

**PIRIDOSTİGMİN BROMÜR MİKROPARTİKÜLLERİNİN  
HAZIRLANMASI ve İN VİTRO  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Nahed HEGAZY

**DOKTORA TEZİ**

## JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Nahed HEGAZY' nin "Piridostigmin Bromür Mikropartiküllerinin Hazırlanması ve İn Vitro Değerlendirilmesi " başlıklı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalındaki, Doktora tezi 20.10.2000 tarihinde, aşağıdaki juri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

ÜYE (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Yasemin YAZAN

ÜYE : Prof.Dr. Murat ŞUMNU

ÜYE : Prof.Dr. Muzaffer TUNÇEL

ÜYE : Doç.Dr. Sevda ŞENEL

ÜYE : Yard.Doç.Dr. Müzeyyen DEMİREL

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 09.10.2000 tarih ve 33 Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

## ÖZET

Bu çalışmada, suda çözünürlüğü çok yüksek ve kısa eliminasyon yarı ömre sahip antikolinesteraz bir etkin madde olan piridostigmin bromür'ün yan etkileri ve kısa eliminasyon yarı ömrünün neden olduğu sık kullanımını ortadan kaldırmak için salım hızını yavaşlatmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, akrilik polimer bir taşıyıcı ile mikron büyüklüğünde partiküllerin hazırlanması düşünülmüştür.

Formülasyonlarda kullanılan etkin ve yardımcı maddeler üzerinde yapılan çalışmalarda, elde edilen deney bulgularının referans kitaplar ve firma spesifikasyonlarına uygun oldukları saptanmıştır.

Çalışmamızda, mikropartikül hazırlamak amacı ile, uygulanabilecek yöntemler arasından, önce emülsiyondan çözücü uçurulması ve çözücü buharlaştırma yöntemleri denenmiştir. Çalışma sırasında, etkin madde-polimer oranı, organik çözücü miktarı gibi parametreler değiştirilerek, etkin madde ile yüklenmiş mikropartiküller elde etmeye çalışılmıştır. Ancak, bu yöntemlerle elde edilen ürünlerde etkin maddenin yüklenmemiş olduğu görülmüştür. Kullandığımız etkin madde ve polimerin özellikleri açısından, püskürterek kurutma yönteminin çalışmamızda kullanılmasının uygun olabileceği düşünülmüştür. Hazırlama yönteminde kullanılan çözücünün, partikül karakteristiklerine etkisini incelemek amacıyla, aynı formülasyonlar, aynı yöntemle, değişik çözücüler kullanarak hazırlanmıştır. Organik çözücüye değiştirerek süspansiyon (polimerik çözeltide etkin madde dağıtılarak) ve çözelti (polimerik çözeltide etkin madde çözündürülerek) oluşturduktan sonra püskürterek kurutucuya besleme yapılma arasında bir karşılaştırma yapılmıştır.

Formülasyonların *in vitro* salımları incelendiğinde, piridostigmin bromür'ün partiküllerden salımında, formülasyon parametrelerinin etkili olduğu, salım ortamının pH'sının anlamlı bir şekilde etkili olmadığı saptanmıştır. Piridostigmin bromür'ün mikropartiküllerinden salım kinetiği incelendiğinde ise, bilinen matematiksel modellerden, modifiye Hixson-Crowell kinetiğine uyum saptanmıştır.

Sonuç olarak, *myastenia gravis* hastalığı tedavisine yönelik geliştirmek istediğimiz piridostigmin bromür partiküllerinin *in vitro* değerlendirmelerinde, salım hızının kontrol edilebileceği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Piridostigmin bromür, Mikropartikül, Püskürterek Kurutma, Salım Hızı

## ABSTRACT

To slow the dissolution rate of an anticholinesterase active ingredient, piridostigmin bromide, whose aqueous solubility is high and has a short elimination half-life, is aimed in this study, to avoid its side effects and frequent use because of its short elimination half-life. For this purpose, preparation of particles with micron size using an acrylic polymer vehicle was planned.

As a result of the studies on active and additive materials used in formulations, experimental data obtained was determined to be in accordance with the reference books and company specifications.

For the preparation of microparticles, solvent evaporation from emulsion and solvent evaporation methods were first tried in our study, among the applicable methods. Parameters like active agent-polymer ratio and organic solvent amount were varied in order to obtain microparticles loaded with the active agent, all through the studies. However, no active agent could be loaded using the mentioned methods. Spray-drying method was thought to be an appropriate method of preparation considering the characteristics of the active agent and the polymer we use. In order to investigate the effect of the solvents used in the preparation method on the characteristics of the particles, the same formulations were prepared using the same method but using different solvents. Feeding the spray-dryer following the formation of suspension (dispersion of the active agent in the polymeric solution) and solution (solubilization of the active agent in the polymeric solution), were compared.

When the in vitro dissolution of the formulations were examined, formulation parameters were determined to be effective but pH value of the dissolution media was ineffective on the release of piridostigmin bromide from the particles. Upon examination of the release kinetics of piridostigmin bromide from the microparticles, using the known mathematical models, fit to the Modified Hixson-Crowell kinetics was found.

As a conclusion, in vitro evaluation of the piridostigmin bromide particles which were aimed to be developed for the therapy of *myasthenia gravis* disease showed that dissolution rate could be controlled.

**Key Words:** Pyridostigmine Bromide, Microparticle, Spray Drying, Dissolution Rate



## TEŞEKKÜR

Bana bu araştırmada her türlü olanağı sağlayan, her zaman değerli bilgilerinden yararlandığım, engin bir anlayış ve iyi niyet göstererek her zaman yardımcı olan, desteğini her an hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Sayın Yasemin YAZAN'a desteklerinden dolayı minnet borçluyum, bana öğrettikleri için kendilerine içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bizlere her konuda yardımcı olan Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Sayın Yusuf ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenciliğim sırasında karşılaştığım sorunları aşmama yardımcı olan Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Muzaffer TUNÇEL'e sonsuz teşekkürlerimi iletmek isterim.

Yardımlarından dolayı, Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Sayın K. Hüsnü Can BAŞER'e teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, büyük desteğini gördüğüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Yard. Doç. Dr. Sayın Müzeyyen DEMİREL'e minnet duygularımı ve sonsuz teşekkürlerimi iletmek isterim.

DSC analizini gerçekleştiren Berlin Freie Üniversitesi'nden Prof. Dr. Sayın Rainer H. MÜLLER'e sonsuz teşekkürlerimi iletmek isterim.

Ayrıca, değerli yardımlarından dolayı Kozmetoloji Bilim Dalı'ndan Kimyager Sayın Sefa AVCIER'e teşekkürlerimi sunarım.

Püskürterek kurutma cihazının kullanımında yardımlarından dolayı, Yard. Doç. Dr. Sayın Temel ÖZEK'e teşekkür ederim.

X-Işını kırınım analizlerinde ve taramalı elektron mikroskobu kullanımında yardımlarını benden esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Seramik Mühendisliği Bölümü'nden Arş. Gör. Uzm. Gürsoy ARSLAN'a ve Arş. Gör. Uzm. Emel ÖZEL'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında, yakın ilgilerini ve yardımlarını gördüğüm bölüm arkadaşlarım, Arş. Gör. Uzm. Ecz. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Arş. Gör. B. Selen KALAVA'ya ve Arş. Gör. Ebru CENGİZ'e çok teşekkür ederim.

Benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan fedakar aileme ve eşime teşekkürlerimi iletirim.

Nahed HEGAZY

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. PİRİDOSTİGMİN BROMÜR	3
2.1.1. Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri	3
2.1.2. Analiz Yöntemleri	3
2.1.3. Farmakolojik Özellikleri	4
2.1.3.1. Etki Mekanizması	5
2.1.3.2. Farmakokinetiği	6
2.1.3.3. Formülasyonu	11
2.1.4. Yan Etkiler ve Toksisitesi	12
2.2. MYASTENİA GRAVIS HASTALIĞI	13
2.3. MİKROPARTİKÜLLER	15
2.3.1. Tanımı	15
2.3.2. Sınıflandırılması	15
2.3.3. Mikropartikül Hazırlamada Kullanılan Maddeler	16
2.3.3.1. Matris Maddeler	16
2.3.3.2. Yüzey Etkin Maddeler	19
2.3.4. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri	20
2.3.4.1. Koaservasyon	21
2.3.4.2. Emülsiyondan Çözücü Ekstraksiyonu	22
2.3.4.3. Emülsiyondan Çözücü Uçurulması	22
2.3.4.4. Püskürterek Kurutma	23

2.3.4.5.	Diğer Yöntemler	28
2.3.5.	Etkin Madde Salımı	32
2.3.5.1.	Etkin Madde Salımının İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler	32
2.3.5.2.	Salım Mekanizması	34
2.3.5.3.	Etkin Madde Salımını Etkileyen Faktörler	37
2.3.6.	Mikropartiküllerin Uygulama Yerleri	39
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	43
3.1.	MADDE ve CİHAZLAR	43
3.1.1.	Kullanılan Maddeler	43
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar	43
3.2.	YÖNTEMLER	44
3.2.1.	Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinler	44
3.2.1.1.	Piridostigmin Bromür ile Yapılan Çalışmalar	44
3.2.1.1.1.	Spektrofotometrik Çalışmalar	44
3.2.1.1.1.1.	UV-Spektrofotometre	44
3.2.1.1.1.2.	IR-Spektrofotometre	44
3.2.1.1.2.	Erime Derecesi Tayini	44
3.2.1.1.3.	Termal Analiz	44
3.2.1.1.4.	Piridostigmin Bromür Miktar Tayini	45
3.2.1.1.4.1.	UV Spektrofotometre için Validasyon Çalışmaları	45
3.2.1.1.4.1.1.	Doğrusallık	45
3.2.1.1.4.1.2.	Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik	45
3.2.1.1.4.1.3.	Yöntemin Uygulanabilirliği	45
3.2.1.1.5.	Çözünürlük Tayinleri	46
3.2.1.1.5.1.	Farklı Sıvı Ortamlardaki Çözünürlük Tayini	46
3.2.1.1.6.	Partikül Boyut Analizi	46
3.2.1.1.7.	X-Işını Kırınım Analizi	46
3.2.1.2.	Eudragit® RS ile Yapılan Çalışmalar	46
3.2.1.2.1.	Erime Derecesi Tayini	46
3.2.1.2.2.	Termal Analiz	46
3.2.1.2.3.	Reolojik Analiz	47

3.2.1.2.4.	X-Işını Kırınım Analizi	47
3.2.2.	Mikropartiküller ile Yapılan Çalışmalar	47
3.2.2.1.	Formülasyonları	47
3.2.2.1.1.	Etkin Madde Dağıtılarak Hazırlanan Formülasyonlar	47
3.2.2.1.2.	Etkin Madde Çözündürülerek Hazırlanan Formülasyonlar	49
3.2.2.2.	Hazırlanışları	49
3.2.2.2.1.	Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlama	49
3.2.2.2.2.	Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlama	50
3.2.2.3.	Mikropartiküllerin Özelliklerine Ait Çalışmalar	50
3.2.2.3.1.	Şekilleri	50
3.2.2.3.2.	Partikül İrilik Dağılımları	51
3.2.2.3.3.	IR Analizleri	51
3.2.2.3.4.	Termal Analizleri	51
3.2.2.3.5.	X-Işını Kırınım Analizi	51
3.2.2.3.6.	Hazırlama Verimi	51
3.2.2.3.7.	Partiküllerde Piridostigmin Bromür Miktar Tayini	51
3.2.2.3.7.1.	Filtre Materyalinin Adsorpsiyon Testi	51
3.2.2.3.7.2.	Partiküllerde Yüklenen Toplam Piridostigmin Bromür Miktarı	52
3.2.2.3.7.3.	Partiküllerde Hapsedilen Piridostigmin Bromür Miktarı	52
3.2.2.4.	Mikropartiküller ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmaları	52
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA	54
4.1.	SONUÇLAR	54
4.1.1.	Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinler	54
4.1.1.1.	Piridostigmin Bromür ile Yapılan Çalışmalar	54



4.1.1.1.1.	Spektrofotometrik Çalışmalar	54
4.1.1.1.1.1.	UV-Spektrofotometre	54
4.1.1.1.1.2.	IR-Spektrofotometre	54
4.1.1.1.2.	Erime Derecesi	56
4.1.1.1.3.	Termal Analiz	56
4.1.1.1.4.	Piridostigmin Bromür'ün Miktar Tayini	56
4.1.1.1.4.1.	UV Spektrofotometresi ile Validasyon Çalışmaları	56
4.1.1.1.4.1.1.	Doğrusallık	56
4.1.1.1.4.1.2.	Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik	57
4.1.1.1.4.1.3.	Yöntemin Uygulanabilirliği	58
4.1.1.1.5.	Çözünürlük Tayinleri	58
4.1.1.1.5.1.	Farklı Ortamlardaki Çözünürlük Tayini	58
4.1.1.1.6.	Partikül Boyut Analizi	58
4.1.1.1.7.	X-Işını Kırınım Analizi	59
4.1.1.2.	Eudragit® RS ile Yapılan Çalışmalar	59
4.1.1.2.1.	Erime Derecesi	59
4.1.1.2.2.	Termal Analiz	60
4.1.1.2.3.	Reolojik Analiz	60
4.1.1.2.4.	X-Işını Kırınım Analizi	62
4.1.2.	Mikropartiküller ile Yapılan Çalışmalar	62
4.1.2.1.	Formülasyonları	62
4.1.2.2.	Mikropartiküllerin Özellikleri	63
4.1.2.2.1.	Şekilleri	63
4.1.2.2.2.	Partikül İrilik Dağılımları	63
4.1.2.2.3.	Infrared Analizleri	70
4.1.2.2.4.	Termal Analizleri	71
4.1.2.2.5.	X-Işını Kırınım Analizi	72
4.1.2.2.6.	Hazırlama Verimi	73
4.1.2.2.7.	Mikropartiküllerde Piridostigmin Bromür Miktar Tayini	73
4.1.2.2.7.1.	Filtre Materyalinin Adsorpsiyon Testi	73

4.1.2.2.7.2.	Partiküllerde Yüklenen Toplam Piridostigmin Bromür Miktarı	74
4.1.2.2.7.3.	Partiküllerde Hapsedilen Piridostigmin Bromür Miktarı	74
4.1.2.3.	Mikroopartiküller ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmaları	79
4.2.	TARTIŞMA	91
4.2.1.	Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinler	91
4.2.1.1.	Piridostigmin Bromür	91
4.2.1.2.	Eudragit® RS	92
4.2.2.	Mikroopartiküller ile Yapılan Çalışmalar	93
4.2.2.1.	Formülasyonları	93
4.2.2.2.	Özellikleri	95
4.2.2.2.1.	Şekilleri	95
4.2.2.2.2.	Partikül İrilik Dağılımları	96
4.2.2.2.3.	IR Analizleri	97
4.2.2.2.4.	Termal Analizleri	97
4.2.2.2.5.	X-Işını Kırınım Analizi	98
4.2.2.2.6.	Hazırlama Verimi	98
4.2.2.2.7.	Piridostigmin Bromür Yükleme ve Hapsedilmesi	99
4.2.2.3.	Mikroopartiküller ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmaları	100
5.	KAYNAKLAR	103

## ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Piridostigmin Bromür'ün Kimyasal Yapısı	3
2.2. Köpek Plazmasında Piridostigmin Bromür'ün Konsantrasyon Ortalaması	8
2.3. Piridostigmin Bromür'ün Parçalanması	10
2.4. Mikropartiküller	16
2.5. Etkin Maddenin Partikül ve Sürekli Faz Arasında Difüzyon Dengesi	35
2.6. Etkin Madde İçeren Çekirdek- Çeper	36
4.1. PB'ün Distile Su Ortamındaki UV-Spektrumu	54
4.2. PB'ün IR- Spektrumu	55
4.3. PB'ün DSC Termogramı	56
4.4. PB'ün Distile Su Ortamındaki Standart Eğrisi	57
4.5. PB'ün Partikül İrilik Dağılımı	59
4.6. PB'ün X-Işını Kırınım Profili	59
4.7. Eudragit®'in DSC Termogramı	60
4.8. Eudragit®'in Reogramı	61
4.9. Eudragit®'in X-Işını Kırınım Analizi	62
4.10. PB'ün Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri	64
4.11. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri	64
4.12. Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri	65
4.13. PB'ün Işık Mikroskop Görüntüleri	65
4.14. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Işık Mikroskop Görüntüleri	66
4.15. Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Işık Mikroskop Görüntüleri	66

4.16. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Partikül Dağılım Eğrileri	68
4.17. Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Partikül Dağılım Eğrileri	69
4.18. Hazırlanan Mikropartiküllerin IR Spektrumları	70
4.19. Hazırlanan Mikropartiküllerin DSC Termogramları	71
4.20. Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Partiküllerin X-Işını Kırınım Eğrisi	72
4.21. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Partiküllerin X-Işını Kırınım Eğrisi	72
4.22. Filtre Materyallerinin Distile Su Ortamında Adsorbsiyon Testi Profilleri	76
4.23. Filtre Materyallerinin pH 1.2 Ortamında Adsorbsiyon Testi Profilleri	77
4.24. Filtre Materyallerinin pH 7.4 Ortamında Adsorbsiyon Testi Profilleri	78
4.25. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Distile Su Ortamında Salım Profilleri	80
4.26. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 1.2 Ortamında Salım Profilleri	81
4.27. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 7.4 Ortamında Salım Profilleri	82
4.28. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Distile Su Ortamında Salım Profilleri	83
4.29. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 1.2 Ortamında Salım Profilleri	84
4.30. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 7.4 Ortamında Salım Profilleri	85
4.31. Toz PB, EF8 ve DF7 Kodlu Formülasyonların Distile Su Ortamında Salım Profilleri	87

