TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKÜLER VERİLİŞ İÇİN ANTİGLOKOM BİR ETKİN MADDE OLAN LEVOBUNOLOL HCl' ÜN MİKROPARTİKÜL FORMÜLASYONLARI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Özlem SONAKIN

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİMDALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yard. Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ

2006 ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKÜLER VERİLİŞ İÇİN ANTİGLOKOM BİR ETKİN MADDE OLAN LEVOBUNOLOL HCl' ÜN MİKROPARTİKÜL FORMÜLASYONLARI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Özlem SONAKIN

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİMDALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yard. Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2003-08-03-039 proje numarası ile desteklenmiştir.

2006 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: 05/07/2006

Prof. Dr. Tamer Baykara
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Dz. Ecz. Alb. Yalçın Özkan
Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Doç. Dr. Nilüfer Yüksel
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. İmran Vural
Hacettepe Üniversitesi

Yard. Doç. Dr. Ayşegül Karataş
Ankara Üniversitesi

ÖNSÖZ

İnsanların hayatını sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmesi için hastalıklardan korunması, hastalıklarının teşhisi ve tedavisi gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan ilaçlardan beklenilen etkilerin sağlanabilmesi ve yan etkilerinin azaltılabilmesi ise oldukça önemlidir. Uygulanan göz preparatlarından biyoyararlanımın oldukça düşük olması, yan ve toksik etkilerin ortaya çıkması araştırmacıları yeni ilaç şekillerinin oluşturulmasına yöneltmiştir. Son yıllarda ilaç alanındaki en önemli gelişmelerden biri de partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Göze de uygulanabilen bu sistemlerde tedavi değeri göz çözeltilerine göre daha fazladır; yan ve toksik etkileri ise oldukça azaltılmaktadır.

Yapılan bu araştırmada, glokom tedavisinde göze uygulanan levobunolol HCl' ün partiküler ilaç taşıyıcı formülasyonlarının oluşturulması, formülasyona etki eden parametrelerin belirlenmesi, in vitro çözünme hızının incelenmesi ve ticari preparatı ile karşılaştırılarak sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, imkan ve desteğiyle çalışmalarımın yürütülmesini sağlayan Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Tamer BAYKARA' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleriyle her zorluğu aşmamı sağlayan sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince güleryüzü ile en zor dönemlerinde bilgi ve manevi desteğinden dolayı Dr. Ecz. Müge KILIÇARSLAN' a katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel katkılarından ve ilgilerinden dolayı değerli öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana manevi açıdan güç veren sevgili arkadaşım Ecz. Meral YÜCE' ye ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince yardımlarından dolayı Dr. Ecz. Özge İNAL'a ve diğer araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bilgi ve yardımlarıyla destek veren Prof. Dr. Sibel ÖZKAN' a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda Ankara Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi' nden (BİTAUM) formüllerin ultrasantrifüjünü gerçekleştiren Uzm. Kimyager Elif KORMANLI'ya ve DSC analizlerinin yapılmasını sağlayan Uzm. Kimyager Nilüfer VURAL' a teşekkür ederim

Zeta potansiyeli tayini için imkan sağlayan Atomika Teknik Cihazlar Limited Şirketi Bölge Müdürü Naci SARAÇOĞLU' na ve ölçüm için laboratuvarlarının kullanılmasına izin veren Anadolu Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü'nden Doç. Dr. Aydın DOĞAN'a teşekkür ederim.

SEM analizlerini sağlayan Uzman Müh. Abdullah ÖNER' e teşekkür ederim.

Oküler veriliş için β-blokör içeren polimerik nanopartikül formülasyonların tasarımı başlıklı proje kapsamında gerçekleştirilen bu tez çalışmasına katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü' ne teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da ilgisi, desteği ve fedakarlıkları ile anneme ve babama teşekkürlerimi sunarım.

Sevgisi, sabrı, düşünceleri ve ilerigörüşü ile bana her yönden destek olan, en zor dönemlerinde beni yalnız bırakmayan sevgili anneme sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ecz. Özlem SONAKIN
Haziran 2006, ANKARA

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No
Kabul ve Onay		**ii**
Önsöz		**iii**
İçindekiler		**v**
Şekiller Dizini		**xi**
Tablolar Dizini		**xv**
Kısaltmalar Dizini		**xviii**
1.	**GİRİŞ**	1
1.1.	Gözün Anatomik Yapısı ve Fizyolojisi	1
1.2.	Oküler İlaç Absorbsiyon Mekanizmaları	3
1.2.1.	Korneadan Absorbsiyon	4
1.2.2.	Konjuktiva ve Skleradan Absorbsiyon	4
1.3.	Oküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	4
1.4.	Oküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerinin Sınıflandırılması	6
1.4.1	Polimerler (Viskozite Arttırıcılar)	7
1.4.1.1.	Mukoadhezif Olmayan Polimerler	7
1.4.1.2.	Biyoadhezif (Mukoadhezif) Polimerler	9
1.4.1.3.	İn-situ jelleşen Sistemler	10
1.4.2.	Kolloidal Sistemler	12
1.4.2.1.	Lipozomlar	12
1.4.2.2.	Mikropartiküller ve Nanopartiküller	12
1.4.2.3.	Mikroemülsiyonlar ve Nanoemülsiyonlar	14
1.4.3.	İnsertler	14
1.4.4.	İmplantlar	14
1.5.	Oküler İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemlerin Hazırlanma Yöntemleri	15
1.6.	Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Mikropartiküllerin ve Nanopartiküllerin Hazırlanışı	15

1.7.	Mikropartiküllerin ve Nanopartiküllerin Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Hazırlanışına Etki Eden Faktörler	19
1.7.1.	Karıştırıcının Tipi, Karıştırma Hızı ve Süresi	19
1.7.2.	Polimer Miktarı ve Yapısı	20
1.7.3.	Polimer/ Etkin Madde Oranı	21
1.7.4.	Etkin Maddenin Miktarı ve Yapısı	21
1.7.5.	Primer Emülsiyonun Stabilitesi	22
1.7.6.	Stabilizör	22
1.7.7.	Dış faz hacmi	23
1.7.8.	Dış Fazın pH'sı ve Etkin Maddenin pKa' sı	23
1.7.9.	Sıcaklık	23
1.8.	Nanopresipitasyon Yöntemi	24
1.9.	Mikropartiküllerin ve Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	26
1.10.	Poli(ε-kaprolakton)	27
1.11.	Polimerik Partiküler Sistemlerin Partikül Büyüklüğü Analiz Yöntemleri	29
1.11.1.	Dinamik Işık Kırınım Yöntemi (Foton Korelasyonu Spektroskopisi)	30
1.11.2.	Statik Işık Kırınım Yöntemi (Lazer Difraksiyonu)	30
1.11.3.	Coulter Counter	30
1.11.4.	Mikroskopi	30
1.11.5.	Elektrokinetik Yöntemler	31
1.11.6.	Akustik Yöntemler	31
1.12.	Çözünme Hızı Yöntemleri	31
1.12.1.	Diyaliz Yöntemi	31
1.12.2.	Örnek Alma ve Ayırma Yöntemi	33
1.12.3.	Sürekli Akış Yöntemi	33

1.12.4.	İn situ Yöntemler	33
1.13.	Çözünme Hızı Kinetikleri	33
1.13.1.	Sıfır Derece Kinetik	34
1.13.2.	Birinci Derece Kinetik	34
1.13.3.	Matris Tipi Preparatlardan Etkin Madde Çıkış Kinetiği	35
1.13.4.	Fick Difüzyon Kanunu	36
1.13.5.	RRSBW (Rosin- Ramler- Sperling- Bennet- Weibull) dağılımı	37
1.14.	Etkin Madde (Levobunolol Hidroklorür)	38
1.15.	Çalışmanın Amacı	40
2.	**GEREÇ VE YÖNTEM**	42
2.1.	Gereçler	42
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
2.1.2.	Kullanılan Aletler	42
2.1.3.	Kullanılan Çözünme Ortamı	44
2.2.	Yöntem	44
2.2.1.	Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi	44
2.2.1.1.	Etkin Maddenin UV Spektrumlarının Belirlenmesi	44
2.2.1.2.	Etkin Maddenin UV Spektrofotometresi ile Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması	45
2.2.1.3.	Etkin Maddenin Analitik Validasyonu	45
2.2.1.3.1	Doğruluk	45
2.2.1.3.2.	Kesinlik	46
2.2.1.3.3.	Doğrusallık ve Aralığı	46
2.2.1.3.4.	Teşhis ve Tayin Alt Sınırları	46
2.2.1.3.5.	Stabilite	47
2.2.2.	Nanopresipitasyon Yöntemiyle Formülasyon Çalışmaları	47
2.2.2.1.	Levobunolol HCl Tuzundan Levobunolol Baz Elde Edilmesi	47

2.2.2.2.	Nanopresipitasyon Yöntemi ile Partiküllerin Hazırlanması	48
2.2.3.	Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Formülasyon Çalışmaları	48
2.2.3.1.	Metilen Mavisi Yüklü Partiküllerin Oluşturulması	48
2.2.3.2.	Etkin Madde Yüklü Mikropartiküllerin ve Nanopartiküllerin Hazırlanması	49
2.3.	Hazırlanan Formüllerde Yapılan Kontroller	59
2.3.1.	Etkin Madde Miktar Tayini	59
2.3.2.	Partiküllerin Yüzey Morfolojisi ve Karakteristiklerinin İncelenmesi	59
2.3.3.	Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	60
2.3.4.	Zeta Potansiyellerinin Belirlenmesi	60
2.3.5.	Termal Analizlerinin Belirlenmesi	60
2.3.6.	Çözünme Hızı Deneyleri	61
2.4.	Partiküllerin Isıya Duyarlı Polimerik Jel İçerisinde Formüle Edilmesi	62
2.5.	Levobunolol HCl içeren Ticari Göz Damlası Betagan®' ın Çözünme Hızı	62
3.	**BULGULAR**	63
3.1.	Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerine İlişkin Bulgular	63
3.1.1.	Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Analizi	63
3.1.2.	Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntem ile Kalibrasyonu	64
3.1.3.	Etkin Maddenin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular	67
3.1.3.1.	Doğruluk	67
3.1.3.2.	Kesinlik	68
3.1.3.3.	Doğrusallık ve Aralığı	71
3.1.3.4.	Teşhis ve Tayin Alt Sınırları	74

3.1.3.5.	Stabilite	74
3.2.	Formülasyonların Hazırlanmasına Ait Bulgular	74
3.3.	Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Formülasyon Çalışmaları	75
3.3.1.	Metilen Mavisi Yüklü Partiküllerin Oluşturulmasına Ait Bulgular	75
3.4.	Hazırlanan Formüllerde Yapılan Kontroller	75
3.4.1.	Formülasyonların Etkin Madde Miktar Tayinine Ait Bulgular	75
3.4.2.	Formülasyon Parametrelerinin İşlem Etkinliği Üzerine Etkisi	76
3.4.3.	Partiküllerin Yüzey Morfolojisi ve Karekteristiklerinin İncelenmesi	83
3.4.4.	Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	96
3.4.5.	Zeta Potansiyellerine Ait Bulgular	101
3.4.6.	Termal Analiz Sonuçları	102
3.4.7.	Çözünme Hızı Sonuçları	103
3.5.	Partiküllerin Isıya Duyarlı Polimerik Jel İçerisinde Formüle Edilmesi	107
3.6.	Levobunolol HCl içeren Ticari Göz Damlası Betagan®' ın Çözünme Hızı	108
3.7.	Çözünme Hızına Ait Kinetik Verilerin Değerlendirilmesi	108
4.	**TARTIŞMA**	114
4.1.	Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi	114
4.1.1.	Etkin Maddenin UV Spektrumlarının Değerlendirilmesi	114
4.1.2.	Etkin Maddenin Kalibrasyon Doğrularının Değerlendirilmesi	114
4.1.3.	Etkin Maddenin Analitik Validasyonunun Değerlendirilmesi	114
4.1.3.1.	Doğrusallık ve Aralığı	114
4.1.3.2.	Doğruluk	115
4.1.3.3.	Kesinlik	115

4.1.3.4.	Teşhis ve Tayin Sınırları	115
4.1.3.5.	Stabilite	115
4.2.	Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	116
4.2.1.	Nanopresipitasyon Yöntemi	116
4.2.2.	Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Formülasyon Çalışmaları	116
4.3.	Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Formülasyonlarda İşlem Etkinliğinin Değerlendirilmesi	117
4.4.	Partiküllerin Yüzey Morfolojisinin Değerlendirilmesi	120
4.5.	Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Değerlendirilmesi	122
4.6.	Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi	124
4.7.	Termal Analizlerin Değerlendirilmesi	124
4.8.	Çözünme Hızı Profillerinin Değerlendirilmesi	125
4.9.	Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirmesi	126
5.	**SONUÇ VE ÖNERİLER**	128
ÖZET		130
SUMMARY		131
KAYNAKLAR		132
ÖZGEÇMİŞ		144

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa No
Şekil 1.1.	Gözün şematik yapısı	1
Şekil 1.2.	Damlatılan göz damlalarının tipik etkin madde konsantrasyon-zaman profili	5
Şekil 1.3.	Çoklu emülsiyon (S/Y/S) çözücü buharlaştırma yönteminin şematik şekli	16
Şekil 1.4.	Poli (ε-kaprolakton)' un kimyasal yapısı	27
Şekil 1.5.	Sink koşulu olmayan membran diyaliz yönteminin kinetiği	32
Şekil 2.1.	Etkin madde yüklü mikropartiküllerin ve nanopartiküllerin hazırlanması	50
Şekil 3.1.	Levobunolol HCl' in a) pH 7,4 izotonik fosfat çözeltisinde ve b) Distile su ile PVA çözeltisindeki UV spektrumları	64
Şekil 3.2.	Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde kalibrasyon doğrusu	65
Şekil 3.3.	Levobunolol HCl' in distile sudaki kalibrasyon doğrusu	66
Şekil 3.4.	pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinin doğrusallık ve aralığı doğrusu.	72
Şekil 3.5.	Levobunolol HCl' in distile suda doğrusallık ve aralığı doğrusu	73
Şekil 3.6.	pH 5,5' te % PVA konsantrasyonunun işlem etkinliği üzerine etkisi.	77
Şekil 3.7.	pH 12' de % PVA konsantrasyonunun işlem etkinliği üzerine etkisi	77
Şekil 3.8.	10 mg etkin madde içeren formülasyonlarda karıştırma hızının işlem etkinliği üzerine etkisi.	78
Şekil 3.9.	20 mg etkin madde içeren fomülasyonlarda karıştırma hızının işlem etkinliği üzerine etkisi.	78

Şekil 3.10. 40 mg etkin madde içeren formülasyonlarda karıştırma hızının işlem etkinliği üzerine etkisi. 79

Şekil 3.11. 60 mg etkin madde içeren formülasyonlarda karıştırma hızının işlem etkinliği üzerine etkisi. 79

Şekil 3.12. 8000 rpm karıştırma hızında etkin madde miktarının işlem etkinliği üzerine etkisi. 80

Şekil 3.13. 9500 rpm karıştırma hızında etkin madde miktarının işlem etkinliği üzerine etkisi. 80

Şekil 3.14. 13500 rpm karıştırma hızında etkin madde miktarının işlem etkinliği üzerine etkisi. 81

Şekil 3.15. Dış faz hacminin işlem etkinliği üzerine etkisi a) 10 mg etkin madde içeren formüller, b) 100 ve 200 ml hacimde üç farklı etkin madde miktarı içeren formüller. 82

Şekil 3.16. Pluronik F68' in işlem etkinliği üzerine etkisi 82

Şekil 3.17. F1B formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 83

Şekil 3.18. F1C formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 84

Şekil 3.19. F2A formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 85

Şekil 3.20. F2B formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 86

Şekil 3.21. F2C formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 87

Şekil 3.22. F3 formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 88

Şekil 3.23. F5C formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 89

Şekil 3.24. F6A formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 90

Şekil 3.25. F7A formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 91

Şekil 3.26. F7D formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 92

Şekil 3.27. F8A formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 93

Şekil 3.28. F8B formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 94

Şekil 3.29. F9D formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000 95

Şekil 3.30. (a)F1B, (b)F1C ve (c)F2A formüllerinin partikül büyüklüğü dağılım grafiği 97

Şekil 3.31. (a) F2B, (b) F2C, (c) F3 formüllerinin partikül büyüklüğü dağılım grafiği. 98

Şekil 3.32. (a) F5C, (b)F6A ve (c)F7A formülünün partikül büyüklüğü dağılım grafiği. 99

Şekil 3.33. (a)F7D, (b)F8A ve (c)F9D formülünün partikül büyüklüğü dağılım grafiği 100

Şekil 3.34. F8A formülünün zeta potansiyeli dağılım grafiği 102

Şekil 3.35. DSC termogramları 102

Şekil 3.36. pH 5,5' te hazırlanan F1A, F1B ve F1C formüllerin çözünme hızı profilleri 103

Şekil 3.37. pH 12' de hazırlanan F2A, F2B, F2C ve F2D formüllerinin çözünme hız profilleri 104

Şekil 3.38. Polimer miktarı ve karıştırma hızı arttırılarak hazırlanan F2C, F3 ve F4 formüllerinin çözünme hızı profilleri 104

Şekil 3.39. Dış faz hacmi değiştirilerek hazırlanan F2B, F8A ve F8B formüllerinin çözünme hızı profilleri 104

Şekil 3.40. 8000 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı profilleri 105

Şekil 3.41. 9500 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı profilleri 105

Şekil 3.42. 13500 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı profilleri 106

Şekil 3.43. 100 ml dış faz hacminde hazırlanan formüllere ait çözünme hızı profilleri 106

Şekil 3.44. Dış fazında Pluronik F68 içeren formüllere ait çözünme hızı profilleri 107

Şekil 3.45. F2B ve bu formülün Pluronik F127 jel içerisinde hazırlanan örneğe ile Betagan®'a ait çözünme hızı profilleri 108

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa No
Tablo 1.1.	Çoklu Emülsiyon (s/y/s) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Hazırlanan Formüller	17
Tablo 2.1.	Dış faz pH'ı 5.5 (F1) ve 12 (F2) olan formüllerde % PVA miktarlarının değişimi	51
Tablo 2.2.	Polimer miktarı artışı (F3) ve karıştırma hızı artışının (F4) incelenmesi	52
Tablo 2.3.	8000 rpm karıştırma hızı ile farklı etkin madde miktarları ile hazırlanan formüller (F5)	53
Tablo 2.4.	9500 rpm karıştırma hızı ile farklı etkin madde miktarları ile hazırlanan formüller (F6)	54
Tablo 2.5.	13500 rpm karıştırma hızı ile farklı etkin madde miktarları ile hazırlanan formüller (F7)	55
Tablo 2.6.	Farklı dış faz hacmi ile hazırlanan formüller	56
Tablo 2.7.	Pluronik F68'in stabilizör olarak kullanıldığı formüller(F9)	57
Tablo 2.8.	İç fazda Pluronik F68 dış fazda PVA kullanılarak hazırlanan formüller (F10)	58
Tablo 3.1.	Levobunolol HCl' in değişik ortamlarda maksimum absorbans verdiği dalga boyları	63
Tablo 3.2.	Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde kalibrasyon doğrusuna ait veriler	65
Tablo 3.3.	Levobunolol HCl' in distile suda kalibrasyon doğrusuna ait veriler	66
Tablo 3.4.	pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde doğruluk tespitine ait veriler	67

Tablo 3.5.	pH 7.4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde doğruluk tespitine ait hesaplamalar	67
Tablo 3.6.	Distile suda doğruluk tespitine ait veriler	68
Tablo 3.7.	Distile suda doğruluk tespitine ait hesaplamalar	68
Tablo 3.8.	pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde tekrar elde edilebilirlik deneyine ait veriler	69
Tablo 3.9.	pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde tekrar elde edilebilirlik deneyine ait hesaplamalar	69
Tablo 3.10	Distile suda tekrar elde edilebilirlik deneyine ait veriler	69
Tablo 3.11	Distile suda tekrar elde edilebilirlik deneyine ait hesaplamalar	69
Tablo 3.12	pH 7.4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde tekrarlanabilirlik deney sonuçları	70
Tablo 3.13	pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde tekrarlanabilirlik deneyine ait hesaplamalar	70
Tablo 3.14	Distile suda tekrarlanabilirlik deney sonuçları	70
Tablo 3.15	Distile suda tekrarlanabilirlik deneyine ait hesaplamalar	71
Tablo 3.16	Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde doğrusallık ve aralığı doğrusuna ait veriler	72
Tablo 3.17	Levobunolol HCl' in distile suda doğrusallık ve aralığı doğrusuna ait veriler	73
Tablo 3.18	Teşhis ve tayin alt sınırlarının hesaplanması	74
Tablo 3.19	Bir hafta boyunca buzdolabında (4 °C) ve oda sıcaklığında (25 °C) bekletilen bir numuneden iki günde bir alınan ölçümlerin sonuçları	74
Tablo 3.20	Formülasyonların Miktar Tayinine Ait Bulgular	76
Tablo 3.21	Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	96
Tablo3.22	Formüllerin Zeta Potansiyelleri (mV)	101
Tablo 3.23	% 20 a/h Pluronik F127 çözeltisinin vizkozluk ölçümleri	107

Tablo 3.24 pH 5,5' te hazırlanan F1A, F1B ve F1C formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 109

Tablo 3.25 pH 12' de hazırlanan F2A, F2B, F2C ve F2D formüllerinin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 109

Tablo 3.26 Polimer miktarı ve karıştırma hızı arttırılarak hazırlanan F3 ve F4 formüllerinin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 110

Tablo 3.27 8000 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 110

Tablo 3.28 9500 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 111

Tablo 3.29 13500 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 111

Tablo 3.30 100 ml dış faz hacminde hazırlanan formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 112

Tablo 3.31 Dış fazında Pluronik F68 içeren formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 112

Tablo 3.32 Betagan®'a ve F2B formülün Pluronik F127 jel içerisinde hazırlanan örneğe ait çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi 113

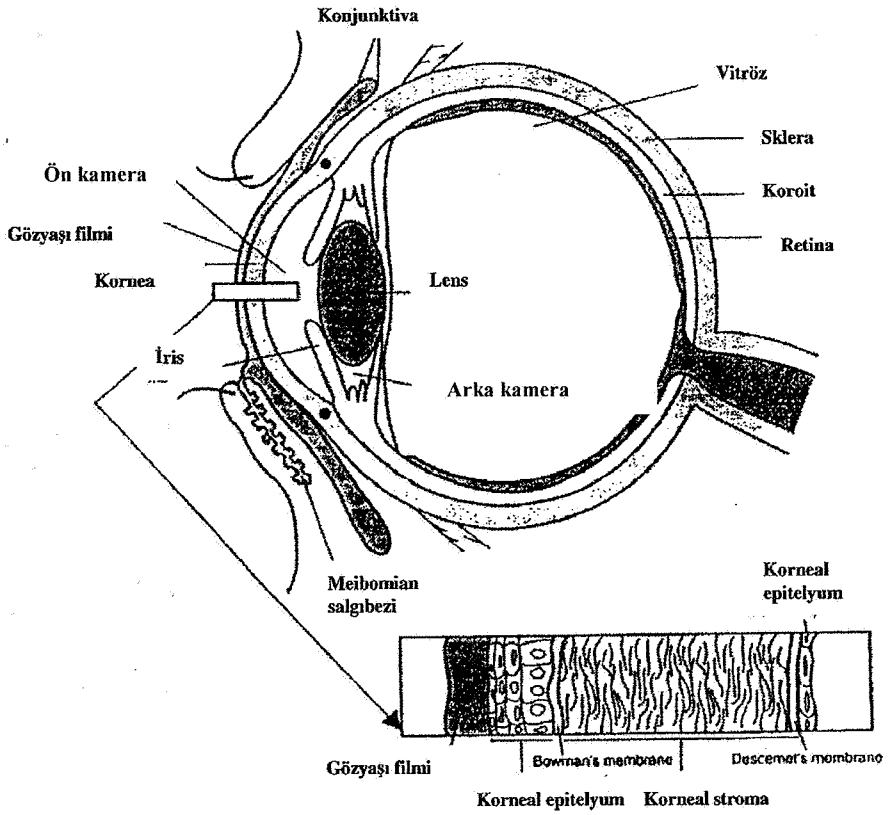
KISALTMALAR DİZİNİ

PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirolidon
MC	Metil selüloz
HEC	Hidroksietil selüloz
HPMC	Hidroksipropil metil selüloz
HPC	Hidroksipropil selüloz
HPEC	Hidroksipropil etil selüloz
CMC	Karboksimetil selüloz
HEMA	2- Hidroksietil metakrilat
S/Y/S	Su içinde yağ içinde su tipi emülsiyon
HSA	İnsan serum albumini
BSA	Sığır serum albumini
PCL	Poli (ε-kaprolakton)
PLGA	Poli(d,l-laktit-ko-glikolik) asit
EC	Etil selüloz
pK_a	Asit-baz disosiyasyon sabiti
PLA	Poli(d,l-laktik asit)
PACA	Polialkilsiyanoakrilat
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
r^2	Determinasyon katsayısı
Sy.x	Regresyon doğrusundan olan sapmalara ait standart sapma
d (0,5)	Median değeri ifade eder. Dağılımın % 50' si bu değerin üstünde % 50' si ise bu değerin altındadır. Birimi μm' dir.
Span	Dağılımın yaygınlığının dar ya da geniş olduğunu gösteren birimsiz bir değerdir.
PF127	Pluronik F127
cPs	Centipoise
RMS	Artık Kareler Ortalaması
SH	Standart Hata

1. GİRİŞ

1.1. Gözün Anatomik Yapısı ve Fizyolojisi

Göz küresi dış tabaka (sklera), orta tabaka (kornea) ve iç tabaka (retina) olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır (Şekil 1.1). Göz küresinin en dıştaki fibröz dokudan oluşan koruyucu bölümü sklera (göz akı) ön bölümde saydam korneaya dönüşür. Işınlar göze kornea ve göz merceği yolu ile girer. Göz merceğinin önünde göze rengini veren, pigmentli ve opak bir yapı gösteren iris bulunur. İristeki kas lifleri ile göz bebeği daralıp genişleyebilmektedir. Kornea ile göz merceği arasında bulunan gözün ön odasının içi, ön kamera sıvısı ile doludur (Gürsoy, 1989; s.:226; Sasaki ve ark,1999; Ludwig 2005).



Şekil 1.1. Gözün şematik yapısı (Ludwig, 2005).

Kornea epitelyum (lipofilik sellüler tabaka), stroma (hidrofilik tabaka) ve endotelyum (lipofilik sellüler tabaka) olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır (Mitra,1988, Chapter 15). Epitelyum tabakasında yer alan bazal hücreler sadece mikroorganizmalar için değil, etkin maddelerin absorbsiyonu için de bariyer oluşturmaktadır. Epitelyumun altında bulunan stroma tabakası %85 su içermektedir ve korneanın %90' nı oluşturmaktadır. Son tabaka olan endotelyum, gözün iç katmanının en önemli kısmıdır. Kornea, yaklaşık %75 hidratasyon/dehidratasyon aktivitesi sağlayan aktif su pompası içermektedir (Le Bourlais ve ark., 1995).

Göz kapaklarının ince yapısı, göz küresini kolayca tutmakta ve gözün hızla açılıp kapanmasını sağlamaktadır. Göz kapakları istemsiz (periyodik ve refleks göz kırpma) ve istemli olarak kontrol altındadır. Göz kapakları, göz yaşının gözün yüzeyinde dağılmasını; böylece kornea yüzeyinin optik olarak pürüzsüz olmasını sağlamaktadır. Göz yaşarması sırasında yüzey geriliminin 20000 sn^{-1} olduğu tahmin edilmektedir. Yüzey gerilimi damlatılan viskoz oküler dozaj şekillerinin reolojik özelliklerini ve uygulanan etkin maddenin biyoyararlanımını etkilemektedir (Ludwig, 2005).

Konjunktiva, göz kapaklarının iç bölümünü kaplayan ve göz küresinin ön bölümünü örten ince, şeffaf bir membrandır (Robinson ve Mlynek,1995). Konjunktiva, gözyaşı bezinden gelen gözyaşı ile ıslak ve temiz tutulur. Goblet hücreleri, konjunktivanın anatomik olarak önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Le Bourlais, 1998). Konjunktivada yaklaşık 1,5 milyon goblet hücreleri bulunur. Goblet hücrelerinin anormal azalması veya yokluğu sadece keratokonjunktivit, alerjik konjunktivit gibi çeşitli patolojik durumlarda değil, benzalkonyum klorür içeren göz damlalarının kronik kullanımından sonra da meydana gelmektedir. Goblet hücreleri mukus salgısı (MUC5AC) ve TFF-peptitleri veya trefoil faktörleri (TFF1 ve TFF3) sentezlemektedir. TFF-peptitlerinin gözyaşı filminin reolojik özelliklerinde ve korneal yara iyileştirilmesinde etkisi bulunmaktadır (Ludwig, 2005).

Mukus tabaka, goblet hücreleri tarafından salgılanmakta olan glikoproteinlerdir (Robinson ve Mlynek, 1995; Le Bourlais ve ark, 1998). Mukus

tabaka hidratasyona oldukça duyarlıdır ve viskoelastik reolojik özellikleri ile jel tabaka oluşturmaktadır. Böylece göz kapaklarının hareketini kolaylaştırmakta ve epitel dokuyu hasardan korumaktadır. Mukus, göz yaşı filminin salınımını düzenlemekte, kohezyon ve stabilitesini arttırmaktadır. Mukus jel; bakteri, hücre artıkları ve yabancı cisimleri, mukoz iplik oluşturarak toplamakta ve göz yaşarması sırasında dışarıya atmaktadır. Mukus tabaka makromoleküller için diffüzyon bariyeri oluşturmaktadır (Ludwig, 2005).

Nazolakrimal drenaj sistemi, salgılama, dağıtma ve toplama kısımlarından oluşur. Göz yaşarması sırasında gözyaşı bezi tarafından salgılanan gözyaşı, göz kapakları ile göz yüzeyine dağıtılmaktadır. Toplama sistemi ise, toplama kanalı, gözyaşı kesesi ve iç kısımda nazal yola açılan nazolakrimal kanaldan oluşmaktadır. Gözyaşı bezi ile gözyaşı üretimi, temel, refleks ve duyusal olmak üzere 3'e ayrılır. Temel akış korneal yüzeyde optik, metabolik ve kayganlık özellikleri açısından göz yaşı filminin sürdürülmesi için gereklidir. Refleks gözyaşına çevresel uyarılar (örn, kimyasal veya mekanik tahriş, sıcaklık ve ışık) neden olmaktadır. Refleks stimulasyon göz yaşarmasını arttırarak yabancı cismin (etkin maddeler dahil) çıkarılmasını sağlamaktadır (Chien, 1982, Chapter 2; Ludwig, 2005).

1.2. Oküler İlaç Absorbsiyon Mekanizmaları

Oküler ilaç taşıyıcı sistemlerinde en yaygın yol, gözün cul de sac bölgesine topik uygulamadır (Macha ve ark, 2003; Chapter 1). Kornea ve konjunktivayı kaplayan, prekorneal gözyaşı filmi topik olarak uygulanan etkin maddeler için aşılması gereken ilk kısımdır (Sasaki ve ark, 1999; Pal Kaur ve ark, 2002). Etkin madde moleküllerinin geçiş yolları moleküllerin fizikokimyasal özelliklerine göre değişmektedir (Le Bourlais ve ark,1995).

Etkin maddelerin absorbsiyonu, korneal ve korneal olmayan yol olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir (Macha ve ark, 2003; Chapter 1):

1.2.1. Korneadan Absorbsiyon

Korneanın epitelyum tabakası hidrofilik etkin maddeler için; stroma tabakası ise lipofilik etkin maddeler için hız sınırlayıcı bariyerdir. Lipofilik etkin maddelerin korneadan absorbsiyonunun daha hızlı olduğu belirtilmektedir (Sasaki ve ark, 1999; Kaur ve ark, 2002).

1.2.2. Konjuktivadan ve Skleradan Absorbsiyon

Konjuktival ve skleral permeabilite, korneadan çok az absorbe olan büyük moleküller ve hidrofilik moleküller için uygun geçiş yoludur (Macha ve ark, 2003; Chapter 1). Korneal olmayan yolun, adhezif jeller ve polimer insertler için en önemli absorbsiyon yolu olduğu belirtilmiştir (Sasaki ve ark,1999).

1.3. Oküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

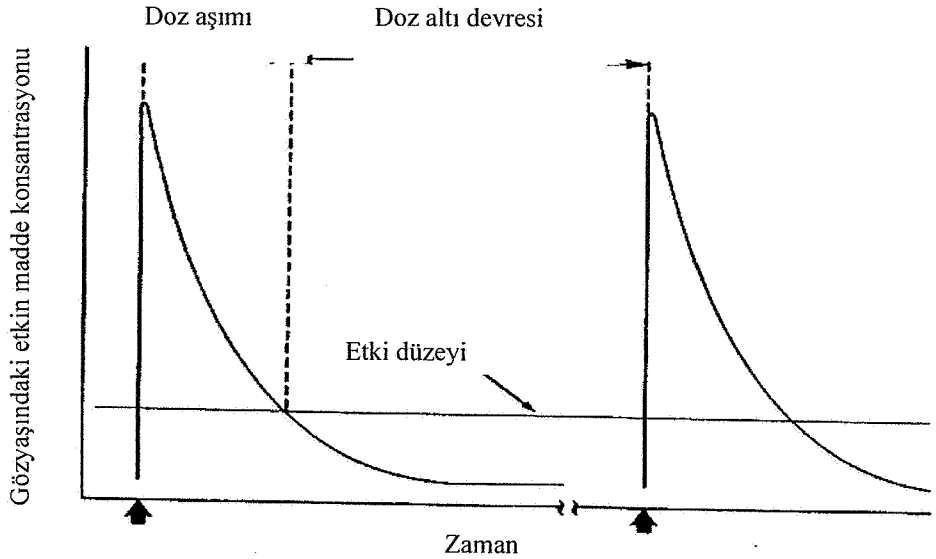
Gözde kontrollü salım, prekorneal alanda bulunan etkili koruyucu mekanizmalarla sınırlanmaktadır. Etkin maddelerin göze absorbsiyonu için korneal penetrasyonun iyi olması ve korneal doku ile temas süresinin uzatılmış olması gerekmektedir (Le Bourlais ve ark., 1995). Dolayısıyla oküler tedaviyi optimize etmek gerekmektedir. Optimizasyonun bir yolu, formülasyona çözünebilir polimerler ekleyerek, viskoz jeller, kolloidal süspansiyonlar, aşınabilir veya aşınmayan insertler geliştirerek prekorneal alanda etkin madde tutma süresini arttırmaktır (Mitra, 1988; Ding, 1998; Desphande ve ark, 1998; Kaur ve Kanwar, 2002). Bu sistemlerden aşınabilir veya aşınmayan insertlerin kullanımı hastalara güçlük vermektedir. Bu nedenle hastaların uyumu açısından sıvı dozaj formları daha çok tercih edilmektedir (Le Bourlais ve ark, 1995).

Gözyaşı ve göz kırpması refleksi gibi fizyolojik faktörler oftalmik etkin maddelerin absorbsiyon süresini sınırlandırmaktadır. Göz yaşı devri salım

sistemine ve dozaj formuna bağlı olarak etkin maddeyi uzaklaştırmaktadır (Barber ve Shek, 1993, Chapter 1; Le Bourlais ve ark., 1995).

Göze uygulanan damlalar genellikle 30-75µl' dir. Gözün normal sıvı hacmi ise 7-9 µl' dir (Le Bourlais ve ark,1995; Sasaki ve ark, 1999). Gözün cul de sac bölgesinde en fazla 30 µl sıvı bulunabileceği belirtilmiştir (Ding, 1998; Sasaki ve ark, 1999; Kaur ve Kanwar, 2002).

Gözün üzerindeki kayıp yolaklarından dolayı oldukça düşük miktardaki etkin madde korneaya ve gözün daha iç dokularına geçebilmektedir. Etkin maddelerin korneal permeabilitesi çok düşüktür. Gözyaşının nabız atışı (pulse entry) şeklindeki sekresyonundan dolayı (Şekil 1.2) etkin madde konsantrasyonu hızla düşmekte ve gözden büyük oranda etkin madde kaybı olmaktadır (Shell, 1985; Barber ve Shek, 1993; Chapter 1). Bu nedenle tipik korneal temas süresi göz damlası için insanlarda 1-2 dakikadır ve oküler biyoyararlanımı da genellikle %10' dan daha azdır (Le Bourlais ve ark, 1995; Alonso ve ark., 2003) .



Şekil 1.2. Damlatılan göz damlalarının tipik etkin madde konsantrasyon-zaman profili (Shell, 1985)

Uygulanan dozun büyük kısmı ise gözyaşı drenajı ile nazolakrimal kanaldan gastrointestinal kanala geçmektedir. Gastrointestinal kanaldan etkin madde absorbe olarak sistemik yan etkilere ve bazen toksisiteye neden olabilmektedir. Uygulanan göz damlalarının hızla eliminasyonu sonucu oküler terapötik etki

süresinin kısalması, daha sık dozda uygulanma gereksinimini arttırmaktadır (Kothuri ve ark, 2003, Chapter 14).

Kontrollü salım sistemlerinin oküler uygulanmasından sağlanan başlıca yararlar şunlardır (Gürsoy, 2002, s.:197):

- Etkin maddenin gözde kalış süresini uzatarak etkisini arttırmak ve istenilen biyoyararlanımı sağlamak,
- Oküler doku ve sıvılardaki etkin madde konsantrasyonlarındaki büyük değişiklikleri önlemek,
- Yan etkileri azaltmak,
- Uygulama sayısını azaltmak,
- Hastaya kolaylık sağlamak ve yaşam kalitesini arttırmak.

1.4. Oküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerinin Sınıflandırılması

Oküler ilaç taşıyıcı sistemler aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır (Le Bourlais ve ark, 1995; Gürsoy, 2002; s.:199):

1.4.1. Polimerler (Viskozite Arttırıcılar)
  1.4.1.1. Mukoadhezif Olmayan Polimerler
  1.4.1.2. Biyoadhezif (Mukoadhezif) Polimerler
  1.4.1.3. In-situ Jelleşen Sistemler
1.4.2. Kolloidal Sistemler
  1.4.2.1. Lipozomlar
  1.4.2.2. Mikropartiküller ve Nanopartiküller
  1.4.2.3. Mikro ve nanoemülsiyonlar
1.4.3. İnsertler
1.4.4. İmplantlar

1.4.1. Polimerler (Viskozite Arttırıcılar)

Çözünebilir polimerlerin sulu çözeltiye yüklenerek, taşıyıcının viskozitesini arttırmak, böylece etkin maddelerin kornea ile temas süresini uzatmak mümkündür (Kaur ve Kanwar, 2002). Genellikle bu polimerler, (selülozik bileşikler, polivinil alkol, poliakrilik asit hidrojeller, hyalüronik asit, poloksamer ve polisakkarit bileşikler) biyolojik membranlardan geçemeyen yüksek molekül ağırlıklı (5000-10000 Da) polimerlerdir. Çeşitli çözünürlükteki etkin maddeler (örn: pilokarpin, tropikamid, betaksolol, timolol, prednisolon, florometalon, progesteron) bu jeller içine yüklenebilmektedir (Plazonnet, 1990; Chapter 25; Le Bourlais ve ark., 1995).

Polimer çözeltileri genellikle Newtonian veya Non-newtonian akış göstermektedirler. Belirli sıcaklık ve basınçta yüzey geriliminden bağımsız viskozitesi sabit olan Newtonian akış gösteren çözeltiler, gözde daha az tolere edilirler. Non-newtonian ve psödoplastik özelliklere sahip (viskozitesi yüzey geriliminin artması ile azalan), polimerik formülasyonların göz kapağının hareketine direnci viskoz Newtonian formülasyonlara göre daha azdır ve daha fazla kabul edilebilirlik göstermektedir (Le Bourlais ve ark., 1995).

1.4.1.1. Mukoadhezif Olmayan Polimerler

Selülozik polimerler, polivinil alkol (PVA) ve polivinil prolidon (PVP) yaygın olarak kullanılan mukoadhezif olmayan polimerlerdir (Sintzel ve ark., 1996; Le Bourlais ve ark, 1995).

- **Selülozik Polimerler**

Metil selüloz (MC), hidroksietil selüloz (HEC), hidroksipropil metilselüloz (HPMC), hidroksipropil selüloz (HPC), hidroksipropil etilselüloz (HPEC) gibi

selülozik polimerler, Newtonian viskozite arttırıcılar olarak oftalmik preparatlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu viskozite arttırıcıların genel özellikleri:

- Geniş aralıkta viskoziteye sahip olmaları (400-15000 cp),
- Topik olarak uygulanan pek çok etkin madde ile geçimli olmaları,
- Isı ile kolayca sterilize edilebilmeleri (120° C),
- Gözyaşı filminin stabilitesini arttırabilmeleri,
- Topik olarak iyi tolere edilebilmeleridir.

Bu polimerler 50 yıl önce suni göz yaşı preparatları olarak hazırlanmıştır (Le Bourlais ve ark, 1995)

Desai ve Blanchard (1992) tarafından, pilokarpin HCl'in MC veya HPMC içeren Pluronik F127 formülasyonlarının kontrollü salım sistemi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

- **Polivinil Alkol (PVA)**

PVA, suyun yüzey gerilimini düşürebilmekte, y/s yüzeylerarası gerilimi azaltmakta ve gözyaşı filminin stabilitesini arttırabilmektedir. Bu film oluşturma özelliği ile birlikte, kolay sterilizasyonu, oftalmik etkin maddelerle geçimliliği ve epitel toksisitesinin görülmemesi, suni gözyaşı preparatlarında ve etkin madde salımında taşıyıcı olarak yaygın kullanılmasını sağlamıştır (Deshpande ve ark., 1998).

- **Poli(vinil pirolidon) (PVP)**

PVP'nun oküler absorbsiyonu arttırmada ve sistemik absorbsiyonu azaltmada etkili olduğu belirtilmektedir (Le Bourlais ve ark., 1995).

1.4.1.2. Biyoadhezif (Mukoadhezif) Polimerler

Mukoadhezif polimerler, çeşitli hidrofilik fonksiyonel gruplar taşıyan makromoleküler hidrokolloidlerdir (Robinson ve Mlynek, 1995). Hyalüronik asit, poliakrilik asit hidrojeller ve karboksimetil selüloz (CMC) biyoadhezif polimerlerdendir.

- **Hyalüronik Asit**

Hyalüronik asitin sodyum tuzu, düz zincirli polisakkaritten oluşan yüksek molekül ağırlıklı biyolojik polimerdir. Gözde hyaluronik asit, vitröz yapıda ve düşük konsantrasyonlarda aköz hümörde bulunmaktadır. Hyalüronik asit %1'den yüksek konsantrasyonda, intraoküler ameliyat sırasında ön kameranın şeklini korumada, korneal endotel hücrelerini korumada, vitröz hümorun değiştirilmesinde, göz kuruluğu tedavisinde göz yaşı olarak ve çeşitli etkin maddelerin kornea yüzeyindeki kalış süresini arttırmada kullanılmaktadır (Sintzel ve ark., 1996; Le Bourlais ve ark,1998). Bazı araştırmalarda hyalüronik asitin yüksek yüzey geriliminde düşük viskozitesi ile tipik bir psödoplastik polimer olarak oküler salım sisteminde kullanılabileceği belirtilmektedir (Le Bourlais ve ark., 1995; Kaur ve Kanwar, 2002).

- **Poliakrilik asit hidrojeller**

Poliakrilik asitler veya karbopol rezinleri, düz zincirli, dallı veya çapraz bağlı polimerlere dayanan akrilik asitlerdir. Karbopol 934P, farmasötik endüstride kullanılan, çapraz bağlı, molekül ağırlığı 3.000.000 Da olan ve sulu çözeltilerde çözünebilen bir polimerdir. Poliakrilik asitler, biyoadhezif özellikleri ile en fazla psödoplastik özelliği olan polimerlerden biridir. Bu polimerler çapraz bağlı mukoadhezif hidrojellerin üretilmesinde de kullanılmaktadır (Le Bourlais ve ark., 1995-1998; Kaur ve Kanwar, 2002).

- **Karboksimetil Selüloz (CMC)**

Sodyum karboksimetil selülozun da poliakrilik asit gibi mukoadhezif bir polimer olduğu belirtilmektedir (Ludwig, 2005; Sintzel ve ark., 1996).

1.4.1.3. İn-situ Jelleşen Sistemler

Başlangıçta düşük viskoziteli olup göze damlatıldığında, gözün cul-de-sac içinde kornea ile temas ederek in situ jel oluşturan sistemler bulunmaktadır (Ding,1998).

