



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KANDESARTAN SİLEKSETİL İÇEREN PRONİOZOMLARIN
ÜRETİLMESİNDE İŞLEM PARAMETRELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE İN VİVO
BİYOYARARLANIMLARININ İNCELENMESİ**

Elif AKSAKAL

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL**

2013- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANDESARTAN SİLEKSETİL İÇEREN PRONİOZOMLARIN
ÜRETİLMESİNDE İŞLEM PARAMETRELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE İN VİVO
BİYOYARARLANIMLARININ İNCELENMESİ**

Elif AKSAKAL

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL**

**Bu tez, TÜBİTAK tarafından 111S283
Proje numarası ile desteklenmiştir.
2013- ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Yüksek Lisans **Programı**

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/07/2013



Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Hakan EROĞLU

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖNSÖZ	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Niozomlar	3
1.2. Proveziküler Sistemler	4
1.3. Proniozomlar	5
1.4. Proniozomların Hazırlama Yöntemleri	7
1.4.1. Bulamaç Yöntemi	8
1.4.2. Sprey-Kaplama Yöntemi	9
1.4.3. Faz ayrışması (Koaservasyon) Yöntemi	9
1.5. Formülasyon: Bileşenler ve Etkileri	10
1.5.1. Noniyonik Yüzey Aktif Maddeler	11
1.5.2. Kolesterol ve Lesitin	14
1.5.3. Yüzey Yüğü Veren Maddeler	16
1.5.4. Çözücüler	17
1.5.5. Etkin Maddenin Etkisi	17
1.6. Proniozomlardan Niozomların Oluşturulması	18
1.7. Hazırlanan Proniozomlarda Yapılan Kontroller	19
1.7.1. Kuru Toz Proniozomlarda Yapılan Kontroller	19
1.7.1.1. Proniozomların morfolojisinin tayini	19
1.7.1.2. Diferansiyel taramalı kalorimetri	19
1.7.1.3. Tozların akış özellikleri	20
1.7.2. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Yapılan Kontroller	21
1.7.2.1. Optik mikroskopla görüntüleme	21
1.7.2.2. Zeta potansiyeli	21
1.7.2.3. Partikül boyutu ölçümü	22
1.7.2.4. Vezikül yüzey yapısının tayin edilmesi	22

1.7.2.5.Etkin madde yükleme etkinliğinin tayin edilmesi	23
1.8.Proniozomlarda Çözünme Hızı Yöntemleri	24
1.9.Çözünme Test Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Kinetik Modeller	26
1.9.1.Sıfır Derece Kinetik	26
1.9.2.Birinci Derece Kinetik	26
1.9.3.Hixson-Crowell Küpkök Kanunu	27
1.9.4.Weibull Modeli	28
1.9.5.Higuchi Eşitliği	29
1.10. Proniozomların Tablet Formlarının Hazırlanması için Basılabilirlik ve Heckel Eşitliği.	30
1.11.Proniozomlarda Stabilitate	31
1.12.Proniozomlarla Yapılmış Çalışma Örnekleri	32
1.13.Kandesartan Sileksetil	39
1.13.1.Kandesartan Sileksetilin Fizikokimyasal Özellikleri	39
1.13.2.Kimyasal Yapısı ve Kapalı Formülü	39
1.13.3.Açık Formülü	40
1.13.4.Farmakolojik Özellikleri	40
1.13.5.Farmakokinetik Özellikleri	41
1.13.6.Tanıma ve Miktar Tayini Yöntemleri	42
2.GEREÇ VE YÖNTEM	43
2.1.Kullanılan Aletler ve Kimyasal Maddeler	43
2.1.1.Kullanılan Aletler ve Malzemeler	43
2.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
2.2.Yöntem	47
2.2.1.Kandesartan Sileksetilin UV Spektrumunun Belirlenmesi	47
2.2.1.1.Kandesartan Sileksetilin UV Spektrofotomerik Yöntemle Standart Doğrularının Hazırlanması	47
2.2.1.2.Çözünme Hızı Testlerinde Kullanılan Ortamlar	48
2.2.1.3.Kandesartanın Plazmadaki Miktar Tayinini Yapmak Amacıyla Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Standart Doğrusunun Hazırlanması	51
2.2.1.4.Farklı Ortamlardaki Standart Doğruların Analitik Validasyonu ve İstatistiksel Verileri	53
2.2.1.4.1.Doğruluk ve Geri Elde	53
2.2.1.4.2. Kesinlik	54

2.2.1.4.3. Teşhis ve Tayin Alt Sınırı	55
2.2.2. Proniozom Formülasyonlarının Hazırlanması ve Kritik İşlem Parametrelerinin Belirlenmesi	55
2.2.3. Hazırlanan Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontroller	58
2.2.3.1. Formülasyonlarda Ürün Verimi Tayini	58
2.2.3.2. Proniozomlardan Hazırlanan Niozomlarda Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Hesaplanması	58
2.2.3.3. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Partikül Büyüklüğü Tayini	59
2.2.3.4. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Zeta Potansiyeli Analizi	59
2.2.3.5. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomların Optik Mikroskop ile İncelenmesi	59
2.2.3.6. Proniozomlarda Çözünme Hızı Çalışmaları	60
2.2.4. Sonuç Formülasyonunun Seçilmesi ve Tablet Formülasyonunu Geliştirilmesi	60
2.2.4.1. Konsolidasyon Özellikleri Tayini	61
2.2.4.2. Yığın Açısı Tayini	62
2.2.4.3. Akış Hızı	62
2.2.5. Tablet Formülasyonunun Geliştirilmesi	62
2.2.5.1. Basılabilirlik	63
2.2.6. Proniozom Tozlardan Basılan Tabletlerde Yapılan Kontroller	64
2.2.6.1. Sertlik, Çap-Kalınlık	64
2.2.6.2. Dağılma Süresi Tayini	64
2.2.6.3. Tabletlerden Elde Edilen Niozomlarda Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü Tayini	65
2.2.6.4. Tabletlerden Elde Edilen Niozomların Optik Mikroskopla İncelenmesi	65
2.2.6.5. Tabletlerde Çözünme Hızı Çalışması	65
2.2.7. Sonuç Formülasyonda Morfolojinin İncelenmesi	65
2.2.8. Stabilite Çalışmaları	66
2.2.9. Formülasyonların Oral Yolla Verilişte Biyoyararlılıklarının İncelenmesi	66
3. BULGULAR	70
3.1. Kandesartan Sileksetilin UV Spektrumunun Belirlenmesi	70
3.1.1. Kandesartan Sileksetilin UV Spektrofotomerik Yöntemle Standart Doğrularının Hazırlanması	72
3.1.2. Kandesartanın Plazmadaki Miktar Tayinini Yapmak Amacıyla HPLC ile Spektrumunun Elde Edilmesi ve Standart Doğrusunun Hazırlanması	78
3.1.3. Farklı Ortamlardaki Standart Doğruların Analitik Validasyonu ve İstatistiksel Verileri	80

3.1.3.1.Doğruluk ve Geri Elde	80
3.1.3.2.Kesinlik	84
3.1.3.3.Teşhis ve Tayin Sınırı	92
3.2. Hazırlanan Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Bulgular	93
3.2.1.Formülasyonlarda Ürün Verimi Bulguları	93
3.2.2.Proniozomlardan Hazırlanan Niozomlarda Etkin Madde Yükleme Etkinliğine Ait Bulgular	94
3.2.3.Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Partikül Büyüklüğü Analizi Bulguları	95
3.2.4.Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Zeta Potansiyeli Analizi Bulguları	97
3.2.5.Proniozomlardan Elde Edilen Niozomların Optik Mikroskop ile İncelenme Görüntüleri	98
3.2.6.Proniozomlarda Çözünme Hızı Çalışmaları Bulguları	100
3.3.Sonuç Formülasyonun Seçilmesi ve Tablet Formülasyonunun Geliştirilmesi	102
3.3.1.Konsolidasyon Özelliklerine Ait Bulgular	102
3.3.2.Yığın Açısı ve Akış Hızı Tayinlerine Ait Bulgular	104
3.3.3.Basılabilirlik Bulguları	104
3.3.4.Proniozom Tozlardan Basılan Tabletlerde Yapılan Kontroller	105
3.3.4.1.Sertlik, Çap-Kalınlık	105
3.3.4.2.Dağılma Süresi Tayini	105
3.3.4.3.Tabletlerden Elde Edilen Niozomlarda Zeta Potansiyeli, Partikül BüyüklüğüTayini Bulguları	106
3.3.4.4.Tabletlerden Elde Edilen Niozomların Optik Mikroskopla İncelenmesi	106
3.3.5.Tabletlerde Çözünme Hızı Çalışmasına Ait Bulgular	107
3.3.6.Sonuç Formülasyonda Morfolojinin İncelenmesi	110
3.3.7. Stabilité Çalışmaları	113
3.4. Formülasyonların Oral Yolla Verilişte Biyoyararlılıklarının İncelenmesine Ait Bulgular	116
4.TARTIŞMA	120
4.1.Kandesartan Sileksetilin ve Kandesartanın Standart Doğrularının Hazırlanması ve Analitik Validasyonuna İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	120
4.2.Proniozom Formülasyonlarının Hazırlanması ve Kritik İşlem Parametrelerinin Belirlenmesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	121
4.3.Seçilen Proniozom Formülasyonunun Tablet Haline Getirilmesi	124
4.3.1.Konsolidasyon ve Akış Özellikleri	125

4.3.2.Basılabilirlik	126
4.3.3.Tabletlerden Elde Edilen Niozomların Özellikleri	127
4.3.4.Farklı Çözünme Ortamlarında Tabletlerden Etkin Maddenin Çözünme Hızı Tayini	127
4.3.5.Sonuç Formülasyonun Morfolojisinin Değerlendirilmesi	129
4.4. Stabilité Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	129
4.5.Formülasyonların Oral Yolla Verilişte Biyoyararlılıklarının Değerlendirilmesi	130
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	132
ÖZET	136
SUMMARY	137
KAYNAKLAR	138
ÖZ GEÇMİŞ	145

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, düşük çözünürlük ve değişen biyoyararlanım gibi sorunlar teşkil eden yeni etkin maddelerin, çözünürlüklerini ve biyoyararlanımlarını artırmak amacıyla araştırılan, ilaç taşıyıcı sistemler sınıfından niozomların ön ilaç şekli olan proniozomlar incelenmiştir. Yaptığımız çalışmada, düşük çözünürlüğe sahip kandesartan sileksetil, model etkin madde olarak kullanılmıştır ve hazırlanan formülasyonlar arasından en iyi sonucu veren formülasyon seçilerek oral yoldan kullanıma uygun tablet formu geliştirilmiş, ayrıca hayvan deneklerde biyoyararlanımlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım süresince bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, ilgisini eğitimimi ve özel hayatımı ayırt etmeksizin, ne şekilde olursa olsun eksik etmeyen canım hocam Sayın Prof. Dr. Nilüfer Yüksel'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarında, yardımlarını eksik etmeyen, kıymetli zamanlarını ve tecrübelerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Tanju Özçelikay'a ve Dr. Ecz. Zerrin Sezgin Bayındır'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca A. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı ve Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda mevcut cihazlardan faydalanmamı sağlayan ve gerekli yardımları gösteren hocalarıma ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmamın en başından sonuna kadar sürdürülmesi için destek projesiyle katkısı olan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi arz ederim.

İsimlerini ayrı ayrı yazamasam da çalışmalarım boyunca destek ve motivasyonlarını eksik etmeyen arkadaşlarıma ve attığım her adımda beni destekleyen, sevgisiyle saran annemle babama sevgilerimi sunarım.

KISALTMALAR ve SİMGELER

A	Bağıl dansite
AUC	Eğri altında kalan alan
BB	Bağıl biyoyararlanım
β	Şekil faktörü
BSS	Bağıl standart sapma
C_{max}	Maksimum konsantrasyon (kanda)
DCP	Disetil fosfat
EE	Entrapment efficiency (etkin madde yükleme etkinliği)
ϕ	Çözünen etkin madde % 'si
HLB	Hidrofilik lipofilik denge
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
K_0	Sıfır derece hız sabiti
K_1	Birinci derece hız sabiti
KD	Küme dansitesi
K_s	Yüzey-hacim ilişkisini ifade eden sabit
mV	Milivolt
MPa	Mega Pascal
PC	Permeabilite katsayısı
PDI	Polidispersite indeksi
Q	Salınan ya da çözünen etkin madde miktarı
Q_0	Çözeltide başlangıçtaki etkin madde miktarı
Q_t	t anında açığa çıkan etkin madde miktarı
rpm	Dakikadaki tur sayısı
SD	Sıkıştırılmış dansite
SEM	Scanning electron microscopy
SH	Standart hata
SS	Standart sapma
SSTF	Kararlı durum transdermal akış
STR	Stearilamin
t	Zaman
$\tan_{\alpha}$	Yığın açısı (α)

T	Sıcaklık
T_c	Kraft noktası sıcaklığı
T_m	Ortalama faz değişim sıcaklığı
T_{max}	Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi (kanda)
TEM	Transmission electron microscopy
τ	Zaman
τ_d	Etkin maddenin % 63,2'sinin çözünmesi için geçen süre
$W_0^{1/3}$	Farmasötik dozaj formunda başlangıçtaki etkin madde miktarının küpkökü
$W_t^{1/3}$	t zamanında farmasötik dozaj formunda açığa çıkmadan kalan etkin madde miktarının küpkökü

SEKİLLER

Şekil 1.1.	Niozom oluşumunun şematik gösterimi	4
Şekil 1.2.	Bir amfifil molekülün kritik yerleşim parametresi	13
Şekil 1.3.	Zincir uzunluğu ve hidrofilik grubun etkisi	13
Şekil 1.4.	Kolesterolün β -OH grubu ve Span 60'ın öncelikli olarak keton grubundaki ve daha zayıf olarak ester grubundaki oksijenleri arasındaki olası H-bağının şematik gösterimi	15
Şekil 1.5.	Yüklenmiş lipit tabakasının, %60/10 Span60/kolesterol niozom formülasyonu içindeki flurbiprofenin %EE üzerinde etkisi	17
Şekil 1.6.	Proniozomlardan niozom oluşumu	18
Şekil 1.7.	Selekoksisib proniozomları ve saf selekoksisibin çözünme hızı grafiği	32
Şekil 1.8.	İnsan deneklerde (n=6) 200 mg tek dozluk proniozomal formülasyon ve ticari kapsül uygulamasından sonra ortalama plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi	33
Şekil 1.9.	Taşıyıcı madde ile proniozomal tozun yüzey morfolojilerinin tarayıcı electron mikroskobu ile karşılaştırılması	35
Şekil 1.10.	A: Konvansiyonel niozomların, B: Proniozomların hidrasyonuyla elde edilen niozomların optik mikroskop görüntüleri	35
Şekil 1.11.	(A) suni mide sıvısında ve (B) suni bağırsak sıvısında ibuprofenin salımı (●:proniozomların dehidratasyonu ile oluşturulan niozomlar; ■:klasik niozomlar; ♦: ibuprofen çözeltisi)	36
Şekil 1.12.	Taşıyıcı maddenin ve proniozomların tarayıcı elektron mikroskop görüntüleri	37
Şekil 3.1.	Kandesartan sileksetilin metanol (a), %0,35 (a/h) Tween 20 içeren pH 6,5 Kandesartan sileksetilin metanol (a), %0,35 (a/h) Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponu (b), pH 1,2 suni mide sıvısı (c), %0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı (d) ortamlarındaki UV spektrumu suni mide sıvısı (d), pH 4,5 asetat tamponu UV Spektrumu	70
Şekil 3.2.	Kandesartan sileksetilin pH 4,5 asetat tamponu (e), %0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu (f), pH 6,8 fosfat tamponu (g), %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponu (d) ortamlarındaki UV spektrumu Kandesartan sileksetilin pH 4,5 asetat tamponu (e), %0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu (f), pH 6,8 fosfat tamponu (g), %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponunda (h) UV spektrumu	71
Şekil 3.3.	Metanolde kandesartan sileksetilin standart doğrusu	72
Şekil 3.4.	%0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponunda kandesartan sileksetilin standart doğrusu	73

Şekil 3.5.	pH 1,2 suni mide sıvısında kandesartan sileksetilin standart doğrusu	73
Şekil 3.6.	Kandesartan Sileksetilin %0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısında standart doğrusu	74
Şekil 3.7.	pH 4,5 asetat tamponunda kandesartan sileksetilin standart doğrusu	74
Şekil 3.8.	Kandesartan Sileksetilin %0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponunda standart doğrusu	75
Şekil 3.9.	pH 6,8 fosfat tamponunda Kandesartan Sileksetilin standart doğrusu	76
Şekil 3.10.	%0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponunda Kandesartan Sileksetilin standart doğrusu	76
Şekil 3.11.	Kandesartanın plazma ortamında belirtilen koşullarda elde edilen HPLC kromatogramı	78
Şekil 3.12.	Kandesartanın HPLC analizinden elde edilen standart doğrusu	79
Şekil 3.13.	Hazırlanan F1-FS kodlu formülasyonlarda etkin madde yükleme etkinliği ve standart hataları	95
Şekil 3.14.	F1-FS kodlu formülasyonlara ait partikül büyüklüğü dağılımı	96
Şekil 3.15.	pH F1-FS kodlu formülasyonlara ait PDI dağılımı	97
Şekil 3.16.	Farklı formülasyonlara ait zeta potansiyeli dağılımı	98
Şekil 3.17.	Proniozomlardan üretilen niozomların optik mikroskopta incelenmesi: a)F1 formülasyonu, b)F2 formülasyonu, c) F3 formülasyonu, d) F4 formülasyonu, e) F5 formülasyonu, f) F6 formülasyonu, g) F7 formülasyonu, h) F8 formülasyonu, ı)FS Formülasyonu	98
Şekil 3.18.	%0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponunda tüm proniozom toz formülasyonların çözünme hızı verilerinin karşılaştırılması (n=4)	101
Şekil 3.19.	Farklı formülasyonlara ait proniozom tozların çözünme hızlarında son saatte elde edilen çözünen madde miktarı (%)	102
Şekil 3.20.	Bağıl dansite değişiminin (A) doğal logaritmasının, yapılan vuruş sayısının doğal logaritmasına karşı değişimi	103
Şekil 3.21.	Tabletten oluşan niozomların optik mikroskopta görüntüsü	106
Şekil 3.22.	Proniozom tabletlere ait farklı pH'larda gerçekleştirilen çözünme hızı testi sonuçları	107
Şekil 3.23.	Ticari tabletlere ait farklı pH'larda gerçekleştirilen çözünme hızı testi sonuçları	108
Şekil 3.24.	Etkin maddeye ait farklı pH'larda gerçekleştirilen çözünme hızı testi sonuçları	108
Şekil 3.25.	Farklı çözünme ortamlarında formülasyona bağlı (proniozom tablet, ticari tablet ve etkin madde) çözünme özelliklerinin incelenmesi:	

	a) pH 4,5%0,2 Tween 80 içeren asetat tamponu, b) pH6,8 fosfat tamponu, c) pH 6,8 %0,2 Tween 80 içeren fosfat tamponu, d)pH 6,5 %0,35 Tween 20 içeren fosfat tamponu	109
Şekil 3.26.	FS, FS tablet, maltodekstrin ve niozomların yüzey morfolojisi	112
Şekil 3.27.	Proniozom tozların optik mikroskop görüntüsü: a) başlangıç proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu, b) üçüncü ay proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu, c) altıncı ay proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu	114
Şekil 3.28.	Başlangıç, üçüncü ve altıncı ay proniozom toz çözünme hızı test sonuçları	114
Şekil 3.29.	Proniozom tabletlerin optik mikroskopla görüntüsü: a) başlangıç proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu, b) üçüncü ay proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu, c) altıncı ay proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu	115
Şekil 3.30.	Başlangıç, üçüncü ve altıncı aylarda yapılan proniozom tabletlerde çözünme hızı test sonuçları	116
Şekil 3.31.	İn vivo performans sonrası FS proniozom tablet, ticari preparat ve saf etkin maddenin kan profillerinin zamana göre dağılımları	118

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Proniozom Hazırlamada kullanılan noniyonik yüzey aktif maddeler ve taşıyıcı materyalleri	11
Çizelge 1.2.	HLB değerlerinin formülasyon üzerindeki etkisi	14
Çizelge 1.3.	Etkin Madde Yapısının Niozom Oluşumu Üzerindeki Etkisi	18
Çizelge 1.4.	Taşıyıcı madde olan sorbitol tozu ile proniozomal tozların yığın açılarının karşılaştırılması (2x: İki kat sorbitol içeren proniozom)	35
Çizelge 1.5.	Proniozomlarla yapılmış çalışma örnekleri	38
Çizelge 2.1.	Analitik Validasyon Parametreleri [ICH Q2(R1)]	53
Çizelge 2.2.	Formülasyona ve işleme ait değişkenler	57
Çizelge 2.3.	Hazırlanan tablet formülasyonu ve bileşenlerin miktarları	63
Çizelge 2.4.	Basılabilirlik çalışmasında etkisi incelenen faktörler	64
Çizelge 3.1.	Kandesartan sileksetilin farklı ortamlarda maksimum absorban verdiği dalga boyları.	72
Çizelge 3.2.	Farklı ortamlarda kandesartan sileksetilin ve plazmada kandesartanın miktar tayinine ait standart doğru denklemlerinin istatistiksel verileri	77
Çizelge 3.3.	Kandesartanın mobil fazdaki HPLC ile tayininde belirlenen koşullar	78
Çizelge 3.4.	Kandesartanın standart doğrusuna ait HPLC analizinden elde edilen konsantrasyon ve alan oranları verileri	79
Çizelge 3.5.	Metanolde kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler	80
Çizelge 3.6.	%0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler	81
Çizelge 3.7.	pH 1,2 enzimsiz suni mide sıvısında kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler	81
Çizelge 3.8.	%0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 enzimsiz suni mide sıvısında kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler	82
Çizelge 3.9.	pH 4,5 asetat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler	82
Çizelge 3.10.	%0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler	83
Çizelge 3.11.	pH 6,8 fosfat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler	83
Çizelge 3.12.	%0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler	84

Çizelge 3.13.	Kandesartanın plazmada yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları	84
Çizelge 3.14.	Kandesartan sileksetilin çözünme ortamlarında yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları	85
Çizelge 3.15.	Kandesartan Sileksetilin %0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponunda yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları	86
Çizelge 3.16.	Kandesartanın plazmada yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları	86
Çizelge 3.17.	Kandesartan sileksetilin farklı çözünme ortamlarında farklı analistler ile yapılan ara kesinlik sonuçları	87
Çizelge 3.18.	Kandesartan sileksetilin metanol ve %0,35 tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponundan yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlere ait ara kesinlik sonuçları	88
Çizelge 3.19.	Kandesartan sileksetilin pH 1,2 suni mide sıvısı ve %0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı ortamından yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlere ait ara kesinlik sonuçları	89
Çizelge 3.20.	Kandesartan sileksetilin pH 4,5 asetat tamponu ve %0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponundan yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlere ait ara kesinlik sonuçları	90
Çizelge 3.21.	Kandesartan sileksetilin pH 6,8 fosfat tamponu ve %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponundan yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlere ait ara kesinlik sonuçları	91
Çizelge 3.22.	Kandesartanın plazmadan yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlerdeki ara kesinlik sonuçları	92
Çizelge 3.23.	Farklı ortamlarda Kandesartan Sileksetilin ve plazmada kandesartanın miktar tayinine ait standart doğruların teşhis ve tayin sınırları	93
Çizelge 3.24.	Farklı formülasyonlarla hazırlanan proniozomlar için ürün verimi	94
Çizelge 3.25.	Hazırlanan F1-FS kodlu formülasyonlarda etkin madde yükleme etkinliği ve standart hataları	94
Çizelge 3.26.	F1-FS kodlu formülasyonların partikül büyüklükleri ve polidispersite indeksleri	96
Çizelge 3.27.	F1-FS kodlu formülasyonların zeta potansiyelleri	97
Çizelge 3.28.	Maltodekstrin, proniozom (FS) ve proniozom tablet basım kütlelerine ait konsolidasyon özellikleri	103

Çizelge 3.29. Maltodekstrin, proniozom kütlesi ve tablet basımında kullanılacak proniozom toz karışım kütlesinde yığın açısı ve akış hızı	104
Çizelge 3.30. Maltodekstrin, proniozom ve tablet basımı için proniozom toz karışımında basılabilirlik verileri	104
Çizelge 3.31. Üretilen tabletlerde sertlik, çap ve kalınlık inceleme sonuçları	105
Çizelge 3.32. Proniozomlardan üretilen tabletlerde zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğü sonuçları	106
Çizelge 3.33. Çözünme hızı deneyi sonunda FS tablet formülasyonu, saf etkin madde ve ticari preparattan elde edilen çözünen madde miktarları (% değerler)	109
Çizelge 3.34. Tüm pH'larda yapılan çözünme hızı çalışmalarına ait matematiksel model verileri	110
Çizelge 3.35. Proniozom tozlarda yapılan stabilite çalışmalarının 0., 3. ve 6. aylarda elde edilen sonuçları	113
Çizelge 3.36. Proniozom tabletlerde yapılan stabilite çalışmaları sonuçları	115
Çizelge 3.37. Oral yolla verilen proniozom tablet, ticari tablet ve saf etkin maddeden elde edilen biyoyararlanım parametreler	118

GİRİŞ ve AMAÇ

Araştırma aşamasında ya da halihazırda ticari olarak erişilebilir olan pekçok etkin madde, değişen biyoyararlanım ile sonuçlanan düşük çözünürlüklere sahiptir (Solanki ve ark., 2008). İlaçların verilmesi için başlıca tercih edilen yol oral yoldur. Bununla birlikte oral yoldan uygulamada mevcut olan ve yeni keşfedilen etkin maddelerin çoğu, zayıf çözünürlük, öngörülemeyen absorpsiyon, bireyler içi ve bireyler arası değişkenlik ve doz orantısızlığı gibi nedenlerden dolayı sıklıkla biyoyararlanım sorunu oluşturmaktadır. Çözünmeyen etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmak amacıyla kompleks oluşturma, etkin madde türevlendirme, katı durum özelliklerinin uygun hale getirilmesi, yüzey aktif maddelerin dahil edilmesi, mikronizasyon ya da nanonizasyon ile yüzey alanı artırma, püskürterek kurutma ve mikro- ve nanoenkapsülasyon şeklinde yaklaşımlar mevcuttur (Gurrapu ve ark., 2011).

Lipozomlar veya niozomlar gibi kolloidal boyutlarda ilaç taşıyıcı sistemler, geleneksel dozaj şekilleri ile kıyaslandıklarında çok farklıdır; çünkü kolloidal partiküller, etkin madde içeren rezervuarlar gibidir ve partikül yapısı ya da yüzeyi işlenerek içerdiği etkin maddenin salım hızı ya da hedeflenen bölgeye affinitesi değiştirilebilmektedir (Gurrapu, A. ve ark., 2011). Bununla birlikte, lipozom ve niozomların genel olarak ilaç uygulamalarında stabil olmamaları gibi önemli problemler de mevcuttur. Proveziküler yaklaşım, lipozom ve niozom gibi geleneksel veziküler sistemlere ilişkin stabilite sıkıntılarını çözmek için geliştirilmiştir. Proveziküler sistemler fosfolipitler/iyonik olmayan (noniyonik) yüzey aktif maddeler ve organik çözücüde çözünen etkin maddeleri taşıyan, taşıyıcı olarak suda çözünen poröz tozlardan oluşurlar. Kuru, serbest akan granüler yapıdaki bu ürün kullanılmadan hemen önce hidrate edilir; böylece sulu veziküler sistemlerle bağlantılı pek çok problemten kaçınılabılır (Jukanti, R. ve ark., 2010).

Kandesartan sileksetil suda hemen hemen hiç çözünmemektedir ve GI kanaldan tam absorbe olmaması nedeniyle oral yoldan verilmede elde edilen mutlak

biyoyararlanımı %15 dolayındadır. GI kanaldan emilimi sırasında ester hidrolizine uğrayarak asıl etkiyi gösteren kandesartana dönüşmektedir. Bu çalışmada model etkin madde olarak kandesartan sileksetil kullanılmıştır.

Çalışmanın amaçları genel olarak aşağıdaki maddeler halinde ifade edilebilir:

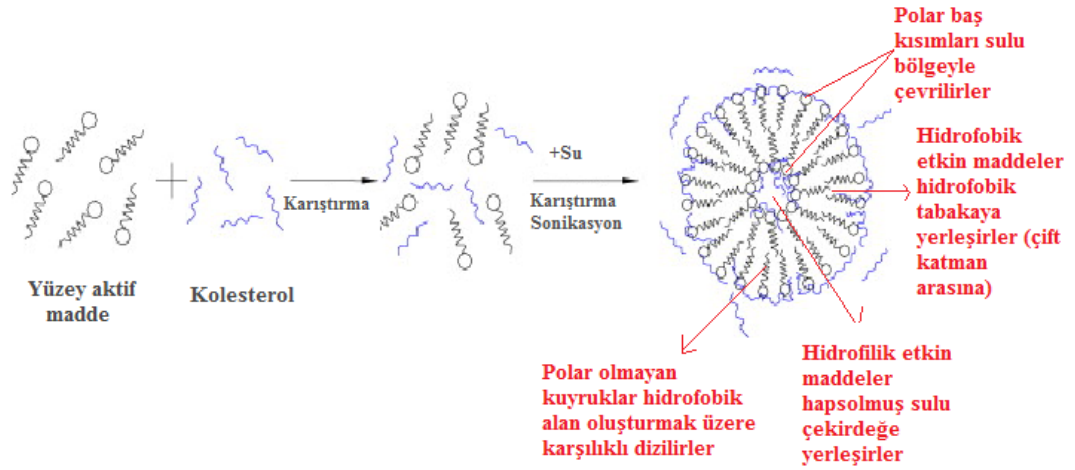
- Teknolojik olarak proniozomların üretim işlemlerinin validasyonunun sağlanması (farklı taşıyıcı, rotavaporda dönü hızı, sıcaklık, membran yük durumu değerlendirmeleri),
- Farklı işlem parametreleri ile hazırlanan kandesartan sileksetil yüklü proniozomların spesifikasyonlarının test edilmesi,
- En uygun kalite özellikleri ve çözünme performansına sahip kandesartan sileksetil yüklü proniozom formülasyonunun seçilmesi ve seçilen proniozomdan tablet basımı ve tabletlerde performans çalışmaları yapılması,
- Seçilen formülasyon ile hazırlanan proniozom tabletlerin oral yolla verilişte in vivo performansının belirlenmesi.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Niozomlar

Niozomlar bir ya da daha fazla noniyonik yüzey aktif madde ve kolesterolden oluşan çift tabakalı bir yapıda hapsolmuş sulu bir çekirdekten oluşan sentetik mikroskobik veziküllerdir. Bu oluşum nadiren kendiliğinden olmakla beraber genelde fiziksel çalkalama ya da ısıtma gibi enerji girişleri gerektirmektedir. Yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ait olan yeni bir grubu temsil etmektedir. Kozmetik endüstrisinde 1975 yılında piyasaya ilk tanıtılmalarından bu yana diğer uygulama alanlarına da geçiş yapmışlardır. Sürekli salım yapan ve hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler için potansiyel olarak araştırılmaları sürdürülmektedir (Azeem ve ark., 2009, Leekumjorn, 2004, Uchegbu ve Vyas, 1999).

En çok kullanılan veziküler taşıyıcı sistemler olan lipozomlar geniş bir yelpazesi olan doğal ve sentetik fosfolipitleri içermektedir. Lipozomların çeşitli tipteki etkin maddeleri kontrollü ya da sürekli biçimde hedeflenen bölgeye kadar taşımaları konusunda etkinlikleri kanıtlanmıştır, fakat formülasyon maliyetinin fazlalığı ve sınırlı raf ömrü, lipozomların bu eksikliklerinin üstesinden gelebilecek diğer veziküler sistemlerin geliştirilme ihtiyacına sebep olan temel faktörler olmuştur. Niozomlar, lipozomlara alternatif olarak pahalı olmayan ve daha stabil olan yapılar olarak üretilmişlerdir ve oldukça yoğun şekilde çalışılan sistemlerdir. Çünkü lipozomlarla aynı fiziksel özelliklere sahiptirler ve fosfolipit vezikülleriyle aynı yöntemle hazırlanabilirler, ancak genellikle daha yüksek kimyasal stabilite sergilerler. Daha uzun raf ömrüne, stabiliteye ve biyoyararlanımı artıran, kontrollü ya da sürekli tarzda hedeflenen bölgeye ilaç taşıma yeteneğine sahiptirler. Biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilen, toksik olmayan, immünojenik ve karsinojenik olmayan maddelerden üretilirler (Azeem ve ark., 2009, Leekumjorn, 2004, Mahale ve ark., 2012, Baroli ve ark., 1999). Hidrolitik degradasyona karşı yüksek rezistans ile birlikte, çok farklı türde çözünen maddenin enkapsülasyonun sağlamaktadırlar (Barolli ve ark., 1999; Uchegbu ve Vyas, 1998) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Niozom oluşumunun şematik gösterimi

1.2. Proveziküler Sistemler

Lipozomlar ve niozomların, hazırlama, sterilizasyon ve depolama sırasında bazı dezavantajlara sahip oldukları bildirilmiştir. Bu dezavantajlar aşağıda verildiği gibidir (Walve ve ark., 2011, Aggarwal ve ark., 2012):

- Lipozomlar ve niozomlar sulu disperse sistemlerdir ve hidroliz ya da oksidasyon yoluyla bozunma problemleri mevcuttur,
- Lipozomlar ve niozomlar özel depolama ve saklama koşulu gerektirmektedirler,
- Saklama aşamasında genellikle sedimentasyon, agregasyon ya da füzyon gözlenmektedir,
- Lipozomlarda doğal fosfolipitlerin saflığı değişkenlik sergilemektedir,
- Sterilizasyon, nakletme, dağıtma, depolamada doz tekdüzeliği ve ölçek büyütme güçlükleri mevcuttur,
- Hazırlanmalarında kullanılan çözücülerin uygun olmaması problemi vardır,
- Yüksek üretim maliyeti gerektirmektedirler,

- Hidratasyon işlemi boyunca üretim kabı cidarında oluşturulan lipit/yüzey aktif madde film tabakasının yetersiz hidrate edilmesi söz konusu olabilmektedir,
- Enkapsüle edilmiş etkin madde veziküllerden sızabilmektedir.

Proveziküler sistemlerin yapıları ve özellikleri klasik veziküler sistemlere benzetmekle birlikte, onlara ek olarak gelişmiş bir stabilite (fiziksel stabilite) sağlarlar. Prolipozomlar ve proniozomlar, yapılarında fosfolipidler, kolesterol ve çeşitli yüzey etkin maddeler taşıyan, su ile hidrate edildiklerinde kendiliğinden lipozomlara veya niozomlara dönüşebilen kuru toz, miseller çözelti ya da jel halindeki formülasyonlardır. Yapı olarak birbirlerine çok benzeyen bu iki formülasyondan proniozomların prolipozomlardan farkı, yapılarında fosfolipidler yerine noniyonik yüzey etkin maddeleri içermesidir. Genel olarak bu etkin madde taşıyıcı sistemler kuru granüler form ve sıvı kristal jel formu olmak üzere iki farklı tipte formüle edilebilmektedir (N.K.Jain, *Progress in Controlled and Novel Drug Delivery Systems*, Bölüm: Provesicles As Surrogate Drug Carriers). Çalışmamızda kuru granüler formda proniozomların oluşturulması hedeflenmiştir.

1.3. Proniozomlar

Niozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin yeteneklerine müdahalede bulunmaksızın stabilize etmeye yönelik yaklaşımlar, gelecek vadeden ilaç taşıyıcılar olan “proniozom”ların geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır. Proniozomlar çökme, agregasyon gibi fiziksel stabilite problemlerini ve tutulan etkin maddenin sulu ortama sızabilmesi sonucunda hidroliz, degradasyon ve oksidasyon gibi kimyasal stabilite problemlerini önlemekte veya azaltmaktadır; bu nedenlerle taşıma, dağıtım, saklama ve depolama açısından daha uygun formlardır. Proniozomlar, gerektiğinde ölçülerek (belli miktara) ayrılabilen ve kullanımdan önce sıcak sudaki birkaç dakikalık kısa bir çalkalama ile hızlı bir şekilde niozom dispersiyonu oluşturmak için dehidrate edilebilen, yüzey etkin madde ile kaplı olan suda çözünebilir taşıyıcı partiküllerin kuru formülasyonlarıdır (Sudhamani ve ark., 2010, Akhilesh ve ark., 2012). Kuru toz

formun hidratasyonu sonucunda oluşan niozomlar, geleneksel olarak hazırlanan niozomlarla aynı yapıdadır ve boyut olarak daha tekdüze özellik sağlamaktadır. Bu özellikler proniozomları, geniş bir aralıktaki aktif bileşenler için potansiyel, çok amaçlı bir taşıyıcı sistem yapmaktadır (Hu ve Rhodes, 1999, Sankar ve ark., 2010). Üretim teknikleri basittir ve ölçek büyütme kolaylığı sağlamaktadır.

Proniozomlar çok yönlü bir salım vezikülü konsepti sunarlar ve özellikle basit üretim teknikleri ve ölçek büyütmedeki kolaylıkları sayesinde gelecek vadeden ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu nedenle, transdermal, oral, oküler ya da enjeksiyonluk preparatlar olarak kullanıldıklarında etkin madde tutma etkinliği ve salımını kontrol eden faktörlerin uygun hale getirilmesi çok önemlidir (Sankar ve ark., 2010, Zidan ve Mokhtar, 2010).

Proniozomlar *kuru granüler form* ve *sıvı kristal jel formunda* olmak üzere iki sistem halinde bulunmaktadır.

Kuru granüler tipteki proniozomlar: Glukoz, fruktoz, laktoz, sorbitol ya da maltodekstrin gibi suda çözünebilen bir taşıyıcının üzerine organik solvan içersinde çözülmüş olan lipid veya yüzey etkin maddenin bir film tabakası şeklinde kaplanması ile oluşturulan kuru, serbest akan bir granüler toz kütlesi şeklindedir. Taşıyıcı madde üzerine kaplama işlemi sonucunda, suda çözünebilen her partikülün etrafının ince bir yüzey etkin madde tabakasıyla kaplandığı kuru bir formülasyon elde edilmektedir (Blazek-Welsh ve Rhodes, 2001).

Kuru toz halinde niozomlar oral, peroral, nazal, intravenöz veya diğer yollarla uygulanabilmektedirler. Özellikle peroral uygulama için doğrudan tablet, kapsül ya da boncuk gibi katı dozaj formları haline dönüştürülebilme olasılıkları, bu sistemler için büyük bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu sayede de hasta ilacı kullanana dek ilaç hiçbir şekilde sıvı ile etkileşmemiş olur. Katı ilaç şekilleri içinde bulunan proniozomlar, vücuda alındıktan sonra vücut sıvılarıyla niozomal dispersiyon haline gelebilmektedir.

Sıvı kristal jel proniozomlar: Yüzey etkin madde molekülleri su ile temas halinde olduklarında, yüzey etkin maddenin lipofilik zincirlerinin “liyotrofik sıvı kristal durumu” denen düzensiz, sıvı duruma dönüştürülmesi üç yolla mümkündür:

- Kraft noktasındaki (T_c) sıcaklığı artırmak,
- Yağları çözen çözücü eklemek,
- Sıcaklık ve çözücü faktörlerini birlikte kullanmak.

Sıvı kristal faz ya da lamel fazı, su ortamında birbirinin üzerine gelecek şekilde dizilmiş çift katlı tabakalar içerir. Bu tipteki yapılar tipik X-ışını kırınımı gösterir ve polarize mikroskopta çift kırılan yapıda lifler gözükür. Üçlü lesitin-yüzey aktif madde-alkol sistemi için, çift katmanlı sıvı kristaller kraft sıcaklığında alkol varlığında oluşmaktadır. Bu lamelli sıvı kristal fazı, su (veya sulu tampon) ilave edilip daha sonra oda sıcaklığına soğutulduğunda bir jel yapısı oluşur. Çift katmanlı kristal faz daha yüksek oranda su içeriği olduğu durumlarda niozom dispersiyonu haline dönüşmektedir (Walve ve ark., 2011.).

Sıvı kristal jel proniozomlar şu avantajlara sahiptirler(Walve ve ark., 2011)

- Stabilité,
- Yüksek etkin madde yükleme etkinliği,
- Penetrasyon artırıcı nitelikleri,
- Stratum korneum'un membran özelliklerini bozmamaları,
- Doğrudan transdermal flaster olarak üretime uygun olmaları ve polimer matris içinde disperse edilmelerine gerek duyulmaması,
- Çok uzun işlem basamakları olmaksızın ölçek büyütmedeki kolaylık ve ayrıca farmasötik olarak uygun olmayan katkı maddelerinin kullanılmaması.

1.4. Proniozomların Hazırlama Yöntemleri

Proniozomların hazırlanması için yöntemler aşağıda verilmektedir.

1.4.1. Bulamaç Yöntemi

Blazek-Welsh ve Rhodes (2001) bu yöntemi taşıyıcısı maltodekstrin olan proniozomları üretmek için geliştirmiştir. Bu yöntemde proniozomların üretilmesi için gereken zaman, yüzey aktif madde çözeltisinin taşıyıcı materyale oranından bağımsızdır. Bu yöntem, taşıyıcı içeren yuvarlak dipli bir balon üzerine, önceden hazırlanan yüzey aktif madde çözeltisinin ilave edilmesi ve bir bulamaç oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu balon rotavapora tutturulmakta, belli sıcaklıkta akıcı bir kuru toz elde edene kadar vakum uygulanmaktadır. Daha sonra balon sistemden çıkarılıp bir gece boyunca vakum altında bırakılmaktadır. Elde edilen toz kütle kapalı kaplara konup uygun koşullarda saklanmaktadır (Solanki ve ark., 2007, Sankar ve ark., 2010).

Yöntemin avantajları:

- Maltodekstrin suda kolaylıkla çözünebilen bir polisakkarittir ve formülasyon içinde taşıyıcı materyal olarak kullanılmaktadır. Kuru maltodekstrine organik çözücü içindeki yüzey aktif maddenin ilave edilmesi işlemiyle maltodekstrin partikülleri kolayca kaplanmaktadır,
- Taşıyıcının yüzeyi tekdüze kaplanabildiği için, yüzey aktif madde ve etkin maddeyi hidroliz, oksidasyon vb. durumlardan korumaktadır,
- Daha fazla yüzey alanı, daha ince yüzey aktif madde kaplaması sağlar ve bu durum rehidratasyon işlemini daha etkili kılar.

Yöntemin dezavantajları:

- Metod zaman gerektirmekte, vakum ve azot gazı gibi özel ekipman içermektedir,
- İnce film yaklaşımı daha önceden belirlenmiş ölçek boyutu için geçerli olmaktadır ki materyalin küçük miktarlarda ya da küçük dozlu ölçeklerde üretilmesi uzun zaman alabilir (Walve ve ark., 2011).

1.4.2. Sprey-Kaplama Yöntemi

Bu yöntemde, yüzey aktif madde organik çözücü içine ilave edip sorbitol üzerine spreylenebilir. Daha sonra bu çözelti buharlaştırılmaktadır. Bu işlem, istenen yüzey aktif madde kaplaması sağlanana kadar tekrarlanır, çünkü taşıyıcı organik çözücüde çözünür yapıdadır. Taşıyıcı üzerine yapılan kaplama çok incedir ve taşıyıcı çözülerek hidrate edilen kaplama çok tabakalı veziküllerin oluşumuna olanak sağlamaktadır. Bu yöntem, lipid süspansiyonu içindeki hidrofobik bir etkin maddenin, süspansiyonun stabil olmaması ya da aktif maddenin hidrolize olan hassasiyeti sorunları olmadan formülasyonu için uygun bir metod olarak önerilmektedir. Ancak bu yöntemin, sorbitolün, yüzey aktif madde kaynağı olarak kullanılan organik çözücüler içinde çözünmesi sebebiyle sıkıntı yarattığı bildirilmiştir (Sankar ve ark., 2010, Jukanti ve ark., 2010).

Yöntemin avantajları:

- Basittir ve hidrofobik etkin maddelerin stabil olmama ya da hidrolize hassaslığı gibi sorunlar olmadan uygulanabilecek bir yöntemdir.

Yöntemin dezavantajları:

- Yüzey aktif madde çözeltisi sorbitolün üzerine çok hızlı uygulanırsa, sorbitol partikülleri bolzulacaktır ve numune viskoz bir bulamaç haline gelecektir,
- Sorbitolün, etkin maddenin yüklenme etkinliğine girişim yaptığı bulunmuştur,
- Proniozom formülasyonunda yüzey aktif madde çözeltisinde kullanılan çözücüde sorbitolün çözünmesi yüzünden, bu metodun problem oluşturabileceği rapor edilmiştir (Walve ve ark., 2011).

