



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**LEVOFLOKSASİNİN PULMONER YOLLA UYGULANMAK ÜZERE
MİKROPARTİKÜLER KURU TOZ İNHALER
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Selin İMAMOĞLU

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

2015 - ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LEVOFLOKSASİNİN PULMONER YOLLA UYGULANMAK
ÜZERE MİKROPARTİKÜLER KURU TOZ İNHALER
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Selin İMAMOĞLU

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

2015 – ANKARA

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2015

Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. İmran VURAL
Hacettepe Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Yrd.Doç .Dr. Burcu DEVRİM
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi

1.	GİRİŞ	1
1.1.	Solunum Sisteminin Yapısı	1
1.2.	Pulmoner Epitelin Yapısı	2
1.3.	Respiratuvar Bölgede Partiküllerin Tutulmasına Etki Eden Faktörler	3
1.4.	Pulmoner Yolla İlaç Uygulamasının Avantajları ve Dezavantajları	5
1.5.	Aerodinamik Partikül Davranışı ve Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Belirlenmesi	6
1.6.	İnhalasyon Cihazları	8
1.6.1.	Ölçülü Doz inhalerler	8
1.6.2.	Nebulizörler	9
1.6.3.	Kuru Toz Inhalerler	10
1.7.	Pulmoner Yolla Uygulanan İlaç Taşıyıcı Sistemler	11
1.7.1.	Lipozomlar	11
1.7.2.	Mikropartiküller	12
1.7.3.	Nanopartiküller	13
1.8.	Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri	13
1.9.	Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	15
1.9.1.	Poli-ε-kaprolakton (ε-PCL)	15
1.9.2.	Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)	16
1.10.	Mikropartiküllerde Yapılan Kontroller	18
1.10.1.	Etkin Madde-Polimer Etkileşimine İlişkin Kontroller	18
1.10.1.2.	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (FTIR)	18
1.10.1.3.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Yöntemi	19
1.10.2.	Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması	19
1.10.3.	Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	20
1.10.4.	Çözünme Hızı Tayini	20
1.10.4.1.	Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirilmesi	20
1.10.4.1.1.	Sıfır Derece Kinetik	21
1.10.4.1.2.	Birinci Derece Kinetik	22
1.10.4.1.3.	Hixon-Crowell Modeli	22

1.10.4.1.4.	Higuchi Modeli	23
1.11.	Akciğer Enfeksiyonları	23
1.12.	Florokinolonlar	25
1.12.1.	Levofloksasin	25
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1.	Materyaller	27
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
2.1.2.	Kullanılan Cihazlar	28
2.2.	Etkin Madde Salım Hızı Deneylerinde Kullanılan Ortamlar	28
2.3.	Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	29
2.3.1.	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizi	29
2.3.2.	FTIR Analizi	29
2.3.3.	Etkin Maddenin Ultra Viole (UV) Spektrofotometrisi ile Analizi	30
2.3.3.1.	Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması	30
2.3.3.2.	Kalibrasyon Doğrularının İstatistiksel Verileri ve Analitik Validasyonu	30
2.3.3.2.2.	Kesinlik	31
2.3.3.2.4.	Teşhis Sınırı (LOD)	32
2.3.3.2.5.	Tayin Sınırı (LOQ)	32
2.3.3.2.6.	Doğrusallık	33
2.4.	Mikropartiküllerin Hazırlanması	33
2.4.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	33
2.4.1.1.	Polikaprolakton (PCL) kullanılarak hazırlanan önformülasyonlar	34
2.4.1.2.	Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) kullanılarak hazırlanan önformülasyonlar	34
2.4.2.	Mikropartikül Üretiminde Kullanılacak Olan Yöntemin Seçimi	35
2.4.3.	PLGA Kullanılarak s/y/y Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Hazırlanan Mikropartikül Formülasyonları	36
2.4.3.1.	Farklı Tween Tipleri ile Hazırlanan Formülasyonlar	36
2.4.3.2.	Farklı Span Tipleri ile Hazırlanan Formülasyonlar	38
2.5.	Mikropartiküllerde Yapılan Kontroller	40
2.5.1.	DSC Analizi	40
2.5.2.	FTIR (Fourier Transform Infrared) Spektrumu	40
2.5.3.	Partikül Büyüklüğünün Saptanması	40
2.5.4.	Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	41
2.5.5.	Etkin Madde Miktar Tayini	41
2.5.6.	Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	41
2.5.7.	Ürün Verimi Tayini	42
2.5.8.	Çözünme Hızı Deneyi	42
2.5.9.	Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin İncelenmesi	43
2.5.9.1.	Sıkıştırılmış Dansite Tayini	43
2.5.9.2.	Teorik Kütlesel Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇt) Tayini	43
2.5.10.	Antimikrobiyal Aktivite Testi	44
2.5.11	Organik Çözücü Kalıntısı Tayini	46

3.	BULGULAR	45
3.1.	Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ile İlgili Bulgular	45
3.1.1.	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizi Bulguları	45
3.1.2.	FTIR Analizine ait Bulgular	45
3.1.3.	Etkin Maddenin Ultra Viole Spektrofotometrisi ile Analizi Bulguları	47
3.1.4.	UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Etkin Maddenin Kalibrasyon Doğrularına ait Bulgular	48
3.1.5.	Kalibrasyon Doğrularının İstatistiksel Verileri ve Analitik Validasyonu ile İlgili Bulgular	49
3.1.5.1.	Doğruluk	49
3.1.5.2.	Kesinlik	50
	-Tekrarlanabilirlik	50
3.1.5.4.	Teşhis Sınırı (LOD)	51
3.1.5.5.	Tayin Sınırı (LOQ)	52
3.1.5.6.	Doğrusallık	52
3.2.	Formülasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular	53
3.2.1.	Ön Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Bulgular	53
3.2.1.1.	Partikül Büyüklüğü Bulguları	53
3.2.1.2.	Enkapsülasyon Etkinliği Bulguları	54
3.2.1.3.	Ürün Verimi Bulguları	54
3.2.2.	Geliştirilen Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontrollere ait Bulgular	54
3.2.2.1.	Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Bulguları	54
3.2.2.2.	Mikropartiküllere ait Enkapsülasyon Etkinliği Bulguları	60
3.2.2.3.	Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	62
3.2.2.4.	Mikropartiküllere ait Üretim Verimi Bulguları	66
3.2.2.5.	Mikropartiküllere ait Çözünme Hızı Bulguları	67
3.2.3.	Seçilen Formülasyonlara Ait Bulgular	72
3.2.3.1.	SEM Analizi Bulguları	72
3.2.3.2.	Çözünme Hızı Kinetikleri	73
3.2.3.3.	Etkin madde-polimer etkileşimi tayini bulguları	73
3.2.3.3.1.	DSC Termogramları	73
3.2.3.3.2.	FTIR Spektrumları	74
3.2.3.4.	Partiküllerin Aerodinamik Özelliklerine ait Bulguları	75
3.2.3.4.1.	Sıkıştırılmış Dansite Tayinine Ait Bulgular	75
3.2.3.4.2.	Teorik Kütlesel Aerodinamik Ortalama Çap (KAOÇt) Tayini Bulguları	76
3.2.3.5.	Mikropartiküllere ait Antimikrobiyal Aktivite Tayini Bulguları	82
3.2.3.6.	Organik Çözücü Kalıntısı Tayini Bulguları	85
4.	TARTIŞMA	84
4.1.	Etkin Maddeye ait Bulguların Değerlendirilmesi	84
4.2.	Ön Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	85
4.4.	Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	86
4.4.1.	Organik fazın seçimi	86

4.4.2.	Dış faz ortamının seçimi	87
4.4.3.	Sürfaktan konsantrasyonlarının belirlenmesi	87
4.4.4.	Polimer-Etkin Madde Etkileşimi Bulgularının Değerlendirilmesi	93
4.4.4.1.	DSC Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi	93
4.4.4.2.	FTIR Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi	93
4.4.5.	Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Verilerinin Değerlendirilmesi	87
4.4.6	Enkapsülasyon Etkinliği Verilerinin Değerlendirilmesi	89
4.4.7.	Üretim Verimi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	90
4.4.8.	Uygun Özelliğe Sahip Formülasyonların Seçimi	90
4.4.9.	Mikroskop görüntülerinin değerlendirilmesi	89
4.4.10.	İn vitro çıkış deneylerinin değerlendirilmesi	90
4.4.11.	Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	94
4.4.12.	Antimikrobiyal Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi	95
4.4.13	Organik Çözücü Kalıntısı Bulgularının Değerlendirilmesi	98
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	97
ÖZET		98
SUMMARY		99
KAYNAKLAR		100
ÖZGEÇMİŞ		111

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, akciğer enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan antibiyotiklerden levofloksasin hemihidrat'ın pulmoner yolla uygulamaya yönelik mikropartiküler kuru toz formülasyonları geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmam boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana destek olan, deneysel çalışmalarım için her türlü imkanı sağlayan danışmanım Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamda bana yardımcı olan, destek ve katkılarını esirgemeyen, sorunların aşılması için bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Sayın Burcu DEVRİM'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı yapabilmem için bana her türlü imkanı sağlayan A.Ü. Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Nilüfer TARIMCI'ya, ve önceki anabilim dalı başkanımız Prof.Dr. Sayın Asuman BOZKIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızda kullandığım levofloksasin hemihidrat'ın teminini sağlayan Koçak Farma ilaç firmasına teşekkür ederim.

SEM analizlerinin yapılmasında yardımcı olan Enver KAHVECİ'ye, DSC analizlerinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Burcu DEVRİM'e, FTIR analizlerinde yardımcı olan Doç.Dr.Mehmet ALP'e, antimikrobiyal aktivite testlerinin yapılmasında yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Müjde ERYILMAZ'a teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında dostluk ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Uzm. Ecz. Rüya ÇAMCA, Ecz. Tuğba EREN BÖNCÜ ve Uzm. Ecz. Umut Can ÖZ'e çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi, tez çalışmalarım süresince de sevgi ve desteklerini sonuna kadar hissettiğim, sevgili babam Şahabeddin İMAMOĞLU'na, sevgili annem Naciye İMAMOĞLU'na ve sevgili kardeşim Tayfun İMAMOĞLU'na sonsuz teşekkür ve minnettarlığımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
BSS	Bağıl standart sapma
C	t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı
C ₀	Başlangıçtaki etkin madde miktarı
DCM	Diklorometan
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FTIR	Fourier transform infrared spektroskopisi
GSS	Geometrik standart sapma
i.v.	İntravenöz
k ₀	Sıfır derece çözünme hızı sabitesi
k ₁	Birinci derece çözünme hızı sabitesi
k ₄	Spesifik çözünme hızı sabitesi
KOÇ	Kütlesel ortalama çap
KOAÇ	Kütlesel ortalama aerodinamik çap
KOAH	Kronik obstruktif akciğer hastalığı
KTi	Kuru toz inhaler
k/s/s	katı/su/su
LALLS	Dar açılı lazer ışığı kırınımı yöntemi
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
m	Eğim
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
n	Kesişim
ÖDİ	Ölçülü doz inhaler
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Poli(vinil alkol)
r	Korelasyon katsayısı
r ²	Determinasyon katsayısı
s/y/s	su/yağ/su
SH	Standart hata
SS	Standart sapma
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
Wo	Başlangıçtaki etkin madde miktarı
W	t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı
σ	Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması
ρ	Sıkıştırılmış dansite
ρ ₀	Referans dansite (1 g/ml)
X	Dinamik şekil faktörü

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Pulmoner sistemin yapısı
- Şekil 1.2.** Pulmoner epitelin yapısı
- Şekil 1.3.** Partiküllerin respiratuvar bölgede tutulma mekanizmaları
- Şekil 1.4.** Anderson Cascade Impactor cihazının genel görünümü
- Şekil 1.5.** Anderson Cascade impactor'de partikül hareketinin şematik gösterimi
- Şekil 1.6.** Örnek ölçülü doz inhaler kesiti
- Şekil 1.7.** Örnek nebulizör cihazı
- Şekil 1.8.** Örnek kuru toz inhaler (Easyhaler®)
- Şekil 1.9.** Çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikropartikül oluşturulması
- Şekil 1.10.** Poli(ε-kaprolakton)'un kimyasal formülü
- Şekil 1.11.** Poli-(laktik-ko-glikolik asit) ve monomerlerinin Kimyasal Yapısı
- Şekil 1.12.** PLGA'nın Kimyasal Formülü
- Şekil 1.13.** Levofloksasin hemihidrat'ın açık formülü
- Şekil 2.1.** Mikropartikül imalat şeması
- Şekil 3.1.** Levofloksasin hemihidrat'a ait DSC termogramı
- Şekil 3.2a.** Levofloksasin hemihidrat'ın FTIR spektrumu
- Şekil 3.2b.** Levofloksasin hemihidrat'ın çalışmamızda elde edilen FTIR spektrumu
- Şekil 3.3.** Levofloksasin hemihidrat'ın distile su için UV spektrumu
- Şekil 3.4.** Levofloksasin hemihidrat'ın ph 7,4 fosfat tamponu için UV spektrumu
- Şekil 3.5.** Levofloksasinin Distile Sudaki Kalibrasyon Grafiği
- Şekil 3.6.** Levofloksasinin pH 7,4 Fosfat Tamponundaki Kalibrasyon Grafiği
- Şekil 3.7.** Distile su için doğrusallık grafiği
- Şekil 3.8.** pH 7,4 fosfat tamponuna ait doğrusallık grafiği
- Şekil 3.9.** Mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü ve dağılımı grafikleri a)F1 b)F2 c)F3 ç)F4 d)F5 e)F6 f)F7 g)F8 h)F9 ı)F10 i)F11 j)F12 k)F13 l)F14 m)F15 n)F16 o)F17 ö)F18 p)F19 r)F20 s)F21 ş)F22 t)F23
- Şekil 3.10.** Mikropartiküllere ait optik mikroskop görüntüleri a)F1 b)F2 c)F3 ç)F4 d)F5 e)F6 f)F7 g)F8 h)F9 ı)F10 i)F11 j)F12 k)F13 l)F14 m)F15 n)F16 o)F17 ö)F18 p)F19 r)F20 s)F21 ş)F22 t)F23
- Şekil 3.11.** Farklı konsantrasyonlarda Tween 80 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).
- Şekil 3.12.** Farklı konsantrasyonlarda Tween 60 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).
- Şekil 3.13.** Farklı konsantrasyonlarda Tween 40 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).
- Şekil 3.14.** Farklı konsantrasyonlarda Tween 20 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).
- Şekil 3.15.** Farklı konsantrasyonda Span 80 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).

- Şekil 3.16.** Farklı konsantrasyonda Span 60 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).
- Şekil 3.17.** Farklı konsantrasyonda Span 40 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).
- Şekil 3.18.** Farklı konsantrasyonda Span 20 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).
- Şekil 3.19a.** F4 formülasyonuna ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri
- Şekil 3.19b.** F6 formülasyonuna ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri
- Şekil 3.19.** F4 ve F6 formülasyonları ve PLGA'nın DSC termogramı
- Şekil 3.21.** F4 formülasyonuna ait FTIR spektrumu
- Şekil 3.22.** F6 formülasyonuna ait FTIR spektrumu
- Şekil 3.23.** F4 + İnhalac 70 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi
- Şekil 3.24.** F4 + İnhalac 70 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmalı miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri
- Şekil 3.25.** F4 + İnhalac 120 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi
- Şekil 3.26.** F4 + İnhalac 120 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmalı miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri
- Şekil 3.27.** F4 + İnhalac 230 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi
- Şekil 3.28.** F4 + İnhalac 230 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmalı miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri
- Şekil 3.29.** F6 + İnhalac 70 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi
- Şekil 3.30.** F6 + İnhalac 70 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmalı miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri
- Şekil 3.31.** F6 + İnhalac 120 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi
- Şekil 3.32.** F6 + İnhalac 120 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmalı miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri
- Şekil 3.33.** F6 + İnhalac 230 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi
- Şekil 3.34.** F6 + İnhalac 230 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmalı miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri
- Şekil 3.35.** F4 ve İnhalac 230 karışımına ait elek üstü toza ait elektron mikroskobu görüntüleri
- Şekil 3.36.** F4 ve İnhalac 230 karışımına ait elek altı toza ait elektron mikroskobu görüntüleri
- Şekil 3.37.** F6 ve İnhalac 230 karışımına ait elek üstü toza ait elektron mikroskobu görüntüleri
- Şekil 3.38.** F6 ve İnhalac 230 karışımına ait elek altı toza ait elektron mikroskobu görüntüleri

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Bazı biyoparçalanır polimerlerin özellikleri
Çizelge 1.2.	Piyasada bu etkin maddeyi içeren farmasötik formlar ve dozları
Çizelge 2.1.	PLGA kullanılarak hazırlanan önformülasyon çalışmaları
Çizelge 2.3.	Farklı Tween tipleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar
Çizelge 2.4.	Farklı Span tipleri ile hazırlanan formülasyonlar
Çizelge 3.1.	Levofloksasinin kalibrasyon doğrularına ait parametreler
Çizelge 3.2.	pH 7,4 fosfat tamponu için yapılan doğruluk bulguları
Çizelge 3.3.	Distile su için yapılan doğruluk bulguları
Çizelge 3.4.	pH 7,4 fosfat tamponu için yapılan tekrarlanabilirlik bulguları
Çizelge 3.5.	Distile su için yapılan tekrarlanabilirlik bulguları
Çizelge 3.6.	Teşhis sınırı (LOD) bulguları
Çizelge 3.7.	Tayin sınırı (LOQ) bulguları
Çizelge 3.8.	Levofloksasinin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu için doğrusallık parametreleri
Çizelge 3.9.	Farklı miktarlarda PLGA ile hazırlanan önformülasyonların enkapsülasyon etkinliği bulguları
Çizelge 3.10.	Ön formülasyonlara ait üretim verimi bulguları
Çizelge 3.11.	Hazırlanan mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü, span ve standart sapma bulguları
Çizelge 3.12.	İç fazda farklı Tween tipleri ve konsantrasyonları kullanılan mikropartiküllerde enkapsülasyon etkinliği bulguları
Çizelge 3.13.	Dış fazda farklı Span tipleri ve konsantrasyonları kullanılan mikropartiküllerde enkapsülasyon etkinliği bulguları
Çizelge 3.14.	İç fazda farklı Tween tipleri ve konsantrasyonları kullanılan mikropartiküllerde ürün verimi bulguları
Çizelge 3.15.	Dış fazda farklı Span tipleri ve konsantrasyonları kullanılan mikropartiküllerde ürün verimi bulguları
Çizelge 3.16.	F4 ve F6 formülasyonlarına ait çözünme hızı kinetikleri bulguları
Çizelge 3.17.	F4 ve F6 formülasyonlarına ait sıkıştırılmış dansite bulguları
Çizelge 3.18.	F4 ve F6 formülasyonlarının İnhalac 70, İnhalac 120 ve İnhalac 230 ile 1:5 oranında hazırlanmış karışımlarına ait sıkıştırılmış dansite bulguları
Çizelge 3.19.	Mikropartiküllerin tek başına ve İnhalac karışımlarına ait KOAÇt bulguları
Çizelge 3.20.	F4 ve F6 formülasyonlarına ait antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları

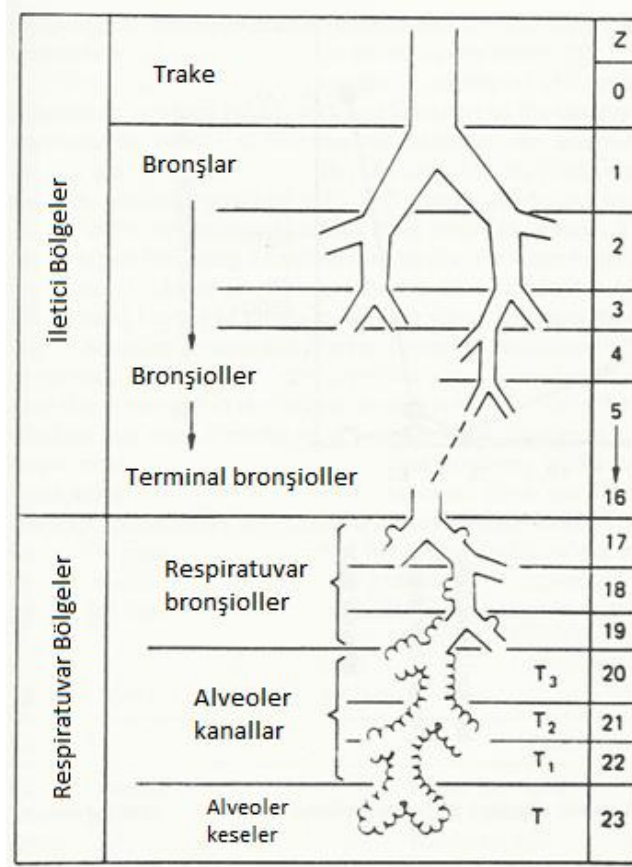
1. GİRİŞ

Akciğer hastalıkları, oldukça yaygın ve tüm yaş gruplarını etkileyen önemli bir sağlık problemidir. Günümüzde bu hastalıkların tedavisi, genellikle antibiyotiklerin oral ve parenteral uygulanması yoluyla yapılmaktadır. Ancak antibiyotiklerin yüksek dozda sistemik uygulanması çeşitli yan etkilere olduğundan, akciğeri direkt hedef alan ve böylece sistemik etkiyi minimum düzeye çekebilecek bir tedavi yöntemine ihtiyaç doğmuştur. Akciğerlerin, geniş yüzey alanı, ince epitel tabakası, yüksek damarlanma ağı ve ilk geçiş etkisini elimine edilebilmesi gibi, hem lokal hem sistemik tedaviler açısından avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Akciğerler aynı zamanda astım, kistik fibrozis, akciğer kanseri, tüberküloz gibi hastalıklarda, sistemik tedavideki istenmeyen etkiler olmaksızın, hastalıklı bölgeye direk ulaşımı sağlamaktadır (Labiris ve ark., 2006). Mikropartiküller, büyüklükleri 0.1 µm-200 µm arasında değişen küçük katı partiküller veya etrafı çeşitli sentetik veya doğal polimerlerle çevrili damlacıklardır (Komatsu ve ark., 1983). Son yıllarda ilaç taşıyıcı olarak sıkça kullanılan mikropartiküller, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu biyomateryallerden hazırlanabilmektedir. Mikropartiküller, tedavide hedef bölgelere etkin madde taşıyabilme, etkin maddeyi enzimatik parçalanmadan koruma, uzun süreli salım sağlayabilme, suda çözünmeyen/az çözünen maddelerin taşınabilmesi ve biyoyararlanımın artırılması gibi avantajlar sağlamaktadır. Levofloksasin hemihidrat, florokinolon grubu bir antibiyotik olup, akciğer enfeksiyonları başta olmak üzere çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğu bilinmektedir. Birçok akciğer hastalığının tedavisinde inhalasyon yoluyla yapılan tedavinin yararını destekleyen çalışmalar günden güne artmaktadır. Çalışmamızda, levofloksasin hemihidrat'ın, pulmoner yolla uygulamaya yönelik mikropartiküler sistemlerini içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Solunum Sisteminin Yapısı

İlacın akciğerlerdeki dağılımı, akciğer anatomisi ile son derece bağlantılıdır. Pulmoner sistem ağaç benzeri bir dallanmaya sahip olup, üst ve alt bölge olarak iki kısımda incelenebilir. Üst bölgede ağız, nazal bölge, farenks, larenks, trake ve bronşlar, alt bölgede bronşoller ve alveoller bulunur. Alt bölgenin ilk dallanmaları daha çok havayı nemlendirme, ısıtma ve transfer görevini görmektedir.

Respiratuvar bölge denilen son dallanmalar ise gaz değişiminden sorumludur. Dallanma arttıkça yüzey alanı genişlemektedir (Zeng ve ark., 2001).

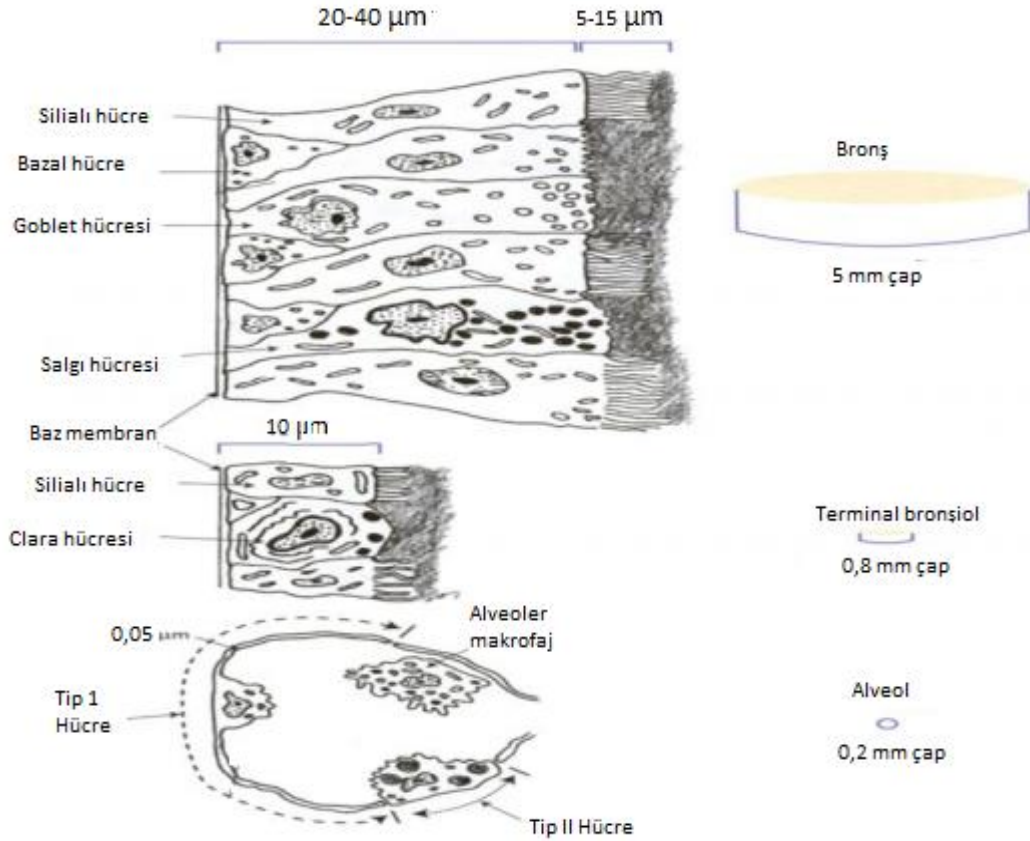


Şekil 1.1. Pulmoner sistemin yapısı (Zeng ve ark., 2001)

1.2. Pulmoner Epitelin Yapısı

Pulmoner sistem 40'tan fazla hücre tipine sahiptir. Bronşlarda bulunan hücreler, aralarında salgı hücrelerinin de bulunduğu, çoğunlukla goblet hücreleri ve silialı hücrelerdir. Silialı epitel hücrelerinin her birinde yaklaşık 5 µm uzunluk ve 0,25 µm çapında ortalama 200 adet silia bulunmaktadır. Bronşiol bölgedeki epitellerde ise silialı kübik hücreler ağırlıkta olup düz kas hücreleri de bulunmaktadır. İçerisinde mukus salgılayan granüller bulunan Goblet hücreleri ve salgı hücreleri alt solunum yollarına gittikçe azalmakta, bronşial sekresyon ve yüksek metabolik aktiviteye sahip Clara hücreleri ise artmaktadır. Alveoler bölge epiteli daha düz bir yüzeye sahiptir ve 0.1-0.5 µm kalınlığındadır. Bu kısımda iki tip epitel hücre bulunmaktadır. Tip-1 pnömositler, hava-kan bariyerinin çok yakın olduğu ince yapıdaki hücrelerdir.

Alveol keseleri çevreleyen epitelin neredeyse tamamını Tip-1 hücreler oluşturmakta, az miktarda Tip-2 hücreleri de bulunmaktadır. Tip-2 pnömositler ise temel olarak pulmoner sürfaktan salgılanmasından sorumludur (Courrier ve ark., 2002). Alveollerin sahip olduğu geniş yüzey alanı, yüksek damarlanmaya sahip bir ağ şeklinde sistemik dolaşıma erişim sağlamaktadır (Stone ve ark., 1992).



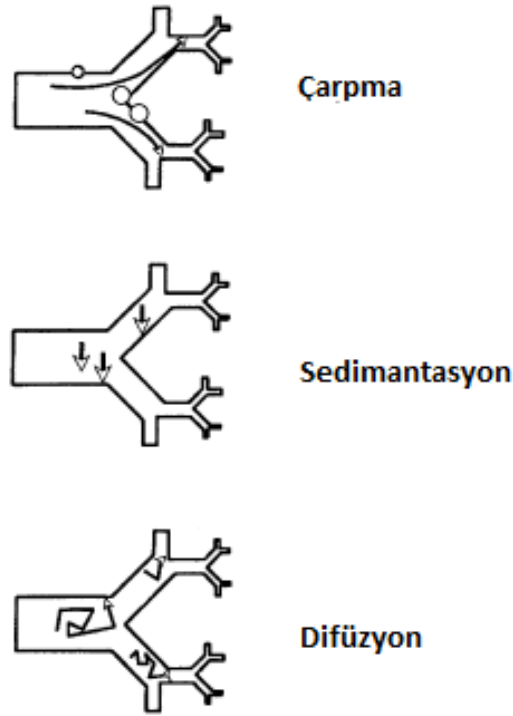
Şekil 1.2. Pulmoner epitelin yapısı (Karhale ve ark., 2012)

1.3. Respiratuvar Bölgede Partiküllerin Tutulmasına Etki Eden Faktörler

İlacın pulmoner sistemde bölgesel tutulumunu etkileyen faktörlerin başında partikülün aerodinamik davranışı gelmektedir. Bununla beraber hastanın nefes alma şekli (hız, hacim ve kalış süresi) ve solunum yolu morfolojisi, inhalasyon cihazının bir seferde akciğere verdiği ilaç miktarı ve uygulama süresi de partiküllerin bölgesel tutulumunu etkiler. Pulmoner yolla uygulama için partiküllerin optimal aerodinamik çapı ortalama 1-5 mikron arasında olmalıdır.

Daha büyük partiküller üst solunum yolu bölgelerinde tutularak respiratuvar bölgeye geçememekte, daha küçük partiküller ise gaz benzeri davranış göstererek nefesle birlikte dışarı verilebilmektedir.

İnhalasyon esnasında partiküller respiratuvar bölgede farklı mekanizmalarla tutuluma uğrar. Bu mekanizmalardan en önemlileri: çarpma (impaction), sedimantasyon ve difüzyondur.



Şekil 1.3. Partiküllerin respiratuvar bölgede tutulma mekanizmaları (Lohrmann, 2005)

- Çarpma (Impaction): Partiküller inhale edildikten sonra, hava solunum yolları boyunca ilerlerken, akımın yön değiştirdiği bölgelerde yeterli momentuma sahip partiküllerin, hava akımı doğrultusu dışında davranarak önlerine çıkan bariyerlere çarpıp tutuluma uğramasıdır. 5 mikron çapından büyük partiküller bu mekanizmayla üst akciğer bölgelerinde tutulmaktadır. Çarpma yöntemiyle tutulum, partikül büyüklüğünün, dansitesinin ve hava akım hızının artışıyla artmaktadır.

- Sedimantasyon: İn hale edilen partiküllerin yerçekimi etkisiyle tutulmasıdır. Bu mekanizma hava akım hızının önemsiz olduğu alt solunum bölgelerinde gerçekleşmektedir. Havanın

akciğerlerde kalma süresi sedimantasyon ile tutulmayı etkilemektedir. Bu mekanizma 1-5 mikron arasındaki partiküller için geçerlidir.

- Difüzyon: Çapı 1 mikrondan küçük partiküllerin hava akışı içerisinde gaz moleküllerinin çarpışma etkisiyle Brownian hareketi göstererek akciğerde tutulmasıdır. Partikül büyüklüğü azaldıkça Brownian difüzyon hareketi artmaktadır. Difüzyon yoluyla tutulma, akciğerin derin bölgelerinde gerçekleşen bir mekanizmadır ve partiküllerin bu bölgelerde kalış süresi de tutulmayı etkileyen faktörlerdendir. (Zeng ve ark., 2001)

İlaç-cihaz kombinasyonunun doğru olması ve uygun partikül büyüklüğü sağlama, ilacı akciğerde istenen bölgeye ulaştırma konularında oldukça önemlidir. Buna ek olarak, hastanın nefes alma şekli de partikül tutulumunu etkilemektedir. Hızlı inhalasyonla partiküller larinks ve burun yüzeyine çarpmakta, akciğere ilerleyememektedir. Yavaş bir inhalasyon ise 10 µm'ye kadar olan partiküllerin akciğere girmesine izin verebilmektedir. Bireyler arasındaki değişkenlik, oldukça yavaş inhale ederek ve/veya küçük partiküller (1-3 µm) kullanılarak azaltılabilmektedir. Bunlara ek olarak, hastalığa bağlı olarak akciğerlerde gelişen bronkokonstrüksiyon ve inflamasyon gibi durumlar, partiküllerin solunum yollarında ulaşabildiği bölgeyi değiştirebilmektedir (Scheuch ve ark., 2007).

1.4.Pulmoner Yolla İlaç Uygulamasının Avantajları ve Dezavantajları

Akciğerler, daha önce bahsedilen yapısal avantajları, sistemik tedavinin neden olduğu yan etki riskini minimum düzeye çekmesi, ilk geçiş eliminasyonunu elimine etmesi gibi avantajlarının yanında, non-invaziv uygulama sağlamasıyla hasta uyuncunu artırmaktadır (Mansour ve ark., 2009). Pulmoner yolla ilaç uygulamasının avantajları yanında dezavantajları da bulunmaktadır. İnhalasyon cihazlarının çeşitliliği ve aparatlarının kullanımı, çocuk ve yaşlı hastalarda uyuncu azaltabilmektedir. İlaç dozunun tekrarlanabilirliği ve akciğerdeki dağılımı, hastanın kullanımından ve nefes alma profilinden etkilenebilmektedir. Lokal etkili ilaçlarda oro-farenks bölgesinde birikme, lokal yan etkiler ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Taylor ve Kelleway, 2001).

1.5. Aerodinamik Partikül Davranışı ve Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Belirlenmesi

Partiküllerin aerodinamik davranışı, partikül büyüklüğü, şekli, dansitesi, yer değiştirme hızını ifade eden bir terimdir. Bir partiküler sistemin kütleli ortalama çapı (KOÇ), partiküllerin ağırlıkça %50'sinin altında, %50'sinin de üzerinde bulunduğu çap olarak tanımlanmaktadır. Kümülatif dağılım eğrisinde %50 noktasına tekabül eder. Ancak partiküller genellikle düzensiz şekillere ve farklı dansitelere sahip olduğundan, davranışlarını belirleyebilmek için aerodinamik çapları dikkate alınmaktadır. Kütleli ortalama aerodinamik çap (KOAC) ise, partikül çökme hızı ile aynı çökme hızına sahip olan birim yoğunluktaki (1g/cm^3) bir kürenin çapıdır (Labiris ve Dolovich, 2003).

$$d_{aero} = d_{geo} \left[\frac{(\rho / \rho_{ref})^{0.5}}{\gamma} \right] \quad (\text{Denklem 1.1.})$$

d_{geo} : Geometrik çap

γ : Şekil faktörü (Bu faktör küre için 1'dir)

ρ : Partiküllerin ortalama sıkıştırılmış dansitesi

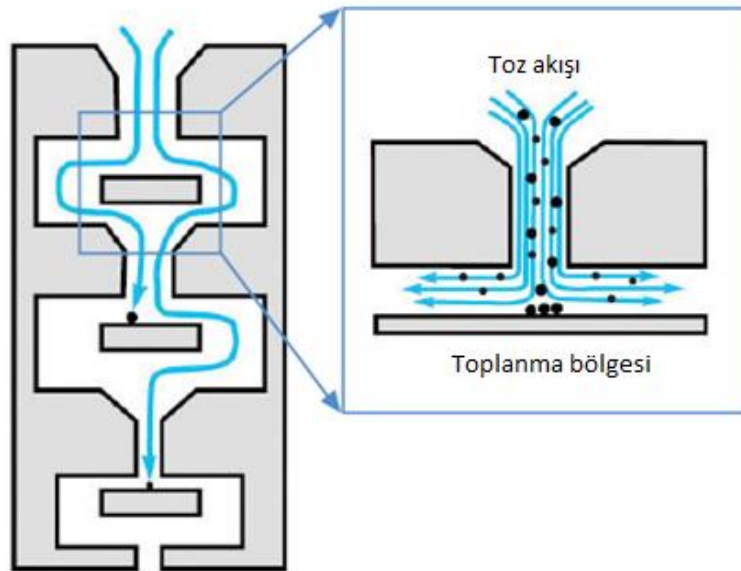
ρ_{ref} : Referans dansite (Suyun dansitesidir, 1g/cm^3 'e eşittir)

Cascade impactor'lar aerodinamik partikül özelliklerinin testi için farmakopelerde yer alan sistemlerdir. Bu yöntem; hem aerodinamik çapın, hem içerikteki aktif farmasötik bileşenlerin, hem de içerikteki dozun ölçümüne imkan vermektedir. Cascade impactor'lar partikülleri, yoğunluk ve şekillerini bilmeye gerek olmaksızın, partikül eylemsizliklerine göre ayıracak hassasiyete sahip olarak geliştirilmişlerdir. Partikül eylemsizliği ise hız ve aerodinamik partikül çapının bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Test cihazı için; partiküller "kuru" bir yüzey veya kapta toplanıyorsa 'impactor', partiküllerin çarptığı yüzey sıvı ise 'impinger' terimleri kullanılmaktadır.



Şekil 1.4. Anderson Cascade Impactor cihazının genel görünümü (Copley Scientific, 2015)

İşlemin prensibine göre, partiküller hava ile birlikte çaplarına göre alt alta sıralanmış elek tabakalarından geçirilir ve aerodinamik çaplarına göre tabakalara çarparak birikirler. En küçük partiküller ise hava ile birlikte alt katmanlara doğru harekete devam ederler. İşlem sonunda her plakadaki partiküller uygun bir çözücüye alınarak HPLC ile miktar analizi yapılır.



Şekil 1.5. Anderson Cascade impactor'da partikül hareketinin şematik gösterimi (Copley ve Lewis, 2011)

1.6. İnhalasyon Cihazları

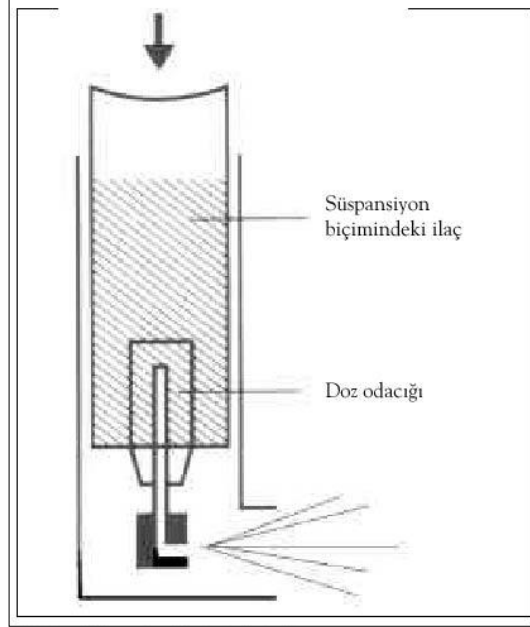
Etkin maddenin akciğerin derin bölgelerine ulaşabilmesi için inhalasyon cihazının, 1-5 mikron büyüklüğünde partiküller içeren formülasyonu dışarı verebilmesi gerekmektedir. Cihaz ayrıca dozların tekrarlanabilirliğini ve saklama süresinde formülasyonun fiziko-kimyasal stabilitesini de sağlamalıdır. Günümüzde inhalasyon cihazları olarak, ölçülü doz inhalerler (ÖDİ), nebulizörler ve kuru toz inhalerler (KTİ) geliştirilmiştir.

