

Meloxicam gyógyszerhatóanyag részecskeméret csökkentése impulzuszéres ablációval

Doktori (PhD) értekezés

Nagy Eszter

Témavezető:

Prof. Dr. Hopp Béla

egyetemi tanár

Fizika Doktori Iskola

Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar



Szeged

2023

Tartalomjegyzék

Jelölések, rövidítések és megjegyzések	4
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1 Motiváció.....	9
2.2 Meloxicam (Mx.) – a modell hatóanyag.....	10
2.3 Oldhatóság javítása	12
2.3.1 Részecskeméret redukáló eljárások	18
2.3.2 Amorfizáció.....	23
2.4 Lézeres abláció	26
2.4.1 Lézeres abláció a gyógyszeriparban	29
3. Céltkítűzés	32
4. A vizsgált anyag, a minta előállítása és előkészítése	33
4.1 Alapanyag	33
4.2 Céltárgy.....	33
4.3 Nanoszekundumos abláció.....	33
4.4 Femtoszekundumos abláció	34
4.5 Minták előkészítése a vizsgálatokhoz	37
4.5.1 Levegő közegbeli impulzuszézeres abláció (Pulsed Laser Ablation, PLA)	37
4.5.2 Folyadék közegbeli impulzuszézeres abláció (Pulsed Laser Ablation in Liquid, PLAL).....	37
5. Vizsgálati módszerek.....	38
5.1 Kémiai analízis	38
5.1.1 Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR spectroscopy)	38
5.1.2 Raman spektroszkópia (Raman spectroscopy).....	40
5.1.3 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, HPLC-MS).....	42
5.2 Morfológia és méret.....	44
5.2.1 Por-röntgendiffrakció (X-Ray Powder Diffractometry, XRPD).....	44
5.2.2 Pásztázó elektronmikroszkópia (Scanning Electron Microscopy, SEM)	45
5.2.3 Differenciális pásztázó kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry, DSC).....	47

5.2.4 Pásztázó elektromos mozgékonyyságon alapuló részecskeméret szeparátor (Scanning Mobility Particle Spectrometer, SMPS)	49
5.3 Ablációs mechanizmus feltárása	51
5.3.1 Ellipszometria	51
5.3.2 Gyorsfényképezéses vizsgálatok pumpa-próba módszerrel	51
5.4 Gyógyászati alkalmazhatóság.....	53
5.4.1 Üledék vizsgálata extinkciós spektroszkópiával	53
5.4.2 Oldékonyság vizsgálata extinkciós spektroszkópiával	55
5.4.3 Citotoxicitási mérések.....	55
5.4.4 Gyulladáscsökkentő hatás	57
6. Eredmények és értékelés	62
6.1 Nanoszekundumos abláció (PLAL).....	62
6.1.1 Kémia analízis	62
6.1.2 Morfológia és méret	65
6.1.3 A részecsekeltési mechanizmus feltárása.....	68
6.1.4 Gyógyászati alkalmazhatóság	75
6.1.5 Összefoglaló a nanoszekundumos ablációról	78
6.2 Femtoszekundumos abláció	79
6.2.1 Kémiai analízis.....	79
6.2.2 Morfológia és méret	83
6.2.3 Mechanizmus feltárása.....	90
6.2.4 Gyógyászati alkalmazhatóság	98
6.2.5 Összefoglaló a femtoszekundumos ablációról	99
7. Összegzés	100
8. Summary	104
9. Publikációs lista	108
9.1 A tézispontokhoz kapcsolódó referált nemzetközi szakfolyóiratokban megjelent tudományos cikkek listája	108
9.2 Nemzetközi szakfolyóiratokban megjelent további publikációk listája	108
9.3 Konferencia előadások és posztetek	108
10. Köszönetnyilvánítás	110
11. Irodalomjegyzék.....	111

Jelölések, rövidítések és megjegyzések

Jelölések:

Jelölés	Jelölés feloldása
$\alpha(\lambda)$	abszorpciós együttható az adott hullámhosszon
d	átmérő
d(50)	medián átmérő
$\delta(\lambda)$	behatolási mélység λ hullámhosszon
E	impulzusenergia
f	ismétlési frekvencia
F	energiasűrűség
F_k	ablációs küszöb (energiasűrűség)
λ	hullámhossz
λ_c	központi hullámhossz
T_m	meloxicam olvadáspontja
θ	diffrakciós szög
v_w	hangsebesség (víz közegben, $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$)
$x \pm y$	átlag $\pm$ standard deviáció

Rövidítések:

Rövidítés	Rövidítés feloldása	Magyar megfelelője
Actb	beta-actin/ β -actin	béta-aktin
ANOVA RM	analysis of variance with repeated measurements	ismételt méréses varianciaanalízis
ArF	argon fluoride	argon-fluorid
ATCC	American Type Culture Collection	-
A549 sejtek	adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells	adenokarcinómás humán alveoláris bazális epitélisejtek
BCS	Biopharmaceutical Classification System	Biofarmáciai Osztályozási Rendszer
BSE	backscattered electron	visszaszórt elektron
CCD	charge-coupled device	töltés-csatolt eszköz (kamera)
CD	cyclodextrin	ciklodextrin
cDNA/cDNS	copy/ complementary deoxyribonucleic acid	kópia/ komplementer dezoxiribonukleinsav
CGT	cyclodextrin-glycosyltransferase	ciklodextrin-glikoziltranszferáz
CO ₂	carbon dioxide	szén-dioxid
COX-1	cyclooxygenase-1	ciklooxigenáz-1
COX-2	cyclooxygenase-2	ciklooxigenáz-2
CPA	chirped pulse amplification	csörpölt impulzuserősítés
CPC	condensation particle counter	kondenzációs részecskeszámláló
CRT	cathode ray tube	katódsugárcső
Ct	threshold cycle	áttörési ciklusszám/ciklus küszöbérték

DAD	diode array detector	diódasoros detektor
DDG	digital delay generator	digitális késleltető generátor
DMA	differential mobility analyzer	differenciális mobilitás elemző
DMF	dimethylformamide	dimetil-formamid
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetil-szulfoxid
DNA/DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
DSC	differential scanning calorimetry	differenciális pásztázó kalorimetria
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzimhez kötött immunszorbiens próba/ enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
EMA	European Medicines Agency	Európai Gyógyszerügyi Szövetség
ESI	electrospray ionization	elektrospray ionizáció
FDA	Food and Drug Administration	Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (USA)
FWHM	full width at half maximum	impulzushossz
F ₂	fluorine	fluor
GI	gastrointestinal	gasztrointesztinális/ gyomor- és bélrendszerei
HAZ	heat-affected zone	hőkárosodott zóna
HIV	human immunodeficiency virus	humán immundeficiencia-vírus
HME	hot-melt extrusion	forró olvadékos extrudálás
HPH	high-pressure homogenization	nagynyomású homogenizálás
HPLC	high performance liquid chromatography	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IL-1 β	interleukin 1 beta	interleukin-1-béta
IL-6	interleukin 6	interleukin-6
IR	infrared	infravörös
KBr	potassium bromide	kálium-bromid
KrF	krypton fluoride	kripton-fluorid
LAS	liquid antisolvent	folyadék antiszolvens
LC	Liquid Chromatography	folyadékkromatográfia
LDH	lactate dehydrogenase	laktát dehidrogenáz
LPS	lipopolysaccharide	lipopoliszacharid
MCC	micro-crystalline cellulose	mikrokristályos cellulóz
MDSC	Modulated Differential Scanning Calorimetry	modulált differenciális pásztázó kalorimetria
mRNA/mRNS	messenger ribonucleic acid	hírvivő ribonukleinsav
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid
Mx.	meloxicam	meloxikám
NCC	nano-crystalline cellulose	nanokristályos cellulóz

Nd:YAG	neodymium-doped yttrium aluminum garnet	neodímiummal adalékolt ittrium-alumínium-gránát (lézer)
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug	nem-szteroid alapú gyulladáscsökkentő
OD	optical density	optikai denzitás/ optikai sűrűség
PBS	phosphate-buffered saline	foszfátpufferes sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PEG	polyethylene glycol	polietilén-glikol
PG	propylene glycol	propilén-glikol
PLA	pulsed laser ablation	impulzuslézeres abláció (disszertációmban: vákuum vagy gáz közeg kontextusban)
PLAL	pulsed laser ablation in liquid	impulzuslézeres abláció folyadék közegben (disszertációmban: desztillált víz közeg kontextusban)
PSD	particle size distribution	részecskeméret eloszlás
PVA	polyvinyl alcohol	polivinil-alkohol
PVP	polyvinylpyrrolidone	polivinil-pirrolidon
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	kvantitatív polimeráz láncreakció
SCF	supercritical fluid	szuperkritikus folyadék
SD	spray drying	porlasztva szárítás
SE	secondary electron	másodlagos/szekunder elektron
SEM	scanning electron microscope	pásztázó elektronmikroszkóp
SFD	spray freeze-drying	porlasztásos fagyasztva szárítás
SMPS	scanning mobility particle spectrometer	pásztázó elektromos mozgékonyaságon alapuló részecskeméret szeparátor
SNES	simulated nasal electrolyte solution	szimulált nazális elektrolit oldat
TNF- α	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrozis faktor alfa
UV	ultraviolet	ultraibolya
WHO	World Health Organization	Egészségügyi Világszervezet
XeCl	xenon monochloride	xenon-monoklorid
XRPD	X-ray powder diffractometry	por-röntgendiffrakció
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt	2,3-bisz(2-metoxi-4-nitro-5-szulfofenil)-2H-tetrazólium-5-karboxanilid belső só

Megjegyzések:

- A grafikonok színkódolása egységes a disszertáción belül, egy adott minta ugyanazon színnel van reprezentálva minden vizsgálat esetén.
- Ha a hivatkozás a mondatvégi írásjel előtt szerepel, akkor az adott mondatra, mondatrészre, ha az írásjel után, akkor pedig a megelőző mondatokra vonatkozik.

1. Bevezetés

A gyógyszerek esetén az az optimális, ha a kívánt hatást minél gyorsabban, minél kisebb dózis felhasználása mellett fejtik ki és emellett minimalizálhatók a mellékhatások. A hatóanyag kifejlesztését követően segédanyagok hozzáadásával és gyógyszerformulálási technikák segítségével próbálják optimalizálni, forgalomba hozáshoz megfelelővé tenni a készítményeket. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (Biopharmaceutical Classification System, BCS) besorolása alapján a forgalmazott gyógyszerhatóanyagok körülbelül 40%-a, míg a fejlesztés alatt állók 90%-a tartozik a vízben rosszul oldódó vegyületek közé [1]. Ez a hatóanyag fejlesztésben tapasztalható tendencia kihívást jelent a gyógyszeriparnak, hiszen a gyenge oldhatóság legtöbb esetben korlátozza a biológiai hasznosíthatóságot is.

A megoldási opciók közül igen elterjedtek a különféle részecskeméret csökkentő és amorfizáló eljárások. A szemcseméret redukálásával megnő az aktív felület, aminek köszönhetően általában javul az oldódási arány és a transzport karakterisztika, így az emberi sejtek gyorsabban fel tudják venni a hatóanyagot [2], [3], míg amorfizáció esetén a kristályrács hiányából adódó magasabb energiaállapotnak, a rendszeren belüli megnövekedett mobilitásnak a következménye a nagyobb oldhatóság [4].

Az impulzuslézeres abláció alkalmas arra, hogy tömbi anyagból mikro- és nanométeres méretű részecskéket állítsunk elő, melyek kristályossága is változhat a besugárzás hatására. Az abláció során a fókuszált lézerimpulzus elnyelődik a megmunkálandó céltárgyban, aminek hatására a felületre merőlegesen anyagfelhő lép ki, ami elektronokat, ionokat, atomokat, molekulákat, olvadék cseppeket és szilárd részecskéket tartalmazhat [5]. Ezen elsődleges termékek mellett lehetnek másodlagos részecskék is, amik az abláció következtében létrejött lökéshullám céltárggyal való ütközésének hatására keletkeznek. A céltárgy optikai, termális és morfológiai tulajdonságai szignifikánsak a folyamat szempontjából. A lézerparaméterek és a kísérleti körülmények megfelelő megválasztásával szerves és szervetlen részecskék előállítására egyaránt találhatunk példákat. [6] Az előállított részecskéket elsősorban kémiai összetétel szempontjából szükséges analizálni, hogy degradálódtak-e a besugárzás hatására, melléktermékek keletkeztek-e és ha igen, milyen vegyületek és mekkora mennyiségben. Másodsorban a részecskék méretét, méreteloszlását, morfológiáját és kristályosságát kell vizsgálni. A sztöchiometria és a méret mellett fontos elemezni és minél pontosabban leírni a részecskekeletkezés mechanizmusát is, valamint hatástani vizsgálatokat végezni.

Disszertációmban tiszta gyógyszerhatóanyag tabletta besugárzása esetén a lézeres ablációt, mint részecskeméret redukáló és amorfizáló eljárást tanulmányoztam. Dolgozatomban a meloxicam, vízben rosszul oldódó nem-szteroid alapú gyulladáscsökkentő hatóanyag lézeres ablációja kapcsán végzett kísérleteket és elért eredményeket mutatom be. Ehhez háttérrel biztosítandó, elsőként irodalmi áttekintés keretében kifejtem a kísérletek elvégzése mögött húzódó motivációt, bemutatom a vizsgált hatóanyagot, majd ismertetem az oldhatóság javításának módszereit és eredményeit, külön kitérve a részecskeméret csökkentésre és az amorfizációra. Ezután a lézeres abláció tudományos előzményeit mutatom be, kiemelve a gyógyszerhatóanyagok besugárzásával foglalkozó publikációkat. A disszertáció célkitűzéseinek ismertetését követően a vizsgált alapanyag és céltárgy tulajdonságait, a lézeres abláció paramétereit és a minták vizsgálatokhoz való előkészítését írom le. A felhasznált vizsgálati módszerek esetén minden technikánál röviden

ismertetem az elméleti háttérét és a berendezés felépítését, majd végezetül az általunk alkalmazott paramétereket. Ezt követően bemutatom a nanoszekundumos, illetve femtoszekundumos impulzusokkal előállított részecskék kémiai analízise, méret és morfológia vizsgálata, keletkezési mechanizmus feltérképezése és gyógyászati alkalmazhatósága kapcsán végzett mérések eredményeit. A könnyebb átláthatóság érdekében az egyes vizsgálatok eredményei után közvetlenül ismertetem azok kiértékelését, a belőlük levont következtetéseket is. Dolgozatom zárásaként összegzem az elért tudományos eredményeimet.

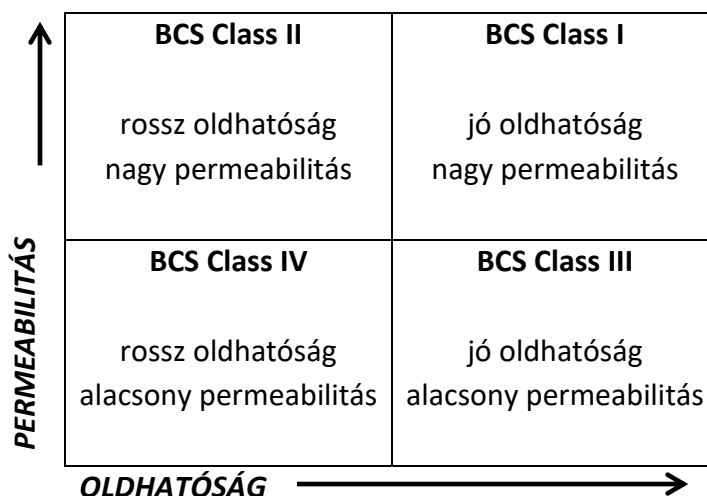
2. Irodalmi áttekintés

Az irodalmi áttekintésben először ismertetem a gyógyszerhatóanyagok egyfajta, fejlesztés szempontjából hasznos csoportosítását, majd a bemutatott osztályok közül a legnagyobb jelentőséggel bíró, oldékonyság miatt korlátozott hatóanyagok hasznosíthatóságának javítását célzó technikáról adok egy áttekintést. Ezt követően a vízbeli oldhatóság fokozásának részecskeméret csökkentéssel, illetve amorfizációval járó eljárásait mutatom be részletesebben. A különböző technikák ismertetés során törekedtem az általunk is vizsgált modell hatóanyaghoz köthető eredmények felsorakoztatására. A gyógyszeriparban elterjedt módszerek után általánosan ismertetem a lézeres abláció jelenségét, kitérve annak elméleti hátterére, alkalmazási területeire. Végezetül a lézeres abláció gyógyszerészeti fejlesztésekben betöltött szerepét összegezem.

2.1 Motiváció

A gyógyszerek döntő része orális bevitelű, ezért a gasztrointesztinális (GI) felszívódás kritikus tényező a hasznosulásnál. Amidon és munkatársai 1995-ben létrehozták a Biofarmáciai Osztályozási Rendszert (Biopharmaceutical Classification System, BCS), ami a hatóanyagokat egységesített rendszerben, az emésztőrendszerből történő felszívódásuk vonatkozásában vizsgálja: oldhatóság és (intesztinális) permeabilitás alapján csoportosít [7]. Oldódás alatt azt a folyamatot értjük, amikor egy anyagot molekuláris szinten diszpergálunk valamilyen oldószerben [8]. Egy hatóanyag akkor minősül „jó oldhatónak”, ha az azonnali felszabadulású készítményként beadott legmagasabb egyszeri dózis legfeljebb 250 ml vizes közegben teljesen feloldódik 37 ± 1 °C-on, az 1,2 és 6,8 közötti pH tartományon (legalább az alábbi három érték esetén el kell végezni a mérést: pH 1,2; 4,5; 6,8) [9]–[11]. A permeabilitás értékelése elsősorban a humán farmakokinetikai vizsgálatok (pl. abszolút biológiai hasznosulás vagy tömegmérleg) alapján meghatározott felszívódás mértékén alapul. Általánosan, „jó permeabilitásúnak” tekinthető egy hatóanyag, ha az abszolút biológiai hasznosulása $\geq 85\%$. [10], [11]

A BCS négy osztályba sorolja be a gyógyszerhatóanyagokat (**1. ábra**) [7], [12].



1. ábra Gyógyszerhatóanyagok Biofarmáciai Osztályozási Rendszere (Biopharmaceutical Classification System, BCS) [7], [12].

Az I. osztályba tartozó hatóanyagok jó oldhatósággal és jó permeabilitással jellemezhetők. Hasznosulásuknak a gyomorürülés és a gasztrointesztinális traktusban való tartózkodás ideje szab határt, így klasszikus szilárd orális tabletták formájában használhatók, szükség esetén szabályozott hatóanyag-felszabadulással. [7], [13], [14].

A II. osztály vegyületei rossz oldhatósági és jó permeabilitási tulajdonságokkal rendelkeznek, biohasznosíthatóságukat az oldékonyságuk limitálja. Alkalmazhatóságuk javítható többek között részecskeméret csökkentés (mikronizáció, nanonizáció), amorfizáció, felületaktív anyagok, pufferek, szilárd diszperziók és komplexképző-szerek, (ön)emulziós vagy mikroemulziós rendszerek, nanoszuszpenziók használatával [1], [13], [14].

A III. osztály esetén a permeabilitás a gátló tényező, hiszen az ide tartozó gyógyszerhatóanyagok jó oldhatóságúak és rossz permeabilitásúak. Esetükben a permeabilitást kell növelni segédanyagok hozzáadásával, abszorpciót fokozó anyagokkal, gasztrointesztinális motilitás segítőkkal, efflux gátlókkal [1], [15].

A IV. osztály hatóanyagai rossz oldhatósággal és rossz permeabilitással jellemezhetők, biohasznosulásuk fokozása a II. és III. osztályok esetén alkalmazott eljárások kombinációjával érhető el [1], [15].

Ez az osztályozás könnyen meghatározható mennyiségek mérésére vezeti vissza a felszívódási tulajdonságok meghatározását, előrejelzését, aminek köszönhetően a BCS széles körben elterjedt a gyógyszeripari szabályozás területén, az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (Food and Drug Administration, FDA) és az Európai Gyógyszerügyi Szövetség (European Medicines Agency, EMA) egyaránt alkalmazza a gyógyszerkészítmények engedélyezése során [16]–[18].

A különböző osztályokba sorolható hatóanyagok aránya az utóbbi évtizedekben jelentősen változott. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) által kiadott Model List of Essential Medicines (vagy Essential Medicines List) alapján, a lakosság egészségügyi szükségletei szempontjából alapvető fontosságú gyógyszerek esetén a 2000 és 2011 között jóváhagyott gyógyszerek 41,8%-a Class I, 20,9%-a Class II, 37,3%-a Class III és 0%-a Class IV besorolású volt a BCS osztályozás szerint [19]. Ehhez képest a 2016-os adatok szerint a II. osztályba tartozó gyógyszerek a forgalomban lévő termékek jelentős részét (30%) és a fejlesztés alatt álló gyógyszer-molekulák túlnyomó százalékát (60–70%) tették ki. Ez azzal magyarázható, hogy a potenciális terápiás jelöltek kiválasztása során döntő szempont, hogy képesek-e kötődni a sejt receptorokhoz, és mivel ez a kötődés hidrofób kölcsönhatásokkal jár, a fejlesztésre többnyire lipofil hatóanyagokat választanak ki. [20]

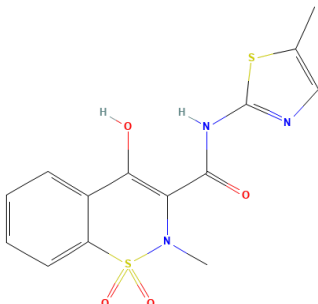
A BCS II. osztályba tartoznak például a carbamazepine, dapsone, flurbiprofen, ibuprofen, naproxen, piroxicam és a meloxicam hatóanyagok [21], [22].

2.2 Meloxicam (Mx.) – a modell hatóanyag

A meloxicam (összegképlet: $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$; IUPAC név: 4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-2-thiazolyl)2H-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide, magyar megnevezése: meloxikám) a nem-steroid alapú gyulladáscsökkentő (nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID) csoportba tartozik, sárga színű, szilárd halmazállapotú anyag. Vízben gyakorlatilag oldhatatlan, a BCS II. osztályába (rossz oldhatóság, magas permeabilitás) sorolható oxamicam származék, melyet a piroxicam piridin-2-

il gyűrűjének 5-metiltiazol-2-il csoporttal való helyettesítésével állítanak elő, ami jelentősen megváltoztatja a farmakokinetikáját és a működését. [23]–[27]

Fontosabb tulajdonságai az **1. táblázatban** szerepelnek [25].

Szerkezeti képlet	Adatok	
	Összegképlet	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂
	Besorolás	NSAID, COX-2 gátló
	Moláris tömeg	351,4 g/mol
	Olvadáspont	254–255 °C (egybeesik a bomlási hőmérséklettel)
	Vízdoldhatóság	7,15 mg/l (25 °C)

1. táblázat A meloxicam tulajdonságai [25].

Míg vízben megközelítőleg oldhatatlan, metanolban enyhén, erős bázisokban jobban oldódik. [25], [28]

A meloxicam nem poláris molekula, így nem tud hatékonyan betörni a víz rácsszerkezetébe, következésképpen a vízben való oldhatósága alacsony. Megállapították, hogy a meloxicam oldhatósága pH függő: a pH növelésével az oldhatósága is nő. Mivel a meloxicam savas hatóanyag, a pH-érték növekedésével nő az ionizált hatóanyag százalékos aránya és így az oldhatósága is. Az oldhatósága és oldódási sebessége savas közegben nagyon gyenge, ami befolyásolja a biológiai hasznosulását. [27], [29]

Hatásmechanizmusát tekintve a meloxicam preferenciális (/szelektív) COX-2 inhibitor, azaz a prosztaglandinok szintézisét blokkolja, azáltal, hogy a termelésükben résztvevő ciklooxygenáz nevű enzimet gátolja. A prosztaglandinok gyulladást, fájdalmat, lázat és exsudációt kiváltó anyagok, termelésük gátlása révén csökkenthetők ezen hatások. [28] A legtöbb NSAID besorolású hatóanyagokhoz képest hosszú a felezési ideje, így kedvező lehet a napi egyszeri dózist igénylőknek. Orális, transzdermális és intravénás készítmények formájában is elérhető. [30] Döntően fájdalomcsillapítónak használják mozgásszervi megbetegedések, rheumatoid arthritis, osteoarthritis és más ízületi betegségek okozta, illetve posztoperatív fájdalom kezelésére [30], [31]. A meloxicam és a ciklooxygenáz-2 (COX-2) inhibitorok hasznosak lehetnek a palliatív betegek életminőségének javításában, hiszen mentális zavarok, székrekedés vagy egyéb mellékhatások nélkül, illetve kisebb mértékű gyomor-bélrendszeri toxicitással jellemezhetők, mint a hagyományos, nem COX-2-szelektív NSAID-ok [24]. Kimutatták, hogy tüdőbe juttatva krónikus obstruktív tüdőbetegség, cisztás fibrózis és további tüdőgyulladással járó betegséges kezelésére is alkalmas hatóanyag. [32], [33]

A meloxicam kedvező modell hatóanyagnak ígérkezett, mivel releváns hatóanyag a terápiában [24], [30]–[33] és a vízben rosszul oldódó hatóanyagokat érintő kutatásokban egyaránt. Az utóbbi években számos technikát vizsgáltak oldódási sebességének és/vagy oldhatóságának fokozására, mint például sóképzést [34], [35], ciklodextrin komplex képzést [36], [37], szilárd diszperzió

létrehozást [38], [39], nedves őrlést [40], gömb alakú agglomeráció kialakítását [41], nanoszuszpenzió és nanokristály képzést [42], [43], aszpirinnel [44] és karbonsavakkal [26] történő együttes kristályosítást. [45], [46]

2.3 Oldhatóság javítása

Oldódás alatt definíció szerint azt a folyamatot értjük, amikor egy anyagot molekuláris szinten diszpergálunk, eloszlatunk egy adott oldószerben [8]. Ezen adat meghatározásakor kritikusak a körülmények (oldószer, hőmérséklet, időtartam, keverési paraméterek, ...). A BCS II. osztályba sorolható hatóanyagok térfolyás miatt az oldhatóság növelését célzó eljárások iránti érdeklődés megélénkült, számos technikát dolgoztak ki. Ezen módszerek egy lehetséges csoportosítása a **2. táblázatban** látható [47], melyben olyan technikákat mutatnak be, amelyeket az általunk választott hatóanyag esetén már alkalmaztak. A továbbiakban ezeket ismertetem röviden.

Eljárások a vízben oldhatatlan/rosszul oldódó hatóanyagok oldhatóságának javítására		
1. Fizikai modifikáció	2. Kémiai modifikáció	3. Egyéb eljárások
a) részecskeméret csökkentése	a) pH módosítása	a) hidrotópok alkalmazása
b) szilárd diszperzió létrehozása	b) sóképzés	b) segédanyagok használata
c) kristályosság módosítása	c) komplexek képzése	c) felületaktív anyagok alkalmazása
		d) koszolvensek alkalmazása

2. táblázat A hatóanyagok oldékonyságának javítására szolgáló eljárások összegzése (alapja: [47]).

(1) A fizikai modifikációra épülnek a részecskeméret csökkentő eljárások, a diszperz rendszerek és szuszpenziók létrehozása, valamint a kristályosságot érintő módszerek. [47]

a) Részecskeméret csökkentése

A gyógyszer oldhatósága gyakran szorosan összefügg a részecskemérettel: ahogy a részecske mérete csökken, a felület/térfogat aránya növekszik. A nagyobb aktív felület lehetővé teszi az effektívebb, intenzívebb kölcsönhatást az oldószerrel, ami növeli az oldhatóságot [47]. A kisebb részecskék előállítása kivitelezhető „top-down” és „bottom-up” eljárásokkal is, ahol az előbbi esetben tömbi anyagot, nagyobb részecskéket aprózunk, míg az utóbbiban kis építő egységek összekapcsolásával érjük el végső részecskeméretet [48].

A részecskeméret csökkentő eljárások kivitelezési módjai részletesebben a 2.3.1 *Részecskeméret redukáló eljárások* című alfejezetben kerülnek kifejtésre.

b) Szilárd diszperzió létrehozása

A szilárd diszperzió kifejezés szilárd termékek egy csoportjára utal, amelyek legalább két eltérő komponensből állnak, tipikusan egy hidrofil mátrixból (pl.: polivinil-pirrolidon (polividon/povidon, PVP) vagy a polietilén-glikol (PEG)) és egy hidrofób hatóanyagból. Szilárd diszperzió képzésével javítható a gyógyszer oldékonysága, felszívódása és terápiás hatékonysága. A kivitelezés egyik módja a komponensek fizikai keverékének megolvasztása, majd gyors lehűtése állandó keverés mellett (forróolvadákos eljárás, hot-melt/fusion method). A kapott szilárd terméket zúzzák, porítják,

majd szitával szűrik tablettázás előtt. Ehhez hasonló eljárás, amikor az összetevők intenzív keverését egy extruder végzi (forróolvadékos extruder eljárás, hot-melt extrusion), ezáltal lehetővé válik a folyamatos gyártás. Mindkét eljárásnál kritikus feltétel a hatóanyag és a hordozó hőstabilitása és az oldadékuk keverhetősége. Ha a gyógyszerhatóanyagot és a hordozót feloldják egy közös oldószerükben, majd az oldószert vákuumban elpárologtatják, akkor szintén kaphatnak szilárd diszperziót (solvent evaporation method). Ezen módszer fő előnye, hogy megfelelően választott oldószer esetén a párologtatáshoz használt hőmérsékleten a hatóanyag és a hordozó nem károsodik. Azonban kihívást jelent a közös illékony oldószer kiválasztása, majd maradéktalan eltávolítása, s mindezek az eljárás versenyképességét is csökkentik. [47]

Sikeresen állítottak elő meloxicam tartalmú szilárd diszperziót, különböző hordozókat és keverési arányokat vizsgáltak. A tiszta meloxicam oldékonysága foszfát puffer (pH 6,8) és 37 °C hőmérséklet alkalmazásakor $4,5 \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$ értékűnek adódott. Ehhez képest a Pluronic® F-127 segédanyag 1:5 hatóanyag - hordozó arányánál érték el a maximális oldhatóságot, $54 \pm 6,66 \mu\text{g/ml}$ -t, míg PEG 4000 alkalmazása esetén $30,7 \pm 2,3$ és $38,5 \pm 2,06 \mu\text{g/ml}$ és PEG 6000 esetén $20,8 \pm 1,5$ és $28 \pm 1,014 \mu\text{g/ml}$ közötti értéket kaptak a keverési arány függvényében. A szilárd diszperzió létrehozása során azt tapasztalták, hogy a rendszer kristályossági foka is csökkent. [49]

c) Kristályosság módosítása

A kristályosság módosítása történhet polimorfizmussal, amorfizációval vagy együttes kristályosítással (kokristályosítással).

A kristályosítási paraméterek manipulálásával (különböző oldószerek használata, a keverés megváltoztatása, a kristályosodó gyógyszer oldathoz további anyagok adása révén) lehetővé válik különböző elrendezésű kristályok előállítása; az ilyen kristályokat nevezik polimorfoknak. Ugyanazon hatóanyag polimorfjai különbözhetnek egymástól a fizikokémiai tulajdonságaikban, mint például az oldhatóság, az oldódási sebesség, az olvadáspont és a stabilitás. A legtöbb gyógyszer rendelkezik szerkezeti polimorfizmussal, ebből kifolyólag célszerű létrehozni/felkutatni a gyógyszer termodinamikailag legstabilabb polimorfját, hogy biztosítani lehessen a hatóanyag biológiai hasznosulásának reprodukálhatóságát az eltarthatósági ideje alatt, különböző valós tárolási körülmények között. [47]

Az EMA adatai [50] alapján a meloxicamnak öt polimorf formája ismert: I-V, amiket az infravörös spektrumok és röntgendiffrakciós mintázatok alapján lehet elkülöníteni. A hatóanyag gyártók rutinszerűen az I polimorf formát állítják elő.

Kimutatták, hogy a meloxicam III metastabilis polimorf jobban oldódik, mint az I forma. Ha a meloxicam I mellett már igen kis mennyiségben jelen volt a III, akkor (jelentősen) javult az oldékonyság és a hatóanyag felszabadulás. Az Mx. III jelenléte az Mx. I forma mellett rendre 17, 15 és 41%-kal növelte az oldhatóságot 5,8, 6,8, és 7,5 pH értékű közeg esetén, ami számértékileg $24,3 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$, $182,6 \pm 6,7 \mu\text{g/ml}$ és $929,9 \pm 11,4 \mu\text{g/ml}$ oldatbeli koncentrációt eredményezett. [51]

Az amorf forma definíció szerint egy nem-kristályos anyag, amely nem rendelkezik nagyobb léptékű rendezettséggel. Szerkezetük úgy képzelhető el, mint egy megfagyott folyadék, amelyben a folyadékban jelen lévő termális fluktuációk kifagynak, és csak „statikus” szerkezeti rendezetlenség marad [52]. Ezen rendezetlenségnek köszönhetően az amorf szilárd anyagok egyedi tulajdonságokkal rendelkeznek kristályos társaikhoz képest. Például az amorf anyagok vízbeli oldhatósága nagyobb, mint a kristályos forma esetén. (Ez egy kinetikus jelenség, és végül a kialakuló túltelített oldatban az oldott anyag elkezd kristályosodni és a kristályos fázis egyensúlyi oldhatósága beáll. Az oldhatóság átmeneti növekedése gyakran jelentős (>10x) és kihasználható a gyógyszerek nagymértékben javuló teljesítményének elérésére [53].) [54]

Az amorfizáció technikai kivitelezéséről a 2.3.2 *Amorfizáció* című alfejezetben írok részletesebben.

A kokristályok hatóanyagból és sztöchiometrikus mennyiségű, gyógyszerészeti szempontból elfogadható kokristály képző anyagból állnak. A kokristály egy olyan kristályos egység, amelyet két vagy több különböző molekuláris egység alkot, ahol a molekulák közötti kölcsönhatások gyengébb, másodrendű erők, mint például a hidrogénkötés. A gyógyszerészeti kokristályok nemionos szupramolekuláris komplexek, amiket a gyógyszerfejlesztés során a fizikai tulajdonságokkal kapcsolatos problémák, például az oldhatóság, a stabilitás és a biológiai hasznosulás javítására használnak a hatóanyag kémiai összetételének megváltoztatása nélkül. [55]

Meloxicam-aszpirin kokristály létrehozásával jelentős javulást értek el oldékonyság és farmakokinetikai tulajdonságok terén. A foszfát pufferben való oldhatóság a bélrendszert szimuláló 7,4 pH mellett 0,005 mg/ml-ről (meloxicam önmagában) 0,22 mg/ml-re (meloxicam-aszpirin kokristály) nőtt. A meloxicam maximális plazma koncentrációja, azaz az a hatóanyag vérplazmában mért maximális koncentrációja, négyszer nagyobb volt a kokristály esetében és kevesebb, mint tizedannyi idő kellett az optimális koncentráció eléréséhez az önmagában vizsgált meloxicamhoz képest. [44]

(2) Kémiai módosításnak számítanak a pH változtatásával elért eredmények, a különböző pufferek használata, a komplex- vagy sóképző eljárások. [47]

a) A pH módosítása

Az ionizálható hatóanyagok esetén az oldékonyság javítható a pH módosítása révén, amit puffer hozzáadásával érnek el. A könnyű fejlesztési eljárás és előállíthatóság ellenében a módszer hátrányai közé tartozik, hogy a nem-fiziológiás pH használata toxikus hatású lehet, valamint vizes közegbeli hígításkor kicsapódhatnak a hatóanyagok, ami intravénás adagolás esetén embóliát is okozhat. Továbbá, mivel a hatóanyag vizes környezetben oldva kémiaiag kevésbé stabil, mint kristályos formában, az alkalmazott pH fokozhatja a hidrolízist vagy katalizálhat más lebontási mechanizmusokat is. [9]

A savas NSAID hatóanyagok (pl. meloxicam) vízoldhatósága pH függő: a pH csökkenése az ionizálatlan és ionizált hatóanyag arányának növekedéséhez vezet, ami az oldhatóság csökkenésével jár. A meloxicam pH függő oldhatósága a többszörös ionizációs állapotának köszönhető. A pH 1, 3, 6 és 9 értékek esetén 0,93, 0,38, 27,0 és 195 µg/ml koncentráció adódott az oldékonyságra. [23]

b) Sóképzés

A rosszul oldódó gyógyszerhatóanyag jelöltek sóképzése több évtizede alkalmazott stratégia az oldhatóság fokozására. Egy savas vagy bázikus hatóanyag vizes oldhatóságának pH függése determinálja, hogy a vegyület megfelelő sókat fog-e képezni [56]. A pH és az oldhatóság közötti összefüggés azt is megszabja, hogy milyen ellenionok szükségesek a sók képződéséhez, hogy a sók milyen könnyen esnek szét szabad savas vagy bázikus formájukra, illetve, hogy milyen lesz az oldódási viselkedésük különböző gyomor-bélrendszeri pH-értékek mellett, és hogy a sók oldhatóságát és oldódási sebességét befolyásolja-e a közös ion hatás. Számos áttekintés vázolta fel a sóválasztás általános stratégiáit és szempontjait. A sóképzéshez a hatóanyagnak rendelkeznie kell ionizálható csoportokkal. Ezen technikával az oldódási sebesség jelentősen fokozható, de hátránya például, hogy a sók jóváhagyása összetett feladat, és semleges molekulák esetében nem alkalmazható ez a módszer. [57]

Különböző meloxicam sók esetén (meloxicam - trisz(hidroximetil)-aminometán/ trietanolamin/ dietanolamin/ L-arginin), 2 óra leforgása alatt magasabb meloxicam koncentráció érték (0,49, 0,51, 0,65, 0,85 $\mu\text{g/ml}$) alakult ki, mint ugyanennyi idő alatt csak meloxicam esetén 0,09 $\mu\text{g/ml}$. A hőmérséklet-gradiens módszerrel előállított meloxicam sók mindegyike esetén szignifikáns javulást tapasztaltak az oldódási jellemzőkben. [34]

c) Komplexek képzése

A komplexek olyan vegyületek, amelyek két vagy több kémiai anyag közötti donor-akceptor kapcsolat eredményeként jönnek létre. A komplexek szubsztrát és ligandum molekulák vagy ionok intermolekuláris társulásai, amelyeket valamilyen erős koordinált kovalens kötések vagy viszonylag gyenge nem kovalens erők, például hidrogénkötések, van der Waals-erők, elektrosztatikus kölcsönhatások, dipólerők vagy hidrofób kölcsönhatások tartanak együtt. Az akceptor típusától függően négy nagyobb csoportot különböztetnek meg: fémion-koordinációs komplexek, szerves molekula komplexek, zárvány komplexek (inklúziós komplexek) és farmakoszómák. [58]

A vízben rosszul oldódó hatóanyagok oldékonyságának, oldódási sebességének és hasznosulásának javítása érdekében többször alkalmaznak zárvány komplex képző eljárásokat. Az inklúziós komplexek esetén egy nem poláros molekula vagy a molekula egy nem poláros régiója (ún. „vendég” – „guest”) illeszkedik be/ csapdázódik egy másik molekula vagy molekulacsoport (ún. „gazda” – „host”) által létrehozott üregbe. Mivel ezek a komplexek általában nem foglalnak magukba a molekulák között kötőerőket, ezért nevezik nem-kötő/kötés nélküli komplexeknek is őket. A leggyakrabban használt gazda molekulák a ciklodextrinek. A keményítő enzimatis lebonthatása a ciklodextrin-glikoziltranszferáz (CGT) által ciklikus oligomereket, ciklodextrineket (CD-eket) eredményez. Ezek a nem redukáló, kristályos, vízben oldódó, ciklikus oligoszacharidok glükóz monomerekből állnak, amelyek fánk alakban vannak elrendezve úgy, hogy hidrofób üreggel és hidrofil külső felszínnel rendelkeznek. A ciklodextrin molekulák külső felülete vízdoldhatóvá teszi őket, míg a hidrofób üreg mikrokörnyezetet biztosít a megfelelő méretű nem poláris molekulák számára. [47]

Az eljárás előnye a sokoldalúsága, valamint, hogy az oldékonyság javításán felül a hatóanyag stabilitását és az oldószer számára a hozzáférhetőségét is fokozza. Hátránya azonban, hogy sokrétű

tesztelés szükséges, illetve a költségei még mindig magasak a szabályozási nehézségek és az anyagköltségek miatt. [59]

Háromféle módszerrel (fizikai keverés, gyúrás, szonikálás) meloxicam inklúziós komplexeket állítottak elő β -ciklodextrin felhasználásával, hogy ezáltal fokozzák a hatóanyag oldhatóságát és stabilitását, valamint elnyújtsák, egyenletesebbé tegyék a felszabadulását. Az általuk alkalmazott vizsgálatok során kimutatták, hogy a meloxicam oldékonysága ($9,45 \pm 0,32 \mu\text{g/ml}$) az inklúziós komplexek létrehozásával minden esetben többszörösére nőtt, $19,07 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$, $21,5 \pm 0,36 \mu\text{g/ml}$ és $36,61 \pm 0,34 \mu\text{g/ml}$ értékeket vett fel. A β -ciklodextrin alapú, szonikálással létrehozott nanoszivacsok esetén javult legjelentősebben az oldhatóság, illetve a kristályossági fok csökkenését is megfigyelték, ami az oldódási sebesség növekedéséhez vezetett. [37]

(3) Az egyéb kategóriában szerepel többek között a hidrotópok, különféle felületaktív anyagok, koszolvensek és segédanyagok használata. [47]

a) Hidrotópok alkalmazása

A hidrotópok olyan anyagok, amelyek képesek egy rosszul oldódó anyag (vízbeli) oldhatóságát javítani. Tipikusan ionos szerves sók rendelkeznek ezzel a tulajdonsággal, mint például a nátrium-benzoát, a karbamid vagy a nátrium-acetát. Az eljárás során nagy mennyiségű hidrotópot adnak a vízben rosszul oldódó anyaghoz, javítva ezzel ez utóbbi tulajdonságait. A módszer előnye, hogy nem igényel kémiai módosítást, szelektív eljárás, nem szükséges emulzió létrehozása, sem szerves oldószerek alkalmazása, elegendő a gyógyszerhatóanyag és a hidrotóp vízbeli összekeverése. Hátránya, hogy a hidrotópok az oldatban önszerveződhetnek, aminek következtében nem fejtik már ki a kívánt hatást. [9]

A meloxicam oldhatóságát 8%-os fenol és 25%-os nátrium-benzoát oldat, mint hidrotóp közeg alkalmazásával fokozták. A hidrotóp oldatban a desztillált vízzel összehasonlítva több mint 32-szeresére nőtt az oldhatóság. Mivel a javasolt módszerben szerves oldószerek helyett hidrotóp anyagot használtak az oldódás javítására, ezért ez a módszer környezetbarát és alkalmazható hatóanyagok rutin jellegű kvantitatív vizsgálatára a gyógyszeripar különböző területein. [60]

b) Segédanyagok használata

Egy gyógyszerkészítményben a hatóanyag mellett jelenlevő, terápiásan inaktív, de a biológiai rendszerben való hasznosuláshoz szükséges formula kialakításához fontos anyagokat nevezzük segédanyagoknak [61]. A segédanyagok lehetnek többek között ízesítők, édesítők, kötőanyagok, tartósítószerke, illetve oldékonyságot javító vegyületek. A természetes vagy szintetikus vagy félszintetikus forrásból származó segédanyagok fontos szerepet játszanak a vízben való oldhatóság, a biológiai hasznosíthatóság és az alacsony oldhatóságú gyógyszerek stabilitásának javításában. Például a polimer alapú segédanyagok alkalmasak lehetnek a hatóanyag amorf formájának stabilizálására és a vizes közegbeli túltelített állapot fenntartására. [62]

Összehasonlították, hogy a nanokristályos cellulóz (nano-crystalline cellulose, NCC), illetve a mikrokristályos cellulóz (micro-crystalline cellulose, MCC) különböző arányú jelenléte hogyan

befolyásolja a meloxicam oldhatóságát laktóz jelenléte mellett. Az oldhatóságot foszfát pufferben (pH 7,5) és 25 °C hőmérsékleten vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a segédanyagok fizikai keverék formában való hozzáadása nem befolyásolta igazán az oldhatóságot, változást csak az együttes őrlés hozott. Megállapították, hogy az NCC kedvezőbb lehet, mint az elterjedt MCC. Kiemelték, hogy pusztán a meloxicam por önmagában ($55,97 \pm 0,72 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) vagy laktózzal keverve ($60,90 \pm 0,47 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) történő őrlése növelte a meloxicam kiindulási oldhatóságát ($33,72 \pm 0,48 \text{ mg}/100 \text{ ml}$). A laktóz mellett NCC hozzáadásával $67,38 \pm 0,48 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ volt a maximális meloxicam oldékonyság, amit elértek. [63]

c) Felületaktív anyagok alkalmazása

A felületaktív anyagok alkalmazása a rosszul oldódó gyógyszerek oldódási tulajdonságának javítására valószínűleg az egyik legkézenfekvőbb és legrégebbi módszer, amely tekinthető a segédanyag használat alesetének. Hatásukat azáltal fejtik ki, hogy csökkentik a felületi feszültséget, ezáltal javítják a lipofil gyógyszerek oldódását vizes közegben. Emellett gyógyszerhatóanyag szuszpenziók stabilizálására is használják őket. Ha a felületaktív anyagok koncentrációja meghaladja a kritikus micella koncentrációjukat, ami 0,05–0,10% közötti tartományban van a legtöbb felületaktív anyag esetében, akkor micellaképződés következik be, amely során a hatóanyag a micellákba záródik. Ennek következtében általában javul az adott hatóanyag oldhatósága. Valamint a felületaktív anyagok javítják a szilárd anyagok nedvesedését és növelik a szilárd gyógyszerek apróbb darabokra szétesésének valószínűségét. [47]

A hidrofób meloxicamot sikeresen csapdázták N-aril-szukcinil-kitozán micellákban és 342,1–444,2 nm mérettartományba eső részecskéket kaptak. Megállapították, hogy a micellákkal javítható az oldhatóság és relatíve magas csapdázási arányt (32,72%) tudtak elérni. [64]

Egy másik tanulmány meloxicammal töltött Soluplus® polimeres micellák intranazális alkalmazási lehetőségeit vizsgálta, ami az orr-agy útvonalat használhatná ki. A meloxicam és a meloxicam tartalmú polimeres micellák termodinamikai oldhatóságát három közegben: tisztított vízben (pH 7,02; 25 °C), SNES pufferben (pH 5,6; 30 °C) és PBS pufferben (pH 7,4; 55 °C) határozták meg, hogy imitálják az orrnyálkahártya és az erek pH- és hőmérsékleti viszonyait. Az oldhatósági mérések azt mutatták, hogy a meloxicam tartalmú polimer micellák értékei mindhárom közegben sokkal magasabbak a kristályos meloxicamhoz képest. A növekvő pH-val a meloxicam oldékonysága $6,92 \pm 0,19 \text{ mg}/\text{l}$, $6,99 \pm 0,45 \text{ mg}/\text{l}$ és $7,09 \pm 0,33 \text{ mg}/\text{l}$ értékekről $5419,7 \pm 1,3 \text{ mg}/\text{l}$, $5527,0 \pm 1,2 \text{ mg}/\text{l}$ és $5775,9 \pm 0,8 \text{ mg}/\text{l}$ értékekre nőtt a micellás oldat alkalmazásának köszönhetően. [65]

d) Koszolvensek alkalmazása

A folyadék gyógyszerformulákban a hatóanyag oldékonyság javításának elterjedt módszere a koszolvensek használata. A gyenge elektrolitoknak és a nem poláros molekuláknak gyakran rossz a vízdoldékonysága, ez azonban általában növelhető olyan vízzel keverhető oldószer hozzáadásával, amelyben a hatóanyag viszont jól oldódik. Ezen, az oldhatóság növelésére használt oldószereket nevezzük koszolvenseknek. A koszolvens rendszer a vizes oldat és a hidrofób oldott anyag közötti felületi feszültség csökkentésével működik. A legtöbb koszolvens hidrogénkötés donor és/vagy akceptor csoportokkal, valamint kis szénhidrogén régiókkal rendelkezik. A hidrofil hidrogénkötő

csoportjaik biztosítják a vízzel való keverhetőséget, míg a hidrofób szénhidrogén régiók megzavarják a víz hidrogénkötési hálózatát, csökkentve a víz eredő intermolekuláris vonzását. A víz önasszociációjának akadályozásával a koszolvensz csökkentik a víz azon képességét, hogy kiszorítsa a nem poláros, hidrofób vegyületeket, így növelve az oldhatóságot [66]. A folyadék alapú készítményekben a gyógyszer oldékonyságát fokozó koszolvens technológia előnyei közé tartozik a módszer egyszerűsége, a biztonsága és az olcsósága. [67]

A meloxicam oldékonyságának koszolvens technikával történő fokozását négy különböző koszolvens (etanol, propilén-glikol (PG), glicerín és polietilén-glikol (PEG) 400) esetén elemezték. Kísérleteik alapján a PEG 400 bizonyult a leghatékonyabbnak, a glicerín pedig a legkevésbé hatékornak, hiszen ez utóbbi csökkentette a meloxicam oldhatóságát. Ezen vizsgált koszolvensz szolubilizáló erejének sorrendje a következő volt: PEG 400 > etanol > PG > glicerín. Az oldhatóság növekedése az előbbi sorrendnek megfelelően rendre 20,59, 2,02, 1,20 és 0,08-szeres értéket adott 80%-os koszolvensz szint mellett, a meloxicam vízbeli oldhatóságához (0,18 mg/ml, 25 °C) viszonyítva. [68]

2.3.1 Részecskeméret redukáló eljárások

A méretcsökkentésnél figyelembe kell venni, hogy milyen beviteli utat választunk, mert ennek függvényében más és más lehet az ideális végtermék méret. Míg a legtöbb vízben rosszul oldódó orális és parenterális (tápcsatornát elkerülő beadású) gyógyszer nanorészecskék formájában szívódik fel a legjobban, a tüdőgyógyszerek esetében más a helyzet. A tüdő ágenszerű szerkezete miatt a 0,5 és 5 μm közötti méretű részecskék jól lerakódnak és felszívódnak a tüdőben. Az 5 μm -nél nagyobb részecskék nem tudnak mélyen behatolni a tüdőbe és a nyálkahártya-tisztulással eliminálódnak, míg a 0,5 μm -nél kisebb részecskék könnyen kilelegezhetők [69] és rossz a felszívódásuk. [70]

Ezen fejezetben a gyógyszerhatóanyagok hagyományos és nem hagyományos méretcsökkentési technikáit mutatom be [71]. A hagyományos technikák közül az őrlés (milling), a nagy nyomású homogenizálás (high-pressure homogenization, HPH) és a porlasztva szárítás (spray drying), míg a nem hagyományos technikák közül a folyadék antizsolvensz kristályosítás (liquid antisolvent crystallization), a porlasztásos fagyasztva szárítás (spray freeze-drying), a szuperkritikus folyadék alapú (supercritical fluid-based) mikronizálási eljárás és az impulzuslézeres abláció kerülnek bemutatásra. Bár elméleti hátterük tekintetében ezen technikák jelentősen különböznek, a gyakorlatban, ahogy azt az idézett publikációk is tükrözik, gyakran kombinálják a különböző eljárásokat [48].

a) Őrlés

Az őrlés az egyik legkézenfekvőbb, talán legelterjedtebb módszer a részecskeméret csökkentésre. Az őrlés mellett aprítás vagy porítás néven is hivatkoznak ezen top-down folyamatra, amelyben a nagyobb részecskéket mechanikai energia alkalmazásával kisebbekké alakítják át. Megkülönböztetünk száraz és nedves őrlést. A folyamat száraz őrlésnek minősíthető, amikor a hatóanyag száraz állapotban van. Elsősorban akkor alkalmazzák ezt, ha a gyógyszer részecskék az őrlés után stabilak és nem hajlamosak agglomerálódni, aggregálódni. Nedves őrlésről akkor

beszélünk, amikor a hatóanyagot folyékony közegben szuszpendálják. Ezen technika alkalmazása során felületaktív anyagokat vagy/és polimereket használnak a gyógyszerhatóanyag részecskék stabilizálására [72]. A **3. táblázat** a részecskeméret csökkentése céljából alkalmazott száraz és nedves őrlési eljárások rövid összehasonlítását mutatja be. [71]

	Száraz őrlés	Nedves őrlés
Közeg	nitrogén, argon, száraz levegő stb.	vizes/nem vizes (pl. hexán, toluol, víz)
Kezdőtőke és üzemeltetési költség	alacsony	magas
Méretcsökkentés sebessége	gyors	lassabb, mint a száraz őrlés
Termék jellemzői:		
Átlagos mérettartomány	mikro	nano
Méreteloszlás (PSD)	széles	szűk, keskenyebb
Felületi morfológia	durva	sima
Stabilitás és áramlási jellemzők	agglomerált részecskék rossz áramlási tulajdonságokkal	stabil részecskék jobb áramlási tulajdonságokkal
Oldódási sebesség	lassú a nedves őrlésű termékkel összehasonlítva	gyors

3. táblázat A száraz és a nedves őrlés összevetése az eljárás paraméterei és a létrehozott termékek jellemzői tekintetében [71].

A hatóanyag részecskék előállítás során ideális, ha a gyártás eredményeképpen keskeny méreteloszlású mintát kapunk, hogy ne legyen szükség további lépésekre. Az őrlési technikákkal tipikusan széles mérettartományt fednek le a létrehozott részecskék, így az aprítás után szitálásra van szükség, hogy azáltal monodiszperzebb méreteloszlást kapjanak és így reprodukálhatóbb legyen a hatás. Az őrléssel nyert gyógyszerpor gyakran összetapad és rossz áramlási tulajdonságokkal rendelkezik. Ez utóbbi probléma kezelése végett általában inert töltőanyagokat vagy segédanyagokat (például: laktózt, kalcium-foszfátot, mannitot) kevernek az őrlemény mellé [73].

A kalapácsmalom, a gyöngyös malom, a légsugaras (air-jet) malom, a tűs malom és a kúpos szitamalom általánosan használt berendezések az őrlési művelethez. Ezekben különböző mechanikai hatások, az ütés, a súrlódás, a koptatás és a nyírás-összenyomás a méretcsökkentés fő erői. A megfelelő berendezés kiválasztása elsősorban a termék kívánt szemcseméretén alapul. A kalapács- és tűs malommal a 10–1000 μm , a gyöngyös és légsugaras malommal az 1–50 μm mérettartomány érhető el. [71]

A gyógyszeriparban leggyakrabban használt malomfajták a légsugármalom (air-jet fluid energy mill) és a golyósmalom (ball mill). Ezen malmok előnye, hogy nagy őrlési hatékonyságúak és különböző keménységű anyagok őrlésére képesek. A légsugaras őrlésben nagy sebességű sűrített levegőt használnak a részecskék méretének csökkentésére. A részecske-részecske ütközés következtében elérhető legkisebb részecskék mérete tipikusan a pár mikrométer nagyságrendbe esik. A légsugaras őrlés előnye, hogy nincs az őrlőkamrában mozgó alkatrész, ezáltal elkerülhető a végtermék szennyeződése. A gyöngyös malomban a részecskék méretcsökkentése a kamrába helyezett

hatóanyag és a gyöngyök ütközésének eredménye. A termék minősége a folyamat paramétereitől függ, például az őrlési sebességtől, az őrlési időtől, a gyöngyök és a hatóanyag arányától, valamint az őrlőközeg térfogatától.

