

# A nanotechnológia mint új irányvonal a hatóanyagkristályok formulálásában

AMBRUS Rita, POMÁZI Anita és SZABÓNÉ RÉVÉSZ Piroska\*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet, Eötvös utca 6, Szeged

## 1. Bevezetés

Az utóbbi években a gyógyszer technológia új és kiemelten fontos irányvonalává vált a nanotechnológia. Az elmúlt tíz év nanorészecskékkel foglalkozó kutatásai igazolták a gyógyszerészeti alkalmazások fontosságát. A nanotechnológiai módszerek fejlesztése és alkalmazása a hatóanyagkristályok formulálása területén, illetve az alapanyag-gyártásban mindenképpen indokolt. A rossz vízoldékonyságú hatóanyagok oldódási sebességének növelése fontos az optimális biohasznosíthatóság szempontjából. A farmakon oldódási sebessége alapvetően az oldékonyság és a részecskeméret függvénye. A kedvezőtlen vízoldékonyságú hatóanyagokról szóló tanulmányok igazolják, hogy a részecskeméret mikrométer alatti tartományba való csökkentésével lehetőség adódik arra, hogy lényegesen javuljon a biohasznosíthatóság, esetenként az alkalmazott dózis, s ezzel a mellékhatások is csökkenthetőek.<sup>1-3</sup>

A modern gyógyszer technológia célja olyan készítmények formulálása, amelyek hatóanyaga megfelelő helyen és időben maximális hatásossággal rendelkeznek. Ebben a megközelítésben a rossz vízoldékonyságú összetételeket nanométeres tartományba tartozó részecskékké alakítják. Az alkalmazott technológiai eljárásokkal a nanorendszerek sajátos jellemzők révén különféle csoportokba sorolhatóak. Az ipar számára elsősorban nanokristályokat, nanokristályos rendszereket javasolt formulálni. Néhány olyan gyógyszer, ami korábban nem felelt meg a klinikai vizsgálatokon (pl. generikumok), újra lehetne formulálni nanotechnológiai módszerek segítségével. A legnagyobb baj ezekkel a hatóanyagokkal az, hogy nehezen oldhatóak fel és/vagy rossz a felszívódásuk. Ha azonban nanokristályokba rendezzük őket, vagyis molekuláris méretű (100-1000 nm) kristályos rendszert hoznak létre, máris kiküszöbölhető az oldékonyság és a permeabilitás problémája. Nanokristályok formulálásával megcélozható az intranazális és a pulmonáris terápia is. Pulmonáris gyógyszerbevitelben is alkalmazható a nanorészecske, megfelelő hordozó segítségével, amelyeket porként (száraz porinhalátor) vagy szuszpenzióként formulálnak. Ezek a nanokristályokat hordozó rendszerek könnyen irányíthatóak a légutakban, így olyan betegségek kezelésében is alkalmazhatóak, mint az obstruktív tüdőbetegségek, a genetikai zavarra visszavezethető kórfolyamatok, és olyan fertőző légúti megbetegedések, mint a tuberkulózis. Közismert, hogy a hatóanyagok központi idegrendszerbe jutását a vér-agy -gát megakadályozza. A nanokristályos rendszerek intranazális alkalmazása újabb lehetőségeket biztosít pl. a farmakonok szaglóideg mentén történő agybajuttatására.<sup>4</sup>

*Jelen tanulmány a nanokristályok formulálásának lehetőségeit mutatja be, valamint protokoll megadásával szemlélteti az előállítás lépéseit. Kísérletes munkánk pedig rossz vízoldékonyságú modell hatóanyag szemcseméretének nanoméret-tartományba csökkentését célozza meg "top down" módszer alkalmazásával.*

## 2. Előállítási módszerek

A nanokristályok előállításának két lehetséges módja a felépítő „bottom up” és a részecske leromboló „top down” technológia.<sup>5</sup> A felépítő molekuláris szintről kiindulva, kivált nanorészecskéket eredményez a rendszerben, míg a leépítő technológia dezintegráló műveletnek tekinthető. Az 1. táblázat előállítási eljárás alapján összegzi a nanotechnológiai módszereket.<sup>6</sup>