4.32. Toz PB, EF8 ve DF7 Kodlu Formülasyonların pH 1.2 Ortamında Salım Profilleri	87
4.33. Toz PB, EF8 ve DF7 Kodlu Formülasyonların pH 7.4 Ortamında Salım Profilleri	88
4.34. pH 1.2 Salım Ortamındaki Hixson-Crowell Kinetiğine Ait Eğri	89
4.35. pH 7.4 Salım Ortamındaki Hixson-Crowell Kinetiğine Ait Eğri	89
4.36. Distile Su Salım Ortamındaki Hixson-Crowell Kinetiğine Ait Eğri	90

## ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. Etkin Madde Dağıtılarak Hazırlanan Formülasyonlarda Kullanılan Parametreler	48
3.2. Etkin Madde Dağıtılarak Hazırlanan Mikropartikül Formülasyonlarının Kodları	48
3.3. Etkin Madde Çözündürülerek Hazırlanan Formülasyonlarda Kullanılan Parametreler	49
3.4. Etkin Madde Çözündürülerek Hazırlanan Mikropartikül Formülasyonlarının Kodları	50
4.1. UV- Spektrofotometrik Yönteme Ait Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik Sonuçları (RSD)	57
4.2. PB'ün Farklı Ortamlardaki Çözünürlük Değerleri ve Standart Hataları	58
4.3. Eudragit®'in Reolojik Analizine Ait Sonuçlar	61
4.4. Mikropartiküllerin Ortalama Partikül İrilikleri ve Spesifik Yüzey Alanları	67
4.5. Mikropartikül Hazırlama Verimleri	73
4.6. Mikropartiküllerde Yüklenen ve Hapsedilen PB Yüzdeleri ve Standart Hataları	74
4.7. Mikropartiküllerde PB Yükleme Kapasitesi ve Hapsedilme Kapasitesi Yüzdeleri ve Standart Hataları	75
4.8. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Distile Su Ortamında Salım Yüzdeleri	80
4.9. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 1.2 Ortamında Salım Yüzdeleri	81
4.10. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 7.4 Ortamında Salım Yüzdeleri	82

4.11. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartikülerin Distile Su Ortamında Salım Yüzdeleri	83
4.12. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartikülerin pH 1.2 Ortamında Salım Yüzdeleri	84
4.13. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 7.4 Ortamında Salım Yüzdeleri	85
4.14. Toz PB, EF8 ve DF7 Kodlu Formülasyonların Distile Su, pH 1.2 ve pH 7.4 Ortamlarındaki Salım Yüzdeleri ve Standart Sapmaları	86
4.15. Mikropartiküllerin Çözünme Hızı Kinetiklerinin Matematiksel Modellere Uyumu Çalışmalarının Bulguları	88

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AUC</b>	: Eğri Altındaki Alan
<b>CAB</b>	: Selüloz Asetat Butirat
<b>CAP</b>	: Selüloz Asetat Ftalat
<b>C<sub>maks</sub></b>	: Doruk Plazma Konsantrasyonu
<b>CS</b>	: Kitosan
<b>EC</b>	: Etil Selüloz
<b>GA</b>	: Glikolik Asit
<b>gD<sub>2</sub></b>	: Rekombinant glikoprotein
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>LA</b>	: Laktik Asit
<b>M<sub>ağ</sub></b>	: Molekül ağırlığı
<b>PB</b>	: Piridostigmin bromür
<b>PEG</b>	: Polietilen Glikol
<b>PLA</b>	: Poli (D, L-laktik asit)
<b>PLG</b>	: Poli (laktit-ko-glikolit)
<b>PLGA</b>	: Poli (laktik-ko-glikolik asit)
<b>SD</b>	: Standart Sapma
<b>SF</b>	: Serum Fizyolojik
<b>SH</b>	: Standart Hata
<b>TLC</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>t<sub>maks</sub></b>	: Doruk Plazma Konsantrasyonuna Ulaşma Süresi



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Her geçen gün, gelişen farmasötik teknolojiyle birlikte konvensiyonel ilaçların kullanımlarından doğan sıkıntıları azaltmaya yönelik birçok yeni çalışma yapılmaktadır. Bu doğrultuda, mikroküre, mikrokapsül ve nanopartikül gibi yeni ilaç şekilleri üzerinde yoğun çalışmalar sürmektedir. Bu ilaç şekilleri, etkin maddeyi en düşük dozda ve etkin olarak hastaya vermeyi amaçlamaktadır. Aynı zamanda, bu sistemler, etkin maddeyi polimer (membran, matris) içine gömerek, kararlılığın sağlanması, yan etkilerinin azaltılması ve ilaç salım hızının modifiye edilmesi gibi birçok avantajlar sunmaktadır (1).

Çalışmamızda, polimerik mikropartiküllerin hazırlanmasında, kullandığımız etkin madde ve polimerin özellikleri açısından, püskürterek kurutma yönteminin kullanılmasının uygun olabileceği düşünülmüştür. Püskürterek kurutma yöntemi, mikropartiküllerin hazırlanmasında kapsamlı olarak kullanılan önemli bir teknolojidir (2,3).

Formülasyonları düşünülen partiküllerde etkin madde olarak tersinir antikolinesteraz etkili bir etkin madde olan piridostigmin bromür seçilmiştir. Piridostigmin bromür, *myastenia gravis* hastalığında yaygın olarak kullanılan kolinerjik bir maddedir (4). Ayrıca Alzheimer hastalığının tedavisinde denenmektedir (5,6). Fakat, tedavi sırasında sık ilaç alımından ve yan etkilerinden kaynaklanan sakıncaları bulunmaktadır. Bu nedenle, etkin maddenin yan etkileri ve kısa eliminasyon yarı ömrünün neden olduğu sık kullanımını ortadan kaldırmak, uzun süreli etki elde etmek bu çalışmadaki hedeflerimiz arasındadır.

Hazırlamayı planladığımız partiküllerde taşıyıcı olarak inert ve uzatılmış salım sağlama potansiyeli olan akrilik polimer (Eudragit® RS) tercih edilmiştir (7,8). Eudragit® RS, akrilik ve metakrilik asit esterlerinin kopolimeridir (9).

Farklı hazırlama yöntemleri ve konsantrasyon oranları ile hazırlanacak partiküllerde, önce in vitro çalışmalarla partiküllerin özellikleri (şekil, partikül iriliği dağılımı, PB'ün yüklenmesi, PB salımı ve stabilite) saptanarak, iki farklı hazırlama yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar arasında karşılaştırma

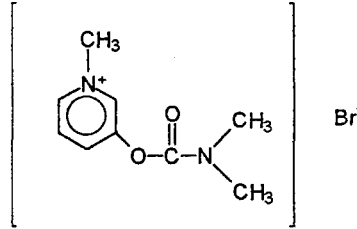
yapılacaktır. Bu çalışmalara başlamadan önce, kullanılacak etkin madde ve polimerin spesifikasyonlara uygunlukları tespit edilecek, etkin maddenin in vitro miktar tayini için seçilen yöntemin validasyonu gerçekleştirilecektir. İn vitro çalışmalardan elde edilen sonuçlar, toz piridostigmin bromür ile karşılaştırılacaktır. Böylece, yüksek derecede hidrofilik bir etkin madde olan piridostigmin bromür'ün akrilik polimer taşıyıcı sistem içinde mikropartiküllerinin geliştirilmesi ile sık ilaç alımının azaltılmasına ne oranda katkıda bulunabileceğimiz araştırılacaktır.

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. PİRİDOSTİGMİN BROMÜR

#### 2.1.1. Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Piridostigmin bromür (PB), kolinerjik, *myastenia gravis* tedavisinde kullanılan bir etkin maddedir (10,11). Açık formülü 3-dimetilkarbamoiloksi-1-metilpiridinium bromür'dür ve kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Kapalı formülü  $C_9H_{13}BrN_2O_2$ , molekül ağırlığı ise 261.12'dir (10,11,12,13). Beyaz veya beyazımsı renkli, kristal yapıda tozdur. 20°C altında 1 kısım PB, 1 kısımdan az miktarda su ve alkolde, 1 kısım kloroformda çözünür. Eter, aseton ve benzende pratik olarak çözünmez (10,11,12,13,14,15). Erime derecesi 152-154°C (15) veya 154-157°C olarak rapor edilmiştir (16). Hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır. Işıktan korunmalıdır. Otoklavda sterilize edilebilir (11,12).



Şekil 2.1. Piridostigmin Bromür'ün Kimyasal Yapısı

#### 2.1.2. Analiz Yöntemleri

PB, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler ile kolayca analiz edilebilir. PB ve ana metaboliti olan 3-hidroksi-1-metilpiridinium bromür'ün, kan ve idrar örneklerinde kantitatif analizi, sırasıyla, kolorimetri, radyoimmün inceleme, sıvı gaz kromatografisi, gaz kromatografisi, TLC ve HPLC ile yapılmıştır. Biyolojik sıvılarda PB ve temel metabolitinin kantitatif analizinde HPLC yönteminin duyarlı, seçici, kolay ve hızlı bir yöntem olduğu saptanmıştır (17,18).

Son yıllarda, HPLC ile kütle spektrometresi arasındaki yüzeysel termosprey kullanılarak, PB'ün insan plazmasındaki konsantrasyonu kantitatif

olarak analiz edilmiştir. Bu yöntem çok duyarlı ve spesifiktir. Bu yöntemin diğer bir özelliği ise, PB'ün plazma konsantrasyonunun 1 ng.ml<sup>-1</sup>'e kadar ölçülebilmesidir (19).

Başka bir kantitatif çalışmada, PB'ün insan idrarında kantitatif analizi Direct Inlet Electron Impact Ionization Mass Spectrometry (DI/EI-MS) ile yapılmıştır (20). Bu yöntem katerner amonyum gurubu içeren bileşiklerin analizinde etkili, hızlı ve uygun bir yöntemdir (20).

Başka bir analiz çalışmasında ise, PB'ün plazma konsantrasyonunu tayin etmek için HPLC yönteminden daha duyarlı ve daha geçerli bir yöntem kullanılmıştır (21). Bu yöntem, radyoimmün inceleme'dir. Radyoimmün inceleme yöntemi son yıllarda fizyolojik, toksikolojik ve terapötik ajanların analizinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu yaklaşımdan hareket ederek, sıçanlara kas içine uygulandıktan sonra, piridostigmin'in farmakokinetik parametrelerinin saptanmasına çalışılmıştır. Bu yöntemde, plazma örnekleri küçük hacimlerde (100 µl) kullanılmaktadır; bu yüzden bu yöntemi kullanarak küçük hayvanlarda piridostigmin'in farmakokinetik çalışmaları gerçekleştirilebilir (21).

### 2.1.3. Farmakolojik Özellikleri

Tersinir antikolinesterazlardan PB, *myastenia gravis* tedavisinde ve sinir sistemine etki eden ajanlara karşı koruyucu olarak kullanılır. Ayrıca Alzheimer hastalığının tedavisinde denenmektedir (5,6). Günümüzde, *myastenia gravis* tedavisinde kullanılan antikolinesteraz ilaçların arasında en sık tavsiye edilen etkin madde piridostigmin'dir (4). Tercih edilmesinin nedeni, muskarinik bölgedeki etkisinin, kullanımda bulunan diğer tersinir antikolinesteraz maddelerin etkilerinden daha üstün olmasıdır (5). *Myastenia gravis* tedavisinde kullanılan başka bir etkin madde olan neostigmin'in etki süresinden daha uzun etki süresine sahiptir (10,22,23). Yüzeysel muskarinik reseptörlerin stimülasyonunun eksikliği ile belli bir şekilde karakterize edilen nöromüsküler hastalıklarda da kullanılmaktadır. Piridostigmin'in, sinir sistemine etki eden ajanlar Sarin® ve Soman® gibi tersinir olmayan organofosfat antikolinesteraz inhibitörlerinin meydana getirdikleri zehirlenmelere karşı kullanılması önerilmektedir (24,25).

Piridostigmin bromür, sinir dokusunun asetilkolinesterazı ile yarışarak tersinir olarak bağlanır, periferik sinir sisteminin asetilkolinesteraz aktivitesini %30-40 tersinir olarak inhibe eder; böylece sinir dokusunun asetilkolinesterazını, organofosfat gazlarla uzun süreli tersinir olmayan inhibisyonundan korur (6,26). Farmakolojik bir çalışmada, 18 myastenik hastada, oral piridostigmin ile tedavi görürken, kas gücü, yardımcı sinirin sürekli stimülasyon sonucu trapezius kasındaki nöromüsküler geçişin azalması ve piridostigmin plazma seviyesi birkaç kez ölçülmüştür. 11 durumun 3'ünde piridostigmin konsantrasyonu ile etkinlik parametreleri arasında anlamlı korelasyon olduğu gözlenmiştir. Bu 11 durumda, araştırma süresi içinde piridostigmin'in plazma seviyelerinin  $25 \text{ ng.ml}^{-1}$  -  $100 \text{ ng.ml}^{-1}$  arasında değiştiği saptanmıştır. Diğer gözlemlerin bazılarına göre, piridostigmin plazma seviyelerinin  $100 \text{ ng.ml}^{-1}$ 'i geçmesi, nöromüsküler fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır (27).

Bir başka çalışmada, asetilkolinesteraz inhibitörü olarak kullanılan PB'ün insanlarda cilt kan akışını azalttığı görülmüştür (28).

İsrail'de gerçekleştirilen bir çalışmada, birkaç seneden beri antikolinesteraz ilacı olan Mestimon<sup>®</sup>'u günlük 300-600 mg dozda alan 24 myastenik hastanın safra kesesi ve safra kanalları ultrason kullanılarak incelenmiş ve bu bölgelerde taş oluşmasına ait bir kanıt bulunamamıştır. Üstelik İsrail halkının yaklaşık %30'unun safra kanalları ve safra kesesinde taş oluşmaktadır. Aynı bölgede ve aynı şartlara maruz kalan 112 sağlıklı kişiye aynı kontroller yapılmış, kontrollerin sonucuna göre 45 kişinin safra taşı taşıdığı gözlenmiştir. Mestimon<sup>®</sup>'un etkisinin, vagal sistemde sürekli parasempatomimetik etkileri uyarıp safranın hareketini artırması olduğu, ve böylece safra salgısının boşalmasını düzelttiği düşünülmektedir (29).

Piridostigmin, katerner amonyum gurubu içerdiği için kan-beyin engelini aşamamakta ve bundan dolayı santral sinir sisteminin asetilkolinesterazını etkileyememektedir (6,22).

### **2.1.3.1. Etki Mekanizması**

Piridostigmin, asetilkolin'in hidrolizini sağlayan kolinesterazın sentetik bir tersinir inhibitörüdür (26,30,6). Piridostigmin, asetilkolinesteraz'a bağlanmak

için asetilkolin ile yarışır ve asetilkolin gibi enzimle hidrolize edilir. Bununla birlikte, piridostigmin'in hidrolizi, asetilkolin hidrolizinden daha yavaştır. Dolayısıyla, asetilkolin'in hidrolizi daha etkili bir şekilde engellenir ve sonuçta muskarinik stimülasyon artar (24,25). Kolinesteraz inhibisyonu ile nöromusküler kavşaktaki sinaptik aralıkta bulunan asetilkolin konsantrasyonunu artırıp kasların kasılmasının artmasına yol açar (23,31).

Karbamoil gurubuna sahip olan etkin maddeler asetilkolinesteraz ile hidrolize edilirler (32). Söz konusu karbamatlar, tıpkı bazı kolin esterleri gibi, kolinesterazların substratıdır. Böylece asetilkolin ile enzimin aktif merkezi için yarışır (22). Katerner amin gurupları fizyolojik pH'larda katyon olarak hareket ederler (32). Katerner amin gurupları ile aktif merkezin anyonik noktasına tutunurlar, karbamoil gurupları ile ise enzimin esteratik (açıl bağlayan) noktasına kovalan bağla bağlanırlar. Bu sırada molekülde ester bağı kırılır ve baz kısmı ayrılır; sonuç olarak enzim karbamoillenmiş olur (22). Böylece tersinir antikolinesteraz olan piridostigmin, iskelet kaslarda bulunan asetilkolinesteraz'ın etkinliğini, asetilkolinesteraz'ın aktif bölgesinde yer alan serin'in hidroksil gurubunu karbamoilleyerek inhibe etmektedir (5). Esteratik bölge ile piridostigmin'in karbamoil gurubu arasında oluşan bağ oldukça hızlı hidrolize edildiği için kolinesteraz molekülünün inhibisyonu oldukça kısa sürer (30). Asetilkolin'in enzimle etkileşmesi sonucu oluşan asetil-enzim kompleksi çok çabuk hidrolize edildiği halde, metilkarbamoil-asetilkolinesteraz veya dimetilkarbamoil-asetilkolinesteraz kompleksleri daha kararlıdır ve daha geç hidrolize edilirler. Sonuç olarak, enzim tersinir olarak birkaç saat inhibe edilmiş olur (22,32).

### **2.1.3.2. Farmakokinetiği**

Piridostigmin hakkında çeşitli farmakokinetik çalışmalar rapor edilmiştir. Fare ve köpeklere damar içi, kas içi ve oral yol ile uygulandıktan sonra piridostigmin'in farmakokinetiği incelenmiştir. Ayrıca, myastenik hastalarda plazma konsantrasyonu, biyoyararlanımı, metabolizması ve anne sütü ile atılımı da rapor edilmiştir (23).