Az őrlés legnagyobb előnye, hogy nem használ oldószert, mivel annak jelenléte a hatóanyag kémiai bomlásához, szennyeződéséhez vezethet. Az őrlés hátrányai közé tartozik, hogy igen nagy az energiaigénye és relatíve alacsony a hatékonysága. Emellett a részecskeméret eloszlása széles, heterogén a részecskék alakja és a malom felszínének kopása miatti szennyeződéssel is számolni kell. Továbbá az őrlés során a részecskék felületét ért hatások a kristályosság megváltozásához és a minőség romlásához vezethetnek [74]. [71]

Bartos és munkatársai bolygó és őrlőgyöngyös malom kombinációjával végrehajtott nedves őrlés esetén vizsgálták az őrlési idő (0–90 *perc*) és a stabilizáló segédanyag (polivinil-alkohol, PVA) hozzáadásának hatását a meloxicam részecskék méretcsökkentése során. Segédanyag hozzáadása nélkül a kiindulási minta ($d(50) = 34,26 \mu\text{m}$) mikronizációját tudták elérni, a legkisebb méretet ($d(50) = 3,55 \mu\text{m}$) 10 *perc* őrlés után kapták. A PVA jelenlétében 10 *perc* őrlés után mikronizáció ($d(50) = 2,96 \mu\text{m}$), majd 50 *percet* követően nanonizáció ($d(50) = 126 \text{ nm}$) következett be. A méret csökkenése mellett a kristályossági fok csökkenését is detektálták. [40]

b) Nagynyomású homogenizálás

A nagynyomású homogenizálás (high-pressure homogenization, HPH) során a hatóanyagot feloldják, majd a szuszpenziót nagy nyomás (50–500 *MPa*) alatt többször átvezetik egy nagyon vékony résen. A keverék (premix) pulzáló áramlását egy nagynyomású dugattyús szivattyúval biztosítják. Az alkalmazott rés szélessége tipikusan az 5–20 μm tartományba esik, ami a szuszpenzió viszkozitása, illetve a nyomás függvényében állítható [72]. A folyadékot érő nyíróerők, kavitáció és turbulencia hatására a nagyobb cseppek felaprózódnak, ami a részecskeméret csökkenéséhez vezet. A végtermék részecskeméret tartományának hangolása/beállítása során az alkalmazott nyomás, a homogenizálási ciklusok száma és a hatóanyag mechanikai tulajdonságai a döntő paraméterek. A HPH kedvező tulajdonsága az őrlési eljárásokkal szemben, hogy ezzel elkerülhető a nagymértékű amorfizáció, a polimorf átalakulás és a fémmel történő szennyeződés [75]. Az eljárás további előnye, hogy felskálázható kereskedelmi, üzemi szintre, ezért széles körben alkalmazzák a gyógyszeriparban [76]. Hátrányai közé sorolható a nagy energiaigény, illetve az, hogy a kivitelezéshez szükséges egy premikronizálási lépés, hogy a keskeny rés ne duguljon el és rövidebb legyen a homogenizálási idő [72]. A HPH technikát más módszerekkel kombinálva is alkalmazzák, például porlasztva szárítással, porlasztva fagyasztva szárítással és folyadék antizsolvens kristályosítással. [71]

Yu és munkatársai a meloxicam port polivinil-pirrolidon-k17 (PVP-k17) vizes oldatában oszlatták el, majd a kapott szuszpenzióból HPH technikával (100 *bar*, 120 *ciklus*) állítottak elő részecskéket. A kapott kristályok alakja szabálytalan, lekerekített téglalapokra hasonlított, míg átlagos mérete $3,262 \pm 0,016 \mu\text{m}$ volt. [77]

c) Porlasztva szárítás

A porlasztva szárítás (spray drying, SD) módszerrel száraz részecskéket lehet kinyerni egy oldatból vagy szuszpenzióból. Az előállított por lehet végtermék vagy közti termék, amit többek között

inhalációs készülékek [78], [79], kapszulák [80] vagy szilárd diszperziók [81] gyártásához használnak fel. Az eljárás első lépése az oldat porlasztása, ami kivitelezhető például forgó porlasztóval, hidraulikus, pneumatikus vagy ultrahangos fúvókával [81]. A porlasztással előállított cseppek mérete tipikusan a 20–100 μm tartományba esik [82], ami megközelítőleg 10^5 m^2 nagyságú felületet eredményez. A porlasztást követően a cseppek a szárító kamrába kerülnek, ahol forró levegővel vagy egyéb gázzal érintkeznek és a rendelkezésre álló nagy párolgási felületnek köszönhetően, a kedvező hőátadási tulajdonságok eredményeképpen az oldószer gyorsan elpárolog. A végtermék részecskemérete és morfológiája befolyásolható a hőmérséklet, az anyag betáplálási sebessége és a porlasztási paraméterek hangolásával [83]. Kimutatták, hogy a porlasztófej nyílásának átmérője, a levegő áramlási sebessége és az oldat koncentrációja is erősen hat a csepp méretre: a csepp mérete csökken, ha csökken a fúvóka nyílásának átmérője vagy az oldat koncentrációja, illetve, ha nő az áramlási sebesség [84]. Az eljárás előnye, hogy rövid a szárítási idő, szabadon szálló port kapunk eredményként és kontrollálható a részecskeméret tartomány. Ezzel szemben hátránya a nagy energia- és költségigény, valamint a folyamat során bekövetkező illóanyag-veszteség és a termék magas bemeneti hőmérséklete miatti termikus degradációjának kockázata [85]. [71]

A meloxicam kezdeti kristályos szemcsemérete ($85,4 \pm 6,6 \mu\text{m}$) jelentősen csökkent, ha a por vizes szuszpenzióját porlasztva szárításnak vetették alá, a kiindulásinak értéknek kevesebb, mint a negyede lett ($19,1 \pm 2,6 \mu\text{m}$). Különbféle segédanyagok és segédanyag kombinációk hozzáadásával, együttes porlasztva szárítással mannitol alapú kristályos mikrokompozitokat ($1\text{--}6 \mu\text{m}$) hoztak létre, amikbe meloxicam mikrokristályok ($1\text{--}5 \mu\text{m}$) voltak beágyazva. A módszer előnye, hogy egy lépésben létre tudtak hozni stabil kompozitokat, amik kiváló nedvesedési és felszabadulási tulajdonságokkal bírtak. [86]

d) Kriogén technikák

A kriogén eljárások során nanostrukúrával rendelkező, nagy porozitású, amorf jellegű hatóanyag részecskéket állítanak elő igen alacsony hőmérsékleteken. A technika általában besorolható a részecskeméret csökkentő, illetve az amorfizáló módszerek közé is. Az eljárások csoportosíthatók a befecskendező egység típusa (kapilláris, forgó, pneumatikus és ultrahangos fúvóka), a fúvóka helye (a folyadékszint felett vagy alatt) és a kriogén folyadék összetétele (hidrofluoralkánok, nitrogén, argon, oxigén és szerves oldószerek) alapján. Porlasztásos fagyasztva szárítás, atmoszferikus fagyasztva szárítás, vákuumos fagyasztva szárítás és liofilizálás felhasználásával egyaránt száraz por terméket lehet kinyerni. [47], [87]–[89]

A porlasztásos fagyasztva szárítás (spray freeze-drying, SFD) tekinthető a porlasztva szárítás továbbfejlesztett változatának. Az eljárás két fázisra bontható: megszilárdulás és szublimáció. A porlasztva szárításhoz hasonlóan az SFD esetén is tipikusan egy vizes oldat a kiindulási minta, ami tartalmazza a hatóanyagot, esetleg további segédanyagokat is. Az oldatot beporlasztják egy hideg, száraz, inert gáz közegbe, s a porlasztással létrehozott cseppeket a kamra alján, fagyott, szilárd állapotban összegyűjtik. Ezt követi a szublimáció, amikor a vákuumba vezetett fagyott anyag víztartalma eltávozik és finom por marad vissza, mint végtermék. A porlasztásos fagyasztva szárítás előnye a porlasztva szárítással szemben, hogy kisebb a termális és a mechanikai stressz, így alkalmas hőérzékeny anyagok feldolgozására is [90]. Ezen felül a csepp gyors fagyásának köszönhetően a

hatóanyag amorf módon ágyazódik be a segédanyagba, nem jön létre köztük fázis szeparáció [91]. [47]

Az SD helyett az SFD használata javíthatja az áramlási tulajdonságot, növelheti a kihozatait és csökkentheti az átlagos részecskeméretet megfelelő paraméterek használata mellett [90]. Ellenben a porlasztásos fagyasztva szárítás fő hátránya a magas fenntartási és működési költség, ami a vákuum fenntartásával járó többletköltségekből adódik [92].

Őrlés és HPH kezelést követően különböző szárítási eljárásokat (szobahőmérsékleten szárítás, vákuum kemencében 25 °C-on szárítás, fagyasztva szárítás mannitol vagy trehalóz (trehalose) jelenlétében) vetettek össze meloxicam „smart kristályok” előállítására céljából. A kiindulási minta $36,54 \pm 5,9 \mu\text{m}$ átlagos részecskemérete az őrlési lépés hatására $349 \pm 32,5 \text{ nm}$ -re csökkent, ami a homogenizáló lépést követően $242,1 \pm 24,2 \text{ nm}$ -re redukálódott. A szárítási opciók közül a fagyasztva szárítással érték el a legkisebb méretet, mannitol esetén $374,75 \pm 12,56 \text{ nm}$, míg trehalóz alkalmazásakor $325,75 \pm 2,47 \text{ nm}$ adódott átlagos részecskeméretre. A vizsgálataik során pH 7,4 és 25 °C esetén a legjelentősebb oldékonyságbeli javulást a fagyasztva szárított mannitolos részecskéknél tapasztalták, ahol az oldékonyság a 2,5-szörösére nőtt, $477,55 \pm 92,60 \mu\text{g/ml}$ -ről $1166,48 \pm 7,57 \mu\text{g/ml}$ -re emelkedett meg. [93]

e) Folyadék antiszolvens kristályosítás

A folyadék antiszolvens (liquid antisolvent, LAS) kristályosítás egy bottom-up eljárás, amely során egy olyan oldatot állítanak elő, ami tartalmazza a hatóanyagot az elsődleges oldószerben feloldva, illetve az ehhez hozzáadott második oldószert. Ez utóbbit nevezik antiszolvensnek, azaz anti-oldószernek, mivel abban a hatóanyag oldhatósága igen alacsony, elhanyagolható. A komponensek összekeverése révén a hatóanyag túltelített oldata jön létre az elsődleges oldószer és az antiszolvens kombinációjában. A túltelítés hatására nagymennyiségű kondenzációs mag keletkezik, amik fokozatosan nőni kezdenek és részecskéket képeznek. [71], [94], [95]

A részecskeméret, a morfológia és a kristályossági tulajdonságok jól szabályozhatók a különböző paraméterekkel, mint az oldószerek anyagi minősége, koncentrációja, térfogataránya, az oldat antiszolvensbe injektálásának, illetve a keverésnek a sebessége, valamint a hőmérséklet. A módszer legfőbb gyengesége a hatékony keverés biztosítása. A nem megfelelő keverés esetén lokális keveredés és lokális túltelítődés jöhet létre, ami a termék agglomerációjához vezet. A re-kristallizáció további szabályozására ultrahangos és mikrofluidikás kiegészítéseket is fejlesztettek. Emellett hátránya még a technikának, hogy tipikusan poláros szerves oldószereket alkalmaznak, amik sok esetben toxikusak, illékonyak, potenciálisan robbanékonyak és károsak. A poláris oldószerek hulladékkezelési problémáját új, zöld oldószerek bevezetésével próbálják megoldani és így fenntarthatóvá tenni a folyamatot. [71]

Raval és Patel megfelelően megválasztott stabilizátorok mellett meloxicam nanorészecskéket állítottak elő antiszolvens kristályosítás és nagynyomású homogenizáció kombinálásával, amiket végül porlasztva szárítással száraz porrá alakítottak. Elsőként ultrahangon alapuló antiszolvens kiválasztást alkalmaztak, a meloxicamot dimetil-formamidban (DMF) oldották fel, antiszolvensként pedig vizet használtak. Ezen lépéssel elő tudtak állítani szubmikrométeres részecskéket, a kiindulási minta $d(50) = 46,39 \pm 7,37 \mu\text{m}$ méretét $d(50) = 0,259 \pm 0,03 \mu\text{m}$ nagyságúra csökkentették, azonban

igen széles volt a méreteloszlás és a méret reprodukálhatósága is gyengének bizonyult. Azonban, ha ezt követően HPH-t hajtottak végre a mintán, akkor kisebb részecskéket kaptak ($d(50) = 0,212 \pm 0,04 \mu m$) és az eloszlás félértékszélessége is jelentősen visszaesett. A formulálási lépések eredményeképpen létrehozott meloxicam nanorészecskék telítési oldhatósága ($21,84 \mu g/ml$) négyszeresére nőtt a kiindulási anyag ($4,4 \mu g/ml$) esetén mért értékhez képest víz közegben, $25^\circ C$ -on. [96]

f) Szuperkritikus folyadék eljárás

A szuperkritikus folyadék (supercritical fluid, SCF) eljárás tekinthető a kriogén technikák egy esetének. A szuperkritikus folyadékok olyan folyadékok, amelyek hőmérséklete és nyomása meghaladja az adott anyagra jellemző kritikus hőmérsékletet és kritikus nyomást, ennek köszönhetően a folyadékok és a gázok jellemzőit is magukban hordozzák. Jellemzőjük, hogy a kritikus hőmérséklet közelében nagymértékben összenyomhatóak, így a nyomás mérsékelt változtatásával is jelentősen lehet a sűrűségüket, s ezáltal oldhatóságukat is befolyásolni. A gyógyszer részecskéket szolubilizálják a kritikus folyadékban (leggyakrabban szén-dioxidban), majd ismét kikristályosítják, jelentősen csökkentett szemcsemérettel. Ezen eljárás alkalmas mikronizálásra, szűk méreteloszlási tartományban létrehozva szubmikrométeres részecskéket, de nanoszuszpenziók is kivitelezhetők vele, az $5\text{--}2000\text{ nm}$ -es átmérő tartomány elérhető. A módszer előnye, hogy jól kontrollált részecskeméretet és keskeny PSD-t képes előállítani. Továbbá amellett, hogy a szén-dioxid kritikus hőmérsékletének alacsonyabb értéke kiküszöböli a hőérzékeny gyógyszerkeverékek termikus degradációját, nem mérgező, nem gyúlékony és olcsóbb a többi szuperkritikus folyadékhoz viszonyítva. [47], [71]

Szén-dioxid szuperkritikus folyadékként való alkalmazásával állítottak elő meloxicam részecskéket, méretcsökkenést és oldékonyság javítást kívántak elérni. A keltett részecskék szabálytalan alakúak voltak és a $0,5\text{--}2,0 \mu m$ tartományba estek. A kiindulási anyag esetén mért vízbeli oldékonyság ($3,6 \pm 0,3 \mu g/ml$) körülbelül megduplázódott ($7,9 \pm 0,3 \mu g/ml$), míg 30 *perc* leforgását követően az oldódási sebesség $0,02 \mu g/ml/min$ -ről $0,19 \mu g/ml/min$ -re nőtt a SCF eljárás következtében. [97]

g) Impulzuslézeres abláció

Az impulzuslézeres abláció és annak gyógyszerészeti alkalmazásai a *2.4 Lézeres abláció* és a *2.4.1 Lézeres abláció a gyógyszeriparban* című egységekben kerülnek részletes bemutatásra.

2.3.2 Amorfizáció

Az amorfizáció gyógyszerkutatásban betöltött szerepét fokozta a gyógyszeripari szilárd anyagok, különösen a polimorfok és szolvátok iránti növekvő figyelem, valamint az üvegesedés és az üvegátmenet tudománya iránti újjáéledt érdeklődés. Amorf anyagok szándékosan és akaratlanul is képződhetnek a szokásos gyógyszergyártási műveletek során, s a változás jelentős javulást idézhet elő a hatóanyag hatékonyságában (pl.: hasznosulás, felszabadulási sebesség), de ugyanakkor nem kívánt hatásokat is kiválthat (pl.: fizikai stabilitás csökkenése). [54]

A kristályos hatóanyag átvitele amorf megfelelőjébe az oldhatóság növelésének egyik módja lehet. Kimutatták azonban, hogy nem létezik egyetlen, meghatározott amorf állapot, illetve, hogy mind az

előállítás folyamat típusa, mind annak paraméterei befolyásolják az amorf vegyület molekuláris rendjét. [4]

Az amorf gyógyszerhatóanyagot tartalmazó termék létrehozása két szinten történhet. Egyrészt amorfizálható maga a hatóanyag, ami anyagtól függ, hogy járható út-e. A kristályos anyag amorfizálása két módon lehetséges: direkt konverzióval (pl.: mechanikai aktiválás, besugárzás) vagy egy termodinamikailag stabil, eredendően nem kristályos forma (gőz, olvadék, oldat) létrehozását követő gyors lehűtéssel, igen alacsony hőmérsékletű vagy nagy kölcsönhatás-intenzitású eljárással (sokkhűtés (quenching), kicsapítás (precipitation), leválasztás (deposition) vagy adszorpció) [98]. Számos hatóanyagnál stabilitási problémák lépnek fel, rövid időn belül visszakristályosodnak. Másrészt gyógyszer technológiai eljárások és stabilitást biztosító segédanyagok alkalmazásával van lehetőség nem magát a hatóanyagot amorfizálni, hanem egy amorf rendszert kialakítani. [99]

Számos olyan metódus van, ahol nem feltétlenül az amorfizálás az elsődleges cél, de a folyamat során részlegesen vagy teljesen megváltozik a kristályszerkezet is. Erre példák a porlasztva szárítás, a fagyasztva szárítás és az őrlés, amik elsődlegesen részecskeméret csökkentő eljárások, de sok esetben amorfizálódik is a minta a folyamat során (lásd 2.3.1 *Részecskeméret redukáló eljárások*). Alkalmaznak még különböző olvadékos technológiákat (pl. olvadék extrudálás (melt-extrusion) vagy olvadék sokkhűtés (melt-quenching)) és együttes kicsapítást (coprecipitation) is amorf forma létrehozására [4]

Az alábbiakban különböző technikákat mutatok be, amik rosszul oldódó gyógyszerhatóanyagok amorfizációja révén javítják az aktív anyag oldhatóságát, s ezáltal biológiai hasznosulását. Az olvadékos technológiákra, az üveges oldat vagy szilárd diszperzió képzésre és a térbeli szeparációra, valamint a koamorf formulákra térek ki.

Ha a hatóanyag olvasztása nem okoz kémiai roncsolódást, akkor meg lehet olvasztani az anyagot, majd az olvadék hirtelen dermedtésével létrehozható az amorf forma. Másik lehetőség, hogy a segédanyagot olvasztják meg és annak az olvadékában oldják fel az aktív anyagot. A hirtelen hőmérsékletcsökkentés, gyors dermedtés, illetve a kristályosodást akadályozó segédanyagok fontosak a stabil amorf forma kialakításához. [99]

Az olvadékos technológiák közül a kereskedelmi méretű gyártáshoz a forró olvadékos extrudálás (hot-melt extrusion, HME) és az olvadék agglomerálás (melt agglomeration) használható fel. [100]

A forró olvadékos extrudálás során polimer segédanyagot kevernek a hatóanyag mellé. A HME folyamata öt lépésre osztható, nevezetesen: adagolás, lágyítás és olvasztás, keverés/gyúrás, szállítás/továbbítás, kiürítés és hűtés a további feldolgozáshoz. [100] A HME berendezés rugalmas kialakítású, a moduláris szerkezeti elemek, nevezetesen a csavarok és a hengerek beállítása lehetővé teszi a folyamatok testreszabását a kívánt eredmények elérése és a különböző nyersanyagok befogadása érdekében [101].

Az olvadékos extrudálás előnye, hogy folyamatos termelést tesz lehetővé, egylépéses, különböző egységekkel változatos formájú és méretű termékeket lehet előállítani, valamint a gyártás skálázható [102]. Hátrányai közé tartozik, hogy nagy az energiafelhasználása és a hőre érzékeny vegyületek esetén nem vagy csak korlátozott körülmények között alkalmazható [102]–[104]. A

berendezés kialakításának megváltoztatása (pl. gyúróelemek jelenléte), valamint lágyítószerke hozzáadása a feldolgozási hőmérséklet és/vagy tartózkodási idő csökkentéséhez vezethet, és így minimalizálható a gyógyszerek termikus bomlásának lehetősége, érzékenyebb vegyületek formulálása is lehetővé válik [105].

Az üveges oldatok, illetve szilárd diszperziók képzése során a hatóanyag mellé valamilyen polimert (polivinil-pirrolidon (PVP), polivinil-alkohol (PVA), cellulózszármazékok vagy polietilén-glikol (PEG)) adagolnak és olvadékos, őrlési, porlasztásos technológiai formulálásnak vetik alá [106]. Üveges oldatokat a nagyobb méretű polimerek esetén képeznek, ahol a hatóanyag molekuláris szinten oszlik el a polimer közegben. [4]

A térbeli elválasztás esetén a hozzáadott anyag a hatóanyaggal részecske szinten van kapcsolatban, például bevonatot képez körülötte. A fizikai határ létrehozásával az amorf forma stabilabbá válik, illetve a bevonás előtti kristályok további növekedésének is gátat szab [107]. Ezen eljárás előnye, hogy nem szükségesek funkciós csoportok (pl.: hidrogén kötés akceptor és /vagy donor helyek) az amorf gyógyszerhatóanyag felszínén, ez szélesebb körű alkalmazhatóságot tesz lehetővé. [4]

További lehetőség a koamorf keverékek képzése, amikor a hatóanyagot molekuláris kölcsönhatásokkal stabilizálják kis molekulatömegű molekulákkal (pl.: karbamid, citromsav, cukrok). A „koamorf” kifejezéssel a csak kis molekulatömegű komponenseket tartalmazó amorf keverékeket különböztetik meg az amorf hatóanyag-polimer keverékektől, amelyeket általában szilárd diszperzióknak vagy üvegoldatoknak neveznek. [4] Chieng és munkatársai koamorf gyógyszer/gyógyszer keverékeket fejlesztettek ki alacsony molekulatömegű komponensek felhasználásával, hogy ezáltal polimerek nélkül stabilizáljanak amorf anyagokat és két hatóanyagot tartalmazó formulát hozzanak létre kombinált terápia céljából [108].

A magas olvadáspontú, rossz vízdoldhatóságú hatóanyagokat nehéz olvadék extrudálással formulálni, mivel a feldolgozáshoz szükséges magas hőmérsékleten kémiai instabilak. Emiatt, a Haser és munkatársai által végzett vizsgálatok során a meloxicam extrudálásához szükséges volt a feldolgozási paraméterek és a készítmény összetételének optimalizálása. A minta 10% meloxicam és 90% kopovidon tartalma esetén a 140 °C feletti feldolgozás jelentős kémiai bomlást eredményezett, ami mögött hidrolízis állt. A henger konfigurációját és a csavar kialakítását úgy tervezték, hogy a nedvességet eltávolítsa és az olvadék tartózkodási idejét csökkentse. Ezen optimalizált paraméterek mellett a minta tisztasága 96,7% volt. A kémiai stabilitás további fokozása érdekében meglumint adtak hozzá, hogy stabilizáló bázikus mikrokörnyezetet biztosítsanak, ami 100%-os tisztaságot eredményezett. Igazolták a meloxicam és a meglumin közötti proton transzfert, ami *in situ* só képződésre utal. Bemutatták, hogy a meglumin hozzáadásával a meloxicam oldékonysága szignifikánsan növelhető: 11,5 $\mu\text{g/ml}$ értékről 30,1 $\mu\text{g/ml}$ -re (1:1 molarány, pH 6,0), ami a köztük fellépő ionos kölcsönhatásnak köszönhető. A folyamat paramétereinek finomításával és a receptúra módosításával sikeresen extrudáltak meloxicam amorf szilárd diszperziót, amely fizikailag stabil volt és kedvezőbb felszabadulási tulajdonságokkal bírt. [109], [110]

2.4 Lézeres abláció

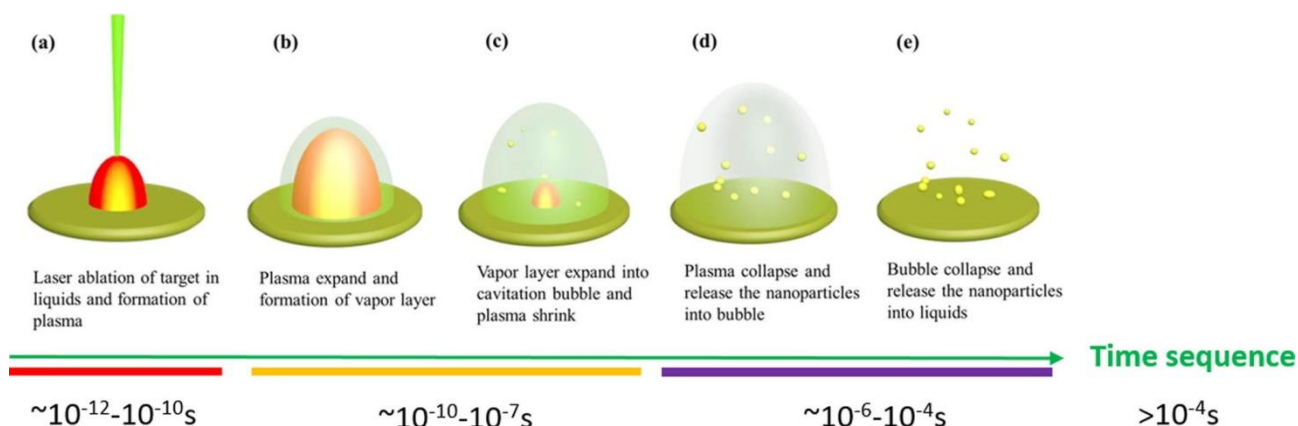
Lézeres abláció alatt azt a jelenséget értjük, amikor egy nagy teljesítményű impulzusüzemű lézer nyalábját a mintára fókuszálva, a besugárzás hatására a minta felületére merőlegesen plazmaállapotú anyagfelhő lép ki. A folyamat során meghatározók a besugárzás paraméterei (hullámhossz, impulzushossz, energiasűrűség) és a céltárgy optikai, termikus és morfológiai tulajdonságai, valamint a környezeti tényezők (közeg, nyomás). [5]

Az abláció folyamata egy komplex fizikai-kémiai jelenség, ami több nagyságrendnyi időt felölel. Első lépésben a minta felszíni rétege elnyeli a lézer energiáját (10^{-15} s), majd ez az energia átadódik a gerjesztett elektronoktól az akusztikus fononoknak (10^{-12} s). A felszín és a környéke felhevül, olvadás és párolgás következik be (10^{-10} – 10^{-9} s), plazmafelhő jön létre a minta felett. A sűrű plazma tágulni kezd és lökeshullámok jönnek létre. A plazma hűlése nyomán kondenzációs folyamatok kezdődnek meg, részecskék keletkeznek és növekednek, aggregálódnak. Végül a plazmafelhő összeomlását követően a keltett részecskék kiszabadulnak, kilökődnek ($>10^{-6}$ s). [111], [112]

Folyadék közegbeli (vagy megnövelt nyomású gáz közegbeli) abláció esetén fontos kiemelni a kavitáció szerepét is. Miután a lézerimpulzust elnyeli a minta, anyagfelhő/plazmafelhő távozik a céltárgyból, ami elektronok, ionok, atomok, molekulák gőzök, olvadék/folyadék cseppek és szilárd részecskék összessége (10^{-12} – 10^{-10} s). Ezt követően a plazma tágulni kezd, körülötte pedig egy vékony gőz réteg alakul ki. A közeg körülhatárolja, bezárja a plazmát. A plazma tágulás következtében lökeshullámok jönnek létre, a gőzrétegből pedig kialakul a kavitációs buborék (10^{-10} – 10^{-7} s), ami fontos szerepet tölt be a nanorészecskék létrehozásában. Ez az a pont, ahol a folyamat eltér az iménti, gáz közegbeli leírástól. A kavitációs buborékon belül a környezettől jelentősen eltérő hőmérséklet és nyomásviszonyok uralkodnak. A körülmények függvényében a buborék összehúzódása és tágulása többször is megismétlődhet. A plazma kihűlését, a plazmafelhő felszakadását és a kavitációs buborék összeomlását követően a részecskék kiszabadulnak a folyadék közegbe (10^{-6} – 10^{-4} s). A kavitáció buborékban megkezdődött nukleációs folyamatokat a folyadékbeli diszpergálást követően lassú részecskenyövekedés és aggregáció követi ($>10^{-4}$ s). [113]–[115]

A folyamat vázlatos rajzát a **2. ábra** mutatja be [116].

A lézeres abláció egyrészt lehet eszköz a felület megmunkálására [117]–[121], másrészt részecskék keltésére is alkalmas [122]–[124]. Elsősorban a részecskék keletkezhetnek a kilépő plazmafelhőből, ez az elsődleges részecskekeletkezés. Másodsorban az abláció által kiváltott lökeshullám és a céltárgy találkozásánál, kölcsönhatásánál is kiszakadhatnak részecskék a felületből, ez a másodlagos részecskekeletkezés folyamata. Amennyiben a keltett részecskék nem hagyják el a céltárgy feletti térrészt és a következő lézerimpulzussal kölcsönhatásba lépnek, akkor további aprózódás következhet be, ezt a folyamatot lézeres fragmentációnak szokták nevezni.



2. ábra A (nanoszekundumos) folyadék közegbeli impulzuslézeres abláció (pulsed laser ablation in liquid, PLAL) folyamatának vázlatos lépései. **(a)** A folyadékba helyezett céltárgy felületének lézeres ablációja következtében a felület határán plazmafelhő alakul ki. **(b)** A folyadékkal körülzárt plazma tágulni kezd és energiáját átadja a környezetének, aminek következtében egy gőzréteg alakul ki a plazma körül. **(c)** A gőzréteg kavitációs buborékká tágul és összenyomja a plazmát. A plazmában létrejött részecskék egy része már ekkor eloszlik a kavitációs buborékban. **(d)** A plazma megszűnik és a benne lévő összes nanorészecske kiszabadul a buborékba. **(e)** A kavitációs buborék összeomlik, így a részecskék a folyadékba kerülnek és kolloidot képeznek. [116]

Elsőként a besugárzási paramétereikről, majd a céltárgyakról és végül a környezeti tényezőkről ismertetek egy rövid áttekintést.

A lézeres abláció céljából használt lézerek hullámhossza a közép-infravörös tartománytól (pl.: CO_2 -lézer: $10,6 \mu\text{m}$) a közeli infravörösön és a látható tartományon át (pl.: Nd:YAG lézer alap- és második harmonikusa: 1064 nm , illetve 532 nm) egészen az ultraibolyáig (pl.: excimer lézerek: XeCl: 308 nm , KrF: 248 nm , ArF: 193 nm és F_2 : 157 nm) terjed. A hullámhossz kiválasztásánál a céltárgy abszorpciós tulajdonságait fontos szem előtt tartani. A lézeres ablációs anyagmegmunkálási kísérletek nagy részét, főleg a kezdeti időszakban, UV hullámhosszakon végezték a nagyobb elérhető fotonenergiák miatt. [114]

Általában impulzusüzemű lézereket alkalmaznak, mert a folyamatos üzeműek esetén a termális jelenségek dominálnak és az anyageltávozás mögött döntően olvadás és forrás áll, ezért igen nagy a másodlagosan hőkárosodott zóna (heat-affected zone, HAZ). [125] Az impulzusüzemű lézerek esetén az impulzushossz is jelentős befolyással bír, hiszen nanoszekundumos vagy piko-, illetve femtoszekundumos impulzusok esetén az anyag eltávolításához és a plazmaképződéshez vezető mechanizmusok eltérőek [114], [126]. Nanoszekundumos impulzusok esetén a lézer foton kölcsönhat a céltárgy elektronjaival, azok energiáját azonnal megnöveli, ami az anyag párolgásához, illetve a folytonos üzemű besugárzáshoz képest kisebb méretű HAZ keletkezéséhez vezet. A termális hatás tovább redukálható piko- és femtoszekundumos impulzusok alkalmazásával. Ezen esetekben a lézerimpulzus időtartama sokkal rövidebb, mint a szabad elektronok és az atomi rács közötti energiaátadás időskálája, így az elektronok néhány vagy néhány tíz elektronvoltra gerjesztődnek. Következésképpen a céltárgy rácshőmérséklete változatlan marad és a lézerimpulzus energiájának nagy része elsősorban a felülethez közeli, mindössze néhány mikrométeres rétegben nyelődik el,

ahol rendkívül magas nyomás és hőmérséklet érhető el. Az elnyelt energia az anyagot nagyon gyorsan az olvadásponton túlra, közvetlenül a nagy kinetikus energiájú gőzfázisba hevíti, az anyag elpárolog. Az ultrarövid (piko- és femtoszekundumos) impulzuslézerek esetében elsősorban a fotonelnyelési mélység határozza meg a felmelegített térfogatot, a termikus diffúziós mélység hatása kisebb. [114]

A besugárzás energiasűrűsége (F) kapcsán bevezethető az ablációs küszöb (F_k) fogalma, amin azt a küszöb energiasűrűséget értik, amely alatti értéken az abláció nem következik be az első impulzus hatására. Ezen határérték leginkább a besugárzott anyag adott hullámhosszon mért abszorpciók együtthatójától (α) függ. [127], [128]

A maratási sebességre (l_m : ablációs gödör mélysége/impulzusszám) felírható az alábbi közelítő összefüggés:

$$l_m = \frac{1}{\alpha} \cdot \ln\left(\frac{F}{F_k}\right), \quad (1)$$

ahol F az aktuális energiasűrűség az abláció során, F_k az ablációs küszöb, α pedig az adott hullámhosszon mért abszorpciók együtthatójátja az anyagnak. Azonban kísérletek alapján igazolták, hogy nagyobb energiasűrűségek esetén (pár J/cm^2) az összefüggés lineárisává válik a logaritmikus kapcsolat helyett, míg egyes anyagok esetén kellően nagy F értéknél állandóvá válik a maratási sebesség. [127], [129]

A céltárgy paraméterei közül kiemelendő a minta besugárzási hullámhosszon mért abszorpciók együtthatója, reflexiója, az anyag hővezetési együtthatója, valamint homogenitása, porozitása. A lézeres abláció bevált technika a nanorészecske keltésre, de mikrométeres részecskék is keletkezhetnek (mellék)termékként. A lézeres ablációt részecskekeltésre elsősorban fémek [130]–[134] és fém ötvözetek [135]–[137] esetén alkalmazták, de az utóbbi évtizedekben egyre több tanulmány foglalkozott szerves anyagok [138]–[140] besugárzásával is. A fémekhez viszonyítva nehezebben írhatók le a szerves anyagok ablációja során lejáráó folyamatok, hiszen a komplexebb molekulák esetén nem számíthatunk arra, hogy a plazmában jelen levő atomokból, ionokból újra összeálljon az eredeti vegyület, fokozottan fennáll a termális degradáció lehetősége. A degradáció csökkentése céljából gyakran forgatják, mozgatják a céltárgyat vagy lézeres pásztázást alkalmaznak, hogy ne egy ponton ablálják a mintát. A lézeres besugárzás következtében kialakuló változatos nyomási és hőmérsékleti jellemzők miatt a keltett részecskék kristályossága is megváltozhat, amorfizálódhatnak. [141], [142]

A lézer és a céltárgy paraméterei mellett a környezeti tényezők is jelentősen befolyásolni tudják a keltett részecskék tulajdonságait. Vákuum, gáz, illetve folyadék közegben egyaránt végeznek lézeres ablációt, valamint inert vagy reaktív is lehet a környezet [122], [123]. A vákuumbeli vagy gáz közegbeli lézeres ablációra többek között szoktak röviden hivatkozni a PLA (pulsed laser ablation) [143], [144], míg a folyadék közegbelire a PLAL (pulsed laser ablation in liquid) [115] rövidítéssel. Amennyiben a céltárgyat folyadékréteg fedi, számolni kell a közeg elnyelése miatti energiacsökkenéssel és a fókusz eltolódásával, ennek megfelelően korrigálni kell a beállításokat. A folyadék közeg előnye, hogy magába fogja, összegyűjti a keltett részecskéket, amik felhalmozódhatnak a tartóban vagy áramlás révén el lehet őket távolítani. Vákuum vagy gáz közeg esetén a környezet anyagi minősége mellett a nyomás értéke is hatással lehet a részecskék méretére, s a keltett minta felfogásáról, elvezetéséről gondoskodni kell [124].

2.4.1 Lézeres abláció a gyógyszeriparban

Az anyagtudományok számos területén alkalmazzák rutinszerűen a lézeres ablációt részecskék előállítására, ami alapján a gyógyszeripari felhasználás lehetősége is egy ígéretes gondolatnak tűnik. Részecskékeltés szempontjából a lézeres abláció a top-down technikák közé sorolható, s ahogy más folyamatoknál is láthattuk, a lézeres ablációnál is egyszerre lehet jelen a részecske aprózás és az amorfizáció. Ezek alapján a BCS Class II és IV besorolású hatóanyagok lézeres ablációja potenciális oldékonyság javítási eljárás lehet. [71]

A lézeres ablációval történő részecskékeltés előnye, hogy a lézer és környezeti paraméterek megfelelő hangolásával változatos céltárgy anyagokból lehet részecskéket előállítani, melyek tulajdonságait is lehet szabályozni. Környezetbarát, vegyszermentes technika, hiszen segédanyagok, adalékok, oldószerek nélkül lehet részecskéket előállítani. További előnye, hogy kis mennyiségű kiindulási mintából gyorsan és jó hatékonysággal lehet részecskéket generálni. Tiszta eljárás, hiszen érintésmentes aprózást tesz lehetővé és alkalmas lehet közti termék vagy végtermék előállítására is. Megfelelő beállítások esetén egy lépéses eljárás, megvalósítható a folyamatos szintézis, ezáltal skálázható a módszer. Kivitelezhető zárt térrészben, a folyadékbeli ablációnál maga a közeg fogja fel a részecskéket, így elkerülhető a keltett részecskék gyártás során történő belélegzése, ami biztonságtechnikai szempontból fontos. Maga az ablációs rendszer egyszerű felépítésű, kevés eszközigényű, megfelelő biztonsági tréning mellett biztonsággal üzemeltethető rövid betanulás után. [71], [145]

Hátrányai között szerepel a degradáció lehetősége és elrendezéstől függően a keltett részecskék esetleges aggregációja. Az alkalmazott lézertípus függvényében megfontolandó lehet a beszerzési és karbantartási költség, valamint a biztonsági előírások hozadéka is. [71]

A lézeres abláció alkalmazása gyógyszerhatóanyag részecskék előállításra egy jelenleg még kezdeti szakaszában lévő kutatási irány, viszonylag kevés csoport foglalkozik a témával és a folyamat leírása, a keltett részecskék karakterizálása még formálódó kérdéskör. Az alábbiakban röviden bemutatok néhányat az eddig publikált nemzetközi eredményekből.

A témakörben talán elsőként 2011-ben Kenth és munkatársai írták le a paclitaxel, vízben oldhatatlan hatóanyag lézeres besugárzását. Céljuk az volt, hogy javítsák a felszívódást és lehetővé tegyék az oldhatatlan hatóanyag intravénás adagolását. Poloxamer 188 tartalmú vizes közegben hajtottak végre femtoszekundumos impulzusokkal lézeres ablációt (tabletta céltárgy besugárzása) és/vagy fragmentációt (kolloid oldat besugárzása). Vizsgálták a lézerteljesítmény, a fókuszálási pozíció és a kezelési idő befolyását a részecskeméretre, a hatóanyag koncentrációra és a degradációra, jellemezték a generált részecskéket morfológia és polimorf állapot tekintetében. A vizsgált paraméterek esetén többnyire néhány mikrométer körüli részecskéket kaptak, mérhető kémiai károsodással. Az optimális lézeres fragmentálási feltételek homogénebb méreteloszlású paclitaxel részecskéket ($<500\text{ nm}$) hoztak létre, de jelentősebb volt a degradáció ($>20\%$), míg az abláció és fragmentálás kombinációja esetén a polidiszperzitás értéke volt magasabb. Összességében megállították, hogy esetükben a nagyobb teljesítményű lézerkezelés kisebb részecskéket eredményezett nagyobb mennyiségű degradációval. Bár kiemelték, hogy a technika ígéretes,

hozzátették, hogy az érzékeny gyógyszerek, mint például a paclitaxel, talán nem a legjobb gyógyszerjelöltek erre a nanonizációs technikára a preklinikai kontextusban, különösképpen a farmakodinamikai vizsgálatokban során, mivel a jelenlévő szignifikáns mennyiségű bomlástermék félrevezetheti a szűrési folyamatot. [146]

Singh és munkatársai 2020-ban ritonavir, atazanavir és kurkumin kombinációjából létrehozott réteg lézeres ablációját hajtották végre desztillált vízben és Pluronic® F127 tartalmú vizes közegben. A több hatóanyagot tartalmazó teranosztikus (terápiás és diagnosztikus) formulációt HIV-1 antiretrovirális terápiához kívánták felhasználni. Azt tapasztalták, hogy az F127-tel előállított készítmények jobb vízbéli diszpergálhatósággal rendelkeztek, igen kicsi méretűek voltak a részecskék (20–25 nm), fokozott felvételt mutattak a mikrogliákban, javították a vér-agy gáton való átjutást egy *in vitro* modellben és töredékére csökkentették a vírusos p24 antigén mennyiségét az F127 nélkül készült készítményekhez képest. Ez a munka azt mutatja, hogy ezek a femtoszekundumos lézerrel előállított nanorészecskék hatékonyan juttathatnak be gyógyszereket agyi terápia céljából. A lézeres abláció ígéretes formulálási módszernek mutatkozik agyi teranosztikában használatos nanorészecskék előállítására, csökkentve a szerves oldószerek szükségességét a gyártás során, valamint új lehetőségeket kínál a nanomolekulák szintézisére és funkcionizálására bioszenzoros, bioképző és terápiás alkalmazásokhoz. [147]

Több tanulmány jelent meg, ahol folyadék közegbeli lézeres fragmentációt alkalmaztak, vagyis a hatóanyag porból koloid oldatot hoztak létre és azt sugározták be. Beclometazon-dipropionát [70], klobetazon-butirát [148], fenofibrát és naproxen [149] és megestrol-acetát [150] aktív anyagokat vizsgáltak. Feltérképezték különböző kísérleti paraméterek (impulzushossz, energiasűrűség, besugárzási idő, szuszpenzió hőmérséklet, stabilizáló segédanyag használat, ...) hatását és széleskörű analízisnek vetették alá a keltett részecskéket többek között kémiai összetétel, morfológia, méret, kristályosság és biológiai hasznosulás tekintetében. Általánosságban elmondható, hogy ezt a technikát is alkalmasnak találták a részecskeméret csökkentésre, de több esetben tapasztaltak változó mértékű kémiai roncsolódást, ami sokszor oxidációhoz volt köthető, illetve amorfizációról, az érzékeny anyagok hidratációjáról is beszámoltak. Megfigyelték a méret-degradáció egyensúlyát, miszerint az intenzitás növelésével kisebb részecskéket kaptak, de nagyobb arányú volt a degradáció. A lézeres fragmentálás előnyöket mutatott a hatékonyság tekintetében, ami a kisebb gyógyszer mennyiséget és a jobb kioldódási kinetikát illeti. Különösen alkalmasnak mutatkozott a gyógyszer kutatás korai fázisaiban, emellett egy egyszerűen kivitelezhető mechanizmusnak bizonyult, ahol a paraméterek hangolásával van lehetőség az ideális paraméterablak megkeresésére. [70], [148]–[150]

A kutatócsoportunk több nem-szteroid alapú gyulladáscsökkentő hatóanyag (ibuprofen, meloxicam, nifluminsav) gáz közegbeli nanoszekundumos impulzuslézeres ablációjával sikeresen állított elő szubmikrométeres, illetve nanométeres mérettartományba eső részecskéket detektálható kémiai károsodás nélkül [151]. Ibuprofen tabletta vákuumkamrában történő besugárzásával, a lézeres ablációval létrehozott anyagfelhő hordozón való depozíciójával létrehozott hatóanyag vékonyréteg morfológiája nyomásfüggést mutatott: a nyomás csökkentésével csökkent a kristályosság, fokozódott az amorf jelleg [152]. Továbbá ibuprofen por és magnetit nanorészecskék különböző

arányú keverékéből préselt céltárgy levegőbeli lézeres ablációjával 100–150 *nm* átlagos méretű nanokompozitokat állítottak elő kémiai roncsolódás nélkül, ami célzott gyógyszeradagolást tenne lehetővé [153].

A lézeres abláció gyógyszeripari alkalmazásaihoz kötődő, a disszertációm során felhasznált publikációk [154]–[157] eredményeit a további fejezetekben ismertetem.

3. Célkitűzés

Kutatásom során az impulzuslézeres ablációt, mint részecskeméret csökkentő és amorfizáló eljárást vizsgáltam vízben oldhatatlan vagy nagyon gyengén oldódó gyógyszerhatóanyagok biológia hasznosulásának javítása céljából. Modell hatóanyagként a nem-szteroid alapú gyulladáscsökkentők csoportjába tartozó, igen alacsony vízdoldhatósággal rendelkező meloxicam hatóanyagot választottam relatíve magas olvadáspontja és széleskörű alkalmazása miatt.

Meloxicam hatóanyag tabletták ablációja során különböző körülmények között (lézerparaméterek, közegek) végeztem szisztematikus kísérletsorozatokat az ideális paraméterablak feltárása érdekében. Vizsgálni kívántam, hogy ezen módszerrel elő lehet-e állítani a tüdőbe juttatáshoz ideális méretű ($0,5\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ közötti mérettartományba eső [69]) tiszta meloxicam részecskéket kémiai károsodás nélkül.

Először a meloxicam desztillált víz közegbeli nanoszekundumos impulzuslézeres ablációját vizsgáltam az alkalmazott hullámhossz és energiasűrűség függvényében. A keltett részecskéket átfogó analízisnek vetettük alá kémiai összetétel, morfológia és méreteloszlás, valamint hatástan szempontjából. A részecskék karakterizálása mellett a lejátszódó mechanizmus leírására is törekedtem.

Másodsorban femtoszekundumos impulzusokkal sugároztam be meloxicam céltárgyakat desztillált víz és levegő közegben, elemezve az alkalmazott energiasűrűség és az ismétlési frekvencia hatását. Ezen részecskék esetén is tanulmányoztuk a sztöchiometriát, a méretcsökkenést, a morfológiát, a termális és kristályossági jellemzőket. A részecskekeeltési mechanizmus modelljénél elemeztem a közeg befolyásoló hatását.

Összegezve, célom az volt, hogy a lézeres gyógyszerhatóanyag aprózás alkalmazhatóságának kísérleti és elméleti alapot biztosítsak, ezáltal lehetővé téve vízben oldhatatlan vagy alig oldódó gyógyszerhatóanyagok effektivitásának javítását, alternatív gyógyszerformulák megalkotását, gyógyszerbeviteli kapuk alkalmazását.

4. A vizsgált anyag, a minta előállítása és előkészítése

Az alábbi alfejezetekben a kísérleteim során felhasznált alapanyagot, illetve a céltárgy formálását mutatom be. Ezt követően a lézeres ablációs kísérletek paramétereit ismertetem, végül az előállított részecskék vizsgálatokra való előkészítésének lépéseit írom le.

4.1 Alapanyag

A kísérleteinkhez alapanyagként felhasznált meloxicam az EGIS Ltd. (Budapest, Magyarország) és a Sigma-Aldrich Chemistry (Darmstadt, Németország) vállalatoktól származott, a jellegét tekintve sárga por 100% kristályossággal, 99% feletti tisztasággal és $d(0,5) = 27,5 \mu m$ medián részecskemérettel rendelkezett.

4.2 Céltárgy

A lézeres ablációhoz tisztán hatóanyagot tartalmazó 9 mm átmérőjű tablettákat használtam céltárgyként, amiket egyenként 300 mg meloxicam porból préseltünk 15 kN erővel a KORSCH EK-0 Tablet Press machine (KORSCH AG - Berlin, Németország) berendezéssel.

4.3 Nanoszekundumos abláció

A nanoszekundumos impulzushosszakkal az ultraibolyától a látható tartományon át az infravörösre három hullámhosszon végeztem kísérleteket desztillált víz közegben, a PLAL elrendezéssel (**3. ábra**). Az alkalmazott lézer és ablációs paramétereket a **4. táblázat** tartalmazza.

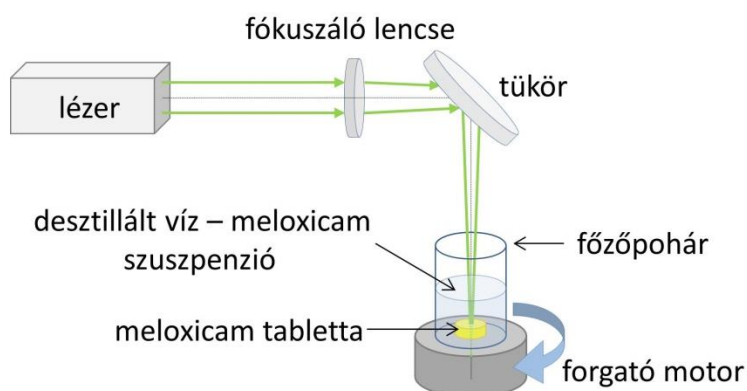
Lézer hullámhossza (λ [nm])	248	532	1064
Impulzushossz (FWHM [ns])	18	8, 6	8, 6
Ismétlési frekvencia (f [Hz])	10	3, 10	3, 10
Alkalmazott energiasűrűség (F [J/cm^2])	4,3–10,9	4,2–9,4	4,1–12,9
Lézer típusa (gyártó)	KrF excimer lézer (LLG Twinamp)	Q-kapcsolt Nd:YAG lézer (Quantel/ GBL Optic-Electronic CO.)	

4. táblázat A desztillált víz közegbeli nanoszekundumos impulzuslézeres ablációs kísérletek során alkalmazott lézer és ablációs paraméterek.

A nanoszekundumos impulzusokat egy KrF excimer lézer (LLG Twinamp, $\lambda = 248 \text{ nm}$, FWHM = 18 ns, $f = 10 \text{ Hz}$) és egy frekvenciakétszerezett Q-kapcsolt Nd:YAG lézer (Quantel, $\lambda = 532 \text{ nm}/1064 \text{ nm}$, FWHM = 6 ns, $f = 10 \text{ Hz}$; G-NY, GBL Optic-Electronic CO., Ltd., $\lambda = 532 \text{ nm}/1064 \text{ nm}$, FWHM = 8 ns, $f = 3 \text{ Hz}/10 \text{ Hz}$) biztosította.

A kísérleti elrendezés (**3. ábra**) minden hullámhossz esetén azonos felépítésű volt: a lézersugarat egy fókuszáló lencsén keresztülvezetve kicsivel a céltárgy felszíne alá fókuszáltuk. A tabletta egy 10 ml

desztillált vizet tartalmazó főzőpohár alján volt rögzítve és körülbelül 5 mm víréteg fedte a felszínét. Az egyenletesebb megmunkálás érdekében a főzőpoharat mozgattuk egy forgatómotorral. A kezdetben vizsgált energiasűrűség (F) tartományok az adott hullámhosszakon az alábbiak voltak: 248 nm: 4,3–10,9 J/cm²; 532 nm: 4,2–9,4 J/cm²; 1064 nm: 4,1–12,9 J/cm². Az alsó határ közelítette az ablációs küszöböt, míg a felső határt a lézerből kinyerhető energia és a nyaláb fókuszálhatósága határozta meg. A későbbi kísérletek során egységesen az $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűséget alkalmaztuk minden hullámhossz esetén. A foltméret $\sim 0,6 \text{ mm}^2$ és az impulzusenergia $\sim 60 \text{ mJ}$ volt a $\lambda = 532 \text{ nm}/1064 \text{ nm}$ hullámhosszakon, míg rendre $\sim 0,3 \text{ mm}^2$ és $\sim 30 \text{ mJ}$ a $\lambda = 248 \text{ nm}$ esetében. Az abláció időtartamát a kihozatal és a tervezett vizsgálathoz szükséges anyag mennyisége alapján határoztuk meg, tipikusan pár 10.000 impulzust alkalmaztunk. A céltárgy besugárzása után a kapott szuszpenziót átszűrtük egy 300 μm pórus méretű fém szitán, hogy az abláció során esetenként keletkező nagyobb, lepattogzott tabletta darabokat eltávolítsuk, amelyek torzították volna a későbbi vizsgálatok eredményét.



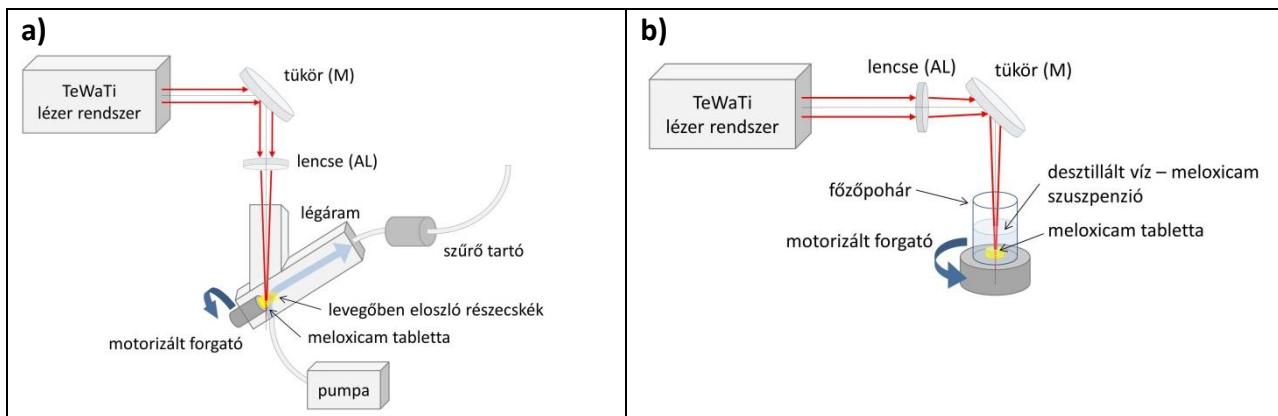
3. ábra Kísérleti elrendezés a folyadék közegbeli nanoszekundumos impulzuslézeres ablációhoz (PLAL). [156]

4.4 Femtoszekundumos abláció

A meloxicam femtoszekundumos lézerral történő besugárzása során két lézerrendszert használtunk a TeWaTi és az ELI-ALPS laborjaiban.

A Szegedi Tudományegyetem TeWaTi lézerrendszere egy Ti:zafír alapú kétfokozatú fázismodulált impulzuserősítőt (chirped pulse amplification, CPA) tartalmazott, amely magimpulzusát egy móduscsatolt (mode-locked) lézeroszcillátor (Spectra-Physics Rainbow™ CEP4, Spectra-Physics 3635 Peterson Way, Santa Clara, CA, USA) biztosította. A kísérleteink során az impulzushossz FWHM = 135 fs volt a $\lambda_c = 800 \text{ nm}$ -es központi hullámhosszon, míg a maximális impulzusenergiát $E = 1 \text{ mJ}$ -ig lehetett növelni az $f = 1\text{--}10 \text{ Hz}$ közötti ismétlési frekvencia tartományon. Egy optikai shutter (SH05-Optical Beam Shutter, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) és a hozzá tartozó vezérlő (SC10-Optical Beam Shutter Controller, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) biztosította az erősítő kimeneténél, hogy a beállított impulzusszám essen a mintára.

A levegőbeli (PLA), illetve desztillált víz közegbeli (PLAL) impulzuslézeres abláció során alkalmazott elrendezés vázlatos rajza rendre a **4. ábra (a) és (b)** egységein látható.



4. ábra A TeWaTi lézerrendszerével folytatott femtoszekundumos ablációs kísérletek során alkalmazott elrendezés **(a)** levegőbeli impulzuslézeres abláció (PLA) és **(b)** desztillált vízbeli impulzuslézeres abláció (PLAL) esetén. [155]

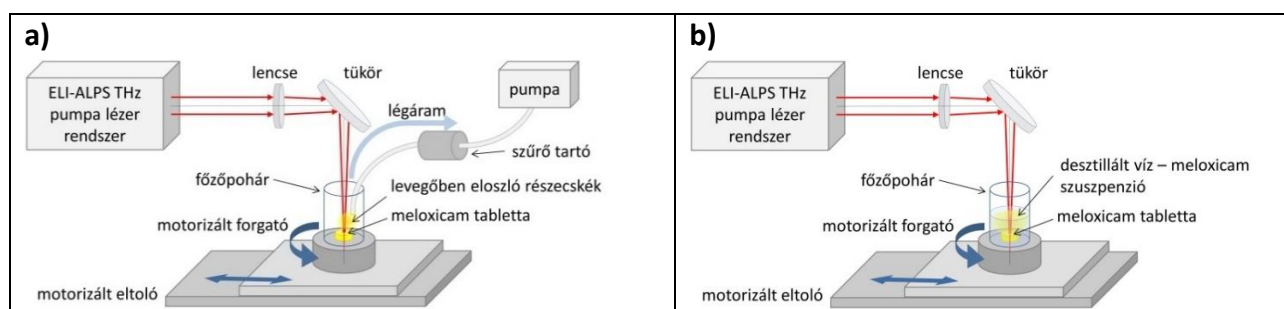
A PLA elrendezés esetén **(4. ábra (a))** a lézerezősítő által szolgáltatott impulzusokat egy ezüst síktükör (M) tükrözte egy akromatikus lencsére (AL; fókusztávolság: 150 mm), amely a céltárgyra fókuszált. A lencsét egy eltolóra helyeztük, hogy kivitelezhető legyen a céltárgy felületén a foltméret pontos beállítása. Az alkalmazott Y-kamra belépő ablaka egy vékony üveglap volt, normál beesési szögben behelyezve. Egy meloxicam tablettát (céltárgy) helyeztünk a kamrába 45°-os beesési szögben, a hátoldalát a mintatartó platformra ragasztva, közvetlenül a lencse fókuszsíkja elé. A mintát a besugárzás során forgattuk, hogy elkerüljük a tabletta gyors degradációját, szétesését. A kamrán keresztül légáramot hoztunk létre, hogy a keletkezett részecskéket a méreteloszlás meghatározásához a mérőeszközbe, illetve a minta későbbi vizsgálatokhoz való összegyűjtéséhez a részecskéket felfogó szűrőhöz juttassuk.

Optikai mikroszkóppal határoztuk meg a lézerfolt méretét a céltárgy felületén. Az ablált gödör kiterjedése 111 μm és 157 μm volt, ami a kis- és nagytengely mentén az $1/e^2$ sugarát adja meg. Az impulzusenergia értékeket energiamérővel rögzítettük. A céltárgyat elérő alkalmazott energiasűrűséget az $F = 0,7\text{--}1,5 \text{ J/cm}^2$ tartományon változtattuk az erősítő kimeneti energiájának állításával. A céltárgy megmunkálása során 1.260 vagy 9.000 impulzussal sugároztuk be a felületet $f = 1$ vagy 10 Hz ismétlési frekvenciával a vizsgálati módszertől függően. Az abláció után a megmunkált céltárgy tabletta felszínét és a keltett részecskéket vizsgáltuk.

A PLAL elrendezés **(4. ábra (b))** esetén az erősített nyaláb egy 150 mm fókusztávolságú akromatikus lencsén (AL) haladt keresztül, amely az impulzusokat egy 10 ml desztillált vízzel feltöltött főzőpohár alján elhelyezett céltárgy felszínére fókuszálta. A tabletta felszíne körülbelül 5 mm-rel volt a vízfelszín alatt. A mintát normál beesésnél sugároztuk be, úgy, hogy a felületen a kör alakú lézerfoltok ($d = 132 \mu\text{m}$) hasonló területűek voltak, mint a PLA kísérleteknél, illetve az ott alkalmazott energiasűrűség tartományt ($F = 0,7\text{--}1,5 \text{ J/cm}^2$) vizsgáltuk víz közegben is. A céltárgy megmunkálása során 72.000 vagy 108.000 impulzussal sugároztuk be a felületet $f = 10 \text{ Hz}$ ismétlési frekvenciával. Az abláció után a céltárgy tablettát kivettük a főzőpohárból és a szuszpenziót további vizsgálatoknak vetettük alá.