### 2.1. Felépítő (bottom up), precipitáción alapuló eljárások

Az utóbbi néhány évben kerültek igazán a gyakorlatba a hatóanyag-precipitációra épülő technikák, illetve eljárás kombinációk. Minden módszer a hatóanyag oldatából indul ki és a megfelelő kicsapószer és/vagy stabilizáló oldat alkalmazásával van mód, precipitálás által, a nanomérettartomány elérésére.<sup>7</sup> A változatosság az alkalmazott energia közlés módjában (ultraturax, nagyintenzitású ultrahang, nagy nyomású homogenizátor), az oldószer eltávolításának lehetőségeiben (porlasztva szárítás, liofilezés, vákuumszárítás) rejlik. Ez alapján a főbb technikák közé az oldószer/emulzió diffúzió és az SCF (szuperkritikus folyadékok) eljárások tartoznak.<sup>8,9</sup> Az ún. emulzió/oldószer diffúzió módszer alkalmazásakor ki kell választani azt a vízzel részben elegyedő oldószert, amelyben a hatóanyag jól oldódik. Az első lépésben alkalmazott stabilizáló oldattal mikroemulzió képződik - ahol a hatóanyag oldott formában van az emulgeált cseppekben -, amelyet a második lépésben vízzel kell hígítani addig, amíg az oldószer-víz teljes elegyedése következtében a hatóanyag-nanokristályok kiválása megtörténik.

### 2.2. Részecske romboló, leépítő (top down) eljárások

A mechanikai hatáson alapuló, részecske romboló eljárások dezintegrációs erők hatása révén, alapvetően két fő irányvonalat képviselnek: őrlés és nagy nyomású homogenizálás. A hagyományos száraz őrléses eljárások 1–10 µm szemcseméret tartományban használhatóak. A

\* Főszerző. Tel.: 06-62-545-575 fax: 06-62-545-571; e-mail: revesz@pharm.u-szeged.hu.

nanorészecskék eléréséhez és stabilizálásához azonban mindenképpen nedves őrlésre van szükség. Liversidge és munkatársai vizsgálták először azokat a paramétereket, amelyek elég energiával rendelkeznek ahhoz, hogy a kristályos hatóanyagból nanorészecskék keletkezzenek.<sup>10</sup> Célszerű a folyamatot szakaszosan végezni, mivel a nagy energia következtében a rendszer túlmelegedhet, éppen ezért a hőmérséklet ellenőrzése feltétlenül szükséges (< 40 °C). A nedves őrlés előnyösen alkalmazható eljárás, mivel egyszerű, alacsony költségű és üzemeshető. Azonban, mindenképpen hátrányai közé tartozik a polimorf átalakulás, anyagszennyezés és a polidiszperzitás. A nagy nyomású homogenizálás alkalmazása igen közkedvelt technika nanoszuszpenziók előállítására, laboratóriumi és nagyüzemi méretben egyaránt, szemben a mikrofluidizálással, ahol a tapasztalatok azt mutatták, hogy igen sok 50–100 ciklus után is a szemcsék 50 %-a 2–3 µm-es tartományba esett.

1. Táblázat. A nanokristályok előállításának fő irányvonalai.

Fő módszerek	„Bottom up”	Kombináció	„Top down”	
	Precipitáció	Homogenizálás majd precipitáció	Őrlés/ Nedves őrlés	Nagynyomású homogenizálás
Eljárások	1. oldószer/emulzió- diffúzió módszer	1. kombinációk	1. őrlés	1. piston-gap homogenizáció
	2. SCF-szuperkritikus folyadék technológia		2. golyós őrlés	2. CFC-kontrollált áramlásos kavitáció nagy intenzitású ultrahanggal
Nanorészec- ke típusa	Hydrosol® Nanomorph™	Nanoedge™	Nanocrystal™	Dissocubes®- vizes közeg Nanopure®- nemvizes közeg, kevert közeg

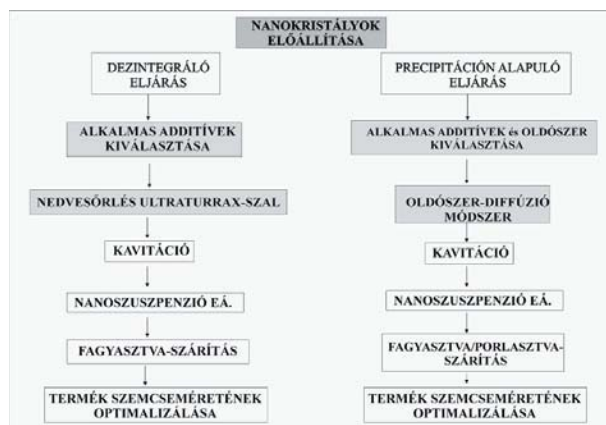
### 2.3. Emulgeáláson alapuló módszerek (kombinált eljárások)