1.4.3 Faz ayrışması (Koaservasyon) Yöntemi

Bu yöntem Vora ve ark. tarafından 1998 yılında geliştirilmiştir ve daha çok proniozomal jel oluşturmak için kullanılmaktadır. 5.0 ml kapasitesindeki geniş ağızlı cam numune kabına, miktarları tam olarak tartılmış yüzey aktif madde, lipid ve etkin

madde alındıktan sonra alkol (0,5 ml) ilave edilmektedir. Tüm bileşenler cam baget ile ya da çalkalama ile kolesterolün tamamı çözününceye kadar iyice karıştırılıp, cam numune kabının ağzı çözücünün uçmasını engellemek için kapatılıp yüzey aktif madde karışımı tamamen çözünene kadar bir su banyosu üzerinde 5 dakika boyunca 60-70°C'ye kadar ısıtılmaktadır. Çalışılan örnek kabına sulu faz (%0,1 gliserol çözeltisi) ya da sıcak su ilave edilip berrak ya da yarı saydam bir çözelti oluşuncaya dek ısıtılmakta, daha sonra soğuyunca proniozomal jel haline dönüşmektedir (Sankar ve ark., 2010, Mokhtar ve ark., 2008).

Yöntemin avantajları:

- Metod basittir ve çok zaman gerektirmez, ayrıca özel ekipman gereksinimi yoktur,
- Jel hazırlanması için özel olarak uygulanmaktadır,

Küçük miktarlar ya da düşük dozlu formülasyonlar laboratuvar ölçekli üretilebilir (Walve ve ark., 2011).

1.5. Formülasyon: Bileşenler ve Etkileri

Proniozom hazırlamak için seçilen taşıyıcı kolay akabilen, toksik olmayan, kullanılan organik çözücüdeki çözünürlüğü olmayan veya çok düşük olan ve hidrasyon için sudaki çözünürlüğü iyi olan toz özelliklerini taşımalıdır. Değişik taşıyıcılar, yüzey aktif maddeler, membran stabilizatörleri, yüzey yükü sağlayan maddeler ve çözücüler Çizelge 1.1'de gösterilmektedir (Pandey, 2011, Aggarwal ve ark., 2012).

Çizelge 1.1. Proniozom hazırlamada kullanılan noniyonik yüzey aktif maddeler ve taşıyıcı materyalleri

<i>Kullanılan Noniyonik Yüzey Aktif Maddeler</i>	• Span 20 • Span 40 • Span 60 • Span 80 • Span 85 • Tween 20 • Tween 60 • Tween80
<i>Kullanılan Taşıyıcı Materyalleri</i>	• Sukroz stearat • Sorbitol • Maltodekstrin (M500, M700) • Glukoz Monostearat • Laktoz monohidrat • Püskürterek kurutulmuş laktoz
<i>Membran Stabilizatörleri</i>	• Kolesterol • Lesitin
<i>Yüzey Yüklü Sağlayıcı Maddeler</i>	• Disetil fosfat • Stearilamin
<i>Çözücüler</i>	• Etanol • Metanol • Propanol • İzopropanolol

1.5.1. Noniyonik Yüzey Aktif Maddeler

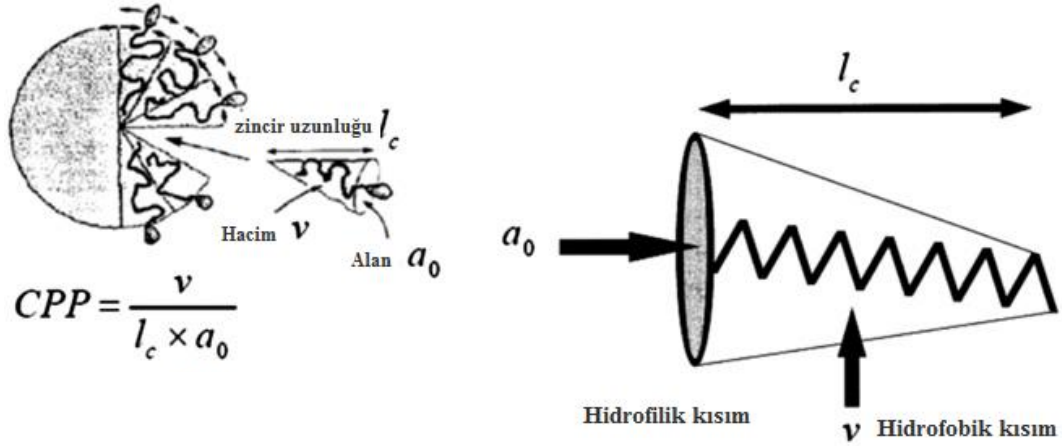
Noniyonik yüzey aktif maddeler, anyonik, amfoterik veya katyonik emsalleri ile kıyaslandıklarında toksisite, stabilite ve uyumluluk açısından daha üstün yararlar sergilediklerinden yüzey aktif maddeler grubunun en çok kullanılan üyeleridir. Genellikle daha az toksik, daha az hemolitikler ve hücre yüzeyinde daha az irritasyon yaparlar ve fizyolojik pH'lara yakın çözeltilerde kendi yapılarını sürdürme

eğilimindedirler. İyonik olmayan yüzey aktif maddeler, hidrate edilmelerini takiben çift tabakalı, nano- ve mikrobeyutlarda veziküller olan niozomların temel yapılarını oluşturmaktadırlar. Farklı pH'larda ıslatıcı, çözündürücü ve geçirgenliği artırıcı gibi fonksiyonlarını sürdürme yetenekleri, onları niozom oluştururken kullanmak için uygun kılmaktadır. Ayrıca doksorubisin ve daunorubisin gibi antikanser etkin maddeler, hidrokortizon ve deksametazon gibi steroidler, ritonavir ve sakuinavir gibi HIV proteaz inhibitörleri, digoksin ve kinidin gibi kardiyovasküler etkin maddeler ve asebutolol ve timolol gibi beta blokörler için gösterilmiş spesifik dokulara etkin madde hedeflemeye ve etkin madde emilimini artırmada yararlı bir özellik olarak iyi bir P-glikoprotein inhibitörüdürler (Kumar ve Rajeshwarrao, 2011)

Yüzey aktif maddelerin faz değişim sıcaklıkları etkin maddenin veziküllerde tutulmasında etkili rol oynamaktadır. Spanlar en yüksek faz değişim sıcaklığına sahiptirler ve böylece en yüksek etkin madde tutulumu bu grup yüzey aktif maddelerde gözlenmektedir. Span 40 ve Span 60 daha fazla etkin madde tutulumu ile daha büyük vezikülleri oluşturmaktadırlar. Vezikülden etkin maddenin sızması, faz değişim sıcaklıklarının yüksek olması ve düşük geçirgenlikleri nedeniyle azalmıştır. Tween'in etkin madde tutma kapasitesi Span'la kıyaslandığında düşüktür; çünkü Tween daha az lipofilik özellik sergiler ve oluşturduğu veziküller daha büyük çaplıdır. Span niozom oluşturmada kullanıldığı zaman oluşturulan ürünün lipofilitesini de artırmaktadır (Aggarwal ve ark., 2012). Hidratasyon ortamının sıcaklığı da niozom oluşumunda, partikül büyüklüğü ve yapısında etkili bir rol oynamaktadır. Sistemin sıcaklığı mutlaka faz değişim sıcaklığının üzerinde olmalıdır. Sıcaklık yüzey aktif madde moleküllerinin dizilimini ve böylece vezikül şeklini etkilemektedir (Mahale ve ark., 2012, Nasser, 2005).

Noniyonik yüzey aktif maddeler polar ve nonpolar bölümlerden oluşmaktadırlar ve yüksek seviyede arayüzey aktivitesi sergilemektedirler. Misellerin aksine çift tabakalı veziküllerin oluşumu yüzey aktif maddeye ait hidrofilik lipofilik dengeye (Hydrophilic Lipophylic Balance, HLB), bileşenlerin kimyasal yapılarına ve kritik yerleşim parametresine bağlıdır (Critical Packing Parameter, CPP). Bir yüzey

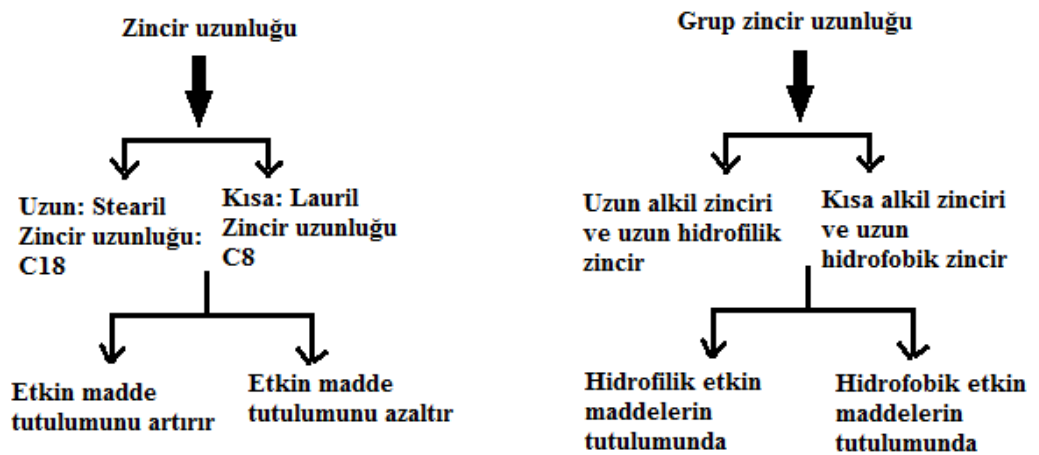
aktif maddenin CPP'si temel alındığında oluşturulacak vezikül Şekil 1.2'de verildiği üzere tahmin edilebilmektedir (Uchegbu ve Vyas, 1998).



Şekil 1.2. Bir amfifil molekülün kritik yerleşim parametresi (Kumar ve Rajeshwarrao, 2011)

CPP şekilde de gösterildiği gibi hidrofobik kısmın hacminin, kuyruk uzunluğu ve hidrofilik alanın çarpımına bölünmesiyle elde edilmektedir. $CPP \leq 0,5$ ise miseller yapı oluşmakta, $CPP=0,5-1$ ise küresel veziküler yapı oluşur, $CPP \geq 1$ ise ters miseller yapı oluşmaktadır.

Hidrofilik grubun ve zincir uzunluğunun niozomlarda etkin madde tutulumuna etkisi Şekil 1.3 (Mahale ve ark., 2012) ile özetlenebilir:



Şekil 1.3. Zincir uzunluğu ve hidrofilik grubun etkisi (Mahale ve ark., 2012)

Çok sayıda yüzey aktif madde mevcuttur ve yüzey aktif madde seçiminde HLB değerlerinin temel alınması gerekmektedir. HLB değeri 4-8 arası olanlar vezikül oluşumu için uygun bulunmuştur. Etkin madde tutulma oranı üzerinde de HLB sayısı etkilidir. HLB değerlerinin niozom oluşumuna etkisi Çizelge 1. 2’de görülmektedir:

Çizelge 1.2. HLB değerlerinin formülasyon üzerindeki etkisi

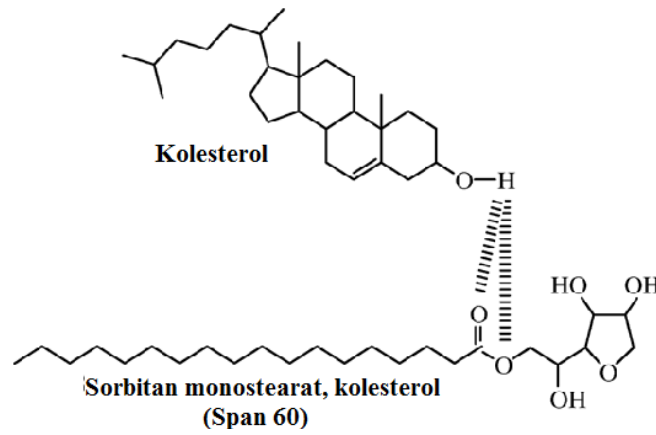
HLB değeri	Formülasyon üzerindeki etkisi
14-16	Proniozom oluşturmazlar
8,6	Etkin madde tutulum etkinliği fazladır
1,7-8,6	Etkin madde tutulum etkinliği azdır
>6	Çift katmanlı vezikül oluşturmaları için yapıya kolesterol eklenmelidir
Daha düşük değerler	Stabiliteyi artırmak için yapıya kolesterol eklenmelidir

1.5.2. Kolesterol ve Lesitin

Kolesterol, vezikül oluşumunda zorunlu olan bir bileşendir. Daha çok hayvansal sistemlerde bulunan hücre membran bileşenidir. Membranın akışkanlığını, elastik yapısını ve proteinler membrana gömülü olduklarında, diğer yağ türlerinin eksik dizilimiyle oluşan boşlukların kapanmasıyla geçirgenliği denetler. Veziküller içinde kolesterol, çift katmanlı yapıyı stabilize etmekte, sızıntıyı önlemekte ve sulu çekirdekte enkapsüle edilen maddelerin permeasyon hızını azaltmaktadır. Kolesterolün yapıdaki konsantrasyonu etkin madde yüklenmesi açısından önemli bir rol oynamaktadır. Partikül boyutuna ve kolesterol molekülünün vezikül yapısındaki konumuna bağlı olarak, yağ ve kolesterol arasındaki en iyi molar oranın 1:1 olduğu bildirilmiştir (Leekumjorn, 2004, Devaraj ve ark., 2002, Aggarwad ve ark., 2012).

Niozom membranının çift katmanında kolesterol ve sorbitan monostearat arasındaki olası etkileşmeyi, Şekil 1.4 şematik olarak göstermektedir. Çift katmanlar arasında yer alan kolesterole ait hafif hidrofilik 3 β -hidroksil (β -OH) baş grubu, kendini sorbitan monostearatın ester grubu civarında yerleştirebilir ve hidrofobik steroid halka, kendini noniyonik yüzey aktif maddenin paraleline yönlendirir. Bu

durum, alkil zincirinin çift katmanda hareketini kısıtlayacak şekilde etki edebilir. Şekil 1.4'te görüldüğü üzere kolesterolün β -OH grubu sorbitan monostearata ait ester grubundaki oksijenle hidrojen bağı oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, sorbitan monostearatın diğer işlevsel oksijen gruplarıyla da membran stabilitesini artıran hidrojen bağları oluşturması mümkündür. Bu etkileşimler, membranın mekanik direncindeki artışta gösterildiği gibi membran kohezyonunda artış olacak şekilde sonuçlanmaktadır (Nasseri, 2005).



Şekil 1.4. Kolesterolün β -OH grubu ve Span 60'ın öncelikli olarak keton grubundaki ve daha zayıf olarak ester grubundaki oksijenleri arasındaki olası H-bağının şematik gösterimi (Kumar ve Rajeshwarrao, 2011)

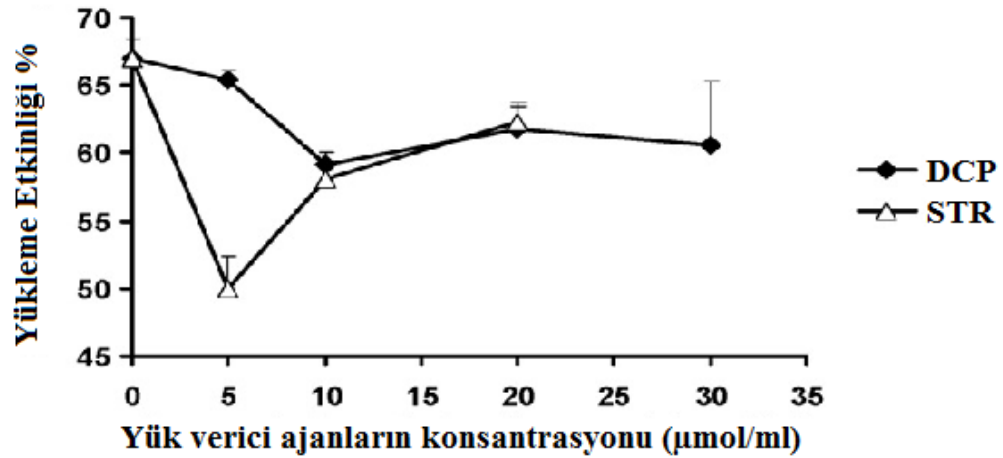
Fosfotidil kolin lesitin ana bileşenidir. İsimlendirilmelerinde elde edildikleri kaynağa bağlı olarak soyadan elde ediliyorsa soya lesitini (soya lecithin), yumurtadan elde ediliyorsa yumurta lesitini (egg lecithin) ismini almaktadır. Fosfotidil kolin suda düşük çözünürlüğe sahiptir. Lesitin niozom yapısına girmesiyle birlikte, yüksek faz değişim sıcaklığına sahip olmasından ötürü permeasyon artırıcı olarak rol oynamakta, etkin maddenin sızmasını önlemekte ve etkin madde yükleme etkinliğini artırmaktadır. Yapısal bileşenlerindeki farklılıklar nedeniyle soya lesitiniyle oluşturulan niozomlar yumurta lesitini kullanılarak oluşturulan niozomlara göre daha büyük vezikül çapına sahiptirler (Aggarwal ve ark., 2012).

1.5.3. Yüzey Yükü Veren Maddeler

Niozomları stabil hale getirmek için kullanılan bir diğer yöntem de membran yapısına yük veren moleküller eklemektir. Disetil fosfat (DSP) ve fosfatidik asit negatif yük verici moleküller olarak kullanılırken, stearilamin (STR) ve setilpridinyum klorür pozitif yük verici moleküller olarak kullanılmaktadır ki her iki grup madde de niozomların agregasyonunu önlemek için kullanılmaktadır. Normalde, yük veren moleküllerin formülasyona eklenme miktarı % 2,5-5 (mol/mol)'dür. Çünkü yüksek miktarda eklenen yük verici moleküller niozom oluşumunu engelleyebilmektedir (Junyaprasert ve ark., 2008).

Flurbiprofenle yapılan bir çalışmada, yüzey yükü veren maddelerin etkin madde yükleme etkinliğine (% Entrapment Efficiency, % EE) etkisi, incelenen parametrelerden birisi olmuştur (Mokhtar et al., 2008). Yüzey yükü oluşturmak için kullanılan DCP ve STR oranı ($\mu\text{mol/ml}$) değiştirilmiş, diğer değişkenler sabit tutulmuştur. Elde edilen veriler grafiğe geçirilmiş (Şekil 1.5) ve bu verilere göre şu yorumlar yapılmıştır:

- DCP ilavesiyle %EE'de görülen azalma, flurbiprofen molekülündeki çift katmanlı lipit yapısına katılımı sağlayan karboksil grubu ile negatif olarak yüklenmiş yağ tabakası arasındaki itici güç etkileşiminden kaynaklanabilir.
- STR, flurbiprofen molekülündeki karboksil grubuna zıt yük taşımaya rağmen yine %EE azaltmıştır. Bu durum elektrostatik olarak zincir eğiliminin indüklenmesi ve yük verici ajanlar sayesinde çift katmanlı tabakada sonradan meydana gelen yan dizilimlerdeki değişimlerle açıklanabilir.
- 10 ve 20 $\mu\text{mol/ml}$ konsantrasyonlarında niozom formülasyonlarına eklenen STR'in, 5 $\mu\text{mol/ml}$ konsantrasyonunda eklenen STR formülasyonuna göre önemli oranda %EE'ni artırdığı gözlenmektedir ($p < 0,05$). Bu durum STR'deki pozitif yüklü baş grubu ile disosiye durumdaki flurbiprofen moleküllerindeki karboksil grupları arasında elektrostatik çekimden kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 1.5. Yüklenmiş lipit tabakasının, %60/10 Span60/kolesterol niozom formülasyonu içindeki flurbiprofenin %EE üzerindeki etkisi (Mokhtar ve ark., 2008).

1.5.4. Çözücüler

Çözücünün seçimi, transdermal uygulamada vezikül büyüklüğü ve deriden etkin madde geçişi oranında büyük bir etkiye sahip olduğu için önemli olan diğer bir konuyu oluşturmaktadır. Değişik alkoller kullanılarak hazırlanan değişik büyüklüğe sahip veziküller şu sırayı takip etmektedir: etanol>propanol>bütanol>izopropanol. Etanolle oluşturulan veziküllerin büyük vezikül boyutuna sahip olmaları etanolün sudaki çözünürlüğünün daha fazla olması ile ve en küçük veziküllerin izopropanolle üretilmesi ise izopropanolün kendi içinde dallanmış olması ile açıklanmıştır. Etanolün membran ile lipit-polar başlık arasındaki etkileşimi azaltıyor olabileceği ve böylece cilt geçişini artırabileceği belirtilmiştir (Aggarwal ve ark., 2012).

1.5.5. Etkin Maddenin Etkisi

Vezikül oluşumunda önemli etkiye sahip bir diğer konu da enkapsüle edilen etkin maddenin yapısıdır (Çizelge 1.3). Amfifilik bir etkin madde olan doksorubisin pH'ya bağlı bir şekilde heksadesil digliserol eter ($C_{16}G_2$) niozomlarında

elektroforetik mobilitiyi deęiřtirmiřtir. Bu da amfipatik etkin maddenin vezikül membranına birleřmiř olduğunu göstermektedir (řahin, 2007).

Çizelge 1.3. Etkin Madde Yapısının Niozom Oluşumu Üzerindeki Etkisi (şahin, 2007).

Etkin maddenin yapısı	Vezikülden Sızıntı Durumu	Stabilite	Diğer Özellikler
Hidrofobik	Azalır	Artar	Gelişmiş transdermal taşıma
Hidrofilik	Artar	Azalır	-
Amfifilik	Azalır	-	Artan enkapsülasyon, değişen elektroforetik mobilite
Makromoleküler	Azalır	Artar	-

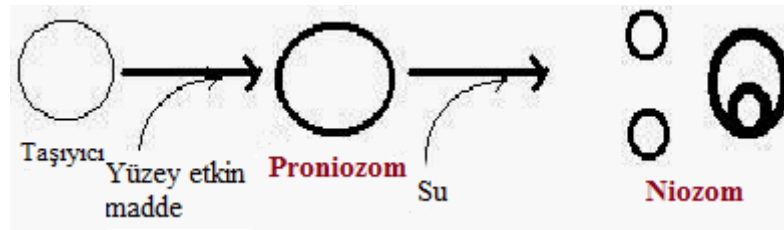
1.6. Proniozomlardan Niozomların Oluşturulması

Niozomlar, proniozomların üzerine yüzey aktif maddenin ortalama faz değişim sıcaklığından yüksek sıcaklıkta sulu fazın ilave edilmesi ve kısa bir çalkalama işlemi uygulanması ile elde edilebilmektedir.

$$T > T_m$$

T=Sıcaklık (Sulu faz)

T_m =Ortalama faz değişim sıcaklığı



şekil 1.6. Proniozomlardan niozom oluşumu

Bu yöntem minimum taşıyıcı kalıntısıyla niozomların hızlı bir şekilde yeniden yapılandırılmasını sağlar (Shukla ve Tiwari, 2011).

1.7. Hazırlanan Proniozomlarda Yapılan Kontroller

Proniozomlarda yapılan kontrolleri iki alt başlıkta toplamak gerekirse:

- Kuru toz proniozomlarda yapılan kontroller
- Proniozomlardan elde edilen niozomlarda yapılan kontroller

1.7.1. Kuru Toz Proniozomlarda Yapılan Kontroller

1.7.1.1. Proniozomların morfolojisinin tayini

Yüzey morfolojisi yani yuvarlaklık, pürüzsüzlük ve kütlelerin biçimlenmesi taramalı elektron mikroskopisi ile incelenmektedir. Proniozomlar çift taraflı yapışkan bir bandın üzerine tutturulur ve bu bant da alüminyum bir silindir üzerine yerleştirilmektedir. Örnekler, otomatik bir püskürtücü başlık kullanılarak püskürterek kaplama işlemi ile altın ve/veya paladyum ya da platin ile ince bir tabaka halinde kaplanmaktadır. Bu alüminyum silindir taramalı elektron mikroskopunda bulunan vakum çemberine yerleştirilmektedir. Örnekler morfolojik karakterizasyon için (gaz gibi) hafif olan ikincil elektron dedektörü ile izlenmektedir (Solanki ve ark., 2007, Blazek-Welsh ve Rhodes, 2001, Raja ve ark., 2011).

1.7.1.2. Diferansiyel taramalı kalorimetri

Etkin madde ile formülasyonda yer alan yardımcı maddeler ve formülasyonun kendisi ile arasındaki olası etkileşimleri incelemek için diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential Scanning Calorimetry, DSC) analizi yapılmaktadır. DSC eğrileri diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı ile elde edilmektedir. Etkin madde ve her bir yardımcı madde ve ayrıca boş üretilen proniozomlar da bu analize tabi tutulmaktadır. Cihaz saf (%99,9) indium ile kalibre edilmektedir. Her bir örnek düz dipli yatay alüminyum kaplara konularak (3-4 mg) alüminyum kapaklarla kapatılıp, belirlenen sıcaklık aralığında, zamana karşı sabit bir sıcaklık artışıyla, azot gazı

altında ölçümler gerçekleştirilmektedir (Gurrapu ve ark., 2011, El-Laithy ve ark., 2011, Aburahma ve Abdelbary, 2012).

1.7.1.3. Tozların akış özellikleri

Proniozom tozlarda bu alanda şimdiye kadar yapılan tek çalışma yığın açısı olmuştur. Bu çalışmanın yapılma amacı, yüzeyi kaplanan toz kütesinin, yüzey özelliklerinin düzelmesi ile nihai ürün ile çalışılan diğer formülasyonlar ve/veya taşıyıcı toz kütesinin arasındaki farklılığın değerlendirilmesi olmuştur.

Yığın açısı, partiküllerarası sürtünme ya da partiküllerarası harekete direnç ile alakalı bir özelliktir. Avrupa Farmakopesi'nde (EP 6, 2011) yığın açısı için tavsiye edilen yöntem şu şekildedir: Akış deliği uygun şekilde kapatılmış bir huniden duyarlı bir şekilde tartılmış test örneği sıkıştırılmadan doldurulur. Yüksekliği 2-4 cm arası değişen bir yükseklikteki huniden düz bir zemin üzerine tozun akıtılıp simetrik bir koni elde edilmesi yöntemine dayanmaktadır. Yığın açısı, bu koninin yüksekliği ve zemine gelen taban kısmının çapının ölçülmesinden sonra şu formüle uygulanması ile bulunmaktadır:

$$\tan\alpha = \frac{\text{Yükseklik}}{0,5 \times \text{çap}} \quad \text{Eşitlik 1.1}$$

Proniozomlarla yapılan çalışmalarda, kesik uçlu huni metodu ile kuru toz proniozomların yığın açısı ölçülmüştür. Akış delik çapı 13 mm olan huni düz bir zeminden 5 cm yükseklikte olacak şekilde yerleştirilmiş ve proniozom kütlesi bu huniye doldurulmuştur. Toz huniden akıtılarak zemin üzerinde bir koni oluşturulmuş ve yığın açısı bu koninin yükseklik ve tabandaki çap değerlerinden hareketle hesaplanarak bulunmuştur (Chintankumar ve ark., 2009, Sudhamani ve ark., 2010).

1.7.2. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Yapılan Kontroller

1.7.2.1. Optik mikroskopla görüntüleme

Yapılan çalışmalarda, proniozomlardan üretilen niozomlar, uygun bir dilüsyon işleminden sonra morfolojik inceleme için bir cam lamın üzerine yerleştirilmiş ve morfolojik yapı tayini için belirli ölçekte büyütme ile bir mikroskopla gözlenmiştir. (Blazek-Welsh ve Rhodes, 2001, Gurrapu ve ark., 2011). Ayrıca başka bir çalışmada hazırlanan niozom süspansiyonu cam lamel üzerine damlatılmış ve gece boyunca sabit şekilde oda sıcaklığında kurutularak niozom süspansiyonundan elde edilen ince kuru tabaka ile veziküllerin yapısı gözlenmiştir (Akhilesh ve ark., 2012).

1.7.2.2. Zeta potansiyeli

Kolloidal boyutlardaki niozomların stabilitesini tayin etmek için zeta potansiyeli analizi yapılır. Niozomları stabilize etmede kullanılan metodlardan birisi de membrana yüklü molekül ilave edilmesidir. Disetil fosfat (DCP) ve fosfatidik asit negatif yük veren moleküller, stearilamin (STR) ve setilpridinyum klorür ise pozitif yük veren moleküllerdir. Bu maddeler niozomların agregasyonunun önlenmesi için kullanılırlar.

Uygun şekilde proniozomlardan dilüsyonu yapılmış niozomların zeta potansiyeli, elektroforetik ışık saçılımı ve lazer Doppler velosimetre metodu temeline dayanan zeta potansiyeli analiz cihazı kullanılarak belirlenmektedir (Akhilesh ve ark., 2012, Junyaprasent ve ark., 2008)

1.7.2.3. Partikül boyutu ölçümü

Partikül boyutunun tayini, yapılan farklı çalışmalarda lazer kırınım tekniği ve foton korelasyon tekniği yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler için niozomal süspansiyon sulu ortamda uygun konsantrasyonlara seyreltilmektedir. Hazırlanan örnekler ölçüm hücresine alınmadan önce sonikasyon işlemine tabi tutulmaktadır. Hu ve Rhodes, ortalama partikül büyüklüğünün niozomlarda yaklaşık olarak 14µm, proniozomlardan hazırlanan niozomlarda ise 6 µm civarında olduğunu kaydetmişlerdir (Gurrapu ve ark., 2011, Hu ve Rhodes, 1999, Nasr, 2009).

Polidispersite indeksi, partikül boyutu dağılımının genişliğinin bir ölçüsüdür ve boyut heterojenliğini göstermektedir ve birimsizdir. Bu nedenle ortalama çap boyutu veya büyüklüğü belirlenirken bu indeksin de verilmesi gerekmektedir. Bir polidispersite indeksinde 1 değeri partikül boyutu dağılımının geniş olduğunu, 0 değeri ise partikül boyutunda herhangi bir dağılımının olmadığı anlamına gelir. Genellikle 0,5'ten daha küçük olan değerler diğerlerine göre monodispers olarak derecelendirilir. 0,7'den daha büyük değerler, numunenin çok geniş bir partikül boyutu dağılımına sahip olduğunu gösterir ve dinamik ışık kırınımı yöntemiyle ölçüm için muhtemelen uygun değildir. Partikül dağılımı değişiminin algoritmaları bu iki uç nokta arasına düşen verilerle çalışır (Malvern, Inform White Paper).

Yapılan bir çalışmada, proniozomlardan üretilen niozomlarda partikül boyutu analizi, partiküllerin %90'ında 0,1167 polidispersite indeksi ile partikül boyutunun ortalaması±SS (Standart Sapma) olarak $1\pm0,12$ µm boyutu sergilemiştir. (Nasr, 2009).

1.7.2.4. Vezikül yüzey yapısının tayin edilmesi

Niozomal veziküllerin yüzey yapısının incelenmesi için geçirimli elektron mikroskopisi (Transmission Electron Microscopy, TEM) kullanılmaktadır. Bu

yönteme göre proveziküler tozun distile su ile hidrate edilmesiyle elde edilen niozomal veziküller TEM kullanılarak incelenmektedir. Niozomal dispersiyondan bir damla, karbon kaplı bakır levhanın üzerine damlatılarak ince bir film tabakası oluşturulmakta ve daha sonra fosfotungustik asidin %1,5'lik (a/h) çözeltisi kullanılarak boyanmaktadır. Numune TEM kullanılarak görüntülenmektedir (Aburahma ve Abdelbary, 2012).

1.7.2.5. Etkin madde yükleme etkinliğinin tayin edilmesi

Niozomal dispersiyonlarda etkin madde tutulumu üç farklı yöntemle yapılabilmektedir:

Jel filtrasyon yöntemi: Tutulmayan etkin madde bir Sephadex-G 50 kolonu boyunca niozomal dispersiyondan jel filtrasyon tekniği ile ayrılmakta ve uygun mobil fazla seyreltilerek seçilen analiz yöntemiyle analiz edilmektedir (Sudhamani ve ark., 2010).

Diyaliz yöntemi: Diyaliz için kullanılacak membran 24 saat boyunca çözünme ortamı içinde ıslatıldıktan sonra içine belirli miktarda niozom konularak ağzı kapatılmaktadır. Diyaliz kesesi uygun çözünme ortamına bırakılıp oda sıcaklığında diyaliz işlemi gerçekleştirilmektedir. Belli zaman aralıklarında ortamdaki alınan numunelerle tutulmayan etkin madde miktarı hesaplanmaktadır.

Bu yöntemde diğer bir uygulama şekli de ortam çözücüsünün sürekli değiştirilmesi işlemidir. Bu işleme göre çözücü içine, diyaliz membran içine konmuş niozom dispersiyonu yerleştirildikten sonra belli zaman aralıklarında (30 dakika) çözücü değiştirilmektedir. Bu işlem, değiştirilen çözücü içinde niozom içine yüklenen maddenin tespit edilemediği noktaya kadar tekrarlamalı olarak uygulanmaktadır (Devaraj ve ark., 2002, Raja ve ark., 2011).

Santrifüj yöntemi: Proniozomlardan elde edilen niozomlar santrifüj edilmekte ve süpernatant ayrılmaktadır. Elde edilen süpernatant etkin maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda uygun seyreltme yapıldıktan sonra okunmaktadır (Sudhamani ve ark., 2010). Bu tekniğin kullanıldığı bir çalışmada, tüpte kalan niozom kalıntısı kullanılan çözücüyle tekrar süspand edilmiş ve santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem elde edilen niozomlar arasındaki boşluklarda etkin madde kalmayınca dek sürdürülmüştür. Toplanan süpernatant uygun şekilde seyreltilerek miktar tayini yapılmıştır (Nasr, 2009).

Ayrıca yapılan başka bir çalışmada, ultrafiltrasyon tekniği kullanılmıştır. Bu yöntemde, iç tüpünün altında bir membran filtre (MWCO 20.000 Dalton) olan bir ultrafiltrasyon tüpünün 3500 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmesinin ardından, sulu fazdaki etkin maddenin analiz edilmektedir. Daha sonra kullanılan etkin madde miktarının yüzde değerinden analiz edilen madde miktarı yüzdesi çıkarıldığında elde edilen sonuçla tutulan madde miktarı hesaplanmaktadır (Gurrapu ve ark. 2011).

Kalan niozomlardaki madde buradan hesaplanabileceği gibi niozomlar içinde tutulan etkin madde, veziküllerin bütünlüğünün %50 n-propanol ya da %0,1 triton X-100 ile bozulmasından sonra sonuç çözelti içinde etkin maddenin uygun bir metod ile miktar tayininin yapılması şeklindedir. Tutulan etkin madde miktarı Eşitlik 1.2 ile hesaplanmaktadır.

$$\% \text{Tutulan madde miktarı} = \frac{\text{Toplam miktarı} - \text{Tutulmayan miktar}}{\text{Toplam miktar}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 1.2}$$

1.8. Proniozomlarda Çözünme Hızı Yöntemleri

İn vitro etkin madde çözünme çalışmaları, formülasyonun in vivo performansının önceden tahmin edilmesinde ve tutarlı tahmin edilmesini sağlamada kabul edilebilir bir aracı temsil etmektedir (Aburahma ve Abdelbary, 2012).

Proveziküler sistemlerden ve proniozomlardan in vitro ilaç salımını ve deriye nüfuz etme çalışmalarını değerlendirmek için Franz difüzyon hücresi, Keshary-Chien difüzyon hücresi, USP çözünme cihazı I, USP çözünme cihazı II, Spectrapor moleküler poröz membran tüpü, diyaliz tüpü ve ters diyaliz yöntemi gibi çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Jukanti ve ark., 2010, Aburahma ve Abdelbary, 2012, Sudhamani ve ark., 2010).

Proniozom tozlarda yapılan çözünme çalışmalarında kullanılan yöntemlere değinilecek olursa:

USP Çözünme Cihazı II (Palet Yöntemi): Yapılan çalışmalarda seçilen çözünme ortamının 900 ml hacminde, $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 50 rpm dönü hızındaki ortama birim ilaç miktarı bırakılarak, ortamdan belirlenen zaman aralıklarında belirlenen miktarda numune alınmıştır. Alınan numuneler 0,45 ya da 0,2 μm çaplı membran filtrelerden geçirilmiş ve uygun yöntemle analiz edilmiştir (Gurrapu ve ark., 2011, Aburahma ve Abdelbary, 2012, Nasr, 2008).

Diyaliz Yöntemi: Daha önce yapılan çalışmalarda bu yöntemde, öncelikli olarak niozomlar dışında tutulmayan maddeyi uzaklaştırmak için niozom dispersiyonuna santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant kısım ayrıldıktan sonra seçilen tamponla disperse edilen niozomal süspansiyon diyaliz membran içine alınmış ve bu membran 100 ml'lik çözünme ortamına bırakılmıştır. Ortam daha önceden $37\pm1^{\circ}\text{C}$ olarak koşullanmış olup ve dönü hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında ortamdan numune çekilmiş ve çekilen numune yerine taze ortam eklenmiştir. Ortamdan alınan numuneler belirlenen analiz yöntemiyle analiz edilmiştir (Chiantankumar ve ark., 2009, Raja K ve ark., 2011, Chandra ve ark., 2009).

1.9. Çözünme Test Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Kinetik Modeller

1.9.1. Sıfır Derece Kinetik

Sıfır derece kinetik oral ozmotik tabletler, transdermal sistemler, düşük çözünürlükteki maddeler için matris tabletler ve diğer taşıyıcı sistemler gibi bir ilaç taşıyıcı sistemden etkin madde salımı kararlı olan işlemleri tanımlarken kullanılır. Burada “kararlı” salım ile birim zamanda çıkan madde miktarının sabit olduğu tanımlanmaktadır (Martin’s physical pharmacy). Basit haliyle,

$$Q=Q_0+K_0t$$

Eşitlik 1.3

Q : Salınan ya da çözünen etkin madde miktarı

Q₀ : Çözeltide başlangıçtaki etkin madde miktarı

K₀ : Sıfır derece hız sabiti

t : Zaman

Sıfır derece kinetikte, t’ye karşı Q değerleri grafiğe geçirildiği zaman eğimi K₀ olan bir doğru elde edilmektedir. Bu kinetiğe göre dozaj formundan birim zamanda çözeltiye geçen etkin madde miktarı sabit olmaktadır. Salım hızı değiştirilmiş pek çok dozaj formunda, özellikle kontrollü/sürekli salım yapan formlarda asıl olarak bu tip çözünme kinetiklerine uyum sağlanması hedeflenmektedir (Banakar, 1992, Physical Pharmacy 2nd edition).

1.9.2. Birinci Derece Kinetik

Noyes-Whitney eşitliği aşağıda verilmektedir.

$$dC/dt=K(C_S-C)$$

Eşitlik 1.4

Buna göre K “birinci derece” çözünme sabitidir. Etkin madde çözünme ortamının tamamında homojen bir konsantrasyondadır. Katı-difüzyon tabakası ara fazında, katıdaki etkin madde, difüzyon tabakasındaki etkin madde ile denge halindedir.

Difüzyon tabakasını geçişte mesafeye bağlı olarak konsantrasyondaki değişim (veya gradyan) sabittir. Bir etkin maddenin doymunluk çözünürlüğü, C_s , Noyes-Whitney eşitliğinin anahtar faktörüdür. Çözünme için itici güç, sınır tabaka mesafesinde etkin maddenin konsantrasyon gradyanıdır. Bu sebeple, itici güç sınır tabakanın kalınlığı ve halihazırda çözünmüş olan etkin madde konsantrasyonuna doğrudan bağlıdır. Çözünen etkin maddenin konsantrasyonu, C , doymunluk konsantrasyonunun, C_s , %20'sinden daha düşük ise sistem "sink koşulu" altında işlemektedir denir. Sistem sink koşulu altında olduğunda çözünme için itici güç en iyi durumdadır. Sink koşulu altında eşitlik şu şekilde basitleştirilmiş formda yazılmaktadır (Martin's Physical Pharmacy 6th Edition):

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + \ln K_1 t$$

Eşitlik 1.5

- Q_t : t zamanında açığa çıkan etkin madde miktarı
 Q_0 : Çözültide başlangıçtaki etkin madde miktarı
 K_1 : Birinci derece hız sabiti
 t : Zaman

1.9.3. Hixson-Crowell Küpkök Kanunu

Bu kanun partikülün normal yüzeyinin onun hacminin küpköküne oranı olarak tanımlamakta ve şu eşitlikten türetilen bir yöntemle açıklanabilmektedir (Costa ve Lobo, 2001) :

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t$$

Eşitlik 1.6

- $W_0^{1/3}$: Farmasötik dozaj formunda başlangıçtaki etkin madde miktarının küpkökü
 $W_t^{1/3}$: t zamanında farmasötik dozaj formunda açığa çıkmadan kalan etkin madde miktarının küpkökü
 K_s : Yüzey-hacim ilişkisi ifade eden sabit

Bu kanun şu varsayımları içermektedir:

- Çözünme işlemi partikülün yüzeyine dik olarak gerçekleşir ve katının yüzey alanının tamamına karşı, karıştırılma etkisi esas olarak aynı derecededir.
- Çoğunlukla küresel şekilde olan çoğu partikül, çözünme işlemi süresince şeklini korur.
- Çözünen partikülün belirli bir geometrik şekilde olması gerekmez ve dolayısıyla ağırlık dışında diğer ölçümlerin yapılması gerekmez.
- Bu koşullar altında, farklı yüzeylerden çözünme hızlarındaki farklılıklar önemsizdir, çünkü tümü, ortalama bir hız oluşturmak üzere birleştirilmiş bir işleme katkıda bulunmaktadır.
- Partikülün etrafında yoğun bir karıştırma söz konusudur; böylece bu bölgede difüzyonun yavaşlamasına neden olacak şekilde durağan bir sıvı tabakası oluşmamaktadır (Hixson ve Crowell, 1931).

1.9.4. Weibull Modeli

Weibull eşitliği çözünme verilerinin doğrusallaştırılması ve parametrelerle tanımlanması amacıyla uygulanan diğer bir modeldir (Costa ve Lobo, 2001).

$$\log[\ln(1/1-\varphi)] = \beta \log \tau - \beta \log \tau_d$$

Eşitlik 1.7

φ : Çözünen etkin madde % 'si

β : Şekil faktörü

τ : Zaman

τ_d : Etkin maddenin % 63.2'sinin çözünmesi için geçen süre

Bu eşitlik, $y=\beta x+\alpha$ şeklinde bir doğru denklemi olup $x=\log \tau$ ve $y=\log[\ln(1/1-\varphi)]$ 'dir. Doğrunun eğimi β ve ordinat kesişimi, $\alpha=-\beta \log \tau_d$ 'dir. Sistemi tanımlayan iki önemli parametre τ_d ve β parametreleridir. β parametresi orijinal çözünme profillerinin şekillerini sayısal olarak karakterize etmektedir.

1.9.5. Higuchi Eşitliği

Bu eşitlik *karekök kanunu* olarak bilinmektedir (Washington, 1990). Salınan etkin madde miktarı zamanın kareköküne karşı grafiğe geçirildiğinde, eğer etkin madde salımı difüzyon kontrollü ise eğimi k sabitine eşit olan bir doğru elde edilmektedir.

$$Q = kt^{1/2}$$

Eşitlik 1.8

Q : t zamanında salınan etkin madde miktarı

k : Salım hızı sabiti

t : Zaman

Bu modelde, etkin maddenin önce matrisin yüzey tabakasından çözündüğü, bu tabakanın boşalmasını takiben bir sonraki tabakanın, matristen çözünme ve difüzyon vasıtasıyla dıştaki çözeltiye doğru boşalmaya başladığı varsayılmaktadır. Böylece çözünmüş etkin maddeyi içeren bölge ve disperse haldeki etkin maddeyi içeren bölge arasındaki arayüzey, matrisin daha iç cephesine doğru hareket etmektedir. Matematiksel modelin türetilmesinde yapılan varsayımlar şunlardır (Longer ve Robinson, remington, 1985):

- Etkin madde salımı anında psödo denge durumu sağlanmıştır.
- Matrisin birim hacmindeki etkin madde miktarı, etkin maddenin matris maddesindeki doygunluk konsantrasyonundan büyüktür.
- Çözünme ortamında daima ideal sink koşulu sağlanmıştır.
- Etkin madde partikülleri, ortalama difüzyon mesafesinden çok daha küçük çaptadır.
- Difüzyon katsayısı sabittir.
- Etkin madde ve matris maddesi arasında etkileşme yoktur.

1.10. Proniozomların Tablet Formlarının Hazırlanması için Basılabilirlik İncelenmesi ve Heckel Eşitliği

Toz karışımlarının basılabilirlik özelliği genellikle, porozite ile sıkışmış kütle ve basınç arasındaki ilişkiyi açıklayan çok iyi bilinen Heckel Eşitliği ile karakterize edilmektedir. Heckel 1961 yılında, konsantrasyon yerine porozitenin, zaman yerine basıncın geldiği birinci derece kimyasal bir reaksiyon gibi düşündüğü kendi eşitliğini geliştirmiştir.

$$\ln \frac{V_p}{V_p - V_\infty} = KP + \ln \frac{V_0}{V_0 - V_\infty}$$

Eşitlik 1.9

$$\ln \frac{V_p}{V_p - V_\infty} = KP + \ln I$$

Eşitlik 1.10

V_p : Basılan tabletin her bir basınçtaki hacmi

V_∞ : Basılan tabletin gerçek hacmi (porlar olmadan)

V₀ : Basılan tabletin ilk hacmi

K : Eğimden hesaplanan sabit

I : Kesişim değeri

Bu eşitliğe göre, basınca karşılık gelen yoğunluktaki değişimin oranı, kütle içinde varolan porozite ile doğrudan ilişkilidir. Heckel sabiti K'nın tersi yoğunlukla hesaplanarak beceri stresi ya da beceri basıncını (P_y-yield stress/pressure) ifade etmek için değerlendirilir. Beceri stresi plastik deformasyonun başladığı stres olarak ifade edilir. Eğimin en üst kısmından elde edilen kesişim değeri, sıkıştırma işleminden sonraki yoğunluğun bir etkisi/yansımasıdır. Kısmen düşük basınçta oluşan K değeri, plastik deformasyonun başlangıcının belirtisidir. Bu nedenle K, bir materyalin sabiti olarak görülür. I sabiti, zımbanın dolumu sırasındaki yoğunlaşma ve partiküllerin bağlanmadan önceki (kendi içinde) yeniden düzenlenmesiyle ilişkilidir. K ve beceri stresi P_y arasındaki korelasyon şu eşitliği verir:

$$Py = \frac{1}{K}$$

Eşitlik 1.11

Yüksek bir P_y değeri partiküllerin yeniden düzenlenmesinden dolayı üründe yüksek bir hacim azalması olduğunu gösterir. I sabitinin plastik deformasyona sebep olması için gereken ortalama ürün basıncının tersine (K) eşit olması gerektiği gösterilmiştir. Daha büyük bir I değeri (düşük ürün basıncı), plastik deformasyonun kısmen daha düşük bir basınçta başladığının göstergesidir, bu belirti materyalin daha basılabilir olduğunu gösterir (Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes, 2008, Physical Pharmacy 6h Ed, 2006).

