

Az egyensúlyi oldhatóságot befolyásoló tényezők
vizsgálata a helyes meghatározási gyakorlat fejlesztése
érdekében

Doktori értekezés

Dr. Csicsák Dóra

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Völgyi Gergely, egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Jójártné Dr. Laczkovich Orsolya, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Alberti-Dér Ágnes, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Zelkó Romána, Ph.D., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Rozmer Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2023

1. Bevezetés

Napjaink leggyakrabban alkalmazott gyógyszerbeviteli módja az orális gyógyszeradagolás. Ezen adagolási forma alkalmazása során a hatóanyag a gasztrointesztinális traktusba kerülve oldódik, ezt követi a leggyakrabban passzív diffúzióval történő felszívódás. Ebből következik, hogy a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságai, mint az oldhatósága és membránpermeabilitása, nagyban befolyásolják a biohasznosulást. Komoly problémát jelent, hogy az új gyógyszerjelölt molekulák döntő többsége rossz vízoldhatósággal, egy részük pedig rossz permeabilitással is rendelkezik. Éppen ezért a gyógyszerkutatás fontos kihívásává vált a rossz vízoldhatóságú hatóanyagok oldhatóságának javítása anélkül, hogy az befolyásolná a vele szorosan összefüggő membránpermeabilitást.

2. Célkitűzés

Doktori munkám célja volt az egyensúlyi oldhatóságot befolyásoló tényezők szisztematikus vizsgálata, és ezen változók figyelembevételével olyan helyes mérési gyakorlatok (good practice) fejlesztése,

amelyek alkalmazása segíti és javítja a pontos és reprodukálható eredmények elérését.

Munkám első részében a telítéssel rászórtósítás (SSF) módszer gyakorlatát vizsgáltuk felül. A validált protokoll szerint a telített oldat koncentrációjának meghatározása előtt az oldat és a szilárd fázis elválasztása szükséges, melyre a szedimentáció a javasolt eljárás. A gyakorlatban viszont leggyakrabban szűrést alkalmaznak e célra, ennek ellenére kevés irányelv áll rendelkezésre a megfelelő szűrő kiválasztásához. Munkám egyik célja éppen ezért annak vizsgálata volt, hogy a különböző karakterisztikájú szűrők alkalmazása mennyiben befolyásolhatja az egyensúlyi oldhatóság értékét ionizált és nem ionizált állapotú molekulák esetén.

Munkám folytatásában különböző, az egyensúlyi oldhatóságot befolyásoló tényezők és az oldhatóság növelésére alkalmazott módszerek esetében kívántunk áttekintést nyújtani az oldhatósági mérés helyes gyakorlatáról. Elsőként három különböző hatóanyag – venlafaxin, oxitetraciklin és karvedilol – polimorf módosulatainak oldhatóságát határoztuk meg. Annak ismeretében, hogy a polimorf módosulatok oldatba

kerülve átalakulásokon mehetnek keresztül, a méréseket kiegészítettük szilárd fázisú analízissel. Annak érdekében, hogy megállapítsuk az adott hatóanyag esetén az egyensúly eléréséhez szükséges időt, az oldhatósági mérés kezdetétől valós időben történt a koncentrációváltás követése, amennyiben az oldat koncentrációja ezt lehetővé tette.

Ezt követően egy oldhatóság növelésére alkalmazott módszer, a részecskeméret-csökkentés egyensúlyi oldhatóságra gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Különböző sav-bázis karakterű modellanyagok mikronizált és nanonizált formáinak előállítása után vizsgáltuk azok pH-függő oldhatóságát. Mivel a nanonizált minták előállításához szükség volt polimer segédanyagokra, így munkám ezen része egy komplex vizsgálat volt a részecskeméret, pH, biomimetikus közeg és formulációs polimerek oldhatóságot befolyásoló hatásáról. Ezen ismeretek fényében pedig javaslatot kívántunk tenni a helyes mérési gyakorlatra és a szükséges kiegészítő műszeres technikák alkalmazására.

3. Módszerek

A szűrők vizsgálatánál felhasznált modellanyagok, az oxitetraciklin polimorfok és a részecskeméret-csökkentés oldhatóságra gyakorolt hatásának vizsgálatára választott minták oldhatóságának meghatározását SSF módszerrel végeztük. A szűréshez PVDF, PES, PTFE és nylon membránszűrőt, valamint analitikai szűrőpapírt alkalmaztunk. A venlafaxin-hidroklorid és a karvedilol oldódását valós időben követtük UV szondák segítségével.