Az o/v és v/o mikroemulziók alkalmazása szintén jól bevált, közkedvelt módszer elsősorban szilárd-lipid nanorészecskék, illetve nanoszuszpenziók előállítására. A stabilizáláshoz szintén emulgenseket, polimereket lehet alkalmazni. A módszer speciális változata az „olvadék emulgeálás” eljárás, alacsony olvadáspontú hatóanyagok esetén. Itt a vizes stabilizáló oldatban szuszpendáljuk a hatóanyagot, majd a rendszert felmelegítjük a hatóanyag olvadáspontja fölé. Ezt követően energiaközléssel mikro-emulzió készül majd a nanorészecskék hűtéssel nyerhetőek.<sup>9</sup>

### 2.4. Előállítási protokoll

A nanokristályok formulálásával kapcsolatos eddigi kísérletes munkánk alapján ún. előállítási protokollokat dolgoztunk ki mind a dezintegráló „top down”, mind a precipitáción alapuló „bottom up” módszerre (1. ábra). A termékészítések során különböző hordozokat (mannit, trehalóz, laktóz) és stabilizálókat (polivinilpirrolidon, Tween 80, Poloxamer 188) alkalmazunk a nanokristályok egyediségének biztosítása céljából. Jelen közleményben a dezintegráción alapuló módszerrel kapott eredményeket mutatjuk be.

A nagy nyomású homogenizálási eljárás során egy ún. preszuszpenzió vagy -emulzió nagy nyomás hatására megy keresztül a szabályozható, szűk nyílású szelepen. A szűkítésben a nagy nyomáskülönbség hatására a minta rendkívüli módon felgyorsul (2–300 m/s), ezáltal erős mechanikai hatások lépnek fel (kavitáció, nyírás, ütközés), amelyek szemcse/csepp méret csökkentést eredményeznek. Ezenkívül gázbuborékok is keletkeznek, amelyek a szűkítésből kiérve, a nyomáscsökkenés következtében berobbannak, ezzel nanoszuszpenziót ill. mikroemulziót képezve. Általában három fő lépés különíthető el a nagy nyomású homogenizálás során: előkeverés ultraturrax-al, alacsony nyomású és nagy nyomású őrlés. A nyomás, hőmérséklet és átréselési ciklusok számának változtatásával szabályozható a művelet hatásossága.<sup>11</sup> A fő limitáló tényező egyes esetekben az, hogy az anyag kristályszerkezete megváltozik és nő az amorf frakció, amely stabilitási problémákat eredményezhet.



1. Ábra. Alkalmazott előállítási protokollok.

### 3. Kísérleti rész

Az általunk alkalmazott modell hatóanyag a meloxicam volt, amely egy nem-szteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító szer. A farmakon rossz vízdoldékonyságú, ezért a szemcseméret nanométeres tartományba való csökkentése feltétlenül indokolt az oldhatóság és biohasznosíthatóság javítása céljából.<sup>12-14</sup>

2. Táblázat. A termékkészítés jellemző paramétereit.

Termékek	Összetétel	Diszperziós közeg/Oldószer	Eljárás	Kavitáció	Szárítás
T1	MEL, Mannit, PVP K-25	víz	Dezintegráló nedvesörlés	Nagynyomású homogenizátor	liofilizálás
T2	MEL, Mannit, Tween 80, PVP K-25	víz	Dezintegráló nedvesörlés	Nagynyomású homogenizátor	liofilizálás

### 3.1. Anyagok

Meloxicam (MEL): EGIS Ltd., (Budapest, Hungary); Polyvinylpyrrolidone (PVP) K-25: BASF (Ludwigshafen, Germany); Tween 80 (polysorbate 80) és  $\beta$ -D-mannit: Pannon Pharma Rt, Hungary.

### 3.2. Előállítás dezintegráló műveletekkel

Nedvesörlés alkalmazásával 1 g mannit, 1g MEL és 0,25g PVP K-25 (T1) vagy 0,25g PVP K-25+0,05g Tween 80 ad 20 ml víz (T2) tartalmú preszuspenziót ultraturaxszal (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Germany) 24000 fordulatszámon 20 percig kezeltünk. A nanoméret-tartományt nagynyomású homogenizátor (APV-2000, Invensys, Denmark) alkalmazásával 1000 bar nyomáson, 15 ciklussal értük el. A nanokristályok szárítása liofilizációval (Crist Beta 1-8 K, Germany) történt. A termékkészítés jellemző paramétereit a 2. táblázat foglalja össze.