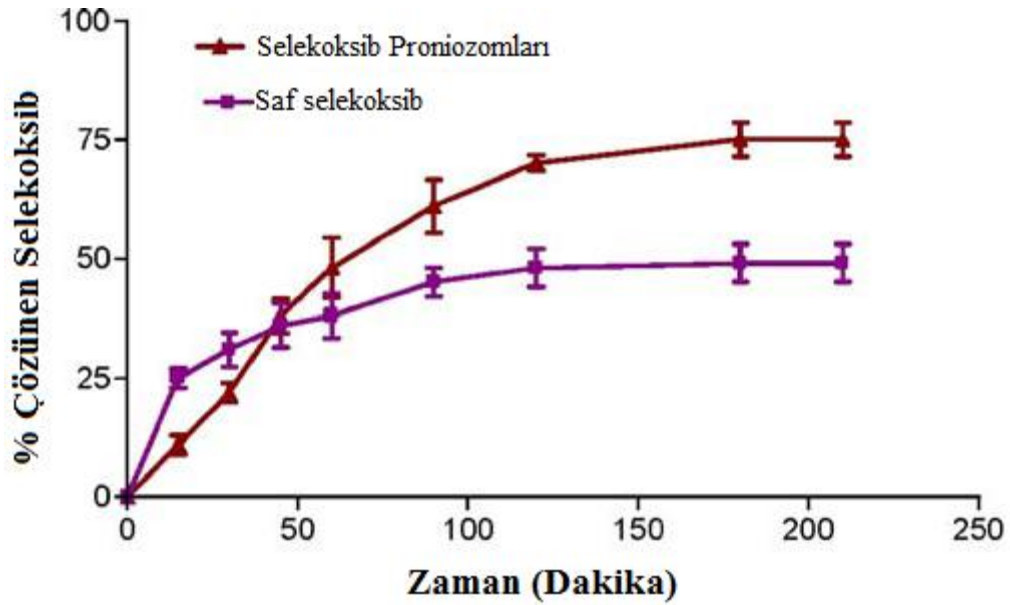
1.11. Proniozomlarda Stabilite

Yapılan çalışmalarda stabilite çalışmaları hazırlanan proniozomların buzdolabı sıcaklığı (2-8 °C), oda sıcaklığı (25°C, %60 bağıl nem) ve yüksek sıcaklık (45 ±0,5 °C) gibi değişik sıcaklık koşullarında, sıkı kapalı kaplarda bir aydan üç aya kadar saklanması sonucu tamamlanmıştır. Etkin madde miktarındaki değişim, vezikül yapısındaki değişim, tozun görüntüsü gibi değişik özellikleri belirli periyotlarda izlenmiştir (Chandra ve ark., 2009, Gupparu ve ark., 2011, Kumar ve Rai, 2011).

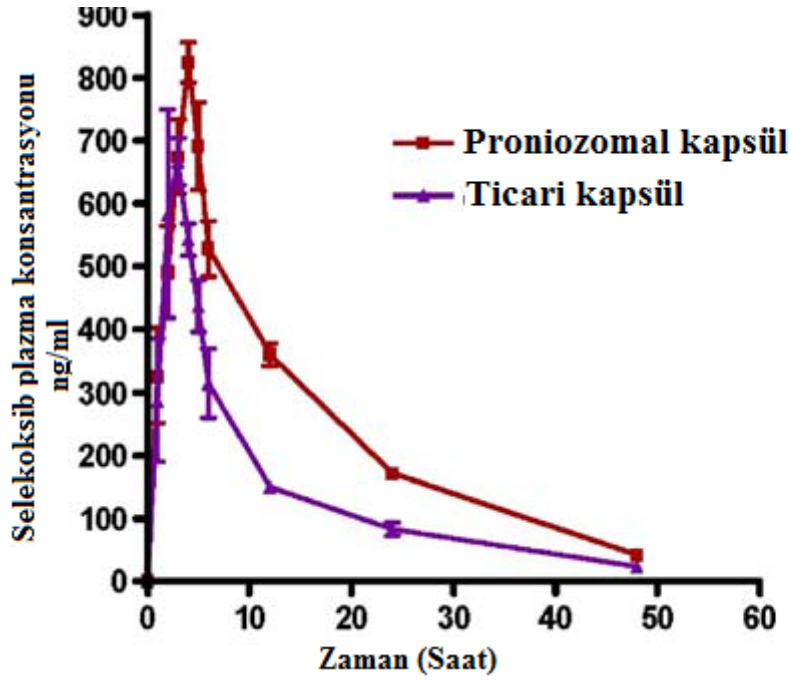
ICH kılavuzları, ilaçlar için stabilite çalışmalarını, hızlandırılmış koşullarda %75 bağıl nemde ve 40°C'de, her iklim kuşağı ve o kuşağa ait koşullar altında yapılmasını önermektedir. Uzun süreli stabilite çalışmaları için koşullar, iklim kuşağı I ve II'de yer alan ülkeler için 25°C / %60 bağıl nem, iklim kuşağı III ve IVa'da yer alan ülkeler için 30°C / %65 bağıl nem ve iklim kuşağı IVb'de yer alan ülkeler için 30°C / %75 bağıl nemdir (Akhilesh ve ark., 2012, Jukanti ve ark., 2010, Markens, 2009).

1.12. Proniozomlarla Yapılmış Çalışma Örnekleri

Oral olarak kullanılması için selekoksib ile yapılan bir çalışmada, sudaki çözünürlüğü düşük olan selekoksib, ardışık sprey metodu ile hazırlanan proniozomlara yüklenmiştir. Proniozomlarda span 60, kolesterol ve disetil fosfat sırasıyla 1:1:0,1 molar oranlarda kullanılmıştır. Etkin madde tutulma yüzdesi %95 civarında bulunmuştur. Hazırlanan proniozomların saf selekoksib toz ile kıyaslandığında çözünürlüğü önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. 200 mg tek dozluk selekoksibin proniozom formülasyonu ve klasik ticari selekoksib kapsülü biyoyararlılık çalışmaları gönüllü insan deneklerde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki proniozomal toz selekoksibin absorpsiyon miktarını klasik kapsüle göre önemli ölçüde artırmıştır (Şekil 1.7 ve 1.8) (Nasr, 2010).



Şekil 1.7. Selekoksib proniozomları ve saf selekoksibin çözünme hızı grafiği (Nasr, 2010).



Şekil 1.8. İnsan deneklerde (n=6) 200 mg tek dozluk proniozomal formülasyon ve ticari kapsül uygulamasından sonra ortalama plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi ($\pm$ SS) (Nasr, 2010).

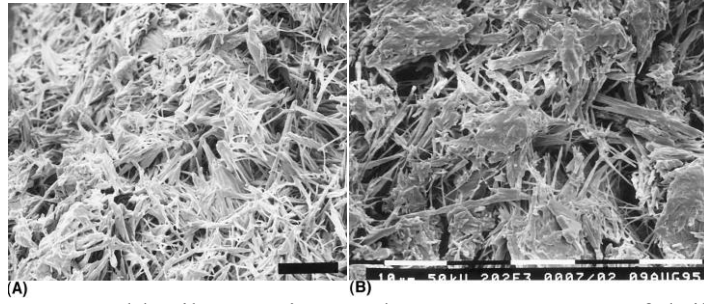
Chandra ve Sharma (2008), piroksikam etkin maddesine ait proniozom formülasyonunun, jel formülasyonu halindeki çıkış deneylerini sıçanların karın derisinde incelemişler, klasik jel formülasyonuna göre madde çıkışında daha fazla gelişim gözlemişlerdir. Oluşan niozomlar vezikül büyüklüğü ve etkin madde tutulma yüzdesi açısından değerlendirilmiştir. Span 60'la hazırlanan veziküller hem daha küçük hem de daha fazla etkin madde tutulumu sergilerken, span 80'le hazırlanan veziküller en az etkin madde tutulumu sergilemişlerdir. Lesitinin ilavesi daha fazla etkin madde tutulumu sağlamıştır. Maksimum akış- $35,61 \mu\text{g}/\text{cm}^3/\text{s}$ değeri, bir kontrol jeliyle kıyaslandığında 7,39 kez daha fazla akışa ulaşıldığı gözlenmiştir.

Chandra ve ark. (2009), en yüksek etkin madde tutulumunu sergilemesi yönünden değişik yüzey aktif madde ve kolesterol oranları kullanarak bir dizi proniozom formülasyonu hazırlamışlardır. Tutulan madde yüzdesi, tutulmayan kısmın diyaliz yöntemiyle ayrılması ile hesaplanmıştır. Mikroskopla inceleme, tüm formülasyonlardan elde edilen niozomların benzer şekil ve partikül boyutu sergilediğini göstermiştir. Niozomlardan hazırlanan 24 saat boyunca sürdürülen in

vitro salım çalışmaları, uzatılmış bir salım sergilemiştir. Stabilité çalışmalarında görülmüştür ki veziküllerden en az 4°C' de saklamada ve sırasıyla 25° ve 37°C' de saklamada ilaç sızıntısı olmuştur. In vitro çalışma sonuçlarından hareketle en iyi tutulmayı gösteren ve uygun salım şekli sergileyen formülasyon in vivo olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak niozomal indometazin formülasyonu artan biyoyararlılık ve uzatılmış ilaç salım profiliyle ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmayı vaat edebilir.

Mokhtar ve ark. (2008), antienflamatuvar bir etkin madde olan flurbiprofeni proniozomlar içine yükleyip jel ve çözelti halinde vücuda uygulamayı amaçlamışlardır. Çalışmada noniyonik yüzey etkin madde olarak span 80, span 60, span 40 ve span 20 kullanılmıştır. Sonuç olarak etkin madde yükleme etkinliğinin formülasyondaki lipid miktarına, kolesterol miktarına, etkin madde miktarına ve serbest etkin maddenin niozomal veziküllerden ayrılmasında kullanılan yöntemle bağlı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca en stabil veziküller kolesterol miktarı formülasyonun % 10'u olduğunda elde edilmiştir.

Hu ve Rhodes (1999) yaptıkları çalışmada sorbitolü taşıyıcı olarak kullanarak Span 60-kolesterol-disetil fosfat'ın kloroform:etanol karışımı içinde çözeltisi ile kaplamışlar ve taşıyıcı maddenin ve proniozomal tozun yüzey morfolojisini tarayıcı elektron mikroskobu ile incelemişlerdir. Taşıyıcı maddede keskin kenarlı yapılar gibi birçok düzensizlik olduğunu saptamışlardır, proniozomal tozda ise bu düzensizliklerin azaldığını ve yapının daha pürüzsüz hale geldiğini saptamışlardır (Şekil 1.9). Ayrıca taşıyıcı madde olan sorbitolün yığın açısının proniozomal tozdan fazla olduğunu saptamışlardır. Hatta proniozom yapısındaki sorbitol miktarı iki katına çıkarıldığında bile yığın açısı değerinin sade haldeki sorbitolden daha az olduğunu saptamışlardır. Bu sonuç proniozomal tozun serbest haldeki taşıyıcı maddeden daha iyi akış özelliğine sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 1.4) (Hu ve Rhodes, 1999).



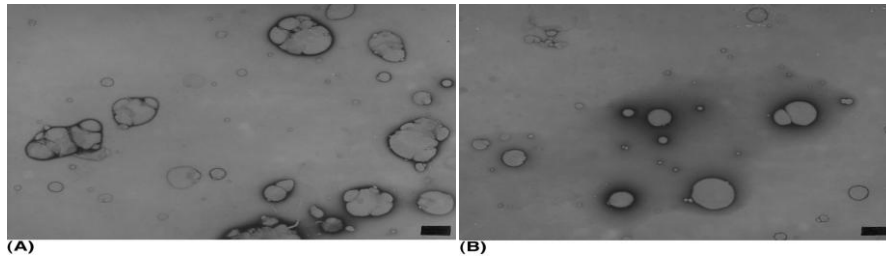
Şekil 1.9. Taşıyıcı madde ile proniozomal tozun yüzey morfolojilerinin tarayıcı electron mikroskobu ile karşılaştırılması (Hu ve Rhodes, 1999).

Çizelge 1.4. Taşıyıcı madde olan sorbitol tozu ile proniozomal tozların yığın açılarının karşılaştırılması (2x: İki kat sorbitol içeren proniozom) (Hu ve Rhodes, 1999)

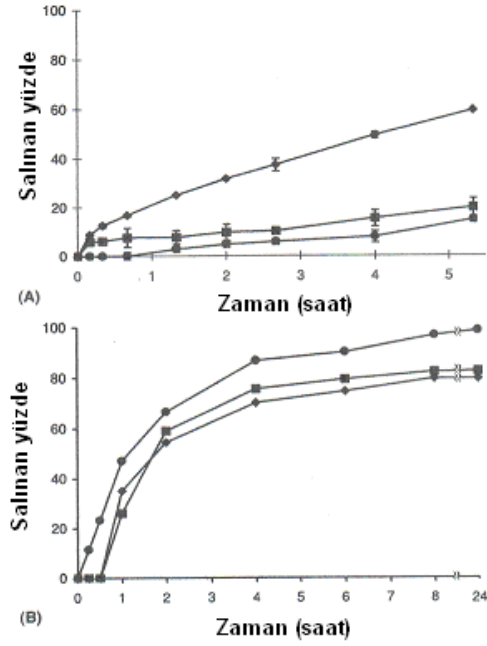
	Yığın Açısı $\pm$ S.S.*
Sorbitol	43,19 $\pm$ 0,75
Proniozom	34,66 $\pm$ 2,10
Proniozom (2x)	37,65 $\pm$ 1,07

*: Standart Sapma

Elektron mikroskop bulgularına göre, proniozomların hidrasyonuyla elde edilen niozomlar, klasik niozomlara göre daha tekdüze ve daha homojen olduğu gözlenmiştir (Şekil 1.10). Proniozomların morfolojileri, partikül büyüklükleri ve partikül büyüklüğü dağılımları ve *in vitro* mide ya da bağırsak sıvısı içindeki etkin madde (ibuprofen) salım performanslarının en az klasik niozomlar kadar iyi olduğu saptanmıştır; proniozomlar, ibuprofenin mide sıvısında salımını azaltırken bağırsak sıvısında artırmıştır (Şekil 1.11.) (Hu ve Rhodes, 1999).



Şekil 1.10. A: Konvansiyonel niozomların, B: Proniozomların hidrasyonuyla elde edilen niozomların optik mikroskop görüntüleri (Hu ve Rhodes, 1999)

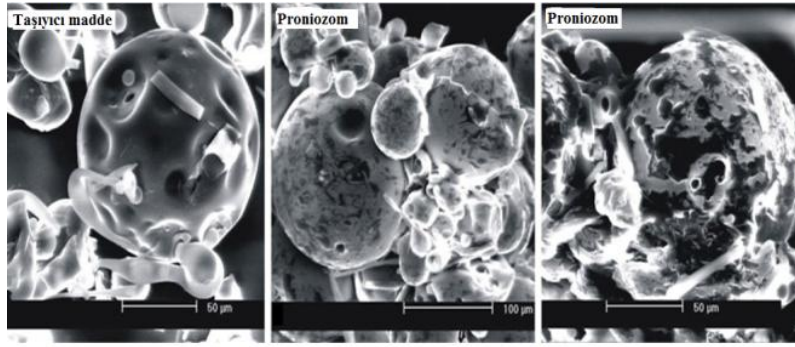


Şekil 1.11. (A) suni mide sıvısında ve (B) suni bağırsak sıvısında ibuprofenin salımı (●: proniozomların dehidratasyonu ile oluşturulan niozomlar; ■: klasik niozomlar; ◆: ibuprofen çözeltisi) (Hu ve Rhodes, 1999).

Mokhtar ve Zidan (2010), flurbiprofen etkin maddesini içeren, bir seri yüzey aktif madde (Span 20/40/60) ve kolesterol kullanılarak üretilen proniozom jel formülasyonlarını hazırlamışlardır. Kararlı durum transdermal akış (SSTF), permeabilite katsayısı (PC) ve tutulan etkin madde yüzdesini incelemişlerdir. Doymuş yağ bölgesindeki (hidrofobik) zincir uzunluğu permeabilite ve etkin madde tutulumunu etkileyen en önemli faktördür. Ayrıca, kısa hidrofobik zincir ve minimum kolesterol içeriğiyle permeasyonun en yüksek olduğu ve etkin madde tutulumunun en düşük olduğu yapı sağlanmıştır.

Solanki ve ark. (2008), aseklofenak etkin maddesini proniozomlar içine yüklemişlerdir. Formülasyonda etkin maddenin lipit tabakasına oranı, yüzey aktif madde miktarı ve hidrasyon hacmi seçilen değişkenler olmuş ve bu değişkenler ortalama partikül çapı ve yüklenen etkin madde yüzdesine (sabitler) göre değerlendirilmiştir. Bir polinom eşitliği hazırlayarak en uygun formülasyonu seçmişler ve bu formülasyon üzerinde stabilite çalışmaları yapmışlardır.

Solanki ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada taşıyıcı madde olarak maltodekstrin ve proniozom tozunun yüzey morfolojilerini incelemişlerdir; taşıyıcı partiküllerinin poröz yüzey yapısının yüzey etkin madde ile efektif bir kaplama için uygun olduğunu ve daha büyük bir alan oluşturduğunu belirtmişlerdir. Soldan sağa artan miktarda kaplamanın (2. ve 3. resim) ise proniozomların yüzeyinin düzgünlüğünü ve kaplamanın homojen dağılımını bozduğunu gözlemişlerdir (Şekil1.12).



Şekil 1.12. Taşıyıcı maddenin ve proniozomların tarayıcı elektron mikroskop görüntüleri (Solanki ve ark., 2007)

Çizelge 1.5.'te daha önce yapılmış olan çalışmaların kısa bir özeti sunulmaktadır.

Çizelge 1.5. Proniozomlarla yapılmış çalışma örnekleri (Aggarwal ve ark., 2012)

<i>Etkin Madde</i>	<i>Kategori</i>	<i>Kullanılan Maddeler</i>	<i>Sonuç</i>
Flurbiprofen	NSAİİ	Span (20, 40, 60, 80), mutlak etanol, kolesterol	Kolesterolsüz proniozomlarda etkin madde salım hızı daha yüksek bulunmuştur.
Levonorgesterol	Anti kontraseptif	Span 40, kolesterol, alkol, lesitin,	Çalışma göstermiştir ki levonorgesterol içerikli proniozomal transdermal jeller etkili kontrasepsiyon için uygun bulunmuştur.
Selekoksib	Siklooksijenaz inhibitörü	Spanlar, kolesterol, lesitin, metanol, etanol	Selekoksibte biyoyararlanım artışı
Piroksikam	NSAİİ	Span 60, lesitin, kolesterol, etanol	Lipit veziküllerine göre Span 60 kaynaklı lesitin vezikülleri daha fazla etkin madde taşıması sağlar
Haloperidol	Nöroleptik etkin madde	Yüzey aktif maddeler, alkol, kolesterol	Tek bir yüzey aktif madde kullanımı, birden çok yüzey aktif madde kullanımına göre derinden emilimi artırabilmektedir.
Ketorolak	NSAİİ	Span 60, etanol, kolesterol, lesitin	Veziküller içerisine yüklenmiş etkin madde oranı artmıştır.
Kaptopril	Antihipertansif	Yüzey aktif maddeler, alkol, kolesterol, lesitin,	Kaptoprilde uzatılmış salım
Östradiol	Steroidler	Span, tween, lesitin, kolesterol	Proniozomal formülasronlardaki yonik olmayan yüzey aktif maddeler etkin maddenin deriden emiliminde artışa yardımcı olmuşlardır.
Losartan potasyum	Antihipertansif	Span (20,40,60,80), tween(20,40,60), kolesterol	Etkin maddenin biyoyararlanımı ve deriden emiliminde artış
Klorfeniramin maleat	Antihistamin	Span 40, alkol, kolesterol, lesitin	Span 40 proniozomları en uygun stabilite, yükleme etkinliği, partikül büyüklüğü ve etkin maddenin transdermal taşınması için uygun çıkış kinetikleri sergilemiştir.
Tenoksikam	NSAİİ	Tween 20, spanlar, kolesterol, alkol	Lesitinsiz proniozomal jel en yüksek stabilite ve etkin madde yükleme etkinliği sergilemiştir
Alprenolol hidroklorid	Antihipertansif	Maltodekstrin, yüzey aktif maddeler, kolesterol, alkol	Maltodekstrinin kullanımı etkin maddenin salınımına yardımcı olmaktadır.

1.13. Kandesartan Sileksetil

1.13.1. Kandesartan Sileksetilin Fizikokimyasal Özellikleri

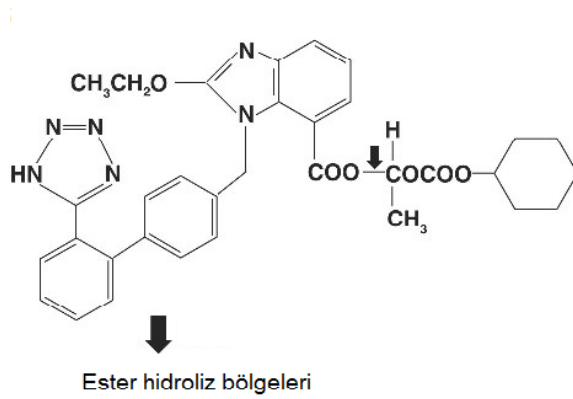
Beyazla kirli beyaz arası değişen kristal yapıda bir tozudur. Mevcut üç polimorfu bulunmaktadır: stabil olan form I ve form II, stabil olmayan amorf formu. Ticari olarak bulunan stabil olan form I'dir. (Matsuna ve ark., 1999). Molekül ağırlığı 610,67 (g/mol)'dür. Pratik olarak suda çözünmez [5×10^{-5} g/l, 0,0003 mg/ml (Nekkanti ve ark., 2009)], metanolde zor çözünür (PDR 2007, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Atacand Tablet Folder).

1.13.2. Kimyasal Yapısı ve Kapalı Formülü

Kimyasal yapısı: $(\pm)$ -1-(Sikloheksiloksikarboniloksi)etil-2-etoksi-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1Hbenzimidazol-7-karboksilat

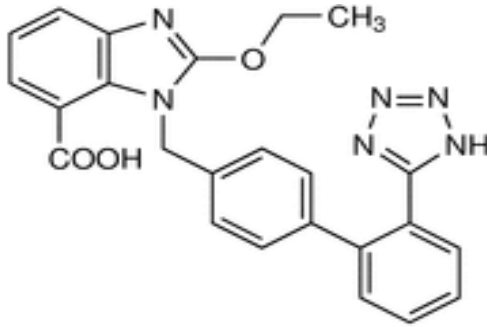
Kapalı Formülü: $C_{33}H_{34}N_6O_6$

1.13.3. Açık Formülü



**Kandesartan
Sileksetil**

↓Ester hidrolizi



Kandesartan

1.13.4. Farmakolojik Özellikleri

Kandesartan sileksetil, yüksek tansiyon ve konjestif kalp yetmezliği tedavilerinde kullanılan peptid olmayan yapıda anjiyotensin II tip-I (AT1) reseptör antagonistidir (Neeharika ve ark., 2012). Oral kullanıma uygun bir ön ilaçtır. Gastro-intestinal kanaldan emilimi sırasında ester hidrolizi sonucu hızla, aktif formu olan kandesartana dönüşür. (PDR, 2007).

Kandesartan, AT1 reseptörlerine selektif olarak sıkı bağlanan ve yavaş ayrılan, bir anjiyotensin II reseptör antagonistidir. Agonist aktivitesi yoktur.

Hipertansiyon ve kalp yetmezliğinde endikedir. Piyasa preparatlarında tiyazid grubu diüretiklerle kombine halde bulunabilir. Piyasa preparatları 4 mg, 8 mg, 16 mg ve 32 mg'lık tabletler halindedir.

1.13.5. Farmakokinetik Özellikleri

Oral yolla kandesartan sileksetil uygulamasını takiben, kandesartana ait mutlak biyoyararlılık %15 olarak tespit edilmiştir. Plazma yarı ömrü 9 saattir. Plazmada proteinlere %99'dan daha fazla bağlanır. Kan hücrelerine bağlanmaz. Dağılıma hacmi 0,13 L/kg'dır. Kandesartan esas olarak idrar ve safra yoluyla değişmeden atılır, çok küçük bir kısmı karaciğerde metabolize edildikten (CYP2C9 ile) sonra atılır. Kanda maksimum konsantrasyona (C_{max}) ulaşma süresi (T_{max}) 3 ila 4 saat arasındadır.

Karaciğerde O-deetilasyon ile minör hepatik metabolizmaya maruz kalarak inaktif metabolitine dönüşür. Kandesartanın serum konsantrasyonu-zaman eğrisi altındaki alan (AUC) gıda alımından belirgin olarak etkilenmez. Yüksek yağ içeriğine sahip besinler kandesartan sileksetil uygulamasından sonra kandesartan biyoyararlılığını etkilemez.

Kandesartan esas olarak idrar ve safra yoluyla değişmeden atılır, çok küçük bir kısmı karaciğerde metabolize edildikten sonra atılır. Kandesartanın toplam plazma klerensi yaklaşık 0.37 ml/dak/kg, renal klerensi ise yaklaşık 0.19 ml/dak/kg'dır. Kandesartanın renal eliminasyonu, hem glomerüler filtrasyon hem de aktif tübüler sekresyon ile gerçekleşir. C14 işaretli kandesartan sileksetilin oral uygulanmasından sonra dozun yaklaşık %26'sı idrarla kandesartan olarak, %7'si inaktif metabolit olarak, yaklaşık %56'sı da feçeste kandesartan olarak ve % 10'u inaktif metabolit olarak atılır.

1.13.6. Tanıma ve Miktar Tayini Yöntemleri

Ultraviyole Spektrum: Sulu asitte (0,2 M H₂SO₄) 246-281 nm; etanolde 251 nm; sulu baz ortamda (0,5 M NaOH) 251 nm (Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 5th Ed.).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi: Serumda ya da idrarda kandesartanın teşhis alt sınırı 2 µg/L, kandesartan sileksetilin 10 µg/L'dir (Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 5th Ed.).

-Kandesartan sileksetilin kare dalgalı adsorblayıcı voltametrik tayini (Süslü ve ark., 2009).

- Sıvı kromatografisi ve sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (Mehta ve ark., 2009).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler ve Kimyasal Maddeler

2.1.1. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Cam malzemeler	İldam (Türkiye)
C8 ters faz HPLC kolonu (250mm x 4,6 mm x 5µm)	Phenomenex Luna C8 (ABD)
Çözünme hızı cihazı	Sotax AT7 SMART (İsviçre)
Dağılma testi cihazı	Aymes (Türkiye)
Taramalı elektron mikroskobu	FEI Quanta 400 FEG (ABD)
Hassas terazi	Sartorius BL 210 S (Almanya)
İklim dolabı	Nüve İD 501 (Türkiye)
Kumpas	Inoxyd (Almanya)
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC (Almanya)
Manyetik karıştırıcı	Heidolph (Almanya)
Membran filtre (Selüloz asetat, 0,45 µm)	Sartorius (Almanya)
Mikropipetler (10-100 µl ve 100-1000 µl)	Rainin (ABD)
Mikropipet uçları (10-100 µl ve 100-1000 µl)	LP Italiana Spa (İtalya)
Mikroskop	Leica DM 4000B (Almanya)

Monsanto sertlik tayin aleti	Pennwalt Stokes (ABD)
Paket Programlar	SPSS 9,0 (ABD); Kinetika (ABD)
pH-metre	Mettler Toledo S-20 K (İsviçre)
Plastik enjektör	Ayset (Türkiye)
Rotavapor	BUCHI R200 (Almanya)
Santrifüj cihazı	Hettich-Mikro 12-24 (Almanya)
Su arıtma sistemi	Milipor Mili-Q Gradient A10 (ABD)
Ultrasantrifüj cihazı	Beckman Optima XL-100K (Almanya)
Ultrasantrifüj tüpü	Beckman (Almanya)
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30 (Almanya)
UV Spektrofotometre	Schimadzu Mini 1240 (Japonya)
Vorteks	Heidolph reax-top (Almanya)
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Agilent 1100 series (Almanya)
Zeta potansiyel ve partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments (İngiltere)

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit	Riedel de H��en (Almanya)
Asetonitril (HPLC grade)	Merck (Almanya)
Çinko sülfat	Kimetsan (Türkiye)
Disetil fosfat (DCP)	Sigma (ABD)
Disodyum hidrojen fosfat	Fluka (Almanya)
Formik asit (% 98-100)	Riedel de H��en (Almanya)
Granulac 70	Meggle (Almanya)
Granulac 200	Meggle (Almanya)
Granulac 230	Meggle (Almanya)
Heparin	Sigma (ABD)
Hidroklorik asit (% 37a/h)	Merck (Almanya)
Hidroksipropil metilselüloz	Sigma, ABD
Irbesartan	Sigma (ABD)
Kandesartan	Dr.Reddy's (Hindistan)
Kandesartan sileksetil	Dr.Reddy's (Hindistan)
Kloroform (HPLC grade- LiChrosolv)	Merck (Almanya)
Kolesterol	Sigma (Japonya)
Kollidon CL	Basf (Almanya)
Magnezyum sülfat	Merck (Almanya)
Maltodekstrin	Aldrich (ABD)

Metanol (HPLC grade)	Merck (Almanya)
Mikrokristal selüloz	FMC (Belçika)
Monobazik potasyum fosfat	Sigma-Aldrich(Almanya)
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck (Almanya)
Sodyum asetat	Merck (Almanya)
Sodyum hidroksit	Riedel de H��en (Almanya)
Sodyum klorür	Carlo Erba (��talya)
Sorbitol	BioShop (Kanada, Burlington)
Span 60	Sigma (ABD)
Stearilamin	Sigma (ABD)
Tersiyer b��til metil eter	Merck (Almanya)
Kandesartan sileksetil ticari tabletleri (8 mg)	Lot No: Nach092015
Tween 20	Merck (Almanya)
Tween 80	Merck (Almanya)

2.2. Yöntem

2.2.1. Kandesartan Sileksetilin UV Spektrumunun Belirlenmesi

Kandesartan sileksetilin miktar tayinlerinde kullanılacak olan standart doğru denkleminin oluşturulması için UV spektrumu alınmıştır. Bunun için 25 mg kandesartan sileksetil 50 ml metanol içinde çözülerek stok çözeltisi hazırlanmıştır; bu stok çözeltiden alınan numunelerin, miktar tayininde ve çözünme testlerinde kullanılacak olan farklı ortamlarla seyreltikten sonra UV spektrofotometresinde 200-400 nm arasında spektrumları alınmış ve maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyları ($\gamma_{\max}$) saptanmıştır.

2.2.1.1. Kandesartan Sileksetilin UV Spektrofotomerik Yöntemle Standart Doğrularının Hazırlanması

Metanol içinde kandesartan sileksetilin 25 mg/50ml'lik stok çözeltisinden alınan farklı miktardaki numuneler, miktar tayini için metanol ile ve çözünme testi için aşağıda belirtilen çözünme ortamları ile 10'ar ml'ye seyreltilerek, her bir ortam için bir seri artan konsantrasyonda etkin madde içeren çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerin absorbans değerleri, Bölüm 2.2.1'de anlatıldığı şekilde belirlenen $\gamma_{\max}$ dalga boylarında okunmuştur. Elde edilen absorbans verileri ile konsantrasyona bağlı olacak şekilde SPSS(IBM® SPSS® Statistics Version 20) paket programında lineer regresyon denklemleri oluşturulmuştur. Determinasyon katsayısı en yüksek ve artık kareler ortalaması en düşük olan seriye ait doğru denklemi çözünme hızı çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir (n=3).

2.2.1.2. Çözünme Hızı Testlerinde Kullanılan Ortamlar

1. pH 1,2 suni mide sıvısı
2. %0,2 a/h Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı
3. pH 4,5 asetat tamponu
4. %0,2 a/h Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu
5. pH 6,8 fosfat tamponu
6. %0,2 a/h Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponu
7. %0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponu

pH 1,2 Enzimsiz Suni Mide Sıvısı (USP 30-NF 25)

Hidroklorik asit, derişik7 mL

Sodyum klorür.....2 g

Distile su.....y.m.....1000 mL

Hazırlanışı:

Sodyum klorür, balonjojede derişik hidroklorik asit çözeltisinde çözülür ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

% 0,2 a/h Tween 80 İçeren pH 1,2 Enzimsiz Suni Mide Sıvısı (USP 30-NF 25)

Hidroklorik asit, derişik7 mL

Sodyum klorür.....2 g

Tween 80.....2 g

Distile su.....y.m.....1000 mL

Hazırlanışı:

Sodyum klorür derişik hidroklorik asit çözeltisinde çözölür; Tween 80 eklenir ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

pH 4,5 Asetat tamponu (USP 30-NF 25)

Sodyum asetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).....2,99 g
 Asetik asit (2N CH_3COOH).....14 mL
 Distile su.....y.m.....1000 mL

Hazırlanışı:

Sodyum asetat ve asetik asit distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

% 0,2 a/h Tween 80 içeren pH 4,5 Asetat tamponu (USP 30-NF 25)

Sodyum asetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).....2,99 g
 Asetik asit (2N CH_3COOH).....14 mL
 Tween 80.....2 g
 Distile su.....y.m.....1000 mL

Hazırlanışı:

Sodyum asetat ve asetik asit üzerine Tween 80 eklenir ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

pH 6,8 Enzimsiz Suni Barsak Sıvısı (USP 30-NF 25)

I. Monobazik potasyum fosfat (KH_2PO_4) çözeltisi.....250 mL
 II 0,2 N Sodyum hidroksit(NaOH) çözeltisi.....77 mL

Distile su.....y.m.....1000 mL

I. 6,8 g monobazik potasyum fosfat 250 mL distile suda çözülür.

II. 8g sodyum hidroksit 1000 mL distile suda çözülür.

Hazırlanışı:

250 mL I. çözelti üzerine 77 mL II. çözelti eklenir . 0,2 N hidroklorik asit veya 0,2 N sodyum hidroksit ile pH 6,8'e ayarlanır ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

% 0,2 a/h Tween 80 içeren pH 6,8 Enzimsiz Suni Barsak Sıvısı (USP 30-NF 25)

I. Monobazik potasyum fosfat (KH_2PO_4) çözeltisi.....250 mL

II 0,2 N Sodyum hidroksit(NaOH) çözeltisi.....77 mL

Tween 80.....2 g

Distile su.....y.m.....1000 mL

I. 6,8 g monobazik potasyum fosfat 250 mL distile suda çözülür.

II. 8g sodyum hidroksit 1000 mL distile suda çözülür.

Hazırlanışı:

250 mL I. çözelti üzerine 77 mL II. çözelti eklenir ve 2g Tween 80 eklenir. 0,2 N hidroklorik asit veya 0,2 N sodyum hidroksit ile pH 6,8'e ayarlanır ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

%0,35 a/h Tween 20 içeren pH 6,5 Fosfat tamponu (*FDA Dissolution Methods Database, USP 30-NF 25*)

I. Monobazik potasyum fosfat (KH_2PO_4) çözeltisi.....250 mL

II 0,2 N Sodyum hidroksit(NaOH) çözeltisi.....75 mL

Tween 20.....3,5 g

Distile su.....y.m.....1000 mL

I. 6,8 g monobazik potasyum fosfat 250 mL distile suda çözülür.

II. 8g sodyum hidroksit 1000 mL distile suda çözülür.

Hazırlanışı:

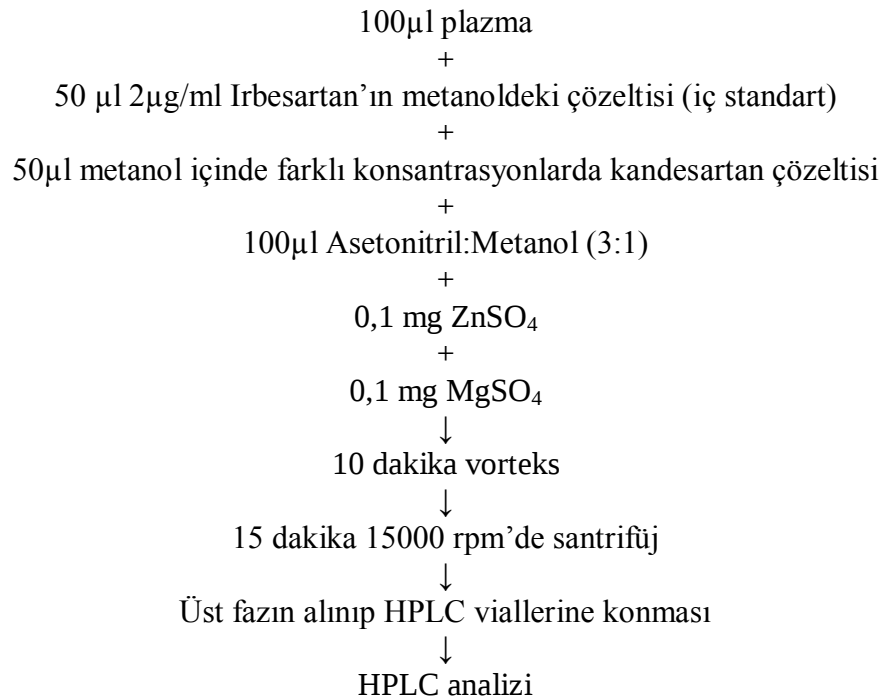
250 mL I. çözelti üzerine 75 mL II. çözelti ve 3,5g Tween 20 eklenir. 0,2 N hidroklorik asit veya 0,2 N sodyum hidroksit ile pH 6,5'e ayarlanır ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

2.2.1.3. Kandesartanın Plazmadaki Miktar Tayinini Yapmak Amacıyla Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Standart Doğrusunun Hazırlanması

İn vivo çalışmalarda plazmada etkin madde miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Öncelikle kandesartanın ve internal standart olan irbesartanın metanol içindeki stok çözeltileri kullanılarak, HPLC'de mobil faz oranları, akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi parametreler değiştirilmiştir ve iki maddeye ait piklerin çakışmadığı en uygun HPLC parametreleri belirlenmiştir. Seçilen yöntemde mobil faz olarak sırasıyla 26:26:48 (h/h) oranlarında asetonitril:metanol:tampon bileşimi seçilmiştir. Kullanılan tampon, pH'sı 3 olan 10 mM KH_2PO_4 tamponudur. Mobil faz akış hızı 1 ml/dak, enjeksiyon hacmi 35 μL , sıcaklık 35°C olarak ayarlanmıştır. Kullanılan kolon phenomenex C8 kodlu HPLC kolonudur.

Kandesartanın metanol içindeki bir seri farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanarak aşağıda verilen akış şemasına göre kalibrasyonu yapılmıştır. Aynı işlem üç farklı stok çözelti üzerinde tekrarlanmıştır. Bilinen kandesartan konsantrasyonlarına (x) karşı elde edilen kandesartan/irbesartan alan oranı (y) değerleri grafiğe geçirilerek standart doğru denklemi hazırlanmıştır.

Akış Şeması



pH 3, 10 mM Fosfat Tamponunun hazırlanışı

Monobazik potasyum fosfat (KH₂PO₄).....1,36 g

Distile suy.m.....1000 mL

Hazırlanışı:

1,36 g potasyum fosfat 1000 mL suda çözülür. 0,2 N HCl ile uygun pH'ya getirilir.

2.2.1.4. Farklı Ortamlardaki Standart Doğruların Analitik Validasyonu ve İstatistiksel Verileri

ICH Q2 (R1)'de analitik yöntemin validasyonunda, hangi kategorilerde hangi parametrelerin valide edileceği Çizelge 2.1'de verilmektedir. Burada teşhis testleri, bir örnekteki analiti tanımayı sağlamak için tasarlanır. Normalde bir örneğe ait herhangi bir özelliği (örn; spektrum, kromatografik özellikler, kimyasal aktivite vs.) bir referans ile karşılaştırma sonucu elde edilir. İmpüriteler için yapılacak testler nicel ya da limit(sınır) testi olabilir. Her iki test de örnekteki impüriteyi doğru olarak yansıtır şekilde tasarlanmıştır. Farklı özellikteki geçerlilik karakterleri limit testinden çok nicel testler için gerekmektedir. Analiz yöntemleri ise verilen örnekteki mevcut analiti ölçmek için tasarlanmıştır. Analiz etkin maddeye ait verilen numunede var olan önemli içerikleri nicel ölçüm şeklinde sergilemektedir. İlaç şeklinde de benzer geçerlilik karakterlerinin özellikleri uygulanabilir olmalıdır (etkin madde ya da seçilen diğer maddeler için).

Çizelge 2.1. Analitik validasyon parametreleri [ICH Q2(R1)]

Analitik başarımların göstergeleri	Teşhis	Saflık analizi		Analiz
	Miktar Tayini	Sınır Testleri		
Doğruluk ve Geri Elde	-	+	-	+
Kesinlik				
Tekrarlanabilirlik	-	+	-	+
Tekraryapılabilirlik	-	+	-	+
Özgüllük	+	+	+	+
Tayin sınırı	-	-	+	-
Niceleme sınırı	-	-	-	-
Doğrusallık	-	-	-	+
Aralık	-	-	-	+

2.2.1.4.1. Doğruluk ve Geri Elde

Bunun için her bir ortamda 3 farklı konsantrasyonda numune çözeltileri hazırlanmış ve her birinden 6 kez ölçüm yapılmıştır. Standart doğru denklemlerinden

hesaplanan konsantrasyon değerlerinden hareketle % geri elde değerleri bulunmuştur. Sonuçlar % geri elde değerlerinin ortalaması, standart sapması ve % bağıl standart sapması şeklinde verilmiştir.

2.2.1.4.2. Kesinlik

Bir analitik işlemde kesinlik, belirlenen şartlar altında aynı homojen numunenin birden fazla sayıdaki analizinden elde edilen ölçümlerin yakınlığını ifade eder. Kesinlik 3 başlık altında incelenmektedir: Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik.

Tekrarlanabilirlik, aynı koşullar altında ve kısa bir zaman aralığında yöntemin kesinliğini göstermek için yapılır. Aynı analist tarafından yüksek, orta ve düşük konsantrasyondan etkin maddeye ait çözeltiler hazırlanarak bu çözeltilerden 6 okuma yapılmış ve kalibrasyon denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar hesaplanmış ve yüzde bağıl sapma (% BS) değerleri bulunmuştur.

Tekrar elde edilebilirlik, farklı cihaz, farklı gün, farklı analist ile yapılan değişiklikler sonucu yöntemin kesinliğini tanımlamak için yapılır. Etkin maddenin miktar tayininde kullanılmak için yapılan kalibrasyonlarda farklı günlerdeki ara kesinliğin tayini için analist tarafından yüksek, orta ve düşük konsantrasyonda çözeltiler hazırlanarak spektrofotometrede 3 gün ardı ardına 6'şar okuma yapılmıştır. Okunan değerler standart doğru denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar ve elde edilen sonuçlara ait % BS değerleri hesaplanmıştır.

Farklı analistlere ait ara kesinliğin tayininde ise UV-spektrofotometresinde farklı ortamlarda 0,015 mg/ml teorik konsantrasyonundan hareketle çözeltiler hazırlanarak 6'şar okuma yapılmış ve elde edilen absorbanslar standart doğru denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar ve bunlara ait % BS değerleri hesaplanmıştır.

2.2.1.4.3. Teşhis ve Tayin Alt Sınırı

Herbir ortam için üç paralel kalibrasyonun en düşük değerindeki absorbanslarından standart sapma değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin ortalaması, seçilen kalibrasyon doğrusunun eğimine bölünmüştür. Bu değer 3,3 ile çarpılarak teşhis sınırı (LOD), 10 ile çarpılarak da tayin sınırı (LOQ) belirlenmiştir.

