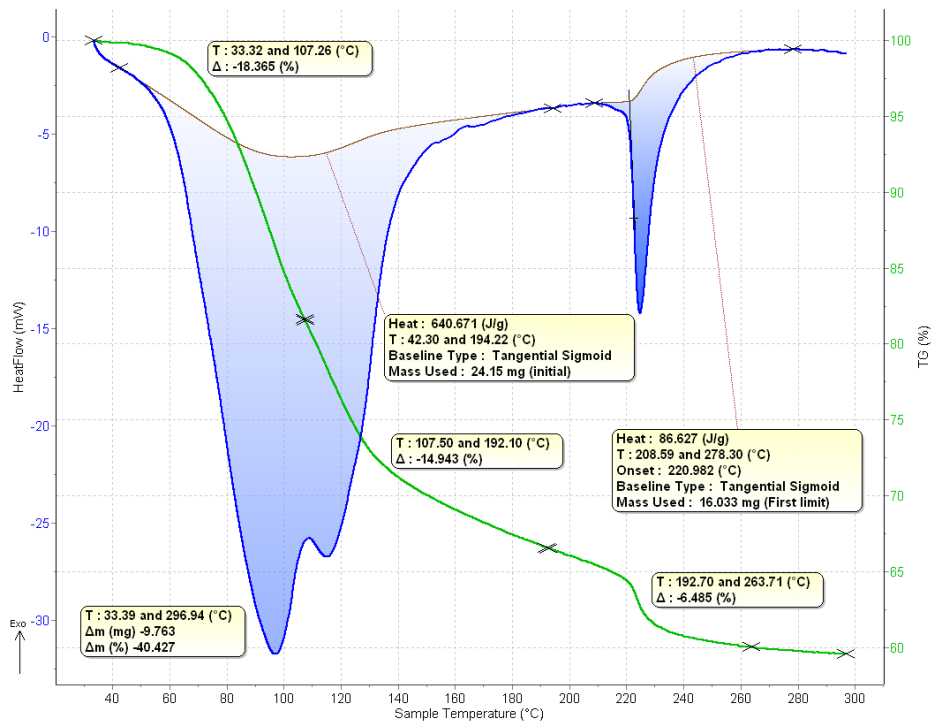
## Melléklet



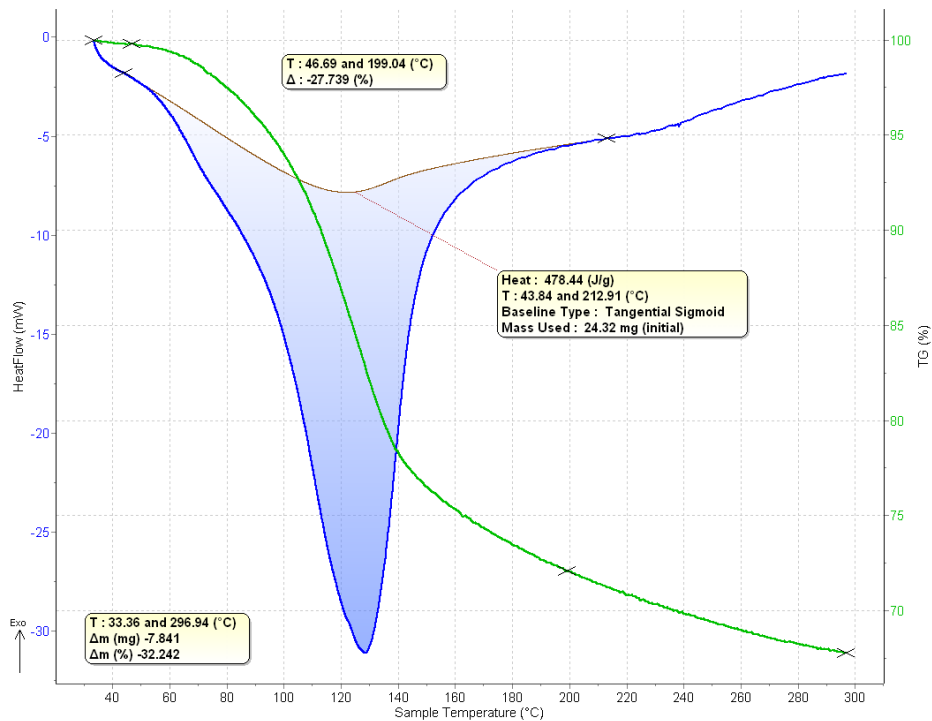
**M.10. ábra. KAI26 DSC diagramja**



**M.11. ábra. KAI61 DSC diagramja**



M.12. ábra. KAl63 DSC diagramja

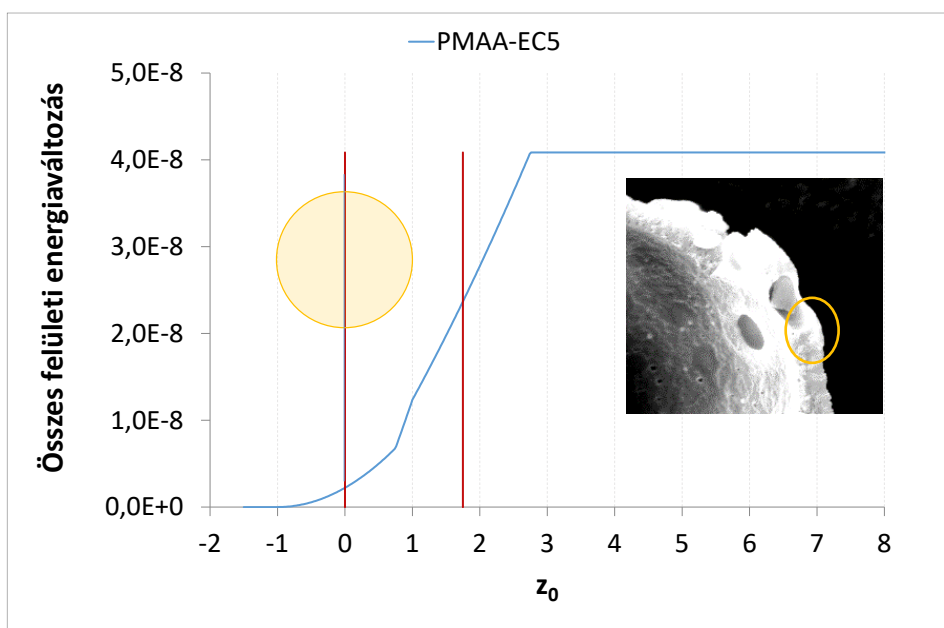


M.13. ábra. KAl66 DSC diagramja

## 8.6 Felületenergia-görbék

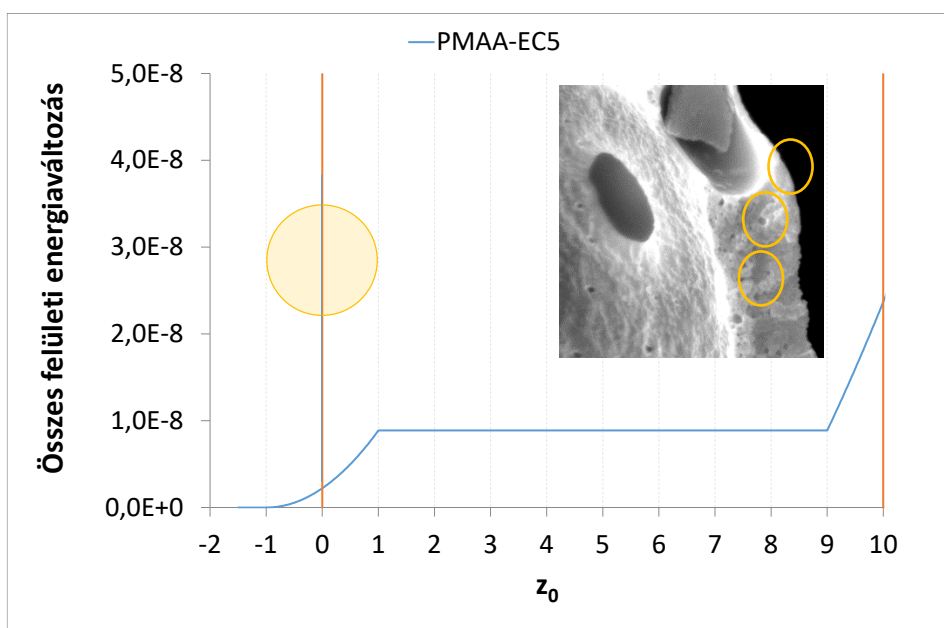
### 8.6.1 További felületenergia-görbék PMAA emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezésére

A 8  $\mu\text{m}$ -es olajcsepphez tartozó  $d/R_0=1,75$ -höz modellezett energiagörbe alapján (M.14. ábra), ahol az 5  $\mu\text{m}$ -es csepphez képest már nem jelenik meg a vízszintes szakasz, a filmben előrehaladásnak kisebb a valószínűsége, átszakítja a filmet, de nem tud átjutni a filmnek az emulgeátor oldat felőli oldalára.