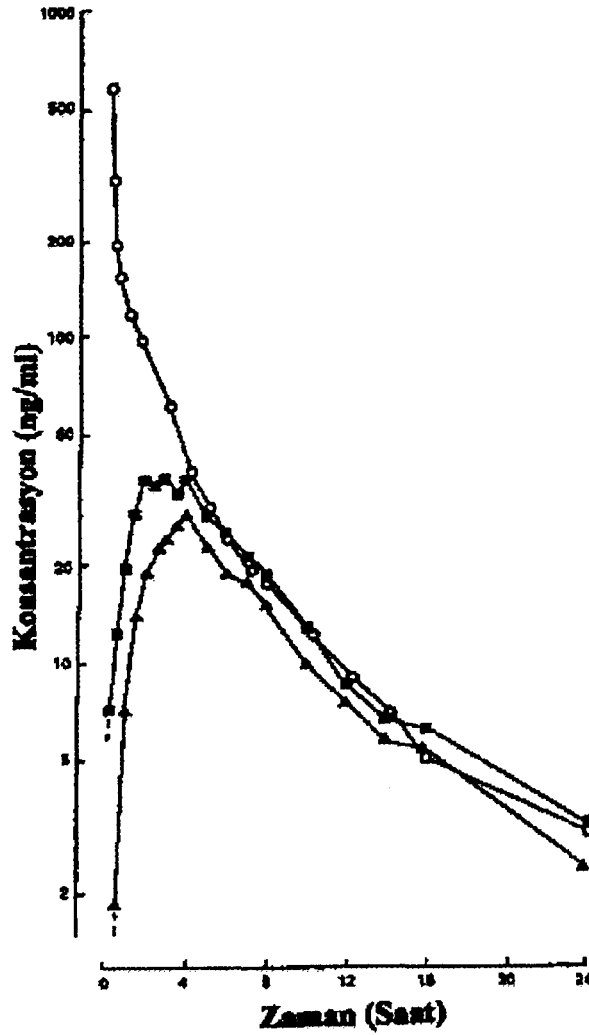
Piridostigmin, katerner amonyum gurubu içermesi nedeniyle, ağız yolundan alındığında gastrointestinal bölgeden az emilir (24). Gönüllü

insanlarda, PB'ün, 60 mg tek oral dozundan sonra eliminasyon yarı ömrünün 0.35 saat olduğu saptanmıştır (6).

Farelerde yapılan bir çalışmada, piridostigmin'in total vücut klerensi ve kararlı durumda dağılım hacmi gibi farmakokinetik değerlerini incelemek için farelere damar içine ( $0.5-2 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) etkin madde verilmesinin ardından, total vücut klerensinin  $15.0 \pm 0.2 \text{ ml.dak}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ , kararlı durumda dağılım hacminin  $0.353 \pm 0.05 \text{ l.kg}^{-1}$ , eliminasyon yarı ömrünün  $24.2 \pm 4.2 \text{ dak}$  olduğu bulunmuştur (23). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, başka çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzememektedir. Bunun nedeni ise, deney koşulları, doz ve örnekleme programının farklı olması olabilir. Kolinesteraz inhibitörleri, hızlı eliminasyonuna karşın, karaciğer ve böbrekte yüksek oranda birikirler. Damar içine uygulanan dozun, 20 dakika sonra yaklaşık %50'si karaciğer ve böbrekte dağılmasına rağmen, kararlı durumda dağılım hacmi bir dereceye kadar düşüktür. Kararlı durumda dağılım hacmi, ekstrasellüler aralıklardakinden biraz yüksek, kas/plazma konsantrasyon oranına ise benzemektedir. Bunun nedeni, kolinesteraz inhibitörlerinin karaciğer ve böbreğe taşınca plazma kompartmanlarına geri dönebilmesinin zor olmasıdır. Etkin maddenin bu dokulara taşınması, eliminasyon işlemi gibi sayılmış olabilir. Onun için, belki de, karaciğer ve böbreklere taşınma işlemi, kolinesteraz inhibitörlerin toplam vücut klerensi'nde başlıca belirleyicidir. Dolayısıyla, kolinesteraz inhibitörlerin plazmadan hızla kayıp olmasının nedeni, karaciğer ve böbreğe yoğun bir şekilde taşınması olabilir. Bununla birlikte, bir dereceye kadar düşük olan kararlı durum dağılım hacmi, asetilkolinesteraz inhibitörlerin dağılımının esas belirleyici olarak kaslarda ve diğer organlar/dokuların ekstrasellüler aralıklarında olduğunu göstermektedir (23).

Bir başka çalışmada, piridostigmin'in farmakokinetiği, 6 erkek av köpeğine damar içi enjeksiyon, şurup ve tablet olarak oral yol ile uygulandıktan sonra incelenmiştir (25). Plazmada piridostigmin'in ortalama konsantrasyonları, **Şekil 2.2**'de görülmektedir. Damar içi uygulamadan sonra piridostigmin'in ortalama yarı ömrü  $8.3 \text{ saat} \pm 2.1$  (standart sapma) bulunmuştur. Sonuçlara göre, piridostigmin'in oral biyoyararlanımı düşüktür: şuruplardan sonra sistemik biyoyararlanım  $\% 44.4 \pm 4.3$ 'dür; tabletlerden sonra ise  $\% 33.6 \pm 9.5$ 'dur. Sistemik

klerensin  $13 \text{ ml.dak}^{-1}.\text{kg}^{-1} \pm 1$ ; toplam dağılım hacminin ( $V_{d\lambda z}$ ),  $8.7 \text{ l.kg}^{-1} \pm 1.9$ ; ve kararlı durumda dağılım hacminin ise ( $V_{dss}$ ),  $3.9 \text{ l.kg}^{-1} \pm 0.9$  olduğu saptanmıştır. Dokularda ve plazmada ortalama kalma süresinin oranı 4'ten büyüktür. Piridostigmin'in, gastrointestinal bölgede yavaş emilimi ve düşük biyoyararlanımına rağmen, köpeklere, şurup şeklinin uygulanmasının ardından sistemik yararlanım oldukça kararlıdır (% 40-50) (25).



Şekil 2.2. Köpek Plazmasında PB'ün Konsantrasyon Ortalaması (n=6): 10 mg PB i.v. İnfüzyonundan sonra (o-o); şurup alımından sonra (■-■); tablet alımından sonra (▲-▲).



Başka araştırmacılar, köpeklere damar içi yolu ile verilen piridostigmin'in ( $0.14 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) %74'ünün değişmeden 4 saat içinde atıldığını rapor etmişlerdir (25). Bu nedenle, karaciğer, bu etkin maddenin başlıca eliminasyon organı olarak görülmeyebilir. Sonuç olarak, biyoyararlanımın düşüklüğü, presistemik eliminasyondan çok emilim eksikliğine ait olabilir.

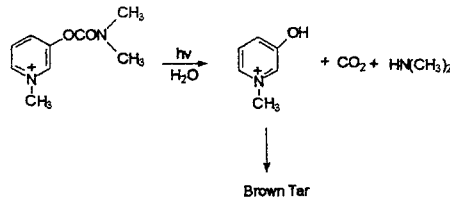
Piridostigmin tabletlerinin alınımının ardından, ilk dört saat içinde etkin madde konsantrasyonu ve biyoyararlanımdaki azalma, tabletlerden maddenin salım eksikliğinden kaynaklanmış olabilir. Bunun yanısıra, etkin maddenin tabletlerden biyoyararlanımı çok değişkendir. Değişkenlik katsayıları tablette %28.3 iken şurup için %9.7'dir. Bu veriler, kolinesteraz inhibitörlere karşı piridostigmin uygulamasında tablet kullanımının, şurup kullanımına avantajlı olmadığını göstermektedir (25).

Başka bir farmakokinetik çalışmada, sıçanlara PB ( $0.056 \text{ mg/kg}$ ) kas içine uygulandıktan sonra, piridostigmin'in plazma seviyeleri incelenmiştir (21). Sonuçta, görünür dağılım hacmi  $1.97 \text{ l.kg}^{-1}$ , AUC  $1010 \text{ ng.dak.ml}^{-1}$ , emilim yarı ömrü 2.41 dak, eliminasyon yarı ömrü 24.8 dak,  $C_{\text{maks}}$   $21.3 \text{ ng.ml}^{-1}$  ve  $t_{\text{maks}}$  9.02 dak olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, sıçanlarda dağılım hacminin  $1.94 \text{ l.kg}^{-1}$  olduğu bildirilirken, başka bir çalışmada insanda dağılım hacminin  $1.43 \text{ l.kg}^{-1}$  olduğu rapor edilmiştir (21). Bunun yanısıra, sıçanlardaki eliminasyon yarı ömrünün (25 dak), başka bir çalışmada rapor edilen insandaki eliminasyon yarı ömründen (89-112 dak) çok farklı çıkması, piridostigmin'in sıçanlarda metabolizmasının ve/veya atılımının insanlardakinden daha hızlı olduğunu göstermektedir (21).

Başka bir çalışmada, hem myastenik hastalara hem de sağlıklı gönüllülere 4 mg damar içi ve 60 mg oral yol ile PB verildikten sonra plazmada piridostigmin farmakokinetik değerleri hesaplanmıştır (33). AUC hesapları sonucu, oral biyoyararlanımın % 11.5-18.9 olduğu bulunmuştur (ortalama=%14.3). Oral alınımın ardından, yarı ömür ortalaması 200 dak'dır.  $C_{\text{maks}}$ , doz verildikten 1-5 saat sonra elde edilmiştir. Damar içi uygulamadan sonra eliminasyon yarı ömrü 97 dak'dır. Bunun sonucu, özellikle ilacın yemekten hemen sonra verildiği koşulda, emilim olayının eliminasyon olayından daha yavaş seyrettiği kararına varılmıştır (33).

Piridostigmin plazma kinetiği, myastenik hastalara ve sağlıklı gönüllülere, oral ve parenteral dozları verildikten sonra incelenmiştir (33). Çalışmada elde edilen verilerin birbirinden oldukça farklı olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni iki temel faktörden olabilir: kullanılan analiz yöntemleri ile ilgili problemler (duyarlılık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik gibi); plazma örneklerinin uygun olmayan saklama koşulları. Plazma örneklerinin  $-20^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta saklanması piridostigmin'in kararsızlığına yol açmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, plazma örneklerin asitleştirilmesi ve  $-75^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta saklanması önerilmektedir (33). Aynı çalışmada, oruçlu durumlarda piridostigmin emiliminin oruçsuz durumlara oranla daha hızlı olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, oruçsuz durumlarda etkin madde emilimi değişkendir (33). Başka bir çalışmaya göre, gıda alınması biyoyararlanıma etki etmemekte, ancak plazma konsantrasyonunun doruk noktasına ulaşması için geçen süreyi geciktirmektedir (12).

Piridostigmin, kolinesteraz tarafından hidrolize edildiği için karaciğerde metabolize edilir (10). Bilindiği gibi, katerner amonyum gurubu içeren kolinesteraz inhibitörleri idrar yolu ile kolayca ve çok miktarlarda atılırlar (23). Değişmeden ve metabolitleri halinde başlıca idrarla atılır (10). Piridostigmin'in plazma klerensinin %75'i renal fonksiyonlara bağlıdır (12). Piridostigmin alan hastaların idrarlarından izole edilen üç metabolitten birisi ve ilk geçiş metabolizması ile oluştuğu sanılan 3-hidroksi-N-metilpiridinium teşhis edilmiştir (12,11,17,23). Şekil 2.3.'de piridostigmin'in parçalanması gösterilmektedir (17).



Şekil 2.3. Piridostigmin'in Parçalanması

İnsanlara verilen dozun % 2-16'sı değişmeden ve % 2.5'u 3-hidroksi-N-metilpiridinium olarak idrarla atılır (11). Sıçanlara verilen piridostigmin'in ise

% 42'si idrarla, % 38'i dışkı ile atılmaktadır (11). Farelerde yapılan bir çalışmada, idrar yolu ile atılan etkin madde oranının % 59.5  $\pm$ 11.2 olduğu ve safra yolu ile atılan etkin madde oranının ise % 0.23  $\pm$ 0.22 olduğu bulunmuştur (23). Piridostigmin, plasentadan geçebilir ve çok az miktarlarda anne sütü ile atılır. Santral sinir sistemine geçmesi zayıftır (10).

### 2.1.3.3. Formülasyonu

Aralarında piridostigmin'in de bulunduğu antikolinesteraz etkili maddeleri hastaların % 99'u oral yol ile almaktadır. Asetilkolinesteraz etkili maddeleri aşağıdaki nedenlerden dolayı farklı formülasyonlarda uygulamak uygun olabilir (4):

- a- Piridostigmin gibi katerner amonyum grubu içeren bileşiklerin gastrointestinal bölgedeki emilimleri zayıftır,
- b- Büyük hacimli oral dozlar, bilinmeyen bir nedenle barsaktan emilimin artması sonucu toksik etkilere yol açabilir,
- c- Orofarenks'in güçsüzlüğü, oral tedaviyi önleyebilir, ve gerekli önlemler alınmadan asetilkolinesterazların uygulanması tehlikeli olabilir.

İntranazal formülasyonların üstünlüğü, damarlarca zengin olan rinofarenkste lokal tedavi gereksiniminde, hastalara her gün uygulama kolaylığı, düzensiz barsaktan emilim veya yutma güçsüzlüğüne sahip olan hastalarda öne çıkmaktadır (4).

Yapılan bir çalışmada, PB farklı yardımcı maddelerle karıştırılarak, sıçanların normal ve skarlı derilerinden emilimi incelenmiştir (34). Elde edilen sonuçlara göre, PB'ün deri yolu ile emilimi artırılabilir veya azaltılabilir. % 8 nerol içeren etanol ile ilaç emilimi yüksek olmakta (normal deride % 78.4 $\pm$ 3.6 ve skarlı deride % 72.8 $\pm$ 4.5), ancak % 10 propilen glikol içeren etanol, piridostigmin'in emilimini düşürmektedir (normal deride % 9.9 $\pm$ 2.6 ve skarlı deride % 2.2 $\pm$ 1.2) (34).

PB'ün emilimi, gastrointestinal bölgeden zayıf olduğu için bu etkin maddenin transdermal yol ile salımı tercih edilebilir. Ancak, polar hidrofilik bir etkin madde olması nedeni ile de deriden yüksek oranda geçirgenlik göstermez. Bir çalışmada, insan kadavra derisinden, PB'ün geçişi incelenmiştir (35).

Sonuçlar, piridostigmin'in deriden geçişinin zayıf olduğunu göstermiştir. Anyonik ve noniyonik yüzey etkin maddeler (örneğin, sodyum oleat, sodyum lauril sülfat, n-desil metil sülfoksit ve N,N-dimetildodesilamin-N-oksit) kullanılarak maddenin geçişi artırılabilir (35).

#### 2.1.4. Yan Etkileri ve Toksisitesi

Piridostigmin alan hastalarda sık görülen istenmeyen belirtiler, yorgunluk, göz kapağı ağırlığı ve gastrik şikayetlerdir (33). Bu belirtiler, dozu verdikten sonra ilk 2-3 saat içinde ortaya çıkarlar ve piridostigmin plazma düzeyleri ile bağlantılı değildir. Bazı hastalarda ise, damar içi uygulamanın ardından kas seyirmeleri rapor edilmiştir (33).

PB'ün yan etkileri arasında, bulantı, kusma, karın krampları, peristaltizm'de artma, ishal, tükürük salgısında artış ve miyozis sayılabilir (36). Antikolinesteraz etkili maddelerin aşırı dozda kullanılmasına bağlı olarak, genel kas güçsüzlüğü ve solunum felci ile ortaya çıkan kolinerjik kriz görülebilir. Myastenik hastalarda atropin ve benzeri maddelerle birlikte kullanılması yan etkileri maskeleyebilir. Kusma, terleme, aşırı tükürük ve gözyaşı salgısı, miyozis, yüzde solukluk, solunumda bozulma, kas felci, bradikardi, hipotansiyon gibi belirtiler yüksek dozlarda görülür. Konfüzyon ve koma da görülebilir (36).

PB'ün, transdermal olarak kullanıldığı durumlarda alerjik temas dermatit'i görülebilir ve dolayısıyla deri duyarlı hale gelir (37).

Köpeklere verilen PB'ün toksik etkileri incelenmiştir (24). Etkilerin genellikle gastrointestinal bölge ile sınırlı kaldığı ve ishal veya yumuşak dışkı ve kırmızı renkli veya mukozal dışkı gibi belirtiler ortaya çıkmıştır. Yüksek dozlar verildiğinde (14 gün boyunca, günlük doz 10 veya 20 mg.kg<sup>-1</sup>) bazı köpeklerde öldürücü etki görülmüştür; bazılarında ise, şiddetli intestinal ağrıya neden olmuştur. Görülen ölümlerin nedeni ise barsağın bir kısmının yandaki kısma girmesidir. Ayrıca yüksek dozlara bağlı olarak, sistemik toksisite aşırı tükürük salgısı ve titremeler içermektedir (24).

PB'e, akut ve subakut olarak maruz kalan sıçanlarda, diyafram, *soleus* ve *extensor digitorum longus* kaslarının nöromusküler kavşaklarında morfolojik değişiklikler olmuştur (6).

PB, hamile sıçanlara yüksek dozlarda verildikten sonra, yavruların ağırlığında hafif ve geçici azalma, kemik gelişmesinde hafif bir gecikme ve erken geri emilim görülmüştür (26).