Az ELI-ALPS THz lézer rendszere (Trident, Amplitude Technologies, Lisses, Franciaország) egy dióda lézer pumpált (Terra 527-50-M, Continuum) Ti:zafír alapú lézer, amely magimpulzusát egy móduscsatolt lézeroszcillátor (C-Fiber 780 High Power Femtosecond Laser, Menlo Systems GmbH, Planegg, Németország) biztosította, továbbá regeneratív és multipass erősítővel volt felszerelve. A rendszerből kinyerhető transzformlimitált impulzus $92,8\text{ fs}$, de kísérleteink során az impulzushosszat negatív csörpöléssel $\text{FWHM} = 135\text{ fs}$ értékre állítottuk be, hogy azonos legyen a korábban alkalmazottakkal. A központi hullámhossz $\lambda_c = 781\text{ nm}$ volt $13,3\text{ nm}$ sávszélességgel. Az impulzusenergia $E = 4\text{ mJ}$ ($> 4\text{ mJ}$) körüli értéket vett fel, míg az ismétlési frekvencia $f = 1\text{ kHz}$ volt.

Az impulzslézeres abláció gáz közegbeli (PLA) és folyadék közegbeli (PLAL) vizsgálatokor ugyanazt az elrendezést (5. ábra) használtuk alapul, csak a közeg és a keltett részecskék összegyűjtése tért el a két esetben.



5. ábra Az ELI-ALPS THz pumpa lézer rendszerével folytatott femtoszekundumos ablációs kísérletek során alkalmazott elrendezés **(a)** levegőbeli impulzslézeres abláció (PLA) és **(b)** desztillált vízbeli impulzslézeres abláció (PLAL) esetén. [157]

A lézernyalábot egy tükör (UM15-45A, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) továbbította az elrendezéshez és egy 200 mm fókusztávolságú plán-konvex lencse (LA1979-B - N-BK7, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) fókuszálta kicsivel a céltárgy felszíne alá. A beállított foltméret ($d = 500\text{ }\mu\text{m}$) esetén a mintára eső átlagos energiasűrűség $F = 1,9\text{ J/cm}^2$ volt a kísérletek során.

A céltárgyat rögzítettük egy üveg főzőpohár aljára, amit egy motorizált forgató és eltoló (LTM 120-xxx-HSM-V15SubDF-V6) részből álló mintatartó egységre helyeztünk, ezzel biztosítva a tabletta felszínének folyamatos pásztázását.

A PLA eljárás esetén a keltett részecskéket egy állandó levegőárammal eltávolítottuk az abláció helyszínéről és egy membrán szűrőn (pórus méret: $1,2\text{ }\mu\text{m}$) (MCE membrane filter, 420.MF025ME120 Labsystem Kft.) felfogtuk azokat. A felhalmozódó részecskék a filter pórusait egy idő után eltömítették, így a lerakódott minta felső rétegében már a teljes mérettartomány megfigyelhető volt. Minden mintát nagyságrendileg 10.000 impulzussal történő besugárzással állítottunk elő.

A PLAL eljárás esetén a főzőpohárba most is 10 ml desztillált vizet töltöttünk, ami 5 mm vastag folyadékréteget képzett a céltárgy felszíne felett. A keltett részecskék a víz közegben felhalmozódtak, amit 300.000 impulzusonként friss folyadékra cseréltünk. Minden mintát nagyságrendileg 600.000 impulzussal történő besugárzással állítottunk elő.

4.5 Minták előkészítése a vizsgálatokhoz

4.5.1 Levegő közegbeli impulzuslézeres abláció (Pulsed Laser Ablation, PLA)

A femtoszekundumos impulzusokkal történő abláció esetén a levegő közegben előállított mintákat porként használtuk fel.

A méretmeghatározás esetén a keltett részecskéket direkt módon a mérőműszerbe vezettük, míg a többi vizsgálat esetén a szűrőn felfogott részecskéket használtuk fel, kapartuk le.

4.5.2 Folyadék közegbeli impulzuslézeres abláció (Pulsed Laser Ablation in Liquid, PLAL)

Mind a nanoszekundumos, mind a femtoszekundumos impulzusokkal történő abláció esetén a desztillált víz közegben előállított mintákat két formában használtuk fel a vizsgálatok során: szuszpenzióként, illetve porként.

Szuszpenziókénti alkalmazás esetén a 4.3 *Nanoszekundumos abláció* és 4.4 *Femtoszekundumos abláció* című alfejezetekben leírtak után a mintát direkt módon felhasználtuk.

Porként alkalmazáshoz a 4.3 *Nanoszekundumos abláció* és 4.4 *Femtoszekundumos abláció* című alfejezetekben leírtak után a szuszpenzió víztartalmát elpárologtattuk egy labor kemencében (CARBOLITE 2416, Thermal Engineering Services Ltd., Worcester, UK) 50 °C-os hőmérsékleten, körülbelül 12 óra leforgása alatt és a visszamaradó szárazanyagot használtuk fel.

5. Vizsgálati módszerek

Ezen fejezetben részletesen bemutatom a lézeres ablációval előállított részecskék karakterizálása során felhasznált módszereket. Minden technika esetén rövid áttekintést adok arról, hogy milyen információ nyerhető az adott méréssel, hogyan épül fel a műszer, mik az előnyei és hátrányai, majd ismertetem az általunk alkalmazott mérési paramétereket.

A kémiai analízis kapcsán a Fourier-transzformációs infravörös és a Raman spektroszkópiát, valamint a tömegspektrometriával kiegészített nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát írom le. A morfológia és a méret vizsgálatához kötődően a por-röntgendiffrakciót, a pásztázó elektronmikroszkópiát, a differenciális pásztázó kalorimetriát és a pásztázó elektromos mozgékonyaságon alapuló részecskeméret szeparátort ismertetem. Az ablációs mechanizmus feltárása kapcsán az ellipszometriát és a gyorsfényképezést mutatom be. Végül a gyógyászati alkalmazhatóság feltérképezése végett az extinkciós spektroszkópiával kivitelezett ülepedési vizsgálat, az oldékonyság, a citotoxicitás és a gyulladáscsökkentő hatás mérésének módszereit vázolom.

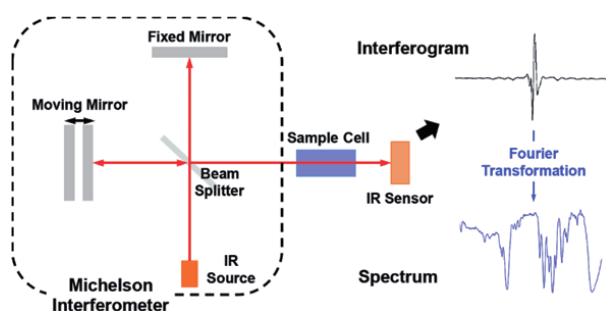
5.1 Kémiai analízis

5.1.1 Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR spectroscopy)

A közép-infravörös (közép-IR) spektroszkópia egy jól bevált módszer a kémiai vegyületek azonosítására és szerkezeti elemzésére. A minta IR spektrumának csúcsai a mintabeli molekulák rezgési és forgási módusainak gerjesztéséhez kötődnek és így a molekulákban jelen lévő különböző kémiai kötésekhez és funkciók csoportokhoz kapcsolódnak. Ennek köszönhetően egy vegyület IR spektruma az egyik legjellemzőbb fizikai tulajdonsága és az összetevő anyagok azonosításra alkalmas. Az infravörös spektroszkópia a mennyiségi elemzés hatékony eszköze is, mivel a vegyület által elnyelt infravörös energia mennyisége arányos a vegyület koncentrációjával. [158]

Az 1970-es évektől kezdődően az infravörös spektroszkópiai műszereket forradalmasította a Fourier-transzformációs infravörös (Fourier transform infrared, FTIR) spektroszkópia módszerének kifejlesztése. Az FTIR spektroszkópia interferometrián alapul, így alapvetően különbözik a hagyományos diszperzív infravörös spektroszkópiától. Kialakítható transzmissziós és reflexiós FTIR spektrométer, valamint szilárd, folyékony és gáz halmazállapotú minták vizsgálata is lehetséges roncsolásmentesen. Az FTIR spektrométer főbb részeit (fényforrás, interferométer, mintatartó, detektor) a **6. ábra** mutatja be, egy tipikus (transzmissziós) elrendezést szemlélítve. [158], [159]

Spektrális bontóelemként egy Michelson-interferométert alkalmaznak, amely segítségével a széles spektrumú infravörös forrásból érkező nyalábot két részre osztják: egyik része egy álló tükörrre, míg a másik része egy, a mérés során folyamatosan, állandó sebességgel mozgó tükörrre jut. Amikor a sugarak visszaverődnek, a nyalábosztónál újra egyesülnek, és konstruktív/destruktív interferencia mintázatot hoznak létre az interferométer két karja közti változó úthosszkülönbség miatt. Miután az infravörös energiát a minta szelektíven elnyelte, a detektorhoz érkező energia intenzitásának ingadozásait valós időben digitalizálják és így egy interferogramot kapnak.



6. ábra Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektrométer vázlatos felépítése és működése.

Részei: fényforrás (IR source), interferométer: fix és mozgó tükör (fixed & moving mirror), nyalábosztó (beam splitter), mintatartó (sample cell), detektor (IR sensor). A műszer a detektált interferogramot Fourier-transzformációval alakítja át spektrummá. [160]

Az interferogram tartalmazza a minta infravörös spektrumának előállításához szükséges összes információt, de ez az információ az idő tartományban van. Ahhoz, hogy értelmezhető információt kapjunk, az interferogramot Fourier-transzformációval át kell alakítani a frekvencia tartományba. Az FTIR spektroszkópiában az interferogram általában az intenzitás ábrázolása az álló és a mozgó tükör közötti útkülönbség, az úgynevezett retardáció függvényében. Az interferogram Fourier-transzformációja egy olyan spektrumot eredményez, amelynek vízszintes tengelye hullámszám [$1/cm$] egységben van, míg a függőleges tengelyen az intenzitás szerepel. Tömören tehát, a mért jel a fényintenzitás az interferométer két karja közötti útkülönbség függvényében, a kapott spektrum pedig ennek a jelnek a Fourier-transzformáltja. [158]

Az FTIR spektrométereknek számos kedvező tulajdonsága van a pásztázó (diszperzív) műszerekkel szemben. Egyrészt az FTIR berendezések egyidejűleg gyűjtenek adatot a teljes hullámhossztartományról (multiplex- vagy Fellgett-előny), így a jel/zaj arány jelentősen javul és a letapogatási idő lecsökken. Másrészt a pásztázó spektroszkópiai elrendezésekkel szemben az FTIR esetén nem kell réseket alkalmazni, amik korlátoznák a detektorra jutó fény mennyiségét. Így a fényerősséget a fényforrásból érkező kollimált nyaláb kiterjedése határozza meg (fényerő- vagy Jacquinot-előny), aminek köszönhetően nagyobb az energiaátviteli hatékonyság. Az adatmanipuláció és a kvantitatív alkalmazások szempontjából további fontos előny, hogy a hullámhossz pontosságát egy belső referencialézer használata biztosítja és így a hullámhossz időbeli eltolódása, mint lehetséges hibaforrás kiküszöbölhető, ennek köszönhetően kiemelkedő a felbontása. Bár a szórt fény hozzájárulhat az FTIR berendezés detektorának telítődéséhez (ügyelni kell ennek elkerülésére), ez a jel nem modulált, így nem jelenik meg a spektrális intenzitásban, vagyis kevésbé érzékenyek ezek az elrendezések a szórt fényre, mint a monokromátort tartalmazó pásztázó spektrométerek. Az FTIR rendszerek jelentős számítási teljesítménye szintén fontos tényező az FTIR spektroszkópia sikerében. [158], [161], [162]

A kapott spektrumokat elemzés során általában két részre osztják. $1500\ 1/cm$ felett a funkciós csoportok tartományáról beszélhetünk, itt viszonylag kevés csúcs található, melyek jellemzően a funkciós csoportok nyújtási rezgéseivel kapcsolódnak és egy szűk tartományon belül változnak. Az $1500\ 1/cm$ alatti hullámszám tartomány az ún. „ujjlenyomat” („fingerprint”) régió, ami jelentősen összetettebb, számos, egymással átfedő csúcsot tartalmaz, melyek többnyire a molekulán belüli hajlító rezgésekből adódnak. A csúcsokból adódó komplex spektrum korlátozottan alkalmas egyes

kötések kiemelésére, de ahogy neve is utal rá, egyedi mintázat, így a referencia ismeretében felhasználható vegyületek, atomcsoportok azonosítására. (A két tartomány közötti határ különböző anyagoként eltérhet az itt említett értéktől.) [158], [163]–[166]

Az FTIR vizsgálatokhoz *mg* nagyságrendű por mintát adtunk 150 *mg* kálium-bromidhoz (KBr), majd a keveréket egy achát mozsárral finom porrá őröltük és 13 *mm* átmérőjű pasztillává préseltük 10 *kN* erővel.

Az FTIR spektrumokat egy AVATAR 330 FTIR spektrométerrel (Thermo Nicolet, LabX Midland, ON, Kanada) vettük fel a 4000–400 cm^{-1} hullámszám tartományon, 4 cm^{-1} feloldással, mintánként 128 mérést átlagolva, alapvonal korrekciót használva. A mintáink vizsgálatát megelőzően tiszta KBr pasztilla spektrumát felvettük és rögzítettük háttérként.

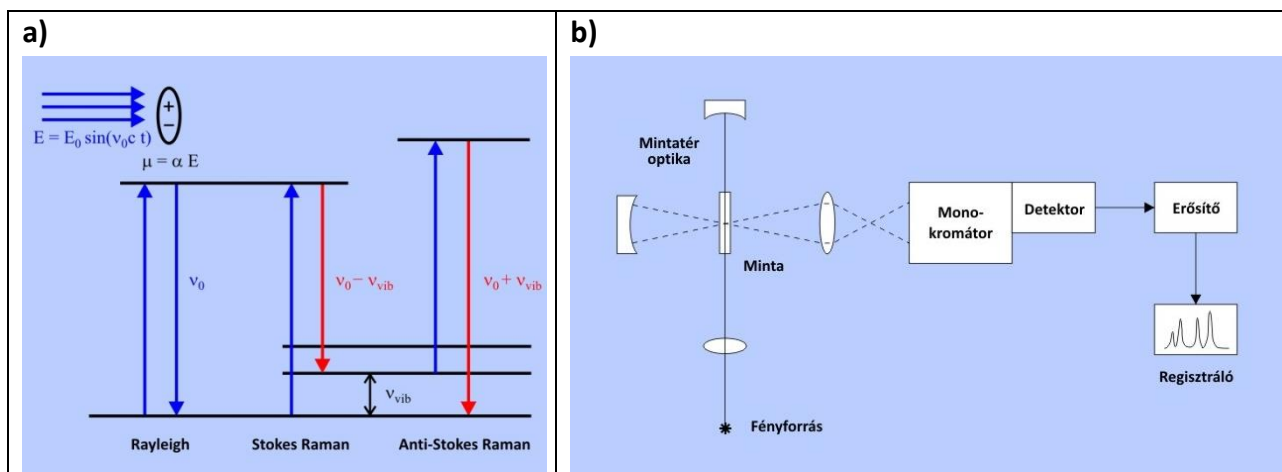
5.1.2 Raman spektroszkópia (Raman spectroscopy)

A fény-anyag kölcsönhatásnak számos formája létezik, például a fluoreszcencia és a foszforeszcencia esetén az anyag elnyel, majd ezt követően kibocsájt fényt. A fény rugalmas szóródása, mint például az atomokon, molekulákon vagy fononokon történő Rayleigh-szórás és a porszemcséken bekövetkező Mie/ Tyndall-szórás olyan példák, ahol a szórt fény hullámhossza nem változik. Ezzel szemben a rugalmatlan szórás, mint például a kristályokban lévő akusztikus hullámok által okozott Brillouin-szórás, a töltött részecskék által okozott Compton-szórás és a molekulák vagy fononok által okozott Raman-szórás olyan példák, ahol a szórt fény hullámhossza megváltozik. [167], [168]

A Raman-szórás a fénykvantumok, azaz a fotonok rugalmatlan szóródása egy anyag gerjesztését követően (**7. ábra (a)**), leggyakrabban az atomok, atomcsoportok rezgési módusainak gerjesztéséhez köthető [169], [170]. A rezgési spektroszkópia alkalmas vizsgálati módszernek bizonyult különböző tudományterületek számára, elsősorban a mintavételi módszerek rendkívüli sokoldalúságának köszönhetően. A Raman mérés megadja az analizálni kívánt anyag rezgési spektrumát, amely a minta ujjlenyomataként kezelhető, lehetővé téve a könnyű elemzést és azonosítást. [171]

A Raman spektroszkópia „klasszikus” kísérleti rendszerének (**7. ábra (b)**) fő összetevői egy gerjesztő lézer és egy nagy felbontású spektrométer. A spektrométer egy kétfokozatú műszer, amelyben a két diffrakciós rács úgy van elrendezve, hogy a szórásuk hatása additív legyen. A legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható Raman spektrométerben ma már töltéscsatolt eszközöket (charge-coupled device, CCD) használnak detektorként. [169]

A nem rezonáns Raman-effektus nagyon gyenge folyamat, ezért monokromatikus, fókuszált és nagy intenzitású lézereket célszerű alkalmazni, hogy megfelelő minőségű spektrumokat tudjunk rögzíteni. Ezen felül a spektrumok minősége javítható a mikroelektronika, például a léptetőmotoros meghajtás, a fotonszámlálók, a digitális adatgyűjtő és a számításokat feldolgozó rendszerek kihasználása révén is. A spontán Raman-effektus inkoherens folyamat, így általában folytonos üzemű lézerforrásokat használnak, mivel az impulzuslézerek nagyobb csúcsteljesítményt igényelnek a megfelelő jel/zaj arányhoz, ami azonban a minták károsodásához vezethet. [168]



7. ábra (a) A Stokes és anti-Stokes Raman spektrum sávjainak eredete összevetve a Rayleigh szórás folyamatával (ν : foton frekvenciája). **(b)** A Raman spektrométer vázlatos felépítése [172]

A gerjesztő lézerforrás hullámhosszának megválasztása a kívánt alkalmazástól függ. Az alacsonyabb látható tartománybeli hullámhosszak és az UV sugárzás erős fotolumineszcenciát okoznak a szerves anyagokban, ami elfedheti a Raman-csúcsokat. Ezért a szerves anyagok vizsgálatához a hosszabb látható vagy közeli infravörös hullámhosszú (500–830 nm) lézerforrás alkalmasabb, mivel így a fotolumineszcencia csökken. A Raman-jel intenzitása azonban fordítottan arányos a pumpafény hullámhosszával. Ezért a hosszabb hullámhosszú fény hosszabb felvételi időt igényel. [167], [168], [171], [173] A Raman spektroszkópiát leggyakrabban $\lambda = 785 \text{ nm}$ -es lézerforrásokkal végzik. Ezt a hullámhosszú forrást gyakran választják, mivel ez optimalizálja a Raman-jel intenzitása, a fluoreszcencia, a detektor érzékenysége és költsége, valamint a költséghatékonyság/kompakt, jó minőségű lézerforrás tényezők összességét. Emellett azonban egyre elterjedtebbek a kék és a zöld tartományban látható lézerek (pl. $\lambda = 532 \text{ nm}$) is. [168], [174]

A Raman-szórás mérése a forrás hullámhosszától való hullámhossz eltolódással történik. Ideális esetben a Raman mérésekhez használt megvilágítási forrásnak tisztán monokromatikusnak, azaz egyetlen hullámhosszúnak kell lennie. Azonban minden lézerforrás rendelkezik egy hullámhosszspektrummal, amelyet vonalszélességnek nevezünk. A lézer sávszélességét általában hertzben [Hz] mérik és a Raman alkalmazásokban használt szilárdtest-lézerek esetében értéke jellemzően $> 1 \text{ MHz}$. A keskeny vonalszélesség előnyös a Raman spektroszkópia számára, mivel a Raman-szórás során mért eltolódást a lézer vonalszélessége korlátozza. A Raman spektroszkópiához használt lézerforrásoknak stabil hullámhosszúságúnak és teljesítményűnek kell lenniük hosszabb időn keresztül és használatról használatra. A Raman spektrumokat általában hosszú integrációs idő alatt és sok felvételen keresztül gyűjtik. Ha a forrás hullámhossza a mérés során eltolódik, akkor a Raman-csúcsok is eltolódnak, mivel a Raman jel a pumpafényhez viszonyított eltolódásként mérhető. A hullámhossz eltolódás mérésről mérésre is problémás, mivel a csúcsok eltolódását okozza, ami megnehezíti a mérések közötti összehasonlítást. Hasonló okokból fontos a forrás kimeneti teljesítményének stabilitása. Ha a lézerteljesítmény mérésről mérésre eltolódik, akkor a mennyiségi összehasonlítások nem végezhetők el könnyen. [168]

A Raman-effektus ma már a biológia, az orvostudomány, a kristallográfia és az áramlási citometria spektroszkópiái technikáinak alapját képezi és a plazmafizikában is egyre nagyobb érdeklődés övezi. Nem invazív, jelölésmentes, kémiaiilag szelektív hiperspektrális képalkotási technikaként

alkalmazzák és a legújabb fejlesztések lehetővé teszik a molekuláris orientáció és a kémiai összetétel vizsgálatát is. [168]

A Raman spektroszkópiai mérések során a por formájú mintákat és a megmunkált tabletták felszínét vizsgáltuk és vetettük össze a referenciával. Vizsgálatainkhoz a Thermo Scientific™ DXR™ Raman mikroszkópot (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) használtuk, gerjesztéshez a $\lambda = 780\text{ nm}$ lézer hullámhosszat alkalmazzuk 2 mW lézerteljesítménnyel és közelítőleg $3,1\text{ }\mu\text{m}$ foltmérettel. A Raman spektrumokat a $2500\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ hullámszám tartományon vettük fel, $4,7\text{--}8,7\text{ cm}^{-1}$ közötti feloldással és egy 400 vonal/mm vonalsűrűségű rács alkalmazása mellett. Minden spektrum 20 darab 2 s -os expozícióval felvett mérés összege.

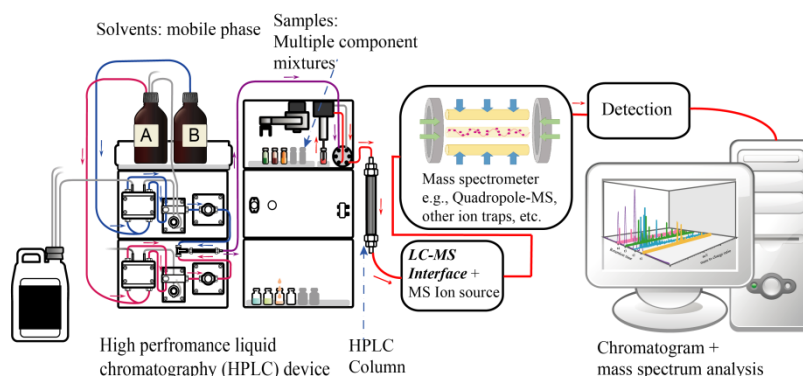
5.1.3 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, HPLC-MS)

A kromatográfia egy analitikai módszer, amely során a vizsgálandó minta alkotóelemeit elválasztják egy helyhez kötött állófázis és egy ezzel érintkező mozgó, fluid fázis közötti anyagátmenet, illetve az egyes alkotóknak az álló- és mozgófázissal való eltérő erősségű kölcsönhatása (adszorpció, abszorpció, komplex képzés, sav-bázis, illetve hidrogén hidas kölcsönhatások) alapján. Tömören, a kémiai potenciálkülönbség biztosítja a fázisok közötti anyagáramlást, ami az alkotóelemek álló- és mozgófázis közötti eloszlását eredményezi. [175]

A folyadékkromatográfia-tömegspektrometria (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS), avagy folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria egy analitikai technika, amely a folyadékkromatográfia (liquid chromatography, LC) és a tömegspektrometria (mass spectrometry, MS) kombinációja. A folyadékkromatográf a kromatográfiás oszlopon való áthaladás során szétválasztja a keverékek komponenseit. Általában az elválasztott komponensek nem azonosíthatók egyértelműen pusztán az LC-vel. A tömegspektrometriát ismeretlen és ismert vegyületek azonosítására és a szerkezet feltárására is használják. A tömegspektrometria önmagában nem alkalmas keverékek azonosítására, mivel a keverék tömegspektruma az elkülönített egyedi komponensek egymással átfedő spektrumainak összessége, ami nem bontható fel. A folyadékkromatográfia (LC) és a tömegspektrometria (MS) összekapcsolására egy interfészt használnak, ami biztosítja a folyékony eluensek LC-ből MS-be történő átvitelét. Az LC-MS-t legtöbbször biológiai hasznosulás, bioekvivalencia és farmakodinamikai vizsgálatokban használják. [176], [177]

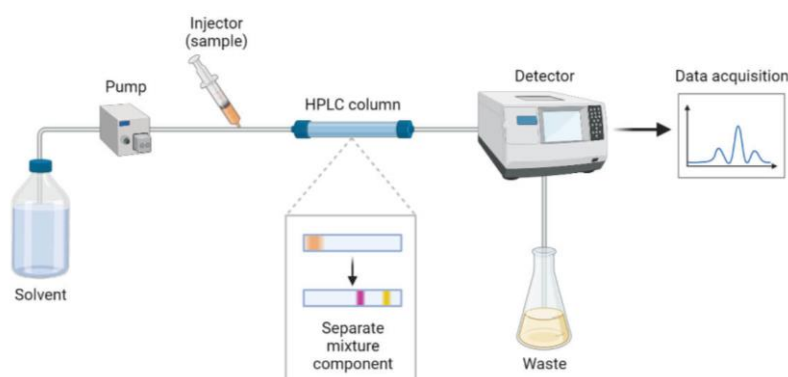
A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (high performance liquid chromatography, HPLC) az egyik leggyakoribb analitikai technika, amelyet a gyógyszeriparban a gyógyszerhatóanyagok és a hozzájuk kapcsolódó vegyületek minőségi és mennyiségi meghatározására használnak. A nagyfokú reprodukálhatóság és pontosság miatt a HPLC-t rutinszerűen használják a gyógyszeriparban, a vegyiparban és a növényvédőszeres fejlesztésben egyaránt. [176]

A HPLC-MS egységeit a **8. ábra** szemlélteti.



8. ábra Nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometriai (HPLC-MS) berendezés vázlatos rajza [178].

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal a keverék komponenseinek elválasztása folyékony mobil- és szilárd állófázis felhasználásával végezhető el. Különböző oszlopok nagy hatékonyságú alkalmazásával kis mennyiségű, összetett keverék is elválasztható. A HPLC alegységei (**9. ábra**) a szivattyú (pump), ami folyamatos eluens áramlást biztosít, a fecskendő (injector), ami a mintát adagolja, a kromatográfiás oszlop (column), ami az állófázist tartalmazza és a detektorok (detectors), illetve a hulladékgyűjtő (waste). Az elválasztást követően kapott kromatogram értelmezése során a retenciós idő (az adott komponens injektálásától a detektorba érkezéséig eltelt idő) kvalitatív, míg a csúcs alatti terület kvantitatív információt biztosít.



9. ábra A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) rendszer egységei [179].

A tömegspektrometria egy analitikai technika, amely a vizsgált mintához kapcsolódó ionos forma tömeg-töltés arányának mérésén alapul. Az MS használható a molekulatömeg és az elemi összetétel meghatározására, valamint a szerkezet vizsgálatára. Az MS kulcsfontosságú alegységei az ionforrás, az analizátor és a detektor. Miután az ionforrás ionizálta a mintát, az ionok átkerülnek a tömeg-analizátorba, ahol tömeg/töltés arányuk alapján szétválasztódnak, majd a beeső ionok töltésével arányos áramot generálnak, amit jellé alakít a berendezés. [175], [176]

A lézeres ablációt követően a keltett részecskéket desztillált víz és acetonitril elegyében feloldottuk. A nanoszekundumos PLAL minták esetén a szuszpenziót 1–2 ml térfogatúra sűrítettük a víztartalom párologtatásával 50 °C-on a korábban említett labor kemencében és 5 ml acetonitrilt adtunk hozzá.

A femtoszekundumos minták esetén végeredményben 10 ml desztillált víz és 10 ml acetonitril közegben oldottuk fel a keltett részecskéket.

A kapott oldatból a HPLC-MS analízis előtt egy fecskendő szűrő (átlagos pórus átmérő: 0,22 μm) segítségével eltávolítottuk az esetlegesen visszamaradt szilárd szemcséket minden esetben.

Az Agilent 1100 HPLC-rendszer diódasoros detektorral (diode array detector, DAD) és Agilent LC/MSD/VL tömegspektrométerrel (mass spectrometer, MS) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) volt felszerelve. A méréseket 35 °C-on termosztált Kinetex 2,6u XB-C18 100A (Phenomenex) oszloppal végeztük. Az eluens (mozgófázis) 40 (V/V)% metanolból és 60 (V/V)% desztillált vízből, valamint hangyasavból (0,1 (V/V)%) állt és az áramlási sebesség 0,80 ml/min volt. A detektálás hullámhosszát 210 nm és 350 nm értékekre állítottuk be. Az MS méréseket elektropray ionizáció (electrospray ionization, ESI) segítségével pozitív ion üzemmódban, 300 °C-os nitrogén szárítógázzal, 3500 V kapillárisfeszültséggel és 50 V fragmentáló feszültséggel végeztük. Az oldatok meloxicam koncentrációja a kalibrációs görbe felvétele után másodlagos információ volt a HPLC-MS mérések során. Az elsőrendű kalibrációs görbe ($R^2 = 0,991$) tiszta meloxicam oldat hígítási sorának vizsgálatából lett meghatározva az 50–500 mg/dm³ tartományon.

5.2 Morfológia és méret

5.2.1 Por-röntgendiffrakció (X-Ray Powder Diffractometry, XRPD)

A por-röntgendiffrakció (X-ray powder diffractometry, XRPD) egy olyan roncsolásmentes analitikai technika, amely értékes betekintést nyújt a kristályos anyagok rácsszerkezetébe, különböző anyagok cellaméretei, kötőszögei, kémiai összetétele és kristályszerkezete meghatározhatók vele [180]. Egyetlen mérésből rendkívül sok információ nyerhető. Az XRPD fontos jellemzőket ad meg, kiegészíti a különböző mikroszkópiai és spektroszkópiai módszereket, a fázisok azonosítása, a minta tisztasága, a kristálméret és bizonyos esetekben a morfológia terén. A csúcsok helyzete és relatív intenzitása anyagra jellemző, amely kvalitatív elemzésre használható. Emellett az intenzitások részletes elemzésével kvantitatív fáziselemzésre is van lehetőség. A csúcsok profilja a kristálméretéről, az alakváltozásról és a nanoszerkezetről adhat információt. A pordiffrakció változatos minták vizsgálatára alkalmas, többek között ásványok, kerámiák, fémek és ötvözetek, katalizátorok, polimerek, gyógyszerek, szerves vegyületek jellemzésére használják. [181]–[183]

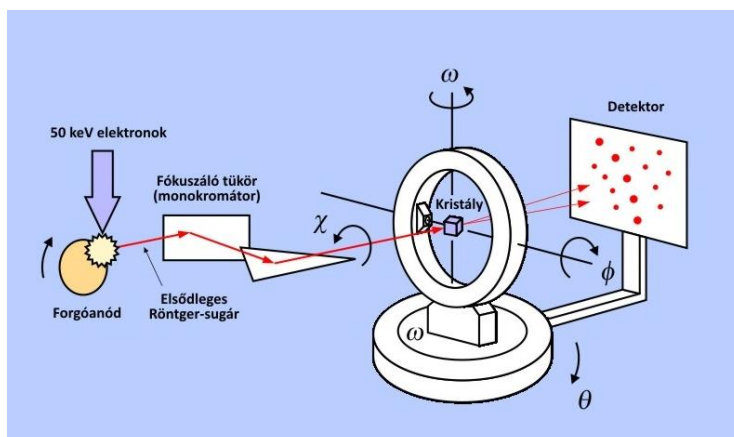
A röntgendiffrakció (X-ray diffractometry, XRD) a röntgensugarak konstruktív interferenciáján/diffrakcióján alapul. A katódsugárcső (cathode ray tube, CRT) által generált röntgensugarakat megszűrik, kollimálják, majd a minta felé irányítják. A röntgensugárzás elsősorban az atomok belső elektronjaival lép kölcsönhatásba. Difrakciós kísérletekben az eredeti sugárzás energiavesztés nélküli, rugalmas szórását (ún. Thompson-féle rugalmas szórás) vizsgáljuk.

A beeső monokromatikus sugarak a kristályos mintán diffrakciót szenvednek, mivel a sugárzás hullámhossza összevethető a minta ráczállandójával. Konstruktív interferencia csak kitüntetett irányokban tapasztalható akkor, ha teljesül a Bragg-egyenlet:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_r \cdot \sin(\theta), \quad (2)$$

ami az elektromágneses sugárzás hullámhosszát (λ) a diffrakciós szöggel (θ) és a kristályos minta rácssíkjai közötti távolságával/racskállandójával (d_r) kapcsolja össze, ahol n a diffrakció rendje. A por

minták, azaz XRPD esetén a szemcsék véletlenszerű orientációja miatt a kristályrács minden lehetséges diffrakciós iránya feltérképezhető a goniométer szögének változtatásával. A pordiffrakcióra a polikristályos jelzővel is gyakran hivatkoznak. Röntgen diffrakció (XRD) elrendezés vázlatos rajzát a **10. ábra** szemlélteti [172]. A minta pásztázása 2θ szögben történik és ezen szögek függvényében az adott irányba diffraktált röntgensugarak amplitúdóját mérik. Detektorként kezdetben röntgenfilmeket, pontszerű vagy képalkotó röntgen detektorokat, míg manapság általában a röntgen tartományra érzékenyített CCD kamerát használnak. [172], [183]



10. ábra Röntgen diffrakció (XRD) elrendezés vázlatos rajza (minta: egykristály; rendszer: goniométeres elrendezés, film detektor) [172].

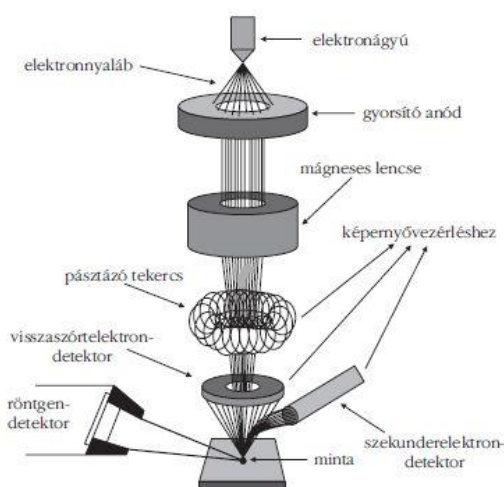
Az XRPD vizsgálatokhoz por formájú mintát készítettünk elő és egy BRUKER D8 Advance típusú por röntgen diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország), $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) sugárforrással és VÅNTEC-1 detektorral végeztük a vizsgálatokat. A mérések során a minta pásztázása 40 kV és 40 mA paraméterekkel történt a $3\text{--}40^\circ$ 2θ szögtartományon, $0,1 \text{ s/lépés}$ pásztázási sebességgel és $0,0074^\circ$ lépésközzel.

5.2.2 Pásztázó elektronmikroszkópia (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Az optikai vagy fény mikroszkópia mellett az elektronmikroszkópia térnyerése jelentős, hiszen a hagyományos optikai képalkotó módszereknél sokkal nagyobb felbontás érhető el ezen berendezésekkel. A pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope, SEM) az elektronmikroszkópok olyan típusa, amelynél a mintát nagy energiájú elektronsugárral, raszteres mintázatban pásztázva képezik le. Az elektronok kölcsönhatásba lépnek a mintát alkotó atomokkal, és az ennek eredményeképp keletkezett jel információt tartalmaz a minta felületi topográfiájáról, összetételéről és egyéb tulajdonságairól, például az elektromos vezetőképességről. A SEM-et számos tudományterületen alkalmazzák, mivel szerves és szervetlen anyagok nanométeres és mikrométeres skálán történő elemzésére alkalmas. [172], [180], [183], [184]

Egy SEM berendezés főbb részei (**11. ábra**) az alábbiak: elektronágyú, elektromágneses lencsék, pásztázó tekercsek, mintatartó, detektorok. Az elektronágyú szolgáltatja az elektront. Típusát tekintve termoemissziós/izzókatódos és téremissziós/hidegkatódos elektronforrás lehet. A termoemissziós elektronforrás egyszerűbb, igénytelenebb, azonban kisebb intenzitást lehet vele elérni és élettartama is rövidebb, mint a téremissziós forrásnak, ami azonban nagyvákuumot

igényel. Az elektromágneses térben felgyorsítják a forrásból kilépő elektronokat, majd a nyaláb elektromágneses lencséken halad át, amik a mintára fókuszálják. A SEM-ben alkalmazott mágneses lencsék a Lorentz-erőhatáson alapulnak, az elektronok spirális pályán mozognak és a fókusztávolság az elektromágneses áramerősségének állításával szabályozható. A lencse asztigmatizma korrekciója mágnesekkel kompenzálható. A pásztázó tekercsek biztosítják a minta felületének sorról-sorra történő végigpásztázását. Ha a minta elektromosan szigetelő, akkor az elektronokkal való bombázás hatására elektromosan feltöltődik, ami torz, valótlan képet adhat. Ezért amennyiben szigetelő (pl. szerves anyag) minták vizsgálata folyik, akkor a mintaelőkészítés során egy vékony (pár nm vastag), vezető réteget párologtatnak a felszínre, tipikus az arany vagy a szén bevonat. A minta elektronokkal történő besugárzásának hatására különböző típusú elektronok vagy röntgen fotonok keletkeznek, amiket a megfelelő detektorokkal rögzítenek. Annak függvényében, hogy az elektronnyaláb a minta milyen mélységében lévő részével hat kölcsön, különböző detektálható jelekről beszélhetünk. A felszínhez legközelebbi, körülbelül $1-2\text{ nm}$ mélységű régióból úgynevezett Auger-elektronok lépnek ki az ionizált atommagok relaxációja során. A távozó elektronok mozgási energiája alapján elemanalízis, megfelelő pásztázás és leképezés esetén a felszínről elemtérkép létrehozása lehetséges. A felszíntől számított $5-50\text{ nm}$ mélységű rétegből, a K-héjról kilépő másodlagos/szekunder elektronok (secondary electron, SE) száma nem függ az anyagi összetételtől, így kémiai analízisre nem alkalmasak. Ellenben, mivel a felszín közelében található az elektronok forrása, így alkalmas jelet ad nagy felbontású kép létrehozásához, a morfológia és a méret feltérképezéséhez. A mélységben ezt követő rétegnél a besugárzó nyaláb elektronjai a minta atomjaival rugalmatlanul ütköznek és visszaszóródnak, ezeket nevezik visszaszórt elektronoknak (back scattered electron, BSE), amelyek intenzitása rendszámfüggő (a nagyobb tömegszámú elemek erősebben szórják vissza az elektronokat), így kémiai összetétel meghatározására alkalmasak. A felszíntől még távolabb eső, $0,5-10\text{ }\mu\text{m}$ mélységben bekövetkező kölcsönhatás során az elektronnyaláb az atomból egy belső héjon elhelyezkedő elektront lök ki, aminek helyére egy külső héjról belép egy másik, amely relaxációt röntgen foton keletkezése kíséri. A röntgensugárzás hullámhosszának vagy energiájának mérésével kémiai analízis kivitelezhető. [172], [180], [183]–[185]



11. ábra Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) felépítése [185].

A PLAL eljárással előállított minták esetén a szuszpenzió felkavarása után egy csepp mintát vettünk, szilícium lemezre helyeztük és hagytuk szobalevegőn kiszáradni. Kontrollként a kemencebeli

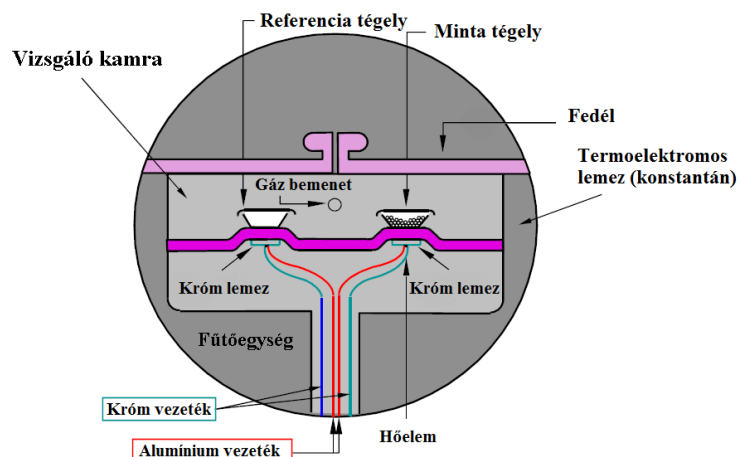
szárításból visszamaradt por mintát is vizsgáltuk. A PLA eljárással előállított minták esetén a porral borított szűrő egy darabját, illetve a szűrőről lekapart részecskékről is készítettünk felvételeket. Emellett a referencia port, az érintetlen és az ablációval megmunkált tablettá felület is tanulmányoztuk.

A töltődés elkerülése végett minden mintát fém (arany vagy arany-palládium ötvözet) réteggel borítottunk be katódporlasztással (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Uckfield, UK). A képeket egy Hitachi S-4700 SEM rendszer (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokió, Japán) alkalmazásával készítettük, tipikusan 10 kV gyorsító feszültséget és 10 μ A elektron áramot beállítva.

5.2.3 Differenciális pásztázó kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry, DSC)

A kalorimetria a hőhatások mérésére utal és az ehhez kötődő módszereket gyakran két kategóriába osztják, bár van némi átfedés közöttük. Az első kategóriába azok a mérések tartoznak, amelyek esetén nem cél a minta kémiai összetételének módosítása, hanem a minta hőmérsékletének folyamatos változtatásával a hőfelvételt, illetve hőfelszabadulást vizsgálják. Ezek a mérések a minta hőkapacitását (C) vagy annak integrálját, azaz az entalpiát (H_T) egy adott T hőmérsékleten vagy a relatív entalpiát ($H_T - H_{T_{ref}}$) adják meg, ahol, T_{ref} egy referencia hőmérséklet, amelyet gyakran szobahőmérsékletnek vagy abszolút nullának (0 K) vesznek. Ha a kalorimetriás mérés során fázisváltozás is bekövetkezik, akkor az átalakulás (fúzió, kristályosodás vagy szilárd halmazállapotú szerkezeti átmenet) entalpiáját is mérik. A minta a mérések során spontán kémiai változáson is keresztülmehet (pl. dehidratáció, bomlás vagy oxidáció-redukció), ilyenkor ezt is figyelembe kell venni az eredmények értelmezésénél. A második kategória a reakció kalorimetria, amely során a mintában és/vagy annak alkotóelemeiben kémiai változás következik be és az ehhez köthető reakcióhőt mérik, amely felhasználható a képződési hő kiszámításához. A kalorimétereket gyakran használják a kémia, a biokémia, a sejtbiológia, a biotechnológia, a farmakológia és újabban a nanotudományok területén is a különféle molekulák és a nanoméretű anyagok termodinamikai tulajdonságainak mérésére. [186], [187]

A differenciális pásztázó kalorimetria (differential scanning calorimetry, DSC) egy gyakran alkalmazott termikus analitikai módszer, ami képes részletes információt szolgáltatni az anyag fizikai és energetikai tulajdonságairól. A kvalitatív (milyen hőmérséklet tartományon milyen jellegű folyamat játszódik le) jellemzés mellett kvantitatív információk (olvadáshő, fajhő, reakcióhő) megadására is alkalmas. A DSC berendezések számszerű adatokat szolgáltatnak az exoterm, endoterm és hőkapacitásbeli változásokról a hőmérséklet és az idő függvényében, ami lehetővé teszi például az üvegesedési átmenetek, az olvadás, a kristályossági fok, a minta tisztasága és a reakciókinetika jellemzését. A technika alapja egy két-tégelyes konfiguráció, ami a minta és referencia közötti energiakülönbséget méri. A DSC-nek két műszertípusa létezik: a teljesítmény-kompenzációs DSC és a hőáram DSC. A teljesítmény-kompenzációs DSC-k két különálló kemencével rendelkeznek. A minta és a referencia közötti hőmérsékletkülönbségeket a két tégely (serpenyő) azonos hőmérsékleten tartásához szükséges hőmennyiség változtatásával „kompenzálják”. Ezzel szemben a hőáram DSC-k egyetlen kemencét használnak (**12. ábra**). A hő mind a mintába, mind a referencia anyagba egy elektromosan fűtött, konstantán termoelektromos lemezen keresztül áramlik és a két termoelem eredő feszültsége arányos a minta és a referencia hőmérsékletkülönbségével. [188]–[190]



12. ábra Hőáram differenciális pásztázó kaloriméter felépítése [191].

A modulált differenciális pásztázó kalorimetria (modulated differential scanning calorimetry, MDSC) a hagyományos DSC-hez, azaz a hőáramú DSC kemence kialakításhoz hasonló technika, a minta és egy referenciaanyag hőáramának különbségét méri az idő és a hőmérséklet függvényében. Az MDSC-ben a hagyományos lineáris fűtési vagy hűtési sebességre egy szabályozott hőmérséklet-modulációt helyeznek, hogy egy folyamatosan változó, nemlineáris mintahőmérsékletet hozzanak létre. A moduláció hozzáadásának köszönhetően két mérés végezhető el egyszerre: az MDSC a teljes hőáramot és a hőáram hőkapacitás-komponensét határozza meg. Egyrészt a minta állandó lineáris sebességgel történő felmelegítéséből megkapják a teljes hőáramot, hasonlóan a hagyományos DSC-hez. Másrészt a hőáram hőkapacitás komponensét úgy adják meg, hogy szabályozott oszcilláló hőmérséklet-modulációt alkalmaznak, amelynek során a nettó hőmérsékletváltozás nulla. Az átlagos fűtési sebesség, a moduláció időtartama és a moduláció hőmérsékleti amplitúdója három fontos változó, amelyeket a kísérleti paraméterek optimalizálása érdekében módosítanak. Mivel a fűtési sebesség a modulációs ciklus során folyamatosan változik, a minta hőkapacitását úgy határozzák meg, hogy a modulált hőáram amplitúdóját elosztják a modulált fűtési sebesség amplitúdójával. A teljes hőáram egy hőkapacitási és egy kinetikus komponensből áll, így a kinetikus komponens a teljes hőáram és a hőáram hőkapacitási komponens különbségéből megadható. [189]

A nanoszekundumos ablációval előállított minták esetén a differenciális pásztázó kalorimetriás mérések során egy TA Q20 (TA Instruments, USA) berendezést használtunk, hogy vizsgáljuk és összehasonlítsuk a PLAL eljárással előállított minta és a referencia meloxicam termális tulajdonságait. A por formájú mintát Tzero alumínium tégelybe mértük és Tzero alumínium fedővel zártuk le. Az MDSC mérés során inert atmoszférában a hőmérsékletet 25 °C-ról 300 °C-ra emeltük 5 °C/min fűtési sebességgel, 60 s-os periódusonként ± 1 °C-os hőmérséklet modulációt alkalmazva. A mérési eredményeket az Universal Analysis V4.5 szoftverrel értékeltük ki.

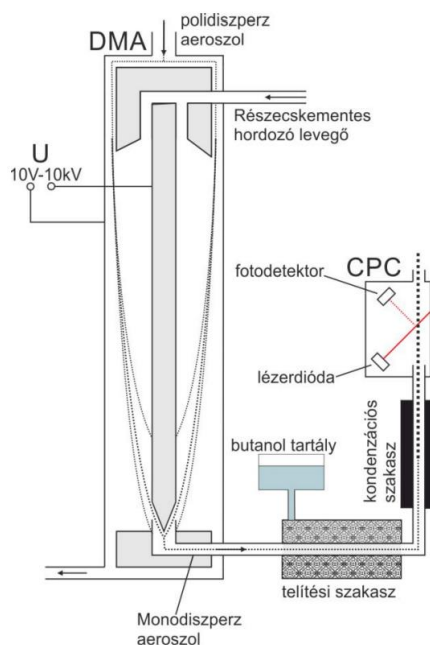
Az ELI-s együttműködésünk során femtoszekundumos ablációval előállított minták hőre adott reakcióját egy Mettler Toledo TG 821e DSC (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) mérőberendezéssel vizsgáltuk. A PLAL és PLA eljárással előállított minták, illetve a gyári meloxicam esetén rendelkezésre álló por formájú mintákból 2–4 mg-nyit mértünk be DSC mintatartókba, melyeket hermetikusan

lezártunk, majd fedelüket átszúrtuk. A DSC mérés során a referencia egy üres tégely volt. A vizsgálatokat inert atmoszférában, folyamatos argon gáz áramoltatás mellett végeztük és a hőmérsékletet 25 °C-ról 300 °C-ra emeltük 10 °C/min fűtési sebességgel. A mérési eredményeket az STARe V9.1 szoftver (Mettler Toledo; Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) alkalmazásával értékeltük ki.

5.2.4 Pásztázó elektromos mozgékonyaságon alapuló részecskeméret szeparátor (Scanning Mobility Particle Spectrometer, SMPS)

Számos műszer létezik, amelyek különböző módszereket alkalmaznak a részecskeméret mérésére. Ezen technikák közé tartozik a diffúziós, a tehetetlenségen alapuló, a fényszórásos, az elektronmikroszkópos és az aerodinamikai módszer. Ezek azonban vagy csak a mikrométeresnél nagyobb méretű részecskék mérésére alkalmasak, vagy csak nehézkes és lassú eljárással lehet információt kapni a mikrométer alatti, nanométeres méretű részecskékről. A leghatékonyabb és legelterjedtebb technika a szubmikrométeres részecskék mérésére az elektromos mobilitás meghatározásának módszere, ami változatos minták, szerves és szervetlen részecskék méreteloszlásnak meghatározására alkalmas. [151], [192]–[194]

A kereskedelmi forgalomban kapható pásztázó elektromos mozgékonyaságon alapuló részecskeméret szeparátorok (scanning mobility particle spectrometer, SMPS) tipikusan a néhány nanométertől az 1000 nm-ig terjedő tartományban alkalmazhatók a darabszámmal súlyozott részecskeméret-eloszlás mérésére. Az SMPS sematikus rajzát a **13. ábra** mutatja be.



13. ábra Pásztázó elektromos mozgékonyaságon alapuló részecskeméret szeparátor (SMPS) vázlatos felépítése [195].

Az SMPS három fő részből áll: a részecske töltő, a differenciális mobilitás elemző (differential mobility analyzer, DMA) és a detektáló rendszerből, melyek feladata rendre az egyensúlyi töltéseloszlás létrehozása, a méret szerinti szeparálás és a részecskeszámlálás. Először egy bipoláris

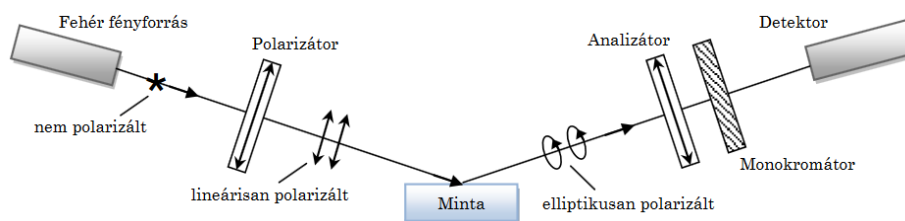
töltőt (semlegesítő - neutralizer) használnak, hogy a részecskék töltésszintjét a Boltzmann-eloszlásnak megfelelő egyensúlyi eloszlásba hozzák. A polidiszperz aeroszolt ezután a DMA-n keresztül vezetik át, ahol egy hengerkondenzátor fegyverzetei közé kerülnek a részecskék. A koncentrikus fegyverzetek közül a belsőre nagy feszültséget kapcsolnak, míg a külső földelt vagy igen alacsony feszültségű. A részecskék a külső fegyverzet felszínéhez közel lépnek be, amivel egyidőben részecskéktől mentes hordozó levegőből lamináris áramlást (általában 10:1 arányban az aeroszol áramlási sebességéhez viszonyítva) hoznak létre a DMA-ban, a belső fegyverzethez közel. A részecskék töltésétől függően (pozitív és negatív) a belső fegyverzet különböző mértékben vonzza vagy taszítja őket. A részecske méretétől függő elektromos mozgékonyság, illetve a hengerkondenzátor fegyverzetei közötti feszültség határozza meg az adott eltérített részecske pályáját. A nagy elektromos mozgékonyságú részecskék az aeroszol bemenetéhez közel csapódnak a belső fegyverzetnek, míg a kisebb mozgékonyságú részecskék lejjebb. A részecskék méret szerinti szeparációját az teszi lehetővé, hogy adott eltérítő feszültség esetén a belső fegyverzet alján lévő gyűrű alakú kilépő résen már csak egy meghatározott eltérítési pályán haladó, azaz szűk elektromos mobilitási tartományba eső, tehát meghatározott méretű, monodiszperz minta lép ki a DMA-ból. Ezen részecskék összességét nevezik monodiszperz aeroszolnak. A feszültség változtatásával változik a kiválasztott mérettartomány, tehát a feszültség folyamatos hangolásával a teljes mérettartomány végigpásztázható, megadható a minta méreteloszlása. A DMA-t követően a monodiszperz mintaáram a kondenzációs részecskeszámláló (condensation particle counter, CPC) egység felé van elvezetve, ahol a részecskék számát határozzák meg, míg az összes fennmaradó részecske a többlet hordozóáramlással távozik a DMA-ból. A DMA-ban kiválasztott részecskék túl kicsik lennének a detektáláshoz, így előbb kondenzációval megnövelik a méretüket. A részecskéket egy fűtött, porózus falú csövön vezetik keresztül, ahol butanol telített gőzével keverednek el, amely butanol a hűtött szakaszon kondenzálódik a felületükre, körülbelül néhány μm -es átmérőt eredményezve. Végezetül a minta egy lézernyalábon halad keresztül és a szórt fényt detektálja a berendezés, ebből határozza meg a részecskeszámot. Az SMPS reakcióideje jellemzően 60–120 s, míg a mérhető részecskeszám-koncentráció körülbelül 10^4 – 10^9 részecske/ cm^3 . [192], [195]

A PLA eljárással keltett részecskék méreteloszlását pásztázó elektromos mozgékonyzágon alapuló részecskeméret szeparátorral (alegységei: Vienna-type Differential Mobility Analyzer (DMA) & Condensation Particle Counter (CPC), Grimm Aerosol Technik GmbH & CO. KG, Ainring, Németország) határoztuk meg, amely a 10,1–1093 nm mérettartomány mérésére alkalmas. Az SMPS által végzett vizsgálat sorozat 3 vagy 4 egymást követő mérést tartalmaz és minden egyes vizsgálat 7 percig tart. A mérések során a lézer ismétlési frekvenciája 1 Hz, a tisztítógáz áramlási sebessége pedig 0,3 l/min volt. A frekvenciát a részecskeáram mérséklése végett csökkentettük, hogy ne duguljon el mérés közben az SMPS.

5.3 Ablációs mechanizmus feltárása

5.3.1 Ellipszometria

Az ellipszometria egy érintés- és roncsolásmentes optikai analitikai eljárás, amellyel akár nanométeres vastagságú dielektrikum rétegek fizikai tulajdonságai is meghatározhatók. A nagy pontossággal elemezhető rétegvastagság tartomány a vizsgáló fény hullámhosszánál vékonyabb, akár egy atom vastagságtól a mikrométeresig terjed, így ennek köszönhetően számos tudományterületen alkalmazzák, például biológiában, orvosi kutatásokban vagy félvezetőiparban. Az ellipszometriában a reflexiós elrendezések (14. ábra) az elterjedtebbek, de kialakítható transzmissziós rendszer is. Az előbbi esetben a mérés során a vizsgált felületre beeső, majd arról visszaverődő polarizált fény tulajdonságait vizsgálják. A polarizáció változása függ az adott minta paramétereitől (vastagság, törésmutató, dielektromos függvény tenzor). A mérés során a komplex törésmutató (refraktív index) vagy a dielektromos függvény tenzorának kiértékelése történik, ami alapján például a minta kémiai összetételéről, morfológiájáról, kristályosságáról, elektromos vezetőképességéről nyerhetünk adatokat. Az ellipszométer a minta komplex visszaverődési arányát ($\rho = r_p/r_s$) méri, kihasználva, hogy a fény polarizációs állapota felbontható két egymásra merőleges komponensre (s és p komponensek), melyek amplitúdóit (r_s és r_p) meg lehet adni a visszaverődés és a normálás után. Annak köszönhetően, hogy nem abszolút értékeket, hanem két mennyiség arányát méri, igen pontos és jól reprodukálható a módszer, jóformán érzéketlen a fluktuációkra, a szórásra, valamint nem szükséges referenciasugár vagy szabványos minta használata. Ellenben hátránya, hogy egy indirekt módszer, vagyis általában a mért mennyiségekből nem lehet közvetlenül a minta optikai jellemzőit megadni, tipikusan egy iterációs modell analízist kell elvégezni. [170]



14. ábra Forgó analizátoros spektroszkópiai ellipszométer (reflexiós elrendezés) felépítése [196].