## 4. Vizsgálati módszerek

### Szemcseméret-megoszlás, morfológia

A kristályok méretét és méreteloszlását Malvern Mastersizer méretanalizátorral (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) végeztük (300 RF, MS14 diszpergáló feltét).

A szemcsék morfológiáját pásztázó elektron mikroszkóppal vizsgáltuk (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán). A szemcsék bevonása a Bio-Rad SC 502 (VG Microtech, Anglia) készülékkel történt, a termékek felületén az elektromos vezetés kiváltására 1,3-13 mPa nyomású levegőt alkalmaztunk.

### Szerkezeti sajátosságok

A DSC méréseket Mettler Toledo STAR<sup>o</sup> termoanalitikai készülékkel végeztük (Mettler Toledo DSC 821<sup>o</sup> thermal analysis system, STAR<sup>o</sup> thermal analysis program V9.0 Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc), argon gáz átáramoltatásával (10 l/óra). A vizsgálatokat 2–5 mg-os mintával 25–300 °C között, 5 °C /perc fűtési sebességgel végeztük.

A mintákban lévő hatóanyag kristályos állapotát por-röntgen diffraktometriával határoztuk meg (Miniflex II Rigaku por-

röntgen diffraktométer, Rigaku Co. Tokyo, Japan). A mérési paraméterek a következők voltak:  $\text{CuK}\alpha = 1,5405 \text{ \AA}$ ; 30 kV; 15 mA.

### In vitro kioldódás

A vizsgálathoz a Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos forgólapátos kioldókészüléket használtuk. A méréseket 100 ml foszfát pufferben pH = 7,4 végeztük. 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 és 120 perc után 5-5 ml mintát vettünk – ezt a kioldó közeggel pótoltuk – szűrés (0,2  $\mu\text{m}$ ) és hígítás után ATI UNICAM UV-VIS spektrofotométerrel  $\lambda = 362 \text{ nm}$  hullámhosszon a hatóanyagtartalmat meghatároztuk.

## 4. Eredmények értékelése

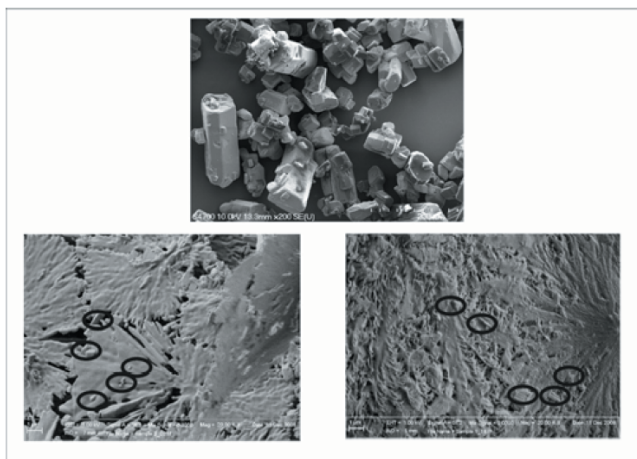
### Szemcseméret-megoszlás, morfológia

Elvégeztük a hatóanyag szemcsék méretének meghatározását (3. táblázat). Összevetve a kiindulási MEL 86  $\mu\text{m}$ -es átlagos szemcseméretét a termékekben található MEL méretével, szignifikáns változást tapasztaltunk. A dezintegráló eljárás a megadott összetételekkel alkalmas volt a hatóanyag nanonizálására. Az eredeti mérethez képest a szemcsék 60%-a nano-mérettartományba esett, valamint a specifikus felület 140-szeresére növekedett, ezzel előre vetítve a kioldódás és permeabilitás javulását is.