PB tedavisi gören bazı hastalarda bromür zehirlenmesi olduğu rapor edilmiştir (38). Hastalarda, ajitasyon, zihin karışıklığı, paranoya kuruntu ve görsel halüsinasyon gibi belirtiler ile karakterize edilen akut nörolojik semptomlar meydana gelmektedir. Bu geçici belirtiler, bromür içeren bileşiklerin yüksek dozlarında ortaya çıkmaktadır. Nörolojik semptomların, yoğun stres ile birlikte psikoz oluşturabileceği tahmin edilmektedir (38).

## 2.2. MYASTENİA GRAVİS HASTALIĞI

*Myastenia gravis*, nöromüsküler bir hastalıktır. Başlıca belirtileri çizgili kasların güçsüzlüğü ve çabuk yorulmadır (22,32). Hastalığın belirtileri zaman zaman şiddetlenir (myasteni krizi) ve ardından bir süre kısmen hafifler. *Myastenia gravis*'teki fizyolojik bozukluk, nöromüsküler kavşaklardaki sinaptik geçiştir (22,32). Hastalık, asetilkolin'in nikotinic reseptörlerine karşı antikor oluşması nedeniyle oluşan nöromüsküler geçiştirdeki eksiklik ve bunun sonucu olan kasların güçsüzlüğü ile karakterize edilmektedir (10). Normalde motor sinirleri 25 Hz frekans ile uyarılınca, elektriksel ve mekaniksel yanıtlar düzgün olarak sürdürülmektedir. Bu frekans değeri, nöromüsküler geçişin güvenle sürdürülmesi için uygun bir sınırdır. Myastenik hastalarda ilk yanıtlar normal olabilir, ancak hızla azalır. Bu durum, istemli kas kasılmasının kısa süreli periyotlardan daha fazla sürdürülebilmesindeki güçlükleri açıklamaktadır. Hastalığın oluşmasında otoimmünite önemli rol oynar. Olguların pek çoğunda nöromüsküler kavşaktaki nikotinic asetilkolin reseptörlerine karşı serumda antikor bulunmuştur. Bu antikorların kasta postsinaptik membranda (son-plakta) toplandığı gösterilmiştir (22). Antikorların, oradaki kolinerjik reseptörlerin yıkılmasını hızlandırması nedeniyle reseptör sayısı büyük oranda azalmıştır. Yılan nörotoksinlerinin nikotinic reseptörlere yüksek afinite ile bağlanma özellikleri kullanarak myastenik hastalarda son plak nikotinic kolinerjik reseptörlerin sayısında % 70-90 azalma tespit edilebilmiştir. Antikorlar, asetilkolin'in reseptörlere bağlanmasını bozmazlar.

*Myastenia gravis*'te nöromüsküler kavşaktaki bozukluğun önemi, Patrick ve Lindstrom (1973) tarafından keşfedilmiştir (32). Elektrik yılanbalığından elde edilen saflaştırılmış nikotinik reseptörlerin tavşanlara enjeksiyonu ile elde edilen antikolar ile, deney hayvanlarında “deneysel myastenia” oluşturulmuştur. *Myastenia gravis*'in belirtilerine benzeyen, kasların güçsüzlüğü ve solunumda zorluklar gibi belirtiler geliştirilmiştir. Hastaların serumunun farelere enjeksiyonu ile de aynı durum oluşmaktadır (32). *Myastenia gravis* hastalarında reseptör antikoları hemen teşhis edilir. Myastenik hastaların klinik durumu, antikor titrasyonu ile tam olarak bağımlı olmamasına rağmen, hastaların %90'ının serumunda reseptör ile antikoların bağlandığı bulunmuştur. Plazmada oluşan antikolar, reseptörlerin sayısını azaltır. Otoimmün reaksiyonlar reseptörlerin parçalanmasını artırır. Myastenia sendromuna yakalanan hastaların yaklaşık %10'unda görülen kas güçsüzlüğünün otoimmün olmasından ziyade doğuştan kaynaklandığı bildirilmiştir (32).

Antikolinesteraz ilaçların aşırı dozları kolinerjik krizlerle sonuçlanmaktadır. Durum, motor son plak depolarizasyonundan meydana gelen güçsüzlükle karakterize edilir; diğer durumlar ise, muskarinik reseptörlerin aşırı uyarılması sonucu ortaya çıkar (32). Depolarizasyonun bloklanmasıyla meydana gelen güçsüzlük, myastenik güçsüzlüğe benzeyebilir; bu durum antikolinesteraz tedavisi yetersiz olduğu zaman olmaktadır. Aralarındaki fark pratiğin önemini göstermektedir: ilki antikolinesteraz ajanların verilmemesi ile, diğeri ise antikolinesteraz ajanların uygulanması ile tedavi edilir (22,32).

Hastaların çoğunun timusunda bozukluk vardır, bazılarında timus tümörüne (timoma) rastlanmıştır. *Myastenia gravis*, belirtilerin dağılım yerine ve şiddetine göre sınıflandırılabilir (32):

- Oküler myastenia. Hastalık ekstraoküler kaslarda görülür.
- Hafif veya orta şiddetli myastenia. Ekstraoküler kasların dışındaki kaslarda etki görülür.
- Aniden, şiddetle oluşan geçici myastenia.
- Gittikçe şiddetlenen myastenia.

Bir başka sınıflandırma ise yaş ve timoma'lı olup olmadığını temel almaktadır. Buna göre, timoma'lı olmayanlar 40 yaşından önce ve sonra olmak üzere iki guruba ayrılır.

Myastenia'nın diğer bir tipi, myastenia'lı annelerden doğan bebeklerin bir kısmında görülen, plasentadan geçen reseptör antikorlar nedeniyle, 1-6 hafta süren "*Neonatal myastenia*"dır. Başka bir tipi de, penisilamin kullanımı ile ortaya çıkan myastenia'dır (10).

## 2.3. MİKROPARTİKÜLLER

### 2.3.1. Tanımı

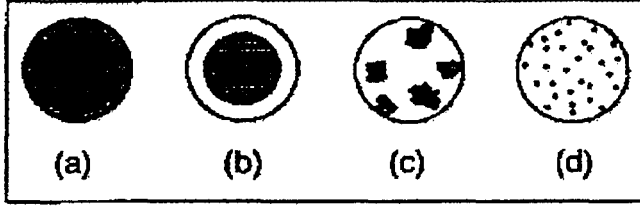
Mikropartikül terimi, etkin madde içeren ve 1000 µm'den küçük çaptaki polimerik küresel partikülleri tanımlamak için kullanılan genel bir isimdir. Bununla birlikte daha büyük boyuttaki mikropartiküllerin de hazırlandığı görülmektedir (1,39,40,41).

Özellikle son yirmi yıldır, mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde, polimerlerin değişik tipleri kullanılarak yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu sistemlerin, etkin maddeyi polimer ağ içine gömerek kararlılığının sağlanması, yan etkilerinin azaltılması, lokal irritasyon kapsamındaki yan etkilerden korunması ve maddenin salım hızının modifiye edilmesi gibi birçok amacı vardır (1).

### 2.3.2. Sınıflandırılması

Mikropartiküler sistemlerin birçok sınıflandırması yapılmıştır. Yapısal karakteristiklerine bağlı olarak özellikle mikroküreler ve mikrokapsüller olarak isimlendirilebilirler. Mikrokapsüllerin isimlendirme sistemini ilk kez Arshady ortaya koymuştur (42). Mikrokapsüller, membran ile çevrelenmiş, katı veya sıvı ilaç çekirdeğinden oluşan partiküllerdir (Şekil 2.4b) (1). Membran, bir veya daha çok polimerden oluşur ve etkin madde salımının hız sınırlayıcı unsurudur. Bu sistemler depo tip partiküller olarak da nitelendirilebilirler. Mikroküreler ise, etkin maddenin, polimer matriste baştan başa disperse olduğu veya çözündüğü, monolitik veya homojen karakterli, partiküler veya moleküler halde iyi aglomere olmuş partiküller olarak tanımlanabilir (Şekil 2.4a) (1,39).

Mikropartikül genel terimi kullanılmalıdır, çünkü, sıklıkla mikrokapsül ve mikroküreleri birbirinden ayırdetmek çok güçtür. Mikropartiküller, birkaç etkin madde kristali içerdiğinde, multinükleer mikrokapsüller (Şekil 2.4c) veya heterojenik mikroküreler (Şekil 2.4d) olarak nitelendirilirler (1,39,43).



Şekil 2.4. Mikropartiküller: Mikroküreler (a), Mikrokapsüller (b), Multinükleer Mikrokapsüller (c) ve Heterojenik Mikroküreler (d)

Mikrokürelerin ve mikrokapsüllerin partikül irilikleri 1 µm'den ufak olduğunda ise, yapısal olarak, sırasıyla, nanoküreler ve nanokapsüller olarak tanımlanırlar (1).

### 2.3.3. Mikropartikül Hazırlamada Kullanılan Maddeler

Her bir farmakoterapinin ana hedefi, etik kurallara göre insan organlarına, sağlığa ve güvenli yaşama zarar vermeden, insan hastalığını iyileştirmektir. Bu yüzden etkin madde ve taşıyıcı sistemler, tamamen biyoyumlu, bütünüyle tolere edilebilen ve nontoksik olmalıdır, irritasyon yapmamalıdır ve tedavi edebilmelidir. Bu temel hedefler "Good Pharmaceutical Practice" de (GPP), "Drug Delivery Research" de ve "Good Manufacturing Practice" de (GMP) esastır (44).

#### 2.3.3.1. Matris Maddeler

Tüm ilaç taşıyıcı sistemlerin taşınması gereken özelliklerin yanı sıra, kullanılan matris maddelerin taşınması gereken özellikler de vardır (45):

- Organizmada parçalanabilmeli,
- Salım hızını denetleyebilmeli,
- Antijenik etkiye sahip olmamalı,
- Toksik etkisi çok az olmalı,



- Biyolojik yarılanma ömrü yeterince uzun olmalıdır.

Son yirmi yıldır, mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, polimerlerin değişik tipleri ile yaygın olarak çalışılmıştır. Formülasyonlarda kullanılacak polimer maddelerin seçiminde, polimer/polimerlerin çözünürlüğü, elastik özellikleri, kristal yapısı, vb özelliklerin gözönünde bulundurulması gerekmektedir (46). Polimer maddesinin seçimi, mikropartikülün fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirler. Özellikle mikropartiküllerden etkin madde salımı, polimerlerin hidrofiliğine bağlıdır (1). Ayrıca, etkin maddenin polimere bağlanma afinitesi, mikropartiküllerin mikroyapısı ve ilaç salımı, büyük oranda polimerin tipine bağlıdır (47).

Selüloz türevleri, mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan ilk maddelerdir (48). Etil selüloz, mikroenkapsülasyonda kaplama materyali, mikroküre ve nanoküre matris maddesi veya bir mikropellet ögesi olarak çok araştırılmış, bilinen bir polimerdir. Selüloz türevleri, mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarında eterler ve esterleri olarak sıklıkla kullanılırlar. Selüloz esterleri, özel asit ile asit anhidritin reaksiyonu ile elde edilir. Selüloz asetat, selüloz asetat butirat ve selüloz asetat ftalat esterleri suda çözünmezler, organik çözücülerde dağılırlar. Selüloz asetat ftalat, pH'ya bağımlı çözünürlük ile karakterize edilir; enterik kaplama istendiğinde bu polimer kullanılır. Selüloz eterleri ise alkilchlorür ve sülfat kullanılarak elde edilir. Yapılan bir çalışmada, mikropartiküllerin hazırlanması için selüloz bazlı selüloz asetat trimellitat kullanılmıştır (48). Enterik bir polimer olan selüloz asetat trimellitat, son yıllarda, farmasötik alanda, granüleler veya oral katı dozaj formlarının kaplanmasında önem kazanmıştır. Hazırlanan mikropartiküler sistemde, yüzeylerarası gerilimin partikül iriliğinde hiçbir etkisinin olmadığı; oysa, iç ve dış fazların viskozitelerinin partikül iriliğini etkilediği gösterilmiştir (48). Bhardway ve arkadaşları (49), üç farklı selüloz esteri ile (selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat, selüloz asetat butirat) hazırladıkları mikrokürelerin çözünme hızı davranışlarını karşılaştırmıştır. Araştırmacılar, selüloz esterlerinin hidrofobitesindeki artışa paralel olarak, sırasıyla, selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat ve selüloz asetat butirat ile ilaç salım hızının arttığını belirtmişlerdir.

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin farklı tipleri kullanılarak yapılan mikropartiküller, çeşitli çalışmalar ile geniş bir şekilde incelenmiştir. Bu ilaç taşıyıcı sistemler, enjeksiyon sırasında organizma içine biyolojik olarak parçalanabilen polimer girdiği için özellikle parenteral veriliş için tasarlanmıştır (intramüsküler, intraperitoneal, intraartiküler ve subkütan). İlaç taşıyıcı sistem oral veriliş için planlandığında, biyolojik olarak parçalanabilen polimere bu anlamda ihtiyaç yoktur (1). Biyolojik olarak parçalanabilen materyallerin güvenlikle kullanımı in vivo koşullardaki biyoyeçimliliğine bağlıdır. Enflamatuar tepkileri ve implantasyonun ardından yara iyileştirici özellikleri açısından, laktik-koglikolik asit A-blokları ve poli (oksietilen) B-bloklarını içeren ABA-triblok kopolimer kompozisyonlarından elde edilmiş mikropartiküller denenmiştir. Sıçanlarda yapılan bu çalışmanın sonuçları ABA-triblok kopolimerlerden hazırlanan mikropartiküllerin, PLG'ye çok benzer özellikleri ile biyoyeçimli taşıyıcı sistem olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir (50).

Son yıllarda, polimer kombinasyonu ile hazırlanan mikropartiküllerin gelişmesi, mikroenkapsülasyon alanına olan dikkati daha da arttırmıştır. Bu sistemler, klasik, tek polimer kökenli mikrokapsüllere göre önemli üstünlükler sağlamaktadır (51):

- 1) Uygun çekirdek/çeper polimeri kombinasyonunun seçilmesi ile hidrofilik ve hidrofobik ilaçların eşzamanlı olarak enkapsülasyonu mümkündür;
- 2) Mikroçekirdekler içindeki etkin maddeler izole edilmeye ve korunmaya uygundur;
- 3) Çekirdek maddenin, salımının kontrolü, kaplama polimerine bir madde ilavesi ile sağlanabilir.

GA ve LA kopolimer oranı ve molekül ağırlığı mikrokürelerin karakteristiklerinde ve in vitro salım kinetiklerinde belirgin etkiler göstermiştir. PLGA'nın içeriğindeki LA ve molekül ağırlığının artışı ile mikrokürelerin yüzeyinde geniş mikroporlar gözlenmiştir ve bu porların genişliği artma eğilimindedir (52). Bu eğilim mikrokürelerden in vitro ilaç salımının hızı ile

uyumludur (52). Yapılan bir çalışmada, polimerin molekül ağırlığının artması ile ilaç yüklemesi artmıştır (53).

Bir başka örnek çalışmada, CAB veya EC gibi hidrofobik bir selüloz türevi polimer içinde hidrofilik CS mikroçekirdeklerinin tutulması ile oluşan yeni bir mikropartiküler kontrollü salım sistemi tasarlanmıştır (51). Mikropartiküller düşük pH'larda bile kararlıdır, ayrıca oral dağılım için uygundur. Bundan dolayı bu çalışmanın amacı, hidrofilik makromoleküllerde olduğu gibi hidrofobik taşıyıcıların kontrollü salım, enkapsülasyon ve oral verilise uygun mikropartiküllerinin hazırlanması için yeni yaklaşımlar sunmaktır (51). CS'ın değişik tipleri ve farklı çekirdek/çeper oranları ile 70 µm'den küçük mikropartiküller elde edilmiştir. Farklı bileşikler kullanılarak [sodyum diklofenak (SD) ve floressein izotiyosiyanat-büyükbaş hayvan serum albümini (FITC-BSA)] ilaçların ve proteinlerin kontrollü salımı ve tutulmanın özellikleri araştırılmıştır (51). Sonuçlar göstermiştir ki, SD'ın tutulma yeteneği işlem koşulları ne olursa olsun çok yüksektir ve bundan dolayı enkapsüle edilen moleküllerin in vitro salımını kontrol etmek mümkündür. İlaç salım hızı, mikropartiküller içindeki CS'ın suyu absorbe etme hızı ve şişme oranı ile kontrol edilebilir.

Yine polimer kombinasyonu ile hazırlanan bir çalışmada, Eudragit L100 ve S100'ün (1:1) karışımı ile insülin mikroküreleri hazırlanmıştır (54).

Mikrokürelerde, çok bilinen maddeler yanında insan serum albümini gibi değişik maddeler de matris maddesi olarak kullanılmıştır (55).

### **2.3.3.2. Yüzey Etkin Maddeler**

Kullanılan yüzey etkin maddeler mikrokürelerin emülsifikasyon ile oluşumunda önemli bir rol oynarlar. Mikrokürelerin özellikleri, yüzey etkin maddelerin tipi ve HLB'sinden etkilenmektedir (56). Daha çok yağlı asit zincirlerinden oluşan aynı HLB'deki yüzey etkin maddeler ile üretilen mikroküreler büyüktür ve yüksek etkin madde içeriklerine sahiptirler. Buna karşılık uzun polioksietilen zincirli yüzey etkin maddeler ile üretilen mikroküreler küçüktür. Etkin madde içeriğinde HLB de etkilidir. Etkin madde salım hızı genellikle düşük HLB'ye sahip yüzey etkin maddeler ile yavaşlatılır.