A kiindulási anyagok illetve az oldhatósági mérések végén vett szilárd minták analízise porröntgen-diffrakciós (XRPD), Raman-spektroszkópiás illetve IR spektroszkópiás mérésekkel történt.

A mikronizált és nanonizált hatóanyagok előállítására Retsch golyósmalomban történt (400 rpm, 2 óra), a különbséget a nanonizált mintákhoz hozzáadott polimer PVA vagy PVP-K25 segédanyag jelentette.

A mikronizált minták részecskeméret-eloszlás meghatározása lézerdiffrakciós mérésekkel történt, míg a nanonizált minták esetén pásztázó elektronmikroszkóppal készült képek alapján.

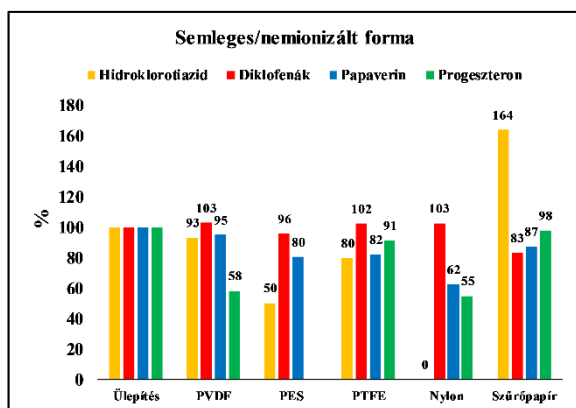
4. Eredmények

4.1. Szűrők alkalmazásának hatása hatóanyagok egyensúlyi oldhatóságára

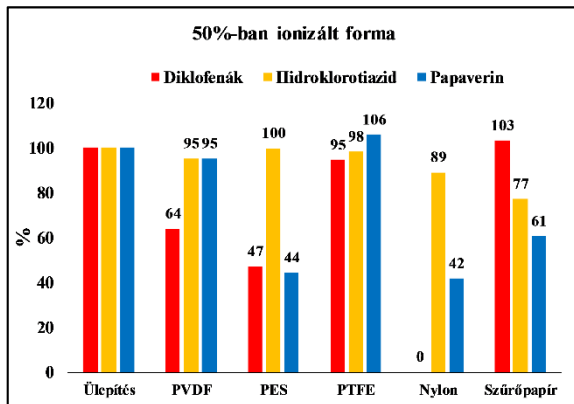
A szűrők vizsgálatához először meghatároztuk az összes hatóanyag oldhatóságát úgy, hogy üleptítettük a mintákat, majd ehhez a kapott referenciaértékhez hasonlítottuk a szűréssel kapott eredményeket. Minden modellanyag – diklofenák, hidroklorotiazid, papaverin, progeszteron – oldhatóságát meghatároztuk olyan pH-jú közegben, ahol a molekula teljesen nemionizált formában van jelen. A második pufferben 50-50% volt az ionizált-nemionizált molekulák aránya, a harmadikban pedig 100%-ban az ionos forma volt jelen.

A diklofenák oldhatósága pH 2,0 közegben olyan alacsony volt, hogy a nylon szűrőn nem jutott át mérhető anyagmennyiség, de a PES és PTFE szűrők is jelentősen csökkentették a mért oldhatósági értéket. pH 4,0 közegben ugyanez a tendencia figyelhető meg. A teljesen ionizált forma esetében azonban épp a nylon szűrő és az analitikai szűrőpapír alkalmazása eredményezett pontos eredményt. A hidroklorotiazid intrinsíc oldhatóságának meghatározásakor a szűrők alkalmazása az analitikai

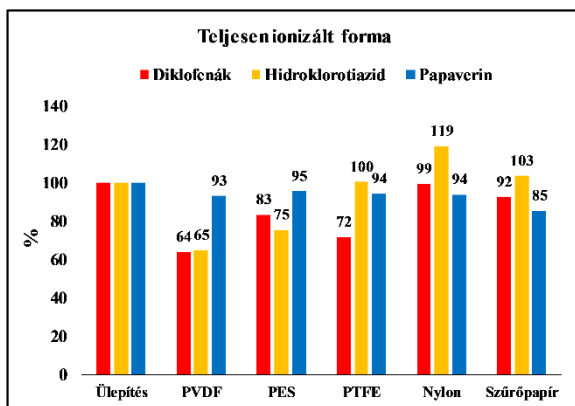
szűrőpapír kivételével nem befolyásolta az eredményt. pH 8,8 közegben ugyanez volt megfigyelhető, kivételt a nylon szűrő jelentett. Az ionizált forma szűrésére PVDF, PES és nylon szűrő nem volt alkalmas. A papaverin-hidroklorid esetén pH 10,0 közegben a PVDF szűrőn kívül egyik sem minősült alkalmasnak, pH 6,4 közegben ez kiegészült a PTFE szűrő alkalmazhatóságával. pH 3,0 pufferben az egyensúlyi oldhatóságot nem befolyásolta a szűrés. A szűrés hatását az 1., a 2. és a 3. ábrán mutatom be.