3. Táblázat. Hatóanyag és termékek szemcseméret-megoszlása és specifikus felülete.

Termékek	D(v,0,1) $\mu\text{m}$	D(v,0,5) $\mu\text{m}$	D(v,0,9) $\mu\text{m}$	Spec. fel. $\text{m}^2\text{g}^{-1}$
MEL	24,80	86,39	237,92	0,09
T1	0,14	0,42	3,00	12,53
T2	0,14	0,96	6,34	10,20

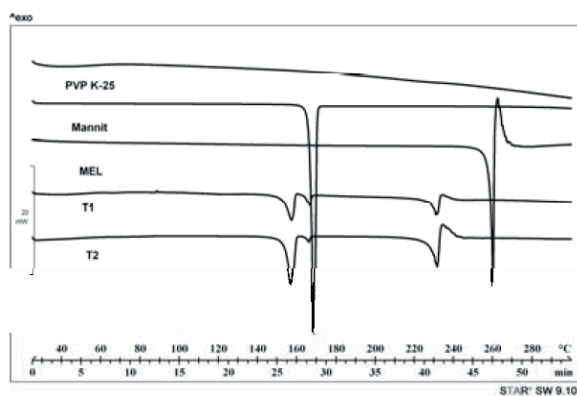
Az elektronmikroszkópos felvételek célja, a hatóanyag eloszlásának és habitusának jellemzése. A felvételek jól szemléltetik, hogy a kiindulási MEL-re oszlopos jellegű, hexagonális kristályhabitus jellemző. A felvételen jól látszik a mannit irányított kristályosodása és mind a T1 mind a T2 mintákban az egyenletesen eloszlott hatóanyagkristályok (2 ábra).



2. Ábra. MEL és a termékek elektronmikroszkópos felvételei.

### Szerkezeti sajátosságok

A minták szerkezetét termikus analízissel jellemeztük. A  $\beta$ -D-mannit esetében az olvadáspont  $165\text{ }^{\circ}\text{C}$ , míg a PVP amorf sajátosságát mutatja, hogy görbéjén olvadás nem látható. A hatóanyag DSC görbéjén  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál éles endoterm csúcs detektálható, amely olvadáspontját jelzi, majd az ezt követő exoterm csúcs alapján rekrisztallizációt állapítottunk meg. A vizsgálattal igazoltuk, hogy a termékekben mind a MEL, mind a vivőanyag kristályos formában van. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a MEL olvadáspontja  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -kal csökkent, többek között a jelentős méretcsökkenés miatt. A mannit esetében a fagyasztva-szárítás a  $\beta$ -D-mannit módosulat  $\delta$  polimorf módosulatát eredményezte (3. ábra).



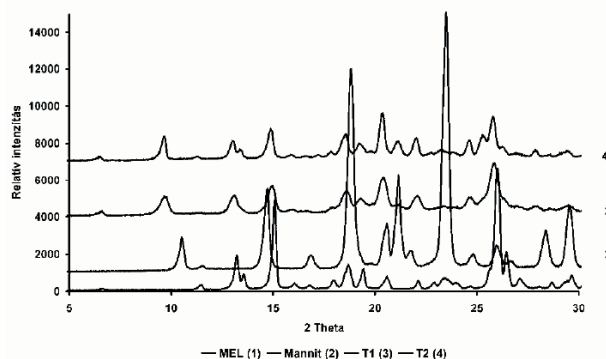
3. Ábra. MEL, segédanyagok és termékek DSC görbéi.

A por-röntgen felvételek alapján igazoltuk, hogy a hatóanyag a termékekben kristályos formában van, illetve, hogy a hordozó liofilezése valóban  $\delta$  módosulat keletkezését eredményezte (4. ábra). A meloxicam kristályosságát jellemző csúcsok  $13,22, 15,06, 26,46$  és  $26,67\text{ }2\theta$  értékeknél olvashatók le. A mannit két kristálymódosulata por-röntgen segítségével is azonosítható.

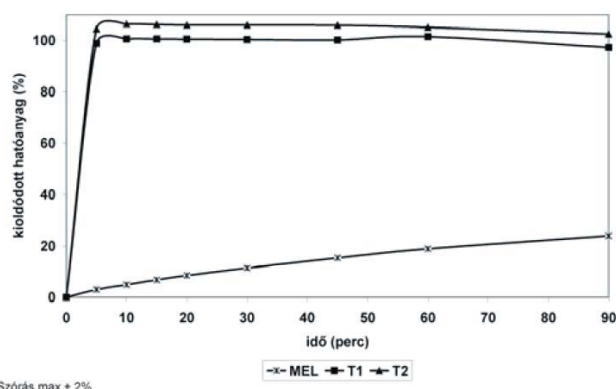
### In vitro kioldódás vizsgálat

A termékek kioldódása szignifikánsan növelte a kiindulási farmakonhoz viszonyítva (5. ábra). A kioldódás sebessége

a hatóanyag esetén elhúzódó, a vizsgálati idő alatt a bemért MEL kevesebb, mint 30%-a oldódott fel. A T1 és T2 termékek kioldódási profilján a burst-effect figyelhető meg, azaz az első 5 percben a farmakon 100%-a robbanásszerűen oldódik ki.