Hazırlama yöntemi de önemlidir. Etkin madde içeren sulu faza hidrofilik yüzey etkin maddenin eklenmesi ile düşük oranda madde enkapsülasyonu ve büyük mikroküreler hazırlanır. Üründe büyük miktarda serbest etkin madde ve sonuçta hızlı ilaç salımı görülür (56).

Farklı HLB'lerdeki polioksietilen sorbitan trioleat ve sorbitan trioleat karışımları kullanıldığında elde edilen sonuçlar, mikrokürelerin oluşumunda HLB ve yüzey etkin madde konsantrasyonunun önemli bir rol oynadığını göstermiştir (57). Mikropartiküllerin irilikleri ve irilik dağılımları HLB tarafından anlamlı olarak etkilenmiştir. Bununla birlikte, HLB etkin madde enkapsülasyonunu değiştirmemiş fakat salım hızını etkilemiştir (57). Buna paralel olarak yapılan bir başka çalışmada da, kullanılan yüzey etkin maddenin HLB değerinin uygun olarak seçilmesi ile etkin madde salımının regüle edilebileceği vurgulanmıştır (58). Yapılan bir başka çalışmada ise, yüzey etkin maddenin HLB'si ile, hazırlanan partiküllerin iriliği arasında bir korelasyon olmadığı bulunmuştur (59). Bir diğer çalışmada da HLB değeri 15 olan Tween 80<sup>®</sup>, en iyi kolloidal ilaç dağıtıcı madde olarak gösterilmiştir (60).

#### **2.3.4. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri**

Mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlamak için birçok mikroenkapsülasyon yöntemi geliştirilmiştir. Mikroenkapsülasyon tekniklerinin seçiminde, esas olarak, apolar bir organik çözücü içinde kaplama polimeri ve etkin madde çözünürlüğünün karşılaştırması yapılır (61,62,63). Örnek olarak, su- içinde-yağ (y/s) emülsiyonundan organik çözücünün uçurulması, hidrofobik matris içindeki lipofilik etkin maddelerin enkapsülasyonunda uygun bir yöntemdir. Suda çözünen etkin maddeler, ya susuz faz ayırma tekniği veya yağ- içinde-yağ emülsiyonunun iç fazının buharlaşabilen çözücüsünün uçurulması ile hidrofobik polimer içinde kolayca immobilize olurlar. Y/y emülsiyonunun kullanıldığı yöntemde, etkin madde önce kaplama maddesini içeren polimer çözeltisinde dağıtılır ve daha sonra da sürekli fazı oluşturan mineral yağ içinde emülsifiye edilir (61).

Hidrofobik polimerlerden matris (mikroküre) veya rezervuar (mikrokapsül) yapısında ilaç içeren partiküllerin hazırlanması için en popüler

yöntemler, organik faz ayrışması (koaservasyon) ve çözücü uzaklaştırma teknikleridir. İkinci yöntem kendi içinde şöyle sınıflandırılabilir: çözücü uçurma, çözücü ekstraksiyonu, püskürterek kurutma ve süperkritik sıvı teknolojisi (62,64).

Mikropartiküler sistemlerin hazırlanması için genellikle kullanılan yöntemler şunlardır:

#### **2.3.4.1. Koaservasyon**

Bu terim, sıvı damlaları içinde lipofilik katıların faz ayrışmasını belirtmektedir (1). Bir başka tanıma göre, koloidal ve dayanıksız sistemlerde meydana gelen ve pıhtılaşma veya topaklanma şeklinde gözlenen (her iki terimde kendi arasında değişebilir bir şekilde kullanılabilir), çöktürme yapmadan, koloidal sistemlerin iki sıvı faz içindeki ayrışmasıdır (1). Bu yöntemde, mikropartikül üretiminin ardından, katı mikropartiküller elde etmek için, mikropartikülleri sertleştirici bir basamak izler. Koaservasyon terimini kolloid kimyasında ilk kez kullananlar Kruty ve Bungenberg de Jong'dur (65). Bu araştırmacılar, koaservasyon terimini sadece sulu ortamda çözünen polimerlerden faz ayrışması olayı için kullanmışlardır. Fakat bugün aynı terim organik çözücüde çözülmüş polimerlerden faz ayrışması olayı için de kullanılmaktadır (40). Bu, neredeyse gelenekselleşmiş yöntem, bugüne kadar birçok polimere uygulanmış ve yaygın olarak incelenmiştir (1).

Koaservasyon işleminin iki tipi vardır: basit koaservasyon ve kompleks koaservasyon. Kompleks koaservasyon terimi enkapsülasyon oluşumunda birden çok polimer etkileşmesini işaret ederken basit koaservasyon tek bir kaplama polimerini içermektedir. Her iki durumda da, koaservasyon, mikroküreden çok mikrokapsül oluşumu ile sonuçlanmaktadır (41).

Koaservasyon yönteminde faz ayrışmasında etkili olan faktörler şunlardır: Ortamın sıcaklığını değiştirerek faz ayrışmasını sağlamak, geçimsiz iki polimerin aynı çözücüde çözündürülmesi ve bunların geçimsizliğinden faydalanarak faz ayrışmasını sağlamak, polimer çözeltisine polimerin çözünmediği ikinci bir sıvı ilave edilmesi ile faz ayrışmasını sağlamak, polimer çözeltisi içinde çekirdek madde süspansiyon edildikten sonra ortama inorganik bir

tuz çözeltisi ekleyerek faz ayrışması sağlamak ve polimer – polimer etkileşmesi ile faz ayrışması (66).

Koaservasyon geleneksel bir teknik olmasına rağmen bugün hala üzerinde yoğun çalışmalar sürmektedir. Buna örnek olarak, Thomasin ve arkadaşlarının (67) çalışması verilebilir.

#### **2.3.4.2. Emülsiyondan Çözücü Ekstraksiyonu (68)**

Bu yöntem, 1984'de Maharaj ve arkadaşları (1) tarafından aseton/etanol karışımı içinde polimer (CAP) çözeltisinin, karıştırma sürdürülürken, mineral yağa eklenmesi ile başlatılmıştır. Daha sonra, kloroform eklenerek oluşan mikroküreler sertleştirilmiştir. Polimer çözeltisini eklemeyen önce mineral yağa etkin madde eklenerek madde yüklü mikrokapsüller elde edilmiştir. Absorbe edilen nem miktarını azaltmak ve esneklik özelliğini arttırmak için bir plastifiyan madde eklenmesi ile bu yöntem kullanılarak mikropartiküller de hazırlanabilir. Aynı yazarlar, bu yöntemle 1-3 mm aralığında çap ile küresel partiküller elde etmişlerdir. Enterik kaplı mikrokürelerin yapay mide koşullarında en az 6 saat kararlı kaldığı da gösterilmiştir (1).

#### **2.3.4.3. Emülsiyondan Çözücü Uçurulması (1,47,52,53,63,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81)**

Klasik çözücü uçurulması tekniğinde, etkin madde içeren organik polimer çözeltisi uygun bir stabilizatör içeren sulu faz içinde emülsifiye edilir. Etkin maddenin çözünürlük özelliklerine bağlı olarak çözündürülür veya disperse edilir veya organik polimer çözeltisi içinde sulu bir çözelti olarak emülsifiye edilir (82). Bu polimer çözeltisinde, etkin maddenin fiziksel durumu daha sonra enkapsülasyon derecesinde ve mikrokürelerin diğer özelliklerinde etkili olacaktır (62,77).

Emülsiyondan çözücü uçurulması, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler kullanarak mikroküre üretiminde basit ve başarılı bir yöntemdir. Polilaktit ve polilaktit-ko-glikolit gibi polimerler yaygın olarak kullanılmıştır. Bu tekniğin kullanıldığı bir çalışma, bir emülgatör içeren sulu bir çözelti içinde polimer çözeltisinin emülsifikasyonunun ardından, etkin madde içeren metilen klorür içinde dispersiyonunu içermektedir. Daha sonra çözücü, oda

temperatüründe 1 saat sürekli karıştırılarak uçurulmuş ve katı polimerik mikroküreler elde edilmiştir (1). Çözücü uçurulması için, çalışma sıcaklığının ve sıcaklık artış hızının etkin maddenin salım profilinde çok etkili olduğu bulunmuştur (83).

Çözücü ekstraksiyonu/uçurulması yöntemleri kullanılarak mikrokürelerin oluşum işlemi, karmaşık kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olmaksızın nispeten basit görünmektedir. Bununla birlikte oluşumun mekanizması, başta polimer, çözücü, yardımcı çözücü ve etkin maddelerin özellikleri olmak üzere sistemdeki birkaç parametre ile bağlantılıdır (84). Emülsifikasyonu, çözücü uçurma ile izleyen işlem, çoğunlukla suda çözünen ilaçlar ve proteinler içeren mikropartiküllerin hazırlanması için kullanılan bir tekniktir (85). Proteinlerin, peptidlerin ve suda çözünen etkin maddelerin enkapsülasyon tekniğinde basit su-içinde-yağ (y/s) tekniğinin kullanılmasının sonucunda genellikle büyük partiküller ve düzensiz protein salımı görülmektedir.

#### **2.3.4.4. Püskürterek Kurutma (2,86,87,88)**

Püskürterek kurutma, farmasötik, kimyasal ve biyokimyasal alanların yanı sıra gıda ve kozmetik endüstrisinde de kapsamlı olarak kullanılan önemli bir teknolojidir (1,2,39,89,90). Çeşitli maddeler, lipozomlar, mikroküreler, oksihemoglobin, enzimler, rekombinant insan anti IgE monoklonal antikolar, vb püskürterek kurutulmuştur (90). Farmasötik alanda, başlıca, ilaç taşıyıcı mikropartiküler sistemleri hazırlamada yararlanılır. Püskürterek kurutma yönteminde, etkin madde polimerik çözeltide ya dağıtılır ya da çözündürülür. Buna bağlı olarak, elde edilen mikropartiküllerin yapısı farklıdır. Genellikle, etkin madde polimerik çözeltide dağıtılırsa mikrokapsül, polimerik çözeltide çözündürülürse mikroküre elde edilir (2). Bu teknolojinin çeşitli işlemlerinin, kullanılan farklı maddelerin (polimerler ve etkin maddeler) ve işlem parametrelerinin mikropartikül karakteristikleri üzerine etkilerinin incelenmesi sürdürülmektedir (39). Farmasötik alanda püskürterek kurutma yönteminin uygulama amaçları arasında, kurutma, örneğin bitkisel ekstraktlar, ısıya duyarlı maddeler; farmasötik tozların akıcılık özelliğini geliştirip yardımcı maddelerin elde edilmesi, örneğin püskürterek kurutulmuş laktoz; granülasyon; suda çözünen polimerle katı dispersiyon hazırlayıp, suda az çözünen etkin maddelerin

çözünürlüğünü arttırmak için siklodekstrinlerle kompleksleşmenin sağlanması; etkin maddelerin polimorfizminin değiştirilmesi; aerosoller için kuru tozların hazırlanması; uçucu ürünlerin enkapsülasyonu; tatları maskeleyerek ve etkin maddeyi oksidasyondan korumak için enkapsülasyon sayılabilir. Bunlara ek olarak, gıda (süt), biyokimya (enzimler) ve tıp (hemoglobin) alanlarında da kullanılmaktadır (39,89).

Püskürterek kurutma yöntemi kullanarak hazırlama sonucunda elde edilen ince, tozsuz ve aglomere olmuş tozlar spesifikasyonlara uygun bulunmuştur (89). İşlem, bir sıvının toz madde haline transformasyonundan oluşmaktadır (39).

Püskürterek kurutma işlemi aşağıda belirtilen dört aşamayı içine almaktadır (39,89):

- 1) Besleme maddelerinin atomizasyonu,
- 2) Püskürtme-hava teması,
- 3) Püskürtme damlalarının kurutulması,
- 4) Gazdan, kurumuş ürünün toplanması  
(püskürterek kurutulmuş mikropartiküller).

Kurutma sırasında çözücü uçurulma olayı hızlı olduğundan dolayı, damlaların sıcaklığı, kurutma havasının sıcaklığından aşağıda tutulabilir. Bu nedenle, püskürterek kurutma tekniği, ısıya dirençli veya duyarlı maddelerin her ikisinin de kullanılmasına olanak sağlar (39). Püskürterek kurutucular, aşırı derecede yüksek kurutma sıcaklıkları kullanılmadıkça, zayıf termal özelliğe sahiptirler (89).

Püskürterek kurutma, farmasötik proteinlerin kurutulması için liyofilizasyona alternatif olarak da yararlı olabilir (89).

Püskürterek kurutma tekniği, kaydırıcıların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Rotthäuser ve arkadaşları (91), efervesan tablet formülasyonunun optimizasyonu için püskürterek kurutulmuş L-lösin ile polietilen glikol 6000 bileşimini lubrikan olarak kullanmışlar. L-lösin miktarı arttığı zaman, kaydırıcılık özelliğinin iyileştiği gözlenmiştir. Bunun yanısıra, ezme kuvveti azalmış ve tabletlerin dağılma süreleri uzamıştır.



Başka bir çalışmada, proteinin yapısına ve aktivitesine, püskürterek kurutma tekniğinin etkisi araştırılmıştır (92). Model protein olarak tripsinojen seçilmiştir. Yardımcı madde yokluğunda, püskürterek kurutma yönteminin, proteinin enzimatik aktivitesinde düşük miktarda kayba neden olduğu görülmüştür. Püskürterek kurutma çözeltisine belli bir konsantrasyona kadar sakkaroz eklenmesinin, protein kararlılığını artırıp, enzimatik etkenliğini azalmaktan koruduğu gözlenmiştir (92).

Püskürtme tasarımına göre atomizasyon sistemleri : döner atomizasyon, basınçlı atomizasyon ve iki sıvılı (pnömatik) atomizasyon olarak sınıflandırılabilir. Döner atomizasyonda, besleme sıvısı kurutucu odaya dönen bir disk veya tekerlek aracılığıyla verilerak damlacıkların sprey haline gelmesi sağlanır. Adından da anlaşılacağı üzere, basınçlı atomizasyon yönteminde, besleme basınç altında yapılarak sıvının damlacıklar haline gelmesi sağlanır. Pnömatik atomizasyonda ise, besleme sıvısı ve atomize edici hava ayrı ayrı sisteme sokulur ve sistem içinde karışarak havanın sıvıyı sprey haline getirmesi ile sonuçlanır. Pnömatik sistemler, genellikle, laboratuvar ölçeğindeki püskürterek kurutucuları kapsamaktadır (farmasötik araştırmalarda kullanılan Büchi 190 gibi) (89).

$\alpha$ -Laktoz monohidrat ve sodyum aljinat sulu çözeltisinden püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan partiküller, kontrollü salımlı matris tabletlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır (93). Püskürterek kurutulmuş partiküller, çok iyi akıcılık özelliğine sahip olmuştur. Bu akıcılık, partiküllerin küresel şekillerine ve benzer irilik dağılımına bağlıdır. Püskürterek kurutulmuş partiküller, tablet halinde basılınca, gerilme kuvveti, ticari laktoz ile direk basımlı tabletlerden ve laktoz ve sodyum aljinat partiküllerinin fiziksel karışımından hazırlanan tabletlerden çok daha fazladır. Bunun yanısıra, püskürterek kurutulmuş partiküllerden hazırlanan matris tabletlerden etkin madde salımı, laktoz, sodyum aljinat ve etkin maddenin fiziksel karışımının tabletlerinden çok daha uzundur (93).

Bu yöntemde bazı teknolojik parametrelere dikkat edilmesi gerekmektedir: püskürtülen polimerik çözeltinin konsantrasyonu, giriş ve çıkış

hava sıcaklıkları, besleme püskürtme oranı, havanın akış hızı, sıcaklık ve hava boşalması (2).

Teofilin mikroenkapsülasyonu, sulu sistemlerde ve püskürterek kurutma tekniği kullanılarak Wan ve arkadaşları (94) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile süspansiyon ve çözelti beslenmesi arasında bir karşılaştırma yapılmıştır. Süspansiyon beslenmesi ile elde edilen püskürterek kurutulmuş ürünün akıcılığı daha iyi bulunmuştur. Aynı yazarlar, teofilin ile yüklü hidroksipropil metil selüloz mikropartiküllerinin püskürterek kurutma ile hazırlanmasında işlem parametrelerinin etkisini değerlendirmişlerdir. Üretim özelliklerinin, püskürtme ağız büyüklüğü, kurutma giriş sıcaklığı, kurutma hava akış hızı, besleme hızı ve atomizasyon basıncı ile kontrol edildiğini bulmuşlardır. Örnek olarak, yüksek kurutma giriş sıcaklığı ile üretilen kaplanmış partiküller ile yavaş çözünürlük hızı; hızlı kurutma hava akış hızı ile hazırlanan partiküllerle daha iyi akıcılık elde edilmiştir. Yüksek besleme hızı sonucunda etkisiz atomizasyon ve dolayısıyla kötü şekilli ürünler gözlenmiştir (1).

Bir başka çalışmada, püskürterek kurutulmuş biyoparçalanabilir mikrokürelerin morfolojisi, yüzey yapısı ve çap ortalaması, X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) tekniği, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve foton korelasyon spektroskopisi ile incelenmiştir (95). PLA ve polietilen glikol 400 distearat'ın [PEG-400 (C<sub>18</sub>)<sub>2</sub>] farklı konsantrasyonları kullanılarak, püskürterek kurutma ile bu iki madde karıştırılmıştır. Mikrokürelerin irilik dağılımı, morfolojisi ve PEG dağılımı araştırıldığında, püskürterek kurutulmuş çözeltilerdeki PLA ve PEG konsantrasyonlarına büyük oranda bağlı olduğu kanıtlanmıştır.