1.6.1. Ölçülü Doz inhalerler

Ölçülü doz inhalerler, kompakt olmaları, kullanım kolaylığı sağlamaları ve kullanıma hazır yapıları nedeniyle günümüzde yaygın kullanıma sahiptir. Bu cihazlar "itici gaz" içermekte olup, gerekli püskürtme özelliği ve buhar basıncı bu gaz aracılığıyla sağlanmaktadır. Kloroflourokarbonlar (CFC) uzun süre itici gaz olarak kullanılmıştır ancak çevresel zararları ortaya çıktıktan sonra kullanımı yasaklanmıştır. Klorofluorokarbonlara alternatif olarak geliştirilen hidroflouroalkanlar ise daha az zararlı olsa da şüpheleri ortadan kaldırmamıştır. Ancak bir formülasyonda itici gazın değiştirilmesi birçok çalışma gerektirmektedir. Bunun nedeni, ölçülü doz inhalerlerde kullanılan itici gazların polaritelerinin, buhar basınçlarının, dansitelerinin birbirlerinden farklı olması, bunun da etkin maddenin çözünürlüğünü ve dolayısıyla akciğerdeki tutunma özelliğini etkilemesidir. Bazı hastalarda boğazdaki yarattığı soğuk etki öksürme refleksine neden olmakta, bu da mikropartiküllerin solunum yollarına geçişine engel olmaktadır. Aynı zamanda ölçülü doz inhaler kullanımı, hastanın nefes almasıyla inhalerden ilaç çıkışının senkronize olmasını gerektirmektedir. Bu durum ise hasta uyumsuzluğuna neden olmaktadır. Bu problemleri çözebilmek adına inhalasyon cihazının ağız kısmına takılan "spacer" isminde ara cihazlar geliştirilmiştir. Bu ara cihazlarla partiküllerin inhalerden çıkış hızı düşmekte, içlerinde partikül bulutu oluşturulduğu için nefes koordinasyonu ihtiyacı ortadan kalkmaktadır (Podzcek, 1997, Zeng ve ark., 2001). Aynı zamanda büyük partiküller bu kısımda ayrıldığı için ağız/boğaz kısmında kalan partikül sayısı azaltılıp, akciğere geçiş yapan partiküllerin sayısı artırılabilir (Steckel, 2003).

Bronşiyal astım ve kronik solunum yolu hastalıklarında inhalasyon yolu ile tedavide ÖDİ ilk olarak düşünülen aerosol ilaç şeklidir. ÖDİ sistem yüzlerce kez püskürtme yapabilmekte ve her püskürtmede 25 - 100 µl çözücü içinde 10 -100 µg disperse edilmiş etkin madde

taşıyabilmektedir. Genellikle ÖDİ formülasyonları süspansiyon veya çözelti şeklinde hazırlanmaktadır.



Şekil 1.6. Örnek ölçülü doz inhaler kesiti (Erk., 2002)

1.6.2. Nebulizörler

Nebulizörler daha çok hastanede tedavi gören, hareketlerinde kısıtlama olan veya diğer cihazları kullanmakta güçlük çeken hastalarda (özellikle 4 yaş altı çocuklarda) kullanılmaktadır. Bu yolla inhalasyon hastaya genelde maske yardımıyla yaptırılmaktadır. Ölçülü doz inhalerler veya kuru toz inhalerlerle verilemeyecek kadar büyük dozların hastaya verilebilmesine de olanak sağlamaktadır. Herhangi bir nefes koordinasyonu gerektirmemekte ve sürekli inhalasyon sağlanmaktadır. Nebulizörler etkin madde içeren çözelti veya süspansiyonları sprey haline dönüştürerek küçük boyutta damlacıklar haline getirmekte, bu da etkin maddenin akciğerlerin derin kısımlarına penetrasyonuna imkan vermektedir. Jet nebulizör ve ultrasonik nebulizör olarak farklı tiplerde, farklı yöntemlerle damlacık oluşturmaktadır. Jet nebulizörler, basınçlı bir gaz yardımıyla çözelti kapiller içerisinden geçirilerek, ultrasonik nebulizörler ise yüksek frekansta ses dalgalarının meydana getirdiği vibrasyon yoluyla çözelti veya süspansiyonu nebulize etmektedir. Diğer inhalasyon cihazlarıyla karşılaştırıldığında nebulizörler büyük boyutta ve pahalı olmaları, kullanımının zaman gerektirmesi yönüyle dezavantajlara sahiptir. 2004 yılında Boehringer firmasının

tanıttığı Respimat® SMI (Soft Mist™ Inhaler) nebulizör taşınabilir olup daha yumuşak, yavaş hareket eden bir partikül boyutu oluşturmayı başarmış ve daha iyi bir akciğer penetrasyonuna olanak sağlamıştır.

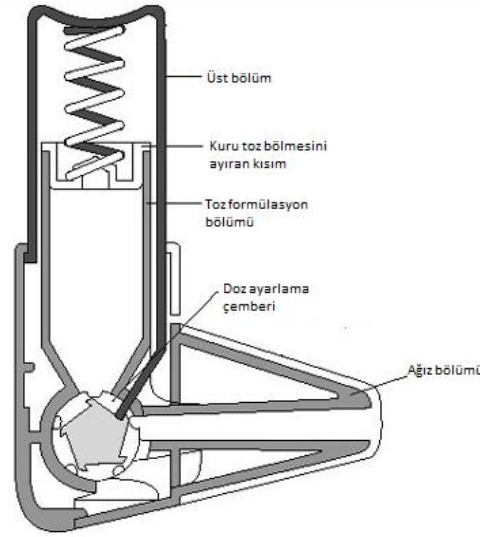


Şekil 1.7. Örnek nebulizör cihazı (Türk Toraks Derneği, 2014)

1.6.3. Kuru Toz İnhalerler

Son yıllarda kuru toz inhalerler (KTİ), daha yüksek miktarda etkin madde taşıyabilme ve stabilite sağlama yönüyle öne çıkmış, çevreye zararlı gaz içermemeleri ve kompakt yapıları sayesinde ölçülü doz inhalerlere ve nebulizörlere alternatif olmuştur (Barclay ve Begg, 1994). Formülasyonun kuru toz formunda olması, saklama süresince yüksek bir fiziko-kimyasal stabilite sağlanmasına olanak vermektedir. En önemli özelliklerinden biri pasif nefesle aktive olmasıdır, yani hastanın nefes-el koordinasyonuna gerek yoktur. Ancak bu durum, akciğere taşınan ilaç miktarının hasta nefes alma kuvveti ve süresi ile beraber değişmesine neden olur. Taşınması kolay, nebulizörlere göre daha ucuz cihazlardır ve doz tekrarlanabilirliğine imkan vermektedir. Piyasada birçok tipte kuru toz inhaler bulunmaktadır. Bazı KTİ'ler, her dozun ayrı ayrı doldurulmuş olduğu jelatin kapsüller cihazın içine yerleştirilerek kullanılmaktadır. İnhalasyondan önce gerekli dozu içeren kapsül, metal iğnelerden oluşan bir mekanizmayla delinmekte ve inhalasyon sırasında toz bu deliklerden dışarı verilmektedir. Bunun dışında, kuru toz formülasyon blisterler halinde bölünmüş olarak da bulunmaktadır. İnhalasyondan önce inhaler içerisindeki blister delinmekte ve

tozu dışarı verebilmektedir. Bu cihazların avantajı, kuru toz formülasyonunun kullanımına dek havadaki nemle temasının önlenmiş olmasıdır (Steckel, 1997). Tekli doz veren cihazlara her seferinde yeni doz yerleştirilmesi gerekmektedir. Çoklu doz içeren cihazlarda ise kuru toz bir bölmede depolanmakta, her inhalasyondan önce gerekli doz cihaz içerisinde bulunan dozlama ünitesiyle yapılmaktadır.



Şekil 1.8. Örnek kuru toz inhaler (Easyhaler® , Juntunen-Backman ve ark., 2002)

1.7. Pulmoner Yolla Uygulanan İlaç Taşıyıcı Sistemler

1.7.1. Lipozomlar

Lipozomlar, etkin madde taşıyıcı sistemlerden biri olup 20 nm- 10 mikrometre arasında değişen partikül büyüklüğüne sahiptirler. Yapılarında su fazdan oluşan çekirdeği saran en az bir lipid çift-tabaka bulunmaktadır. Bu lipid tabakalar arasında sulu faz içermektedirler. Lipozomlar, yapılarındaki sulu faz nedeniyle hidrofilik moleküllerin, lipid çift-tabakalar sayesinde hidrofobik moleküllerin taşınabilmesine olanak vermektedir. Lipozomların, akciğer sürfaktanında bulunan materyallerle hazırlanabilmesi, onları akciğerlere uygulama için özellikle uygun duruma getirmektedir. Akciğer sürfaktanları ise kompleks bir karışım halinde salgılanmakta olup, yapısı %85 oranında fosfolipidlerden oluşmaktadır. Bunlar arasında en yüksek miktara sahip olan dipalmitoilfosfatidilkolindir ve bunu fosfatidilgliserol izlemektedir (King, 1984). Akciğer sürfaktanı aynı zamanda kolesterol ve serum dışı proteinler içermektedir ve bu proteinler sürfaktanın dağılma, absorpsiyon ve tekrar

kullanımı bakımından önem taşımaktadır (Wright ve Clements, 1987). Sürfaktanın klirens ve tekrar kullanım mekanizmaları, alveolde tutulan lipozom miktarını etkileyen en büyük faktördür. Yapılan çalışmalarda, radyoaktif olarak işaretlenmiş lipozomların akciğere uygulanmış, lipozomal fosfolipidlerin hızla akciğer parankimasına bağlandığı belirtilmiştir. Lipozomların yapısal kompozisyonu, pulmoner absorpsiyonunun hız ve derecesini etkileyen faktörlerden biridir. İçeriğinde fosfatidilgliserol taşıyan lipozomların daha hızlı ve yüksek oranda absorbe edildiği araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Oyarzun ve ark., 1980, Morimoto ve Adachi., 1982).

Lipozomlar son yıllarda hayvanlarda ve insanlarda denenmiştir. Bu çalışmalarda başlıca sitotoksik ajanlar, antiastmatik etkin maddeler, antimikrobiyal ve antiviral etkin maddeler ve sistemik etkili antioksidanlar lipozomlara yüklenmiştir. Bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonların tedavisinde, aşı ve immünomodülatör olarak çalışmalar yapılmıştır (McCullogh ve Juliano, 1979, Gilbert ve ark., 1988, Mihalko ve ark., 1988, McCalden ve ark., 1989, Taylor ve ark., 1989).

1.7.2. Mikropartiküller

Mikropartiküller büyüklükleri 0.1 µm-200 µm arasında değişen küçük katı partiküller veya etrafı çeşitli sentetik veya doğal polimerlerle çevrili damlacıklardır (Komatsu ve ark., 1983).

Mikropartiküller biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu biyomateriyallerden hazırlanabilmektedir. Mikropartiküllerin avantajlarından bazıları, tedavide hedef bölgelere etkin madde taşıyabilme, etkin maddeyi enzimatik parçalanmadan koruma, uzun süreli salım sağlayabilme, suda çözünmeyen/az çözünen maddelerin taşınabilmesi ve biyoyararlanımın artırılmasıdır. Mikropartiküllerin pulmoner sistemde hedef bölgeye penetrasyonu için uygun partikül büyüklüğü aralığında olması gerekmektedir. Çapı 30 µm'den büyük partiküller burun içinde 1-1,5 cm mesafede tutulmaktadır. Çapı 10 µm'den büyük partiküller ağız, burun ve nefes borusunda tutulmaktadır. 10 µm'den küçük olanlar broşlara ve akciğerin alt kısımlarına geçebilmekte, 5 - 10 mikron aralığındaki partiküller ise bronş ağacının ilk 6 dallanmasında tutulmaktadır (Gerrity, 1990). 5 mikrondan daha küçük partiküller ise son 6 dallanmada birikirler (Effros ve Mason., 1983, Folkesson ve ark., 1990, Tena ve Clara, 2012).

1.7.3. Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm arasında değişen koloidal polimerik partiküllerdir. Etkin maddelere adsorbsiyon, absorpsiyon, birleşme veya kimyasal bağlama yoluyla bağlanarak taşımaktadırlar. Nanopartiküller özellikle vücut sıvılarında, diğer koloidal ilaç taşıyıcı formlara göre daha stabildirler. Nanopartiküller kanserden tüberküloza kadar bir çok hastalık için ilaç taşıyıcı sistemler olarak geliştirilmiştir (Pandey ve Khuller, 2005, Gelperina ve ark., 2005). Partiküllerin yüzey ve boyutunda değişiklik yapılarak, partiküllerin dolaşımda kalış süresini artırılabilir. Bu şekilde partiküller klirensten korunarak fiziksel bariyerler (ör. kan-beyin yada mukozal bariyerler) üzerinden taşınması sağlanabilmekte ya da absorpsiyon yerinde kalma süresi uzatılabilir. Nanopartiküllerin hedeflendirilmesi ile, düşük ilaç konsantrasyonu ile terapötik doz sağlanabilmekte ve ilacın neden olduğu sistemik toksisitenin önüne geçilebilir.

1.8. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri

Mikropartiküller, günümüzde çeşitli yöntemlerle üretilmektedir. Bu yöntemler birbirinin yerine veya birbirini tamamlayıcı özelliklere sahiptir. Çoğu hazırlama yolu 3 temel teknikten oluşmaktadır. Bunlar:

1. Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma yöntemi

- a- Su İçine Yağ (Y / S) Tipi Emülsiyon ile Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi
- b-Yağ İçinde Su (S/Y) Tipi Emülsiyon ile Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi
- c- Modifiye (S / Y / S) Emülsiyon ile Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi
- d- Modifiye (S / Y/ Y) Emülsiyon ile Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi

2. Faz ayırıştırma (Koaservasyon) Yöntemi

- a- Basit Koaservasyon,
- b- Kompleks Koaservasyon

3. Püskürterek Kurutma Yöntemi (Aftabrouchad ve Doelker, 1992, Das ve Rao, 2006).

Bu yöntemlere ek olarak, polimerizasyon yöntemi (emülsiyon, süspansiyon, misel polimerizasyonu), polikondensasyon yöntemi (süspansiyon polikondensasyonu, emülsiyon polikondensasyonu), püskürterek dondurma yöntemi, sıcakta eritme yöntemi, kuasi-emülsiyon çözücü difüzyon yöntemi, delik (orifice) yöntemi, in-sitü yöntem, dispers fazda jelleşme ve çapraz bağlanma yöntemi gibi yöntemler de mikropartikül oluşturmada kullanılmaktadır. (Li ve ark., 1988; Arshady, 1990; Aftabrouhad ve Doelker, 1992, Gürsoy ve ark., 2002).

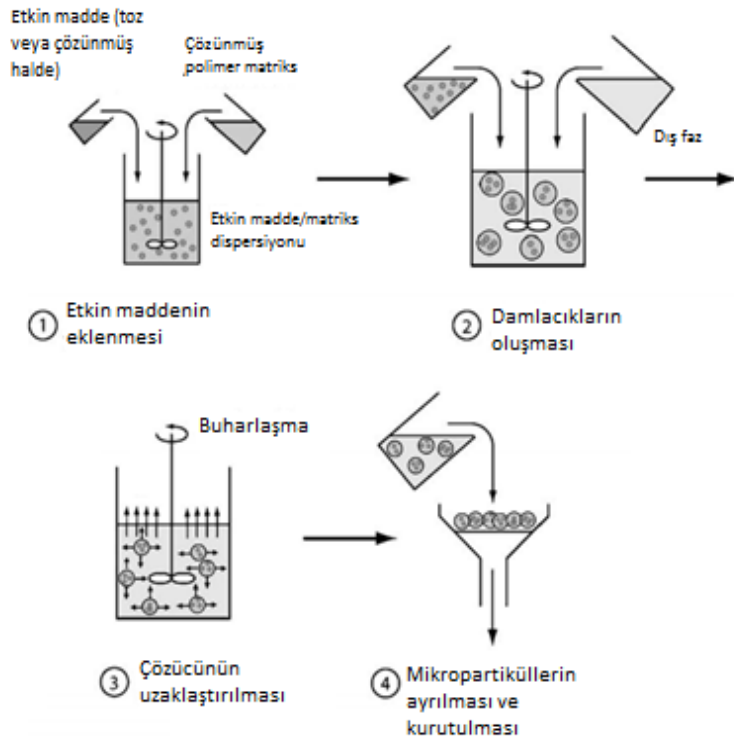
Püskürterek kurutma diğer yöntemlere göre basit ve yüksek verimliliğe sahip bir yöntemdir ancak yüksek sıcaklığa hassas etkin maddeler için kullanılması uygun değildir ve partikül büyüklüğünü kontrol etmek zordur (Johansen ve ark., 2000).

Koaservasyon yöntemi ise mikropartiküllerde çözücü ve koaservasyon ajanı kalıntısı bırakma riski taşımaktadır. Ayrıca bu yöntem küçük partikül büyüklüğü aralığında mikropartikül üretimi için uygun değildir. (Thomasin ve ark., 1996).

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yönteminde ise yüksek sıcaklıklara ve faz ayrıştırma ajanlarına gereksinim duyulmamaktadır. Nano boyutlardan mikro boyutlara kadar partikül büyüklüğü kontrol edilebilmektedir. Ancak enkapsülasyon koşulları ve materyalleri, yüksek enkapsülasyon ve düşük çözücü kalıntısı bırakma kriterlerini sağlayacak biçimde ayarlanmalıdır.

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemiyle mikropartikül hazırlanması, temel olarak 4 aşamadan oluşmaktadır:

- 1-Etkin maddenin polimer materyali ve -genellikle- organik çözücü bulunan faz içerisinde çözülmesi veya disperse edilmesi
- 2-Hazırlanan organik fazın, kendisiyle karışmayan ikinci bir -sıklıkla sulu- faz ile emülsifiye edilmesi
- 3- Çözücünün buharlaştırılmasıyla birlikte mikropartikül damlacıklarının katılaştırılması
- 4- Oluşan mikropartiküllerin ayrıştırılıp kurutulması



Şekil 1.9. Çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikropartikül oluşturulması

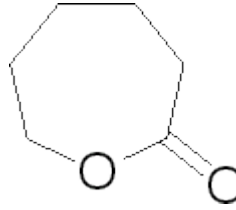
1.9. Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Mikropartikül hazırlanmasında doğal, yarı-sentetik veya sentetik, biyolojik olarak parçalanabilen veya parçalanamayan tipte polimerler kullanılmaktadır.

1.9.1. Poli-ε-kaprolakton (ε-PCL)

Biyolojik olarak geçimli bir polimer olan poli-ε-kaprolakton, hakkında in-vivo incelemeler yapılan ilk ilaç taşıyıcı polimerler arasındadır. Yavaş parçalanın, kısmen kristal yapıya ve yüksek molekül ağırlığına sahip, hidrofobik bir polimerdir. 2 - oksipanon homopolimeridir. Poli-kaprolakton beyaz katı parçacıklar halinde bulunur ve erime sıcaklığı 58°C – 63°C arasında ve camısı geçiş sıcaklığı -65°C ile -60°C arasındadır. Kloroformda, diklorometanda, etil asetatda, asetonunda, dimetil formamidde, tetrahidrofuranda ve hegzaflorozopropanolde çözünebilmektedir (Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition, 2009). Poli-ε-kaprolaktonların bozulması esnasında zincirler koparak molekül ağırlığı azalmakta, buna

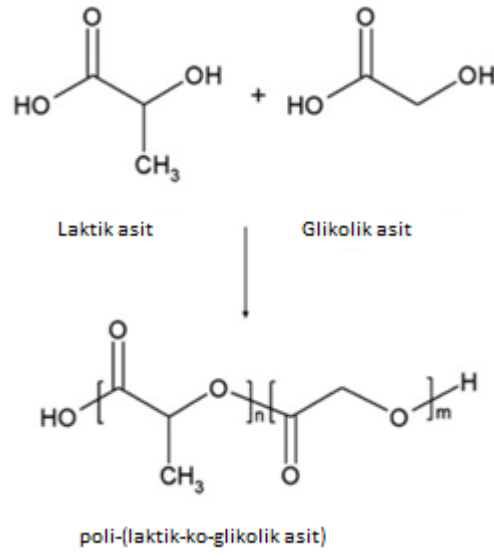
karşılık kristal yapı artmaktadır. Bunun nedeni, zincir kopmasının polimerin amorf bölgesinde gerçekleşmesi ve polimer zincirlerin hareketlilik kazanmasına yol açmasıdır. Bu zincirler tekrar tekrar yönlenip şekillenerek kristallenmekte, böylece kristal yapıda artış meydana gelmektedir. Poli-ε-kaprolaktonun diğer laktonlarla, örneğin D-L-laktat ile kopolimerleri ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır. Bu kopolimerlerin parçalanma hızı her iki polimerin ayrı ayrı parçalanma hızından daha yüksektir (Gürsoy ve ark., 2002).



Şekil 1.10. Poli(ε-kaprolakton)'un kimyasal formülü (Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition, 2009).

1.9.2. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)

PLGA, fizyolojik ortamda inert olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyolojik olarak uyumlu olması ve toksik olmayan metabolitlere parçalanabilmesi nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından da onaylı bir biyopolimerdir. Polilaktid-ko-glikolidler, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin farklı oranlarda bir araya getirilmesiyle elde edilen kopolimerlerdir. Örneğin PLGA 75:25 ifadesi, kopolimerin % 75 oranında laktik asit, %25 oranında glikolik asitten oluştuğunu belirtmektedir. Kopolimeri oluşturan bu monomerlerin oranları, elde edilen PLGA'nın oldukça farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip olmasına neden olmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan PLGA'ların bu özelliklerine göre ilaç salımının uzatılması ve kontrolü mümkün olmaktadır. PLGA'nın biyodağılım ve farmakokinetik profili non-lineer ve doz bağımlıdır (Yang ve ark., 2001). 120 °C'de susuz ortamda laktik asit ve glikolik asit polikondensasyonu ile düşük moleküllü PLGA sentezlenebilmektedir (Zhou ve ark., 2004, Wang ve ark., 2006). Başka araştırmacılar ise, kaynama sıcaklığı yüksek azaetropik bir çözücü olan difenil eter kullanılarak basit ve tek aşamalı bir polikondensasyon metodu geliştirmişlerdir. Ancak bu yöntemin kontrol parametrelerinin çokluğu ve yöntemde kullanılan çözücünün elde edilen üründen temizlenmesinin zorluğu yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır (Ajioka ve ark., 1995, Ajioka ve ark., 1998).



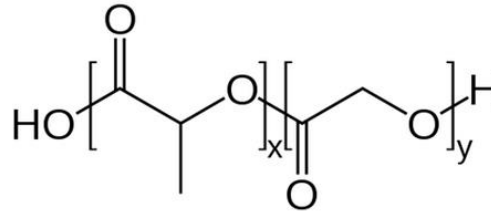
Şekil 1.11. Poli-(laktik-ko-glikolik asit) ve monomerlerinin Kimyasal Yapısı (Gentile ve ark., 2014)

PLGA, birçok çözücünde çözünebilme özelliğine, farklı molekül ağırlıklarına sahip etkin madde ve biyomolekülleri enkapsüle etme yeteneğine sahip bir polimerdir. PLGA'nın fiziksel özellikleri monomerlerin moleküler ağırlıkları ve oranları gibi birçok faktöre bağlıdır.

Çizelge 1.1. Bazı biyoparçalanır polimerlerin özellikleri (Sabir ve ark., 2009)

Polimer	Çözücü	Kristal Oranı (%)	Biyoparçalanma Süresi (Hafta)
Poli (L-laktik) asit	Benzen, tetrahidrofuran, dioksan	37	12-18
Poli (D,L-laktik)asit	Metanol, Dimetilformamid	Amorf	11-15
Poli (D,L-laktik-ko-glikolik)asit 85/15	Etil asetat, kloroform, aseton, tetrahidrofuran	Amorf	5-6
Poli (D,L-laktik-ko-glikolik)asit 75/25	Etil asetat, kloroform, aseton, Dimetilformamid, tetrahidrofuran	Amorf	4-5
Poli (D,L-laktik-ko-glikolik)asit 50/50	Etil asetat, kloroform, aseton, Dimetilformamid, tetrahidrofuran	Amorf	1-2

Yapısında % 70'den az glikolik asit içeren PLGA kopolimerleri amorf yapıya sahiptir ve diklorometan, etil asetat gibi organik çözücülerde iyi çözünmektedirler. Yüksek glikolik asit içeriği ve düşük molekül ağırlığı, parçalanma oranını artırmaktadır. PLGA kopolimerleri hem yağda, hem suda çözünen etkin maddeler kullanılarak mikropartiküler sistemlerin hazırlanmasına imkan vermektedirler. Farklı terapötik etkinliğe sahip düşük veya yüksek molekül ağırlıklı birçok etkin madde PLGA mikropartiküllerine enkapsüle edilebilmektedirler. PLGA mikropartikülleri oral, intravenöz, intra-arteriyal, nazal ve inhalasyon yoluyla ilaç taşınmasında uygulanabilmektedir. PLGA vücutta laktik asit ve glikolik asit monomerlerine parçalanmaktadır. Bu monomerler ise sitrik asit döngüsünde metabolize olup CO₂ ve H₂O olarak atılmakta, glikolik asit ise böbrekler tarafından elimine edilmektedir (Jalil ve Nixon, 1990, Okada ve Toguchi, 1995, Tunçay ve Çalış, 1999).



Şekil 1.12. PLGA'nın Kimyasal Formülü (Makadia ve Siegel, 2011)

1.10. Mikropartiküllerde Yapılan Kontroller

1.10.1. Etkin Madde-Polimer Etkileşimine İlişkin Kontroller

1.10.1.2. Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (FTIR)

FTIR (Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi) ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısı ölçme prensibine dayanan kimyasal analitik bir yöntemdir. İşlem temel olarak kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından absorpsiyonu ile gerçekleşir. Absorpsiyon, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden, moleküldeki bağların titreşim ve dönüşleri için gereken miktarda dalga enerjisinin gönderilmesiyle meydana gelir. Bu yöntem organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılır. Maddenin yapısındaki fonksiyonel grupların belirlenmesi, iki organik bileşiğin aynı olup olmadığının anlaşılması gibi ayırt edici bilgiler sağlamaktadır. Az miktarda örnekle çalışılabilmesi, birden

fazla dalga boyunu tarayabilmesi ve hızlı ölçüm yapabilmesi gibi avantajlara sahiptir (Skoog ve ark., 1998).

1.10.1.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Yöntemi

Diferansiyel taramalı kalorimetri yöntemi (DSC), madde ısıtılırken, soğutulurken veya sabit bir sıcaklıkta tutulurken absorbe edilen veya dışarı verilen enerji miktarını ölçen termoanalitik bir yöntemdir. Test edilen maddenin ve referansın sıcaklığını arttırmak için gerekli olan ısı miktarı, sıcaklığın zamana bağlı fonksiyonu olarak ölçülmektedir. Bu yöntem maddenin, erime, kristalleşme, süblimleşme gibi değişimlerinin, polimerlerin amorf durumdaki zincirlerinin camsı geçiş sıcaklığının (Tg), polimerin kristal yapı oranının, iki ya da daha fazla polimerden oluşan polimer karışımlarının faz durumunun tespit edilmesi gibi bilgiler sağlamaktadır.

1.10.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması

Partiküllerin büyüklük ve dağılımı formülasyon özelliklerini, bitmiş ürün özelliklerini ve ürünün biyoyararlanımını etkileyen parametreler arasındadır. Örneğin tozların partikül büyüklüğü değiştiğinde spesifik yüzey alanları da değişmekte, buna bağlı olarak ilacın vücut sıvılarında çözünme hızı ve emilimi de etkilenmektedir. Partikül büyüklüğü ve dağılımının belirlenmesi, hazırlanan formülasyonun amaca uygun hale getirilmesi, dozlamamanın doğru yapılması, karıştırma gibi işlemler kullanılan yöntemin standardize edilmesi açısından önemlidir. Partikül büyüklüğü ve dağılımının tespit edilmesi için, lazer difraksiyonu (LD) (Solanki, 2007), coulter counter (Fang, 2001), optik mikroskop yöntemi (Gupta, 2007) ve dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi (Varshosaz, 2005) gibi yöntemler sıkça kullanılmaktadır.

- Lazer Difraksiyonu (LD) Yöntemi

Çalışmamızda kullanılan lazer difraksiyonu yöntemi, partikül büyüklüğü ölçümünde kullanılan hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Bu yöntem inhalasyon formülasyonları için, nebulizörlerden (Clark, 1995), basınçlı ölçülü doz inhalerlerden (Moren, 1981), ve kuru toz inhalerlerden (Olsson ve ark.,1988, Everard ve ark., 1995) elde edilen partiküllerin büyüklüklerinin tespitinde kullanılmaktadır. Lazer difraksiyon yöntemi pratikte hızlı ölçüm

sağlaması nedeniyle, inhaler formülasyonlarının partikül büyüklüğü ölçümü için cascade impactor'lara alternatif olarak düşünülmüştür. Lazer difraksiyonu yöntemiyle elde edilen sonuçların, Anderson cascade impactor'la elde edilenlerle iyi bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (Ziegler ve Wachtel, 2001, Smyth ve Hickey, 2003).

1.10.3. Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Mikropartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde optik mikroskop veya taramalı elektron mikroskobu (SEM) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda optik mikroskop ve SEM kullanılarak mikropartiküllerin küresel şekilleri incelenmiştir.

1.10.4. Çözünme Hızı Tayini

In-vitro çözünme hızı, formülasyon geliştirmede en önemli faktörlerdendir. Çözünme hızını ifade edebilmek için çeşitli kinetik modeller geliştirilmiştir. Dozaj formu, polimorfik özelliği, kristal özelliği, partikül büyüklüğü, çözünürlüğü, dozaj formunun içerdiği etkin madde miktarı salım kinetiğini etkileyen faktörlerdendir (El-Arini ve Leuenberger, 1995). Mikropartiküllerde in-vitro salım çalışmaları diyaliz membran difüzyon tekniği, difüzyon hücre, ters diyaliz, ultrasantrifüj gibi çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Çalışmamızda kullanılan diyaliz membran yönteminde, mikropartikül süspansiyonu diyaliz membran içerisine eklenmekte ve bu membranlar çözünme ortamına inkübe edilmektedir (Soppimath ve ark., 2001).

1.10.4.1. Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirilmesi

Suda çözünürlüğü yüksek bir etkin maddenin matriks yapısından salımı büyük ölçüde difüzyonla olurken, suda çözünürlüğü düşük bir etkin maddenin salımı matriksin erozyonuna bağlı bir kinetik göstermektedir. Çözünme hızı çalışmalarını yaparken, çözünmüş etkin maddenin kümülatif profili sıkça kullanılmaktadır. Çözünme hızı profillerinin karşılaştırılmasında, modele bağlı (eğrinin uygunluğu-curve fitting), istatistik analizler ve modelden bağımsız metodlar kullanılabilmektedir (Costa ve Lobo, 2001).

1.10.4.1.1. Sıfır Derece Kinetik

Parçalanmayan, etkin maddeyi yavaş yavaş salıveren dozaj formlarının gösterdiği çözünme kinetiği modelidir. Bu kinetik modelinde dozaj formunun düzey alanının ve denge koşullarının değişmediği varsayılmaktadır. Sıfır derece kinetik aşağıdaki denklemle açıklanmaktadır:

$$W_0 - W_t = Kt \quad (\text{Denklem 1.2})$$

W_0 : Başlangıçta dozaj formunda bulunan etkin madde miktarı
 W_t : Dozaj formunda t zamanında bulunan etkin madde miktarı
K: Oran sabiti

Bu denklem, zamanın bir fonksiyonu halinde ifade edilirse;

$$f_t = K_0 t \quad (\text{Denklem 1.3})$$

f_t : t süresinde çözünen etkin maddenin oranı
 K_0 : Görünen çözünme hızı sabiti (Sıfır derece salım sabiti)

Bu şekilde sabit koşullar korunduğunda, çizilen 'çözünmüş etkin madde oranı – zaman' grafiği lineer olacaktır.

Sıfır derece salım kinetiği denklemi, transdermal sistemler, suda düşük çözünürlüğe sahip etkin maddelerin matriks preparatları gibi, kontrollü salım gerçekleştiren dozaj formlarından etkin madde salım hızı profillerinin açıklanmasında yararlı olmaktadır (Varelas ve ark., 1995).

Uzatılmış salım preparatlarının ideal davranışı olan birim zamanda her zaman aynı etkin madde miktarının salınması, bu kinetiğe uymaktadır.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (\text{Denklem 1.4})$$

Q_t : t süresi içerisinde salınmış etkin madde miktarı
 Q_0 : Başlangıçta solüsyonda bulunan etkin madde miktarı (Genellikle $Q_0=0$)
 K_0 : Sıfır derece salım sabiti

1.10.4.1.2. Birinci Derece Kinetik

Bu tip çözünme hızı profili yüzeyden hareketle gerçekleşmektedir. Noyes-Whitney denkleminde göre:

$$dC/dt = K (C_s - C) \quad (\text{Denklem 1.5})$$

C: t zamanında çözünenin konsantrasyonu
C_s : Denge sıcaklığındaki çözünürlük
K : Birinci derece denge sabiti

Brunner ve arkadaşları tarafından 1900 yılında bu denklem değiştirilerek, disolüsyona elverişli olan katı yüzey alanı (S) dahil edilmiş ve aşağıdaki denklem oluşturulmuştur (Costa ve Lobo, 2001).

$$dC/dt = K_1 S (C_s - C) \quad (\text{Denklem 1.6})$$

1.10.4.1.3. Hixon-Crowell Modeli

Hixson ve Crowell, 1931'de partiküllerin yüzey alanlarının, hacimlerinin küp köküyle orantılı olduğunu göstermişlerdir. Bunu açıklayan formül aşağıdaki gibidir:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t \quad (\text{Denklem 1.7})$$

W₀: Başlangıçta dozaj formunun içerdiği etkin madde miktarı
W_t: t zamanında dozaj formunda kalan etkin madde miktarı
K_s: Yüzey-hacim ilişkisine ait sabit

Bu eşitlik, tabletler gibi dissolüsyonun yüzeye paralel tabakalardan gerçekleştiği dozaj formlarında geçerli olup, tablet boyutlarının orantılı biçimde azaldığı ve geometrik formunun sabit kaldığı varsayılmaktadır. Eşitlik aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K' N^{1/3} D C_s t / \delta \quad (\text{Denklem 1.8})$$

N: Partiküllerin sayısı
K': Yüzey, şekil ve dansite sabiti
D: Difüzyon katsayısı
C_s: Denge sıcaklığındaki çözünürlük
δ: Difüzyon katmanının kalınlığı

Küp veya küre şeklindeki partiküller eğer her yönden eşit biçimde çözünüyorlar ise şekil faktörleri sabit tutulmalıdır. Bu durumun meydana gelmesi zor olduğundan eşitliğin uygulanması mümkün olmamaktadır. Eşitlik aşağıdaki biçimde değiştirilmiştir:

$$(1 - f_t)^{1/3} = 1 - K_\theta t \quad (\text{Denklem 1.9})$$

$$f_t = 1 - (W_t / W_0) \quad (\text{Denklem 1.10})$$

f_t : t zamanında çözünen etkin maddenin başlangıçtaki miktara oranı

K_θ : Salım sabiti

Çözünmemiş etkin madde miktarının başlangıçtaki miktara oranının küp kökü, zamana karşı grafiğe geçirildiğinde lineer bir grafik oluşmaktadır. Bu durum, denge durumuna henüz ulaşılmadığı ve dozaj formunun geometik şeklinin orantılı biçimde küçüldüğü koşullarda geçerlidir. Bu model kullanıldığında, salım hızının difüzyonla değil partiküllerin çözünme hızıyla sınırlı olduğu varsayılmaktadır ve partiküllerin yüzeyden doğru çözünme gösterdiği salım profillerini açıklayan bir modeldir (Niebergall ve ark., 1995, Varelas ve ark., 1995, Prista ve ark., 1995) .

1.10.4.1.4. Higuchi Modeli

Salımı modifiye edilmiş dozaj formlarının çoğu bir matris şeklindedir ve bu model etkin maddenin matristen salımını tanımlamak üzere kullanılan en yaygın modeldir. Denkleme göre bir t anında salınan etkin madde miktarı zamanın karekökü ile doğru orantılıdır (Costa ve Lobo, 2001).

$$Q = k_h t^{1/2} \quad (\text{Denklem 1.11})$$

Q: t zamanında salınan etkin madde miktarı

k_h : Higuchi salım hız sabiti

t: zaman

1.11. Akciğer Enfeksiyonları

Akciğer enfeksiyonlarının tedavisi, oral ve parenteral tedavi yöntemleriyle ulaşmanın kısıtlı olduğu derin pulmoner bölgelere yerleşmiş bakteriler nedeniyle zor olmaktadır.

Enfeksiyonun yerleştiği bölgelerde minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) oluşturabilecek sistemik doz çok yüksek olmaktadır. Bununla ilgili olarak 'kolistin' kullanılarak yapılmış bir çalışmada, akciğerde enfekte olmuş bölgeyi tedavi etmek için verilen sistemik dozun, hastaların %60'ında nörotoksisite ve nefrotoksisiteye neden olabileceği belirtilmiştir (Garonzik ve ark.,2011). Bu nedenle etkin maddeyi özellikle alt solunum yollarındaki enfekte bölgelere direkt taşıma fikri son zamanlarda araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Yine kolistin kullanıldığı bir çalışmada, etkin madde kistik fibrozis hastalarına nebulizasyon yoluyla (2 milyon IU) uygulanmış, daha sonra hastaların mukus salgısında yüksek konsantrasyonda (Cmax 6 mg/l) kolistin tespit edilmiş ve etkin maddenin sistemik dolaşıma yalnızca ihmal edilebilir bir düzeyde (Cmax<0,3mg/l) geçtiği belirtilmiştir (Yapa ve ark.,2014). Çoğu inhaler antibiyotik preparatı, kistik fibrozis gibi kronik otozomal resesif multisistemik bir hastalık olup tekrarlayan akciğer enfeksiyonlarına yol açan akciğer hastalıklarına odaklanmaktadır (Jones ve Helm., 2009). Klinik in-vivo çalışmalar sonucunda inhalasyon yoluyla uygulanan antibiyotikler Gram-negatif bakteri kolonizasyonunu azaltmakta ve enfeksiyon oluşumunu engellemektedir (Hoiby, 2011).

Özellikle kistik fibrozis veya kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi mukosilyer klirens hızını düşüren hastalıklar, ciddi enfeksiyonlarla sonuçlanmaktadır. Devamında alt solunum yolu enfeksiyonları, kistik fibrozisin eşlik ettiği veya etmediği tüm bronşektazi hastaları arasında morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni haline gelmektedir (Trucksis ve Swarts, 1991, Nicotra,1994).