A meloxicam optikai tulajdonságainak vizsgálatát a céltárgyat imitálva egy tiszta hatóanyag tabletta felszínén, egy Woolam gyártmányú M2000F típusú ellipszométerrel végeztük 75°-os beesési szög esetén a 250–1000 nm hullámhossztartományon. Az optikai abszorpciós együtthatót (α) a hullámhossz (λ) függvényében mért komplex törésmutatóból ($\kappa(\lambda)$) határoztuk meg az alábbi összefüggéssel:

$$\alpha = \frac{4 \cdot \pi \cdot \kappa}{\lambda}. \quad (3)$$

5.3.2 Gyorsfényképezéses vizsgálatok pumpa-próba módszerrel

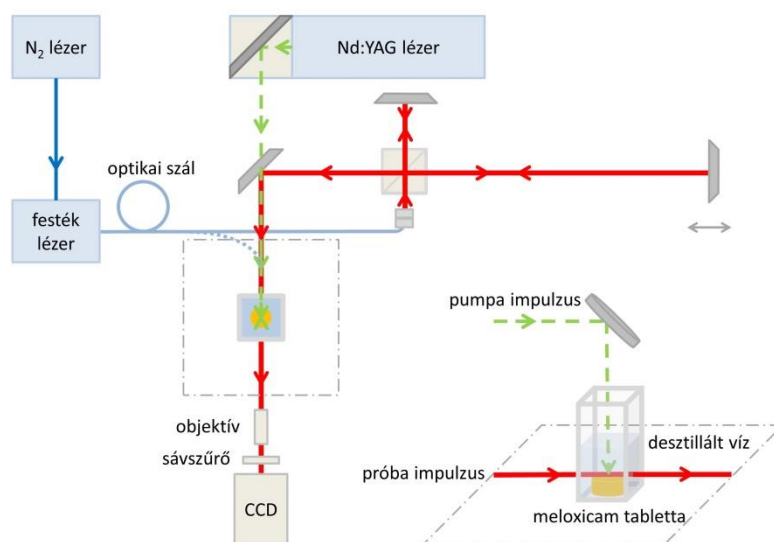
A lézeres anyagmegmunkálást tipikusan rövid (nanoszekundumos) vagy ultrarövid (pikoszekundumos vagy femtoszekundumos) impulzusú lézerekkel végzik, ahol a lejátszódó lézertárgy kölcsönhatás pontos nyomon követése lehetővé tenné a lejátszódó folyamatok mélyebb

megértését. Mind a folytonos, mind az impulzusüzemű lézersugárzás által szilárd felületeken indukált jelenségek tanulmányozása a modern szilárdtestfizika és -kémia széles körben kutatott témája. A lézer-anyag kölcsönhatás összetett és több kulcsfontosságú mechanizmuson keresztül zajlik le, amelyekhez mintegy 15 nagyságrendet átfogó időskála rendelhető. Számos optikai módszert fejlesztettek a lejátszódó jelenségek, például a lézer által kiváltott károsodás, kémiai reakciók, a besugárzással indukált lökéshullám, az anyagfelhő- és plazmaképződés, a fázisátalakulások, a mikro- és makrofolyamatok vizsgálatára. Többek között a nagysebességű képalkotás egy értékes eszköz a kölcsönhatás feltérképezéséhez, hiszen nagy időbeli felbontás válik vele lehetővé. [197]

A pumpa-próba technika egy elterjedt optikai detektálási módszer a lézersugár által indukált gyors folyamatok megfigyelésére, képalkotó vagy nem képalkotó (pl. spektroszkópiai) stratégiák segítségével. A relatíve egyszerű és rugalmas optikai felépítésnek köszönhetően adaptív időbeli és térbeli felbontás érhető el. A pumpa-próba módszerben a pumpa impulzus hat kölcsön az anyaggal, és egy második, az ún. próba impulzus a pumpa nyaláb által kiváltott hatást teszi detektálhatóvá. A próba impulzus intenzitása sokkal kisebb, mint a pumpa impulzusé, hogy ne idézzon elő változást a mintában. A pumpa-próba rendszer időbeli felbontása a femtoszekundumostól a másodperces tartományig terjed, amit a képalkotó, azaz a próba lézer impulzusideje határoz meg. Ha a pumpa és a próba impulzus közötti késleltetést változtatjuk, a felvett képkockákból rekonstruálhatóvá válik a lejátszódó folyamat időbeli fejlődése. Ha egy adott pumpa impulzus által kiváltott hatás dinamikáját szeretnénk vizsgálni, akkor a próba impulzus nyalábosztása révén több időpillanat is megörökíthető. A nyalábosztás történhet például egy Michelson-interferométerrel, így a karhossz változtatásával a próba impulzusok közötti időbeli különbség könnyen változtatható. Végeredményképpen a pumpa impulzushoz képest két eltérő időbeli késleltetéssel rendelkező próba impulzusunk lesz, amelyek által létrehozott felvételeket egy képre lehet exponálni. A detektálás tipikusan egy CCD kamerával történik, amely elé például sávszűrőt helyezhetnek a háttér csökkentése érdekében vagy objektívet a nagyobb térbeli feloldás eléréseért. A CCD helyettesíthető spektrofotométerrel is, ha a fény-anyag kölcsönhatás spektroszkópiai vizsgálata a cél, ami például a gerjesztések élettartamának időbontott mérését teszi lehetővé. [197], [198]

Az általunk felépített és használt rendszer vázlatos rajzát a **15. ábra** mutatja be. A pumpa-próba rendszerünkben az abláló pumpa impulzust egy Nd:YAG lézer (Quantel, $\lambda = 532\text{ nm}/1064\text{ nm}$, FWHM = 6 ns) biztosította, míg a gyorsfényképezéshez a kivilágítást adó próba impulzust egy nitrogén lézer által gerjesztett Rhodamin 6G festéklézer ($\lambda = 590\text{ nm}$, FWHM = 1 ns) szolgáltatta. A $\lambda = 532\text{ nm}$ hullámhosszú pumpa impulzusok esetén a foltméret $\sim 0,2\text{--}0,3\text{ mm}^2$ és az impulzusenergia $\sim 6\text{--}8\text{ mJ}$ és $\sim 12\text{--}16\text{ mJ}$ volt, ami rendre $F = 3\text{ J/cm}^2$ és $F = 6\text{ J/cm}^2$ energiasűrűséget eredményezett. A $\lambda = 1064\text{ nm}$ hullámhossz alkalmazásakor a foltméret $\sim 0,07\text{--}0,09\text{ mm}^2$ volt, míg az impulzusenergia $\sim 15\text{ mJ}$, így $F = 18\text{ J/cm}^2$ energiasűrűség adódott. A minta előállítása esetén alkalmazott értékhez képest csökkentettük a foltméretet, hogy beleférjen a látómezőbe. A céltárgyat egy kvarc küvetta aljába helyeztük és a felszíne fölött 5 mm magasságig töltöttük fel desztillált vízzel, a korábbi kísérleteknek megfelelően. A próba lézernyaláb homogén részét egy optikai szállal vezettük az ablációs elrendezéshez és továbbítottuk az impulzusokat vagy közvetlenül a céltárgyra, vagy egy Michelson-interferométerbe, amely két, egymást 8 ns időbeli különbséggel követő próba impulzust eredményezett. A közvetlen megvilágítást a részecskeképződés időbeli

alakulásának vizsgálatára használtuk, míg a két, egymást követő próba impulzus használatának célja az ablációs folyamat kezdeti, tranziens részének tanulmányozása volt. A rendszer beállításánál a két korból érkező próba impulzusok közötti intenzitáskülönbséget neutrális szűrők behelyezésével egyenlítettük ki. A pumpa és az első próba impulzus közötti időbeli különbséget fotodióda segítségével követtük nyomon. A pumpa impulzus felülről, a besugárzott felület normálisával párhuzamos irányból érte a céltárgyat, míg a próba impulzusok oldalról, a felszín normálisára merőleges irányból világították meg és az ablációs folyamat árnyékképét vetítették rá egy CCD kamerára (The Imaging Source-DMK 23G445, 30 fps, N = 3×). A CCD kamera elé helyezett objektívvel elért nagyítást egy hitelesített skála fókuszsíkba való helyezésével és lefényképezésével állapítottuk meg. Az objektív után behelyeztünk egy sáváteresztő optikai szűrőt, hogy az abláció során keletkező plazma vakító fénye, illetve az abláló nyaláb szórt fénye ne juthasson a kamerába. A pumpa és a próba lézer, valamint a CCD kamera nanoszekundumos és milliszekundumos késleltetésekkel történő triggerelését egy digitális késleltető generátor (digital delay generator, DDG) (Stanford Research Systems-DG645) vezérelte.



15. ábra Pumpa-próba elrendezés a gyorsfényképezéses vizsgálatokhoz direkt próba nyaláb kivilágítás (kék szaggatott vonal), illetve Michelson-interferométerrel bővített, két próba impulzust, azaz dupla expozíciót biztosító kivilágítás esetén [156].

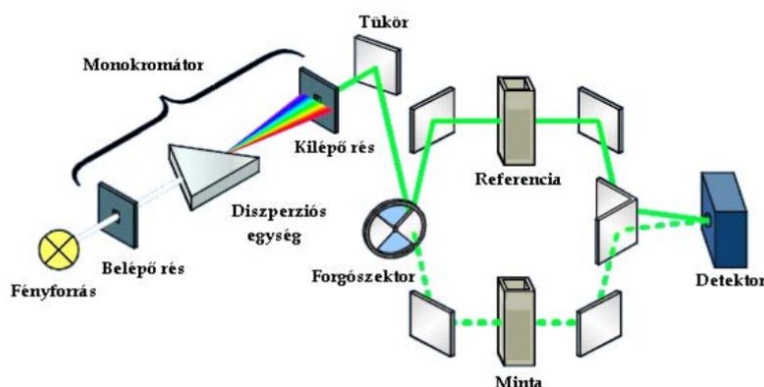
5.4 Gyógyászati alkalmazhatóság

5.4.1 Ülepedés vizsgálata extinkciós spektroszkópiával

A spektroszkópia alapja a fény-anyag kölcsönhatás, amely során egy elektromágneses hullám és az anyagot alkotó atomok, molekulák között kölcsönhatás (emisszió, abszorpció, transzmisszió, szórás) következik be. A kölcsönhatás során az elektromágneses sugárzás frekvenciafüggő intenzitásváltozást szenved, s az így kapott spektrum vizsgálatából a minta szerkezetére és tulajdonságaira vonatkozóan nyerhetünk információkat. Az ún. optikai tartomány az UV-től az IR-ig terjed, ami nagyjából a 0,1–100 μm hullámhossztartománynak felel meg. A spektroszkópiai eljárások alkalmasak anyagok, összetevők azonosítására, a karakterisztikus sávok alapján minőségi

analízisre, a spektrum részletes elemzése alapján konfigurációk, konformációk vagy fizikai állapot meghatározására, illetve fizikai összefüggésekkel (pl. Lambert-Beer törvény) az intenzitások alapján mennyiségi analízis is végezhető. Előnyük, hogy roncsolásmentes, általában kis anyagmennyiséget igénylő, gyors és bármely halmazállapot esetén alkalmazható vizsgálati módszerek. Az UV-VIS spektroszkópia elektrongerjesztési spektrometria abban az értelemben, hogy az UV (100–380 nm) és látható (380–700 nm) hullámhossz tartománybeli abszorpció a molekulapályák közötti elektronátmenetekhez köthető, ahol a $h \cdot \nu$ energiával (h : Planck-állandó, ν : foton frekvencia) rendelkező foton elnyelődése következtében az E_0 alapállapotból az E_1 gerjesztett állapotba kerülhet a rendszer. Az atomokra diszkrét, vonalas spektrum a jellemző, míg a többatomos molekulák esetén sávós a spektrum, mivel az egyes alap- és gerjesztett állapotok több rezgési és forgási energianívóból állnak, így a lehetséges átmenetek sávokká olvadnak össze. A spektroszkópia egy széles körben alkalmazott eljárás, amely kvalitatív és kvantitatív információkat szolgáltat a mintákról. Analitikai elemzés szempontjából az UV-VIS tartomány korlátozottan alkalmazható kvalitatív analízisre, mivel a spektrum abszorpciós sávjai igen szélesek, az egyes csoportokra jellemző sávok gyakran átfednek, nem elkülöníthetők, így az egyes funkciós csoportok nem azonosíthatók. Ellenben, ezen tartomány ideális a kvantitatív elemzésre a Lambert-Beer törvény alkalmazására alapozva.

Az abszorpciós spektrométer (16. ábra) főbb elmei az alábbiak: fényforrás, monokromátor, minta(tartó), detektor. Az elektromágneses (ultraibolya, látható és infravörös tartományú) sugárzást biztosító fényforrás fényét a monokromátor monokromatizálja, azaz keskeny hullámhossztartományú fénynyalábbá alakítja és folyamatosan hangolja, hogy mely hullámhosszal világítja ki a mintát. A fénybontás történhet prizmával, ráccsal vagy szűrőkkel. A sugárzás áthalad a mintatartóba helyezett anyagon és a detektor rögzíti az egyes hullámhosszak esetén az intenzitásokat, azaz felveszi a spektrumot. Az egy fényutas kialakításokban egymást követően, míg a két fényutas műszerekben, ahol a monokromátor után két részre van bontva a fénysugár, egyszerre mérhetjük a referenciát és a mintánkat. [170], [199], [200]



16. ábra Két fényutas spektrofotométer vázlatos felépítése [201].

A gyógyászati alkalmazás szempontjából fontos jellemző az előállított kolloid oldat időbeli stabilitása. A PLAL eljárással keltett részecskék desztillált vízbeli ülepedését az időben extinkciós spektroszkópiával vizsgáltuk. A Shimadzu UV-2101 PC UV-VIS spektrométerbe mintaként $\lambda = 532 \text{ nm}$ hullámhosszon, $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűséggel, desztillált víz közegben ablált, 43.200 impulzussal előállított kolloid oldatot helyeztünk, a referencia desztillált víz volt. Az abláció után azonnal

bekerült a minta a spektrométerbe és adott időközönként felvettük az extinkciós spektrumot. A méréseket a 190–800 nm-es hullámhossztartományon végeztük és kvarc küvettát használtunk.

5.4.2 Oldékonyság vizsgálata extinkciós spektroszkópiával

Az oldékonyság definíció szerint megadja azt az oldószer mennyiséget *ml*-ben, amelyben az vizsgált anyag 1 g-nyi mennyisége feloldódik jól definiált körülmények között [202].

Tehát az oldékonyság mérése visszavezethető koncentráció mérésre, amire alkalmas lehet az abszorpciós spektroszkópia. A Lambert-Beer törvény megadja a minta abszorbanciája (*A*) és a koncentrációja (*c*) közötti összefüggést:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c = \lg \left(\frac{I_0}{I_t} \right), \quad (4)$$

ahol ε a moláris abszorbancia, *l* a minta vastagsága (a küvette hossza), *c* a mérendő anyag koncentrációja, míg I_0 a beeső fény intenzitása, I_t pedig a transmittált fény intenzitása. [200] A moláris abszorbancia meghatározható, ha a mintánkból ismert koncentrációjú oldatokat, például a törzsoldata hígításával sorozatot készítünk a vizsgálni kívánt körülmények között és rögzítjük a spektrumokat. A hígítási sorozat esetén a *c* koncentrációk és a mért *A* abszorbanciák ismeretében kalibrációs egyenest vehetünk fel, amelynek meredekségéből megadható a moláris abszorbancia adott pH-n, az adott oldószerben. Ezt követően egy ismeretlen koncentrációjú minta oldott anyag tartalmát meg tudjuk már adni a spektrometriai mérést követően. [202]

A korábban ismertetett spektrométer felépítése mellett van lehetőség ún. „at line” vagy „in line” elrendezésre is, ahol egy mérőfejet (szonda) direkt módon a mintába helyeznek és tipikusan optikai szállal vezetik a jelet a spektrométer detektorához [203].

A nanoszekundumos PLAL eljárással előállított minták esetén a szuszpenzió formát használtuk fel, míg a femtoszekundumos PLA és PLAL technikával előállított minták esetén 5 mg por formából indultunk ki az oldékonysági vizsgálatok során.

A mintákhoz 10 ml foszfát puffer oldatot (PBS) (pH = 7,4) adtunk hozzá, majd szobahőmérsékleten (22 °C) 24 óra keverésnek vetettük alá. Egy nap után, a mérés előtt minden egyes mintaoldatot megszűrtünk (átlagos pórusátmérő: 0,45 μm), majd a szükséges hígítást követően megmértük az abszorbanciát λ = 362 nm hullámhosszon egy AvaSpec-2048L transzmissziós merülő szonda és AvaLight DH-S-BAL spektrofotométer (Avantes, Apeldoorn, Hollandia) segítségével. Az adott minta meloxicam koncentrációját a korábbi hitelesítés alapján határoztuk meg. A kalibrációs görbe (R² = 0,999) PBS-ben (pH 7,4) feloldott tiszta meloxicam vizsgálatából lett meghatározva az 1–15 μg/ml tartományon.

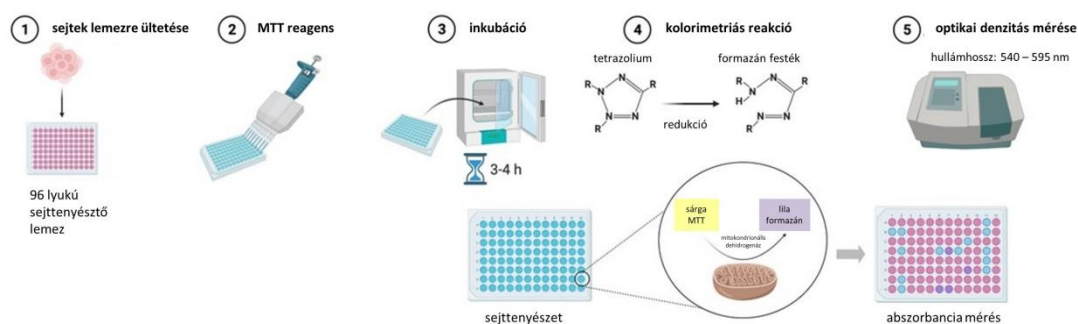
5.4.3 Citotoxicitási mérések

A citotoxicitás alapjelentése a „sejttölő képesség”. Az immunrendszer sejtes elemei is képesek citotoxikus reakcióra, például a szervezet saját rendellenes sejtjei vagy kórokozók ellen. [204]

A citotoxicitás fontos tényező a vegyi anyagok sejtekre és szövetekre gyakorolt hatásmechanizmusának megértéséhez is. Úgy gondolják, hogy a citotoxicitás fontos szerepet játszik számos patológiai folyamatban, beleértve a karcinogenezist és a gyulladást. A sejtkultúra-

rendszerek használata általánossá vált a vegyi anyagok és vegyszer keverékek toxikológiai értékelésében, hiszen az *in vitro* vizsgálatoknak számos előnye van. Egyrészt így a toxicitási vizsgálatok során minimálisra csökkenthető az állatok felhasználásának szükségessége. Másrészt az *in vitro* vizsgálatokkal képesek meghatározni a toxicitás sejt- vagy szervspecifikus mechanizmusait. Például az elsődleges sejt kultúrák, klónozott sejt törzsek vagy immortalizált sejtvonalak használata lehetővé teszi egy viszonylag homogén sejt populáció viselkedésének tanulmányozását [205], illetve ma már a különböző célszervekből származó sejtek széles spektruma is rendelkezésre áll. Egy vegyület citotoxicitási vizsgálatok során számos, a sejt különböző tulajdonságaira kifejtett hatást lehet elemezni, melyek lehetnek általános, minden sejtre jellemző mechanizmusok vagy egy adott sejt típusra specifikusak. A 0%-os citotoxicitás alatt azt a legmagasabb koncentrációját értik a vizsgált anyagnak, amely már nem okoz toxikus jelenségeket a sejtben. A kenacid kék, a szulforhidamin B és sav foszfatáz módszerrel a sejtek számát a sejtfehérjéhez vagy a sejt hártárhoz/membránhoz kötődő sav foszfatáz mennyisége alapján méri. Az MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid), az XTT (2,3-bisz(2-metoxi-4-nitro-5-szulfofenil)-2H-tetrazólium-5-karboxanilid belső só), a rezazurin vagy a neutrálvörös (neutral red) technikával/teszttel a sejtek metabolikus aktivitását és életképességét határozzák meg, míg az LDH aktivitás változását a membrán integritásának mérésére használják. [206], [207]

A mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz alapú viabilitás teszt (assay) a sejtek életképességének mérésére szolgál, amit a mitokondriális dehidrogenázok aktivitásának értékelésével határoznak meg. Az MTT teszt (17. ábra) egy kolorimetriás módszer, aminek alapja, hogy az élő sejtekben működő mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz enzim a sárga színű MTT reagenst a tetrazólium gyűrű felhasítása mellett lila formazán vegyületté redukálja, mely vizes oldatban nem oldódó kristályokat képez. A sejteken belül képződött kristályokat valamilyen detergenssel (pl.: dimetil-szulfoxid (DMSO) vagy savasított izopropanol) szolubilizálják, majd megméri az optikai sűrűséget (optical density, OD), amely jel arányos a keletkezett formazán mennyiséggel, ami homogén sejt populáció esetén széles tartományon (10^3 – 10^6 sejt/kamra) egyenesen arányos az élő sejtek számával. Amennyiben a fluoreszcencia spektroszkópiával meghatározott formazán koncentrációja azonos a kezelt sejt esetén meghatározott értékkel, akkor az adott hatóanyag koncentráció nem számít toxikusnak. [206], [208], [209]



17. ábra A citotoxicitás meghatározásának folyamata MTT protokollal [210].

A citotoxicitás vizsgálatok során por formából indultunk ki minden esetben, 1 mg száraz mintát feloldottuk 1 ml tápoldatban, ami Earle-sókat tartalmazó, 10 (V/V)% magzati borjúsérummal,

0,5 (m/V)% glükózzal, 0,3 mg/ml L-glutaminnal, 4 mM HEPES-szel és 25 µg/ml gentamicinnel kiegészített Minimum Essential Medium Eagle (Sigma, St Louis, MO, USA) volt.

A sejtek életképességének jellemzésére a mitokondriális aktivitást MTT tesztel, protokoll szerint mértük. A kísérletek során a tüdő alveoláris hámsejtjeit modellező A549 sejteket (adenokarcinómás humán alveoláris bazális epitelsejtek) (ATCC) használtunk, amelyeket egy 96 lyukú sejttenyésztő lemezen $4 \cdot 10^4$ sejt/lyuk sűrűségben helyeztünk el. A sejteket referencia meloxicamot, illetve a lézeres ablációjával előállított részecskéket tartalmazó mintákkal kezeltük. Az 1 mg/ml maximális vegyület koncentrációból kiindulva, a koncentrációt felező léptékekkel hígítási sort hoztunk létre és felvittük a sejtekre, amiket ezután 24 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. Következő lépésként 20 µl tiazol kék tetrazólium-bromidot, azaz MTT-t (MTT; Sigma, St. Louis, Missouri, USA) adtunk minden egyes lyukba. További 4 óráig, 37 °C-on történő inkubációt követően nátrium-dodecil-szulfát (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) oldatot (10% 0,01 M HCl-ban) adtunk hozzá és egy éjszakán át inkubáltuk. Végül a citotoxicitást az 550 nm-es hullámhosszon (referencia hullámhossz: 630 nm) végzett optikai sűrűség méréssel határoztuk meg egy EZ READ 400 ELISA (Biochrom, Cambridge, UK) berendezés segítségével. A protokollt minden koncentráció esetén négyszer ismételtük meg. A sejtek életképességére a következő képlet alapján következtettünk:

$$100 - \left(\frac{OD_{\text{minta}} - OD_{\text{közeg kontroll}}}{OD_{\text{sejt kontroll}} - OD_{\text{közeg kontroll}}} \right) \cdot 100, \quad (5)$$

ahol az indexnek megfelelően a kezelt sejtek (minta), a kezeletlen sejtek (sejt kontroll) és a háttér (közeg kontroll) optikai denzitásai/sűrűségei (OD) szerepelnek.

5.4.4 Gyulladáscsökkentő hatás

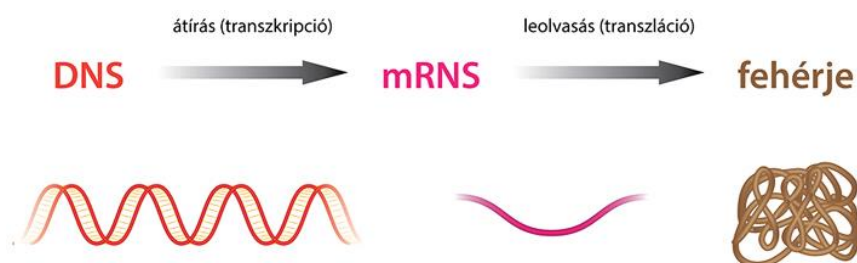
A gyulladás egy összetett védekező válaszreakció számos ingerre és sérülésre. Az epidemiológiai és klinikai adatok szerint a gyulladás a krónikus betegségek vagy szövődményeik, például az artritisz, a szív- és érrendszeri betegségek, a rák és a II. típusú cukorbetegség hátterében álló egyik fő mechanizmus. Ezért ezen betegségek kezelésében gyulladáscsökkentő stratégiákat kell alkalmazni. Jelenleg a klinikai alkalmazásra engedélyezett gyulladáscsökkentők főként a nem-szteroid gyulladáscsökkentőket és a kortikoszteroid hormonokat foglalják magukba. [211]

Az egyes vegyületek gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatára különböző módszerek állnak rendelkezésre. Tipikusan mesterséges gyulladást idéznek elő, majd az elemezni kívánt anyag hozzáadását követően valamilyen, a gyulladásra jellemző paraméter méréssel határozzák meg a hatékonyságot. A gyulladás kiváltható lipopoliszacharid (lipopolysaccharide, LPS) hozzáadásával, amely többek között indukálja az interleukin-6 (IL-6) gén termelődését. Ez a mechanizmus mérhető kvantitatív polimeráz láncreakcióval (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) és enzimhez kötött immunszorbiens próba (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) alkalmazásával. [211]

Az LPS a Gram-negatív baktériumok sejtfalának legnagyobb mennyiségben előforduló összetevője, amelyet széles körben használnak gyulladást vizsgáló modellekben. Az LPS kulcsszerepet játszik az immunsejtek mechanizmusainak szabályozásában, például serkentheti gyulladást okozó citokinek felszabadulását különböző sejt típusokban, ami kórokozókkal szembeni akut gyulladást okozó válaszhoz vezet. [212]

A citokinek hormonszerű fehérjék, amelyek gyulladásos és immunválaszokat közvetítenek és szabályoznak. A gyulladásos citokin interleukin-6 (IL-6) egy endogén pirogén és kimutatták, hogy szabályozza a T- és B-sejtek funkcióit, valamint indukálja az akut fázisú válaszfehérjéket [213]. Az IL-6-ot számos sejtípus termeli, beleértve a makrofágokat, monocitákat, fibroblasztokat, endotélsejteket és simaizomsejteket. Az IL-6 termelés indukálható, a fibroblasztok IL-6-termelését és IL-6 mRNS expresszióját mikrobiális faktorok, például az LPS serkenthetik. [214]

Az IL-6 keletkezésének mechanizmusa vázlatosan leírható a fehérjeszintézis lépéseivel (**18. ábra**). A gén definíció szerint az öröklődés és a genetikai funkció egysége, a DNS egy specifikus szakasza [215]. A sejtek genetikai információja a DNS-ben található, amely tartalmazza az RNS és a fehérje molekulák felépítéséhez szükséges információt. A sejtben a fehérje előállításának első lépésében a DNS adott szakaszáról másolat készül, ezt a folyamatot nevezik transzkripciónak/génátírásnak, amelynek eredménye az mRNS. A második lépés a transzláció, maga a fehérjeszintézis, amelyben a hírvívő RNS molekula szekvenciája (bázis sorrendje) meghatározza a képződő fehérje aminosav sorrendjét. [216]

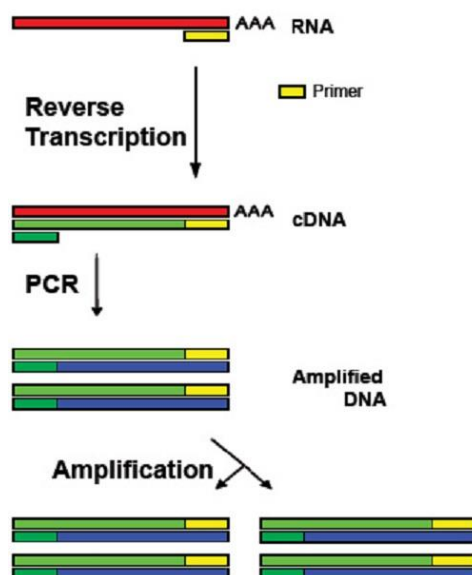


18. ábra A fehérjeszintézis folyamatának vázlatos lépései [217].

Az IL-6 szintézise mérhető az mRNS szinten és a fehérje szinten, rendre a qPCR és az ELISA módszerekkel.

Az IL-6 gén fehérjeszintézise során az mRNS mennyiségéről qPCR méréssel nyerhetünk információt. A rendelkezésre álló nukleinsav minták általában igen kis mennyiségűek, önmagukban nem is mérhetőek. A polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR) lényege, hogy a DNS bármely specifikus része, azaz bármely nukleinsav szekvencia egység megsokszorozható a polimeráz enzim segítségével a hőmérséklet megfelelő ciklusos változtatásával és ezen amplifikációnak köszönhetően detektálhatóvá válik. Az eljárás lényegében a DNS szintézis természetes folyamatát utánozza *in vitro* körülmények között. A PCR módszer DNS amplifikálására képes, így amikor egy génről átíródott mRNS (lásd esetünkben) mennyiségét szeretnénk meghatározni, akkor az RNS izolálását követően reverz transzkriptáz segítségével elő kell állítani az RNS komplementer DNS (cDNS) szálát, végezetül ezt lehet PCR-rel felfszaporítani és a mennyiségét detektálni (**19. ábra**). Összehasonlító vizsgálatok során szükség van normalizálásra, vagyis például az RNS szintű génexpressziós mérések esetén a vizsgálni kívánt target gén expressziós szintjét egy referencia gén expressziós szintjére vonatkoztatjuk, amely egyenesen arányos a kiindulási sejt mennyiséggel. A vizsgálni kívánt szekvencia (esetünkben: IL-6) mellett egy fix mennyiségben termelődő szekvenciát (esetünkben: Actb/ β -aktin) is felfszaporítunk, aminek expressziója független a feltérképezni kívánt hatástól (esetünkben: gyulladáscsökkentő anyag hozzáadása), s ehhez viszonyítva adjuk meg a relatív expressziót. A valós idejű (real-time) PCR berendezések esetén lehetőség van az amplifikációs görbék (ún. PCR-kinetikai görbék) felvételére, így nyomon követhető a végtermék sokszorozódása

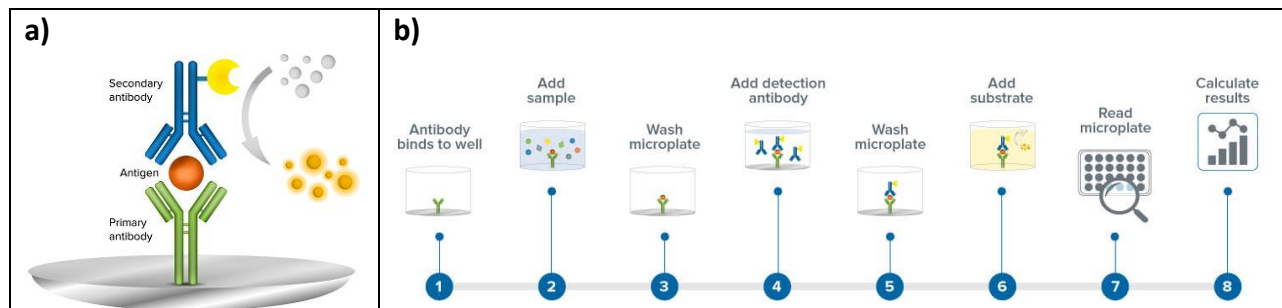
és lehetővé válik a PCR termék mennyiségének valós idejű detektálása. A mérés fluorometriás úton történik, valamely erre alkalmas fluoreszcenciás jelölési technika használatával. A kvantitatív PCR (quantitative PCR, qPCR) esetén a jelző arra utal, hogy a PCR-kinetikai görbék elemzésével a kvalitatív mellett kvantitatív információkat is nyerünk az érintett nukleinsavról. Az adatot az áttörési ciklusszám/ciklus küszöbérték (threshold cycle, Ct) adja meg, amely azon tartományban adható meg, ahol minden egyes PCR ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd, vagyis áttöri a detektálás érzékenységi határát. [218]–[220]



19. ábra Fordított transzkripció polimeráz láncreakció (PCR) lépései [221].

Az ELISA egy széles körben alkalmazott, antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló, nem radioaktív immunoassay, amellyel a szintetizált IL-6 fehérjék mennyiségét lehet megadni. Az ELISA lehet direkt, indirekt, szendvics vagy kompetitív. Az általunk is használt szendvics ELISA (**20. ábra**) antigének specifikus kimutatására alkalmas, például citokinek, hormonok, tumor markerek detektálására. Az ELISA alapja egy lyuksorozatot tartalmazó polisztirol alapú műanyag lemez. Első lépésben a lyukak aljához és oldalához ismert mennyiségű elsődleges, elkapó/befogó (capture) antitestet kötnek van der Waals-erők, hidrofób- és elektrosztatikus kölcsönhatások segítségével. A második lépés a létrehozott antitest bevonat (coating) telítése, azaz a nem-specifikus kötőhelyek blokkolása. Ennek kivitelezésére olyan indifferens fehérjét használnak, amely várhatóan nem vesz részt az immunreakcióban, ezekkel telítik a lyukak belső felületének szabad fehérjemegkötő kapacitását. Tipikusan szarvasmarha (bovine) szérum albumint vagy zselatint használnak erre a célra. Harmadik lépésként beviszik a rendszerbe a megfelelő specificitású antigént, azaz a célfehérjét tartalmazó mintát, ami a befogó antitesthez kötődik. Következő lépésben hozzáadják a másodlagos, detektáló antitesteket, amik az antigénhez kötődnek és egy immunkomplexet hoznak létre, kialakul az antitest-antigén-antitest „szendvics”. A szendvics ELISA esetén a befogó és a detektáló antitest ugyanazon antigén eltérő epitópjait ismeri fel. Egyes esetekben a detektáló antitest maga, míg más esetekben a detektáló antitesthez kötődő további antitest lesz az enzim-konjugált antitest. Végezetül kromogén szubsztrátot adnak a rendszerhez, amit az antitesthez kötött enzim színes végtermékké alakít át, amely feloldódik és egyenletesen eloszlik az oldatban. Adott hullámhosszon

spektrofotométerrel mérik a színintenzitást, az optikai denzitást, melynek értéke arányos az enzim aktivitással, valamint a mintában található antigén mennyiségével. A kvantitatív elemzéshez, a kalibrációs görbe felvételéhez szükséges ismert koncentrációjú standardok (referencia sorozathígítás) egyidejű vizsgálata, amely segítségével az ismeretlen minták abszorbancia értékeit illeszthetjük és kiszámíthatjuk a vizsgált anyag pontos koncentrációját. [222]–[224]



20. ábra (a) Szendvics ELISA egységei: elsődleges antitest, antigén, másodlagos antitest. **(b)** ELISA assay lépése: 1. a befogadó antitestek kötődnek a lyukak aljához; 2. minta (antigén) hozzáadása és befogó antitestekhez kötődése; 3. mosás – a nem kötött anyagok eltávolítása; 4. detektáló antitestek hozzáadása és antigénhez kötődése; 5. mosás – a nem kötött anyagok eltávolítása; 6. kromogén szubsztát hozzáadása; 7. optikai sűrűség mérése; 8. eredmények kiszámítása és elemzése. [225]

A gyulladáscsökkentő hatás méréséhez A549 sejteket helyeztünk 6 lyukú sejtenyésző lemezekbe $1 \cdot 10^6$ *sejt/lyuk* sűrűséggel. A kezelt sejtek esetén a hozzáadott anyag koncentrációja minden esetben megfelelt a maximális, nem toxikus koncentrációnak, amit a citotoxicitási mérések során meghatároztunk. A sejteket a maximális, 0% citotoxicitásnak megfelelő koncentrációjú referencia meloxicamot, illetve az ablációval előállított részecskéket tartalmazó tápoldatos szuszpenzió és $5 \mu\text{g/ml}$ lipopoliszacharid (LPS; Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) keverék hozzáadásával vagy $5 \mu\text{g/ml}$ LPS-sel bemérésével (pozitív kontroll) kezeltük vagy kezeletlenül (untreated) hagytuk. Ezt követően a qPCR protokollal az IL-6 relatív expresszióját, míg az ELISA elvégzésével az IL-6 koncentrációját határoztuk meg.

Teljes RNS kivonás és cDNS szintézis:

A 24 órás kezelés után a TRI reagens (TRIzol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) segítségével teljes RNS kivonást hajtottunk végre a gyártó utasításai szerint. Ezt követően $2 \mu\text{g}$ RNS-t Random Hexamer Primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) alkalmazásával cDNS-sé írtunk át Maxima Reverse Transcriptase segítségével, a gyártó protokolljának megfelelően.

Az IL-6 és Actb (β -aktin) amplifikációja kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qPCR):

A qPCR-hez egy Bio-Rad CFX96 valós idejű rendszert használtunk az 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Észtország) és az alábbi humán specifikus primerpárok felhasználásával: IL-6: 5'-CAGCTATGAACTCCTTCTCTCCAC-3', és 5'-GCGGCTACATCTTTGGAATCT-3'; Actb: 5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGTGGCT-3', és 5'-TAGCACACAGCCTGGATAGCAACGTA-3'. A primereket a Primer Quest Tool szoftverrel terveztük és az Integrated DNA Technologies Inc. (Montreal, Quebec, Kanada) szintetizálta. Az amplifikációs specificitás ellenőrzésére olvadási

görbeelemzést végeztünk. A ciklus küszöbértéket az IL-6 és az Actb esetében határoztuk meg és a relatív génexpressziót a $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ módszerrel számoltuk ki. Egytényezős/egyszempontos (one-way) ismételt mérések varianciaanalízist (analysis of variance with repeated measurements, ANOVA RM) és tervezett összehasonlításokat alkalmaztunk a kezelt, kezeletlen és a kontroll minták közötti $\log_2(\Delta\Delta Ct)$ értékek statisztikai különbségeinek összehasonlítására $P < 0,05$ szignifikanciaszint mellett, a korábban publikáltak szerint [226].

Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat/ Enzimhez kötött immunszorbens próba (ELISA):

A 24 órás kezelést követően a sejtek felülúszóját összegyűjtöttük és az IL-6 koncentrációját standard szendvics humán IL-6 ELISA kit Legend Max™ (standard sandwich human IL-6 ELISA kits Legend Max™) (BioLegend, San Diego, USA) segítségével határoztuk meg a gyártói ajánlásoknak megfelelően. Az LPS-kezelt sejtek felülúszóját 10-szeresére hígítottuk. A kit dinamikai tartománya 7,8 és 500 pg/ml között volt. A lemezek elemzéséhez Biochrom Anthos 2010 mikrolemezolvasót (Biochrom, Cambridge, UK) használtunk. Minden mintát két példányban vizsgáltuk.

6. Eredmények és értékelés

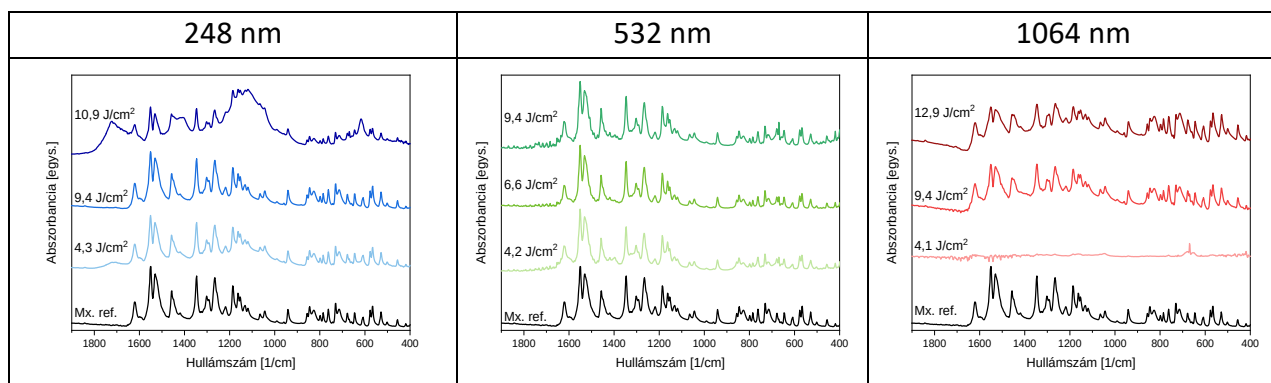
Az alábbiakban a meloxicam lézeres ablációja során keltett részecskék széleskörű vizsgálatának eredményeit és azok értékelését ismertetném. Először a nanoszekundumos abláció (6.1 *Nanoszekundumos abláció (PLAL)*) [154], [156], majd a femtoszekundumos besugárzás (6.2 *Femtoszekundumos abláció*) [155], [157] részleteit mutatom be, mindkét esetben kitérve a kémiai analízis, a morfológia és méret, a mechanizmus feltárása és a gyógyászati alkalmazhatóság alegységekre. A sokféle mérés áttekinthetősége érdekében a kapott eredményeket követően azonnal kitérek azok értelmezésére is, majd a végén az elemzések összességét diszkutálom.

6.1 Nanoszekundumos abláció (PLAL)

6.1.1 Kémia analízis

A kémiai analízis részeként FTIR, Raman spektroszkópiai és HPLC-MS méréseket végeztünk, hogy karakterizálni tudjuk a lézeres ablációval előállított részecskék összetételét.

A kémiai analízis első lépéseként felvettük a PLAL eljárással előállított minták és a referencia meloxicam FTIR spektrumát. Egyrészt adott hullámhossz esetén vizsgáltam az energiasűrűség változtatásának hatását (**21. ábra**), másrészt összevettem a különböző hullámhosszak esetén az azonos energiasűrűséggel készített mintákat (**22. ábra**).



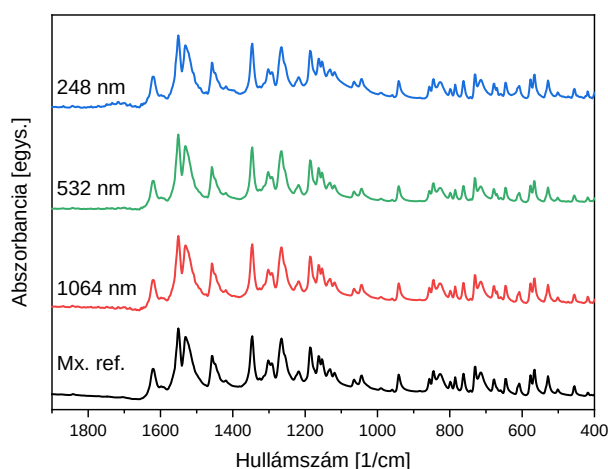
21. ábra Az energiasűrűség változtatás FTIR spektrumra gyakorolt hatásának vizsgálata különböző hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) esetén. Az összehasonlíthatóság érdekében minden spektrum az 1550 1/cm körüli csúcsra normált, kivéve a $\lambda = 1064 \text{ nm}$ esetén az $F = 4,1 \text{ J/cm}^2$ adatokhoz tartozó spektrum, amit nem lehetett normálni a mérhető karakterisztikus csúcs hiányában. [154], [156]

Mind a három esetben a minimális és maximális, illetve egy köztes vizsgált energiasűrűséggel előállított minta, valamint a referencia meloxicam spektrumát ábrázoltam. A kémiai egyezés szempontjából a karakterisztikus csúcsok adott hullámszámoknál való detektálása, illetve a csúcsok relatív intenzitásának megőrzése a reprezentatív.

A $\lambda = 248 \text{ nm}$ hullámhossz esetén az $F = 10,9 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűségű minta FTIR spektruma szignifikánsan eltért a referenciától, ami az kiindulási anyag roncsolódására utal. Alacsonyabb

energiasűrűségek esetén jó egyezést találtunk. A $\lambda = 532 \text{ nm}$ hullámhosszon előállított minták az összes vizsgált energiasűrűségen igen jó egyezést mutattak a gyári meloxicam spektrumával. A maximális energiasűrűséget ebben az esetben a lézer paraméterei limitálták. A $\lambda = 1064 \text{ nm}$ hullámhossz alkalmazása esetén a minimális, $F = 4 \text{ J/cm}^2$ körüli energiasűrűség esetén nem adódott kiértékelhető spektrum, feltehetően a túl alacsony kihozatal miatt. A magasabb energiasűrűségeknel a PLAL minták spektrumában jelen voltak a karakterisztikus csúcsok. Ezen tapasztalatok alapján az $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűséget választottuk a további, hullámhossz hatását vizsgáló mérések elvégzéséhez.

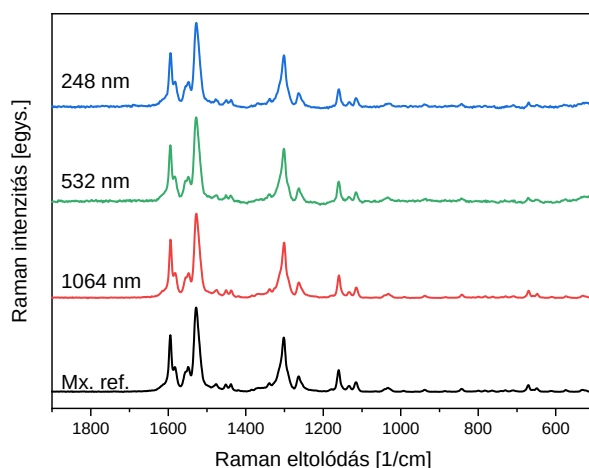
Az $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűséggel megismételtük a mintaelőállítást és az FTIR spektrumok felvételét mind a három hullámhossz esetén (**22. ábra**). Ekkor azt tapasztaltuk, hogy ezen energiasűrűségen minden hullámhossz esetén a referenciával igen jó egyezést mutató spektrumot kaptunk.



22. ábra A különböző hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) esetén, azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) előállított minták és a referencia meloxicam (Mx. ref.) FTIR spektrumainak összevetése. Az összehasonlíthatóság érdekében minden spektrum az 1550 $1/\text{cm}$ körüli csúcsra normált. [156]

A „fingerprint”, azaz „ujjlenyomat” tartomány (1900–400 $1/\text{cm}$) vizsgálata alapján megállapíthattam, hogy az $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűség alkalmazásával egyik vizsgált hullámhosszon sem történt szignifikáns kémiai degradáció a PLAL eljárás hatására.

A Raman spektroszkópiai vizsgálat is ezt erősítette meg (**23. ábra**): a meloxicam karakterisztikus csúcsai jelen voltak az adott Raman-eltolódás értékeknél és a referenciára jellemző csúcsok közötti relatív intenzitáseloszlást visszaadta mind a három PLAL eljárással előállított minta.

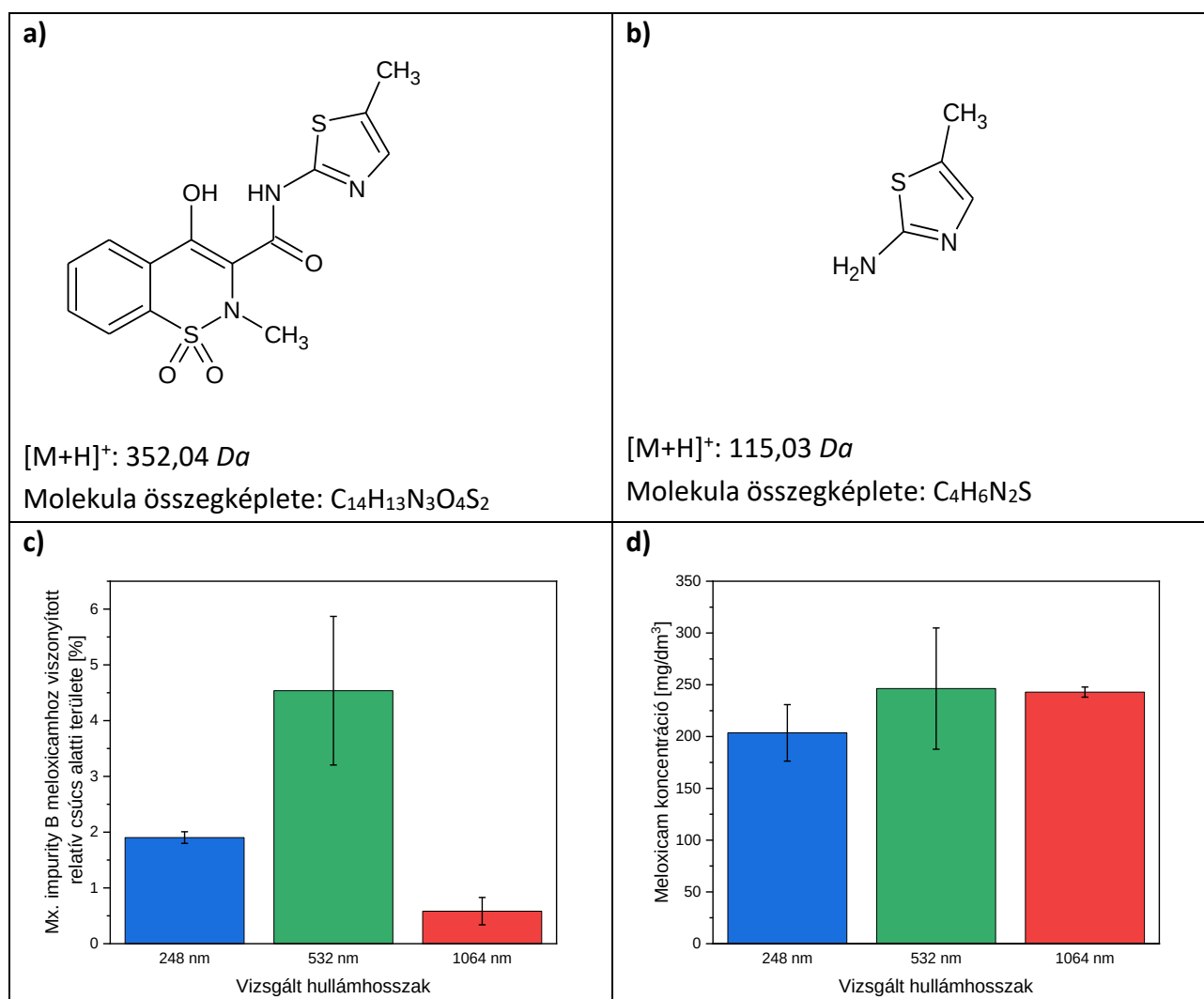


23. ábra A különböző hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) esetén, azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) előállított minták és a referencia meloxicam (Mx. ref.) Raman spektrumainak összevetése. Az összehasonlíthatóság érdekében minden spektrum az 1530 $1/\text{cm}$ körüli csúcsra normált. [156]

A kémiai összetétel mélyebbre ható vizsgálatát a HPLC-MS mérések tették lehetővé. Az ablációval előállított minták HPLC-MS analízise a bomlástermékek vizsgálatát és relatív mennyiségük meghatározását biztosította.

Kimutattuk, hogy minden vizsgált hullámhosszon az abláció során keletkezett anyag nagy része meloxicam volt. A tömegspektrumokban a meloxicam ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$, **24. ábra (a)**) mellett a $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}$ összegképletű terméket (**24. ábra (b)**) tudtuk azonosítani, amely meloxicam impurity B [227]–[229] néven ismert. A meloxicam impurity B a meloxicam molekula egy része és gyógyszeripari primer standardnak [230], [231] minősül. A mennyiségi összehasonlítás érdekében a kromatogram csúcsai alatti területeket vetettük össze. Mindhárom ablációs hullámhosszon az Mx. impurity B csúcs alatti területe kevesebb mint 5%-a volt a meloxicamhoz rendelhető értéknek (**24. ábra (c)**). Ezenkívül legalább három, feltehetően aromás termék volt jelen jóval kisebb mennyiségben, de összetételük meghatározásához túl kicsi volt a jelük.

A HPLC mérésekből a kémia összetétel mellett a kihozatalról is kinyerhettünk adatokat. A HPLC-MS analízishez a szuszpenzióban található összes részecskét feloldottuk, amely mennyiséget minden hullámhossz esetén ~ 36.000 impulzussal állítottunk elő. A meghatározott meloxicam koncentráció rendre $203,56 \pm 27,30 \text{ mg/dm}^3$, $246,32 \pm 58,57 \text{ mg/dm}^3$ és $242,92 \pm 4,90 \text{ mg/dm}^3$ volt a 248 nm, 532 nm és 1064 nm hullámhosszakon (**24. ábra (d)**).

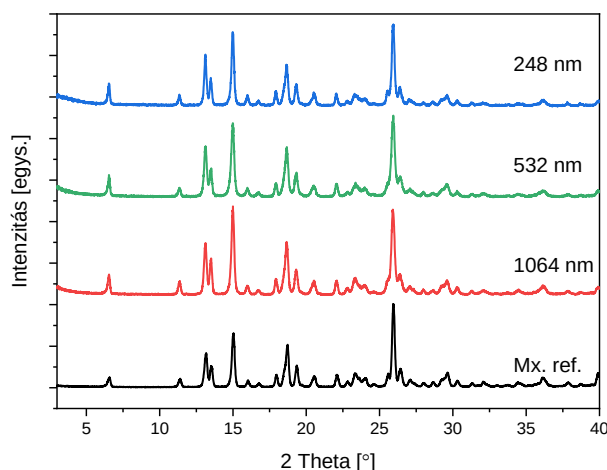


24. ábra A kémiai szerkezete és iontömege a detektált termékeknek: **(a)** meloxicam és **(b)** meloxicam impurity B. **(c)** A meloxicam impurity B meloxicamhoz viszonyított relatív csúcs alatti területe $[(\text{Terület}_{\text{Impurity B}}/\text{Terület}_{\text{Meloxicam}}) \times 100\%]$ a különböző vizsgált hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) és azonos energiasűrűség ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) alkalmazása esetén. **(d)** A PLAL eljárással különböző hullámhosszakkal (248 nm, 532 nm, 1064 nm) és azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) előállított szuszpenziók teljes meloxicam koncentrációja. [156]

6.1.2 Morfológia és méret

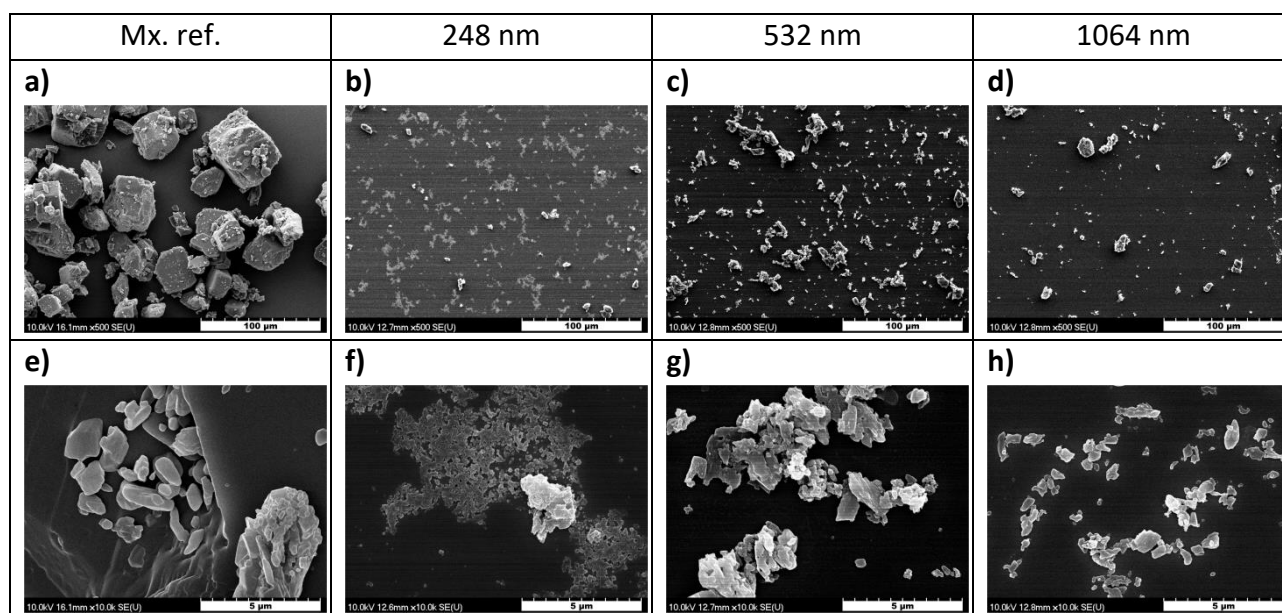
A morfológia és a méret vizsgálata céljából krisztallográfiai és elektronmikroszkópos méréseket végeztünk.

A PLAL technikával előállított részecskék XRPD spektrumai mind a három hullámhossz esetén jó egyezést mutattak a referencia meloxicam spektrumával (**25. ábra**). A karakterisztikus csúcsok a várt szög értékeknél jelentek meg, a csúcsok relatív intenzitás és félértékszélesség értékei is követték a referenciát, ami arra utal, hogy a besugárzás nem módosította a kristályszerkezetet, a forgalmazott porral közel megegyező a nanoszekundumos PLAL eljárással előállított részecskék kristályossági indexe.



25. ábra A különböző hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) esetén, azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) előállított minták és a referencia meloxicam (Mx. ref.) XRPD spektrumainak összevetése. Az összehasonlíthatóság érdekében minden spektrum a $25,94^\circ$ körüli csúcsra normált. [156]

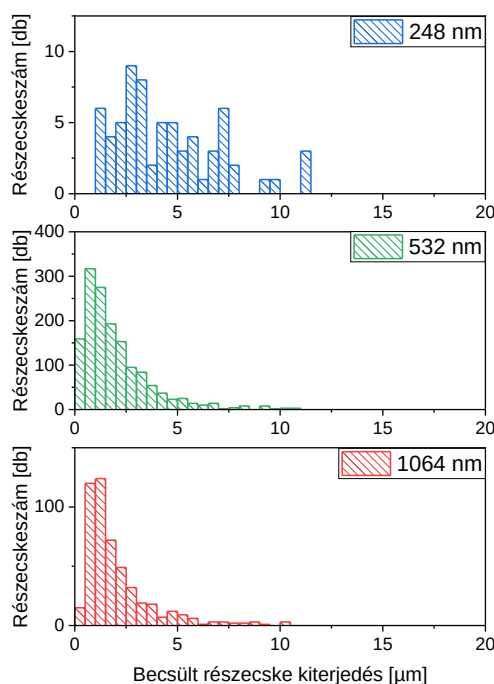
Az elektronmikroszkópos felvételek alapján a keltett részecskék morfológiáját és részecskeméretét vizsgáltuk. Néhány tipikus SEM felvétel látható a **26. ábra** egységeiben a referencia porról és a PLAL eljárással előállított mintákról. A lézeres ablációval előállított minták töredezett kristály darabokra hasonlítottak, változatos méretű és alakú, egyenes éllel határolt részecskéket tartalmaztak, ami arra utal, hogy a mechanikai aprózás lehetett a domináns részecskeméret csökkentő mechanizmus. Az UV abláció ($\lambda = 248 \text{ nm}$) esetén emellett a szilícium lap felszínén film jellegű réteg szigeteket is láttunk, amelyek beoldott anyagok újrakristályosodásából, azaz rekrisztallizációjából keletkezhettek.