Forni ve arkadaşları (96), püskürterek kurutma tekniğini kullanarak püskürterek-kurutulmuş ve püskürterek-gömülmüş etil selüloz mikropartikülleri hazırlamışlardır. Mikropartiküllerin (mikrokapsül veya mikroküre) yapısı, etkin maddenin (diltiazem hidroklorür) püskürterek kurutulmuş etil selüloz çözeltisi içinde dağıtılmış veya çözündürülmüş olduğunu göstermektedir. Mikropartiküllerden etkin madde salım oranının, amorf veya kristalin gibi fiziksel durumdan değil, mikropartikülün yapısından etkilendiği görülmüştür.

Püskürterek kurutma tekniği, hem suda çözünen, hem de çözünmeyen etkin maddelerin mikrokürelerinin hazırlanmasında kullanılır (39). Sudaki çözünürlüğü düşük, önemli bir steroidal etkin madde olan deksametazon'un, püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak, polimerik kitosan içinde tutulması ile çözünme hızında iyileşme kaydedilmiştir (97).

Lin ve Kao (98), püskürterek kurutma tekniğini kullanarak, asetaminofen, indometazin, piroksikam ve varfarin ile  $\beta$ -siklodekstrin'in inklüzyon komplekslerini hazırlamışlardır. Püskürterek kurutma tekniğinin, amorf inklüzyon komplekslerinin hazırlanmasında kullanılabilirdiği bulunmuştur. Elde edilen püskürterek kurutulmuş ürünlerin, akıcılık ve sıkıştırılabilirliklerinin zayıf olduğu ortaya çıkmıştır. Bu zayıflık, partiküllerin küçük hacimlerinden ileri gelmektedir. Bununla birlikte, püskürterek kurutulmuş partiküller ile hazırlanan tabletlerden etkin maddenin çözünme hızı, saf etkin maddenin ve etkin madde ile  $\beta$ -siklodekstrin'in fiziksel karışımlarının çözünme hızından daha fazladır. Püskürterek kurutulmuş ürünlerin çözünme hızındaki artışlar, partiküllerin küçük hacimlerine, yüksek-enerjili amorf haline ve inklüzyon kompleks oluşmasına ait olabilir.

Başka bir çalışmada, Forni ve arkadaşları (99), püskürterek kurutma tekniğini kullanarak, salbutamol sülfat mikrokapsüllerini hazırlamışlardır. Salbutamol sülfat ile etilselülozun, değişik oranları ile hazırlanan mikrokapsüllerden etkin madde salımını incelemişlerdir. Sonuçta, polimer/etkin madde oranı arttırıldıkça, mikropartiküllerden salımın uzatıldığı görülmüştür.

Lin ve Kao (100), püskürterek kurutma tekniği ile diklofenak sodyum'un enterik kaplı mikrokapsüllerini hazırlamışlardır. Kaplama materyali olarak Eudragit L30D'yi kullanmışlar ve daha sonra bu mikrokapsülleri tablet haline getirmişlerdir.

Conti ve arkadaşları (101), püskürterek kurutma tekniğini kullanarak, indometazin mikropartiküllerini hazırlamışlar ve farklı çözünme hızı yöntemlerini kullanarak, karıştırma hızı, iyonik güç ve yüzey etkin madde varlığı gibi koşulların etkilerini değerlendirmişlerdir (101).

Yine, Conti ve arkadaşları (87), püskürterek kurutma tekniğini kullanarak, asiklovir partiküllerini hazırlamışlardır. Polimer olarak, farklı molekül ağırlığına sahip (3000-109000) PL ve PLG biyopolimerini kullanmışlardır. Sonuçlara göre, mikropartiküllerin morfolojik özelliklerinin ve in vitro çözünme hızı verilerinin, polimerin molekül ağırlığına bağlı olduğu gözlenmiştir (87).

Ganza-Gonzalez ve arkadaşları (102), farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı olan formaldehid içeren sulu polimer dispersiyonları kullanarak püskürterek kurutma tekniği ile metoklopramid hidroklorür mikroküreleri hazırlamışlardır. Polimer olarak kitosan ve kondroitin sülfat kullanılmıştır.

Guo ve Bodmeier (103), etkin madde-sulu kolloidal akrilik polimer dispersiyonundan püskürterek kurutma tekniği ile polimerik mikropartiküller hazırlamışlardır. Polimer olarak, Eudragit RS30D kullanmışlardır. Polimerik dispersiyonun sulu fazında, etkin madde ya çözündürülmüş (klorfeniramin maleat) ya da süspanse edilmiştir (ibuprofen, naproksen). Püskürterek kurutmanın optimum koşulları altında hazırlanan mikropartiküllerden, hem pelletler hem de çabuk parçalanabilen tabletler hazırlanmıştır.

Birçok uygulamada, püskürterek kurutmanın esas dezavantajı, ekipman ve işlem sırasındaki maliyettir.

#### **2.3.4.5. Diğer Yöntemler**

Yukarıda bahsi geçen ve sıkça kullanılan bu yöntemler dışında literatürde değişik ve/veya modifiye yöntemlere de rastlanmaktadır. Bunlar, emülsiyon polimerizasyonu (104,105), çoklu emülsiyondan çözücü uçurma (106,107,108), emülsiyondan çözücü-difüzyonu (109), püskürterek soğutma (58), modifiye emülsiyon polimerizasyonu (110), modifiye çözücü uçurma (86,111,112) yöntemleridir.

Mikropartikül özelliklerine hazırlama tekniklerinin etkisini incelemek amacı ile bazı çalışmalarda bu yöntemler karşılaştırılmıştır. Model etkin madde olarak Vitamin D<sub>3</sub> içeren polilaktit mikroküreleri çözücü uçurulması, çözücü ekstraksiyonu ve püskürterek kurutma ile hazırlanmıştır (113). Çalışmada, üç farklı hazırlama yönteminde, mikrokürelere özelliklerini etkileyen her bir etken

belirlenip karşılaştırılmıştır. Çözücü ekstraksiyonunun diğer geleneksel yöntemlerden daha iyi olduğu gösterilmiştir. Bu karara varılma nedenleri, daha düzenli şekil, ufak boyut, irilik dağılımının sınırlılığı ile yüksek porozite olmuştur. Püskürterek kurutmanın verimi çözücü ekstraksiyonu verimine eşit olmasına karşın, çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile daha yüksek enkapsülasyon verimi ve daha kısa hazırlama süresi, çözünme profilinde de daha kontrollü etkin madde salımı gözlenmiştir (113).

Bir başka çalışmada, farklı teknikler ile hazırlanan Eudragit RL100 ve Eudragit RS100 kaplı tolmetin mikropartikülleri değerlendirilmiştir (3). Mikropartiküller üç farklı teknik ile hazırlanmıştır: geleneksel emülsiyondan çözücü uçurulması tekniği, kuasi emülsiyondan çözücü difüzyonu yöntemi ve püskürterek kurutma. Bu çalışmada, etkin madde enkapsülasyonu ve in vitro salıma ek olarak, partikül verimi ve irilik dağılımı sonuçları incelenmiştir. Sonuç olarak, farklı hazırlama tekniklerinin enkapsüle edilebilen etkin madde miktarına, partikül dağılımına ve in vitro salım hızına etkili olduğu görülmüştür (3).

Model madde olarak diklofenak sodyum'un kullanıldığı başka bir çalışmada, önce püskürterek kurutma tekniğini kullanarak CS mikroçekirdekleri hazırlanmış, daha sonra bu mikroçekirdekler, y/y çözücü uçurulması yöntemi kullanılarak Eudragit L-100 ve Eudragit S-100 ile kaplanmıştır (114). Bu yeni çoklu partikül sistemi ile, gastrik çözeltide CS'in yüksek çözünürlüğünden ve dolayısıyla diklofenak sodyum'un gastrik ortamda salımından kaçınılmıştır. Böylece, asidik pH'larda salım görülmeyip, Eudragit'in çözünürlük pH'sına ulaşıldığı zaman (8-12 saat) sürekli salım elde edilmiştir (114).

Başka bir çalışmada, iki-boyutlu elektroforez kullanarak, in vitro plazma protein adsorpsiyonu üzerinde mikrokürelerin hazırlama teknikleri ve polimer karışımların etkileri araştırılmıştır (115). Mikropartiküller, L-PLA, PLGA ve ABA-triblok [poli-(oksietilen) (B-blokları), poliesterler (A-blokları)] kopolimerler kullanılarak hazırlanmıştır. Mikropartikül hazırlanmasında iki farklı yöntem, s/y/s emülsiyon çözücü uçurulması ve püskürterek kurutma tekniği kullanılmıştır. Polimer karışımları ve özellikle enkapsülasyon tekniğinin, plazma proteinleri ile etkileşme üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür (115).

Yapılan diğ er bir ç alışmada, biyolojik olarak parçalanabilen eritropoitein ile floressein izotiyosiyanat işaretli dekstran kaplı mikroküreler, modifiye edilmiş püskürt erek kurutma tekniğ i kullanarak hazırlanmıştır (116). Bu mikroenkapsülasyon yöntemi, s/y/s çoklu emülsiyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır (116). Kullanılan s/y/s çoklu emülsiyon yöntemi, Ogawa ve arkadaşları (77,116) tarafından, 1988'de, poli (laktit-ko-glikolit) mikroküreleri içinde löporelit asetat'ın enkapsülasyonu için tanımlanmıştır. Beklenen, mikroküre morfolojisi, partikül iriliğ i ve partikül iriliğ i dağ ılımının üretim işlemlerine bağ ı olması idi. Bu özellikler yönünden, püskürt erek kurutma yönteminin avantajları s/y/s çoklu emülsiyon tekniğ i ile karşılaştırılmış ve üstün olduğu bulunmuştur. S/y/s çoklu emülsiyon tekniğ inin esas avantajı ise enkapsülasyon ürünlerinin etkinliklerini sürdürülebilir olmasıdır (116).

Polimer parçalanması üzerinde mikropartikül hazırlama teknikleri ve peptid yüklenmesinin etkileri, in vitro test kullanarak incelenmiştir (117). Mikropartiküller, üç farklı yöntemle hazırlanmıştır: püskürt erek kurutma, s/y/s çözücü uçurulması ve aerosol çözücü ekstraksiyonu. Polimer olarak, biyoparçalanabilir poli(laktik asit) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) guruplarından beş polimer seçilmiştir: L-PLA,  $M_{ağ}$  81200; DL-PLGA (75:25),  $M_{ağ}$  64300; DL-PLGA (50:50),  $M_{ağ}$  52600; DL-PLGA (50:50),  $M_{ağ}$  14500; ve DL-PLGA (50:50),  $M_{ağ}$  3400. Peptid modeli olarak tetrakosaktid kullanılmıştır. Çözücü uçurulması tekniğ i ile hazırlanan mikropartiküllerin, çap ortalaması ve etkin madde enkapsülasyon verimlerinin, polimerin molekül ağ ırlığ ı azalması ve polimerde glikolik asit oranı artması ile azaldığ ı saptanmıştır. Püskürt erek kurutma tekniğ i ile hazırlanan mikropartiküllerde ise, bu parametrelere, polimerin özelliğ inin direkt etki göstermediğ i gözlenmiştir. Üç yöntemde de enkapsülasyon esnasında polimer parçalanmasının az olduğu görölmüştür. İn vitro test sırasında ise, üç yöntemle hazırlanan L-PLA ve DL-PLGA (75:25) mikropartiküllerde de polimer parçalanması karmaşık bulunmuş ve etkin madde yüklenmesinden etkilenmediğ i gözlenmiştir. DL-PLGA (50:50),  $M_{ağ}$  52600 ile hazırlanan mikropartiküllerde, etkin madde yüklenmesi artırılınca, parçalanma oranı hafifçe azalmıştır. Sadece DL-PLGA (50:50),  $M_{ağ}$  14500 kullanıldığ ında, püskürt erek kurutma tekniğ i ile hazırlanan mikropartiküllerde polimer

parçalanma oranı, s/y/s çözücü uçurulması tekniği ile hazırlanan mikropartiküllere göre daha yüksektir (117).

Poliester mikrokürelerin in vitro parçalanmasına ve özelliklerine, hazırlama tekniklerinin etkisini incelemek amacı ile yapılan başka bir çalışmada, model madde olarak diazepam içeren poliester mikroküreleri çözücü uçurulması ve püskürterek kurutma yöntemleri ile hazırlanmıştır (118). İncelemeler hem boş hem de etkin madde yüklü partiküllerde yapılmıştır. Sonuçlar, partiküllerin değişik özelliklerinin hazırlama yöntemine bağlı olduğunu göstermiştir. Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerin, çözücü uçurulması ile hazırlanan mikrokürelerden daha ufak boyuta, daha yumuşak ve düzenli şekle ve daha sınırlı irilik dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir. Yine elde edilen sonuçlara göre, mikrokürelerin parçalanmasında hazırlama yöntemi ve diazepam varlığının önemli rol oynadığı görülmüştür.

Yeni bir çalışmada kullanılan aerosol çözücü ekstraksiyon sistemi (ASES), biyolojik olarak parçalanabilen polimerik mikropartiküllerin üretiminde uygun ve ümit verici bir işlemdir (119). İşlem parametrelerinin değiştirilmesi ile 6-50 µm aralığında partikül iriliğine sahip mikropartiküller üretilebilmiştir. Bu yöntemde kullanılan CO<sub>2</sub> yoğunluğunun, partikül iriliğine önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. Yüksek CO<sub>2</sub> yoğunluklarında üretilen partiküller küçük çaplara sahiptir. Aynı zamanda, düşük yoğunlukta CO<sub>2</sub> kullanarak hazırlanan partiküllerin yüzeylerinde çatlak ve deliklerin varlığı saptanmıştır. Oysa diğer partiküllerin yüzeyleri düzgün ve gözeneksizdir (119).

İn vivo bir çalışmada, makromoleküler etkin madde içeren biyolojik olarak parçalanabilen mikro- ve nanopartiküller, dokuya bağlanma ve emilim özellikleri açısından karşılaştırılmıştır (120). Nanopartiküller, mikropartiküllerden bu özellikleri açısından daha iyi olmakla birlikte, uygulanan tüm partiküllerin yaklaşık %10'unun barsak membranında adsorbe edildiği bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda, makromoleküler etkin maddelerin oral biyoyararlanımlarını arttırmak için öncelikle partiküllerin membran afinitelerini arttırmaya ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (120).

### **2.3.5. Etkin Madde Salımı**

Tıbbi hedeflere ulaşmak için sadece non-toksik, non-immünojenik, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak rezorbe olabilen değil, aynı zamanda etkin madde yüklemeye ve salım karakteristiklerine uygun partiküllere gereksinim vardır (121).

Katı dispersiyon teknolojisinde, mikropartikül formülasyonları, suda az çözünen etkin maddelerin çözünme hızı özelliklerinin iyileştirilmesi ve hidrofilik bileşiklerin suda çözünmeyen polimer dispersiyonu ile çözünme hızı oranlarının ve dolayısıyla biyoyararlanımlarının düzeltilmesinde yaygın olarak kullanılırlar (3,122). Bu nedenle mikropartiküllerin çoğu kontrollü salım dozaj formlarında ümit verici olarak ortaya çıkmıştır (123).

Antikanser ajanların kontrollü salımı için taşıyıcı olarak beyaz balmumu mikroküreleri araştırılmış, hazırlanan mikrokürelerden etkin madde salımı in vitro olarak değerlendirilmiştir (124). Mikroküre oluşumunun sonucu, etkin maddenin çözünme hızı fazlasıyla yavaşlamıştır. İbuprofen mikroküreleri de aynı şekilde, göstermiş oldukları in vitro sürekli salım profilleri ile olumlu bulunmuştur (125).

#### **2.3.5.1. Etkin Madde Salımının İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler**

Katı etkin maddelerin formülasyonu, geliştirilmesi ve kalite kontrolünde, çözünme hızı oranlarının değerlendirilmesi son derece önemlidir. Katıların çözünme hızı oranları, deneysel olarak, teorik olarak tasarlanarak ve sistemin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak belirli zaman aralıklarında saptanabilir (126). Mikropartiküler ilaç taşıyıcı formülasyonların davranışı da, genellikle etkin madde salım profiline in vitro ölçümü ile karakterize edilmektedir. Bu tip veriler formülasyonun davranışı hakkında fikir edinmede kullanılabilir (127). Bu nedenle, in vitro salım testleri, etkin maddenin emiliminde, formülasyon faktörlerinin değişiminin etkisini değerlendirmede, uzatılmış salımlı dozaj formlarının kalite kontrolünde bir araç olarak kullanılır (128).



Mikropartiküler ilaç dağıtım sistemleri ile ilgili resmi bir çözünme hızı yöntemi yoktur. Halen, farklı çözünme hızı yöntemleri kullanılmaktadır. Oysa, etkin madde salımında farklı çevresel koşullar, karıştırma hızı, iyonik güç ve yüzey etkin madde varlığı oldukça etkilidir. Bu nedenle, kullanılan çözünme hızı yöntemi önemlidir. Üstelik, birçok çalışmada in vitro salım sonuçlarına göre, etkin maddenin oral kullanım için elverişli olup olmadığına karar verilmektedir (101).

Mikropartiküler sistemlerde kullanılan çözünme hızı yöntemleri şunlardır (101):

- 1-USP XXII Dissolution Test Apparatus (Paddle) (USP dissolüsyon test yöntemi - Palet) (87,109,128,129,130,131)
- 2- Rotating Bottle Apparatus (dönen şişe yöntemi) (107,112,132)
- 3- Shaker Incubator (çalkalayıcı inkübatör) (103, 114,117,133, 134)
- 4- Modified Recycling Flow Through Cell (128)  
(modifiye akış hücresi)

Bu yöntemlerin hepsi de avantaj ve dezavantajlara sahiptir (135).