Oftalmik çözeltilerin gözdeki drenaj ve seyreltme nedeniyle zayıf olan biyoyararlanımı, geri dönüşümlü sıvı-jel faz geçişi sağlayan polimerlerden hazırlanan in situ jel oluşturan oftalmik salım sistemleri kullanılarak arttırılabilmektedir (Cohen ve ark., 1997).

Göz yüzeyinde faz geçişine neden olan üç yöntem bulunmaktadır (Robinson ve Mlynek, 1995; Ding, 1998):

- pH' ya bağlı sistemler,
- Sıcaklığa bağlı sistemler,
- İyon aktivasyonuna bağlı faz değişimi

- **pH' ya Bağlı Sistemler**

pH' ya bağlı sistemlerden selüloz asetat hidrojen fitalat lateks, su içinde düşük viskoziteli polimerik bir dispersiyon olup (pH 5), konjunktivanın cul-de-sac içine damlatıldığında (gözyaşı pH' sı 7,2-7,4) kendiliğinden koagülasyona ve jelasyona uğramaktadır. (Gurny ve ark.,1985; Le Bourlais ve ark, 1995).

Srividya ve ark, (2001) tarafından pH' ya bağlı in situ jel oluşturan göz damlası formüle edilmiştir. Jel oluşturma ajanı olarak % 0,3 a/h poliakrilik asit (Carbopol® 940), viskozite arttırıcı ajan hidroksipropil metil selüloz (Methocel E50LV) ile kombine edilerek kullanılmıştır. Geliştirilen formülasyonun irritan

olmadığı, terapötik olarak etkili, stabil olduğu ve 8 saat boyunca etkin maddenin sürekli salımını sağladığı belirtilmiştir.

- **Sıcaklıkla Değişen Sistemler**

Sürekli salım sistemi, göz sıcaklığında (33-35 °C) çözeltiden jele dönüşen polimerler kullanılarak da oluşturulabilmektedir. Bu tip polimerlere bir örnek polioksietilen ve polioksipropilen ünitelerinin bağlanmasıyla oluşan Poloksamer F127' dir. Oda sıcaklığında poloksamer çözelti halinde iken, göze damlatıldığında, sıcaklığın yükselmesi ile jel oluşturmakta ve böylece oküler yüzey ile temasını sürdürmektedir. Bu sistemlerin bir dezavantajı, yüksek polimer konsantrasyonu (% 25 Poloksamer) ve poloksamerin yüzey özellikleri nedeniyle oküler toleransının iyi olmamasıdır (Cohen ve ark, 1997).

- **İyonik Aktivasyona Bağlı Faz Değişimi**

İyonik aktivasyona bağlı faz değişimi için kullanılan Gomme 'Gellan' (Gelrite®) mono ve divalan katyonların varlığında berrak jel oluşturan bir polisakkarittir. İnsan gözyaşındaki sodyum konsantrasyonu 2,6 g/dl, materyalin konjunktival kese içine topik olarak uygulandığında jel oluşumu için uygundur. Gelrite® iyi tolere edilebilmekte ve isotonik nötral çözelti olarak formüle edilebilmektedir (Ding, 1998; Kaur ve Kanwar, 2002).

Aljinatın sulu çözeltilerinin de gözde in situ jel oluşturduğu belirtilmektedir. Oküler toleransının iyi olması, uygulanma kolaylığı ve tekrarlanabilir olması, lakrimal sıvı ile jel oluşturması başlıca avantajlarıdır (Sintzel, 1996; Cohen ve ark, 1997; Ludwig, 2005).

Cohen ve ark., (1997) tarafından pilokarpin salımının ve aljinatın jelasyon süresinin polimerde bulunan, gluronik asit (G) yüzdesine bağlı olduğu belirtilmiştir. G içeriği % 65' den fazla olan aljinatlar (örn; Manugel DMB), gözyaşı ile hemen jel oluştururken; G içeriği düşük olan (örn; Kelton LV) daha

düşük hızda zayıf jel oluşturmaktadır. Yüksek G içeren in situ jel oluşturan aljinat sistemin, pilokarpinin uzatılmış salımı için iyi bir taşıyıcı olduğu belirtilmiştir.

1.4.2. Kolloidal Sistemler

1.4.2.1. Lipozomlar

Lipozomlar, derişik sulu faz içeren fosfolipit katmanlarından oluşmuş veziküllerdir. Veziküllerin büyüklüğü 10nm-10μm' dir. Lipozom yapısında genellikle kolesterol bulunmaktadır; böylece etkin maddenin vezikülden çıkışı sınırlanmaktadır (Le Bourlais ve ark, 1995). Fosfolipitlerin yapısına ve hazırlanış yöntemine göre; çok tabakalı veziküller (MLV), tek tabakalı büyük veziküller (LUV) (100-300 nm) ve tek tabakalı küçük veziküller (SLV)(10-100 nm.) olarak üçe ayrılmaktadır (Le Bourlais ve ark., 1998; Gürsoy, 2002, s.:106; Kaur ve Kanwar, 2002; Ludwig, 2005). Lipozomlar, doğal bileşikler içerdiği için biyogeçimli ve biyolojik olarak parçalanabilir veziküller olarak tanımlanmaktadır. Lipozomların stabilitesi ve etkin madde yükleme kapasitesi açısından oftalmik ilaç taşıyıcı sistemlerinde kullanımının sınırlı olduğu belirtilmektedir (Juliano, 1987; Chapter 13; Ding, 1998).

1.4.2.2. Mikropartiküller ve Nanopartiküller

Partiküler ilaç taşıyıcı sistemler; mikropartiküller, nanopartiküller, mikroküreler, nanoküreler, mikrokapsüller ve nanokapsüller olarak tanımlanmaktadır. Büyüklüğü 100 nm' den, birkaç yüz mikrometreye kadar olan partiküller 'mikropartiküller' olarak adlandırılmaktadır. Mikropartiküller, mikrokapsüller ve mikroküreler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Mikrokapsüller, etkin madde partiküllerinin veya damlacıklarının polimerik membran içine yüklenmesiyle oluşan birkaç yüz mikrometre çapında partiküllerdir. Mikroküreler ise polimer matris içine etkin maddenin homojen

olarak dispersiyonu ile oluşmuş polimer-etkin madde kombinasyonlarıdır (Kothuri ve ark, 2003, Chapter 14). Nanopartiküller, partikül büyüklüğü 1μm' den küçük koloidal sistemlerdir. Mikropartiküllere benzer özellikler taşımaktadır. Nanopartiküller, nanokapsüller ve nanoküreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Nanoküreler, matris yapıdadır. Etkin madde yüzeyde adsorbe olabilmekte, partikül içine yüklenebilmekte veya partikül içinde çözünebilmektedir. Nanokapsüller ise genellikle etkin madde içeren yağ veya su damlacıklarının polimerik membranla kaplanması sonucu oluşan veziküler sistemlerdir (Fessi ve ark., 1989; Kreuter, 1991; Allémann ve ark., 1993; Couvreur ve ark., 2002; Kothuri ve ark., 2003, Chapter 14; Reis ve ark., 2006).

Oküler ilaç taşıyıcı partiküler sistemlerin uygulanma şekline göre topik sistemler ve lokal enjeksiyonlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır:

a) Topik Sistemler

Oküler dokularda terapötik konsantrasyonlara ulaşmak için sistemik dozun oldukça yüksek uygulanması, etkin maddelerin yan etkilerine ve toksisitesine neden olmaktadır. Bu nedenle göz için en yaygın ilaç taşıyıcı sistem yolu topik uygulamadır. Etkin madde yüklü mikropartiküler sistemler gözün cul de sac bölgesine uygulandığında; çözünme, diffüzyon, mekanik dağılma ve polimer matriksin erozyonu ile etkin madde açığa çıkmaktadır (Kothuri ve ark, 2003; s.:441).

b) Lokal Enjeksiyon

Proliferatif vitreoretinopati, endoftalmitis ve tekrarlayan uvertis gibi bazı hastalıkların tedavisinde terapötik düzeyi sürdürmek için etkin maddenin vitröz boşluğa enjeksiyonu gerekmektedir. Lokal enjeksiyon için biyolojik olarak parçalanabilen partiküler dozaj şekillerinin geliştirilmesi ile etkin maddenin vitröz boşluğa yavaş salımı sağlanarak enjeksiyon sıklığı azaltılmıştır (Kothuri ve ark., 2003, s.:442; Lallemand ve ark, 2003).

1.4.2.3. Mikroemülsiyonlar ve Nanoemülsiyonlar

Mikroemülsiyon ve nanoemülsiyon sistemler, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmalarının yanısıra, mikropartiküllerin ve nanopartiküllerin elde edilmesinde ara basamak olarak da kullanılmaktadır.

Damlacık boyutlarının ufak olması nedeniyle berrak görünüme sahiptir. Tindal etkisi sonucu mavimsi görünen mikroemülsiyonlarda dispersiyon çok iyi demektir (Speiser, 1976; Chapter 1; Yazan, 2002, Bölüm 7).

1.4.3. İnsertler

İnsertler, şekil ve büyüklüğü topik veya sistemik etki için etkin madde salınımı sağlayacak şekilde göze uygulanmak üzere hazırlanmış, katı veya yarıkatı steril sistemlerdir. İnsertler, membran-kontrollü depo insertler, çözünebilen insertler ve kollajen koruyucular olmak üzere üç grupta toplanmaktadır (Kaur ve Kanvar, 2002).

İnsertler etkin maddenin kontrollü salımını uzun süre devam ettirmek üzere alt göz kapağına yerleştirilirler. Böylece oküler biyoyararlanım arttırılarak iyi bir tedavi sağlanmaktadır (Karataş, 1996).

1.4.4. İmplantlar

İmplantların insertlerden farkı, göze cerrahi bir işlemle yerleştirilmeleridir. Biyolojik olarak parçalanabilen veya parçalanmayan polimerlerden hazırlanabilmektedir. Biyolojik olarak parçalanmayan polimerlerden hazırlanan implantlar salım sona erince cerrahi işlemle gözden alınması gerekmektedir.

2-hidroksi etil metakrilat (HEMA) hidrojeller içine mikroemülsiyon damlacıklarının dispersiyonu ile hazırlanan intraoküler lensler, göz içine uygulanmış ve kontrollü salım sağlandığı belirtilmiştir (Gülsen ve Chauhan, 2005).

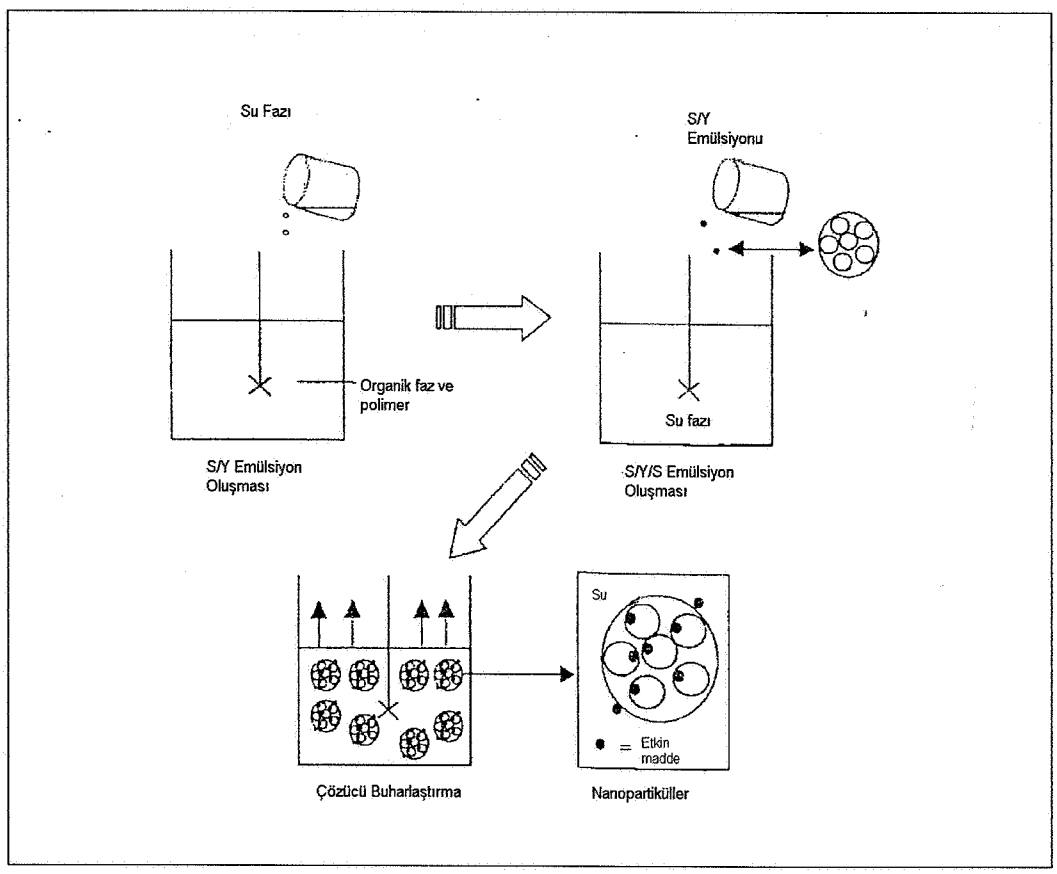
1.5. Oküler İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemlerin Hazırlanma Yöntemleri

1. Sulu Fazda Emülsiyon Polimerizasyonu (Verdun ve ark., 1986),
2. Organik Fazda Emülsiyon Polimerizasyonu (Kothuri ve ark., 2003, s.:442-444),
3. Yüzeylerarası Polimerizasyon (Fallouh ve ark., 1986),
4. Doğal Proteinlerin Denaturasyonu ve Desolvasyonu ile Polimerizasyon (Vandervoort ve Ludwig, 2004),
5. Çözücü Buharlaştırma Yöntemi (O' Donnell ve McGinity, 1997),
   a. Emülsiyon (Y/S, S/Y) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi (Couvreur ve ark., 2002)
   b. Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi (Iwata ve McGinity, 1992),
6. İyonik Jelasyon Yöntemi (Kothuri ve ark., 2003, s.: 442-444),
7. Nanopresipitasyon (Fessi ve ark., 1989),
8. Püskürterek Dondurma Yöntemi (Speiser, 1976; Chapter 1; Blanco ve ark., 2003).

1.6. Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Mikropartiküllerin ve Nanopartiküllerin Hazırlanışı

Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (s/y/s), ilk olarak mikropartiküller için geliştirilmiştir. Bu yöntemde, öncelikle su içinde çözünmüş (yüzey etkin maddeli veya yüzey etkin maddesiz) etkin madde çözeltisi (su fazı) ile suyla karışmayan uçucu çözücü içinde çözünmüş polimer çözeltisi (organik faz) oluşturulur. Çözücü buharlaştırma yöntemiyle enkapsülasyonda iki önemli basamak bulunmaktadır: Bunlardan birincisi emülsiyonda stabil damlacıkların oluşturulması ve ikincisi emülsiyonda damlacıkların solvanla yer değiştirmesidir (Lamprecht ve ark, 1999). İç faz (su fazı), organik faz içine eklenmektedir. Bu karışım, iç emülsiyonu veya primer s/y emülsiyonu oluşturmaktadır. Oluşan s/y emülsiyon, mekanik karıştırıcılarla kuvvetle karştırılarak, yüzey etkin madde

içeren dış faz (su fazı) içine ilave edilmekte ve s/y/s çoklu emülsiyonun oluşması sağlanmaktadır. Oluşan çoklu emülsiyon, sürekli karıştırılarak çözücü buharlaşmaktadır. Böylece polimerin çökmesine neden olarak etkin madde yüklü katı partiküller şekillenmektedir (Şekil 1.3.) (Couvreur ve ark, 2002).



Şekil 1.3. Çoklu emülsiyon (S/Y/S) çözücü buharlaştırma yönteminin şematik şekli (Couvreur ve ark., 2002)

Çoklu emülsiyon (s/y/s) çözücü buharlaştırma yöntemi ile ilgili çeşitli çalışmalara ait örnekler Tablo 1.1' de yer almaktadır.

Tablo 1.1. Çoklu Emülsiyon (S/YS) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Hazırlanan Formüller

Su Fazı		**Yağ Fazı**			**Su Fazı**		**Kaynak**
Etkin madde	*Çözücü*	*Polimer ve etkin madde*	*Çözücü*	*Surfaktan*	*Çözücü*	*Surfaktan*	
Propranolol HCl	Distile su	PCL (M_a: 40000) Nifedipin	Diklorometan	-	Distile su pH 12 1500ml	% 0,25 a/a PVA	Pérez ve ark., 2000
Serum albumini (HSA)	Distile su	PCl-PEG blok kopolimer	Diklorometan etil asetat	-	Distile su 100 ml	% 2 a/a PVA	Zhou ve ark., 2003
HSA	Distile su	PLA	Diklorometan	-	Distile su 8 ml	%5 a/h PVA	Zambaux ve ark., 1998
Propranolol HCl	Distile su	PLGA 50:50, PCl veya Etil selüloz	Diklorometan	-	Distile su pH 9,7 200 ml	% 0,25 a/a PVA	Ubrich ve ark., 2004
Sığır serum albumini (BSA)	Distile su	PCL	Diklorometan	Synperonik L 61	Distile su 100 ml	%1-10 a/h PVA	Huatan ve ark., 1995

Pérez ve ark (2000), tarafından s/y/s yöntemi kullanılarak hem lipofilik (nifedipin) hem de hidrofilik (propranolol HCl) etkin maddelerin poli(ε-kaprolakton) (PCL) mikropartikülleri hazırlanmıştır.

Çoğu araştırmacı (Alex ve Bodmeier, 1990; Iwata ve Mc Ginity, 1992) hidrofilik etkin maddeler ve proteinlerin mikropartiküllere enkapsülasyonu için çoklu emülsiyon tekniğinin en uygun yöntem olduğunu göstermiştir. Bu teknik, nanopartiküllere de uygulanmıştır (Blanco ve Alonso, 1997; Lemoine ve Préat 1998).

Partiküllerin oluşması için kullanılan başlıca polimerler, poli(laktit-ko-glikolit) ve poli(ε-kaprolakton)' dur (Couvreur ve ark, 2002). Bu yöntemle etkin maddenin dış sulu faz içindeki çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle hidrofilik etkin maddenin iç faz veya polimerik matristeki porlardan diffüzyonla etkin madde kaybı olmaktadır (Alex ve Bodmeier, 1990; Pérez ve ark, 2000).

Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle PCL' a dayalı protein enkapsülasyonunda oluşan partiküllerin pürüzsüz ve non poröz yapıda olduğu belirtilmiştir (Huatan ve ark, 1995).

Lamprecht ve ark. (1999), tarafından çoklu emülsiyon yöntemiyle hidrofilik protein olan serum albumini (BSA) nanopartiküllere yüklenmiştir. İki farklı biyodegredabl polimer poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) 50/50 PLGA ve PCL kullanılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği oldukça yüksek (>% 80) bulunmuştur. Proteinin in vitro salım çalışmalarında, sürekli salım gerçekleştirdiği de belirlenmiştir.

Ubrich ve ark (2004), tarafından çoklu emülsiyon s/y/s çözücü buharlaştırma yöntemiyle propranolol HCl gibi hem hidrofilik hem de düşük molekül ağırlıklı etkin madde yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Nanopartiküller, basınçlı homojenizatör kullanılarak, çeşitli polimerler (poli(ε-kaprolakton), poli(laktit-ko-glikolit), etilselüloz) ve çeşitli konsantrasyonlarda etkin madde ile hazırlanmıştır. Yüksek enkapsülasyon etkinliği, hem PCL (%77,3) hem de PLGA (%83,3) ile gözlenmiştir. Etil selülozla hazırlanan nanopartiküllerin ise daha az enkapsülasyon etkinliğine (%66,8) sahip olduğu belirlenmiştir. Her bir polimerin amorf ve/veya yarı kristal özelliklerinin nanopartikül hazırlanırken değişmediği gözlenmiştir. Propranolol HCl için erime sıcaklığında önemli değişim olmasına

rağmen, kristal yapısının değişmediği bulunmuştur. Bu nedenle çoklu emülsiyon yönteminin hem düşük molekül ağırlıklı hem de hidrofilik etkin maddeler için uygulanabileceği belirtilmiştir.

Hoffart ve ark (2002), s/y/s emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemiyle düşük molekül ağırlıklı heparin yüklü polimerik nanopartiküller hazırlamışlardır. Formülasyonda iki biyolojik olarak parçalanbilen iki polimer (poli (ε-kaprolakton) ve poli(D,L-laktit-ko-glikolik asit) 50/50 PLGA) ve iki biyolojik olarak parçalanmayan polimer (Eudragit RS ve RL) tek veya kombine olarak kullanılmıştır. Ortalama partikül büyüklüğü 240-490 nm olarak bulunmuş ve polimerik organik çözeltinin viskozitesine bağlı olduğu belirtilmiştir. PCL ve PLGA ile bulunan düşük enkapsülasyon etkinliğinin (%10,6-16) organik fazın viskozitesi ile ilgili olabileceği belirtilmiştir. Polimerik organik fazın viskozitesindeki artışın, organik çözücünün sulu faza difüzyon hızının azalmasına, polimer çökmesinin daha yavaş olmasına ve dış faza etkin madde kaybının daha belirgin görülmesine neden olduğu açıklanmıştır.

1.7. Mikropartiküllerin ve Nanopartiküllerin Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü BuharlaştırmaYöntemiyle Hazırlanışına Etki Eden Faktörler

1.7.1. Karıştırıcının Tipi, Karıştırma Hızı ve Süresi

Çoklu emülsiyonun homojenizasyonu sonikasyonla (Blanco ve Alanso, 1997) ultratoraks (Lemoine ve Préat, 1998) veya basınçlı homojenizatör (Lamprecht ve ark., 1999) kullanılarak sağlanmaktadır.

Oluşan partiküllerin büyüklüğü, hazırlanış yönteminin karıştırma hızına bağlıdır. Daha hızlı karıştırma, daha küçük partiküllerin oluşmasını sağlamaktadır. Nanopartiküller sonikatör kullanılarak hazırlandığında polidispersite indeksi yüksek bulunduğu için yüksek basınçlı homojenizatörün daha uygun olduğu belirtilmektedir (Ubrich ve ark, 2004).

Karıştırma süresinin arttırılması, etkin maddenin dış faza geçmesini sağladığı için enkapsulasyon etkinliğini azaltmaktadır (Alex ve Bodmeier, 1990).

Maksimum enkapsülasyon etkinliğine ulaşmak için, karıştırma süresinin minimum tutulması gerekmektedir; fakat karıştırma süresi arttıkça partiküllerde artık organik solvan içeriği azaltılabilmektedir (Herrman ve Bodmeier, 1995).

İkinci emülsiyonda karıştırma hızının arttırılması, emülsiyon damlacıklarının çapını azaltmakta ve daha düzgün partiküller oluşmasını sağlamaktadır (Rosca ve ark, 2004).

Lamprecht ve ark (2000), homojenizasyon süresinin (3 dak) nanopartikül büyüklüğünü değiştirmediğini, polidispersite indeksini ise azalttığını belirtmişlerdir. Homojenizasyon süresi 3 dak' dan daha uzun olduğunda ise, nanopartikül büyüklüğünün ve polidispersitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Homojenizasyon süresi arttıkça çoklu emülsiyonun stabilitesi azalmış ve damlacıkların koalesansına neden olmuştur.

1.7.2. Polimer Miktarı ve Yapısı

Lu ve ark (1999), tarafından S/Y/S çoklu emülsiyon yöntemiyle, sığır serum albumini (BSA) içeren poli l-laktit nanopartikülleri hazırlanmıştır. Poli l-laktit ile poli(ε-kaprolakton)-poli(etilen-oksit) blok kopolimeri (PCE) karşılaştırıldığında, yükleme etkinliğinin polimerin hidrofilitesine önemli ölçüde bağlı olduğu bulunmuştur. Daha hidrofilik PCE polimer kullanıldığında daha düşük yükleme etkinliği ve daha küçük nanokapsüller gözlenmiştir.

Ubrich ve ark. (2004), tarafından PCL, PLGA ve EC polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerde partikül büyüklüğünün ve etkin madde yükleme etkinliğinin polimerin doğal yapısından etkilendiği belirtilmiştir. Etil selüloz ile hazırlanan nanopartiküllerde partikül büyüklüğünün diğer iki polimerle hazırlanan nanopartiküllere göre arttığı, yükleme etkinliğinin ise azaldığı gözlenmiştir.

Organik fazdaki polimer konsantrasyonundaki artış, nanopartikülün hem büyüklüğünü hem de polidispersite indeksini arttırmaktadır (Lamprecht ve ark,1999,2000).

Organik polimer fazın etkin madde için iç ve dış sulu faz arasında difüzyonel bariyer oluşturduğu ve bu tabakanın kalınlığının iç sulu faz hacminin artması ile azaldığı belirtilmektedir (Herrman ve Bodmeier, 1995).

1.7.3. Polimer/ Etkin Madde Oranı

Lamprecht ve ark. (1999), tarafından polimer miktarına bağlı olarak Polimer/ BSA oranı arttıkça nanopartiküle albumin yüklenme kapasitesinin de arttığı tespit edilmiştir. Polimer konsantrasyonu arttıkça primer emülsiyonun viskozitesinde artış sağlandığı ve proteinin dış faza geçen miktarının azaldığı; böylece protein yükleme etkinliğinde artış görüldüğü belirtilmiştir

Propranolol HCl miktarı arttırılarak polimer/etkin madde oranı azaltıldığında, nanopartikül boyutunda azalma olduğu belirtilmiştir (Ubrich ve ark, 2004).

1.7.4. Etkin Maddenin Miktarı ve Yapısı

S/Y/S emülsifikasyon yöntemi yüksek molekül ağırlıklı protein ve peptitler gibi hidrofilik makromoleküllerin polimerik partikül içine enkapsülasyonu için de tercih edilmektedir (Cohen ve ark, 1991; Herrmann ve Bodmeier, 1995; Rafati ve ark, 1997; Blanco ve ark, 1997; Lemoine ve Préat, 1998; Lu ve ark, 1999; Benoit ve ark, 1999; Lamprecht ve ark, 2000; Li ve ark, 2001).

Lamprecht ve ark. (1999) tarafından iç sulu fazda BSA konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliği üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir. Hem PLGA hem de PCL nanopartiküllerinde optimal enkapsülasyon etkinliğine en düşük BSA konsantrasyonunda ulaşılmıştır. BSA konsantrasyonu arttıkça enkapsülasyon etkinliği azalmıştır.

Yüklenen etkin madde miktarı arttıkça iç ve dış su fazı arasındaki ozmotik basınç farkının yükleme etkinliğinde azalmaya neden olabileceği belirtilmektedir (Alex ve Bodmeier, 1990; Lamprecht ve ark, 2000).

Lamprecht ve ark, (2000) tarafından iç sulu fazda BSA konsantrasyonun artmasıyla, polidispersite indeksinin de arttığı, partikül büyüklüğünün ise belirgin olarak etkilenmediği tespit edilmiştir.

1.7.5. Primer Emülsiyonun Stabilitesi

Lindenstruth ve ark., (2004) tarafından en yüksek enkapsülasyon etkinliğinin en iyi oluşan primer s/y emülsiyonunda bulunduğu açıklanmıştır. Primer emülsiyonun stabilitesi çoklu emülsiyonun stabilitesi ve yüksek oranda etkin madde yüklenmesi açısından önemlidir (Schugens ve ark, 1994).

1.7.6. Stabilizör

Bu yöntemde sıklıkla kullanılan bir stabilizör olan PVA' nın konsantrasyonu arttıkça partikül büyüklüğünün azaldığı belirtilmektedir (Zambaux ve ark., 1998; Lamprecht ve ark., 1999; Vandervoort ve Ludwig, 2002). PVA konsantrasyonu arttıkça, daha fazla PVA molekülleri, organik faz ile dış sulu faz ara yüzeyini kaplamaktadır. Damlacıkların koalesansının önlenmesi, daha küçük emülsiyon damlacıklarının oluşmasını sağlamaktadır (Lamprecht ve ark, 2000).

PVA yerine stabilizör olarak karbopol ve poloksamerin de kullanılabileceği belirtilmektedir (Vandervoort ve Ludwig,2002).

Dış fazdaki PVA stabilizör konsantrasyonunun sadece partikül büyüklüğü ve dağılımı ile protein içeriğini değil; partiküllerin salım özelliklerini ve iç yapısını da etkilediği belirtilmektedir (Rafati ve ark., 1997).

1.7.7. Dış Faz Hacmi

Lamprecht ve ark. (1999)'a göre, dış faz hacmi arttıkça hem BSA yükleme etkinliğinde hem de nanopartikülün partikül büyüklüğünde artış sağlanmaktadır. Dış faz hacmi arttıkça, karıştırma etkinliğinin azalması sonucu partikül büyüklüğünde artışa neden olduğu düşünülmektedir.

Alex ve Bodmeier (1990), dış faz hacminin arttırılması ile Pseudoefedrin HCl'in % etkin madde içeriğinin azaldığını belirtmişlerdir.

1.7.8. Dış Fazın pH'sı ve Etkin Maddenin pKa' sı

S/Y/S yöntemiyle nanopartikül üretiminde etkin maddenin sudaki çözünürlüğü azaltılarak, dış faza geçen miktarı azaltılabilmektedir. Dış fazın pH' sının nötralden bazik pH' ya ayarlanması ile etkin maddenin sudaki çözünürlüğü azaltılmış ve böylece PLGA nanopartiküllerine etkin madde yüklenmesinde büyük oranda artış sağlanmıştır (Song ve ark, 1997).

Etkin maddenin iyonizasyon derecesi ve sürekli fazın pH' sı, propranolol HCl (pK_a 9,5) gibi iyonize olabilen etkin maddelerin enkapsülasyonu için önemli parametrelerdir. PVA çözeltisinin pH' sı etkin maddenin pK_a değerinin üzerine yükseltildiğinde etkin maddenin çözünürlüğünde azalma meydana gelmekte ve sulu faza geçen etkin madde miktarı azaltılabilmektedir. Bu nedenle, distile sudan daha iyi bir enkapsülasyon etkinliği sağlanmaktadır (Ubrich ve ark, 2004)

Pérez ve ark (2000), propranolol HCl' in enkapsülasyon etkinliğinin pH 5' de yaklaşık %1,6 iken pH 12' de %57 olduğunu belirtmişlerdir.

1.7.9. Sıcaklık

Sıcaklık 4 °C' den 29 °C' ye arttırıldığında mikroküre büyüklüğünün azaldığı, 29 °C' den yüksek sıcaklıklarda ise hızlı buharlaşma nedeniyle partikül büyüklüğünün arttığı belirtilmiştir (Yang ve ark., 2000). Diklofenak sodyumla

S/Y/S çoklu emülsiyonu hazırlanırken yüksek basınç ve yüksek sıcaklığın büyük yağ damlacıklarına neden olduğu belirlenmiştir (Lindenstruth ve Müller, 2004).

1.8. Nanopresipitasyon Yöntemi

Nanopartikül üretimi için nanopresipitasyon yöntemi (veya çözücü değiştirme yöntemi) ilk kez Fessi ve arkadaşları (1989) tarafından geliştirilmiştir. Nanopresipitasyon yönteminde, birbiriyle karışabilir iki çözücü kullanılmaktadır. İdeal olarak hem polimer hem de etkin madde birinci sistemde (solvan) çözünmeli; fakat ikinci sistemde (nonsolvan) çözünmemelidir. Nanopresipitasyon, polimer çözeltisinin ikinci sisteme eklenmesi sonucu meydana gelmektedir. Polimer içeren çözücü, dispers ortama difüze olduğunda polimer çökmekte ve etkin maddeyi hemen kaplamaktadır. Hızlı nanopartikül oluşumu solvan ve nonsolvan yüzeyleri arasındaki türbülans nedeniyle Marangoni etkisi olarak adlandırılmaktadır. Nanopresipitasyonla, genellikle 100-300 nm gibi küçük nanopartiküller oluşturulabilmektedir (Bilati ve ark, 2005).

Nanopresipitasyonda poli (D,L-laktik asit ko-glikolik asit), selüloz deriveleri, Eudragit S 100® veya poli (ε-kaprolakton) gibi çeşitli polimerler kullanılabilmektedir (Leroueil- Le Verger ve ark., 1998; Govender ve ark,1999; Zili ve ark, 2005; Schaffazic ve ark, 2005; Bilati ve ark, 2005).

Schaffazic ve ark. (2005) tarafından nanopresipitasyon yöntemiyle Eudragit S 100® polimeri kullanılarak melatonin yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Partikül büyüklüğü 255 nm' den daha küçük bulunmuştur. Nanokapsül ve nanokürelerin, melatoninin antioksidan etkinliğinde önemli ölçüde artış sağladığı belirtilmiştir.

Nanopresipitasyon yöntemiyle yüksek karıştırma hızı, sonikasyon veya yüksek sıcaklık gerekmediği, toksik organik çözücülerin ve yüzey etkin maddelerin de genellikle kullanılmadığı belirtilmektedir (Calvo ve ark, 1996). En uygun nanopartiküllerin düşük karıştırma hızında (50 rpm) ve iç fazın dış faza damla damla eklenmesiyle oluştuğu ifade edilmektedir (Peltonen ve ark, 2003). Bununla birlikte nanopresipitasyon yönteminin bazı dezavantajları

bulunmaktadır. Bu yöntem indometazin gibi hidrofobik yapısı bulunan, etanolde veya asetonda çözünebilen; fakat sudaki çözünürlüğü çok az olan bileşikler için daha uygundur. (Calvo ve ark, 1996) Etkin maddenin dış faza geçmemesi, nanopartiküllerde yükleme etkinliğini %100' e ulaşmasını sağlamaktadır (Fessi ve ark, 1989; Barichello ve ark, 1999). Bununla birlikte bazı çalışmalarda suda çözünebilen maddelerin de yüklenebileceği belirtilmektedir. Örneğin; dış fazın pH' sı değiştirilerek prokain hidroklorürün iyonizasyonu azaltılmış ve böylece etkin maddenin dış faza geçmesi önlenmeye çalışılmıştır. Sulu fazın pH'sı 5,8' den 9,3' e arttırıldığında, nanopartikül veriminin %65,1' den %93,4'e artmış, etkin madde içeriği %0,3' den %1,3 a/a' e ve işlem etkinliği %11' den %58,2' e arttığı belirtilmiştir (Govender ve ark, 1999).

Peltonen ve ark, (2004) tarafından hidrofilik etkin madde olan sodyum kromoglikat'ın, yükleme etkinliğinin arttırılması için çeşitli parametreler (etkin madde miktarı, çözücü seçimi, elektrolit ilavesi, pH değişikliği) incelenmiştir. Sodyum kromoglikat' ın (pK_a 2,5 20 ° C) yükleme etkinliğini en fazla pH' nın azaltılması arttırmıştır. pH değiştirilmediğinde %10-15 iken pH azaltıldığında yükleme etkinliğinin %70' e ulaştığı belirtilmiştir.

Barichello ve ark (1999) tarafından, nanopresipitasyon yöntemi ile çeşitli etkin maddelerin PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyonuna ve partikül büyüklüğüne etkisi incelenmiştir. Bütün sistemlerde partikül büyüklüğü genellikle 160-170 nm ölçülmüştür. Enkapsülasyon etkinliği sonuçlarına göre, siklosporin ve indometazin gibi daha lipofilik etkin maddelerde dış faza etkin madde kaybı olmamıştır; fakat vankomisin ve fenobarbital gibi daha hidrofilik etkin maddelerin PLGA nanopartiküllerine çok az yüklenebildiği belirtilmiştir.

Zili ve ark (2005) tarafından, nanopresipitasyon yöntemiyle poly(ε-kaprolakton) nanoküreleri ve nanokapsülleri hazırlanmıştır. Lipofilik antifungal bir ajan olan griseofulvin içeren nanopartiküllerde oldukça yüksek enkapsülasyon etkinliği (%98) gözlenmiştir. Partikül büyüklüğü nanoküreler için 250-326 nm, nanokapsüller için 390-400 nm bulunmuştur. Griseofulvinin nanoenkapsülasyonu ile biyoyararlanımında artış sağlanmıştır. Bu yöntem, griseofulvinin lipofilik olması ve asetondaki çözünürlüğü nedeniyle oldukça uygun bulunmuştur.

Ubrich ve ark (2005), nanopresipitasyon yöntemiyle Siklosporin A içeren biyolojik olarak parçalanmayan polimerik (Eudragit RS veya RL) nanopartiküller hazırlamışlardır. Etkin maddenin sudaki çözünürlüğünün oldukça az olması nedeniyle yüksek enkapsülasyon etkinliği (%70-85) gözlenmiştir. Partikül büyüklüğü 170-310 nm. ölçülmüştür.

Bozkır ve Saka (2005) tarafından, nanopresipitasyon yöntemiyle 5-Florourasil yüklü poli D,L (laktit-ko-glikolit) nanopartikülleri hazırlanmış ve %78,3 yükleme etkinliği bulunmuştur.

Bilati ve ark, (2005) tarafından nanopresipitasyon yönteminin aseton veya etanol dışında diğer çözücülere de uygulanabildiği, uygun çözücü ve çözücü olmayan sıvılar seçilerek, daha hidrofilik etkin maddelerle nanopartiküllerin oluşturulabileceği belirtilmektedir. Çözücü olmayan sıvı olarak dielektrik sabitelerinin düşük olması nedeniyle alkoller kullanılmaktadır. Daha düşük dielektrik sabitesi demek hidrofilik maddeleri daha az çözmesi demektir; böylece etkin madde kaybı önlenmektedir. Suyun dielektrik sabitesinden (80,1) oldukça uzak olan etanolün (24,6) ve n-propanolün (20,3) en uygun olduğu belirtilmiştir. Çözücü olarak ise dielektrik sabitesi yüksek olanlar kullanılmıştır. Nanopresipitasyonla protein yüklü nanopartiküllerin oluşturulmasında proteinin çözünürlüğü ve stabilitesi açısından polar ve aprotik çözücülerden dimetilsülfoksit (DMSO)' in kullanılması tercih edilmiştir. Lipofilik etkin maddelerin yüklenmesinde ise daha düşük dielektrik sabiteli çözücüler kullanılmıştır .

1.9. Mikropartiküllerin ve Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Doğal ve yarısentetik polimerlerden kitozan (Alonso ve Sánchez, 2003), jelatin (Vandervoort ve Ludwig, 2004) ve albumin mikropartikül ve nanopartikül hazırlanmasında kullanılmaktadır (Sintzel ve ark., 1996; Deshpande ve ark, 1998; Ludwig ve ark., 2005).

Biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerlerden, poli(d,l-laktik asit) (PLA) (Konan ve ark., 2003; Leo ve ark., 2004; Dalpiaz ve ark., 2005),

poliglikolik asit (PGA) ve kopolimerleri polilaktik- ko- glikolik asit (PLGA) (Blanco-Príeto ve ark., 1997; Hoffart ve ark., 2002; Konan ve ark., 2003; Cegnar ve ark., 2004), poli(ε-kaprolakton) (PCL) (Losa ve ark., 1993; Hoffart ve ark., 2002) ve hazırlama sırasında sentezlenen polialkilsiyanoakrilat (PACA) (Losa ve ark., 1993) en yaygın olarak kullanılan polimerlerdir.

Biyoparçalanmayan polimerlerden Eudrajit® (Hoffart ve ark., 2002) ve etil selüloz (Wieland-Berghausen ve ark., 2002) mikropartikül ve nanopartikül hazırlanmasında kullanılmaktadır.

1.10. Poli(ε-kaprolakton)

Poli(ε-kaprolakton) biyolojik olarak geçimli ve yavaş aşınabilen bir polimerdir (Zhou ve ark., 2003). Bu polimer kısmen kristal, daha çok hidrofobik ve yüksek molekül ağırlıklıdır (Marchal-Heussler ve ark., 1992) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Poli (ε-kaprolakton)' un kimyasal yapısı (Pitt, 1990, Chapter 3).

Poli(ε-kaprolakton) oda sıcaklığında tetrahidrofuran, kloroform, metilenklorür, karbontetraklorür, benzen, toluen, sikloheksanon, dihidropiran ve 2-nitropropan dahil çeşitli organik çözücülerde çözünebilmektedir. Aseton, 2-butanon, etilasetat, asetonitril ve dimetilformamit' te az çözünür, alkol, petroleteri ve dietil eterde hiç çözünmez (Pitt, 1990, Chapter 3).

Poly(ε-kaprolakton), saf ε-kaprolaktonun açık zincirli polimerizasyonuyla hazırlanmaktadır (Sintzel ve ark, 1996; Jiang ve ark., 2003). ε-kaprolaktonun polimerizasyonu anyonik, katyonik, koordinasyon ve radikal olmak üzere en az dört farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (Pitt, 1990, Chapter 3).

Poli (ε- kaprolakton), kristal büyüklüğüne bağlı olarak erime sıcaklığı 59-64° C arasında değişen yarı kristal bir polimerdir. Camsı geçiş sıcaklığı (Tg) –

60° C, -70° C' dir (Deshpande ve ark., 1998). %100 kristal PCL için füzyon sıcaklığı ΔH_f: 139,5 j/g olarak belirtilmiştir (Bu değer PCL ve kopolimerlerinin kristalliğini diferansiyel taramalı kalorimetreden (DSC) tahmin etmek için kullanılmaktadır) (Pitt, 1990, Chapter 3).

Poli(ε-kaprolakton)' un kristalliği, molekül ağırlığı ile değişmektedir ve M_a 100.000' den daha yüksek molekül ağırlığı için kristalliği % 40'dır, M_a 5.000'e azaldığında ise % 80'e çıkmaktadır. Kristalliğin, hem permeabiliteyi hem de biyolojik olarak parçalanabilirliği tespit etmek için önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Kristalliğin artışı poli(ε-kaprolakton)' un çözeltideki çözünürlüğünü ve permeabilitesini azaltmaktadır. Ester bağlarının azalmasına bağlı olarak biyoparçalanma hızı düşmektedir.

Poli(ε-kaprolakton) filmi subdermal olarak ratlara, tavşanlara veya maymunlara implante edildiğinde, ester bağlarında hidrolitik yarılma ile degredasyon başlamaktadır ve polimerin molekül ağırlığında, viskozitesinde azalma görülmektedir. Aynı oranda yarılma, 40° C su içinde de in vitro olarak görülmektedir (Pitt, 1990, Chapter 3; Deshpande ve ark., 1998).

Marchal-Heussler ve ark. (1992-1993) tarafından, poli(ε-kaprolakton), poli (laktit-ko-glikolik) asit kopolimerleri ve poliisobutilsiyanoakrilat etkinlikleri açısından test edilmiştir. Çalışmalarında antiglokom etkin maddelerle (örn: betaksolol ve karteolol gibi) hazırlanan kolloidal taşıyıcılarda intraoküler basınçta azalmanın poly(ε-kaprolakton)'un kullanılmasıyla daha belirgin olduğu açıklanmıştır.

Daha hidrofobik taşıyıcılar ile daha yüksek oküler aktivitenin olduğu düşünülmektedir. Etki mekanizması doğrudan konjunktival bölge içinde poli(ε-kaprolakton)un aglomerasyonuna bağlanmaktadır. Poli(ε-kaprolakton) nanokapsüllerin, nanokürelerden daha iyi etki gösterdiği bilinmektedir.

Calvo ve ark (1996a) tarafından, indometazin içeren poli(ε-kaprolakton) nanopartikül, nanokapsül ve submikron emülsiyonlarının, izole korneadan korneal penetrasyonları karşılaştırılmış ve 6 saat boyunca üç formülasyonun da ticari göz damlalarından daha fazla penetrasyonu arttırdığı gözlemlenmiştir.

Çoğu araştırıcılar nanopartiküllerin, korneal irritasyona veya toksisiteye neden olmadığını belirtmektedirler. Bununla birlikte diğer araştırıcılar (Marchal-Heussler ve ark, 1992, 1993; Calvo ve ark., 1994; Zimmer ve ark, 1994) PACA' dan oluşan nanopartiküllerin hücre membranının yapısını bozarak korneal epitelde hasarlar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. İncelemelerde poli(ε-kaprolakton) nanokapsüllerinin korneal epitel hücreleri üzerinde herhangi bir toksisitesinden bahsedilmemektedir.

Nanopartiküler dozaj şekli, daha düşük etkin madde konsantrasyonuyla daha yüksek terapötik etkinin gözlenmesini, böylece sistemik etkilerin minimum olmasını sağlamaktadır. Bu özellikler Losa ve ark, (1993) tarafından metipranolol yüklenmiş poli(ε-kaprolakton) veya poiisobutil siyanoakrilat nanokapsüllerin oftalmik olarak uygulanmasıyla ispat edilmiştir.