2.2.2. Proniozom Formülasyonlarının Hazırlanması ve Kritik İşlem Parametrelerinin Belirlenmesi

Formülasyonların üretiminde bulamaç yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle göre hesaplanan miktarlarda kandesartan sileksetil, span 60, kolesterol ve disetil fosfat (DCP) tartılarak yuvarlak dipli cam bir balona alınmış, 10 ml kloroform eklenmiş ve sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonikasyon işleminden sonra elde edilen çözelti üzerine taşıyıcı olarak tartılıp hazırlanan sorbitol (partikül büyüklüğü: 0,25-0,50 mm) ilave edilmiş ve bulamaç halindeki karışımdan çözücünün çekilmesi için balon, 10 dakika süreyle rotavaporda buharlaştırma işlemine tabi tutulmuştur. İşlem koşulları ve formülasyon değişkenleri Çizelge 2.2’de verilmiştir. Süre sonunda elde edilen kuru toz proniozomlar, artık solvanın uçurulması için bir gece boyunca liyofilizatörde bekletilmiş ve kütle iyice kurutulmuştur. Elde edilen ürün sıkı kapalı kaplara alınarak desikatörde, oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve formülasyonun karakterizasyonu amacıyla aşağıdaki başlıklar altında verilen kontrollere tabi tutulmuştur. Yapılan ilk üretim sonrası ilk varyasyon taşıyıcı materyalin üzerinde olmuştur. Aynı kütledeki ve aynı partikül boyutu aralığında maltodekstrin ile işlem koşulları değiştirilmeden üretim yapılmıştır. Ayrıca farklı partikül büyüklüğü ortalamasına sahip Granulac® türleri ile de niozom oluşturulması incelenmiştir. Bu ve bundan sonra yapılan her üretimden elde edilen kütle, aynı saklama koşulu ve kontrollere tabi tutulmuştur. Taşıyıcı performansı değerlendirildikten sonraki değişim dönü hızında yapılmıştır. Bu adımı sıcaklık ve sonrasında yük verici ajanların formülasyon üzerindeki etkileri izlemiştir. .

Kullanılan taşıyıcılar: Sorbitol, maltodekstrin, Granulac[®] 200, 230 ve 70

Dönü hızı (rpm): 30 rpm, 60 rpm, 90 rpm

Sıcaklık: 30°C, 60°C, 90°C

Yük verici ajan: DCP, stearilamin ve yüksüz formülasyon

Çizelge 2.2. Formülasyona ve işleme ait değişkenler

Formülasyon Kodu Formülasyon Bileşenleri	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Kandesartan sileksetil	69,61 mg	69,61 mg	69,61 mg	69,61 mg	69,61 mg	69,61 mg	69,61 mg	69,61 mg
Kolesterol	44,23mg	44,23mg	44,23mg	44,23mg	44,23mg	44,23mg	44,23mg	44,23 mg
Span 60	49,28mg	49,28mg	49,28mg	49,28mg	49,28mg	49,28mg	49,28mg	49,28mg
DCP	6,49 mg	6,49 mg	6,49 mg	6,49 mg	6,49 mg	6,49 mg	-	-
Stearilamin	-	-	-	-	-	-	-	3,23 mg
Kloroform	10,00 ml	10,00 ml	10,00 ml	10,00 ml	10,00 ml	10,00 ml	10,00 ml	10,00 ml
Sorbitol	2,00 g	-	-	-	-	-	-	-
Maltodekstrin	-	2,00 g	2,00 g	2,00 g	2,00 g	2,00 g	2,00 g	2,00 g
İşleme Ait Değişkenler								
Rpm	60	60	30	90	60	60	60	60
Sıcaklık	45 °C	45 °C	45 °C	45 °C	30°C	60°C	60°C	60°C
Süre	10 dak	10 dak	10 dak	10 dak	10 dak	10 dak	10 dak	10 dak

2.2.3. Hazırlanan Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontroller

2.2.3.1. Formülasyonlarda Ürün Verimi Tayini

Formülasyonda yer alan toplam katı miktarından, ve final ürün olarak elde edilen proniozomal tozdan hareketle % ürün verimi hesaplanmıştır (Eşitlik 2.1.)

$$\% \text{ Ürün Verimi} = (A / B) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.1})$$

A : Elde edilen kütlenin miktarı (mg)

B : Formülasyondaki toplam katı miktarı (mg)

2.2.3.2. Proniozomlardan Hazırlanan Niozomlarda Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Hesaplanması

Tüm formülasyonlardan elde edilen proniozomal tozun 1g'ı, 60°C'deki distile su ile 10 mL'ye tamamlanıp hidrate edilmiştir ve 2 dakika vorteks işlemi ve takiben 45.000 rpm'de 4°C'de 1 saat süreyle ultrasantrifüj işlemi uygulanmıştır. Ultrasantrifüj işlemi sonrasında, santrifüj tüpünde üstteki berrak kısım (süpernatant) niozomal veziküllerin içine yüklenemeyen serbest etkin maddeyi içermektedir; alt kısımdaki çökelek (presipitat) ise etkin madde yüklenmiş olan niozomal vezikülleri içermektedir. Üst kısımdaki süpernatant, bir mikropipet yardımıyla presipitattan ayrılarak miktarı not edilmiştir. Analiz için elde edilen süpernatant kısımdan farklı deney tüplerine, 1'er ml alınmıştır ve üzerlerine 4'er ml metanol eklenmiştir (n=3). Maltodekstrin metanolde çözünmediği ve çöktüğü için hazırlanan çözelti 0,45 µm selüloz asetat filtrelerden süzöldükten sonra UV - spektrofotometrede metanol ortamında tespit edilen dalga boyunda okunmuştur. Bulunan absorbans değerlerinden, etkin maddenin metanol ortamındaki standart doğru denklemi kullanılarak konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuçlar, yüzde etkin madde yükleme etkinliği (% EE) şeklinde verilmiştir.

$$\% EE = \frac{\text{Yüklenen Etkin Madde Miktarı}}{\text{Teorik Etkin Madde Miktarı}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.2})$$

2.2.3.3. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Partikül Büyüklüğü Tayini

Dinamik ışık saçılımı (DLS) prensibi ile ölçüm yapan zetasizer cihazı kullanılarak, niozomal süspansiyonlarda partikül büyüklüğü dağılımı ve polidispersite indeksi tayini yapılmıştır. Analizler 25°C’de He-Ne lazer (633 nm) ile 175°’lik saçılım açısı kullanılarak yapılmıştır.

Ölçümü yapılacak olan niozom dispersiyonu, 100 mg proniozomun tartılıp, bir enderford tüp içinde 60°C sıcaklıkta 1 mL su ile 2 dakika vorteks işlemi maruziyeti sonrasında taşıyıcının çözülmesi sağlandıktan sonra 50 µL’sinin oda sıcaklığındaki 4 ml distile su ile seyreltilmesi şeklinde hazırlanmıştır. Bu dispersiyon, Whatman no.42 filtre kâğıdından süzöldükten sonra ölçüm hücreesine alınmış ve her bir numune için 6 okuma yapılmıştır.

2.2.3.4. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Zeta Potansiyeli Analizi

Niozom formülasyonlarında zeta potansiyel tayini yapmak amacıyla PALS (Phase Analysis Light Scattering) tekniği ile ölçüm yapan Zetasizer cihazı kullanılmıştır. Ölçümü yapılacak olan niozom dispersiyonu, Bölüm 2.2.3.3’te anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve her bir numune için 6 okuma yapılmıştır.

2.2.3.5. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomların Optik Mikroskop ile İncelenmesi

Proniozomlardan oluşturulan niozom dispersiyonu mikropipet yardımıyla lam üzerine damlatılmış ve, lam üzerinde yayma işlemi yapılmıştır. Sonra üzerlerine lamel kapatılmıştır ve çeşitli büyütme derecelerinde (10x, 40x, 100x) elde edilen

niozomal veziküllerin optik mikroskop görüntüleri incelenmiştir. 100x büyütmede görüntüyü netleştirmek amacıyla immersiyeon yağı kullanılmıştır.

2.2.3.6. Proniozomlarda Çözünme Hızı Çalışmaları

Çözünme hızı çalışması için kandesartan sileksetilin piyasa preparatına ait, FDA’de verilen yöntem seçilmiştir. Çözünme hızı testinde 8 mg kandesartan sileksetil içerecek şekilde hesaplanan miktarda proniozom kütlesi kullanılmıştır (FDA, Dissolution Methods). Buna göre 900 ml, %0,35 Tween 20 içeren 0,05M, pH 6,5 fosfat tamponunda, 50 rpm’de ve 37°C sıcaklıkta, palet yöntemi (USP cihaz II) ile yapılan çözünme testi 4 saat sürdürülmüş, belirlenen zaman noktalarında (10., 30., 60., 120. ve 240. dakikalar) ortamdan 5’er ml numune alınmış ve yerine aynı miktarda taze çözünme ortamı ilave edilmiştir. Alınan örnekler, çözelti içinde disperse olan niozom veziküllerinin çöktürülmesi amacıyla 1 saat 45000 rpm dönü hızında, 4°C’de ultrasantrifüj işlemine tabi tutulmuştur. İşlem sonrası santrifüj tüpü üzerinden (niozomlar çöktürüldükten sonra) 3 ml çözelti alınmış, UV-spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Elde edilen absorpsiyon değeri seçilen ortama ait standart doğru denkleminde yerine konarak çözünen madde miktarı bulunmuştur. Her bir zaman noktası için etkin maddenin salınan miktarı, % çıkan madde miktarı olarak hesaplanmıştır.

2.2.4. Sonuç Formülasyonun Seçilmesi ve Tablet Formülasyonunun Geliştirilmesi

Farklı işlem parametreleri ve formülasyon değişkenleri kullanılarak hazırlanan formüllerde (F1-F8) etkin madde yükleme yüzdesi, zeta potansiyeli, partikül boyutu ve dağılımı, çözünme hızı sonuçları gözönünde bulundurularak seçilen formülasyon F7 kodlu formülasyon olmuştur.

Bu formülden stabilite ve tablet basımı işlemi için yeteri kadar kütle elde etmek üzere seriler üretilmiştir. Bu seriler birleştirildikten sonra miktar tayini, zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü incelemesi, etkin madde yükleme yüzdesi, çözünme hızı ve optik mikroskop incelemeleri yapılmıştır. Bu formül **FS** olarak kodlanmıştır.

Sonuç formülasyondan tablet basılması için bir takım ön çalışmalar yapılmıştır. Basım çalışmaları ve basım işlemi el presiyle manuel olarak ve 10 mm çapta tablet zımbası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ön formülasyon hazırlık aşamasında basılabilirlik çalışmaları, sertlik, dağılma ve ayrıca basıma etki eden toz özelliklerini değerlendirmek amacıyla akış hızı, yığın açısı ve konsolidasyon özellikleri değerlendirilmiştir.

2.2.4.1. Konsolidasyon Özellikleri Tayini

Konsolidasyon özellikleri değerlendirilecek toz kütlesi, 10 ml'lik darası alınmış bir mezüre, 10 ml hacminde doldurularak ağırlığı saptanmış ve küme dansitesi (KD) hesaplanmıştır. Mezür 2,5 cm yükseklikten tahta bir zemin üstüne düşürme hareketiyle belli sayılardaki vuruşlardan (5, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 125, 200, 300, 500) sonra toz hacmine bakılarak hacimdeki azalmalar not edilmiştir. Bu işlem kütlenin hacmi değişmeyinceye kadar sürdürülmüştür. Buradan elde edilen sıkıştırılmış hacimden hareketle sıkıştırılmış dansite (SD) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlardan bağıl dansite değişimi (A) belirlenmiştir (Eşitlik 2.4.) :

$$A = \frac{SD - KD}{SD} \quad \text{(Eşitlik 2.3)}$$

Vuruşların doğal logaritmasına karşılık bağıl dansite değişiminin doğal logaritması grafiğe geçirilerek lineer regresyon hesaplaması yapılmıştır.

Ayrıca, deney sonrasında ulaşılan sonuç hacimden hareketle sıkıştırılmış dansite hesaplanmış ve Hausner indeksleri (HI) tayin edilmiştir (Eşitlik 2.4).

$$HI= SD/KD$$

(Eşitlik 2.4)

2.2.4.2. Yığın Açısı Tayini

Yığın açısı çalışmasında Avrupa Farmakopesi 6'da belirtilen yöntem kullanılmıştır. Burada belirtilen yönteme göre ucu zeminden 2,5 cm yukarda olan kesik uçlu bir huniye doldurulan 30 ml proniozom kütlesi, düz ve titreşimsiz zemine düzgün bir koni oluşturacak şekilde boşaltılmıştır. Oluşan koninin yüksekliği ve farklı noktalardan 3 kez alınan çapın ortalaması ölçülmüştür. Bu işlem beş defa tekrarlanmış ve Bölüm 1.7.1.3.'te verilen Eşitlik1.1. ile yığın açısı hesaplanmıştır.

2.2.4.3. Akış Hızı

Akış hızı çalışmasında kütle az olduğu için farmakope yöntemi kullanılamamış, bu yöntem modifiye edilmiştir. 10 g proniozom kütlesi kesik uçlu huniye doldurulmuş, zaman tutularak huninin içindeki tozun akış süresi belirlenmiştir. Bu işlem beş defa tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.

$$Akış\ Hızı = \frac{Akan\ toz\ kütlesinin\ ağırlığı(g)}{Tozun\ akması\ için\ geçen\ zaman(sn)} \quad (Eşitlik\ 2.5)$$

2.2.5. Tablet Formülasyonunun Geliştirilmesi

Bu çalışmalar sırasında öncelikle herhangi bir yardımcı madde kullanılmaksızın, üretilmiş proniozom kütlesinde kayıp olmaması için maltodekstrinle basım yapılmıştır. Buradan elde edilen verilerden hareketle proniozom kütlesine geçiş yapılmış, ancak kaplama sonucu toz özelliklerindeki değişim nedeniyle proniozomlarda farklı basınç kullanılarak tablet formu oluşturulmuştur. Başlangıçta tablet sertliğinin yaklaşık olarak 7-8 kg olması için

basımda kullanılacak basınç seçilmiştir. Tabletlerin dağılma süreleri değerlendirilerek, mümkün olan en kısa sürede proniozomlar halinde dağılmasını sağlamak amacıyla dağıtıcı ajanlar tablet formülasyonuna eklenmiştir. Tabletlerde yer alacak proniozom miktarı 8 mg etkin maddeye karşılık gelecek şekilde belirlenmiştir. Nihai tablet formülasyonu Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Hazırlanan tablet formülasyonu ve bileşenlerin miktarları

Tablet Formülasyon Bileşenleri		Miktar (mg)	% a/a
Proniozom kütlesi (8 mg Kandesartan Sileksetile Eşdeğer)	<i>Proniozom Formülasyonu</i>	241 mg	76,99
	<i>Kandesartan Sileksetil 69,61 mg</i>		
	<i>Span 60 49,28 mg</i>		
	<i>Kolesterol 44,23 mg</i>		
	<i>Maltodekstrin 2000 mg</i>		
Kollidon-CL		24 mg	7,67
Avicel PH 101		48 mg	15,34
<i>Bir Tablet Kütlesi</i>		<i>313 mg</i>	<i>100</i>

2.2.5.1. Basılabilirlik

Basılabilirlik çalışması, ayrı ayrı maltodekstrin, proniozom kütlesi ve Çizelge 2.3.'te verilen tablet formülasyonu üzerinde yapılmıştır. Basılabilirlik çalışması sırasında Bölüm 1.10'da verilen Heckel eşitliğinden yararlanılmıştır. Her bir materyalden, etkin madde miktarından bağımsız olarak, aynı kütle üzerindeki basınç etkisini görebilmek adına, teorik olarak hesaplanan basılacak tablet kütlesi kadar toz tartılmış ve farklı basınçlarda basım işlemi yapılmıştır (Çizelge 2.4). Her bir basınçta sertlik, çap ve kalınlık değerlendirilmiştir. Bu işlem her bir materyal için 3 kez tekrarlanmıştır.

Çizelge 2.4. Basılabilirlik çalışmasında etkisi incelenen faktörler

Kullanılan Materyaller	• Maltodekstrin • Proniozom • Tablet için hazırlanan proniozom kütlesi
Basınçlar (MPa)	• 43,33 • 86,65 • 173,31 • 259,96 • 346,62 • 433,27 • 519,92
Değerlendirilen Kriterler	• Çap (mm) • Kalınlık (mm) • Sertlik (kg)

2.2.6. Proniozom Tozlardan Basılan Tabletlerde Yapılan Kontroller

Proniozom içeren tabletler üretildikten sonra dağılma, sertlik, çap-kalınlık, çözünme hızı, zeta potansiyeli, PDI, partikül büyüklüğü, optik mikroskopla görüntüleme analizlerine tabi tutulmuştur.

2.2.6.1. Sertlik, Çap-Kalınlık

Sertlik ölçümü için monsanto aleti kullanılmıştır. Çap ve kalınlık ölçümlerinde kumpas kullanılmıştır.

2.2.6.2. Dağılma Süresi Tayini

Dağılma süresinin incelenmesi için Avrupa Farmakopesi 6'da belirtilen yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre 900 ml, 37°C'deki dağılma ortamında çalıştırılan farmakopede belirtilen, 6 adet hücreden oluşan cihaza, tabletler atılarak

dağılıma süreleri hesaplanmıştır. Yöntemden hareketle 900 ml distile su olarak seçilen ortamda 3 adet tablet kullanılarak dağılıma süreleri tespit edilmiştir.

2.2.6.3. Tabletlerden Elde Edilen Niozomlarda Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü Tayini

100 mg proniozom içeren tablet kütesine 60°C distile su içinde iki dakika vorteks işlemi uygulandıktan sonra elde edilen niozomlarda Bölüm 2.2.3.3 ve 2.2.3.4'te anlatıldığı şekilde zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğü tayini yapılmıştır.

2.2.6.4. Tabletlerden Elde Edilen Niozomların Optik Mikroskopla İncelenmesi

100 mg proniozom içeren tablet kütesine 60°C distile su içinde iki dakika vorteks işlemi uygulandıktan sonra elde edilen niozomlarda Bölüm 2.2.3.5'te anlatıldığı gibi yapılmıştır.

2.2.6.5. Tabletlerde Çözünme Hızı Çalışması

Tabletlerde çözünme hızı testi, Bölüm 2.2.3.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Proniozomlardan hazırlanan tabletlerin çözünme performansını ticari tabletler ve saf etkin madde ile kıyaslamak amacıyla, Bölüm 2.2.1.2'de verilen farklı çözünme ortamlarında çözünme hızı tayini yapılmıştır. Elde edilen çözünme verileri sıfır derece, birinci derece, Hixson-Crowel küpkök kanunu, Weibull dağılımı ve Higuchi eşitliği gibi matematiksel modellere uygulanmıştır.

2.2.7. Sonuç Formülasyonda Morfolojinin İncelenmesi

Üretilen final formülasyona ait proniozomların, final formülasyon kullanılarak basılan tabletlerin kırılması ile elde edilen parçaların ve kaplama

yapılmamış taşıyıcı partiküllerinin yüzey yapıları, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir. SEM analizi için çift taraflı yapışkan karbon bir bant alüminyum silindir üzerine yapıştırıldıktan sonra diğer yüzeyine numuneler yerleştirilmiştir. Bu numuneler püskürtücü bir başlık yardımıyla altın ve paladyum ile kaplanmıştır. Yüksek vakum altında, 30 keV enerjide elektron tarama yöntemiyle numunelerin yüzeyleri görüntülenmiştir.

2.2.8. Stabilite Çalışmaları

Gerekli hesaplamalar yapılarak proniozomlar toz halinde ve tabletler halinde ağız sıkı kapalı kaplara alınmış, $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ ve % 60 ± 5 bağıl nem ortamında (ICH Q2(R1), USP 30, EMEA) tutularak altı ay süre ile stabilite testi uygulanmıştır. Karıştırma işleminden sonra tozlar üzerinde yapılan kontroller yenilenmiştir. Başlangıç, 3. ve 6. aylarda alınan numuneler üzerinde proniozomlar için Bölüm 2.2.3'te verilen, tabletler için ise Bölüm 2.2.6'da verilen kontroller uygulanmıştır. Çözünme testi için sadece FDA'de verilen çözünme ortamında çözünme testleri yürütülmüştür.

2.2.9. Formülasyonların Oral Yolla Verilişte Biyoyararlılıklarının İncelenmesi

Formülasyonların in vivo etkinliğinin deney hayvanlarında incelenebilmesi için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan uygunluk alınmıştır (Tarih: 27.04.2011; Karar no: 2011-111-416). Hazırlanan proniozomlardan kandesartan sileksetilin oral biyoyararlanımını değerlendirmek amacıyla yapılacak deneyde her birinde 9'ar hayvan olan deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

Grup 1: Etkin maddenin sulu süspansiyonunun oral yolla verilmesi (kontrol grubu)

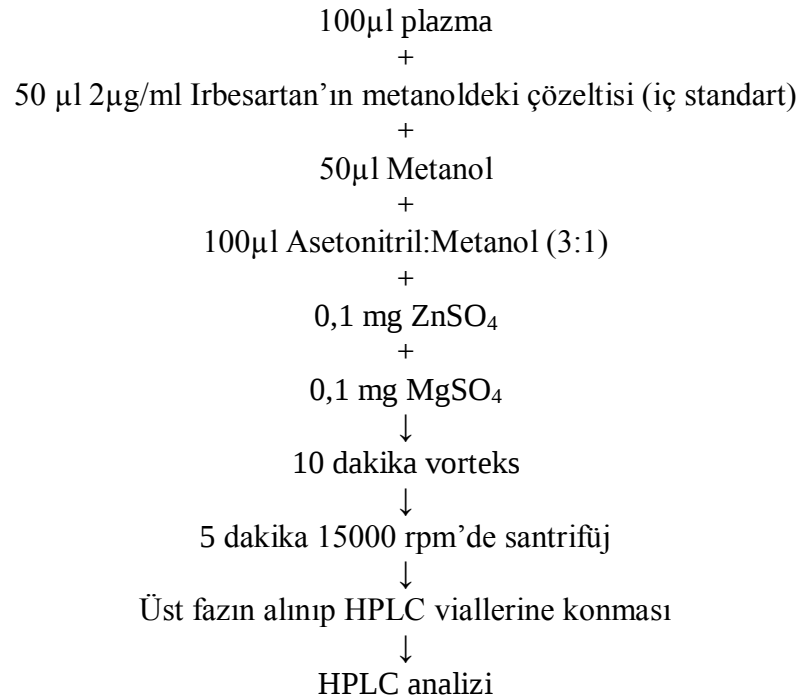
Grup 2: Etkin madde içeren proniozom süspansiyonunun oral yolla verilmesi

Grup 3: Etkin maddenin ticari tabletlerinin toz edilerek hazırlanmış süspansiyonunun oral yolla verililişi

Çalışmada Sprague-Dawley türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanların bakımları fakültemiz hayvan evinde (07:00-19:00 saatleri arası aydınlık 19:00-07:00 saatleri arası karanlık, oda sıcaklığında $25\pm1^{\circ}\text{C}$) standart kafeslerde yapılmıştır. Bütün sıçanlar pellet şeklinde hazırlanmış standart bir diyetle beslenmiştir. Sıçan ağırlıkları 280-340 g arası değişim göstermiştir. Sıçanlara deneyden önceki 12 saat süre boyunca yem verilmezken su ad libitum olarak verilmiştir.

Hayvanların ağırlıklarına göre 10 mg/kg dozda kandesartan sileksetil içerecek şekilde etkin madde, proniozom ve kırılarak toz haline getirilen tabletlerin %0,45 (a/h) hidroksipropil metil selüloz çözeltisi içinde süspansiyonları hazırlanmış ve hayvanlara gastrik gavaj yöntemi ile verilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında (0.25, 0.5, 1,2,4,6,8,10 ve 24. saat) hayvanların kuyruklarına kesi yapılarak mikro ependorf tüplere yaklaşık olarak 300 µl kan, 7 ünite heparin içeren ve içinde heparinize kılcal boru bulunan tüplere alınarak 15000 rpm'de 5 dak santrifüj edilip ayrılan plazmadan 100 µl alınmıştır. Hayvanlara 6. saatin sonunda tekrar yem verilmiştir. Alınan plazmalar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Numuneler HPLC yöntemi ile belirlenen yöntemle ekstrakte edilmiştir. Seçilen yöntem in akış şeması aşağıda verilmektedir.

Akış Şeması:



HPLC çalışması için seçilen yöntemde mobil faz asetonitril:metanol:tampon (26:26:48) olarak seçilmiştir. Kullanılan tampon, pH'sı 3 olan 10 mM KH₂PO₄ tamponudur. Mobil faz akış hızı 1 ml/dak, enjeksiyon hacmi 35 µl, sıcaklık 35°C olarak ayarlanmıştır. Ölçülen plazma konsantrasyonları için paralel sonuçlar arasında atılması gereken değerler olup olmadığını bulmak için Dixon-Massey testi uygulanmıştır (Hinchen, 1969). Bunun için kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$r_9 = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_2} \quad (\text{Eşitlik 2.6.})$$

x_n : Şüphelenilen değer

x_{n-1} : Şüphelenilen değere en yakın değer

x_2 : Şüphelenilen değere en uzak ikinci değer

Plazma konsantrasyon değerlerinden hareketle farmakokinetik parametreler kompartıman modelinden bağımsız analiz ile (Thermo Kinetika ver. 5.0, Thermo Fisher Scientific, USA) hesaplanmıştır.

Uygulanan her bir formülasyon için kandesartanın kanda ulaştığı maksimum konsantrasyon (C_{max}) değerleri ve bu konsantrasyona ulaşmak için geçen süreler (T_{max}) doğrudan plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri üzerinde tespit edilmiştir. Kandesartanın plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinin altında kalan alan ($AUC_{0\rightarrow24}$) log lineer trapezoidal yöntem ile hesaplanmıştır. L_z etkin maddenin plazmadan genel çıkışını göstermektedir, bütün atılım ve metabolizma yollarını kapsamaktadır. Plazmadaki etkin madde konsantrasyonunun zamana karşı çizilen logaritmik grafiğinde absorpsiyondan sonraki fazın eğimi genel uzaklaşma hız sabitini (L_z) vermektedir.

Elde edilen parametrelerin istatistiksel karşılaştırması SPSS programında t testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır.

Aynı yoldan uygulanan formülasyonları karşılaştırmak amacıyla Eşitlik 2.6 kullanılarak % bağıl biyoyararlanım (%BB) değerleri hesaplanmıştır.

$$\%BB = \frac{AUC_{test}}{AUC_{ref}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.7})$$

% BB : % Bağıl Biyoyararlanım

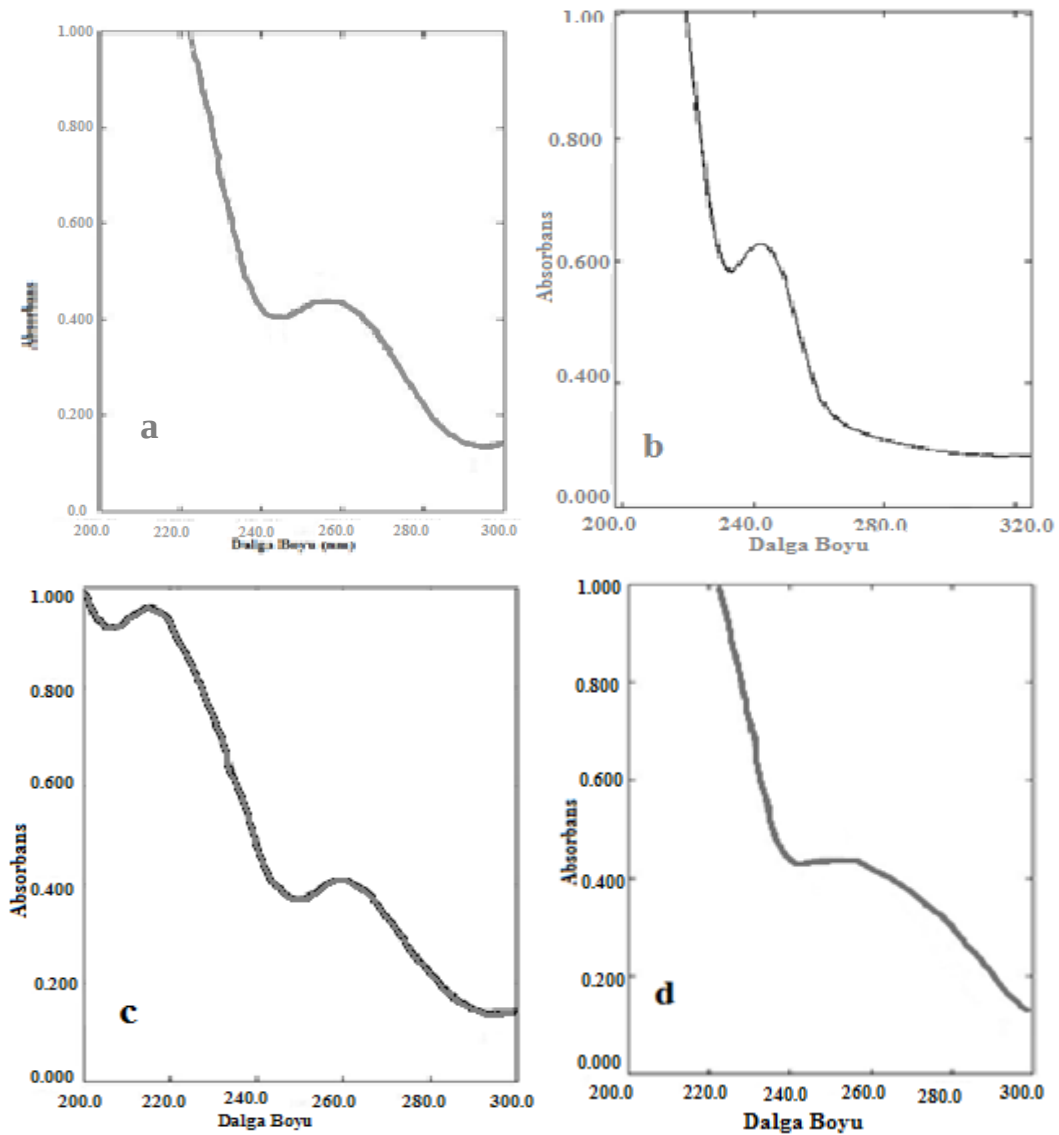
AUC_{test} : Proniozomların deney hayvanlarına verilışı neticesinde elde edilen AUC değeri.

AUC_{ref} : Saf etkin maddenin ve ticari tabletlerin deney hayvanlarına verilışı neticesinde elde edilen AUC değeri,

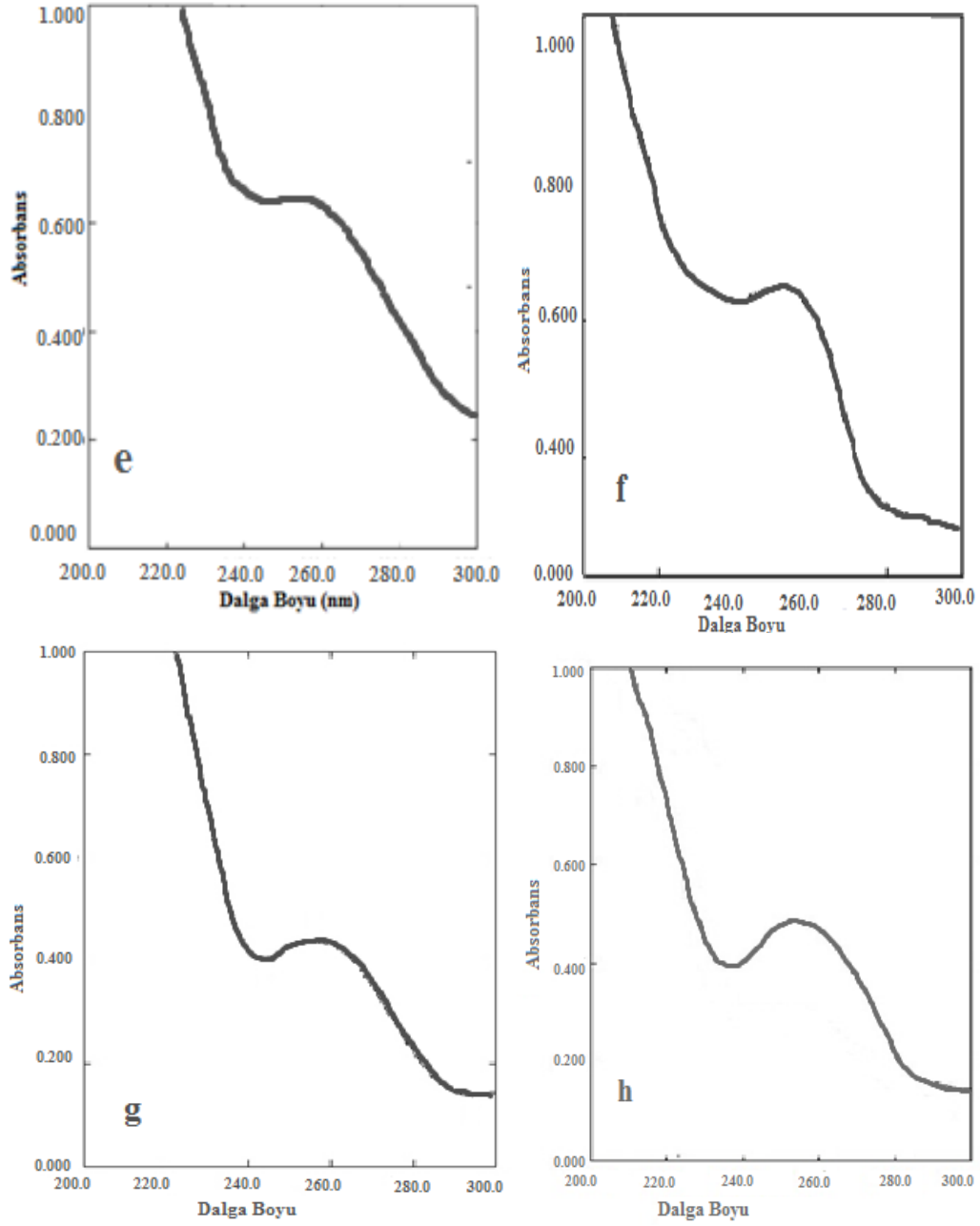
3. BULGULAR

3.1. Kandesartan Sileksetilin UV Spektrumunun Belirlenmesi

Bölüm 2.2.1.'de anlatıldığı gibi farklı çözünme ortamları ve metanolde etkin maddeden elde edilen UV spektrumları Şekil 3.1-Şekil 3.2'de ve maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyları ($\lambda_{\max}$) Çizelge 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1. Kandesartan sileksetilin metanol (a), %0,35 (a/h) Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponu (b), pH 1,2 suni mide sıvısı (c), %0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı (d) ortamlarındaki UV spektrumu



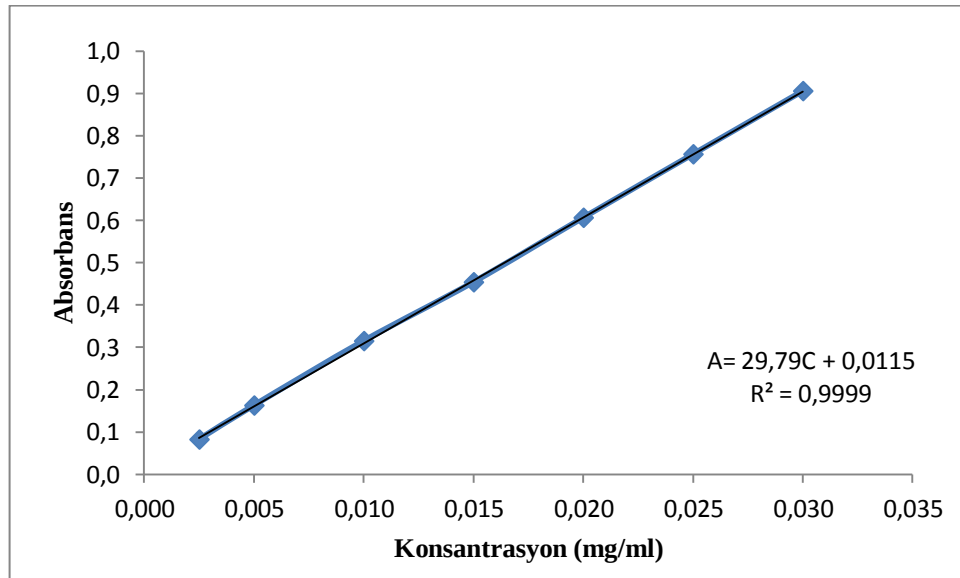
Şekil 3.2. Kandesartan sileksetilin pH 4,5 asetat tamponu (e), %0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu (f), pH 6,8 fosfat tamponu (g), %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponunda(h) UV spektrumu

Çizelge 3.1. Kandesartan sileksetilin farklı ortamlarda maksimum absorban verdiği dalga boyları.

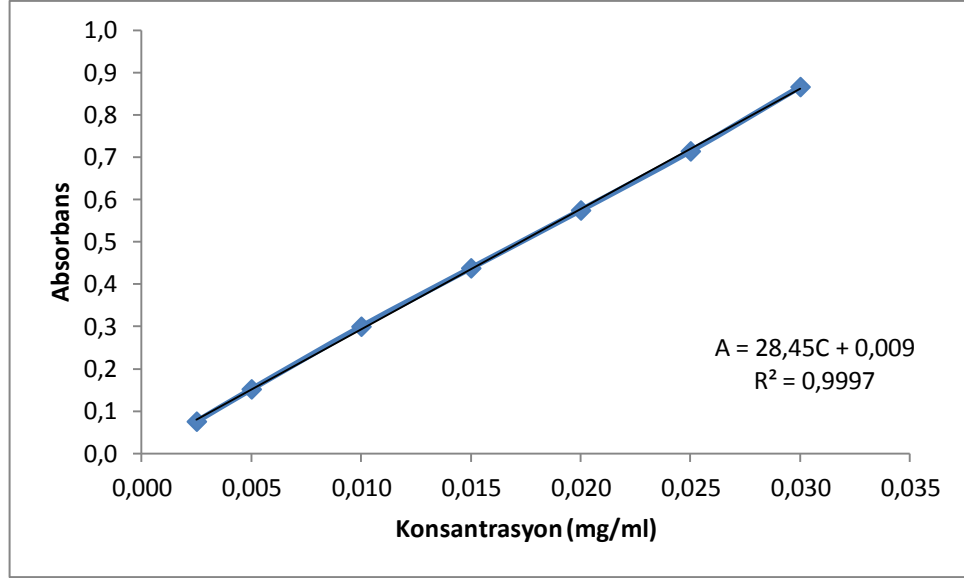
Ortam	$\lambda_{\max}$ (nm)
Metanol	254,0
%0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponu	258,5
pH 1,2 suni mide sıvısı	248,0
%0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı	255,0
pH 4,5 asetat tamponu	256,5
%0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu	258,0
pH 6,8 fosfat tamponu	256,5
%0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponu	259,0

3.1.1. Kandesartan Sileksetilin UV Spektrofotomerik Yöntemle Standart Doğrularının Hazırlanması

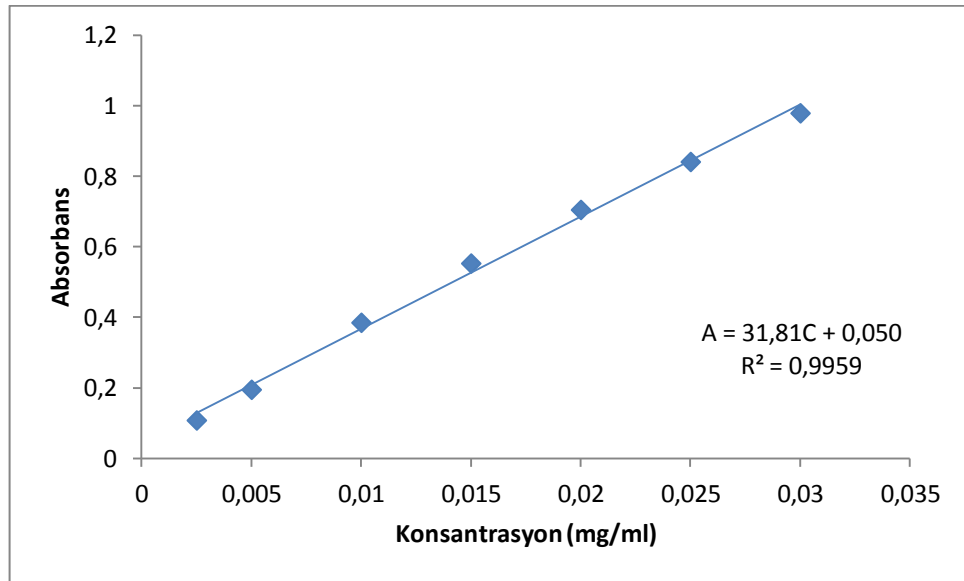
Etkin maddenin Bölüm 2.2.1.1.'de anlatıldığı üzere yapılan ölçümlerden sonra oluşturulan standart doğrular ise Şekil 3.3. – Şekil 3.10.'da verilmiştir. Standart doğru denklemlerinin oluşturulmasına yönelik istatistiksel sonuçlar ise Çizelge 3.2'de yer almaktadır.