1. ábra. Szűrés hatása a semleges állapotban lévő molekulák oldhatóságára



2. ábra. Szűrés hatása az 50%-ban ionizált molekulák oldhatóságára



3. ábra. Szűrés hatása a teljesen ionizált molekulák oldhatóságára

4.2. Polimorfok egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata

Polimorf módosulatok egyensúlyi oldhatóságának vizsgálatát szilárd fázisú analízissel kiegészítve végeztük el. A két venlafaxin-hidroklorid polimorf pH 7,5 – 12,0 tartományban mért egyensúlyi oldhatósága között nem volt különbség, ami átalakulásra utal. Ezt a feltételezést Raman-spektroszkópiás és XRPD mérésekkel igazoltuk.

Az oxitetra-ciklin-hidroklorid polimorfok oldhatósága a vizsgált pH 4,0 – 7,4 tartományban szintén nem mutatott eltérést, ez ellentmond az irodalomban idézetteknek. A keletkezett termék azonosítását XRPD mérésekkel végeztük.

A karvedilol polimorfok egyensúlyi oldhatósága bázikus közegben eltért, ez arra utal, hogy a módosulatok megőrzik kiindulási szerkezetüket. Ennek igazolása Raman és XRPD mérésekkel történt. A savas pH tartományban a puffer ellenion-tartalmától függően különböző só keletkezett, ennek egyik jele a Henderson-Hasselbalch összefüggés által becsült értéktől való eltérés volt. A keletkező sókat szintén a fent említett szilárd fázisú módszerekkel azonosítottuk. A végbemenő átalakulások miatt az oldódást valós időben monitoroztuk, amely

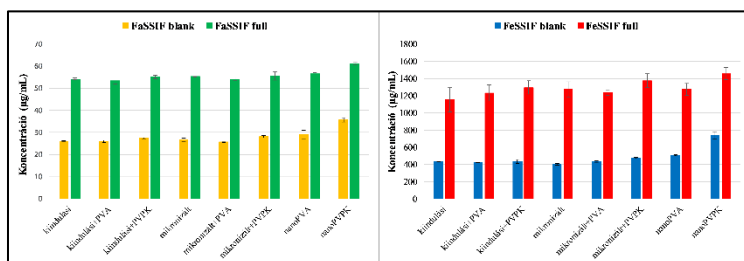
segített megállapítani, hogy mikor következik be az egyensúlybeállítás.

4.3. Mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának vizsgálata

Munkám harmadik részében száraz őrléssel előállított, mikronizált és nanonizált minták egyensúlyi oldhatóságának vizsgálatát végeztem, többféle bioreleváns közegben, 37°C-on. A nanonizált minták segédanyagai befolyásolhatják az egyensúlyi oldhatóságot, így azok hatását külön is vizsgáltuk. Modellanyagként papaverin-hidrokloridot, furoszemidet és nifluminsavat használtunk.

A papaverin-hidroklorid jobban oldódik pH 5,0 közegben, mint pH 6,5 pufferekben. A különbséget az ionizáltsági állapot megváltozása okozza. A SIF por hozzáadása mindkét esetben javította a vegyület oldhatóságát. A polimer segédanyagok közül csak a PVP-K25 rendelkezett oldhatóságnövelő hatással, fizikai keverékként is képes volt növelni azt. A legmagasabb oldhatósága az ezzel a polimerrel nanonizált mintáknak volt, sőt, az oldhatóságra gyakorolt hatásán kívül az aggregációt is képes volt gátolni a kereskedelmi