Inhaler antibiyotikler, solunum yollarındaki bakteriyel yoğunluğu düşürerek semptomları azaltabilmekte, böylece enfeksiyonun önlenmesi veya kronik kolonizasyonun nlenmesine olanak vermektedirler. Çoğu hasta uzun süreli sistematik antibiyotik tedavisine devam etmektedir. Bu tedavi fiziksel iyileşmeyi sağlamakla beraber, bir miktar ilaç hipersensivitesi, bakteriyel direnç artışına veya fungal sperenfeksiyonlara neden olmuştur. (Hodson ve ark., 1981, Stead ve ark., 1987, Ramsey ve ark., 1993, Mukhopadhyay ve ark., 1996, Ramsey ve ark., 1999)

Günümüzde antibiyotiklerin inhalasyon yöntemiyle verililişi nebulizasyon ile sınırlı olup, bu yöntem düşük verimli, pahalı, rutin bakım gerektiren bir yöntem olması gibi dezavantajlara sahiptir. Son yıllarda kuru toz inhalerler (KTi), daha yüksek miktarda etkin madde taşıyabilme ve stabilite sağlama yönüyle ne çıkmıştır. Tedavi oral veya parenteral

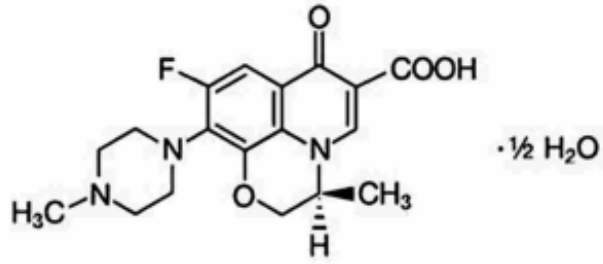
uygulandığı taktirde yüksek doz gerektirdiğinden sistemik toksisite riski taşımaktadır. (Barclay ve Begg, 1994). 2014 yılı itibariyle Amerika’da nebulizasyon yoluyla uygulanmaya yönelik olarak yalnızca tobramisin ve aztreonam preparatları onaylanmıştır. 2010 yılında onay almış olan Cayston®, kistik fibrozis ve Pseudomonas Aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisi için aztreonam’ın nebulizasyonla uygulanması için geliştirilmiştir. Nebulizasyon yoluyla kullanmak üzere geliştirilen levofloksasin preparatı Aeroquin®’in ise Faz 3 çalışmaları devam etmektedir. Bazı Avrupa ülkelerinde ise yalnızca kolistin metansülfonat preparatları (kolistimetan sodyum, CMS) onay alabilmiştir. Nebulizöre yönelik amikasin, vankomisin ve siprofloksasin formülasyonları üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Cipolla ve Chan., 2013). Kuru toz inhaler formülasyonu olarak ise, yalnızca tobramisin (TOBI®podhaler®) ve kolistin metasülfonat (Colobreathe®) adlı preparatlar Amerika ve Avrupa’da onay almıştır.

1.12. Florokinolonlar

Florokinolonlar, sınırlı bir antibakteriyel aktivite ve hızlı gelişen bir dirence sahip olan nalidiksik asit çalışmaları esnasında ortaya çıkmıştır. Nalidiksik asit ilk kez 1962 yılında tanımlanmış olup, sonraki yıllarda temel molekülün 6. konumuna flor atomunun eklenmesi ve 1,5,7 ve 8. konumlara da diğer moleküler substitüsyonlar yapılması ile 10 binden fazla nalidiksik asit analogu sentezlenmiştir (Leshner ve ark., 1962). Florokinolonlar, Gram-negatif, Gram-pozitif ve atipik organizmalara karşı geniş bir aktiviteye sahiptir. Son zamanlarda levofloksasin, ofloksasin, siprofloksasin, perfloksasin, norfloksasin gibi yeni türevleri gündeme gelmekte ve üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır.

1.12.1. Levofloksasin

Levofloksasin, duyarlı patojenlerin neden olduğu komplike ve komplike olmayan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Florokinolonlar grubundan olan ofloksasinin S-(-) izomeridir. S-(-) enansiyomerinin R-(+) enansiyomerinden 8-128 kez, rasemik ofloksasinden ise 2 kez daha fazla potense sahip olduğu bilinmektedir (Fujimoto ve Mitsunashi, 1990).



Şekil 1.13. Levofloksasin hemihidrat'ın açık formülü (Hurst ve ark., 2002)

Levofloksasin, bakteri hücresindeki DNA replikasyonu, transkripsiyon, onarım ve rekombinasyon gibi kritik süreçleri Tip-II topoizomerleri inhibe ederek etkilemektedir. Levofloksasin, Gram-pozitif bakterilerden penisiline duyarlı ve dirençli *Streptococcus pneumoniae*, Gram-negatif bakterilerden *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* ve diğer organizmalardan *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ve *Mycoplasma pneumoniae* bakterilerine karşı etkindir (Dunbar ve ark., 2003).

Çizelge 1.2. Piyasada bu etkin maddeyi içeren farmasötik formlar ve dozları (Rx Media Pharma, 2015)

Farmasötik Form	Piyasada Bulunan Dozları
Film kaplı tablet	250 mg, 500 mg, 750 mg
İntravenöz İnfüzyon Çözeltisi	500 mg/100 ml, 750 mg/150 ml

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Antimikrobiyal aktivite testi için	: Agar
- Asetonitril	: Sigma, Almanya
- Escherichia coli	: ATCC 25922
- Diklorometan	: Sigma, Almanya
- Klebsiella pneumoniae	:RSKK 574
- Levofloksasin hemihidrat	:Koçak Farma, Türkiye
- Monobazik potasyum fosfat	: Sigma, Almanya
- n-Hegzan	: Sigma, Almanya
- Poli(laktik-co-glikolik asit) (PLGA) (MA: 24000-38000) 50:50	: Sigma, Almanya
- Poli(ε-kaprolakton) (PCL) (MA: 14000)	: Sigma, Almanya
- Polivinil alkol (PVA)(MA: 30000-70000)	: Sigma, Almanya
- Pseudomonas aeruginosa	: ATCC 27853
- Sodyum hidroksit (NaOH)	: Sigma, Almanya
- Span 80	:Merck, Almanya
- Span 60	:MayChem, Malezya
- Span 40	:Merck, Almanya
- Span 20	:Merck, Almanya
- Tween 80	: Merck, Almanya
- Tween 60	:Sigma, Almanya
- Tween 40	:Merck, Almanya
- Tween 20	:Merck, Almanya

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Cam malzemeler	:İldam, Türkiye
- Çalkalayıcı su banyosu	:GFL 1083, Almanya
- DSC cihazı	: Shimadzu DSC 60
- Elektronik terazi	:Mettler Toledo, İsviçre
- FTIR Cihazı	: Agilent Technologies
- Homojenizatör	:T25 Basic Ika Labortechnik, Almanya
- Liyofilizatör	:Christ Alpha 1-2 Ld Plus, Almanya
- Manyetik karıştırıcı	:Ika-Werke, Almanya
- Mikropipet (100-1000 µl)	:Biohit, Almanya
- Optik mikroskop	: Leica, Almanya
- Parafilm	:Bemis Flexible Packaging
- pH metre	:Mettler Toledo, Çin
- Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	:Sympatec laser diffraction particle sizer, Almanya
- Santrifüj tüpleri	: Sigma, Almanya
- Santrifüj cihazı	: Sigma, Almanya
-Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	: FEI Quanta 200 FEG
- UV spektrofotometre	:Thermo Scientific, Almanya
- Vorteks karıştırıcı	:Heidolph Reax, Almanya

2.2. Etkin Madde Salım Hızı Deneylerinde Kullanılan Ortamlar

Etkin maddenin üretilen formülasyonlardan çıkışının incelenmesinde kullanılan pH 7,4 fosfat tamponu Amerikan Farmakopesi 36'ya (USP 36) göre hazırlanmıştır.

pH 7,4 Fosfat Tamponu:

0,2 M Sodyum hidroksit çözeltisi.....	195,5 ml
Monobazik potasyum fosfat çözeltisi.....	250 ml
Distile su.....	ym.....1000,0 ml

0,2 M Sodyum hidroksit çözeltisi

Sodyum hidroksit.....8 g
Distile su.....ym.....1000,0 ml

Monobazik potasyum fosfat çözeltisi

Monobazik potasyum fosfat.....27,22 g
Distile su.....ym.....1000,0 ml

Hazırlanışı:

8 g sodyum hidroksit distile su içerisinde çözülmüştür. Çözelti 1000 ml'lik balon jojeye konarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Aynı bir yerde 27,22 g monobazik potasyum fosfat distile suda çözülmüş ve bir balon jojede distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden alınan 195,5 ml 0,2 M sodyum hidroksit çözeltisi ve 250 ml monobazik potasyum fosfat çözeltisi balonjojeye alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltinin pH'sı pH-metre ile ölçülerek 1 M NaOH yardımıyla 7,4'e ayarlanmıştır.

2.3. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**2.3.1. Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizi**

Etkin maddenin, termal davranışını incelemek ve kristal formunu belirlemek amacıyla alüminyum pan içine konulan levofloksasin hemihidrat preslenerek cihaza yerleştirilmiştir. 25-300°C sıcaklık aralığında 5 °C/dk. hızında termogramı alınmıştır.

2.3.2. FTIR Analizi

Levofloksasin hemihidrat'ın FTIR spektroskopisi ile tanımlanmasında Agilent FTIR cihazı kullanılmıştır. Cihaza toz halinde yerleştirilen örneğin 4000 - 650 cm⁻¹ dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır.

2.3.3. Etkin Maddenin Ultra Viole (UV) Spektrofotometrisi ile Analizi

Etkin maddenin, distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bir seri çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin UV spektrofotometresinde 200 - 400 nm arasında spektrumları alınmış ve maksimum absorbens gösterdiği dalga boyları (λ_{max}) belirlenmiştir.

2.3.3.1. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması

Etkin maddenin, distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içinde 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış, bu stoktan hareketle gerekli seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 $\mu\text{g/mL}$) çözeltiler hazırlanmıştır.

Hazırlanan çözeltilerin absorbens değerleri belirlenen λ_{max} dalga boyu olan 288 nm' de okunmuştur. Okunan çözeltinin konsantrasyon değeri (x) ve buna karşılık gelen absorbens değeri (y) kullanılarak kalibrasyon doğrusu denklemi oluşturulmuş ve grafiği çizilmiştir. Daha sonra yapılan analizlerde ve çözünme hızı testlerinde etkin maddenin miktar tayinleri için bu doğru denklemi kullanılmıştır.

2.3.3.2. Kalibrasyon Doğrularının İstatistiksel Verileri ve Analitik Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizler için istenen şartları sağlayan metodun performans özelliklerinin deneysel çalışmalarla belirlenmesidir. Miktar tayini metodlarında performans özellikleri şu analitik parametrelerle açıklanmaktadır (ICH Q2(R1)):

1. Doğruluk
2. Kesinlik
3. Seçicilik
4. Teşhis ve Tayin Sınırı
5. Doğrusallık
6. Uygulama Aralığı

2.3.3.2.1. Doğruluk

Kullanılacak yöntemle elde edilen sonuçların gerçek verilere yakınlığı, o analitik yöntemin doğruluğudur. Gerçeklik olarak da adlandırılır. Analiz edilen maddenin bilinen miktar tayini yöntemi ile % geri elde değerleri bulunarak hesaplanır. Doğruluk, belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numune miktarlarının yüzde geri eldelerinin belirlenmesiyle tayin edilmektedir (ICH Q2(R1)).

Levofloksasin hemihidrat'ın pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 3 µg/ml, 6 µg/ml ve 9µg/ml konsantrasyonda üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerle UV spektrofotometre kullanılarak 3'er kere okuma yapılmıştır. Elde edilen veriler yardımıyla pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma (SS) ve % bağıl sapma verileri hesaplanarak yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır.

2.3.3.2.2. Kesinlik

Bir analitik işlemin kesinliği, aynı örnekten alınan numuneler için birbirini takip eden ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı anlamına gelmektedir. Tekrarlanabilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve ara kesinlik ile açıklanır. (ICH Q2(R1)).

- Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralığında aynı işlem koşulları altında kesinliği ifade etmektedir. Belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyonda en az üçer kez ya da test konsantrasyonunun %100'ünde en az altı ölçümle belirlenmektedir. Bu konsantrasyonların ortalaması, standart sapması (SS) ve bağıl standart sapması hesaplanmaktadır (ICH Q2(R1)).

Levofloksasin hemihidrat'ın pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 3 µg/ml, 6 µg/ml ve 9µg/ml konsantrasyonda üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltilerin UV spektrofotometre yardımıyla pratik konsantrasyonları okunmuştur. Ortalama konsantrasyon, standart sapma (SS) ve % bağıl sapma verileri kullanılarak yöntemin tekrarlanabilirliği ve kesinliği kanıtlanmıştır.

2.3.3.2.3. Seçicilik

Seçicilik, analizi yapılan maddeyi ortamda başka bileşenler varlığında doğru tayin edebilme anlamına gelmektedir (ICH Q2(R1)).

2.3.3.2.4. Teşhis Sınırı (LOD)

Bir numune içerisinde, analiz edilen maddenin teşhis edilebilen ancak tayin edilemeyen en düşük konsantrasyonu, o analitik yöntemin teşhis sınırı anlamına gelmektedir (ICH Q2(R1)).

Levofloksasin hemihidrat'ın distile su ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin teşhis sınırını belirlemek amacıyla, 0,1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 6 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 3 paralel olacak şekilde ölçümleri yapılarak, konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri bulunduğundan sonra aşağıdaki denklem kullanılarak teşhis sınırları hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \sigma/s \quad (\text{Denklem 2.1})$$

σ : Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması

s : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.3.3.2.5. Tayin Sınırı (LOQ)

Bir analitik yöntemin tayin sınırı, analiz edilen maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik özelliklerini sağlayan, kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktarı olarak tanımlanmıştır (ICH Q2(R1)).

Levofloksasin hemihidrat'ın distile su ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin tayin sınırını belirlemek amacıyla, 0,1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 6 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 3 paralel olacak şekilde ölçümleri yapılarak, konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve

standart sapma değerleri bulunduktan sonra aşağıdaki denklem kullanılarak tayin sınırları hesaplanmıştır.

$$LOQ = 10 \sigma / s \quad (\text{Denklem 2.2})$$

σ : Regresyon doğrularının y kesim değerlerinin standart sapması

s : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.3.3.2.6. Doğrusallık

Doğrusallık, verilen aralıklarda, örnekteki madde konsantrasyonu ile test sonuçlarının doğru orantılı sonuçlar sağlayabilmesidir. Doğrusallığın saptanmasında en az 5 konsantrasyon gereklidir. Eğer doğrusal bir ilişki mevcutsa, analiz sonuçları, en küçük kareler yöntemiyle regresyon doğrusunun hesaplanması gibi uygun istatistiksel metodlarla değerlendirilebilmektedir. Korelasyon katsayısı, y-kesişim, regresyon doğrusunun eğimi ve artık kareler toplamı hesaplanmalıdır (ICH Q2(R1)). Parametrelerin hesaplanmasında Graphpad Prism programından yararlanılmıştır.

Distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içinde ayrı ayrı 10mg/100ml konsantrasyonda hazırlanmış etkin maddenin stok ozeltilerinden seyreltmeler yapılarak her bir ortam icin 8 farklı konsantrasyonda ozelti elde edilmistir. Bu ozeltilerin 288 nm'deki absorbanları okunmuş ve bundan hareketle doğrusallık ve doğrusallık aralığına ait doğrular ve bu doğrulara ait parametreler hesaplanmıştır.

2.4. Mikropartiküllerin Hazırlanması

2.4.1. n Formülasyon alışmaları

Levofloksasin hemihidrat içeren mikropartiküller emülsiyon çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmıştır. Polimer olarak polikaprolakton (PCL) ve polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) kullanılmıştır.

2.4.1.1. Polikaprolakton (PCL) Kullanılarak Hazırlanan Önformülasyonlar

Levofloksasin hemihidrat içeren mikropartiküller önce s/y/s, k/y/s veya s/y/y emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Polimer olarak PCL kullanılmıştır (Ogawa ve ark.,1988, Meng ve ark.,2003, Jelvehgari ve ark., 2010).

Hazırlanan formülasyonlarda polimer miktarı, organik çözücü tipi ve oranı, dış su fazın hacmi, dış su fazda kullanılan PVA konsantrasyonu gibi faktörler değiştirilmiş ve formülasyonlar etkin madde enkapsülasyon etkinliği açısından değerlendirilmiştir.

2.4.1.2. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) Kullanılarak Hazırlanan Önformülasyonlar

Levofloksasin hemihidrat içeren mikropartiküller, s/y/y emülsiyon çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Polimer olarak PLGA kullanılmıştır (Çizelge 2.1) (Lee ve ark., 2000, Maravajhala ve ark.,2009).

10 mg levofloksasin hemihidrat 1 ml distile suda çözülmüştür. Organik çözücü olarak 5 ml asetonitril kullanılmıştır. Etkin madde çözeltisi organik faz üzerine eklenerek homojenizatörde 8000 rpm hızında 2 dakika boyunca homojenize edilmiş ve s/y tipi primer emülsiyon hazırlanmıştır. Dış faz olarak % 1 a/h konsantrasyonda Span 80 içeren 50 ml sıvı parafin kullanılmıştır. Oluşturulan primer emülsiyon sıvı parafin içerisine eklenerek 8000 rpm’de 5 dakika homojenize edilmiştir. Oluşturulan s/y/y tipi emülsiyon, organik çözücünün buharlaşmasını sağlamak üzere mekanik karıştırıcıda 450 rpm hızında 24 saat süreyle karıştırılmıştır.

Hazırlanan formülasyonlar 9000 rpm’de 24 dk boyunca santrifüj edilmiş ve mikropartiküller hegzan ile 3 defa yıkanmıştır. Çöken partiküller distile su içinde disperse edilerek dondurulmuş ve 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir. Elde edilen toz mikropartiküller ağız kapalı kavanozlarda desikatör içerisinde saklanmıştır.

Oluşturulan formülasyonun polimer miktarı 100 mg’dan 200 mg’a artırılmış ve enkapsülasyon etkinliği açısından değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.1. PLGA kullanılarak hazırlanan önformülasyon çalışmaları

		ÖNF1	ÖNF2
Primer Emülsiyon	Birim		
Levofloksasin miktarı	mg	10	10
İç su faz hacmi	ml	1,0	1,0
Polimer Tipi		PLGA	PLGA
Polimer Miktarı	mg	100	200
İç faza eklenen Tween 80 konsantrasyonu	% a/h	% 5	% 5
Organik Çözücü Tipi		ACN	ACN
Organik Çözücü Hacmi	ml	5	5
Homojenizasyon Hızı	rpm	8000	8000
Homojenizasyon Süresi	dk	2	2
Ortam Sıcaklığı	°C	25	25
Sekonder Emülsiyon			
Dış yağ faz tipi		Sıvı parafin	Sıvı parafin
Dış yağ faz hacmi	ml	50	50
Dış faza eklenen Span 80 konsantrasyonu	% a/h	% 1	% 1
Homojenizasyon Hızı	rpm	8000	8000
Homojenizasyon Süresi	dk	5	5
Ortam Sıcaklığı	°C	25	25
Final Karıştırma Hızı	rpm	450	450
Final Karıştırma Süresi	Saat	24	24

ACN: Asetonitril

DCM: Diklorometan

2.4.2. Mikropartikül Üretiminde Kullanılacak Olan Yöntemin Seçimi

Mikropartikül hazırlamak için uygun üretim yönteminin seçiminde, ön formülasyon sürecinde hazırlanan mikropartiküllerin partikül büyüklükleri ve etkin madde enkapsülasyon etkinlikleri dikkate alınmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, çalışmamızın devamında mikropartiküllerin s/y/y emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmasına karar verilmiştir.

2.4.3. PLGA Kullanılarak s/y/y Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Hazırlanan Mikropartikül Formülasyonları

2.4.3.1. Farklı Tween Tipleri ile Hazırlanan Formülasyonlar

İç faz olarak kullanılmak üzere, farklı Tween tipleri (Tween 80, Tween 60, Tween 40, Tween 20) distile su içerisinde çözülerek farklı konsantrasyonlarda (%0,5 a/h , %1 a/h ve %3 a/h) Tween içeren stok çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir stok çözeltiden 1 ml alınmış ve 10 mg levofloksasin hemihidrat, hazırlanan bu sulu faz içerisinde çözülmüştür. Aynı bir yerde polimer (PLGA), 5 ml organik çözücüde (asetonitril) çözülmüştür. Primer su/yağ (s/y) tipi emülsiyon oluşturulmak üzere levofloksasin hemihidrat'ın sulu çözeltisi ve polimerin organik çözücüdeki çözeltisinden oluşan organik faz yüksek hızlı homojenizatör ile 8000 rpm'de 2 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Oluşan primer emülsiyon %1 (a/h) konsantrasyonda Span 80 içeren sıvı parafinden oluşan dış faza eklenerek homojenizatörde 8000 rpm'de 5 dk homojenize edilmiş ve s/y/y tipi emülsiyon oluşturulmuştur. Oluşan emülsiyon, organik çözücünün buharlaşması için 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 450 rpm hızda karışmaya bırakılmıştır.

Hazırlanan formülasyonlar 9000 rpm'de 24 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Yıkama çözeltisi olarak önce n-hegzan, sonra distile su kullanılmıştır. Santrifüjden sonra yaklaşık 4 ml distile su içerisine alınıp dondurulan mikropartiküller 2 gün süreyle liyofilize edilmiştir. Elde edilen mikropartiküller ağız kapalı kavanozlarda, nem çekici madde içeren desikatör içerisinde saklanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar Çizelge 2.3'de gösterilmiştir. Mikropartiküllerin imalat şeması Şekil 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Farklı Tween tipleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

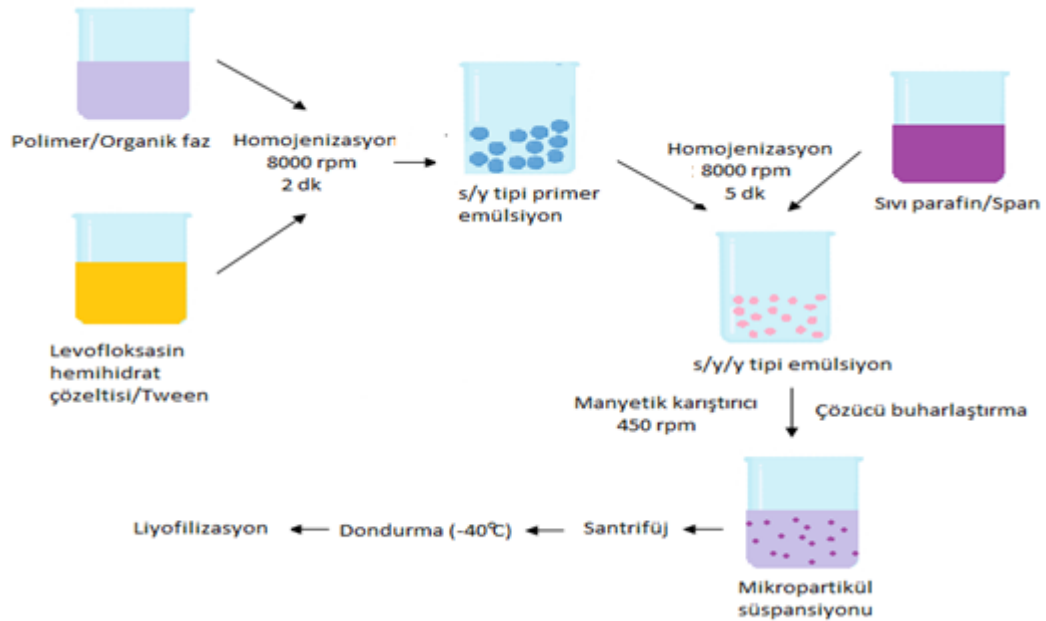
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Primer Emülsiyon	Birim												
Levofloksasin miktarı	mg	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
İç su faz hacmi	ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Polimer Tipi		PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA
Polimer Miktarı	mg	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
İç fazdaki Tween tipi ve konsantrasyonu	% a/h	Tween 80 % 0,5	Tween 80 % 1	Tween 80 % 3	-	-	-	Tween 40 % 0,5	Tween 40 % 1	Tween 40 % 3	-	-	-
		-	-	-	Tween 60 % 0,5	Tween 60 % 1	Tween 60 % 3	-	-	-	Tween 20 % 0,5	Tween 20 % 1	Tween 20 % 3
Organik Çözücü Tipi		ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN
Organik Çözücü Hacmi	ml	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Karıştırma Hızı	rpm	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
Karıştırma Süresi	dk	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Karıştırma Sıcaklığı	°C	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Sekonder Emülsiyon													
Dış faz tipi		Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı Parafin	Sıvı Parafin	Sıvı Parafin	Sıvı Parafin	Sıvı Parafin	Sıvı Parafin
Dış faz hacmi	ml	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Dış faza eklenen Span 80 konsantrasyonu	% a/h	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Karıştırma Hızı	rpm	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
Karıştırma Süresi	dk	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Karıştırma Sıcaklığı	°C	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Final Karıştırma Hızı	rpm	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450
Final Karıştırma Süresi	Saat	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24

ACN: Asetonitril

2.4.3.2. Farklı Span Tipleri ile Hazırlanan Formülasyonlar

İç su fazın içerdiği Tween tipi ve miktarı (Tween 60, %3 a/h) sabit tutulmuş, dış faz olarak farklı Span tiplerini (Span 80, Span 60, Span 40, Span 20) farklı konsantrasyonlarda (%0,5 a/h , %1 a/h, %3 a/h) içeren 50'şer ml sıvı parafin hazırlanmıştır. 10 mg levofloksasin hemihidrat %3 konsantrasyonda Tween 60 içeren 1 ml sulu fazda çözülmüştür. Polimer (PLGA) 5 ml asetonitrilde çözüldükten sonra levofloksasinin sulu çözeltisine yavaş yavaş eklenerek homojenizatörde 8000 rpm hızında 2 dk süreyle homojenize edilmiştir ve primer emülsiyon oluşturulmuştur. Oluşan primer emülsiyon farklı Span tiplerini ve miktarlarını içeren dış fazlara ayrı ayrı eklenerek homojenizatörde 8000 rpm'de 5 dk boyunca homojenize edilmiş ve organik çözücünün buharlaşması için 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 450 rpm hızında karıştırılmaya bırakılmıştır.

Hazırlanan formülasyonlar için 9000 rpm'de 24 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Yıkama çözeltisi olarak önce n-Hegzan, sonra distile su kullanılmıştır. Santrifüjden sonra yaklaşık 4 ml distile su içerisine alınıp dondurulan mikropartiküller 2 gün süreyle liyofilize edilmiştir. Elde edilen mikropartiküller ağzı kapalı kavanozlarda, nem çekici madde içeren desikatör içerisinde saklanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar Çizelge 2.4'de gösterilmiştir. Mikropartiküllerin imalat şeması Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Mikropartikül imalat şeması

Çizelge 2.4. Farklı Span tipleri ile hazırlanan formülasyonlar

		F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23
Primer Emülsiyon	Birim											
Levofloksasin miktarı	mg	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
İç su faz hacmi	ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Polimer Tipi		PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA
Polimer Miktarı	mg	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
İç faza eklenen Tween 60 konsantrasyonu	% a/h	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
Organik Çözücü Tipi		ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN	ACN
Organik Çözücü Hacmi	ml	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Karıştırma Hızı	rpm	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
Karıştırma Süresi	dk	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Karıştırma Sıcaklığı	°C	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Sekonder Emülsiyon												
Dış faz tipi		Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin	Sıvı parafin
Dış faz hacmi	ml	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Dış faza eklenen Span tipi ve konsantrasyonu	% a/h	Span 80 % 0,5	Span 80 % 3	-	-	-	Span 40 % 0,5	Span 40 % 1	Span 40 % 3	-	-	-
		-	-	Span 60 % 0,5	Span 60 % 1	Span 60 % 3	-	-	-	Span 20 % 0,5	Span 20 % 1	Span 20 % 3
Karıştırma Hızı	rpm	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
Karıştırma Süresi	dk	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Karıştırma Sıcaklığı	°C	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Final Karıştırma Hızı	rpm	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450
Final Karıştırma Süresi	Saat	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24

ACN:Asetonitril

2.5. Mikropartiküllerde Yapılan Kontroller

2.5.1. DSC Analizi

Etkin maddenin, polimerin ve seçilen mikropartikül formülasyonlarının termal davranışını incelemek ve kristal formunu belirlemek amacıyla alüminyum pan içine konulan levofloksasin hemihidrat, polimer ve mikropartikül formülasyonu preslenerek cihaza yerleştirilmiştir. 25-400°C sıcaklık aralığında 5 °C/dk. hızında termogramı alınmıştır.

2.5.2. FTIR (Fourier Transform Infrared) Spektrumu

Levofloksasin hemihidrat ve mikropartiküllerin FTIR spektroskopisi ile tanımlanmasında Agilent FTIR cihazı kullanılmıştır. Cihaza toz halinde yerleştirilen örneklerin 4000 - 650 cm⁻¹ dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır.

2.5.3. Partikül Büyüklüğünün Saptanması

Hazırlanan mikropartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımı analizi optik mikroskop ve lazer kırınımı yöntemleri kullanılarak yapılmıştır (Kostanski ve Deluca., 2000, Meinel ve ark., 2001, Bouissou ve ark., 2006, Lane ve ark., 2006, Wang ve ark., 2009).

Elde edilen mikropartiküllerin partikül büyüklüklerinin tespiti için lazer kırınımı granülometresi (Sympatec Laser Diffraction particle sizer) kullanılmıştır. Mikropartiküllerin formülasyonunda kullanılan polimer suda çözünmediğinden, toz haldeki mikropartiküller ependorf tüpe alınıp distile suda vortekslenerek disperse edilmiş, sonra ölçümler yapılmıştır.

Elde edilen veriler kullanılarak, mikropartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımının bir göstergesi olan span değerleri hesaplanmıştır.

$$Span = [D_{90\%} - D_{10\%}] / D_{50\%} \quad (\text{Denklem 2.3})$$

$D_{10\%}$: Mikropartiküllerin 10% kümülatif hacim yüzde değeri

$D_{50\%}$: Mikropartiküllerin 50% kümülatif hacim yüzde değeri

$D_{90\%}$: Mikropartiküllerin 90% kümülatif hacim yüzde değeri

2.5.4. Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanan tüm mikropartikül formülasyonlarından alınan örnekler distile su ile disperse edilmiş ve optik mikroskop kullanılarak incelenmiştir. Seçilen uygun formüller (F4 ve F6) ise buna ek olarak, FEI Quanta 200 FEG taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir.

2.5.5. Etkin Madde Miktar Tayini

Etkin madde içeriğini tespit etmek amacıyla 5 mg mikropartikül tartılarak 5 ml asetonitrilde çözülmüş ve 5 ml distile su eklenerek organik çözücü tamamen buharlaşana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen sulu çözeltinin 288 nm'de UV spektrofotometresinde absorbens değeri ölçülmüştür.

2.5.6. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Bölüm 2.5.3'de anlatılan miktar tayini metotuna göre ölçüm yapılmış ve aşağıdaki formüle göre enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır (Mao ve ark.,2007, Parikh ve ark., 2003, Yuan ve ark., 2009).

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{\text{Yüklenen etkin madde miktarı}}{\text{Teorik etkin madde miktarı}} \times 100 \quad (\text{Denklem 2.4})$$

2.5.7. Ürün Verimi Tayini

Mikropartiküllerin üretim verimi, üretim tamamlandıktan sonra elde edilen mikropartikül miktarının üretim içine kullanılan toplam katı madde miktarına oranlanması ile hesaplanmakta ve yüzde olarak ifade edilmektedir.

$$\% \text{ Ürün verimi} = \frac{\text{Üretilen mikropartikül miktarı}}{\text{Üretim için kullanılan toplam katı madde miktarı}} \times 100 \quad (\text{Denklem 2.5})$$

2.5.8. Çözünme Hızı Deneyi

Çözünme hızı tayininde statik yöntem kullanılmıştır (Yan ve ark., 1994). Deneylerde çözünme hızı ortamı olarak pH 7,4 fosfat tamponu kullanılmıştır. Mikropartiküllerden 25 mg tartılarak 1 ml pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde disperse edilip membran içerisine alınmıştır. Membranlar cam kaplara yerleştirildikten sonra, üzerlerine 37±0,5°C'de 100 ml pH 7,4 fosfat tamponu eklenmiş ve 100 rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır. Belli zaman aralıklarında (15 dk, 30 dk, 45 dk, 60 dk, 2 sa, 3 sa, 4 sa, 5 sa, 6 sa, 7 sa, 8 sa, 24 sa) ortamdan 3 ml örnek alınmış ve yerine her seferinde taze tampon eklenmiştir. Çözünme ortamındaki etkin madde miktarının tespiti için örneklerin UV spektrofotometresinde 288 nm'de verdiği absorpsiyonlar ölçülmüştür. Absorpsiyon verilerinden çıkan madde miktarları hesaplanarak çözünme hızı grafikleri hazırlanmıştır.

In vitro salım profillerinin karşılaştırılması için f_1 (fark faktörü) ve f_2 (benzerlik faktörü) değerleri kullanılmıştır. f_1 değeri 0-15 arasında olduğunda ve f_2 değeri 50-100 arasında olduğunda FDA ve EMEA tarafından iki *in vitro* salım profili benzer kabul edilmektedir. Aşağıda formüller verilmiştir. (Costa ve Lobo, 2001).

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100 \quad (\text{Denklem 2.6})$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right) \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (\text{Denklem 2.7})$$

R_t : Referans formülün n adet örnekleme zamanının herbirinde çözünen kümülatif etkin madde yüzdesi

T_t : Test edilen formülün n adet örnekleme zamanının herbirinde çözünen kümülatif etkin madde yüzdesi

2.5.9. Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin İncelenmesi

2.5.9.1. Sıkıştırılmış Dansite Tayini

Hazırlanan mikropartikül formülasyonlarından seçilen formülasyonlar ve bu formülasyonların İnhalac 70, İnhalac 120 ve İnhalac 230 ile 1:5 (a/a) oranında hazırlanmış karışımları için sıkıştırılmış dansite ölçümleri yapılmıştır (USP 30). 100 mg toz mikropartikül tartılarak 0,05 ml duyarlılığa sahip 5 ml'lik pipet içerisinde 1250 defa tapping işlemi uygulanmıştır. Tartılan toz mikropartikül ağırlığı (g) tapping sonrası okunan hacme (ml) oranı hesaplanarak mikropartikül formülasyonlarının sıkıştırılmış dansite değerleri hesaplanmıştır (Ungaro ve ark., 2006).

$$\text{Sıkıştırılmış dansite (g/ml)} = \frac{\text{Mikropartikül ağırlığı (g)}}{\text{Tapping sonrası okunan mikropartikül hacmi (ml)}} \quad (\text{Denklem 2.8})$$

2.5.9.2. Teorik Kütlesel Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇt) Tayini

Mikropartiküllerin ve mikropartikül-inhalac karışımlarının sıkıştırılmış dansiteleri ayrı ayrı belirlendikten sonra KOAÇt değerlerinin hesaplanmıştır. Mikropartikül-inhalac karışımlarının geometrik ortalama çaplarının belirlenmesi için elek analizi yapılmıştır. Bu işlem için 1,00; 0,50; 0,25 ve 0,125 mm gözenek çapına sahip elekler içeren mikroelet takımı kullanılmıştır. Elek analizi, elekler en büyük gözenek çapına sahip elek en üstte olmak üzere gözenek çaplarına göre büyükten küçüğe doğru üst üste dizilerek ve belirli bir titreşim uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Her elek üzerindeki toz miktarı belirlendikten sonra, % elek üstü miktar ve % yığılmalı miktarlar hesaplanarak grafikler oluşturulmuştur. X eksenine gözenek çapları aritmetik ortalaması, y eksenine ise % yığılmalı miktarlar girilerek, yığılmalı partikül dağılım eğrisi çizilmiştir. Bu grafikte dmedyan, %50 yığılmalı değere karşılık gelen partikül büyüklüğüdür. % yığılmalı miktar olasılık skalasında, partikül çapları logaritmik skalada olacak şekilde grafik çizilerek, geometrik ortalama çap ve standart sapma hesaplanmıştır. Daha sonra teorik kütlesel ortalama aerodinamik çap değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Ungaro ve ark., 2006, Bashoff ve Beaser, 1995).

$$KOA\check{t} = d(\rho/\rho_0X)^{1/2} \quad (\text{Denklem 2.9})$$

d: Geometrik ortalama çap

p: Partiküllerin ortalama sıkıştırılmış dansitesi

p0: Referans dansite (1 g/ml)

X: Dinamik şekil faktörü (Küresel şekildeki partiküller için, 1 olarak alınacaktır)

2.5.10. Antimikrobiyal Aktivite Testi

Seçilen formüllerin antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi için kuyucuk difüzyon testi uygulanmıştır (European Pharmacopoeia – 6.0). Levofloksasinin distile su içerisinde 1 mg/ml konsantrasyondaki standart çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 2, 5, 20, 40 ve 80 µg/ml’lik bir dizi etkin madde çözeltisi hazırlanmıştır. F4 ve F6 kodlu formüllerden, 1 mg/ml konsantrasyonda levofloksasin hemihidrat’a eşdeğer miktarda mikropartikül tartılarak steril su içerisinde disperse edilmiştir. Mikropartikül dispersiyonlarının bir kısmı, petrilere ekilmiş test organizmalarının (Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli) bulunduğu steril agar besiyeri ortamına çukurlar açılarak hemen uygulanmıştır. Mikropartikül dispersiyonunun bir bölümü ise 48 saat bekletildikten sonra besiyerine uygulanmıştır. Petrilerin 37°C’de 24 saat inkübasyonundan sonra örneklerin inhibisyon çapları ölçülmüştür.