M.14. ábra. A héjszerkezetben a kb. 8  $\mu\text{m}$ -es olajcsepphez tartozó felületenergia-görbe

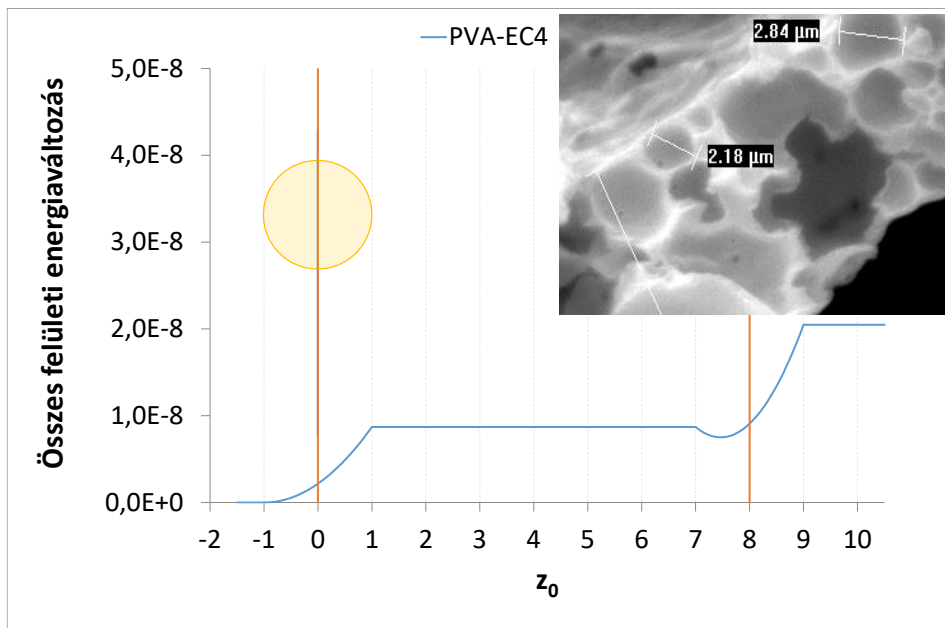
Végül egy kb. 1,4  $\mu\text{m}$ -es olajcseppre az energiagörbe szerint (M.15. ábra), ha a csepp eléri a filmet, akkor be is nyomhatja, átlyukasztja a héj belső falát, sőt a film szinte teljes vastagságán végighaladhat energiaváltozás nélkül. A héj viszkozitásának növekedésével különböző pontokon rekedhet meg a héjban, de ahhoz, hogy átjusson az emulgeátor felőli oldalára a filmnek további energiátöbbletre lenne szüksége.



M.15. ábra. A héjszerkezetben a kb. 1,4  $\mu\text{m}$ -es olajcsepphez tartozó felületienergia-görbe