Çoğu araştırmacıya göre, nanokapsüllerin etkinliğinin bir nedeni, gözde kalış süresinin uzatılması ve arttırılmış biyolojik yanıt sağlayan biyoadhezif özelliklerinin olmasıdır (Kreuter 1991, Zimmer ve Kreuter 1995).

1.11. Polimerik Partiküler Sistemlerin Partikül Büyüklüğü Analiz Yöntemleri

Polimerik partiküler sistemlerin analiz yöntemleri aşağdaki şekilde sınıflandırılmaktadır (Malmsten, 2002, Chapter 9):

1.11.1. Dinamik Işık Kırınımı Yöntemi (Foton Korelasyonu Spektroskopisi),

1.11.2. Statik Işık Kırınımı Yöntemi (Lazer Difraksiyonu),

1.11.3. Coulter Counter,

1.11.4. Mikroskopi,

1.11.5. Elektrokinetik Yöntemler,

1.11.6. Akustik Yöntemler.

1.11.1. Dinamik Işık Kırınımı Yöntemi (Foton Korelasyonu Spektroskopisi)

500 nm' den küçük disperse partiküllerin tayininde kullanılmaktadır. Seyreltik partiküler dispersiyondan zamana bağlı olarak ışık kırınımı yoğunluğunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Dinamik ışık kırınımı partiküllerin brownian hareketine göre belirlenmektedir. Daha büyük partiküller, küçük partiküllere göre daha yavaş difüze olmaktadır (Malvern Ins.,2003).

1.11.2. Statik Işık Kırınımı Yöntemi (Lazer Difraksiyonu)

0,1 μm' den daha büyük seyreltik partiküler örneklerin analizinde kullanılmaktadır. Bu yöntem ışık kırınımının, kırınım açısının bir fonksiyonu olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Uygun optik teorilerle, partikül büyüklüğü ve dağılımı belirlenmektedir.

1.11.3. Coulter Counter

Dinamik ışık kırınım yöntemi ve ışık difraksiyonu yöntemlerinin tersine, coulter counter yöntemi optik bir yöntem değildir. Derişik dispers sistemlerin karekterizasyonu için avantajlıdır. Bu yöntem, yarıktan geçen bütün partiküllerin sayılması ile partikül büyüklüğü ve dağılımının belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

1.11.4. Mikroskopi

Elektron mikroskopi, floresan mikroskopi, ışık mikroskopi, taramalı prob mikroskopi gibi çeşitli teknikler bulunmaktadır. 1μm' den küçük partiküller için ışık mikroskopi yerine elektron mikroskopi veya taramalı prob mikroskopi uygulanmalıdır.

1.11.5. Elektrokinetik Yöntemler

Elektrik yüklü partiküller bir elektrik alanında karşı yükün bulunduğu tarafa doğru hareket ederler. Elektroforetik mobilite olarak adlandırılan bu göç partikül yükünün tanımlanmasında kullanılabilmektedir. Elektrostatik potansiyelin büyüklüğü Zeta (ζ) potansiyel olarak belirlenmektedir.

1.11.6. Akustik Yöntemler

Akustik ölçüm yöntemleri optik olmayan diğer bir partikül analiz yöntemidir. Bu yöntemin esası elektrik alanında partiküllerin elektroforetik mobilitelerine dayanmaktadır. Alternatif elektrik alanı uygulanarak, yüklü partiküllerin titreşimi sağlanabilmektedir. Böylece hem partikül büyüklüğü hem de ζ-potansiyeli ölçülmektedir.

1.12. Çözünme Hızı Yöntemleri

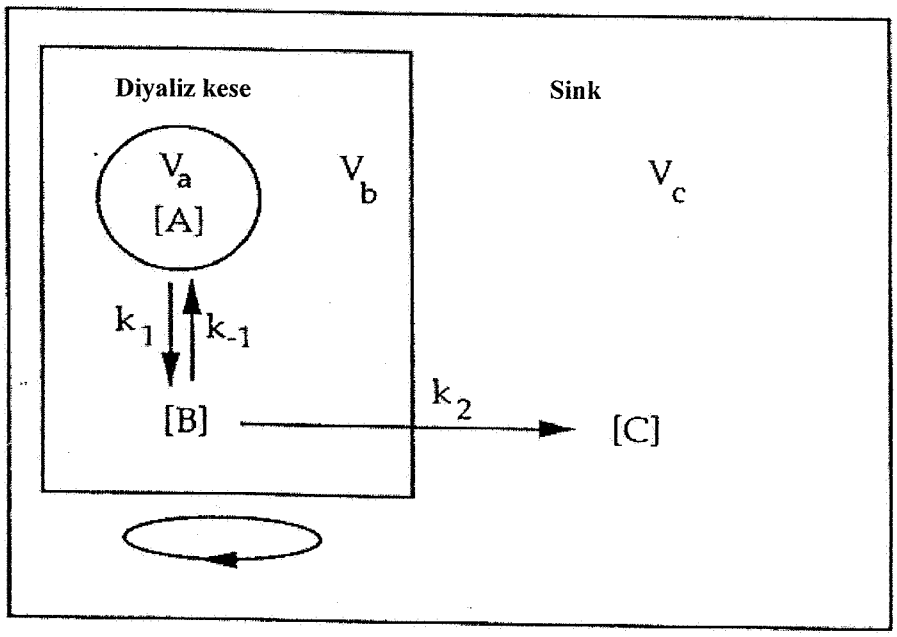
Mikropartiküler sistemlerden etkin maddenin çözünme hızının ölçülmesinde diyaliz yöntemi, örnek alma ve ayırma, sürekli akış ve in situ yöntemler olmak üzere dört tane yöntem bulunmaktadır (Washington, 1996, Chapter 7).

1.12.1. Diyaliz Yöntemi

Bu yöntemde partikül süspansiyonunu içeren diyaliz kesesi daha büyük hacimli sürekli faz sıvısına daldırılmaktadır (Miyazaki ve ark., 1986; Benita ve ark., 1986; Levy ve Benita 1990; Calvo ve ark., 1996a,b-1997; Leo ve ark., 2004). Etkin madde, partiküler taşıyıcıdan sürekli faza difüze olarak diyaliz membrandan dış faza geçmekte (Şekil 1.5.) ve bu fazdan belirli zamanlarda alınan örnekler ölçülerek çözünme hızı belirlenmektedir (Washington, 1996, Chapter 7; Leroueil-Le Verger ve ark., 1998; Kim ve ark., 1998a,b; Vandervoort

ve ark., 2004). Çözünme hızının etkin madde taşıyıcı partiküler sistem ile lokal faz arasındaki partisyon katsayısına bağlı olduğu belirtilmektedir (Washington, 1989).

Etkin madde konsantrasyonları [A], [B], [C] olmak üzere üç kompartmanda belirtilmiştir. A ve B kompartmanlarındaki etkin maddeler partisyon nedeniyle dengededir. Partisyon katsayısı K_p olarak belirtilmiştir. [B] membrandan [C]' ye birinci derece kinetik sabiti k_2 ile geçmektedir. [V_c] daha geniş hacimli olduğundan ters yönde geçiş hız sabitinin (k_{-2}) sıfıra eşit olduğu belirtilmektedir (Washington, 1989; Washington, 1996, Chapter 7).



Şekil 1.5. Sink koşulu olmayan membran diyaliz yönteminin kinetiği

$$[A]_t = [A]_0 \exp\left(-k_2 \frac{[A]}{K_p} \cdot \frac{V_b}{V_a} t\right)$$ **Denklem 1.1.**

A_t= Dış faz içindeki etkin madde konsantrasyonu

k_p= Partisyon katsayısı

k_2= Diyaliz membranın difüzyon oranı

k_1= Ölçülmesi istenilen değer

V_a= Koloidal taşıyıcı sistemin hacmi

V_b = Sürekli faz

V_c= Dış faz (Akseptör faz)

1.12.2. Örnek Alma ve Ayırma Yöntemi

Bu yöntemde partikül süspansiyonundan belirli zaman aralıklarında alınan örneklerden partiküller ultrasantrifüjle (Ubrich ve ark., 2004) veya filtrasyonla (Govender ve ark., 1999) ayrılmakta ve sürekli faza geçen etkin madde miktarı ölçülerek çözünme hızı belirlenmektedir. Partikül büyüklüğü azaldıkça santrifüj süresinin artması veya filtrenin etkin maddeyi adsorblaması başlıca dezavantajlarıdır (Washington, 1996, Chapter 7).

1.12.3. Sürekli Akış Yöntemi

Sürekli akış yönteminde, ultrafiltrasyon hücresi kullanılarak açığa çıkan etkin madde miktarının doğrudan ve sürekli olarak ölçümü yapılmaktadır. Bu yöntemin kolay olduğu; ancak ultrafiltrasyon membrandan akış hızındaki değişikliklerin salım profilinde değişikliklere neden olabileceği belirtilmektedir (Washington, 1996, Chapter 7).

1.12.4. İn situ Yöntemler

İn situ yöntemler, sadece çözeltinin içindeki etkin maddeye duyarlı olan analitik tekniklerin kullanılması ile açığa çıkan etkin madde miktarının belirlenmesine dayanmaktadır (Washington, 1996, Chapter 7).

1.13. Çözünme Hızı Kinetikleri

Çözünme hızı verilerinin değerlendirilmesi için çeşitli çözünme hızı kinetikleri bulunmaktadır (Kılıçarslan, 1999). Çalışmamızda kullanılan başlıca çözünme hızı kinetikleri sıfır derece kinetik, birinci derece kinetik, matris tipi preparatlardan etkin madde çıkış kinetiği (Higuchi), RRSBW dağılımı

kinetiğidir. Çözünme hızı grafikleri, birim zamanda % açığa çıkan toplam madde miktarının, zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilmiştir.

1.13.1. Sıfır Derece Kinetik

Değiştirilmiş salım sistemlerinden özellikle kontrollü salım sistemlerinin, sıfır derece kinetikle etkin madde salımını gerçekleştirmeleri beklenmektedir. Bu kinetiğe göre ilaç şeklinden herbir zaman aralığında çözeltiye geçen etkin madde miktarı sabit olmaktadır (Gürsoy, 2002, s.: 6, Banakar, 1992, Chapter 8).

Sıfır derece kinetiğin hız ifadesi Denklem 1.2 ve Denklem 1.3' de verilmiştir (Martin ve ark, 1970):

$-dC / dt = k_0$ **Denklem 1.2.**

$C = C_0 - k_0 t$ **Denklem 1.3.**

C = t anında çözünmeden kalan madde miktarı,

C_0 = Başlangıçtaki etkin medde miktarı,

k_0 = Sıfır derece çözünme hız sabitesi.

1.13.2. Birinci Derece Kinetik

Birinci derece kinetikle zamana karşı açığa çıkan etkin madde miktarı üssel olarak azalmaktadır (Martin ve ark, 1970). Klasik ilaç şekilerinin çoğu bu çözünme mekanizmasını göstermektedir. Bazı değiştirilmiş salım sistemlerinden, özellikle uzatılmış salım (prolonged-release) sistemlerinin bu tip çözünme kinetiğine uyum sağladığı belirtilmektedir (Banakar, 1992, Chapter 8).

Birinci derece kinetiğin hız ifadesi Denklem 1.4. ve Denklem 1.5.' te verilmiştir (Martin ve ark., 1970; Schwartz ve ark., 1968):

$-dC / dt = k_1 t$ **Denklem 1.4.**

$\ln C = \ln C_0 - k_1 t$ **Denklem 1.5.**

C = t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı,

C_0 = Başlangıçtaki etkin madde miktarı,

k_1 = Birinci derece çözünme hız sabitesi.

1.13.3. Matris Tipi Preparatlardan Etkin Madde Çıkış Kinetiği

Çözünmeyen, inert matristen etkin maddenin çıkış kinetiği (Denklem 1.6'da belirtilen eşitlik) Higuchi tarafından (1963) tanımlanmıştır (Schwartz ve ark.,1968; Washington, 1996, Chapter 7):

$Q = (D_t (2A - C_S) C_S)^{1/2}$ **Denklem 1.6.**

Q = Birim yüzeyden t zamanda difüze olan etkin madde miktarı (mg/cm^2),

D = Etkin maddenin homojen matris içindeki difüzyon katsayısı (cm^2/s),

A = Matrisin birim hacmindeki etkin madde miktarı (mg/ml),

C_S = Etkin maddenin matris içindeki çözünürlüğü.

Düzlemsel poröz ya da granüler matristen açığa çıkan etkin madde miktarı Denklem 1.7.' de verilen eşitlikle hesaplanmaktadır :

$Q = (D.\varepsilon / \tau (2A - \varepsilon.C_S) C_S.t)^{1/2}$ **Denklem 1.7.**

Q = Birim yüzeyden t zamanda difüze oan etkin madde miktarı (mg/ cm^2),

D = Etkin maddenin heterojen matris içindeki difüzyon katsayısı (cm^2/s),

ε = Matrisin porozitesi (%),

τ = Matristeki kapiller sistemin eğri- büğrülük (tortuosity) katsayısı,

A = Matrisin birim hacmindeki etkin madde miktarı (mg/ ml),

C_S = Etkin maddenin ortam sıvısındaki çözünürlüğü.

Denklem 1.6. ve Denklem 1.7. genel olarak Denklem 1.8.' de verilen şekilde kullanılmaktadır:

$Q = kt^{1/2}$ **Denklem 1.8.**

Bu eşitlik 'karekök kanunu' olarak bilinmektedir. Salınan etkin madde miktarı zamanın karekköküne karşı grafiğe geçirildiğinde, etkin madde salımı difüzyon kontrollü ise eğimi k sabitesine eşit olan bir doğru elde edilmektedir (Washington, 1989; Banakar, 1992, Chapter 8).

1.13.5. Fick Difüzyon Kanunu

Higuchi tarafında geliştirilen eşitlik Fick' in birinci difüzyon kanununa dayanmaktadır (Banakar, 1992; Chapter 7).

Gözenekli sistemlerden etkin madde transferi, moleküllerin gözeneklerini dolduran sıvı faz içerisinden difüzyonu şeklinde gerçekleşmektedir. Gözenekli membranlardan difüzyon Denklem 1.9.' da verildiği gibi genel olarak Fick kanunu ile tanımlanmaktadır Gözeneksiz polimerlerden etkin maddenin geçişi, makromoleküler zincirler arasındaki boşluklardan moleküler difüzyonla gerçekleşmektedir. Boşluklardan difüzyon çapraz bağlı polimerlerde, örgü açıklığından; çapraz bağlı olmayan polimerlerde ise birbiri içine girmiş makromolekül zincirleri tarafından oluşturulmaktadır. Yarıkristal polimerlerde ise kristal bölümlerin oluşturduğu fiziksel çapraz bağlar bulunmaktadır. Bu tür membran ve polimer filmlerden ilaç difüzyonu da Fick kanunu ile tanımlanmaktadır (Peppas, 1989; Bölüm 4):

$J = -D_E (d_c/d_x)$ **Denklem 1.9.**

D_E = Etkin difüzyon katsayısı (cm^2/s)

c = Etkin madde konsantrasyonu (mol/cm^3 veya g/cm^3).

J = Akı ($mol/cm^2.s$ veya $g/cm^2.s$)

x = Boyut (cm)

t = Difüzyon süresi (s)

Polimer zincirlerinin gevşeyebilme özelliği, etkin maddenin polimerden difüzyon mekanizmasını önemli derecede etkilemektedir. Genel olarak jel benzeri fazdan (hidrofil polimerden) etkin maddenin difüzyonla çıkışı Fick kanununa göre değil, düzenli olmayan transport mekanizmalarına göre gerçekleşmekte ve belli koşullarda sıfır dereceden salım hızına ulaşılabilmektedir (Peppas, 1989; Bölüm 4).

1.13.6. RRSBW (Rosin- Ramler- Sperling- Bennet- Weibull) dağılımı

Çözünme verilerinin doğrusallaştırılması ve parametrelerle tanımlanması için uygulanan bir modeldir.

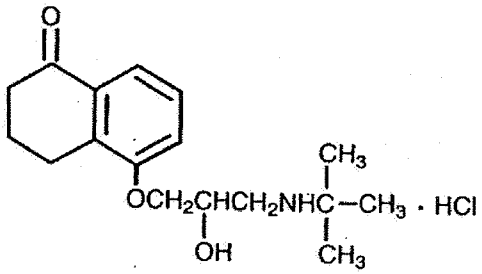
$$\log [\ln (1/ 1-\varphi)] = \beta \log \tau - \beta \log \tau_d \qquad \textbf{Denklem 1.10.}$$

φ = Çözünen etkin madde yüzdesi.
β = Şekil faktörü.
τ = Süre.
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' dır. $\beta > 1$ olması, başlangıçta yavaş etkin made salımını takiben hızla platoya ulaşılması şeklinde oluşan çan eğrilerini tanımlamaktadır. $\beta \leq 1$ olduğunda ise başlangıçta hızlı etkin madde salımını takiben, birinci derece üssel eğri ile uyumlu hızda platoya ulaşılmasını tanımlamaktadır (Langenbucher, 1976).

1.14. Etkin Madde (Levobunolol Hidroklorür)

Açık Formülü:



Kapalı Formülü ve Molekül Ağırlığı:

$C_{17}H_{25}NO_3,HCl$ M_a: 327.85

Levobunololün Kimyasal Adı :

5- [(2S)-3-[(1,1-Dimetiletil) amino]- 2-hidroksipropoksi]- 3,4-dihidro-1(2H)-naftalenon;
(-)-5- [3- (tert-bütilamino)-2 -hidroksipropoksi]- 3,4-dihidro-1(2H)- naftalenon (The Merck Index,1996,s.: 5482).

Analiz Yöntemleri

Levobunolol HCl' in UV spektrofotometresinde maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları 221, 253, 310 nm' dir (The Merck Index, 1996, s.:5482). Levobunolol ve metaboliti dihidrolevobunololün kanda ve idrarda belirlenmesinde yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC) tercih edilmektedir (Hengy ve Kölle, 1985).

Fizikokimyasal Özellikleri

Beyaz, kristal tozdur. Suda kolay çözünür. % 96 etanolde çözünür. %5 a/h çözeltisinin pH' sı 4,5-6,5' tir (Eur. Ph. 2002, s.:861). Erime sıcaklığı 206 - 211 °C' dir (USP 23, s.: 876). pK_a' sı 9,32' dir (Saettone ve ark., 1996).

Levobunolol HCl, iyi kapatılmış kaplarda ve ışıktan korunarak saklanmalıdır (Eur. Ph. 2002, s.:861).

Farmakolojik Özellikleri

Levobunolol ve metaboliti dihidrolevobunolol selektif olmayan β (β_1 ve β_2) adrenoseptör antagonistidir (Gonzalez ve Clissold, 1987; Hengy ve Kölle, 1985). Kronik açık açılı glokom olgularında göz içi basıncını düşürmektedir (Hoyng ve Van Beek, 2000; Kayaalp, 2000, Bölüm 43; Cinotti ve ark., 1985). β-blokerlerin göz içi basıncını düşürmeleri aköz hümör yapısını azaltmaları ile ilgilidir (Kayaalp, 2000).

Uzun süreli çalışmalarda primer açık açılı glokomda veya oküler hipertansiyonda göz içi basıncının kontrolü için gereken en düşük levobunolol konsantrasyonunun %0,25 olduğu belirlenmiştir. En düşük konsantrasyonda hastaların %63' ünde (24'ünün 15' inde) göz içi basıncın kontrolünün sağlandığı belirlenmiştir (Long ve ark., 1985).

Levobunololün (%0,25-1) topik olarak uygulandığında iyi tolere edildiği gözlenmiştir. En çok görülen oküler yan etkileri, blefarit, konjunktivit, görme netliğinin azalması, keratit, göz kızarıklığı, kaşıntı ve yanmadır (Gonzales ve Clissold, 1987).

Bronkokonstrüksiyon, kalp yetmezliği, insüline duyarlılığının azalması, lipid metabolizmasının bozulması, eksersize toleransın azalması, periferde kan akımının azalmasına bağlı çeşitli etkilerin oluşması beta-blokörlerin en çok görülen sistemik yan etkileridir (Kayaalp, 2002, Bölüm 43). Levobunolol; bradikardi, aritmi, konjestif kalp bloğu, bronkospazm gibi yan etkilere sebep olmaktadır. Etkin maddenin tüm sistemik etkileri nazofarinks epitelyumu yoluyla

kana hızla karışması sonucu gerçekleşmektedir (Hoyng ve Beek, 2000). Levobunolol HCl' in kalp hızı üzerine etkisinin timololden daha fazla olduğu belirtilmiştir (Walter ve ark, 1998).

1.15. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı prekorneal etkin madde kaybını minimum düzeyde tutan, kornea ile etkin maddelerin temas süresini uzatarak ilaç absorpsiyonunu maksimum düzeye çıkartan ve böylece gözde etkin maddenin terapötik etkinliğini arttıran nanopartiküller formüle etmektir. Bu amaç için etkin madde olarak non-selektif β-blokör bir antiglokom ajan olan levobunolol HCl kullanılacaktır. Glokom tedavisi için kullanılan levobunololün en büyük problemlerinden biri klasik göz damlasının sebep olduğu kardiyovasküler yan etkileridir. Levobunulol HCL bradikardi, aritmi, konjestif kalp bloğu, bronkospazm gibi sendromlara sebep olmaktadır. Etkin maddenin tüm sistemik etkileri nazofarinks epitelyumu yoluyla kana hızla karışması neticesinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle levobunulolün istenmeyen sistemik yan etkilerinin azaltılması gerekmektedir (Hoyng ve Beek, 2000). Bu durum göze uygulanan çoğu β-blokörler için de genel bir problemdir, bunu ortadan kaldırmak için lipofilik prodrugların kullanılması için birkaç yaklaşım olmuştur ancak çoğu prodruglar sulu ortamda stabil olmamaları nedeniyle kullanılamamıştır. Bu nedenle nano veya mikropartiküllerinin tasarımı alternatif bir yol olarak düşünülmüştür. Oküler nano veya mikropartikülleri hazırlamak için son yıllarda yaygın olarak kullanılan poli-ε-kaprolakton polimerinin kullanılması amaçlanmıştır. Bu göz yaşı pH' sı ile hidrolize uğrayarak biyolojik olarak aşınabilen bir polimerdir ve korneal epitelyum hücrelerine hiçbir toksik etkisinin olmadığı ispatlanmıştır (Kaur ve Kanwar, 2002).

Farklı yöntemlerle çeşitli parametreler kullanılarak formülasyonların hazırlanması amaçlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların işlem etkinlikleri, yüzey karakteristikleri, partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri, çözünme hızı profilleri tayin edilecek ve kinetik değerlendirmeleri yapılacaktır. Çözünme hızı

çalışmaları sonucu seçilen en iyi formül/ler ısıya duyarlı *in situ* jel oluşturan polimerik çözelti içersinde süspande edilerek formüle edilecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Levobunolol HCl	:Abdi İbrahim
- Diklorometan	: Merck
- Metanol	: Sigma-Aldrich
- Kloroform	: Merck
- Etanol	: Merck
- Propilen glikol	: Merck
- Polivinilalkol (Mowiol 4-88) (M_A: 31.000)	:Hoechst
- Poli (ε- kaprolakton) (M_A: 80.000)	:Aldrich
- Pluronik F68	: Sigma
- Pluronik F127	: Sigma
- Sodyum hidroksit	: Merck
- Sodyum hidrojen fosfat monohidrat	: Merck
- Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat	: Merck
- Sodyum klorür	: Merck

2.1.2. Kullanılan Aletler

- UV Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1202
- Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	: Shimadzu DSC 60
- Lazer Kırınım Difraktometresi	: Malvern Inst, Mastersizer Hydro 2000S
- Zetametre	: Zetasizer NanoZS (Malvern)

- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) : JEOL JSM-840A
- Ultrasantrifüj : Beckman Optima XL100K
- Liyofilizatör : Christ® Gamma 2-16 LSC
- pH- metre : Meterlab pHM201
- Viskozimetre : Brookfield Model DV-II
- Hassas teraziler : Sartorius
- Üstten kefeli terazi : Sartorius
- Magnetik karıştırıcılar : Heidolph, Stuart
- Etüv : Heraeus
- Termostatlı su banyosu : Memmert
- Paletli Karıştırıcı : Stir-pak®
- Ultratoraks : Kilca Labortechnick T25 basic
- Ultrasonik banyo : Ultrasonic LC 30
- Optik Mikroskop : Olympus
- Çalkalayıcı su banyosu : Memmert
- Diyaliz membran : Sigma- Aldrich (M_a: 12400 23 mm*15 mm)

2.1.3. Kullanılan Çözünme Ortamı

Normal gözyaşının ortalama pH' sı 7,4' tür (Ludwig, 2005). Çalışmalarda çözünme ortamı olarak pH 7,4 izotonik fosfat tamponu (Modifiye Sørensen) kullanılmıştır (Wade, 1980).

pH 7,4 izotonik fosfat tamponu:

Sodyum hidrojen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4.2H_2O$).....2,1 g

Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4.12H_2O$).....19,1 g

Sodyum klorür (izotonik yapmak için).....4.4 g

Distile su y.m. .....1000.0 ml

Hazırlanışı: Sodyum hidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat ve sodyum klorür ayrı ayrı bir miktar distile suda çözülür. Hazırlanan çözeltiler karıştırılarak belirtilen hacme distile su ile tamamlanır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1. Etkin Maddenin UV Spektrumlarının Belirlenmesi

Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tamponu ve distile su içinde 25mg/50ml konsantrasyonunda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler 0,050 mg/ml konsantrasyona seyreltilerek UV spektrofotometrede 200-400 nm' de spektrumları alınmıştır. Spektrumlardan her bir çözeltinin maksimum pik verdiği dalga boyları (λ_{max}) ve bu dalga boylarındaki absorbansları tespit edilmiştir.

2.2.1.2. Etkin Maddenin UV Spektrofotometresi ile Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması

Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tamponunda ve distile suda 25 mg/50 ml' lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Her iki ortam için stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda bir seri çözelti hazırlanmış ve absorbansları λ_{max}' da okunmuştur. Her bir konsantrasyona (x) karşılık gelen absorbans değerlerinin (y) grafiğinden eğim, kesişim ve r^2 (determinasyon katsayısı) belirlenmiştir. En uygun kalibrasyon doğru denklemleri etkin madde miktar tayininde ve çözünme hızında kullanılmıştır.

2.2.1.3. Etkin Maddenin Analitik Validasyonu

Validasyon çalışmalarında incelenen analitik parametreler doğruluk, kesinlik, seçicilik, teşhis ve tayin alt sınırı, doğrusallık ve aralığı' dır (USP 23, s.:1982).

2.2.1.3.1. Doğruluk

Farklı konsantrasyonlardaki numune çözeltilerinden en az 6 değerin, başlangıçta belirlenen kalibrasyon denklemiyle % geri elde değerleri hesaplanmıştır (Denklem 2.1.). Bu değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapmasının hesaplanmıştır.

Stok çözeltilerden alt sınır, orta sınır ve üst sınır değerleri belirlenmiş ve her bir konsantrasyonun absorbansları 6'şar kere okunmuştur.

$$\%\text{Geri Elde} = C_{pratik} / C_{teorik} * 100 \qquad \textbf{Denklem 2.1.}$$

2.2.1.3.2. Kesinlik

Bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecesinin bir ölçüsüdür.

- Tekrar elde edilebilirlik: Aynı konsantrasyonda altı farklı balonjojeden iki analist tarafından okunan absorbans değerleri karşılaştırılmıştır.

- Tekrarlanabilirlik: İki ayrı günde 6'şar kere okunan absorbans değerleri karşılaştırılmıştır.

2.2.1.3.3 Doğrusallık ve Aralığı

En küçük konsantrasyonun katları halinde 7 nokta alınmış ve absorbansları ölçülerek konsantrasyona karşı absorbans grafiğinde doğrusallık ve aralığı incelenmiştir. Doğrusallık numune içindeki etkin madde miktarının test sonuçları ile orantılı olduğunun belirlenmesidir. Aralığı ise, bu orantının kesinlik, doğruluk ve doğrusallık olarak hangi konsantrasyon arasında devam ettiğinin ve hangi aralıklardan sonra bozulduğunun incelenmesidir.

2.2.1.3.4. Teşhis ve Tayin Alt Sınırları

Alt sınır değeri için aynı balonjojeden 6 kere okunan absorbans değerlerinden hesaplanan konsantrasyonların ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri belirlenmiş ve denklemlere göre teşhis ve tayin alt sınırları hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3{,}3xSS}{m}$$ **Denklem 2.2.**

$$LOQ = \frac{10xSS}{m}$$ **Denklem 2.3.**

LOD :Limit of Detection (Teşhis Sınırı)

LOQ :Limit of Quantitation (Tayin Alt Sınırı)

m :Eğim

SS :Standart Sapma

2.2.1.3.5. Stabilite

pH 7,4 izotonik fosfat tamponu ve distile suda hazırlanmış belirli konsantrasyondaki bir numune bir hafta boyunca oda sıcaklığında ve buzdolabında bekletilmiş ve iki günde bir absorbansları ölçülerek stabilitesi incelenmiştir.

2.2.2. Nanopresipitasyon Yöntemiyle Formülasyon Çalışmaları

2.2.2.1. Levobunolol HCl Tuzundan Levobunolol Baz Elde Edilmesi

1 g. Etkin madde üzerine 2 M NaOH çözeltisi ilave edilmiş ve süzgeç kağıdından süzerek oluşan çökelek alınmıştır. Süzgeç kağıdında toplanan kalıntı distile su ile yıkandıktan sonra etüvde kurutularak incelenmiştir.

2.2.2.2. Nanopresipitasyon Yöntemi ile Partiküllerin Hazırlanması

Bir beherde 0,050 g Levobunolol HCl, 3 ml distile suda çözünmüş ve üzerine kosolvan olarak 10 ml metanol ilave edilmiştir. Üstü parafilmle kapatılmış bir diğer beherde 500 mg PCL ve 500 mg propilen glikol 50 ml diklorometanda veya kloroformda çözülmüştür. Bu çözelti etkin madde çözeltisine ilave edilerek dispersiyon oluşturulmuştur. Oluşan dispersiyon paletli karıştırıcıda 1500 rpm' de damla damla 100 ml etanol (% 70 a/h)' e ilave edilmiştir. Oluşan partiküller mikroskopta incelenmiştir (Peltonen ve ark., 2004). Aynı deney 900 rpm' de magnetik karıştırıcıda ve 8000 rpm' de ultratoraksta karıştırılarak partikül oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir.

Aynı formül kullanılan maddeler 1/10 azaltılarak oluşan dipersiyon 50 rpm' de damlatma hunisinde damla damla 10 ml etanol (%70 a/h) çözeltisine ilave edilmiştir. Çözücünün buharlaştırılması için ayrı ayrı su trompu, rotasyon evaporatörü ve azot gazı ile vakum uygulanmıştır.

2.2.3. Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Formülasyon Çalışmaları

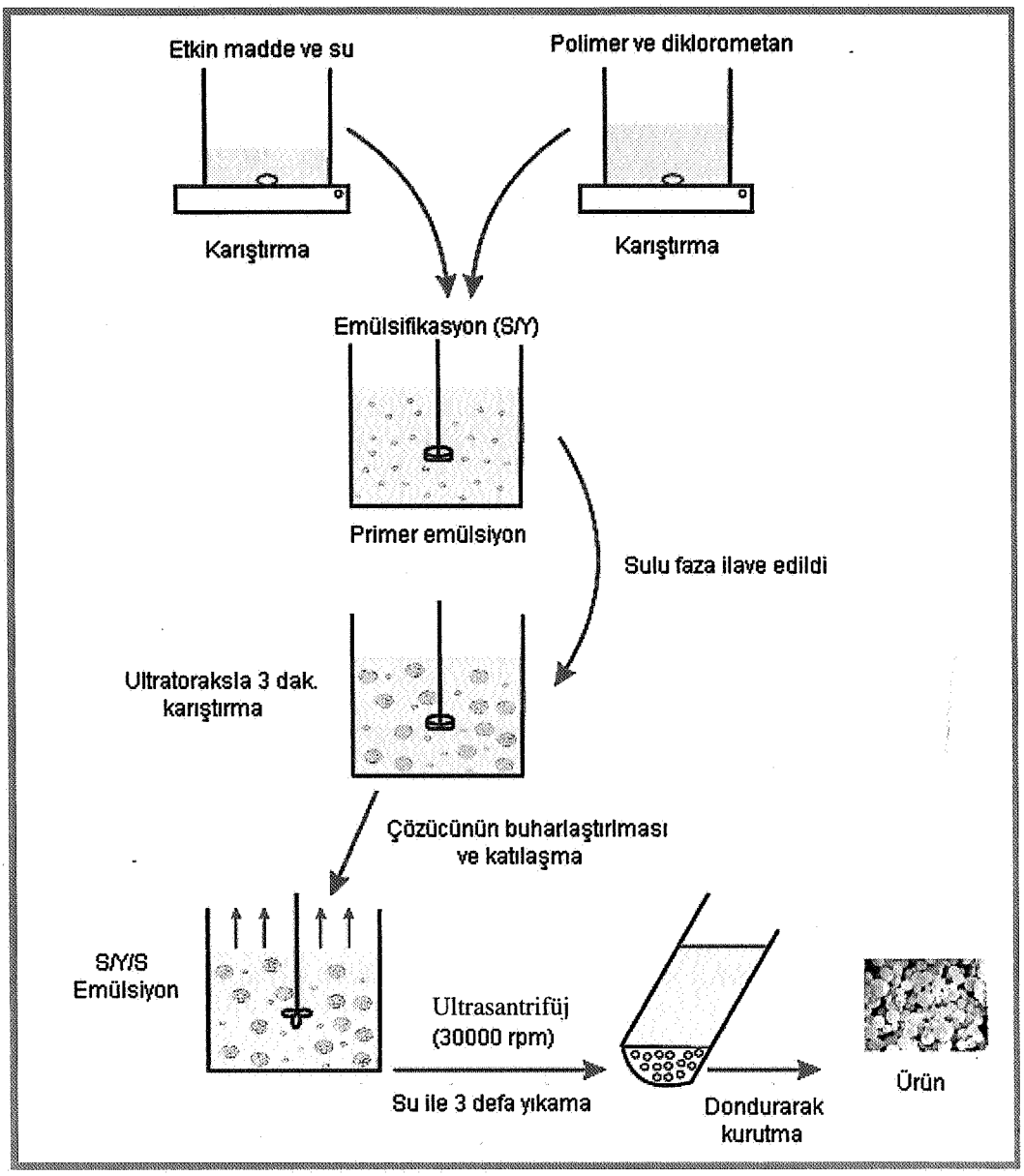
2.2.3.1. Metilen Mavisi Yüklü Partiküllerin Oluşturulması

Mikropartiküller ve nanopartiküller hazırlamak için, suda çözünen maddeler için uygun bir yöntem olan çoklu emülsiyon (s/y/s) çözücü buharlaştırma yöntemi tercih edilmiştir.

Partikül hazırlanması için gerekli formülasyon çalışmalarına geçmeden önce kullanılacak karıştırıcı tipi (magnetik karıştırıcı, sonikatör, pervaneli karıştırıcı veya ultratoraks), karıştırma süresi ve sıcaklığı belirlenmiştir. Bu amaçla iç faza metilen mavisi çözeltisi eklenerek primer emülsiyon ve çoklu emülsiyon oluşumu, çözücü buharlaştırılması ile oluşan partiküllerin şekli ve büyüklüğü, metilen mavisi ile yüklenmiş olup olmadığı ışık mikroskobunda karşılaştırılarak incelenmiştir.

2.2.3.2. Etkin Madde Yüklü Mikropartiküllerin ve Nanopartiküllerin Hazırlanması

Çoklu emülsiyon (s/y/s) çözücü buharlaştırma yöntemi ile partiküller hazırlanmıştır. Belirlenen miktardaki etkin madde 1 ml distile suda çözülerek iç su fazı oluşturulmuştur. 25 ml' lik bir beherde formülasyonda belirtilen miktarda poli-ε-kaprolakton üzerine 10 ml diklorometan ilave edilerek üstü parafilmle kapatılmış ve magnetik karıştırıcıda karıştırılarak yağ fazı hazırlanmıştır. 300 ml' lik beherde değişen formülasyonlarda belirlenen konsantrasyonlarda PVA 200 ml. distile suda çözülerek dış su fazı hazırlanmıştır (Ubrich ve ark., 2004). Levobunolol HCl çözeltisi, polimer çözeltisine ilave edilerek ultratoraksta 8000, 9500 veya 13500 rpm'de karıştırılmıştır. Oluşan S/Y emülsiyon 200, 100, 50 ml PVA çözeltisine ilave edilerek ultratoraksta 3 dak karıştırılmıştır. Oluşan s/y/s çoklu emülsiyonu 3 pervaneli paletli karıştırıcıda 25° C' de 1500 rpm' de karıştırılarak çözücü buharlaşması sağlanmıştır. Emülsiyon 30000 rpm'de (56000xg) santrifüj edilmiştir (Şekil 2.1). Partiküller üçer kere, distile suyla yıkanarak santrifüj edilmiştir. Elde edilen sulu dispersiyonlar liyofilize edilerek toz halindeki formülasyonlar (ürün) oda sıcaklığında desikatörde saklanmıştır.



Şekil 2.1. Etkin madde yüklü mikropartiküllerin ve nanopartiküllerin hazırlanması

Hazırlanan tüm formüller Tablo 2.1-2.8' de verilmiştir

Tablo 2.1. Dış faz pH'ı 5.5 (F1) ve 12 (F2) olan formüllerde % PVA miktarlarının değişimi

Formülasyon İçeriği	**F1A**	**F1B**	**F1C**	**F2A**	**F2B**	**F2C**	**F2D**
Etkin Madde (mg)	10	10	10	10	10	10	10
İç Faz Distile Su (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Diklorometan (ml)	10	10	10	10	10	10	10
PCL (mg)	250	250	250	250	250	250	250
Dış Faz Distile Su (ml)	200	200	200	200	200	200	200
PVA (g)	0.5	1	2	0.5	1	2	3
Formülasyon Bilgisi							
% PVA (a/h)	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	1.5
Et Mad./Polimer	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25
Dış Faz pH	5.5	5.5	5.5	12	12	12	12
Karıştırma Hızı(rpm)	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000

F1A, F1B, F1C 8000 rpm' de pH 5,5' te PVA değişimini (%0,25, %0,5, %1) simgelemektedir. F2A, F2B, F2C, F2D 8000 rpm' de pH 12' de PVA konsantrasyonundaki değişimi (%0,25, %0,5, %1, %1,5) göstermektedir.

Tablo 2.2. Polimer miktarı artışı (F3) ve karıştırma hızı artışının (F4) incelenmesi

Formülasyon İçeriği	**F2C**	**F3**	**F4**
Etkin Madde (mg)	10	10	10
İç Faz Distile Su (ml)	1	1	1
Diklorometan (ml)	10	10	10
PCL (mg)	250	500	500
Dış Faz Distile Su (ml)	200	200	200
PVA (g)	2	2	2
Formülasyon Bilgisi			
% PVA (a/h)	1	1	1
Et Mad./Polimer	1/25	1/50	1/50
Dış Faz pH	12	12	12
Karıştırma Hızı (rpm)	8000	8000	9500

F3 ve F4 8000 ve 9500 rpm' de polimer miktarındaki artışı (250 mg' dan 500 mg' a) göstermektedir.

Tablo 2.3. 8000 rpm karıştırma hızı ile farklı etkin madde miktarları ile hazırlanan formüller (F5)

Formülasyon İçeriği	**F2B**	**F5A**	**F5B**	**F5C**
Etkin Madde (mg)	10	20	40	60
İç Faz Distile Su (ml)	1	1	1	1
Diklorometan (ml)	10	10	10	10
PCL (mg)	250	250	250	250
Dış Faz Distile su (ml)	200	200	200	200
PVA (g)	1	1	1	1
Formülasyon Bilgisi				
% PVA (a/h)	0.5	0.5	0.5	0.5
Et Mad./Polimer	1/25	1/12.5	1/6.25	¼.16
Dış Faz pH	12	12	12	12
Karıştırma Hızı (rpm)	8000	8000	8000	8000

F2B, F5A, F5B, F5C 8000 rpm'de etkin madde (10 mg, 20 mg, 40mg, 60mg) veya etkin madde/ polimer oranındaki artışı (1:25, 1:12,5, 1:6,25, 1:4,16) simgelemektedir.

Tablo 2.4. 9500 rpm karıştırma hızı ile farklı etkin madde miktarları ile hazırlanan formüller (F6)

Formülasyon İçeriği	**F6A**	**F6B**	**F6C**	**F6D**
Etkin Madde (mg)	10	20	40	60
İç Faz Distile Su (ml)	1	1	1	1
Diklorometan (ml)	10	10	10	10
PCL (mg)	250	250	250	250
Dış Faz Distile Su (ml)	200	200	200	200
PVA (g)	1	1	1	1
Formülasyon Bilgisi				
% PVA (a/h)	0.5	0.5	0.5	0.5
Et Mad./Polimer	1/25	1/12.5	1/6.25	1/4.16
Dış Faz pH	12	12	12	12
Karıştırma Hızı (rpm)	9500	9500	9500	9500

F6A, F6B, F6C, F6D 9500 rpm'de etkin madde (10 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg) veya etkin madde/polimer miktarındaki artışı (1:25, 1:12,5, 1:6,25, 1:4,16) belirtmektedir.

Tablo 2.5. 13500 rpm karıştırma hızı ile farklı etkin madde miktarları ile hazırlanan formüller (F7)

Formülasyon İçeriği	**F7A**	**F7B**	**F7C**	**F7D**
Etkin Madde (mg)	10	20	40	60
İç Faz Distile Su (ml)	1	1	1	1
Diklorometan (ml)	10	10	10	10
PCL (mg)	250	250	250	250
Dış Faz Distile su (ml)	200	200	200	200
PVA (g)	1	1	1	1
Formülasyon Bilgisi				
% PVA (a/h)	0.5	0.5	0.5	0.5
Et Mad./Polimer	1/25	1/12.5	1/6.25	1/4.16
Dış Faz pH	12	12	12	12
Karıştırma Hızı (rpm)	13500	13500	13500	13500

F7A, F7B, F7C, F7D 13500 rpm' de etkin madde (10 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg) veya etkin madde/polimer miktarındaki artışı (1:25, 1:12,5, 1:6,25, 1:4,16) belirtmektedir.

Tablo 2.6. Farklı dış faz hacmi ile hazırlanan formüller

Formülasyon İçeriği	**F2B**	**F8A**	**F8B**	**F8C**	**F8D**
Etkin Madde (mg)	10	10	10	40	60
İç Faz Distile Su (ml)	1	1	1	1	1
Diklorometan (ml)	10	10	10	10	10
PCL (mg)	250	250	250	250	250
Dış Faz Distile su (ml)	200	100	50	100	100
PVA (g)	1	0.5	0.25	0.5	0.5
Formülasyon Bilgisi					
% PVA (a/h)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Et Mad./Polimer	1/25	1/25	1/25	1/6,25	1/4,16
Dış Faz pH	12	12	12	12	12
Karıştırma Hızı (rpm)	8000	8000	8000	8000	8000

F2B, F8A, F8B 8000 rpm' de 10 mg etkin madde için dış faz hacmindeki değişimi (200 ml, 100 ml, 50 ml) simgelemektedir.

F2B, F8C, F8D 8000 rpm' de 100 ml dış faz hacminde etkin madde (10 mg, 40mg, 60 mg) veya etkin madde/ polimer oranındaki artışı (1:25, 1:6,25, 1:4,16) simgelemektedir.

Tablo 2.7. Pluronik F68'in stabilizör olarak kullanıldığı formüller (F9)

Formülasyon İçeriği	**F9A**	**F9B**	**F9C**	**F9D**	**F9E**	**F9F**	**F9G**
Etkin Madde (mg)	60	60	60	60	60	10	10
İç Faz Distile Su (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Diklorometan (ml)	10	10	10	10	10	10	10
PCL (mg)	250	250	250	250	250	250	250
Dış Faz Distile su (ml)	200	200	200	200	200	200	200
Pluronik F68 (g)	0,5	1	1	2	3	1	2
Formülasyon Bilgisi							
% Pluronik F68 (a/h)	0.25	0.5	0.5	1	1.5	0.5	1
Et Mad./Polimer	1/4.16	1/ 4.16	1/4.16	1/4.16	1/4.16	1/25	1/25
Dış Faz pH	12	12	12	12	12	12	12
Karıştırma Hızı (rpm)	13500	13500	8000	8000	8000	8000	8000

F9A, F9B, F9C, F9D, F9E, F9F, F9G dış fazda % pluronik F68 değişimini (%0,25, %0,5, %1, %1,5) simgelemektedir.