2.5.11. Organik  z c  Kalıntısı Tayini

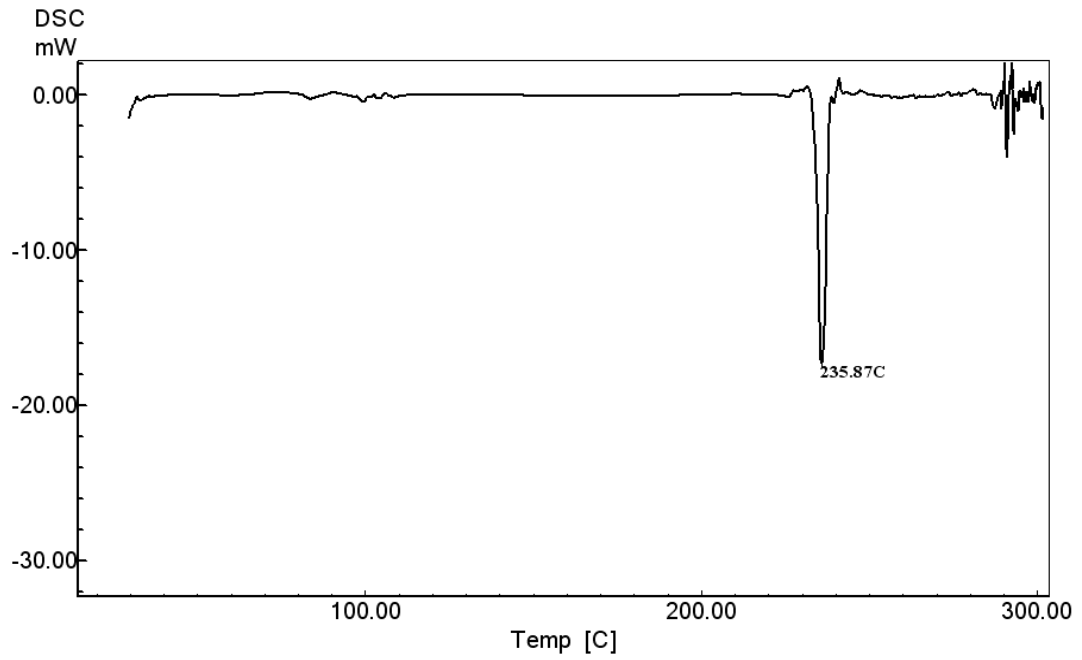
Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan organik çözücülerin belli bir konsantrasyona kadar bulunmasına izin verilmektedir (USP 30, 2007). Form lasyonlarımızda kullanılan n-hegzan’ın, hazırlanan mikropartiküllerde kalıntısı olup olmadığının belirlenmesi için gaz kromatografisi kullanılmıştır. Bunun için mikropartiküller, polimerin çözünemediği ancak organik çözücü ile karışabilen çözücülerle muamele edilmiştir. 20 mg mikropartikül üzerine 2 ml 2-propanol eklenip 2 saat vorteksle karıştırdıktan sonra süzülerek katı kalıntılardan ayrılan örnek gaz kromatografisinde analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ile İlgili Bulgular

3.1.1. Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizi Bulguları

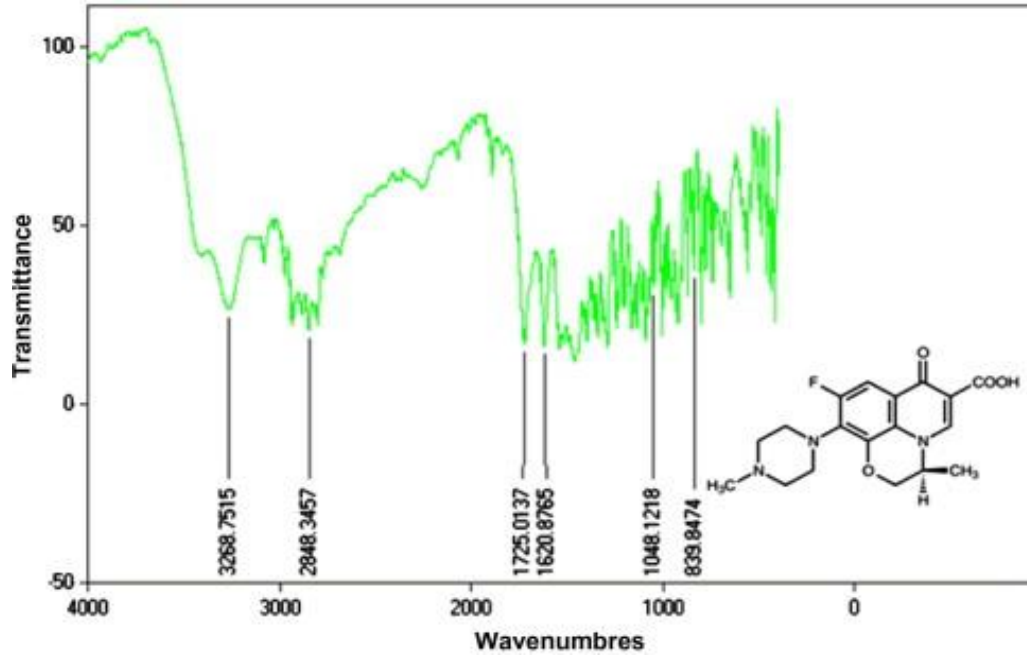
Levofloksasin hemihidrat'ın DSC analizi Bölüm 2.3.1. de anlatıldığı gibi yapılmış ve Şekil 3.1'deki termogram elde edilmiştir.



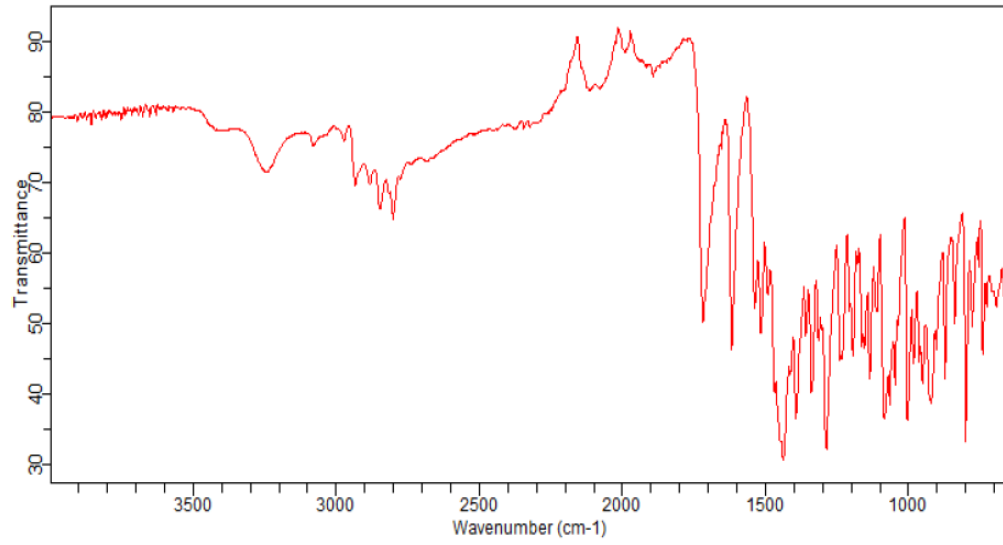
Şekil 3.1. Levofloksasin hemihidrat'a ait DSC termogramı

3.1.2. FTIR Analizine ait Bulgular

Levofloksasin hemihidrat'ın FTIR spektrumu Bölüm 2.3.2. de anlatıldığı gibi elde edilmiştir. Levofloksasin hemihidrat'ın referans kaynaktaki FTIR spektrumu ve fonksiyonel grupların absorpsiyon bantları Şekil 3.2a'da, çalışmamızda elde edilen FTIR spektrumu ise Şekil 3.2b'de gösterilmektedir.



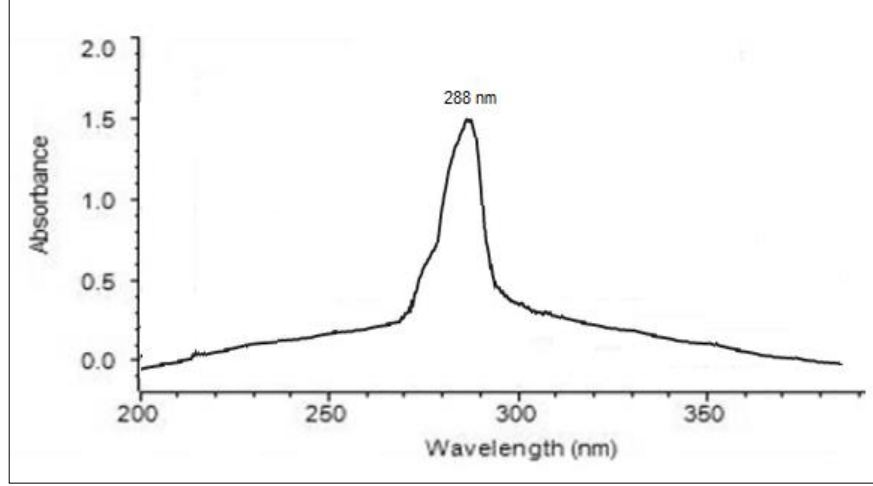
Şekil 3.2a. Levofloksasin hemihidrat'ın FTIR spektrumu (Mouzam ve ark., 2011)



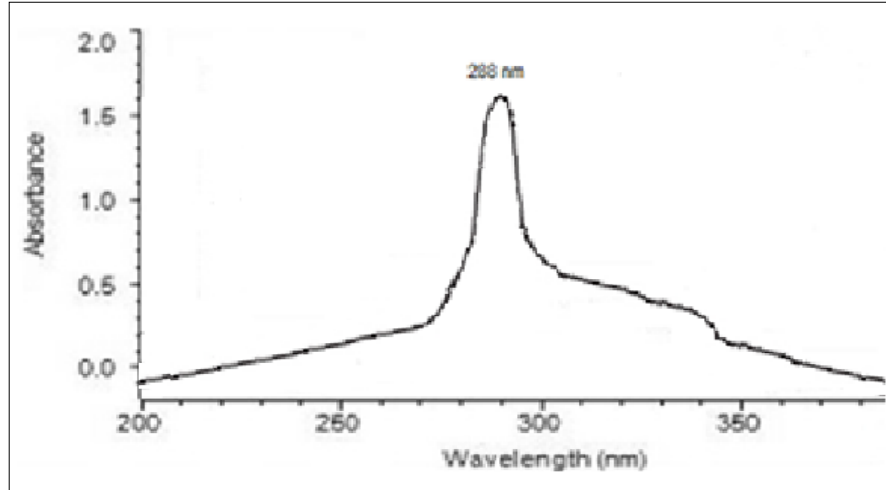
Şekil 3.2b. Levofloksasin hemihidrat'ın çalışmamızda elde edilen FTIR spektrumu

3.1.3. Etkin Maddenin Ultra Viole Spektrofotometrisi ile Analizi Bulguları

Levofloksasin hemihidrat'ın UV spektrumu Bölüm 2.3.3'de anlatıldığı şekilde alınmış ve elde edilen spektrumlar Şekil 3.3-3.4'te verilmiştir.



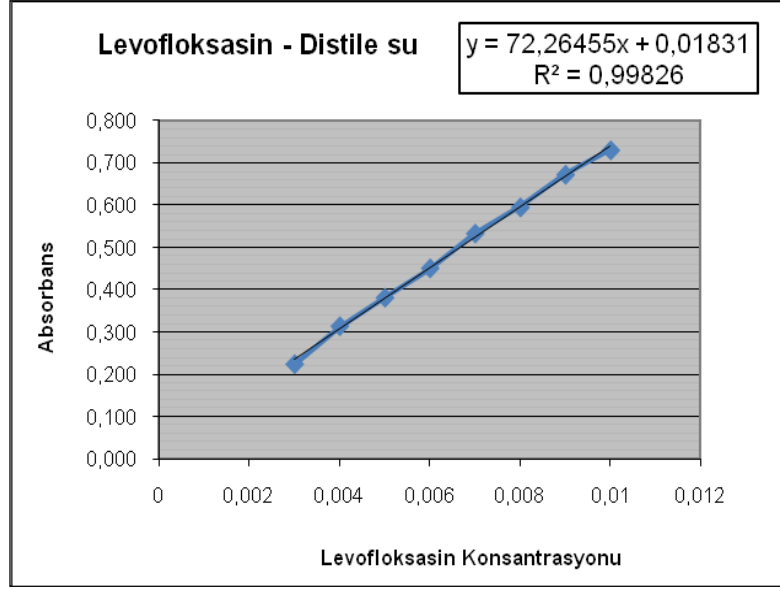
Şekil 3.3. Levofloksasin hemihidrat'ın distile su için UV spektrumu



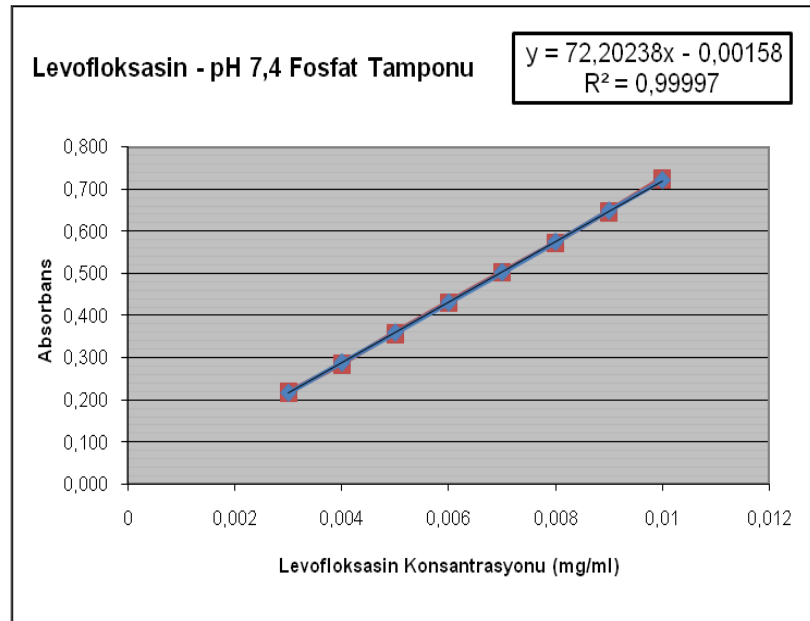
Şekil 3.4. Levofloksasin hemihidrat'ın pH 7,4 fosfat tamponu için UV spektrumu

3.1.4. UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Etkin Maddenin Kalibrasyon Doğrularına ait Bulgular

Bölüm 2.3.3.1’de anlatıldığı şekilde distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde yapılan ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon grafikleri ve kalibrasyon parametreleri Şekil 3.5-3.6 ve Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Levofloksasinin distile sudaki kalibrasyon grafiği



Şekil 3.6. Levofloksasinin pH 7,4 Fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.1. Levofloksasinin kalibrasyon doğrularına ait parametreler

Ortam	Eğim ± SH	Kesişim ± SH	r ²
pH 7,4 Fosfat Tamponu	72,2024 ± 0,05895	0,0016 ± 0,000198	0,9999
Distile su	72,2646 ± 0,05282	0,01831 ± 0,000154	0,9983

SH: Standart Hata = SS/VN

3.1.5. Kalibrasyon Doğrularının İstatistiksel Verileri ve Analitik Validasyonu ile İlgili Bulgular

3.1.5.1. Doğruluk

Çizelge 3.2-3.3'de distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ile yapılan doğruluk testi için 3 farklı konsantrasyon için altışar kez okunan numunelerin hesaplanan ve bulunan konsantrasyon, % geri elde değerleri ve % geri elde değerlerinin ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri görülmektedir.

Çizelge 3.2. pH 7,4 fosfat tamponu için yapılan doğruluk bulguları

Teorik Konsantrasyon: 3 µg/ml			Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml			Teorik Konsantrasyon: 9 µg/ml		
Abs.	Pratik Kons.	%Geri Elde	Abs.	Pratik Kons.	%Geri Elde	Abs.	Pratik Kons.	%Geri Elde
0,218	3,04	101,38	0,438	6,09	101,47	0,651	9,04	100,43
0,217	3,03	100,92	0,435	6,05	100,78	0,651	9,04	100,43
0,218	3,04	101,38	0,434	6,03	100,55	0,652	9,05	100,58
0,217	3,03	100,92	0,438	6,09	101,47	0,648	9,00	99,97
0,219	3,06	101,84	0,435	6,05	100,78	0,650	9,02	100,27
0,219	3,06	101,84	0,432	6,01	100,09	0,651	9,04	100,43
ORTALAMA %GERİ ELDE		101,38	ORTALAMA %GERİ ELDE		100,86	ORTALAMA %GERİ ELDE		100,35
STANDART SAPMA		0,413	STANDART SAPMA		0,539	STANDART SAPMA		0,212
BAĞIL ST. SAPMA (SS*100/Xort)		0,407	BAĞIL STANDART SAPMA		0,535	BAĞIL STANDART SAPMA		0,211

Çizelge 3.3. Distile su için yapılan doğruluk bulguları

Teorik Konsantrasyon: 3 µg/ml			Teorik Konsantrasyon : 6 µg/ml			Teorik Konsantrasyon: 9 µg/ml		
Abs.	Pratik Kons.	%Geri Elde	Abs.	Pratik Kons.	%Geri Elde	Abs.	Pratik Kons.	% Geri Elde
0,201	3,03	101,13	0,415	5,99	99,91	0,634	9,02	100,27
0,200	3,02	100,67	0,414	5,98	99,67	0,634	9,02	100,27
0,199	3,01	100,21	0,416	6,01	100,14	0,630	8,97	99,65
0,199	3,01	100,21	0,417	6,02	100,37	0,629	8,95	99,50
0,198	2,99	99,74	0,415	5,99	99,91	0,631	8,98	99,81
0,198	2,99	99,74	0,414	5,98	99,67	0,631	8,76	97,35
ORTALAMA %GERİ ELDE		100,28	ORTALAMA %GERİ ELDE		99,94	ORTALAMA %GERİ ELDE		99,47
STANDART SAPMA		0,539	STANDART SAPMA		0,269	STANDART SAPMA		1,087
BAĞIL STANDART SAPMA		0,538	BAĞIL STANDART SAPMA		0,269	BAĞIL STANDART SAPMA		1,093

3.1.5.2. Kesinlik

Levofloksasinin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki kalibrasyonunun kesinliğinin saptanmasında tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiştir.

-Tekrarlanabilirlik

Çizelge 3.4-3.5’de distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ile 3 farklı konsantrasyon için 6 kez yapılan ölçümlere ait ortalama, standart sapma ve bağıl sapma değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.4. pH 7,4 fosfat tamponu için yapılan tekrarlanabilirlik bulguları

Teorik Konsantrasyon : 3 µg/ml		Teorik Konsantrasyon : 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon : 9 µg/ml	
Absorbans	Pratik Konsantrasyon	Absorbans	Pratik Konsantrasyon	Absorbans	Pratik Konsantrasyon
0,222	3,10	0,438	6,09	0,653	9,07
0,219	3,06	0,437	6,07	0,650	9,02
0,218	3,04	0,434	6,03	0,651	9,04
0,217	3,03	0,438	6,09	0,648	9,00
0,218	3,04	0,436	6,06	0,650	9,02
0,219	3,06	0,432	6,01	0,652	9,05
ORTALAMA	3,05	ORTALAMA	6,06	ORTALAMA	9,03
STANDART SAPMA	0,02	STANDART SAPMA	0,03	STANDART SAPMA	0,02
BAĞIL ST. SAPMA	0,781	BAĞIL ST. SAPMA	0,549	BAĞIL ST. SAPMA	0,268

Çizelge 3.5. Distile su için yapılan tekrarlanabilirlik bulguları

Teorik Konsantrasyon: 3 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 6 µg/ml		Teorik Konsantrasyon: 9 µg/ml	
Absorbans	Pratik Konsantrasyon	Absorbans	Pratik Konsantrasyon	Absorbans	Pratik Konsantrasyon
0,216	3,24	0,435	6,27	0,646	9,19
0,215	3,23	0,432	6,23	0,641	9,12
0,218	3,27	0,431	6,22	0,647	9,21
0,217	3,26	0,433	6,25	0,641	9,12
0,219	3,28	0,437	6,30	0,641	9,12
0,219	3,28	0,430	6,20	0,646	9,19
ORTALAMA	3,26	ORTALAMA	6,25	ORTALAMA	9,16
STANDART SAPMA	0,02	STANDART SAPMA	0,04	STANDART SAPMA	0,04
BAĞIL ST. SAPMA	0,693	BAĞIL ST. SAPMA	0,578	BAĞIL ST. SAPMA	0,445

3.1.5.4. Teşhis Sınırı (LOD)

Bölüm 2.3.3.2.4'de anlatıldığı gibi hesaplanan veriler Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Teşhis sınırı (LOD) bulguları

	Teşhis Sınırı (LOD) (mg/ml)
Distile su	$1,216 \times 10^{-4}$
pH 7,4 fosfat tamponu	$1,568 \times 10^{-5}$

3.1.5.5. Tayin Sınırı (LOQ)

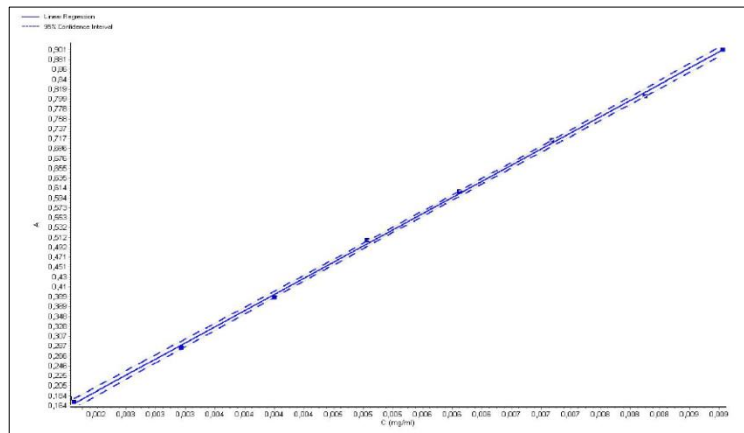
Bölüm 2.3.3.2.5'de anlatıldığı gibi hesaplanan veriler Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Tayin sınırı (LOQ) bulguları

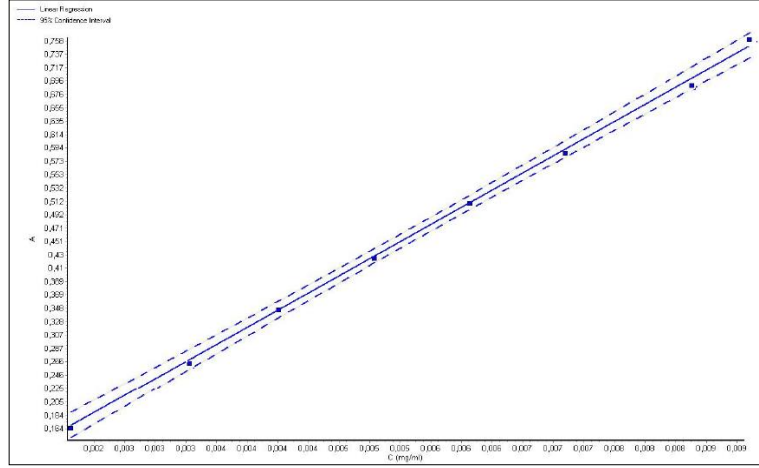
	Tayin Sınırı (LOQ) (mg/ml)
Distile su	$3,684 \times 10^{-4}$
pH 7,4 fosfat tamponu	$4,753 \times 10^{-5}$

3.1.5.6. Doğrusallık

Distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içinde ayrı ayrı 10mg/100ml konsantrasyonda hazırlanmış etkin maddenin stok çözeltilerinden seyreltmeler yapılarak her bir ortam için 8 farklı konsantrasyonda çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerin 288 nm'deki absorbanları okunmuş ve bundan hareketle doğrusallık ve doğrusallık aralığına ait doğrular ve bu doğrulara ait parametreler hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. Distile su için doğrusallık grafiği



Şekil 3.8. pH 7,4 fosfat tamponuna ait doğrusallık grafiği

Çizelge 3.8. Levofloksasinin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu için doğrusallık parametreleri

	pH 7,4 fosfat tamponu	Distile su
Eğim	71,01	71,68
Eğimin standart hatası	0,839	0,02
Güven aralığı (%95)	69,02 → 72,99	69,82 → 73,54
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9996	0,9995
Regresyon Katsayısı (r ²)	0,9990	0,9992
Kesişim (n)	0,0023	0,0197
Kesişimin standart hatası	0,0055	0,0051
Kesişimin güven aralığı	- 0,0106 → 0,0152	0,0076 → 0,03178
Regresyon doğrusundan sapmanın standart hatası	0,0075	0,00699
Artık kareler toplamı	0,3702	0,3244

3.2. Formülasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular

3.2.1. Ön Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Bulgular

3.2.1.1. Partikül Büyüklüğü Bulguları

Elde edilen mikropartiküllerin büyüklük incelemesi optik mikroskop ile yapılmıştır. Partikül büyüklüklerinin 10 µm'dan küçük olduğu tespit edilmiştir.

3.2.1.2. Enkapsülasyon Etkinliği Bulguları

Polimer olarak PCL kullanılarak hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliği sonuçları %0,09 - %5,08 aralığında bulunmuştur.

Polimer olarak PLGA kullanılarak s/y/y emülsiyon çözücü buharlaşma yöntemi ile hazırlanan önformülasyonlara ait enkapsülasyon etkinliği verileri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Farklı miktarlarda PLGA ile hazırlanan önformülasyonların enkapsülasyon etkinliği bulguları

Formülasyon Kodu	Polimer Tipi	Polimer Miktarı (mg)	Organik Çözücü Tipi	Dış faza eklenen Span 80 konsantrasyonu %a/h	% Enkapsülasyon Etkinliği
ÖNF1	PLGA	100	ACN	1	31,719
ÖNF2	PLGA	200	ACN	1	59,910

3.2.1.3. Ürün Verimi Bulguları

Ön formülasyon olarak Bölüm 2.4.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan mikropartiküllerde üretim verimi sonuçları Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Ön formülasyonlara ait üretim verimi bulguları

Formülasyon Kodu	%Verim
ÖNF1	70,19
ÖNF2	84,65

3.2.2. Geliştirilen Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontrollere ait Bulgular

3.2.2.1. Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Bulguları

s/y/y tipi emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü bulguları Bölüm 2.5.3'deki gibi analiz edilmiş ve Çizelge 3.11'de

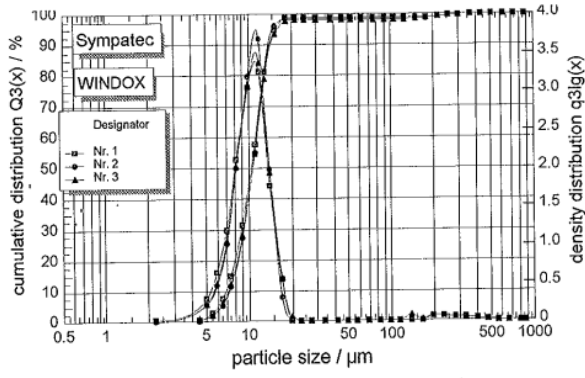
verilmiştir. Formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımı grafikleri ise Şekil 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. Hazırlanan mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü, span ve standart sapma bulguları

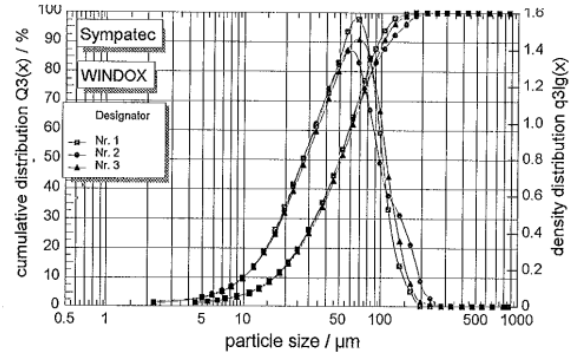
Formülasyon kodu	Partikül Büyüklüğü (μm) $\pm$ SS	Span* değerleri $\pm$ SS
F1	50,47 $\pm$ 0,83	1,739 $\pm$ 0,20
F2	29,21 $\pm$ 0,30	1,712 $\pm$ 0,28
F3	10,59 $\pm$ 0,12	0,713 $\pm$ 0,04
F4	13,0 $\pm$ 0,54	1,685 $\pm$ 0,05
F5	10,69 $\pm$ 0,99	0,830 $\pm$ 0,13
F6	5,59 $\pm$ 0,54	2,783 $\pm$ 0,23
F7	36,26 $\pm$ 0,52	1,859 $\pm$ 0,18
F8	33,65 $\pm$ 1,55	1,816 $\pm$ 0,14
F9	10,40 $\pm$ 1,89	4,077 $\pm$ 0,49
F10	29,57 $\pm$ 1,39	1,729 $\pm$ 0,22
F11	29,40 $\pm$ 2,06	1,669 $\pm$ 0,04
F12	7,03 $\pm$ 1,47	3,054 $\pm$ 0,43
F13	29,18 $\pm$ 2,97	1,668 $\pm$ 0,15
F14	15,99 $\pm$ 0,61	1,844 $\pm$ 0,34
F15	11,86 $\pm$ 1,18	3,471 $\pm$ 0,29
F16	45,58 $\pm$ 4,57	2,342 $\pm$ 0,10
F17	52,63 $\pm$ 3,58	1,988 $\pm$ 0,16
F18	20,84 $\pm$ 2,83	3,011 $\pm$ 0,34
F19	58,10 $\pm$ 1,30	2,766 $\pm$ 0,59
F20	76,19 $\pm$ 2,20	1,785 $\pm$ 0,04
F21	9,57 $\pm$ 1,87	3,270 $\pm$ 0,06
F22	7,01 $\pm$ 1,49	8,423 $\pm$ 2,78
F23	9,31 $\pm$ 0,50	5,728 $\pm$ 1,24

*Span değeri: Bölüm 2.5.3'de açıklanmıştır.

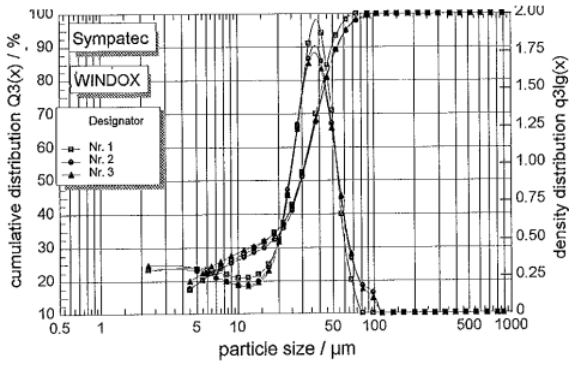
a)



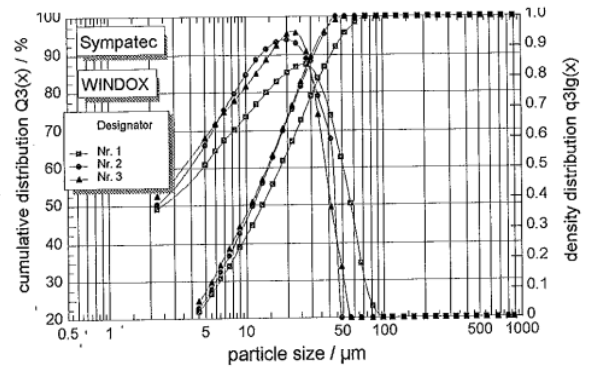
b)



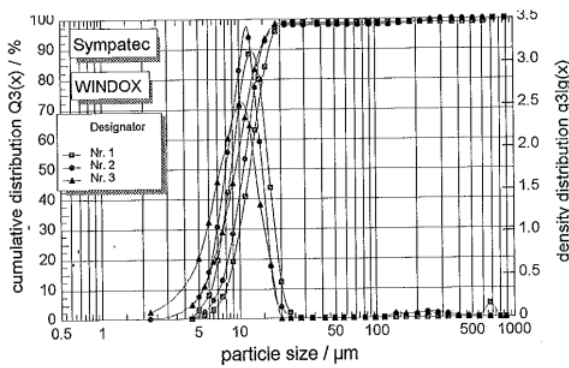
c)



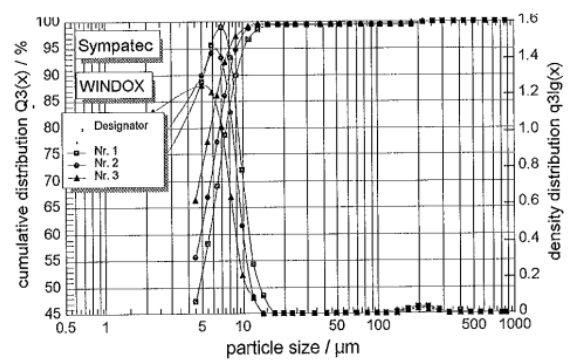
ç)



d)



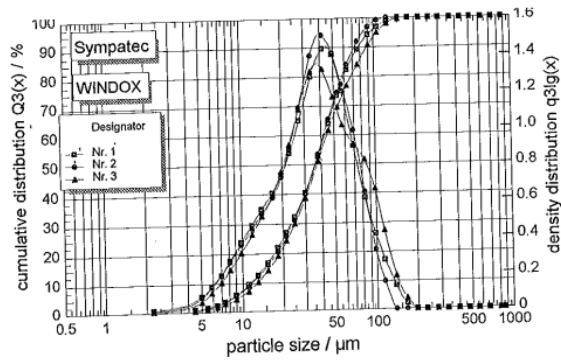
e)



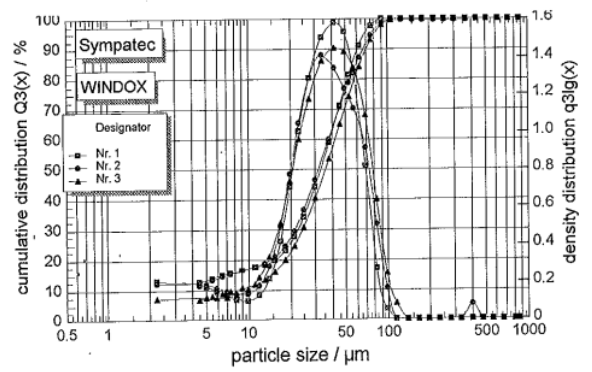
Şekil 3.9. Mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü ve dağılımı grafikleri . a)F1 b)F2 c)F3 ç)F4 d)F5 e)F6 f)F7 g)F8 h)F9 ı)F10 i)F11 j)F12 k)F13 l)F14 m)F15 n)F16 o)F17 ö)F18 p)F19 r)F20 s)F21 ş)F22 t)F23

Şekil 3.9 Devam.

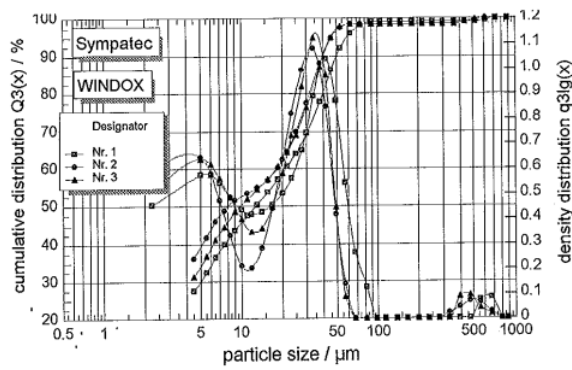
f)



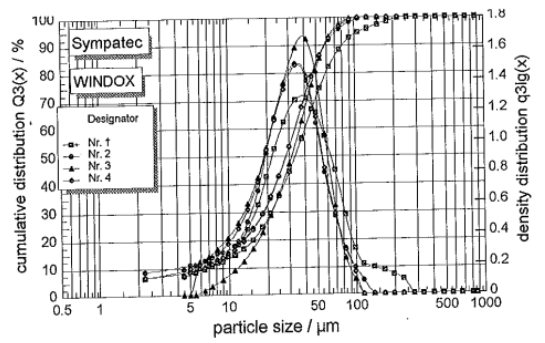
g)



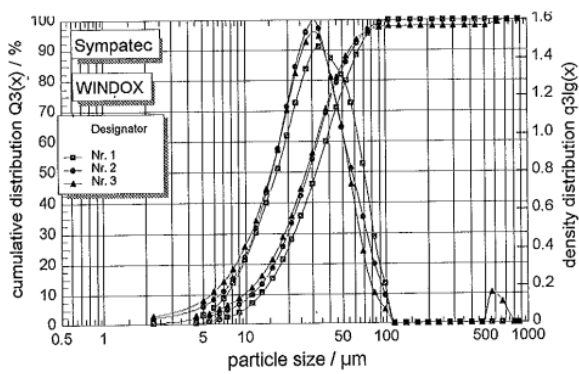
h)



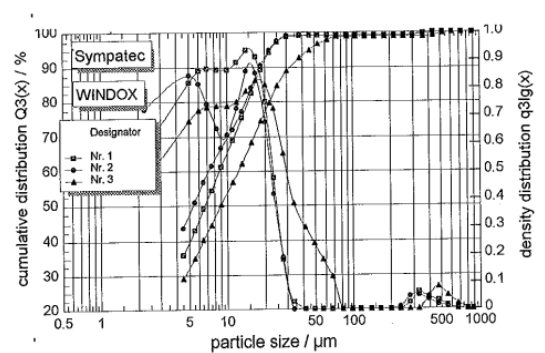
i)



j)

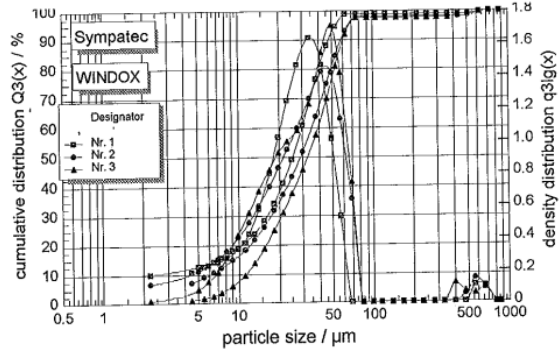


j)

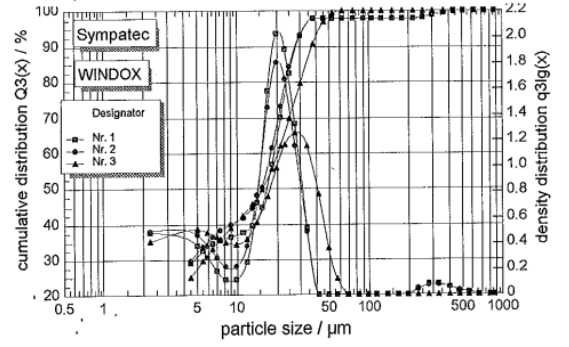


Şekil 3.9 Devam.