26. ábra SEM képek a forgalmazott meloxicam porról (Mx. ref.) és a PLAL eljárással, különböző hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) esetén, azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) előállított részecskékről. Nagyítások: (a)-(d): 500; (e)-(h): 10k. [156]

A PLAL eljárással előállított részecskék méreteloszlását a SEM képek elemzésével határoztam meg. Ezen eljárás előnye, hogy a morfológia mellett még egy adatot ki tudunk nyerni, illetve, hogy egy stabil rendszert tudunk elemezni. A módszer hátránya, hogy nem magában a szuszpenzióban tudjuk közvetlenül vizsgálni a méretet, a cseppek kiszáradása során az esetlegesen beoldódott anyagmennyiség kikristályosodhat, illetve aggregáció, agglomeráció következhet be. Továbbá egy kétdimenziós vetületet elemzünk, ahol van, hogy átfedve helyezkednek el a vizsgálandó részecskék. Ezen felül a részecskék térbeli alakját nem tudjuk elemezni, ami különösen fontos lehetne aerodinamikai szempontból a tüdőbejuttatás során. Az oldódás szempontjából a felület nagysága lenne a kritikus adat, de erről csak korlátozott információkat tudunk szerezni. Ezen megfontolásokat figyelembe véve elsősorban összehasonlítani, rangsorolni tudjuk a különböző mintáinkat a SEM képek alapján.

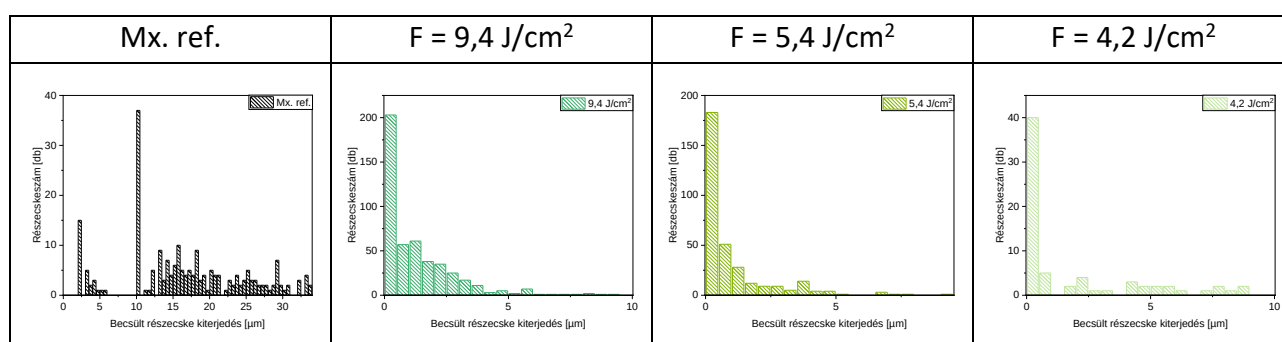
A forgalmazott meloxicam porhoz viszonyítva mind a három vizsgált hullámhossz esetén szignifikáns szemcseméret csökkenést értünk el a PLAL eljárással. Az ablációval előállított részecskék mérete a néhány száz nanométertől a néhány mikrométeres tartományig terjedt. A kvantitatív analízist az ImageJ és a QuPath-0.3.1 szoftverek felhasználásával végeztem. A kiértékelést nehezítette a részecskék már említett csoportosulása, átfedése, ami a cseppek száradása során következhetett be. Az érintkezésekből kifolyólag a részecskék körvonalát egyesével határoztam meg. Azonos, nagyságrendileg 10 mm^2 területet térképeztem fel minden minta esetén. Közelítésképpen, minden egyes részecske kétdimenziós vetülete területének meghatározása után a körvonalazott résszel azonos területű köröket rendeltem a részecskékhez és ezen körök átmérőjét tekintettem karakterisztikus részecskeméret paraméternek a méreteloszlások megállapításakor. A méreteloszlást különböző hullámhosszak (**27. ábra**), illetve különböző energiasűrűségek esetén ábrázoltam (**28. ábra**) a referencia porhoz viszonyítva.



27. ábra A különböző hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) esetén, azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) előállított minták részecskeméret eloszlása (Felhívnam a figyelmet az eltérő beosztású függőleges tengelyekre.) [156]

A **27. ábra** részegységein szemléltetett adatok alapján a $\lambda = 532 \text{ nm}$ hullámhossz esetén volt a legnagyobb a kihozatal, a becsült részecske kiterjedés értékének mediánja $1,49 \mu\text{m}$ volt, míg az átlagra és a standard deviációra a $2,12 \pm 2,14 \mu\text{m}$ érték adódott. A $\lambda = 1064 \text{ nm}$ alkalmazásakor a kihozatal kisebb volt, de a mediánra, az átlagra és a standard deviációra hasonló értékek adódtak: $1,49 \mu\text{m}$, valamint $2,35 \pm 2,68 \mu\text{m}$. Az UV tartományba eső $\lambda = 248 \text{ nm}$ esetén volt a legkisebb a kihozatal és a legszélesebb a méreteloszlás tartomány, a medián $4,08 \mu\text{m}$, az átlag és a standard deviáció pedig $5,18 \pm 4,74 \mu\text{m}$ volt.

A kvantitatív elemzés alátámasztotta, hogy a referencia porhoz képest jelentős méretcsökkenést tudtam az ablációval elérni, valamint, hogy az energiasűrűség elsősorban a kihozatalt befolyásolja, az F növelésével növelhető a keltett részecskék száma, míg méreteloszlásuk jellege nem változik számottevően (**28. ábra**).



28. ábra A forgalmazott meloxicam por (Mx. ref.) és PLAL eljárással, $\lambda = 532 \text{ nm}$ hullámhosszon, különböző energiasűrűségekkel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$, $5,4 \text{ J/cm}^2$, $4,2 \text{ J/cm}^2$) előállított részecskék méreteloszlása. (Felhívnom a figyelmet az eltérő beosztású tengelyekre.) [154]

6.1.3 A részecskekeltési mechanizmus feltárása

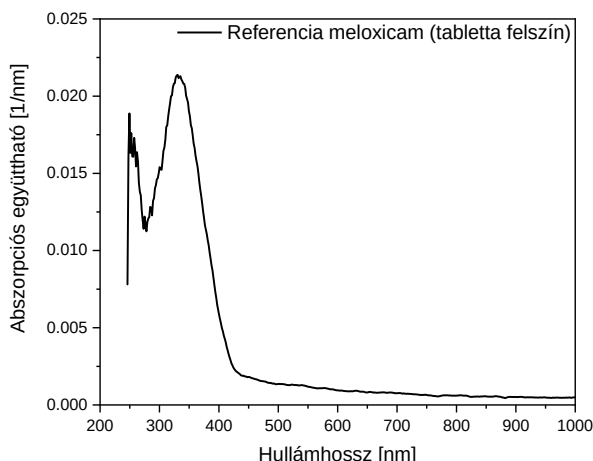
A mechanizmus feltárása céljából egy egyszerű termális modellt állítottunk fel és gyorsfényképezési méréseket végeztünk.

Kezdetben az ablációs folyamatok számítógépes modellezését tűztük ki célul, de a hiányzó anyagra jellemző paraméterek és a céltárgy szerves mivoltából adódó nehézségek miatt egy egyszerűbb modell felállítását valósítottuk meg.

A termális modellünkkel az egyetlen lézer impulzus által a céltárgy tablettá legfelső rétegében előidézett hőmérsékletváltozást kívántuk megbecsülni. A besugárzó impulzust a hullámhosszal (λ) és az alkalmazott energiasűrűséggel (F) jellemeztük, míg a besugárzott térfogatot (V) a behatolási mélység ($\delta(\lambda)$) és a foltméret (A) szorzataként közelítettük. A nyalábprofil jellegétől eltekintettünk, illetve feltételeztük, hogy az alacsonyabb ismétlési frekvencia és a minta mozgatása következtében, mire a céltárgy ugyanazon pontját érné újabb besugárzás, addigra ott visszaáll az egyensúlyi állapot. Korábbi mérések során megállapítottuk, hogy a céltárgy tabletták reflexiója különböző szögek és polarizációk esetén is minden esetben 10% alattinak adódott, így a reflexiót elhanyagoltuk modellünkben [232]. További egyszerűsítésként nem számoltunk a folyadék közeggel. Emellett elhanyagoltuk a céltárgy hővezetését, a porózus szerkezete miatt.

Az MDSC mérés alapján a referencia meloxicam átlagos fajhője a 25–250 °C (bomlási hőmérséklet alatti) hőmérséklet tartományon $c = 1800 \text{ J/(kg}\cdot\text{K)}$, míg a bomlási hőmérséklete 258,7 °C-nak adódott, ami jó egyezést mutat az irodalmi értékkel [25]. A meloxicam sűrűsége az elérhető adatbázis alapján $\rho = 1,613 \text{ g/cm}^3$ (20 °C) [233], hőmérsékletfüggésére nem találtunk adatot.

A lézeres abláció esetén a céltárgy paraméterei közül az abszorpciós együttható meghatározó jellemző. A referencia meloxicamból préselt tabletta felszínén végzett ellipszometriai méréssel meghatároztuk a tiszta anyag abszorpciós együtthatóját ($\alpha(\lambda)$) a hullámhossz (λ) függvényében (**29. ábra**).



29. ábra A meloxicam abszorpciós együtthatója a hullámhossz függvényében. [154]

A meloxicam abszorpciós együtthatója az UV tartományban megnő ($\sim 0,01\text{--}0,02 \text{ 1/nm}$), míg a látható és közeli infravörös tartományban minimálisan változik és alacsonyabb értéket ($\sim 0,002\text{--}0,0005 \text{ 1/nm}$) vesz fel. A görbe alapján megadható a vizsgált lézer hullámhosszakon az $\alpha(\lambda)$ értéke, ebből pedig a $\delta(\lambda) = 1/\alpha(\lambda)$ behatolási mélység. Az ellipszometriai mérések esetén $\lambda = 1000 \text{ nm}$ volt a maximális hullámhossz, ahol még rendelkezünk mérési adattal, de a tartományon belüli kis változásnak köszönhetően ez valószínűleg jó közelítést ad az általam alkalmazott $\lambda = 1064 \text{ nm}$ -es abláló hullámhosszra is.

A rendelkezésünkre álló adatok alapján meghatároztuk a tabletta felszínétől mért x mélységben a λ abláló hullámhossz esetén kiváltott ΔT hőmérsékletváltozást a módosított Lambert-Beer törvény felhasználásával:

$$\Delta T(x) = \frac{\alpha(\lambda) \cdot F}{\rho \cdot c} \cdot e^{-\alpha(\lambda) \cdot x}, \quad (6)$$

ahol F az aktuális energiasűrűség és $\alpha(\lambda)$ a meloxicam abszorpciós együtthatója, ρ a sűrűsége és c a fajhője.

Az $x = \delta(\lambda)$ mélységben meghatározott ΔT értékeket az **5. táblázat** szemlélteti az $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűség esetén.

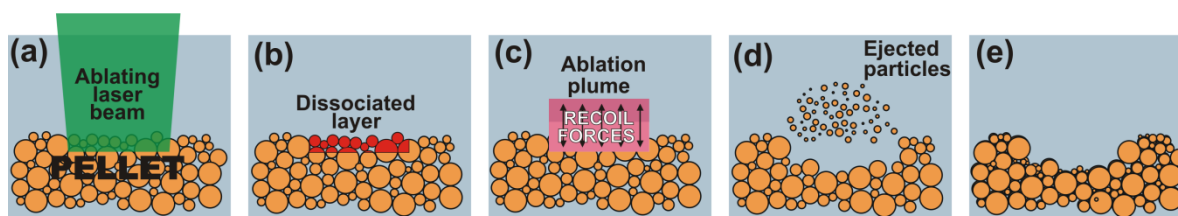
λ [nm]	F [J/cm ²]	$x = \delta(\lambda)$ [nm]	$\Delta T(x)$ [K]
248	9,4	62	191763
532		781	15245
1000		2083	5716

5. táblázat Termális modell adatai és eredményei nanoszekundumos abláció esetén.

A kapott hőmérséklet értékek a megfelelő behatolási mélységben mind a három hullámhossz esetén több nagyságrenddel meghaladják a meloxicam bomlási hőmérsékletét, de az érintett térfogat igen kicsi. Az UV hullámhossz esetén kaptuk a legmagasabb, 10^5 K nagyságrendbe eső hőmérsékletet és ezen esetben volt a legkisebb a behatolási mélység. A látható és az IR tartományban 10^3 – 10^4 K nagyságrendű hőmérsékletet kaptunk és a behatolási mélység a mikrométeres nagyságrendbe esett. Még a legnagyobb számolt behatolási mélység nagysága is jelentősen kisebb a meloxicam por szemcseméreténél, így a tabletta felső rétegén feltehetően nem hatol át a hőhatás.

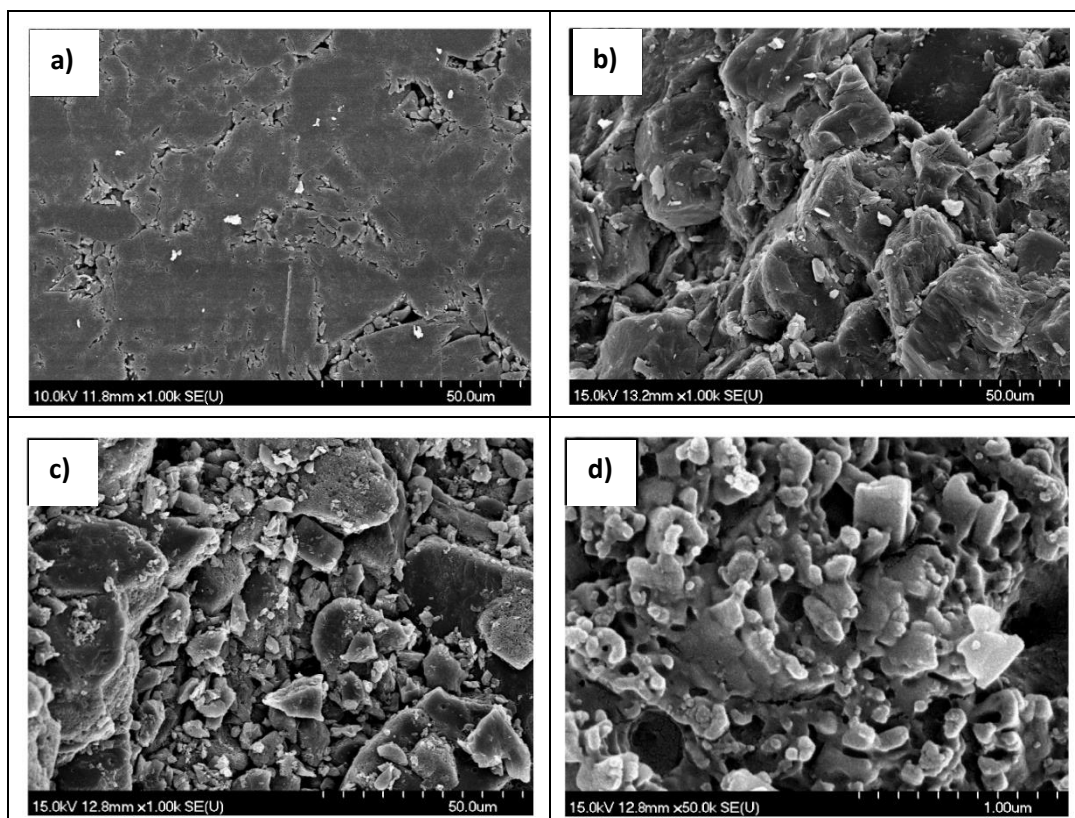
Ezen eredmények alapján az alábbi részecskekeltési folyamatot feltételezhetjük (**30. ábra**):

- a-b) a lézer impulzus energiáját elnyeli a céltárgy legfelső rétege, ahol a kialakult magas hőmérséklet miatt az anyag elbomlik;
- c) a gyors bomlás, párolgás eredményeképpen robbanás jellegű gáz felszabadulás és plazma tágulás játszódik le, ami mechanikai lökéshullámot idéz elő;
- d-e) a lökéshullámban uralkodó magas nyomás hatására a visszamaradt felületről (ablációs nyomból) olvadékcseppek és szilárd részecskék szakadnak ki, töredeznak fel és kirepülnek a folyadék közegbe, kolloid oldatot képezve.



30. ábra A PLAL eljárással történő részecskekeltés feltételezett folyamata [154].

Ezt a folyamatleírást alátámasztják az ablált tabletta felszínéről készült SEM felvételeken látottak (**31. ábra**). Az ablációs gödör alján visszahullott szubmikrométeres – mikrométeres nagyságrendű törmelék látható, alatta pedig durva, határozott éllel rendelkező, töredezett felszín. Magát az ablált felszínt vizsgálva, nagyobb nagyítások esetén lekerekítettebb határvonalakat is láttunk, ami valamilyen szintű termális hatásra is utalhat.

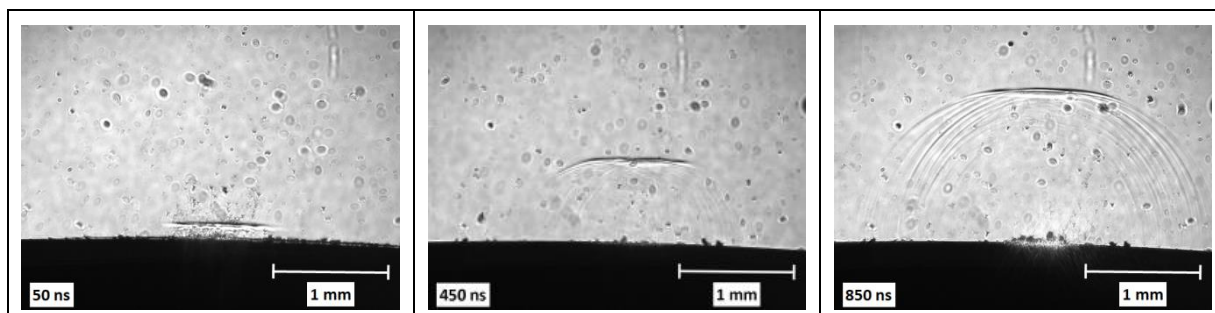


31. ábra Meloxicam tabletta **(a)** érintetlen felszíne; **(b)** törés menti keresztmetszete és **(c)-(d)** ablált ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $F = 5,4 \text{ J/cm}^2$) felszíne. Nagyítások: (a)-(c): 1k; (d): 50k. [154]

A lejátszódó folyamat mélyebb megértése és időbeli lefutásának leírása céljából gyorsfényképezéses kísérleteket hajtottunk végre.

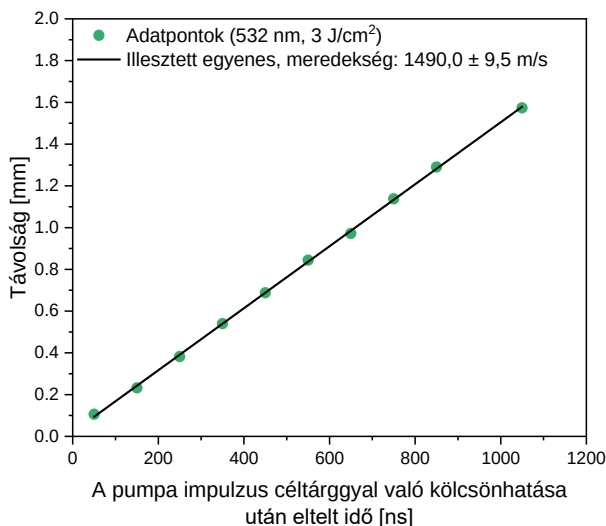
Az abláló impulzus beérkezése utáni 50 ns és 2 ms közötti időtartományt $\lambda = 532 \text{ nm}$ hullámhosszúságú pumpa impulzusokkal és direkt próba impulzusos kivilágítással hajtottuk végre. Az abláció során keletkező plazma fényének minimalizálása érdekében törekedtünk azon minimális energiasűrűség megtalálására, ahol már megfigyelhető volt a részecskekeltés, azaz az ablációs küszöböt kerestük.

Szemléltetésképpen, az $F = 3 \text{ J/cm}^2$ esetén csak a táguló plazma által keltett hullámfront volt megfigyelhető, nem tapasztaltunk anyagkilökődést (**32. ábra**).



32. ábra Gyorsfényképezés felvételek a meloxicam desztillált víz közegbeli impulzuslézeres ablációjáról ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $F = 3 \text{ J/cm}^2$) különböző időbeli késleltetések esetén. [156]

A képek ImageJ programmal történő kiértékelését követően ábrázoltuk a hullámfront tabletta felszínétől mért távolságát az idő függvényében és egy egyenest illesztettünk az adatpontokra (**33. ábra**). A meredekségre $v = 1490,0 \pm 9,5 \text{ m/s}$ értéket kaptunk, ami csak kevéssel haladja meg a vízben terjedő hang sebességét: $v_w = 1480 \text{ m/s}$ ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$), ez arra utal, hogy a megfigyelt hullámok inkább akusztikus-, mintsem lökeshullámok voltak. Ez azt jelenti, hogy még ha voltak is kezdeti lökeshullámok, amelyeket a táguló plazma indukált, ezek rövid időn belül lelassultak.



33. ábra A hullámfront tabletta felszínétől mért távolsága az idő függvényében. Az adatpontok a gyorsfényképezés (pumpa impulzus: $\lambda = 532 \text{ nm}$, $F = 3 \text{ J/cm}^2$) felvételek elemzéséből adódtak.

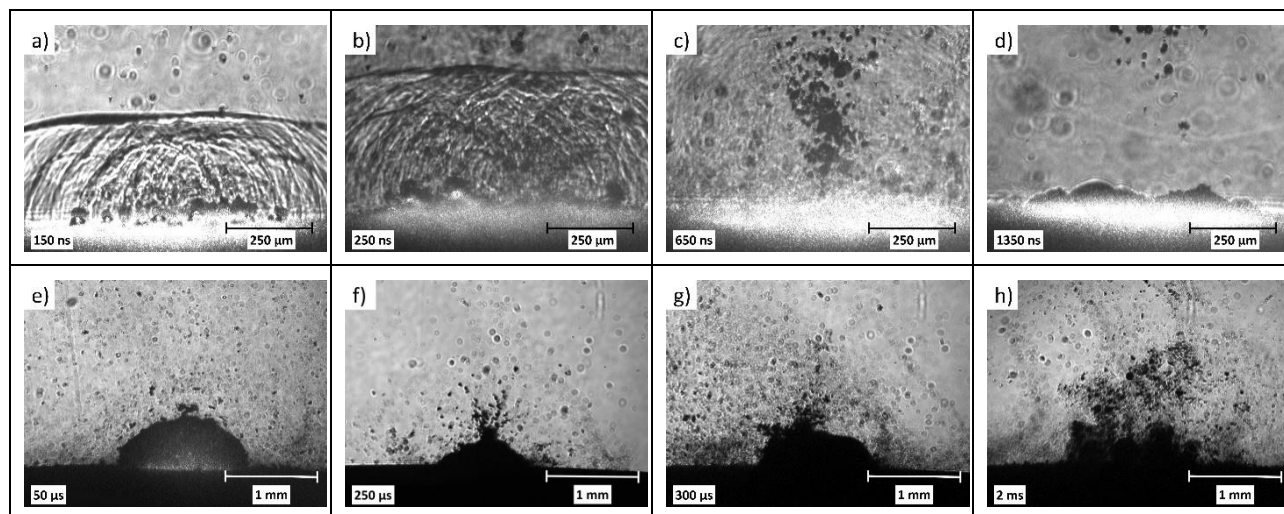
[156]

Az energiasűrűség $F = 6 \text{ J/cm}^2$ értékre emelésével próbáltuk megnövelni a lökeshullám láthatóságát. Ebben az esetben sem tudunk lökeshullámot detektálni, de intenzív anyagkilökődést tapasztaltunk. Az ablációt követő nanoszekundumostól milliszekundumosig terjedő időtartomány feltérképezése alapján a vízben történő impulzuslézeres abláció folyamatában három fő fázist különböztethetünk meg, amelyek jól láthatók a gyorsfényképezéses felvételeken (**34. ábra**).

Az első néhány száz nanoszekundumban az abláció indukálta hullámfront terjed a közegben (**34. ábra (a)-(c)**). A fő front a céltárgy felületén lévő különböző pontszerű forrásokból származó számos kis hullám összege. Ezen hullámok interferenciája és az oldatban lévő részecskéken való szóródása szintén látható. Továbbá a közeg reflexiós indexének a hőmérséklet növekedése miatti változása is hozzájárulhat a fő hullámfront mögött látható sávokhoz, mintázatokhoz.

A második szakasz néhány mikroszekundumtól néhány száz mikroszekundumig tart és a kavitációs buborék kialakulását és méretváltozását foglalja magában (**34. ábra (d)-(g)**). A kavitációs buboréknak ezt a pulzáló méretváltozását korábban már leírták a buborékdinamika keretében fém (réz) nanorészecskék folyadékbeli lézeres ablációval történő keltése kapcsán [234]. A keletkező részecskék főként a kavitációs buborék belsejében vannak, de ahogy a buborék pulzál, egyre több részecske szabadul ki. Kis gázbuborékok jelennek meg és emelkednek a folyadék felszínére önmagukban vagy néha részecskékkel együtt. Egy korábbi publikációval [235] ellentétben a mi elrendezésünkben nem voltak jellemzők a vízben tartósan jelenlévő gázbuborékok, talán a kisebb alkalmazott ablációs frekvencia miatt.

Végül a harmadik szakaszban, néhány milliszekundum után a kavitációs buborék kisebb buborékokra szakad szét, amelyek a víz felszínére emelkednek és a kavitációs buborékban rekedt összes részecske kilöködik, eloszlik a vízben (**34. ábra (h)**). Hasonló mechanizmust mutattak be, írtak le mások is különböző céltárgyak és folyadékok esetében [236]–[238].



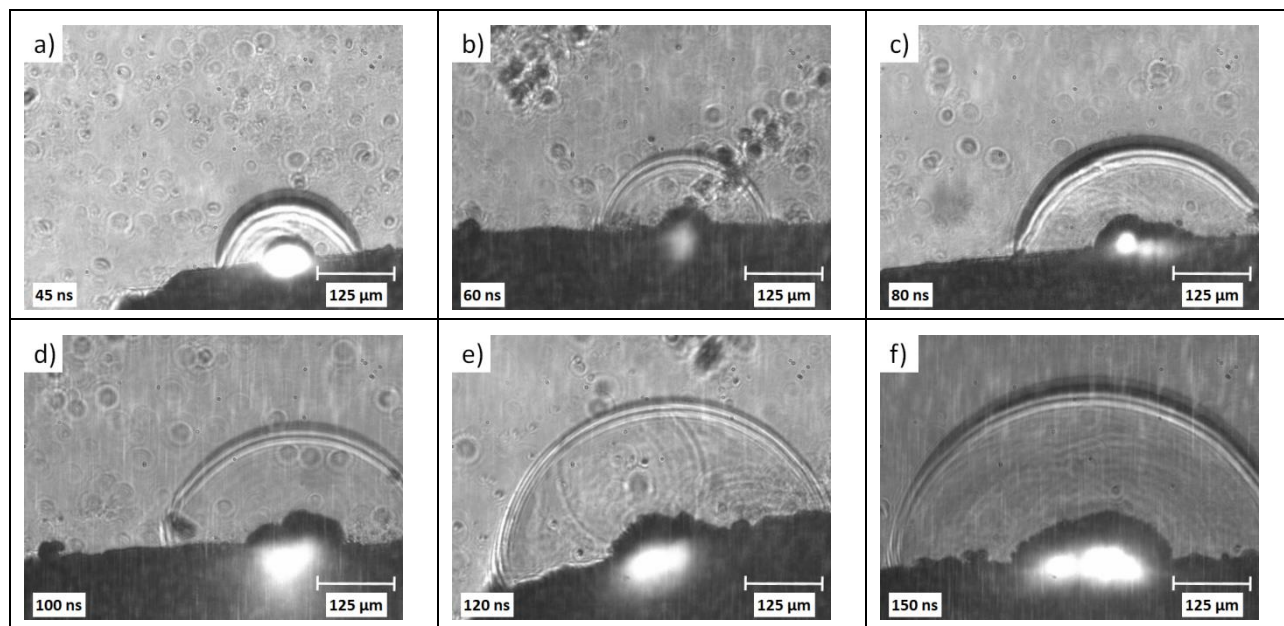
34. ábra Gyorsfényképezés felvételek a meloxicam desztillált víz közegbeli impulzuslézeres ablációjáról ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $F = 6 \text{ J/cm}^2$). **(a)-(c)** A hullámfront kialakulása és terjedése; **(d)-(g)** a kavitációs buborék pulzáló dinamikája, amit fokozatos részecske kibocsátás kísér; **(h)** a kavitációs buborék felaprózódása és a részecskék vízben való eloszlása/diszpergálása. [156]

Optimalizáltuk az elrendezést és a beállításokat, hogy észlelni tudjuk a kezdeti, ablált felszín közeli lökéshullámokat. Az optikai szálból a próba impulzust a Michelson-interferométerbe vezettük, amely két próba impulzust biztosított fix időbeli különbséggel. Ez az elrendezés lehetővé tette a terjedési sebesség pontosabb meghatározását. A pumpa és a próba lézer impulzusok fényének, expozíciós hatásának hatékonyabb elkülönítése és a szórt fény minimalizálása érdekében a $\lambda = 1064 \text{ nm}$ -es lézersugarat alkalmaztuk pumpaként. Az energiasűrűséget addig növeltük, amíg a lökéshullámok meg nem jelentek. Az abláció erősen roncsolta a felületet, ezért az egymást követő ablációs impulzusok között mozgatnunk kellett a céltárgyat, hogy friss felületet biztosítsunk, mivel a maratási gödörbe nem lát be az elrendezésünk. Ezenkívül az időzítés jitterének szórása, a céltárgy porozitása és a lézerimpulzus energiájának enyhe eltérése mind hozzájárult a mennyiségi elemzés bizonyos fokú bizonytalanságához.

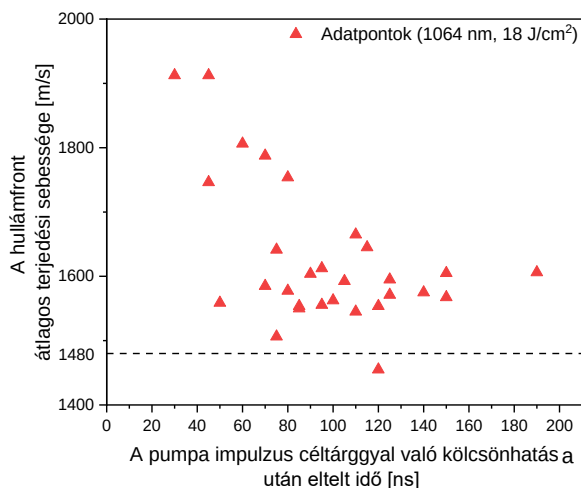
A **35. ábra** az ezen, optimalizált beállítás használatával készült képeket mutatja be, amelyek a lökéshullám kialakulásának kezdeti fázisait és a kavitációs buborék megjelenését mutatják be. Az idő múlásával, a speciális képalkotási séma miatt, úgy tűnik, mintha két hullámfront terjedne, csökkenő térbeli elkülönüléssel. Emellett a kavitációs buborék is megjelenik és növekedni kezd.

Az ImageJ szoftver alkalmazásával minden képen megmértük az adott hullámfront két expozíciós időpontbeli pozíciójának térbeli különülését/távolságát (s). A Michelson-interferométer $t = 8 \text{ ns}$ időbeli különbséget vezetett be a két próba impulzus között. A pumpa impulzus beesése utáni adott pillanatban az aktuális távolságot (s) a fix időbeli különbséggel (t) elosztva, ki tudtuk számítani a

hullámfront átlagos terjedési sebességét a két próba impulzussal megörökített két pillanat között, azaz egy adott késleltetés esetén (**36. ábra**).



35. ábra Gyorsfényképezési felvételek a meloxicam desztillált víz közegbeli impulzslézeres ablációjáról ($\lambda = 1064 \text{ nm}$, $F = 18 \text{ J/cm}^2$). **(a)-(f)** A hullámfront kialakulása és terjedése két időpontban, $t = 8 \text{ ns}$ időbeli különbséggel, duplán exponálva; **(c)-(f)** a kavitációs buborék keletkezése és méretváltozása. [156]



36. ábra A meloxicam desztillált víz közegbeli impulzslézeres ablációja ($\lambda = 1064 \text{ nm}$, $F = 18 \text{ J/cm}^2$) során keletkező hullámfront terjedési sebességének időfüggése. [156]

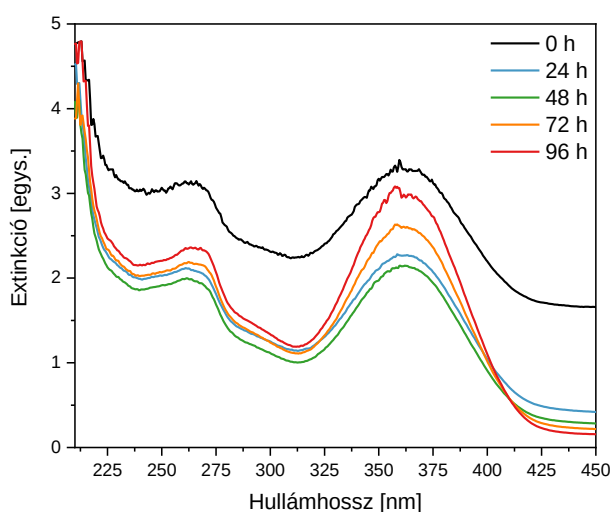
Az adatpontok azt mutatják, hogy az átlagos terjedési sebesség meghaladja a vízbeli hangsebességet (v_w), majd az idő múlásával csökkenő tendenciát követ, fokozatosan közelítve a $v_w = 1480 \text{ m/s}$ értékhez. Mivel a lökeshullám elhagyta a látómezőt, 200 ns késleltetés után nem tudtunk sebesség adatokat meghatározni, így a telítődés 1550 m/s körüli értéknek tűnik. A **33. ábra** grafikonján bemutatott hullámfront terjedési mérések alapján azonban feltételezhetjük, hogy a telítődési érték végül $v_w = 1480 \text{ m/s}$ körül lesz.

Összefoglalva, a kezdeti lökéshullám néhány tíz vagy száz nanoszekundumon belül akusztikus hullámmá alakul, az alkalmazott energiasűrűségtől függően.

6.1.4 Gyógyászati alkalmazhatóság

A gyógyászati alkalmazhatóság elemzése keretében a kolloid oldat stabilitását, a keltett részecskék oldékonyságát, citotoxicitását és gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltuk.

A felhasználás szempontjából megfontolandó tényező a kolloid oldat időbeli stabilitása. A desztillált vízbeli PLAL eljárással ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$, impulzusszám: ~ 43.200 impulzus) keltett részecskék ülepedését extinkciós spektroszkópiával tanulmányoztuk. A minta a kolloid oldat, a referencia desztillált víz volt. Az ablációt követően a minta azonnal bekerült a spektrométerbe, majd adott időközönként felvettük az extinkciós spektrumot (**37. ábra**).



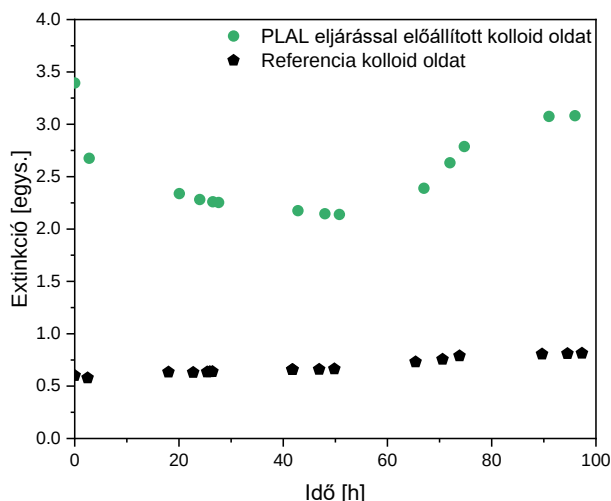
37. ábra A meloxicam desztillált víz közegbeli impulzulézeres ablációja ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) során előállított kolloid oldat extinkciójának változása az abláció utáni különböző időpontokban.

[154]

A $\lambda = 360 \text{ nm}$ körüli karakterisztikus csúcs intenzitásának változását is ábrázoltuk az ablációt követően eltelt idő függvényében (**38. ábra - zöld korong**). A 150 órás vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy ezen csúcs intenzitása először csökkent, elért egy minimumot, majd körülbelül 50 óra elteltével növekedni kezdett, végül 90 óra körül beállt egy állandó értékre. Feltételezésünk szerint a vizsgált időintervallumban két párhuzamos folyamat, ülepedés és oldódás zajlott, melyek az extinkció értékét ellentétes módon befolyásolták. Kezdetben a nagyobb meloxicam részecskék relatíve gyors ülepedése miatt csökkent az extinkció értéke, a fényszórást döntően okozó részecskék lesüllyedése miatt. Később a lassabb és igen kismértékű kémiai oldódás következtében lassú növekedést tapasztaltunk az extinkcióban.

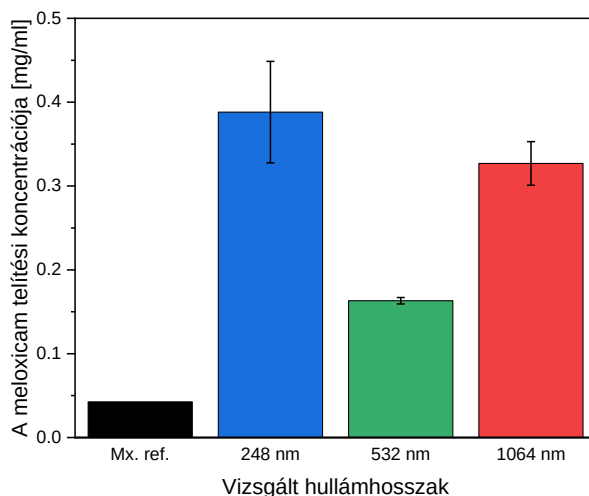
Analitikai tömegméréssel megállapítottuk, hogy a besugárzás ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$, impulzusszám: ~ 43.200 impulzus) során $3,5 \text{ mg}$ anyag távozott el a céltárgy meloxicam tablettából. Tehát az extinkciós vizsgálatnak alávetett, PLAL eljárással előállított kolloid oldat esetében $3,5 \text{ mg}$ anyag volt jelen 20 ml desztillált vízben részecske vagy oldott anyag formájában. Ez alapján

referencia oldatot készítettünk: 3,5 mg referencia, gyári meloxicam port kevertünk 20 ml desztillált vízbe, majd homogenizálás céljából 2 percig ultrahangos kádba helyeztük és ráztuk. Az így előállított oldatot a PLAL eljárással előállított kolloid oldattal azonos extinkciós mérésorozatnak vetettük alá (**38. ábra – fekete ötszög**). A referencia oldat extinkciója igen alacsony volt és minimális növekedés volt csak megfigyelhető az idő múlásával. Az alacsony alap extinkció oka lehetett, hogy a meloxicam por igen kicsiny része eshetett a spektrométer által vizsgált folyadékoszlop középső részébe, mivel a meloxicam por legnagyobb része azonnal a kuvetta aljára süllyedt vagy a desztillált víz felszínén lebegett, nem keveredett. Nagyjából 60 óra elteltével az extinkció értéke növekedésnek indult, majd beállt egy konstans értékre, amely feltevésünk szerint megfeleltethető a meloxicam beoldódásának, illetve az oldat telítődésének.



38. ábra A meloxicam desztillált víz közegbeli impulzuslézeres ablációja ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) során előállított és a referencia kolloid oldat $\lambda = 360 \text{ nm}$ körüli karakterisztikus extinkciós csúcsának intenzitásváltozása az abláció után eltelt idő függvényében. [154]

Az oldhatósági vizsgálatok azt mutatták, hogy minden alkalmazott lézer hullámhossz esetén a PLAL módszerrel előállított részecskékből nagyobb mennyiségű meloxicam oldható puffer oldatban, mint a referencia meloxicam porból (**39. ábra**).

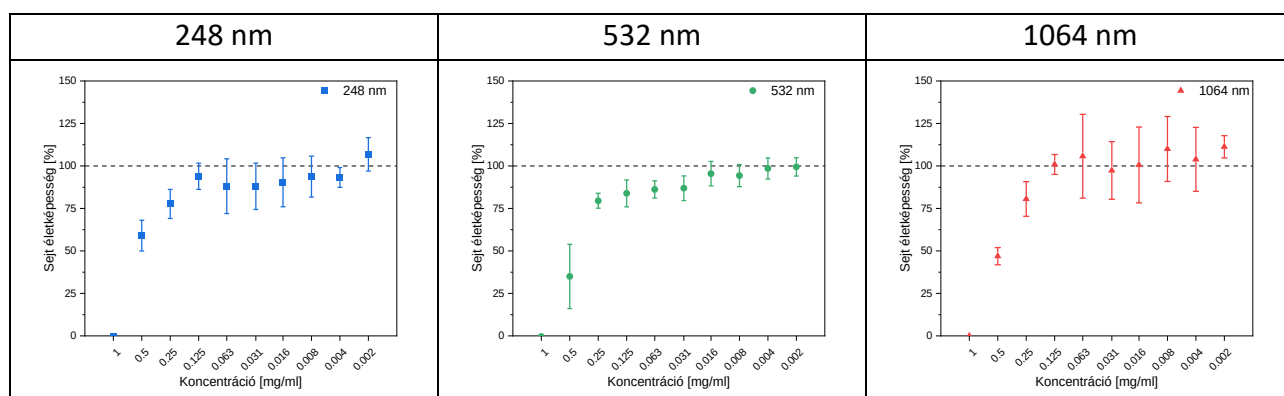


39. ábra A referencia meloxicam por (Mx. ref.) és a különböző hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) esetén, azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) előállított minták oldékonysági adatai.

[156]

A referencia meloxicam telítési koncentrációjához (0,043 mg/ml) képest kilenc-, négy- és nyolcszoros telítési koncentráció növekedést mértünk, amikor a 248 nm, 532 nm és 1064 nm hullámhosszon PLAL segítségével előállított meloxicam részecskéket oldottuk fel. Mennyiségileg ez rendre $0,388 \pm 0,0605 \text{ mg/ml}$ ($\lambda = 248 \text{ nm}$ esetén), $0,163 \pm 0,004 \text{ mg/ml}$ ($\lambda = 532 \text{ nm}$ esetén) és $0,327 \pm 0,026 \text{ mg/ml}$ ($\lambda = 1064 \text{ nm}$ esetén) telítési koncentrációt eredményezett.

A toxicitási határértéket úgy határoztuk meg, mint a legmagasabb koncentrációt, amely már 100%-os sejtelétképességet, azaz 0%-os citotoxicitást biztosít. A meloxicam terápiás dózisa a forgalomban lévő gyógyszerekben 7,5 vagy 15,0 mg mennyiségű *per os* és ennek az adagnak az 1/10 része ajánlott tüdőbe juttatásra [239], [240], ezért a citotoxicitási vizsgálatokhoz 1 mg/ml koncentrációt választottunk maximális vizsgálati koncentrációnak. A referencia meloxicam 0,125 mg/ml alatti koncentrációban nem mutatott toxicitást [232]. A citotoxicitási mérések azt mutatták, hogy a PLAL eljárással $\lambda = 248 \text{ nm}$ és 1064 nm hullámhosszakon előállított minták 0,125 mg/ml koncentráció alatt nem mutattak mérhető citotoxikus hatást, míg $\lambda = 532 \text{ nm}$ esetén a nem toxikus határérték 0,016 mg/ml körül volt (40. ábra). A PLAL által $\lambda = 248 \text{ nm}$ és 1064 nm -en előállított minták a referencia meloxicammal azonos citotoxicitási tartományban voltak, míg a $\lambda = 532 \text{ nm}$ hullámhosszon generált vegyület volt a leginkább toxikus. Ezeket a meghatározott citotoxicitási határérték koncentrációkat használtuk a gyulladáscsökkentő mérésekben.

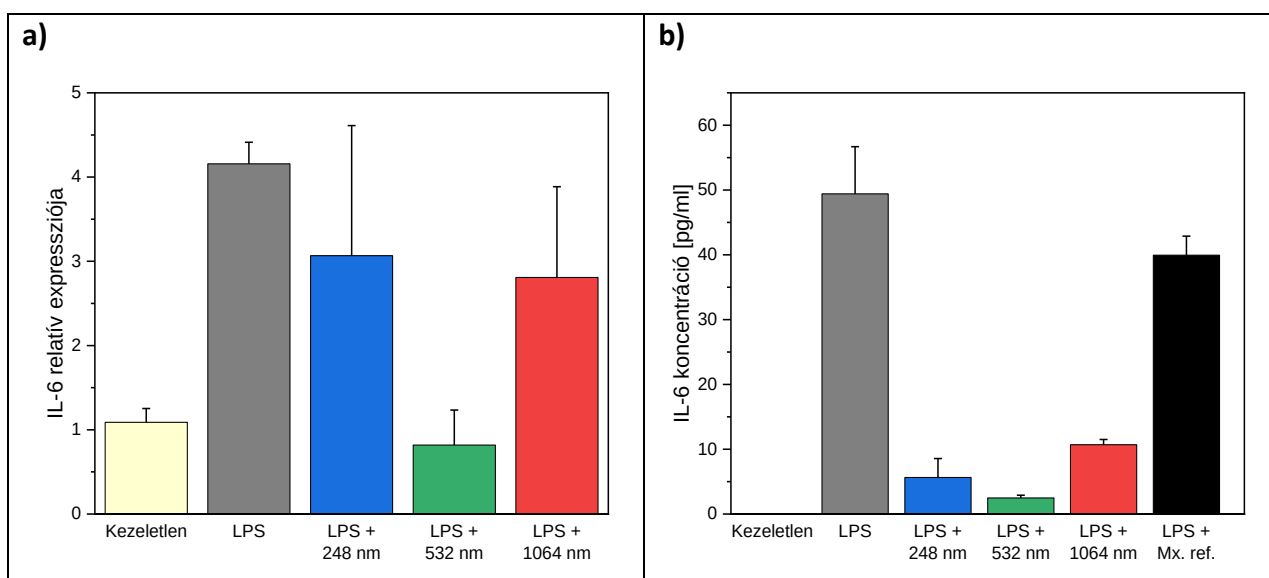


40. ábra A különböző hullámhosszak (248 nm, 532 nm, 1064 nm) esetén, azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4 \text{ J/cm}^2$) előállított mintákkal kezelt A549 sejtek életképesség adatai az alkalmazott koncentráció függvényében. [156]

A gyulladáscsökkentő hatás teszteléséhez LPS-t, egy erős proinflammatorikus ágenszt használtunk az A549 sejtek IL-6 termelésének növelésére [241]. A PLAL eljárással előállított gyógyszermintákkal való kezelést követően az IL-6 tartalom mérésével jellemeztük és hasonlíthattuk össze a gyulladáscsökkentő hatásukat. A hozzáadott LPS jelentősen megemelte az IL-6 relatív expresszióját a kezeletlen csoporthoz képest. Az IL-6 relatív expressziója megnégyszereződött az LPS kezelt sejtek esetében ($4,2 \pm 0,2$) a kezeletlen sejtekhez ($1,1 \pm 0,2$) képest. Összehasonlítva az IL-6 relatív expresszióját az LPS + ablációval előállított mintával és a csak LPS-sel kezelt sejtek esetében, azt találtuk, hogy az UV ($\lambda = 248 \text{ nm}$) és IR ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) lézeres ablációval előállított minták hozzáadásával kisebb mértékű csökkenést ($\sim 25\%$), a VIS ($\lambda = 532 \text{ nm}$) lézeres ablációval előállított minták hozzáadásával pedig jelentős csökkenést ($\sim 75\%$) tudtunk elérni (41. ábra (a)). Kvantitatívan

ez az UV esetében $3,1 \pm 1,5$, a VIS esetében $0,8 \pm 0,4$, az IR esetében pedig $2,8 \pm 1,1$ relatív IL-6 expressziót eredményezett.

Annak megállapítására, hogy ezek a relatív expressziós szintek korrelálnak-e a fehérjeszintekkel, ELISA méréseket végeztünk a felülszóban lévő IL-6 koncentráció meghatározására (**41. ábra (b)**). A kezeletlen csoportban nem volt mérhető IL-6 szint. A kezeletlen sejtekhez képest ($0,0 \pm 0,0$ pg/ml) az IL-6 koncentrációja az LPS kezelés hatására jelentősen megnőtt ($49,4 \pm 7,3$ pg/ml-re). Amikor az LPS kezelt sejtekhez referencia meloxicamot adtunk, az IL-6 koncentrációja 20%-kal csökkent ($39,9 \pm 2,9$ pg/ml-re) a csak LPS-sel kezelt sejtekhez képest. Az LPS kezelést követően a lézeres ablációval előállított minták hozzáadása jelentősen csökkentette az IL-6 koncentrációját: rendre 89%-kal ($5,6 \pm 2,9$ pg/ml-re), 95%-kal ($2,5 \pm 0,4$ pg/ml-re) és 78%-kal ($10,7 \pm 0,8$ pg/ml-re) az UV, VIS és IR hullámhosszak esetén. Az IL-6 citokin koncentrációjának csökkenése alapján valamennyi PLAL módszerrel előállított minta jelentős gyulladáscsökkentő hatást mutatott, sokkal erősebbet, mint a referencia meloxicam. A mérések alapján a $\lambda = 532$ nm-en előállított minta rendelkezett a legjobb gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal, a citotoxicitási mérések alapján alkalmazott legkisebb dózissal történő kezelés ellenére.



41. ábra Az IL-6 **(a)** relatív expressziója és **(b)** koncentrációja a kezeletlen (Kezeletlen), LPS-sel kezelt (LPS), illetve LPS-sel és PLAL eljárással különböző hullámhosszakkal (248 nm, 532 nm, 1064 nm), azonos energiasűrűséggel ($F = 9,4$ J/cm²) előállított szuszpenziókkal/ koloid oldatokkal kezelt (LPS + 248 nm, LPS + 532 nm és LPS + 1064 nm) A549 sejtek esetén. Az IL-6 koncentráció esetén **(b)** az LPS-sel és referencia meloxicam szuszpenzióval (LPS + Mx. ref.) kezelt A549 sejtekre vonatkozó adat is fel lett tüntetve. [156]

6.1.5 Összefoglaló a nanoszekundumos ablációról

A meloxicam desztillált vízben történő nanoszekundumos impulzuslézeres ablációja mindhárom vizsgált hullámhosszon hatékony és vegyszermentes részecskeméret csökkentési, oldékonyság javítási technikának bizonyult.

Az FTIR, Raman spektroszkópiai és HPLC-MS vizsgálatok azt mutatták, hogy a kémiai bomlás a részecskékben elhanyagolható volt az abláció során, a meloxicam impurity B viszonylag kis mennyiségben volt jelen a meloxicam mellett.

A részecskék megőrizték kristályosságukat és morfológiájuk töredezett kristály darabokra hasonlított. A meloxicam részecskék kezdeti $\sim 30 \mu\text{m}$ -es méretét néhány száz nanométer és néhány mikrométer közötti mérettartományúra lehetett csökkenteni, ami optimális a tüdőbe juttatáshoz [69].

A termális számítások azt igazolták, hogy minden egyes beeső lézerimpulzus hatására a céltárgy legfelső rétege ($\sim 100 \text{ nm}$ – pár μm) a paraméterektől függően közelítőleg a 10^3 – 10^5 K hőmérsékletet is eléri, aminek hatására a releváns rétegben a meloxicam elbomlik és a bomlástermék eltávozik. Feltehetően a gyorsan bekövetkező hőmérséklet-, nyomásváltozás, tágulás lökéshullámot eredményez, ami a visszamaradt felszínből részecskéket szakít, tör ki. A gyorsfényképes elemzés megerősítette, hogy a mechanikai aprítás, a lézer indukált lökéshullám hatása a részecskék méretcsökkenéséhez vezető fő folyamat.

Az extinkciós vizsgálat alapján információt nyertünk a kolloid oldatban lejátszódó ülepedési és oldódási folyamatok időskálájáról, ami alapot adhat a további formulálás tervezéséhez. A lehetséges gyógyszeripari alkalmazhatóságot alátámasztja a lézeres ablációval előállított minták oldhatóságának jelentős (4–8–9-szeres) referenciához viszonyított növekedése. A PLAL technikával előállított szuszpenziók hasonló ($\sim 0,125 \text{ mg/ml}$ $\lambda = 248$ és 1064 nm -en) vagy jelentősebb ($\sim 0,016 \text{ mg/ml}$ $\lambda = 532 \text{ nm}$ -en) citotoxikus hatása ellenére a gyulladáscsökkentő hatásuk kiváló volt (az IL-6 koncentrációja 89, 95, illetve 78%-kal csökkent), nagymértékben meghaladták a referencia meloxicamét (20%). A kapott oldhatósági, citotoxicitás és gyulladáscsökkentő tulajdonságok alapján arra számítottunk, hogy a PLAL technikával aprított részecskék alkalmazásával lényegesen kisebb gyógyszerdózis mellett is elérhető ugyanaz a terápiás hatás.

A nanoszekundumos impulzuslézeres ablációval desztillált vízben előállított meloxicam részecskék alkalmasak lehetnek *per os* vagy pulmonális beadásra. Alternatívaként a vízben szuszpendált meloxicam szilárd köztes terméké alakítható át különböző gyógyszerformák (tabletták, kapszulák vagy szárazpor-inhalátorok stb.) előállításához.

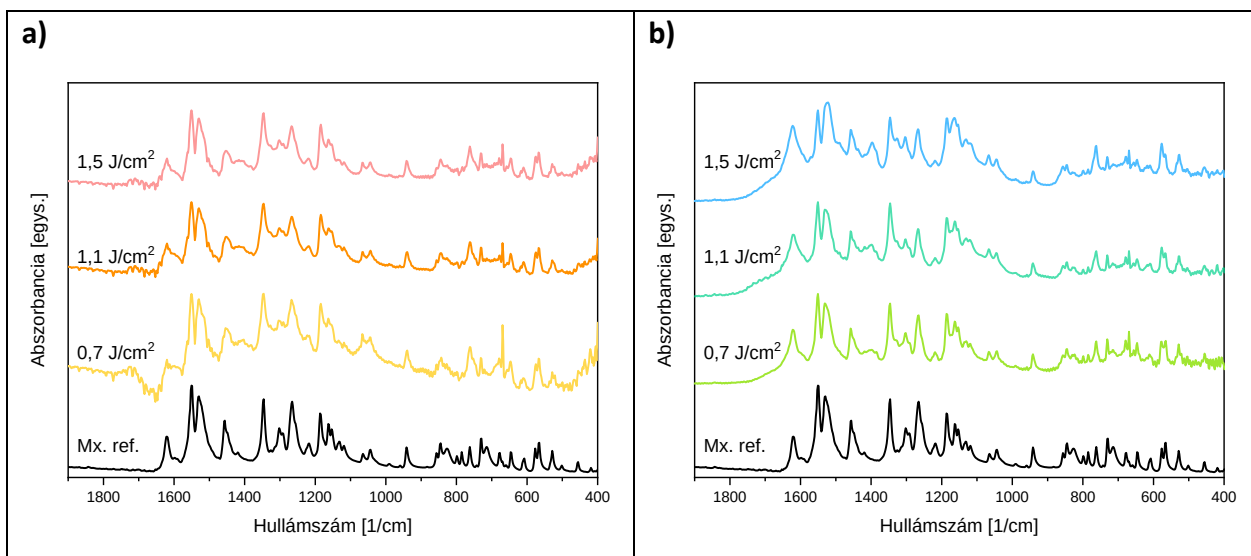
6.2 Femtoszekundumos abláció

6.2.1 Kémiai analízis

A kémiai analízis keretében FTIR, Raman spektroszkópiai és HPLC-MS vizsgálatokat végeztünk mind a PLA, mind a PLAL technikával előállított minták esetében.

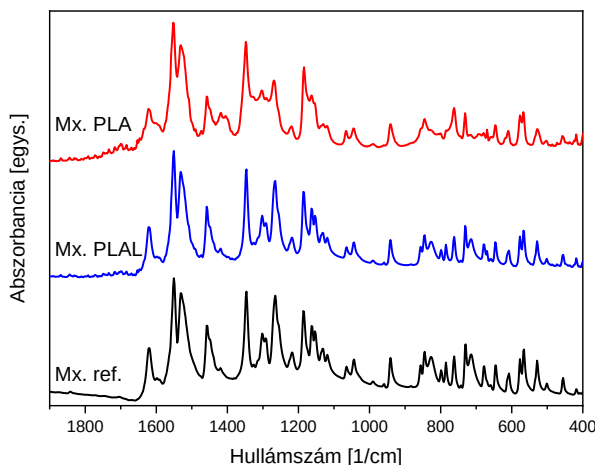
Az FTIR analízis keretében az energiasűrűség és az alkalmazott közeg befolyásoló hatását tanulmányoztuk. A spektrumok „fingerprint” régióját vizsgálva megállapíthattuk, hogy a PLA és a

PLAL által különböző energiasűrűségek esetén létrehozott részecskék spektrumai szoros hasonlóságot mutattak az eredeti meloxicam spektrumával (**42. ábra**). A karakterisztikus csúcsok a várt hullámszámoknál jelentek meg és a vizsgált tartományban az energiasűrűség változtatása sem eredményezett szignifikáns eltérést. Mindazonáltal kisebb változásokat lehetett felfedezni a csúcsok relatív intenzitásában (pl.: 1260 1/cm körül) és alacsonyabb energiasűrűségek esetén a keletkezett/vizsgált részecskék kisebb mennyisége miatt romlott a jel/zaj viszony.