Tablo 2.8. İç fazda Pluronik F68 dış fazda PVA kullanılarak hazırlanan formüller (F10)

Formülasyon İçeriği	**F10A**	**F10B**	**F10C**
Etkin Madde (mg)	10	60	60
İç Faz Distile Su (ml)	1	1	1
İç Faz stabilizatörü Pluronik F68 (mg)	60	60	30
Diklorometan (ml)	10	10	10
PCL (mg)	250	250	250
Dış Faz Distile su (ml)	200	200	200
PVA (g)	1	1	1
Formülasyon Bilgisi			
% PVA (a/h)	0.5	0.5	0.5
Et Mad./Polimer	1/25	1/ 4.16	1/ 4.16
Dış Faz pH	12	12	12
Karıştırma Hızı (rpm)	8000	13500	13500

F10A, F10B, F10C iç faz stabilizörü olarak % pluronik F68' in eklenmesini belirtmektedir.

2.3. Hazırlanan Formüllerde Yapılan Kontroller

2.3.1. Etkin Madde Miktar Tayini

Etkin madde miktar tayini santrifüj işleminden sonra sulu faza geçen etkin madde miktarının spektofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir (Pérez ve ark, 2000). Partiküllerin distile su ile yıkama işlemi sonrasında üstteki sıvılar da toplanarak spektrofotometrede absorbansı ölçülmüştür.

Yüklenen etkin = Toplam etkin madde (mg)- Dış faza geçen madde miktarı (mg)
madde (mg)

Denklem 2.4.

% İşlem etkinliği, etkin madde içeriği ve verim aşağıda belirtilen denklemlere göre hesaplanmıştır (Govender ve ark, 1999):

% İşlem Etkinliği = Partikül içindeki etkin madde miktarı (mg) x100/
Formülasyonda kullanılan etkin madde miktarı (mg)

Denklem 2.5.

% Etkin madde İçeriği = Partikül içindeki etkin madde miktarı (mg) x100/
Tartılan partikül miktarı (mg)

Denklem 2.6.

% Verim = Tartılan partikül miktarı(mg) x100/
Toplam miktar (mg)(polimer ve etkin madde.)

Denklem 2.7.

2.3.2. Partiküllerin Yüzey Morfolojisi ve Karakteristiklerinin İncelenmesi

Hazırlanan partiküllerin yüzey morfolojisi ve karakteristiklerini incelemek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmaktadır. Mikropartiküller taşıyıcı (set up) üzerine sıvı karbon ile yapıştırılmıştır. Polaron E 5100 seri II kaplama cihazında 'sputter' yöntemi ile yüzeyi 0,015 mikron (200A°)

kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Mikropartiküller 20 kV'da (hızlandırıcı gerilim) incelenmiştir.

2.3.3. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Oluşan partiküllerin büyüklüğü ve dağılımı Bölüm 1.11.2' de verilen statik ışık kırınımı yöntemiyle (Malvern Mastersizer Hydro 2000S, Malvern Inst.) belirlenmiştir. 5 ml distile su içerisinde süspande edilmiş örnekler üçer kere ölçülmüştür.

2.3.4. Zeta Potansiyellerinin Belirlenmesi

Zeta potansiyeli, süspansiyonların stabilitesi açısından önemlidir. Monodispers bir sistem için zeta potansiyelinin yeterli olması gerekir. Bu kritik değer her süspansiyon için özeldir (Gönül, 2000, Bölüm 4). Bu değerin nanopartikül süspansiyonu için 30 mV (pozitif veya negatif değerlerde) olduğu belirtilmiştir (Couvreur ve ark., 2002).

Çalışmamızda zeta potansiyelleri, Zetasizer Nano ZS (Malvern) ile ölçülmüştür. Bu cihazla hem zeta potansiyeli (3 nm' den 10μm' ye) hem de partikül büyüklüğü (0,6 nm' den 6μm' ye) ölçülebilmektedir. 25 °C' de pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisindeki partiküller tek kullanımlık zeta hücrelerine doldurulmuştur. Üçer kere ölçülen zeta değerlerinin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması belirlenmiştir.

2.3.5. Termal Analizlerinin Belirlenmesi

İşlem etkinliği yüksek bir formül olan F8A' nın, etkin maddenin, polimerin, surfaktanın, F8A formülündeki oranla hazırlanmış olan etkin madde-polimer fiziksel karışımının Shimadzu DSC 60 cihazı ile termal analizleri yapılmıştır. 5'er mg numüne alimino pan içinde tartılıp Universal Holder ile kapatılmıştır.

25° C ortam sıcaklığından 5° C/ dak artışlarla 300° C' ye kadar, akışı 30 ml/ dak olan azot atmosferinde çalışılmıştır (Peréz ve ark., 2000; Chawla ve Amiji, 2002).

2.3.6. Çözünme Hızı Deneyleri

- Doz Hesabı

Uzun süreli çalışmalarda primer açık açılı glokomda veya oküler hipertansiyonda göz içi basıncının kontrolü için gereken en düşük levobunolol konsantrasyonunun % 0,25 olduğu belirlenmiştir (Long ve ark., 1985). Bir damlanın hacmi 70-100µl' dir. 100 µl içindeki etkin madde miktarı 0,25mg olarak bulunmuştur.

Levobunolol HCl' in %0,5' lik göz damlası şeklindeki oftalmik preparatı Betagan®, glokom tedavisinde günde iki defa birer damla olarak kullanılmaktadır.

Levobunolol HCl' in ilaç taşıyıcı partiküler sistemler içindeki dozu 0,25 mg olarak hesaplanmıştır. Etkin madde çıkışı altı saat için tasarlanmıştır.

- Diyaliz Yöntemi

Etkin maddenin in vitro çözünme hızı, diyaliz yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Washington, 1989; Levy ve Benita, 1990).

35° C termostatlı su banyosunda, pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. 0,25 mg Levobunolol HCl içeren PCL partiküllerinin miktarı hesaplanarak tartılmıştır. 2 cm eninde olan diyaliz kesenin içine tartılan partiküller ve 100 µl pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Diyaliz kese iyice bağlandıktan sonra 35° C' deki 10 ml pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisine daldırılmıştır. Diyaliz kese belirli zaman aralıklarında (15, 30, 60, 120, 180, 240, 360) her seferinde 10 ml 35° C' deki taze çözeltiye aktarılarak deneye devam edilmiştir. Çözünme ortamlarındaki etkin madde

miktarı spektrofotometrik olarak 314,5 nm' de tayin edilmiş ve etkin madde çıkışı kümülatif olarak incelenmiştir.

2.4. Partiküllerin Isıya Duyarlı Polimerik Jel İçerisinde Formüle Edilmesi

Pluronik F127 (PF127)' nin oda sıcaklığında sıvı, 35 °C' de jel oluşturması için gereken en düşük konsantrasyonu belirlemek için %5, %10, %15 ve %20 konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin viskozluğu hem oda sıcaklığında hem de 35 °C' de rotasyon viskozimetresinde (Brookfield) LV1 nolu spindle kullanılarak ölçülmüş ve en uygun konsantrasyon belirlenmiştir.

İşlem etkinliği, yüzey özellikleri, çözünme hızı, partikül büyüklüğü ve dağılımı açısından en uygun formül 100 µl PF127 jel içerisine süspande edilerek bölüm. 2.3.6.' da belirtildiği gibi diyaliz bag diffüzyon yöntemiyle çözünme hızı incelenmiştir.

2.5. Levobunolol HCl içeren Ticari Göz Damlası Betagan®' ın Çözünme Hızı

% 0,5 Levobunolol HCl içeren Betagan®' ın içinde 0,25 mg etkin madde içeren miktarı (50µl) pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisi ile 100 µl' ye seyreltilmiş ve Bölüm 2.3.6' da belirtildiği gibi diyaliz bag difüzyon yöntemi ile çözünme hızı incelenmiştir.

3. BULGULAR

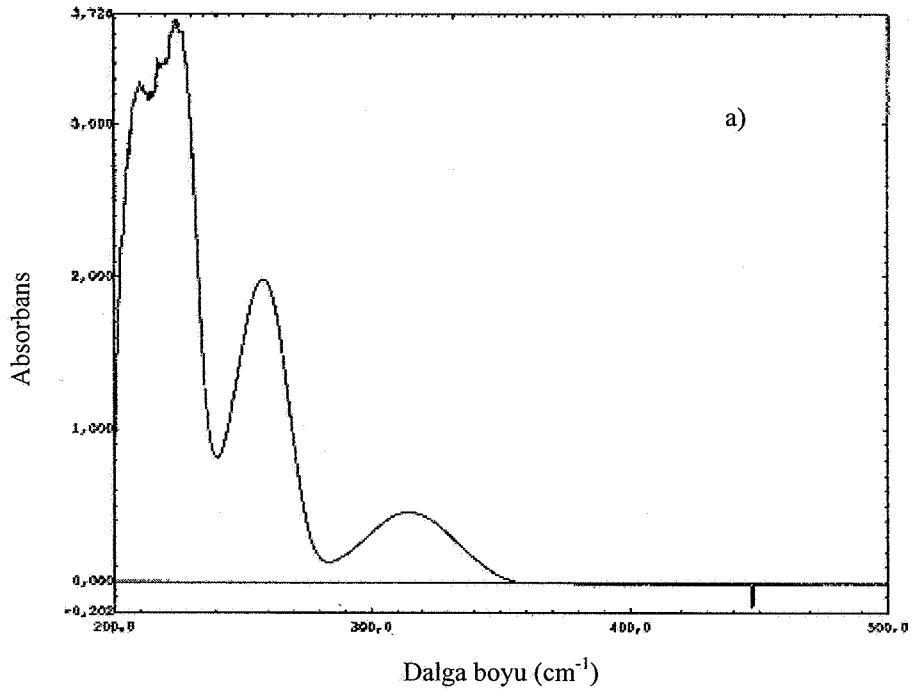
3.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerine İlişkin Bulgular

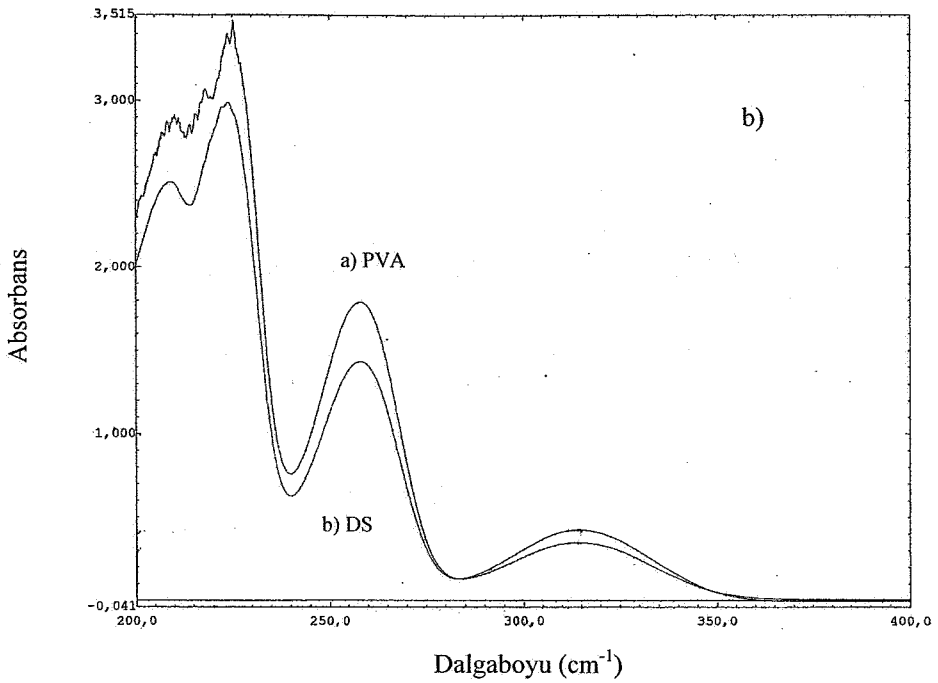
3.1.1. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Analizi

Etkin maddenin Bölüm 2.2.1.1.' de belirtilen şekilde pH 7,4 izotonik fosfat çözeltisinde, distile suda ve PVA içeren distile suda maksimum pik veren dalga boyları (λ_{max}) Tablo 3.1.' de; alınan spektrum grafikleri ise Şekil 3.1.' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Levobunolol HCl' in değişik ortamlarda maksimum absorbans verdiği dalga boyları

Ortam	pH 7,4	Distile su
λ_{max} (nm)	314,5	314

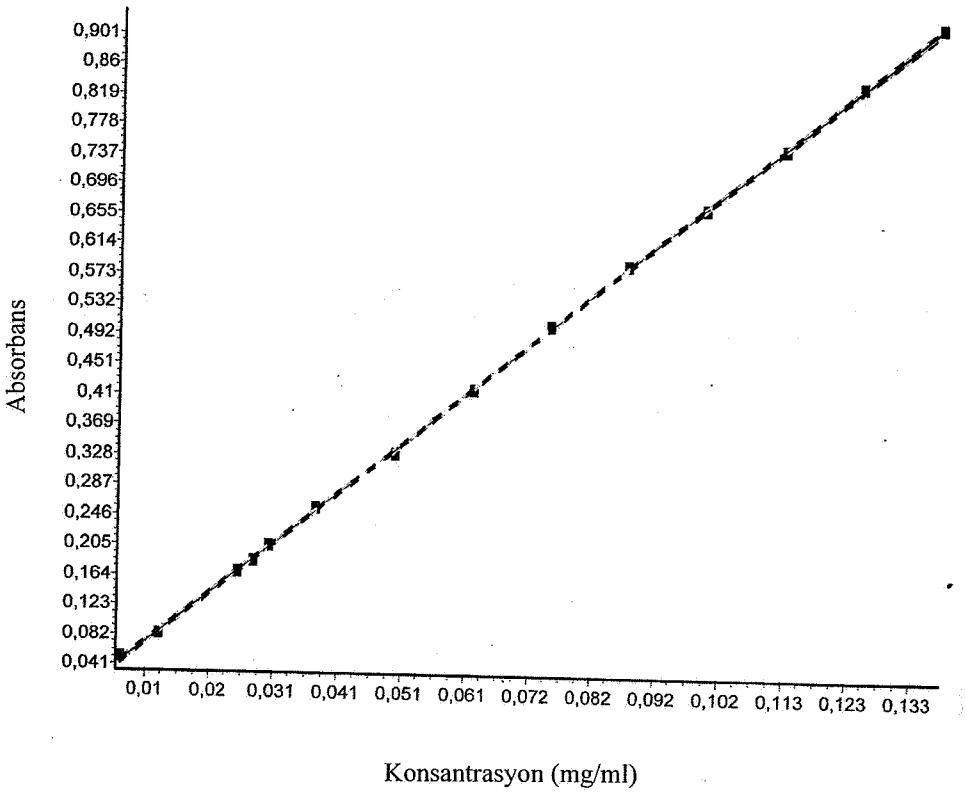




Şekil 3.1. Levobunolol HCl' in a) pH 7,4 izotonik fosfat çözeltisinde ve b) Distile su ile PVA çözeltisindeki UV spektrumları

3.1.2. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntem ile Kalibrasyonu

Etkin maddenin Bölüm 2.2.1.2.' de anlatıldığı gibi alınan ölçümlerden sonra elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 3.2.'de ve Şekil 3.3.' de kalibrasyon doğrularından belirlenen parametreler ise Tablo 3.2.' de ve Tablo 3.3.' de verilmiştir.



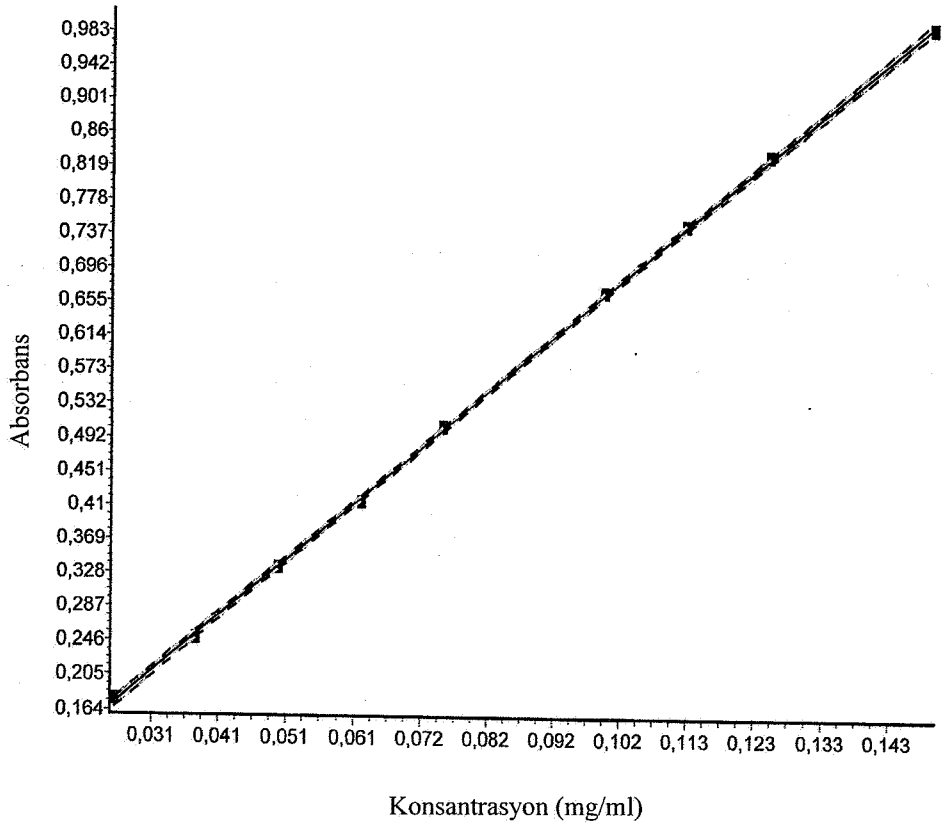
Şekil 3.2. Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde kalibrasyon doğrusu

Tablo 3.2. Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde kalibrasyon doğrusuna ait veriler

Eğim (m) Standart hata % 95 Olasılıklı Güven Sınırları	6,682 ± 0,047 0,02156 (6,635)-(6,729)
Kesişim (n) Standart Hata % 95 Olasılıklı Güven Sınırları	0,002660 ± 0,003568 0,001638 (-0,0009094)-(0,006228)
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9999
(Sy.x)*	0,003364

* Regresyon doğrusundan olan sapmalara ait standart sapma

$Y= 6,682X+ 2,66.10^{-3}$ **Denklem 3.1.**



Şekil 3.3. Levobunolol HCl' in distile sudaki kalibrasyon doğrusu

Tablo 3.3. Levobunolol HCl' in distile suda kalibrasyon doğrusuna ait veriler

Eğim (m) Standart hata % 95 Olasılıklı Güven Sınırları	6,625 ± 0,076 0,03235 (6,548)-(6,701)
Kesişim (n) Standart Hata % 95 Olasılıklı Güven Sınırları	0,006359 ± 0,006981 0,002950 (-0,0006174)-(0,01334)
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9998
(Sy.x)*	0,003883

* Regresyon doğrusundan olan sapmalara ait standart sapma

Y=6,625X+0,006359 **Denklem 3.2.**

3.1.3. Etkin Maddenin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular

3.1.3.1. Doğruluk

Farklı konsantrasyonlardaki numune çözeltilerinden en az 6 değerin, başlangıçta belirlenen kalibrasyon denklemiyle Denklem 2.1.' de belirtildiği şekilde % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması Tablo 3.4.-3.7' verilmiştir.

Tablo 3.4. pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde doğruluk tespitine ait veriler

C_{Teorik} (mg/ml)	C_{pratik}(mg/ml)	% Geri Elde
0,0125	0,0126	100,9
0,0125	0,0125	100,0
0,0125	0,0127	102,2
0,0125	0,0126	100,9
0,0125	0,0126	100,9
0,0125	0,0127	102,2
0,0625	0,0632	101.1
0,0625	0,0623	99,68
0,0625	0,0626	100,2
0,0625	0,0624	99,92
0,0625	0,0626	100,2
0,0625	0,0623	99,68
0,1375	0,1376	100,0
0,1375	0,1376	100,0
0,1375	0,1379	100,2
0,1375	0,1379	100,2
0,1375	0,1376	100,0
0,1375	0,1379	100,2

Tablo 3.5. pH 7.4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde doğruluk tespitine ait hesaplamalar

C_{teorik} (mg/ml)	Ortalama % Geri Elde	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma %
0,0125	101,18	0,8089	0,7994
0,0625	100,13	0,5291	0,5284
0,1375	100,16	0,1205	0,1203

Tablo 3.6. Distile suda doğruluk tespitine ait veriler

C_{Teorik} (mg/ml)	C_{pratik}(mg/ml)	% Geri Elde
0,0375	0,0369	98,47
0,0375	0,0372	99,27
0,0375	0,0373	99,67
0,0375	0,0369	98,47
0,0375	0,0372	99,27
0,0375	0,0370	98,87
0,0750	0,0749	99,95
0,0750	0,0755	100,7
0,0750	0,0752	100,3
0,0750	0,0754	100,5
0,0750	0,0757	100,9
0,0750	0,0763	101,7
0,1250	0,1256	100,5
0,1250	0,1255	100,4
0,1250	0,1253	100,3
0,1250	0,1256	100,5
0,1250	0,1265	101,2
0,1250	0,1253	100,3

Tablo 3.7. Distile suda doğruluk tespitine ait hesaplamalar

C_{teorik} (mg/ml)	Ortalama % geri elde	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma %
0,0375	99,01	0,4874	0,4923
0,0750	100,7	0,6159	0,6115
0,1250	100,5	0,3615	0,3595

Bağıl standart sapma değerleri hem pH 7,4' te hem de distile suda % 2' nin altındadır.

3.1.3.2. Kesinlik

Tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri incelenmiştir. İki farklı analist tarafından yapılan tekrar elde edilebilirlik parametresine ait deneylerde yer alan her iki gruba ortalamalar arası farkın önem testi uygulanmıştır.

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Tablo 3.8. pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde tekrar elde edilebilirlik deneyine ait veriler

C(mg/ml) Teorik	C (mg/ml) 1.Analist	C (mg/ml) 2.Analist
0,00125	0,0130	0,0128
0,00125	0,0126	0,0130
0,00125	0,0129	0,0134
0,00125	0,0132	0,0130
0,00125	0,0130	0,0128
0,00125	0,0130	0,0130

Tablo 3.9. pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde tekrar elde edilebilirlik deneyine ait hesaplamalar

pH 7,4 (314,5 nm)	Ortalama C (mg/ml)	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma %
1.Analist	0,0129	$1,94.10^{-4}$	1,524
2.Analist	0,0130	$2,19.10^{-4}$	1,685

P= 0,687 P>0,05 olduğundan önemli derecede fark yoktur.

Tablo 3.10. Distile suda tekrar elde edilebilirlik deneyine ait veriler

C (mg/ml) Teorik	C (mg/ml) 1.Analist	C (mg/ml) 2.Analist
0,075	0,0745	0,0740
0,075	0,0743	0,0740
0,075	0,0766	0,0763
0,075	0,0761	0,0746
0,075	0,0745	0,0740
0,075	0,0754	0,0748

Tablo 3.11. Distile suda tekrar elde edilebilirlik deneyine ait hesaplamalar

Distile su (314 nm)	Ortalama C(mg/ml)	Standart sapma	Bağıl Standart Sapma %
1. Analist	0,0752	$9,58.10^{-4}$	1,273
2. Analist	0,0746	$8,95.10^{-4}$	1,199

P=0,271 P >0,05 olduğundan önemli derecede fark yoktur.

- **Tekrarlanabilirlik**

Tablo 3.12. pH 7.4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde tekrarlanabilirlik deney sonuçları

C (mg/ml) Teorik	C (mg/ml) 1.Gün	C (mg/ml) 2.Gün
0,0125	0,0126	0,0120
0,0125	0,0125	0,0126
0,0125	0,0127	0,0130
0,0125	0,0126	0,0127
0,0125	0,0126	0,0133
0,0125	0,0127	0,0130

Tablo 3.13. pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde tekrarlanabilirlik deneyine ait hesaplamalar

pH 7,4 (314,5nm)	Ortalama C (mg/ml)	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma %
1.Gün	0,0126	$7{,}25.10^{-5}$	0,5966
2.Gün	0,0127	$4{,}50.10^{-4}$	3,526

Bağıl standart sapması % 5' den küçüktür.

Tablo 3.14. Distile suda tekrarlanabilirlik deney sonuçları

C (mg/ml) Teorik	C (mg/ml) 1. Gün	C (mg/ml) 2. Gün
0,075	0,0745	0,0739
0,075	0,0743	0,0742
0,075	0,0766	0,0778
0,075	0,0761	0,0745
0,075	0,0745	0,0766
0,075	0,0754	0,0758

Tablo 3.15. Distile suda tekrarlanabilirlik deneyine ait hesaplamalar

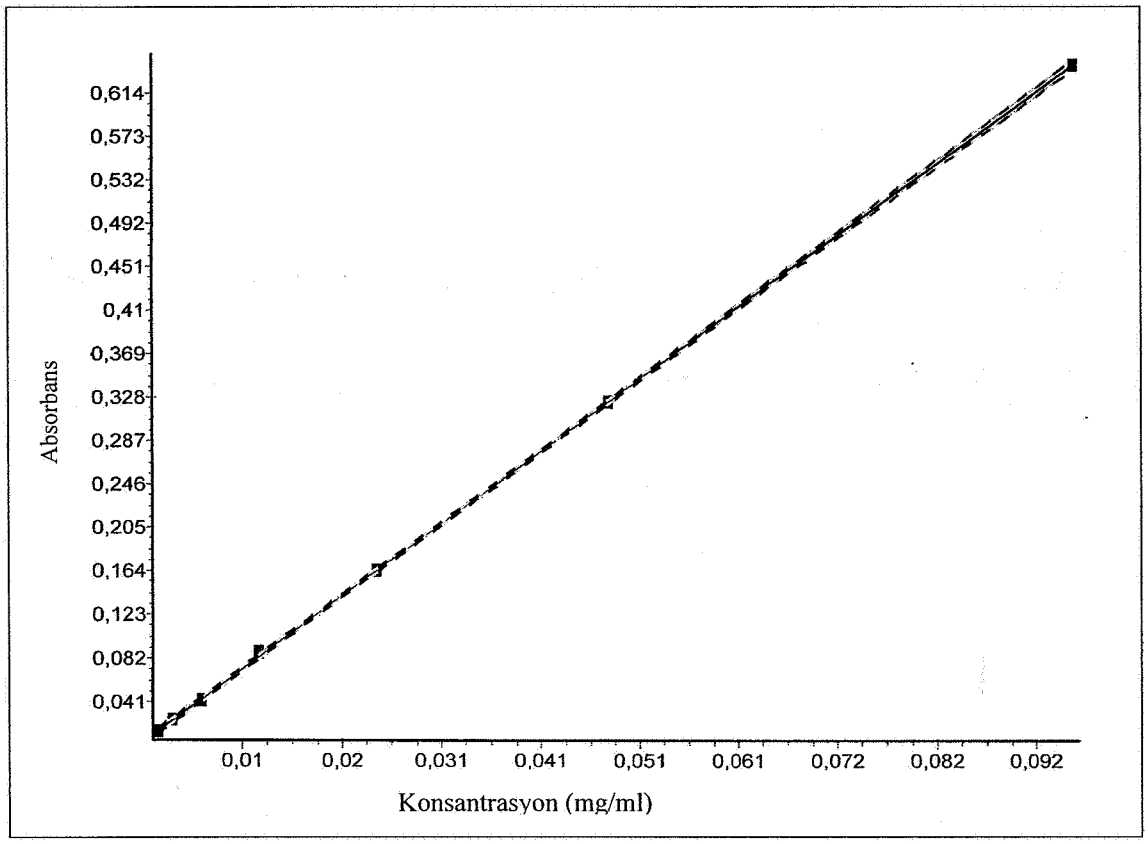
Distile su (314nm)	Ortalama C (mg/ml)	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma
1.Gün	0,0752	$9,58.10^{-4}$	1,274
2.Gün	0,0754	$1,53.10^{-3}$	2,03

Bağıl standart sapması % 5' den küçüktür.

3.1.3.3. Doğrusallık ve Aralığı

Her bir ortam için etkin maddenin okunabileceği en küçük konsantrasyonunun katları halinde 7 nokta alınmıştır. Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde ve distile suda hazırlanan 0,5 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltilerinden; birbirinin katları halinde seçilen noktalara seyreltmeler yapılarak her bir ortam için bir seri farklı konsantrasyonda çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerin absorbansları λ_{max}' da ölçülerek konsantrasyona karşı absorbans grafiğinde doğrusallık ve aralığı incelenmiştir.

pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisine ait doğrusallık ve aralığı grafiği şekil 3.3' de, distile suya ait doğrusallık ve aralığı grafiği şekil 3.4.' te verilmiştir.

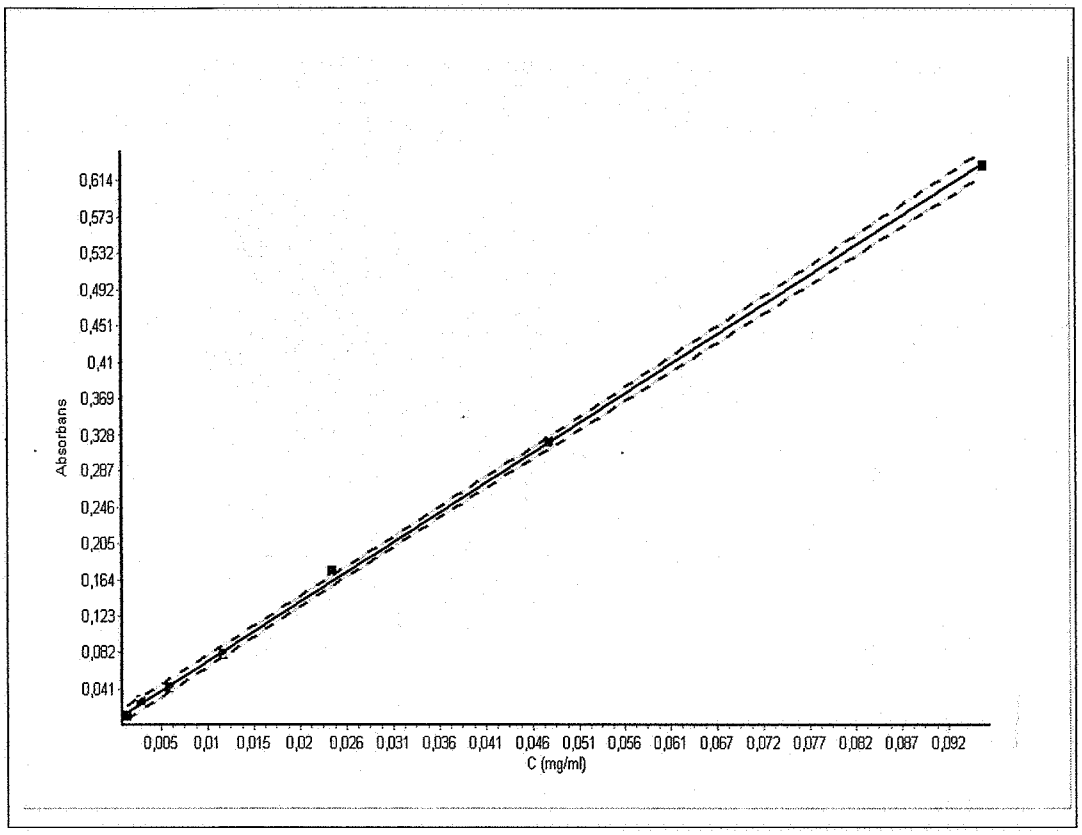


Şekil 3.4. pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinin doğrusallık ve aralığı doğrusu.

Tablo 3.16. Levobunolol HCl' in pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde doğrusallık ve aralığı doğrusuna ait veriler

Eğim (m) Standart hata % 95 Olasılıklı Güven Sınırları	6,674 ± 0,057 0,02206 (6,618)-(6,731)
Kesişim (n) Standart Hata % 95 Olasılıklı Güven Sınırları	0,003218 ± 0,002377 0,0009244 (0,0008416)-(0,005595)
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9999
(Sy.x)	0,001860

* Regresyon doğrusundan olan sapmalara ait standart sapma



Şekil 3.5. Levobunolol HCl' in distile suda doğrusallık ve aralığı doğrusu

Tablo 3.17. Levobunolol HCl' in distile suda doğrusallık ve aralığı doğrusuna ait veriler

Eğim (m) Standart hata % 95 Olasılıklı Güven Sınırları	6,540 ± 0,183 0,07143 (6,356)-(6,723)
Kesişim (n) Standart Hata % 95 Olasılıklı Güven Sınırları	0,005460 ± 0,00769 0,002993 (-0,002234)-(0,01315)
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9994
(Sy.x)	0,006020

* Regresyon doğrusundan olan sapmalara ait standart sapma

3.1.3.4. Teşhis ve Tayin Alt Sınırları

Bölüm 2.2.1.3.4.' te belirtildiği gibi yapılan deneylerin sonuçları Tablo 3.18' de verilmiştir.

Tablo 3.18. Teşhis ve tayin alt sınırlarının hesaplanması

Tayin ve teşhis alt sınırları	pH 7,4	Distile su
LOD (mg)	$3{,}718.10^{-5}$	$9{,}106.10^{-5}$
LOQ (mg)	$1{,}127.10^{-4}$	$2{,}759.10^{-4}$

3.1.3.5. Stabilite

Bir hafta boyunca hem buzdolabında (4 °C) hem de oda sıcaklığında (25 °C) bekletilen numunelerin iki günde bir aborbansları ölçülmüş ve her iki ortamda da levobunolol HCl'in stabil olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.19. Bir hafta boyunca buzdolabında (4 °C) ve oda sıcaklığında (25 °C) bekletilen bir numuneden iki günde bir alınan ölçümlerin sonuçları

	pH 7,4		Distile su	
t	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
Gün	C (mg/ml)	C (mg/ml)	C (mg/ml)	C (mg/ml)
1	0,0654	0,0638	0,0633	0,0624
3	0,0644	0,0648	0,0637	0,0627
5	0,0642	0,0665	0,0639	0,0634
7	0,0666	0,0681	0,0645	0,0622

3.2. Formülasyonların Hazırlanmasına Ait Bulgular

- **Levobunolol HCl Tuzundan Baz Elde Edilmesi**

Bölüm 2.2.2.1.' de belirtildiği şekilde hazırlanan levobunolol bazının katı toz halinde oluşmaması nedeniyle elde edilememiştir. Bu nedenle tüm formülasyon çalışmaları HCl tuzu ile gerçekleştirilmiştir.

- **Nanopresipitasyon Yöntemiyle Partiküllerin Hazırlanması**

Etkin maddenin bazı elde edilemediği için formülasyon çalışmalarına tuz formu ile devam edilmiştir.

Bölüm 2.2.2.2' de anlatıldığı şekilde hazırlanan formülasyonlarda partikül oluşumu mikroskopta gözlenmiştir; ancak dispers çözeltinin damla damla ilave edilmesi esnasında oluşan partiküller kısa sürede agregatlar oluşturmuştur.

Çözücüyü ortamdan uzaklaştırmak için su trompu, rotasyon evaporatörü ve azot gazı uygulanarak hazırlanan formülasyonlarda da çözücünün buharlaşması süresince, oluşan partiküllerin birleşerek agregatlar oluşturduğu gözlenmiştir.

3.3. Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Formülasyon Çalışmaları

3.3.1. Metilen Mavisi Yüklü Partiküllerin Oluşturulmasına Ait Bulgular

Çoklu emülsiyon oluşturulması için magnetik karıştırıcı, ultrasonik banyo, pervaneli karıştırıcı ve ultratoraks kullanılmıştır. Magnetik karıştırıcı (900 rpm) ve pervaneli karıştırıcı (1500 rpm) ile hazırlanan formüller mikroskopta incelenmiş ve 250μm büyüklüğünde metilen mavisi yüklü mikropartiküllerin oluştuğu belirlenmiştir. Ultrasonik banyo ile çoklu emülsiyon oluşmamıştır. Partikül büyüklüğünü azaltmak için ultratoraks kullanılmış ve formülasyon mikroskopta incelendiğinde oldukça küçük partiküller oluşturulduğu belirlenmiştir. Dış fazın pH'sı arttırıldığında da metilen mavisi yüklü partiküller mikroskopta gözlenmiştir.

3.4. Hazırlanan Formüllerde Yapılan Kontroller

3.4.1. Formülasyonların Etkin Madde Miktar Tayinine Ait Bulgular

Bölüm 2.3.1.' de belirtildiği gibi hesaplanan % etkin madde içeriği, % verim ve % işlem etkinliği değerleri Tablo 3.20' de verilmiştir.

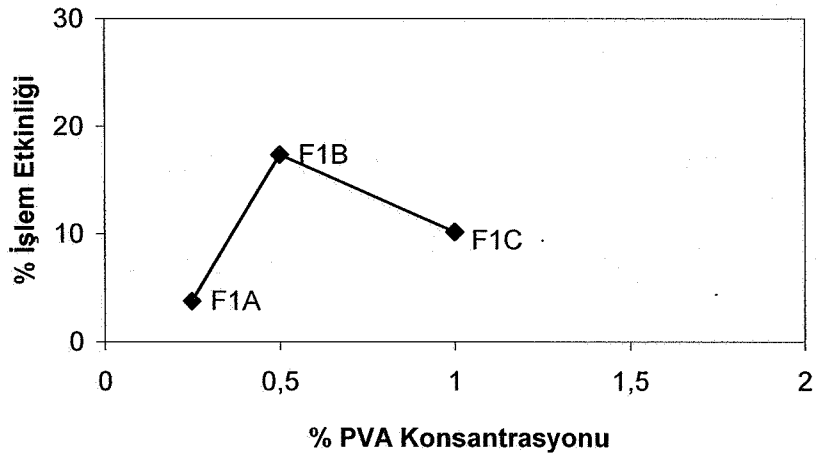
Tablo 3.20. Formülasyonların Miktar Tayinine Ait Bulgular

Formül	Toplam Partikül (mg)	Etkin Madde (mg)	% Etkin Madde İçeriği	% Verim	% İşlem Etkinliği
F1A	102,6	0,405	0,394	39,46	3,780
F1B	136,7	1,893	1,384	52,57	17,36
F1C	191,6	1,110	0,579	73,69	10,18
F2A	105,0	1,291	1,229	40,38	12,06
F2B	145,0	3,305	2,279	55,76	30,60
F2C	31,50	2,535	8,049	12,11	23,26
F2D	36,00	1,060	2,944	13,84	15,63
F3	369,0	1,668	0,452	72,35	15,30
F4	185,3	0,174	0,093	36,33	8,720
F5A	91,60	10,57	11,54	31,58	15,28
F5B	81,20	9,917	12,21	26,19	22,61
F5C	86,20	3,087	3,580	31,92	16,47
F6A	187,6	1,937	1,032	72,04	18,62
F6B	131,0	2,069	1,579	48,48	10,24
F6C	152,9	7,731	5,056	52,66	19,18
F6D	180,8	8,324	4,604	58,26	13,80
F7A	147,9	1,085	0,7339	56,84	10,64
F7B	158,9	2,085	1,312	58,76	10,22
F7C	169,7	8,757	5,160	58,49	21,83
F7D	153,5	12,06	7,857	49,48	20,30
F8A	163,2	3,752	2,299	62,76	36,78
F8B	109,5	3,196	2,919	42,11	31,33
F8C	120,5	11,02	9,150	41,55	27,56
F8D	146,5	19,50	13,31	47,25	21,10
F9D	130,6	3,250	2,488	42,13	5,370
F9E	167,2	2,478	1,482	53,93	4,103
F10A	83,30	0,514	0,6173	31,97	4,890

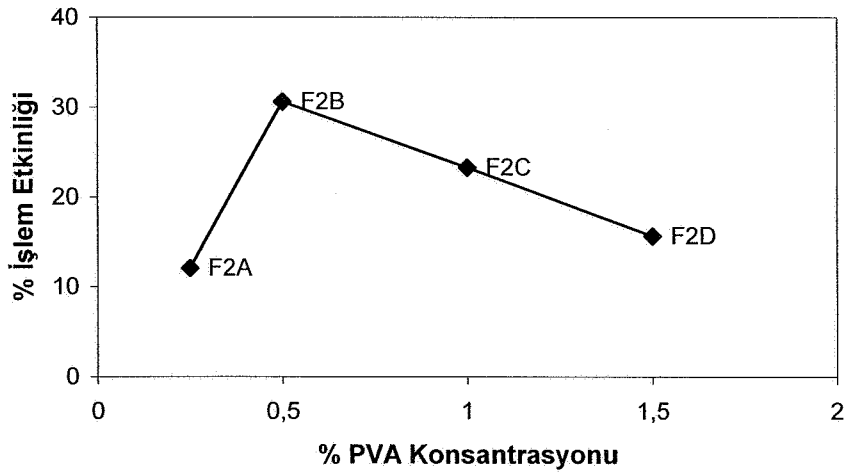
3.4.2. Formülasyon Parametrelerinin İşlem Etkinliği Üzerine Etkisi

Bölüm 2.2.3.2.' de belirtildiği gibi hazırlanan ve Tablo 2.1-2.8' de verilen formüllerin [dış fazın pH' sı (pH 5,5 ve 12) , stabilizör olarak kullanılan % PVA konsantrasyonu (% 0,25, 0,5, 1 ve 1,5) karıştırma hızı (8000, 9500, 13500 rpm), etkin madde miktarı (10, 20, 40, 60 mg), dış faz hacmi (50, 100, 200 ml) ve farklı bir stabilizör olarak kullanılan Pluronik F68 gibi formülasyon parametrelerindeki değişimlerinin işlem etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir.

- **Dış Fazın pH' sı ve % PVA Konsantrasyonu**

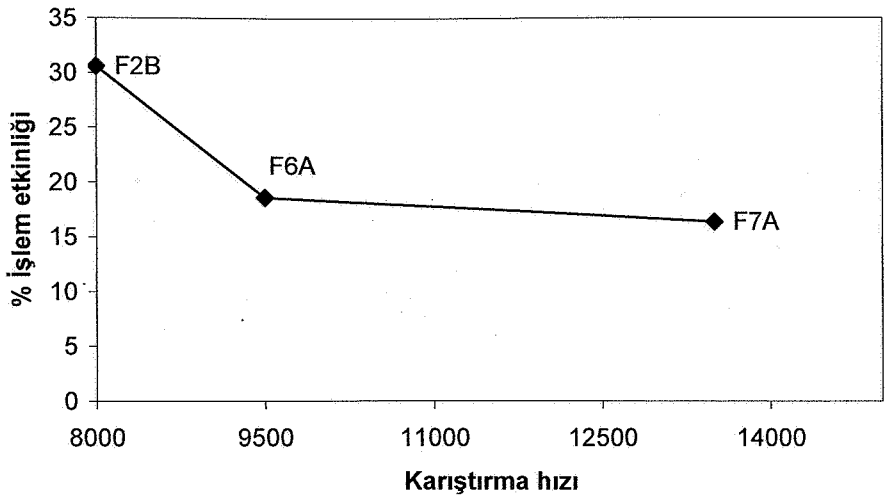


Şekil 3.6. pH 5,5' te % PVA konsantrasyonunun işlem etkinliği üzerine etkisi.