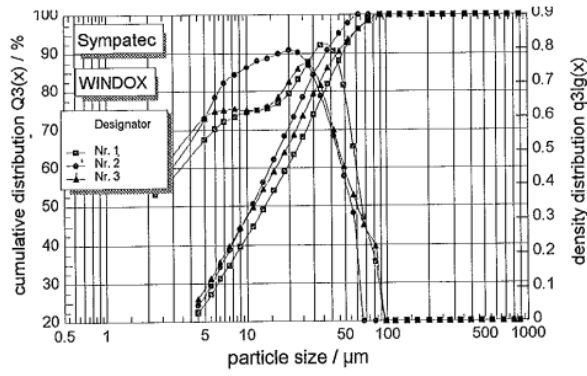
k)



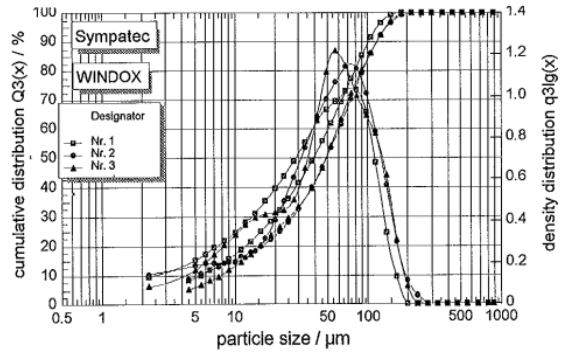
l)



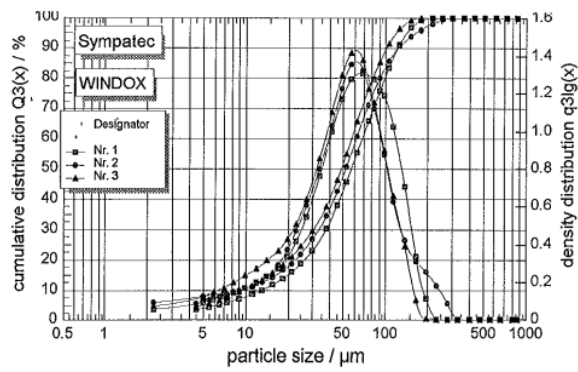
m)



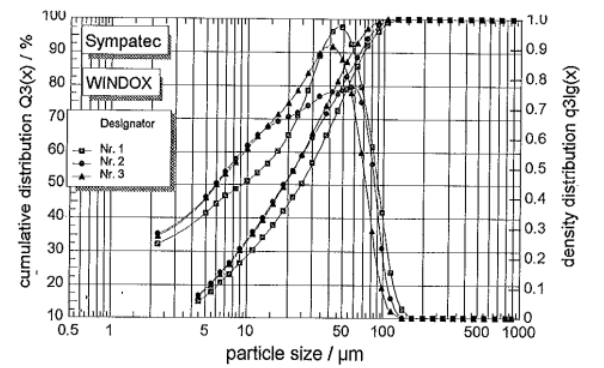
n)



o)

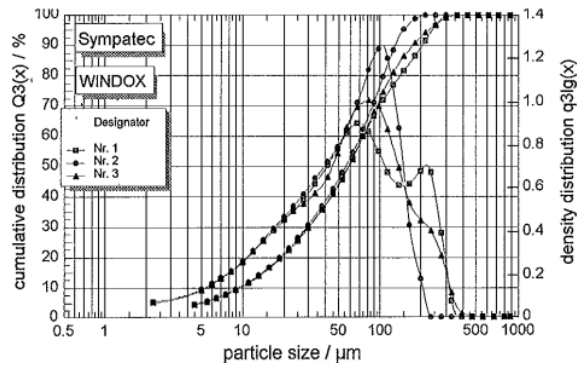


ö)

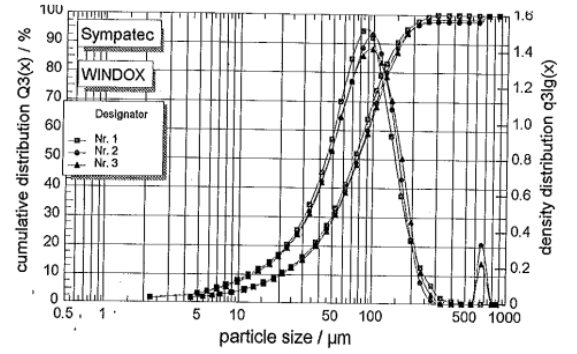


Şekil 3.9 Devam.

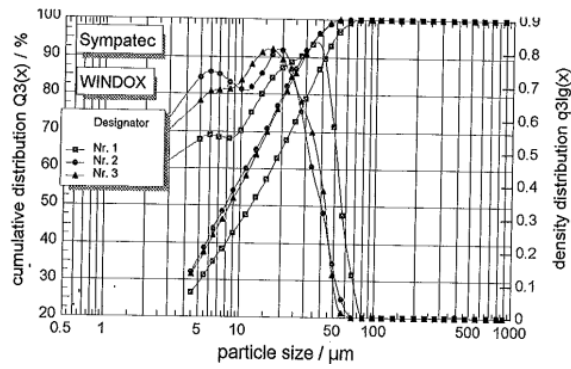
p)



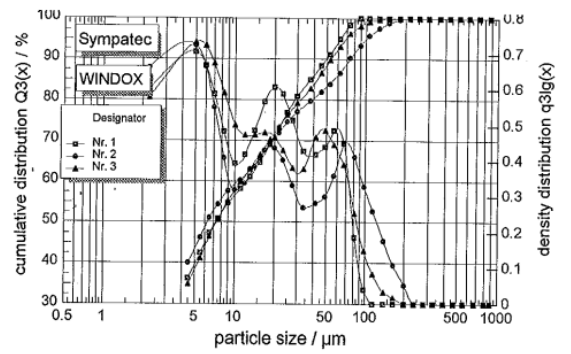
r)



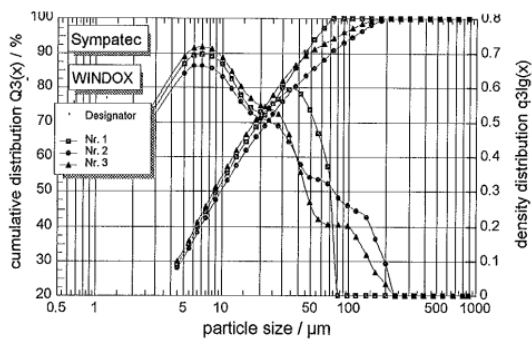
s)



ş)



t)



3.2.2.2. Mikropartiküllere ait Enkapsülasyon Etkinliği Bulguları

Hazırlanan mikropartiküllere ait enkapsülasyon etkinliği bulguları Bölüm 2.5.6'da anlatıldığı gibi hesaplanmış ve Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. İç fazda farklı Tween tipleri ve konsantrasyonları kullanılan mikropartiküllerde enkapsülasyon etkinliği bulguları

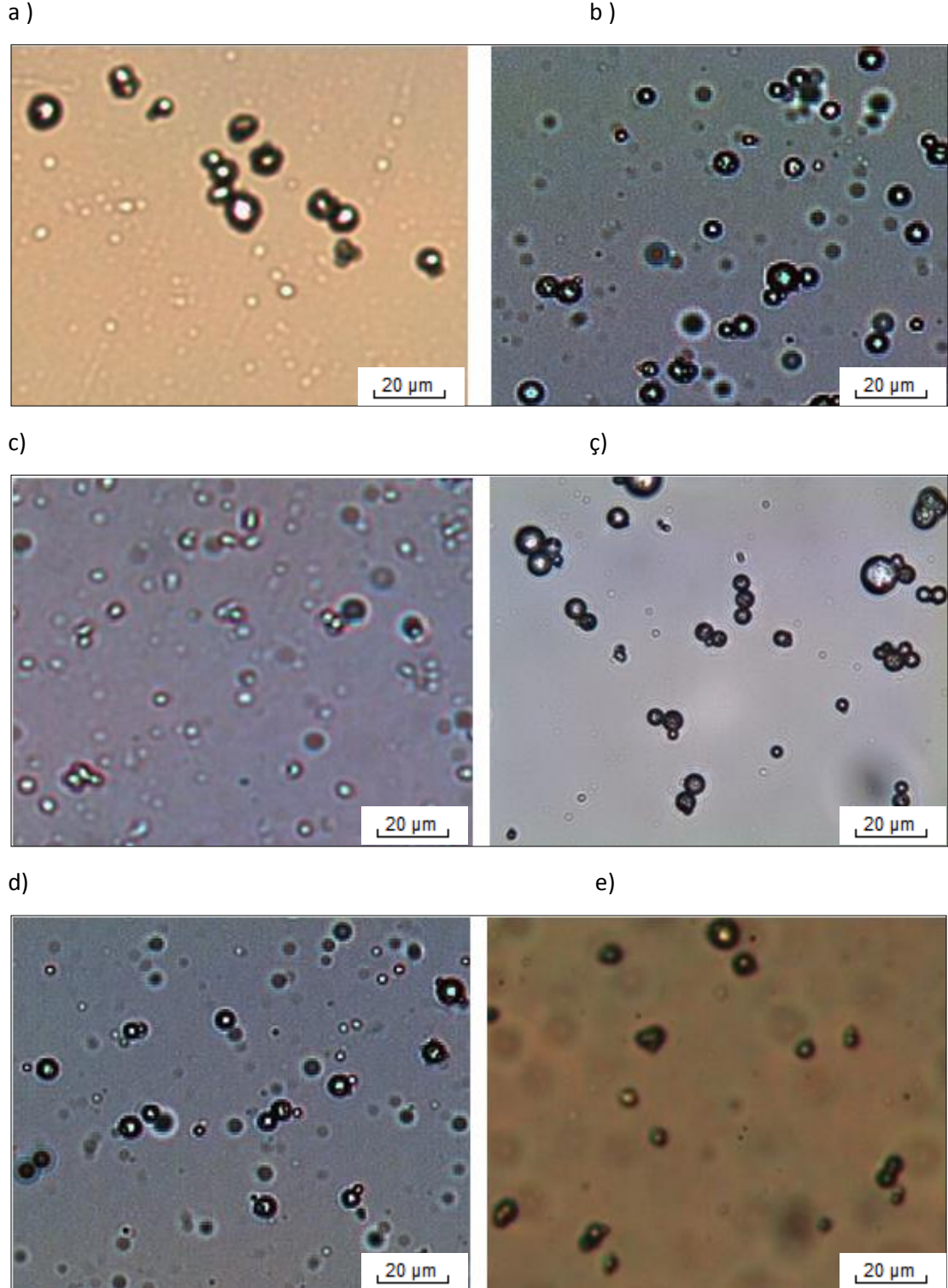
Formülasyon kodu	İç faza eklenen Tween tipi ve konsantrasyonu	Dış faza eklenen Span 80 konsantrasyonu	% Enkapsülasyon Etkinliği $\pm$ SS
F1	Tween 80 % 0,5	% 1	57,81 $\pm$ 0,011
F2	Tween 80 % 1	% 1	63,44 $\pm$ 0,013
F3	Tween 80 % 3	% 1	68,61 $\pm$ 0,012
F4	Tween 60 % 0,5	% 1	89,47 $\pm$ 0,014
F5	Tween 60 % 1	% 1	87,62 $\pm$ 0,012
F6	Tween 60 % 3	% 1	82,51 $\pm$ 0,024
F7	Tween 40 % 0,5	% 1	71,41 $\pm$ 0,024
F8	Tween 40 % 1	% 1	73,36 $\pm$ 0,013
F9	Tween 40 % 3	% 1	80,67 $\pm$ 0,011
F10	Tween 20 % 0,5	% 1	58,47 $\pm$ 0,024
F11	Tween 20 % 1	% 1	70,71 $\pm$ 0,031
F12	Tween 20 % 3	% 1	75,42 $\pm$ 0,014

Çizelge 3.13. Dış fazda farklı Span tipleri ve konsantrasyonları kullanılan mikropartiküllerde enkapsülasyon etkinliği bulguları

Formülasyon kodu	İç faza eklenen Tween 60 konsantrasyonu	Dış faza eklenen Span tipi ve konsantrasyonu	% Enkapsülasyon Etkinliği $\pm$ SS
F13	% 3	Span 80 % 0,5	78,43 $\pm$ 0,018
F6 *	% 3	Span 80 % 1	82,51 $\pm$ 0,024
F14	% 3	Span 80 % 3	52,78 $\pm$ 0,021
F15	% 3	Span 60 % 0,5	82,89 $\pm$ 0,013
F16	% 3	Span 60 % 1	64,59 $\pm$ 0,017
F17	% 3	Span 60 % 3	29,72 $\pm$ 0,028
F18	% 3	Span 40 % 0,5	66,43 $\pm$ 0,017
F19	% 3	Span 40 % 1	54,46 $\pm$ 0,013
F20	% 3	Span 40 % 3	27,90 $\pm$ 0,011
F21	% 3	Span 20 % 0,5	67,87 $\pm$ 0,014
F22	% 3	Span 20 % 1	45,26 $\pm$ 0,014
F23	% 3	Span 20 % 3	37,54 $\pm$ 0,018

3.2.2.3. Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

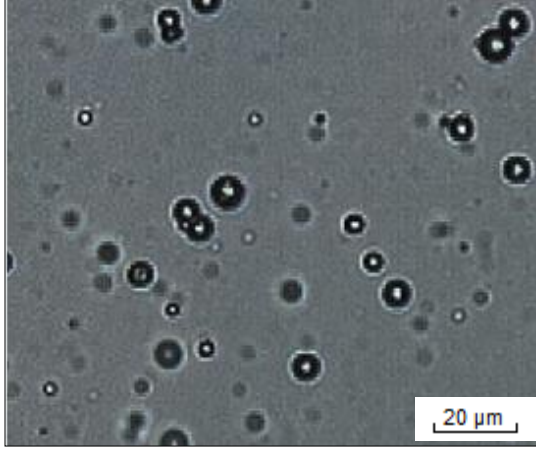
Hazırlanan mikropartiküllerden alınan örnekler distile suda disperse edildikten sonra, 100x büyütme oranı ile alınan optik mikroskop görüntüleri Şekil 3.10'da verilmiştir.



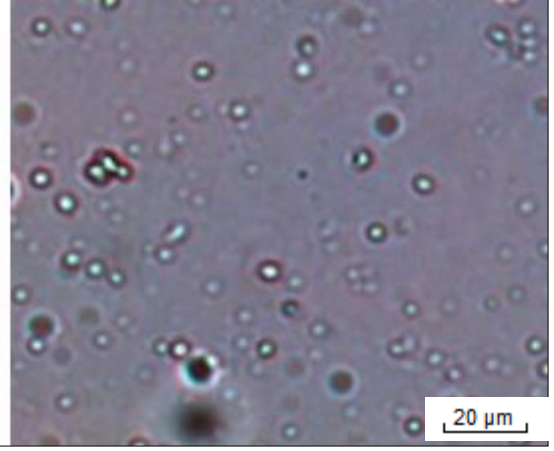
Şekil 3.10. Mikropartiküllere ait optik mikroskop görüntüleri. a)F1 b)F2 c)F3 ç)F4 d)F5 e)F6 f)F7 g)F8 h)F9 i)F10 j)F11 j)F12 k)F13 l)F14 m)F15 n)F16 o)F17 ö)F18 p)F19 r)F20 s)F21 ş)F22 t)F23

Şekil 3.10.Devam.

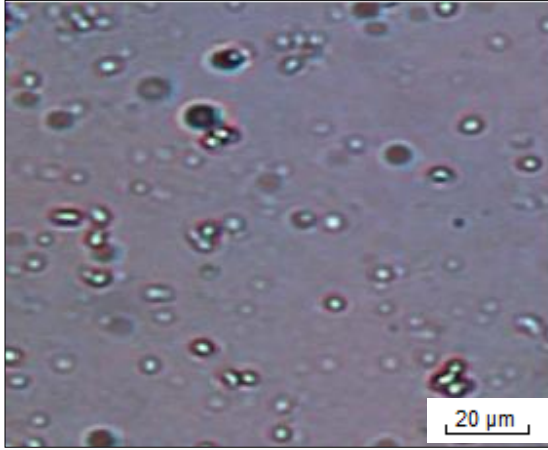
f)



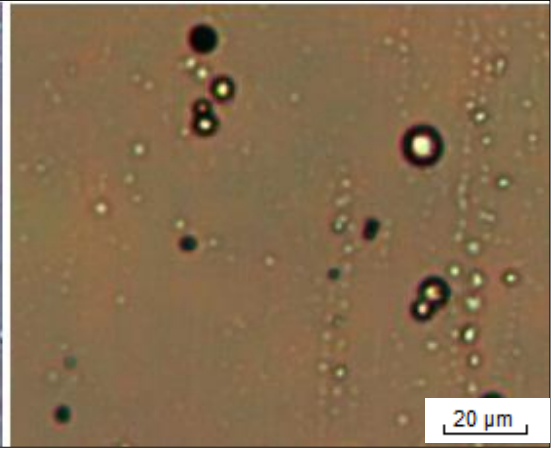
g)



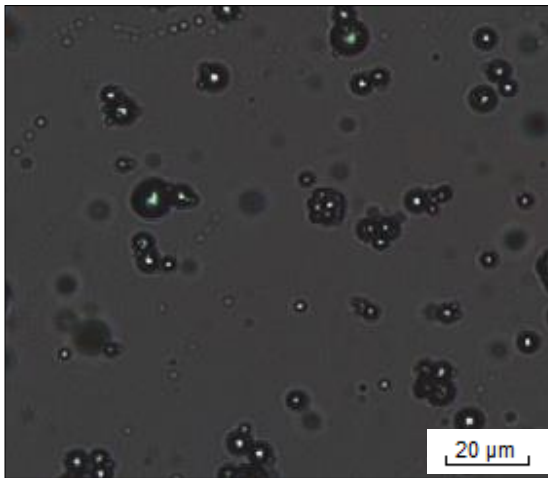
h)



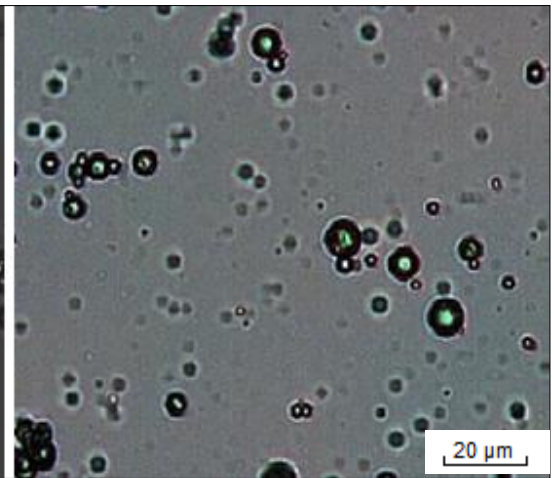
i)



j)

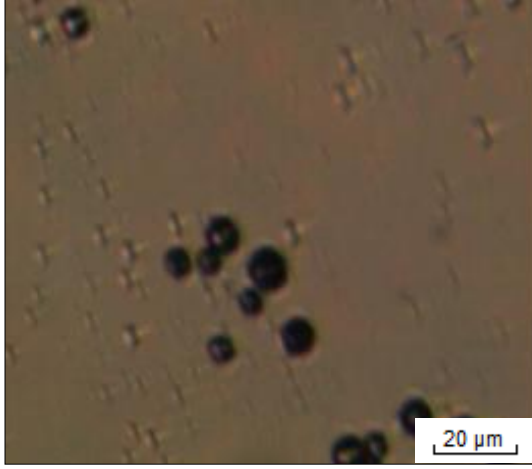


k)

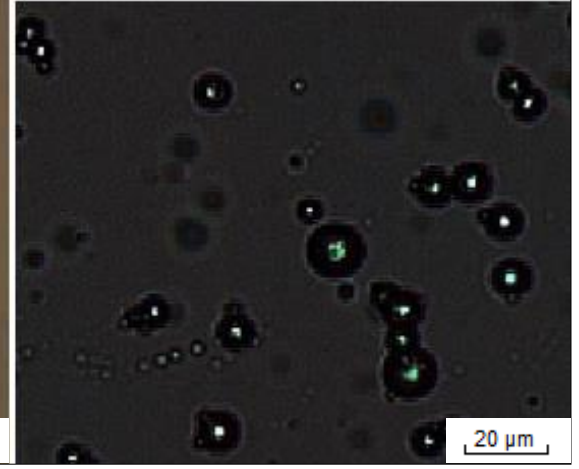


Şekil 3.10 Devam.

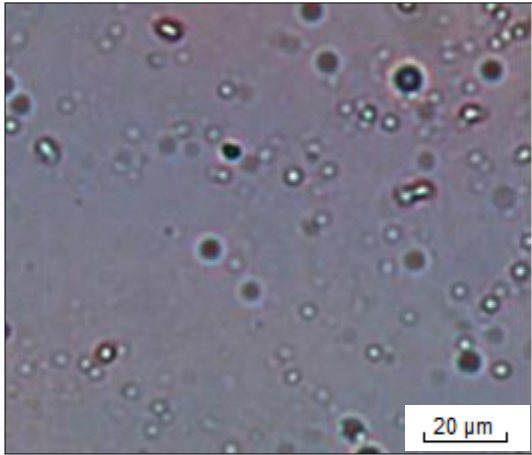
k)



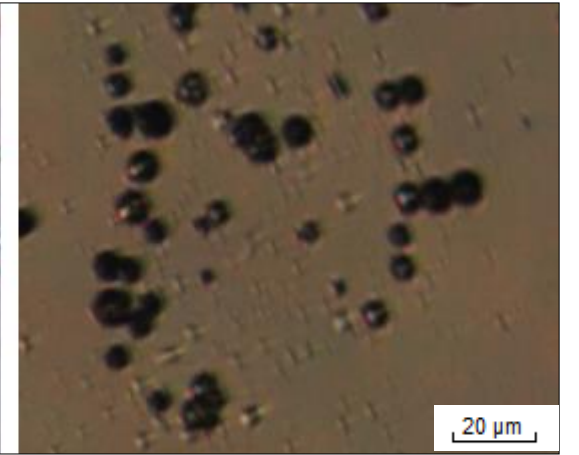
l)



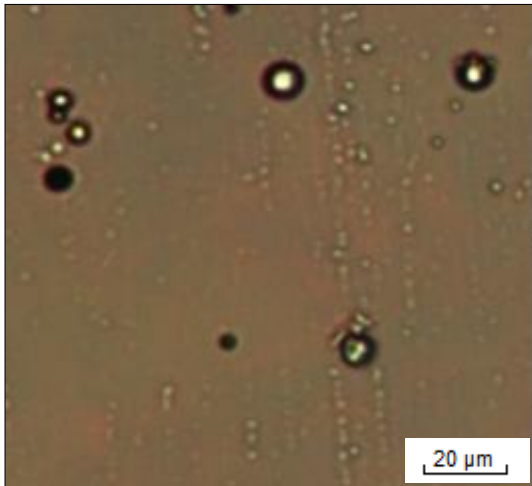
m)



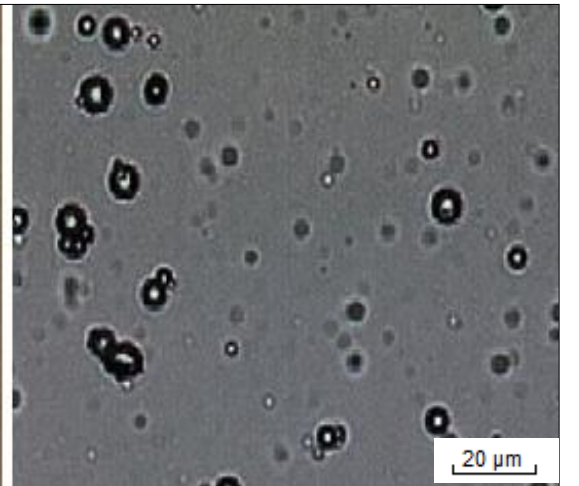
n)



o)

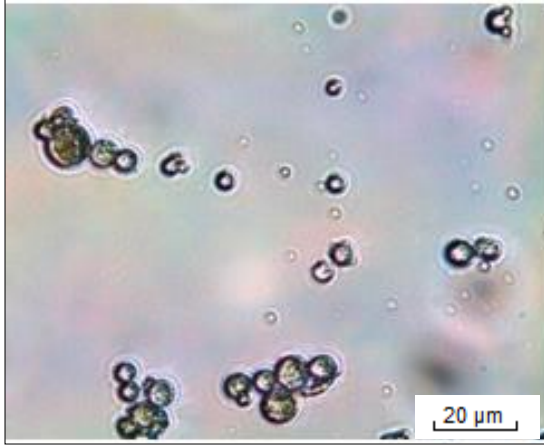


ö)

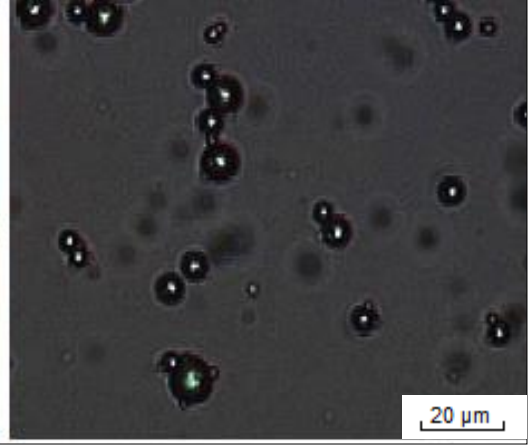


Şekil 3.10 Devam.

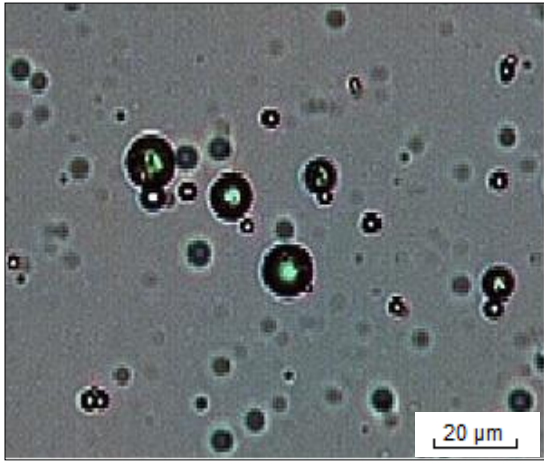
p)



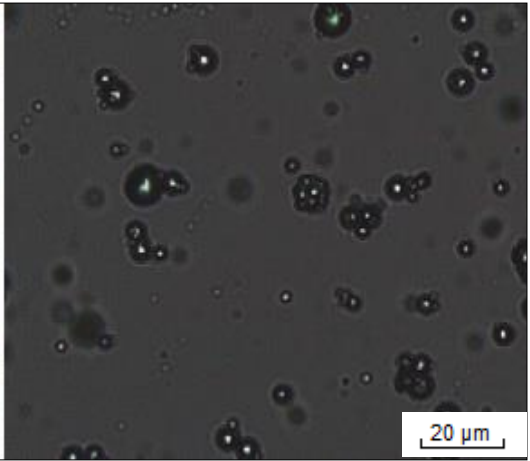
r)



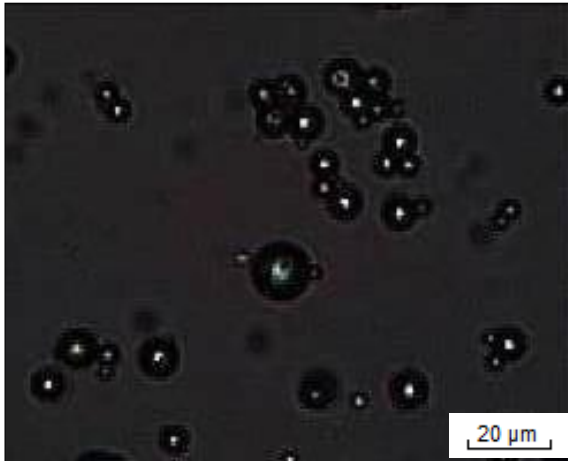
s)



ş)



t)



3.2.2.4. Mikropartiküllere ait Üretim Verimi Bulguları

Hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait üretim verimi bulguları Bölüm 2.5.7'de anlatıldığı gibi hesaplanmış ve Çizelge 3.14 ve Çizelge 3.15'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. İç faza farklı Tween tipleri ve konsantrasyonları kullanılan mikropartiküllerde ürün verimi bulguları

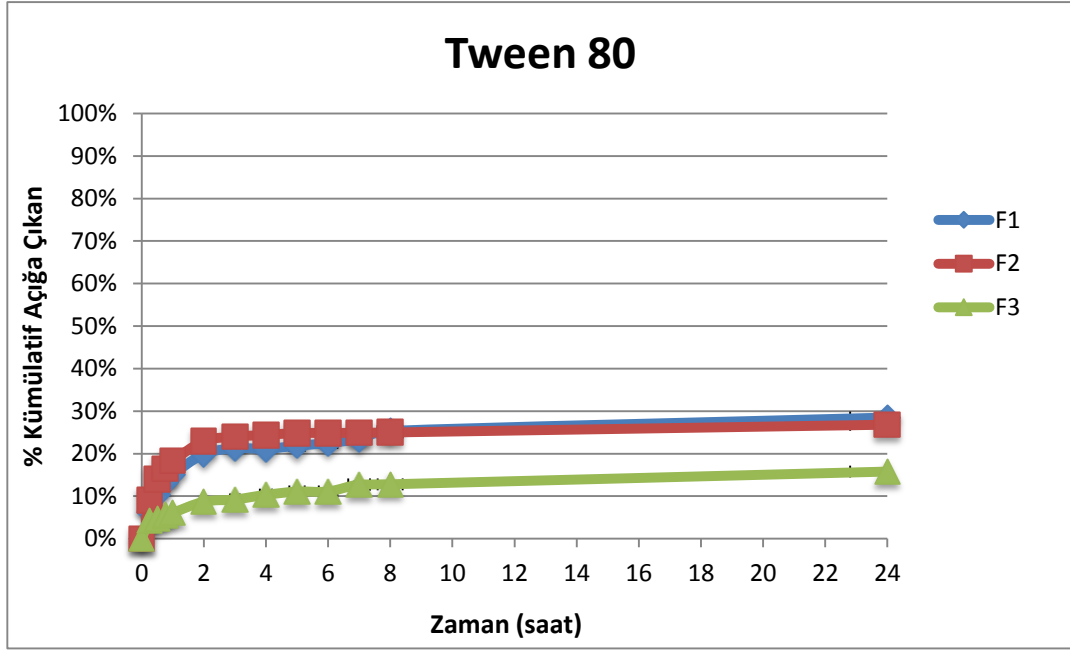
Formülasyon kodu	İç faza eklenen Tween tipi ve konsantrasyonu	Dış faza eklenen Span 80 konsantrasyonu	% Verim
F1	Tween 80 % 0,5	% 1	95,57
F2	Tween 80 % 1	% 1	98,73
F3	Tween 80 % 3	% 1	88,71
F4	Tween 60 % 0,5	% 1	64,81
F5	Tween 60 % 1	% 1	73,90
F6	Tween 60 % 3	% 1	81,71
F7	Tween 40 % 0,5	% 1	72,29
F8	Tween 40 % 1	% 1	71,19
F9	Tween 40 % 3	% 1	76,14
F10	Tween 20 % 0,5	% 1	82,86
F11	Tween 20 % 1	% 1	72,56
F12	Tween 20 % 3	% 1	68,91

Çizelge 3.15. Dış fazda farklı Span tipleri ve konsantrasyonları kullanılan mikropartiküllerde ürün verimi bulguları

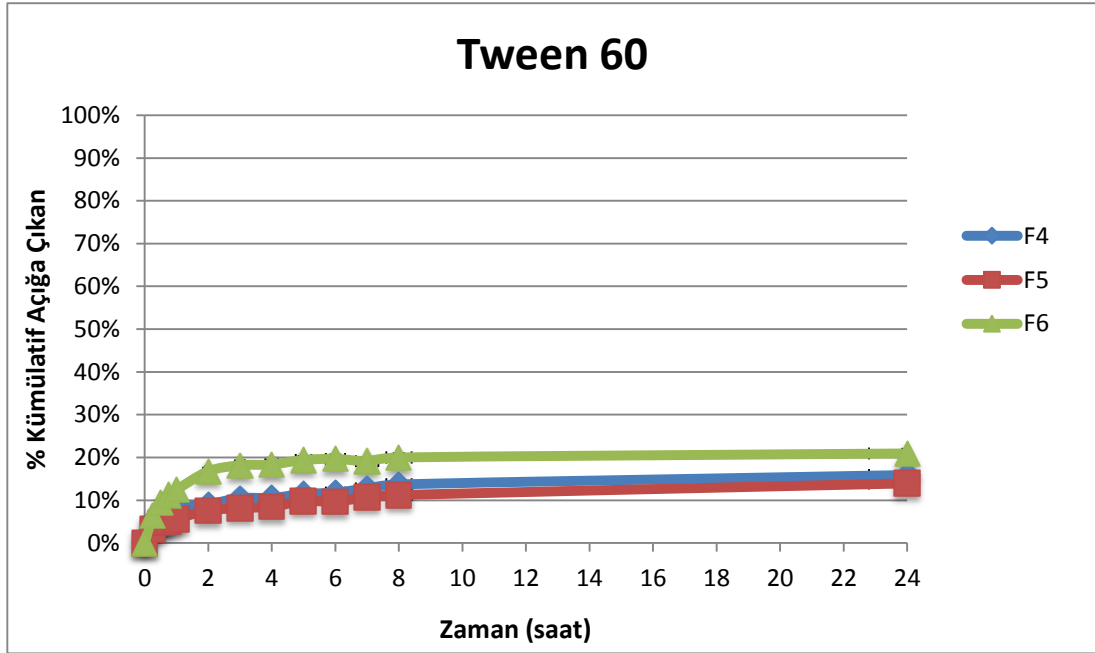
Formülasyon kodu	İç faza eklenen Tween 60 konsantrasyonu	Dış faza eklenen Span tipi ve konsantrasyonu	%Verim
F13	% 3	Span 80 % 0,5	83,80
F14	% 3	Span 80 % 3	73,45
F15	% 3	Span 60 % 0,5	74,97
F16	% 3	Span 60 % 1	75,57
F17	% 3	Span 60 % 3	85,51
F18	% 3	Span 40 % 0,5	82,61
F19	% 3	Span 40 % 1	78,65
F20	% 3	Span 40 % 3	79,67
F21	% 3	Span 20 % 0,5	74,81
F22	% 3	Span 20 % 1	73,55
F23	% 3	Span 20 % 3	71,75

3.2.2.5. Mikropartiküllere ait Çözünme Hızı Bulguları

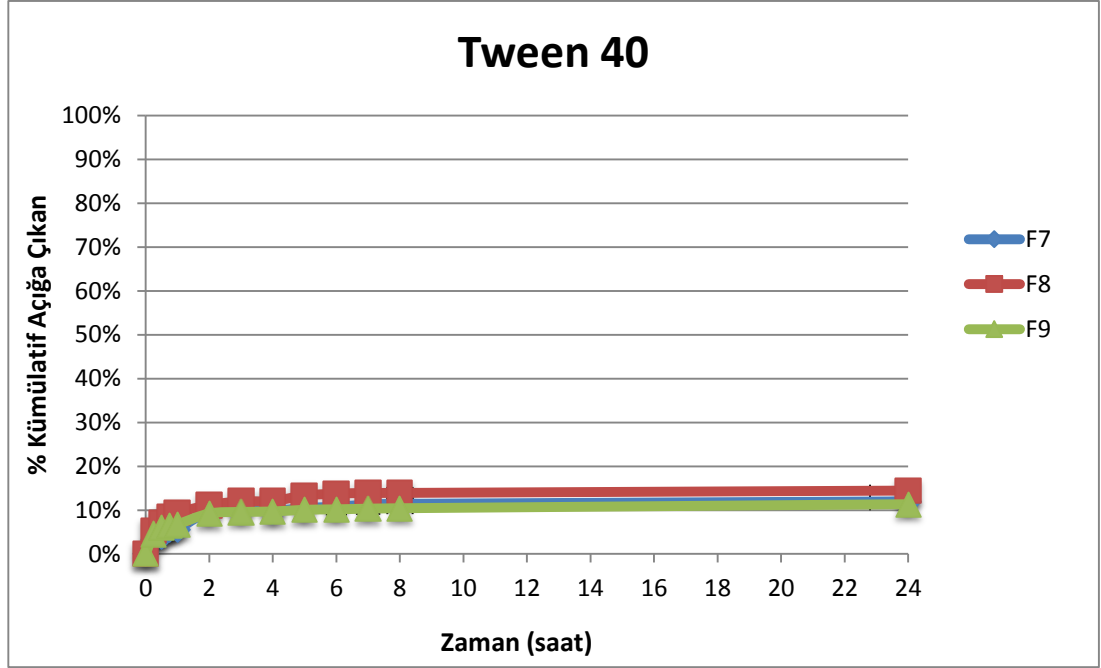
Mikropartiküllerde çözünme hızı bölüm 2.5.6'da anlatılan yöntem ile $37 \pm 0,5$ °C'de pH 7,4 fosfat tamponunda incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonlara ait çözünme hızı grafikleri Şekil 3.11-3.12-3.13-3.14-3.15-3.16-3.17'de verilmiştir.



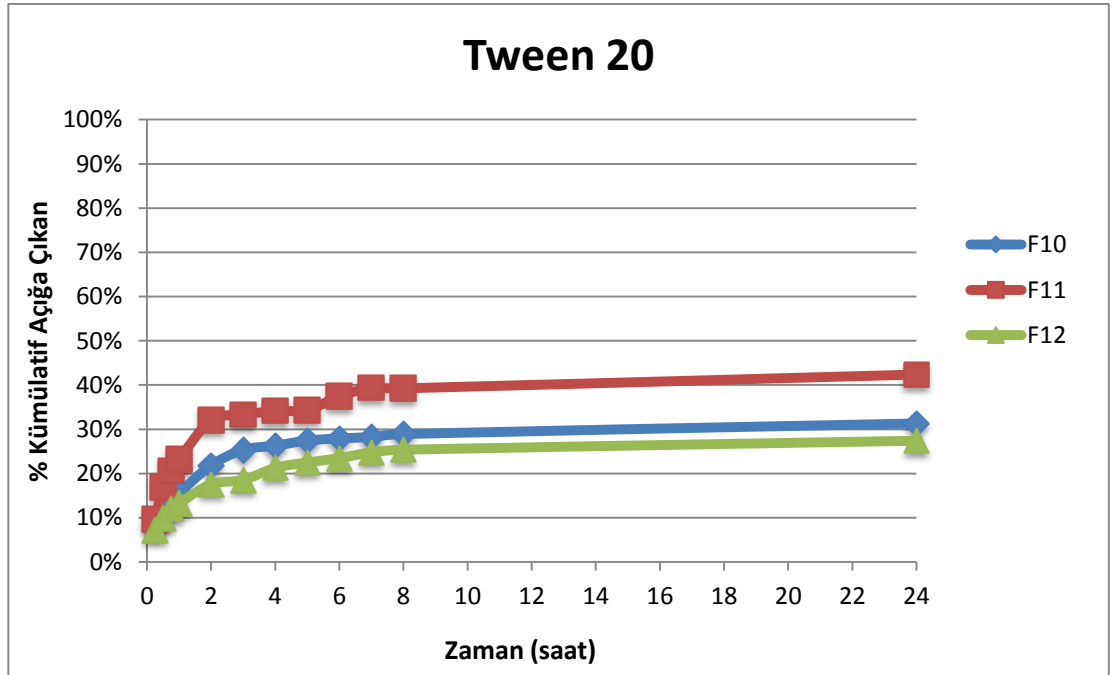
Şekil 3.11. Farklı konsantrasyonlarda Tween 80 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).



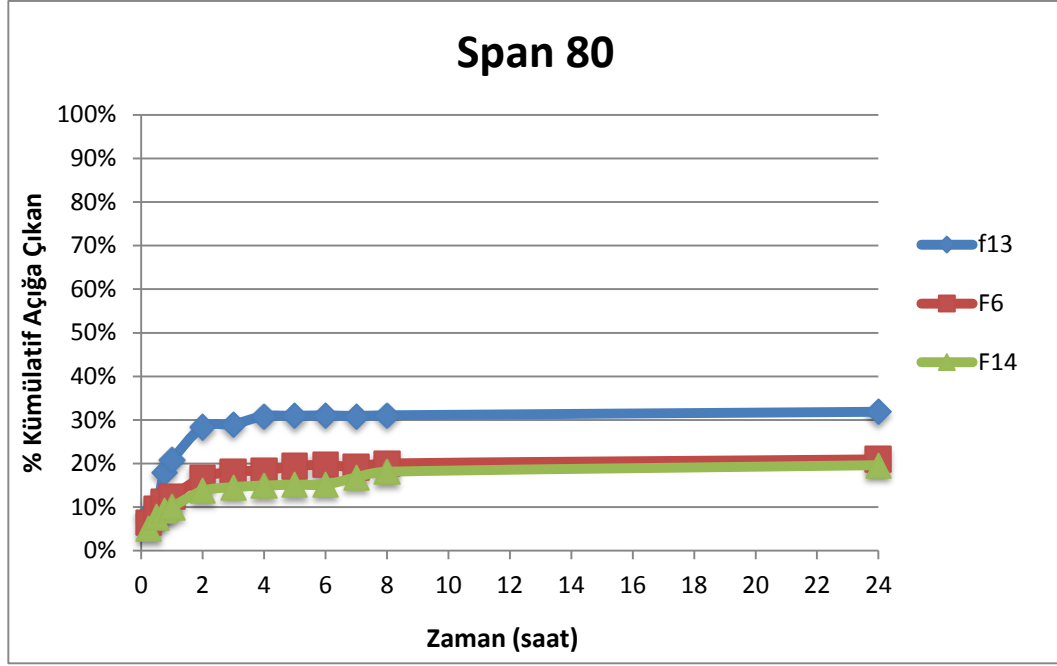
Şekil 3.12. Farklı konsantrasyonlarda Tween 60 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).