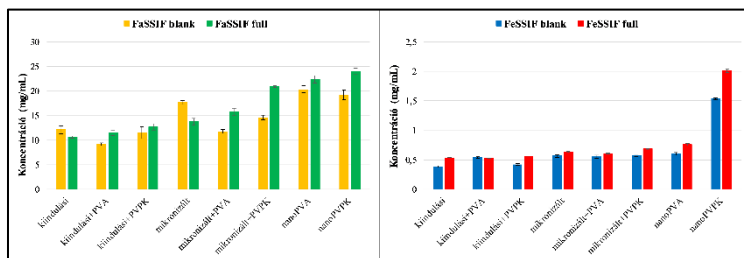
forgalomban kapható és a mikronizált minták esetén, ahogy az a lézerdiffrakciós mérésekből kiderült. Ahhoz egyik polimer aggregációt gátló hatása sem volt elég erős, hogy a részecskéket a szubmikron tartományban tartsa. A XRPD mérések megmutatták, hogy a nanonizált minták részleges amorf karaktere, ami a mérés kezdetén fennállt, annak végére eltűnik. pH 6,5 oldatban a só bázissá alakul, míg pH 5,0 közegben a só és a bázis is jelen van a szilárd fázisban. Az oldhatósági eredményeket a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra. *A vizsgált papaverin-hidroklorid formulációk egyensúlyi oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben*

A furoszemid savi karakterű molekula, így pH 6,5 közegben rendelkezett jobb oldhatósággal. Ennek a jó oldhatóságnak köszönhetően FaSSIF közegben a SIF por oldhatóságra gyakorolt hatása kevésbé érvényesül. Mindkét, segédanyaggal nanonizált minta oldhatósága

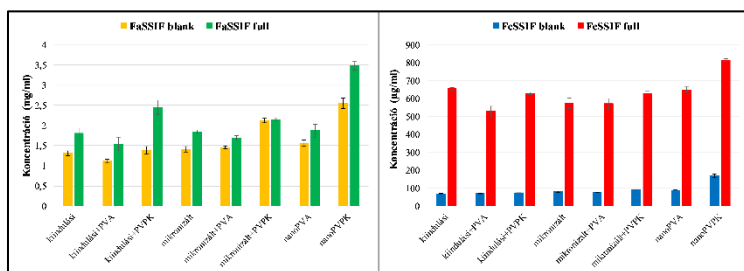
javult, azonban ez a javulás kifejezettebb volt a PVP-K25-tel nanonizált minta esetében. Ez az oldhatóságnövekedés a nanonizált mintáknál azonban nem tulajdonítható teljes mértékben a részecskeméret-csökkentésnek, ugyanis az XRPD mérések alapján a részlegesen amorf karakter a mérés végén is fennáll, és ez szintén befolyással lehet az egyensúlyi oldhatóságra. A PVP-K25 aggregációt gátló hatása olyannyira kifejezett volt a furoszemidnél, hogy a nanonizált mintát is képes volt részlegesen a szubmikron tartományban tartani. Az oldhatósági eredményeket az 5. ábrán mutatom be.



5. ábra. A vizsgált furoszemid formulációk egyensúlyi oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben

A nifluminsav amfoter molekula, pH 6,5 közegben oldhatósága körülbelül 20-szorosa a pH 5,0 közegben mérhetőnek, ez látható a 6. ábrán. Ebből kifolyólag a SIF por szolubilizáló hatása előbbi esetben kevésbé, utóbbi

esetben viszont kiemelten érvényesül. A polimer segédanyagok közül a PVP-K25 mind a kereskedelmi forgalomban kapható, mind pedig a mikronizált minta oldhatóságát megnövelte. A legmagasabb oldhatósággal minden közegben a PVP-K25-tel nanonizált minta rendelkezett. Ez a segédanyag, valamint a PVA is gátolni tudta a kereskedelmi forgalomban kapható és a mikronizált minta esetén az aggregációt, azonban ez a gátló hatás nem volt elég erős a nanonizált minták aggregációjának megakadályozásához.



6. ábra. A vizsgált niifluminsav formulációk egyensúlyi oldhatósága pH 6,5 FaSSIF blank/full és pH 5,0 FeSSIF blank/full közegekben

5. Következtetések

Doktori munkám során áttekintettem az egyensúlyi oldhatóság mérésének számos olyan buktatóját, melyek

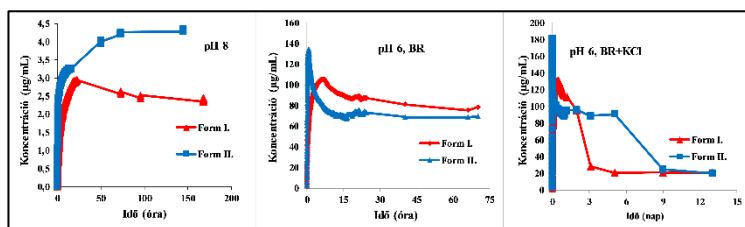
figyelmen kívül hagyása szignifikáns hibát eredményezhet az egyensúlyi oldhatóság értékében.