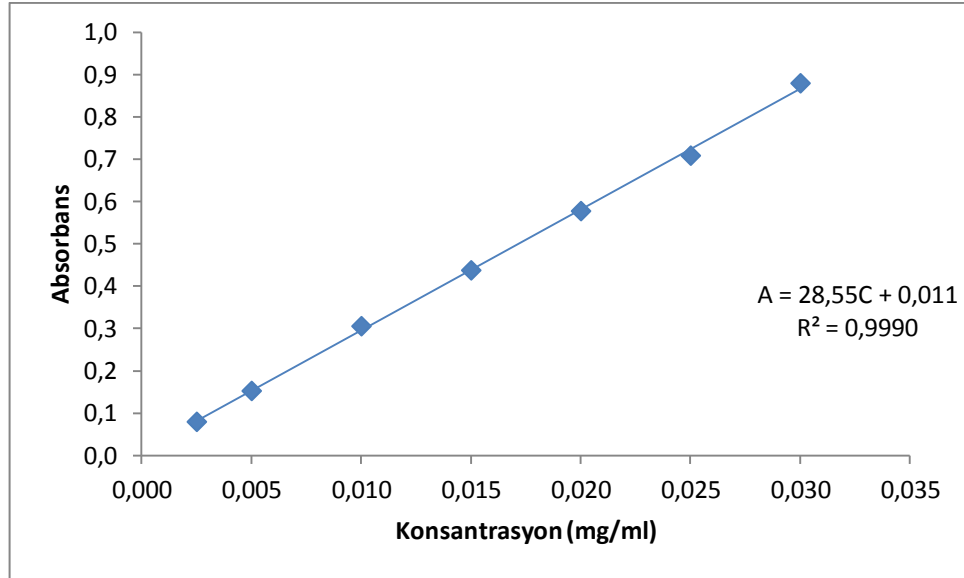
Şekil 3.3. Metanolde kandesartan sileksetilin standart doğrusu



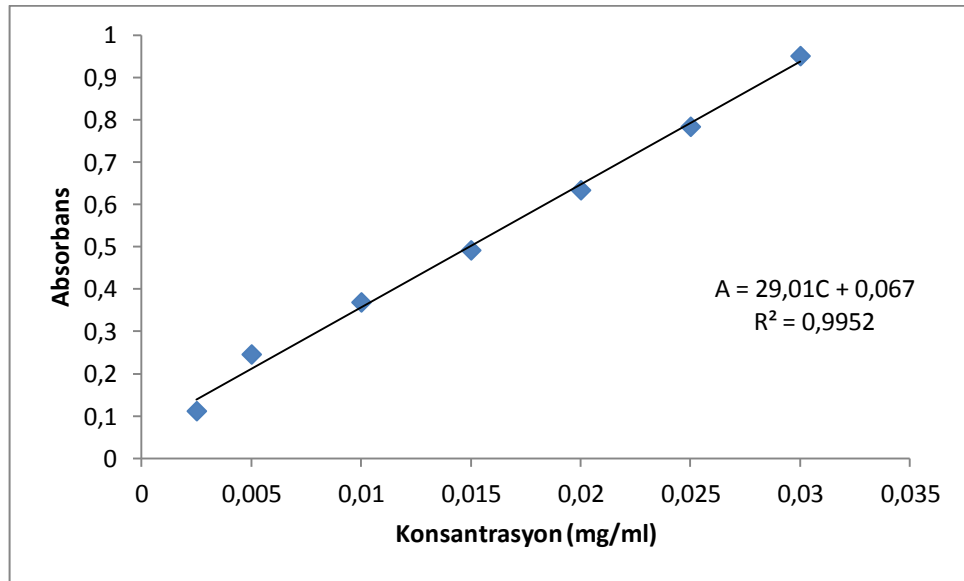
Şekil 3.4. %0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponunda kandesartan sileksetilin standart doğrusu



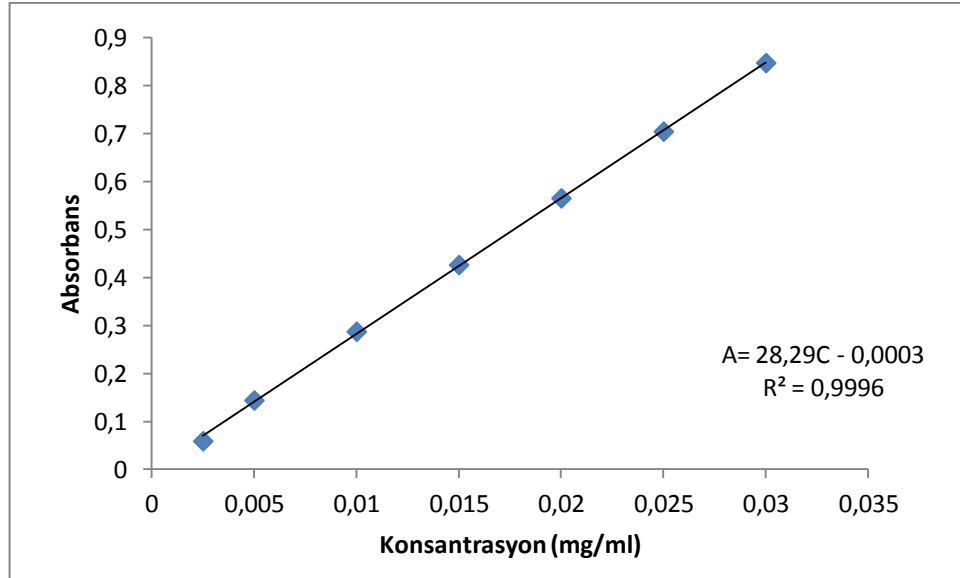
Şekil 3.5. pH 1,2 suni mide sıvısında kandesartan sileksetilin standart doğrusu



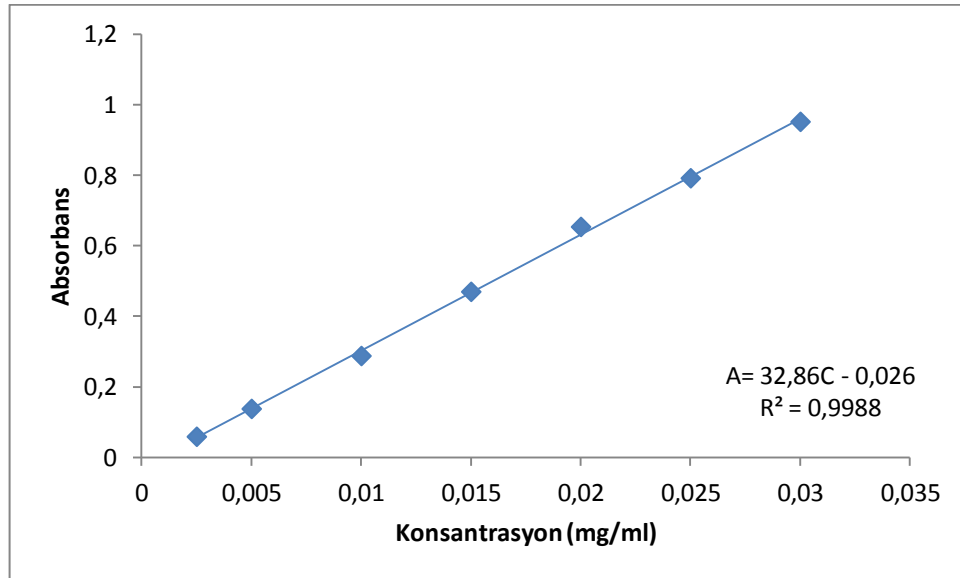
Şekil 3.6. %0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısında kandesartan sileksetilin standart doğrusu



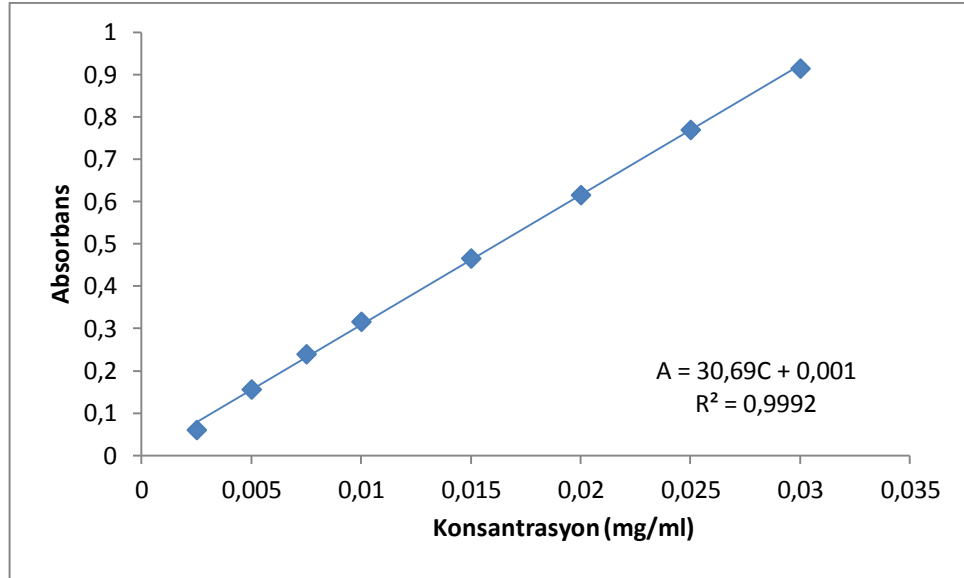
Şekil 3.7. pH 4,5 asetat tamponunda kandesartan sileksetilin standart doğrusu



Şekil 3.8. %0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponunda Kandesartan Sileksetilin standart doğrusu



Şekil 3.9. pH 6,8 fosfat tamponunda Kandesartan Sileksetilin standart doğrusu



Şekil 3.10. %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponunda Kandesartan Sileksetilin standart doğrusu

Çizelge 3.2. Farklı ortamlarda kandesartan sileksetilin ve plazmada kandesartanın miktar tayinine ait standart doğru denklemlerinin istatistiksel verileri

	Metanol ortamı	%0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponu	pH 1,2 suni mide sıvısı	%0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı	pH 4,5 asetat tamponu	%0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu	pH 6,8 fosfat tamponu	%0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponu	Plazma ortamı
Doğrusallık ve Aralığı	0,0025-0,0300 mg/ml	0,0025-0,0300 mg/ml	0,0025-0,0300 mg/ml	0,0025-0,0300 mg/ml	0,0025-0,0300 mg/ml	0,0025-0,0300 mg/ml	0,0025-0,0300 mg/ml	0,0025-0,0300 mg/ml	1666,7-83,3 ng/ml
Eğim	29,79	28,45	31,81	28,55	29,01	28,29	32,86	30,69	29,08x10 ⁻⁴
Eğimin % 95 Güven Aralığı	Alt Sınır: 29,41 Üst Sınır: 30,17	Alt Sınır: 27,93 Üst Sınır: 28,96	Alt Sınır: 29,46 Üst Sınır: 34,15	Alt Sınır: 27,51 Üst Sınır: 29,59	Alt Sınır: 26,69 Üst Sınır: 31,34	Alt Sınır: 27,74 Üst Sınır: 28,85	Alt Sınır: 31,55 Üst Sınır: 34,18	Alt Sınır: 29,83 Üst Sınır: 31,55	Alt Sınır: 27,44x10 ⁻⁴ Üst Sınır: 30,34x10 ⁻⁴
Eğimin Önemlilik Değeri (p)	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
Kesişim (n)	11,45x10 ⁻³	90,33x10 ⁻⁴	49,29x10 ⁻³	10,68x10 ⁻³	67,01x10 ⁻³	- 30,53x10 ⁻⁴	- 25,67x10 ⁻³	11,52x10 ⁻⁴	30,90x10 ⁻⁴
Kesişimin % 95 Güven Aralığı (n)	* 0,005/0,018	* 0,000/ 0,018	* 0,007/0,092	-0,008/0,029	* 0,025/0,109	-0,010/0,009	*-0,049/-0,002	-0,019/ 0,015	-0,143/ 0,136
Determinasyon Katsayısı (r²)	0,9999	0,9997	0,9959	0,9990	0,9952	0,9996	0,9988	0,9992	0,9960

* : p<0.05 ise sonuç önemlidir

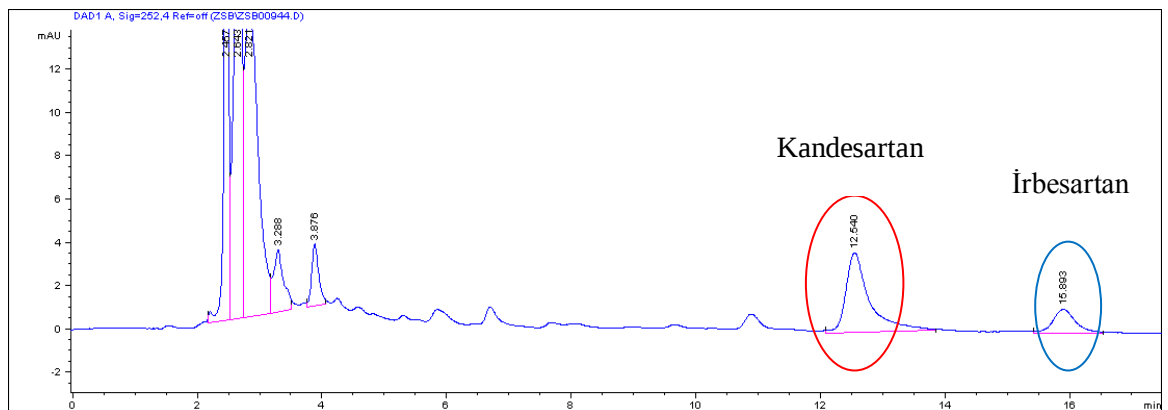
** :n %95 güven aralığı sıfırı içermediği taktirde sonuç önemlidir.

3.1.2. Kandesartanın Plazmadaki Miktar Tayinini Yapmak Amacıyla HPLC ile Spektrumunun Elde Edilmesi ve Standart Doğrusunun Hazırlanması

Kandesartanın mobil fazda (26:26:48, metanol:asetonitril:tampon) ile miktar tayininde belirlenen koşullar Çizelge 3.3'te, bu koşullara göre HPLC'de elde edilen kandesartanın pikini gösteren spektrum Şekil 3.10'da verilmiştir. HPLC'de yapılan ölçümler sonucu elde edilen kandesartanın kalibrasyonuna ait veriler Çizelge 3.4'te, bu verilere ait standart doğru Şekil 3.12'de ve *istatistiksel verileri* Çizelge 3.2'de görülmektedir.

Çizelge 3.3. Kandesartanın mobil fazdaki HPLC ile tayininde belirlenen koşullar

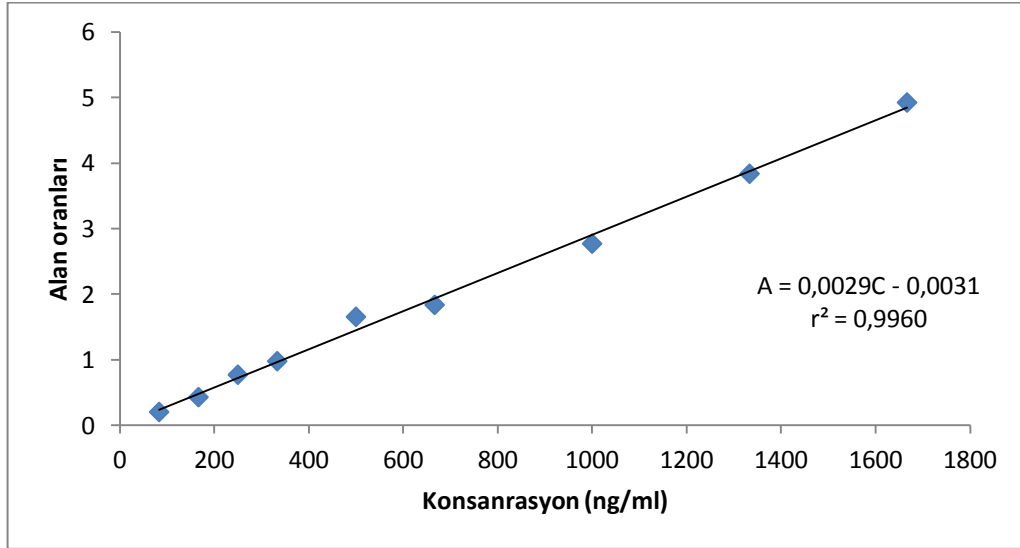
Cihaz	Agilent Series 110
Kolon	Phenomenex C8
Akış hızı	1 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	35µl
Dalga Boyu	252 nm
Mobil Faz	Metanol:Asetonitril:pH 3 mM fosfat tamponu
Kandesartanın Ahkonma Zamanı	12,5 dak
İrbesartanın Ahkonma Zamanı	16,1 dak



Şekil 3.11. Kandesartanın plazma ortamında belirtilen koşullarda elde edilen HPLC kromatogramı

Çizelge 3.4. Kandesartanın standart doğrusuna ait HPLC analizinden elde edilen konsantrasyon ve alan oranları verileri

	Konsantrasyon ($\times 10^3$, ng/ml)	Alan oranları
1	83,33	0,205
2	166,7	0,431
3	250	0,773
4	333,3	0,979
5	500	1,656
6	666,7	1,839
7	1000	2,773
8	1333	3,840
9	1666	4,926



Şekil 3.12. Kandesartanın HPLC analizinden elde edilen standart doğrusu

3.1.3. Farklı Ortamlardaki Standart Doğruların Analitik Validasyonu ve İstatistiksel Verileri

3.1.3.1. Doğruluk ve Geri Elde

Kandesartan Sileksetilin metanol ve seçilen çözünme ortamlarında, Kandesartanın plazma ortamlarındaki miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri elde çalışması Bölüm 2.2.1.4.1’de belirtildiği şekilde tayin edilmiştir. Kandesartan sileksetilin ve kandesartanın belirtilen ortamlarda yapılan miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları Çizelge 3.5 - Çizelge 3.13’te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Metanolde kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler

1. konsantrasyon (0,005 mg/mL)			2. Konsantrasyon (0,015 mg/mL)			3. Konsantrasyon (0,025 mg/mL)		
Abs.*	C ** mg/mL	% Geri Elde	Abs.	C mg/mL	% Geri Elde	Abs.	C mg/mL	% Geri Elde
0,164	0,0051	102,4	0,454	0,0148	99,03	0,753	0,0249	99,57
0,158	0,0049	98,36	0,452	0,0147	98,59	0,755	0,0249	99,84
0,161	0,0050	100,4	0,456	0,0149	99,48	0,754	0,0249	99,70
0,161	0,0050	100,4	0,457	0,0149	99,71	0,76	0,0251	100,5
0,159	0,0050	99,03	0,456	0,0149	99,48	0,757	0,0250	100,1
0,161	0,0050	100,4	0,454	0,0148	99,03	0,758	0,0250	100,2
<i>Ortalama</i>		100,2	<i>Ortalama</i>		99,22	<i>Ortalama</i>		99,99
SS ***		1,387	SS		0,411	SS		0,354
%BSS ****		1,384	%BSS		0,414	%BSS		0,354

* :Absorbans

** :Konsantrasyon

*** :Standart sapma

**** :Bağıl standart sapma

Çizelge 3.6. %0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler

1. konsantrasyon (0,005 mg/mL)			2. Konsantrasyon (0,02 mg/mL)			3. Konsantrasyon (0,03 mg/mL)		
Abs.	C mg/mL	% Geri Elde	Abs.	C mg/mL	% Geri Elde	Abs.	C mg/mL	% Geri Elde
0,154	0,0051	101,9	0,578	0,020	99,94	0,879	0,031	101,9
0,151	0,0050	99,77	0,576	0,0199	99,59	0,883	0,031	102,3
0,153	0,0051	101,2	0,578	0,020	99,94	0,882	0,031	102,2
0,152	0,005	100,5	0,575	0,0199	99,42	0,884	0,031	102,5
0,151	0,0050	99,77	0,574	0,0198	99,24	0,886	0,031	102,7
0,15	0,0050	99,06	0,576	0,0199	99,59	0,885	0,031	102,6
<i>Ortalama</i>		100,4	<i>Ortalama</i>		99,62	<i>Ortalama</i>		102,4
SS		1,034	SS		0,281	SS		0,291
%BSS		1,031	%BSS		0,282	%BSS		0,284

Çizelge 3.7. pH 1,2 enzimsiz suni mide sıvısında kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler

1. Konsantrasyon (0,005 mg/ml)			2. Konsantrasyon (0,015 mg/ml)			3. Konsantrasyon (0,025 mg/ml)		
Abs.	C (mg/mL)	%Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde
0,180	0,410	82,06	0,442	0,123	82,27	0,787	0,232	92,75
0,184	0,423	84,57	0,446	0,125	83,11	0,789	0,233	93,00
0,185	0,426	85,20	0,448	0,125	83,53	0,793	0,234	93,50
0,189	0,439	87,71	0,449	0,126	83,73	0,797	0,235	94,00
0,192	0,448	89,60	0,451	0,126	84,15	0,799	0,236	94,26
0,195	0,457	91,49	0,454	0,127	84,78	0,802	0,237	94,63
<i>Ortalama</i>		86,77	<i>Ortalama</i>		83,59	<i>Ortalama</i>		93,69
SS		3,484	SS		0,866	SS		0,737
BSS (%)		4,015	BSS (%)		1,036	BSS (%)		0,786

Çizelge 3.8. %0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 enzimsiz suni mide sıvısında kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler

1. Konsnatasyon (0,005 mg/ml)			2. Konsantasyon (0,015 mg/ml)			3. Konsantrasyon (0,025 mg/ml)		
Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde
0,137	0,442	88,47	0,412	0,141	93,70	0,696	0,24	96,01
0,138	0,446	89,17	0,415	0,142	94,40	0,699	0,241	96,43
0,141	0,456	91,28	0,417	0,142	94,87	0,702	0,242	96,85
0,143	0,463	92,68	0,418	0,143	95,11	0,703	0,242	96,99
0,144	0,467	93,38	0,421	0,144	95,81	0,706	0,244	97,41
0,145	0,47	94,08	0,421	0,144	95,81	0,708	0,244	97,69
<i>Ortalama</i>		91,51	<i>Ortalama</i>		94,95	<i>Ortalama</i>		96,90
SS		2,288	SS		0,818	SS		0,618
BSS (%)		2,500	BSS (%)		0,861	BSS (%)		0,638

Çizelge 3.9. pH 4,5 asetat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler

1. Konsnatasyon (0,005 mg/ml)			2. Konsantasyon (0,015 mg/ml)			3. Konsantrasyon (0,025 mg/ml)		
Abs.	C (mg/ml)	Geri Elde (%)	Abs.	C (mg/ml)	%Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde
0,203	0,469	93,75	0,481	0,143	95,13	0,776	0,244	97,75
0,205	0,475	95,13	0,483	0,143	95,59	0,776	0,244	97,75
0,207	0,482	96,51	0,487	0,145	96,51	0,775	0,244	97,61
0,204	0,472	94,44	0,488	0,145	96,74	0,778	0,245	98,03
0,208	0,486	97,20	0,486	0,144	96,28	0,781	0,246	98,43
0,207	0,483	96,51	0,488	0,145	96,78	0,783	0,247	98,71
<i>Ortalama</i>		95,59	<i>Ortalama</i>		96,16	<i>Ortalama</i>		98,05
SS		1,356	SS		0,662	SS		0,440
BSS (%)		1,418	BSS (%)		0,688	BSS (%)		0,448

Çizelge 3.10. %0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler

1. Konsnatasyon (0,005 mg/ml)			2. Konsantasyon (0,015 mg/ml)			3. Konsantrasyon (0,025 mg/ml)		
Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde
0,140	0,494	98,75	0,427	0,151	100,5	0,708	0,250	100,1
0,139	0,490	98,05	0,429	0,152	101,0	0,707	0,250	99,91
0,141	0,497	99,46	0,429	0,152	101,0	0,707	0,250	99,91
0,140	0,494	98,75	0,429	0,152	101,0	0,708	0,250	100,1
0,141	0,497	99,46	0,430	0,152	101,3	0,710	0,251	100,3
0,138	0,487	97,34	0,432	0,153	101,7	0,711	0,251	100,5
<i>Ortalama</i>		98,64	<i>Ortalama</i>		101,1	<i>Ortalama</i>		100,1
SS		0,826	SS		0,385	SS		0,232
BSS (%)		0,838	BSS (%)		0,381	BSS (%)		0,232

Çizelge 3.11. pH 6,8 fosfat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler

1. Konsnatasyon (0,005 mg/ml)			2. Konsantasyon (0,015 mg/ml)			3. Konsantrasyon (0,025 mg/ml)		
Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	% Geri Elde
0,140	0,494	98,75	0,427	0,151	100,5	0,708	0,250	100,1
0,139	0,490	98,05	0,429	0,152	101,0	0,707	0,250	99,91
0,141	0,497	99,46	0,429	0,152	101,0	0,707	0,250	99,91
0,140	0,494	98,75	0,429	0,152	101,0	0,708	0,250	100,1
0,141	0,497	99,46	0,430	0,152	101,3	0,710	0,251	100,3
0,138	0,487	97,34	0,432	0,153	101,7	0,711	0,251	100,5
<i>Ortalama</i>		98,64	<i>Ortalama</i>		101,1	<i>Ortalama</i>		100,1
SS		0,826	SS		0,385	SS		0,232
BSS (%)		0,838	BSS (%)		0,381	BSS (%)		0,232

Çizelge 3.12. %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponunda kandesartan sileksetilin doğruluk ve geri elde testine ait veriler

1. Konsantrasyon (0,005 mg/ml)			2. Konsantrasyon (0,015 mg/ml)			3. Konsantrasyon (0,025 mg/ml)		
Abs.	C (mg/ml)	Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	Geri Elde	Abs.	C (mg/ml)	Geri Elde
0,155	0,501	100,2	0,468	0,152	101,4	0,764	0,249	99,41
0,154	0,498	99,56	0,467	0,152	101,2	0,763	0,248	99,28
0,153	0,495	98,91	0,467	0,152	101,2	0,764	0,249	99,41
0,153	0,495	98,91	0,465	0,151	100,7	0,766	0,249	99,67
0,154	0,498	99,56	0,467	0,152	101,2	0,763	0,248	99,28
0,153	0,495	98,91	0,466	0,151	101,0	0,764	0,249	99,41
<i>Ortalama</i>		99,35	<i>Ortalama</i>		101,1	<i>Ortalama</i>		99,41
SS		0,532	SS		0,224	SS		0,143
BSS (%)		0,536	BSS (%)		0,222	BSS (%)		0,144

Çizelge 3.13. Kandesartanın plazmada yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları

1. Konsantrasyon (166,6 ng/ml)			2. Konsantrasyon (500 ng/ml)			3. Konsantrasyon (1333,3 ng/ml)		
Alan	C (ng/ml)	% Geri Elde	Alan	C (ng/ml)	% Geri Elde	Alan	C (ng/ml)	% Geri Elde
9,600	138,4	83,09	31,400	456,0	91,20	83,600	1254	94,09
8,500	120,2	72,16	32,100	484,4	96,89	82,800	1232	92,38
8,200	117,0	70,20	30,800	477,3	95,47	84,100	1337	100,3
8,700	121,6	72,96	32,100	474,1	94,82	84,200	1216	91,19
9,000	123,7	74,27	32,100	449,2	89,84	84,300	1305	97,85
8,400	116,9	70,19	32,500	458,5	91,70	82,600	1203	90,22
<i>Ortalama</i>		73,81	<i>Ortalama</i>		93,32	<i>Ortalama</i>		94,34
SS		4,815	SS		2,785	SS		3,969
BSS (%)		6,524	BSS (%)		2,985	BSS (%)		4,207

3.1.3.2. Kesinlik

Kandesartan sileksetilin kalibrasyonu yapılan ortamlardaki miktar tayini yönteminin kesinlik çalışması Bölüm 2.2.1.4.2.'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir. Kandesartan sileksetilin belirtilen ortamlarda yapılan miktar tayininin analitik

validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 3.14, 3.15 ve 3.16’da verilmiştir.

Çizelge 3.14. Kandesartan sileksetilin çözünme ortamlarında yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları

Teorik Konsantrasyon	Metanol	pH 1,2 suni mide sıvısı	%0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı	pH 4,5 asetat tamponu	%0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu	pH 6,8 fosfat tamponu	%0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponu
0,005	0,0049	0,0043	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
0,005	0,0050	0,0044	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
0,005	0,0051	0,0045	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
0,005	0,0051	0,0043	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
0,005	0,0050	0,0044	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
0,005	0,0050	0,0045	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
Ortalama	0,0050	0,0040	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
SS	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
BSS(%)	1,338	2,033	1,500	1,335	0,6400	0,9340	0,5360
0,015	0,0149	0,0130	0,0140	0,0140	0,0150	0,0150	0,0150
0,015	0,0149	0,0130	0,0140	0,0140	0,0150	0,0150	0,0150
0,015	0,0148	0,0130	0,0140	0,0140	0,0150	0,0150	0,0150
0,015	0,0149	0,0130	0,0140	0,0140	0,0150	0,0150	0,0150
0,015	0,0150	0,0130	0,0140	0,0140	0,0150	0,0150	0,0150
0,015	0,0150	0,0130	0,0140	0,0140	0,0150	0,0150	0,0150
Ortalama	0,0149	0,0130	0,0140	0,0140	0,0150	0,0150	0,0150
SS	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
BSS(%)	0,4190	1,5980	0,5940	0,5040	0,2740	1,0310	0,6020
0,025	0,0250	0,0230	0,0240	0,0240	0,0250	0,0250	0,0250
0,025	0,0251	0,0240	0,0240	0,0240	0,0250	0,0250	0,0250
0,025	0,0251	0,0240	0,0240	0,0240	0,0250	0,0250	0,0250
0,025	0,0251	0,0240	0,0240	0,0240	0,0250	0,0240	0,0250
0,025	0,0249	0,0240	0,0240	0,0240	0,0250	0,0250	0,0250
0,025	0,0251	0,0240	0,0250	0,0240	0,0250	0,0250	0,0250
Ortalama	0,0250	0,0240	0,0240	0,0240	0,0250	0,0250	0,0250
SS	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
BSS(%)	0,3130	0,3810	0,5630	0,2140	0,1650	0,3080	0,3760

Çizelge 3.15. Kandesartan Sileksetilin %0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponunda yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları

Teorik C (mg/mL)	Pratik C (mg/mL)	Teorik C (mg/mL)	Pratik C (mg/mL)	Teorik C (mg/mL)	Pratik C (mg/mL)
0,005	0,0050	0,0200	0,0202	0,0300	0,0307
0,005	0,0050	0,0200	0,0201	0,0300	0,0307
0,005	0,0050	0,0200	0,0201	0,0300	0,0307
0,005	0,0050	0,0200	0,0200	0,0300	0,0308
0,005	0,0051	0,0200	0,0200	0,0300	0,0308
0,005	0,0050	0,0200	0,0200	0,0300	0,0307
<i>Ortalama</i>	0,0050	<i>Ortalama</i>	0,0200	<i>Ortalama</i>	0,0307
SS	$3,63 \times 10^{-05}$	SS	$9,60 \times 10^{-05}$	SS	$5,17 \times 10^{-05}$
%BSS	0,726	%BSS	0,478	%BSS	0,168

Çizelge 3.16. Kandesartanın plazmada yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları

Teorik C (mg/ml)	Pratik C (mg/ml)	Teorik C (mg/ml)	Pratik C (mg/ml)	Teorik C (mg/ml)	Pratik C (mg/ml)
166,7	125,6	500,0	484,4	1333	1337
166,7	116,9	500,0	477,3	1333	1216
166,7	121,6	500,0	474,1	1333	1303
166,7	123,7	500,0	462,2	1333	1343
166,7	122,4	500,0	465,0	1333	1238
166,7	116,9	500,0	480,7	1333	1305
<i>Ortalama</i>	121,2	<i>Ortalama</i>	474,0	<i>Ortalama</i>	1290
SS	3,582	SS	8,756	SS	52,12
BSS(%)	2,957	BSS(%)	1,847	BSS(%)	4,039

Kandesartan sileksetilin ve Kandesartanın belirtilen ortamlarda yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen ara kesinlik değerlendirmesinde farklı analistler çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 3.17, farklı günlere ait sonuçlar Çizelge 3.18-22’de verilmiştir.

. Çizelge 3. 17. Kandesartan sileksetilin farklı çözünme ortamlarında farklı analistler ile yapılan ara kesinlik sonuçları

	Metanol		pH 1,2 suni mide sıvısı		pH 4,5 asetat tamponu		pH 6,8 fosfat tamponu		
	Konsantrasyon (Teorik)	Analist 1	Analist 2	Analist 1	Analist 2	Analist 1	Analist 2	Analist 1	Analist 2
	0,015 mg/ml	0,0149	0,0150	0,0128	0,0130	0,0138	0,0126	0,0149	0,0149
	0,015 mg/ml	0,0151	0,0149	0,0128	0,0130	0,0138	0,0125	0,0150	0,0150
	0,015 mg/ml	0,0152	0,0148	0,0129	0,0131	0,0138	0,0127	0,0150	0,0150
	0,015 mg/ml	0,0151	0,0149	0,0130	0,0132	0,0139	0,0126	0,0149	0,0149
	0,015 mg/ml	0,0152	0,0150	0,0131	0,0133	0,0139	0,0128	0,0149	0,0149
	0,015 mg/ml	0,0152	0,0151	0,0131	0,0133	0,0140	0,0127	0,0150	0,0150
	Ortalama	0,0151	0,0149	0,0129	0,0132	0,0139	0,0127	0,0149	0,0149
	SS	10,6x10 ⁻⁵	10,3x10 ⁻⁵	12,6x10 ⁻⁵	11,8x10 ⁻⁵	7,8x10 ⁻⁵	8,3x10 ⁻⁵	3,7x10 ⁻⁵	3,7x10 ⁻⁵
BSS(%)	0,6992	0,6883	0,9721	0,8990	0,5595	0,6594	0,2466	0,2466	
%0,35 Tween 20 içeren pH ,65 fosfat tamponu			%0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı		%0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu		%0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponu		
Analist 1	Analist 2	Konsantrasyon (Teorik)	Analist 1	Analist 2	Analist 1	Analist 2	Analist 1	Analist 2	
0,020 mg/ml	0,0183	0,0199	0,015 mg/ml	0,0139	0,0142	0,0148	0,0151	0,0150	0,0151
0,020 mg/ml	0,0182	0,0198	0,015 mg/ml	0,0139	0,0141	0,0148	0,0151	0,0150	0,0151
0,020 mg/ml	0,0183	0,0198	0,015 mg/ml	0,0140	0,0142	0,0149	0,0150	0,0149	0,0151
0,020 mg/ml	0,0184	0,0197	0,015 mg/ml	0,0140	0,0142	0,0149	0,0150	0,0150	0,0151
0,020 mg/ml	0,0184	0,0197	0,015 mg/ml	0,0141	0,0142	0,0150	0,0150	0,0149	0,0152
0,020 mg/ml	0,0184	0,0198	0,015 mg/ml	0,0141	0,0143	0,0150	0,0150	0,0149	0,0151
Ortalama	0,0183	0,0198	Ortalama	0,0140	0,0142	0,0149	0,0150	0,0150	0,0151
SS	7,37x10 ⁻⁰⁵	6,57x10 ⁻⁰⁵	SS	8,2x10 ⁻⁵	5,4x10 ⁻⁵	7,3x10 ⁻⁵	4,1x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻⁵
BSS(%)	0,402	0,332	BSS(%)	0,5866	0,3822	0,4899	0,2748	0,2638	0,2609

Çizelge 3. 18. Kandesartan sileksetilin metanol ve %0,35 tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponundan yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlere ait ara kesinlik sonuçları

	Metanol				%0,35 Tween 20 içeren pH ,65 fosfat tamponu		
Teorik Konsantrasyon	1. gün	2. gün	3. gün	Teorik Konsantrasyon	1. gün	2. gün	3. gün
0,005 mg/ml	0,0050	0,0050	0,0052	0,005 mg/ml	0,0050	0,0050	0,0053
0,005 mg/ml	0,0050	0,0049	0,0051	0,005 mg/ml	0,0050	0,0051	0,0053
0,005 mg/ml	0,0050	0,0049	0,0052	0,005 mg/ml	0,0050	0,0051	0,0054
0,005 mg/ml	0,0050	0,0050	0,0051	0,005 mg/ml	0,0051	0,0051	0,0053
0,005 mg/ml	0,0051	0,0050	0,0051	0,005 mg/ml	0,0050	0,0051	0,0054
0,005 mg/ml	0,0051	0,0051	0,0052	0,005 mg/ml	0,0051	0,0051	0,0054
<i>Ortalama</i>	0,0050	0,0050	0,0051	<i>Ortalama</i>	0,0050	0,0051	0,0054
<i>SS</i>	$57,82 \times 10^{-6}$	$77,77 \times 10^{-6}$	$49,41 \times 10^{-6}$	<i>SS</i>	$51,71 \times 10^{-6}$	$52,89 \times 10^{-6}$	$48,00 \times 10^{-6}$
<i>BSS(%)</i>	1,151	1,562	0,9642	<i>BSS(%)</i>	1,0305	1,041	0,8969
0,015 mg/ml	0,0151	0,0152	0,0152	0,02 mg/ml	0,0198	0,0198	0,0201
0,015 mg/ml	0,0149	0,0152	0,0151	0,02 mg/ml	0,0198	0,0199	0,0202
0,015 mg/ml	0,0148	0,0151	0,0152	0,02 mg/ml	0,0199	0,0199	0,0202
0,015 mg/ml	0,0148	0,0152	0,0153	0,02 mg/ml	0,0199	0,0199	0,0202
0,015 mg/ml	0,0149	0,0153	0,0153	0,02 mg/ml	0,0199	0,0199	0,0203
0,015 mg/ml	0,0151	0,0152	0,0153	0,02 mg/ml	0,0197	0,0198	0,0202
<i>Ortalama</i>	0,0149	0,0152	0,0152	<i>Ortalama</i>	0,0198	0,0199	0,0202
<i>SS</i>	$11,71 \times 10^{-5}$	$45,87 \times 10^{-6}$	$65,15 \times 10^{-6}$	<i>SS</i>	$6,82 \times 10^{-5}$	$5,29 \times 10^{-5}$	$5,17 \times 10^{-5}$
<i>BSS(%)</i>	0,7850	0,3022	0,4278	<i>BSS(%)</i>	0,3436	0,2661	0,2559
0,025 mg/ml	0,0249	0,0248	0,0254	0,030 mg/ml	0,0307	0,0309	0,0313
0,025 mg/ml	0,0250	0,0247	0,0254	0,030 mg/ml	0,0307	0,0310	0,0313
0,025 mg/ml	0,0250	0,0249	0,0253	0,030 mg/ml	0,0308	0,0311	0,0313
0,025 mg/ml	0,0251	0,0250	0,0255	0,030 mg/ml	0,0308	0,0311	0,0313
0,025 mg/ml	0,0251	0,0249	0,0256	0,030 mg/ml	0,0307	0,0312	0,0313
0,025 mg/ml	0,0251	0,0248	0,0256	0,030 mg/ml	0,0307	0,0312	0,0313
<i>Ortalama</i>	0,0250	0,0248	0,0255	<i>Ortalama</i>	0,0307	0,0311	0,0313
<i>SS</i>	$75,56 \times 10^{-6}$	$10,11 \times 10^{-5}$	$10,27 \times 10^{-5}$	<i>SS</i>	$51,71 \times 10^{-6}$	$90,02 \times 10^{-6}$	3142×10^{-6}
<i>BSS(%)</i>	0,3021	0,4068	0,4034	<i>BSS(%)</i>	0,1683	0,2896	0,1004

Çizelge 3. 19. Kandesartan sileksetilin pH 1,2 suni mide sıvısı ve %0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı ortamından yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlere ait ara kesinlik sonuçları

Teorik Konsantrasyon	pH 1,2 suni mide sıvısı			Teorik Konsantrasyon	%0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı		
	1. gün	2. gün	3. gün		1. gün	2. gün	3. gün
0,005 mg/ml	0,0042	0,0041	0,0041	0,005 mg/ml	0,0047	0,0047	0,0046
0,005 mg/ml	0,0043	0,0042	0,0042	0,005 mg/ml	0,0047	0,0046	0,0047
0,005 mg/ml	0,0044	0,0042	0,0043	0,005 mg/ml	0,0048	0,0047	0,0048
0,005 mg/ml	0,0044	0,0043	0,0044	0,005 mg/ml	0,0047	0,0046	0,0047
0,005 mg/ml	0,0044	0,0044	0,0045	0,005 mg/ml	0,0048	0,0047	0,0047
0,005 mg/ml	0,0045	0,0045	0,0045	0,005 mg/ml	0,0047	0,0047	0,0047
Ortalama	0,0044	0,0043	0,0043	Ortalama	0,0047	0,0047	0,0047
SS	96,22 x10 ⁻⁶	15,24 x10 ⁻⁵	15,46 x10 ⁻⁵	SS	42,42 x10 ⁻⁶	42,42 x10 ⁻⁶	54,26 x10 ⁻⁶
BSS(%)	2,1913	3,5645	0,9642	BSS(%)	0,8973	0,9063	1,1535
0,015 mg/ml	0,0129	0,0128	0,0129	0,015 mg/ml	0,0141	0,0142	0,0141
0,015 mg/ml	0,0129	0,0129	0,0129	0,015 mg/ml	0,0141	0,0142	0,0142
0,015 mg/ml	0,0130	0,0130	0,0130	0,015 mg/ml	0,0141	0,0143	0,0142
0,015 mg/ml	0,0131	0,0131	0,0130	0,015 mg/ml	0,0142	0,0143	0,0143
0,015 mg/ml	0,0131	0,0131	0,0130	0,015 mg/ml	0,0143	0,0143	0,0143
0,015 mg/ml	0,0132	0,0131	0,0131	0,015 mg/ml	0,0142	0,0143	0,0144
Ortalama	0,0130	0,0130	0,0130	Ortalama	0,0142	0,0143	0,0143
SS	88,92 x10 ⁻⁶	10,03 x10 ⁻⁵	64,94 x10 ⁻⁶	SS	86,98 x10 ⁻⁶	51,56 x10 ⁻⁶	90,43 x10 ⁻⁶
BSS(%)	0,6824	0,7708	0,4278	BSS(%)	0,6140	0,3612	0,6344
0,025 mg/ml	0,0234	0,0234	0,0235	0,025 mg/ml	0,0245	0,0244	0,0245
0,025 mg/ml	0,0235	0,0235	0,0236	0,025 mg/ml	0,0245	0,0245	0,0244
0,025 mg/ml	0,0236	0,0235	0,0237	0,025 mg/ml	0,0246	0,0246	0,0245
0,025 mg/ml	0,0237	0,0236	0,0237	0,025 mg/ml	0,0245	0,0246	0,0245
0,025 mg/ml	0,0237	0,0237	0,0238	0,025 mg/ml	0,0246	0,0246	0,0245
0,025 mg/ml	0,0238	0,0238	0,0239	0,025 mg/ml	0,0246	0,0246	0,0245
Ortalama	0,0236	0,0236	0,0237	Ortalama	0,0245	0,0245	0,0245
SS	15,61 x10 ⁻⁵	14,84 x10 ⁻⁵	15,33 x10 ⁻⁵	SS	48,28 x10 ⁻⁶	72,35 x10 ⁻⁶	36,73 x10 ⁻⁶
BSS(%)	0,6612	0,6293	0,6469	BSS(%)	0,1967	0,2948	0,1501

Çizelge 3. 20. Kandesartan sileksetilin pH 4,5 asetat tamponu ve %0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponundan yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlere ait ara kesinlik sonuçları

	pH 4,5 asetat tamponu				%0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu		
Teorik Konsantrasyon	1. gün	2. gün	3. gün	Teorik Konsantrasyon	1. gün	2. gün	3. gün
0,005 mg/ml	0,0045	0,0047	0,0046	0,005 mg/ml	0,0049	0,0049	0,0049
0,005 mg/ml	0,0046	0,0046	0,0045	0,005 mg/ml	0,0049	0,0050	0,0049
0,005 mg/ml	0,0047	0,0046	0,0047	0,005 mg/ml	0,0049	0,0049	0,0049
0,005 mg/ml	0,0046	0,0046	0,0046	0,005 mg/ml	0,0049	0,0049	0,0049
0,005 mg/ml	0,0047	0,0047	0,0047	0,005 mg/ml	0,0049	0,0049	0,0050
0,005 mg/ml	0,0047	0,0048	0,0047	0,005 mg/ml	0,0049	0,0049	0,0049
<i>Ortalama</i>	0,0046	0,0047	0,0046	<i>Ortalama</i>	0,0049	0,0049	0,0049
<i>SS</i>	$74,46 \times 10^{-6}$	7230×10^{-6}	6036×10^{-6}	<i>SS</i>	$22,35 \times 10^{-6}$	$36,50 \times 10^{-6}$	$42,80 \times 10^{-6}$
<i>BSS(%)</i>	1,608	1,554	1,300	<i>BSS(%)</i>	0,4573	0,7432	0,8736
0,015 mg/ml	0,0140	0,0125	0,0126	0,015 mg/ml	0,0149	0,0150	0,0149
0,015 mg/ml	0,0140	0,0126	0,0127	0,015 mg/ml	0,0149	0,0150	0,0150
0,015 mg/ml	0,0140	0,0126	0,0127	0,015 mg/ml	0,0149	0,0149	0,0150
0,015 mg/ml	0,0140	0,0127	0,0128	0,015 mg/ml	0,0149	0,0150	0,0149
0,015 mg/ml	0,0141	0,0127	0,0128	0,015 mg/ml	0,0150	0,0150	0,0149
0,015 mg/ml	0,0140	0,0127	0,0127	0,015 mg/ml	0,0149	0,0149	0,0149
<i>Ortalama</i>	0,0140	0,0127	0,0127	<i>Ortalama</i>	0,0149	0,0150	0,0149
<i>SS</i>	$40,29 \times 10^{-6}$	$71,20 \times 10^{-6}$	$48,74 \times 10^{-6}$	<i>SS</i>	$37,07 \times 10^{-6}$	$26,61 \times 10^{-6}$	$41,32 \times 10^{-6}$
<i>BSS(%)</i>	0,2878	0,5623	0,3833	<i>BSS(%)</i>	0,2487	0,1779	0,2767
0,025 mg/ml	0,0235	0,0237	0,0236	0,025 mg/ml	0,0252	0,0251	0,0250
0,025 mg/ml	0,0236	0,0237	0,0237	0,025 mg/ml	0,0251	0,0251	0,0251
0,025 mg/ml	0,0237	0,0236	0,0237	0,025 mg/ml	0,0251	0,0251	0,0251
0,025 mg/ml	0,0236	0,0237	0,0238	0,025 mg/ml	0,0251	0,0252	0,0250
0,025 mg/ml	0,0238	0,0238	0,0237	0,025 mg/ml	0,0251	0,0251	0,0251
0,025 mg/ml	0,0238	0,0238	0,0237	0,025 mg/ml	0,0251	0,0251	0,0250
<i>Ortalama</i>	0,0237	0,0237	0,0237	<i>Ortalama</i>	0,0251	0,0251	0,0251
<i>SS</i>	$97,49 \times 10^{-6}$	$59,37 \times 10^{-6}$	$60,36 \times 10^{-6}$	<i>SS</i>	$41,32 \times 10^{-6}$	$36,50 \times 10^{-6}$	$44,71 \times 10^{-6}$
<i>BSS(%)</i>	0,4117	0,2500	0,2547	<i>BSS(%)</i>	0,1645	0,1453	0,1783

Çizelge 3. 21. Kandesartan sileksetilin pH 6,8 fosfat tamponu ve %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponundan yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlere ait ara kesinlik sonuçları

	pH 6,8 fosfat tamponu				%0,2 Tween 80 içeren 6,8 fosfat tamponu		
Teorik Konsantrasyon	1. gün	2. gün	3. gün	Teorik Konsantrasyon	1. gün	2. gün	3. gün
0,005 mg/ml	0,0146	0,0146	0,0146	0,005 mg/ml	0,0050	0,0050	0,0049
0,005 mg/ml	0,0147	0,0146	0,0147	0,005 mg/ml	0,0049	0,0051	0,0049
0,005 mg/ml	0,0147	0,0146	0,0146	0,005 mg/ml	0,0049	0,0049	0,0049
0,005 mg/ml	0,0146	0,0146	0,0146	0,005 mg/ml	0,0049	0,0049	0,0049
0,005 mg/ml	0,0146	0,0146	0,0147	0,005 mg/ml	0,0050	0,0049	0,0049
0,005 mg/ml	0,0146	0,0146	0,0146	0,005 mg/ml	0,0050	0,0050	0,0049
Ortalama	0,0146	0,0146	0,0146	Ortalama	0,0050	0,0050	0,0049
SS	44,79 x10 ⁻⁶	29,92 x10 ⁻⁶	35,57 x10 ⁻⁶	SS	47,96 x10 ⁻⁶	50,47 x10 ⁻⁶	24,53 x10 ⁻⁶
BSS(%)	0,3063	0,2049	0,2433	BSS(%)	0,9644	1,0139	0,4997
0,015 mg/ml	0,0048	0,0049	0,0049	0,015 mg/ml	0,0151	0,0149	0,0150
0,015 mg/ml	0,0048	0,0049	0,0048	0,015 mg/ml	0,0150	0,0149	0,0149
0,015 mg/ml	0,0048	0,0048	0,0048	0,015 mg/ml	0,0149	0,0150	0,0149
0,015 mg/ml	0,0049	0,0049	0,0048	0,015 mg/ml	0,0149	0,0149	0,0150
0,015 mg/ml	0,0049	0,0048	0,0048	0,015 mg/ml	0,0150	0,0150	0,0150
0,015 mg/ml	0,0048	0,0048	0,0049	0,015 mg/ml	0,0150	0,0150	0,0150
Ortalama	0,0048	0,0048	0,0048	Ortalama	0,0150	0,0150	0,0150
SS	43,03 x10 ⁻⁶	46,15 x10 ⁻⁶	43,03 x10 ⁻⁶	SS	49,05 x10 ⁻⁶	53,20 x10 ⁻⁶	24,53 x10 ⁻⁶
BSS(%)	0,8911	0,9526	0,8911	BSS(%)	0,3272	0,3557	0,1638
0,025 mg/ml	0,0244	0,0245	0,0244	0,025 mg/ml	0,0250	0,0251	0,0250
0,025 mg/ml	0,0245	0,0245	0,0245	0,025 mg/ml	0,0251	0,0250	0,0249
0,025 mg/ml	0,0245	0,0244	0,0245	0,025 mg/ml	0,0251	0,0251	0,0251
0,025 mg/ml	0,0245	0,0245	0,0245	0,025 mg/ml	0,0251	0,0250	0,0250
0,025 mg/ml	0,0245	0,0245	0,0245	0,025 mg/ml	0,0250	0,0251	0,0251
0,025 mg/ml	0,0245	0,0245	0,0245	0,025 mg/ml	0,0251	0,0251	0,0251
Ortalama	0,0245	0,0245	0,0245	Ortalama	0,0251	0,0251	0,0250
SS	41,95 x10 ⁻⁶	35,57 x10 ⁻⁶	45,81 x10 ⁻⁶	SS	63,23 x10 ⁻⁶	47,96 x10 ⁻⁶	58,28 x10 ⁻⁶
BSS(%)	0,1714	0,1453	0,1872	BSS(%)	0,2521	0,1912	0,2327

Çizelge 3. 22. Kandesartanın plazmadan yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen farklı günlerdeki ara kesinlik sonuçları

Teorik Konsantrasyon	1. gün	2. gün	3. gün
166,6 ng/mL	138,4	121,6	128,0
166,6 ng/mL	125,6	124,0	116,5
166,6 ng/mL	121,6	127,3	118,8
166,6 ng/mL	123,7	122,0	120,6
166,6 ng/mL	122,4	121,9	129,3
166,6 ng/mL	132,2	119,3	122,1
<i>Ortalama</i>	127,3	122,7	122,5
<i>SS</i>	6,639	2,697	5,078
<i>BSS(%)</i>	5,215	2,198	4,144
500 ng/ml	484,4	455,5	473,7
500 ng/ml	477,3	499,7	487,9
500 ng/ml	474,1	503,3	471,7
500 ng/ml	462,2	500,5	458,4
500 ng/ml	465,0	495,2	481,2
500 ng/ml	480,7	492,4	459,9
<i>Ortalama</i>	474,0	491,1	472,1
<i>SS</i>	8,756	17,87	11,6
<i>BSS(%)</i>	1,847	3,640	2,450
1333 ng/mL	1337	1236	1221
1333 ng/mL	1215	1283	1265
1333 ng/mL	1303	1236	1211
1333 ng/mL	1342	1232	1260
1333 ng/mL	1238	1247	1220
1333 ng/mL	1304	1348	1299
<i>Ortalama</i>	1290	1264	1246
<i>SS</i>	52,12	45,36	34,32
<i>BSS(%)</i>	4,039	3,588	2,753

3.1.3.3. Teşhis ve Tayin Sınırı

Seçilen çözünme ortamlarına ait miktar tayini yöntemlerinin analitik validasyonunda teşhis ve tayin alt sınırı bölüm 2.2.1.4.3.'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Miktar tayinine ait yöntemin teşhis ve tayin alt sınırı Çizelge 3.23.'te verilmiştir.