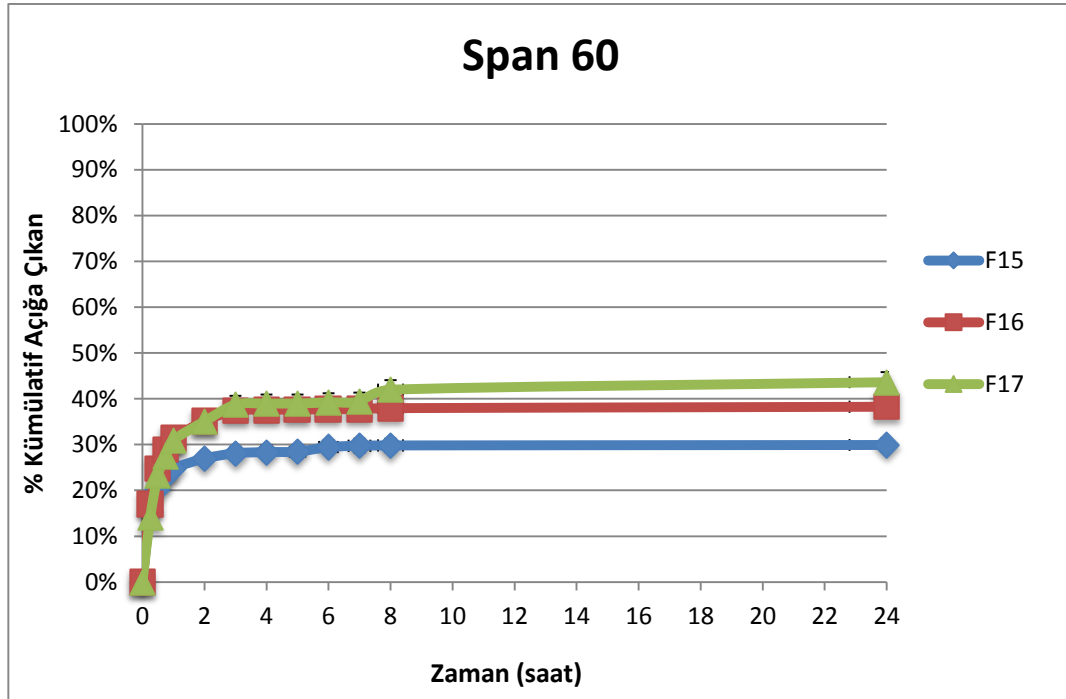
Şekil 3.13. Farklı konsantrasyonlarda Tween 40 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).



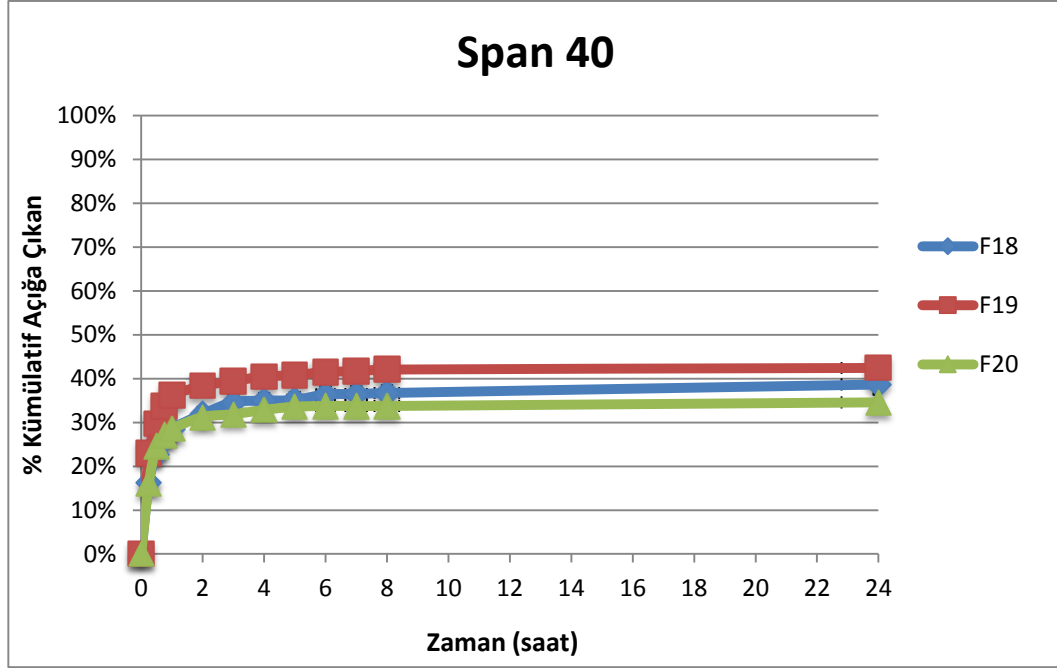
Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda Tween 20 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).



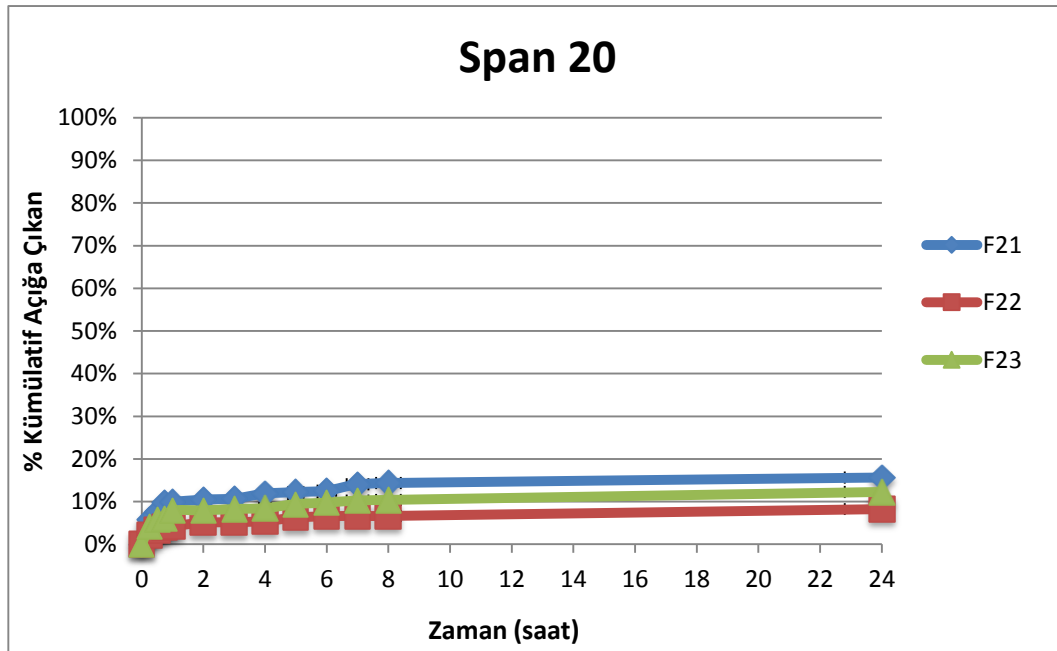
Şekil 3.15. Farklı konsantrasyonda Span 80 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).



Şekil 3.16. Farklı konsantrasyonda Span 60 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).



Şekil 3.17. Farklı konsantrasyonda Span 40 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).



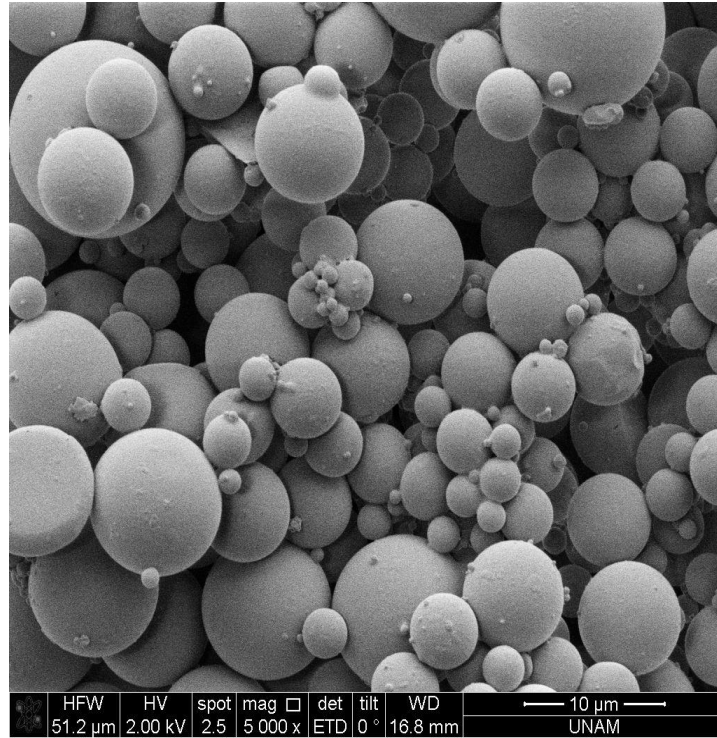
Şekil 3.18. Farklı konsantrasyonda Span 20 ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait çözünme hızı grafikleri (n=3).

3.2.3. Seçilen Formülasyonlara Ait Bulgular

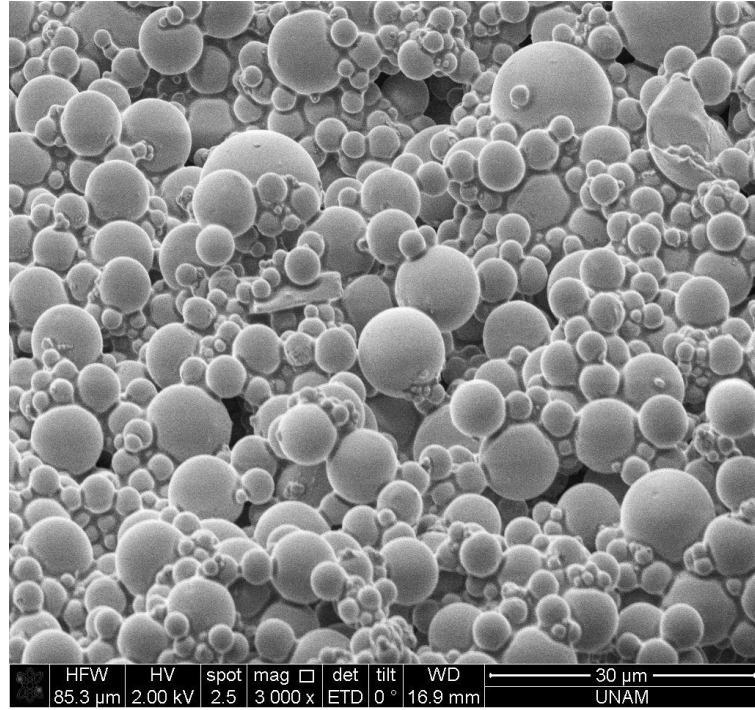
Üretilen mikropartikül formülasyonları arasından, partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği bulguları bakımından en uygun formülasyonlar olan F4 ve F6 formülasyonları ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.2.3.1. SEM Analizi Bulguları

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenen F4 ve F6 formülasyonlarına ait görüntüler Şekil 3.19a ve 3.19b’de verilmiştir.



Şekil 3.19a. F4 formülüne ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü



Şekil 3.19b. F6 formülüne ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü

3.2.3.2. Çözünme Hızı Kinetikleri

F4 ve F6 formülasyonlarının çözünme hızı kinetikleri bulguları Çizelge 3.19'da verilmiştir.

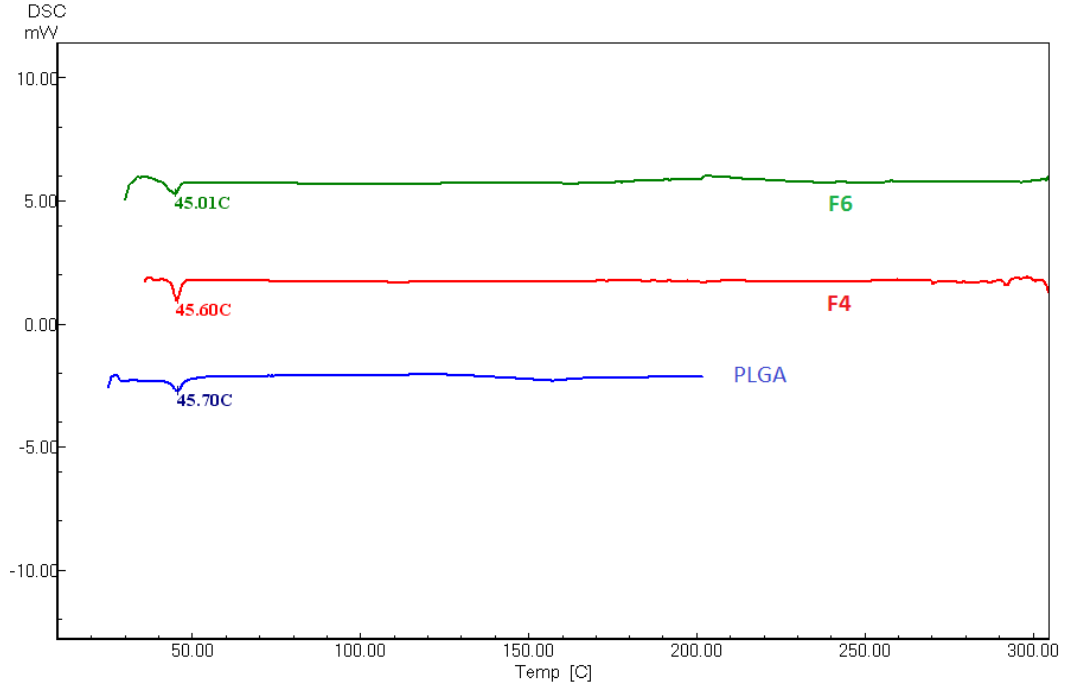
Çizelge 3.19. F4 ve F6 formülasyonlarına ait çözünme hızı kinetikleri bulguları

	KİNETİKLER											
	SIFIR DERECE			BİRİNCİ DERECE			HİXON-CROWEL			HİGUCHİ		
Formül Kodu	k_0 (mg/sa)	r^2	SH	k_1 (sa ⁻¹)	r^2	SH	k_4	r^2	SH	k_h (sa ^{-1/2})	r^2	SH
F4	-0,040	0,762	0,016	-0,057	0,774	0,015	-0,017	0,77	0,006	0,067	0,957	0,0027
F6	-0,078	0,834	0,029	-0,122	0,867	0,382	-0,035	0,856	0,116	0,127	0,993	0,0025

3.2.3.3. Etkin madde-polimer etkileşimi tayini bulguları

3.2.3.3.1. DSC Termogramları

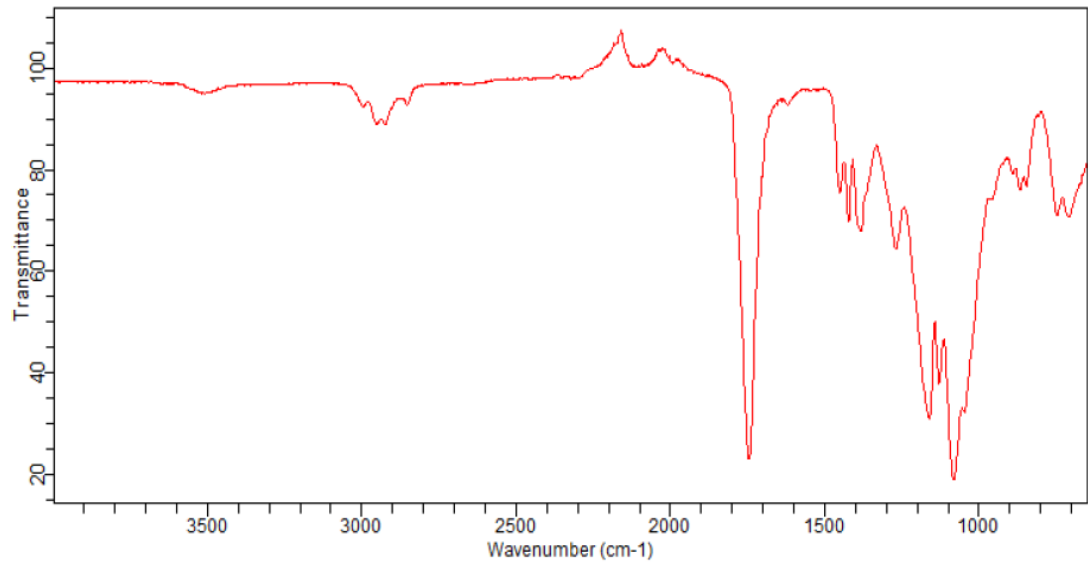
F4 ve F6 kodlu formülasyonlara ve PLGA'ya ait DSC termogramları Şekil 3.20'da verilmiştir.



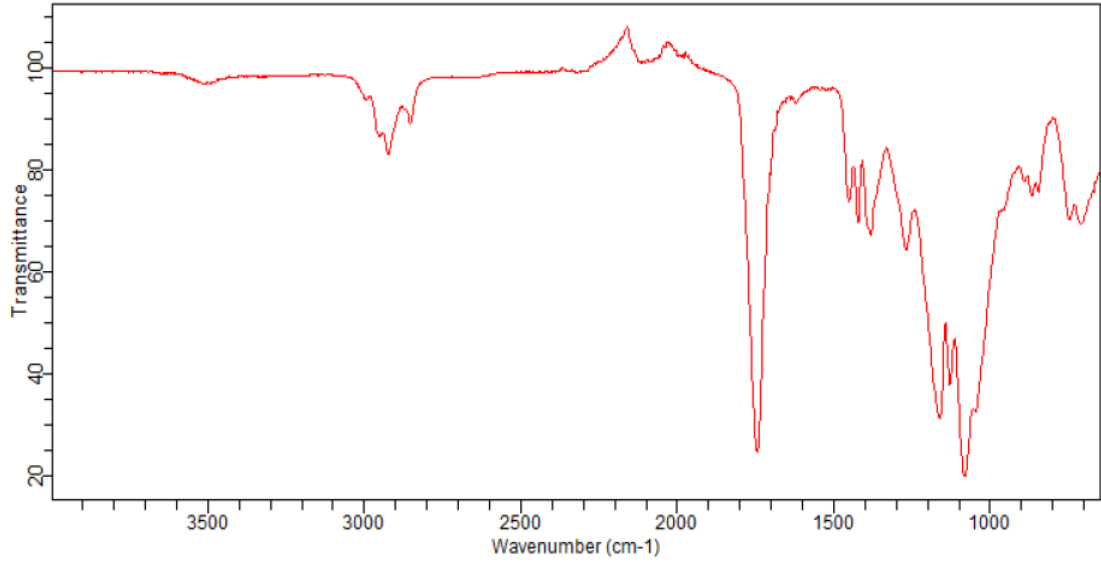
Şekil 3.20. F4 ve F6 formülleri ve PLGA'nın DSC termogramı

3.2.3.3.2. FTIR Spektrumları

Seçilmiş formüller olan F4 ve F6 formülasyonlarına ait FTIR spektrumları Bölüm 2.5.2'deki gibi alınmış ve sonuçlar Şekil 3.21-3.22 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.20. F4 formülüne ait FTIR spektrumu



Şekil 3.21. F6 formülüne ait FTIR spektrumu

3.2.3.4. Partiküllerin Aerodinamik Özelliklerine ait Bulguları

3.2.3.4.1. Sıkıştırılmış Dansite Tayinine Ait Bulgular

Seçilmiş mikropartikül formülasyonlarının sıkıştırılmış dansiteleri Bölüm 2.5.9.1'de belirtildiği şekilde belirlenmiştir. Ayrıca bu formülasyonların İnhalac 70, İnhalac 120 ve İnhalac 230 ile 1:5 oranında ayrı ayrı karışımları hazırlanmış ve bu karışımların sıkıştırılmış dansite tayinleri yapılmıştır ve sonuçlar Çizelge 3.17-3.18'de verilmiştir.

Çizelge 3.17. F4 ve F6 formülasyonlarına ait sıkıştırılmış dansite bulguları

Formülasyon Kodu	Sıkıştırılmış Dansite (mg/ml) $\pm$ SS
F4	0,509 $\pm$ 0,015
F6	0,514 $\pm$ 0,023

Çizelge 3.18. F4 ve F6 formülasyonlarının İnhalac 70, İnhalac 120 ve İnhalac 230 ile 1:5 oranında hazırlanmış karışımlarına ait sıkıştırılmış dansite bulguları

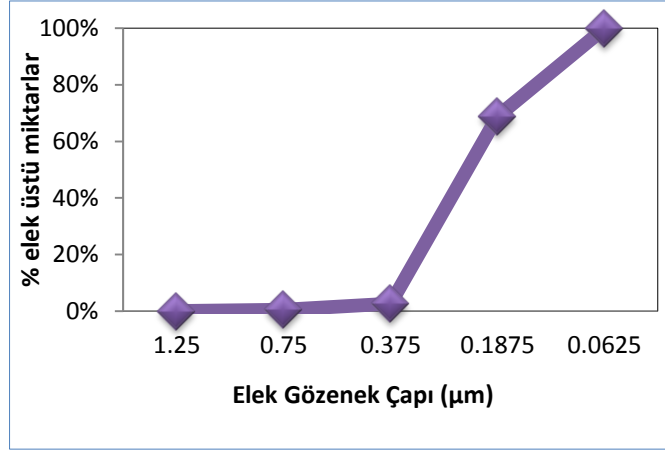
Formülasyon Kodu	Sıkıştırılmış Dansite (mg/ml) ± SS
F4 : İnhalac 70	0,75 ± 0,10
F4: İnhalac 120	0,80 ± 0,00
F4 : İnhalac 230	0,81 ± 0,01
F6 : İnhalac 70	0,75 ± 0,00
F6: İnhalac 120	0,77 ± 0,03
F6 : İnhalac 230	0,77 ± 0,01

3.2.3.4.2. Teorik Kütlesel Aerodinamik Ortalama Çap (KOAÇt) Tayini Bulguları

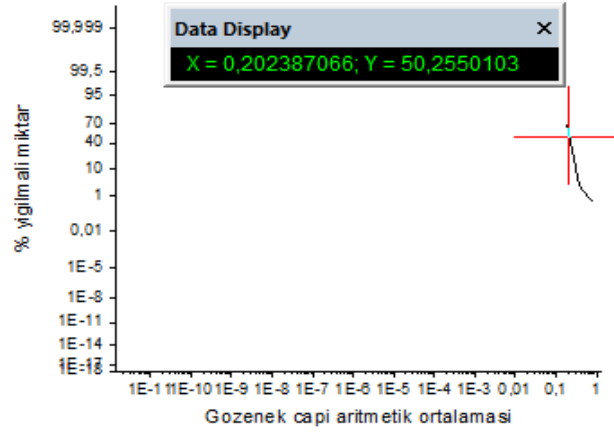
F4 ve F6 formülasyonlarının İnhalac 70, İnhalac 120 ve İnhalac 230 ile 1:5 oranında hazırlanmış karışımlarına ait elek analizi sonuçları Şekil 3.23-3.23-3.24-3.25-3.26-3.27-3.28-3.29-3.30-3.31-3.33'de verilmiştir. Mikropartikül formülasyonlarının ve İnhalac ile hazırlanan karışımlarının KOAÇt verileri ise Çizelge 3.19'da yer almaktadır.

Çizelge 3.19. Mikropartiküllerin tek başına ve İnhalac karışımlarına ait KOAÇt bulguları

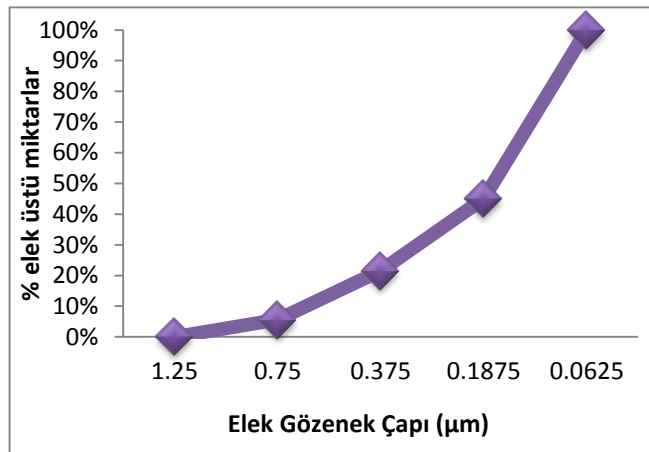
Formülasyon	Geometrik Ortalama Çap (µm)	KOAÇt (µm)
F4	13,000	9,273
F6	5,590	4,006
F4 : İnhalac 70	0,202	0,175
F4: İnhalac 120	0,199	0,178
F4 : İnhalac 230	0,188	0,169
F6 : İnhalac 70	0,241	0,208
F6: İnhalac 120	0,300	0,264
F6 : İnhalac 230	0,278	0,244



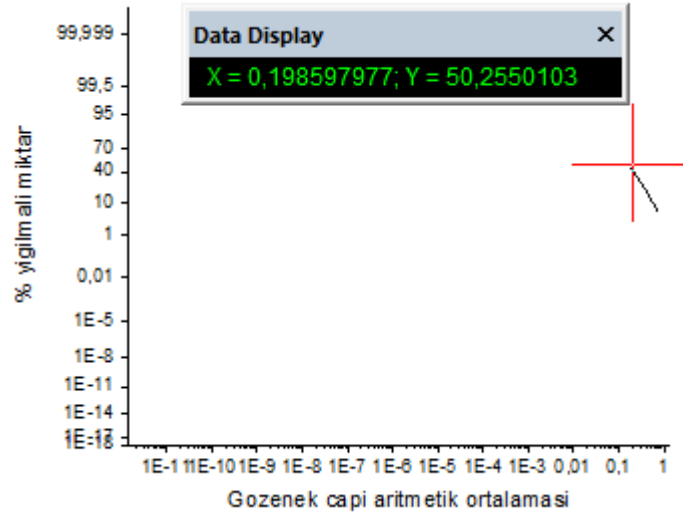
Şekil 3.23. F4 + İnhalec 70 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi



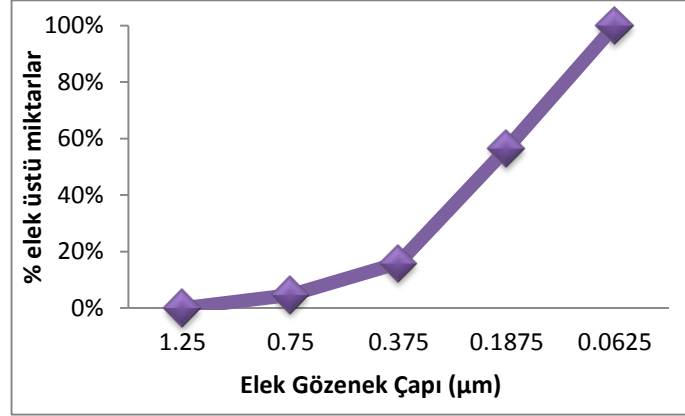
Şekil 3.24. F4 + İnhalec 70 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmalı miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri



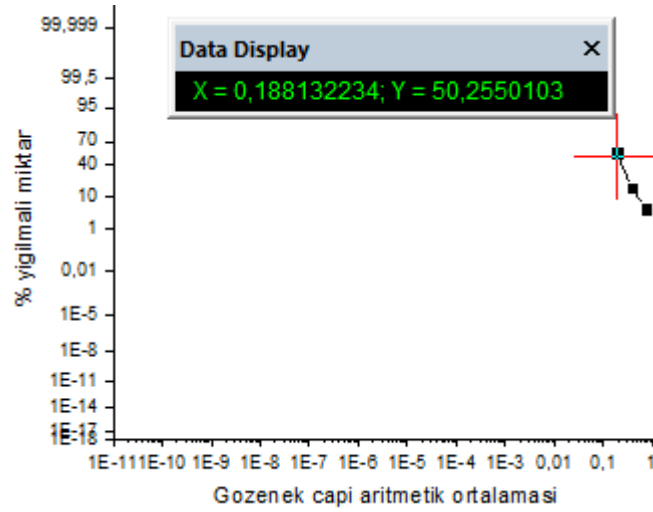
Şekil 3.25. F4 + İnhalec 120 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi



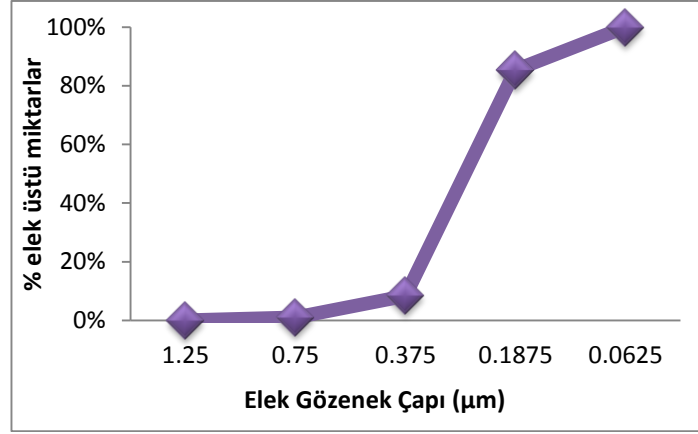
Şekil 3.26. F4 + İnhalac 120 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmali miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri



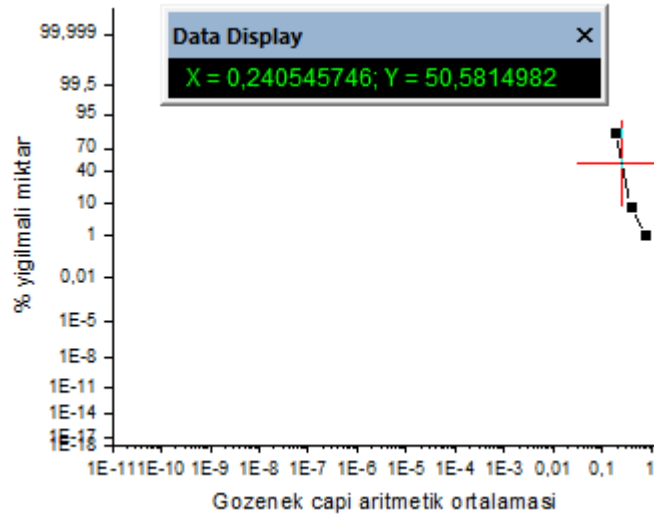
Şekil 3.27. F4 + İnhalac 230 (1:5 a/a) karışımı için yığılmali partikül dağılım eğrisi



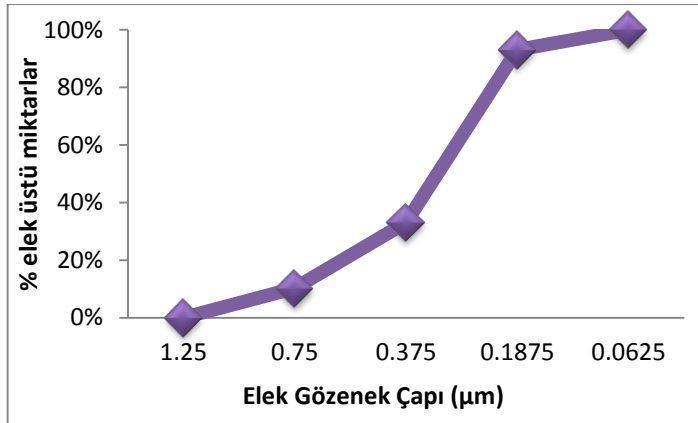
Şekil 3.28. F4 + İnhalac 230 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmali miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri



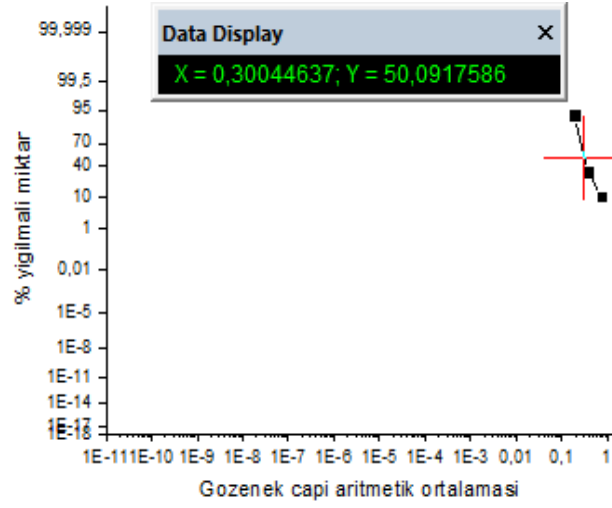
Şekil 3.29. F6 + İnhalac 70 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi



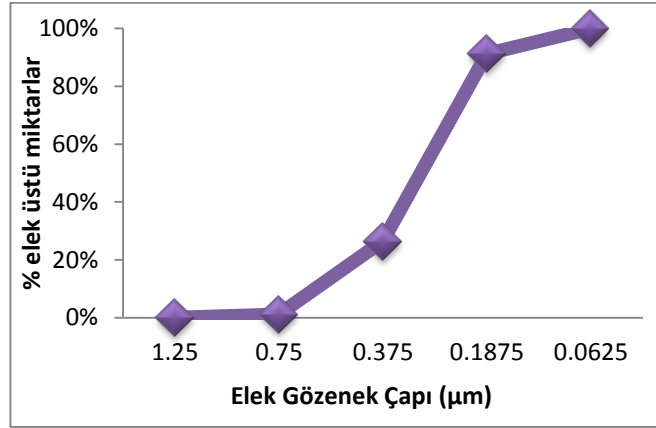
Şekil 3.30. F6 + İnhalac 70 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmalı miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri



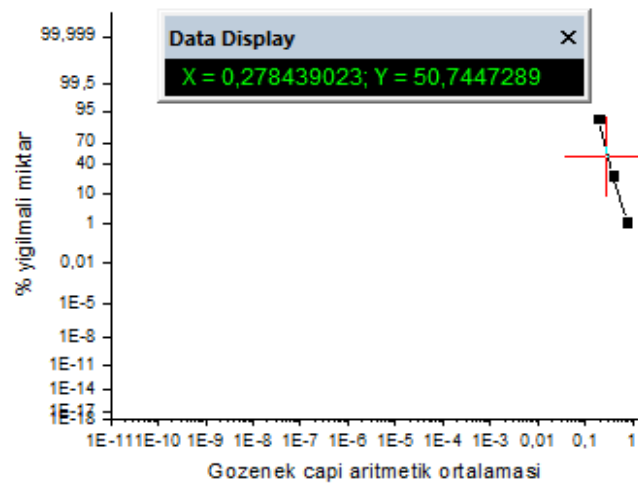
Şekil 3.31. F6 + İnhalac 120 (1:5 a/a) karışımı için yığılmalı partikül dağılım eğrisi



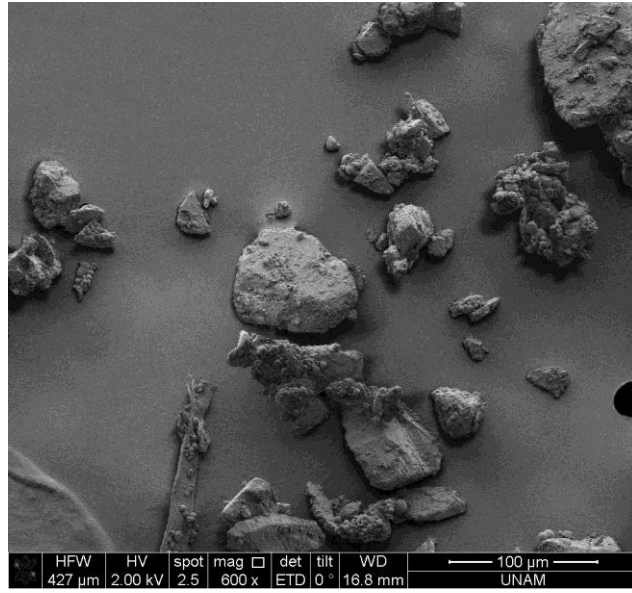
Şekil 3.32. F6 + İnhalac 120 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmali miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri



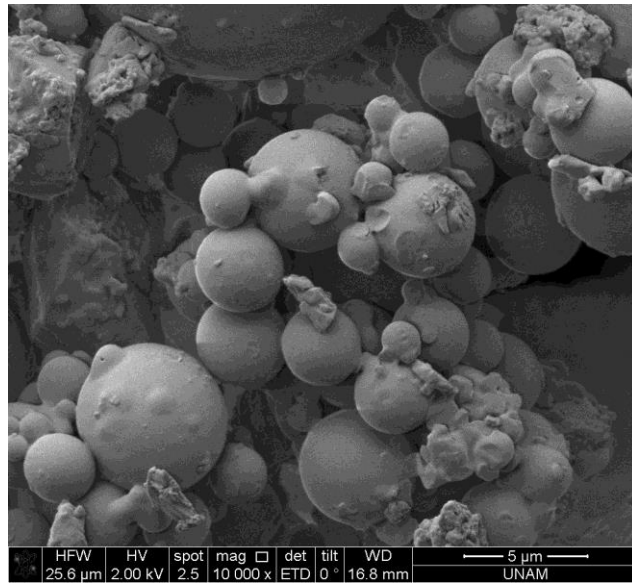
Şekil 3.33. F6 + İnhalac 230 (1:5 a/a) karışımı için yığılmali partikül dağılım eğrisi



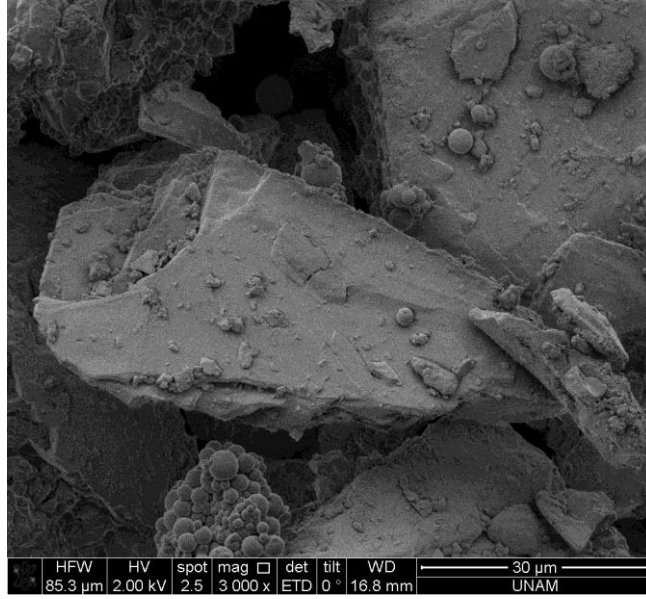
Şekil 3.34. F6 + İnhalac 230 (1:5 a/a) karışımı için olasılık skalasında % yığılmali miktar, logaritmik skalada partikül çapları bulunan grafik ve geometrik ortalama çap değeri



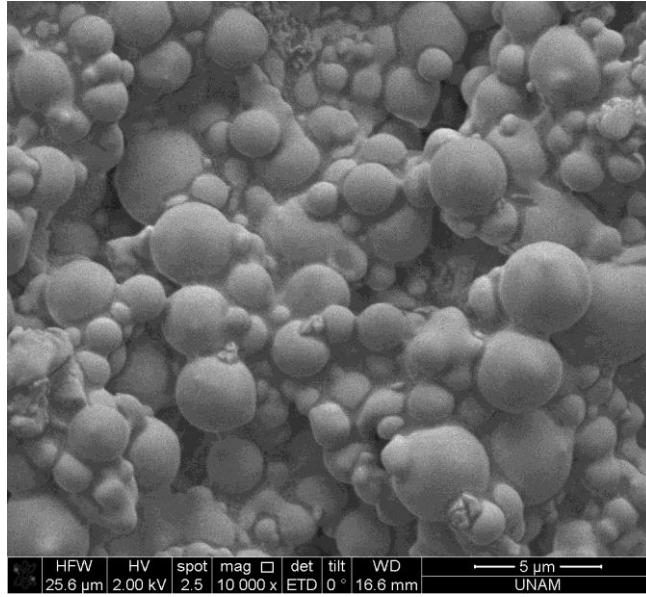
Şekil 3.35. F4 ve İnhalac 230 karışımına ait elek üstü toza ait SEM görüntüsü



Şekil 3.36. F4 ve İnhalac 230 karışımına ait elek altı toza ait SEM görüntüsü



Şekil 3.37. F6 ve İnhalac 230 karışımına ait elek üstü toza ait SEM görüntüsü



Şekil 3.38. F6 ve İnhalac 230 karışımına ait elek altı toza ait SEM görüntüsü

3.2.3.5. Mikropartiküllere ait Antimikrobiyal Aktivite Tayini Bulguları

F4 ve F6 formüllerine ait antimikrobiyal aktivite tayini Bölüm 2.5.10'da anlatılan yöntemle yapılmış, sonuçlar Çizelge 3.20'de verilmiştir.