Literatürde çözünme hızı çalışmaları için farklı modifiye yöntemlere de rastlanmaktadır. Bazı çalışmalarda etkin maddenin in vitro salımı için USP basket yöntemi kullanılmış (136,54), bir çalışmada da mikroküreler mikrosantrifüj tüplerinde çalkalama ile inkübe edilmiştir (137). Bir diğer çalışmada ise, mikroküreler çözünme ortamında su üstünde yüzmeye eğilimli oldukları için, minibasketlerin kullanıldığı modifiye edilmiş USP yöntemi kullanılmıştır (138). Yine bir diğer çalışmada, mikropartiküllerden etkin maddenin in vitro salımı için, 25 ml.dak<sup>-1</sup> akışla, 250 ml deiyonize su içinde kolon-tip aparey (Dissotest CE-1) kullanılmıştır (99,96). Deney “sink koşullar”da yapılmıştır. Başka bir çalışmada, Spinfilter dissolüsyon test apareyi (nominal porozite 1 µm) kullanılmıştır. Buradaki ortam sıvısı, spektrofotometreden sürekli geçerek absorbanlar kayıt edilmiştir (139). Bazı araştırmacılar geleneksel olarak kendi ülkelerinin farmakopelerindeki çözünme hızı yöntemini kullanmışlardır. Örnek olarak, Japon araştırmacılar mikroküre çalışmalarında, in vitro salım konusunda referans olarak JP XI'i vermişlerdir (140).

Farklı çözünme hızı yöntemlerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, etkin madde salımında farklı çevresel koşulların, karıştırma hızının, iyonik ve yüzey etkin madde varlığının etkisi araştırılmıştır (101). Test edilen yöntemler ile elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, etkin madde salım profilinde çevresel koşullar ve kullanılan in vitro çözünme hızı yöntemi etkilidir. Bu çalışmaya göre, parenteral veriliş için tasarlanan mikropartiküllerin in vitro çözünme hızı testlerinde, hücre içinden akış çok uygun görünmektedir (101). Yapılan bir diğer çalışmada, palet yöntemi ile sürekli-akış teknikleri karşılaştırılmış, salım eğrileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (128). Farklı bir görüşe göre “sink” koşullarda yapılan bu salım ölçümlerinde ortam son derece seyreltiktir ve ilaç salımı bu son derece seyreltik çözüldüden ölçülemez (127).

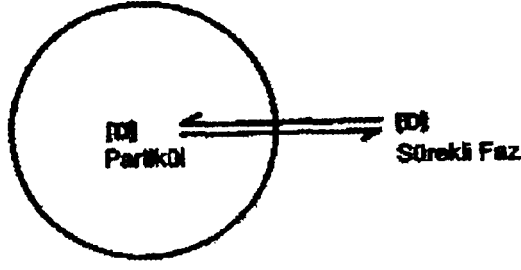
Mikrondan daha ufak partiküllerden etkin madde salımının ölçülmesinde, daha iri partiküler sistemlerde karşılaşılmayan birçok güçlükler vardır. Tüm bu yöntemlerde esas güçlük, koloidal taşıyıcı süspansiyondan, sürekli faz içindeki maddenin salımını ayırmaya çalışırken ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, mikrodisperse sistemlerde salım profillerinin tayini için taşıyıcı ve çözüldünün ayrılmasına bağlı olmayan analitik teknikleri kullanmak daha iyidir. Bu analitik teknikler şunlardır (135,141): 1. Denge diyalizi, 2. Örnek ve ayırma, 3. Sürekli akış, 4. İn situ yöntemler.

#### **2.3.5.2. Salım Mekanizması**

Etkin madde, mikrokürelerin hazırlanması sırasında matris içinde toplandığı gibi yüzeye de tutunabilir. Buradan, yüzey erozyonu, mikrokürenin tamamen dağılması, mikroküre hidrasyonu ve difüzyon ile salınır (134).

Mikrodisperse sistemlerden ilaç salımında çok önemli işlemler bulunmaktadır. Bunlar:

1- Etkin madde katı matristen taşıyıcının dışına difüze olabilir. Bu yol makroskobik dağıtım sistemleri için ihmal edilebilir derecede yavaştır fakat mikrondan ufak taşıyıcılar için hızlı olabilir.



**Şekil 2.5. Etkin Maddenin Partikül ve Sürekli Faz Arasında Difüzyon Dengesi (135).**

2- Etkin madde, mikropartiküle penetre olan çözücüde çözünüp dışarıya difüze olabilir.

3- Taşıyıcı, çevre tarafından bozunabilir veya çözündürülebilir. Bu durumda madde yeterli derecede hareketsizdir, eşit zaman aralıklarında taşıyıcıdan difüze olur. Böylece taşıyıcının bozunmasının ardından sürekli fazda etkin madde birikir (135).

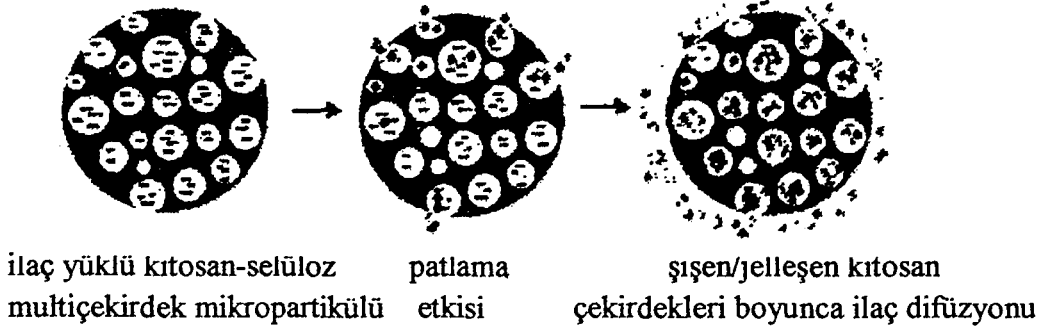
Mikropartiküler bir sistemden olası ilaç salım mekanizması Şekil 2.6.'de gösterilmiştir (51). Buna göre ilaç salımı şu işlemleri içerir:

- a- Mikropartiküller içine suyun penetrasyonu,
- b- Polimerin şişmesi/jelleşmesi ve etkin bileşiğin çözünmesi,
- c- Polimer hidrojelleri içinden etkin bileşiğin difüzyonu.

Bu işlemlerden dolayı, etkin maddenin salım hızı, mikropartiküller içindeki maddenin su absorpsiyon hızı ve şişme oranı ile kontrol edilebilir (51).

Yapılan bir çalışmada, çözücü uçurma tekniği ile hazırlanan mikrokürelerden etkin maddenin salım profili ve taşınma kapasitesi incelenmiştir (142). 0.2-30  $\mu\text{m}$  arasında farklı partikül irilikleri tanımlanmış olan etkin maddenin mikrokürelerden in vitro salım profilleri sürekli akış aleti kullanılarak tayin edilmiştir. 37°C'lik su banyosunda bir hücre bulunduran bu alet, mikrokürelerden maddelerin salımı için "sink koşulları" sağlamaktadır. Etkin madde taşıma kapasitesi, partikül iriliği ve özellikle ilaç ve ilaç/polimer oranına bağlı bulunmuştur. Madde salımının, ilaç yüklenmesine bağlı olduğu saptanmış ve karakteristik trifazik model ile gösterilmiştir (142,72). Etkin madde

molekülleri yerlerine yerleştikten sonra, ilk baştaki yavaş fazı takip eden patlama etkisi ile taşıyıcıların yüzeyinden uzaklaşmışlardır. Sabit yavaş salım hızı ise etkin maddelerin polimer taşıyıcıdan geçerek düşük hızda difüzyonunu göstermiştir (142).



**Şekil 2.6. Etkin Madde İçeren Çekirdek-Çeper Mikropartiküllerinin Yatay Kesitlerinin Teorik Yapısı ve Salım Mekanizması**

Nifedipin yüklü PLG mikrokürelerinden salım değerlendirildiğinde, nifedipin salımı 1 günlük patlama etkisinden sonra 15 gün içinde tamamlanmıştır. 80 µm'lik mikroküreler için bifazik ve 18 µm mikroküreler için ise oldukça lineer profiller elde edilmiştir (74).

Bir başka çalışmada,  $s_1/y/s_2$  emülsiyonundan çözücü uçurulması yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerin in vitro salım deneylerinde, 10. dakikadan sonra % 60'dan fazla salım ile dramatik patlama etkisi gözlenmiştir (63).

Bir diğer mikroküre çalışmasında ise, mikroküre örnekleri fosfat tamponu içersinde test tüplerine konularak her bir tüp döner palet aletine bağlanmıştır (143). Çalışmada kullanılan polimerin molekül ağırlığının fonksiyonu olarak iki tip profil tanımlanmıştır. Yüksek molekül ağırlığı için salım önemli derecede patlama etkisi ile karakterize edilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı polimer kullanıldığında, patlama etkisinin yok olması, protein ve polimer arasında gelişen fizikokimyasal etkileşmenin varlığı ile açıklanmıştır (143).

Diğer bir mikroküre çalışmasında, çözücü uçurma tekniği ve PLG ile 5-florourasil kullanılmıştır (100). Kullanılan polimerler üç farklı molekül ağırlığına sahiptir. Polimerlerin molekül ağırlığı ile salım hızı ve tampon çözeltilerdeki 5-

florourasilin çözünürlüğü arasında doğrusal bir korelasyon saptanmıştır (100). Salım çalışmaları, çalkalayıcı şişe yöntemi ile yapılmıştır. Salım hızı verileri sıfır derece, birinci derece ve Higuchi kinetikleri kullanılarak incelenmiştir. Salım çalışmaları sonucunda, çözünme ortamının pH'sı ve polimerin molekül ağırlığındaki farklılıklar ile anlamlı değişimler bulunmuştur. Etkin maddenin çözünürlüğünde, yalnızca çözünme ortamının pH'sı değil, molekül ağırlığına bağlı olarak polimer de kendi başına etkilidir. Düşük molekül ağırlığındaki polimerlerde gözlenen kısa zincir molekülleri, yüksek çözünürlük hızına yol açabilir ve çözünme sırasında, düşük molekül ağırlığındaki polimerin matris hacminde kanallar ve porlar oluşur (144).

S/y emülsiyonundan çözücü uçurulması yöntemi ile hazırlanan ve progesteron içeren kitosan mikrokürelerinin salım hızları incelendiğinde, salım kinetiklerinin kullanılan hazırlama yöntemi ve formülasyona bağlı olarak ciddi farklılıklar gösterdiği bulunmuştur (145). Saptanan minimum madde salımının bile mikroküre hazırlamadan önce progesteronun polimer çözeltisi içindeki karıştırma periyodları ile önemli derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (145). Buna benzer şekilde, y/s ve s/y/s emülsiyonu yöntemleri ile hazırlanan mikrokürelerin salım hızları arasında farklılıklar gözlenmiştir; bu farkın iç faz hacmindeki artışa bağlı olarak gözeneklilikteki artıştan dolayı olabileceği belirtilmiş ve bu yorum mikrokürelerin SEM analizleri ile de desteklenmiştir (137).

Bir başka çalışmada, hiçbir patlama etkisi olmaksızın etkin maddenin uzatılmış salımına izin veren mikrokürelerin hazırlanmasında başarılı olunamadıysa da, eğer etkin madde ve polimer matris arasındaki geçimlilik iyi değilse, mikrokürelerin hazırlama koşullarının optimizasyonu ile mikrokürelerden etkin madde salım profilinin düzeltilebileceği gösterilmiştir (83).

### **2.3.5.3. Etkin Madde Salımını Etkileyen Faktörler**

Mikropartiküllerden istenilen salım özelliklerini elde etmek için şu faktörler gözönünde tutulmalıdır: etkin maddenin mikroküre içindeki konumu; matris maddenin tipi, miktarı (112,146) ve molekül ağırlığı (72,87); partiküllerin yüzeysel özellikleri, (146), biçim ve irilikleri (58,112); etkin maddenin

fizikokimyasal özelliği, molekül ağırlığı ve konsantrasyonu (58,112); yardımcı maddelerin seçimi (146); salım ortamı ve koşulları (134).

Etkin maddenin en önemli özellikleri, molekülün büyüklüğü, şekli ve çözünürlüğüdür. Molekül ağırlığı (M) ve difüzyon katsayısı (D) arasında, yaklaşık bir log-log korelasyonu vardır:

$$\log D = a - b \log M$$

a ve b sabit sayı olmak üzere M arttıkça, D azalır. Polimerler için genellikle M büyüktür ve D giderek küçülerek yok olur (147).

Genel olarak, suda çözünmeyen maddelerin barsaktan emiliminin önceden belirlenmesi için, mide-barsak ortamı kullanılarak yapılan çözünme hızı çalışmalarında, sınırlı hız dikkat çekmektedir (148). Dolayısıyla, etkin maddenin sudaki çözünürlüğü ilacın salım hızına etkilidir (149).

Etkin maddenin mikrokürelerden salımını, mikroküre iriliği de etkilemektedir (134). Etkin madde, daha küçük taşıyıcı partiküllerden, ikinci faz boyunca çok daha fazla ve hızlı bir şekilde salınmaktadır. Bunun büyük bir olasılıkla iki nedeni vardır:

- a) Salım olayı için kullanılabilir yüzey alanının büyümesi,
- b) Etkin maddelerin dışarıya difüzyonu için gerekli olan mesafenin kısalması.

Mikrokürelerin irilikleri arttırıldığında ise ikinci fazdaki salım yavaşlamaktadır (134).

İbuprofen mikrokürelerinin uzatılmış salım gösteren süspansiyonları ile, in vivo etkin madde emilimi ve in vitro salım arasındaki ilişki incelenmiştir (140). Süspansiyonlardan salım hızının, mikrokürelerin iç porozitesi, ilaç-polimer oranı ve partikül iriliği tarafından kontrol edildiği saptanmıştır. Çalışılan 3 süspansiyondan üçüncüsü ticarî granüle ile karşılaştırıldığında, 3 kat uzun plazma doruk düzeyine ulaşma süresi ( $t_{maks}$ ) ve eşit emilim (AUC) ile ideal bir biyoyararlanım göstermiştir. Diğer iki süspansiyonun in vitro salım hızları aynı olduğu halde, biyoyararlanım oranları arasında anlamlı farklılıklar olması ilginçtir. Biyoyararlanımdaki bu farklılıkların, mikrokürelerin mide-barsak alanında kalma zamanına bağlı olabileceği düşünülmüştür (140).

### 2.3.6. Mikropartiküllerin Uygulama Yerleri

Mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, hacimlerine, partikülleri oluşturan etkin madde ve polimerlere, terapötik amaçlarına göre, partiküllerin hazırlama tekniklerine bağlı olarak farklı yollar ile verilebilirler: tablet veya jelatin kapsül içine konularak oral (39,150); nazal olarak transmukozal (151); intraperitoneal; intraartiküler; subkütan; intramüsküler ve intravenöz. Mikropartiküler sistemi oluşturacak olan polimerin tipi ve sistemin boyutu, tedavinin cinsine ve veriliş yoluna bağlı olarak tasarlanır (1). Mikropartiküler sistemlerin oral yol ile verilmesi birçok avantaj taşır. Bu sistemler, gastrointestinal alan içinde genişçe yayılarak düzenli hareketleri ile etkin maddeyi kontrollü salabilirler, ilaçların emilimini arttırabilirler ve mide veya barsak mukozasındaki irritasyonu azaltabilirler (1,3). Mikropartiküler ilaç dağıtım sisteminin oral verilişi ile, özellikle kronik ilaç kullanılması durumunda, polimerik maddelerin istenmeyen retansiyonundan sakınılabılır (1). Bunların yanısıra, yeni deneysel çalışmalar, mikropartiküllerin insanlarda ve diğer türlerde, mide-barsak lümeninde, bağırsak içinden emilerek biyoaktif bir cevap sağlayabildiğini göstermiştir. Böylece, ilaçlar ve aşı antijenleri gibi profilaktik ajanların oral yoldan uygulanması mikropartiküler taşıyıcı bir sistem ile mümkün kılınmıştır (150). Bu bilgileri doğrulayıcı çalışmaların birinde, Eudragit RL ve Eudragit RS ile hazırlanmış tolmetin mikropartikülleri ile, suda yavaş çözünen bu etkin maddenin yararlı etkileri uzatılmış ve ülserasyon gibi yan etkileri azaltılmıştır (3). Yine tolmetinin polilaktit mikroküreleri ile, intraperitoneal verilikten sonra etki anlamlı olarak uzatılmıştır. Ayrıca, EC kaplı tolmetin mikroküreleri serbest etkin maddeden daha iyi gastrik dayanıklılık göstermiştir ve ülserojenik etki azalmıştır (3).