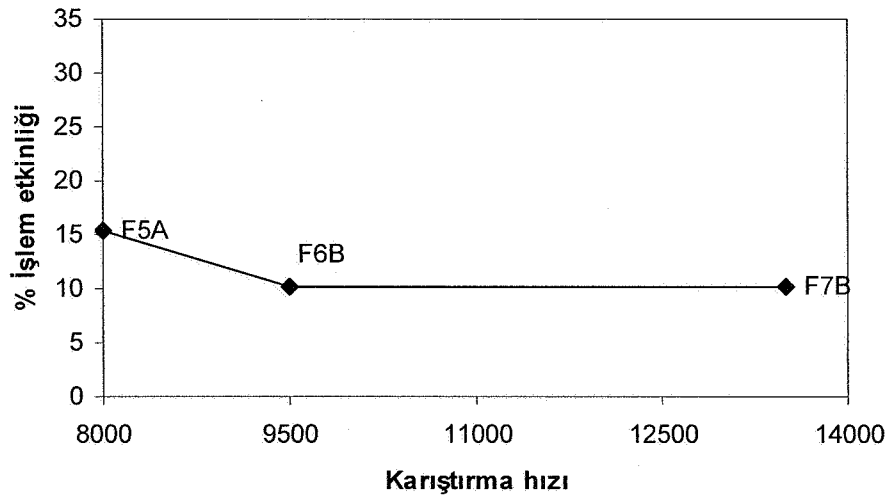


Şekil 3.7. pH 12' de % PVA konsantrasyonunun işlem etkinliği üzerine etkisi

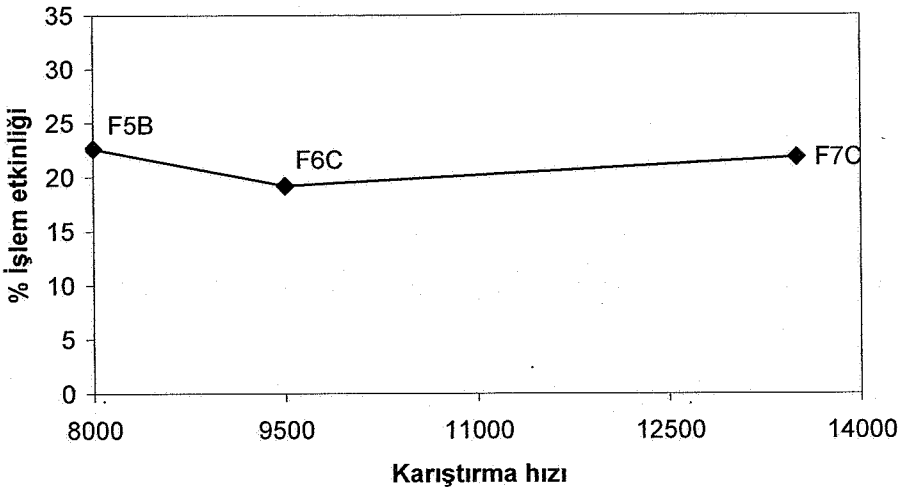
- **Karıştırma Hızı ve Etkin Madde Miktarının Etkisi**



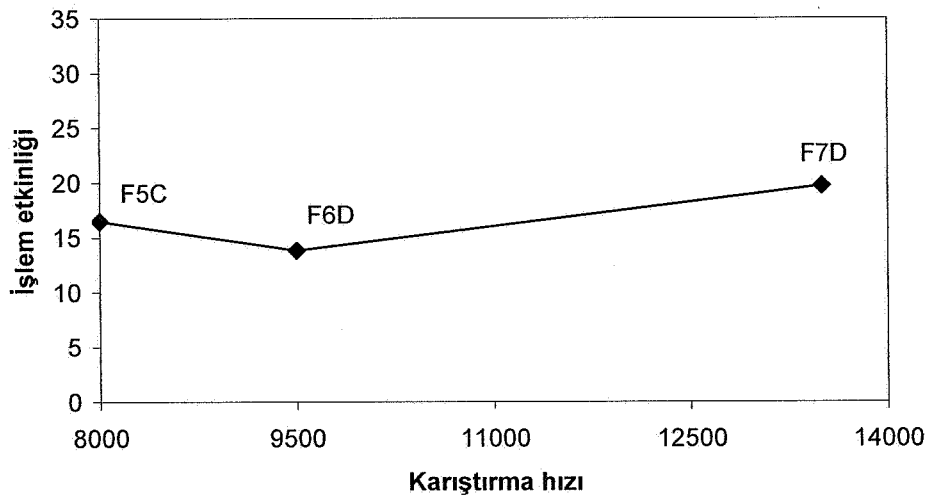
Şekil 3.8. 10 mg etkin madde içeren formülasyonlarda karıştırma hızının işlem etkinliği üzerine etkisi.



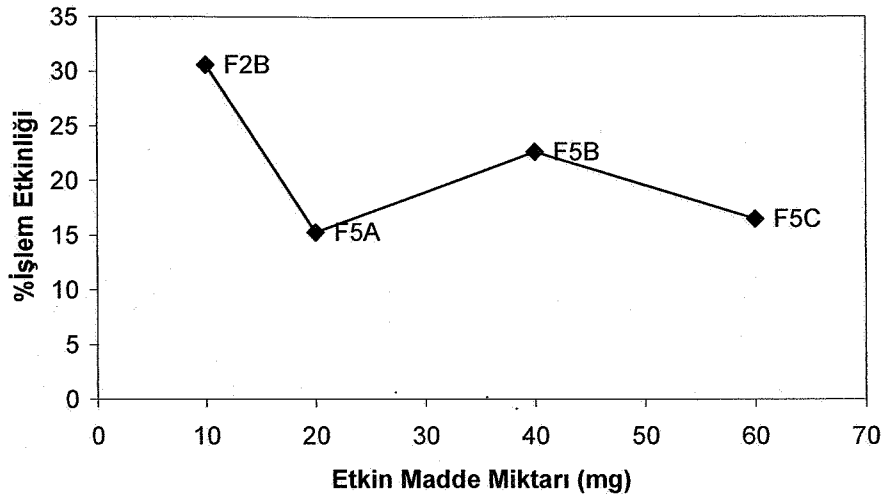
Şekil 3.9. 20 mg etkin madde içeren fomülasyonlarda karıştırma hızının işlem etkinliği üzerine etkisi.



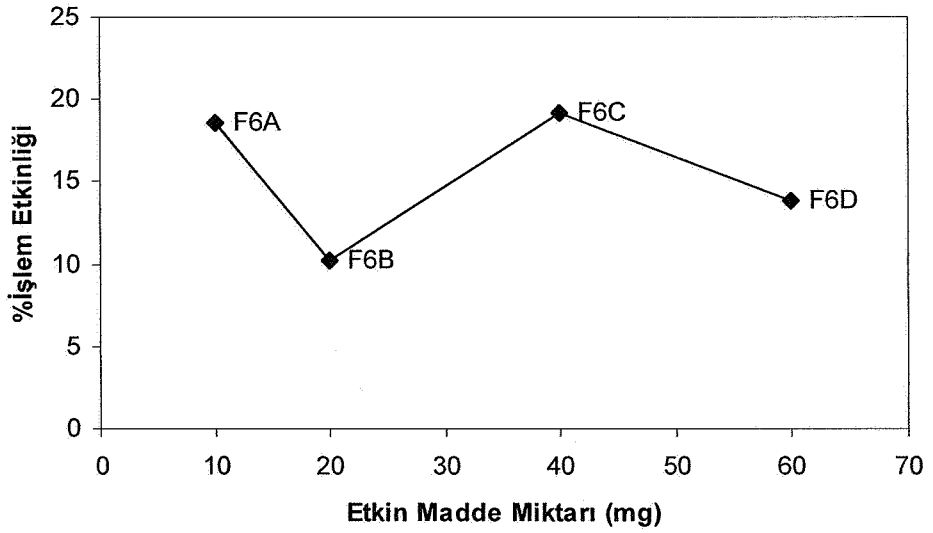
Şekil. 3.10. 40 mg etkin madde içeren formülasyonlarda karıştırma hızının işlem etkinliği üzerine etkisi.



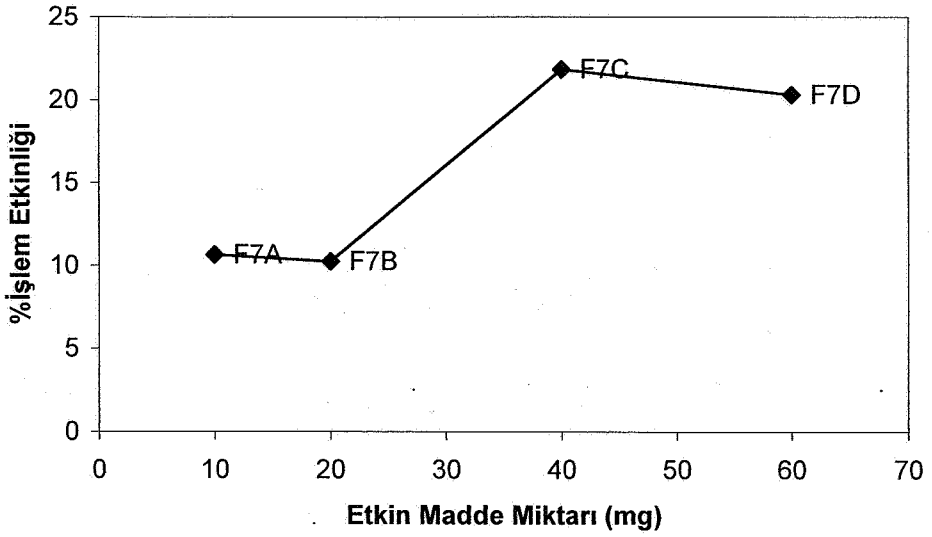
Şekil 3.11. 60 mg etkin madde içeren formülasyonlarda karıştırma hızının işlem etkinliği üzerine etkisi.



Şekil 3.12. 8000 rpm karıştırma hızında etkin madde miktarının işlem etkinliği üzerine etkisi.



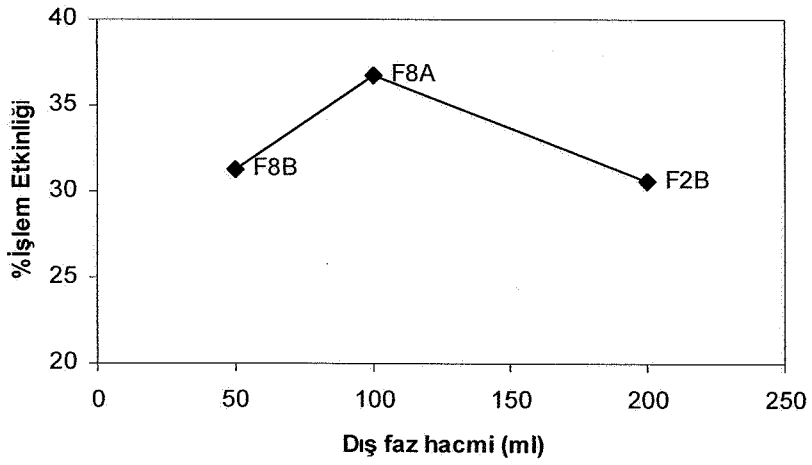
Şekil 3.13. 9500 rpm karıştırma hızında etkin madde miktarının işlem etkinliği üzerine etkisi.



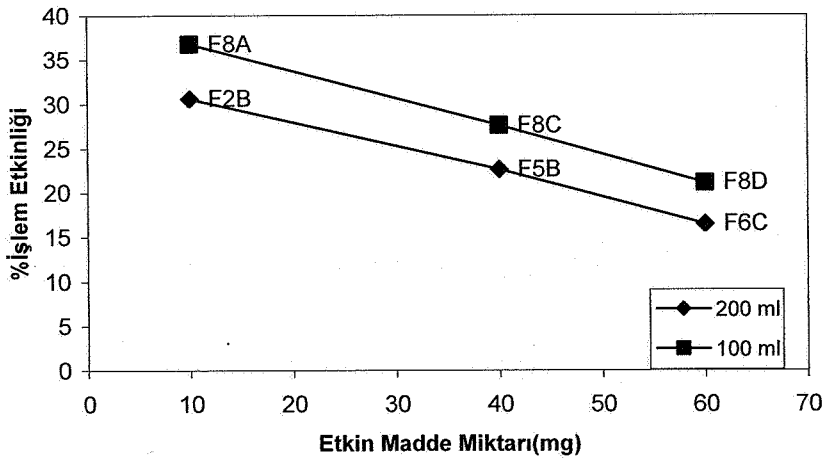
Şekil 3.14. 13500 rpm karıştırma hızında etkin madde miktarının işlem etkinliği üzerine etkisi.

- **Dış Faz Hacminin Etkisi**

a)

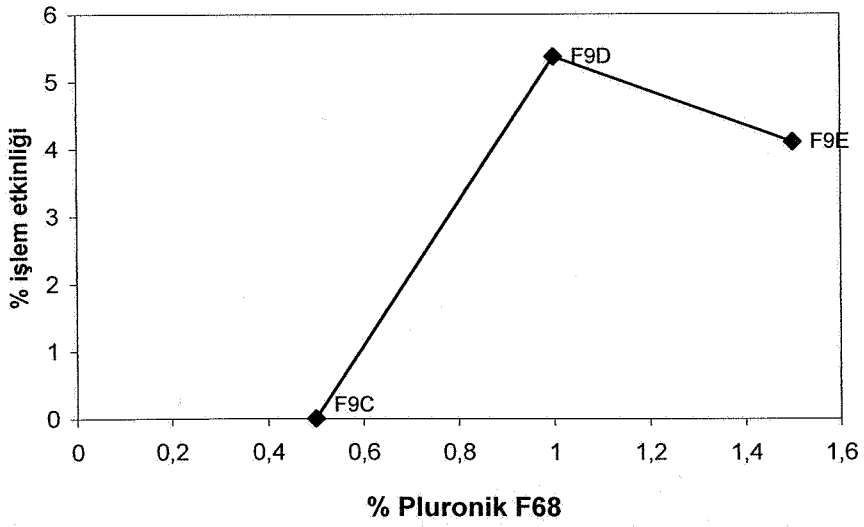


b)



Şekil 3.15. Dış faz hacminin işlem etkinliği üzerine etkisi a) 10 mg etkin madde içeren formüller, b) 100 ve 200 ml hacimde üç farklı etkin madde miktarı içeren formüller.

- **Pluronik F68' in İşlem Etkinliği Üzerine Etkisi**

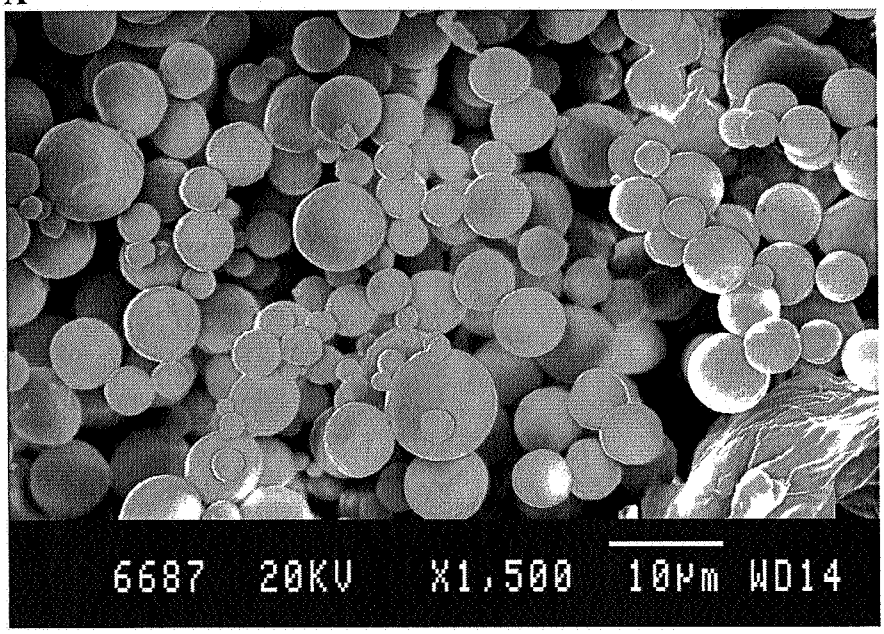


Şekil 3.16. Pluronik F68' in işlem etkinliği üzerine etkisi

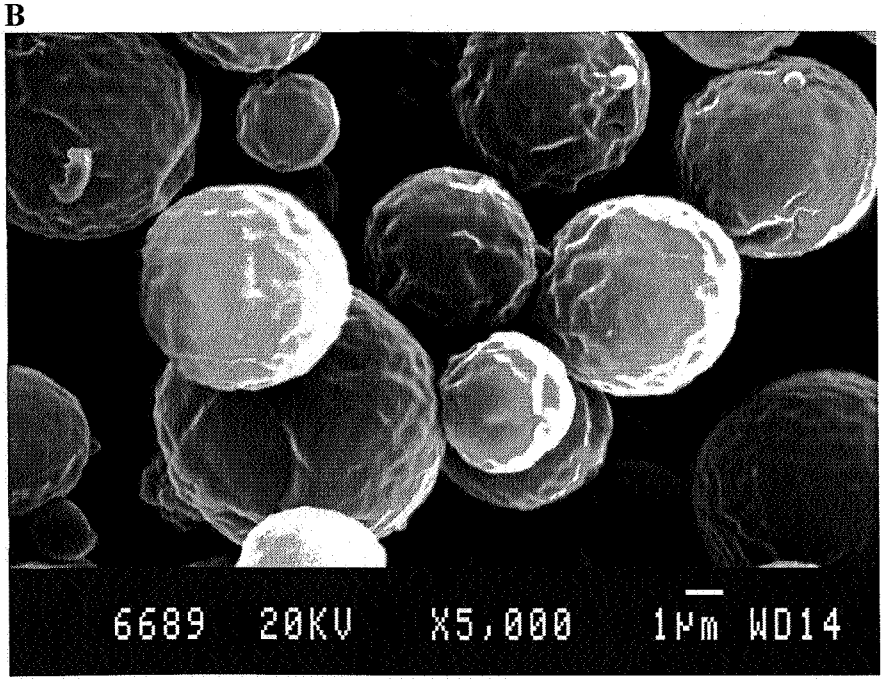
3.4.3. Partiküllerin Yüzey Morfolojisi ve Karakteristiklerinin İncelenmesi

Bölüm 2.3.2.' de anlatıldığı şekilde taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile alınan sonuçlar Şekil 3.17-3.29' de görülmektedir.