Munkám első részében a különböző szűrők egyensúlyi oldhatóságra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Kijelenthetjük, hogy a szűrés csak akkor szolgáltat torzítatlan eredményt, amennyiben megfelelő szűrőt választunk az elválasztásra, ehhez pedig figyelembe kell vennünk az adott hatóanyag poláris/apoláris jellegét. A szűrők hajlamosak az anyag adszorpciójára, ám általában könnyen telíthetők az adott anyaggal. Alacsony koncentrációjú oldatok vagy a szűrő anyaga iránt nagy affinitással bíró hatóanyagok szűrésekor azonban ez nem mindig következik be. Összességében arra a megállapításra jutottunk, hogy a semleges molekulákat vagy a molekula nemionizált formáját tartalmazó telített oldatok szűrésekor hidrophil anyagú szűrő alkalmazása javasolt. Ezzel szemben, ha az oldatban túlnyomórészt a molekula ionizált formája van jelen, hidrofób szűrő a megfelelő választás.

Munkám folytatásaként a különböző polimorf módosulatok egyensúlyi oldhatóságának mérésekor felmerülő problémákat vizsgáltuk. A vizsgált

modellanyagok közül a venlafaxin-hidroklorid két polimorf módosulatának egyensúlyi oldhatósági analízisét pH 7,5 – 12,0 tartományban végeztük el. A szilárd fázisú Raman és XRPD mérések segítségével megállapítottuk, hogy a Form I. és Form II. is ugyanazon terméké alakul át az oldhatósági mérés végére, a terméket pedig pH-tól függően szabad venlafaxin bázis Form I. módosulataként, vagy venlafaxin-hidroklorid-monohidrátként tudtuk azonosítani. Az oxitetraciklin-hidroklorid minták vizsgálatakor a két különböző kiindulási módosulattól szintén közös termék keletkezett, tehát azonos egyensúlyi oldhatóságot mértünk mindkét kiindulási anyag esetén. A közös terméket XRPD mérések és adatbázis segítségével oxitetraciklin-dihidrátként azonosítottuk. Eredményeink továbbá tisztázták az eredeti, Burger és munkatársai (1986) által közölt 28-szoros oldhatóságkülönbség körül kialakult hibás nézeteket. Harmadik modellvegyületünk, a karvedilol bázikus pH tartományban túlnyomórészt semleges formában van jelen, itt a két módosulat egyensúlyi oldhatósága között eltérést tapasztaltunk, ami azt vetíti előre, hogy a módosulatok nem alakulnak át oldószer jelenlétében. Ezt a feltevést Raman és XRPD

mérésekkel támasztottuk alá. Savas pH tartományban sóképződés figyelhető meg, a só típusa függ a közeg ellenion tartalmától: a kloridionokat is tartalmazó közegből karvedilol-hidroklorid, a kloridionokat nem tartalmazó közegből (BR pufferoldat, amelyben acetát-, borát- és foszfátionok vannak) karvedilol-dihidrogénfoszfát-anhidrát vált le mindkét kiindulási módosulat esetén. Az oldódás valós idejű követésének jelentősége itt is megmutatkozik: mind bázikus tartományban, mind a köztes, pH 6,0 – 6,5 tartományban hosszú időre van szükség az egyensúly beállításához. Szélsőséges esetben akár 600%-os eltérés is tapasztalható volt a 24 óra után mért oldatkonzentráció és a tényleges egyensúlyi oldhatóság között, ez látható a 7. ábrán.