Çizelge 3.23. Farklı ortamlarda Kandesartan Sileksetilin ve plazmada Kandesartanın miktar tayinine ait standart doğruların teşhis ve tayin sınırları

	Tayin Sınırı	Teşhis Sınırı
Metanol ortamı	11,23 x10 ⁻³ mg/ml	3,71 x10 ⁻³ mg/ml
%0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponu	1,11x10 ⁻³ mg/ml	0,365x10 ⁻³ mg/ml
pH 1,2 suni mide sıvısı	3,82x10 ⁻³ mg/ml	1,26x10 ⁻³ mg/ml
%0,2 Tween 80 içeren pH 1,2 suni mide sıvısı	3,02x10 ⁻³ mg/ml	1x10 ⁻³ mg/ml
pH 4,5 asetat tamponu	6,27x10 ⁻³ mg/ml	2,07x10 ⁻³ mg/ml
%0,2 Tween 80 içeren pH 4,5 asetat tamponu	2,6x10 ⁻³ mg/ml	0,86x10 ⁻³ mg/ml
pH 6,8 fosfat tamponu	2,97x10 ⁻³ mg/ml	0,98x10 ⁻³ mg/ml
%0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponu	2,04x10 ⁻³ mg/ml	0,67x10 ⁻³ mg/ml
Plazma ortamı	155,199ng/ml	51,216ng/ml

3.2. Hazırlanan Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Bulgular

Formülasyonlar, üretim işlemi boyunca üretimi ve elde edilen ürünün performansını etkileyecek değişkenlere bağlı olarak hazırlanmıştır. Bunlardan ilki farklı taşıyıcı materyal kullanımı olmuştur. Granulac 70, 200 ve 230 ile yapılan üretimlerde, bulamaç, solvan uçurma işlemi sonrasında balon yüzeyini kaplamış ve akıcı kuru toz elde edilememiştir. Bu nedenle formül kodu verilmemiştir. Diğer formülasyonlarla elde edilen formülasyonlar F1-F8 olarak kodlanmıştır. FS formülasyonu daha ileri derecede çalışmaların sürdürüleceği formülasyondur ve F7 formülasyonundan hareketle herbiri 2.0-2,1g miktarında toplam 18 sayıda üretilen serilerin birleştirilmesi ile oluşturulmuştur.

3.2.1. Formülasyonlarda Ürün Verimi Bulguları

Ürün verimi Bölüm 2.2.3.1.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Çizelge 3.24'te işlem geliştirme formülasyonlarına (F1-F8) ve sonuç formülasyona (FS) ait ürün verimi sonuçları gösterilmektedir. Ürün verimi değerleri, % 60,90 ile %93,80 arasında bulunmuştur.

Çizelge 3.24. Farklı formülasyonlarla hazırlanan proniozomlar için ürün verimi

Formülasyon Kodu	Ürün Verimi (%)
F1	80,13
F2	92,85
F3	90,62
F4	60,90
F5	90,62
F6	93,80
F7	92,90
F8	93,60
FS	93,20

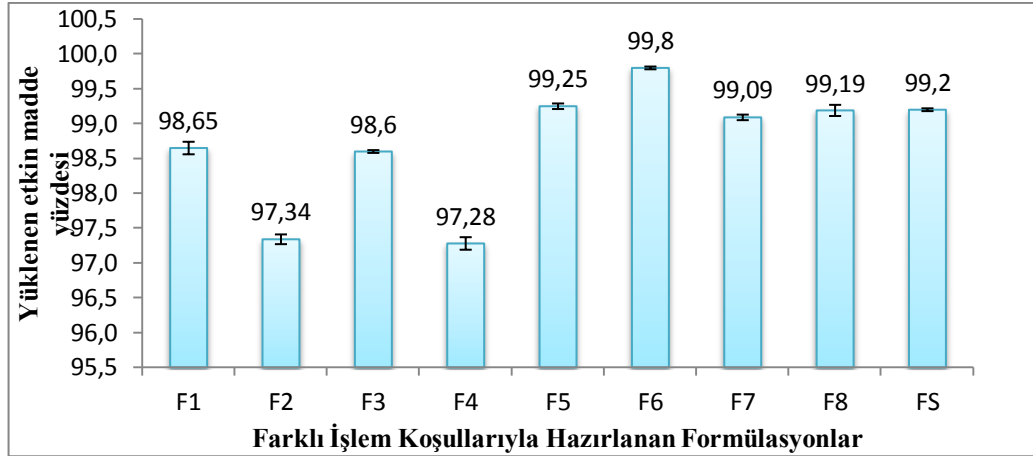
3.2.2. Proniozomlardan Hazırlanan Niozomlarda Etkin Madde Yükleme Etkinliğine Ait Bulgular

Etkin madde yükleme etkinliği tayini Bölüm 2.2.3.2.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Çalışma sonuçları Çizelge 3.25'te gösterilmektedir. Etkin madde yükleme etkinliği % 97,28-99,80 değerleri arasında değişmektedir.

Çizelge 3.25. Hazırlanan F1-FS kodlu formülasyonlarda etkin madde yükleme etkinliği ve standart hataları

Formülasyon	%Yüklenen Etkin Madde	SH*
F1	98,65	0,09
F2	97,34	0,07
F3	98,60	0,02
F4	97,28	0,09
F5	99,25	0,04
F6	99,80	0,02
F7	99,09	0,04
F8	99,19	0,08
FS	99,20	0,02

*:Standart hata



Şekil 3.13. Hazırlanan F1-FS kodlu formülasyonlarda etkin madde yükleme etkinliği ve standart hataları

3.2.3. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Partikül Büyüklüğü Analizi Bulguları

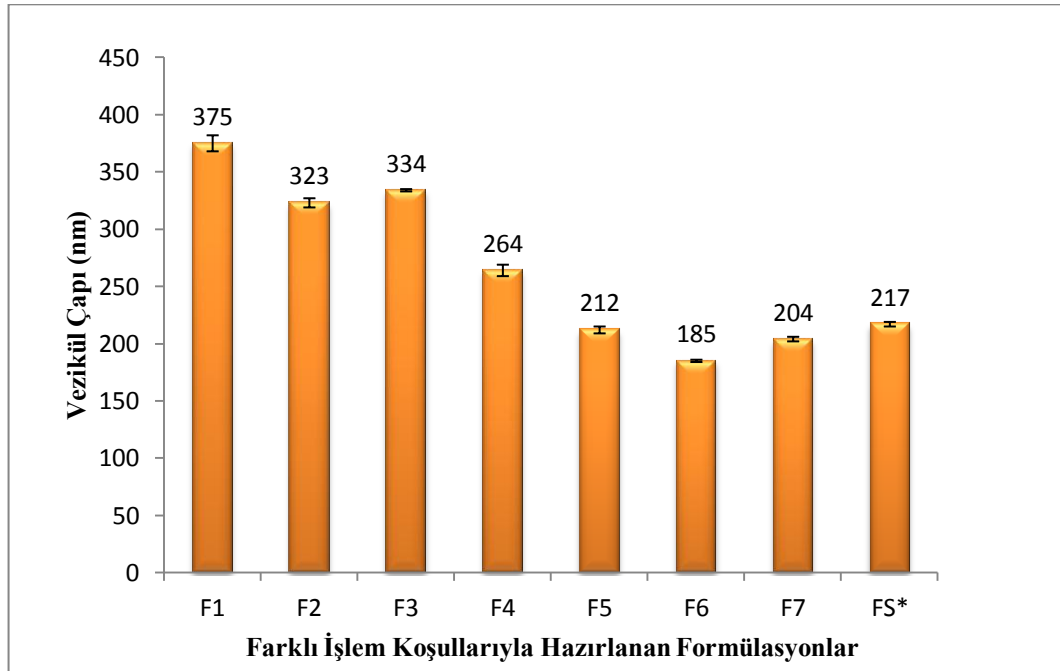
Bölüm 2.2.3.3.'te belirtildiği şekilde DLS cihazı ile yapılan partikül büyüklüğü ölçümlerinin sonuçları Çizelge 3.26'da verilmektedir. Proniozomlardan elde edilen niozomların partikül büyüklüğü 185-375 nm arasında değişmektedir. PDI değerleri ise 0,306 – 0,519 arasında olmuştur. F8 formülasyonundan elde edilen niozomlar sulu dispersiyonunda agregat oluşturarak yüzeye çıkmıştır; bu nedenle partikül boyutu ölçümü yapılamamıştır.

Çizelge 3.26. F1-FS kodlu formülasyonların partikül büyüklükleri ve polidispersite indeksleri

Formülasyon Kodu	Partikül Büyüklüğü (nm)±SH	PDI*±SH
F1	375±7	0,458±0,027
F2	323±4	0,519±0,006
F3	334±1	0,464±0,012
F4	264±5	0,471±0,031
F5	212±3	0,503±0,0003
F6	185±1	0,392±0,002
F7	204±2	0,307±0,004
FS*	217±2	0,408±0,015

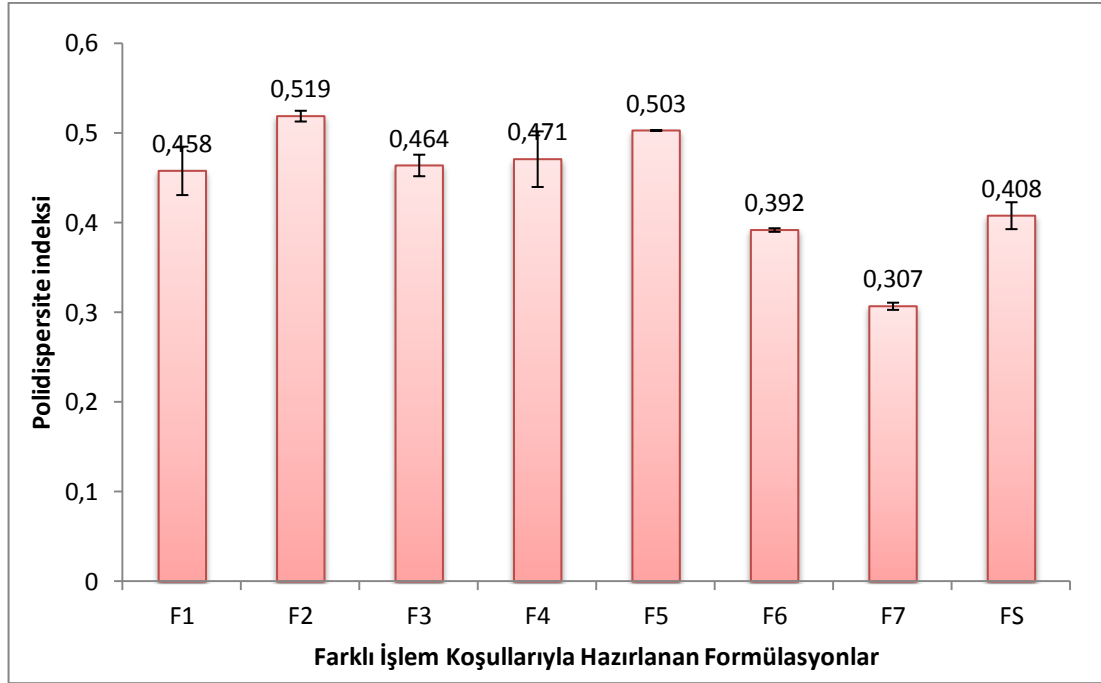
PDI: Polidispersite indeksi

* : Sonuç Formülasyon



Şekil 3.14. F1-FS* kodlu formülasyonlara ait partikül büyüklüğü dağılımı

* : Sonuç Formülasyon



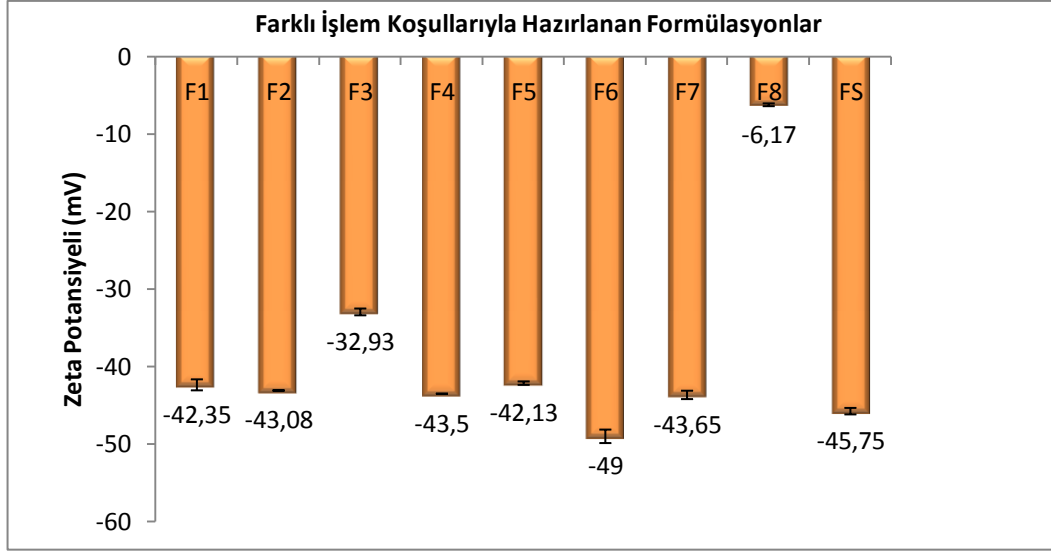
Şekil 3.15. F1-FS kodlu formülasyonlara ait PDI dağılımı

3.2.4. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomlarda Zeta Potansiyeli Analizi Bulguları

Zeta potansiyeli analizi tayini Bölüm 2.2.3.4.'te anlatıldığı gibi yapılmıştır. Çalışma sonuçları Çizelge 3.27'de gösterilmektedir. Pozitif yük verici stearilaminin kullanıldığı F8 formülasyonu dışında zeta potansiyel değerleri -42 mV ile -49 mV arasında bulunmuştur.

Çizelge 3.27. F1-FS kodlu formülasyonların zeta potansiyelleri

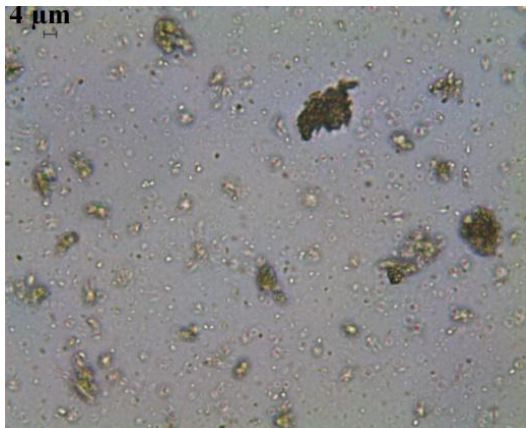
Formül Kodu	Zeta Potansiyeli (mV) $\pm$ SH
F1	-42,35 $\pm$ 0,71
F2	-43,08 $\pm$ 0,06
F3	-32,93 $\pm$ 0,44
F4	-43,50 $\pm$ 0,10
F5	-42,13 $\pm$ 0,22
F6	-49,00 $\pm$ 0,87
F7	-43,65 $\pm$ 0,54
F8	-6,17 $\pm$ 0,18
FS	-45,75 $\pm$ 0,42



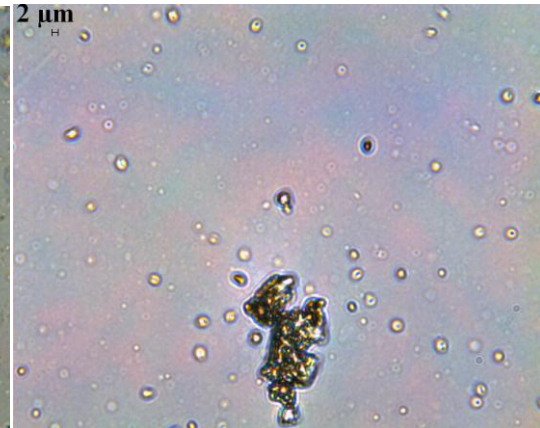
Şekil 3.16. Farklı formülasyonlara ait zeta potansiyeli dağılımı

3.2.5. Proniozomlardan Elde Edilen Niozomların Optik Mikroskop ile İncelenme Görüntüleri

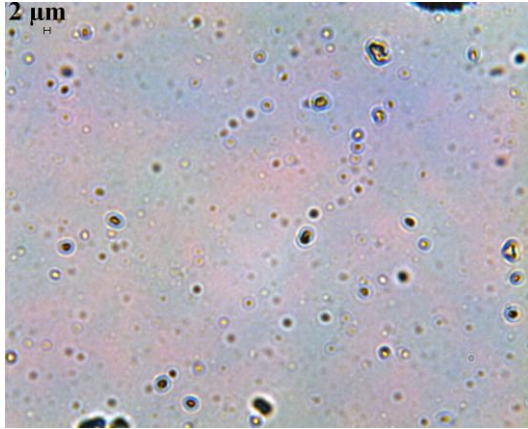
Proniozomlardan hazırlanan niozomların optik mikroskop kullanılarak görüntülenmesi Bölüm 2.2.3.5.'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. İşlem geliştirmede üretilen F1-F8 formülasyonları ve FS formülasyonu optik mikroskopta görüntülenmiştir. Görüntülemeye seçilen büyütme oranı x40 olmuştur.



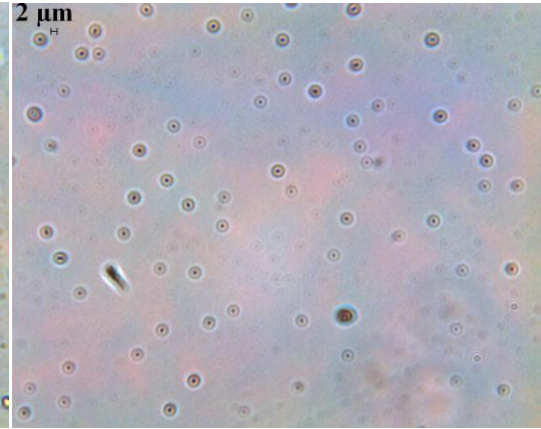
a) F1 formülasyonu



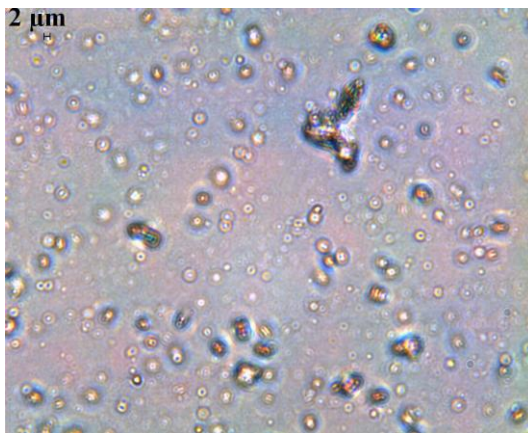
b) F2 Formülasyonu



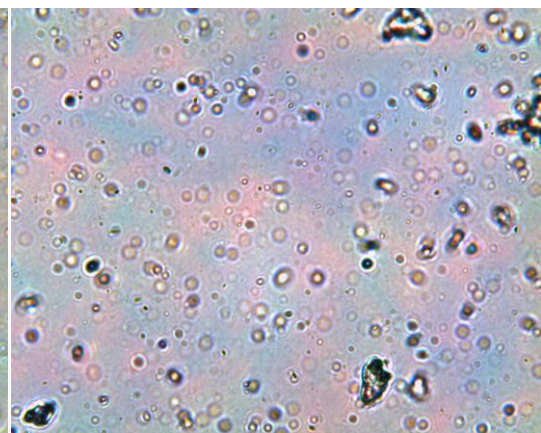
c) F3 formülasyonu



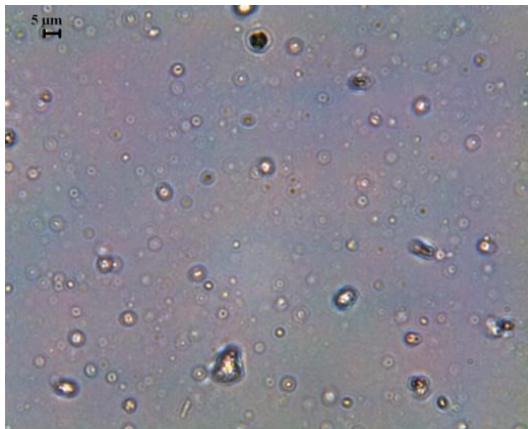
d) F4 formülasyonu



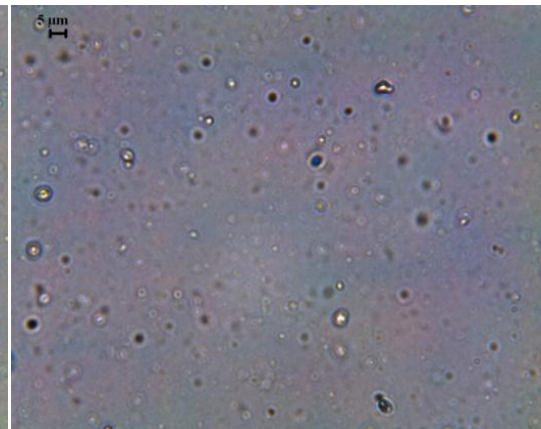
e) F5 formülasyonu



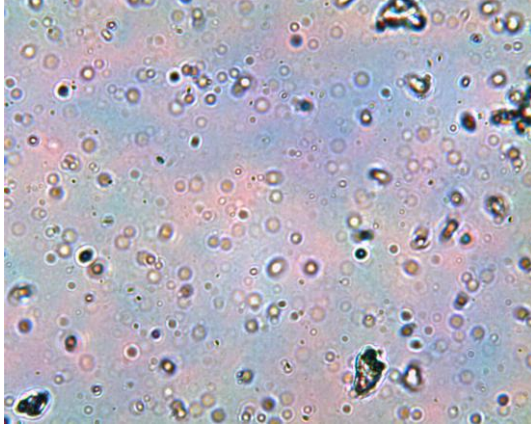
f) F6 formülasyonu



g) F7 formülasyonu



h) F8 formülasyonu

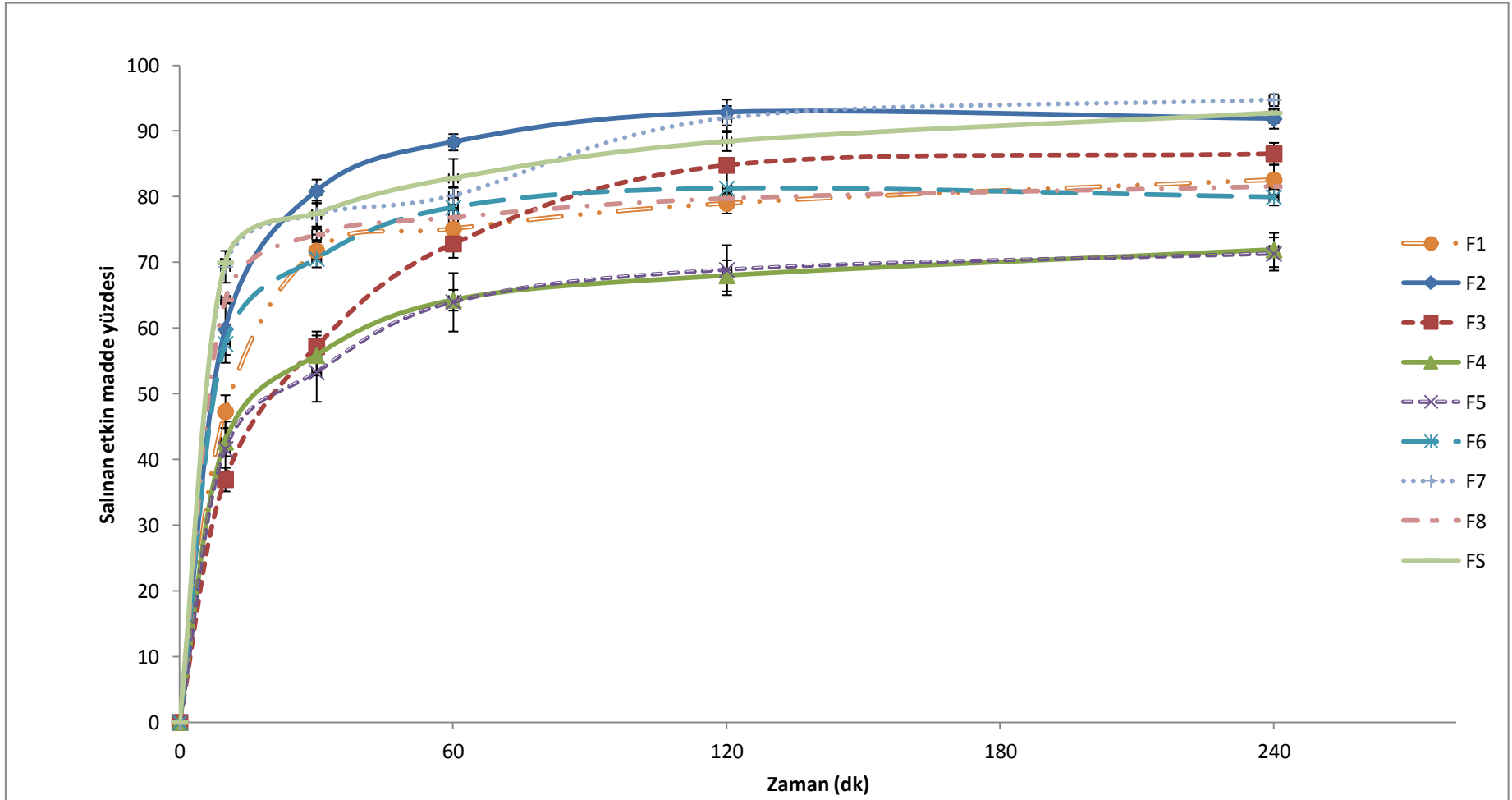


ı) FS formülasyonu

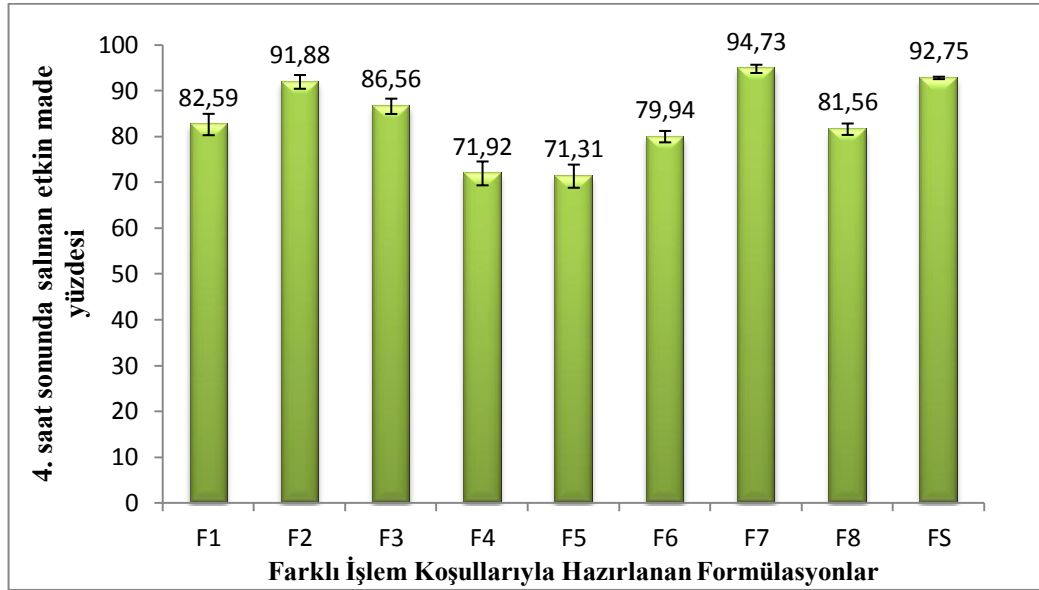
Şekil 3.17. Proniozomlardan üretilen niozomların optik mikroskopta incelenmesi: a)F1 formülasyonu, b)F2 formülasyonu, c) F3 formülasyonu, d) F4 formülasyonu, e) F5 formülasyonu, f) F6 formülasyonu, g) F7 formülasyonu, h) F8 formülasyonu, ı)FS Formülasyonu

3.2.6. Proniozomlarda Çözünme Hızı Çalışmaları Bulguları

Şekil 3.18’de proniozomlardan kandesartan silekselitin salım profilleri yer almaktadır. Şekil 319’da ise çözünme hızı testinin son 4. Saatinde salınan etkin madde yüzde değerleri görülmektedir. Buna göre etkin madde salımı % 71,31-94,73 arasında değişmektedir.



Şekil 3.18. %0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponunda tüm proniozom toz formülasyonların çözünme hızı verilerinin karşılaştırılması (n=4)



Şekil 3.19. Farklı formülasyonlara ait proniozom tozların çözünme hızlarında son saatte elde edilen salınan madde miktarı (%)

3.3. Sonuç Formülasyonun Seçilmesi ve Tablet Formülasyonunun Geliştirilmesi

Bölüm 2.2.4.'te belirtildiği şekilde proniozomlar üzerinde yapılan karakterizasyon sonuçlarına bağlı olarak seçilen F7 formülasyonundan seri üretimlerle tablet hazırlama ve stabilite için gereken kadar üretim yapılmıştır (FS formülasyonu). Tablet basımı için konsolidasyon, yığın açısı, akış hızı ve basılabilirlik çalışmaları için hazırlanan kütleden faydalanılmıştır. Basım işlemine karar verildikten sonra kalan kütle kullanılarak, hem tabletlerde hem de tozlarda proniozomların yüzey yapısı görüntülenmiştir.

3.3.1. Konsolidasyon Özelliklerine Ait Bulgular

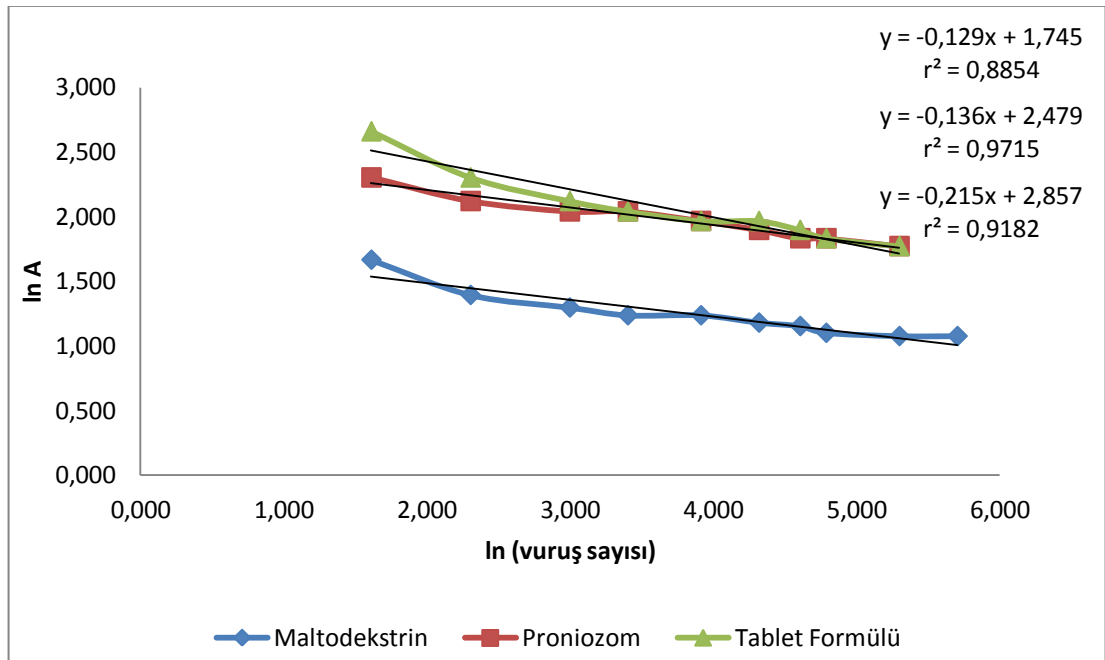
Bir mezür içindeki seçilen toz kütlelerinin sıkıştırma işlemi için yukarıdan aşağı bırakıldığı ve hacmindeki gözlenen değişimlerin kaydedildiği işlem Bölüm 2.2.4.1.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.28'de verilmiştir. Eşitlik 2.3.'e göre her bir vuruş için hesaplanan bağıl dansitelerin

değişimi (A) grafiksel olarak Şekil 3.20’de verilmiştir. Şekilde ayrıca bu değişimin doğrusallığını incelemek için yapılan lineer regresyon işleminin parametreleri de görülmektedir.

Çizelge 3.28. Maltodekstrin, proniozom (FS) ve proniozom tablet basım kütesine ait konsolidasyon özellikleri

Özellikler	Maltodekstrin	Proniozom	Proniozom tablet formülasyonu
Sıkıştırılmış Dansite	0,372 mg/ml	0,360mg/ml	0,373mg/ml
Küme Dansitesi	0,245 mg/ml	0,295 mg/ml	0,310 mg/ml
HI	1,512	1,220	1.203
Eğim	0,129	0,136	0,215

*:Hausner indeksi (Eşitlik 2.4)



Şekil 3.20. Bağlı dansite değişiminin (A) doğal logaritmasının, yapılan vuruş sayısının doğal logaritmasına karşı değişimi

3.3.2. Yığın Açısı ve Akış Hızı Tayinlerine Ait Bulgular

Yığın açısı ve akış hızı tayininde taşıyıcı olan maltodekstrin, proniozom kütlesi ve tablet basımında kullanılacak proniozom içeren toz karışımı kullanılmıştır. Yığın açısı tayini Bölüm 2.2.4.2.'de anlatılan şekilde yapılmış, Bölüm 1.7.1.3.'te verilen Eşitlik 1.1. ile yığın açısı hesaplanmıştır. Akış hızı analizi Bölüm 2.2.4.3.'te anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 3.29'da verilmiştir.

Çizelge 3.29. Maltodekstrin, proniozom kütlesi ve tablet basımında kullanılacak proniozom toz karışım kütlesinde yığın açısı ve akış hızı

	Maltodekstrin	Proniozom	Proniozom tablet basım kütlesi
Yığın açısı	36,22°	29,85°	31,44°
Akış hızı	1,306±0,068 g/san	3,124±0,071g/san	2,94±0,042 g/san

3.3.3. Basılabilirlik Bulguları

Basılabilirlik çalışması Bölüm 2.2.5.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır ve Bölüm 1.10'da verilen Eşitlik 10'a göre K (eğimden elde edilen sabit) değerleri hesaplanarak buradan Py (beceri stresi) değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 3.30. Maltodekstrin, proniozom ve tablet basımı için proniozom toz karışımında basılabilirlik verileri

Heckel eşitliği parametresi	Maltodekstrin	Proniozom	Proniozom tablet formülasyonu
K (eğim)	0,0158±0,0017	0,0143±0,0009	0,0106±0,0010
Py (1/K; MPa)	64,97±8,16	70,75±4,97	96,55±10,05
I (kesişim)	0,878±0,133	0,986±0,093	1,248±0,0060

3.3.4. Proniozom Tozlardan Basılan Tabletlerde Yapılan Kontroller

Proniozom tabletler, üretildikten sonra dağılma, sertlik, çap-kalınlık, çözünme hızı tayini yapılmıştır. Proniozom tablet kütlelerinin hidratasyonu ile elde edilen niozomların zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü incelenmiş ve optik mikroskopla görüntüleri alınmıştır.

3.3.4.1. Sertlik, Çap-Kalınlık

Sertlik ölçümü ve çap-kalınlık ölçümü Bölüm 2.2.6.1’de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Çizelge 3.31. Üretilen tabletlerde sertlik, çap ve kalınlık inceleme sonuçları (SH: standart hata)

Kalınlık		Çap		Sertlik (kg)	
Ortalama	SH	Ortalama	SH	Ortalama	SH
0,3 cm	0	1 cm	0	7,625	0,125

3.3.4.2. Dağılma Süresi Tayini

Dağılma süresinin incelenmesi için Bölüm 2.2.6.2.’de anlatıldığı gibi çalışma yürütülmüştür. Dağılma süresi tayini için 3 tablet kullanılmıştır ve ortalama dağılma süresi **8 dakika 25 saniye ($\pm 0,0085$)** bulunmuştur.

3.3.4.3. Tabletlerden Elde Edilen Niozomlarda Zeta Potansiyeli ve Partikül Büyüklüğü Tayini Bulguları

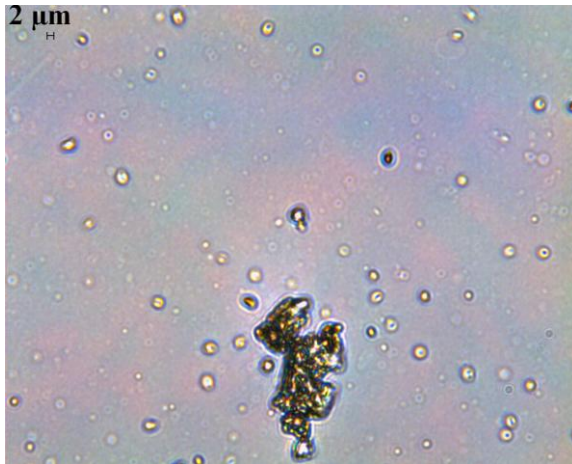
Zeta potansiyeline ve partikül büyüklüğüne yönelik çalışmalar Bölüm 2.2.6.3.'te anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.32'de sunulmaktadır.

Çizelge 3. 32. Proniozomlardan üretilen tabletlerde zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğü sonuçları (SH: Standart hata)

Zeta Potansiyeli(mV)		Partikül büyüklüğü(nm)		PDI	
<i>Ort</i>	<i>SH</i>	<i>Ort</i>	<i>SH</i>	<i>Ort</i>	<i>SH</i>
-45,6	0,354	221,7	1,877	0,364	0,003

3.3.4.4. Tabletlerden Elde Edilen Niozomların Optik Mikroskopla İncelenmesi

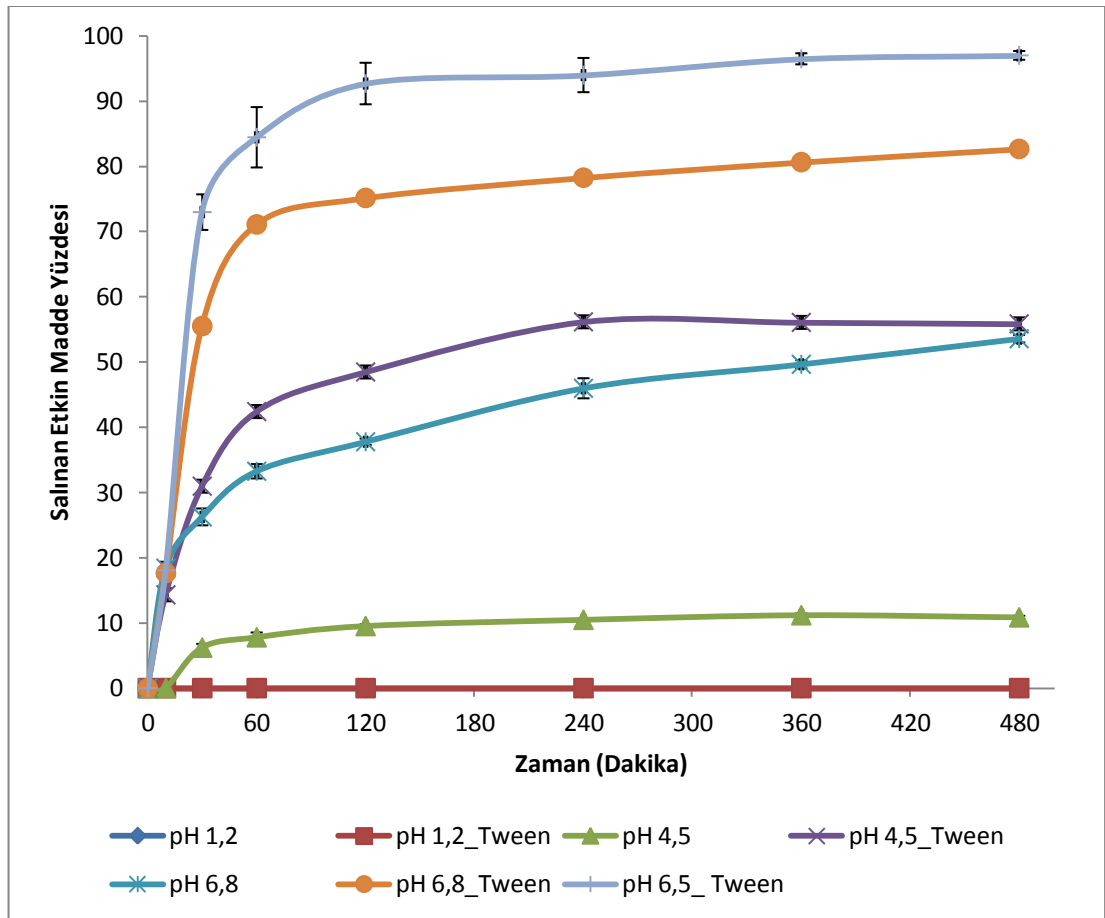
Proniozom tabletlerden elde edilen niozomların optik mikroskopla görüntülenmesi Bölüm 2.2.6.4.'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen görüntü Şekil 3.21'de görülmektedir.