Çizelge 3.20. F4 ve F6 formülasyonlarına ait antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları

	Standart çözelti*		F4 (Taze)	F4 (Bekletilmiş)	F6 (Taze)	F6 (Bekletilmiş)
Escherichia coli	Etkin madde konsantrasyonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu
	2 µg/ml	19 mm	-	-	-	-
	5 µg/ml	22 mm	-	12 mm	-	12 mm
	20 µg/ml	24 mm	16 mm	19 mm	16 mm	18 mm
	40 µg/ml	25 mm	17 mm	20 mm	19 mm	21 mm
	80 µg/ml	27 mm	20 mm	23 mm	20 mm	24 mm
Klebsiella pneumoniae	Etkin madde konsantrasyonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu
	2 µg/ml	19 mm	-	-	-	-
	5 µg/ml	20 mm	-	12 mm	-	13 mm
	20 µg/ml	24 mm	14 mm	18 mm	15 mm	18 mm
	40 µg/ml	26 mm	16 mm	19 mm	16 mm	21 mm
	80 µg/ml	28 mm	20 mm	22 mm	19 mm	23 mm
Pseudomonas aeruginosa	Etkin madde konsantrasyonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu	İnhibisyon zonu
	2 µg/ml	-	-	-	-	-
	5 µg/ml	11 mm	-	-	-	-
	20 µg/ml	15 mm	-	-	-	-
	40 µg/ml	21 mm	-	-	-	10 mm
	80 µg/ml	24 mm	-	10 mm	-	12 mm

*Levofloksasin hemihidrat çözeltisi

3.2.2.9. Mikropartiküllere ait Organik Çözücü Kalıntısı Tayini Bulguları

F4 ve F6 formülasyonlarında çözücü kalıntısı Bölüm 2.5.11'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Gaz kromatografisi sonuçlarına bakıldığında mikropartiküllerde n-hegzan kalıntısı bulunmadığı tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Akciğer enfeksiyonlarının oral veya paranteral tedavisindeki en büyük zorluk terapötik dozların yüksek olması ve bu nedenle yan etkilerinin artmasıdır. Bu nedenle çalışmamızda levofloksasin hemihidrat'ı inhalasyon yoluyla hedef bölgeye ulaştırmaya yönelik, polimerik mikropartiküler formda kuru toz formülasyonlarının hazırlanması amaçlanmıştır.

4.1. Etkin Maddeye ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda etkin madde olarak, florokinolon türevi antibakteriyel etkili bir madde olan levofloksasin hemihidrat kullanılmıştır. Miktar tayini işlemlerinde kullanılmak üzere, distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu için kalibrasyon doğrularına ait r^2 değerlerinin 1'e yakın, standart hata değerlerinin düşük olması, okunan absorbans değerlerinden hareketle elde edilen konsantrasyonların güvenilir olduğu anlamına gelmektedir (Çizelge 3.1). UV analizi ile elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon doğrularının validasyonu yapılmış, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik), teşhis ve tayin sınırı, doğrusallık parametreleri incelenmiştir. Miktar tayini yöntemi için yapılan doğruluk testinde elde edilen sonuçlara göre, % bağıl standart sapma değerleri % 2'den küçük olmalıdır. Buna göre veriler değerlendirilmiş ve doğruluk tespit edilmiştir (Çizelge 3.2-3.3). Kesinlik testlerinden, tekrarlanabilirlik verileri olan % bağıl sapma değerleri % 2'den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve uygun bulunmuştur (Çizelge 3.4-3.5). Teşhis sınırı ve tayin sınırları, miktar tayini için doğrusallık alt sınırının altında bulunmuştur (Çizelge 3.6-3.7). Doğrusallık ve aralığı hesaplamaları sonucunda doğrulara ait r^2 değerlerinin yüksek, regresyondan sapmanın standart hatasının düşük olması, elde edilen bulguların güvenilir olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.8).

Etkin maddenin özelliklerinin belirlenebilmesi için UV spektrumları (Şekil 3.3-3.4), FTIR spektrumu (Şekil 3.2b), DSC termogramı (Şekil 3.1) elde edilmiştir. Levofloksasin hemihidrat'ın DSC termogramında 235 °C'de görülen endotermik pik maddenin erime noktasını ifade etmekte olup, bu değer literatür bulgularıyla örtüşmektedir (Gevariya ve ark., 2011). FTIR analizinde 3500-3450 cm^{-1} (-COOH grubuna ait -OH), 1750-1700 cm^{-1} (C=O grubu), 2800-3000 cm^{-1} (aromatik C-H bağları), 1050-1000 cm^{-1} (C-F grubu) pikleri levofloksasin hemihidrat'a ait fonksiyonel grup pikleridir (Mouzam ve ark., 2011, Doodipala ve ark., 2011, Sahoo ve ark., 2012). Levofloksasin hemihidrat'ın çalışmamızda elde ettiğimiz

FTIR spektrumunda 1718 cm^{-1} civarında karbonil (C=O) grubu, 3242 cm^{-1} civarı karboksilik aside ait hidroksil (-OH) grubu, 1045 cm^{-1} civarı C-F bağları, $2801\text{-}2933\text{ cm}^{-1}$ civarında aromatik C-H bağlarına ait pikler görülmektedir.

4.2. Ön Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Hazırlanacak mikropartiküllere yönelik uygun üretim yönteminin seçimi için literatür araştırması yapılmış, bunun için formülasyonların pulmoner yolla uygulanacağı, belli bir partikül büyüklüğü aralığında olması gerektiği ve levofloksasin hemihidrat'ın suda çözünen bir etkin madde olması dikkate alınmıştır. Mikropartiküllerin üretimi için önce s/y/s ve k/y/s emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri denenmiştir (Perez ve ark., 2000). Literatürde levofloksasin ile yapılmış az sayıda mikropartikül çalışmasının bulunması nedeniyle polimer olarak polikaprolakton (PCL) kullanılmıştır. Hazırlanan formüllerde polimer miktarı, dış su fazın hacmi, dış su fazda kullanılan PVA konsantrasyonu gibi faktörler değiştirilmiş ve formülasyonlar partikül büyüklüğü ve etkin madde enkapsülasyon etkinliği açısından değerlendirilmiştir. Mikropartiküllerde yapılan mikroskop incelemeleri sonucu pulmoner yol ile uygulanabilecek uygun partikül büyüklüğüne sahip partiküller elde edilebilmekle birlikte, s/y/s ve k/y/s emülsiyon yöntemleriyle hazırlanan formülasyonlarda etkin maddenin suda çözünür olmasının, sekonder emülsiyon oluşumu sırasında etkin maddenin polimerik matristen dış sulu faza difüzyon eğilimi göstermesine neden olduğu, bu durum sonucunda hazırlanan mikropartikül formülasyonlarında etkin madde enkapsülasyon oranının düşük olduğu düşünülmüştür (Hombreiro ve ark., 2000, Jalil ve Nixon 1989). Bu nedenle tekrar literatür araştırmaları yapılarak, formülasyonun dış fazının su yerine yağ fazından oluştuğu s/y/y emülsiyon tipiyle formülasyon çalışmalarına devam edilmiştir (Lee ve ark., 2000, Maravajhala ve ark., 2009). Bu formülasyonlarda da kullanılan polimer miktarı değiştirilerek enkapsülasyon etkinliği değerlendirilmiştir. Ancak polimer olarak polikaprolakton kullanılan tüm formülasyonlarda, etkin maddenin enkapsülasyon oranının çok düşük (%0,09 - %5,08) olduğu görülmüştür.

Mikropartikül üretiminde kullanılan polimer tipi enkapsülasyon etkinliğini etkilemektedir. Bu nedenle enkapsülasyon etkinliğini artırabilmek için polimer değiştirme yoluna gidilmiştir. Bu nedenle ÖNF1 kodlu formülasyon, polimer olarak PCL yerine PLGA kullanılarak hazırlanmıştır. Organik çözücü olarak asetonitril kullanılmıştır. Polimer olarak PLGA'nın

kullanımı ile enkapsülasyon etkinliği %31,719'e yükselmiştir. PLGA ile hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği, önformülasyonlarda PCL kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan oldukça yüksek bulunmuştur. Enkapsülasyon etkinliğindeki bu artışın, PLGA'nın PCL'a göre hidrofilisitesinin daha yüksek olması ve levofloksasin hemihidrat suda iyi çözünen bir etkin madde olduğu için polimerdeki çözünürlüğünün de artmasına neden olduğu düşünülmektedir.

PLGA kullanılan formülasyonlarda polimer miktarı artışının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini görmek amacıyla ÖNF2'de PLGA miktarı 200 mg'a çıkarılmıştır. Polimerin artışı ile organik fazın viskozitesini yükseltmek, böylece etkin maddenin enkapsülasyonunu artırmak amaçlanmıştır (Song ve ark., 1997). Böylece levofloksasin hemihidrat'ın enkapsülasyon oranı %59,91'e yükselmiştir (Çizelge 3.9).

Bu sonuçlardan sonra mikropartikül formülasyonlarını oluşturmak için çalışmalara s/y/y tipi emülsiyon ile devam edilmesine, polimer olarak PLGA kullanılmasına karar verilmiştir. Polimer miktarı 200 mg olarak seçilmiştir. Mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan sürfaktanların özellikleri enkapsülasyon etkinliğini etkilemektedir (Hans ve Lowman, 2002). Bu nedenle hidrofilik ve lipofilik özellikleri göz önüne alınarak, iç su faz sürfaktanı olarak Tween, dış yağ faz sürfaktanı olarak Span eklenmesine karar verilmiştir. Sürfaktan konsantrasyonu ile birlikte enkapsülasyon oranı anlamlı şekilde değiştiğinden, farklı sürfaktanların formülasyon özelliklerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4.3. Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda levofloksasin içeren mikropartiküller, yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlayabilmek amacıyla Bölüm 2.4.3.1 ve Bölüm 2.4.3.2'de anlatıldığı şekilde, s/y/y tipi emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmıştır (Çizelge 2.3-2.4) (Mandal ve Tenjarla, 1996, Das ve Rao, 2006, Ciombor ve ark., 2006).

4.3.1. Organik fazın seçimi

Hazırladığımız emülsiyon tipinin oluşturulabilmesi için, dış yağ fazının kullanılan organik fazda çözünmemesi gerekmektedir (Badri ve ark., 1999). PLGA, aseton, asetonitril, etil asetat, tetrahidrofuran gibi organik çözücülerde çözünmektedir. Kullandığımız organik

çözücü olan asetonitril, diğer organik çözücülerden farklı olarak; polar özellikte olup suyla karışabilmekte, yağ ile karışmamaktadır. Etanol, metanol, etil asetat, aseton ve dimetilsülfoksit gibi diğer organik çözücüler ise yağ ile karışabilme özelliğine sahiptir (Quintanar ve ark., 1996).

4.3.2. Dış faz ortamının seçimi

Dispersiyon ortamı olarak, etkin maddemizi ve kullanmayı amaçladığımız polimerimizi (PLGA) çözmemesi, toksisitesinin düşük olması ve mikroküre yüzeyinden kolaylıkla temizlenebilmesi nedeniyle sıvı parafinin kullanılmasına karar verilmiştir (Donbrow, 1991, Bogataj ve ark., 2000).

4.3.3. Sürfaktan konsantrasyonlarının belirlenmesi

Mikropartikülleri hazırlarken kullanılan sürfaktanların mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü gibi formülasyon parametreleri üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Lee ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları çalışmaya göre, iç sulu fazda sürfaktan kullanılmayan formülasyonlarda mikropartiküllerde agregasyon gözlenmiş, Tween konsantrasyonunun %5'in üzerine çıktığı formülasyonlarda ise parçacıklar halinde agregasyonla ve damlacıkların şeklinde bozulma olmuştur. Çalışmada, dış fazda span kullanılmadan hazırlanan formülasyonlarda büyük mikropartiküllerde agregasyon görülmüş, span kullanılan formülasyonlarda ise verim yüksek olup mikropartiküllerin küresel şekle sahip olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle hazırlanan formülasyonlarda, yüksek HLB değerlerine sahip Tween 80, 60, 40, ve 20 iç su faza, düşük HLB değerlerine sahip Span 80, 60, 40 ve 20 ise dış yağ faza eklenmiştir. Kullanılan sürfaktanların her biri, %5'in altında 3 farklı konsantrasyonda (%0,5 , %1 ve %3 a/h) kullanılarak hazırlanmış ve sürfaktan oranlarının formülasyon özelliklerine etkileri incelenmiştir.

4.3.4. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Verilerinin Değerlendirilmesi

Mikropartiküllerin partikül büyüklük ve dağılımı analizi Bölüm 2.5.3'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır ve sonuçlar Çizelge 3.11'te ve grafikler Şekil 3.9'da verilmiştir. İç ve dış fazda kullanılan sürfaktanın tipi ve konsantrasyonu, partikül büyüklüğü ve dağılımını etkilemektedir (Mitchell ve ark.,1981).

Çalışmamızda iç sulu fazda kullanılan Tween konsantrasyonu arttıkça, mikropartiküllerin büyüklüğünde azalma görülmüştür. Khoee ve Yaghoobian (2009) isimli araştırmacılar, kullanılan sürfaktan miktarı arttıkça genellikle partikül büyüklüğünün azaldığını belirtmişlerdir.

Tween konsantrasyonu sabitken, dış yağ fazdaki Span konsantrasyonlarının artırıldığı formülasyonlarda, konsantrasyon arttıkça partikül büyüklüğünde artış görülmüştür. Yağ asidi zincirleri ile Span'ların etkileşim eğilimleri s/y tipi emülsiyonlardaki damlacık büyüklüklerini etkileyen bir parametredir (Palazolo ve Wagner, 2007). Emülsiyon damlacıkları oluşurken sürfaktan molekülleri damlacıklar arası yüzeylere adsorbe olmakta ve yeniden birleşmelerini önlemektedir. Span konsantrasyonunun artmasıyla birlikte dış yağ fazın viskozitesi artmakta ve buna bağlı olarak sürfaktanın ara yüzeylere adsorbsiyonu gecikmektedir (Jiao ve Burgess, 2003). Bu durum ise, çarpışan damlacıkların birleşmesine ve damlacık büyüklüğünün artmasına neden olmaktadır (Mohan ve Narsimhan, 1997, Shulz ve Daniels, 2000, Kolb ve ark.,2001, Narsimhan ve Goel, 2001, Tesch ve Schubert, 2002, Jafari ve Bhandari, 2007a, 2007b, 2007c).

İç ve dış fazda kullanılan Tween ve Span konsantrasyonları sabit tutularak, kullanılan sürfaktan tipinin partikül büyüklüğüne etkisi incelenmiştir. İç fazda Tween 80 kullanılarak hazırlanan F1-F3 kodlu formülasyonlar ile, Tween 60'ın kullanıldığı F4-F6 kodlu formülasyonlar karşılaştırıldığında iç fazda Tween 80 yerine Tween 60'ın kullanılması partikül büyüklüğünde azalmaya neden olmuştur. Bunun nedeninin, Tween 60'ın hidrofobik zincirinin daha kısa olması olduğu düşünülmektedir (Khoee ve Yaghoobian, 2009, Azizi ve ark., 2013). Bununla birlikte Tween 40 ve Tween 20 ile hazırlanan formülasyonlarda partikül büyüklüğünde belirgin bir azalma gözlenmemiştir. Dış fazda kullanılan Span tiplerinin partikül büyüklüğüne etkisi incelendiğinde Span 40, 60 ve 80 ile hazırlanan formülasyonlarda, artan HLB değeriyle beraber partikül büyüklüğü artmıştır. Ancak Span 20 ile hazırlanan formülasyonlarda partikül büyüklüğünde bir miktar azalma görülmüştür.

Mikropartiküllerin büyüklük dağılımının bir göstergesi olarak span değerleri hesaplanmış ve partikül büyüklüğü dağılımı grafikleriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

4.4.4. Mikroskop görüntülerinin değerlendirilmesi

Tüm formülasyonların optik mikroskop görüntülerinde formülasyonların küresel morfolojik yapıya sahip oldukları görülmektedir (Şekil 3.10).

4.4.5. Enkapsülasyon Etkinliği Verilerinin Değerlendirilmesi

Kullanılan sürfaktanın tipi, enkapsülasyon etkinliğini değiştiren faktörlerden biridir. Çizelge 3.12'de Span konsantrasyonu sabitken iç fazdaki Tween konsantrasyonu artırılan formülasyonlarda, Tween konsantrasyonundaki artışla birlikte enkapsülasyon oranında artış görülmüştür. Enkapsülasyonun artışı, etkin maddenin iç su fazda büyük oranda hapsedilebildiğinin göstergesidir. Tween'in iç fazda sürfaktan olarak kullanılmasıyla hidrofilik bir ortam yaratılmış ve böylece etkin maddenin iç fazda kalışı artırılmıştır. Bunun muhtemel nedeni, sürfaktanın polar gruplarının (hidroksil grupları) su-yag fazları arayüzeyinde etkin maddenin fonksiyonel gruplarıyla oluşturduğu etkileşim olarak açıklanabilir. Aynı parametreler düşünüldüğünde, bu durumun partikül büyüklüğünü azaltıp enkapsülasyon etkinliğini artırması beklenen bir sonuçtur (Khoee ve Yaghoobian, 2009).

Çizelge 3.13'da iç fazdaki Tween konsantrasyonu sabitken, dış fazdaki Span miktarı arttıkça etkin madde enkapsülasyon oranı düşmüştür. Hazırladığımız formülasyonlarda yağ fazında artan Span konsantrasyonu ile beraber enkapsülasyonun düşmesinin nedeni, asetonitril ve sıvı parafinin karışabilirliğinin de artması, bunun da etkin maddenin dış faza sızma eğilimini artırması olabilir (Khoee ve Yaghoobian, 2009, Azizi ve ark., 2013). Ayrıca Span konsantrasyonunun artmasıyla ortamın lipofilitesinin artması, hidrofilik etkin maddenin iç su fazda kalışının azalmasına neden olabilir (Narang ve ark., 2007). Span konsantrasyonu ile birlikte viskozitenin arttığı, bu nedenle emülsiyondaki damlacıkların büyüklüğünün arttığı ve bu durumun mikropartiküllerin katılaşmasının yavaşlamasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu süre içinde de mikropartiküllerden dışarı etkin madde difüzyonu olmuş, buna bağlı olarak etkin madde enkapsülasyon oranı düşmüştür (Jiao ve Burgess, 2003, Das ve Ramarao, 2007).

İç ve dış fazda kullanılan Tween ve Span konsantrasyonları sabit tutularak, kullanılan sürfaktan tipinin enkapsülasyon etkinliğine etkisi incelenmiştir. İç fazda Tween 80 kullanılarak hazırlanan F1-F2-F3 kodlu formülasyonlar ile, Tween 60'ın kullanıldığı F4-F5-F6 kodlu formülasyonlar karşılaştırıldığında iç fazda Tween 80 yerine Tween 60'ın kullanılması

enkapsülasyon etkinliğinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte Tween 40 ve Tween 20 ile hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliğinde bir miktar azalma gözlenmiştir. Dış fazda kullanılan Span tiplerinin enkapsülasyon etkinliğine etkisi incelendiğinde, aralarında en yüksek yükleme etkinliğinin Span 60 ile hazırlanan F15 formülasyonuna ait olduğu belirlenmiştir. Dış fazda kullanılan Span konsantrasyonu sabit tutularak enkapsülasyon etkinlikleri karşılaştırıldığında, Span tipi ile enkapsülasyon etkinliği arasında korelasyon belirlenememiştir.

4.4.6. Üretim Verimi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan s/y/y tipi emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle yüksek imalat verimi (%71-85) elde edilmiştir (Çizelge 3.14-3.15).

4.4.7. İn-vitro Etkin Madde Çıkış Deneylerinin Değerlendirilmesi

Formülasyonlara ait in-vitro etkin madde çıkış deneyleri Bölüm 2.5.8.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlarda kullanılan farklı sürfaktan tipi ve konsantrasyonlarının, mikropartiküllerden etkin madde çıkış hızlarına etkisine ait grafikler Şekil 3.11-3.12-3.13-3.14-3.15-3.16-3.17-3.18'de verilmiştir. Kullanılan sürfaktan tipleri ve konsantrasyonlarına göre etkin madde çıkış hızlarının incelenmesi, f_1 (fark faktörü) ve f_2 (benzerlik faktörü) değerleri hesaplanarak yapılmıştır.

Kullanılan Tween konsantrasyonlarına bağlı olarak, mikropartiküllerden etkin madde çıkış hızlarındaki değişim değerlendirilmiştir. Tween 80 kullanılarak hazırlanan F1 (%0,5 a/h) ve F2 (%1 a/h) formüllerine ait etkin madde çıkış profilleri benzer bulunmuş (f_1 : 11,57 ve f_2 : 99,93), ancak F3 (%3 a/h) formülasyonuna ait çıkış hızının daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Tween 60 kullanılarak hazırlanan formüllerden F4 (%0,5 a/h) ve F5 (%1 a/h) formüllerine ait etkin madde çıkış profilleri benzer bulunmuş (f_1 : 14,79 ve f_2 : 99,95), F6 (%3 a/h) formülasyonuna ait etkin madde çıkışının daha fazla olduğu görülmüştür. Tween 40 kullanılarak hazırlanan formüllerden F7 (%0,5 a/h) ve F9 (%3 a/h) formüllerine ait etkin madde çıkış profilleri benzer bulunmuş (f_1 : 0,68 ve f_2 : 99,99), F8 (%1 a/h) formülasyonunda ise etkin madde çıkışı biraz daha fazla olmuştur. Tween 20 kullanılan formülasyonlarda da etkin madde çıkış hızları ile sürfaktan konsantrasyonu arasında bir korelasyon bulunmadığı görülmüştür. Ancak açığa çıkan etkin madde oranına bakıldığında, Tween 20 kullanılan formülasyonlarda en yüksek olduğu görülmektedir.

Tween 20'nin etkin madde çıkış oranının en yüksek olmasının nedeni, kullanılan sürfaktanlar içerisinde en yüksek HLB değerine (16,7) sahip olması, böylece ortam hidrofilitasını artırarak etkin maddenin tampon çözeltiye difüzyonunu kolaylaştırması olabilir (Nokhodchi, 2002, Bolourtchian ve ark., 2010). Efentakis ve arkadaşlarının (1990) yaptığı çalışmada, Tween'in mikropartiküllerle çözünme ortamı arasındaki yüzey gerilimini azalttığı ve ortamın matrikse penetrasyon miktarını ve hızını artırdığı belirtilmiştir.

Tween konsantrasyonu sabit tutularak, tiplerine bağlı olarak mikropartiküllerden etkin madde çıkış profillerindeki değişim değerlendirilmiştir. Bunun için aynı konsantrasyonda Tween 80, 60, 40 ve 20 kullanılan formülasyonların etkin madde çıkış hızları karşılaştırılmıştır. %0,5 (a/h) konsantrasyonda Tween kullanılan formülasyonların salım profilleri incelendiğinde, Tween 60 ve 40 kullanılan formüllerin salım profilleri arasında (f_1 : 12,98 ve f_2 : 98,77) ve Tween 20 ve 80 kullanılan formüllerin salım profilleri arasında benzerlik (f_1 : 13,94 ve f_2 : 94,94) bulunmuştur. %1 ve %3 (a/h) konsantrasyonlarda Tween içeren formülasyonların çıkış profilleri incelendiğinde de, %1 (a/h) konsantrasyonda en yüksek çıkış F11 formülasyonunda (Tween 20), %3 (a/h) konsantrasyonda ise en yüksek çıkış hızı F6 (Tween 60) formülasyonunda bulunmuştur. Formülasyonlarda kullanılan farklı Span konsantrasyonlarının, mikropartiküllerden etkin madde çıkış hızlarına etkisi incelenmiştir. Span 80 kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda, etkin madde çıkış hızı F13 (%0,5 a/h) formülasyonunda en yüksek, F14 (%3 a/h) formülasyonunda ise en düşüktür. Span 60 kullanılarak hazırlanan F16 (%1 a/h) ve F17 (%3 a/h) formüllerine ait etkin madde çıkış profilleri benzer bulunmuş (f_1 : 2,56 ve f_2 : 99,98), ancak F15 (%0,5 a/h) formülasyonuna ait çıkış hızı daha düşük bulunmuştur. Span 40 kullanılarak hazırlanan F18 (%0,5 a/h) ve F20 (%3 a/h) formülasyonlarına ait etkin madde salım profilleri benzer bulunmuş (f_1 : 4,68 ve f_2 : 99,97), ancak F19 (%1 a/h) formülasyonunda çıkış hızı daha yüksek olmuştur. Span 20 kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda ise etkin madde çıkış hızlarının sürfaktan konsantrasyonu ile birlikte değiştiği tespit edilmiş, ancak aralarında konsantrasyona bağlı bir korelasyon bulunmadığı görülmüştür. Levofloksasinin suda çözünen bir etkin madde olduğu gözönüne alındığında, kullanılan Span konsantrasyonu arttıkça, formülasyonun lipofilite özelliğinin artmakta, dolayısıyla ıslanabilme özelliğinin azalmaktadır. Bu nedenle etkin maddenin sulu ortama difüzyonunu azalabilmektedir (Abd-Elbary ve ark., 2013). Span 80 (HLB = 4,3) kullanılan formülasyonlarda bu durum gözlenmiş olup, diğer formülasyonlarda çözünme hızı ile Span konsantrasyonuna arasında bir korelasyon görülmemiştir.

Bolourtchian ve arkadaşlarının (2010) yaptığı araştırmada, formülasyonlarda farklı konsantrasyonlarda Span kullanımının, fosfat tamponuna etkin madde çıkış hızında genellikle etkili olmadığı belirtilmiştir. Bunun nedeni suda çözünürlük ve ıslanabilme özelliğinin düşük olmasıdır.

Span konsantrasyonu sabitken, tiplerine bağlı olarak mikropartiküllerden etkin madde çıkış profillerindeki değişim değerlendirilmiştir. Bunun için aynı konsantrasyonda Span 80, 60, 40 ve 20 kullanılan formülasyonların etkin madde çıkış hızları karşılaştırılmıştır. %0,5 (a/h) konsantrasyonda Span kullanılan formülasyonların salım profilleri incelendiğinde, Span 60 ve 80 kullanılan formüllerin salım profilleri arasında (f_1 : 5,88 ve f_2 : 92,85), % 1 (a/h) konsantrasyonda Span kullanılan formülasyonların salım profilleri incelendiğinde, Span 40 ve 60 kullanılan formüllerin salım profilleri arasında (f_1 : 11,96 ve f_2 : 90,75), % 3 (a/h) konsantrasyonda Span kullanılan formülasyonların salım profilleri incelendiğinde, Span 40 ve 60 kullanılan formüllerin salım profilleri (f_1 : 12,09 ve f_2 : 90,44) benzer bulunmuştur.

Kullanılan sürfaktanların hidrofilite veya lipofilitesi, etkin madde çıkış hızı ve miktarı üzerinde etkili olup (Habib ve Mesue, 1995), formülasyonun HLB dengesinin sağlanması, optimum çözünme hızı profilinin sağlanmasında önemlidir (Mohammadi-Samani ve Boostanian, 2010).

Tüm formülasyonların 24 saatlik etkin madde çıkış profilleri incelenmiştir. Yüksek enkapsülasyon etkinliği ve ilk salım hızının düşük olması, suda çözünen etkin maddelerin sürekli salım preparatlarının üretilmesi için en önemli parametrelerdir. Hazırladığımız mikropartiküllerin in-vitro çıkış deneylerinde etkin maddenin ilk çıkış hızı (Burst effect) yüksek olmuş, çıkış hızı 8. saatten sonra ise azalmıştır. İlk çıkış etkisinin, hidrofilik özellikteki etkin maddenin mikropartiküllerin yüzeyinde tutunmasının yanı sıra, poröz kanallara sahip mikropartiküler yapıdan hızla difüzyonuna bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmüştür (Das ve Ramarao, 2007, Maravajhala ve ark., 2009). Formülasyonların çoğunda 8. saatten sonra etkin madde çıkışı olmamış veya çok az olmuştur. Habib ve Mesue'nin yaptığı çalışmada (1995), hazırlanan formülasyonda Span kullanımı, etkin maddenin çıkış hızında gecikmeye neden olmuştur. Bu durum, sürfaktanın çözünme ortamında az çözünmesi ve lipofilitesi nedeniyle ortamın matrise penetrasyon hızı düşmesi, böylece etkin madde çıkışının azalması olarak açıklanmıştır.

4.4.8. Uygun Özelliğe Sahip Formülasyonların Seçimi

Hazırlanan 23 adet mikropartikül formülasyonu, partikül büyüklüğü ve etkin madde enkapsülasyon etkinliği kriterlerine göre değerlendirilerek uygun formülasyonlar seçilmiştir. Mikropartiküllerin, akciğerin alt bölgelerine ulaşması hedeflendiği için, F6 ($5,59 \pm 0,54$) formülasyonu partikül büyüklüğü bakımından uygun bulunmuştur (Çizelge 3.11). Formülasyonlar arasında en yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlayan formülasyon ise F4 ($\%89,47 \pm 0,014$) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.12). Çalışmanın devamında, seçilen formülasyonlar üzerinde SEM görüntülemesi, etkin madde çıkış kinetiklerinin hesaplanması, laktozlarla (İnhalac 70, 120, 230) fiziksel karışımlarının hazırlanması, aerodinamik özelliklerinin incelenmesi ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.4.9. Polimer-Etkin Madde Etkileşimi Bulgularının Değerlendirilmesi

4.4.9.1. DSC Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

Etkin madde ve polimer etkileşiminin incelenmesi amacıyla F4 ve F6 formülasyonları ile PLGA'nın DSC termogramları alınmış (Şekil 3.19) ve etkin maddenin termogramı ile (Şekil 3.1) karşılaştırılmıştır. Etkin madde 235 °C'de kristal formda endotermik pik vermiştir. F4 ve F6 formülasyonlarına ait termogramda 45 °C civarında polimere ait pik gözlenmekte ancak etkin madde piki görülmemektedir. Bunun nedeni etkin maddenin amorf yapıya dönüşmesi veya katı dispersiyon şeklinde polimer içerisine hapsolması olarak açıklanabilir (Dillen ve ark., 2004, Sant ve ark., 2005, Salah, 2013).

4.4.9.2. FTIR Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

Mikropartiküllerin hazırlanma yönteminin etkin maddenin yapısında herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığının tespit edilmesi için F4 ve F6 formülasyonlarının FTIR spektrumları alınmış (Şekil 3.21-3.22) ve etkin maddenin spektrumu ile (Şekil 3.2b) karşılaştırılmıştır. F4 ve F6 formülasyonlarının FTIR spektrumlarına bakıldığında levofloksasin hemihidrat'a ait 1750 cm^{-1} civarında karbonil (C=O) grubu, $2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ arasında aromatik C-H bağları,

1000-1100 cm^{-1} (C-F grubu) pikleri görülmektedir. Buna göre etkin maddenin formülasyonlarda yapısal bir değişikliğe uğramadığı söylenebilmektedir.

4.4.10. Çözünme Hızı Kinetikleri Bulgularının Değerlendirilmesi

Seçilmiş F4 ve F6 formülasyonlarına ait çözünme hızı kinetikleri verileri ise Çizelge 3.16'de verilmiştir. Kinetiklere ait r^2 değerlerine bakıldığında, formüllerin en yüksek r^2 değerleriyle (F4: 0,957, F6: 0,993) Higuchi kinetiğine uyum gösterdiği görülmüştür. Higuchi, kontrollü salım yapan katı matrisler içinde disperse edilmiş etkin maddelerin salım modelini ifade etmekte olup, etkin madde salımının difüzyon kontrollü olduğu anlamına gelmektedir.

4.4.11. SEM görüntülerinin değerlendirilmesi

Seçilen F4 ve F6 formülasyonlarının SEM görüntülerinde düzgün küresel yapıdaki mikropartikülleri görülmektedir (Şekil 3.19a-3.19b).

4.4.12. Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda uygun partikül büyüklükleri ve enkapsülasyon oranlarına sahip formülasyonlar olan F4 ve F6 üzerinde Bölüm 2.5.9.2'de anlatıldığı gibi teorik kütleli ortalama aerodinamik çap (KOAÇt) tayini yapılmıştır.

KOAÇt, partiküllerin akciğerdeki dağılım ve tutulumunu etkileyen önemli bir parametredir. Sıkıştırılmış dansite, partiküllerin inhalasyon cihazından dışarı verilebilme özelliğini etkilemekte, poroziteleri, büyüklük dağılımları, dansiteleri ve partiküllerarası kohezif ve adhezif kuvvetlerle ilgili bilgi vermektedir (Devrim ve ark., 2011).

Mikropartiküller kuru toz inhalerde tek başına kullanılmasının aerolize olabilmesi için yeterli olmadığı, partiküllerin zayıf akış ve agregasyon gösterdiği belirtilmiştir (Sivadas ve ark., 2008). Bu nedenle mikropartiküllerin akış özelliğini düzeltmek, inhalasyon için uygun hale getirmek için uygun taşıyıcı yardımcı maddeye ihtiyaç olduğu düşünülmüştür. Çalışmamızda bunun için, piyasada hazır bulunan, farklı partikül büyüklüklerine sahip laktozlar (İnhalac 70, Inhalac 120 ve Inhalac 230) kullanılmıştır.

F4 ve F6 formüllerine ve formüllerin İnhalac 70, İnhalac 120 ve İnhalac 230 ile yapılan fiziksel karışımlarının aerodinamik davranışı hakkında fikir edinmek amaçlanmıştır. Bölüm 3.2.2.7.2'de anlatıldığı gibi yapılan KOAÇt hesaplamaları için, toz karışımların elek analizi ile hesaplanan geometrik ortalama çap verileri (Şekil 3.24-3.26-3.28-3.30-3.32-3.34) ile sıkıştırılmış dansite verilerinden (Çizelge 3.17-3.18) yararlanılmıştır. Yapılan hesaplamalara göre, F4 ve F6 formülasyonlarının, akciğerin alt bölgelerine ulaşma açısından uygun KOAÇt değerlerine (F4: 9,273 μm ve F6: 4,006 μm) sahip olduğu görülmüştür. Bu değerler, hazırlanan formüllerin akciğerin alt bölümlerinde tutulabileceği fikrini vermektedir. F4 ve F6 formülasyonlarının İnhalac'lar ile yapılan fiziksel karışımlarının ise formülasyonlardan daha düşük KOAÇt değerine sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.19). 5 μm 'den daha düşük KOAÇt değerleri, akciğerin respiratuvar bölgesinde tutulum sağlanabileceğini göstermektedir. Buna göre, hazırlanan formüllerin laktoz yardımıyla akış ve aerodinamik davranışın iyileştirildiği sonucuna varılmıştır.

Kuru toz formüller inhale edildiğinde, taşıyıcı maddenin (laktoz) daha büyük partiküllere sahip olduğu için ağız ve farenkste kalması, etkin maddeyi taşıyan mikropartiküllerin ise laktozdan ayrılarak alt pulmoner bölgelere geçmesi istenmektedir. Hazırladığımız formüllerin laktozdan ayrılabilme özelliğini değerlendirebilmek için, F4:İnhalac 230 ve F6:İnhalac 230 karışımlarının elek analizinde elde edilen elek üstü ve elek altı örnekleri SEM aracılığı ile görüntülenmiştir (Şekil 3.35-3.36-3.37-3.38). SEM görüntülerine bakıldığında, İnhalac 230'un çoğunlukla elek üstünde (Şekil 3.35-3.37), F4 ve F6 formüllerine ait mikropartiküllerin ise elek altında (Şekil 3.36-3.38) yoğun şekilde bulunduğu görülmektedir. Buna göre, laktozun ve formülasyonun birbirinden kolayca ayrılabilirdiği sonucuna varılmıştır.

4.4.13. Antimikrobiyal Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi

F4 ve F6 formülasyonlarının antimikrobiyal aktivite tayini Bölüm 2.5.10'da belirtildiği gibi yapılmış, sonuçlar Çizelge 3.20'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, hazırlanan mikropartiküllerin akciğer enfeksiyonuna neden olan bakterilerden *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı etkin olduğu görülmüştür (Fu ve ark., 1992).

F4 ve F6 formüllerine ait örneklerden bir kısmı bekletilmeden, bir kısmı ise 48 saat dispersiyon halinde bekletildikten sonra uygulanmıştır. *Escherichia coli* ve *Klebsiella*

pneumoniae için bekletilmeden uygulanan F4 ve F6 kodlu formülasyonlar 20-80 µg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite gösterirken 48 saat bekletilen mikropartikül dispersiyonları uygulandığında 5 µg/ml levofloksasin hemihidrat içeren mikropartiküllerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür. F4 ve F6 formüllerinin inhibisyon çapları karşılaştırıldığında aralarında fark görülmemektedir. Her iki formülasyonun da antimikrobiyal etkinliklerinde 48 saat bekletildikten sonra artış gözlenmiştir. Pseudomonas aeruginosa için saf levofloksasin 5-80 µg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite gösterirken, F4 ve F6 kodlu mikropartiküller 48 saat bekletildikten sonra uygulandığında ancak 80 µg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Mikropartiküllerin içerdiği etkin madde miktarı arttıkça inhibisyon çapının artması, antimikrobiyal aktivitenin de arttığını göstermektedir. 48 saat bekletilen örneklerin inhibisyon çaplarının daha geniş olması, etkin maddenin o süre boyunca ortam sıvısına çıkışının devam etmesi ve ortamdaki konsantrasyonunun artmasından kaynaklanmaktadır. F4 ve F6 formüllerine ait antimikrobiyal aktivite gösterdikleri konsantrasyon, levofloksasin hemihidrat için literatürlerde belirtilen minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleriyle uyumlu bulunmuştur (Fu ve ark., 1992).