A

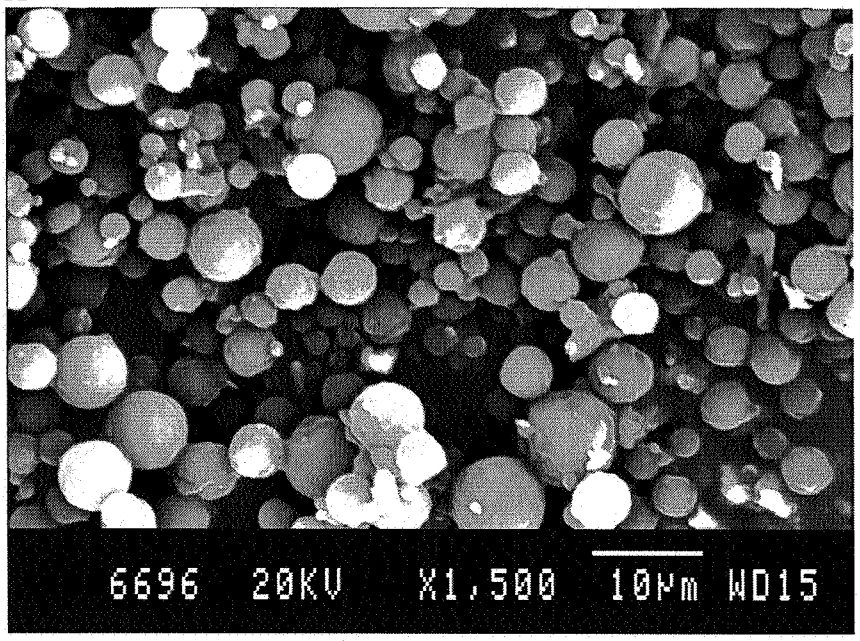


B

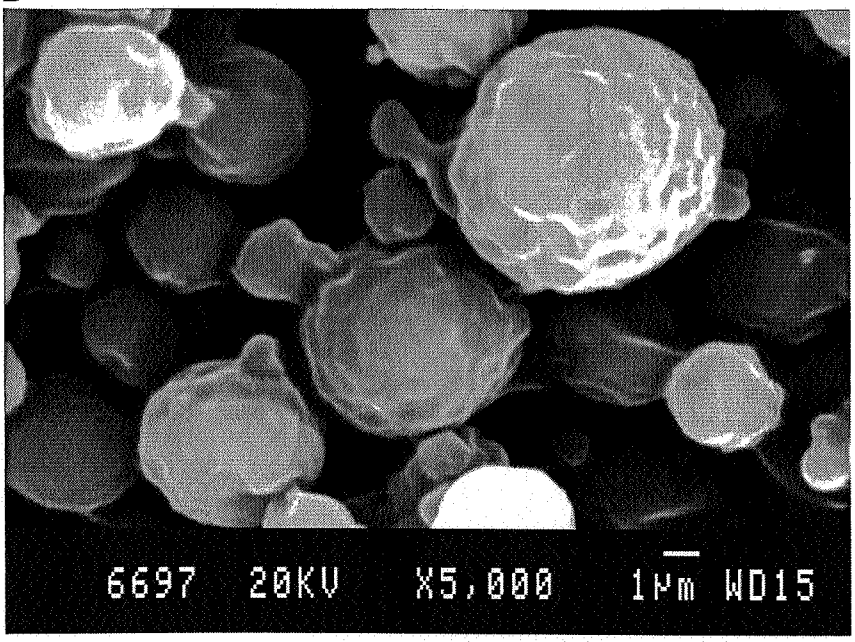


Şekil 3.17. F1B formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

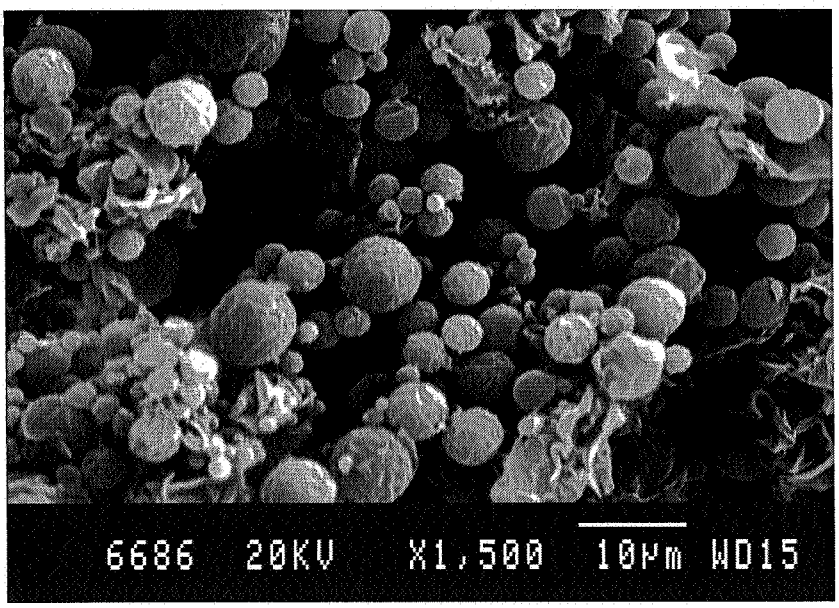


B

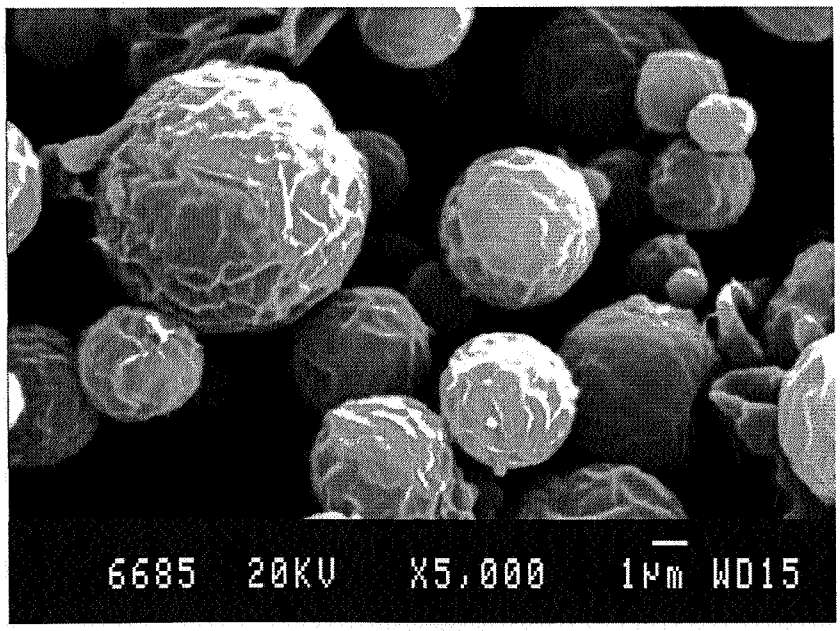


Şekil 3.18. F1C formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

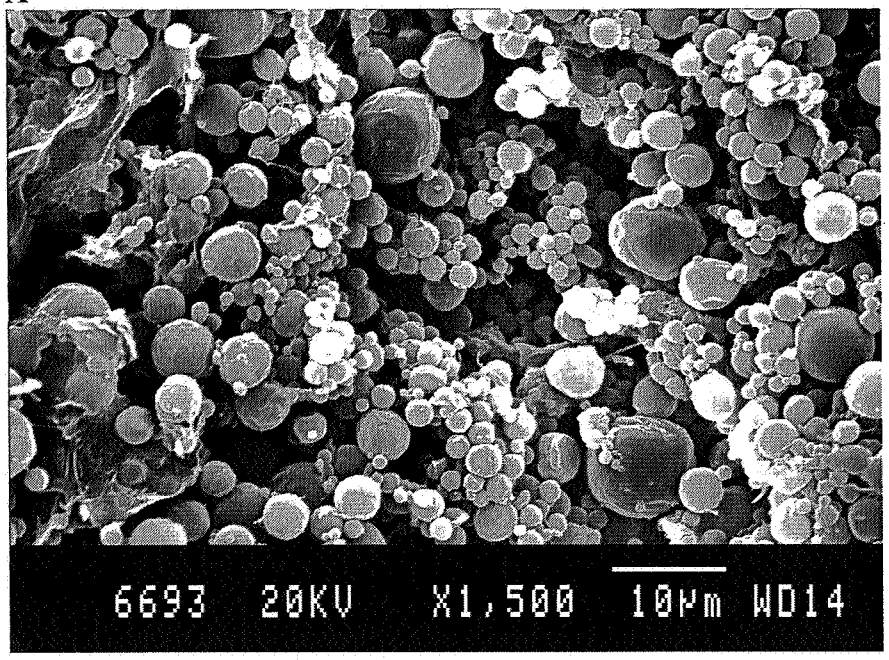


B

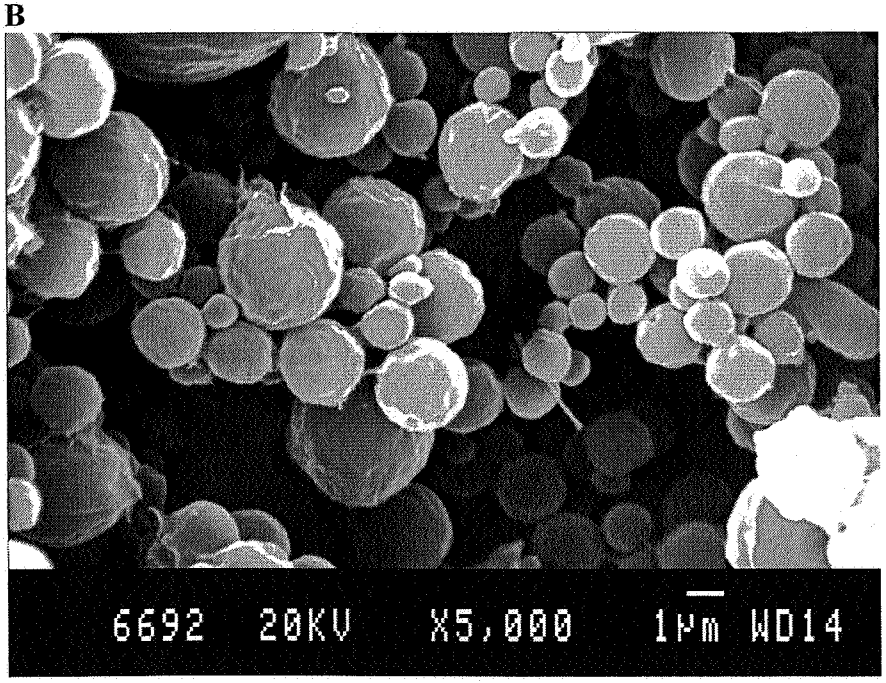


Şekil 3.19. F2A formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

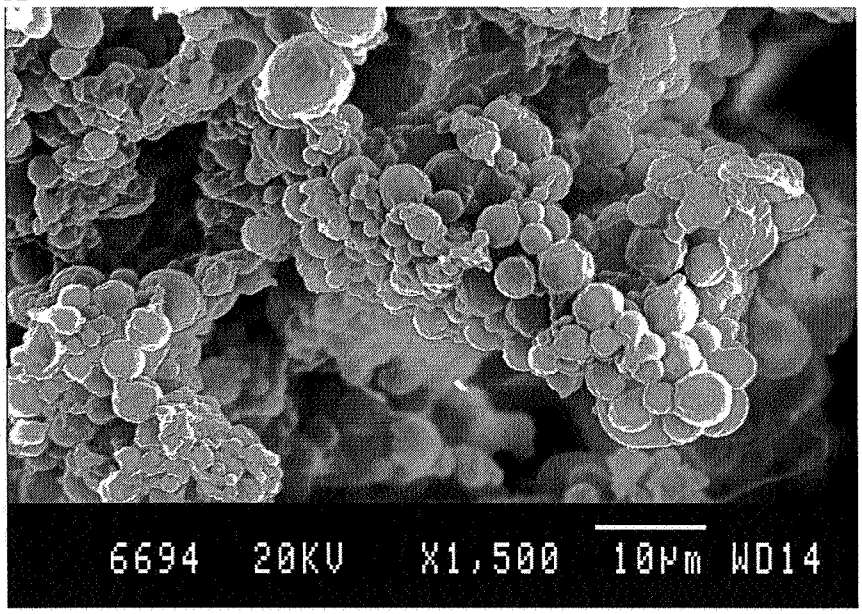


B

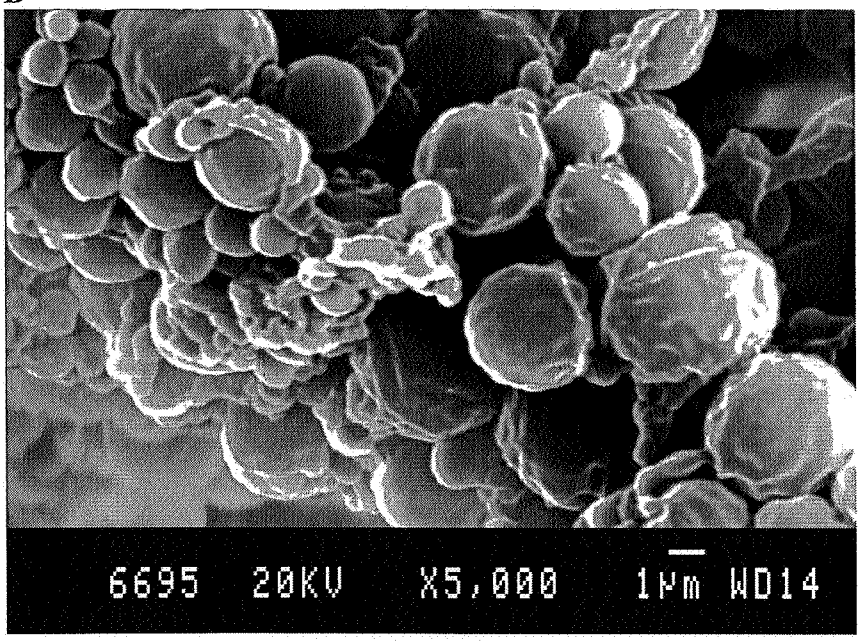


Şekil 3.20. F2B formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

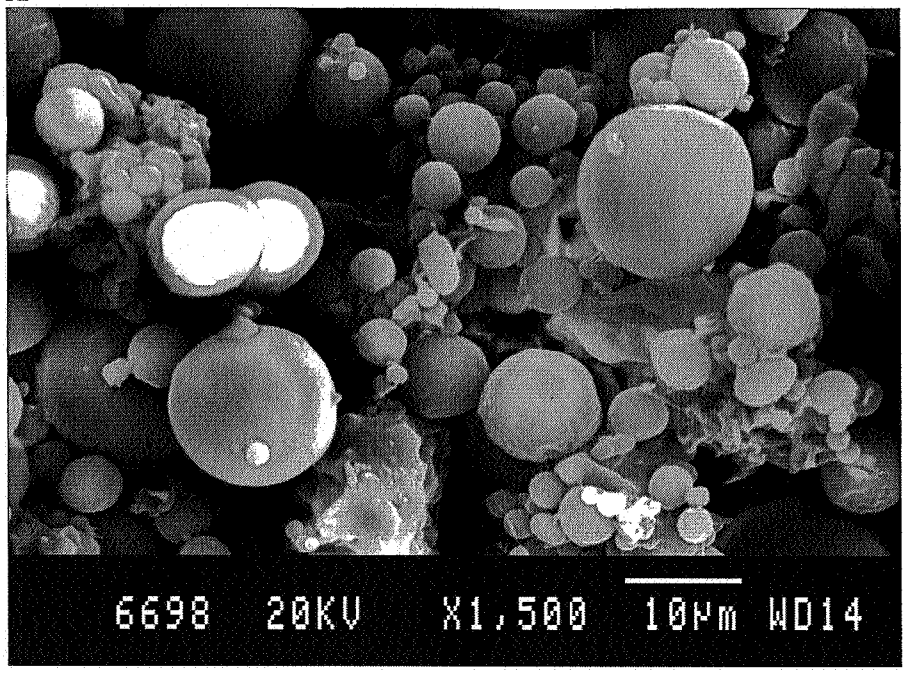


B

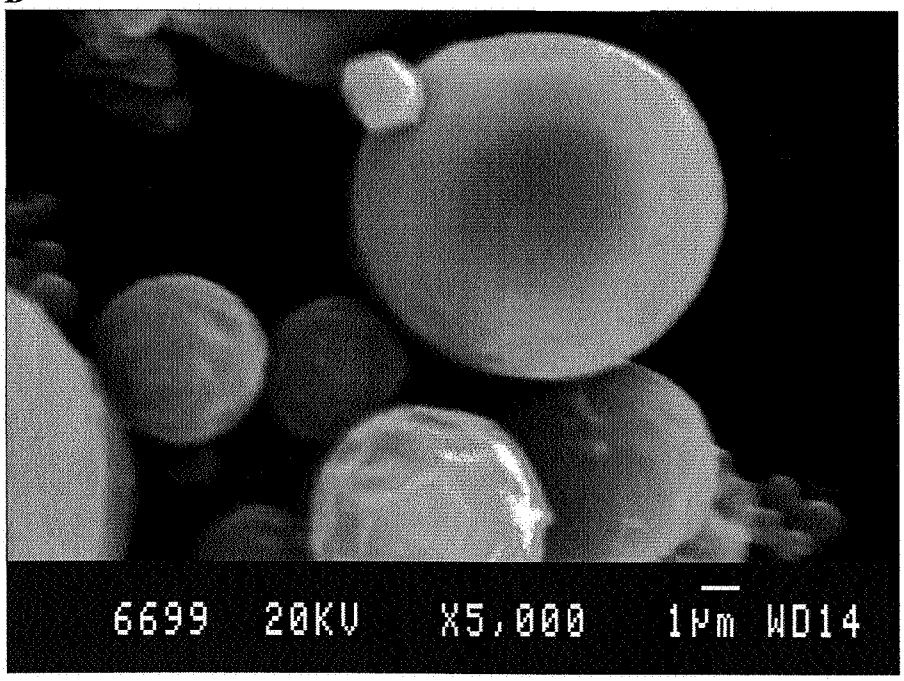


Şekil 3.21. F2C formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

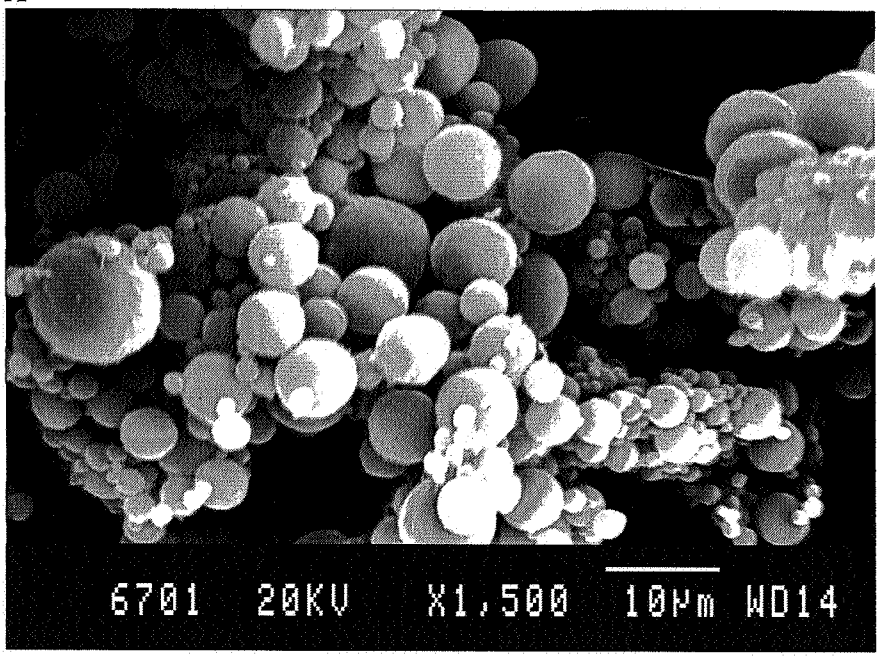


B

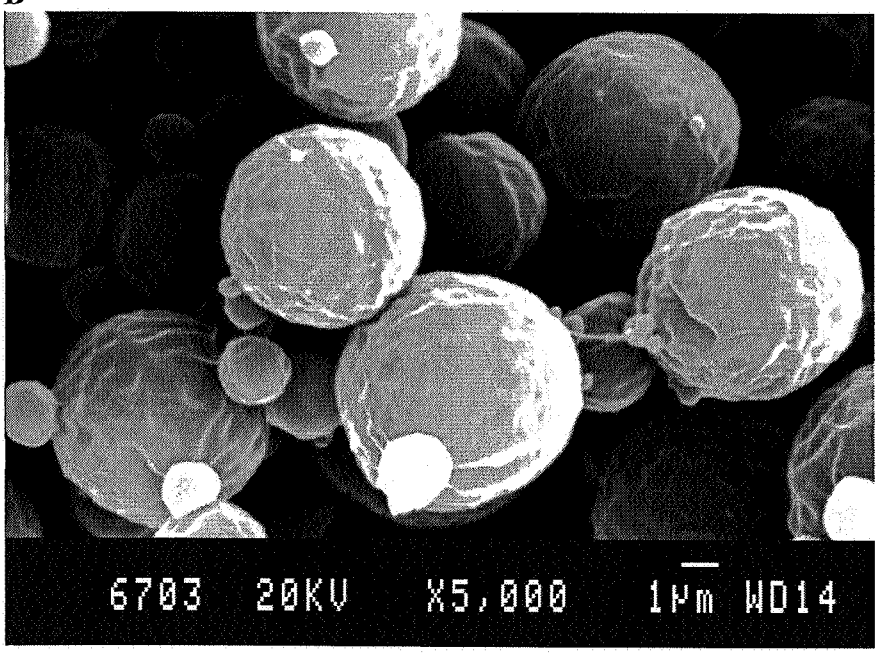


Şekil 3.22. F3 formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

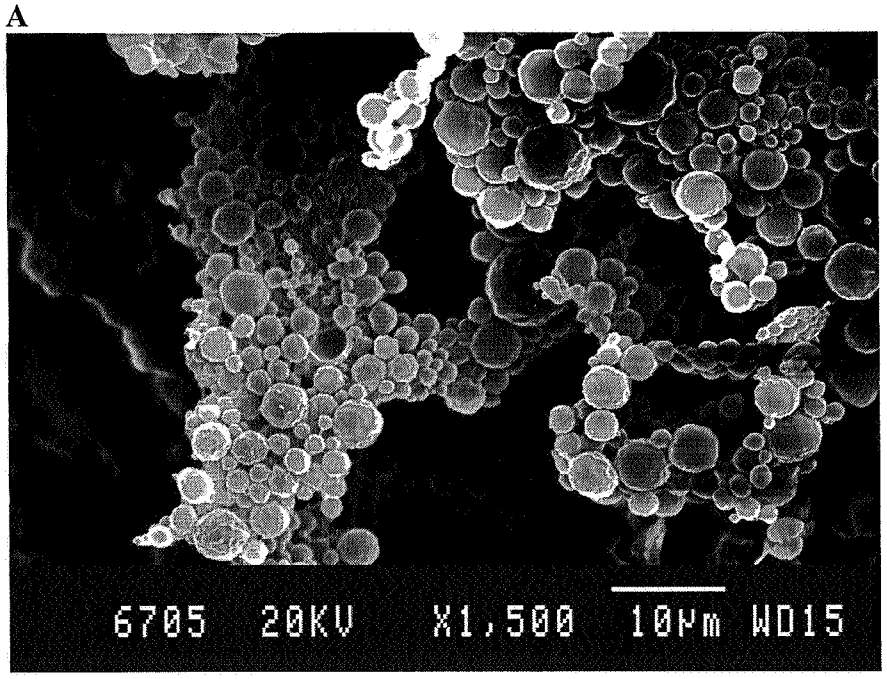


B

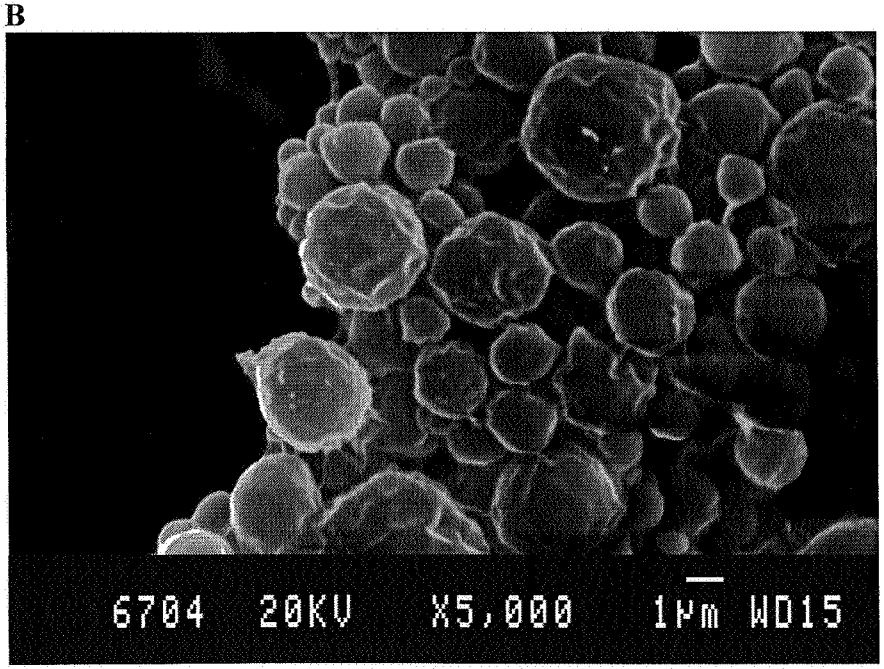


Şekil 3.23. F5C formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

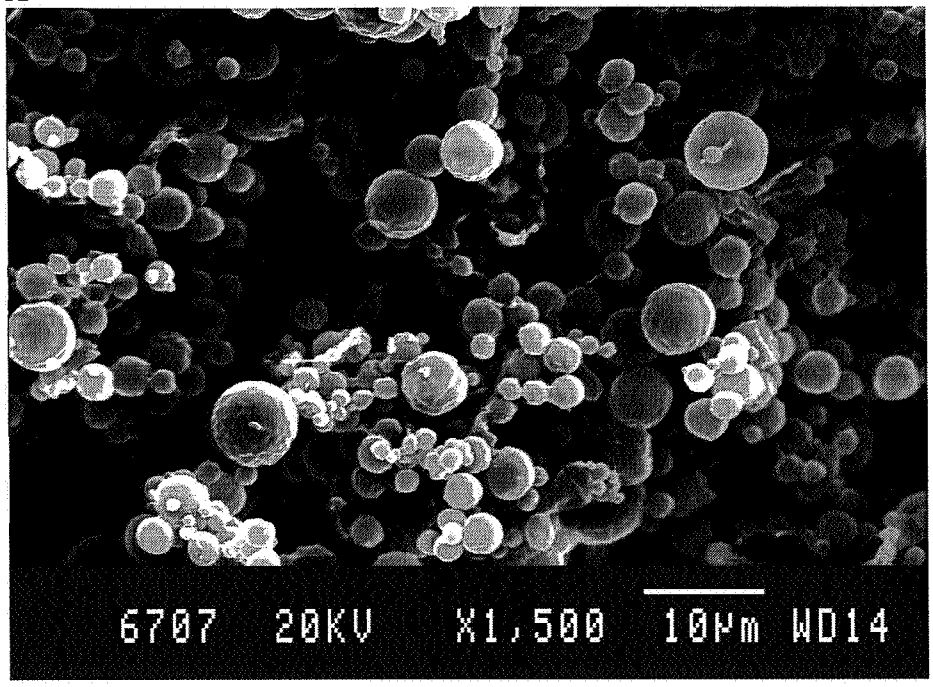


B

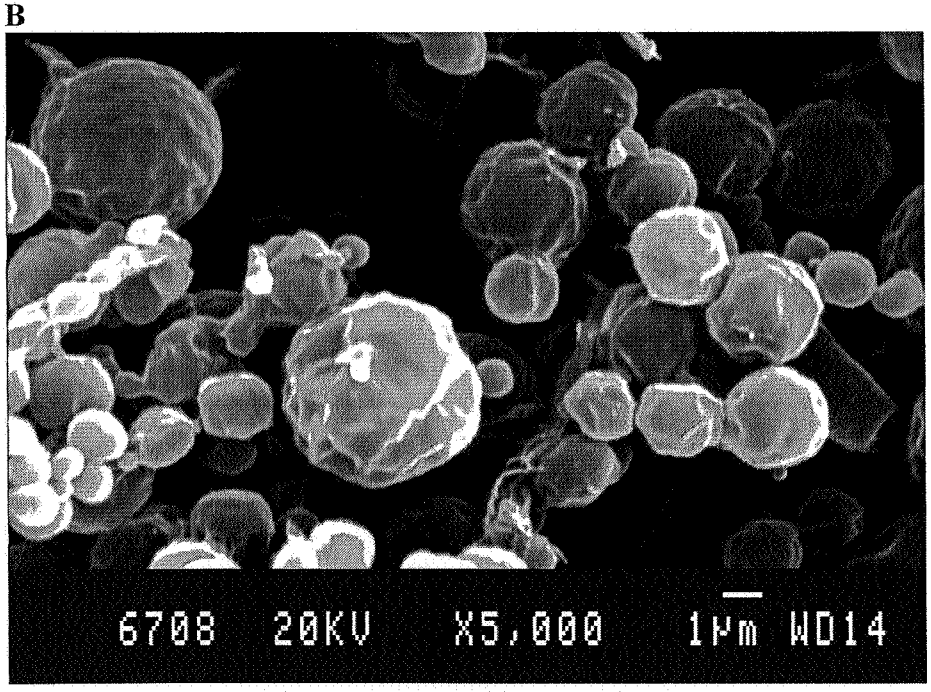


Şekil 3.24. F6A formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

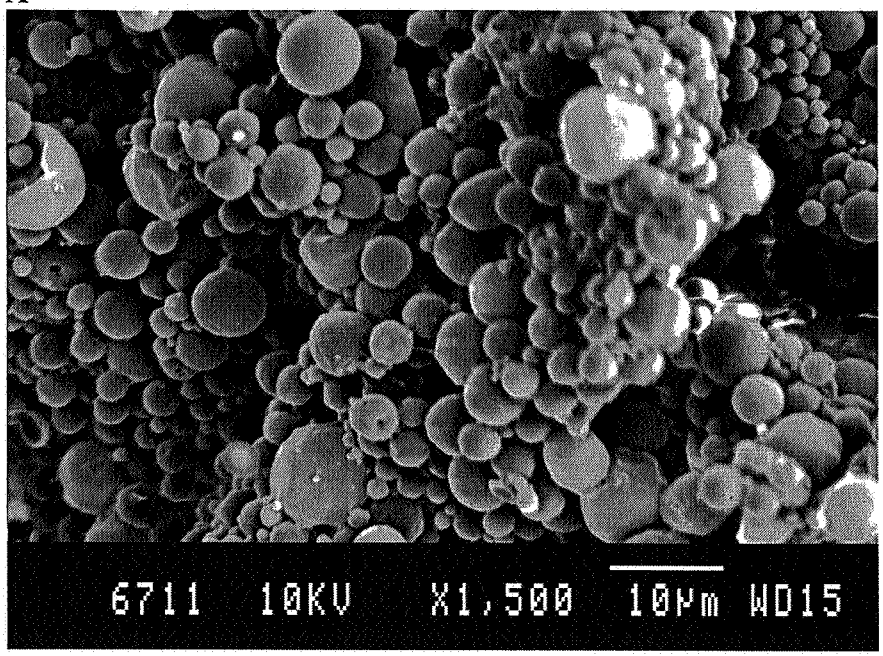


B

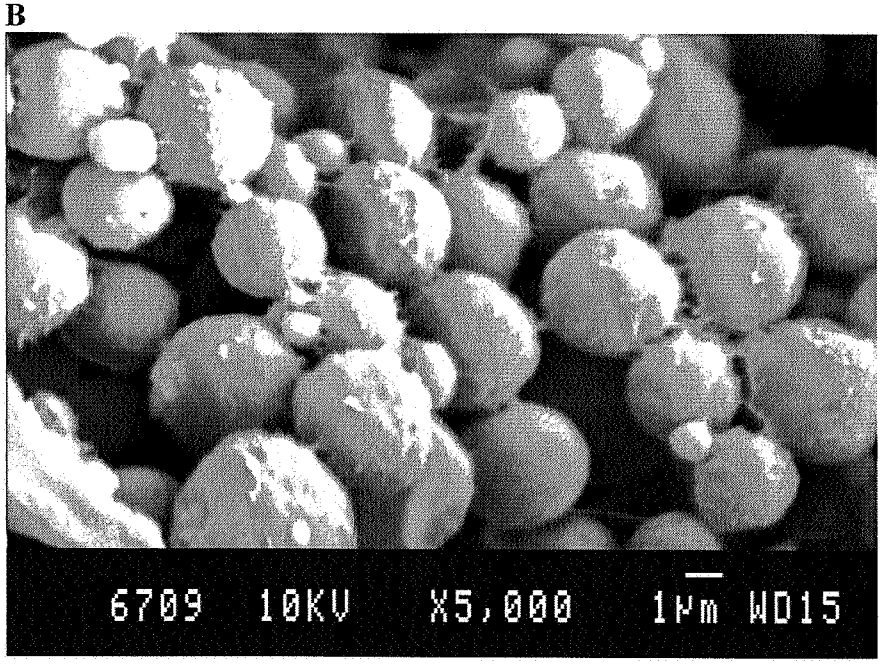


Şekil 3.25. F7A formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

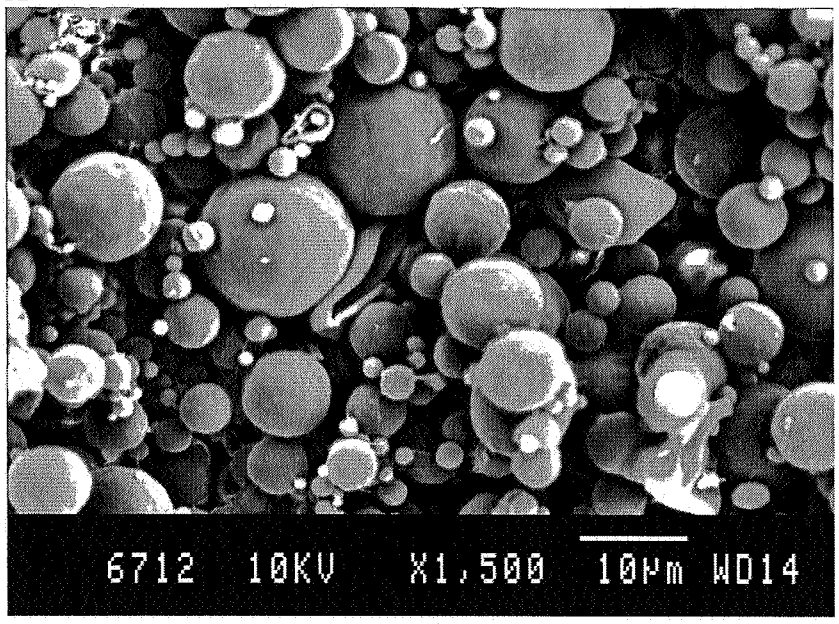


B

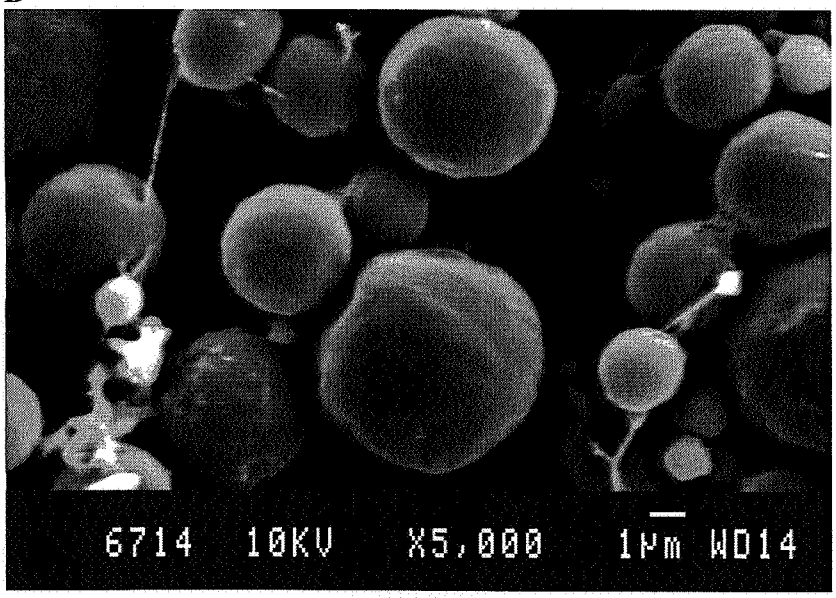


Şekil 3.26. F7D formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

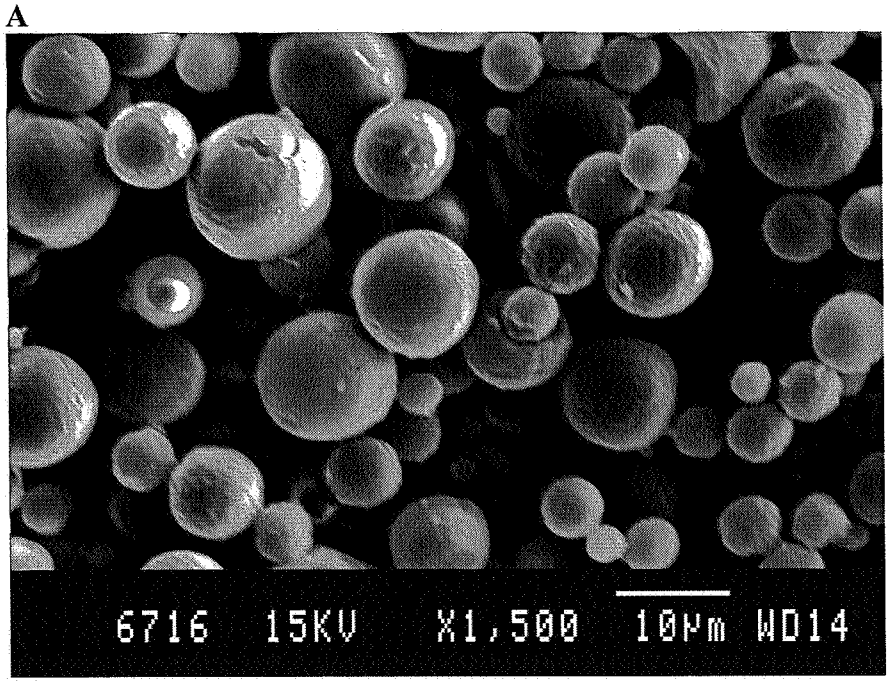


B

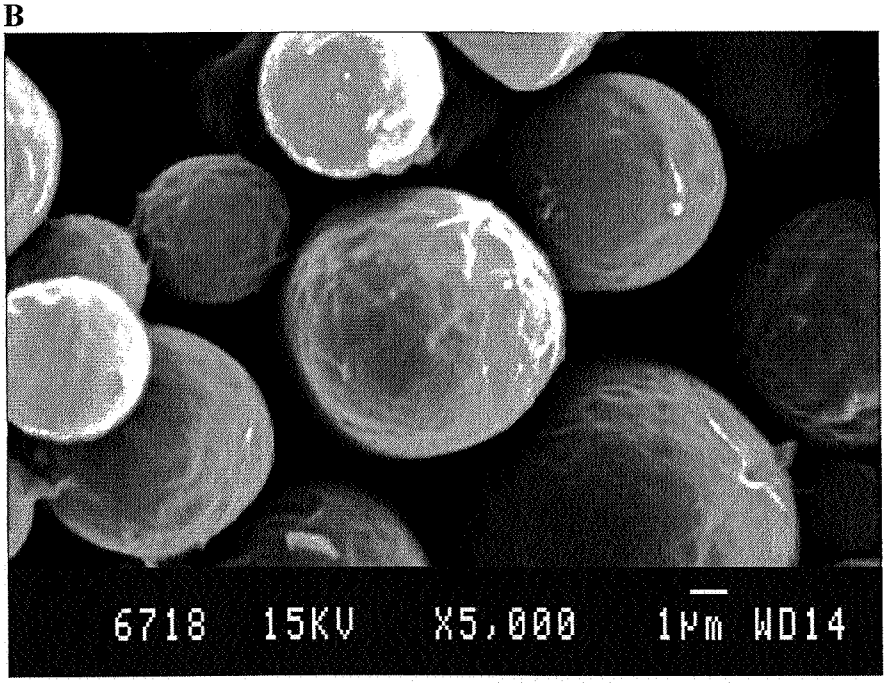


Şekil 3.27. F8A formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A

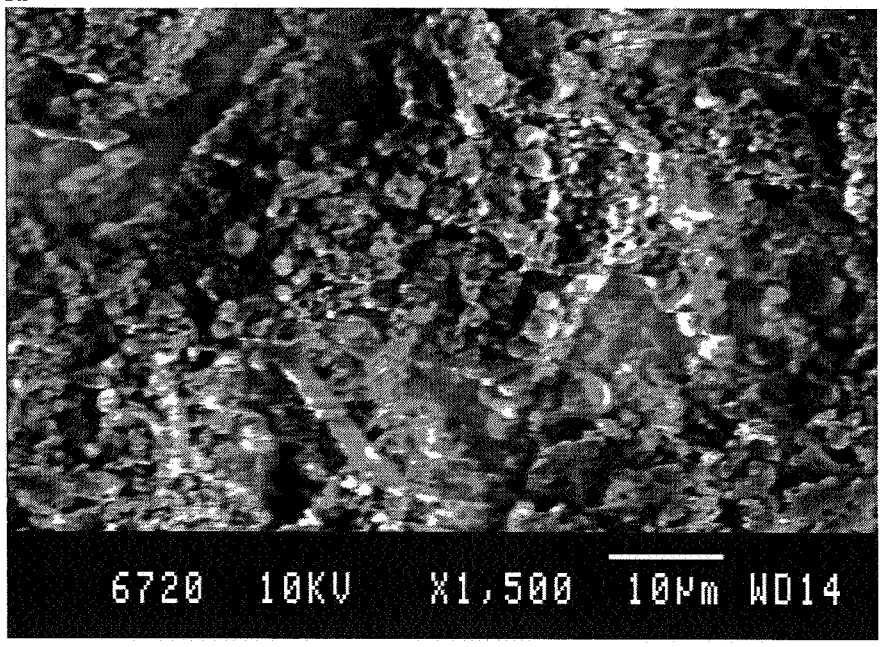


B

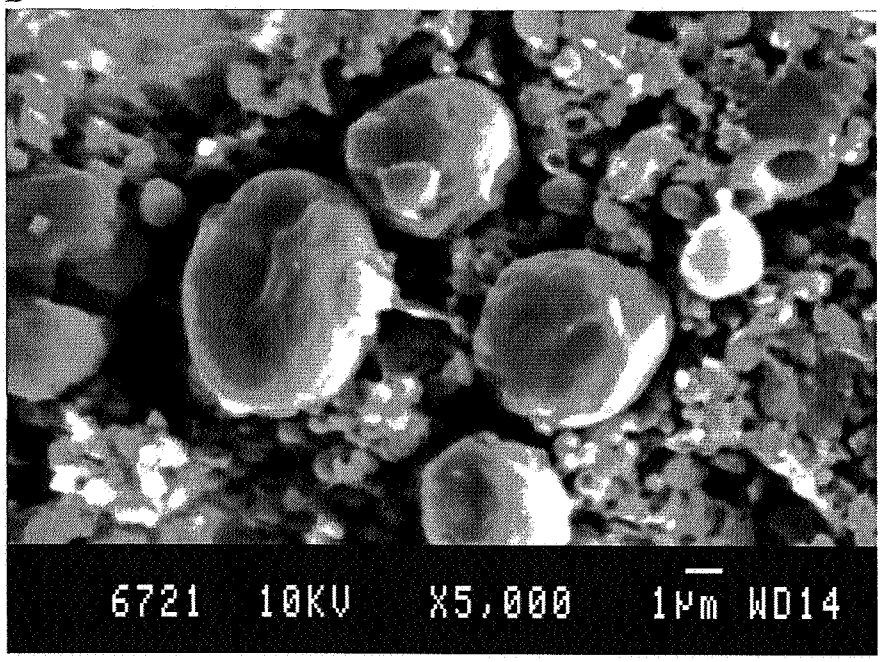


Şekil 3.28. F8B formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

A



B



Şekil 3.29. F9D formülünün Taramalı Elektron Mikrografları A)x1500, B)x5000

3.4.4. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Bölüm 2.3.3.'de belirtilen yöntemle ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı değerleri Tablo 3.21.' da, SEM analizi yapılan örneklerin partikül büyüklüğü dağılımı grafiği şekil 3.30-3.33' te verilmiştir.

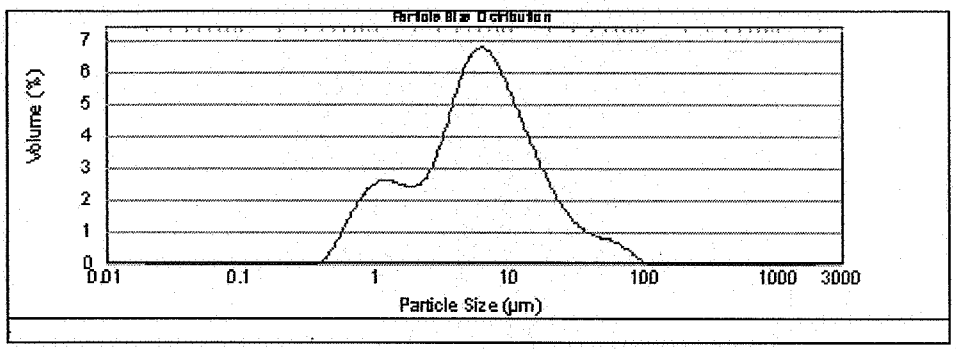
Tablo 3.21. Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Formül	d (0,5)* (µm)	Span**
F1A	7,466	4,493
F1B	5,819	3,273
F1C	4,779	3,434
F2A	19,90	2,403
F2B	7,882	5,918
F2C	129,1	2,838
F2D	148,9	5,480
F3	348,3	2,718
F4	3,269	5,542
F5A	25,54	3,622
F5B	5,628	9,589
F5C	8,118	7,148
F6A	2,872	10,42
F6B	14,55	3,706
F6C	3,370	12,84
F6D	4,223	2,455
F7A	4,469	14,19
F7B	7,176	5,275
F7C	4,175	11,57
F7D	8,197	5,411
F8A	9,866	2,590
F8B	27,15	6,466
F8C	5,869	2,208
F8D	8,124	4,291
F9C	7,345	6,668
F9D	3,147	14,08
F9E	8,379	6,891
F10A	177,4	2,625

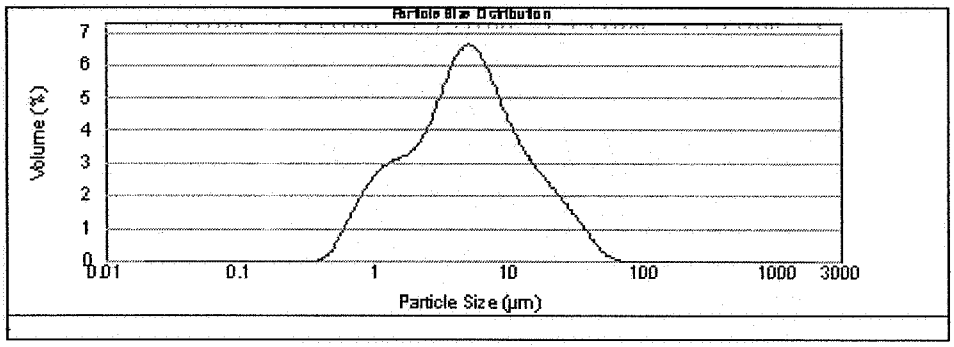
* d (0,5) değeri medianı ifade eder. Dağılımın % 50' sinin bu değerin üstünde % 50' si ise bu değerin altındadır. Birimi µm' dir.

** Span değeri, dağılımın yaygınlığının dar ya da geniş olduğunu gösteren birimsiz bir değerdir.

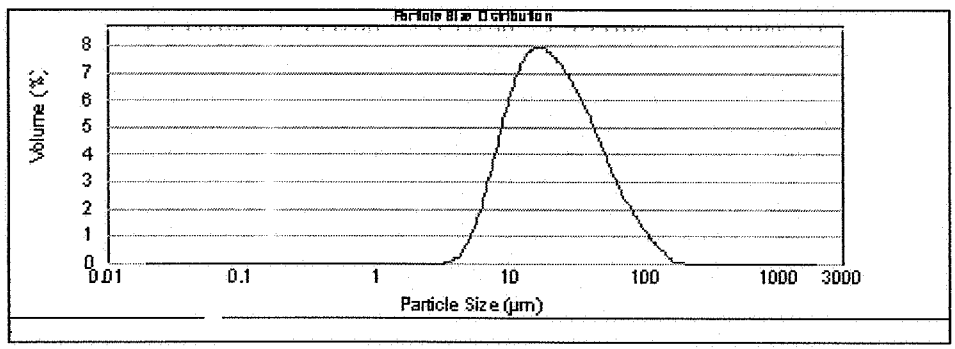
(a)



(b)

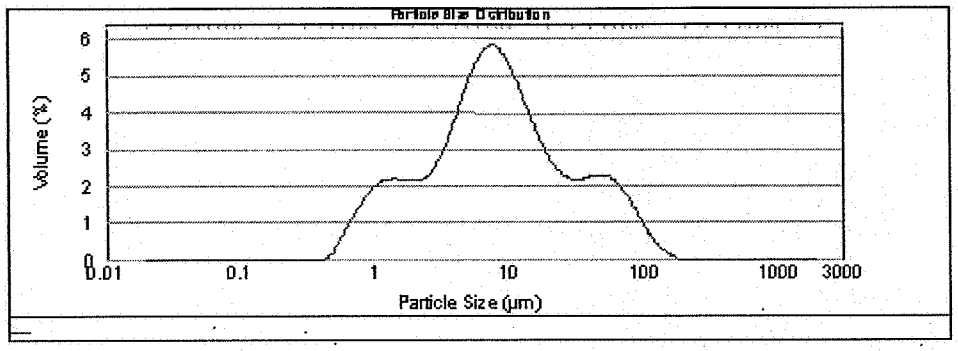


(c)

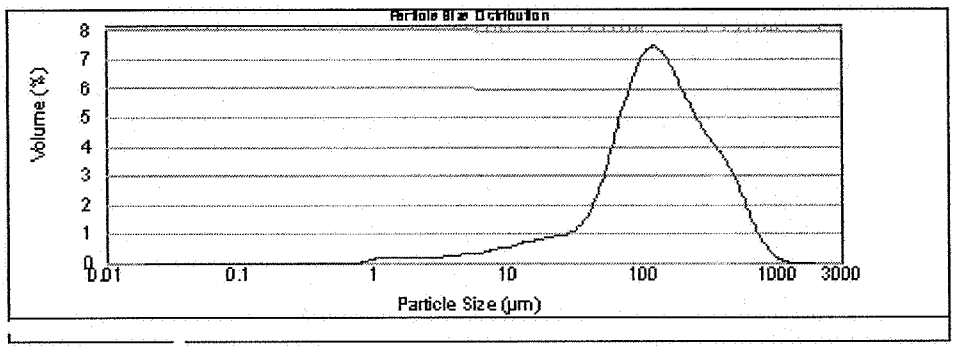


Şekil 3.30. (a)F1B, (b)F1C ve (c)F2A formüllerinin partikül büyüklüğü dağılım grafiği

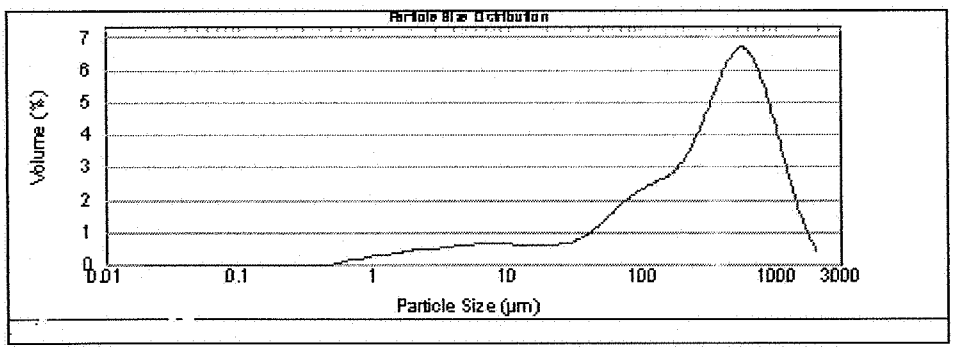
(a)



(b)

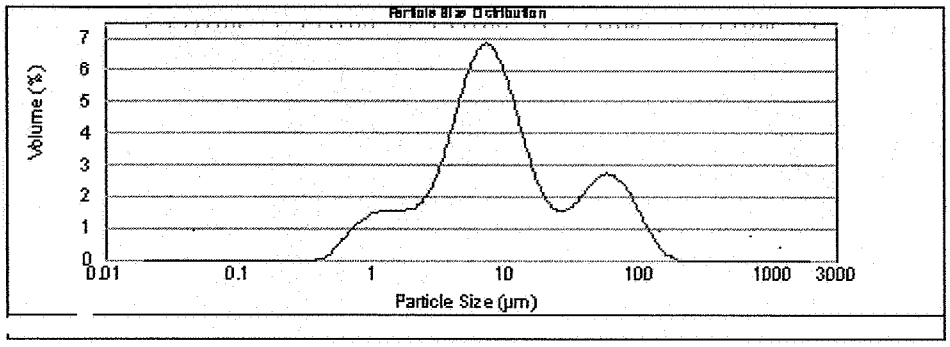


(c)

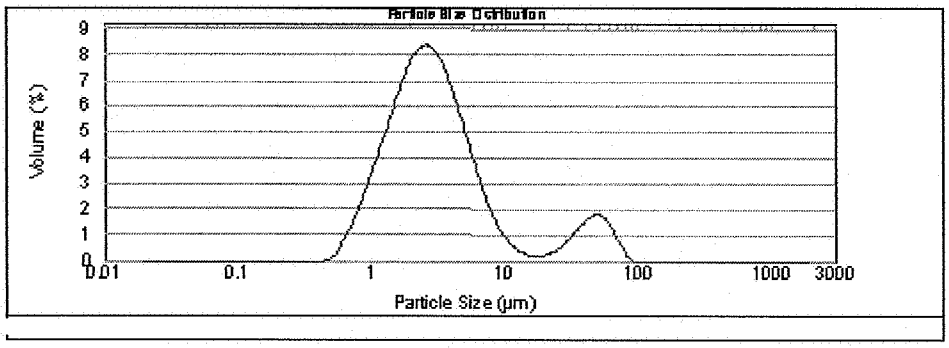


Şekil 3.31. (a) F2B, (b) F2C, (c) F3 formüllerinin partikül büyüklüğü dağılım grafiği.

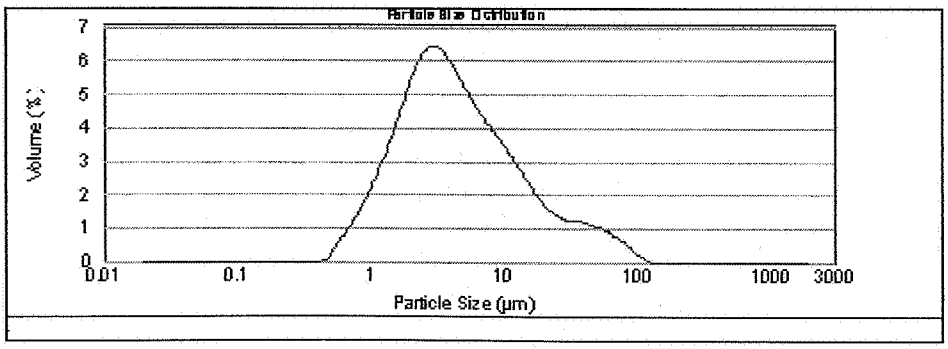
(a)



(b)

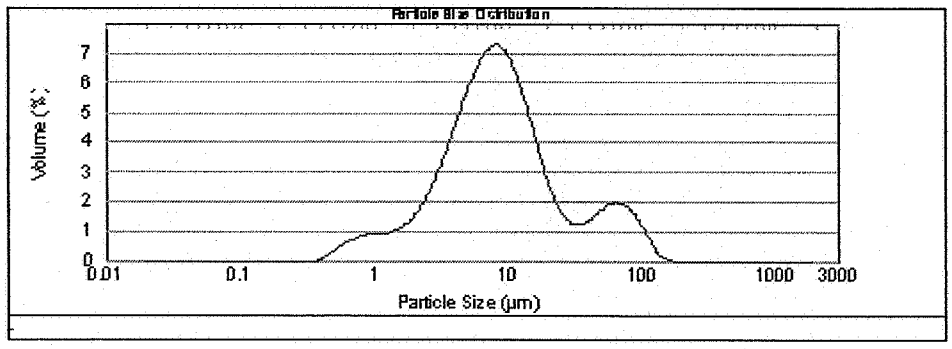


(c)

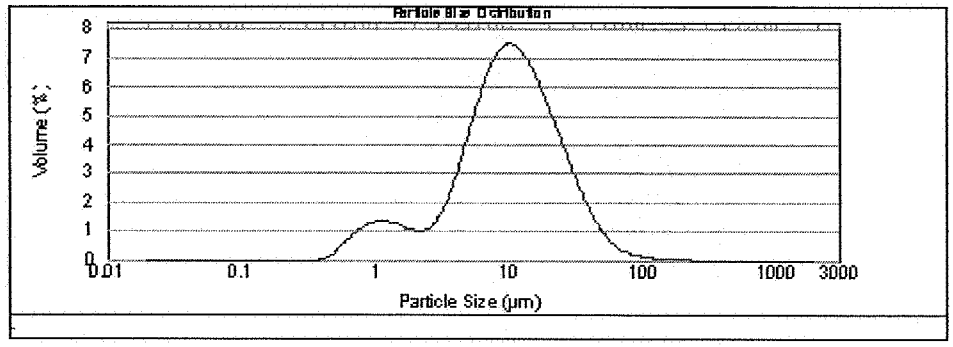


Şekil 3.32. (a) F5C, (b)F6A ve (c)F7A formülünün partikül büyüklüğü dağılım grafiği.

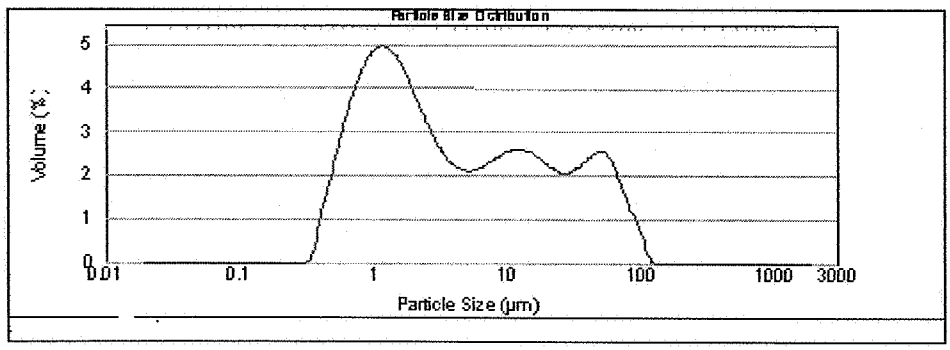
(a)



(b)



(c)



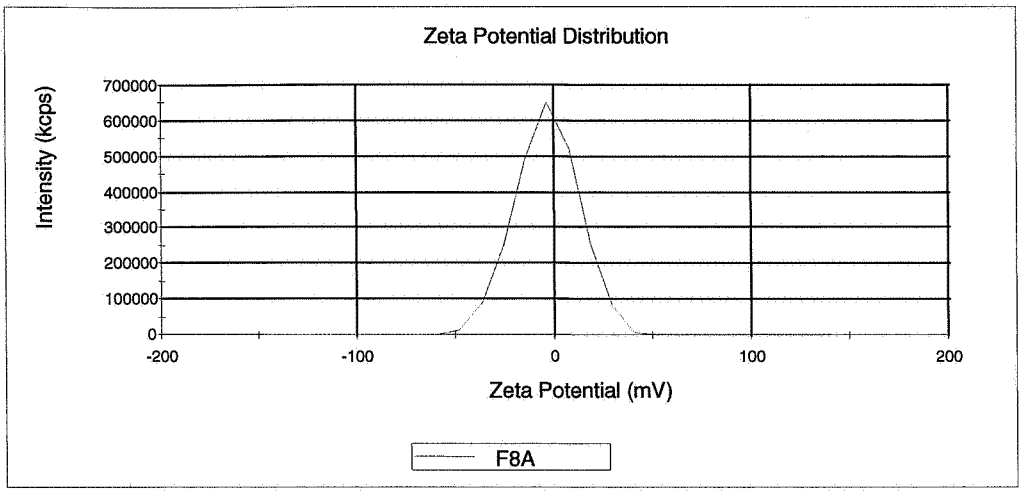
Şekil 3.33. (a)F7D, (b)F8A ve **(c)**F9D formülünün partikül büyüklüğü dağılım grafiği

3.4.5. Zeta Potansiyellerine Ait Bulgular

Bölüm 2.3.4.'de belirtilen yöntemle ölçülen zeta potansiyel değerleri Tablo 3.22.' de, bir örneğin grafiği ise Şekil 3.34.' da verilmiştir.

Tablo 3.22. Formüllerin Zeta Potansiyelleri (mV)

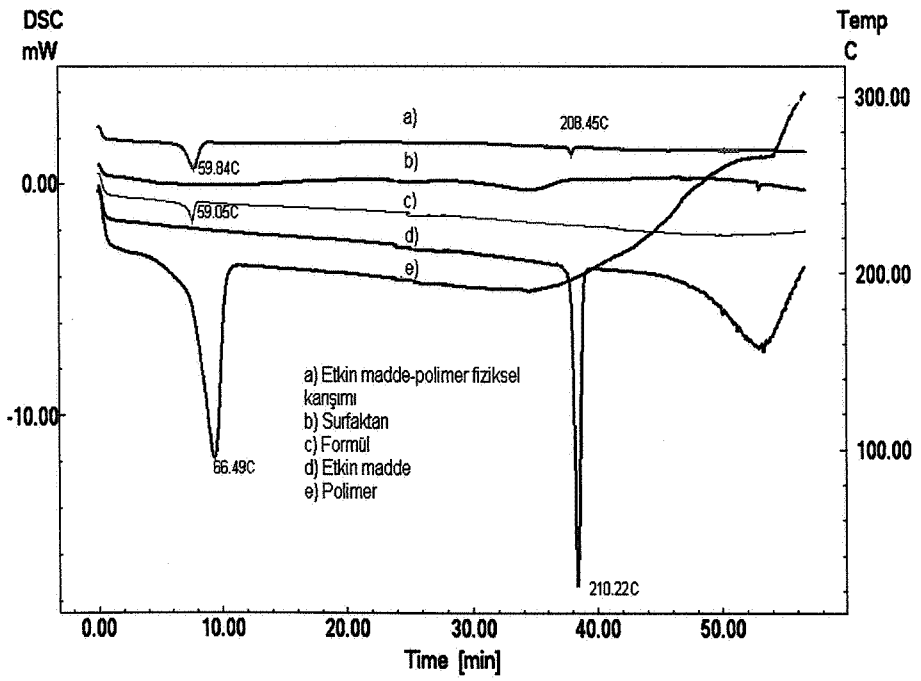
Formül	Zeta Potansiyeli (mV) Ortalama	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma
F1A	-31,30	1,562	0,9018
F1B	-1,960	0,2718	0,1569
F1C	-3,685	0,7552	0,3083
F2A	-10,63	0,3214	0,1855
F2B	-19,76	3,150	1,818
F2C	-5,993	0,5902	0,3408
F3	-17,67	2,881	1,440
F4	-21,86	1,350	0,7796
F5A	-7,606	2,556	1,043
F5B	-11,56	0,6110	0,3527
F5C	-21,23	0,4041	0,2333
F6A	-6,388	1,393	0,5687
F6B	-4,636	0,6165	0,3559
F6C	-21,96	2,350	1,357
F6D	-5,878	1,057	0,4314
F7A	-10,16	0,1154	0,0666
F7B	-25,40	3,5341	2,040
F7C	-11,73	1,101	0,6359
F7D	-5,890	0,9522	0,5497
F8A	-3,523	0,9733	0,5619
F8B	-5,150	1,215	0,7018
F8C	-23,18	2,667	1,088
F8D	-10,34	2,095	0,8555
F9C	-9,446	1,198	0,6918
F9D	-27,33	0,7234	0,4176
F9E	-8,013	0,2371	0,1369
F10A	-36,21	5,115	2,088



Şekil 3.34. F8A formülünün zeta potansiyeli dağılım grafiği

3.4.6. Termal Analiz Sonuçları

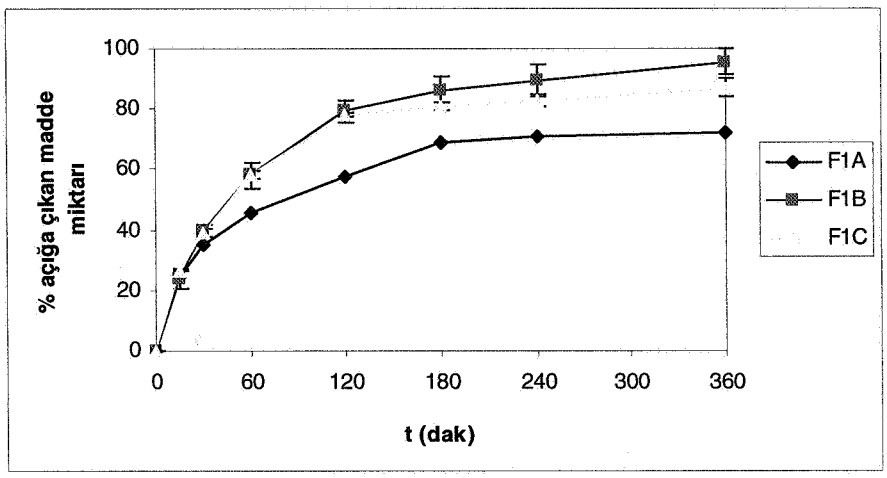
Bölüm 2.3.5.' te belirtildiği gibi etkin madde, polimer, surfaktanın, etkin madde-polimer fiziksel karışımı ve formülün (F8A) termal analiz sonuçları şekil 3.35.'de verilmiştir.



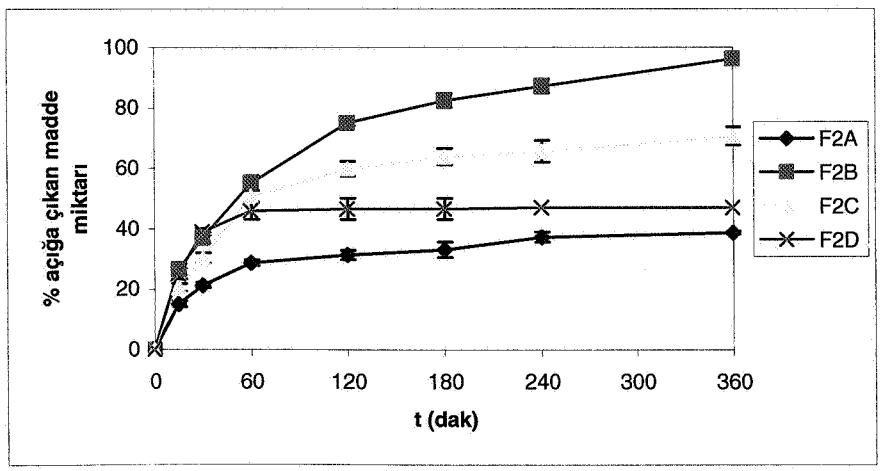
Şekil 3.35. DSC termogramları

3.4.7. Çözünme Hızı Sonuçları

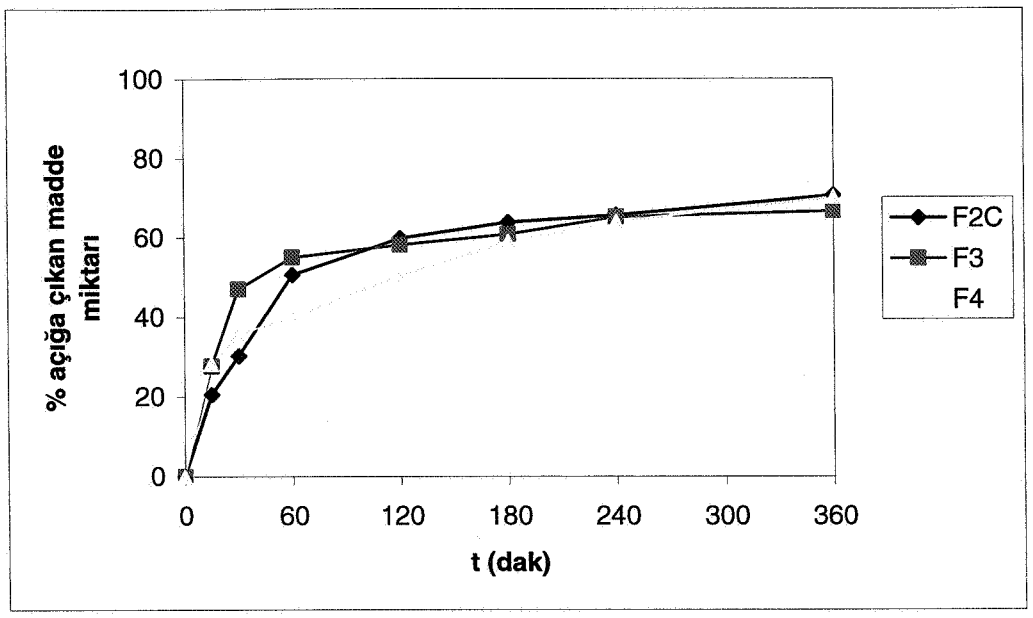
Bölüm 2.3.6.' da belirtildiği şekilde 35°C' de su banyosunda diyaliz bag diffüzyon yöntemi ile partiküllerden etkin madde çıkışı kümülatif olarak incelenmiştir. Dış fazın pH' sının (pH 5,5 ve 12) , stabilizör olarak kullanılan % PVA konsantrasyonunun (% 0,25, 0,5, 1 ve 1,5) karıştırma hızının (8000, 9500, 13500 rpm), etkin madde miktarının (10, 20, 40, 60 mg), dış faz hacminin (50, 100, 200 ml) ve Pluronik F68'in stabilizör olarak kullanımının çözünme hızı üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil3.36-3.44).