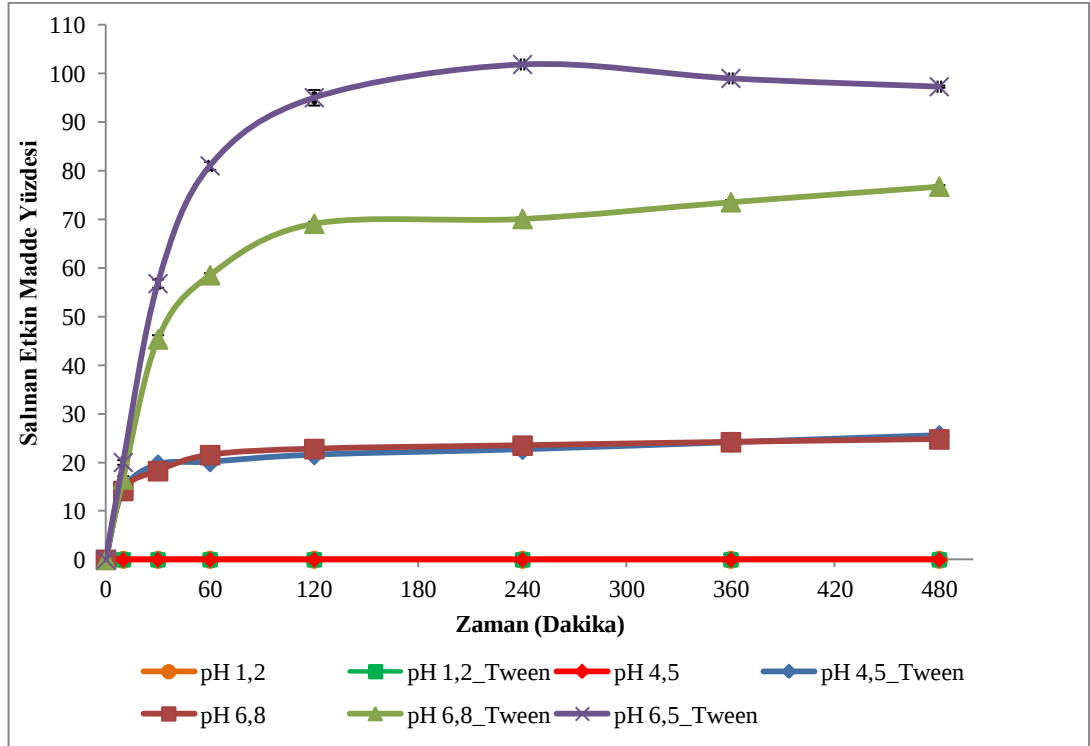
Şekil 3.21. Tabletten oluşan niozomların optik mikroskopta görüntüsü

3.3.5. Tabletlerde Çözünme Hızı Çalışmasına Ait Bulgular

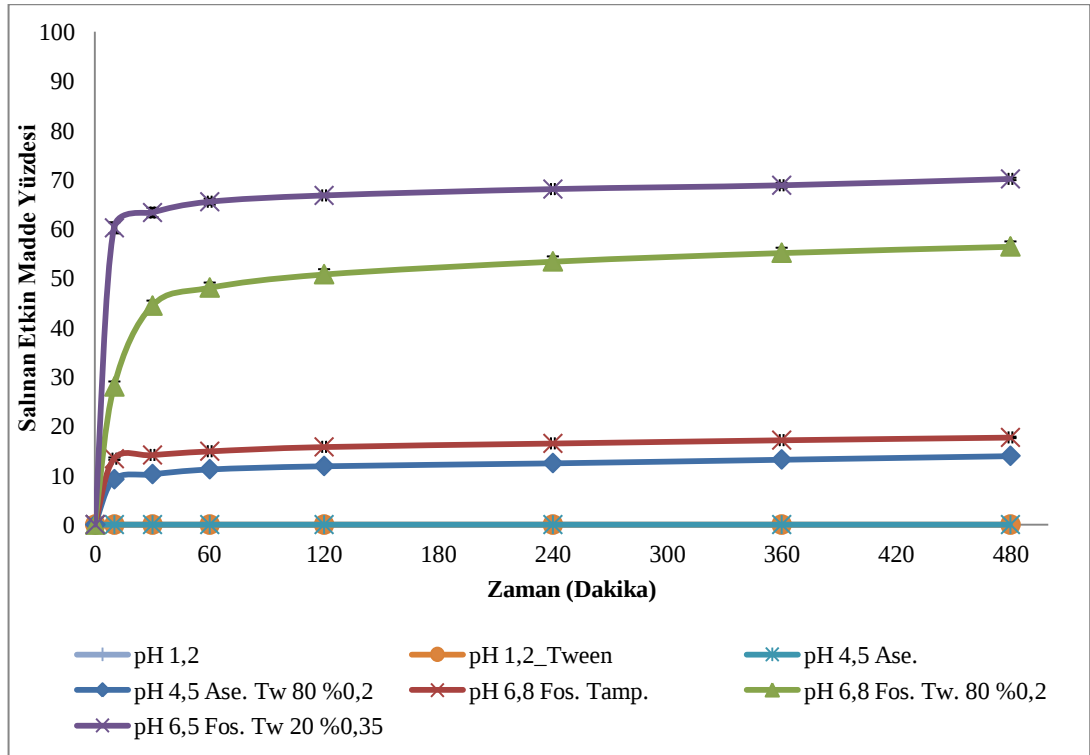
Proniozom tabletlerin yanısıra karşılaştırma amacıyla ticari tabletler ve saf etkin madde ile yapılan çözünme hızı çalışmaları Bölüm 2.2.6.5'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Çözünme hızına ait veriler ve bu verilerin matematiksel modellerle değerlendirildiği sonuçlar Şekil 3.22-3.24 ve Çizelge 3.33 ve.34'te gösterilmiştir.



Şekil 3.22. Proniozom tabletlere ait farklı pH'larda gerçekleştirilen çözünme hızı testi sonuçları



Şekil 3.23. Ticari tabletlere ait farklı pH'larda gerçekleştirilen çözünme hızı testi sonuçları



Şekil 3.24. Etkin maddeye ait farklı pH'larda gerçekleştirilen çözünme hızı testi sonuçları

Çizelge 3.33. Çözünme hızı deneyi sonunda FS tablet formülasyonu, saf etkin madde ve ticari preparattan elde edilen çözünen madde miktarları (% değerler)

	Proniozom Tablet	Saf Etkin Madde	Ticari Preparat
Çözünme ortamı	4. saat sonunda çözünen etkin madde yüzdesi		
pH 1,2	-	-	-
pH 1,2 Tween	-	-	-
pH 4,5	10,47±0,139	-	-
pH 4,5 Tween	56,14±0,227	12,49±0,251	22,68±0,77
pH 6,8	45,95±1,539	16,47±0,059	23,48±0,505
pH 6,8 Tween	78,23±0,329	56,44±0,226	76,77±0,32
pH 6,5	96,97±0,669	70,13±0,246	97,35±0,235

3.3.6. Sonuç Formülasyonda Morfolojinin İncelenmesi

Tabletlerde, proniozomlarda ve maltodekstrinde morfolojinin incelemesi Bölüm 2.2.6.'da anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

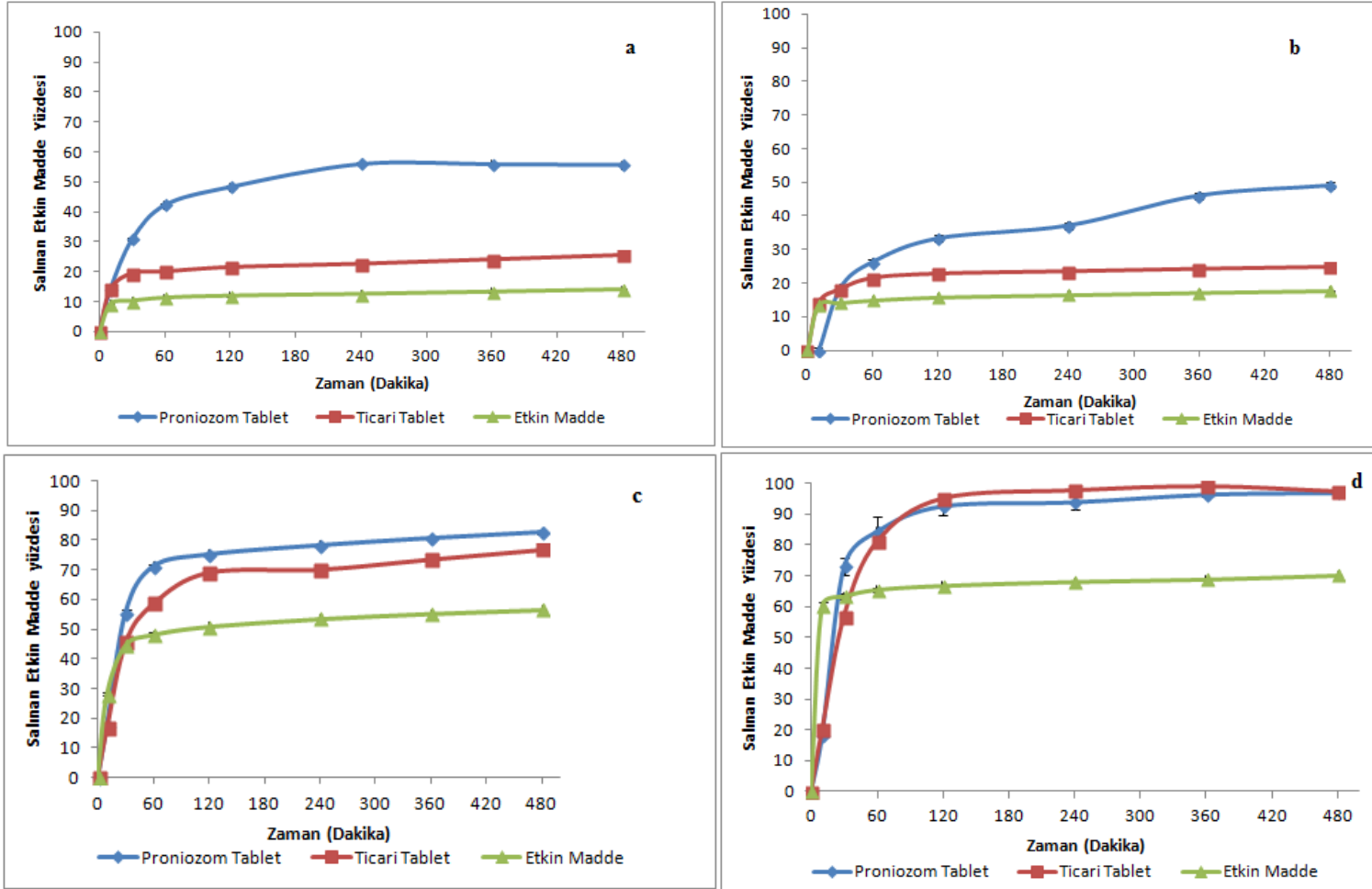
Çizelge 3.34. Tüm pH'larda yapılan çözünme hızı çalışmalarına ait matematiksel model verileri (PT:Proniozom tablet; EM:Etkin madde; TT:Ticari tablet)

Kinetikler	pH 6,8 Fosfat Tamponu			pH 6,8 Fosfat Tamponu %0,2 Tween 80			pH 6,5 Fosfat Tamponu %0,35 Tween 20			pH 4,5 Asetat Tamponu %0,2 Tween 80			pH 4,5 Asetat Tamponu		
	PT*	EM**	TT***	PT	EM	TT	PT	EM	TT	PT	EM	TT	PT	EM	TT
0 Derece K (%/dak x10 ⁻³) r ²	84,63 0,7214	18,52 0,3375	29,78 0,4119	122,9 0,4872	69,68 0,422	119,2 0,5577	142,5 0,4430	62,19 0,2237	373,2 0,6670	197,5 0,7014	15,93 0,4163	30,67 0,4478	27,61 0,6318	- -	- -
1.Derece K (1/dak x10 ⁻³) r ²	1,848 0,7556	0,5354 0,8739	0,8309 0,5569	1,799 0,3427	0,9234 0,4722	1,949 0,4155	1,831 0,2912	0,2544 0,7545	5,106 0,5002	4,493 0,5849	0,7356 0,8306	0,8716 0,6587	1,553 0,7821	- -	- -
Hixson-Crowell K(% ^{1/3} /dak x10 ⁻³) r ²	1,428 0,9013	0,1449 0,9036	0,8309 0,6266	2,622 0,5811	0,9465 0,6045	2,421 0,6605	4,518 0,6266	0,5339 0,7951	23,11 0,9915	3,306 0,7982	0,1451 0,8752	0,3216 0,7594	0,4464 0,6409	- -	- -
Weibull β τ_d (dak) r ²	0,3373 1042 0,9966	0,0795 49,73x 10 ⁹ 0,9899	0,1514 13,67x 10 ⁵ 0,9098	0,4923 93,84 0,7972	0,2096 805,4 0,8549	0,4822 145,5 0,8570	0,6484 43,28 0,8224	0,06644 29,85 0,9893	1,051 38,98 0,9935	0,5206 263,2 0,9435	0,1093 19,62x 10 ⁹ 0,9912	0,1475 18,67x 10 ⁵ 0,9221	0,2447 18,92x 10 ⁵ 0,9695	- -	- -
Higuchi K (dak ^{1/2}) r ²	2,192 0,9102	0,2235 0,9806	0,6502 0,8624	2,591 0,6273	1,168 0,7131	2,583 0,7272	2,988 0,5537	0,4619 0,8984	6,258 0,6751	3,189 0,8864	0,2308 0,9607	0,4883 0,8564	0,5871 0,7490	- -	- -

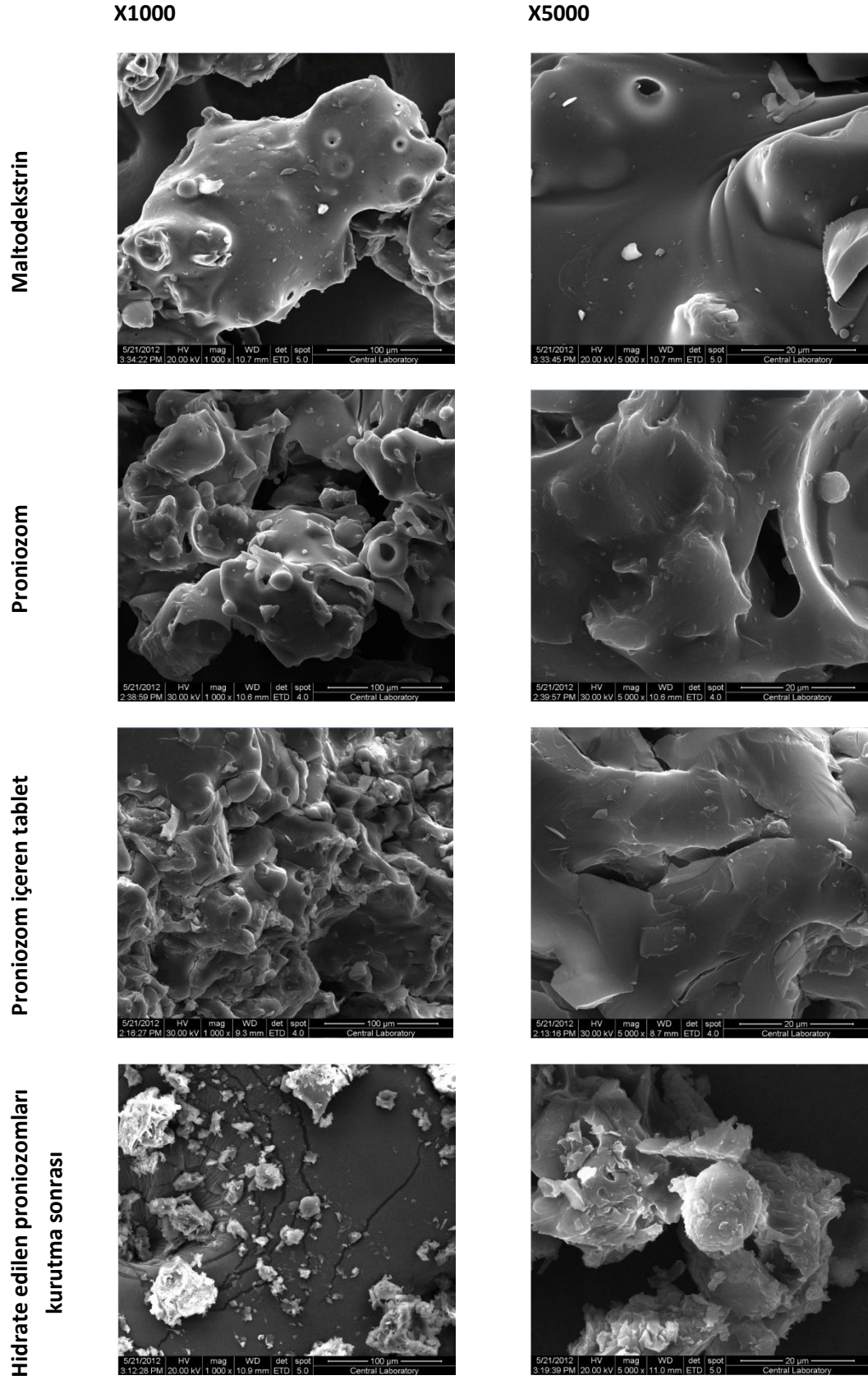
* : Proniozom tablet

** : Etkin madde

*** : Ticati tablet



Şekil 3.25. Farklı çözünme ortamlarında formülasyona bağlı (proniozom tablet, ticari tablet ve etkin madde) çözünme özelliklerinin incelenmesi: a) pH 4,5%0,2 Tween 80 içeren asetat tamponu, b) pH6,8 fosfat tamponu, c) pH 6,8 %0,2 Tween 80 içeren fosfat tamponu, d)pH 6,5 %0,35 Tween 20 içeren fosfat tamponu



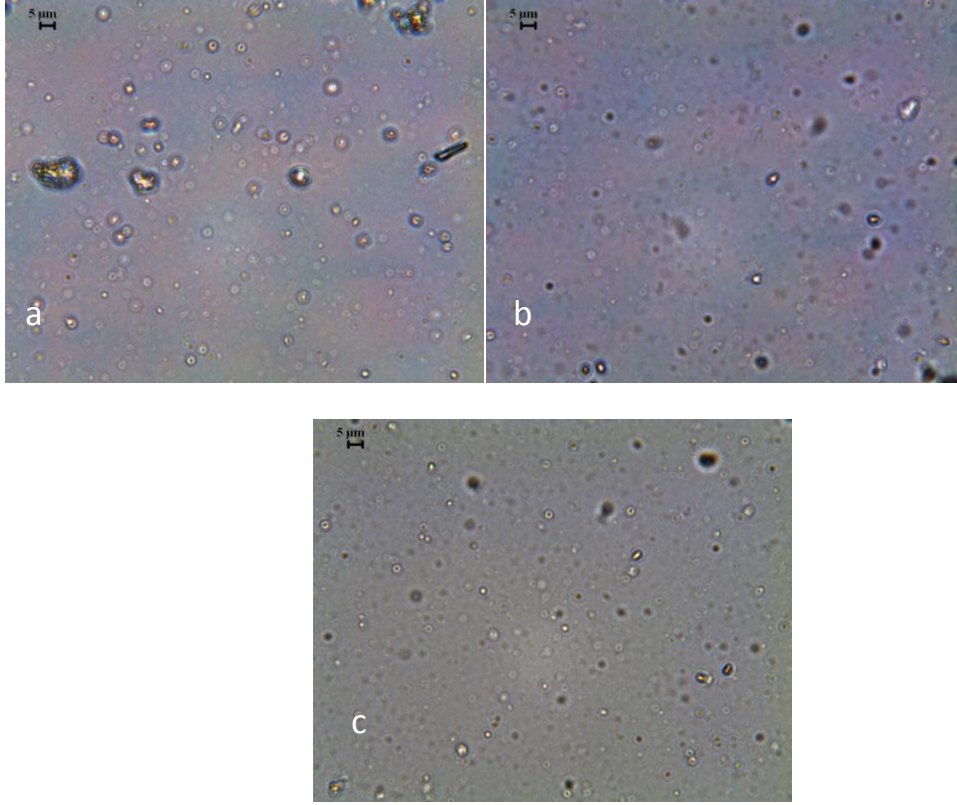
Şekil 3.26. FS, FS tablet, maltodekstrin ve niozomların yüzey morfolojisi

3.3.7. Stabilite Çalışmaları

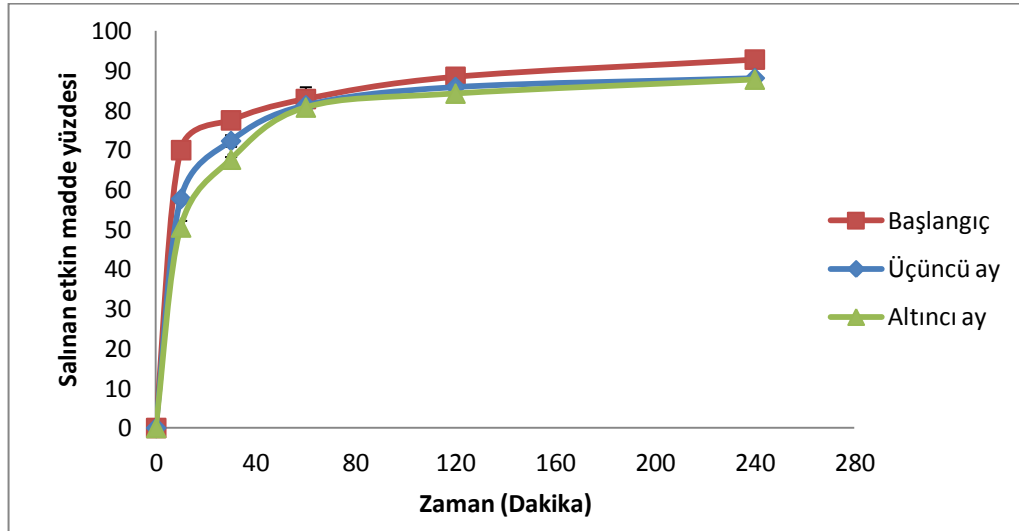
Bölüm 2.2.8.'de anlatıldığı şekilde ağzı sıkı kapalı cam kaplar içinde ve 25°C'de % 60 bağıl nemde saklanan proniozom toz ve proniozomlardan basılan tabletlerin 6 ay süre stabiliteleri izlenmiştir. Yapılan kontroller hidrate edilen formlardan elde edilen niozomlarda tutulan etkin madde miktarı, zeta potansiyel ve partikül büyüklüğü tayini ve proniozom toz ve tabletlerden etkin madde salım testleri ve ilaveten tabletler üzerinde yapılan çap, kalınlık, sertlik ve dağılma testleridir. Proniozom tozlar üzerinde yapılan testlerin sonuçları Çizelge 3.35 ve Şekil 3.27 ve 3.28'de gösterilmektedir. Proniozomlardan hazırlanan tabletlerin stabilite sonuçları Çizelge 3.36. ve Şekil 3.29 ve 3.30'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.35. Proniozom tozlarda (FS formülasyonu) yapılan stabilite çalışmalarının başlangıç, 3. ve 6. aylarda elde edilen sonuçları (SH:Standart hata)

Testler	Başlangıç±SH	3. Ay Sonuçları±SH	6.Ay Sonuçları±SH
Miktar tayini	%103,9±1,56	%98±0,611	%99,1±1,144
Zeta Potansiyeli(mV)	-45,75±0,417	-45,325±0,409	-46,63±0,076
Partikül Büyüklüğü	211,575±1,913	273,33±3,698	239,56±5,98
PDI	0,402±0,015	0,59±0,024	0,625±0,046



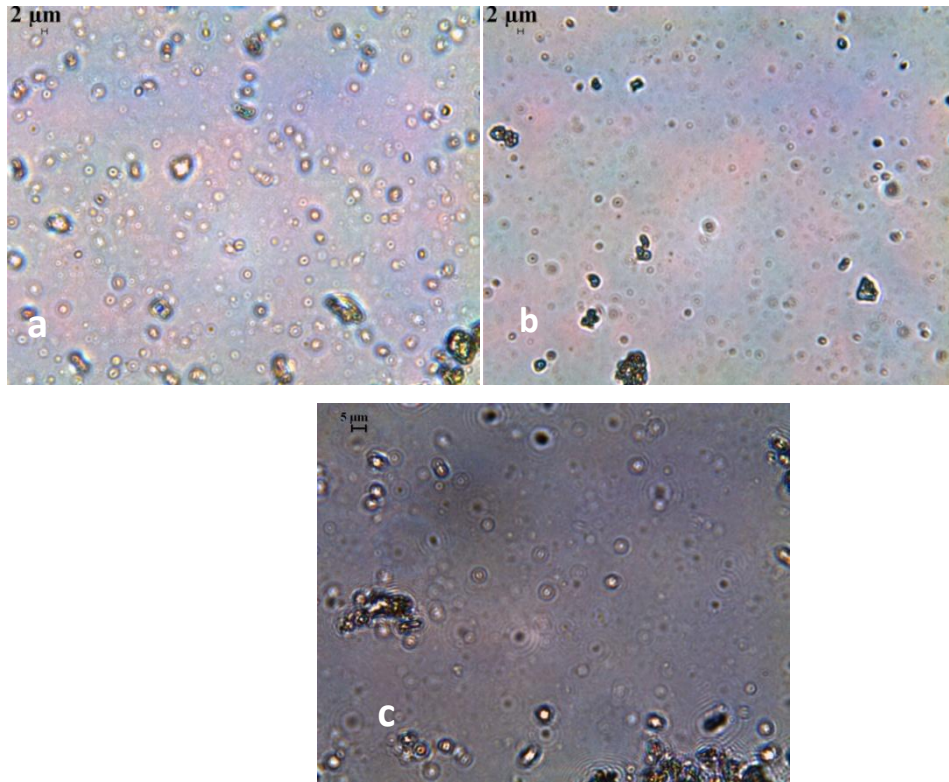
Şekil 3.27. Proniozom tozların optik mikroskop görüntüsü: a) başlangıç proniozomlarından elde edilen niozom süspansiyonu, b) üçüncü ay proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu, c) altıncı ay proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu.



Şekil 3.28. Proniozom tozların (FS formülasyonu) başlangıç, üçüncü ve altıncı ay proniozom toz çözünme hızı test sonuçları

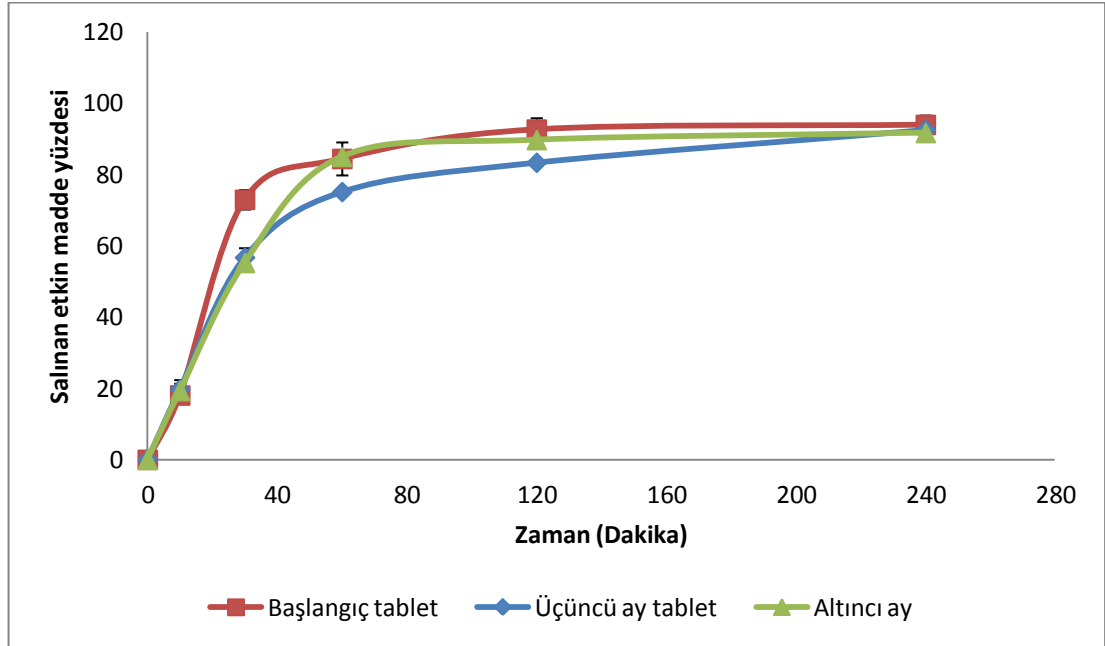
Çizelge 3.36. Proniozom tabletlerde yapılan stabilite çalışmaları sonuçları (SH:Standart hata)

Zaman Testler	Başlangıç ±SH	3.Ay ± SH	6. Ay ± SH
	Proniozom tabletlerden elde edilen niozomlar		
Zeta Potansiyeli (mV)	-45,60±04	-45,87±0,38	-43,3±0,4
Partikül Büyüklüğü (nm)	222±2	229±2	224,67±1,82
PDI	0,364±0,003	0,374±0,030	0,471±0,021
Proniozom tabletler			
Sertlik (kg)	7,6±0,1	5,4±0,2	5,5±0,2
Çap (cm)	1.0±0	1,08±0,014	1,09±0,013
Kalınlık (cm)	0,34±0	0,34±0,0012	0,34±0,0014
Dağılma Süresi (dak)	8,42 ±0,03	8,16±0,03	8,05±0,12



Şekil 3.29. Proniozom tabletlerin optik mikroskopla görüntüsü: a) başlangıç proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu, b) üçüncü ay proniozomdan elde

edilen niozom süspansiyonu, c) altıncı ay proniozomdan elde edilen niozom süspansiyonu



Şekil 3.30. Başlangıç, üçüncü ve altıncı aylarda yapılan proniozom tabletlerde çözünme hızı test sonuçları

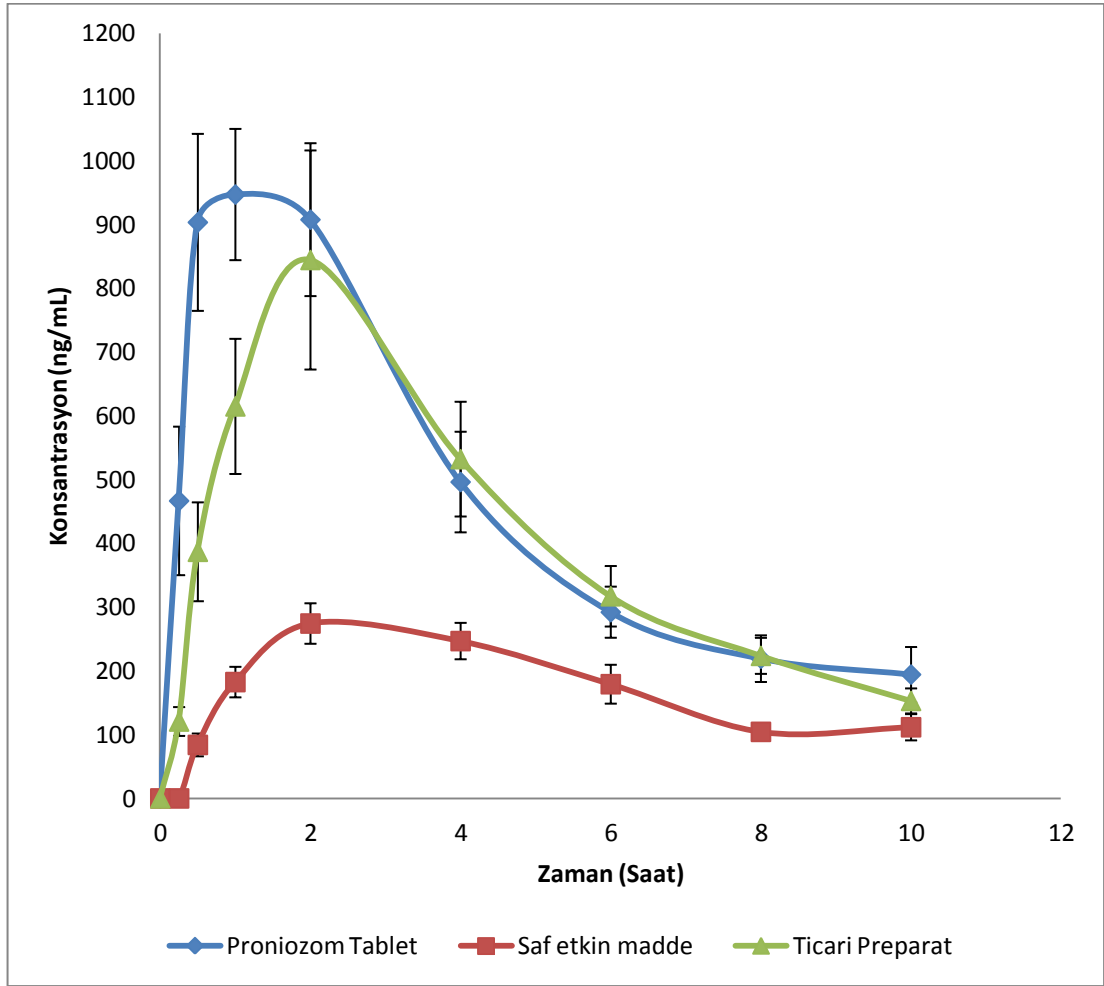
3.4. Formülasyonların Oral Yolla Verilişte Biyoyararlılıklarının İncelenmesine Ait Bulgular

Biyoyararlanım çalışması Bölüm 2.2.9’da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Uygulama şeklinin etkinliğini görmek için önce her gruptan birer hayvana gruplarına ait ilaç şekli uygulanmış ve plazmalarında Kandesartanın tayin edilebilip edilemediği incelenmiştir. Yöntemin uygulduğu görüldükten sonra gruplar arası varyans minimuma inecek şekilde çalışma sürdürülmüştür. Çalışma sırasında proniozom grubundan bir hayvan kendini yaraladığı için kanında madde saptanamamıştır ve bu hayvan çalışma dışı kalmıştır. Ayrıca çalışma sonunda elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve grup içi varyansı artıran hayvanlara ait veriler deney sonuçlarına katılmamıştır(etkin maddeye ait gruptan bu şekilde bir hayvan deney dışı bırakılmıştır).

Elde edilen verilerle farmakokinetik hesaplamalar yapılmıştır ve sonuçları Çizelge 3.37’de görülmektedir. Ayrıca gruplara ait kan profilleri de Şekil 3.31’de görülmektedir.

Çizelge 3.37. Oral yolla verilen proniozom tablet, ticari tablet ve saf etkin maddeden elde edilen bulgulara ait biyoyararlanım parametreleri

	Cmax(ng/ml)			Tmax(Saat)			AUC _{tot} (0→∞)			AUC _{last} (0→n)		
	Pron.	EM	Tic.	Pron.	EM	Tic.	Pron.	EM	Tic.	Pron.	EM	Tic.
1	907,7	312,5	821,5	2	6	1	3711	6118	4530	3188	2168	3931
2	1486	337,3	1560	0,5	2	2	4936	1797	5314	4512	1560	4978
3	984,8	411,3	951,8	1	4	2	5312	2518	5813	5125	2201	4895
4	1160	303,1	639,6	1	6	2	6070	2843	2701	5224	1874	2528
5	743,4	329,1	869,2	2	2	2	4905	2113	5800	3763	1659	4907
6	1407	407,1	1745	1	2	2	6413	3750	7966	5925	1996	7610
7	830,7	228,6	504,2	1	2	2	5264	-	6023	3227	4838	3419
8	1193	212,1	439,1	2	4	4	6590	2087	3579	6214	1270	2772
9			290,2			4			-			2047
Ort. ^a	937,1	274,3	844,5	1	2	2	5667	2581	4987	4673	1741	4149
SE ^b	94,91	25,57	158,5	0,21	0,63	0,28	333,5	532,3	540,5	413,9	393,6	541,5
	P-EM	P-T	EM-T	P-EM	P-T	EM-T	P-EM	P-T	EM-T	P-EM	P-T	EM-T
%95 GA ^c												
AS ^d	347,9	-191,5	-962,9	-3,71	-2,50	-0,32	557,	-1565	-3994	724,6	-1152	-3603,
ÜS ^e	1195	631,7	-139,8	-0,66	0,46	2,65	4178	1933	-373,2	4178	2205	-246,8
P değeri ^f	0,0004	0,387	0,008	0,004	0,217	0,142	0,009	0,961	0,016	0,004	0,714	0,023
^a Ortalama ^c %95 Güven Aralığı ^e Üst Sınır ^b Standart Hata ^d Alt Sınır ^f P<0,05 (Önemli)												



Şekil 3.31. Ratlara veriliş sonrası FS proniozom tablet, ticari preparat ve saf etkin maddenin zamana bağlı plazma konsantrasyonları

4. TARTIŞMA

4.1. Kandesartan Sileksetilin ve Kandesartanın Standart Doğrularının Hazırlanması ve Analitik Validasyonuna İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Kandesartan sileksetilin metanol ve Bölüm 2.2.1.2’de verilen çözünme ortamlarında miktar tayinini yapabilmek için UV spektrofotometre ile ve in vivo çalışmalarda plazmadaki kandesartan miktarını tayin etmek amacıyla ise HPLC ile miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir.

Bölüm 2.2.1.1’de UV spektrofotometri ile ölçüm için kandesartan sileksetilin farklı ortamlarda Şekil 3.1-3.2’deki spektrumları vasıtasıyla belirlenen, maksimum absorbans verdiği dalga boyları (Çizelge 3.1) literatürle uyum göstermektedir (Moffat ve ark., 2005). Etkin madde miktar tayinlerinin hesaplanması için kullanılacak standart doğru denklemlerinin parametreleri ve istatistiksel bulguları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Yüksek determinasyon katsayıları, doğru denklemlerinin güvenilir kullanımını göstermektedir. Bölüm 2.2.1.4’te belirtildiği şekilde etkin madde miktar tayini yöntemlerinin analitik validasyonları yapılmıştır. İn vitro çalışmalar için doğruluk, geri elde ve kesinlik çalışmalarında hesaplanan % BSS değerleri genellikle % 2’nin altında olmuştur. Sadece en düşük konsantrasyonlarda bu değer % 4’e kadar çıkmıştır(Çizelge 3.5.-3.13.). Plazmada miktar tayini validasyon verilerinde ise % BSS değerleri daha yüksektir; ancak biyolojik numune çalışmalarında bu değer % 10-15’e çıkabilmektedir (Özkan ve ark., 2011). Böylece miktar tayini yöntemlerinin doğruluğu gösterilmiştir.

Diğer analitik validasyon parametreleri olan tekrarlanabilirlik ile farklı günlerde ölçüm ve farklı analistler tarafından ölçüm şeklinde incelenen ara kesinlik çalışmalarının bulguları incelendiğinde, % BSS değerleri, % 2 altında olmuştur (3.14, 3.15, 3.17-3.21). Plazma ortamında bu validasyon parametreleri için en yüksek % BSS değeri 5,215 olmuştur(3.16, 3.22). Bu sonuçlarla uygulanan yöntemlerin sağlamlığı, doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği ispat edilmiştir.

Kullanılan yardımcı maddelerle ve solvanlarla kandesartan sileksetil piki girişim yapmamaktadır, bu da yöntemin özgünlüğünü göstermektedir. Çizelge 3. 23'te uygulanan miktar tayini yöntemleri için teşhis ve tayin limitleri görülmektedir. Bu değerler etkin maddenin çalışılan aralık içinde incelenmesi için uygundur.

4.2. Proniozom Formülasyonlarının Hazırlanması ve Kritik İşlem Parametrelerinin Belirlenmesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Proniozom formülasyonlarının hazırlanması için kolay ve büyük çapta üretime olanak veren bulamaç yöntemi kullanılmıştır (Solanki ve ark., 2007). Proniozomları oluşturmak ve formülasyon hazırlamada kullanılacak uygun parametreleri seçmek amacıyla formülasyon çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 2.2). Çalışmada öncelikle proniozomlar için uygun taşıyıcı seçilmiştir. Bu amaçla sorbitol, maltodekstrin, Granulac® 200, 230 ve 70 kullanılmıştır.

Granulac® materyalleri değişik ve çok küçük partikül büyüklüğüne sahip laktoz kökenli maddelerdir. Taşıyıcı olarak farklı partikül büyüklüklerine sahip Granulac® tozların kullanıldığı formülasyonlarda, proniozomlar elde edilememiştir. Bu nedenle formülasyon tablosunda bu formülasyonlara yer verilmemiştir. Bu formülasyonlarda organik çözücünün buharlaştırılması sırasında toz kütlelerinin cam balonun çeperine yapıştığı görülmüştür. Normalde laktoz kloroform içerisinde çözünmemektedir, ancak formülasyonda yer alan yüzey aktif madde ile birlikte bir çözünürleştirme etkisi beklenebilir.

Hazırlanan formülasyonlar için ürün verimi % 60,90 ile % 93,80 arasında değişmektedir (Çizelge 3.24). Sorbitol ile hazırlanan F1 formülasyonunda ürün verimi % 80,13 olarak bulunmuştur. Ancak sorbitolün, organik solvanda çözünmesi ve bulamaç yönteminden ziyade sprey yöntemine daha uygun bir taşıyıcı olduğu belirtilmektedir (Sankar ve ark., 2010, Jukanti ve ark., 2010). Bu nedenle ürün verimi diğer formülasyonlara göre daha düşük olmuştur. Diğer bir taşıyıcı materyal olarak maltodekstrin ile de formülasyon çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmada incelenen ilk

kritik işlem parametresi rotavaporun çözücü buharlaştırma işlemi sırasındaki dönü hızı olmuştur. Sırasıyla 60, 30 ve 90 rpm’lerde buharlaştırma işlemi yapılarak, F2, F3 ve F4 formülleri hazırlanmıştır. Dönü hızı olarak 60 rpm’de hazırlanan F2 formülünde % 92,85 olan ürün verimi, dönü hızı 30 olduğunda F3 formülü için % 90,62 ve ve dönü hızı 90 rpm olduğunda F4 formülü için % 60,90 olmuştur. (Çizelge 3.24). F3 ve F4 formülasyonlarının hazırlanması sırasında kütlenin cam balonun çeperlerine yapıştığı ve proniozomlarının agregatlar şeklinde olduğu gözlenmiştir. Düşük dönü hızında, çözücü buharlaşmasının yavaş olması nedeniyle bulamaç viskozluğunun artması agregat oluşumuna neden olurken, hızlı dönüş sırasında balon içindeki bulamacın balonun çeperlerine homojen bir şekilde dağılamaması nedeniyle agregat oluşmaktadır. Sonuç olarak solvanın ortamdaki uzaklaşmasıyla balonda kalan kütle akışkanlığı kötü ve agregatlar içeren bir yapıda olmaktadır. Bu nedenle optimum dönü hızı, ürün veriminin de en yüksek olduğu 60 rpm olarak belirlenmiştir.

Organik solvanın uzaklaştırılması işlemi amacıyla üç farklı sıcaklık kullanılmıştır. Sırasıyla F2, F5 ve F6 proniozomları kloroformun 45°C, 30°C ve 60°C’ de uçurulmasıyla elde edilmiştir. Ürün verimisi sıcaklıktan önemli derecede etkilenmemekle birlikte en yüksek ürün verimi (% 93,80) 60°C’ de hazırlanan F6 formülasyonunda olmuştur (Çizelge 3.24). Bu nedenle 60°C en uygun çözücü buharlaştırma sıcaklığı olarak seçilmiştir.

Bu aşamada proniozomlardan oluşacak niozomlarda stabilite açısından kullanılan negatif yük verici disetil fosfat (DCP) ilave edilmeksizin F7 formülasyonu ve pozitif yük verici stearilamin kullanılarak F8 formülasyonu hazırlanmıştır. Her iki formülasyonun ürün verimi de yüksek olmuştur.

Etkin madde yükleme etkinliklerinin hazırlanan formülasyonlarda % 97,28 - % 99,80 gibi dar bir aralıkta ve oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.25, Şekil 3.13). Bu sonuç tüm proniozom formülasyonlarının temel bileşimi olan Span 60 ve kolesterolün kandesartan sileksetili başarılı bir şekilde enkapsüle ettiğini göstermiştir. Etkin madde yükleme etkinliğinin çözücü buharlaştırma esnasındaki

sıcaklık ve dönü hızı gibi işlem parametrelerinden etkilenmediği bulunmuştur. Ayrıca taşıyıcı ve yük verici ajanlar da yükleme etkinliğini değiştirmemiştir. Kandesartan sileksetil pratik olarak suda çözünmeyen, lipofilik bir etkin maddedir. Bu nedenle HLB'si düşük olan Span 60 (HLB 4,70) ile hazırlanan proniozom formülasyonlarında etkin madde yükleme etkinliği yüksek olmuştur (Bayındır ve Yuksel, 2010).

Proniozomların hidratasyonu ile oluşturulan niozomların partikül büyüklüğü nanometre boyutlarında, 185-375 nm arasında değişmektedir, PDI değerleri ise 0,306 – 0,519 arasında olmuştur (Çizelge 3.26). Özellikle 60°C'de hazırlanan proniozomlardan elde edilen niozomların boyutları daha küçüktür (Şekil 3.14). Düşük PDI değerleri partikül boyutu dağılımının homojenliğini göstermektedir. Yük verici olarak stearilaminin kullanıldığı F8 formülasyonunun partikül büyüklüğü, oluşturulan niozom dispersiyonunda sedimantasyon nedeniyle ölçülememiştir.

F1 ve F6 formülasyonlarında yük verici ajan olarak DCP mevcuttur ve ölçülen zeta potansiyel değerleri -32,93 mV ile -49,00 mV arasındadır. F7 formülasyonu DCP olmamasına rağmen diğer formülasyonlarla karşılaştırılabilir negatif yük (-43,65 mV) göstermiştir (Çizelge 3.27, Şekil 3.16). Bu etkin maddenin yapısal olarak negatif yük taşıması ile ilişkilidir. Yapıda etkin maddenin karboksil grubu ile oluşan bir ester yapısı yanı sıra azot ve oksijen üzerindeki serbest elektron çiftleri bu negatif yükü oluşturmaktadır. Stearilaminle yapılan formülasyonda zeta potansiyeli agregasyonu önleyecek değerden çok düşüktür (-6.166 mV) (Çizelge 3.27, Şekil 3.16); bu nedenle oluşturulan niozom dispersiyonunda sedimantasyon gözlenmiştir. Çalışmanın sonucu bu etkin maddenin niozomları için DCP kullanımının gerekli olmadığını göstermektedir.

Optik mikroskop incelemeleri proniozom formülasyonlarının hidratasyonu neticesinde küresel niozom veziküllerinin oluştuğunu göstermiştir (Şekil 3.17).