42. ábra Az energiasűrűség változtatás FTIR spektrumra gyakorolt hatásának vizsgálata **(a)** levegőbeli (PLA), illetve **(b)** desztillált víz közegbeli (PLAL) eljárás ($f = 10\text{ Hz}$) esetén, a referencia meloxicam por (Mx. ref.) spektrumával összevetve. Az összehasonlíthatóság érdekében minden spektrum az 1550 1/cm körüli csúcsra normált. [155]

Az energiasűrűséget tovább növelve, valamint az ismétlési frekvenciát százszorosára emelve nem tapasztaltunk jelentős változást (**43. ábra**).

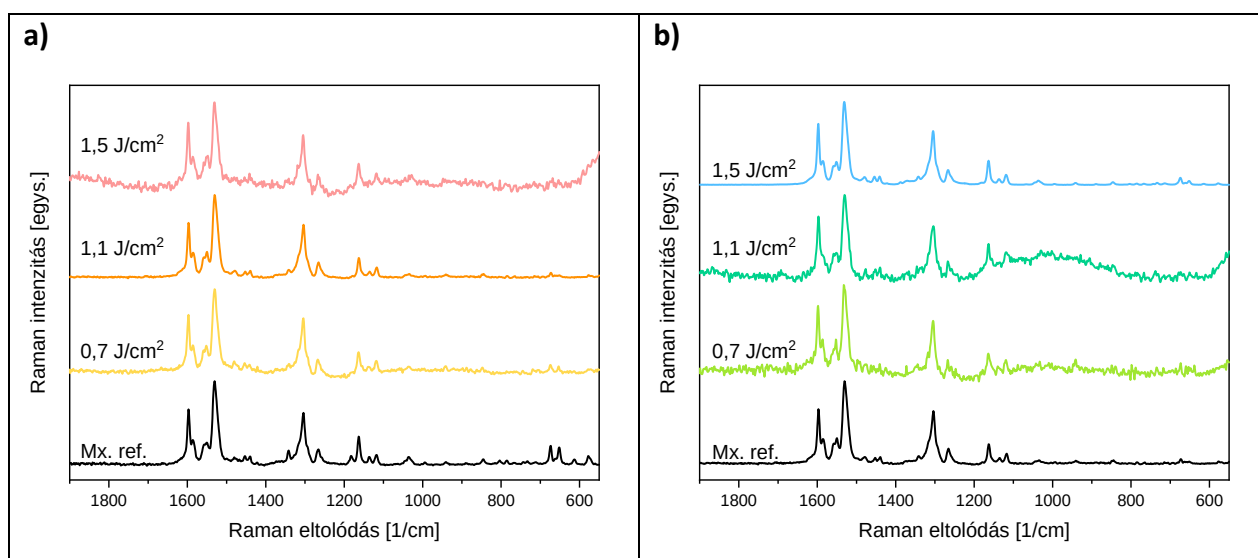


43. ábra A különböző közeg FTIR spektrumra gyakorolt hatásának vizsgálata a levegőbeli (Mx. PLA) és a desztillált víz közegbeli (Mx. PLAL) impulzuslézeres ablációval ($F = 1,9\text{ J/cm}^2$, $f = 1\text{ kHz}$) előállított minták, illetve a referencia meloxicam por (Mx. ref.) esetén. Az összehasonlíthatóság érdekében minden spektrum az 1550 1/cm körüli csúcsra normált. [157]

Összevetve a PLA és a PLAL eljárással előállított részecskék, illetve a meloxicam referencia spektrumát, megállapítható, hogy a víz közegbeli abláció esetén nem történt jelentős változás, míg a levegőbeli folyamat nyomán a korábbiakban leírt relatív intenzitásváltozások megjelentek.

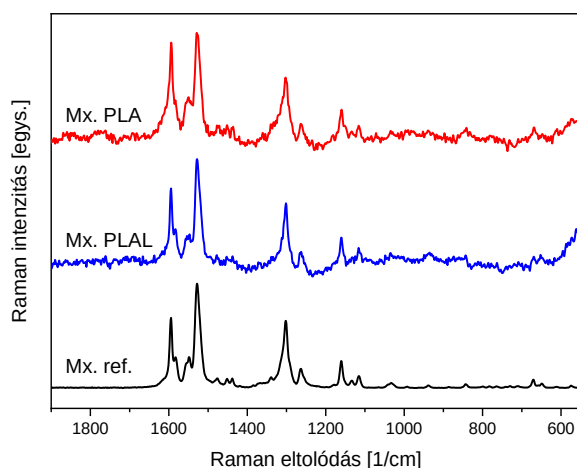
Az FTIR spektrum változása utalhatna kémiai módosulásra, bár degradáció esetén a karakterisztikus csúcsok hiányát vagy új csúcsok megjelenését várnánk, amit itt nem tapasztaltunk. Emellett az IR spektrum alakját befolyásolhatja a minta kristályossági állapota, strukturális módosulása is, ami jellemzően a csúcsok eltolódásában és kiszélesedésében mutatkozik meg [242]–[245].

Mind a PLA, mind a PLAL technikával generált részecskék spektrumai jó egyezést mutattak a referencia meloxicam Raman spektrumával (**44. ábra**), a karakterisztikus csúcsok jelen voltak és a relatív intenzitások is hasonlóak voltak. A Raman spektroszkópiai vizsgálatok során egy adott mintán belül változatos helyeken vettünk fel spektrumot, hogy átfogó képet, értékelhető spektrumokat kapjunk. A mérések során a berendezés rendszeresen figyelmeztetett fellépő fotofluoreszcenciára, fotokémiai reakciók okozta „kifehérítésre” (photobleaching), illetve több esetben igen rossz volt a jel/zaj viszony. Összességében a Raman spektroszkópia megerősítette az FTIR eredményeket, miszerint az ablációs folyamat eredményeképpen nem történt szignifikáns kémiai változás.



44. ábra Az energiasűrűség változtatás Raman spektrumra gyakorolt hatásának vizsgálata **(a)** levegőbeli (PLA), illetve **(b)** desztillált víz közegbeli (PLAL) eljárás ($f = 10 \text{ Hz}$) esetén, a referencia meloxicam por (Mx. ref.) spektrumával összevetve. Az összehasonlíthatóság érdekében minden spektrum az 1530 1/cm körüli csúcsra normált. [155]

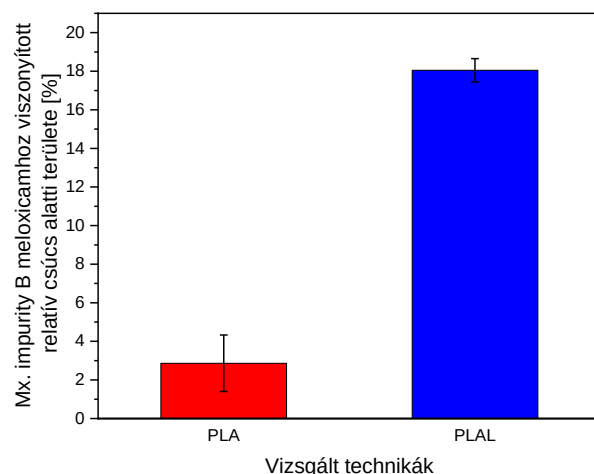
Az $F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$ ablációs paraméterek esetén összevetve a PLA és a PLAL eljárással előállított részecskék, illetve a meloxicam referencia Raman spektrumát (**45. ábra**), a karakterisztikus csúcsok megjelentek és a csúcsok relatív intenzitásában kicsi eltérést tapasztaltunk (pl.: 1600 1/cm körül), valamint az ablációval előállított minták esetén a jel/zaj viszony rosszabb volt.



45. ábra A különböző közegek Raman spektrumra gyakorolt hatásának vizsgálata a levegőbeli (Mx. PLA) és a desztillált víz közegbeli (Mx. PLAL) impulzuslézeres ablációval ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) előállított minták, illetve a referencia meloxicam por (Mx. ref.) esetén. Az összehasonlíthatóság érdekében minden spektrum az 1530 1/cm körüli csúcsra normált. [157]

Az összetétel és a bomlástermékek azonosítása céljából az $F = 1,9 \text{ J/cm}^2$ és $f = 1 \text{ kHz}$ paraméterekkel előállított mintákat vizsgáltunk HPLC-MS mérésekkel.

A nanoszekundumos ablációnál (6.1.1 *Kémia analízis*) tapasztaltakhoz hasonló eredményt kaptunk femtoszekundumos abláció esetén a PLA és a PLAL eljárás esetén is. A keletkezett anyag túlnyomó része meloxicam ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$, **24. ábra (a)**) volt, ami mellett a $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}$ összegképletű (**24. ábra (b)**) meloxicam impurity B-t [227]–[229] azonosítottuk. A meloxicam impurity B meloxicamhoz viszonyított relatív mennyiségét a csúcs alatti területek összevetéséből határoztuk meg. A PLA eljárással előállított minta esetén a nanoszekundumossal összevethető (<5%) volt a relatív mennyiség, míg a femtoszekundumos PLAL technika esetén szignifikánsan magasabb arányban (~20%) volt jelen a meloxicam impurity B (**46. ábra**). A PLAL esetén megnövekedett bomlástermék arány lehet a folyadék közegbeli lézeres fragmentációnak az eredménye, vagyis a folyadékban felhalmozódó részecskék további lézerimpulzusokkal való kölcsönhatásának a következménye. Az előzetes tesztek alapján a nanoszekundumos abláció során elhanyagolhatónak tekintettük ezt a jelenséget, de a femtoszekundumos abláció folyamán alkalmazott, jelentősen nagyobb ismétlési frekvencia esetén már számottevő lehetett a fragmentáció és az általa kiváltott degradáció. Több publikációban [70], [148]–[150] foglalkoztak lézeres fragmentációval, mint méretcsökkentő eljárással, ahol a kémiai roncsolódás szignifikáns volt. Tapasztalatuk szerint az intenzitás növelésével csökkent a részecskeméret és nőtt a degradáció mértéke. Ez alapján megfontolandó lehet a nagy ismétlési frekvencia esetén a PLAL eljárás során az áramlásos elrendezés alkalmazása, amely a lézeres abláció során keltett részecskéket elvezeték a besugárzott térrészből.



46. ábra A meloxicam impurity B meloxicamhoz viszonyított relatív csúcs alatti területe $[(\text{Terület}_{\text{Impurity B}}/\text{Terület}_{\text{Meloxicam}}) \cdot 100\%]$ a PLA és a PLAL technikák ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) esetén. [157]

6.2.2 Morfológia és méret

A morfológiát és a részecskeméretet XRPD spektrumok, DSC görbék, SEM felvételek, illetve a PLA esetében SMPS mérések alapján határoztuk meg.

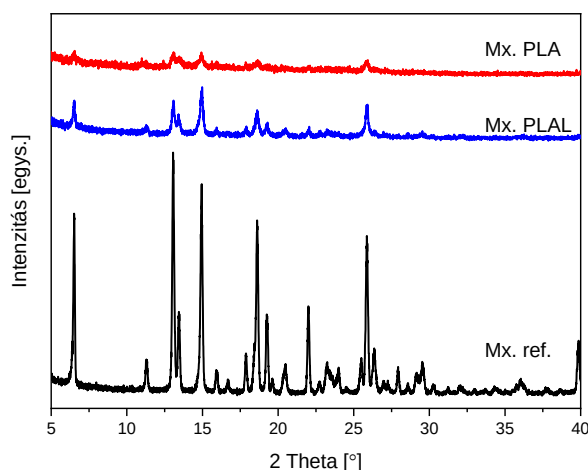
A femtoszekundumos abláció alkalmazásakor tapasztaltunk olvadásra utaló jeleket és mivel a kémiai összetétel döntően sértetlen maradt, így felmerült, hogy esetlegesen amorfizáció is bekövetkezhetett.

Az XRPD hagyományosan alkalmazott technika a gyógyszerészetben kristályosság karakterizálására, a Bragg-csúcsok hiánya és a diffúz halo (széles, laposabb görbe) jelenléte tipikusan amorfizációra utal [98], [246]. Az amorfizáció vizsgálata során az XRPD mérést gyakran egészítik ki DSC görbe felvételével, ahol az olvadási endoterma alacsonyabb hőmérséklet felé történő eltolódása vagy ellaposodása szintén amorf szilárd anyag jelenlétére utal [98].

A meloxicam amorfizációjának egyértelmű megállapítása kapcsán nehezítő tényező, hogy tiszta amorf formájáról semmilyen irodalmi adat nem áll rendelkezésre.

Az XRPD spektrumokhoz az $F = 1,9 \text{ J/cm}^2$ és $f = 1 \text{ kHz}$ paraméterekkel előállított részecskéket használtuk fel és minden vizsgálathoz azonos tömegű mintát mértünk be (**47. ábra**).

A lézeres ablációval előállított minták esetén szignifikánsan lecsökkent a jel intenzitása, például a $\sim 25,94^\circ$ csúcs esetén a referencia meloxicam intenzitásához képest a PLAL esetén negyedére, míg a PLA esetén tizedére csökkent. A legerősebb csúcsok mindegyik esetben a várt szögnél jelentek meg, míg a kisebbek az ablált minták esetén elvesztek a zajban.



47. ábra A különböző közegek XRPD spektrumra gyakorolt hatásának vizsgálata a levegőbeli (Mx. PLA) és a desztillált víz közegbeli (Mx. PLAL) impulzuslézeres ablációval ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) előállított minták, illetve a referencia meloxicam por (Mx. ref.) esetén, azonos minta tömeget bemérve mind a három esetben. [157]

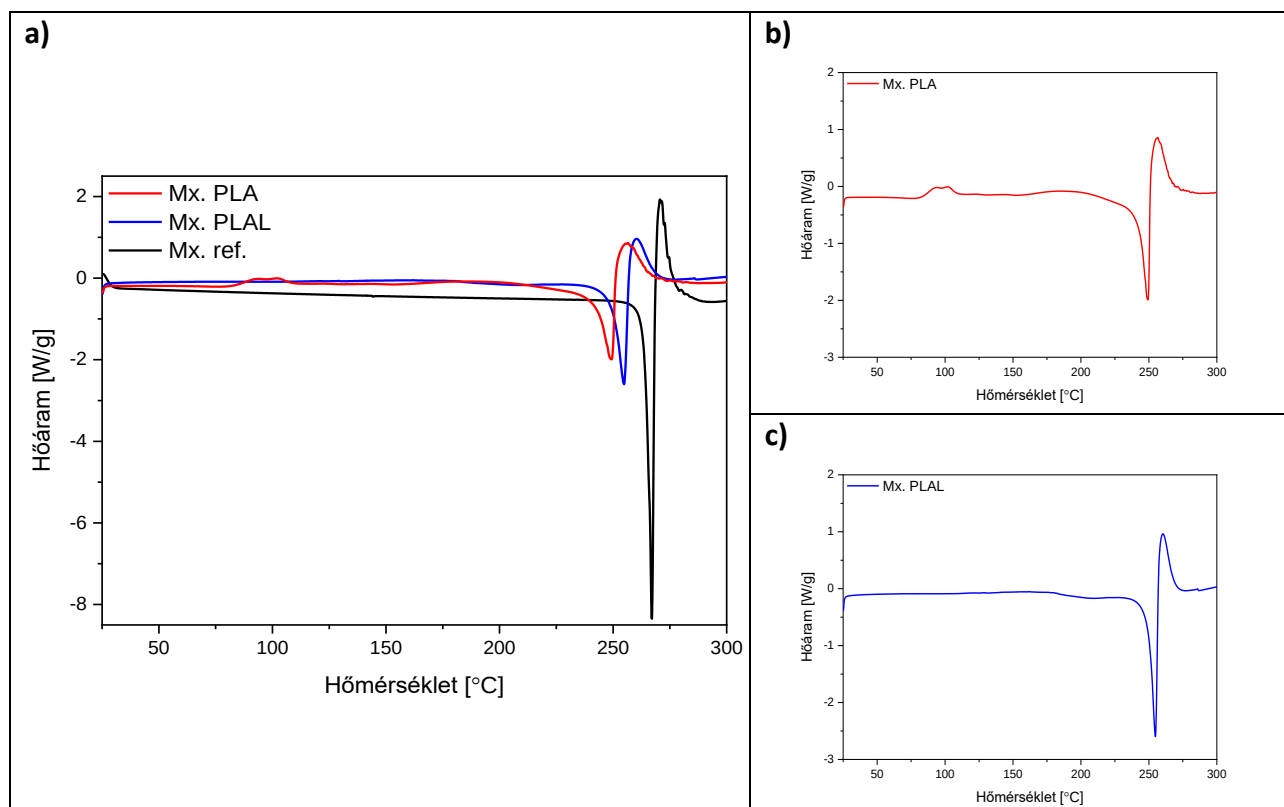
Az XRPD spektrumok vizsgálata során nem tapasztaltunk az irodalomban részletezett, amorfizációra utaló kiszélesedést, látszólag csak a jel intenzitásában volt változás amikor azonos tömegeket vizsgáltunk. Az XRPD jelintenzitás csökkenését több tényező is előidézheti és az amorf meloxicam spektruma nem ismert, így csupán azt állapíthatjuk meg, hogy az abláció révén aprított részecskék kristálytani tulajdonságai eltérnek a kiindulási meloxicamtól. Morfológiai megfigyeléseink alapján az a sejtésünk, hogy az amorfizáció okozhatta a legfőbb változást, de az XRPD spektrumok ezt nem tették bizonyossá. A **47. ábra** spektrumai alapján elképzelhető, hogy a lézeres abláció során mind levegő, mind desztillált víz közegben a keltett részecskék jelentős része amorfizálódik, amik így nem adnak hozzá vagy nagyon széles, elnyúlt halo-t adnak az XRPD jelhez, míg a kisebb arányban az abláció során keletkező kristályos vagy re-kristallizáció eredményeképp létrejött részecskék Bragg-csúcsai mutatkoznak meg a spektrumban. A mérések alapján valószínű, hogy a PLA eljárás során a kristályosság jelentősebben csökken, mint a PLAL alkalmazásakor.

Az FTIR, Raman és XRPD spektrumok vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a lézeres ablációval előállított minták megőrizték a kiindulási anyag polimorf állapotát, ami az enolos/ I forma (módosulat) volt [247].

Az XRPD mérés során vizsgált minták ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) DSC görbéit is felvettük, a kristályosságbeli változások elemzése céljából (**48. ábra**).

A referencia meloxicam DSC görbéjéhez viszonyítva a lézeres ablációval előállított minták esetén alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódott az endoterm olvadási csúcs, amely ellaposodott, kiszélesedett. Az XRPD-hez hasonlóan, itt is a PLA minta tért el jobban a kiindulási anyagtól. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a lézeres ablációval előállított mintákban amorf fázis is jelen lehet a kristályos mellett. Számszerűen az endoterm csúcsok a PLA, a PLAL és a referencia minta esetén rendre a $248,91 \text{ }^\circ\text{C}$, $254,47 \text{ }^\circ\text{C}$ és $264,78 \text{ }^\circ\text{C}$ értékre estek. A PLA görbe esetén egy kis intenzitású, exoterm kettős csúcs található $90\text{--}100 \text{ }^\circ\text{C}$ környékén, ilyen karakterisztikával a

kristályosodási folyamatok jellemezhetők, emellett a PLAL esetén 180 °C körül van egy lépcső, amilyen jellegű változást tipikusan az üvegesedési átmenethez társítanak [248], [249].

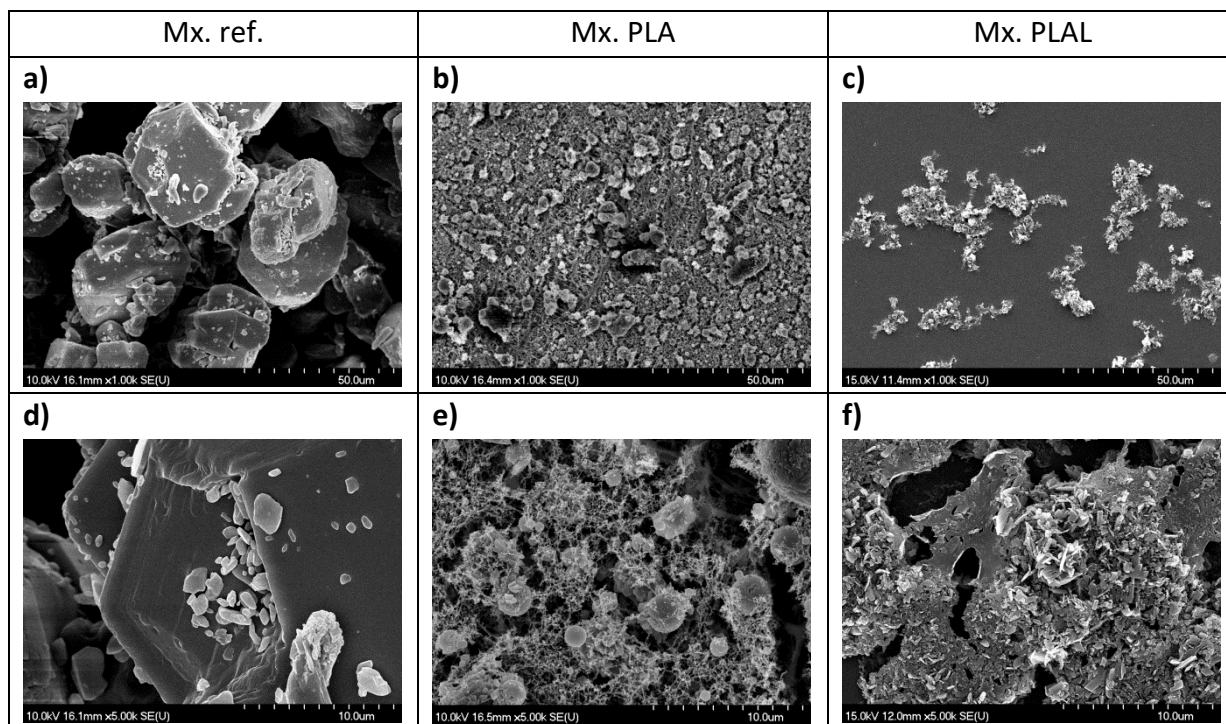


48. ábra (a) A különböző közegek DSC görbére gyakorolt hatásának vizsgálata a **(b)** levegőbeli (Mx. PLA) és a **(c)** desztillált víz közegbeli (Mx. PLAL) impulzuslézeres ablációval ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) előállított minták, illetve a referencia meloxicam por (Mx. ref.) esetén. [157]

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során feltérképeztük az energiasűrűség, a közeg és az ismétlési frekvencia keltett részecskékre gyakorolt hatását. A SEM felvételek alapján megállapítható, hogy a referencia porhoz viszonyítva szignifikáns részecskeméret csökkenést értünk el a lézeres ablációval (**49. ábra**).

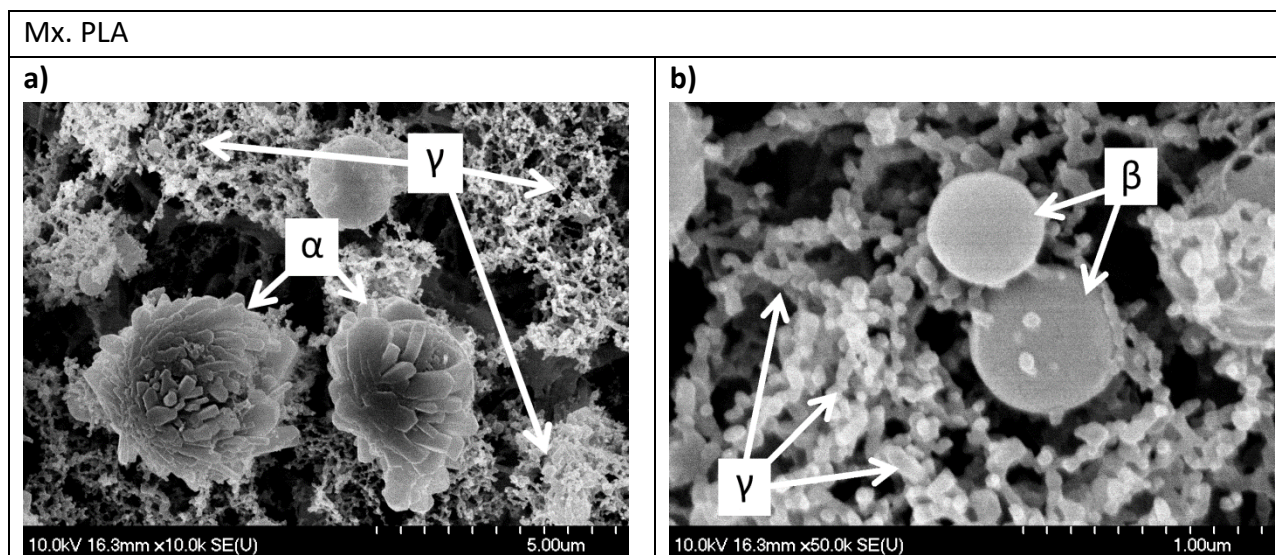
Az energiasűrűség változtatása önmagában nem okozott szembetűnő változást a részecskék morfológiájában és méretében sem.

Az abláció közege azonban jelentősen befolyásolta a keletkezett részecskék morfológiáját, ami feltehetően az eltérő részecskékelési mechanizmusoknak köszönhető.



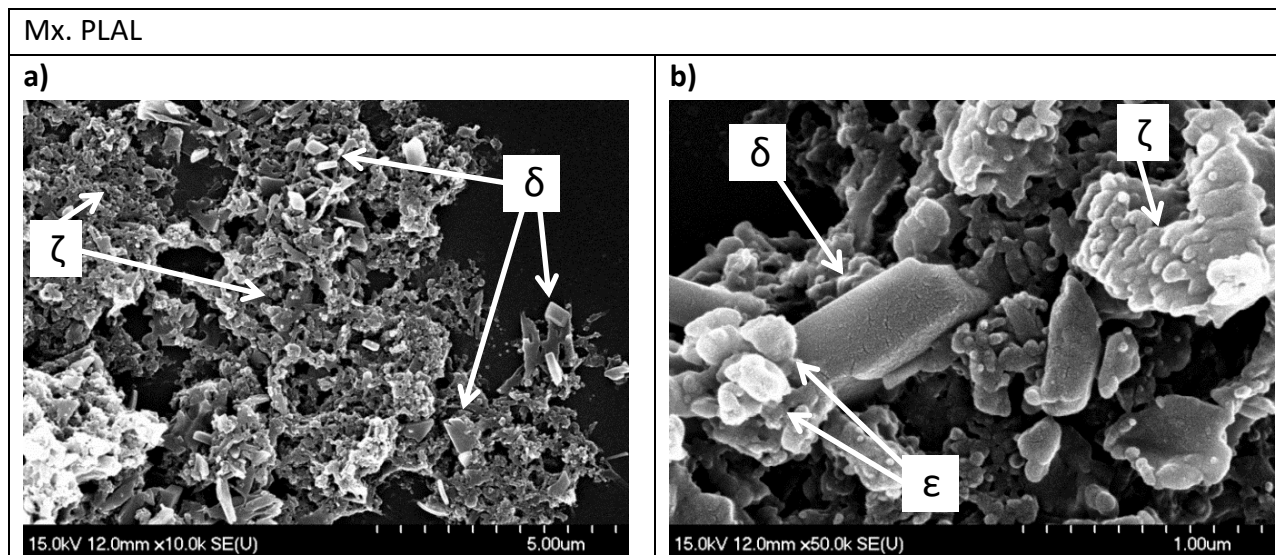
49. ábra SEM képek a forgalmazott meloxicam porról (Mx. ref.), a PLA (Mx. PLA) és a PLAL (Mx. PLAL) eljárással ($F = 1,2 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$) előállított részecskékről. Nagyítások: (a)-(c): 1k; (d)-(f): 5k. [155]

A PLA eljárással, $f = 10 \text{ Hz}$ ismétlési frekvenciával előállított részecskék (**50. ábra**) három csoportba sorolhatók: (α) egyenetlen felszínű gömbök: a részecskék alapja gömbnek tűnik (átmérő: $\sim 2\text{--}3 \mu\text{m}$), amit téglatestek, lamellák ($\sim 1 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m} \times 0,25 \mu\text{m}$) borítanak; (β) sima felszínű gömbök (átmérő: $\sim 0,5\text{--}1,0 \mu\text{m}$); (γ) apró gömbölyű részecskék (átmérő: $\sim 0,1 \mu\text{m}$), amik láncokba rendeződnek, pókháló jellegű struktúrát alkotva.



50. ábra SEM képek a szűrőn összegyűjtött PLA (Mx. PLA) eljárással ($F = 1,5 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$) előállított részecskékről: (α) egyenetlen felszínű gömbök téglatestekkel, lamellákkal borítva; (β) sima felszínű gömbök; (γ) apró gömbölyű részecskék láncokba rendeződve, pókháló jellegű struktúrát alkotva. Nagyítások: (a): 10k; (b): 50k. [155]

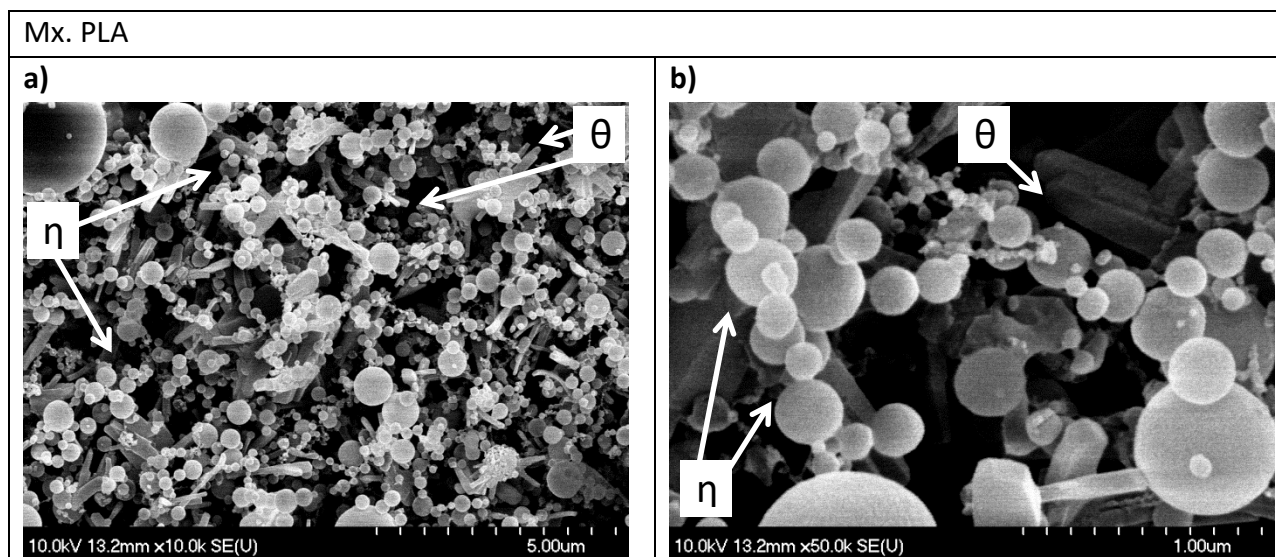
A PLAL technikával, $f = 10 \text{ Hz}$ ismétlési frekvenciával előállított részecskék (**51. ábra**) kupacokba tömörültek, feltehetően a csepp száradása során. A részecskék egy része (δ) kristályos jellegű volt, töredezett üvegdarabokra hasonlított, éles határvonalak és sima felületek jellemezték. Emellett (ϵ) lekerekített éllel rendelkező, amorf jellegű részecskék és (ζ) alakatlan, összeállt (aggregálódott/agglomerálódott) anyagtömeg is megfigyelhető volt a háttérben.



51. ábra SEM képek a PLAL (Mx. PLAL) eljárással ($F = 1,5 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$) előállított, szilíciumlapon a csepp száradását követően visszamaradt részecskékről: (δ) kristályos jellegű, (ϵ) lekerekített, amorf jellegű részecskék és (ζ) alakatlan, összeállt anyagtömeg. Nagyítások: (a): 10k; (b): 50k. [155]

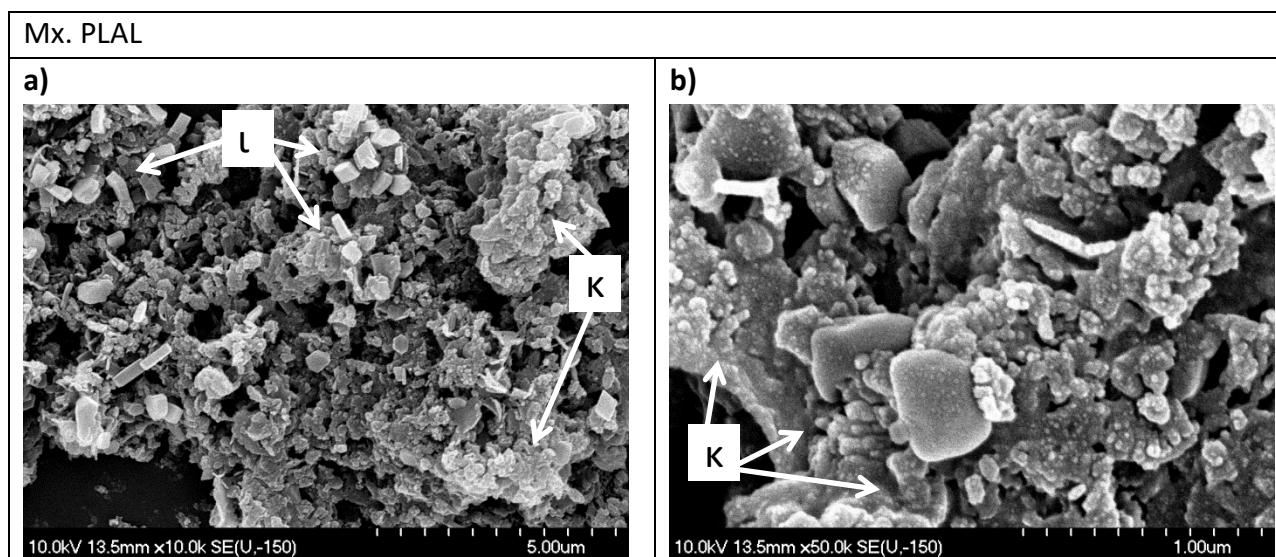
Az ismétlési frekvencia növelésének morfológiára gyakorolt hatása is nyomon követhető a SEM felvételeken. Az ismétlési frekvenciát a korábban alkalmazott ($f = 10 \text{ Hz}$) százszorosára növeltük: $f = 1 \text{ kHz}$ paraméterrel állítottuk elő az alábbi mintákat. A frekvencia változtatásával egy időben az energiasűrűséget is tovább növeltük, de a korábbi tapasztalatok alapján feltehetően nem az F változtatásának hatását látjuk a morfológián.

A PLA eljárással, $f = 1 \text{ kHz}$ ismétlési frekvenciával és $F = 1,9 \text{ J/cm}^2$ energiasűrűséggel előállított részecskéket (**52. ábra**) két kategóriába lehet besorolni: (η) sima felszínű gömbök széles mérettartományban (átmérő: $\sim 0,1\text{--}5,0 \mu\text{m}$); illetve (θ) rudak/ pálcikák ($\sim 1,5 \mu\text{m} \times 0,25 \mu\text{m} \times 0,25 \mu\text{m}$). A frekvencia változtatásának hatására az $f = 10 \text{ Hz}$ esetén tipikus egyenetlen felszínű gömbök (**50. ábra α**), illetve a láncokba rendeződött, közelítőleg monodiszperz méretű, kicsiny gömbölyű részecskék (**50. ábra γ**), egyaránt eltűntek. Ellenben, $f = 1 \text{ kHz}$ esetén a sima felszínű gömbök, az **50. ábra β** részecskéihez hasonlóak voltak megfigyelhetők, csak szélesebb méreteloszlási tartományt lefedve. Bár nanorészecske láncolatok nem voltak jellemzők, a sima felületű, változatos méretű részecskék sok esetben összekapcsolódtak, megfigyelhető volt nyakasodás. Ezen felül rúdszerű, kristály jellegű részecskék is megjelentek tipikus dimenziókkal és random irányultsággal, ami az alacsonyabb frekvencián nem volt jellemző.



52. ábra SEM képek a szűrőn összegyűjtött PLA (Mx. PLA) eljárással ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) előállított részecskékről: (η) sima felszínű gömbök; illetve (θ) rudak/pálcikák. Nagyítások: (a): 10k; (b): 50k. [157]

A PLAL eljárás esetén kisebb morfológiai változást okozott csak az ismétlési frekvencia megnövelése. Az $f = 1 \text{ kHz}$ és $F = 1,9 \text{ J/cm}^2$ paraméterekkel előállított részecskék (**53. ábra**) sem voltak egyesével elkülöníthetők, halmazokba tömörültek, feltehetően a csepp száradása miatt. A halmazokban voltak (ι) kristályos jellegű, üvegszilánkra hasonlító, éles határvonalú és sík felületekkel jellemezhető részecskék, valamint a háttérben (κ) lekerekített élekkel rendelkező, amorf jellegű és alakatlan, összeállt anyagtömeg volt található. A szabálytalan részecske halmazok felület/térfogat aránya feltehetően igen magas volt.



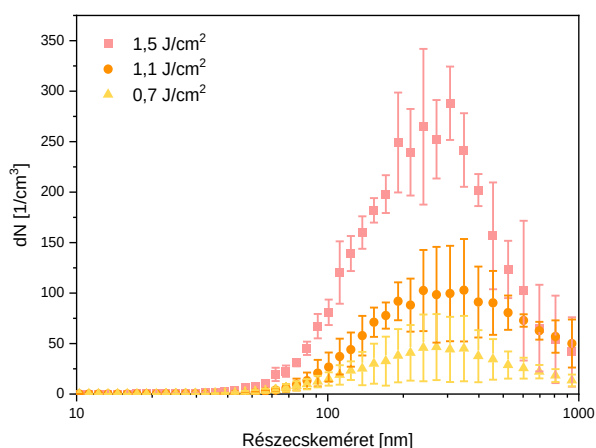
53. ábra SEM képek a PLAL (Mx. PLAL) eljárással ($F = 1,5 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$) előállított, szilíciumlapon a csepp száradását követően visszamaradt részecskékről: (ι) kristályos jellegű részecskék, illetve (κ) amorf jellegű és definiálatlan anyagtömeg. Nagyítások: (a): 10k; (b): 50k. [155]

A femtoszekundumos abláció minden paraméter kombinációja során kristályos és amorf jellegű részecskék keverékét figyeltük meg a SEM képeken, ami összhangban van az XRDP és DSC mérések alapján valószínűsített kevert szilárd fázis jelenlétével.

Az elektronmikroszkópos felvételek nem voltak alkalmasak méreteloszlás meghatározására sem a PLA, sem a PLAL eljárással generált részecskék esetén, mivel nem lehetett megbízhatóan elkülöníteni a részecskéket.

A PLA technika esetén adódott lehetőség SMPS mérések elvégzésére, melynek keretében a levegőben keltett részecskéket légáramlással direkt módon a mérőeszközbe vezettük és felvettük a méreteloszlást különböző energiasűrűségek ($F = 0,7\text{--}1,5 \text{ J/cm}^2$) estén. Az $f = 10 \text{ Hz}$ alkalmazásakor a részecskehozam eltömítette az SMPS berendezést a mérés közben, ezért a direkt méreteloszlás méréshez csökkenteni kellett az ismétlési frekvenciát, $f = 1 \text{ Hz}$ paraméterrel dolgoztunk.

A PLA eljárással ($f = 1 \text{ Hz}$), különböző energiasűrűséggel előállított részecskék SMPS-sel meghatározott méreteloszlását az **54. ábra** szemlélteti. Látható, hogy az energiasűrűség növelése emelte a kihozatalt (részecskeszámot), de az eloszlási görbe lefutása és maximumának helye nem mutatott energiasűrűség függést a vizsgált tartományon. Ez a mérés is alátámasztotta, hogy szignifikáns méretcsökkenés érhető el a lézeres ablációval a referencia por szemcseméretéhez képest. A méreteloszlás széles tartományt lefedett, a részecskék körülbelül a 60 nm és $1 \mu\text{m}$ közötti mérettartományba estek és legnagyobb számban a $200\text{--}400 \text{ nm}$ közötti részecskék voltak jelen. Az eloszlás $1 \mu\text{m}$ körüli „vállasodása” az SMPS detektálási módszerére jellemző túltöltődésből adódik, ami statisztikus hibát vezet be, emelve a nagyobb méretű detektált részecskék számát. Ezt figyelembe véve feltételezhetjük, hogy az ennél nagyobb részecskék száma nem volt jelentős.



54. ábra Az energiasűrűség változtatás részecskeméret eloszlásra gyakorolt hatásának vizsgálata PLA ($f = 1 \text{ Hz}$) alkalmazása esetén, SMPS technikával végezve a mérést. [155]

Mivel az elektronmikroszkópos vizsgálatok és az *in situ* SMPS mérések részecskeméret meghatározása mögött eltérő módszer, metodika áll, ezért a kapott adatok eltérhetnek.

Az SMPS elemzéshez az ablált részecskéket azonnal a mérőműszerbe vezettük, a mért adatokat azonban befolyásolja az SMPS rendszer átviteli függvénye és a 100 nm -es vagy annál kisebb részecskéknek csak egy kis része jut el a detektorba az ütközések miatt. Ezen kívül az $1 \mu\text{m}$ körüli, illetve annál nagyobb részecskék a légáramból történő kiüledés miatt elveszhetnek. Emellett az

SMPS műszer nem tudja elkülöníteni a korábban összeállt részecskéket, így, ha aggregáció/agglomeráció zajlott le a detektálás előtt, akkor az aggregátum/agglomerátum effektív átmérőjét határozza meg.

A SEM képek pontosabb adatokat szolgáltatnak a részecskék alakjáról, kiterjedéséről és morfológiájáról, azonban a vizsgálatot megelőzően az összegyűjtött részecskék termikus vagy mechanikai kölcsönhatásba kerülhetnek egymással vagy a környezettel. Például termikus relaxáción, kristályosodáson mehetnek keresztül vagy a viszonylag kisebb részecskék nagyobb struktúrákat alkotva egyesülhetnek. Sok esetben a SEM felvételek alapján nem dönthető el egyértelműen, hogy különálló, egymásra rakódott részecskék vagy már aggregált/agglomerálódott részecskék alkotnak egy adott részecskecsoportot.

Mindazonáltal ez a két módszer egymást kiegészítő információkat adhat az előállított részecskék gyógyszeripari alkalmazási lehetőségeiről. Az SMPS mérések a részecskék/aggregátumok aerodinamikai jellemzőit tükrözik, amelyek utánozzák azok potenciális orron át, tüdőbe történő bevitelét, míg a SEM vizsgálatok mélyebb megértést nyújtanak a létrehozott képződmények tényleges morfológiájáról, az aktív felület nagyságáról. Például a korábban említett 100 nm-es, láncokba rendeződő részecskék (50. ábra γ) már az SMPS mérések előtt aggregálódhattak, ami azt jelenti, hogy az SMPS valószínűleg nagyobb effektív méretet rendelt ezekhez a részecskecsoportokhoz, de ez tükrözi az aerodinamikai viselkedést. A SEM képek alapján azonban megállapíthatjuk, hogy ezen összekapcsolódott részecskék nagyon nagy számban vannak jelen és igen nagy felület/térfogat aránnyal bírnak, ami kedvező a gyógyszerek oldódási sebességének növeléséhez.

6.2.3 Mechanizmus feltárása

A mechanizmus feltárását a termális adatok és az elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján közelítettük meg.

A nanoszekundumos ablációnál alkalmazott termális modell (6.1.3 *A részecskekeltési mechanizmus feltárása*) alap adatait átemelve femtoszekundumos esetben is meghatározhatjuk a $x = \delta(\lambda)$ behatolási mélységben a besugárzás hatására bekövetkező $\Delta T(x)$ hőmérsékletváltozást (6. táblázat) a maximális alkalmazott F energiasűrűség esetén. Az esetleges nemlineáris effektusokat nem vettük figyelembe.

λ [nm]	F [J/cm ²]	$x = \delta(\lambda)$ [nm]	$\Delta T(x)$ [K]
780	1,9	1613	7384

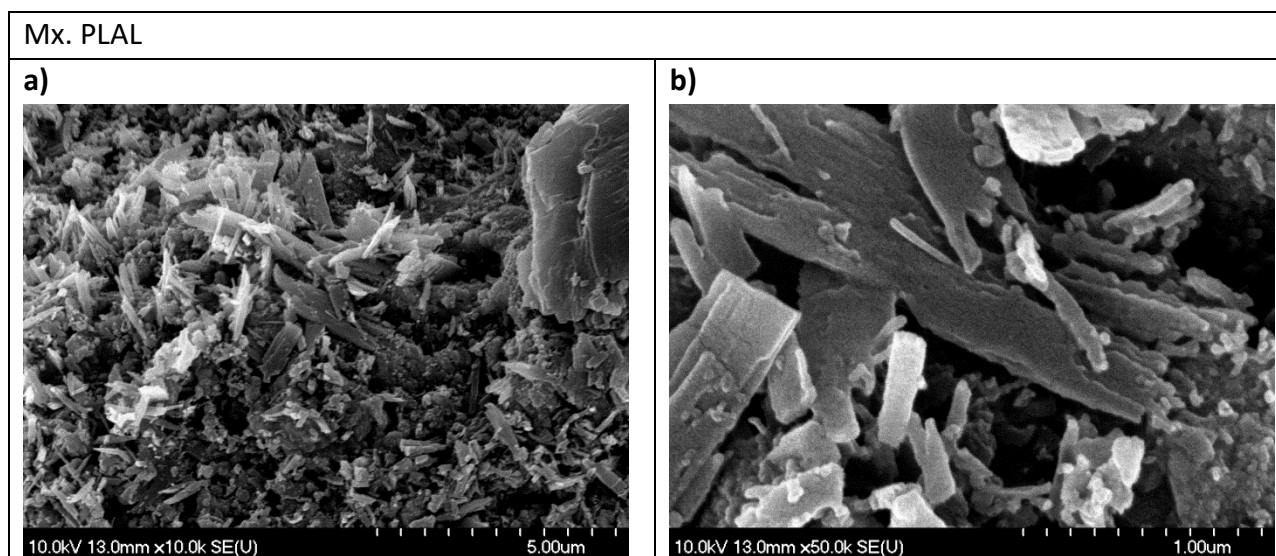
6. táblázat Termális modell adatai és eredménye femtoszekundumos abláció esetén.

Az femtoszekundumos besugárzás esetén a hőmérsékletváltozás a 10^3 K nagyságrendbe esik és a behatolási mélység mikrométer nagyságrendű. Ez alapján a nanoszekundumoshoz hasonló ablációs mechanizmust tételezhetünk fel, ahol a besugárzás hatására keletkezett lökéshullám aprózó hatása a meghatározó, míg a legfelső, abszorbeáló réteg elbomlik.

A mechanizmus jellege kapcsán a keltett részecskék alakja egy következő tényező, amit érdemes lehet megvizsgálni mind a PLAL, mind a PLA esetében.

A femtoszekundumos PLAL eljárással keltett részecskék (**53. ábra**) esetén megfigyelhetőek voltak a nanoszekundumos folyadékbeli abláció során (**26. ábra**) látottakhoz hasonló, töret jellegű kristálydarabok, amik a korábban leírt mechanikai aprózódási folyamathoz (6.1.3 *A részecskekeletési mechanizmus feltárása*) hasonló módon jöhetnek létre. Emellett a nagyobb ismétlési frekvencia esetén a lézeres fragmentáció is fontos szerepet tölthetett be a végtermék kialakításában. Az egyenes éllel és sík felületekkel rendelkező darabok legtöbb esetben amorf jellegű anyagtömegbe ágyazva voltak jelen. Ezen alaktalan anyag kapcsán kérdés, hogy vajon milyen módon volt jelen eredetileg a folyadék közegben? Lehetséges, hogy oldott anyag formában volt, amely a szárítás során nem tudott szabályos kristályrácsba rendeződni vagy részecskék voltak, amik az abláció során vesztek kristályosságukból és ezen részecskék aggregálódtak/ agglomerálódtak a csepp víztartalmának elpárolgásakor. További lehetőségként felmerül, hogy az anyagtömeg a HPLC-MS vizsgálat során (6.2.1 Kémiai analízis) azonosított meloxicam impurity B vagy ezen melléktermék és a meloxicam keveréke, és ezen eltérő kémiai összetételnek köszönhető a kristályostól eltérő morfológia. Mivel a HPLC-MS azt mutatta, hogy a meloxicam mennyiségéhez viszonyítva is szignifikáns arányban van jelen a meloxicam impurity B a femtoszekundumos PLAL esetében, így feltételezhetjük, hogy ez a morfológiában is megmutatkozhat. A lekerekített élek kapcsán felvetődik a termális hatás, esetlegesen részleges olvadás, lágyulás lehetősége is.

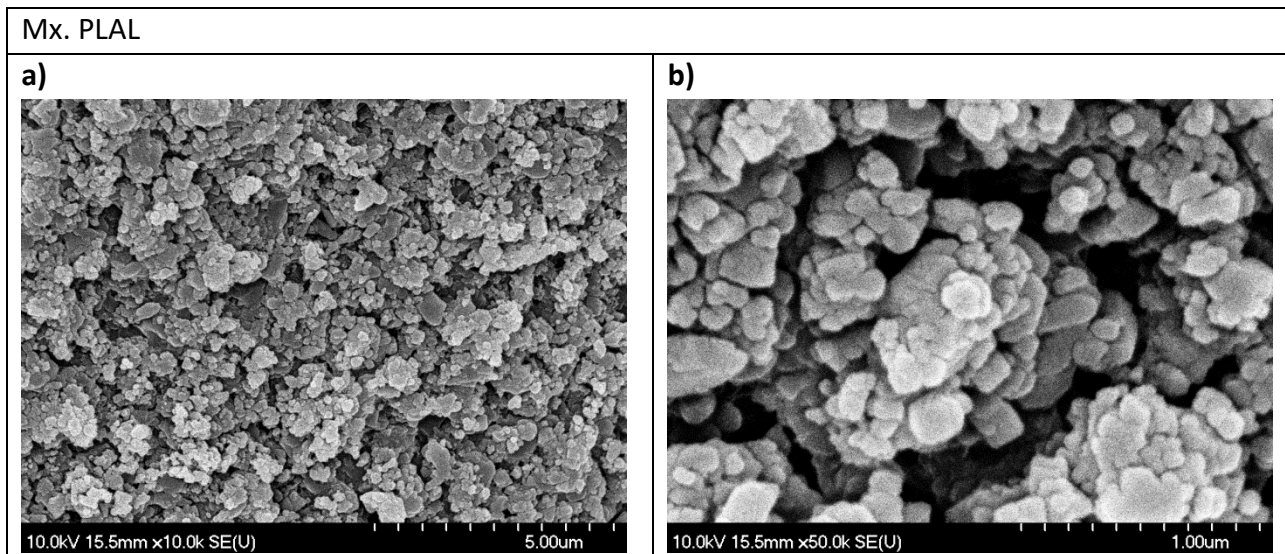
A részecskék alakja mellett az ablált céltárgy felszínét is vizsgáltuk. Alacsonyabb ismétlési frekvencia ($f = 10 \text{ Hz}$) alkalmazásakor a megmunkált felszínt tűszerű és lemez jellegű, lamináris törmelék borította (**55. ábra**), alátámasztva a mechanikai aprózási modellt.



55. ábra SEM képek a PLAL (Mx. PLAL) eljárással ($F = 1,5 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$) megmunkált meloxicam tabletta felszínéről, amit tűszerű és lamináris részecskék borítanak. Nagyítások: (a): 10k; (b): 50k.

[155]

Megemlítendő, hogy az f növelésével az ablált felület jellege is drasztikusan megváltozott. Az $f = 1 \text{ kHz}$ ismétlési frekvencia esetén az ablált felszínt lekerített körvonalakkal rendelkező, karfiol jellegű finomstruktúra borította (**56. ábra**), ami a szignifikánsabb maradvány hő, olvadás eredménye lehetett.



56. ábra SEM képek a PLAL (Mx. PLAL) eljárással ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) megmunkált meloxicam tabletta felszínéről, amit lekerített körvonalakkal rendelkező, karfiol jellegű finomstruktúra borított.

Nagyítások: (a): 10k; (b): 50k. [157]

A femtoszekundumos PLA eljárás során keletkezett részecskék gömb alakja azonban már nem magyarázható a mechanikai aprózódásos modellel. A gömb alak kialakulására a legintuitívabb keletkezési mechanizmus a halmazállapot változáshoz, olvadáshoz, párolgáshoz köthető.

A femtoszekundumos PLA ($f = 10 \text{ Hz}$) esetében megfigyelt három fő részecsketípus (**50. ábra**) feltehetően különbözőképpen alakult ki.

A sima gömbök (**50. ábra β**) megolvadt és újra megszilárdult részecskék lehetnek. Az olvadt állapotban energetikai szempontból a gömb alak a legkedvezőbb, amely forma felvétele után olyan gyors dermedés zajlódhatott le, hogy a kristályrács nem tudott kialakulni. A lamellákkal/téglatestekkel borított gömbök (**50. ábra α**) esetében feltételezzük, hogy a kezdetben sima gömb felszínén kialakult egy gócpont, egy kristálymag és a kristályrácsba rendeződés megkezdődött ebből a pontból. Ezzel magyarázhatók a virágszerűen, sugárirányba előretörő tömbök, amik a „bokros”/ „fenyőtobozszerű” részecskék létrejöttét eredményezték. Megemlítendő, hogy az, hogy a részecske felszínén bekövetkezik-e ez a fajta kristályosodás, re-kristallizáció, az függhet a részecske térfogatától, hiszen ezen két típus tagjai más mérettartományba estek.

Morfológiailag ezek a részecskék hasonlóságot mutatnak a porlasztva szárított részecskékkal [250]–[252], azonban eltérés, hogy a PLA generált részecskék kisebb méretűek és nem tartalmaznak adalékanyagot.

A hálószerű struktúrát alkotó kis gömb alakú részecskék (**50. ábra γ**) korábban megolvadt cseppekből aggregálódhattak vagy a gázfázisból kondenzálódhattak. Hasonló morfológiát írtak le az irodalomban különböző szervesetlen anyagok ablációja során. A femtoszekundumos lézer ablációval

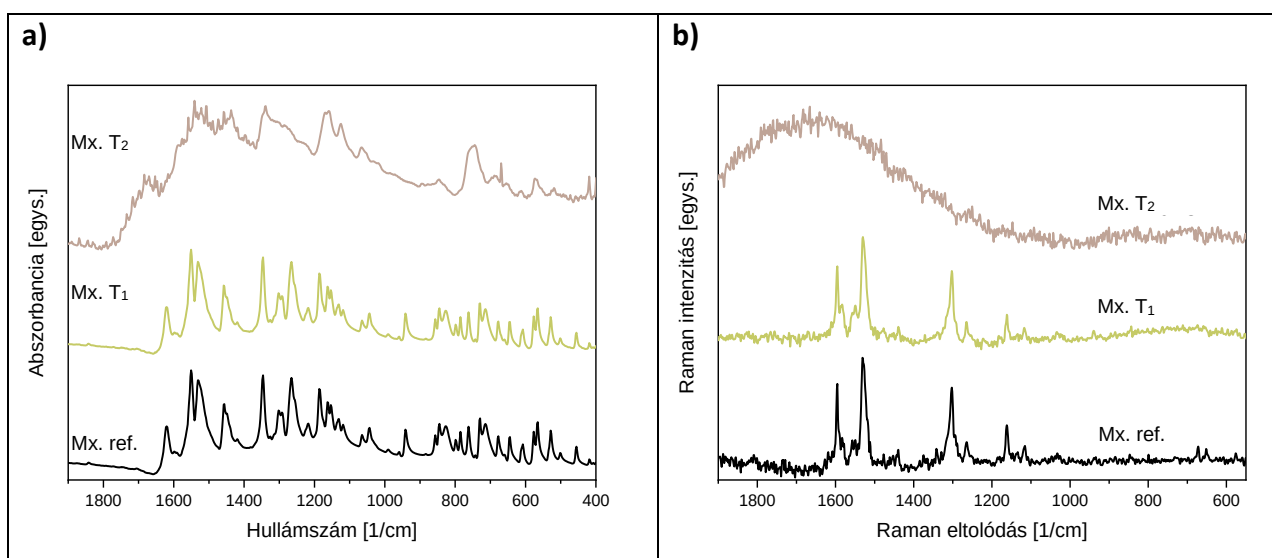
előállított szilícium- és grafit nanorészecskék részletes vizsgálata alapján a keletkezési mechanizmust több alapfolyamatra osztották fel: felületi olvadás, átmenet túlkritikus folyadékba, párologás, anyagfelhő képződése, túltelített gőz létrejötte, nanorészecske képződés kondenzáció útján, végül a nanorészecskék összekapcsolódása hálószerű aggregátummá [253]. Lézeres ablációval létrehozott szén aeroszol részecskék esetében fraktál aggregátumokat írtak le [254], amelyek hasonlóak a SEM felvételeinken látható láncos, hálószerű struktúrákhoz. Az említett tanulmány szerint az ilyen részecskék/képződmények kialakulása egy háromlépcsős egyszerűsített modellel írható le [255]: nukleáció, koaguláció és aggregáció, amely folyamat egészét az kedvező energetikai feltételek vezérlik. A lézeres ablációval létrehozott plazmaállapotban az atomok összeütközhetnek, összekapcsolódhatnak, létrehozva a nanorészecske magokat. Ezek az elsődleges részecskék ezután ütköznek egymással, formálódnak és nagyobb gömböket hoznak létre, amíg a felület/térfogat arány el nem éri az ideális értéket. Ezt követően fraktálos aggregátumok jelennek meg, mivel az ütköző részecskék között gyengébb, másodrendű kötések alakulnak ki. [254]

Az ablációs frekvencia megnövelésével a morfológiában is tapasztaltunk változást. A kristályokkal borított gömbök (**50. ábra α**) és a nanoaggregátum láncok (**50. ábra γ**) nem voltak tipikusak, széles mérettartományt lefedő sima felszínű gömbök (**52. ábra η**), illetve kristályos jellegű, tűszerű pálcikák (**52. ábra θ**) voltak jelen. Ez feltehetően a nagyobb ismétlési frekvenciának köszönhető, aminek hatására a létrehozott anyagfelhő lokális sűrűsége megnőtt, a korábban aggregátum láncokat képező részecskék nagyobb eséllyel ütköztek és így növekedtek. A *kHz*-es besugárzás hatására a céltárgyon bekövetkező termális hatás is intenzívebb lehetett a maradványhő miatt, így a korábban esetleg visszamaradó kristályos góccok is teljesen megolvadhattak, nem keletkeztek „toboz jellegű” felületek. A kristályos fázist a tűszerű részecskék képviselték, amik feltehetően nem törés, hanem korlátozott kiterjedésű re-kristallizáció eredményei, hiszen közel egységes dimenziókkal rendelkeznek.