7. ábra. *Karvedilol polimorfok koncentráció-idő diagramja pH = 8,0 és pH = 6,0 (BR és BR+KCl) közegekben*

Végül pedig a részecskeméret-csökkentés, valamint ehhez kapcsolódóan a pH, biomimetikus közeg és a nanonizáláshoz használt segédanyagok egyensúlyi oldhatóságra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Eredményeink igazolták, hogy a mikronizálás nem változtatja meg a hatóanyagok egyensúlyi oldhatóságát, a nanonizálás azonban az alkalmazott segédanyagtól függően képes növelni azt. Az általunk vizsgált két segédanyag közül jellemzően a PVP-K25-tel nanonizált forma oldhatósága növekedett meg szignifikáns mértékben. Ez a segédanyag fizikai keverékként a kereskedelmi forgalomban kapható és a mikronizált minták oldhatóságát is képes volt megnövelni. A PVA-val történő nanonizálás a legtöbb esetben nem gyakorolt pozitív hatást az egyensúlyi oldhatóságra. A segédanyagoknak a részecskeméret befolyásolásában is szerepe volt, jelenlétük gátolta az aggregációt. A PVP-K25 ebből a szempontból is előnyösebbnek bizonyult. Munkánk során vizsgáltuk még a biomimetikus közeg alkalmazásának hatását a hatóanyagok egyensúlyi oldhatóságára. Eredményeink konklúziója az, hogy jelentős oldhatóságnövelő hatás érhető el vele, ez a hatás azonban kevésbé kifejezett, ha

egy molekula ionizált formája van jelen az oldatban, mivel ekkor a pH hatása erősebb, mint a SIF por szolubilizáló tulajdonsága.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Disszertáció alapját képező közlemények

Csicsák D, Szolláth R, Kádár SZ, Ambrus R, Bartos CS, Balogh E, Antal I, Köteles I, Tózsér P, Bárdos V, Horváth P, Borbás E, Takács-Novák K, Sinkó B, Völgyi G. (2023) The Effect of the Particle Size Reduction on the Biorelevant Solubility and Dissolution of Poorly Soluble Drugs with Different Acid-Base Character. *Pharmaceutics*, 15: 278

Csicsák D, Borbás E, Kádár SZ, Tózsér P, Bagi P, Pataki H, Sinkó B, Takács-Novák K, Völgyi G. (2021) Towards more accurate solubility measurements with real time monitoring: a carvedilol case study. *New J Chem*, 45: 11618-11625.

Tempfli D, Borbás E, Pataki H, **Csicsák D**, Völgyi G, Sinkó B, Takács-Novák K. (2020) Revisit of solubility of oxytetracycline polymorphs. An old story in the light of new results. *Eur J Pharm Sci*, 149: 105328

Takács-Novák K, Tempfli D, **Csicsák D**, Völgyi G, Borbás E, Nagy ZSK, Sinkó B. (2019) Solubility analysis of venlafaxine hydrochloride polymorphs by shake-flask method and real time monitoring. *Acta Pharm Hung*, 89: 88-96.

Völgyi G, **Csicsák D**, Takács-Novák K. (2018) Right filter-selection for phase separation in equilibrium solubility measurement. *Eur J Pharm Sci*, 123: 98-105.

6.2. Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

Tózsér P, Kovács LL, Kádár SZ, **Csicsák D**, Sóti P, Völgyi G, Sinkó B, Nagy ZSK, Borbás E. (2023) The Effect of Surfactants and pH Modifying Agents on the Dissolution and Permeation of Pimobendan, *Period Polytech Chem Eng*, doi: 10.3311/PPch.20970

Kádár SZ, **Csicsák D**, Tózsér P, Farkas A, Pálla T, Mirzahosseini A, Tóth B, Tóth G, Fiser B, Horváth P, Madarász J, Avdeef A, Takács-Novák K, Sinkó B, Borbás E, Völgyi G. (2022) Understanding the pH Dependence of Supersaturation State - A Case Study of Telmisartan. *Pharmaceutics*, 14: 1635

Kádár SZ, Tózsér P, Nagy B, Farkas A, Nagy ZSK, Tsinman O, Tsinman K, **Csicsák D**, Völgyi G, Takács-Novák K, Borbás E, Sinkó B. (2022) Flux-Based Formulation Development-A Proof of Concept Study. AAPS J, 24: 22

Szabó ZI, Orbán GY, Borbás E, **Csicsák D**, Kádár SZ, Fiser B, Dobó M, Horváth P, Kiss E, Budai L, Dobos J, Pála T, Órfi L, Völgyi G, Tóth G. (2021) Inclusion complexation of the anticancer drug pomalidomide with cyclodextrins: fast dissolution and improved solubility. Heliyon, 7: e07581

Borbás E, Kádár SZ, Tsinman K, Tsinman O, **Csicsák D**, Takács-Novák K, Völgyi G, Sinkó B, Pataki H. (2019) Prediction of Bioequivalence and Food Effect Using Flux- and Solubility-Based Methods. Mol Pharm, 16: 4121-4130