Hazırlanan proniozomların FDA'da verilen çözünme ortamında (% 0,35 Tween 20 içeren pH 6,5 fosfat tamponu) çözünme hızı verileri incelendiğinde F4 ve

F5 formüllerinden 4. saat sonunda salınan etkin madde yüzdesinin % 71,9 ve 71,3 olduğu ve diğer formüllere göre daha az bir etkin madde çıkışı olduğu bulunmuştur (Şekil 3.18 ve Şekil 3.19). F4 formülasyonunun hazırlanmasında en yüksek dönü hızı olan 90 rpm uygulanmıştır. Daha önce belirtildiği gibi bu yüksek hız, balon çeperine bulamacın homojen yayılımını engelleyerek bireysel akıcı partiküler toz yerine agregat oluşumuna neden olmaktadır. Dolayısı ile bu agregatların dağılması ile proniozomların oluşması ve oluşan proniozomlardan da niozomların oluşumu gecikmiştir ve bu da daha yavaş etkin madde salımı ile sonuçlanmıştır. F5 formülasyonunda ise işlemde uygulanan sıcaklık düşüktür; (30°C) ve tam olarak çekilemeyen organik solvan nedeniyle akışkan bir toz kütlesi elde edilememiştir. En yüksek etkin madde çıkışı (% 91,9 ve 94,7) F2 ve F7 formülasyonlarından elde edilmiştir (Şekil 3.18 ve Şekil 3.19). Elde edilen sonuçlar proniozom imalatında yer alan kritik işlem parametrelerinden çözücü buharlaştırma sıcaklığı ve dönü hızının in vitro etkin madde salım profillerini etkilediği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmalar sonucunda F7 formülasyonu bileşimi ve işlem koşulları incelenen spesifikasyonlara bağlı olarak en uygun formülasyon olarak belirlenmiştir. Daha ileri çalışmalar için bu formülasyon 18 seri halinde üretilip bir araya getirilerek FS olarak kodlanmış ve tüm diğer formüllerle birlikte kontrolleri yapılmıştır. Bu formül orijinal formülasyonu olan F7 ile aynı özellikleri göstermiştir (Çizelge 3.24 - 3.27; Şekil 3.18 -3.19).

4.3. Seçilen Proniozom Formülasyonunun Tablet Haline Getirilmesi

Proniozomların niozomlarla karşılaştırıldığında oral yolla veriliş için bir avantajı, bu formların sert jelatin kapsüller içine doldurulabilmesi veya tablet haline getirilebilmesidir. Bu çalışmamızın amaçlarından birisi de seçilen proniozom formülasyonun tablet haline getirilmesi ve özelliklerinin değişip değişmediğinin incelenmesidir.

Tablet formülasyonuna proniozomlar yanısıra şişme ve kapiler etki ile tabletlerin dağılmasını sağlayan bir süper dağıtıcı olarak çapraz bağlı polivinil pirolidon (Kollidon-CL) ve kapiler etki ile dağılma sağlayan bir dağıtıcı olarak mikrokristal selüloz (Avicel PH 101) ilave edilmiştir (Çizelge 2.3). Böylece tabletlerin hızla dağılarak proniozomların açığa çıkması hedeflenmiştir. Tabletlerin dağılmasını geciktirmemesi için basımda uygulanacak basınç ile tablet sertliği yaklaşık olarak 7,5 kg olarak ayarlanmıştır.

Bu şekilde belirlenen tablet formülasyonu, maltodekstrin ve proniozomlarla karşılaştırmalı olarak toz akış özellikleri, konsolidasyon ve basılabilirlik açısından incelenmiştir.

4.3.1. Konsolidasyon ve Akış Özellikleri

Tablet basımında granül akışkanlığı ve konsolidasyonu (sıkışabilirliği), basım kütesinin tablet zımbası içine tektür dolumu, tablet içinde tektür bir dansite dağılımı ve tabletlerin mekanik özellikleri açısından önemli özelliklerdir. Konsolidasyon (bağlı dansite değişimi) ve Hausner indeks (HI) değerleri, toz karışımlarının akışkanlığı ve sıkışabilmesi hakkında göstergelerdir (Yuksel ve ark., 2007).

Bölüm 2.2.4.1’de belirtildiği şekilde taşıyıcı maltodekstrin, proniozom ve proniozom içeren tablet formülasyonu (basım kütesi) üzerinde yapılan konsolidasyon incelemesinin sonuçları Şekil 3.20’de ve Çizelge 3.28’de verilmektedir.

Tablet oluşumu esnasında ilk adım, toz partiküllerinin birbirine yakın şekilde yerleşmeleri için sıkışabilmeleri, küme hacimlerinin azalması yani konsolide olabilmeleridir. Sonrasında plastik deformasyon ve kırılma ile tabletlerin oluşumu gerçekleşmektedir. Başlangıç yerleşim hızı, Şekil 3.20’de vuruş sayısına karşılık bağlı dansite değişimi (A) grafiğinde görüldüğü şekilde, oluşan doğrunun eğimi ile yorumlamak mümkündür. Buna göre en yavaş yerleşim maltodekstrinde

görülmektedir. Sonra sırası ile proniozomlar ve proniozom basım kütlesi için bu hız bağıl olarak artmaktadır (Çizelge 3.28). Bu sonuç HI değerleri ile de uyumludur. Maltodekstrin için HI değeri 1,512 olup çok zayıf akış özelliğine karşılık gelirken, sırasıyla proniozom ve proniozom basım kütlesinin 1,220 ve 1,203 olan HI değerleri akış açısından kabul edilebilir değerlerdir (EP 6.0).

Tozların akışkanlığı yığın açısı ve akış hızı ile belirlenmektedir. Bu parametrelere ait veriler Çizelge 3.29'da verilmiştir. Maltodekstrin için 36.22 derece olan yığın açısı toz akış özelliği açısından sadece kabul edilebilir görünürken, proniozomlar için 29,85 derece değeri ile mükemmel ve proniozom basım kütlesi için 31,44 derece ile iyi olarak nitelendirilmektedir (EP 6.0). Aynı şekilde en hızlı akış da proniozomlar ve sonrasında proniozom basım kütlesi için gözlenmiştir.

Bu sonuçlar maltodekstrin üzerine kaplanan yüzey aktif madde filminin partiküllerarası etkileşimi azaltarak akışkanlığını artırdığını göstermektedir.

4.3.2. Basılabilirlik

Bölüm 1.10'da anlatılan Heckel eşitliği uygulanarak elde edilen basılabilirlik parametreleri, ortalama beceri basıncı, P_y ($1/eğim$) ve I , kesişim değerleri Çizelge 3.30'de verilmektedir. P_y değeri bir materyalin basım esnasında deformasyona karşı direncini ifade etmektedir. I değeri ise başlangıç yerleşim aşamasında kütlenin dansifikasyonunun ölçüsüdür. Bu değerler maltodekstrin (0,878) – proniozom (0,986) - proniozom basım kütlesi (1,248) arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında maltodekstrin ile proniozom basım kütlesi arasında % 10 düzeyinde ($p<0,10$) önemli derecede farklılık gözlenmiştir.

Proniozom tablet formülasyonunun en düşük eğimi (0,0106) ve buna karşılık en yüksek P_y değeri (96,55 MPa), kütlenin plastik özelliğinin azaldığını ve deformasyon için daha büyük basınç gerektiğini göstermektedir. Maltodekstrin ve

proniozomlar için Py değerleri sırasıyla 64,97 MPa ve 70,75 MPa'dır (Çizelge 3.30). Genel olarak 80MPa altında Py değerlerinin esas olarak plastik deformasyonu gösterdiği belirtilmektedir (Yuksel ve ark., 2003).

Çizelge 3.31'de verilen tablet özelliklerine göre proniozomları içeren tabletlerin sertlikleri 7,625 kg'dır ve dağılma süresi yaklaşık 8 dakika olmuştur.

4.3.3. Tabletlerden Elde Edilen Niozomların Özellikleri

Tablet basımı öncesinde belirlenen proniozom özelliklerinin tablet basımından sonra değişip değişmediğini gözlemleyebilmek için Bölüm 2.2.6.3 – 2.2.6.4'te anlatıldığı şekilde tabletlerden elde edilen niozomların partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve optik görüntüleri incelenmiştir (Çizelge 3.32 ve Şekil 3.21). Bu incelemeler, basım öncesi proniozomlardan elde edilen niozomların özellikleri ile karşılaştırıldığında, tablet basımında uygulanan basıncın, özellikleri değiştirmedğini göstermiştir.

4.3.4. Farklı Çözünme Ortamlarında Tabletlerden Etkin Maddenin Çözünme Hızı Tayini

Bu çalışmada başlıca amaç çözünürlüğü düşük bir etkin maddenin proniozomlar vasıtası ile çözünürlüğünün artırılmasıdır. Bu nedenle seçilen sonuç formülasyon ile hazırlanan proniozomları (FS) içeren tabletlerin, saf etkin maddenin ve ticari olarak bulunan tabletlerin gastrointestinal sistemde karşılaşılabilecek pH değerlerinde ve yüzey gerilimini düşürerek ıslatma etkisi için ilave edilen yüzey aktif madde olan ve olmayan ortamlarda (Bölüm 2.2.1.2) çözünme hızları test edilmiştir.

Şekil 3.22'de proniozom içeren tabletlerin çözünme profilleri görülmektedir. Suni mide sıvısı - pH 1,2 tween içeren ve içermeyen çözünme ortamlarında etkin madde çıkışı gözlenmemiştir. Yüzey aktif madde içermeyen ortamlarda etkin

maddenin çıkışı daha da düşük olmuştur. En uygun çıkış, FDA tarafından önerilen ve % 0,35 a/h Tween 20 pH 6,5 fosfat tamponunda ve takiben % 0,2 a/h Tween 80 içeren pH 6,8 fosfat tamponunda gözlenmiştir. Şekil 3.23'te ticari tabletlerin ve Şekil 3.24'te saf etkin maddenin çözünme profilleri görülmektedir. Her ikisi için de suni mide sıvısı - pH 1,2 tween içeren ve içermeyen çözünme ortamlarında ve Tween içermeyen pH 4.5 tamponda etkin madde çıkışı gözlenmemiştir. Çizelge 3.33'te çözünme deneyleri sonunda ulaşılan etkin maddenin yüzde çözünme değerleri verilmektedir. Buna göre proniozom tabletler için en yüksek değerler elde edilmiştir. Bu sonuç, proniozomların kandesartan sileksetilin çözünürlüğünü dolayısı ile çözünme hızını artırdığını göstermektedir.

Farklı çözünme ortamlarında yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler karşılaştırma amacı ile Bölüm 1.9'da verilen kinetik modellere uygulanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.34'te görülmektedir. Etkin madde, proniozom tabletler ve ticari tabletlerden çözünme verileri Weibull modeline uyum göstermiştir. Etkin maddenin % 63,2'sinin çözündüğü zamanlar (τ_d) açısından bir karşılaştırma yapıldığında proniozom tabletlerin çözünme ortamlarında (pH 6.5, % 0,35 Tween 20 içeren ortam dışında) daha kısa sürelerde bu değere ulaştığı gözlenmektedir. Etkin madde, pH 6.5, % 0,35 Tween 20 içeren ortamda en düşük τ_d değerini vermiştir, ama sonrasında çözünmesi durmuştur. Beta şekil faktörü (β) değerleri genellikle birden küçük olmuştur. Budeğerin birden küçük ya da bire eşit olması başlangıçta hızlı etkin madde salımını takiben basit birinci derece eğri ile uyumlu hızda bir platoya ulaşılması söz konusudur (Langenbucher, 1981). Benzerlik faktörü kıyaslaması göstermiştir ki, çözünmenin yüksek olduğu ortamlarda ticari preparatla proniozom tabletlere ait çözünme hızı profilleri benzerken, çözünme hızının düşük olduğu pH'larda benzerlikten söz edilememektedir.

4.3.5. Sonuç Formülasyonun Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Proniozom oluşumunda taşıyıcı materyal olan maltodekstrin partikülleri (0,25-0,50 μm) yüzeyine, organik solvan içinde çözülmüş olan noniyonik yüzey aktif madde, bulamaç yöntemi ile kaplanmıştır. Bu oluşum sırasında materyal yüzeyinde ve sonrasında tablet basımı sırasında yüzey yapısındaki değişimleri gözlemek için SEM analizi yapılmıştır. Şekil 3.26'da görüldüğü gibi kaplanmamış maltodekstrin partikülleri belirli bir şekle sahip değildir ve yüzeyinde katlanma ve porlar bulunmaktadır. Düz yüzeyler üzerine yüzey aktif madde homojen ve ince bir film şeklinde kaplanırken, yüzeydeki porlar ve katlanmalar yüzey aktif madde ile dolmakta ve bu da daha kalın bir kaplama tabakası oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle proniozomlarda taşıyıcının yüzey özelliklerinin ve yüzey alanının yüzey aktif madde yüklemesinde etkili olduğu belirtilmektedir (Blazek-Welsh ve G. Rhodes, 2001). Bununla birlikte Şekil 3.26'da verilen proniozomların görüntüsü kaplanmamış olanla çok fazla bir fark göstermemektedir. Dolayısı ile proniozomların hazırlanması sırasında maltodekstrinin yüzeyinin ince bir film tabkası ile kaplanmış olduğu anlaşılmaktadır.. Proniozomlardan hazırlanan tabletler toz edilmeksizin kırılarak SEM ile incelenmiştir. Tabletlerin kırılma yüzeylerinde, tablet basımı sırasında uygulanan basıncın sonucu olarak artan bir dansite ve yer yer çatlakların olduğu bir yapı gözlenmektedir. Şekil 3.26'da yer alan diğer bir mikrograf ise proniozomlar hidrate edilip bir desikatörde kurutulmasından sonra elde edilen partiküler bir niozom ve maltodekstrin partiküllerinin karışımını göstermektedir.

4.4. Stabilité Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

Stabilite çalışmalarında başlangıç, üçüncü ve altıncı ay sonuçları alınmıştır. Proniozom tozlardan elde edilen veriler Çizelge 3.35 ve Şekil 3.27ve 3.28'de verilmiştir. Buna göre proniozomlardan elde edilen niozomların özelliklerinde önemli derecede bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak proniozomlardan hazırlanan tabletlerin sertliği, kalınlık ve çapında değişiklikler gözlenmiştir (Çizelge 3.36). Genel olarak tabletlerde basım sonrası ölçülen sertlik değeri bekletme ile

değişmektedir. Bu basınç uygulaması sırasında tablet içinde kalan stresin bekletme sırasında salıverilmesi ile oluşan gevşemenin sonucudur. Proniozom tabletlerden elde edilen niozomların 3. ve 6. ay sonunda boyutu ve yüzey yükü değişiklik göstermemiştir (Çizelge 3.36, Şekil 3.29). Etkin madde salımı açısından da proniozom tabletlerde bir fark oluşmamıştır (Şekil 3.30).

4.5. Formülasyonların Oral Yolla Verilişte Biyoyararlılıklarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda üç farklı dozaj formunun (saf etkin madde, FS proniozomları ve etkin maddenin ticari preparatı) değerlendirilmesi için kompartıman modelinden bağımsız farmakokinetik analiz uygulanmıştır; belirlenen farmakokinetik parametreler, $AUC_{0 \rightarrow t}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, C_{max} ve T_{max} olmuştur.

Şekil 3.31’de oral yolla verilen formülasyonların plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri görülmektedir. Uygulanan formülasyonlarda en son 10. saatte kanda kandestartan miktarı tayin edilmiştir. Plazma konsantrasyonu-zaman eğrilerinin iniş kısımları incelendiğinde, özellikle ticari preparat, saf etkin madde ve proniozomlar için etkin maddenin eliminasyonunun bifazik tarzda olduğu görülmektedir (Şekil 3.31). Buna göre erken zaman noktalarında kandestartan konsantrasyonundaki azalma hızlıdır ve sonraki zaman noktalarında azalmaktadır.

C_{max} değerleri proniozom formu için $937,09 \pm 94,91$ ng/ml, saf etkin madde için $274,29 \pm 25,57$ ng/ml ve ticari preparat için $844,45 \pm 158,53$ ng/ml olmuştur; bu sıra ile T_{max} değerleri ise $1 \pm 0,21$ saat, $2 \pm 0,63$ saat ve $2 \pm 0,28$ saat’tir (Çizelge 3.37). C_{max} değerleri proniozom ve ticari preparat uygulamalarında saf etkin maddeye göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$). Proniozom uygulamalarında elde edilen T_{max} değeri istatistiksel olarak diğer formüller için elde edilen değerlerden önemli derecede kısadır ($p < 0,01$). Bu sonuç etkin madde çözünme sonuçlarından da tahmin edilebilmiştir. Terapötik etkinin daha hızlı bir şekilde ortaya çıkmasının isteneceği yüksek tansiyon rahatsızlığında erken etki göstermesi açısından

çalışmamızda hazırlanan proniozom formülleri saf etkin madde ve ticari preparattan daha üstün özelliktedir.

AUC_{0-t} ve $AUC_{0-\infty}$ değerleri proniozomların ve ticari preparatın uygulandığı sıçanlarda saf etkin madde uygulanan gruba göre önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). AUC , C_{max} ve T_{max} değerlerinin saf etkin maddeye göre daha yüksek oluşu formülasyonların, içerdikleri etkin maddenin daha yüksek oranlarda kana geçişini sağlayarak etkinliğini artırdığını göstermiştir. Ticari preparatın etkin maddeye göre bağlı biyoyararlanımının 1,93 kat arttığı gözlenmiştir. Oral olarak uygulanan proniozom formülasyonları ise hem saf etkin madde hem de ticari preparata göre biyoyararlanımı 2,20 ve 1,14 kat artırmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Lipozomlar ve niozomlar gibi veziküler sistemlerin ticari forma dönüştürülebilmeleri ciddi fiziksel stabilite problemlerinden dolayı oldukça sınırlıdır. Veziküler sistemlerin sahip olduğu üstün özellikleri değiştirmeksizin daha stabil formları olan proveziküler sistemlere dönüştürülmesi veziküler sistemlerin hastaların kullanıma girmesini büyük ölçüde artıracaktır. Özellikle kuru granüler formdaki proniozomların oral yolla ilaç verilmesi için farmasötik formlar kapsül, tablet veya kullanımdan hemen önce hazırlanan çözelti şeklindedir ve bu formlar hasta uyuncu ve kullanımı açısından en fazla tercih edilen formlardır. Bu formlar aynı zamanda büyük çaplı üretim açısından da esneklik sağlayacaktır. Veziküler sistemlerin üretiminde karşılaşılan yüksek maliyet sıkıntısını düşürecektir. Proniozomlar kuru ve serbest akan toz ürünler oldukları için niozomal sistemlerin stabilite ile ilgili sorunlarını önemli derecede azaltırlar; depolama ve sterilizasyon sırasında niozomlara göre daha stabil sistemlerdir. Taşıma, dağıtma, depolama ve ölçüm yapma kolaylığı proniozomları geniş bir etkin madde çeşitliliği ile kullanılabilir kılan sistemler haline getirmiştir.

Bu çalışmada antihipertansif etkili Kandesartan Sileksetilin proniozom formülasyonlarının hazırlanarak tablet haline getirilmiş ve in vivo olarak sıçanlarda biyoyararlılıkları incelenmiştir. Bu nitelikte bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Ayrıca proniozomlar ile ilgili genellikle topikal uygulama çalışmaları bulunmaktadır ancak oral yolla uygulanmalarına ilişkin çalışma sayısı sınırlıdır. Bu açıdan gerçekleştirilen bu proje literatüre katkıda bulunacaktır.

Bu tez çalışması sonucunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Kandesartan sileksetil'in metanol ve gastrointestinal sistem koşullarını yansıtabilecek farklı çözünme ortamlarında miktar tayinini yapabilmek için spektrofotometri ve in vivo çalışmalarda plazmadaki Kandesartan miktarını

tain etmek amacıyla ise HPLC ile etkin madde miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir ve analitik validasyonu yapılmıştır.

- Çalışmada farklı formülasyon (taşıyıcı materyal, yük verici ajan) ve işlem parametreleri (organik çözücüyü uzaklaştırma aşamasında kullanılan dönü hızı ve sıcaklık) kullanılarak bulamaç yöntemi ile Span 60 içeren proniozom formülasyonları hazırlanmıştır. Kandesartan sileksetil yüksek yükleme etkinliği (% 97,28 - % 99,25) ile hazırlanan tüm formüllere başarıyla yüklenmiştir.
- Uygun taşıyıcı materyal olarak maltodekstrin seçilmiştir. İşlem parametrelerinin proniozom spesifikasyonlarını (ürün verimi, etkin madde çıkışı, hidrate niozomların partikül boyutu ve yüzey yükü) değiştirdiği tesbit edilmiştir. Optimum organik çözücü buharlaştıma sıcaklığı 60°C ve dönü hızı 60 rpm olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda üretilen ve taşıyıcı olarak maltodekstrin kullanılan, yük verici ajan içermeyen F7 formülasyonu en uygun formülasyon olarak belirlenmiştir. Bu formülasyon çoğaltılarak FS formülü oluşturulmuştur.
- FS proniozomlarından tablet basımı ve tabletlerde performans çalışmaları yapılmıştır. Proniozom formülasyonuna çeşitli dağıtıcılar ilave edilerek elde edilen tablet basım kütlesi, maltodekstrin ve proniozomlar karşılaştırmalı olarak toz akış özellikleri, konsolidasyon ve basılabilirlik açısından incelenmiştir. Proniozom formülasyonunun ve tablet basım kütlesinin akış özelliklerinin maltodekstrine göre daha iyi olduğu bulunmuştur.
- Tabletleme işleminin hidrasyon neticesinde oluşan niozomların özelliklerini (partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve optik görüntü) değiştirmediği bulunmuştur.
- Proniozom tabletleri üzerinde farklı çözünme hızı ortamlarında yürütülen etkin madde çıkış deneylerinde piyasa preparatına göre etkin madde çıkışının daha yüksek olduğu bulunmuştur.

- Maltodekstrin ve proniozomların SEM analizinde literatürle uyumlu olarak taşıyıcı partiküllerinin yüzeylerinin kaplama ile değişmediği ancak tablet basımı sırasında yüzeyde çatlaklıklar/kırıklıklar olduğu görülmüştür.
- Seçilen formülasyon ile hazırlanan proniozom tabletlerin saf etkin madde ve ticari preparat ile karşılaştırmalı olarak in vivo performansı belirlenmiştir. Oral yolla Sprague-Dawley türü erkek sıçanlara uygulanan formülasyonlardan elde edilen farmakokinetik veriler incelendiğinde proniozomlar ve ticari preparat ile saf etkin maddeye göre AUC değerinde önemli artışlar sağlamıştır. Oral olarak uygulanan proniozom formülasyonlarının saf etkin madde ve ticari preparata göre biyoyararlanımı 2,20 ve 1,14 kat artırdığı bulunmuştur.
- Oral yolla uygulanan proniozomlar sayesinde Kandesartan sileksetil, ticari preparata ve saf etkin maddeye göre daha kısa sürede kandaki maksimum seviyesine ulaşmıştır. Terapötik etkinin daha hızlı bir şekilde ortaya çıkmasının isteneceği yüksek tansiyon rahatsızlığında erken etki göstermesi açısından çalışmamızda hazırlanan proniozom formülleri saf etkin madde ve ticari preparattan daha üstün özelliktedir.
- Bu çalışmada niozomların sahip olduğu üstün özellikleri değiştirmeksizin daha stabil formları olan proniozom formülleri başarıyla hazırlanmıştır böylece veziküler sistemlerin hastaların kullanıma girmesini sağlayacak bir formülasyon başarıyla oluşturulmuştur.

Elde edilen sonuçlara bağlı olarak, proniozomlar, aşağıdaki alanlarda çalışmaların yürütülmesi için de önerilmektedir:

- Proniozom içeren tablet formülasyonlarının geliştirilmesi ayrı bir proje konusu olarak incelenmeli ve proniozomların katı dozaj formu haline getirilmesi üzerinde daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.
- Özellikle son zamanlarda farmasötik teknoloji alanında pek çok çalışmaya konu olan ağızda dağılan/çözünen tablet formülasyonları olarak proniozomları içeren tabletler incelenebilir.

- Analjezikler, antihistaminikler gibi özellikle hızlı etki göstermesi istenen etkin maddelerin formülasyonu için proniozomların çalışılması uygun görülmektedir.
- Proniozom formülasyonları, düşük çözünürlük problemi yüzünden formüle edilemeyen ve oral biyoyararlanımı sınırlı olan diğer lipofilik etkin maddelerin (antikanser ilaçlar gibi) de oral biyoyararlanımını artırmak açısından ümit vericidir; daha pek çok çalışma yapılması mümkün olacaktır.

ÖZET

Kandesartan sileksetil içeren proniozomların üretilmesinde işlem parametrelerinin değerlendirilmesi ve in vivo biyoyararlanımlarının incelenmesi

Suda çözünürlüğü düşük etkin maddelerin ilaç taşıyıcı sistemler ile çözünüleştirilerek oral biyoyararlanımlarının artırılması farmasötik teknoloji alanında başlıca çalışma alanlarından birisidir. Özellikle niozomlar gibi kolloidal veziküler sistemlerdir oral biyoyararlanımlarının artırılması açısından umut vericidir. Ancak bu sistemlerin sedimantasyon, agregasyon gibi fiziksel stabilite ve hidroliz, oksidasyon gibi kimyasal stabilite problemleri ile saklama sırasında olabilecek etkin madde sızıntısı problemlerinin üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Bu amaçla yakın zamanlarda geliştirilen bir yaklaşım proveziküler sistemlerinin hazırlanmasıdır. Bu çalışmada düşük suda çözünürlüğü nedeniyle oral verilişte biyoyararlılığı yüzde 15 düzeyinde olan kandesartan sileksetilin proniozom formülleri ile çözünürlüğünün ve çözünme hızının artırılması ve in vivo performansının incelenmesi amaçlanmıştır.

Kandesartan sileksetil yüklü proniozomlar değişik taşıyıcı materyaller üzerine yüzey aktif madde, Span 60, kolesterol, yük verici maddenin organik solvandaki çözeltisinin kaplanması ile oluşturulmuştur. Üretim işleminin kritik parametreleri, taşıyıcı tipi (sorbitol, maltodekstrin, Granulac), yük verici madde ilavesi, işlem sıcaklığı, dönü hızı olmuştur. Uygun taşıyıcı materyal olarak maltodekstrin seçilmiştir. İşlem parametrelerinin proniozom spesifikasyonlarını (ürün verimi, etkin madde çıkışı, hidrate niozomların partikül boyutu ve yüzey yükü) değiştirdiği tesbit edilmiştir. Optimum organik çözücü buharlaştırma sıcaklığı 60°C ve dönü hızı 60 rpm olarak belirlenmiştir. Seçilen formülasyonun yardımcı maddeler varlığında akış özellikleri, konsolidasyonu ve basılabilirliği değerlendirilerek tablet formu geliştirilmiştir. Tabletleme işleminin hidratasyon neticesinde oluşan niozomların özelliklerini (partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve optik görüntü) değiştirmede bulunmuştur. Üç aylık stabilite sonuçları hem tabletlerden hem de proniozomlardan oluşturulan niozomların özelliklerinin değişmediğini göstermiştir. Saf etkin madde, proniozomlar ve ticari tabletin sıçanlarda oral yolla verilişte biyoyararlıkları belirlenmiştir. Sonuç olarak uygulanan proniozom formülasyonunun saf etkin madde ve ticari preparata göre biyoyararlanımı 2,20 ve 1,14 kat artırdığı bulunmuştur. Oral yolla uygulanan proniozomlar sayesinde Kandesartan sileksetil, ticari preparata ve saf etkin maddeye göre daha kısa sürede kandaki maksimum kandesartan seviyesine ulaşmıştır.

Proniozom formülasyonları, düşük çözünürlük problemi yüzünden formüle edilemeyen ve oral biyoyararlanımı sınırlı olan diğer lipofilik etkin maddelerin (antikanser ilaçlar gibi) de oral biyoyararlanımını artırmak açısından ümit vericidir; daha pek çok çalışma yapılması mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Proniozom, taşıyıcı, yüzey etkin madde, bulamaç yöntemi, işlem validasyonu, kandesartan sileksetil, biyoyararlılık.

SUMMARY

Evaluation of process parameters for the preparation of proniosomes containing candesartan cilexetil and assessment of their in vivo bioavailabilities

Solubilization of poorly water-soluble drugs using drug carrier systems to enhance their oral bioavailability is a major research area in pharmaceutical technology. Especially colloidal vesicular systems such niosomes are promising systems for enhancing oral bioavailability. However, it is necessary to overcome the physical stability problems like sedimentation, aggregation and chemical stability problems such as hydrolysis, oxidation and drug leakage during storage of these systems. For this purpose, a recently developed approach is preparation of provesicular systems. In this study, we aimed to enhance the solubility and dissolution rate of candesartan cilexetil, which has an oral bioavailability of around 15% due to low aqueous solubility, by preparing its proniosome formulations and evaluate its in vivo performance.

Candesartan cilexetil loaded proniosomes were prepared by coating the solution of non ionic surfactant (Span 60), cholesterol, charge inducing agents in the organic solvent into various types of carriers. The critical parameters of the production process were, types of the carriers (sorbitol, maltodextrin, Granulac), addition of charge inducing agents, temperature and rotation speed. Maltodextrin was chosen as the appropriate carrier. The process parameters changed the specifications of proniosomes (such as production yield, drug release, particle size and surface charge of assembled niosomes after hydration of proniosomes). The optimum temperature and rotation speed for organic solvent evaporation were found to be 60°C and 60 rpm respectively. The flow properties, consolidation and compressibility properties of the selected formulation in the presence of tableting excipients were evaluated and their tablet form was produced. The tableting process did not change the properties (particle size, zeta potential and optical micrographs) of niosomes that assemble after hydration. The results of three month stability test revealed that the properties of both proniosomes and assembled niosomes did not change during storage. The bioavailabilities of pure active agent, proniosomes and marketed dosage form were evaluated upon oral administration. As a result the bioavailability of Candesartan cilexetil was increased 2.20 and 1.14 times compared to pure drug and marketed dosage form. Candesartan reached to its maximum level in plasma within a shorter period of time after oral proniosom application compared to pure drug and marketed dosage form.

The proniosom formulations are promising for enhancing the oral bioavailability of other lipophilic agents (such as anticancer agents) which cannot be formulated and demonstrate limited oral bioavailability due to solubility problem; the area is open for further studies.

Keywords: Proniosome, carrier, surfactant, slurry method, process validation, candesartan cilexetil, bioavailability.

KAYNAKLAR

- ABD ELBARY, A., EL-LAİTHY, H.M., TADROS, M., (2008). Sucrose stearate-based proniosome-derived niosomes for the nebulisable delivery of cromolyn sodium. *Int. J. Pharm.*, **357**: 189-198
- ABURAHMA, M. H., ABDELBARY, G. A., (2012). Novel diphenyl dimethyl bicarboxylate provesicular powders with enhanced hepatocurative activity: Preparation, optimization, in vitro/in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.*, **422**: 139-150
- AKHILESH, D., FAISHAL, G., KAMATH, JV., (2012). Comparative Study of Carriers Used in Proniosomes, *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, **1(1)**, 164-173
- AKHILESH, D., FAISHAL, G., PRABHU, P.,DR, AND KAMATH, J.V., DR., (2012). Development and Optimization of Proniosomes for Oral Delivery of Glipizide. *Int J Pharm Pharm Sci.*, **4** :307-314,
- ANNAKULA, D., ERRABELLI, M. R., JUKANTI, R., BANDARI, S., VEERAREDDY, P., (2010). Provesicular drug delivery systems: An overview and appraisal. *Arch. Appl. Sci. Res.*, **2 (4)**:135-146
- Atacand® Kısa Ürün Bilgisi, Erişim:
[\[http://www.iegml.gov.tr/Folders/KubKT/Ruhsatl%C4%B1%20%C3%9Cr%C3%BCnler-2%20%C5%9Eube%20M%C3%BCd%C3%BCrl%C3%BC%C4%9F%C3%BC/Atacand%20KUB%208%20mg%20 temiz _aaf1bac.pdf\]](http://www.iegml.gov.tr/Folders/KubKT/Ruhsatl%C4%B1%20%C3%9Cr%C3%BCnler-2%20%C5%9Eube%20M%C3%BCd%C3%BCrl%C3%BC%C4%9F%C3%BC/Atacand%20KUB%208%20mg%20 temiz _aaf1bac.pdf)
- AZEEM,A., MD. KHALİD ANWER, K., TALEGAONKAR, S., (2009). Niosomes in Sustained and Targeted Drug Delivery: Some Recent Advances, *Journal of Drug Targeting*, **17(9)**: 671–689
- BAROLI, B., DELOGU, G., FADDA, A. M., PODDA, G., SINICO, C., (1999). Vesicle formation from hexasubstituted cyclophosphazenic derivatives, *Int. J. Pharm.*, **183**: 101–107
- BAYINDIR, Z.S., YÜKSEL, N. (2010). “Characterization of Niosomes Prepared with Various Nonionic Surfactants for Paclitaxel Oral Delivery” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **Vol:99**: 2049-60

- BLAZEK-WELSH, A.L., RHODES, D.G., (2001). SEM Imaging Predicts Quality of Niosomes from Maltodextrin-based Proniosomes, *Pharm. Res.*, **18**: 656-61
- CHANDRA, A., SHARMA, P. K., (2008).Proniosome Based Drug Delivery System of Piroxicam, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **2 (9)**: 184-190
- CHINTANKUMAR J.T., CHETAN, H. B., ASHOK, H. B., RAKESH, P. P, TAMIZHARASI,S., SUREJA , K. D., PATEL , D. S., PARMAR, G. R. , (2009). Formulation and Evaluation of Aceclofenac Loaded Maltodextrin Based Proniosome, *Int.J. ChemTech Res.*,**1(3)**:567-573
- COSTA, P., LOBO, J., M., S., (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European J. of Pharmaceut.Sci.*, **13**: 123-133
- DEVARAJ, G.N., PARAKH, S.R., DEVRAJ, R., APTE, S.S., RAO, B.R., RAMBHAU, D. (2002). Release studies on niosomes containing fatty alcohols as bilayer stabilizers instead of cholesterol. *J. Coll. Int. Sci.*, **251(2)**: 360-365.
- DISSOLUTION METHODS FOR DRUGS; FDA. <http://www.fda.gov/default.htm>
- Dynamic Light Scattering Common terms Defined, ,Inform White Paper, Malvern Instruments Worldwide,(2011).
- EL-LAITHY, H. M., SHOUKRY, O., MAHRAN, L.G., (2011). Novel Sugar Esters Proniosomes for Transdermal Delivery of Vincopoetine: Preclinical and Clinical Studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **77**: 43-55
- EMA ,Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology, www.ema.europa.eu , (1995).
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0, Council of Europe, 67075, Strasbourg, Cedex, France (2011).
- FDA, Dissolution Methods. Erişim:
[http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm?PrintAll=1]. Erişim Tarihi: 20.06.2007

- GURRAPU A, JUKANTI R, BOBBALA S.R., KANUGANTI S, JEEVANA J.B., (2011). Improved Oral Delivery of Valsartan from Maltodextrin Based Proniosome Powders. *Adv Powder Technol.*, **23**:583–590
- HAZEL, G., AKHILESH, D., PRABHAKARA, P., JAGAVISH, K., (2012). Development and Evaluation of Norfloxacin Loaded Maltodextrin Based Proniosomes, *International Research Journal of Pharmacy*, **3(6)**: 176-179
- HIGUCHI, S., (1963). Mechanism of Sustained-Action Medication-theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices, *J. Pharm. Sci.*, **52**: 1145-1149
- HU, C., RHODES, G.D. , (1999). Proniosomes: A Novel Drug Carrier Preparation, *Int. J. Pharm.*, **185**: 23-35
- ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology, Q2(R1), (1994).
- JUNYAPRASERT, V.B., TEERANACHAIDEEKUL, V., SUPAPERM, T.,(2008). Effect of Charged and Non-ionic Membrane Additives on Physicochemical Properties and Stability of Niosomes. *AAPS PharmSciTech.*, **9**: 851-859,
- KAUSHIK D., MISHRA P.R., TALEGAONKAR S., (2005). “Provesicles as surrogate drug carriers” *Progress in Controlled and Novel Drug Delivery Systems*, Ed. N.K. Jain, CBS Publishers & Distributors, New Delhi, **p**: 259-274
- KUMAR, K., RAI, A. K., (2011). Development and Evaluation of Proniosome-Encapsulated Curcumin for Transdermal Administration, *Trop J Pharm Res*, **10 (6)**: 697-703,
- KUMAR, G. P., RAJESHWARRAO, P., (2011). Nonionic Surfactant Vesicular Systems for Effective Drug Delivery-An Overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **1(4)**: 208-219,
- LANGENBUCHER, F., (1981). Parametric Representation of Dissolution-Rate Curves by the RRSBW Distribution. *Pharm. Ind.*, **38**: 201-214
- LEEKUMJORN, S., (2004). Synthesis and Characterization of Potential Drug Delivery Systems Using Nonionic Surfactant “Niosome”, Master Science Thesis, University of South Florida

- LONGER, M. A., ROBINSON, J. R., (1985). Sustained Release Drug Delivery Systems. ABDON, H. M., , Dissolution, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Easton, Mack Publishing Co.
- MAHALE, N. B., THAKKAR P. D., MALI, R. G., WALUNJ, D. R., CHAUDHARI, S. R., (2012). Niosomes: Novel Sustained release nonionic Stable Vesicular Systems-An Overview, *Advances in Colloid and Interface Science*. **183-184**: 46-54
- MARKENS, U., (2009). "Conducting Stability Studies-Recent Changes to Climatic Zone IV", *SGS Life Science, Technical Bulletin*, **13**:1-4,
- MARTIN, A. (2006). *Physical Pharmacy 6h Ed*. LWilliams&Wilkins, **p.:** 302-303.
- MEHTA, S., SHA, R.P., PRIYADARSHI R., SINGH, S., , (2009). "LC and LC-MS/TOF studies on stress degradation behaviour of candesartan cilexetil", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, doi: 10.1016/j.jpba.2009.05.006
- MOFFAT A.C., OSSELTON M. D., WIDDOP B., (2005). *Clark's Analysis of Drugs And Poisons*,; London: Pharmaceutical Press
- MOKHTAR, M., SAMMOUR, O., HAMMAD, M., MEGRAB, N., (2008). Effect of Some Formulation Parameters on Flurbiprofen Encapsulation and Release rates of Niosomes Prepared from Proniosomes. *Int. J. Pharm.*, **361**: 104-11
- NASR, M., MANSOUR, S., MORTADA, N., ELSHAMY, A., (2008). ""Vesicular aceclofenac systems: A comparative study between liposomes and niosomes" *Journal of microencapsulation*, **Vol.25, No.7**: 499-512,
- NASR, M., (2010). In vitro and In vivo Evaluation of Proniosomes Containing Celecoxib for Oral Administration. *AAPS PharmSciTech*, **No.1, Vol.11**. 85-89
- NASSERI B. , (2005). Effect of Cholesterol and Temperature on the Elastic Properties of Membranes. *Int J Pharm.*, **300**: 95-101
- NEKKANTI, V., PILLAI, R., VENKAESHWARLU, V., HARISUDHAN, T., (2009). "Development and characterization of solid oral dosage form incorporating candesartan nanoparticles" *Pharmaceutical Development and Technology*, **Vol. 14 (3)**: 290-298

- KAUSHİK D., MISHRA P.R., TALEGAONKAR S., (2005). Provesicles as surrogate drug carriers. In: *Progress in Controlled and Novel Drug Delivery Systems*, Ed. N.K. Jain, CBS Publishers & Distributors, New Delhi, **p.:** 259-274
- ORAL, M, (2010). Oral Yolla Veriliş İçin Kandesartan Sileksetil İçeren Proniozomların Hazırlanması: Formülasyon Parametreleri ve Etkin Madde Salımının Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
- ÖZKAN, Y., SAVAŞER, A., TAŞ, Ç., ÖZKAN, C. K., BAYRAK, Z., EŞİM, Ö., ÖZKAN, S., (2011). İlaçların Analiz ve Kalite Kontrollerinde Kullanılan Analitik Yöntemlerin Geçerliliği (Validasyon), *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı*, **87**
- PANDEY, N., (2011). Proniosomes and ethosomes: New prospect in Transdermal and Dermal Drug Delivery System. *Int J. Pharm Sciences & Res.*, **2(8)**:1988-1996
- Physicians' Desk Reference*, (2005).PDR 59. Ed., Medical Economics Company, Montvale, NJ, p:610
- RHODES, D. G., HU, C. , (2005). Proniosomes, In: *Synthetic Surfactant Vesicles niosomes and other non-phospholipid vesicular systems*, Ed.:Uchegbu, I. F., Netherlands: Harwood academic publishers, (2000), **p.:**153-184.
- SAHIN, N.O., 2007. Niosomes as Nanocarrier Systems. In: *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*, Ed. M.R. Mozafari, Springer, Netherlands, **p:** 67-81
- SANTOS, H. M. M., SOUSA, J. J. M. S., (2008). Tablet Compression, In: *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, Ed. Gad, S. C., John Wiley&Sons, **p:** 1136-37
- SANKAR, V., RUCKMANI, K., DURGA, S., JAILANI, S., (2010). Proniosomes As Drug Carriers, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **23 (1)**, 103-107,
- SENGODAN, T., SUNIL, B., VAISHALI, R., CHANDRA, R. J. , (2009). Formulation and Evaluation of Maltodextrin Based Proniosomes Loaded with Indomethacin, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **1(3)**, 517-523
- SHUKLA, N. D., TIWARI, M., (2011). Proniosomal Drug Delivery Systems – Clinical Applications, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **2(3)**: 880-887

- SINGLA, S., HARIKUMAR, S. L., AGGARWAL, G., (2012). Proniosomes for Penetration Enhancement in Transdermal System, *Int. J. Drug Dev. & Res.*, **4 (2)**: 1-13
- SOLANKI, A., PARIKH, J., PARIKH, R., (2007). Formulation and Optimization of Piroxicam Proniosomes by 3-Factor, 3-Level Box-Behnken Design. *AAPS PharmSciTech*, **8, (4), Article 86**: E1-7
- SOLANKI, A., PARIKH, J., PARIKH, R., (2008). Preparation, Characterization, Optimization and Stability Studies of Aceclofenac Proniosomes. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **7 (4)**: 237-246
- SUDHAMANI, T., PRIYADARISINI, N., RADHAKRISHNAN, M., (2010). Proniosomes- A Promising Drug Carriers, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **2(2)**: 1446-1454,
- SÜSLÜ, İ., ÖZALTIN, N., ALTINÖZ, S., (2009). "Square-wave adsorptiv stripping voltammetric determination of candesartan cilexetil in pharmaceutical formulations", *J. Appl. Electrochem.*, doi 10.1007/s10800-009-9836-z,
- UCHEGBU, I.F., VYAS, S.P., (1998). Nonionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *Int. J. of Pharm.*, **172**: 33-70
- USP 30 NF 25, (2007). Port city press, Baltimore, United States
- WALVE, J. R., RANE, B. R., GUJRATHI, N. A., BAKALIWAL, S. R., PAWAR, S. P., (2011). Proniosomes: A Surrogated Carrier for Improved Transdermal Drug Delivery System, *IJRAP*, **2 (3)**: 743-750
- WASHINGTON, C., (1990). Drug Release from Microdisperse Systems: A Critical Review, *Int. J. Pharm*, **58**: 1-12
- YÜKSEL, N., KARATAŞ, A., BAYKARA, T. , (2003). Comparative Evaluation of Granules Made with Different Binders by a Fluidized Bed Method, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **Vol. 29, No. 4**: 387-395
- YÜKSEL, N., TÜRKMEN,B., KURDOĞLU, A. H., BAŞARAN, B., ERKİN, J., BAYKARA, T. , (2007). Lubricant Efficiency of Magnesium Stearate in Direct Compressible Powder Mixtures Comprising Cellactose 80 and Pyridoxine Hydrochloride, *FABAD J. Pharm. Sci.*, **32**: 173-183

ZIDAN, A. S., (2010). Mokhtar, M., Multivariate Optimization of Formulation Variables Influencing Flurbiprofen Proniosomes Characteristics, *J. Pharm. Sci.*, **100** (6): 2212-2221

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı : Elif
 Soyadı : Aksakal
 Doğum yeri ve tarihi : Artvin-1987
 Uyuğu : T. C.
 Medeni durumu : Bekar

İletişim adresi : Kavaklıdere Mah. Bağış Sk. Kısmet Apt. No: 6/13
 Çankaya/Ankara
 Telefonu : 0 506 713 57 58
 e-posta adresi : elifaksakal@aol.com
 ecz.aksakal@gmail.com

Eğitimi:

- Artvin Anadolu Lisesi 2001-2005
- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2005-2010
- Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans 2010-2013
- İngilizce (Upper intermediate)

Unvanları:

Eczacı-2010

Bilimsel Etkinlikleri

- Başbakanlık Bursu
- TÜBİTAK Destek Projesi (Hızlı Destek-1002) Bursu
- Kandesartan Sileksetil İçeren Proniozomların Üretilmesinde İşlem Parametrelerinin Değerlendirilmesi ve İn Vivo Biyoyararlanımlarının İncelenmesi- TÜBİTAK Hızlı Destek Projesi
- ISOPS-10, 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences

Diğer Bilgiler

- Çağdaş Drama Derneği Yaratıcı Drama Eğitimi : Ekim 2012- Ocak 2013
- SEM HPLC Eğitimi-Ankara Üniversitesi
- Ankara Eczacı Odası Gençlik Komisyonu - SEO