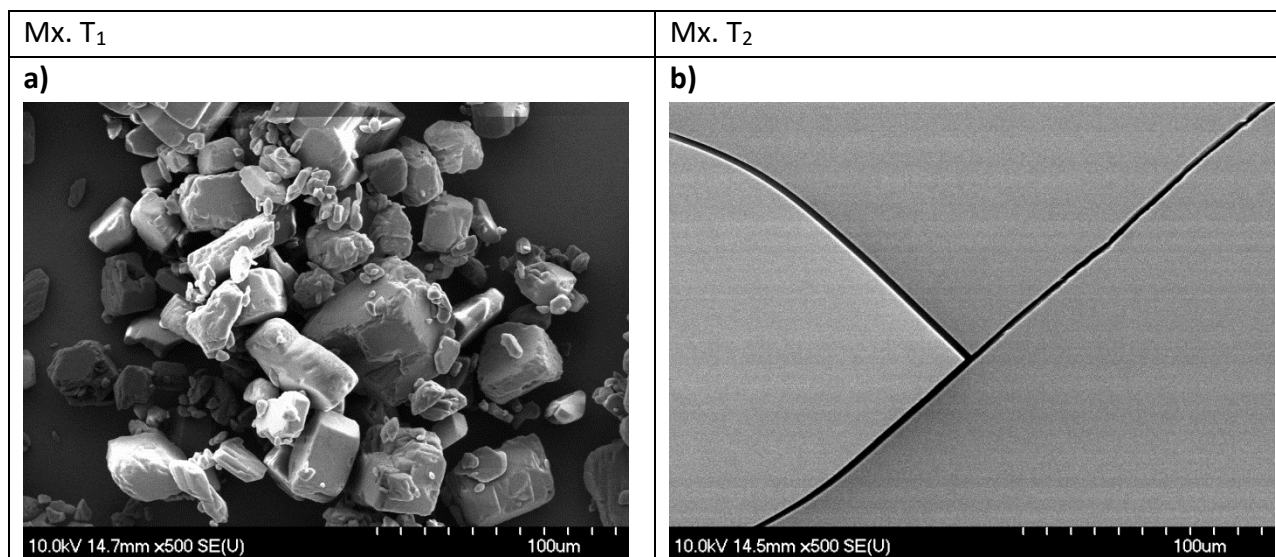
Az elemi nanorészecskék kialakulásának iménti modelljét összehasonlítva a megfigyeléseinkkel, tegyük fel, hogy az a meloxicamra is alkalmazható. Mivel azonban a meloxicam egy hőérzékeny szerves molekula, szükségszerű megvizsgálni az anyag kémiai károsodás nélküli fázisváltozásának lehetőségét. Adatbázisok szerint a meloxicam olvadáspontja atmoszférikus környezetben $T = 254\text{ °C}$ és elvileg ezen a hőmérsékleten el is bomlik [25]. Ahogy azt a termális modellnél már láthattuk, ezt a hőmérsékletet magasan meghaladja a felszíni hőmérséklet az abláció során, de az FTIR (**42. ábra** és **43. ábra**) és Raman spektroszkópia (**44. ábra** és **45. ábra**) a vizsgált részecskékben nem mutatta ki a meloxicam kémiai bomlását és a HPLC-MS (**46. ábra**) is kis relatív mennyiségben detektálta a meloxicam impurity B-t. A magas hőmérséklet miatt a felszíni réteg el kellett párologjon, s feltehetően el is bomlott, de a bomlástermékek döntően illékony formában jöhettek létre, nem hagyva mérhető maradványt a részecskében, a részecskéken. Mindezek mellett az is feltehető, hogy az abláció során kialakult hőmérsékleti és nyomásviszonyok a fázisdiagram egy olyan részére estek, ahol a fázisátalakulás a bomlási hőmérséklet elérése nélkül bekövetkezik. Ezáltal összeegyeztethető lenne a halmazállapotváltozás, ami szükségszerűnek tűnik a gömb alakhoz, és az irodalomban feltüntetett bomlási hőmérséklet.

Normál atmoszferikus nyomáson ($\sim p = 101.300 \text{ Pa}$) végeztünk hevítési kísérleteket a referencia meloxicammal, majd a visszamaradó mintát elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, hogy lássuk, hogy milyen struktúrát kapunk különböző hőmérsékleteken. A minták hevítésére a korábbiakban is alkalmazott laboratóriumi kemencét használtuk, néhány milligramm gyári meloxicam port 10 *percre* az olvadáspont (T_m) alatti (T_1) és feletti (T_2) hőmérsékletű kemencébe helyeztünk, majd FTIR (**57. ábra (a)**), Raman (**57. ábra (b)**) és SEM (**58. ábra**) vizsgálatoknak vetettük alá.

A T_1 ($<T_m$) hőfokra melegített minta a hevítés hatására enyhe elszíneződést mutatott, barnás árnyalat adódott az eredeti sárga színhez, de megőrizte por jellegét. Az elektronmikroszkópos képeken a morfológia és méret lényegében azonos a gyári poréval és az FTIR és Raman spektrumban sem volt eltérés. Ezzel szemben T_2 ($>T_m$) hőmérsékletre melegített meloxicam elszéneseedett, a kezdeti sárga por egy fekete filmszerű réteggé alakult át. A SEM felvételeken összefüggő, sima felszínt és benne egy-egy repedést lehetett megfigyelni, míg az FTIR és Raman spektrumokból elveszett az összes karakterisztikus csúcs, feltehetően a hőkárosodás miatt. Ez megerősítette, hogy atmoszferikus nyomáson az irodalomban szereplő olvadáspont egybeesik a meloxicam bomlási hőmérsékletével, illetve, hogy ez a degradáció FTIR és Raman spektroszkópiával kimutatható.

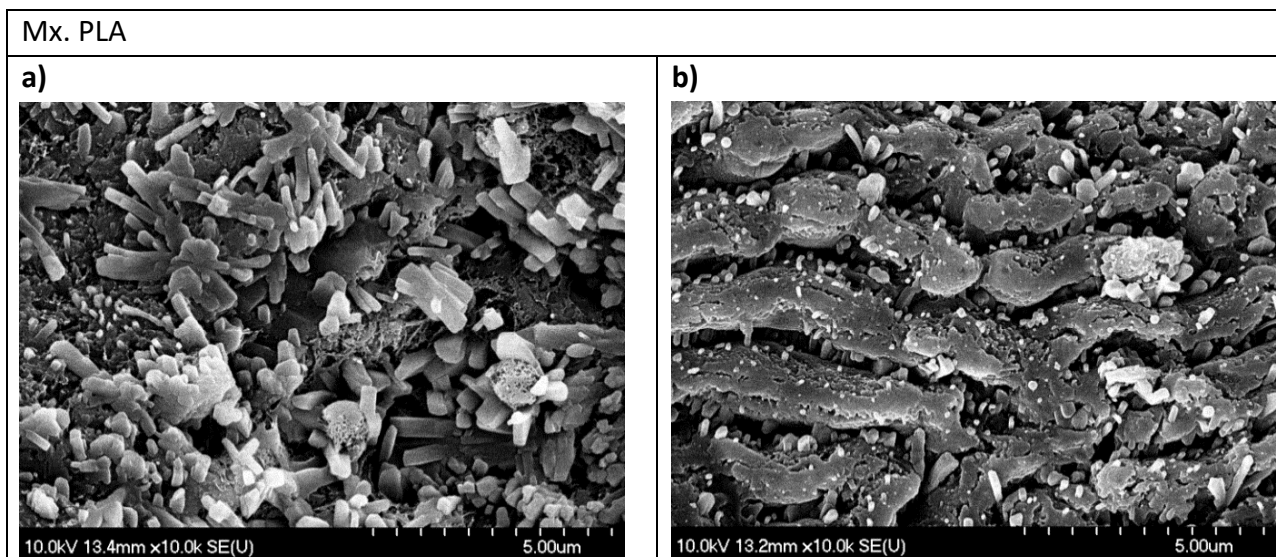


57. ábra A meloxicam por T_1 ($<T_m$) (Mx. T₁) és T_2 ($>T_m$) (Mx. T₂) hőfokokra hevítésének hatása az **(a)** FTIR és **(b)** Raman spektrumra, a meloxicam referenciához (Mx. ref.) viszonyítva. Az összehasonlíthatóság érdekében minden **(a)** FTIR spektrum az 1550 $1/cm$ körüli csúcsra, míg minden **(b)** Raman spektrum az 1530 $1/cm$ körüli csúcsra normált.



58. ábra SEM képek **(a)** T₁ (<T_m) (Mx. T₁) és **(b)** T₂ (>T_m) (Mx. T₂) hőfokokra hevített kemencébe helyezett meloxicam porról. Nagyítások: (a)-(b): 500.

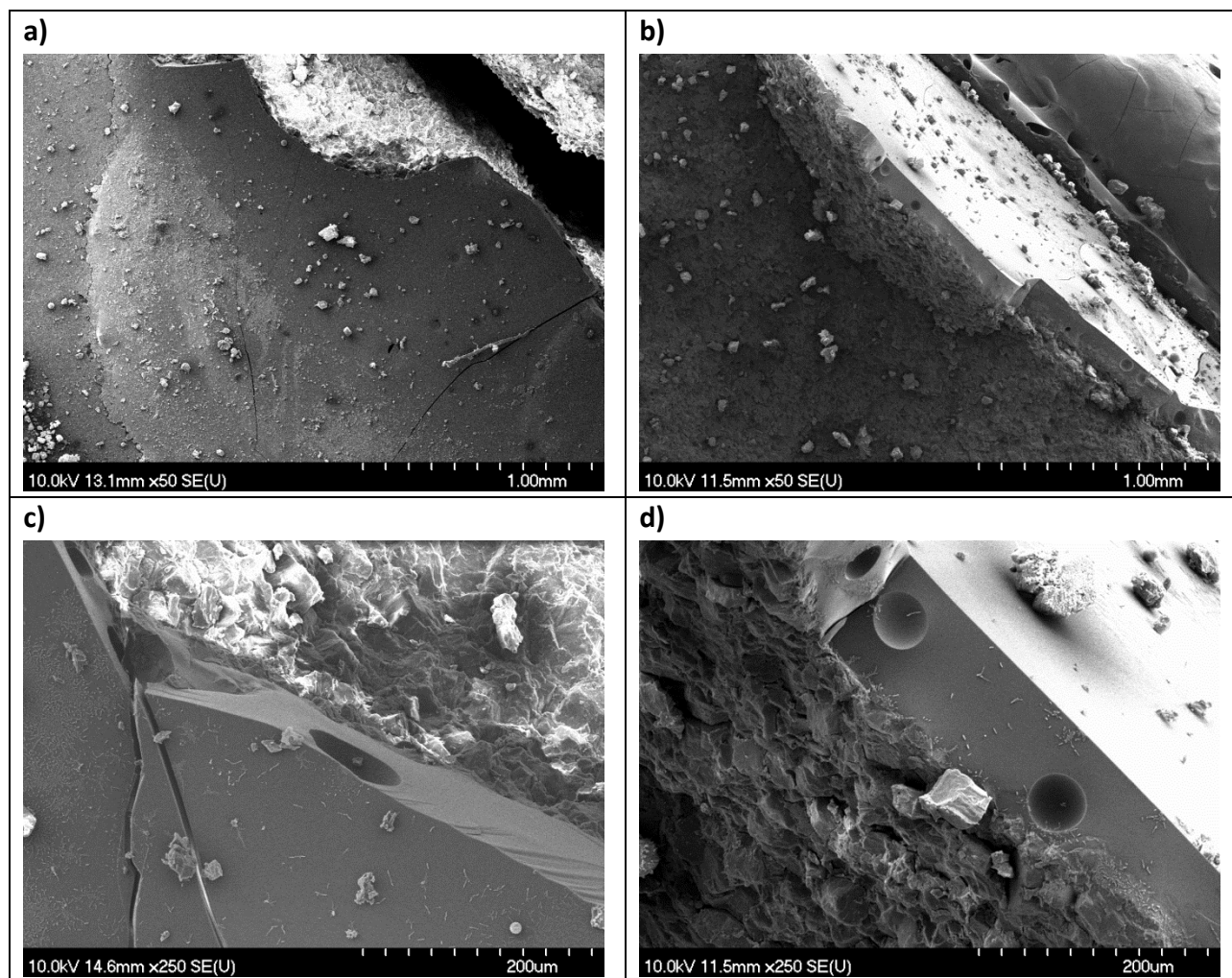
A levegőbeli abláció esetén is megvizsgáltuk az ablált tabletta felszínét. PLA esetén az alacsonyabb ismétlési frekvencia ($f = 10 \text{ Hz}$) alkalmazásakor véletlenszerű vagy virág alakba, sugarasan elhelyezkedő tömbszerű/lamináris struktúrákat figyeltünk meg (**59. ábra (a)**), amik feltehetően rekristallizáció eredményei. Emellett az ablált tabletták egyes részeit körülbelül $1,8 \mu\text{m}$ periódustávolságú, párhuzamos vonalak borították (**59. ábra (b)**), amelyek nagy hasonlóságot mutatnak a lézer által indukált periodikus felületi struktúra (laser-induced periodic surface structure, LIPSS) jelenségével, amely gyakran előfordul a különböző anyagok femtoszekundumos ablációja következtében [256].



59. ábra SEM képek a PLA (Mx. PLA) eljárással ($F = 1,5 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$) megmunkált meloxicam tabletta felszínéről, amit **(a)** random vagy sugaras elhelyezkedésű tömbök és **(b)** helyenként párhuzamos vonalakkal álló, LIPSS jellegű struktúra borít. Nagyítások: (a)-(b): 10k. [155]

A PLA eljárás során a megnövelt ismétlési frekvencia ($f = 1 \text{ kHz}$) esetén az ablációs gödör vizsgálata céljából félbetörtünk egy megmunkált tablettát, hogy a felszínt **(60. ábra (a), (c))** és a keresztmetszetet **(60. ábra (b), (d))** is tudjuk elemezni.

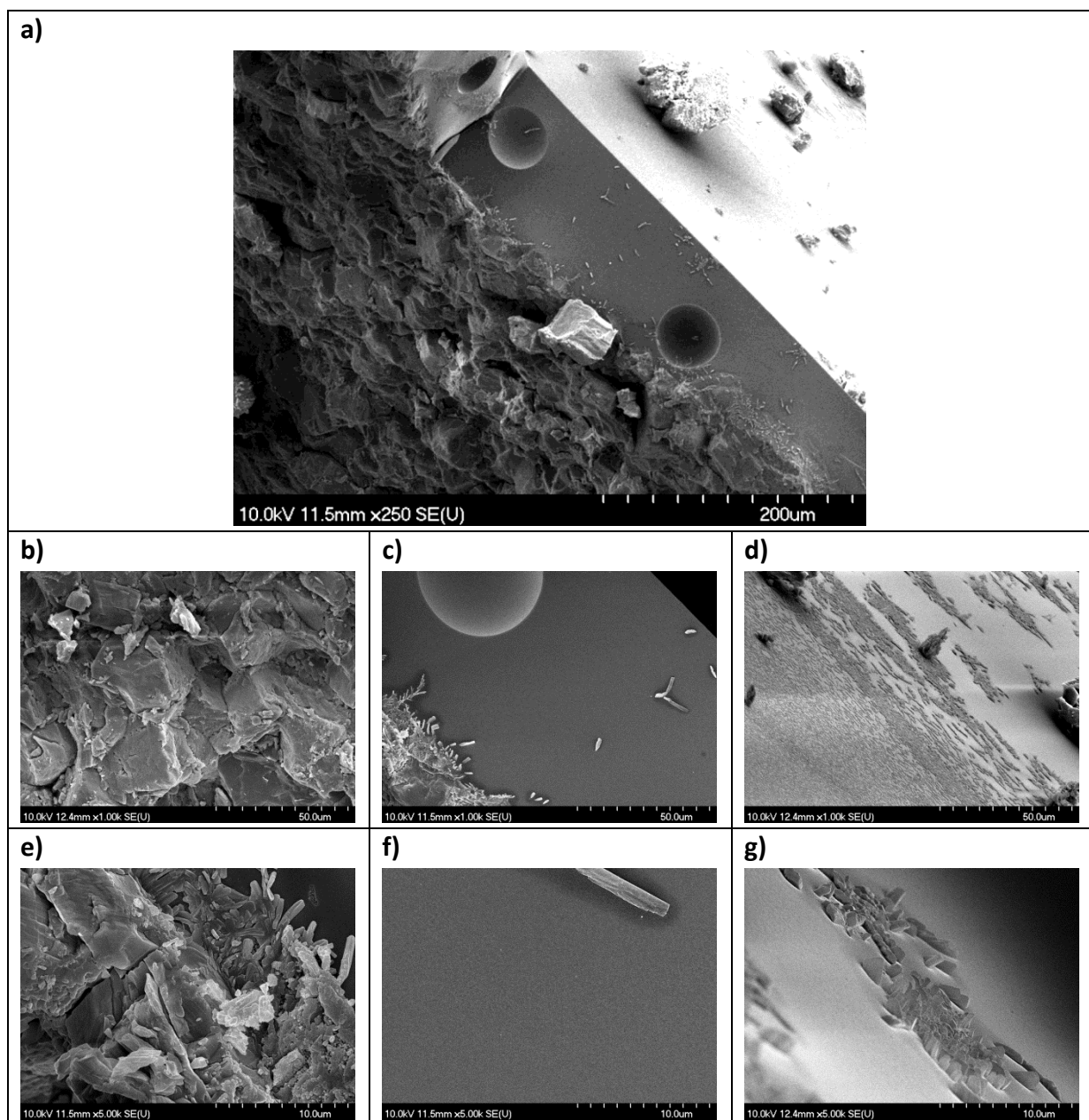
Felülnézetben az ablációs nyom a megmunkálatlan felülettől jól elkülöníthető gödör volt **(60. ábra (a))**. A mélyedés körvonalát repedés övezte, ami utalhat hőtágulás okozta folyamatokra. A gödör felülete igen sima volt, de elszórtan tömörszerű kristályok emelkedtek ki a felszínből vagy helyezkedtek el a felszínen, amiket több esetben sugárirányú, elágazó tűskék vettek körül **(60. ábra (b))**.



60. ábra SEM képek a PLA (Mx. PLA) eljárással ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) megmunkált meloxicam tabletta **(a), (c)** felszínéről, felülnézetből és **(b), (d)** keresztmetszetéről, oldalnézetből. Nagyítások: (a)–(b): 50; (c)–(d): 250. [157]

Az ablációs gödör keresztmetszeti képén **(61. ábra)** jól elkülöníthető két tartomány: a mélyebben elhelyezkedő, a tablettázás során összepréselt, gyakorlatilag érintetlen kristályokból álló réteg **(61. ábra (b), (e))** és a tömör, néhány félgömb alakú üreget tartalmazó, sima felületű, homogén felső réteg **(61. ábra (c), (f))**. Ezen felül, a felszín oldalnézeti képén megfigyelhetők töret szerű, kristályos darabok **(61. ábra (d), (g))** amik vagy visszahullva beágyazódtak, vagy az ablációs nyomból nőttek ki re-kristallizáció révén.

A felületi réteg jellegét tekintve a lézeres abláció során tipikusan kialakuló hőkárosodott/hőérintett zónára (heat-affected zone, HAZ) hasonlít. Ez az a térfogat, ahol a lézeres besugárzás hőhatása jelentkezik, míg alatta az érintetlen tömbi anyag foglal helyet. A HAZ esetünkben elérte akár a $200\text{ }\mu\text{m}$ vastagságot is, ami messze meghaladja a termális számítások során számolt mikrométer nagyságrendű optikai behatolási mélységet. Mindez feltehetően a nagy ismétlési frekvencia eredménye. Az $f = 1\text{ kHz}$ ismétlési frekvencia esetén a betáplált energia hőként akkumulálódhatott, az egyes impulzusok között nem telt el annyi idő, hogy a termális egyensúly visszaálljon. A visszamaradó, folyamatosan melegedő felszíni réteg így fokozatosan meglágyult, majd megolvadt, aminek eredményeképpen a beeső impulzusok már egy olvadék tócsát abláltak és az ebből kiszakadó cseppekből is keletkezhetnek a felfogott részecskék.

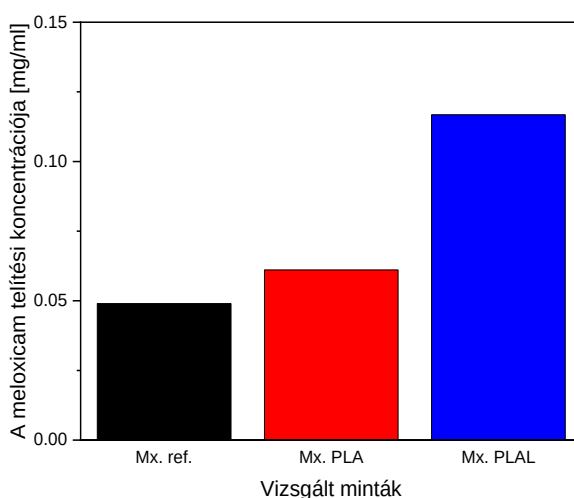


61. ábra SEM képek a PLA (Mx. PLA) eljárással ($F = 1,9\text{ J/cm}^2$, $f = 1\text{ kHz}$) megmunkált meloxicam tabletta **(a)** keresztmetszetéről: **(b)**, **(e)** tömbi anyag, **(c)**, **(f)** tömör, hőkárosodott (HAZ) réteg, **(d)**, **(g)** a felszínből kiemelkedő töret jellegű, kristályos darabok oldalnézetből. Nagyítások: (a): 250; (b)–(d): 1 k; (e)–(g): 5 k. [157]

A PLA ablációs nyom vizsgálata megerősítette, hogy termális folyamatok döntőek lehetnek a levegőbeli femtoszekundumos lézeres abláció során. A termális folyamatokat kísérhette amorfizáció, a keltett részecskék morfológiája összhangban van az FTIR, DSC és XRPD eredményekkel, amik a kristályosság megváltozására utalnak.

6.2.4 Gyógyászati alkalmazhatóság

A femtoszekundumos impulzuslézeres ablációval előállított részecskék oldódási tulajdonságait vizsgálva megállapíthattuk, hogy mind a PLA, mind a PLAL eljárás esetén megnövekedett a meloxicam telítési koncentrációja a referencia porhoz viszonyítva pH 7,4 puffer közegben (**62. ábra**). A referencia meloxicam telítési koncentrációja 0,0490 mg/ml értékről 0,0611 mg/ml-re nőtt a PLA, míg 0,1168 mg/ml-re a PLAL eljárás következtében.



62. ábra A különböző közeg telítési meloxicam koncentrációra gyakorolt hatásának vizsgálata a levegőbeli (Mx. PLA) és a desztillált víz közegbeli (Mx. PLAL) impulzuslézeres ablációval ($F = 1,9 \text{ J/cm}^2$, $f = 1 \text{ kHz}$) előállított minták, illetve a referencia meloxicam por (Mx. ref.) esetén. [157]

A femtoszekundumos lézeres ablációval keltett részecskék oldékonyságbeli javulása kisebb mértékű, mint amit a nanoszekundumos minták (**39. ábra**) esetén tapasztaltunk. A PLAL esetén a számottevő aggregáció/agglomeráció és a meloxicam impurity B nagyobb arányú jelenléte is befolyásolhatta a kapott meloxicam oldékonyság értéket. Mivel egységi volt mindegyik mintából bemérve és relatíven a PLAL mintában volt a legnagyobb arányban jelen a bomlástermék, így a PLAL eljárással előállított meloxicam részecskék oldékonysága valójában jobb volt, mint a számérték, amit mértünk. A PLA esetén megfigyelt gömb alak a felület/térfogat arány szempontjából igen kedvezőtlen, ami alacsonyabb oldékonyságot eredményezhetett.

6.2.5 Összefoglaló a femtoszekundumos ablációról

A meloxicam femtoszekundumos impulzuslézeres ablációja levegő (PLA) és desztillált víz (PLAL) közegben is effektív részecskeméret csökkentő és oldékonyságot fokozó eljárásnak bizonyult.

A PLA és PLAL technikákkal előállított részecskék spektrumában megtalálhatók voltak a meloxicamra jellemző FTIR és Raman csúcsok. A PLA részecskék összetételbeli vizsgálata során tapasztaltunk eltérést az ablációs és a referencia minták FTIR spektruma között, amit azonban nem kémiai degradáció, hanem feltehetően a kristályosság változása okozott. A HPLC-MS vizsgálatok során, a nanoszekundumos ablációhoz hasonlóan, a meloxicam impurity B azonosítása történt meg, aminek a meloxicamhoz viszonyított relatív aránya rendre <5% és ~20% volt a PLA és PLAL technikák esetén. A vízbeli abláció során tapasztalt megnövekedett arányú kémiai roncsolódás a nagy ismétlési frekvencia esetén bekövetkezett lézeres fragmentáció eredménye lehetett.

Az elektronmikroszkópos felvételek, valamint a DSC és XRPD vizsgálatok megerősítették azt a feltevést, miszerint a femtoszekundumos lézeres abláció során a létrehozott részecskék kristályossági állapota megváltozott, megjelent egy feltehetően amorf fázis. A jelentős részecskeméret redukció mind a PLA, mind a PLAL esetén megfigyelhető volt, bár a morfológia jelentősen függött a közegtől. Levegőben többnyire gömbök keletkeztek, míg a vízben a töret jelleg és az amorf jellegű anyagtömeg összessége dominált. A mechanizmus vizsgálatánál elsősorban a részecskék és a megmunkált tabletta alapján tudtunk következtetéseket levonni. A PLA során a tabletta felszíne feltehetően meglágyult, megolvadt és a részecskék olvadék cseppek gyors megszilárdulása vagy részleges/teljes re-kristallizációja során keletkezhettek. A levegőben a termikus hatások dominálhattak. A PLAL esetén a besugárzás által kiváltott lökéshullám és a termikus effektusok mellett a lézeres fragmentáció is döntő szerepet játszhatott.

Mind a két közeg esetén növekedett az oldékonyság a referencia mintához viszonyítva. Bár a PLA esetén igen kis mértékű volt ez a javulás, a részecskék mérettartománya és aerodinamikailag a gömb alak igen kedvező lehet tüdőbe juttatás esetén. A PLAL esetén a telítési koncentráció a kiindulási anyagra jellemző érték kétszerese lett, de a fellépő aggregáció/agglomeráció miatt szükségszerű lehet további formulálási lépések alkalmazása.

7. Összegzés

A vízben rosszul oldódó hatóanyagok gyógyszeripari térnyerése miatt számos eljárást dolgoztak ki, amelyek az oldékonyságot, s ezáltal a biológiai hasznosíthatóságot kívánják növelni. A módszerek alapját képezheti többek között a részecskeméret csökkentés, ami a megnövekedett aktív felület révén, valamint az amorfizálás, ami pedig a kristályrács felbontása révén éri el a kívánt javulást.

Kutatásaim során megvizsgáltam, hogy a nanotechnológiában elterjedt lézeres ablációt, mint részecskeméret csökkentő és amorfizáló eljárást lehet-e gyógyszerhatóanyagok esetén is alkalmazni. A lézer ablációs módszer hatékonyságának teszteléséhez modell hatóanyagként a nem-steroid gyulladáscsökkentők közé sorolt, gyenge vízoldhatósággal rendelkező meloxicam vegyületet választottuk. A keltett részecskéket széleskörű kémiai, morfológiai és hatástani vizsgálatoknak vettem alá, valamint a mögöttes mechanizmust is feltérképeztem. Munkám eredményeit az alábbi tézispontokban összefoglalom.

T1. Meloxicam céltárgy desztillált víz közegbeli nanoszekundumos impulzuslézeres ablációjának (PLAL) vizsgálata: részecskék generálása és karakterizálása

Vizsgáltam a nanoszekundumos lézeres abláció paramétereinek a részecskék keltésére gyakorolt hatását. A céltárgyat képező préselt meloxicam tablettát különböző lézer hullámhosszak ($\lambda = 248, 532$ és 1064 nm) és energiasűrűségek ($\sim F = 4\text{--}13\text{ J/cm}^2$) alkalmazása mellett sugároztam be.

T1/A A PLAL eljárással generált részecskéket, valamint a gyári referencia port FTIR és Raman spektroszkópiai módszerekkel analizáltam. Az eredményeket összevetve megállapítottam, hogy a lézeres abláció nem idézett elő számottevő változást a spektrumokban, vagyis a keltett részecskék túlnyomórészt megőrizték kémiai összetételüket. Az együttműködő partnerek által végzett HPLC-MS mérés megerősítette, hogy kis arányú volt csak a detektálható degradáció, a meloxicam impurity B melléktermék volt csak jelen detektálható mennyiségben. [S1] [S3]

T1/B A keltett részecskék morfológiáját és méreteloszlását pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján jellemeztem, a kristályosságot XRPD módszerrel vizsgáltam. Megmutattam, hogy a PLAL technika alkalmazható részecskeméret csökkentő eljárásként: töredezett kristálydarabokra hasonlító, néhány száz nanométer és néhány mikrométer közötti méretű részecskéket állítottam elő, mely mérettartomány optimális a tüdőbe juttatáshoz. A lézeres abláció során nem ment végbe kimutatható amorfizáció, a részecskék a kiinduló anyaghoz hasonlóan kristályos szerkezetűek maradtak. [S1] [S3]

T1/C Spektrofotométeres extinkciós vizsgálatok információt szolgáltattak az ülepedési és az oldódási folyamatok párhuzamos zajlásáról, melyek időbeli lefutása fontos paraméter a további formulálás tervezéséhez. Kimutattam, hogy az ablációval létrehozott mintából több meloxicam kerül az oldatba, mint ugyanolyan mennyiségű referencia porból. Az együttműködő partnerek által végzett oldékonysági vizsgálatok is megerősítették ezt: a referenciához viszonyítva az általam lézeres ablációval előállított minták oldhatósága a többszörösére (4–8–9-szeresére) nőtt. [S1] [S3]

T1/D Az általam előállított és előkészített mintákon az együttműködő partnerek által végzett citotoxicitási és gyulladáscsökkentő hatást vizsgáló mérések adatai alapján megállapítottam, hogy a PLAL eljárással előállított részecskék gyulladáscsökkentő hatása nagymértékben meghaladta a kiindulási, kereskedelembe kapható meloxicamét. A kapott oldhatósági, citotoxicitási és gyulladáscsökkentő tulajdonságok alapján arra számítottunk, hogy a PLAL technikával aprított részecskék alkalmazásával lényegesen kisebb gyógyszerdózis mellett is elérhető ugyanaz a terápiás hatás. [S3]

T2. A meloxicam céltárgy desztillált víz közegbeli nanoszekundumos impulzuslézeres ablációja során lezajló részecskekeltési mechanizmus leírása

T2/A Közelítő termális modellt dolgoztam ki a besugárzott céltárgyban végbemenő hőmérsékletváltozás leírására, amihez az ellipszométeres mérésekkel meghatározott abszorpciós együtthatót és a módosított Lambert-Beer törvényt használtam fel. A termális számítások azt mutatták, hogy a beeső impulzus hatására a céltárgy legfelső rétege ($\sim 100\text{ nm}$ – pár μm) közelítőleg 10^3 – 10^5 K hőmérsékletet érhetett el, ami magasan meghaladta az anyag olvadási/bomlási hőmérsékletét. [S1]

T2/B Az ablációs folyamat feltárása érdekében összeállítottam egy pumpa-próba gyorsfényképező elrendezést, mellyel végig tudtam követni a lézeres abláció során létrejövő lökeshullám akusztikus hullámmá alakulását, a kavitációs buborékok keletkezését és pulzáló méretváltozását, majd az anyagfelhő folyadék közegbe való kiszabadulását. A felvételek alapján megerősítettem azt a korábbi felvetést, hogy a részecskekeltésben a lökeshullám mechanikai aprózó hatása a meghatározó. [S3]

T2/C A kísérleteink alapján megállapítottam, hogy a nanoszekundumos PLAL eljárással történő meloxicam részecskekeltés mechanizmusa az alábbi főbb lépésekből áll: a) A lézerimpulzus energiája elnyelődik a céltárgy felszíni rétegében, melynek anyaga felhevül, elpárolog, elbomlik. b) A gyorsan bekövetkező hőmérséklet-, nyomásváltozás, tágulás lökeshullámot eredményez, amelynek visszahatása a visszamaradt felszínből részecskéket szakít ki. c) A lökeshullám terjedési sebessége lecsökken az akusztikus hullám tartományába, valamint a folyadékban létrejön a kavitációs buborék. d) Bekövetkezik a kavitációs buborék pulzáló méretváltozása, ami további aprózódást eredményezhet. e) A kavitációs buborék összeomlását követően a keltett részecskék eloszlanak a folyadék közegben. [S1] [S3]

T3. Meloxicam céltárgy desztillált víz és levegő közegbeli femtoszekundumos impulzuslézeres ablációja: részecskék generálása és karakterizálása

Vizsgáltam a femtoszekundumos lézeres abláció paramétereinek a részecskék keltésére gyakorolt hatását. Különböző közegek (desztillált víz és levegő), energiasűrűségek ($\sim F = 0,7$ – $1,9\text{ J/cm}^2$) és

ismétlési frekvenciák ($f = \text{néhány Hz}$ vagy 1 kHz) alkalmazása esetén állítottam elő részecskéket meloxicam tabletta céltárgy besugárzásával.

T3/A Az FTIR vizsgálatok kimutatták, hogy az alkalmazott energiasűrűségtől és ismétlési frekvenciától függetlenül a levegőbeli abláció (PLA) esetén a karakterisztikus FTIR csúcsok helyzete megegyezett a referenciával, miközben a relatív intenzitásuk változott, míg vízbeli abláció (PLAL) esetén a spektrumok minden jellemzőjükben jó egyezést mutattak a kiindulási anyagéval. A Raman spektrumok esetén a lézeres ablációval előállított minták spektrumai mindkét közeg alkalmazásakor megegyeztek a referenciáéval. Az együttműködő partnereink által végzett HPLC-MS mérések alapján megállapítottam, hogy a PLA és PLAL mintákban egyaránt jelen volt melléktermékként a meloxicam impurity B, mely a meloxicam molekula töredéke lévén nehezen mutatható ki az FTIR és Raman spektroszkópiai módszerekkel. [S2] [S4]

T3/B A részecskék morfológiáját pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján karakterizáltam. Jelentős különbséget tapasztaltam a levegő és a desztillált víz közegben előállított részecskék között. Kimutattam, hogy PLA esetén az ismétlési frekvencia módosítása kihatott a részecskék jellegére. Ekkor döntően gömb alakú részecskéket kaptunk széles mérettartományban ($\sim 0,1 - \text{néhány } \mu\text{m}$ átmérőjű), változatos felülettel (sima vagy kristálytömbökkel borított). Ezzel szemben a PLAL esetén a részecskék egy része kristályos jellegű volt, töredezett üvegdarabokra hasonlított, míg voltak lekerekített éllel rendelkező, amorf jellegű részecskék és alakatlan, összeállt anyagtömeg is. [S2] [S4]

T3/C Az alacsony ismétlési frekvenciájú levegőbeli abláció során döntően szubmikrométeres részecskéket állítottam elő és megállapítottam, hogy az energiasűrűség változtatása az adott tartományon belül csak a kihozatalt befolyásolta, a méreteloszlást nem. Ezt az együttműködő partnerek által végzett SMPS mérések igazolták. [S2]

T3/D A lézeres ablációval előállított minták XRPD és DSC görbéit összevetettem a referencia anyagéval. Azonos tömegű PLA és PLAL minták XRPD spektrumaiban a karakterisztikus csúcsok helye nem változott, míg intenzitásuk jelentősen csökkent a referenciához viszonyítva. A minták DSC görbéinek vizsgálata alapján kimutattam, hogy az endoterm olvadási csúcsuk az alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódott, illetve ellaposodott, kiszélesedett. Mindkét vizsgálati módszer esetén a PLA minta tért el jobban a referenciától. Az FTIR és SEM vizsgálatok eredményeit is figyelembe véve a változások arra utaltak, hogy részleges amorfizáció is lezajlódhatott, miközben az anyag jelentős része megőrizte a kiindulási polimorf módosulatát, ami az enolos/ I forma (módosulat) volt. [S2] [S4]

T3/E Az általam előállított és előkészített mintákon az együttműködő partnerek által végzett koncentráció mérések alapján igazoltam, hogy a kiinduló porral összehasonlítva mind a PLA, mind pedig a PLAL módszerrel előállított részecskék oldékonysága javult. [S4]

T4. A meloxicam céltárgy desztillált víz és levegő közegbeli femtoszekundumos impulzuslézeres ablációja során lezajló részecskekeltési mechanizmus leírása

T4/A Termális számolások alapján megállapítottam, hogy az alkalmazott energiasűrűségen mind a PLA, mind pedig a PLAL estében a céltárgy felszíni rétegének hőmérséklete jelentősen meghaladta a meloxicam olvadási hőmérsékletét. Hevítési kísérletekkel igazoltam, hogy normál légköri nyomáson valóban egybeesik a meloxicam olvadási és bomlási hőmérséklete, továbbá azt, hogy a degradáció FTIR és Raman spektroszkópiával is kimutatható. A mechanizmust a keltett részecskék és a megmunkált tabletta felszínek pásztázó elektronmikroszkópos felvételei, valamint az egyéb analitikai vizsgálatok során kapott eredmények és a szakirodalom szintéziséből törekedtem megalkotni. Megállapítottam, hogy a közeg alapvetően meghatározza a részecske aprózás jellegét. **[S2] [S4]**

T4/B A levegőbeli abláció esetén a keltett részecskék gömb alakja és a megmunkált tabletta felszín egyaránt olvadásra utalt, ami alapján megállapítottam, hogy a termális hatások meghatározóak voltak a részecskekeltés folyamatában. A kémiai analízis megerősítette, hogy a keltett részecskék az olvadás ellenére sem degradálódtak. Ez feltehetően a femtoszekundumos abláció esetén kialakult speciális nyomás és hőmérséklet paraméterek eredménye lehetett, ami lehetővé tett egy bomlási hőmérséklet alatti, de már olvadással járó fázisátmenetet. **[S2] [S4]**

T4/C Kimutattam egy szerves molekula, a meloxicam esetén nanoaggregátum láncok keletkezését, amely jelenség eddig csak elemi összetevők esetén volt leírva. Ezen felül segédanyagtól mentes meloxicam gömböket tudtam előállítani, amelyek aerodinamikai szempontból és méretük alapján is ideálisak a tüdőbe juttatáshoz. **[S2] [S4]**

T4/D A desztillált víz közegbeli abláció során a töret jellegű kristályok és az amorf jellegű részecskék, anyagtömeg jelenléte alapján megállapítottam, hogy az ablációs folyamat során több mechanizmus is szerepet kapott. Mechanikai hatásként az ablációs lökeshullám részecskéket szakíthat ki a tömbi anyag felszínéből, illetve emellett találhatunk a termális hatásra utaló jeleket is. Megnövelt ismétlési frekvenciánál számottevő lehet a már szuszpenzióban lévő részecskék lézerrel történő kölcsönhatása, a lézeres fragmentáció is. **[S2] [S4]**

8. Summary

The rising number of poorly water-soluble active substances in the pharmaceutical industry has led to the development of a number of processes to improve solubility and thus bioavailability. These mechanisms include particle size reduction, which achieves the improvement through increased active surface area, and amorphization, which achieves the desired outcome through the dissolution of the crystal lattice.

In my research, I have investigated whether laser ablation, which is widely used in nanotechnology, can be applied as a particle size reduction and amorphization technique for active pharmaceutical ingredients. To test the effectiveness of the laser ablation method, meloxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug with poor water solubility, was chosen as a model drug. The generated particles were subjected to extensive chemical, morphological and pharmaceutical applicability studies, additionally the underlying mechanism was also investigated. The results of my work are summarized in the following thesis points.

T1. Nanosecond pulsed laser ablation of a meloxicam target in distilled water (PLAL): particle generation and characterization

I have investigated the effect of nanosecond laser ablation parameters on particle generation. I have generated particles by irradiating a meloxicam tablet target with different wavelengths ($\lambda = 248, 532$ and 1064 nm) and fluences ($\sim F = 4\text{--}13\text{ J/cm}^2$).

T1/A I have analyzed the PLAL generated particles and the reference meloxicam powder by FTIR and Raman spectroscopy. Comparing the results, I have found that laser ablation did not induce significant changes in the spectra, the generated particles predominantly retained their chemical composition. HPLC-MS measurements performed by our collaborating partners confirmed that only a small amount of degradation was detectable and meloxicam impurity B was the only identifiable by-product. [S1] [S3]

T1/B The morphology and size distribution of the generated particles were characterized by scanning electron microscopy and crystallinity was investigated by XRPD. I have demonstrated that the PLAL technique can be used as a particle size reduction technique: particles resembling broken, fragmented crystal pieces, ranging from a few hundred nanometers to a few micrometers in size were produced, which is the optimal size range for pulmonary drug delivery. No detectable amorphization took place during laser ablation and the particles remained crystalline in structure, like the initial material. [S1] [S3]

T1/C The spectrophotometric extinction studies provided information on the parallel occurrence of sedimentation and dissolution processes, the time evolution of which is an important parameter for further formulation design. I have demonstrated that from the laser ablation generated sample more meloxicam can be dissolved than from the same amount of the reference powder. This was confirmed by the solubility tests performed by our collaborating partners: compared to the

reference, the solubility of the laser ablation produced samples increased by several-fold (4-8-9-fold). [S1] [S3]

T1/D Based on the cytotoxicity and anti-inflammatory effect measurements performed by our collaborating partners on the samples I have generated and prepared, I have concluded that the anti-inflammatory effect of the PLAL generated particles was significantly greater than that of the initial commercially available meloxicam. On the basis of the determined solubility, cytotoxicity and anti-inflammatory properties, it is expected that the same therapeutic effect can be achieved at a significantly lower drug dose using the particles produced by the PLAL technique. [S3]

T2. Characterizing the particle generation process/ mechanism of the nanosecond pulsed laser ablation of a meloxicam target in distilled water

T2/A I have developed an approximate thermal model to describe the temperature change in the irradiated target, using the absorption coefficient determined by ellipsometry measurements and the modified Lambert-Beer law. The thermal calculations have indicated that due to the irradiation the top layer of the target ($\sim 100\text{ nm}$ – a few μm) could reach a temperature of approximately 10^3 – 10^5 K which is highly above the melting/ degradation temperature of the material. [S1]

T2/B In order to explore and describe the ablation process, I have built a pump-probe fast photography system to monitor the evolution of the shock wave after laser ablation into an acoustic wave, the formation and pulsating size changes/ rebounding dynamics of the cavitation bubbles, and the particle release into the liquid medium. Based on the measurements I have confirmed the previous hypothesis that the mechanical disintegrating, shredding effect of the shock wave is the dominant mechanism in particle generation. [S3]

T2/C Based on our experiments, I have determined that the mechanism of meloxicam particle generation by nanosecond PLAL process consists of the following main steps: a) The energy of the laser pulse is absorbed by the surface layer of the target, where the material is heated, it evaporates and decomposes. b) The rapid changes in temperature, pressure and the expansion result in the generation of a shock wave and the emerging recoil forces tear out particles from the residual surface. c) The propagation velocity of the shock wave decreases to the acoustic wave range and a cavitation bubble is formed in the liquid. d) The pulsating size changes/ rebounding dynamics of the cavitation bubble occur, which can lead to further size reduction. e) After the collapse of the cavitation bubble, the generated particles are dispersed in the liquid medium. [S1] [S3]

T3. Femtosecond pulsed laser ablation of a meloxicam target in distilled water (PLAL): particle generation and characterization

I have investigated the effect of femtosecond laser ablation parameters on particle generation. I have generated particles by irradiating a meloxicam tablet target in different media (distilled water and air), with different fluences ($\sim F = 0.7\text{--}1.9 \text{ J/cm}^2$) and repetition rates ($f = \text{a few Hz or } 1 \text{ kHz}$).

T3/A The FTIR studies have shown that regardless of the applied fluence and repetition rate, in the case of ablation in air (PLA) the positions of the characteristic FTIR peaks were identical with the reference although their relative intensities varied, while for ablation in water (PLAL) the spectra matched well with the spectrum of the initial material in all their properties. The Raman spectra of the laser ablation generated particles matched the reference spectrum for both media. Based on the HPLC-MS measurements performed by our collaborating partners, I have concluded that both PLA and PLAL samples contained meloxicam impurity B as a by-product, which, being a fragment of the meloxicam molecule, is difficult to detect by FTIR and Raman spectroscopy. [S2] [S4]

T3/B The morphology of the particles was characterized using scanning electron microscopy. I have observed significant differences between particles produced in air and in distilled water media. I have demonstrated that in the case of PLA, the change of the repetition rate affected the morphology of the particles. In this case, predominantly spherical particles were obtained over a wide range of sizes ($\sim 0.1 - \text{a few } \mu\text{m}$ in diameter) with a varied surface texture (smooth or covered with crystal blocks). In contrast, in the case of PLAL, some of the particles were crystalline in nature, resembling broken glass pieces, while there were also amorphous-like particles with rounded edges and shapeless, aggregated/ agglomerated mass as well. [S2] [S4]

T3/C As the result of the low repetition rate laser ablation in air (PLA) I have produced predominantly sub-micrometer particles and concluded that changing the energy density within the investigated range only affected the yield, not the size distribution. This was confirmed by the SMPS measurements performed by our collaborating partners. [S2]

T3/D I have compared the XRPD and DSC curves of the laser ablation generated samples with those of the reference material. In the XRPD spectra of PLA and PLAL samples of the same weight, the position of the characteristic peaks did not change, while their intensities decreased significantly compared to the reference. Based on the examination of the DSC curves of the samples, I have observed that their endotherm melting peaks shifted towards lower temperatures, flattened and broadened. In both measurements, the PLA samples deviated more from the reference than the PLAL samples. Together with the results of the FTIR and SEM studies, the changes suggest that partial amorphization may have occurred, while significant part of the generated material retained its initial polymorphic form, which was the enolic form/ form I. [S2] [S4]

T3/E Based on the concentration measurements performed by our collaborating partners on the samples I have generated and prepared, I have verified that the solubility of both PLA and PLAL generated particles has improved compared to the initial powder. [S4]

T4. Characterizing the particle generation process/ mechanism of the femtosecond pulsed laser ablation of a meloxicam target in distilled water and in air

T4/A Based on thermal calculations, I have demonstrated that at the applied fluences, for both PLA and PLAL, the temperature of the surface layer of the target significantly exceeded the melting temperature of meloxicam. I have verified with heating experiments that the melting and decomposition temperatures of meloxicam do coincide at normal atmospheric pressure and that degradation can be detected by FTIR and Raman spectroscopy. I have aimed to describe the mechanism based on a synthesis of scanning electron microscopy images of the generated particles and the ablated tablet surfaces, as well as other analytical studies and literature. I have concluded that the medium in which the ablation took place fundamentally determines the nature of the particle generation process. [S2] [S4]

T4/B In the case of ablation in air, both the spherical shape of the generated particles and the surface of the ablated tablet were indicating previous melting, which led me to conclude that thermal effects were dominant in the particle generation process. The chemical analysis confirmed that the generated particles were not degraded despite melting. This was presumably the result of the specific pressure and temperature parameters of femtosecond laser ablation, which allowed a phase transition (melting) below the decomposition temperature. [S2] [S4]

T4/C I have described the formation of nanoaggregate chains for an organic molecule, meloxicam, a phenomenon previously described only for elementary compounds. In addition, I have demonstrated the production of excipient-free meloxicam spheres, which are aerodynamically and dimensionally ideal for pulmonary delivery. [S2] [S4]

T4/D Based on the presence of crystalline-like, amorphous-like particles and aggregated/agglomerated mass in the samples generated by ablation in distilled water medium, I have concluded that several mechanisms were involved in the ablation process. As a mechanical effect, the ablation induced shock wave could tear out particles from the surface of the bulk material, and in addition, we can observe indications of a thermal effect. At the increased repetition rate, the interaction of particles already in the suspension with the laser irradiation, i.e., laser fragmentation, may also be significant. [S2] [S4]

9. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10073972

9.1 A tézispontokhoz kapcsolódó referált nemzetközi szakfolyóiratokban megjelent tudományos cikkek listája

[S1] B. Hopp, E. Nagy, F. Peták, T. Smausz K., J. Kopniczky, Cs. Tápai, J. Budai, I. Z. Papp, Á. Kukovecz, R. Ambrus, and P. Szabó-Révész, "Production of meloxicam suspension using pulsed laser ablation in liquid (PLAL) technique," J Phys D Appl Phys, vol. 51, no. 16, p. 165401, Mar. 2018, doi: 10.1088/1361-6463/aab4be.

[S2] E. Nagy, A. Andrásik, T. Smausz, T. Ajtai, F. Kun-Szabó, J. Kopniczky, Z. Bozóki, P. Szabó-Révész, R. Ambrus, and B. Hopp, "Fabrication of Submicrometer-Sized Meloxicam Particles Using Femtosecond Laser Ablation in Gas and Liquid Environments," Nanomaterials, vol. 11, no. 4, p. 996, Apr. 2021, doi: 10.3390/nano11040996.

[S3] E. Nagy, Z. Homik, T. Smausz, J. Kopniczky, M. Náfrádi, T. Alapi, D. Kokai, K. Burián, P. Szabó-Révész, R. Ambrus, and B. Hopp, "A comprehensive analysis of meloxicam particles produced by nanosecond laser ablation as a wet milling technique," Sci Rep, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-16728-9.

[S4] E. Nagy, J. Kopniczky, T. Smausz, M. Náfrádi, T. Alapi, J. Bohus, V. Pajer, P. Szabó-Révész, R. Ambrus, and B. Hopp, "A comparative study of femtosecond pulsed laser ablation of meloxicam in distilled water and in air," Sci Rep (Under Review), Jan. 2023, doi: 10.21203/RS.3.RS-2506430/V1.

9.2 Nemzetközi szakfolyóiratokban megjelent további publikációk listája

[S5] R. Ambrus, P. Szabó-Révész, T. Kiss, E. Nagy, T. Szűcs, T. Smausz, and B. Hopp, "Application of a suitable particle engineering technique by pulsed laser ablation in liquid (PLAL) to modify the physicochemical properties of poorly soluble drugs," J Drug Deliv Sci Technol, vol. 57, p. 101727, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101727.

[S6] T. Gera, E. Nagy, T. Smausz, J. Budai, T. Ajtai, F. Kun-Szabó, Z. Homik, J. Kopniczky, Z. Bozóki, P. Szabó-Révész, R. Ambrus, and B. Hopp, "Application of pulsed laser ablation (PLA) for the size reduction of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)," Sci Rep, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72865-z.

9.3 Konferencia előadások és poszterek

[S7] E. Nagy, F. Peták, T. Smausz K., T. Bellák, A. Nógrádi, and B. Hopp, "Sejtmintázatok kialakítása lézeres technikával", Kvantumelektronika 2018: VIII. Szimpózium a hazai kvantumelektronikai kutatások eredményeiről, p-34, 2018.

[S8] E. Nagy, F. Peták, T. Smausz K., R. Ambrus, P. Szabóné R., and B. Hopp, “Gyógyszerhatóanyag aprítás folyadék alatti lézeres ablációval”, Kvantumelektronika 2018: VIII. Szimpózium a hazai kvantumelektronikai kutatások eredményeiről, p-33, 2018.

[S9] E. Nagy, F. Petak, T. Szucs, T. Smausz, J. Kopniczky, R. Ambrus, P. Szabo-Revesz, and B. Hopp, “Production of Drug Particles using Pulsed Laser Ablation in Liquid (PLAL) Technique,” in 2019 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe & European Quantum Electronics Conference (CLEO/Europe-EQEC), pp. 1–1., 2019, doi: 10.1109/CLEOE-EQEC.2019.8873211.

[S10] E. Nagy, Z. Homik, T. Smausz, J. Kopniczky, R. Ambrus, P. Szabó-Révész, and B. Hopp, “Laser ablation of meloxicam in liquid environment,” in International Workshop on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, pp. 84–88, 2020.

[S11] T. Smausz, E. Nagy, T. Gera, Z. Homik, J. Kopniczky, T. Ajtai, R. Ambrus, P. Szabó-Révész, M. Ehrhardt, K. Zimmer, P. Lorenz, and B. Hopp, “Study of the fragmentation of solid drug particles during ablation with different pulse length lasers,” in International Workshop on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, pp. 32–37, 2020.

[S12] T. Gera, E. Nagy, T. Smausz, Z. Homik, J. Kopniczky, J. Budai, T. Ajtai, R. Ambrus, P. Szabó-Révész, and B. Hopp, “Size reduction of drug particles by pulsed laser ablation technique,” in Kvantumelektronika 2021, pp. 59–63, 2020.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Hopp Bélának, hogy szaktudása és tapasztalatai megosztásával segítette kutatói pályám alakulását, végigkísérte hallgatói éveimet. Köszönöm, hogy ösztönző és támogató közeget teremtett.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Kopniczky Juditnak és Dr. Smausz Kolumbán Tamásnak mindennemű támogatásukért, a kutatómunkában és publikációkban nyújtott felmérhetetlen szakmai segítségükért, türelmükért és a támogató beszélgetésekért.

Köszönettel tartozom hallgatótársaimnak, Gera Tamásnak, Kondász Bencének, Homik Zsoltnak, Krisztin Rékának, Peták Franciskának és Szűcs Tímeának, hogy az évek során a kísérletekben és a hallgatói élet kihívásaiban egyaránt mellettem álltak, baráti légkört teremtve a laborban.

Köszönetet szeretnék mondani a Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet munkatársainak, különösképpen Dr. Ambrus Ritának és Prof. Szabóné Dr. Révész Piroskának, a kísérletek végrehajtásához és az eredmények elemzéséhez biztosított fáradhatatlan segítségükért.

Hálámat szeretném kifejezni minden együttműködő partnernek, társzerzőnek, hogy szaktudásukkal segítették a munkámat.

Végezetül, de nem utolsó sorban mérhetetlen hálával tartozom családomnak és barátaimnak kimeríthetetlen türelmükért és támogatásukért.

Doktori tanulmányaim során munkámat és a kutatást a következő pályázati források támogatták: Új Nemzeti Kiválóság Program; GINOP-2.3.2-15-2016-00036; University of Szeged Open Access Fund.

11. Irodalomjegyzék

- [1] T. Loftsson and M. E. Brewster, "Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 62, no. 11, pp. 1607–1621, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x.
- [2] M. Mosharraf and C. Nyström, "The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of micro-sized practically insoluble drugs," *Int J Pharm*, vol. 122, no. 1–2, pp. 35–47, Aug. 1995, doi: 10.1016/0378-5173(95)00033-F.
- [3] N. Rasenack, H. Hartenhauer, and B. W. Müller, "Microcrystals for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs," *Int J Pharm*, vol. 254, no. 2, pp. 137–145, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0378-5173(03)00005-X.
- [4] H. Grohgan et al., "Amorphous drugs and dosage forms," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 23, no. 4. Editions de Sante, pp. 403–408, Jan. 01, 2013. doi: 10.1016/S1773-2247(13)50057-8.
- [5] D. Péter et al., "D2 kurzus: OPTIKAI ALAPOK AZ ELI-ALPS TÜKRÉBEN II."
- [6] M. Kim, S. Osone, T. Kim, H. Higashi, and T. Seto, "Synthesis of nanoparticles by laser ablation: A review," *KONA Powder and Particle Journal*, vol. 2017, no. 34. Hosokawa Powder Technology Foundation, pp. 80–90, 2017. doi: 10.14356/kona.2017009.
- [7] G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, and J. R. Crison, "A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability," *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 12, no. 3, pp. 413–420, 1995, doi: 10.1023/A:1016212804288.
- [8] Dr. D. Attila, "A gyógyszertechnológia alapjai | Digitális Tankönyvtár," *Pécsi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézet*, 2013. https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0016_02_gyogyszertechnologia_alapjai/ch11.html (accessed Aug. 30, 2021).
- [9] S. A. A. Rizvi and H. Et Al, "Brief Overview of Various Approaches to Enhance Drug Solubility Applications of Cocrystallized and Ionic Liquid based Systems in Medicine View project Application of Surfactants in Chiral and Achiral Separations View project Journal of Developing Drugs," *J Develop Drugs*, vol. 2, p. 3, 2013, doi: 10.4172/2329-6631.1000115.
- [10] EMA - Committee for Medicinal Products for Human Use, "Committee for Medicinal Products for Human Use ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers ICH M9 on biopharmaceutics classification system-based biowaivers," 2020. Accessed: Aug. 30, 2021. [Online]. Available: www.ema.europa.eu/contact
- [11] C. Miranda et al., "ICH Guideline for Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaiver (M9): Toward Harmonization in Latin American Countries," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 3, p. 363, Mar. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13030363.