4. Ábra. MEL, mannit, T1 és T2 termékek por-röntgen felvételei.



5. Ábra. MEL és termékek in vitro kioldódása.

### 6. Összegzés

Összegzésképpen elmondható, hogy az általunk választott modellanyag esetén a dezintegráló módszer alkalmazható szubmikroszkópos szemcseméret elérésére. A dezintegráló eljárások előnye, hogy oldószermentes, azonban a szükséges energia biztosítására nagynyomású homogenizátorra van szükség. A nanokristályok előállításához minden esetben elővizsgálatok sorozatára van szükség, hogy a megfelelő hatóanyag-segédanyag kombinációkat, megfelelő eljárási paraméterekkel kombináljuk. A hatóanyag szemcseméret-megoszlása alapján a részecskék 60%-a nano mérettartományba esett. Az in vitro kioldódási vizsgálatok pillanatszerű 90-100 %-os hatóanyag felszabadulást mutattak. Ezen kísérletek alapján a továbbiakban a dezintegráló eljárások alkalmazása javasolt nanokristályos MEL tartalmú gyógyszerformák előállítására.

### Köszönetnyilvánítás

A munka megvalósítását a Magya-Szlovén Kormányközi kooperáció (TÉT) mobilitási project (HU-SLO-7/2006) tette lehetővé.

### Hivatkozások

1. Leuner, C.; Dressmann, J. *Eur. Pharm. BioPharm.* **2002**, *54*, 107–112.
2. Antal, I. *Acta Pharm. Hung.* **2006**, *2*, 95–103.
3. Dexler, E. *Engines of Creation*, Anchor Books: New York, **1986**.
4. Pison, U.; Welte, T., et al. *Eur. J. Pharm.* **2006**, *533*, 341–350.
5. Kreuter, J. *Encyclopedia of Pharmaceutical technology*, Dekker: New York **1994**, Vol. 10, p.165.
6. www.pharmtech.findpharma.com: Kharb, V. et al **2006**.
7. Hu, J. et al. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2004**, *30*, 233–245.
8. Ambrus, R. és munkatársai, *Gyógyszerészet* **2006**, *50*, 287–291.
9. Kocbek, P.; Baumgartner, S.; Kristl, J. *Int. J. Pharm.* **2006**, *312*, 179–186.
10. Liversidge, G. G.; Cundy, K. C. *Int. J. Pharm.* **1995**, *125*, 91–97.
11. Date, A. A.; Patravale, V. B. *Curr. Op. Colloid Interf. Sci.* **2004**, *9*, 222–235.
12. <http://www.pharmindex.hu/gyogyszer.xhtml?tid=6367>
13. Pomazi, A.; Ambrus, R.; Sipos, P.; Kása, P.; Szabó-Révész, P. *Pharm. J. Slov.* **2008**, *59*, 119–121.
14. Ambrus, R.; Kocbek, P.; Sibanc, R.; Kristl, J.; Szabó-Révész, P. *Pharm. J. Slov.* **2008**, *59*, 62–63.

### Nanotechnology, as a recent development for the formulation of active pharmaceutical ingredients

During the past 10 years, nanoparticle engineering processes have been developed and reported for pharmaceutical applications. In this approach, poorly water-soluble compounds are formulated as nanometre-sized drug particles. Nanoparticulate technology offers increased bioavailability, improved absorption, and the potential for drug targeting. Particle formation and the design of solid particles, powders, suspensions and composites with unique properties are currently major features of interest in the development of nanotechnological applications. This paper presents the background relating to the families of nanocrystal formation processes, their applications and the technological advantages.

Submicronization can be classified into two main categories, the bottom-up and the top-down technology. The bottom-up technology sets out from molecules which are dissolved and precipitated by adding solvent and non-solvent, while the top-down technology involves disintegration through the application of stress.

This study focuses on the possible procedures for the formation of nanocrystals of Meloxicam, a poorly water-soluble drug with a large particle size. Use of the top-down method for the preparation and investigation of Meloxicam nanocrystals is discussed.