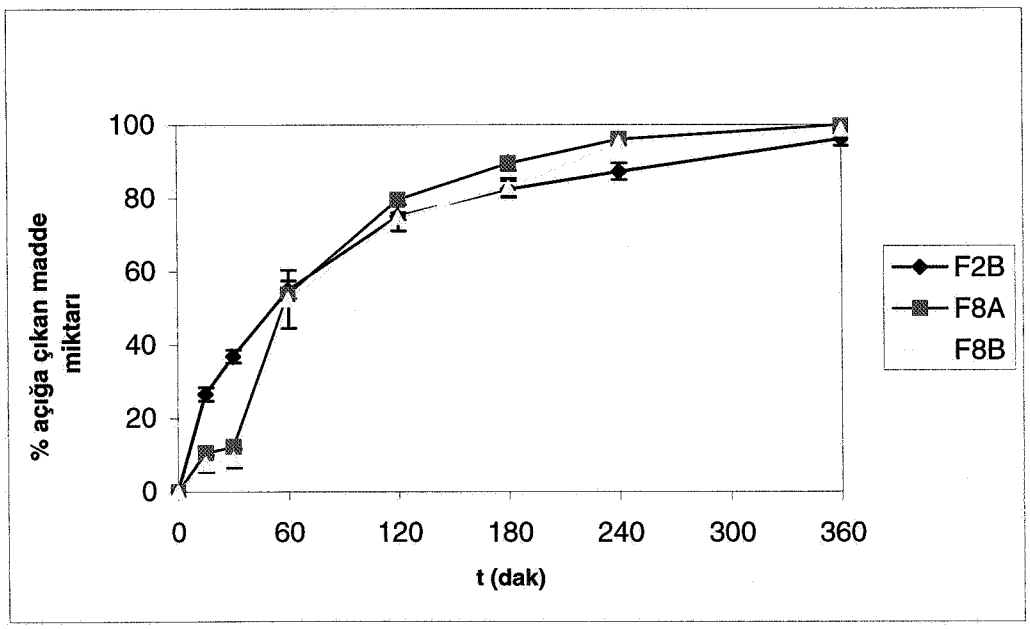
Şekil 3.36. pH 5,5' te hazırlanan F1A, F1B ve F1C formüllerin çözünme hızı profilleri



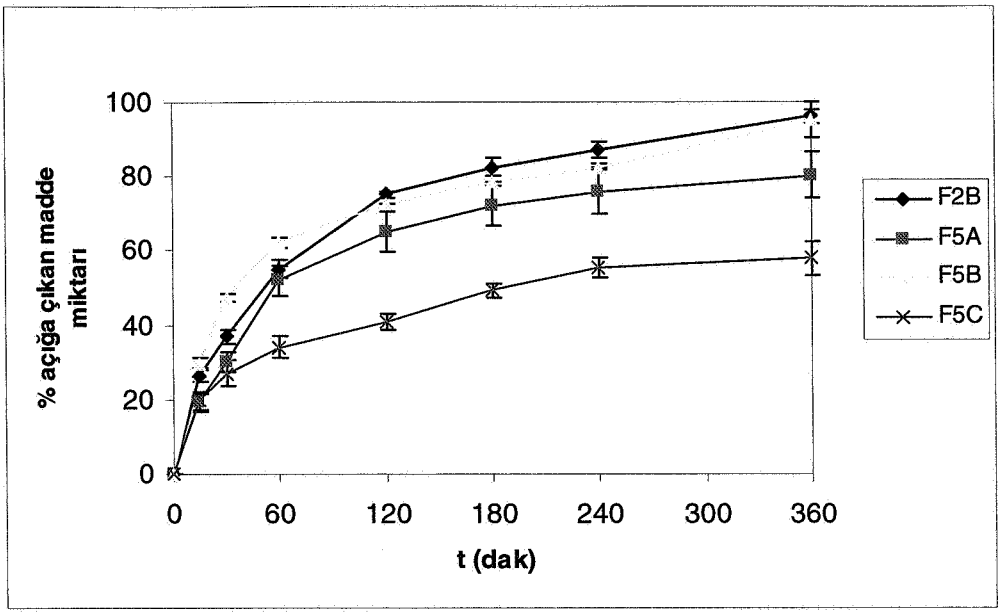
Şekil 3.37. pH 12' de hazırlanan F2A, F2B, F2C ve F2D formüllerinin çözünme hız profilleri



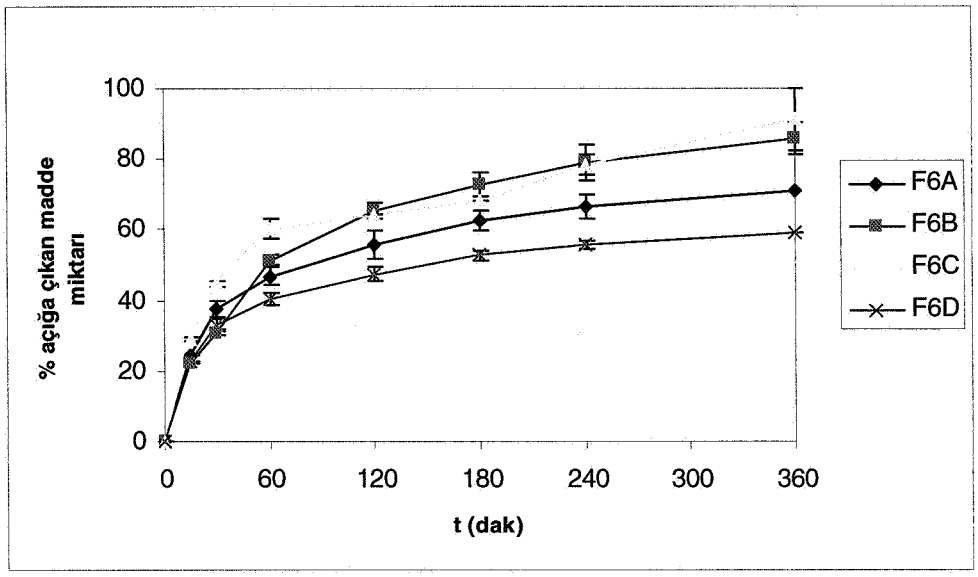
Şekil 3.38. Polimer miktarı ve karıştırma hızı arttırılarak hazırlanan F2C, F3 ve F4 formüllerinin çözünme hızı profilleri



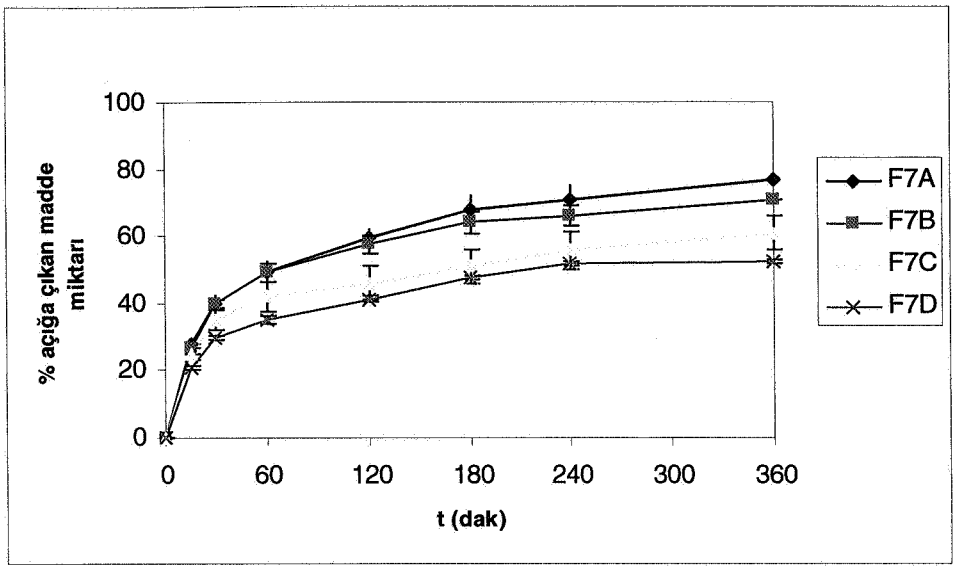
Şekil 3.39. Dış faz hacmi değiştirilerek hazırlanan F2B, F8A ve F8B formüllerinin çözünme hızı profilleri



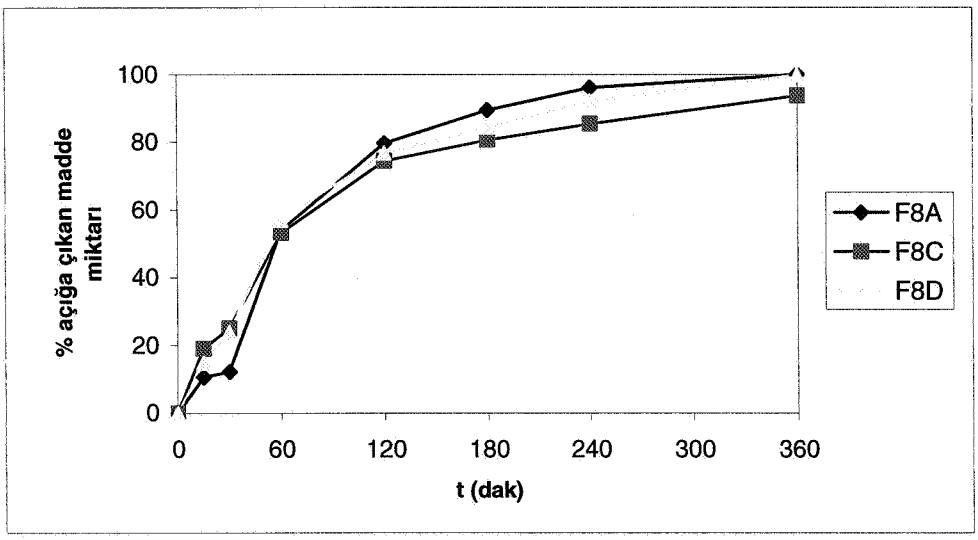
Şekil 3.40. 8000 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı profilleri



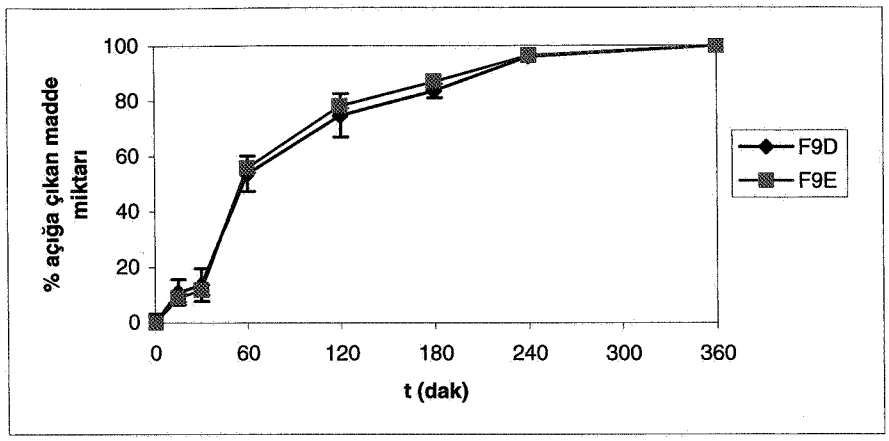
Şekil 3.41. 9500 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı profilleri



Şekil 3.42. 13500 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı profilleri



Şekil 3.43. 100 ml dış faz hacminde hazırlanan formüllere ait çözünme hızı profilleri



Şekil 3.44. Dış fazında Pluronik F68 içeren formüllere ait çözünme hızı profilleri

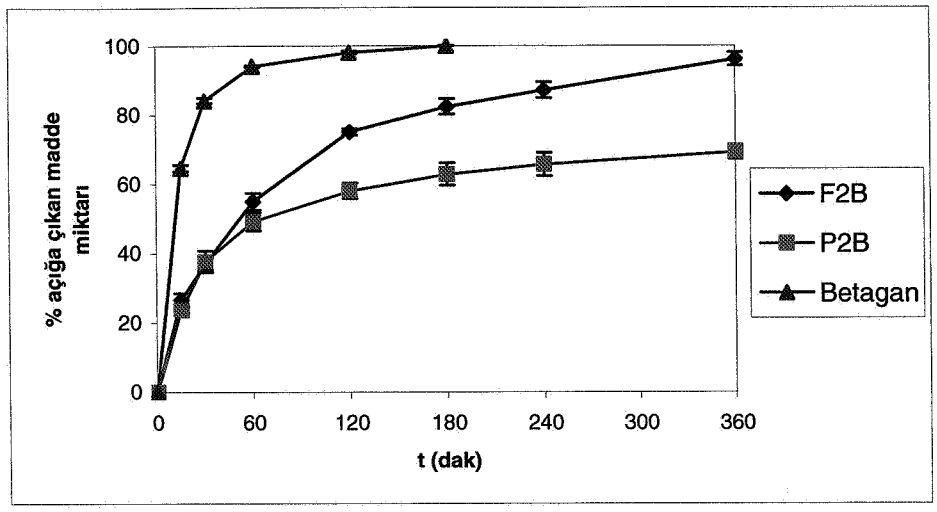
3.5. Partiküllerin Isıya Duyarlı Polimerik Jel İçerisinde Formüle Edilmesi

Pluronik F127' nin oda sıcaklığında akışkan bir sıvı, 35 °C' de jel oluşturması için gereken en düşük konsantrasyonun %20 olduğu görülmüştür. Hem buzdolabı (4 °C) sıcaklığında hem de 35° C' de çözeltilerin viskozluk değerleri Tablo 3.23' de verilmiştir. Viskozluk ölçümleri LV1 no' lu spindle ile alınmıştır.

Tablo 3.23. % 20 a/h Pluronik F127 çözeltisinin vizkozluk ölçümleri

Sıcaklık (°C)	Spindle Dönü Hızı (rpm)	Viskozluk (cPs)
4	50	34,6
35	50	21000

F2B formülü 100 µl % 20 Pluronik F127 jel içerisinde süspande edilerek hazırlanan formülasyonun (P2B) çözünme hızı profili Şekil 3.45' de verilmiştir.



Şekil 3.45. F2B ve bu formülün Pluronik F127 jel içerisinde hazırlanan örneğe ile Betagan®'a ait çözünme hızı profilleri

3.6. Levobunolol HCl içeren Ticari Göz Damlası Betagan®' ın Çözünme Hızı

Bölüm 2.5' te anlatıldığı şekilde belirlenen Betagan®'ın çözünme hızı deneyi yapılarak elde edilen profil Şekil 3.45' te verilmiştir.

3.7. Çözünme Hızına Ait Kinetik Verilerin Değerlendirilmesi

Bölüm 1.13.' de anlatıldığı gibi şekilde hesaplanan çözünme hızı kinetik verileri Tablo 3.24-3.32' de verilmiştir.

Tablo 3.24. pH 5,5' te hazırlanan F1A, F1B ve F1C formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	F1A	F1B	F1C
0 Derece	r^2	0,717	0,724	0,680
	k_0	-0,172	-0,237	-0,207
	S.H.	0,044	0,031	0,030
	RMS	217,9	330,1	310,0
1. Derece	r^2	0,833	0,662	0,829
	k_1	0,003	-0,160	-0,006
	S.H	0,001	0,003	0,001
	RMS	0,044	2,119	0,101
Higuchi	r^2	0,924	0,911	0,895
	k	3,875	5,297	4,727
	S.H	0,452	0,354	0,345
	RMS	58,19	106,8	101,4
Weibull	r^2	0,982	0,935	0,955
	β	0,497	0,154	0,616
	S.H	0,030	0,077	0,031
	τ_d	168,0	70.15	86,76
	RMS	0,001	0,027	0,004

Tablo 3.25. pH 12' de hazırlanan F2A, F2B, F2C ve F2D formüllerinin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	F2A	F2B	F2C	F2D
0 Derece	r^2	0,623	0,774	0,673	0,480
	k_0	-0,081	-0,235	-0,166	-0,189
	S.H.	0,014	0,027	0,025	0,049
	RMS	68,46	247,6	205,9	174,7
1. Derece	r^2	0,681	0,614	0,770	0,512
	k_1	-0,001	-0,120	0,003	0,003
	S.H	0,000	0,002	0,000	0,001
	RMS	0,009	1,411	0,046	0,032
Higuchi	r^2	0,852	0,950	0,882	0,744
	k	1,917	5,186	3,787	3,356
	S.H	0,183	0,254	0,295	0,492
	RMS	26,851	54,99	74,26	85,92
Weibull	r^2	0,909	0,912	0,914	0,657
	β	0,333	0,111	0,530	0,289
	S.H	0,026	0,055	0,037	0,058
	τ_d	2357	77,27	185,3	591,0
	RMS	0,003	0,014	0,006	0,008

Tablo 3.26. Polimer miktarı ve karıştırma hızı arttırılarak hazırlanan F3 ve F4 formüllerinin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	F3	F4
0 Derece	r^2	0,731	0,428
	k_0	-0,094	-0,152
	S.H.	0,012	0,037
	RMS	49,66	496,5
1. Derece	r^2	0,784	0,380
	k_1	-0,001	-0,005
	S.H	0,000	0,001
	RMS	0,007	0,662
Higuchi	r^2	0,924	0,565
	k	2,098	3,412
	S.H	0,128	0,639
	RMS	14,03	377,9
Weibull	r^2	0,968	0,374
	β	0,381	0,337
	S.H	0,016	0,100
	τ_d	1712,3	115,4
	RMS	0,001	0,071

Tablo 3.27. 8000 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	F5A	F5B	F5C
0 Derece	r^2	0,705	0,717	0,740
	k_0	-0,201	-0,211	-0,136
	S.H.	0,028	0,028	0,017
	RMS	261,0	269,5	100,3
1. Derece	r^2	0,782	0,582	0,806
	k_1	0,005	-0,015	-0,002
	S.H	0,001	0,003	0,000
	RMS	0,095	2,520	0,018
Higuchi	r^2	0,885	0,914	0,910
	k	4,490	4,737	3,008
	S.H	0,346	0,309	0,201
	RMS	101,9	81,48	34,52
Weibull	r^2	0,897	0,790	10,901
	β	0,663	0,704	0,441
	S.H	0,052	0,083	0,034
	τ_d	132,4	68,20	454,5
	RMS	0,012	0,031	0,005

Tablo 3.28. 9500 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	F6A	F6B	F6C	F6D
0 Derece	r^2	0,692	0,616	0,724	0,658
	k_0	0,160	-0,196	-0,197	0,125
	S.H.	0,023	0,033	0,029	0,021
	RMS	174,5	367,02	271,4	139,2
1. Derece	r^2	0,808	0,585	0,745	0,768
	k_1	0,003	-0,005	-0,004	-0,002
	S.H	0,000	0,001	0,001	0,000
	RMS	0,035	0,271	0,079	0,022
Higuchi	r^2	0,898	0,784	0,894	0,878
	k	3,624	4,393	4,418	2,913
	S.H	0,261	0,492	0,359	2,250
	RMS	58,14	206,4	104,5	49,85
Weibull	r^2	0,939	0,699	0,913	0,943
	β	0,454	0,577	0,471	0,378
	S.H	0,027	0,087	0,040	0,023
	τ_d	194,3	105,7	106,5	410,9
	RMS	0,003	0,034	0,005	0,002

Tablo 3.29. 13500 rpm karıştırma hızında hazırlanan formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	F7A	F7B	F7C	F7D
0 Derece	r^2	0,674	0,655	0,605	0,650
	k_0	0,0173	-0,155	-0,124	-0,114
	S.H.	0,026	0,024	0,023	0,018
	RMS	221,9	192,79	173,1	106,6
1. Derece	r^2	0,791	0,775	0,677	0,739
	k_1	0,004	-0,003	-0,002	-0,002
	S.H	0,000	0,000	0,000	0,000
	RMS	0,056	0,038	0,038	0,017
Higuchi	r^2	0,839	0,876	0,805	0,870
	k	3,838	3,555	2,895	2,616
	S.H	0,359	0,285	0,327	0,215
	RMS	109,7	69,48	85,41	39,51
Weibull	r^2	0,914	0,933	0,796	0,921
	β	0,530	0,421	0,349	0,986
	τ_d	185,3	184,5	421,3	0,023
	S.H	0,037	0,026	0,044	681,3
	RMS	0,006	0,003	0,008	0,003

Tablo 3.30. 100 ml dış faz hacminde hazırlanan formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	F8A	F8B	F8C	F8D
0 Derece	r^2	0,743	0,790	0,766	0,796
	k_0	-0,267	-0,293	-0,247	-0,271
	S.H.	0,033	0,032	0,029	0,029
	RMS	378,2	349,98	284,7	288,8
1. Derece	r^2	0,638	0,764	0,567	0,827
	k_1	-0,017	-0,018	-0,012	-0,022
	S.H	0,003	0,002	0,002	0,002
	RMS	2,407	1,587	1,624	1,520
Higuchi	r^2	0,872	0,902	0,919	0,942
	k	5,751	6,227	5,373	5,866
	S.H	0,470	0,437	0,339	0,311
	RMS	188,7	162,7	98,01	82,75
Weibull	r^2	0,879	0,910	0,891	0,952
	β	1,238	1,466	0,907	1,163
	S.H	0,105	0,106	0,073	0,050
	τ_d	104,9	105,8	94,08	81,71
	RMS	0,050	0,051	0,024	0,016

Tablo 3.31. Dış fazında Pluronik F68 içeren formüllerin çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	F9D	F9E	F10A
0 Derece	r^2	0,803	0,784	0,708
	k_0	-0,289	-0,293	-0,211
	S.H.	0,031	0,033	0,055
	RMS	314,9	362,9	344,4
1. Derece	r^2	0,827	0,882	0,969
	k_1	0,019	-0,023	-0,008
	S.H	0,002	0,002	0,001
	RMS	0,794	1,070	0,035
Higuchi	r^2	0,922	0,911	0,914
	k	6,164	6,285	4,768
	S.H	0,381	0,418	0,598
	RMS	123,9	148,7	101,7
Weibull	r^2	0,938	0,957	0,975
	β	1,309	1,438	0,589
	S.H	0,081	0,070	0,042
	τ_d	94,03	91,71	65,30
	RMS	0,025	0,022	0,003

Tablo 3.32. Betagan®'a ve F2B formülün Pluronik F127 jel içerisinde hazırlanan örneğe ait çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirilmesi

Model	İstatistik	Betagan®	P2B
0 Derece	r^2	0,472	0,647
	k_0	-0,378	-0,154
	S.H.	0,100	0,024
	RMS	725,8	199,6
1. Derece	r^2	0,932	0,753
	k_1	-0,045	0,003
	S.H	0,003	0,000
	RMS	0,687	0,043
Higuchi	r^2	0,738	0,868
	k	6,827	3,559
	S.H	0,977	0,295
	RMS	338,8	74,47
Weibull	r^2	0,943	0,913
	β	0,791	0,448
	S.H	0,054	0,032
	τ_d	14,85	192,07
	RMS	0,007	0,005

4. TARTIŞMA

4.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi

4.1.1. Etkin Maddenin UV Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Etkin maddenin pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde ve distile suda hazırlanan belirli konsantrasyondaki çözeltilerinin UV spektrofotometrede maksimum pik verdiği dalga boylarının Merck Index (1996)' de belirtilen değerlere uygun olduğu, her iki ortamdaki spektrum şekillerinin de benzer olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1).

4.1.2. Etkin Maddenin Kalibrasyon Doğrularının Değerlendirilmesi

Etkin maddenin pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisine (Şekil 3.2, Tablo 3.2) ve distile suya (Şekil 3.3, Tablo 3.3) ait kalibrasyon doğrularının r^2 değerlerinin yüksek, Sy.x değerlerinin düşük bulunması, okunan absorbanslarda bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar olacağını belirtmektedir. Etkin maddenin her iki ortama ait kalibrasyon doğrularının kesişim değerleri sıfırı içermektedir.

4.1.3. Etkin Maddenin Analitik Validasyonunun Değerlendirilmesi

4.1.3.1. Doğrusallık ve Aralığı

Etkin maddenin pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinden (Şekil 3.4, Tablo 3.16) ve distile su ortamlarından (Şekil 3.5, Tablo 3.17) alınan 7 noktadan elde edilen doğrulara ait r^2 değerlerinin yüksek, Sy.x. değerlerinin düşük olması nedeniyle, ölçüm yapılacak numune içindeki etkin madde miktarının test sonuçları ile orantılı olacağı belirlenmiştir. Doğrusallığın sağlandığı en düşük konsantrasyonun 0,0015 mg/ ml olduğu tespit edilmiştir.

4.1.3.2. Doğruluk

Etkin maddenin pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde (Tablo 3.5) ve distile suda (Tablo 3.7) yapılan doğruluk testine ait verilerin bağıl standart sapma (%) değerlerinin % 2'den küçük olması nedeniyle doğruluk tespit edilmiştir.

4.1.3.3. Kesinlik

Etkin maddenin pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde ve distile suda üçer konsantrasyonda gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik deneylerinden elde edilen verilerin bağıl standart sapma değerleri tekrarlanabilirlik için % 5' den küçük bulunmuştur (Tablo 3.13, 3.15). Tekrar elde edilebilirlik için ise ikişerli gruplarda, ortalamalar arası farkın önemlilik testi uygulanmış ve gruplara ait ortalamalar arasında %95 olasılık seviyesinde farkların önemli olmadığı belirlenmiştir (Tablo 3.9, 3.11). Bu sonuçlar yöntemin tekrarlanabilirliğinin ve tekrar elde edilebilirliğinin olduğunu göstermektedir.

4.1.3.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Etkin maddenin pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde ve distile suda tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonun 0,000127 mg, distile su için 0,0002759 mg olarak bulunmuştur (Tablo 3.18). Bu değerlerden daha düşük etkin madde konsantrasyonu hesaplanmamıştır.

4.1.3.4. Stabilite

Bir hafta boyunca hem buzdolabında (4 °C) hem de oda sıcaklığında (25 °C) bekletilen numunelerin iki günde bir alınan absorbanslarından hesaplanan konsantrasyon değerlerinin değişmemesi etkin maddenin her iki ortamda da stabil olduğunu göstermektedir (Tablo 3.19).

4.2. Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

4.2.1. Nanopresipitasyon Yöntemi

Bu yöntem kullanılarak beklenildiği gibi levobunolol HCl' den baz formunda toz şeklinde bir kütle elde edilememiş, verimli bir sonuç alınamamıştır. Aynı yöntemle Govender ve ark., (1999) tarafından prokainhidroklorürden prokain dihidrat kristallerinin elde edilmesinin maddenin yapısal özelliği ile ilgili olduğunu düşündürmektedir.

Maddenin baz formu için uygun olan Fessi ve ark., (1989)' nın yöntemi yerine hidrofilik etkin maddeler için uygun olan nanopresipitasyon yöntemi kullanılmıştır (Peltonen ve ark., 2004). Bu yöntemle partiküller hazırlanırken çözücüyü ortamdan uzaklaştırmak için su trompu, rotasyon evaporatörü ve azot gazı kullanılmasına rağmen partiküllerin agregasyonun engellenememiştir. Bu yöntemin formülasyonlarımızı hazırlamak için uygun olmadığını görülmüştür. Bu nedenle çoklu emülsiyon (s/y/s) çözücü buharlaştırma yöntemiyle formülasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

4.2.2 Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Formülasyon Çalışmaları

- **Metilen Mavisi Yüklü Partikülleri Oluşturulması**

Literatür araştırması sonucu çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi Levobunolol HCl gibi hidrofilik etkin maddeler için en uygun yöntem olduğu bulunmuştur (Alex ve Bodmeier, 1990; Iwata ve Mc Ginity, 1992; Blanco ve Alonso, 1997; Lemoine ve Préat 1998; Pérez ve ark.,2000; Ubrich ve ark., 2004) Ön çalışma olarak etkin madde yerine metilen mavisi kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda metilen mavisi yüklü partiküllerin oluştuğu gözlenmiştir.

4.3. Çoklu Emülsiyon (S/Y/S) Çözücü Buharlaştırma Yöntemiyle Formülasyonlarda İşlem Etkinliğinin Değerlendirilmesi

- **Dış Fazın pH' sı ve % PVA Konsantrasyonunun Etkisi**

Dış fazın pH' sının 5,5' ten 12' ye arttırılması her üç PVA konsantrasyonunda da (% 0,25, 0,5 ve 1) işlem etkinliğini artırmıştır (Tablo 3.20). Levobunolol HCl pKa' sı 9,32 olan zayıf bazik bir madde olup, kendi pKa değerinin üstündeki pH' larda noniyonize formdadır. pH 12' de etkin maddenin iyonizasyon derecesinin azalmasından dolayı etkin maddenin suda daha az çözünür formda bulunması işlem etkinliğini arttırmıştır. Bu sonuçlar Bodmeier ve McGinity, (1988); Jones ve ark., (1995); Govender ve ark., (1999); Pérez ve ark., (2000), Ubrich ve ark., (2004) ile aynı doğrultudadır.

Her iki pH' da da en yüksek işlem etkinliği % 0,5 PVA içeren formüllerde (F1B ve F2B) elde edilmiştir (Şekil 3.6-3.7). pH 5,5' te PVA konsantrasyonu %1' e ve % 1,5' e arttırıldığında işlem etkinliği azalmıştır (%17,36' dan %10,18'e ve %30,6' dan % 15,38' e)(Tablo 3.20).

Dış fazda PVA konsantrasyonu % 1 olduğunda PVA' nın emülsiyonun stabilizasyonunu sağlamadığı ve partiküllerin koalesansına neden olduğu, daha büyük ve zayıf şekillenmiş mikroküreler veya çökmüş partiküller oluşturduğu belirtilmektedir (Huatan ve ark.,1995). Yüksek PVA konsantrasyonunun partiküllerde işlem etkinliğini azalttığı belirtilmektedir. Bu durum etkin madde moleküllerinin PVA moleküllerine bağlanarak partikül oluşumu esnasında etkin madde kaybına neden olması ile açıklanmaktadır. Formüllerin hazırlanmasında en uygun stabilizör oranının belirlenmesinin hem nanoküreler hem de mikroküreler için önemli olduğu belirtilmiştir (Feng ve Huang, 2001).

Sonuçta hem dış fazın pH' sının 5,5' ten 12' ye arttırılması, hem de % PVA konsantrasyonunun 0,25' ten 0,5' e arttırılması ile işlem etkinliğinde 10 kat artış sağlanmıştır. (F1A: 3,78' den F2B: 30,6' ya) (Tablo 3.20).

- **Karıştırma Hızı ve Etkin Madde Miktarının Etkisi**

10 mg etkin madde içeren formüllerde karıştırma hızı azaldıkça işlem etkinliği artmıştır (Şekil 3.8). Karıştırma hızı 8000 rpm olan F2B kodlu formülde en yüksek işlem etkinliği (%30,06) elde edilmiştir (Tablo 3.20).

20 mg etkin madde içeren formüllerde 9500 ve 13500 rpm karıştırma hızlarının işlem etkinliği üzerine etkisi bulunmamaktadır (%10,24-10,22). Karıştırma hızı 8000 rpm' e azaltıldığında ise işlem etkinliği %15,28' e kadar artmıştır.

40 mg etkin madde içeren formüllerde 8000 rpm' de yine yüksek işlem etkinliği bulunmuştur (% 22,61). 10 mg ve 20 mg etkin madde içeren formüllerden farklı olarak 13500 rpm' de işlem etkinliği de artmıştır (Şekil 3.10)

60 mg etkin madde içeren formüllerde ise en yüksek işlem etkinliği 13500 rpm karıştırma hızına sahip formülde görülmüştür (F7D %20,30). 8000 rpm'de işlem etkinliği % 16,47 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak tüm formüller birarada değerlendirildiğinde 20 mg. etkin madde kullanıldığında tüm karıştırma hızlarında en düşük işlem etkinliğine sahip formüller elde edilmiştir (F5A, F6B, F7B)(Tablo 3.20).

En yüksek işlem etkinliği 10 mg etkin madde içeren ve 8000 rpm karıştırma hızında hazırlanan formülle elde edilmiştir (F2B %30,06). Etkin madde miktarı arttıkça iç faz ile dış faz arasındaki ozmotik basınç farkı artmaktadır. Artan ozmatik basınç farkı iç fazdan dış faza geçen etkin madde miktarını arttırmaktadır. Bu nedenle etkin madde miktarı arttıkça işlem etkinliği azalmaktadır (Alex ve Bodmeier, 1990). Polimerin etkin maddeyi hemen kaplamaması da etkin madde kaybına neden olmaktadır. Çoklu emülsiyon oluşumunda polimer iç faz ile dış faz arasında bariyer oluşturmaktadır. İki faz arasındaki değişim (etkin madde miktarı arttığında) primer emülsiyonunu stabil olmamasına ve etkin maddenin dış fazdaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle etkin madde kaybına neden olmaktadır (Lamprecht ve ark., 1999). Bu nedenle etkin madde miktarı artıkça daha fazla yükleme etkinliğine sahip formüller hazırlamak için karıştırma hızının da arttırılması gerekmektedir.

Karıştırma hızı arttırıldığında 60 mg etkin madde içeren primer emülsiyonun daha stabil olduğu düşünülmektedir.

- **Dış Faz Hacminin Etkisi**

En yüksek işlem etkinliği etkin madde miktarı 10 mg olan ve karıştırma hızı 8000 rpm olan F2B formülü ile elde edildiğinden sabit karıştırma hızında (8000 rpm) dış faz hacmi 100 ml' ye ve 50 ml' ye azaltılarak işlem etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 3.15 a). Dış faz hacmi 100 ml olan F8A formülü ile en yüksek işlem etkinliği elde edilmiştir (% 36,78). En düşük işlem etkinliği ise dış faz hacmi 50 ml olan formülde bulunmuştur. Her iki dış faz hacmi(100 ml ve 200 ml) karşılaştırıldığında 100 ml dış faz hacmi ile daha yüksek işlem etkinliğine sahip partiküller elde edilmiştir (F8A, F8D, F8E) (Şekil 3.15 b). Sonuçta 100 ml dış faz hacmi bulunan F8A ile yükleme etkinliği %36,78' e ulaşmıştır (Tablo 3.20).

Karıştırma hızının etkisinin, dış fazın daha küçük hacimlerinde daha fazla olması ile ilgilidir. Bu sonuçlar Alex ve Bodmeier (1990) ile aynı doğrultudadır.

- **Pluronik F68' in Etkisi**

Etkin madde miktarı 10 mg, karıştırma hızı 8000 rpm olan formülde dış faz stabilizörü olarak % 0,5 ve %1 oranında Pluronik F68 kullanıldığında formüllerin elde edilemediği görülmüştür (F9F, F9G). 10 mg yerine 60 mg etkin madde kullanıldığında (F9C, F9D, F9E) Pluronik F68 ile % 0,5, 1 ve %1,5 oranlarında yeni formüller hazırlanmıştır. 13500 rpm karıştırma hızı kullanılarak Pluronik F68' in %0,25 ve %0,5 oranları ile formüller hazırlanmıştır. Bu oranlar ve 13500 rpm karıştırma hızında da sonuç elde edilememiştir. Bunlardan karıştırma hızı 8000 rpm olan ve % 0,5 pluronik F68 içeren formül (F9C) ile partiküller elde edilmesine rağmen etkin madde yüklenememiş, %1 ve %1,5 Pluronik F68 içeren formüllerde ise işlem etkinliği sırasıyla % 5 ve % 4 olarak bulunmuştur (Tablo 3.20, Şekil 3.16). Bu sonuçlara göre Pluronik F68'in %1 ve

%1,5 konsantrasyonlarda 60 mg etkin madde içeren emülsiyonun stabilitesini sağladığı düşünülmektedir.

- **Polimer Miktarı**

Polimer miktarının 250 mg' dan (F2C) 500 mg' a arttırılması (F3, F4), primer emülsiyonun viskozluğunu arttırmış, polimer fazın difüzyon hızını azaltmış ve etkin maddenin dış faz ile temas süresini arttırarak, işlem etkinliğini azaltmıştır (Tablo 3.20). Bu sonuçlar Alex ve Bodmeier, (1990)' ın çalışmaları ile benzer bulunmuştur.

4.4. Partiküllerin Yüzey Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.4.2.' de verilen formüllerin taramalı elektron mikrografları incelendiğinde % 0,5 PVA içeren pH 5,5'te hazırlanan F1B formülünün küresel ve yüzeyinin düzgün olduğu görülmektedir (Şekil 3.17). PVA oranı % 1'e arttırıldığında ise küreselliğin azaldığı ve PVA kalıntısı uzantılarının bulunduğu görülmektedir (Şekil 3.18).

pH 12' de hazırlanan ve % 0,25 PVA içeren F2A formülünün de küresel olduğu ancak agregatlar oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 3.19). Bu oluşum, Pèrez ve ark., (2000) tarafından bulunan sonuçlarla uyumludur. Oluşan agregatlar partikül büyüklüğünü arttırmıştır. % 0,5 PVA içeren F2B'nin yüzeyleri düzgün ve küresel olduğu görülmektedir (Şekil 3.20). PVA oranı % 1'e arttırıldığında ise (Şekil 3.21) F2C formülünün stabil olmadığı, oldukça küçük partiküllerin agregatlar oluşturması nedeniyle partikül büyüklüğünün yüksek bulunduğu düşünülmektedir.

Sonuçta hem pH 5,5' te hem de pH 12' de PVA oranı % 1 olduğunda partikül yüzeyinde PVA uzantılarının bulunduğu ve partiküllerin agregatlar oluşturduğu belirlenmiştir. Hem pH 5,5' ta hem de pH 12 için en uygun PVA oranı % 0,5 olarak tespit edilmiştir.

Polimer oranı 250 mg' dan 500 mg' a iki katına arttırılan F3 formülünde; partiküller küresel ve yüzeyleri pürüsüzdür. Şekil 3.22' de içi etkin madde yüklü partiküller görülmektedir. Partikülün iç yapısında boşluk veya porozite bulunmamaktadır. Bu sonuçlar Jeong ve ark., (2003)'nın çalışmaları ile aynı doğrultudadır.

Etkin madde miktarı 10 mg' dan 60 mg' a arttırıldığında F5C formülünde partikül büyüklüğü artmıştır (Şekil 3.23). 13500 rpm' de 60 mg etkin madde içeren F7D formülünün küresel olduğu ve yüzeylerinin F7A formülüne göre daha düzgün olduğu ve partikül büyüklüğünün arttığı görülmektedir (Tablo 3.21). Partikül büyüklüğünün artması yüzey alanını azalttığı için PVA kalıntısı azalmıştır (Lee ve ark., 1999).

Karıştırma hızı arttıkça F2B (8000 rpm) (Şekil 3.20), F6A (9500 rpm) (Şekil 3.24) ve F7A (13500 rpm) (Şekil 3.25) partikül büyüklüğünün azaldığı görülmektedir (Tablo 3.21). Partikül büyüklüğü azaldıkça yüzey alanı artmakta ve partikül yüzeyinde bulunan PVA miktarı artmaktadır (Lee ve ark., 1999). Bu nedenle partikül büyüklüğü daha yüksek, PVA kalıntısı daha az olan F2B fomülünün yüzeyi daha düzgündür.

Dış faz hacmi 200 ml' den 100 ml' ye azaltılarak hazırlanan F8A formülünde partiküllerin küresel, yüzeylerinin düzgün ve pürüzsüz olduğu görülmektedir (Şekil 3.27). Dış faz hacmi 50 ml' ye azaltılan F8B formülünde ise agragasyonun hiç oluşmadığı, partikül yüzeylerinin düzgün ve küresel olduğu görülmektedir (Şekil 3.28). Bu durum karıştırmanın etkinliğinin küçük hacimlerde tüm yüzeylere eşit olmasıyla ilgilidir (Alex ve Bodmeier, 1990). Dış faz hacmi azaltıldığında birim yüzeydeki PVA miktarının azalması da yüzeylerinin pürüzsüz olmasını sağlamaktadır.

Dış fazında Pluronik F68 içeren F9D formülünün taramalı elektron mikrografı incelendiğinde küresel partiküllerin oluşmadığı görülmektedir. Oluşan partiküllerin ise farklı şekillerde ve büyüklüklerde oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 3.29).

4.5. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Değerlendirilmesi

Tablo 3.21 incelendiğinde F2A, F2C, F2D, F3, F5A, F6B, F8B ve F10A formülleri hariç bütün formüllerde partikül büyüklüğü 10 μm' nin altında bulunmuştur. Göze uygulanan partiküllerin irritasyonu en aza indirmek için 10 μm'den az olması gerektiği Sieg ve Robinson, (1975) tarafından belirtilmektedir. Hazırlanan formüllerin göze uygulanabilecek partikül büyüklüğüne sahip olduğu görülmektedir.

Dış fazın pH' sı pH 5,5 olan ve % 0,25, % 0,5 ve % 1 PVA içeren formüllerde partikül büyüklükleri sırasıyla 7,466 μm, 5,819 μm ve 4,779 μm olarak bulunmuştur. Yani PVA oranı arttıkça partikül büyüklüğü azalmıştır. Bu sonuçlar Feng ve Huang, (2001)'ın çalışmaları ile aynı doğrultudadır. pH 12' de de aynı şekilde PVA oranı % 0,25' de % 0,5' e arttırıldığında partikül büyüklüğü 19,89 μm' den 7,89 μm' ye azalmıştır. PVA oranı % 1 ve % 1,5 olduğunda ise partikül büyüklüğünde 129,1 μm ve 148,9 μm gibi yüksek değerler elde edilmesinin partiküllerin agregasyonundan kaynaklandığı Şekil 3.21' den de görülmektedir.

Karıştırma hızı arttıkça daha küçük partiküller oluştuğu çalışmalarda belirtilmektedir (Ubrich ve ark., 2004; Rosca ve ark., 2004). Çalışmamızdaki sonuçlar incelendiğinde de benzer bulgular elde edilmiştir.

10 mg etkin madde içeren formüllerde karıştırma hızı 8000 rpm' den (F2B) 9500 rpm' e (F6A) arttırıldığında partikül büyüklüğü 7,882 μm'den 2,872 μm'ye azalmış, 13500 rpm'de ise (F7A) karıştırma hızının partikül büyüklüğüne etkisi olmamıştır (4,469μm) (Tablo 3.21).

20 mg etkin madde içeren formüllerde karıştırma hızı 8000 rpm' den (F5A) 9500 rpm'e (F6B) arttırıldığında partikül büyüklüğü 25,54 μm'den 14,55 μm'ye azalmış, 13500 rpm' e arttırıldığında ise (F7B) partikül büyüklüğü 7,176 μm' ye kadar azalmıştır (Tablo 3.21).

40 mg etkin madde içeren formüllerde karıştırma hızı 8000 rpm' den (F5B) 9500 rpm' e (F6C) arttırıldığında partikül büyüklüğü 5,628 μm'den 3,370 μm'ye azalmıştır. Karıştırma hızı 13500 rpm' e arttırıldığında (F7C) partikül büyüklüğünde azalma tespit edilmemiştir (Tablo 3.21).

60 mg etkin madde içeren formüllerde karıştırma hızı 8000 rpm'den (F5C) 9500 rpm'e (F6D) arttırıldığında partikül büyüklüğü 8,118 μm'den 4,223μm'ye azalmıştır. Karıştırma hızı 13500 rpm' e arttırıldığında (F7D) partikül büyüklüğünü etkilememiştir (Tablo 3.21).

Sonuç olarak karıştırma hızı 8000 rpm' den 9500 rpm' e arttırıldığında bütün etkin madde miktarlarında (10 mg, 20 mg, 40 mg ve 60 mg) partikül büyüklüğü azalmıştır. Karıştırma hızı 13500 rpm' e arttırıldığnda 20 mg etkin madde içeren formül hariç partikül büyüklüğüne etkisi olmadığı görülmektedir.

Dış faz hacmi 200 ml' den (F2B) 100 ml' ye (F8A) azaltıldığında partikül büyüklüğü 7,882 μm' den 9,866 μm' ye artmış, 50 ml' ye (F8B) azaltıldığında ise 27,15 μm' ye artmıştır. Dış faz hacmi azaldıkça partikül büyüklüğü artmıştır. Bu sonuç Benoit ve ark., (1999) ile aynı doğrultudadır.

İç faza % 6 Pluronik F68 eklenen F10A formülünde partikül büyüklüğü 7,882 μm (F2B)' den 177,4 μm' ye artmıştır. Bu artışın gerçek partikül büyüklüğünü mü yansıttığı yoksa agregatlar oluşturması ile mi ilgili olduğu anlaşılamamıştır. Elde edilen sonuçlar, Lamprecht ve ark., (1999)' nın iç faza bir yüzey etkin maddenin ilave edilmesinin partikül büyüklüğünü azaltacağı yönündeki sonuçlarla bağdaşmamaktadır. Bu durumda agregasyon ihtimali öne çıkmaktadır. Bu da zeta potansiyelinin –36,21 mV gibi bir değere sahip olması ile çelişki yaratmaktadır. Bu formülün taramalı elektron mikrografının olmaması kesin sonucun anlaşılmasını güçleştirmektedir.

Polimer miktarı iki katına arttırıldığında partikül büyüklüğünün arttığı görülmektedir; ancak bu sonucun gerçek partikül büyüklüğünü yansıtmadığı düşünülmektedir. Jeong ve ark., (2003)' a göre de polimer miktarı arttıkça partikül büyüklüğü artmaktadır.

Sonuç olarak iç faz emülsiyonun stabilitesini arttırarak, oluşan damlacıkların koalesansını engelleyecek yüzey etkin maddelerin eklenmesinin partikül büyüklüğünü azaltacağı düşünülmektedir (Lamprecht ve ark.,1999).

4.6. Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Yüksek zeta potansiyel değeri formüllerin stabilitesinin iyi olduğunu göstermektedir. Zeta potansiyeli 25-30 mV (pozitif veya negatif) olduğunda daha stabil partiküllerin oluşması sağlanarak agregasyon oluşumu önlenmektedir (Leroueil- Le Verger ve ark., 1998; Couvreur ve ark., 2002). F1A, F2B, F3, F4, F5C, F6C, F7B, F8C, F9D ve F10A' nın zeta potansiyel değerleri –19 mV' nin üzerinde bulunmuştur (Tablo 3.22).

pH 5,5' ta hazırlanan formüllerde % 0,25 PVA içeren F1A formülünün zeta potansiyel değeri en yüksektir (-31,30 mV). pH 12' de ise % 0,5 PVA içeren F2B formülünün zeta potansiyeli (-19,76 mV) kendi grupları içerisinde en yüksek değerleri veren sonuçlardır.

F2C formülünde zeta potansiyeli değerinin –5,993 mV bulunması, bu formülde görülen agregasyonun nedenlerinden biri olarak değerlendirilebilir.