- [12] B. Attila, "Szálképzési eljárások gyógyszer technológiai alkalmazása," BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM, Budapest, 2014.
- [13] S. Baghel, H. Cathcart, and N. J. O'Reilly, "Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 105, no. 9. Elsevier B.V., pp. 2527–2544, Sep. 01, 2016. doi: 10.1016/j.xphs.2015.10.008.
- [14] H. V. Chavda, C. N. Patel, and I. S. Anand, "Biopharmaceutics classification system," *Systematic Reviews in Pharmacy*, vol. 1, no. 1. Systematic Reviews in Pharmacy, pp. 62–69, Jan. 04, 2010. doi: 10.4103/0975-8453.59514.
- [15] A. Dr. Shaukat and K. Dr. Karl, "Challenges and Opportunities in Oral Formulation Development," *American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology*, Dec. 11, 2012. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/126887-Challenges-and-Opportunities-in-Oral-Formulation-Development/> (accessed Aug. 30, 2021).
- [16] O. Wolk, R. Agbaria, and A. Dahan, "Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development," *Drug Des Devel Ther*, vol. 8, pp. 1563–1575, Sep. 2014, doi: 10.2147/DDDT.S68909.
- [17] "Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry," 2017.
- [18] L. X. Yu *et al.*, "Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiver extensions," *Pharm Res*, vol. 19, no. 7, pp. 921–925, Jul. 2002, doi: 10.1023/A:1016473601633.
- [19] A. K. Nair *et al.*, "Statistics on BCS classification of generic drug products approved between 2000 and 2011 in the USA," *AAPS Journal*, vol. 14, no. 4. AAPS J, pp. 664–666, Dec. 2012. doi: 10.1208/s12248-012-9384-z.
- [20] I. Nikolakakis and I. Partheniadis, "Self-Emulsifying granules and pellets: Composition and formation mechanisms for instant or controlled release," *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 4. MDPI AG, Dec. 01, 2017. doi: 10.3390/pharmaceutics9040050.
- [21] Y. Seok Youn, J. Lee, S. Hoon Jeong, B. Soo Shin, and E.-S. Park, "Pharmaceutical Usefulness of Biopharmaceutics Classification System: Overview and New Trend," *J Pharm Investig*, vol. 40, p. 1, 2010, doi: 10.4333/KPS.2010.40.S.001.
- [22] S. Alladi and N. R. Shastri, "Semi solid matrix formulations of meloxicam and tenoxicam: An in vitro and in vivo evaluation," *Arch Pharm Res*, vol. 38, no. 5, pp. 801–812, May 2015, doi: 10.1007/s12272-014-0396-3.
- [23] P. Luger, K. Daneck, W. Engel, G. Trummelitz, and K. Wagner, "Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID," *European Journal of*

Pharmaceutical Sciences, vol. 4, no. 3, pp. 175–187, May 1996, doi: 10.1016/0928-0987(95)00046-1.

- [24] H. S. Smith and W. Baird, “Meloxicam and selective COX-2 inhibitors in the management of pain in the palliative care population,” *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*, vol. 20, no. 4. Weston Medical Publishing, pp. 297–306, 2003. doi: 10.1177/104990910302000413.
- [25] M. | C.- PubChem, “Meloxicam | C14H13N3O4S2 - PubChem,” *Date accessed: 2020-02-05*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Meloxicam#section=Solubility&fullscreen=true> (accessed Feb. 05, 2020).
- [26] D. R. Weyna *et al.*, “Improving solubility and pharmacokinetics of meloxicam via multiple-component crystal formation,” *Mol Pharm*, vol. 9, no. 7, pp. 2094–2102, Jul. 2012, doi: 10.1021/mp300169c.
- [27] N. Seedher and S. Bhatia, “Solubility enhancement of cox-2 inhibitors using various solvent systems,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, no. 3, p. 36, 2003, doi: 10.1208/pt040333.
- [28] “EMA/255706/2013 - EPAR-összefoglaló a nyilvánosság számára - Meloxidolor,” 2013.
- [29] M. M. Ghorab, H. M. Abdel-Salam, M. A. El-Sayad, and M. M. Mekhel, “Tablet formulation containing meloxicam and B-cyclodextrin: Mechanical characterization and bioavailability evaluation,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 5, no. 4, 2004, doi: 10.1208/pt050459.
- [30] A. Bekker, C. Kloepping, and S. Collingwood, “Meloxicam in the management of post-operative pain: Narrative review,” *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, vol. 34, no. 4. Wolters Kluwer Medknow Publications, pp. 450–457, Oct. 01, 2018. doi: 10.4103/joacp.JOACP_133_18.
- [31] G. Hanft, D. Türck, S. Scheuerer, and R. Sigmund, “Meloxicam oral suspension: A treatment alternative to solid meloxicam formulations,” *Inflammation Research*, vol. 50, no. SUPPL. 1, pp. 35–37, 2001, doi: 10.1007/pl00000219.
- [32] H. M. M. Arafa, M. H. Abdel-Wahab, M. F. El-Shafeey, O. A. Badary, and F. M. A. Hamada, “Anti-fibrotic effect of meloxicam in a murine lung fibrosis model,” *Eur J Pharmacol*, vol. 564, no. 1–3, pp. 181–189, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.ejphar.2007.02.065.
- [33] A. P. Goldman *et al.*, “Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells,” *Carcinogenesis*, vol. 19, no. 12, pp. 2195–2199, 1998, doi: 10.1093/carcin/19.12.2195.
- [34] M. Ochi, R. Inoue, Y. Yamauchi, S. Yamada, and S. Onoue, “Development of meloxicam salts with improved dissolution and pharmacokinetic behaviors in rats with impaired gastric motility,” *Pharm Res*, vol. 30, no. 2, pp. 377–386, Feb. 2013, doi: 10.1007/s11095-012-0878-2.

- [35] H. K. Han and H. K. Choi, "Improved absorption of meloxicam via salt formation with ethanolamines," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 65, no. 1, pp. 99–103, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.ejpb.2006.07.003.
- [36] N. B. Naidu, K. P. R. Chowdary, K. V. R. Murthy, V. Satyanarayana, A. R. Hayman, and G. Becket, "Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-cyclodextrin binary systems," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 35, no. 1, pp. 75–86, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.jpba.2004.01.003.
- [37] P. K. Shende, R. S. Gaud, R. Bakal, and D. Patil, "Effect of inclusion complexation of meloxicam with β -cyclodextrin- and β -cyclodextrin-based nanosponges on solubility, in vitro release and stability studies," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 136, pp. 105–110, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.09.002.
- [38] S. G. Vijaya Kumar and D. N. Mishra, "Preparation, characterization and in vitro dissolution studies of solid dispersion of meloxicam with PEG 6000 1," *Yakugaku Zasshi*, vol. 126, no. 8, pp. 657–664, 2006, doi: 10.1248/yakushi.126.657.
- [39] D. Pathak, S. Dahiya, and K. Pathak, "Solid dispersion of meloxicam: Factorially designed dosage form for geriatric population," *Acta Pharmaceutica*, vol. 58, no. 1, pp. 99–110, Mar. 2008, doi: 10.2478/v10007-007-0048-y.
- [40] C. C. Bartos, P. Szabó-Révész, C. C. Bartos, G. Katona, O. Jójárt-Laczovich, and R. Ambrus, "The Effect of an Optimized Wet Milling Technology on the Crystallinity, Morphology and Dissolution Properties of Micro- and Nanonized Meloxicam," *Molecules*, vol. 21, no. 4, p. 507, Apr. 2016, doi: 10.3390/molecules21040507.
- [41] M. Farid, D. A. El-Setouhy, M. A. El-Nabarawi, and T. El-Bayomi, "Particle engineering/different film approaches for earlier absorption of meloxicam," *Drug Deliv*, vol. 23, no. 7, doi: 10.3109/10717544.2014.982262.
- [42] R. Ambrus, P. Kocbek, J. Kristl, R. Šibanc, R. Rajkó, and P. Szabó-Révész, "Investigation of preparation parameters to improve the dissolution of poorly water-soluble meloxicam," *Int J Pharm*, vol. 381, no. 2, pp. 153–159, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.07.009.
- [43] S. Iurian *et al.*, "Development of oral lyophilisates containing meloxicam nanocrystals using QbD approach," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 104, pp. 356–365, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.ejps.2017.04.011.
- [44] M. L. Cheney, D. R. Weyna, N. Shan, M. Hanna, L. Wojtas, and M. J. Zaworotko, "Coformer Selection in Pharmaceutical Cocrystal Development: a Case Study of a Meloxicam Aspirin Cocrystal That Exhibits Enhanced Solubility and Pharmacokinetics," *J Pharm Sci*, vol. 100, no. 6, pp. 2172–2181, Jun. 2011, doi: 10.1002/jps.22434.
- [45] N. Bolourchian, M. Nili, S. M. Foroutan, A. Mahboubi, and A. Nokhodchi, "The use of cooling and anti-solvent precipitation technique to tailor dissolution and physicochemical properties of meloxicam for better performance," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 55, p. 101485, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2019.101485.

- [46] N. Bolourchian, M. Nili, S. Shahhosseini, A. Nokhodchi, and S. M. Foroutan, "Crystallization of meloxicam in the presence of hydrophilic additives to tailor its physicochemical and pharmaceutical properties," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 66, p. 102926, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.jddst.2021.102926.
- [47] K. T. Savjani, A. K. Gajjar, and J. K. Savjani, "Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques," *ISRN Pharm*, vol. 2012, pp. 1–10, 2012, doi: 10.5402/2012/195727.
- [48] J. Salazar, R. H. Müller, and J. P. Möschwitzer, "Combinative Particle Size Reduction Technologies for the Production of Drug Nanocrystals," *J Pharm (Cairo)*, vol. 2014, pp. 1–14, 2014, doi: 10.1155/2014/265754.
- [49] A. N. Amina M, A. K. M. M af, and K. Ahlam A, "PREPARATION AND EVALUATION OF MELOXICAM SOLID DISPERSIONS BY SOLVENT EVAPORATION METHOD," *International Research Journal of Pharmacy*, vol. 5, no. 11, pp. 838–845, Dec. 2014, doi: 10.7897/2230-8407.0511172.
- [50] European Medicines Agency, "EMA/499895/2010 - Scientific discussion for the approval of Meloxoral," 2011. Accessed: Aug. 23, 2022. [Online]. Available: www.ema.europa.eu
- [51] J. T. Jacon Freitas, O. M. M. Santos Viana, R. Bonfilio, A. C. Doriguetto, and M. B. de Araújo, "Analysis of polymorphic contamination in meloxicam raw materials and its effects on the physicochemical quality of drug product," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 109, pp. 347–358, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.ejps.2017.08.029.
- [52] S. R. Elliott, C. N. R. Rao, and J. M. Thomas, "The Chemistry of the Noncrystalline State," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 25, no. 1, pp. 31–46, Jan. 1986, doi: 10.1002/anie.198600311.
- [53] B. C. Hancock and M. Parks, "What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?," *Pharm Res*, vol. 17, no. 4, pp. 397–404, 2000, doi: 10.1023/A:1007516718048.
- [54] E. Vranić, "Amorphous pharmaceutical solids.," *Bosnian journal of basic medical sciences / Udruzenje basicnih medicinskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences*, vol. 4, no. 3. Association of Basic Medical Sciences of Federation of Bosnia and Herzegovina, pp. 35–39, 2004. doi: 10.17305/bjbms.2004.3383.
- [55] T. Patole and A. Deshpande, "Co-crystallization- a technique for solubility enhancement," *Int J Pharm Sci Res*, 2014.
- [56] N. Seshadri, "Strategies to impact solubility and dissolution rate during drug lead optimization: Salt selection and prodrug design approaches," *Am Pharm Rev*, vol. 7, no. 5, pp. 108–113, 2004.

- [57] Y. S. Thorat, I. D. Gonjari, and A. H. Hosmani, "SOLUBILITY ENHANCEMENT TECHNIQUES: A REVIEW ON CONVENTIONAL AND NOVEL APPROACHES," *IJPSR*, vol. 2, no. 10, 2011.
- [58] T. Loftsson, "Drug solubilization by complexation," *Int J Pharm*, vol. 531, no. 1, pp. 276–280, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.087.
- [59] M. Rodriguez-Aller, D. Guillarme, J. L. Veuthey, and R. Gurny, "Strategies for formulating and delivering poorly water-soluble drugs," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 30, pp. 342–351, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.jddst.2015.05.009.
- [60] R. Jain, N. Jain, and S. K. Jain, "QUANTITATIVE ESTIMATION OF MELOXICAM: A NOVEL APPROACH USING HYDROTROPIC SOLUBALIZATION TECHNIQUE," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 6, 2013.
- [61] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, "Handbook of Pharmaceutical Excipients."
- [62] M. K. Vadlamudi and S. Dhanaraj, "Significance of excipients to enhance the bioavailability of poorly water-soluble drugs in oral solid dosage forms: A Review," in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Dec. 2017, vol. 263, no. 2. doi: 10.1088/1757-899X/263/2/022023.
- [63] L. H. Emara, A. A. El-Ashmawy, N. F. Taha, K. A. El-Shaffei, E. S. M. Mahdey, and H. K. El-kholly, "Nano-crystalline cellulose as a novel tablet excipient for improving solubility and dissolution of Meloxicam," *J Appl Pharm Sci*, vol. 6, no. 2, pp. 032–043, 2016, doi: 10.7324/JAPS.2016.60205.
- [64] T. Woraphatphadung, W. Sajomsang, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, and P. Opanasopit, "Polymeric Micelles for Enhanced Solubility of Meloxicam in Oral Drug Delivery," *Adv Mat Res*, vol. 1060, pp. 7–11, Dec. 2014, doi: 10.4028/www.scientific.net/amr.1060.7.
- [65] B. Sipos *et al.*, "Quality by Design Based Formulation Study of Meloxicam-Loaded Polymeric Micelles for Intranasal Administration," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 8, p. 697, Jul. 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12080697.
- [66] J. W. Millard, F. A. Alvarez-Núñez, and S. H. Yalkowsky, "Solubilization by cosolvents: Establishing useful constants for the log-linear model," *Int J Pharm*, vol. 245, no. 1–2, pp. 153–166, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0378-5173(02)00334-4.
- [67] A. K. Nayak and P. P. Panigrahi, "Solubility Enhancement of Etoricoxib by Cosolvency Approach," *ISRN Physical Chemistry*, vol. 2012, pp. 1–5, Apr. 2012, doi: 10.5402/2012/820653.
- [68] P. R. S. Babu, C. V. S. Subrahmanyam, J. Thimmasetty, R. Manavalan, K. Valliappan, and S. A. Kedarnath, "Solubility enhancement of cox-II inhibitors by cosolvency approach," *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 7, no. 2, pp. 119–126, 2008, doi: 10.3329/dujps.v7i2.2166.
- [69] M. E. Aulton, *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. Elsevier-Churchill Livingston, 2007. Accessed: Jan. 07, 2023. [Online]. Available:

https://books.google.com/books/about/Aulton_s_Pharmaceutics.html?hl=hu&id=EUqBjwEACAAJ

- [70] W. Ding, J.-P. Sylvestre, G. Leclair, and M. Meunier, "Laser Fragmentation as an Efficient Size-Reduction Method for Pulmonary Drug Discovery: Proof-of-Concept Study of Beclomethasone Dipropionate," *International Journal of Theoretical and Applied Nanotechnology*, vol. 1, no. 1, 2012, doi: 10.11159/xxx.
- [71] R. Kumar, A. K. Thakur, P. Chaudhari, and N. Banerjee, "Particle Size Reduction Techniques of Pharmaceutical Compounds for the Enhancement of Their Dissolution Rate and Bioavailability," *Journal of Pharmaceutical Innovation*. Springer, pp. 1–20, Jan. 11, 2021. doi: 10.1007/s12247-020-09530-5.
- [72] Z. H. Loh, A. K. Samanta, and P. W. Sia Heng, "Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, no. 4. Shenyang Pharmaceutical University, pp. 255–274, Aug. 10, 2014. doi: 10.1016/j.ajps.2014.12.006.
- [73] K. Thalberg, D. Lindholm, and A. Axelsson, "Comparison of different flowability tests for powders for inhalation," *Powder Technol*, vol. 146, no. 3, pp. 206–213, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.powtec.2004.08.003.
- [74] U. V. Shah *et al.*, "Effect of milling temperatures on surface area, surface energy and cohesion of pharmaceutical powders," *Int J Pharm*, vol. 495, no. 1, pp. 234–240, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.061.
- [75] J. Kluge, G. Muhrer, and M. Mazzotti, "High pressure homogenization of pharmaceutical solids," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 66, pp. 380–388, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.supflu.2012.01.009.
- [76] K. S. Yadav and K. Kale, "High Pressure Homogenizer in Pharmaceuticals: Understanding Its Critical Processing Parameters and Applications," *J Pharm Innov*, vol. 15, no. 4, pp. 690–701, Dec. 2020, doi: 10.1007/s12247-019-09413-4.
- [77] Y. Yu *et al.*, "The Evaluation of Meloxicam Nanocrystals by Oral Administration with Different Particle Sizes," *Molecules*, vol. 27, no. 2, p. 421, Jan. 2022, doi: 10.3390/molecules27020421.
- [78] M. Y. T. Chow *et al.*, "Inhaled powder formulation of naked siRNA using spray drying technology with L-leucine as dispersion enhancer," *Int J Pharm*, vol. 530, no. 1–2, pp. 40–52, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.013.
- [79] Z. Shao *et al.*, "Spray-Dried Powder Formulation of Capreomycin Designed for Inhaled Tuberculosis Therapy," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 12, p. 2044, Nov. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13122044.
- [80] H. Yoshii, T. L. Neoh, T. Furuta, and M. Ohkawara, "Encapsulation of proteins by spray drying and crystal transformation method," in *Drying Technology*, 2008, vol. 26, no. 11, pp. 1308–1312. doi: 10.1080/07373930802330888.

- [81] A. Singh and G. Van den Mooter, "Spray drying formulation of amorphous solid dispersions," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 100. Elsevier B.V., pp. 27–50, May 01, 2016. doi: 10.1016/j.addr.2015.12.010.
- [82] K. Cal and K. Sollohub, "Spray drying technique. I: Hardware and process parameters," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 99, no. 2. John Wiley and Sons Inc., pp. 575–586, Feb. 01, 2010. doi: 10.1002/jps.21886.
- [83] K. Muzaffar and P. Kumar, "Parameter optimization for spray drying of tamarind pulp using response surface methodology," *Powder Technol*, vol. 279, pp. 179–184, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.powtec.2015.04.010.
- [84] J. Elversson, A. Millqvist-Fureby, G. Alderborn, and U. Elofsson, "Droplet and Particle Size Relationship and Shell Thickness of Inhalable Lactose Particles During Spray Drying," *J Pharm Sci*, vol. 92, no. 4, pp. 900–910, Apr. 2003, doi: 10.1002/jps.10352.
- [85] B. Bhandari, K. Patel, and X. Chen, "Spray drying of food materials - process and product characteristics," Xiao Dong Chen and Arun S Mujumdar, Eds. BPS Blackwell, 2008, pp. 113–157.
- [86] A. Pomázi, R. Ambrus, P. Sipos, and P. Szabó-Révész, "Analysis of co-spray-dried meloxicam-mannitol systems containing crystalline microcomposites," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 56, no. 2, pp. 183–190, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.jpba.2011.05.008.
- [87] H. Leuenberger, "Spray freeze-drying-the process of choice for low water soluble drugs?," 2002.
- [88] M. Mumenthaler and H. Leuenberger, "Atmospheric spray-freeze drying: a suitable alternative in freeze-drying technology," *Int J Pharm*, vol. 72, no. 2, pp. 97–110, May 1991, doi: 10.1016/0378-5173(91)90047-R.
- [89] S. H. Surasarang and R. O. Williams, "Pharmaceutical cryogenic technologies," in *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*, vol. 22, Springer Verlag, 2016, pp. 527–607. doi: 10.1007/978-3-319-42609-9_11.
- [90] Y. Wang, K. Kho, W. S. Cheow, and K. Hadinoto, "A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles," *Int J Pharm*, vol. 424, no. 1–2, pp. 98–106, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.12.045.
- [91] S. Wanning, R. Süverkrüp, and A. Lamprecht, "Pharmaceutical spray freeze drying," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 488, no. 1–2. Elsevier B.V., pp. 136–153, Jul. 05, 2015. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.053.
- [92] E. Wolff and H. Gibert, "Atmospheric freeze-drying part 2 : Modelling drying kinetics using adsorption isotherms," *Drying Technology*, vol. 8, no. 2, pp. 405–428, 1990, doi: 10.1080/07373939008959891.
- [93] R. Ambrus, A. Alshweiat, P. Szabó-Révész, C. Bartos, and I. Csóka, "Smartcrystals for Efficient Dissolution of Poorly Water-Soluble Meloxicam," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2, p. 245, Jan. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14020245.

- [94] A. A. Thorat and S. v. Dalvi, "Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective," *Chemical Engineering Journal*, vol. 181–182. Elsevier, pp. 1–34, Feb. 01, 2012. doi: 10.1016/j.cej.2011.12.044.
- [95] M. E. Matteucci, M. A. Hotze, K. P. Johnston, and R. O. Williams, "Drug nanoparticles by antisolvent precipitation: Mixing energy versus surfactant stabilization," *Langmuir*, vol. 22, no. 21, pp. 8951–8959, Oct. 2006, doi: 10.1021/la061122t.
- [96] A. J. Raval and M. M. Patel, "Preparation and Characterization of Nanoparticles for Solubility and Dissolution Rate Enhancement of Meloxicam," *Intl. R. J. of Pharmaceuticals*, vol. 01, pp. 42–49, 2011.
- [97] A. H. J. Chiou, M. K. Yeh, C. Y. Chen, and D. P. Wang, "Micronization of meloxicam using a supercritical fluids process," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 42, no. 1, pp. 120–128, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.supflu.2006.12.024.
- [98] P. Gurikov and I. Smirnova, "Amorphization of drugs by adsorptive precipitation from supercritical solutions: A review," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 132. Elsevier B.V., pp. 105–125, Feb. 01, 2018. doi: 10.1016/j.supflu.2017.03.005.
- [99] P. RÉVÉSZ, O. LACZKOVICH, and I. ERŐS, "Amorfizálás a gyógyszer-technológiában," *Acta Pharm Hung*, pp. 39–44, 2004.
- [100] S. V. Bhujbal *et al.*, "Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies," *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 11, no. 8. Chinese Academy of Medical Sciences, pp. 2505–2536, Aug. 01, 2021. doi: 10.1016/j.apsb.2021.05.014.
- [101] J. Breitenbach, "Melt extrusion: from process to drug delivery technology," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 54, no. 2. Elsevier, pp. 107–117, Sep. 01, 2002. doi: 10.1016/S0939-6411(02)00061-9.
- [102] M. A. Repka *et al.*, "Melt extrusion: Process to product," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 9, no. 1. Taylor & Francis, pp. 105–125, Jan. 2012. doi: 10.1517/17425247.2012.642365.
- [103] M. M. Crowley *et al.*, "Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion: Part I," *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 33, no. 9, pp. 909–926, Jan. 2007, doi: 10.1080/03639040701498759.
- [104] M. A. Repka *et al.*, "Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion: Part II," *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 33, no. 10, pp. 1043–1057, Jan. 2007, doi: 10.1080/03639040701525627.
- [105] H. Patil, R. V. Tiwari, and M. A. Repka, "Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation," *AAPS PharmSciTech*, vol. 17, no. 1, pp. 20–42, Feb. 2016, doi: 10.1208/s12249-015-0360-7.
- [106] J. E. Patterson, M. B. James, A. H. Forster, R. W. Lancaster, J. M. Butler, and T. Rades, "Preparation of glass solutions of three poorly water soluble drugs by spray drying, melt

- extrusion and ball milling," *Int J Pharm*, vol. 336, no. 1, pp. 22–34, May 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.11.030.
- [107] T. Wu, Y. Sun, N. Li, M. M. De Villiers, and L. Yu, "Inhibiting surface crystallization of amorphous indomethacin by nanocoating," *Langmuir*, vol. 23, no. 9, pp. 5148–5153, Apr. 2007, doi: 10.1021/la070050i.
- [108] N. Chieng, J. Aaltonen, D. Saville, and T. Rades, "Physical characterization and stability of amorphous indomethacin and ranitidine hydrochloride binary systems prepared by mechanical activation," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 71, no. 1, pp. 47–54, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.06.022.
- [109] A. Haser, S. Huang, T. Listro, D. White, and F. Zhang, "An approach for chemical stability during melt extrusion of a drug substance with a high melting point," *Int J Pharm*, vol. 524, no. 1–2, pp. 55–64, May 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.070.
- [110] A. Haser, T. Cao, J. W. Lubach, and F. Zhang, "In Situ Salt Formation during Melt Extrusion for Improved Chemical Stability and Dissolution Performance of a Meloxicam-Copovidone Amorphous Solid Dispersion," *Mol Pharm*, vol. 15, no. 3, pp. 1226–1237, Mar. 2018, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01057.
- [111] "What is Laser Ablation?" <https://appliedspectra.com/technology/laser-ablation.html> (accessed Sep. 05, 2022).
- [112] J. Krüger and W. Kautek, "Ultrashort pulse laser interaction with dielectrics and polymers," *Advances in Polymer Science*, vol. 168, pp. 247–289, May 2004. doi: 10.1007/b12683.
- [113] N. D. M. Desa and M. Duralim, "Gold-Nanoparticle Synthesization in Gum Arabic Solution by Pulsed Laser Ablation," in *Journal of Physics: Conference Series*, May 2021, vol. 1892, no. 1. doi: 10.1088/1742-6596/1892/1/012019.
- [114] S. Stauss, K. Urabe, H. Muneoka, and K. Terashima, "Pulsed Laser Ablation in High-Pressure Gases, Pressurized Liquids and Supercritical Fluids: Generation, Fundamental Characteristics and Applications," in *Applications of Laser Ablation - Thin Film Deposition, Nanomaterial Synthesis and Surface Modification*, InTech, 2016. doi: 10.5772/65455.
- [115] G. K. Yogesh, S. Shukla, D. Sastikumar, and P. Koinkar, "Progress in pulsed laser ablation in liquid (PLAL) technique for the synthesis of carbon nanomaterials: a review," *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, vol. 127, no. 11. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, p. 810, Nov. 01, 2021. doi: 10.1007/s00339-021-04951-6.
- [116] J. Xiao, P. Liu, C. X. Wang, and G. W. Yang, "External field-assisted laser ablation in liquid: An efficient strategy for nanocrystal synthesis and nanostructure assembly," *Progress in Materials Science*, vol. 87. Elsevier Ltd, pp. 140–220, Jun. 01, 2017. doi: 10.1016/j.pmatsci.2017.02.004.

- [117] R. Zakaria, "Surface Modification of Polymer Materials Induced by Laser Irradiation," in *Applications of Laser Ablation - Thin Film Deposition, Nanomaterial Synthesis and Surface Modification*, InTech, 2016. doi: 10.5772/66377.
- [118] A. F. Obilor, M. Pacella, A. Wilson, and V. V. Silberschmidt, "Micro-texturing of polymer surfaces using lasers: a review," *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 120, no. 1–2. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 103–135, May 01, 2022. doi: 10.1007/s00170-022-08731-1.
- [119] V. S. Kazakevich, P. V. Kazakevich, P. S. Yaresko, and D. A. Kamynina, "Laser-induced surface modification of metals and alloys in liquid argon medium," in *Journal of Physics: Conference Series*, Sep. 2016, vol. 741, no. 1, p. 012188. doi: 10.1088/1742-6596/741/1/012188.
- [120] P. Maack, A. Kanitz, J. Hoppius, J. Köhler, C. Esen, and A. Ostendorf, "Surface modification of silicon by femtosecond laser ablation in liquid," in *Laser-based Micro- and Nanoprocessing XVI*, Mar. 2022, vol. 11989, p. 33. doi: 10.1117/12.2608708.
- [121] S. Loganathan, S. Santhanakrishnan, R. Bathe, and M. Arunachalam, "Prediction of femtosecond laser ablation profile on human teeth," *Lasers Med Sci*, vol. 34, no. 4, pp. 693–701, Jun. 2019, doi: 10.1007/s10103-018-2644-0.
- [122] A. H. Hamad, K. S. Khashan, and A. A. Hadi, "Laser Ablation in Different Environments and Generation of Nanoparticles," in *Applications of Laser Ablation - Thin Film Deposition, Nanomaterial Synthesis and Surface Modification*, InTech, 2016. doi: 10.5772/65241.
- [123] D. Zhang, Z. Li, and K. Sugioka, "Laser ablation in liquids for nanomaterial synthesis: Diversities of targets and liquids," *JPhys Photonics*, vol. 3, no. 4. IOP Publishing Ltd, p. 042002, Oct. 01, 2021. doi: 10.1088/2515-7647/ac0bfd.
- [124] W. T. Nichols *et al.*, "Gas and pressure dependence for the mean size of nanoparticles produced by laser ablation of flowing aerosols," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 2, no. 2, pp. 141–145, 2000, doi: 10.1023/A:1010014004508.
- [125] M. N. R. Ashfold, F. Claeysens, G. M. Fuge, and S. J. Henley, "Pulsed laser ablation and deposition of thin films," *Chem Soc Rev*, vol. 33, no. 1, pp. 23–31, Dec. 2004, doi: 10.1039/b207644f.
- [126] X. Li and Y. Guan, "Theoretical fundamentals of short pulse laser-metal interaction: A review," *Nami Jishu yu Jingmi Gongcheng/Nanotechnology and Precision Engineering*, vol. 3, no. 3. Tianjin University, pp. 105–125, Sep. 01, 2020. doi: 10.1016/j.npe.2020.08.001.
- [127] H. Béla, "IMPULZUS LÉZERES ANYAGÁTVITELI TECHNIKÁK AZ ANYAGTUDOMÁNYBAN ÉS A BIOLÓGIÁBAN," Szegedi Tudományegyetem, Szeged, 2007.
- [128] G. D. Mahan, H. S. Cole, Y. S. Liu, and H. R. Philipp, "Theory of polymer ablation," *Appl Phys Lett*, vol. 53, no. 24, pp. 2377–2379, Dec. 1988, doi: 10.1063/1.100235.

- [129] G. H. Pettit and R. Sauerbrey, "Fluence-dependent transmission of polyimide at 248 nm under laser ablation conditions," *Appl Phys Lett*, vol. 58, no. 8, pp. 793–795, Feb. 1991, doi: 10.1063/1.104518.
- [130] V. S. Kazakevich, P. V. Kazakevich, P. S. Yaresko, and D. A. Kazakevich, "Laser ablation of gold and titanium targets in heavy water," in *Journal of Physics: Conference Series*, Dec. 2018, vol. 1096, no. 1. doi: 10.1088/1742-6596/1096/1/012123.
- [131] A. Pyatenko, K. Shimokawa, M. Yamaguchi, O. Nishimura, and M. Suzuki, "Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure water," in *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 2004, vol. 79, no. 4–6, pp. 803–806. doi: 10.1007/s00339-004-2841-5.
- [132] R. Karimzadeh, J. Z. Anvari, and N. Mansour, "Nanosecond pulsed laser ablation of silicon in liquids," *Appl Phys A Mater Sci Process*, vol. 94, no. 4, pp. 949–955, 2009, doi: 10.1007/s00339-008-4873-8.
- [133] M. Boutinguiza, R. Comesaña, F. Lusquiños, A. Riveiro, J. Del Val, and J. Pou, "Production of silver nanoparticles by laser ablation in open air," in *Applied Surface Science*, May 2015, vol. 336, pp. 108–111. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.09.193.
- [134] M. Wang, N. Zhang, X. Zhu, and Z. Wu, "Femtosecond laser ablation of silicon in air and vacuum," *Chinese Optics Letters*, Vol. 9, Issue 9, pp. 093201-, vol. 9, no. 9, p. 093201, Sep. 2011.
- [135] S. M. Pershin, V. N. Lednev, and A. F. Bunkin, "Laser ablation of alloys: Selective evaporation model," *Physics of Wave Phenomena*, vol. 19, no. 4, pp. 261–274, Dec. 2011, doi: 10.3103/S1541308X11040054.
- [136] Y. Liu, X. Liu, M. Chen, and M. Zhao, "Laser ablation of Ti-Al alloy in vacuum and air environments," in *Applied Mechanics and Materials*, 2012, vol. 217–219, pp. 2257–2264. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.217-219.2257.
- [137] B. Zheng, G. Jiang, W. Wang, K. Wang, and X. Mei, "Ablation experiment and threshold calculation of titanium alloy irradiated by ultra-fast pulse laser," *AIP Adv*, vol. 4, no. 3, Mar. 2014, doi: 10.1063/1.4867088.
- [138] T. Asahi, T. Sugiyama, and H. Masuhara, "Laser fabrication and spectroscopy of organic nanoparticles," *Acc Chem Res*, vol. 41, no. 12, pp. 1790–1798, Dec. 2008, doi: 10.1021/ar800125s.
- [139] P. Wagener and S. Barcikowski, "Laser fragmentation of organic microparticles into colloidal nanoparticles in a free liquid jet," *Appl Phys A Mater Sci Process*, vol. 101, no. 2, pp. 435–439, Nov. 2010, doi: 10.1007/s00339-010-5814-x.
- [140] M. Flores-Castañeda *et al.*, "Preparation and characterization of organic nanoparticles by laser ablation in liquids technique and their biological activity," *Mater Res Express*, vol. 6, no. 10, p. 105091, Sep. 2019, doi: 10.1088/2053-1591/ab3cf1.
- [141] S. X. Liang, L. C. Zhang, S. Reichenberger, and S. Barcikowski, "Design and perspective of amorphous metal nanoparticles from laser synthesis and processing," *Physical*

Chemistry Chemical Physics, vol. 23, no. 19. Royal Society of Chemistry, pp. 11121–11154, May 21, 2021. doi: 10.1039/d1cp00701g.

- [142] Z. Wang, X. Li, M. Gao, and X. Zeng, “One-step preparation of amorphous iron nanoparticles by laser ablation,” *Powder Technol*, vol. 215–216, pp. 147–150, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.powtec.2011.09.039.
- [143] T. Takiya and N. Fukuda, “Nanoparticle Formation and Deposition by Pulsed Laser Ablation,” in *Practical Applications of Laser Ablation*, IntechOpen, 2021. doi: 10.5772/intechopen.95299.
- [144] S. V. Starinskiy, Y. G. Shukhov, and A. V. Bulgakov, “Dynamics of pulsed laser ablation of gold in vacuum in the regime of nanostructured film synthesis,” *Technical Physics Letters*, vol. 42, no. 4, pp. 411–414, Apr. 2016, doi: 10.1134/S1063785016040258.
- [145] D. Zhang and H. Wada, “Laser Ablation in Liquids for Nanomaterial Synthesis and Applications,” in *Handbook of Laser Micro- and Nano-Engineering*, Springer International Publishing, 2021, pp. 1481–1515. doi: 10.1007/978-3-030-63647-0_30.
- [146] S. Kenth, J.-P. P. Sylvestre, K. Fuhrmann, M. Meunier, and J.-C. C. Leroux, “Fabrication of Paclitaxel Nanocrystals by Femtosecond Laser Ablation and Fragmentation,” *Pharm Nanotechnol*, vol. 100, no. 3, pp. 1022–1030, 2011, doi: 10.1002/jps.22335.
- [147] A. Singh, H. L. Kutscher, J. C. Bulmahn, S. D. Mahajan, G. S. He, and P. N. Prasad, “Laser ablation for pharmaceutical nanoformulations: Multi-drug nanoencapsulation and theranostics for HIV,” *Nanomedicine*, vol. 25, p. 102172, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.nano.2020.102172.
- [148] S. Pan *et al.*, “Nanonization of poorly water-soluble drug clobetasone butyrate by using femtosecond laser,” *Opt Commun*, vol. 313, pp. 152–156, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.optcom.2013.10.035.
- [149] W. Ding, J. P. Sylvestre, E. Bouvier, G. Leclair, and M. Meunier, “Ultrafast laser processing of drug particles in water for pharmaceutical discovery,” *Appl Phys A Mater Sci Process*, vol. 114, no. 1, pp. 267–276, Jan. 2014, doi: 10.1007/s00339-013-8089-1.
- [150] J. P. Sylvestre, M. C. Tang, A. Furtos, G. Leclair, M. Meunier, and J. C. Leroux, “Nanonization of megestrol acetate by laser fragmentation in aqueous milieu,” *Journal of Controlled Release*, vol. 149, no. 3, pp. 273–280, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.10.034.
- [151] T. Gera *et al.*, “Application of pulsed laser ablation (PLA) for the size reduction of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs),” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72865-z.
- [152] T. Gera *et al.*, “Production of ibuprofen in crystalline and amorphous forms by Pulsed Laser Deposition (PLD),” *Appl Surf Sci*, vol. 493, pp. 359–367, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.06.254.

- [153] T. Gera *et al.*, "Production of ibuprofen-magnetite nanocomposites by pulsed laser ablation," *J Phys D Appl Phys*, vol. 54, no. 39, p. 395401, Sep. 2021, doi: 10.1088/1361-6463/ac07df.
- [154] B. Hopp *et al.*, "Production of meloxicam suspension using pulsed laser ablation in liquid (PLAL) technique," *J Phys D Appl Phys*, vol. 51, no. 16, p. 165401, Mar. 2018, doi: 10.1088/1361-6463/aab4be.
- [155] E. Nagy *et al.*, "Fabrication of Submicrometer-Sized Meloxicam Particles Using Femtosecond Laser Ablation in Gas and Liquid Environments," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 4, p. 996, Apr. 2021, doi: 10.3390/nano11040996.
- [156] E. Nagy *et al.*, "A comprehensive analysis of meloxicam particles produced by nanosecond laser ablation as a wet milling technique," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-16728-9.
- [157] E. Nagy *et al.*, "A comparative study of femtosecond pulsed laser ablation of meloxicam in distilled water and in air," Jan. 2023, doi: 10.21203/RS.3.RS-2506430/V1.
- [158] A. A. Ismail, F. R. van de Voort, and J. Sedman, "Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications," *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, vol. 18, no. C, pp. 93–139, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0167-9244(97)80013-3.
- [159] P. Tschida and T. Lawson, "FTIR Instrument Instructions."
- [160] S. H. Lee, S. M. Park, and L. P. Lee, "Optical methods in studies of olfactory system," *Bioelectronic Nose: Integration of Biotechnology and Nanotechnology*, vol. 9789401786133, pp. 191–220, Dec. 2014, doi: 10.1007/978-94-017-8613-3_11.
- [161] P. R. Griffiths and J. A. De Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. John Wiley & Sons, 2007.
- [162] R. White, *Chromatography/Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications*. CRC Press, 2020. doi: 10.1201/9781003066323.
- [163] A. Hynes, D. A. Scott, A. Man, D. L. Singer, M. G. Sowa, and K. Z. Liu, "Molecular mapping of periodontal tissues using infrared microspectroscopy," *BMC Med Imaging*, vol. 5, May 2005, doi: 10.1186/1471-2342-5-2.
- [164] "Infrared Spectroscopy." <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/infrared/infrared.htm> (accessed May 12, 2022).
- [165] U. O. Aroke, A. Abdulkarim, and R. O. Ogubunka, "Fourier-transform Infrared Characterization of Kaolin, Granite, Bentonite and Barite," *ATBU Journal of Environmental Technology*, vol. 6, no. 1, pp. 42–53, Jul. 2014.
- [166] "How can I distinguish functional group region and fingerprint region in a infrared spectrum? | Socratic." <https://socratic.org/questions/how-can-i-distinguish-functional-group-region-and-fingerprint-region-in-a-infrar> (accessed May 12, 2022).

- [167] D. A. Long, *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. doi: 10.1002/0470845767.
- [168] R. R. Jones, D. C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, and V. K. Valev, "Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers," *Nanoscale Research Letters*, vol. 14, no. 1. Springer New York LLC, pp. 1–34, Dec. 01, 2019. doi: 10.1186/s11671-019-3039-2.
- [169] D. Wolverson, "Raman spectroscopy," in *Characterization of Semiconductor Heterostructures and Nanostructures*, Elsevier, 2008, pp. 249–288. doi: 10.1016/B978-0-444-53099-8.00008-7.
- [170] D. Gagik, N. Attila, and B. T. Sára, *Optikai alapok az ELI-ALPS tükrében - MSc.* 2014.
- [171] R. S. Das and Y. K. Agrawal, "Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 57, no. 2. Elsevier, pp. 163–176, Nov. 01, 2011. doi: 10.1016/j.vibspec.2011.08.003.
- [172] G. Galbács, I. Ilisz, A. Felinger, and B. Csóka, *Illusztrált segédanyag a modern műszeres analitikai kémia oktatásához*. Szegedi Tudományegyetem; Pécsi Tudományegyetem, 2012. doi: 10.15170/ttk.2015.00001.
- [173] C. V. Raman and K. S. Krishnan, "A new type of secondary radiation [11]," *Nature*, vol. 121, no. 3048. Nature Publishing Group, pp. 501–502, 1928. doi: 10.1038/121501c0.
- [174] H. Karlsson and E. Illy, "How to Choose a Laser: How to choose a laser for Raman spectroscopy," *Laser Focus World*. <https://www.laserfocusworld.com/lasers-sources/article/16555207/how-to-choose-a-laser-how-to-choose-a-laser-for-raman-spectroscopy> (accessed May 17, 2022).
- [175] M. Zoltán, "HPLC-MS/MS módszerek kidolgozása biológiailag aktív anyagok mennyiségi meghatározására," BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM, 2019.
- [176] N. A. Pratima and R. Gadikar, "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review," *Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences*, vol. 1, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.32474/aoics.2018.01.000103.
- [177] C. K. Lim and G. Lord, "Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 25, no. 5. Biol Pharm Bull, pp. 547–557, May 2002. doi: 10.1248/bpb.25.547.
- [178] "Liquid chromatography tandem Mass spectrometry diagram.png - Wikipedia." https://en.wikipedia.org/wiki/File:Liquid_chromatography_tandem_Mass_spectrometry_diagram.png (accessed Sep. 22, 2022).
- [179] A. Sagar, "HPLC- Definition, Principle, Parts, Types, Uses, Diagram," Sep. 12, 2022. <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (accessed Sep. 22, 2022).
- [180] S. Thodeti, M. V Ramana Reddy, and J. Siva Kumar, "Synthesis and Characterization of Pure and Indium doped SnO₂ nanoparticles By Sol-Gel Methods," *Int J Sci Eng Res*, vol. 7, 2016.

- [181] J. A. Kaduk *et al.*, "Powder diffraction," *Nature Reviews Methods Primers*, vol. 1, no. 1, pp. 1–22, Dec. 2021, doi: 10.1038/s43586-021-00074-7.
- [182] C. F. Holder and R. E. Schaak, "Tutorial on Powder X-ray Diffraction for Characterizing Nanoscale Materials," *ACS Nano*, vol. 13, no. 7. American Chemical Society, pp. 7359–7365, Jul. 23, 2019. doi: 10.1021/acsnano.9b05157.
- [183] S. Boddolla, "A review on Characterization techniques of Nanomaterials," 2018.
- [184] A. Mohammed and A. Abdullah, "SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM): A REVIEW."
- [185] H. Károly and D. Zoltán ELTE Anyagfizikai Tanszék, "PÁSZTÁZÓ ELEKTRONMIKROSKÓPIA 1 PÁSZTÁZÓ ELEKTRONMIKROSKÓPIA."
- [186] A. Navrotsky, "New Developments in the Calorimetry of High-Temperature Materials," *Engineering*, vol. 5, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 366–371, Jun. 01, 2019. doi: 10.1016/j.eng.2019.03.003.
- [187] P. Gill, T. T. Moghadam, and B. Ranjbar, "Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience," *Journal of Biomolecular Techniques*, vol. 21, no. 4. The Association of Biomolecular Resource Facilities, pp. 167–193, Dec. 2010.
- [188] M. Reading, A. Luget, and R. Wilson, "Modulated differential scanning calorimetry," *Thermochim Acta*, vol. 238, no. C, pp. 295–307, Jun. 1994, doi: 10.1016/S0040-6031(94)85215-4.
- [189] S. D. Clas, C. R. Dalton, and B. C. Hancock, "Differential scanning calorimetry: Applications in drug development," *Pharmaceutical Science and Technology Today*, vol. 2, no. 8. Elsevier Current Trends, pp. 311–320, Aug. 01, 1999. doi: 10.1016/S1461-5347(99)00181-9.
- [190] "19. TERMIKUS ANALÍZIS," 1999.
- [191] H. Hargitai and T. Ibriksz, "Polimer nanokompozit blendek mechanikai és termikus tulajdonságai," Győr, Feb. 2013.
- [192] N. Tippayawong, "An overview of aerosol particle sensors for size distribution measurement," 2007.
- [193] T. Ajtai, N. Utry, M. Pintér, B. Major, Z. Bozóki, and G. Szabó, "A method for segregating the optical absorption properties and the mass concentration of winter time urban aerosol," *Atmos Environ*, vol. 122, pp. 313–320, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.09.072.
- [194] A. Kohut *et al.*, "From plasma to nanoparticles: Optical and particle emission of a spark discharge generator," *Nanotechnology*, vol. 28, no. 47, p. 475603, Oct. 2017, doi: 10.1088/1361-6528/aa8f84.
- [195] G. Kiss-Albert, "Légköri aeroszolok klímareleváns optikai sajátosságainak in-situ vizsgálata fotoakusztikus módszerrel," Szeged, 2015.

- [196] P. Basa, "Mérés spektroszkópai ellipszométerrel," Budapest, 2010.
- [197] B. Guo, "Optical Methods for in-Process Monitoring of Laser-Matter Interactions," in *Handbook of Laser Micro- and Nano-Engineering*, Springer International Publishing, 2021, pp. 1927–1977. doi: 10.1007/978-3-030-63647-0_46.
- [198] D. Wang *et al.*, "Ultrafast imaging for uncovering laser–material interaction dynamics," *International Journal of Mechanical System Dynamics*, vol. 2, no. 1, pp. 65–81, Mar. 2022, doi: 10.1002/msd2.12024.
- [199] T. László, "UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIA (Gyakorlati segédlet a műszeres analitika gyakorlathoz)," Debrecen, 2019.
- [200] B. Boros *et al.*, *Műszeres analitika gyakorlatok*. Pécsi Tudományegyetem, 2010.
- [201] I. Fábián, "Spektrofotometria," Debrecen, 2019.
- [202] B. Edit, "Gyógyszerek oldhatóságának meghatározására alkalmas módszerek vizsgálata és fejlesztése," Semmelweis Egyetem, Budapest, 2010.
- [203] P. Gieszinger, "RESEARCH AND DEVELOPMENT OF NANOSIZED DRUG CONTAINING NASAL DRUG DELIVERY SYSTEMS TO REACH SYSTEMIC AND CENTRAL NERVE SYSTEM EFFECT," University of Szeged, Szeged, 2020.
- [204] G. Péter and K. Gábor, *Bevezetés az Immunológiába, Avagy hogyan működik az immunrendszer*. Debrecen: Debreceni Egyetemi Kiadó (Debrecen University Press), 2015.
- [205] J. W. Bridges, D. J. Benford, and S. A. Hubbard, "The design and use of in vitro toxicity tests," in *Animals in Scientific Research: An Effective Substitute for Man?*, Macmillan Education UK, 1983, pp. 47–68. doi: 10.1007/978-1-349-06439-7_4.
- [206] K. P. Putnam, D. W. Bombick, and D. J. Doolittle, "Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate," *Toxicology in Vitro*, vol. 16, no. 5, pp. 599–607, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0887-2333(02)00050-4.
- [207] A. Otilia Tamara, "Cianobaktérium törzsek citotoxicitásának vizsgálata CHO-K1 sejteken Készítette," 2008.
- [208] T. Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," 1983.
- [209] L. Júlia Anna, "Kis molekulatömegű szerves vízi szennyezőanyagok hatása a sejtadhézióra és migrációra - A sejtadhézió és migráció alkalmazhatósága ökotoxikológiai végpontként-Doktori értekezés Budapest 2013," Semmelweis Egyetem, Budapest, 2013.
- [210] "MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation." <https://researchtweet.com/mtt-assay-protocol-for-cell-viability/> (accessed Sep. 27, 2022).

- [211] J. Zhang, H. Li, W. Wang, and H. Li, "Assessing the anti-inflammatory effects of quercetin using network pharmacology and in vitro experiments," *Exp Ther Med*, vol. 23, no. 4, Feb. 2022, doi: 10.3892/etm.2022.11230.
- [212] A. Ngkelo, K. Meja, M. Yeadon, I. Adcock, and P. A. Kirkham, "LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G α dependent PI-3kinase signalling," *J Inflamm*, vol. 9, no. 1, p. 1, Dec. 2012, doi: 10.1186/1476-9255-9-1.
- [213] J. Van Snick, "Interleukin-6: An Overview," *Annu Rev Immunol*, vol. 8, no. 1, pp. 253–278, Apr. 1990, doi: 10.1146/annurev.iy.08.040190.001345.
- [214] L. W. Kent, F. Rahemtulla, R. D. Hockett, R. C. Gilleland, and S. M. Michalek, "Effect of Lipopolysaccharide and Inflammatory Cytokines on Interleukin-6 Production by Healthy Human Gingival Fibroblasts," 1998.
- [215] S. János, "SEJTBIOLÓGIA ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA jegyzethez," Szeged, 2012.
- [216] B. László, "A gének kifejeződése és szabályozása Segédlet a BSc záróvizsgára felkészüléshez," Szeged, 2020.
- [217] "Természettudományos tananyagok - A fehérjeszintézis." <https://ttko.hu/kbf/kisalkalmazas.php?id=257&c=biológia> (accessed Sep. 27, 2022).
- [218] N. Bálint, "A valósídejű PCR módszer alkalmazása a klinikai genetikai gyakorlatban ," MTA, Budapest, 2014.
- [219] R. Gergely and M. Petra, "Quantitative real-time PCR laborgyakorlat," Budapest, 2018.
- [220] D. Péter, "Kvantitatív PCR alkalmazása a gyógyszerkutatásban," BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM Vegyész-mérnöki és Biomérnöki Kar , Budapest, 2007.
- [221] "Difference Between RT-PCR and QPCR | Difference Between." <http://www.differencebetween.net/science/difference-between-rt-pcr-and-qpcr/> (accessed Sep. 28, 2022).
- [222] P. Éva *et al.*, *IMMUNOLÓGIAI SZEMINÁRIUMOK*. Budapest: Semmelweis Egyetem, 2012.
- [223] M. Adrienn, "Szomatosztatin és PACAP hatásainak vizsgálata gyulladás és trigeminovászkuális aktiváció modelljeiben," PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR, Pécs, 2012.
- [224] "Az immunológia alapjai - 8. gyakorlat: Immunszerológia 2: ELISA, immunoblottechnikák," Pécs, 2016.
- [225] "ELISA Assay Kit, Protocol, ELISA Plate Reader and Plate Washer | Molecular Devices." <https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa> (accessed Sep. 28, 2022).

- [226] J. Hellemans, G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, and J. Vandesompele, "qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data," *Genome Biol*, vol. 8, no. 2, p. R19, Feb. 2008, doi: 10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- [227] "Meloxicam impurity B | C₄H₆N₂S | ChemSpider." <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.312333.html?rid=4f47e648-d48c-4052-8ce1-1e506a5e4814> (accessed Jan. 25, 2022).
- [228] "2-Amino-5-methylthiazole | C₄H₆N₂S - PubChem." <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Amino-5-methylthiazole> (accessed Jan. 25, 2022).
- [229] D. T. Modhave, T. Handa, R. P. Shah, and S. Singh, "Successful characterization of degradation products of drugs using LC-MS tools: Application to piroxicam and meloxicam," *Analytical Methods*, vol. 3, no. 12, pp. 2864–2872, Dec. 2011, doi: 10.1039/c1ay05493g.
- [230] "Meloxicam impurity B European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard 7305-71-7." <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/product/sial/y0001036> (accessed Jan. 25, 2022).
- [231] "Meloxicam- An NSAID With A Difference." <https://www.pharmaffiliates.com/en/blog/meloxicam-an-nsaid-with-a-difference> (accessed Jan. 25, 2022).
- [232] G. Tamás Bence, "Gyógyszerhatóanyagok kezelése impulzuslézeres ablációval gáz környezetben," Szegedi Tudományegyetem, Szeged, 2021.
- [233] "Meloxicam(71125-38-7)," *Chemical Book*. https://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB2191355_EN.htm (accessed Sep. 29, 2022).
- [234] R. Tanabe, T. T. P. Nguyen, T. Sugiura, and Y. Ito, "Bubble dynamics in metal nanoparticle formation by laser ablation in liquid studied through high-speed laser stroboscopic videography," *Appl Surf Sci*, vol. 351, pp. 327–331, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.05.030.
- [235] M. R. Kalus, V. Reimer, S. Barcikowski, and B. Gökce, "Discrimination of effects leading to gas formation during pulsed laser ablation in liquids," *Appl Surf Sci*, vol. 465, pp. 1096–1102, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.apsusc.2018.09.224.
- [236] T. Tsuji, D. H. Thang, Y. Okazaki, M. Nakanishi, Y. Tsuboi, and M. Tsuji, "Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in polyvinylpyrrolidone solutions," *Appl Surf Sci*, vol. 254, no. 16, pp. 5224–5230, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.apsusc.2008.02.048.
- [237] V. Amendola and M. Meneghetti, "What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution?," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 9, pp. 3027–3046, Mar. 07, 2013. doi: 10.1039/c2cp42895d.

- [238] S. Reich *et al.*, “Early appearance of crystalline nanoparticles in pulsed laser ablation in liquids dynamics,” *Nanoscale*, vol. 11, no. 14, pp. 6962–6969, Apr. 2019, doi: 10.1039/c9nr01203f.
- [239] Z. Sheikh, H. X. Ong, M. Pozzoli, P. M. Young, and D. Traini, “Is there a role for inhaled anti-inflammatory drugs in cystic fibrosis treatment?,” *Expert Opinion on Orphan Drugs*, vol. 6, no. 1. Taylor and Francis Ltd, pp. 69–84, Jan. 02, 2018. doi: 10.1080/21678707.2018.1409110.
- [240] “Pharmacology for Pharmacy and the Health Sciences - Michael Boarder, Jane Dixon, David Newby, Phyllis Navti, Tyra Zetterström - Oxford University Press.” <https://global.oup.com/academic/product/pharmacology-for-pharmacy-and-the-health-sciences-9780198728832?cc=hu&lang=en&> (accessed Mar. 02, 2022).
- [241] B. Crestani, P. Cornillet, M. Dehoux, C. Rolland, M. Guenounou, and M. Aubier, “Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo: Regulation by alveolar macrophage secretory products,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, no. 2, pp. 731–740, Aug. 1994, doi: 10.1172/JCI117392.
- [242] L. Martínez, M. Videa, N. Sosa, J. Ramírez, and S. Castro, “Long-Term Stability of New Co-Amorphous Drug Binary Systems: Study of Glass Transitions as a Function of Composition and Shelf Time,” *Molecules*, vol. 21, no. 12, p. 1712, Dec. 2016, doi: 10.3390/molecules21121712.
- [243] M. Kansiz, A. Domínguez-Vidal, D. McNaughton, and B. Lendl, “Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs),” in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Jul. 2007, vol. 388, no. 5–6, pp. 1207–1213. doi: 10.1007/s00216-007-1337-5.
- [244] S. Li, T. He, X. Liao, Q. Yang, and G. Li, “Structural changes and crystallization kinetics of polylactide under CO₂ investigated using high-pressure Fourier transform infrared spectroscopy,” *Polym Int*, vol. 64, no. 12, pp. 1762–1769, Dec. 2015, doi: 10.1002/pi.4977.
- [245] V. Timón, B. Maté, V. J. Herrero, and I. Tanarro, “Infrared spectra of amorphous and crystalline urea ices,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 23, no. 39, pp. 22344–22351, Oct. 2021, doi: 10.1039/d1cp03503g.
- [246] K. K. Qian and R. H. Bogner, “Application of mesoporous silicon dioxide and silicate in oral amorphous drug delivery systems,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 101, no. 2. John Wiley and Sons Inc., pp. 444–463, Feb. 01, 2012. doi: 10.1002/jps.22779.
- [247] L. Coppi, M. B. Sanmarti, and M. C. Clavo, “Crystalline forms of meloxicam and processes for their preparation and interconversion - Google Patents,” US6967248B2, 2005 Accessed: Oct. 17, 2022. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/US6967248B2/en>
- [248] M. Z. Saavedra-Leos, C. Leyva-Porras, E. Martínez-Guerra, S. A. Pérez-García, J. A. Aguilar-Martínez, and C. Álvarez-Salas, “Physical properties of inulin and inulin–orange

- juice: Physical characterization and technological application," *Carbohydr Polym*, vol. 105, no. 1, pp. 10–19, May 2014, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2013.12.079.
- [249] C. Leyva-Porras *et al.*, "Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.3390/POLYM12010005.
- [250] C. Arpagaus, "Pharmaceutical Particle Engineering via Nano Spray Drying - Process Parameters and Application Examples on the Laboratory-Scale," *Int J Med Nano Res*, vol. 5, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.23937/2378-3664.1410026.
- [251] M. M. Mehanna, S. M. Mohyeldin, and N. A. Elgindy, "Rifampicin-carbohydrate spray-dried nanocomposite: A futuristic multiparticulate platform for pulmonary delivery," *Int J Nanomedicine*, vol. 14, pp. 9089–9112, 2019, doi: 10.2147/IJN.S211182.
- [252] A. Chvatal *et al.*, "Formulation and comparison of spray dried non-porous and large porous particles containing meloxicam for pulmonary drug delivery," *Int J Pharm*, vol. 559, pp. 68–75, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.034.
- [253] S. Senadheera, B. Tan, and K. Venkatakrishnan, "Critical Time to Nucleation: Graphite and Silicon Nanoparticle Generation by Laser Ablation," *J Nanotechnol*, vol. 2009, pp. 1–6, 2009, doi: 10.1155/2009/590763.
- [254] T. Ajtai *et al.*, "Microphysical properties of carbonaceous aerosol particles generated by laser ablation of a graphite target," *Atmos Meas Tech*, vol. 8, no. 3, pp. 1207–1215, Mar. 2015, doi: 10.5194/amt-8-1207-2015.
- [255] A. Gelencsér, *Carbonaceous aerosol*. Springer, 2004.
- [256] B. Tan and K. Venkatakrishnan, "A femtosecond laser-induced periodical surface structure on crystalline silicon," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, no. 5, pp. 1080–1085, May 2006, doi: 10.1088/0960-1317/16/5/029.