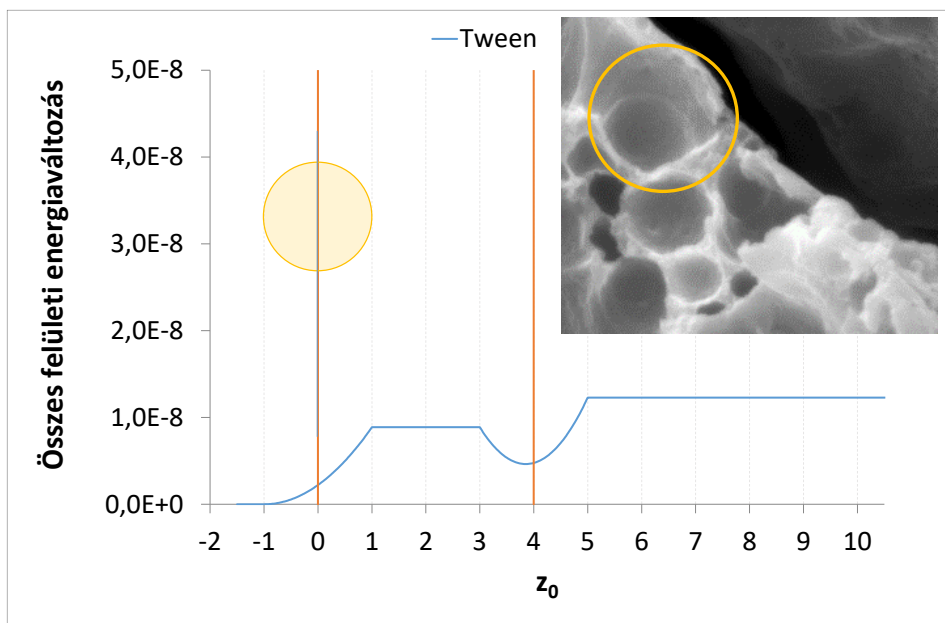
### 8.6.2 További felületienergia-görbék PVA emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezésére

Az M.16. ábrán a kinagyított képen látható 2,18 és 2,84  $\mu\text{m}$  méretű olajcseppek benyomják a filmet, sőt az egyik – leküzdve az első energiagátat – beljebb is jut a filmben, bár nem lyukasztja ki a túloldalra. A felületienergia-görbe a 4,6  $\mu\text{m}$ -es cseppéhez hasonló lefutású, de hosszabb az a szakasz, ahol nem változik az energia, vagyis hosszabb utat tehet meg az olajcsepp a méretéhez képest szélesebb polimerfilmben. A növekvő viszkozitás és a kialakuló energiaminimum miatt az ilyen méretű olajcsepp valószínűleg nagyrészt megragad a filmben, és nem kerül a filmen túlra így porózus héjat hozva létre.

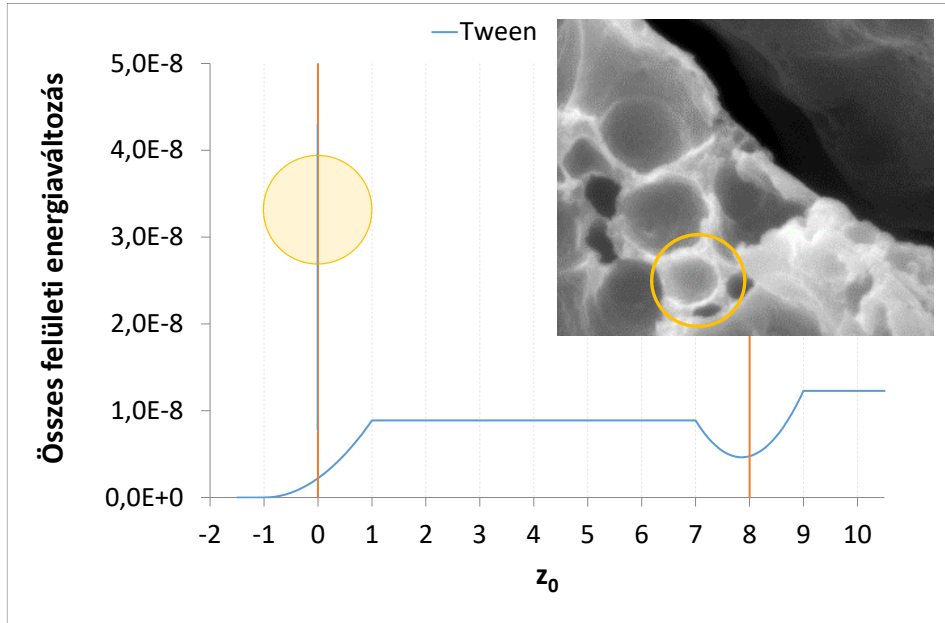


M.16. ábra. A héjszerkezetben egy 2,51  $\mu\text{m}$ -es olajcsepphez tartozó felületenergia-görbe

### 8.6.3 További felületenergia-görbék Tween 80 emulgeátorral készült szemcsék porozitásának modellezésére



M.17. ábra. A héjszerkezetben az 5  $\mu\text{m}$ -es olajcsepphez tartozó felületenergia-görbe



M.18. ábra A héjszerkezetben a 2,5  $\mu\text{m}$ -es olajcsepphez tartozó felületenergia-görbe