4.4.13. Organik Çözücü Kalıntısı Tayini Bulgularının Değerlendirilmesi

F4 ve F6 formülasyonları için organik çözücü kalıntı tayini Bölüm 2.5.11'deki gibi yapılmıştır. Formülasyonlarımızda kullandığımız n-hegzan gibi insan sağlığı için toksik özellikte olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu çözücülerin, hazırlanan ürünlerde bulunabilecek miktarları sınırlandırılmıştır. Bu sınır n-hegzan için 290 ppm'dir (USP 30, 2007). Gaz kromatografisi analizinde alınan sonuçlara göre, hazırladığımız mikropartiküllerde n-hegzan kalıntısına rastlanmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan florokinolonlar grubundan bir antibiyotik olan Levofloksasin hemihidrat'ın pulmoner yolla uygulanmak üzere kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Oral verilisin sistemik yan etkilerini ve pulmoner yolla ilaç verilisinin avantajlarını gözönüne alarak levofloksasinin alt pulmoner bölgeye taşınması ve ilgili bölgede yeterli terapötik konsantrasyonun oluşturulabilmesi hedeflenmiştir.

Kullanılan yöntem ve formülasyon değişkenlerinin hazırlanan mikropartiküllerin özelliklerine etkileri incelenmiştir. Değişen formülasyon parametrelerinin, partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliğini etkilediği tespit edilmiştir. Formülasyonların SEM görüntüleri alınmış ve düzgün küresel partiküller elde edildiği görülmüştür. Formülasyonların üretim verimi yüksek bulunmuş, polimer olarak PLGA kullanılan formülasyonlarda yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir. Çözünme hızı deneylerinde, ilk 8 saatten sonra etkin madde çıkışının çok yavaş olduğu gözlenmiştir.

Hazırlanan mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklükleri göz önüne alınarak seçilen F4 ve F6 kodlu formülasyonların, hazır laktoz preparatları (İnhalac 70, 120, 230) ile karışımları hazırlanmıştır. Bu işlemin amacı toz formülasyonları inhalasyona uygun hale getirmek amacıyla akış özelliklerini iyileştirmektir. Elde edilen karışımların sıkıştırılmış dansite ve elek analizleri yapılmış, KOAÇt değerleri hesaplanmıştır. Partiküllerin KOAÇt değerlerine bakılarak, akciğerin respiratuvar bölgesinde tutulumu için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. F4 ve F6 formülasyonlarının antimikrobiyal aktivite tayini yapıldığında, levofloksasin hemihidrat'ın etkin olduğu mikroorganizmalara karşı aktivitesinin bulunduğu gözlenmiştir. Mikropartiküllerde organik solvan kalıntısı bulunmadığı tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, levofloksasin hemihidrat'ın pulmoner yolla uygulamaya uygun, kuru toz mikropartiküler formülasyonlarının başarılı bir şekilde geliştirildiği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Levofloksasinin Pulmoner Yolla Uygulanmak Üzere Mikropartiküler Kuru Toz İnhaler Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı, solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan florokinolonlar grubundan bir antibiyotik olan Levofloksasin hemihidrat'ın pulmoner yolla uygulanmak üzere kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesidir.

Antibiyotiklerin yüksek dozda sistemik uygulanmasının çeşitli istenmeyen yan etkilere olması, akciğeri direkt hedef alan ve böylece sistemik etkiyi minimum düzeye çekebilecek bir tedavi yöntemine ihtiyaç doğurmuştur. Akciğerlerin, geniş yüzey alanı, ince epitel tabakası, yüksek damarlanma ağı ve ilk geçiş etkisini elimine edilebilmesi gibi, hem lokal hem sistemik tedaviler açısından avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, levofloksasin hemihidrat'ın, mikropartiküler sistemlerini içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Mikropartiküler formülasyonlar çoklu emülsiyon tekniği ile hazırlanmıştır. Formülasyonlarda kullanılmak üzere seçilmiş olan polimerler biyouyumlu olduğu ve toksik olmadığı bilinen PLGA (poli(laktik-ko-glikolik asit) ve PCL (polikaprolakton) kullanılmıştır.

Mikropartikül formülasyonlarında polimer tipi, oranları ve miktarı, organik çözücü hacmi, dış su faz hacmi, organik faza ve dış faza eklenen yardımcı maddelerin, partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinlikleri, ürün verimi, etkin madde salım profilleri özelliklerine etkisi incelenmiştir. Bulgulara göre F4 ve F6 uygun bulunmuş ve çalışmalara bu formüllerle devam edilmiştir. Seçilen formülasyonların inhalasyonla taşınmasını sağlamak için İnhalac 70, İnhalac 120 ve İnhalac 230 ile belli oranlara fiziksel karışımları hazırlanmış ve mikropartiküllerin aerodinamik özelliklerine etkisi incelenmiştir. Kullanılan yardımcı maddelerin mikropartiküllerin agregasyonunu önlediği ve aerodinamik özelliklerini iyileştirdiği tespit edilmiştir.

Seçilen mikropartiküler formülasyonlar üzerinde antimikrobiyal aktivite tayini yapılmış ve formülasyonların mikroorganizmalara karşı aktif olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda edilen sonuçlar, Levofloksasin hemihidrat'ın inhalasyona yönelik uygun özelliklerde mikropartiküler formülasyonlarının hazırlandığı sonucunu vermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kuru toz inhaler, levofloksasin hemihidrat, mikropartikül

SUMMARY

Development and Evaluation of Dry Powder Inhaler Formulations that Comprising Microparticular Drug Delivery Systems for Administration by Pulmonary Route.

The aim of this work is to develop a dry powder inhaler formulations of lexofloxacin hemihydrate, which is one of the fluoroquinolones used for the treatment of respiratory tract infections.

High doses of antibiotics have various undesirable side effects of systemic administration, so a need arised for treatments for targeting the lungs directly for reducing systemic side effects. The lung has some advantages in both local and systemic therapies, like large surface area, thin epithelial layer, high bioavailability, and high first-pass effect can be eliminated. Therefore, in our study, levofloxacin hemihydrate dry powder inhaler formulations had planned to be developed for pulmonary route.

Microparticle formulations were prepared by multiple emulsion technique. Polymers that used for microparticle formulations are PLGA (poly (lactic-co-glycolic acid)), and PCL (polycaprolactone), which were known as biocompatible and non-toxic.

The effect of polymer type, ratio and amount of the organic solvent volume, external water phase volume, excipients that added to the external phase and organic phase, particle size and distribution, encapsulation efficiency, product yield, drug release profile, to microparticle properties was investigated. According to the results, F4 and F6 has been choosen as optimal formulations. In order to improve aerodynamic properties and prevent aggregation of microparticles, a physical mixture of selected formulations was prepared with Inhalac 70, Inhalac 120 and Inhalac 230.

Determination of antimicrobial activity on the selected microparticle formulations was investigated. As result, the formulations have animicrobial effiency against tested microorganisms.

The results obtained in our study showed that Levofloxacin hemihydrate microparticles with appropriate specifications were prepared.

Keywords: Dry powder inhaler, levofloxacin hemihydrate, microparticles

KAYNAKLAR

- ABD-ELBARY, A., TADROS, M. I., & ALAA-ELDİN, A. A. (2013). Sucrose stearate-enriched lipid matrix tablets of etodolac: modulation of drug release, diffusional modeling and structure elucidation studies. *AAPS PharmSciTech*, 14(2), 656-668.
- AFTABROUCHAD, E. DOELKER (1992), Méthodes de preparation des microparticules biodegradables charge'es en principes actifs hydrosolubles, S.T.P. Pharma Sci. 2 365 – 380.
- AJİOKA, M.; ENOMOTO, K.; SUZUKİ, K.; YAMAGUCHİ, A. (1995) The basic properties of poly(lactic acid) produced by the direct condensation polymerization of lactic-acid. *J. Environ. Polym. Degrad.*, 3, 225–234.
- AJİOKA, M.; SUİZU, H.; HİGUCHİ, C.; KASHİMA, T. (1998) Aliphatic polyesters and their copolymers synthesized through direct condensation polymerization. *Polym. Degrad. Stab.* 59, 137–143.
- ARSHADY, R. (1990). Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques Part II: Coacervation. *Polymer Engineering & Science*, 30(15), 905-914.
- AZİZİ, M., FARAHMANDGHAVİ, F., JOGHATAEİ, M., ZANDİ, M., IMANİ, M., BAKHTİARY, M., GHAZİZADEH, F. (2013). Fabrication of protein-loaded PLGA nanoparticles: effect of selected formulation variables on particle size and release profile. *Journal of Polymer Research*, 20(4), 1-14.
- BADRİ VN, THOMAS PA, PANDİT JK, KULKARNİ MG, MASHELKAR RA (1999). Preparation of non-porous microspheres with high entrapment of proteins by a (water-in-oil)-in-oil emulsion technique. *J Control Release* 58:9–20.
- BARCLAY ML, BEGG EJ. (1994). Aminoglycoside toxicity and relation to dose regimen. *Adverse Drug React Toxicol Rev*, 13(4):207–34.
- BASHOFF, E.C. AND BEASER, R.S. (1995) Insulin therapy and basis for therapy. Marcel Dekker, New York, pp. 385–415. the reluctant patient. Overcoming obstacles to success. *Postgrad. Med.* 97, 86–90.
- BOGATAJ, M., MRHAR, A., GRABNAR, I., RAJTMAN, Z., BUKOVEC, P., & SRCİC, S. (2000). The influence of magnesium stearate on the characteristics of mucoadhesive microspheres. *Journal of microencapsulation*, 17(4), 499-508.
- BOLOURTCHİAN, NOUSHİN; SATTARİ JAVİD, F.; DADASHZADEH, SİMİN (2010) The effect of various surfactants on release behavior of procainamide HCl from ethylcellulose based matrices. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13-19.
- BOİSSOU, C., ROUSE, J. J., PRİCE, R., VAN DER WALLE, C. F. (2006). The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm. Res.* 23(6): 1295-1305.
- CİOMBOR D.M.C.K., JAKLENEC A., LİU A.Z., THANOS C., RAHMAN N., WESTON P., AARON R., MATHİOWİTZ E. (2006) Encapsulation of BSA using a modified W/O/O emulsion solvent removal method. *J. Microencapsul.* 23(2):183–194
- CİPOLLÀ, H.-K. CHAN (2013). Inhaled antibiotics to treat lung infection, *Pharm. Patent Anal.* 2 647–663.

- CLARK, A.R., (1995) The use of laser diffraction for the evaluation of aerosol clouds generated by medical nebulisers. *Int. J. Pharm.* 115, 69–78.
- COSTA, P., & LOBO, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(2), 123-133.
- COURRIER, H. M., BUTZ, N., VANDAMME, T. F. (2002). Pulmonary drug delivery systems : recent developments and prospects. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **19**: 425- 498.
- COPLEY M. ,LEWIS D., (2011), Inhaled Product Characterization Calculating Particle-Size Distribution Metrics, Particle Characterization, *Pharmaceutical Technology*. Erişim: www.pharmtech.com.
- COPLEY SCIENTIFIC (2015), Introduction to Aerodynamic Particle Sizing, Erişim: <http://www.copleyscientific.com/home/inhaler-testing/aerodynamic-particle-size/introduction-to-aerodynamic-particle-sizing>.
- DAS MK, RAMARAO K. (2007) Microencapsulation of Zidovudine by double emulsion solvent diffusion technique using ethylcellulose. *Indian J Pharm Sci*;69:244–50.
- DAS, M. K., & RAO, K. R. (2006). Evaluation of zidovudine encapsulated ethylcellulose microspheres prepared by water-in-oil-in-oil (w/o/o) double emulsion solvent diffusion technique. *Acta Pol Pharm*, 63(2), 141-148.
- DEVRIİM, B., BOZKIR, A., CANEFE K. (2011). Preparation and Evaluation of Poly(lactic-coglycolic acid) Microparticles as a Carrier for Pulmonary Delivery of Recombinant Human Interleukin-2: II. In Vitro Studies on Aerodynamic Properties of Dry Powder Inhaler Formulations. *DrugDevelopment and Industrial Pharmacy*, 37(11): 1376-1386.
- DILLEN, K., VANDERVOORT, J., VAN DEN MOOTER, G., VERHEYDEN, L., & LUDWIG, A. (2004). Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *International journal of pharmaceuticals*, 275(1), 171-187.
- DONBROW, M. (1991). *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy*. CRC press. 57-58.
- DOODİPALA, N., PALEM, C., REDDY, S., RAO, Y. (2011). Pharmaceutical development and clinical pharmacokinetic evaluation of gastroretentive floating matrix tablets of levofloxacin. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* 4, 1463–1469.
- EFFROS RM, MASON GR (1983). Measurements of pulmonary epithelial permeability in vivo. *Am Rev Resp Dis*; 127(Suppl): s59–s66.
- EL-ARİNİ, S.K., LEUENBERGER, H., (1995). Modeling of drug release from polymer matrices: effect of drug loading. *Int. J. Pharm.* 121, 141–148.
- ERK M., (2002). İnhalyasyon Teknikleri, Türk Toraks Dergisi Ek - İnhalyasyon Yolu ve Nebülizatör ile İlaç Kullanımı, Cilt 3, Sayfa(lar) 007-013.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0 (2008). Druckerei C. H. Beckpress, Nördlingen, Germany
- EVERARD, M., DEVADASON, S.G., SUNDERLAND, V.B., LE SOUEF, P.N (1995). An alternative aerosol delivery system for amiloride. *Thorax* 50, 517–519.

- FANG, J. Y., YU, S.Y., WU, P.C., HUANG, Y.B., TSAI, Y.H., (2001). In vitro skin permeation of estradiol from various proniosome formulations. *Int. J. Pharm.*, 215: 91-99.
- FOLKESSON HG, WESTROM BR, KARLSSON BW (1990). Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules intratracheal instillation in young and adult rats. *Acta Physiol Scand* 139: 347–354.
- FREITAS, S., MERKLE, H. P., & GANDER, B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of controlled release*, 102(2), 313-332.
- FU, K. P., LAFREDO, S. C., FOLENO, B., ISAACSON, D. M., BARRETT, J. F., TOBIA, A. J., & ROSENTHALE, M. E. (1992). In vitro and in vivo antibacterial activities of levofloxacin (l-ofloxacin), an optically active ofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36(4), 860-866.
- FUJIMOTO AND S. MITSUHASHI (1990), *Chemotherapy*, 36, 268.
- GARONZIK, J. LI, V. THAMLIKITKUL, D.L. PATERSON, S. SHOHAM, J. JACOB, F.P. SILVEIRA, A. FORREST, R.L. NATION (2011), Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55- 3284–3294.
- GELPERINA, S., KISICH K., ISEMAN M.D., HEIFETS L. (2005). The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **172**: 1487–1490.
- GENTILE, PIERGIORGIO (2014) "An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering." *International journal of molecular sciences* 15.3: 3640-3659.
- GERRITY TR. Pathophysiological and disease constraints on aerosol deposition. In *Respiratory drug delivery*. Ed Byron PR. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1990; 1–38.
- GEVARIYA, HITESH B., SURESH GAMI, AND NITIN PATEL (2011) "Formulation and characterization of levofloxacin-loaded biodegradable nanoparticles." *Asian Journal of Pharmaceutics* 5.2 : 114.
- GILBERT BE, SIX HR, WILSON SZ, WYDE PR, KNIGHT V (1988). Small particle aerosols of enviroxime-containing liposomes. *Antivir Res*;9:355-65.
- GUPTA A., Prajapatg S., Sngnh M., Balamurugan M. (2007). "Proniosomal Powder of Captopril: Formulation and Evaluation", *Molecular Pharmaceutics*, Vol:4, No:4, 596-599.
- GURSOY, A. (2002). *Kontrollü Salım Sistemleri*, Bölüm 4. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti.
- HABIB MJ AND MESUE R (1995). Development of controlled release formulations of ketoprofen for oral use. *Drug Dev. Ind. Pharm* 21: 1463-72.
- HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, Sixth Edition, 2009
- HANS M.L., LOWMAN A.M., (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **6**: 319–327.

- HILLERY, ANYA M., ANDREW W. LLOYD, AND JAMES SWARBRICK (1997), eds. *Drug delivery and targeting: for pharmacists and pharmaceutical scientists*. CRC Press, 2002. Podczeczek, F. Pulveraerosole zur Inhalation. Deutsche Apotheken. Zeitung 137 - 73 – 79
- HODSON ME, PENKETH AR, BATTEN JC. (1981). Aerosol carbenicillin and gentamicin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *Lancet*, 2(8256):1137–9.
- HOİBY (2011), Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis, *BMC Med.* 9.
- HOMBREİRO PEREZ ET AL (2000). The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug *Journal of Controlled Release* 65. 429 –438
- HOOPER, DAVID C (1999). Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs*, 58.2: 6-10.
- HURST M, LAMB HM, SCOTT LJ (2002). Levofloxacin: an update review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* 62(14): 2127-2167.
- ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)
- IGARTUA, M., HERNANDEZ, R. M., ESQUIŞABEL, A., GASCON, A. R., CALVO, M. B., AND PEDRAZ, J. L.(1997), Influence of formulation variables on the in vitro release of albumin from biodegradable microparticulate systems. *J. Microencapsulation*, 14, 349-356.
- İMAMOĞLU SELİN, DEVRİM BURCU, BOZKIR ASUMAN (2014), Preparation and evaluation of levofloxacin loaded PLGA microparticles for pulmonary delivery: Effect of surfactant type and concentration on properties of microparticles, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium Abstract Book Sayfa:162-164.
- J. JUNG, M. PERRUT, Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey, *J. Supercrit. Fluids* 20 (2001) 179 – 219.
- JAFARİ, S. M., HE, Y., & BHANDARİ, B. (2007a). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82, 478–488.
- JAFARİ, S. M., HE, Y., & BHANDARİ, B. (2007b). Effectiveness of encapsulating biopolymers to produce sub-micron emulsions by high energy emulsification techniques. *Food Research International*, 40, 862–873.
- JAFARİ, S. M., HE, Y., & BHANDARİ, B. (2007c). Optimization of nanoemulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, 225, 733–741.
- JAİN, KEWAL K., ED. *Drug delivery system*. Humana Press/Springer, 2014.
- JALİL, R., NİXON, J.R.. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties, *Journal of Microencapsulation*, 7(3), 297-325, (1990).
- JELVEHGARİ, M., BARAR, J., VALİZADEH, H., LOVEYMI, B. D., & ZİAPOUR, M. (2010). Preparation of diclofenac sodium composite microparticles with improved initial release property. *Scientia Iranica*, 17(2), 79-89.

- JIAO, J., & BURGESS, D. J. (2003). Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *Aaps Pharmsci*, 5(1), 62-73.
- JOHANSEN, P., MERKLE, H. P., & GANDER, B. (2000). Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(3), 413-417.
- JONES, J.M. HELM (2009), Emerging treatments in cystic fibrosis, *Drugs* 69.1903–1910.
- JUNTUNEN-BACKMAN K., KAJOSAARI M., LAURIKAINEN K., MALINEN A., KAILA M., MUSTALA L., KASKI U., LINNA O., MARENK M., TOIVANEN P., (2002), Comparison of Easyhaler® Metered-Dose, Dry Powder Inhaler and a Pressurised Metered-Dose Inhaler plus Spacer in the Treatment of Asthma in Children, *Clinical Drug Investigation*, Volume 22, Issue 12, pp 827-835.
- KARHALE ASHISH ., CHAUDHARI HIRALAL S1., UGHADE PRAJAKTA (2012). "Pulmonary Drug Delivery System." *Pharmtech*, Pg. No. 293-305
- KHOEE, S., & YAGHOUBIAN, M. (2009). An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European journal of medicinal chemistry*, 44(6), 2392-2399.
- KING RJ.(1984) Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant. In: Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, eds. *Pulmonary surfactant*. Amsterdam: Elsevier,1-15.
- KOLB, G., VIARDOT, K., WAGNER, G., & ULRICH, J. (2001). Evaluation of a new high-pressure dispersion unit (HPN) for emulsification. *Chemical Engineering and Technology*, 24, 293–296.
- KOMATSU M, TAGAWA K, KAWATA M AND GOTO S (1983) Biopharmaceutical evaluation of gelatine microcapsules of sulfonamides. *Chem. Pharm. Bull.*, 31: 262–268.
- KONSTANSKI, J. W., DELUCE, P. P. (2000). A novel *in vitro* release technique for peptidecontaining biodegradable microspheres. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 1(1): article 4.
- LABIRIS N. RENEE, BOSCO A P., DOLOVICH B. (2006). Aerosols as Drug Carriers. *Nanoparticles as Drug carriers* Ed.:Torchilin V.P., Chapter 17: s.367-396.
- LABIRIS, N.R. & DOLOVICH, M.B., (2003). Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol*, Vol. 56, pp. 588-599, ISSN: 1365-2125.
- LANE, M. E., BRENNAN, F. S., CORRIGAN, O. I. (2006). Influence of postemulsification drying processes on the microencapsulation of human serum albumin. *Int.J. Pharm.* 307: 16-22.
- LEE, JUNG-HWA, TAE GWAN PARK, AND HOO-KYUN CHOI. (2000) "Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method." *International journal of pharmaceutics* 196.1.75-83.
- LESHER GY, FROELICH ED, GRUET MD, BAILEY JH, BRUNDAGE RP.(1962) 1,8 naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem*;5:1063-8.
- LI, S. P., KOWARSKI, C. R., FELD, K. M., GRIM, W. M. (1988). Recent advances in microencapsulation technology and equipment. *Drug Dev. Ind. Pharm.*,14: 353-376.

- Lǐ, X., DENG, X., YUAN, M., XǐONG, C., HUANG, Z., ZHANG, Y., AND JǐA, W. (1999), Investigation on process parameters involved in preparation of polylactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing *Leptospira Interrogans* antigens. *Int. J. Pharm.*, 178, 245-255 .
- LOHRMANN, M. (2005) Adhaesionskraefte in interaktiven Mischungen fuer Pulverinhalatoren. PhD Thesis. Duesseldorf, Germany.
- M. EFENTAKIS, H. AL-HMOUD, N.H. CHOULIS (1990), Effects of additives on flurbiprofen controlled release preparation, *Acta Pharm. Technol.* 36. 237–239
- MAKADIA, H. K., & SIEGEL, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397.
- MANDAL TK, TENJARLA SM. (1996) Preparation of biodegradable microcapsules of zidovudine using solvent evaporation: Effect of the modification of aqueous phase. *Int J Pharm.* 137:187–97.
- MANSOUR H.M., RHEE Y.S., WU X. (2009). Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int. J. Nanomedicine*, 4: 299–319.
- MAO, S., XU, J., CAI, C., GERMERSHAUS O., SCHAPER, A., KISSEEL, T. (2007). Effect of wow process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *Int. J. Pharm.* 334: 137-148.
- MARAVAJHALA V, DASARI N, SEPURI N, JOGINAPALLI S. (2009) Design and evaluation of niacin microspheres. *Indian J Pharm Sci*;71: 663–9
- MCCALDEN TA, ABRA RM, MIHALKO PJ. (1989) Bronchodilator efficacy of liposome formulations of metaproteranol sulfate in the anesthetized guinea pig. *J Liposome Res*;1:211-22.
- MCCULLOUGH HN, JULIANO RL. (1979) Organ-selective action of an antitumour drug: pharmacologic studies of liposome encapsulated Cytosine arabinoside administered via the respiratory system of the rat. *J Natl Cancer Inst*;63:727-31.
- MEHTA, R. C., THANOO, B. C., AND DELUCA, P. P.(1996), Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(D,L-lactide-co-glycolide). *J. Controlled Release*, 41, 249- 257 .
- MEINEL L, ILLI, O. E., ZAPF, J., Malfanti M., MERKLE, H. P., GANDER, B. (2001). Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Release* 70: 193-202.
- MENG, F. T., MA, G. H., QIU, W., & SU, Z. G. (2003). W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of controlled release*, 91(3), 407-416.
- MIHALKO PJ, SCHRIER H, ABRA RM (1988). Liposomes: a pulmonary perspective. In: Gregoriadis G, ed. *Liposomes as drug carriers*. New York: Wiley: 679-94.
- MITCHELL, B.W. NINHAM (1981), Micelles, vesicles and microemulsions, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* 77 - 601.
- MOHAMMADI-SAMANI, S., & BOOSTANIAN, A. (2010). The effect of HLB on the release profile of atenolol from ethyl cellulose-coated tablets. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 145-148.

- MOHAN, S., & NARSIMHAN, G. (1997). Coalescence of protein-stabilized emulsions in a high-pressure homogenizer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 192, 1–15.
- MOREN, F., 1981. Pressurized aerosols for inhalation. *Int. J. Pharm.* 8, 1–10.
- MORIMOTO Y, ADACHI Y (1982). Pulmonary uptake of liposomal phosphatidylcholine upon intratracheal administration to rats. *Chem Pharmaceut Bull*;30:2248-51.
- MOUZAM, MD ISMAIL, ET AL. (2011) Preparation of a novel floating ring capsule-type dosage form for stomach specific delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19.2: 85-93.
- MUKHOPADHYAY S, SINGH M, CATER JI, OGSTON S, FRANKLIN M, OLVER RE. (1996). Nebulised antipseudomonal antibiotic therapy in cystic fibrosis: A meta-analysis of benefits and risks. *Thorax*, 51(4):364–8.
- NARANG AJIT S, DELMARRE D, GAO D. (2007). Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 345: 9–25.
- NARSIMHAN, G., & GOEL, P. (2001). Drop coalescence during emulsion formation in a high-pressure homogenizer for tetradecane-in-water emulsion stabilized by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 238, 420–432.
- NICOTRA MB. (1994). Bronchiectasis. *Semin Respir Infect*, 9(1):31–40.
- NIEBERGALL, P.J., MILOSOVICH, G., GOYAN, J.E. (1963). Dissolution rate studies. Dissolution of particles under conditions of rapid agitation. *J. Pharm. Sci.* 52: 236-241.
- O'HAGAN, D. T., JEFFERY, H., AND DAVIS, S. S., (1994) The preparation and characterization of PLGA microspheres: III. Microparticle/ polymer degradation rates and the in vitro release of a model protein. *Int. J. Pharm.*, 103, 37-45.
- OGAWA, M. YAMAMOTO, H. OKADA, T. YASHIKI, T. SHIMAMOTO (1988) A new technique of efficiently entrapped leup- rolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid, *Chem. Pharm. Bull.* 36- 1095–1103.
- OKADA, H., TOGUCHI, H. (1995). Biodegradable microspheres in drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 12(1), 1-99.
- OLSSON, B., JÆGFELDT, H., HED, K., LUDBACK, H., 1988. Correlation between laser scattering and inertial impaction for the particle distribution characterization of Bricanyl turbobaler. *J. Aerosol Sci.* 19, 1107–1111.
- OYARZUN MJ, CLEMENTS JA, BARITUSSIO A. Ventilation enhances the pulmonary alveolar clearance of radioactive dipalmitoylphosphatidylcholine in liposomes. *Am Rev Respir Dis* 1980;121:709-21.
- PALAZOLO GG, WAGNER JR (2007) Water in oil (w/o) and double (w/o/w) emulsions prepared with spans: microstructure, stability, and rheology. *Colloid Polym Sci* 285: 1119–1128
- PANDEY, R. AND KHULLER, G.K. (2005). Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. *J. Antimicrob. Chemother*, 55: 430–435.

- PARÍKH, R., PARÍKH, J. R., DUBEY, R. R., SONI, H. N., KAPADIA, K. N. (2003). Poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: optimization of process parameters. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 4(2): article 13.
- PRÍSTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R.M., (1995). In: 5th Edition. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galeânica*, Vol. I. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp. 453–454.
- QUÍNTANAR-GUERRERO, D., FESSI, H., ALLEMANN, E., DOELKER, E., (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 143, 133–141.
- PEREZ, ZINUTTI, C., LAMPRECHT, A., UBRICH, N., ASTIER, A., HOFFMAN, M., & MAINCENT, P. (2000) The preparation and evaluation of poly (ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of controlled release*, 65.3: 429-438.
- R. JALIL, J.R. NIXON, (1989) Microencapsulation using poly(L-lactic acid), 1: Microcapsule properties affected by the preparative technique, *J. Microencap* 6 473–484.
- R.F. FALK, T.W. RANDOLPH, (1998) Process variable implications for residual solvent removal and polymer morphology in the formation of gentamycin-loaded poly(l-lactide) microparticles, *Pharm. Res.* 15 - 1233 – 1237.
- RAFATI, H., COOMBES, A. G. A., ADLER, J., HOLLAND, J., AND DAVIS, S. S. (1997), Protein-loaded PLGA microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *J. Controlled Release*, 43, 89-102.
- RAMSEY BW, DORKIN HL, EISENBERG JD, GIBSON RL, HARWOOD IR, KRAVITZ RM, (1993). Efficacy of aerosolized tobramycin in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 328(24):1740–6.
- RAMSEY BW, PEPE MS, QUAN JM, OTTO KL, MONTGOMERY AB, WILLIAMS-WARREN J. (1999). Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic fibrosis inhaled tobramycin study group. *N Engl J Med*, 340(1):23–30.
- SABIR, MUHAMMAD IQBAL, XIAOXUE XU, AND LI LI, (2009) "A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications." *Journal of Materials Science* 44.21: 5713-5724.
- SAH, H., TODDYWALA, R., AND CHIEN, Y. W. (1994), The influence of biodegradable microcapsule formulations on the controlled release of a protein. *J. Controlled Release*, 30, 201-211.
- SALAH, SALWA MOHAMED (2013). "Formulation of ciprofloxacin hydrochloride loaded biodegradable nanoparticles: Optimization of the formulation variables." *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH & OPINION* 3.11.
- SANDERS, J.S. KENT, G.I. MCRAE, B.H. VICKERY, T.R. TICE, D.H. LEWIS, (1984) Controlled release of a luteinizing hormone releasing hormone analogue from poly(DL-lactide-co-glycolide) biodegradable polymers, *J. Pharm. Sci.* 82 326–329.
- SANT, SHILPA, VERONIQUE NADEAU, AND PATRICE HILDGEN. "Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles." *Journal of controlled release* 107.2 (2005): 203-214.

- SCHEUCH, G., ZIMLICH, W. C., SIEKMEIER, R. (2007). Biophysical parameters determining pulmonary drug delivery. In: *Pulmonary Drug Delivery*, Ed.: K. Bechtold- Peters, H. Luessen. Stuttgart: Druckerei Marquart GmbH, Chapter I..
- SCHULZ, M. B., & DANIELS, R. (2000). Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: Influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49, 231–236.
- SIVADAS, N., O'ROURKE, D., TOBIN, A., BUCKLEY, V., RAMTOOLA, Z., KELLY, J. G., HICKEY, A. J., CRYAN, S.-A. (2008). A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins. *Int. J. Pharm.* 358: 159- 167.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, NIEMAN TA. (1998). Principles of Instrumental Analysis. 5th Edition. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H (çeviri ed) Bilim Yayıncılık, Ankara,.s. 850
- SMYTH, H.D., HICKEY, A.J., (2003). Multimodal particle size distributions emitted from HFA-134a solution pressurized metered-dose inhalers. *AAPS Pharm. Sci. Technol.* 4, E38.
- SOLANKI, A., PARGKH, J., PARGKH, R., (2007). "Formulation and Optimization of Piroxicam Proniosomes by 3-Factor, 3-Level Box-Behnken Design", *AAPS PharmSciTech*, 8 (4), Article 86.
- SONG C.X., LABHASETWAR V., MURPHY H., QU X., HUMPHREY W.R., SHEBUSKI R.J., LEVY R.J. (1997). Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **43**: 197–212.
- SOPPIMATH K. S. , AMINABHAVIA T. M., KULKARNIA A. R., RUDZIŃSKI W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70: 1–20.
- STEAD RJ, HODSON ME, BATTEN JC. (1987). Inhaled ceftazidime compared with gentamicin and carbenicillin in older patients with cystic fibrosis infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Br J Dis Chest*, 81(3):272–9.
- STECKEL, H (2003). Inhalationspulver - Neuere Entwicklungen bei Pulverinhalatoren. *PZ Prisma* 10- 145 – 157.
- STECKEL, H., MUELLER, B.W. In vitro evaluation of dry powder inhalers: drug deposition of commonly used devices. *International Journal of Pharmaceutics* 154 (1997) 19 – 29
- STONE, K.C., MERCER R.R, GEHR P., STOCKSTIB., CRAPO J.D. (1992). Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **6**: 235–243.
- TAYLOR G., KELLEWAY I. (2001). Pulmonary Drug Delivery. *Drug Delivery and Targeting for*
- TAYLOR KMG, TAYLOR G, KELLAWAY IW, STEVENS J. The influence of liposomal encapsulation on sodium cromoglycate pharmacokinetics in man. *Pharmaceut Res* 1989;6:633-6.
- TENA A.F., CLARA P.C. (2012). Deposition of Inhaled Particles in the Lungs. *Arch Bronconeumol.*, **48(7)**: 240–246.
- TESCH, S., & SCHUBERT, H. (2002). Influence of increasing viscosity of the aqueous phase on the short-term stability of protein stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering*, 52, 305–312.

- THOMASIN, P. JOHANSEN, R. ALDER, R. BEMSEL, G. HOTTINGER, H. ALTORFER, A.D. WRIGHT, E. WEHRLI, H.P. MERKLE, B. GANDER, (1996) A contribution to overcoming the problem of residual solvents in biodegradable microspheres prepared by coacervation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42 - 16 – 24.
- TRUCKSIS M, SWARTZ MN. (1991). Bronchiectasis: A current view. *Curr Clin Top Infect Dis*, 11:170–205.
- TUNÇAY, M., ÇALIŞ, S. (1999). İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyoparçalanabilir sentetik ve doğal polimerler. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 109-123.
- TÜRK TORAKS DERNEĞİ (2014), Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Hasta Eğitim Slayt Seti. Erişim: <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/27102014101540-KOAH-Hasta-Egitim-Seti-2014--ppt.pdf>
- UNGARO, F., DE ROSE, G., MIRO, A., QUAGLIA, F., LA ROTONDA, M. I. (2006). Cyclodextrins in the production of large porous particles : development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 28: 423-432.
- THE UNITED STATE OF PHARMACOPEIA-NATIONAL FORMULARY (USP 30-NF 25) (2007). The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
- VARELAS CG, DIXON DG, STEINER C (1995). Zero order release from biphasic polymer hydrogels. *J Control Release* ;34:185–192. 19
- VARSHOSAZ, J., PARDAKHTY, A., MOHSEN, S., BAHARANCHG, H., (2005). “Sorbitan Monopalmitate-Based Proniosomes for Transdermal Delivery of Clorpheniramine Maleate”, *Drug Delivery*, 12:75-82.
- WANG, X., WANG, Y., WEI, K., ZHAO, N., ZHANG, S., CHEN, J. (2009). Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release. *J. Material Process. Technol.* 209: 348–354
- WANG, Z.Y.; ZHAO, Y.M.; WANG, F.; WANG, J.(2006) Syntheses of poly(lactic acid-co-glycolic acid) serial biodegradable polymer materials via direct melt polycondensation and their characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* 99, 244–252.
- WIELAND-BERGHAEUSEN, S., SCHOTE, U., FREY, M., & SCHMIDT, F. (2002). Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCl. *Journal of controlled release*, 85(1), 35-43.
- WRIGHT JR, CLEMENTS JA (1987). Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis*;135:426-44
- YAN C, RESAU JH, HEWETSON J, WEST M, RILL WL, KENDE M. Characterization and morphological analysis of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. *J Cont Rel* 32: 231-241, 1994.
- YANG, Y.-Y., CHUNG, T.-S., AND PING NG, N., Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, 22, 231-241 (2001).
- YAPA, J. LI, K. PATEL, J.W. WILSON, M.J. DOOLEY, J. GEORGE, D. CLARK, S. POOLE, E. WILLIAMS, C.J.H. PORTER, R.L. NATION, M.P. MCINTOSH, Pulmonary and systemic pharmacokinetics of inhaled and intravenous colistin methanesulfonate in cystic fibrosis patients: targeting advantage of inhalational administration, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 2570–2579.

- YEO, YOON, AND KINAM PARK. "Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems." *Archives of pharmacal research* 27.1 (2004): 1-12.
- YUAN, W., FEIWU, Y. G., LIU, Y., GUO, M., ZHAO, H., JIN T. (2009). Preparation of polysaccharide glassy microparticles with stabilization of proteins. *Int. J. Pharm.* 366: 154–159.
- ZENG, M.Z., MARTIN, G.P., MARRIOTT C. Particulate Interactions in Dry Powder Formulations for Inhalation. Taylor&Francis London (2001)
- ZHOU, S.B.; DENG, X.M.; LI, X.H.; JIA, W.X.; LIU, L. Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 91, 1848–1856.
- ZIEGLER, J., AND H. WACHTEL. 2001. Particle size measurement techniques for pharmaceutical device development. *Drug Deliv. Lungs XII* 54–57.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selin İMAMOĞLU

Doğum Tarihi: 15.04.1988

Doğum Yeri: İstanbul

Uyruğu: T.C.

Medeni Hali: Bekar

İletişim Adresi: Bahçelievler 3.cad No:70/1 Çankaya ANKARA

Telefon: +905553711500

E-posta: selinimamoglu@gmail.com

Eğitim Durumu:

2011 – 2015	Ankara Üniversitesi	<i>Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimi</i>
2006 – 2011	Ankara Üniversitesi	<i>Eczacılık Lisans Eğitimi</i>
2004 – 2005	Meram Anadolu Lisesi	<i>Ortaöğrenim</i>
2002 - 2004	Ankara Atatürk Lisesi	
1999 - 2002	TED Kayseri Koleji	<i>İlköğrenim</i>
1994 – 1999	Özel İdeal Koleji	

Yabancı Diller: İngilizce, Almanca

Mesleki Deneyimler:

	2012 - Özel TOBB ETÜ Hastanesi <i>Eczane Bölüm Sorumlusu</i>
Staj:	2011 - Drog-san (Ankara) <i>Ruhsatlandırma Departmanı</i>
	2010 - Drog-san (Ankara) <i>Ar&Ge Departmanı</i>

Seminerler:

2012 - Pulmoner Yolla Uygulanan İlaçların In-vivo/In-vitro Performans Değerlendirmeleri

Yayınlar:

KILIÇARSLAN, Müge; ÇAMCA, Rüya; İMAMOĞLU, Selin; ANTEP, Mustafa Naim; OCAK, Basak; YÜKSEL, Nilüfer (2009) - Model Etken Madde Olarak Pridoksin Hidroklorür Kullanılarak Farklı Doğrudan Tabletleme Ajanlarının Akış Özellikleri ve Basılabilirlik Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Ankara Ecz. Fak. Derg., 38 (4): 331-344.

Poster Bildirileri:

İMAMOĞLU SELİN, DEVRİM BURCU, BOZKIR ASUMAN (2014), Preparation and evaluation of levofloxacin loaded PLGA microparticles for pulmonary delivery: Effect of surfactant type and concentration on properties of microparticles, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium Abstract Book, Sayfa : 162-164.

Bilimsel Toplantılar:

- 1- Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 28-30 Kasım 2014, İstanbul, Türkiye
- 2- BIOMED 2011 - Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu
23-25 Kasım 2011, Ankara, Türkiye

Kurslar:

- 1- İyi Klinik Uygulamaları (Temel) - Klinik Araştırmalar Derneği, Ankara, 2015
- 2- İyi Klinik Uygulamaları (İleri Seviye) - Klinik Araştırmalar Derneği, Ankara, 2015