4.7. Termal Analizlerin Değerlendirilmesi

Polimerin DSC analizi literatürde belirtildiği gibidir (Jiang ve ark., 2003). Şekil 3.36' da verildiği gibi Levobunolol HCl' in erime piki 210,22 °C' dir. Yarıkristal polimer PCl 66,49 °C' de erime piki vermektedir (Şekil 3.35).

Genellikle polimer ile etkin madde arasında güçlü etkileşimler olduğunda erime sıcaklığı belirgin şekilde azalmaktadır. Bu durum 60 mg etkin madde içeren PCL formülünde de gözlenmiştir. Polimerin erime sıcaklığı 66,49 °C' den 59,05 °C' ye azalmıştır. Etkin maddenin erime sıcaklığı pikinin kaybolması, etkin madde ile polimer arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Etkin maddenin polimer içinde amorf faza dönüştüğünü veya çözündüğünü göstermektedir (Şekil 3.35) (Pèrez ve ark., 2000; Jeong ve ark., 2003; Ubrich ve ark., 2004).

PCL'nun etkin madde yüklü partiküller içinde de erime sıcaklığı ile karakterize edilmesi, polimerin yarıkristal yapısını koruması ile ilgilidir (Ubrich ve ark., 2004).

4.8. Çözünme Hızı Profillerinin Değerlendirilmesi

Levobunolol HCl' in her bir formül için pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisindeki çözünme hızı profilleri Bölüm 3.4.6.' da verilmiştir. Bütün formüllerde başlangıçta hızlı etkin madde salımı meydana gelmiştir. S/Y/S çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan partiküllerde hidrofilik etkin maddenin sulu faza doğru eğilimi sonucunda partikül yüzeyinde toplanan etkin madde hızlı salınıma (burst etkiye) neden olmaktadır. Bu durum etkin maddenin partikül içine tamamen hapsolamadığını, polimerin suda çözünür olmaması, suda çözünen partiküllerin dış yüzeye yakın olması ile hızlı salıma neden olduğunu düşündürmektedir (Govender ve ark., 1999; Pèrez ve ark., 2000).

Genel olarak tüm formüllerde ilk 15. dakikada gerçekleşen hızlı salımı takiben 6 saat boyunca daha yavaş salım tespit edilmiştir

Polimer olarak kullanılan PCL' nun yarıkristal yapıda olması nedeniyle polimer matristen çözücü buharlaştırması sırasında oluşan porlardan su kolayca geçebilmektedir. Böylece suda çözünebilen etkin maddelerin porlardan diffüzyonla geçerek salımı kolaylaşmaktadır (Pèrez ve ark., 2000; Jeong ve ark., 2003).

PVA oranı arttıkça hem pH 5,5' te hem de pH 12' de hazırlanan formüllerde en düşük salım %0,25 PVA konsantrasyonunda, en yüksek salım hızı ise % 0,5 PVA konsantrasyonunda gözlenmiştir (Şekil 3.36-3.37). Bu durum işlem etkinliği ile paralellik göstermektedir (Tablo 3.20).

Polimer miktarının iki katına çıkması ile çıkış hızında belirgin bir azalma görülmektedir (Şekil 3.38). Taramalı elekron mikrografında görüldüğü gibi (Şekil 3.22) polimer miktarı arttıkça oluşan agregatların etkin maddenin çıkışını azalttığı düşünülmektedir.

8000 rpm, 9500 rpm ve 13500 rpm' de (Şekil 3.40-3.42) en yavaş etkin madde çıkışı 60 mg için gözlenmiştir. 60 mg etkin madde içeren formüllerde (F5C, F6D, F7D) etkin madde salımının daha yavaş olduğu tespit edilmiştir. Artan etkin madde miktarı ile etkin madde-polimer arasındaki etkileşimlerin

daha güçlü olması nedeniyle etkin madde salım hızının azalabileceği Ubrich ve ark., (2004) tarafından da ifade edilmektedir.

8000 rpm' de ve 13500 rpm' de (Şekil 3.40, 3.42) en hızlı etkin madde çıkışı 10 mg etkin madde yüklenen formüllerde görülmüştür (F2B, F7A). Çözünme hızlarındaki bu artışların; F2B formülünde yükleme etkinliğinin %30,60 gibi yüksek bir değerde olması nedeniyle, F7A formülünde ise partikül büyüklüğünün kendi grubu içerisinde en küçük (4,469 μm) değere sahip olması ve taramalı elektron mikrograflarından da görüldüğü gibi (Şekil 3.25) yüzeyinin düzgün olmaması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Dış faz hacminin değiştirilmesi ile hazırlanan formüllerin çıkış hızında belirgin bir fark görülmemektedir (Şekil 3.39).

Dış fazda stabilizör olarak PVA yerine Pluronik F68 kullanılmasıyla (F9D, F9E) küresel ve düzgün şekilli partiküllerin oluşmadığı, oluşanların ise oldukça küçük olduğu (Şekil 3.29) bu nedenle etkin maddenin yüklenemeyip polimer yüzeyinde bulunmasının çıkış hızını arttırdığı düşünülmektedir (Şekil 3.43).

Levobunolol HCl' in ticari preparatı olan Betagan®' ın, işlem etkinliği %30,60 olan F2B formülünün ve bu formülün % 20 Pluronik F127 jeli içerisinde süspande edilmiş olan P2B'nin çözünme hızı profilleri incelendiğinde (Şekil 3.45) 120. dakikada Betagan®'dan etkin maddenin tamamı açığa çıkarken, F2B'nin 120. dakikada % 78' i, P2B' nin % 60' ı salınmıştır. Sonuçlar beklentilerimiz doğrultusundadır.

4.9. Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirmesi

Düşük RMS (Artık Kareler Ortalaması) ve yüksek r^2 (Determinasyon Katsayısı) değerleri incelenerek, formülasyonların çözünme hızı verilerinin hangi kinetik modele uyum sağladıkları incelenmiştir (Tablo 3.24-3.32).

Tüm formülasyonlarda en yüksek uyumun Weibull dağılımı için olduğu ve en yüksek r^2 değerlerinin bu dağılım için elde edildiği belirlenmiştir. Bu kinetiğe ait iki önemli parametre ise β ve τ_d' dir. $\beta<1$ olması durumunda başlangıçta hızlı etkin madde salımını takiben yavaş etkin madde salımı görülmektedir. F8A,

F8B ve F8D formüllerinde $\beta>1$ olması, başlangıçta yavaş etkin madde salımını takiben hızla bir platoya ulaşılmasını belirtmektedir. Şekil 3.39 ve Şekil 3.43' te görüldüğü gibi başlangıçta bir lag time (gecikme süresi) bulunmaktadır. Bu durumun partikül içine yüklenen etkin maddenin partikül yüzeyine ulaşması için geçen süre olduğu düşünülmektedir. Bu formüllerin taramalı elektron mikrograflarından da partikül yüzeylerinin oldukça düzgün olduğu, etkin maddenin yüzeye adsorbe olmadığı görülmektedir (Şekil 3.27, 3.28).

Betagan®, F2B ve P2B formüllerinde τ_d değerleri (etkin maddenin %63,2' sinin çözünmesi için geçen süre) karşılaştırıldığında; τ_d değerlerinin Betagan®' için 14,85 dak, F2B için 77,27 dak ve P2B için 192,07 dak olduğu görülmektedir (Tablo.3.32)

Sıfır, birinci derece ve Higuchi kinetikleriyle karşılaştırıldığında en yüksek uyumun higuchi kinetiği ile olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.24-3.32). F2B, F5B, F5C, F8C, F8D, F9D, F9E, F10A formüllerinde sırasıyla r^2 değerleri 0,950, 0,914, 0,910, 0,919, 0,942, 0,922, 0,911, 0,914 olarak bulunmuştur. Bu da partiküllerin matris yapıda olduğunu, partiküllerin kapsül formunda değil, matris formunda oluştuğunu ve etkin madde salımının partiküllerden difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

pH 7,4 izotonik fosfat tampon çözeltisinde ve distile suda etkin maddenin doğruluğu, kesinliği, doğrusallık ve aralığı,teşhis ve tayin alt sınırları, stabilitesi belirlenerek uygulanan miktar tayini yöntemi valide edilmiştir.

Hidrofilik bir etkin madde olan Levobunolol HCl için en uygun nanopartikül ve mikropartikül hazırlama yönteminin çoklu emülsiyon (S/Y/S) çözücü buharlaştırma olduğu bulunmuştur.

Formülasyon parametrelerinin işlem etkinliği üzerine etkisi incelendiğinde, dış fazın pH'sının 5,5' ten 12' ye arttırılması ve PVA konsantrasyonunun %0,25' ten %0,5' e arttırılmasının işlem etkinliğini önemli oranda arttırdığı belirlenmiştir.

8000 rpm karıştırma hızında etkin madde miktarı 10 mg ve 40 mg olduğunda en yüksek işlem etkinliği gözlenmiştir. Karıştırma hızı 13500 rpm' e arttırıldığında, işlem etkinliğinin azaldığı, 60 mg etkin madde miktarı içeren formüllerde ise işlem etkinliğinin arttığı belirlenmiştir.

Dış faz hacminin 100 ml' ye azaltılması ile yüzey özellikleri iyi ve işlem etkinliği yüksek olan formüller elde edilmiştir.

Hazırlanan formüllerin göze uygulanabilecek partikül büyüklüğüne (<10μm) sahip olduğu görülmektedir. Bu çalışmada nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması amaçlanmasına rağmen sonuçta elde edilen partiküllerin büyüklüklerinin 10 μm' ye kadar arttığı bulunmuştur. Bu yöntemle bir çok literatürde belirtildiği gibi çalışmamızda da hem nanopartiküllerin hem de mikropartiküllerin hazırlanabildiği bulunmuştur. Ancak birçok parametre değiştirilerek formülasyonlar hazırlanmasına rağmen ortalama büyüklüğü nanometre boyutunda olan partiküller elde edilememiştir.

Levobunolol HCl' in ticari preparatı olan Betagan®'ın, işlem etkinliği %30,60 olan F2B formülünün ve bu formülün % 20 Pluronik F127 jeli içerisinde süspande edilmiş olan P2B'nin çözünme hızı profilleri karşılaştırıldığında Betagan®'ın çözünme hızı 2 saat içerisinde tamamlanırken F2B ve P2B

formüllerinde etkin maddenin salım hızı 6 saate uzatılmıştır. PF127 jeli içerisine formüle edilmesiyle oda sıcaklığında çözelti halinde olan formülasyonunu 35 °C' de (göz içi sıcaklığı) jel formuna dönüşmektedir. Bu durum hazırlanan partiküllerin jel süspande edilerek uygulanmasının gözde kalış süresini uzatarak etkin maddenin biyoyararlanımının arttırılmasını ve olası yan etkilerini azaltılmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Oküler Veriliş İçin Antiglokom Bir Etkin Madde Olan Levobunolol HCl' ün Mikropartikül Formülasyonları Üzerinde Çalışmalar

Çalışmamızda antiglokom bir etkin madde olan Levobunolol HCl' in poli(ε-kaprolakton) nanopartiküllerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Çoklu emülsiyon (S/Y/S) çözücü buharlaştırma yönteminin suda çözünür bir etkin madde olan Levobunolol HCl için en uygun partikül hazırlama yöntemi olduğu bulunmuştur.

Dış fazın pH' sının (pH 5,5 ve 12), stabilizör olarak kullanılan % PVA konsantrasyonunun (% 0,25, 0,5, 1 ve 1,5) karıştırma hızının (8000, 9500, 13500 rpm), etkin madde miktarının (10, 20, 40 ve 60 mg), polimer miktarı (250 ve 500 mg) dış faz hacminin (50, 100, 200 ml) ve diğer bir stabilizör Olan Pluronik F68 kullanımıyla hazırlanan formüllerin işlem etkinliği, yüzey özellikleri, partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli ve çözünme hızı üzerine etkisi incelenmiştir.

Sonuçta, daha yüksek dış faz pH' sında ve PVA konsantrasyonu % 0,5 olduğunda daha yüksek işlem etkinliğine sahip formüller elde edilmiştir. Formüllerde partiküller nanometre boyutunda elde edilememesine rağmen hemen hemen tüm partiküller 10μm' den küçük olarak elde edilmiştir. Bu büyüklük göze uygulanan partiküler ilaç şekilleri için uygundur.

Pluronik F127 kullanımıyla saklama sıcaklığında (4°C) çözelti, göz içi sıcaklığında ise (35 °C) in situ jel oluşturan formülasyon hazırlanmıştır. İşlem etkinliği en yüksek olan formülün Pluronik F127 içerisinde süspande edilmesiyle, preparatı hazırlanmıştır. Bu formülasyonda ve Levobunolol HCl ticari preparatı Betagan® göz damlasında etkin madde salım hızı karşılaştırıldığında etkin madde salımının hazırlanan formülasyonlarda daha yavaş olduğu sonucu elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Levobunolol HCl, poli(ε-kaprolakton), çoklu emülsiyon (S/Y/S) çözücü buharlaştırma, Pluronik F127, nanopartikül ve mikropartikül.

SUMMARY

Studies on Microparticle Formulations of Levobunolol HCl as an Antiglaucomatous Drug for Ocular Administration

In this study it was aimed to prepare poly (ε- caprolactone) nanoparticles of Levobunolol HCl used as an antiglaucomatous drug. It is observed that the double emulsion (w/o/w) solvent evaporation technique was the most appropriate method to encapsulate Levobunolol HCl as a hydrophilic drug.

The effect is of the pH of external aqueous phase (pH 5,5 and 12), PVA concentration in the external phase (0,25-0,5-1-1,5%) stirring rate (8000, 9500, 13500 rpm), different amount of the drug (10, 20, 40 and 60 mg), amount of the polymer (250 and 500 mg), volume of external phase (50, 100, 200 ml) and use of Pluronic F68 as an another stabilizer on the drug entrapment recovery, surface morphology, particle size and size distribution, zeta potential, and drug release were investigated.

In conclusion, the higher encapsulation efficiency was achieved at 0.5 % PVA concentration and higher pH value of the external phase. Although the particle sizes of the formulations were not at the level of nanometer, all particles were almost below 10 μm which is appropriate for particular ocular drug delivery.

The gel formulation was prepared by using Pluronic F127 which is liquid at the storage temperature of 4 °C while, forming gel at the temperature (35 °C). Then, the formulation which has the highest encapsulation efficiency was suspended into the in situ formed gel. Drug release of Levobunolol HCl from this formulation was studied in comparison with the commercial eye drop Betagan® . It was found that drug release rate from this formulation was slower than Betagan® .

Key words: Levobunolol HCl, Poly (ε-caprolactone), double emulsion (w/o/w) solvent evaporation , Pluronic F127, nanoparticle and microparticle.

KAYNAKLAR

ALEX, R., BODMEIER, R. (1990). Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment, *J. Microencapsul.,* **7 (3):** 347-355.

ALLÉMANN, E., GURNY, R., DOELKER, E. (1993). Drug loaded Nanoparticles, Preparation Methods and Drug Targeting Issues, *Eur.J.Pharm. Biopharm.,* **39 (5):** 173-191.

ALONSO, J.M., SÁNCHEZ, A. (2003). The potential of chitosan in ocular drug delivery, *J. Pharm. and Pharmcology,* **55:** 1451-1463.

BANAKAR, U.V. (1992). Pharmaceutical Dissolution Testing, Ed.: J. Swarbrick , New York: Marcel Dekker, Chapter 7-8.

BARBER, R.F., SHEK, P.N. (1993). Liposomes as a Topical Ocular Drug Delivery System. In: *Pharmaceutical Particulate Carriers Therapeutic Applications,* Ed.: A. Rolland, New York: Marcel Dekker, Chapter 1.

BARICHELLO, J.M., MORISHITA, M., TAKAYAMA, K., NAGAI, T. (1999). Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method, *Drug Dev. Ind. Pharm.,* **25 (4):** 471-476.

BENITA, S., FRIEDMAN, D., WEINSTOCK, M. (1986). Pharmacological evaluation of an injectable prolonged release emulsion of physostigmine in rabbits, *J. Pharm. Pharmacol.,* **38:** 653-658.

BENOIT, M.-A., BARAS, B., GILLARD, J. (1999). Preparation and characterization of protein-loaded poly (ε-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery, *Int. J. Pharm.,* **184:** 73-84.

BILATI, U., ALLÉMANN, E., DOELKER, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.,* **24:** 67-75.

BLANCO, M.D., ALONSO, M.J. (1997). Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres, *Eur.J. Pharm. Biopharm.,* **43:** 287-294.

BLANCO-PRÍETO, M.J., FATTAL, E., GULIK, A., DEDIEU, J.C., ROQUES, B.P., COUVREUR, P. (1997). Characterization and morphological analysis of a cholecystokinin derivative peptide-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a water-in-oil-in-water emulsion solvent evaporation method, *J. Control. Release,* **43:** 81-87.

BLANCO, M.D., BERNARDO, M.V., SASTRE, R.L., OLMO, R., MUÑIZ, TEIJÓN, J.M. (2003). Preparation of bupivacaine-loaded poly(ε-caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **55:** 229-236.

BODMEIER, R., MCGINITY, J.W. (1988). Solvent selection in the preparation of poly(D,L-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method, *Int. J. Pharm.*, **43:** 179-186.

BOZKIR, A., SAKA, O.M. (2005).Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies, *II Farmaco*, **60:** 840-846.

CALVO, P., THOMAS, C., ALONSO, M.J., VILA-JATO, J.L., ROBINSON, J.R. (1994). Study of the mechanism of interaction of poly(ε-caprolactone) nanocapsules th the cornea by confocal laser scanning microscopy, *Int. J. Pharm.*, **103:** 283-291.

CALVO, P., SÁNCHEZ, A., MARTÍNEZ, J., LÓPEZ, M.I., CALONGE, M., PASTOR, J.C., ALONSO, M.J. (1996). Polyester Nanocapsules as New Topical Ocular Delivery Systems for Cyclosporin A, *Pharm. Res.*, **13 (2):** 311- 315.

CALVO, P., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. (1996). Comparative *in Vitro* Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers, *J. Pharm. Sci,* **85 (5):** 530-536

CALVO, P., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M. (1997). Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers, *Int. J. Pharm.*, **153:** 41-50.

CEGNAR, M., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, V., KRISTL, J., KOS, J. (2004). Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cystatin into tumor cells, *Exp. Cell Res.*, **301:** 223-231.

CHAWLA, J.S., MANSOOR, M.A. (2002). Biyodegredable poly(ε-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen, *Int. J. Pharm.*, **249:** 127-138.

CHIAO, C.S.L., PRICE J.C. (1994). Formulation, preparation and dissolution characteristics of propranolol hydrochloride microspheres, *J. Microencapsul.*, **11 (2):** 153-159.

CHIEN, Y.W. (1982). Novel Drug Delivery Systems, New York: Marcel Dekker, Chapter 2.

CINOTTI, A., CINOTTI, D., GRANT, W., JACOBS, I., GALIN, M., SILVERSTONE, D., SHIN, D., ESTERS, J., LEE, J., BOUCHEY, R., NOVACK, G., DUZMAN, E., LUE, J. (1985). Levobunolol vs Timolol for Open-Angle Glaucoma and Ocular Hypertension, *American Journal of Ophthalmology,* **99:** 11-17.

COHEN, S., YOSHIOKA, T., LUCARELLI, M., HWANG, L.H., LANGER, R. (1991). Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic/Glycolc Acid) Microspheres, *Pharm. Res.*, **8 (6):** 713-720.

COHEN, S., LOBEL, E., TREVGODA, A., PELED,Y. (1997). A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye, *J. Control. Release,* **44:** 201-208.

COUVREUR, P., BARRATT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P., VAUTHIER, C. (2002). Nanocapsule Technology: A Review, Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, **19 (2):** 99-134.

DALPIAZ, A., LEO, E., VITALI, F., PAVAN, B., SCATTURIN, A., BORTOLOTTI, F., MANFREDINI, S., DURINI, E., FORNI, F., BRINA, B., VANDELLI, M.A. (2005). Development and characterization of biodegradable nanospheres as delivery systems of anti-ischemic adenosine derivatives, *Biomaterials*, **26:** 1299-1306.

DESAI, D.S., BLANCHARD, J. (1998). In Vitro Evaluation of Pluronic F127-Based Conrolled- Release Ocular Delivery Systems for Pilocarpine, *J. Pharm. Sci.,* **87 (2):** 226-230.

DESHPANDE, A.A., HELLER, J., GURNY, R. (1998). Bioerodible Polymers for Ocular Drug Delivery, *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems,* **15 (4):** 381-420.

DING, S. (1998). Recent developments in ophthalmic drug delivery, *Pharm. Sci. Technol. Today.1.,* **1 (8):** 328-335.

European Pharmacopeia. (2002).

FALLOUH, N.A., ROBLOT, T.L., FESSI, H., DEVISSAGUET, J., PUISIEUX, F. (1986). Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules, *Int. J. Pharm.,* **28**: 125-132.

FENG, S.-S, HUANG, G. (2001). Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegredable polymers, *J. Control. Release,* **71:** 53-69.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P., AMMOURY, N., BENITA, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.,* **55:** R1-R4.

FRESTA, M., PUGLISI, G., GIAMMONA, G., CAVALLARDO, G., MICALI, N., FURNERI, P.M. (1995). Pefloxacine Mesilate- and Ofloxacin- Loaded Polyethylcyanoacrylate Nanoparticles: Characterization of the Colloidal Drug Carrier Formulation, *J. Pharm. Sci.,* **84 (7):** 895-902.

GONZALEZ, J.P., CLISSOLD, S.P. (1987). Ocular Levobunolol: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy, *Drugs,* **34:** 648-661

GOVENDER, T., STOLNIK, S., GARNETT, M.C., ILLUM, L., DAVIS, S.S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug, *J. Control. Release,* **57:** 171-185.

GÖNÜL, N. (2000). Çok Fazlı Sistemler I-Yüzey Kimyası ve Kolloidler, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 81.

GULSEN, D., CHAUHAN, A. (2005). Dispersion of microemulsion drops in HEMA hydrogel: a potential ophthalmic drug delivery vehicle, *Int.J. Pharm.*, **292:** 95-117.

GURNY, R., BOYE, T., IBRAHIM, H. (1985). Ocular therapy with nanoparticulate systems for controlled drug delivery, *J. Control. Release,* **2:** 353-361.

GÜRSOY, A. (1989). Oküler Sistemler, *Kontrollü İlaç Serbestleştiren Sistemler*, Ed.: A. Gürsoy, E. Pişkin, B. Dortunç, N.A. Peppas, İstanbul: Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları , Bölüm 14.

GÜRSOY, A. (2002). Kontrollü Salım Sistemleri, İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, No:1.

HENGY, H., KÖLLE, E-U. (1985). Determination of levobunolol and dihydrolevobunolol in blood and urine by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection, *J. Chromatography*, **338:** 444-449.

HERRMANN, J., BODMEIER, R. (1995). Somatostatin containing biodegredable microspheres prepared by a modified solvent evaporation method based on W/O/W-multiple emulsions, *Int. J. Pharm.,* **126:** 129-138.

HERRMANN, J., BODMEIER R. (1998). Biodegredable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods, Eur.J. Pharm. Biopharm **45:** 75-82.

HOFFART, V., UBRICH, N., SIMONIN, C., BABAK, V., VIGNERON, C., HOFFMAN, M., LECOMPTE, T., MAINCENT, P. (2002). Low Molecular Weight Heparin- Loaded Polymeric Nanoparticles: Formulation, Characterization and Release Characteristics. *Drug Dev. Ind. Pharm.,* **28 (9):** 1091-1099.

HOYNG, P.F.J. and BEEK, L.M.V. (2000). Pharmacological Therapy for Glaucoma: A Review, *Drugs*, **59 (3):** 411-434.

HUATAN, H., COLLETT, H.J., ATTWOOD, D. (1995). The microencapsulation of protein using a novel ternary blend based on poly(ε-caprolactone), *J. Microencapsul.,* **12 (5):** 557-567.

HUANG, H-S., SCHOENWALD, R.D., LACH, J.L. (1983). Corneal Penetration Behavior of β-Blocking Agents III: *In Vitro-In Vivo* Correlations, *J. Pharm. Sci.,* **72 (11):** 1279-1281.

HU, Y., JIANG, X., DING, Y., ZHANG, L., YANG, C., ZHANG, J., CHEN, J., YANG, Y. (2003). Preparation and drug release behaviours of nimodipine-loaded poly(caprolactone)-poly(ethylene oxide)-polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles, *Biomaterials,* **24:** 2395-2404.

HYVÖNEN, S., PELTONEN, L., KARJALAINEN, M., HIRVONEN, J. (2005). Effect of nanoprecipitation on the physochemical properties of low molecular weight poly(L-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone dipropionate, *Int. J. Pharm.*, **295:** 269-281.

IWATA, M., MC GINITY, J.W. (1992). Preparation of multi-phase microspheres of poly(D,L-lactic acid) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) containing a W/O emulsion by a multiple emulsion solvent evaporation technique, *J. Microencapsul.*, **9 (2)** 201-214.

JEONG, J.C., LEE, J., CHO, K. (2003). Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly (ε- caprolactone) microspheres, *J. Control. Release,* **92:** 249-258.

JIANG, H., HE, J., TAO, Y., YANG, Y. (2003). Synthesis and Characterization of Star-Branched Poly(ε-caprolactone), *Polym. J.,* **35 (7):** 598-602.

JONES, D.S., PEARCE, K.J. (1995). An investigation of the effects of some process variables on the microencapsulation of propranolol hydrochloride by the solvent evaporation method, *Int. J. Pharm.,* **118:** 199-205.

JULIANO, R.L. (1987). Microparticulate Drug Carriers: Liposomes, Microspheres and Cells, *Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications,* 2nd Ed.: J.R. Robinson, V.H.L.Lee, New York: Marcel Dekker, Chapter 13.

KARATAŞ, A. (1996). Nonsteroidal Antienflamatuvar Maddelerin Oftalmik Amaçlı İnsertlerinin Hazırlanması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

KAUR, I.P., KANVAR, M. (2002). Ocular Preparations: The Formulation Approach, *Drug Dev. Ind. Pharm.,* **28 (5):** 473-493.

KAYAALP, O. (2000). Tıbbi Farmakoloji, 9. Baskı, Ankara: Feryal Matbaası, Bölüm 43.

KILIÇARSLAN, (1999). Verapamil HCl' in Kontrollü Salım Yapan Çok birimli Oral İlaç Şeklinin Hazırlanması,Doktora tezi , Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

KIM, S.Y., SHIN, I.G., LEE, Y.M. (1998a). Preparation and characterization of biodegredable nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and dl-lactide block copolymer as novel drug carriers, *J. Control. Release,* **56:** 197-208.

KIM, S.Y., SHIN, G.I., LEE, Y.M., CHO, C. S., SUNG, Y.K. (1998b). Methoxy poly (ethylene glycol) and ε- caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviors, *J. Control. Release,* **51:** 13-22.

KONAN, Y.N., CERNY, R., FAVET, J., BERTON, M., GURNY, R., ALLÉMANN, E. (2003). Preparation and characterization of sterile sub 200 nm meso-tetra (4-hydroxylphenyl) porphyrin loaded nanoparticles for photodynamic therapy, *Eur.J.*

Pharm. And Biopharm., **55**: 115-124.

KOTHURI, M.K., PINNAMANENI, S., DAS., N.G., DAS., S.K. (2003). Microparticles and Nanoparticles in Ocular Drug Delivery, *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, 2nd Ed.: A.K Mitra, New York: Marcel Dekker, Chapter 14.

KREUTER, J. (1991). Nanoparticle-based drug delivery systems, *J. Control. Release,* **16:** 169-176.

KRIWET, B., WALTER, E., KISSEL, T. (1998). Synthesis of bioadhesive poly(acrylic acid) nano- and microparticles using an inverse emulsion polymerization method for the entrapment of hydrophilic drug candidates, *J. Control. Release,* **56:** 149-158.

KUMAR, R., KUMAR, N. (2001). Polymeric Controlled Drug- Delivery Systems: Perspective Issues and Opportunities, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **27 (1):** 1-30.

LALLEMAND, F., FELT-BAEYENS, O., BESSEGHIR, K., COHEN-BEHAR., F., GURNY., R. (2003). Cyclosporin A delivery to the eye: A pharmaceutical challenge, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **56:** 307-318.

LAMPRECHT. A, UBRICH, N., PÉREZ, M.H., LEHR, C.-M., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (1999). Biodegredable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization- emulsification, *Int. J. Pharm,*. **184:** 97-105.

LAMPRECHT, A., UBRICH, N., PÉREZ, M.H., LEHR, C.-M., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (2000). Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique, *Int. J. Pharm.*, **196:** 177-182.

LE BOURLAIS, C.A., TREUPEL-ACAR, L., RHODES, C.T., SADO, P.A., LEVERGE, R. (1995). New Ophthalmic Drug Delivery Systems , *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21 (1):** 19-59.

LE BOURLAİS C., ACAR, L., ZIA, H., SADO, P.A., NEEDHAM,T., LEVERGE, R. (1998). Ophthalmic Drug Delivery Systems-Recent Advances, *Progress in Retinal and Eye Res.*, **17(1):** 33-58.

LEE, S.C., OH, J.T., JANG, M.H., CHUNG, S. (1999). Quantitative analysis of polyninyl alcohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by a solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration, *J. Control. Release,* **59:** 123-132.

LEE, K.W., PARK, J-Y., JUNG, S., YANG, C.W., KIM, W-U., KIM, H-Y., PARK, J-H., PARK, J-S. (2005). Preparation and characterization of biodegredable nanoparticles entrapping immunodominant peptide conjugated with PEG for oral tolerance induction, *J. Control. Release,* **105:** 77-88.

LEMOINE, D., PRÉAT, V. (1998). Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins, *J. Control. Release.*, **54:** 15-27.

LEROUEIL-LE VERGER, M., FLUCKIGER, L., KIM, Y-II., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (1998). Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent, *Eur. J. Pharm. Biopharm.,* **46:** 137-143.

LEO, E., BRINA, B., FORNI, F., VANDELLI, M.A. (2004). In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form, *Int. J. Pharm.,* **278:** 133-141.

LEVY, M.Y., BENITA, S. (1990). Drug release submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model, *Int. J. Pharm.,* **66:** 29-37.

LI, Y-P., PEI, Y.-Y., ZHANG, X.-Y., GU, Z.-H., ZHAO, Z.-H., YUAN, W.-F., ZHOU, J.-J., ZHU, J.-H., GAO, X.-J. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats, *J. Control. Release,* **71:** 203-211.

LINDENSTRUTH, K., MULLER, B.W. (2004). W/O/W multiple emulsions with diclofenac sodium, *Eur.J. Pharm. Biopharm.,* **58:** 621-627.

LIU, M., DONG, J., YANG, Y., YANG, X., XU, H. (2005). Characterizationand release of triptolide-loaded poly(D,L- lactic acid) nanoparticles, *Eur. Polymer J.,* **41:** 375-382.

LONG, D., ZIMMERMAN, T., SPAETH, G., NOVACK, G., BURKE, P.J., DUZMAN, E. (1985). Minimum Concentration of Levobunolol Required to Control Intraocular Pressure in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension, *American Journal of Ophthalmology,* **99:** 18-22.

LOSA, C., MARCHAL-HEUSSLER, L., ORALLO, F., JATO, J.L.V., ALONSO, M.J. (1993). Design of New Formulations for Polymeric Nanocapsules Containing Metipranolol, *Pharm. Res.,* **1 (10):** 80-87.

LU, Z., BEI, J., WANG, S. (1999). A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer, *J. Control. Release,* **61:** 107-112.

LUDWIG, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery, *Adv. Drug. Deliv.Rev.,* **57:** 1595-1639.

MACHA, S., MITRA, A.K., HUGHES, P.M. (2003). Overview of Ocular Drug Delivery, *Ophthalmic Drug Delivery Systems,* 2nd Ed.: A.K. Mitra, New York: Marcel Dekker, Chapter 1.

MALMSTEN, M. (2002). Surfactants and Polymers in Drug Delivery, New York: Marcel Dekker, Chapter 9.

MALVERN ,Instruments, Particle Sizing by Dynamic Light Scattering, (2003). Erişim: [http://brainshark.com.] Erişim tarihi: 07.06.2006

MARCHAL-HEUSSLER, L., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.P., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (1992). Colloidal drug delivery systems for the eye A comparison

of the efficacy of three different polymers: polyisobutylcyanoacrylate, polylactic-co-glycolic acid, poly-epsilon-caprolacton, *S.T.P. Pharma. Sci.*, **2 (1):** 98-104.

MARCHAL-HEUSSLER, L., SIRBAT, D., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (1993). Poly (ε- caprolactone) Nanocapsules in Carteolol Ophthalmic Delivery, *Pharm. Res.*, **10 (3):** 386-390.

MENG, F.T., MA, G.H., LIU, Y.D., QIU, W., SU, Z.G. (2004). Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* **33:** 177-183.

MITRA,. K.A. (1988). Ophthalmic Drug Delivery Devices, In: *Drug Delivery Devices,* Ed.: P.Taylor, New York and Basel: Marcel Dekker, Chapter 15.

MIYAZAKI, S., HASHIGUCHI, N., HOU, W-M., YOKOUCHI, C., TAKADA, M. (1986). Preparation and Evaluation *in Vitro* and *in Vivo* of Fibrinogen Microspheres Containing Adriamycin, *Chem. Pharm. Bull.*, **34 (8):** 3384-3393.

MURILLO, M., GOÑI, M.M., IRACHE, J.M., ARANGOA, M.A., BLASCO, J.M., GAMAZO, C. (2002). Modulation of the cellular immune response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens, *J. Control. Release,* **85:** 237-246.

NIWA, T., TAKEUCHI, H., HINO, T., KUNOU, N., KAWASHIMA, Y. (1993). Preparation of biodegredable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior, *J. Control. Release,* **25:** 89-98.

O'DONNELL, P.B., MCGINITY, J.W. (1997). Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28:** 25-42.

PAUL, M., FESSI, H., LAATIRIS, A., BOULARD, Y., DURAND, R., DENIAU, M., ASTIER, A. (1997). Pentamidine-loaded poly (D,L-lactide) nanoparticles: physicochemical properties and stability work, *Int. J. Pharm.*, **159:** 223-232.

PELTONEN, L., KOISTENEN, P., HIRVONEN, J. (2003). Preparation of nanoparticles by the nanoprecipitation of low molecular weight poly(l)lactide, *S.T.P. Pharma Sci.*, **13:** 299-304.

PELTONEN, L., AITTA, J., HYVÖNEN, S., KARJALAINEN, M., HIRVONEN, J. (2004). Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drug Substance During Nanoprecipitation of Poly(l)lactide Nanoparticles, *AAPS. Pharm. Sci. Tech.*, **1:** 1-6.

PEPPAS, N.A. (1989). Difüzyonun Temelleri, *Kontrollü İlaç Serbestleştiren Sistemler,* Ed.: A. Gürsoy, E. Pişkin, B. Dortunç, N.A. Peppas, İstanbul: Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları ,Bölüm 4.

PEPPAS, N.A. (1985). Analysis of Fickian and Non-Fickian Drug Release from Polymers, *Pharm. Acta. Helv.*, **60 (4):** 110-111.

PÉREZ, M.H., ZINNUTI, C., LAMPRECHT, A., UBRICH, N., ASTIER, A., HOFFMAN, M., BODMEIER, R., MAINCENT, P. (2000). The preparation and evaluation of poly (ε- caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and hydrophilic drug, *J. Control. Release,* **65:** 429-438.

PITT, C. G. (1990). Poly-ε- Caprolactone and Its Copolymers. In : *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* , Ed.: M. Chasin and R. Langer, New York: Marcel Dekker, p.: 71-119.

PLAZONNET, B. (1990). Ophthalmic Drug Delivery, *Modified Release Drug Delivery Technology,* Ed.: J. Swarbrick, New York: Marcel Dekker, Chapter 25.

RAFATI, H., COOMBES, A.G.A., ADLER, J., HOLLAND, J., DAVIS, S.S. (1997). Protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics, *J. Control. Release,* **43:** 89-102.

REIS, C.P., NEUFELD, R.J., RIBEIRO, A.J., VEIGA, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology and Medicine,* **2:** 8-21.

RITGER, P.L., PEPPAS, N.A. (1987). A simple equation for description of soluble release I. Fickian and Non-Fickian release from non- swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J. Control. Release,* **3**: 23-26.

ROBINSON, J.R., MLYNEK, G.M. (1995). Bioadhesive and phase-change polymers for ocular drug delivery, *Adv. Drug. Deliv. Rev.,* **16:** 45-50.

ROLLOT, J.M., COUVREUR, P., ROBLOT-TREUPEL, L., PUISIEUX, F. (1986). Physicochemical and Morphological Characterization of Polyisobutyl Cyanoacrylate Nanocapsules, *J. Pharm. Sci.,* **75 (4):** 361-364.

ROSCA, I.D., WATARI, F., UO, M. (2004). Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation, *J. Control. Release.,* **99:** 271-280.

SAETTONE, F.M., CHETONI, P., CERBAI, R., MAZZANTI, G., BRAGHIROLI, L. (1996). Evaluation of ocular permeation enhancers: in vitro effects on corneal transport of four β- blockers, and in vitro/ in vivo toxic activity, *Int. J. Pharm.,* **42:** 103-113.

SALEM, H., (2002). Spectrophotometric determination of β- adrenergic blocking agents in pharmaceutical formulations, *J. Pharm Biomed. Anal.,* **29:** 527-538.

SASAKI, H., YAMAMURA, K., MUKAI, T., NISHIDA, K., NAKAMURA, J., NAKASHIMA, M., ICHIKAWA, M. (1999). Enhancement of Ocular Drug Penetration, *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems,* **16 (1):** 85-146.

SCHAFFAZICK, S.R., POHLMANN, A.R., DALLA-COSTA, T., GUTERRES. (2003). Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.,* **56:** 501-505.

SCHAFFAZICK, S.R., POHLMANN, A.R., DE CORDOVA, C.A.S., CRECZYNSKI-PASA, T.B., GUTERRES, S.S. (2005). Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation, *Int. J. Pharm.,* **289:** 209-213.

SCHUGENS C., LARUELLE, N., NIHANT, N., GRANDFILS, C., JÉROME, R., TEYSSIÉ, P. (1994). Effects of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly l-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation, *J. Control. Release,* **32:** 161-176.

SCHWARTZ, J.B., SIMONELLI, A.P, HIGUCHI, W.I. (1968). Drug release from wax matrices I, *J. Pharm. Sci.,* **57** (2): 274-282.

SHELL, J.W. (1985). Ophthalmic Drug Delivery Systems, *Drug Dev. Res.,* **6:** 245-261.

SHIN, I.S., KIM, S.Y., LEE, Y.M., CHO, C.S., SUNG, Y.K. (1998). Methoxy poly(ethylene glycol)/ε-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. I. Preparation and characterization, *J. Control. Release,* **51:** 1-11.

SİEG, J.W., ROBINSON, J.R. (1975). Vehicle Effects on Ocular Drug Bioavailability I: Evaluation of Fluoromethalone, *J. Pharm. Sci.,***64 (6):** 931-936.

SINTZEL, M.B., BERNATCHEZ, S.F., TABATABAY, C., GURNY, R. (1996). Biomaterials in Ophthalmic Drug Delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.,* **42 (6):** 358-374.

SONG, C.X., LABHASETWAR, V., MURPHY, H., QU, X., HUMPHREY, W.R., SHEBUSKI, R.J., LEVY, R.J. (1997). Formulation and characterization of biodegredable nanoparticles for intravascular local drug delivery, *J. Control. Release,* **43:** 197-212.

SPEISER, P. (1976). Microencapsulation by Coaservation, Spray Encapsulation and Nanoencapsulation. In: *Microencapsulation,* Ed.: J.R. Nixon, New York: Marcel Dekker, Chapter 1.

SRIVIDYA, B., CARDOZA, R.M., AMIN, P.D. (2001). Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system, *J. Conrol. Release,* **73:** 205-211.

The Merck Index. (1996).

The United States Pharmacopeia XXIII (USP 23).(1995).

TOMLINSON, E. (1983). Microsphere delivery systems for drug targeting and controlled release, *Int. J. Pharm. Tech.,* **4 (3):** 49-57.

UBRICH, N., BOUILLOT, P., PELLERIN, C., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (2004). Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study, *J. Control. Release,* **97:** 291-300.

UBRICH, N., SCHMIDT, C., BODMEIER, R., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (2005). Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, **288:** 169-175.

VANDERVOORT, J., LUDWIG, A. (2002). Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles : a factorial design study, *Int. J. Pharm.*, **238:** 77-92.

VANDERVOORT, J., LUDWIG, A. (2004) Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use, *Eur. .J. Pharm. Biopharm.*, **57:** 251-261.

VERDUN, C., COUVREUR, P., VRANCKX, H., LENAERTS, V., ROLAND, M. (1986). Development of a nanoparticle controlled-release formulation for human use, *J. Control. Release,* **3:** 205-210.

WADE, A. (1980). Pharmaceutical Handbook , 9th Ed. London: The Pharmaceutical Pres, p.: 237-243.

WASHINGTON, C. (1989). Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition, *Int. J. Pharm.*, **56:** 71-74.

WASHINGTON, C. (1996). Drug Release from Microparticulate Systems. In: *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*, Ed.: S. Benita. NewYork: Marcel Dekker, p.: 156-181.

WALTERS, R.T., MALONEY, S., SLATER, D., LISS, C., WILSON, H., HARTENBAUM, D. (1998). Efficacy and Tolerability of 0,5% Timolol Maleate Ophthalmic Gel-Forming Solution QD Compared with 0,5% Levobunolol Hydrochloride BID in Patients with Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension, *Clinical Therapeutics*® , **20 (6):** 1170-1178

WIELAND-BERGHAUSEN, S., SCHOTE, U., FREY, M., SCHMIDT, F. (2002). Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCl, *J. Control. Release*, **85:** 35-43.

YANG, Y.Y., CHUNG, T.S., BAI, X.L., CHAN, W.K. (2000). Effects of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegredable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion method, *Chem. Eng. Sci.*, **55:** 2223-2236.

YAZAN, Y.(2002). Emülsiyon Sistemler, *Kontrollü Salım Sistemleri,* Ed. A. Gürsoy, İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, Bölüm 7.

ZAMBAUX, M.F., BONNEAUX, F., GREF, R., MAINCENT, P., DELLACHERIE, E., ALONSO, M.J., LABRUDE, P., VIGNERON, C. (1998). Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method, *J. Control.Release*, **50:** 31-40.

ZHOU, S., DENG, X., YANG, H. (2003). Biodegredable poly(ε-caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system, *Biomaterials,* **24:** 3563-3570.

ZILI, Z., SFAR, S., FESSI, H. (2005). Preparation and characterization of poly-ε-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin, *Int. J. Pharm.,* **294:** 261-267.

ZIMMER, A.K., ZERBE, H., KREUTER, J. (1994). Evaluation of pilocarpine-loaded albumin particles as drug delivery systems for controlled delivery in the eye I. In vitro and in vivo characterisation, *J. Control. Release,* **32:** 57-70.

ZIMMER, A., KREUTER, J. (1995). Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.,* **16:** 61-73.

XU, Z., GU, W., HUANG, J., SUI, H., ZHOU, Z., YANG, Y., YAN, Z., LI, Y. (2005). In vitro and in vivo evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery, *Int. J. Pharm.,* **288:** 361-368.

ÖZGEÇMİŞ

I	**Bireysel Bilgiler**	
	Adı	Özlem
	Soyadı	Sonakın
	Doğum yeri ve tarihi	Ankara 06.11.1981
	Uyruğu	T.C.
	Medeni durumu	Bekar
	İletişim adresi ve telefonu	Güneşevler Sitesi 3/11 İ Blok Sincan/ Ankara –0312 2675260
II	**Eğitimi**	
	Yabancı Dil	İngilizce
	Eylül 2003 (Başlangıç)	A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji A.B.D. Yüksek Lisans
	Haziran 2003	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
	1999	Başkent Lisesi
	1995	Demirlibahçe Ata İlköğretim Okulu
	1993	Demirlibahçe İlkokulu
III	**Mesleki Deneyimleri**	
	T.C. Emekli Sandığı Sağlık İşleri Daire Başkanlığı	Eczacı (Halen çalışıyor)
IV	**Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar**	FABAD
V	**Bilimsel İlgi Alanları**	
	Poster	ISOPS 2006, Ankara " Influence of Stabilizers and pH of external aqueous phase on the characteristics of poly (ε - caprolactone) microparticles prepared by a multiple emulsion (w/o/w) solvent evaporation technique"
	Seminer	"Mikrofabrikasyon teknolojisi ve etkin madde salım sistemleri üzerinde uygulamaları"