Mikropartiküllerin parenteral ve oftalmik uygulamalarında, partikül irilikleri önemlidir. Parenteral uygulama için, subkütan veya intramüsküler enjeksiyonda, iğneden kolaylıkla geçmesini sağlamak açısından yeterli derecede ufak olmalıdır. Bundan dolayı, ufak partiküllerin üretilmesi hazırlama işleminde önemli bir koşuldur (143). Parenteral uygulamalarda, mikropartikül boyutunun 20-40  $\mu\text{m}$  olması istenir (1,152). Damarların tıkanması ancak büyük partiküllerle olmaktadır (200-800  $\mu\text{m}$ ), fakat yine de kimyasal embolizasyon

beklenebilir. Bundan başka, iriliklerine bağılı olarak, mikropartiküller vücudun özel yerlerinde tercihi olarak biraraya toplanabilirler. Örneğin, 2-5 µm aralığındaki mikrokürelerin makrofajlar tarafından tutulduğı ispatlanmıştır (1). İntravenöz enjeksiyondan sonra, mikropartiküllerin kandan eliminasyonu partiküllerin yüzey özelliklerine bağılıdır (153,154,155). Oysa, retikuloendotelial sistemde partiküller yüzey özelliklerine bağılı olmaksızın lokalize olurlar (154). Parenteral ilaç taşıyıcılar aracılığı ile özel yerlere ilaç taşınması başarılı bir stratejidir, çünkü diğere vücut yerlerinde istenmeyen etkiler azalır. Bu nedenle, mikroküreler vücutta özellikle belirli bir hücre, doku ya da organda toplanması istenen etkin maddeler için tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemler olarak tercih edilmektedir. Hedeflendirme, aktif veya pasif olarak yapılabilmekte ve etkin maddenin hedef bölgede kontrol edilebilen bir hızla salımı sağlanmaktadır (45,134,156). Bugün piyasada, parenteral kullanım için mikropartikül içeren birçok ürün mevcuttur (123).

Son zamanlarda birkaç amaca yönelik olarak etkin maddeler saç foliküllerine hedeflendirilmektedirler (157). Foliküler hedeflendirilme için sahip olduğı birkaç avantajından dolayı en çok mikroküreler tercih edilmektedir. Bu avantajlar şunlardır (157):

- Deriye uygulandığıında mikrokürelerin kararlılığıının iyi olması,
- Sınırlı boyutta kolay hazırlanmaları,
- Deri yüzeyinde mikroküre ajanlarının bozunmasında etkin madde içeriğinin korunması,
- Mikrokürelerden saç foliküllerine kontrollü salım,
- Mikroküreler içinde hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddelerin her ikisinin bulunma olanağı.

Mikropartiküllerin yüzey özellikleri, partikül irilikleri ve polimerin bozunması gibi birçok faktör enflamasyon reaksiyonlarının derece ve önemini etkiler (50). Aslında, mikropartiküllere olan doku reaksiyonu, normal korunma reaksiyonudur. Bunun yanısıra, düşük bozunma hızının da, daha az şiddetli bir reaksiyonun sonucu olabileceğı rapor edilmiştir (50). Partikül iriliğinin implante materyallerin doku reaksiyonunda rol oynadığı görülmüştür. Williams (50),



yüksek molekül ağırlığına sahip monolitik, katı, saf bir polimerin, genel olarak, vücuda yabancı olmayacağını ve çok düşük fibröz cevaba yol açacağını rapor etmiştir. Bu davranıştan sapmanın ancak partiküler halde implante edilmenin ardından görülebileceğini ve bunun da fiziksel irritasyona bağlı doku reaksiyonu sonucu olabileceğini belirtmiştir.

Son yıllarda, mikropartiküler sistemlerin kullanımı ile beyine ilaç taşınması da araştırmacıların çalıştıkları konular arasına girmiştir. Böylece, çeşitli moleküllerin beyine taşınması için, fiziksel, biyolojik ve kimyasal bölgeye özgü taşıma sistemleri geliştirilmiştir (158). Benoit ve arkadaşları (158) hazırladıkları, 5-florourasil yüklü PLGA mikrokürelerini, sıçan beynine implante ederek in vivo salım kinetiklerini ve toksisitelerini incelemişler, kötü huylu glioması olan hayvanlarda ise terapötik değerlendirmesini yapmışlardır. Yavaş salım sağlaması tasarlanan mikrokürelerin 30 gün süre ile salım sağladığı ve herhangi bir nörohistolojik anormallik göstermediğini bulmuşlardır. PLGA kullanarak hazırlanan 5-florourasil mikroküreleri beyne ilaç dağıtımı için ümit verici bir çalışmadır. Çünkü, bunlar kolaylıkla implante edilebilen, biyolojik olarak geçimli, biyolojik olarak parçalanabilen ve  $\gamma$ -ışınları ile sterilize edilebilen preparatlardır (159).

Diğer taraftan, aynı tip mikropartiküller farklı verilmiş yollarına göre farklı etkiler gösterebilmektedir. gD2 içeren mikropartiküller hazırlanarak, protein bütünlükleri ve antijen salım hızları in vitro olarak saptanmıştır (160). Mikropartiküllerden, değişmemiş antijenin önce % 20-30 başlangıç salımı gösterdiği ve bunun ardından antijenin çok yavaş salındığı bulunmuştur. Bu sonuç, gD2'nin poli (laktit-ko-glikolit) polimerine güçlü olarak bağlanması olarak değerlendirilmiş ve antijenin olası yavaş salımı için açıklayıcı olduğu söylenmiştir. Antijenin in vitro bozunması gözle görünür olmasına rağmen, mikropartiküler taşıyıcı içinde intramüsküler verilmişin ardından kuvvetli immünojenik, oral verilmişin ardından ise çok zayıf immünojenik etkisinin olduğu bulunmuştur (160).

Glikokortikoidler için taşıyıcı bir sistem olarak kolajen mikropartikülleri değerlendirilmiş ve bunların fizikokimyasal özellikleri saptanmıştır (123). Bu çalışmada partikül yükünün pH'ya bağımlı olduğu gözlenmiştir. Örneğin, ortam

4.5'un üzerinde bir pH ile çevrelendiğinde sonuç negatif bir yük, 4.5'un altında bir pH ile pozitif bir yükür. Bu yük, ayrıca çözünmüş etkin maddelerde etkileşmenin önemini tayin etmektedir. Prednilidin dietilaminoasetat partikülleri, pH 4.5 üzerinde pozitif yüklüken, prednisolon sodyum fosfat bu pH'nın altında negatif yüklüdür. Hidrokortizon gibi bağlanmamış lipofilik ilaçların emilimi ise çoğunlukla pH'dan bağımsızdır. pH'dan bağımsız olduğu için, mikropartiküler sistemin stabilitesi ve salımı, sadece hidrokortizon ile test edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, kolajen mikropartiküllerinin lipofilik steroidler için taşıyıcı bir sistem olarak başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir (123).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. MADDE ve CİHAZLAR

##### 3.1.1. Kullanılan Maddeler

Diklormetan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); Hidroklorik asit (HCl); Sodyum dihidrojen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ); Sodyum hidroksit (NaOH); Sodyum klorür (NaCl)

E. Merck, Almanya

Etil asetat ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ )

Carlo Erba, İtalya

Eudragit RS

Röhm Pharma, Almanya

Piridostigmin bromür (PB)

Roche, USA

Potasyum klorür (KCl)

J.F.Baker, USA

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Buz Banyosu

PolyScience 9005

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

Mettler Toledo DSC 821

Electronic

Erime Derecesi Tayin Cihazı

Electrothermal 1A9000

Işık Mikroskobu

Olympus BX50

Magnetik Karıştırıcı

Electro-Mag

Partikül Boyut Dağılım Cihazı

Malvern Mastersizer 2000

Püskürterek Kurutma Cihazı

Büchi 190

Spektrofotometre (IR)

Shimadzu-IR 435

Spektrofotometre (UV)

Shimadzu-160 A

Taramalı Elektron Mikroskobu

CamScan S4

Ultrasonik Banyo

Elma Transsonic 470/H

Ultraturaks

Janke&Kunkel IKA T25

X-Işını Kırınım Cihazı

Rigaku

Yatay Çalkalayıcı

Nüve

## 3.2. YÖNTEMLER

Bu bölümde, mikropartiküllerin formülasyonunda kullanılan etkin ve matris maddenin fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi, kullanılan miktar tayini yönteminin validasyon çalışmaları, formülasyonların hazırlanışı ve bu formülasyonlarda yapılan in vitro çalışmalar anlatılacaktır.

### 3.2.1. Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinler

#### 3.2.1.1. Piridostigmin Bromür ile Yapılan Çalışmalar

PB'ün çeşitli karakteristiklerini saptamak için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

##### 3.2.1.1.1. Spektrofotometrik Çalışmalar

###### 3.2.1.1.1.1. UV-Spektrofotometre

Farklı ortamlardaki [distile su, SF, pH 1.2 ve pH 7.4] PB çözeltilerinin spektrumları 400-200 nm dalga boylarında UV-Spektrofotometresi kullanılarak alınmış,  $\lambda_{maks}$  ve  $\lambda_{min}$  değerleri belirlenmiştir.

###### 3.2.1.1.1.2. IR- Spektrofotometre

PB'ün infrared (IR) spektrumu, IR spektrofotometresinde 4000-400  $cm^{-1}$  arasında potasyum bromür ile hazırlanan diskleri kullanılarak alınmıştır.

###### 3.2.1.1.2. Erime Derecesi Tayini

PB'ün erime derecesi, kılcal tüp içersinde, erime derecesi tayin cihazı ile saptanmıştır. İşlem üç kez tekrarlanmıştır.

###### 3.2.1.1.3. Termal Analiz

PB'ün termal analizinde, diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılmıştır. Piridostigmin, duyarlı olarak alüminyum örnek kabında tartılmış, kapak basınç yardımı ile kapatılıp, sıkıştırılmıştır. Alüminyum referans kullanılarak, ısıtma aralığı oda sıcaklığından 165° K'e kadar, ısıtma hızı 5 K°.dak<sup>-1</sup>, dinlendirme süresi 1 dak, soğutma hızı 5 K°.dak<sup>-1</sup> ve 200 ml.dak<sup>-1</sup> N<sub>2</sub> akış hızında termal analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.1.1.4. Piridostigmin Bromür Miktar Tayini**

İn vitro çözünme hızı testlerinde kullanılan UV-spektrofotometrik yöntemin güvenilirliğini saptamak için validasyon çalışmaları yapılmıştır.

##### **3.2.1.1.4.1. UV Spektrofotometre için Validasyon Çalışmaları**

###### **3.2.1.1.4.1.1. Doğrusallık**

PB'ün kalibrasyon eğrilerinin belirlenmesinde, pH 1.2, pH 7.4, distile su ve SF için  $0.1 \text{ mg.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki stok çözeltilerinin seyreltilmesi ile 10-50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonlarında PB çözeltileri hazırlanmıştır. Bu farklı ortamlardaki çözeltilerin absorpsanları, çalışılan çözücünün maksimum dalga boyunda belirlenmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorpsan değerlerinden, her bir ortama ait doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Her konsantrasyon değeri için deney altı kez tekrarlanmıştır.

###### **3.2.1.1.4.1. 2. Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik**

İn vitro salım çalışmalarında çözünme ortamı olarak kullanılan distile su, pH 1.2 ve pH 7.4 ortamlarında PB'ün 3'er farklı konsantrasyonda (15, 30 ve 45  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) çözeltileri hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar, validasyon çalışmamızın gerçek amacına ulaşabilmesi için, tüm çalışma boyunca PB'ün miktar tayininde kullandığımız kalibrasyon eğrilerinin belirlenmesinde çalışılan konsantrasyonlar içerisinde seçilmiştir. Çözeltilerin absorpsanları, çalışılan çözücünün maksimum dalga boyunda belirlenmiştir. Her konsantrasyon değeri için deney altı kez yapılmıştır. 1. gün için yapılan tüm bu çalışmalar, 2. ve 3. günlerde de tekrarlanmıştır ( $k=3$ ) (161). Üç gün boyunca elde edilen sonuçlardan, gerekli formüller yardımıyla, yöntemin tekrarlanabilirlik ve günler arası kesinlik değerleri hesaplanmıştır (162).

###### **3.2.1.1.4.1.3. Yöntemin Uygulanabilirliği**

Yöntemin uygulanabilirliğini araştırmak amacı ile, biri etilasetatla (EF8) diğeri diklormetan (DF7) ile etkin madde içermeyen (plasebo) iki formülasyon hazırlanmıştır. Her iki test için, in vitro salım çalışmalarında kullanılan miktarda formülasyonlar kullanılarak, üç çözücü ortamında (distile su, pH 1.2 ve pH 7.4) altışar çözünme hızı çalışması yapılmıştır. İn vitro salım çalışmalarında

kullanılan koşullarda çalışılarak, alınan örneklerin absorpsanları belirlenmiş ve yöntemin uygulanabilirliği araştırılmıştır.

#### **3.2.1.1.5. znrlk Tayinleri**

##### **3.2.1.1.5.1. Farklı Sıvı Ortamlardaki znrlk Tayini**

PB'n znrlğ, distile su, SF, pH 1.2 ve pH 7.4'te tayin edilmiştir. pH 1.2 ve pH 7.4 tampon zlteleri, USP XXII'de belirtilen oranlar kullanılarak hazırlanmıştır (163). Bu ortamlarda PB'n doymuş zlteleri hazırlandıktan sonra, znmenin tam olarak sağlanması amacı ile, ultrasonik banyoda 15 dak karıştırılmıştır. zlteler, Whatman No.41 süzgeç kağıdından süzülerek sulu kısımlar ayrılmış ve znme ortamları ile seyreltilerek UV-spektrofotometre ile absorpsanları llmştir. znebiyen PB miktarları, kalibrasyon denklemlerinden hesaplanmıştır. Bu işlemler üçer kez tekrarlanmış ve ortalamalar bulunmuştur.

##### **3.2.1.1.6. Partikül Boyut Analizi**

PB'n partikül boyut dağılımı, PB'n znmediği zcy (etilasetat) kullanarak, lazer taramalı cihaz ile saptanmıştır.

##### **3.2.1.1.7. X-Işını Kırınım Analizi**

PB'n X-işını kırınım analizi, 0-40° aralığında, 40 kV voltaj ve 30 mA akım Şiddetinde, Rigaku jeneratör yardımı ile yapılmıştır.

#### **3.2.1.2. Eudragit® RS ile Yapılan alışmalar**

Eudragit® RS'nin özelliklerini ve firma spesifikasyonlarına uygunluğunu saptamak amacı ile erime derecesi, reolojik, termal ve X-işını kırınım analiz çalışmaları yapılmıştır.

##### **3.2.1.2.1. Erime Derecesi Tayini**

Eudragit® RS'nin erime derecesi, kılcal tp içersinde, erime derecesi tayin cihazı ile saptanmıştır. Işlem  kez tekrarlanmıştır.

##### **3.2.1.2.2. Termal Analiz**

Eudragit® RS'nin termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılmıştır. Eudragit® RS alüminyum örnek kaplarında duyarlı olarak tartıldıktan

sonra, kapaklar sıkıştırılarak Bölüm 3.2.1.1.4'de açıklanan koşullarda termal analize tabi tutulmuştur.

#### **3.2.1.2.3. Reolojik Analiz**

Eudragit® RS'nin reolojik özellikleri 20°C'de, 1-10 rpm arasında belirlenmiştir. Analizde, Brookfield reometresi kullanılmıştır. Kullanılan reometre, koni-tabla geometrisine sahiptir. Seçilen koninin açısı 1.565°, çapı 1.2 cm ve kayma hızı  $3.84 \times N$ 'dir ( $N = \text{rpm}$ ).

#### **3.2.1.2.4. X-Işını Kırınım Analizi**

Analiz, 0-40° aralığında, 40 kV voltaj ve 30 mA akım şiddetinde gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2. Mikropartiküller ile Yapılan Çalışmalar**

#### **3.2.2.1. Formülasyonları**

Mikropartiküller, çözücü değiştirerek iki farklı yöntemle hazırlanmıştır.

##### **3.2.2.1.1. Etkin Madde Dağıtılarak Hazırlanan Formülasyonlar**

Etkin maddenin hapsedilebilme oranı ve partiküllerden salım hızının modifiye edilebilmesini araştırmak için, giren hava sıcaklığı, çıkan hava sıcaklığı, beslenme oranı, püskürtme akış basıncı ve deneyin diğer parametreleri sabit tutulmuş, sabit miktarda çözücüde, PB ve polimer oranları değiştirilerek (etkin madde/polimer: 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4) püskürterek kurutma cihazı kullanılarak partiküller hazırlanmıştır.

Kullanılan parametreler Çizelge 3.1.'de özetlenmiş ve formülasyonların kodları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1. Etkin Madde Dağıtılarak Hazırlanan Formülasyonlarda Kullanılan Parametreler**

Parametre	Deney koşulları
Etkin madde	Piridostigmin Bromür (500 mg, 1 g, 2 g)
Polimer	Eudragit® RS (1:1, 1:2, 1:3, 1:4)
Çözücü	Etil Asetat
Dağıtılma sıcaklığı	-5°C
Karıştırma hızı	1000 rpm
Karıştırma süresi	10 dak
Giren hava sıcaklığı	61°C
Çıkan hava sıcaklığı	43°C
Besleme oranı	7 ml.dak <sup>-1</sup>
Püskürtme akış basıncı	4 atm
Nozzle çapı	0.7 mm
Saklama	Desikatör (CaCl <sub>2</sub> , atmosfer basıncı, oda sıcaklığı)

**Çizelge 3.2. Etkin Madde Dağıtılarak Hazırlanan Mikropartikül Formülasyonlarının Kodları**

Eudragit® RS (g)	Piridostigmin Bromür (g)	EtkinMadde/Polimer Oranı	Kod
0.5	0.5	1:1	EF1
1	0.5	1:2	EF2
1.5	0.5	1:3	EF3
2	0.5	1:4	EF4
1	1	1:1	EF5
2	1	1:2	EF6
3	1	1:3	EF7
4	1	1:4	EF8
2	2	1:1	EF9
4	2	1:2	EF10
6	2	1:3	EF11
8	2	1:4	EF12



### 3.2.2.1.2.Etkin Madde Çözündürülerek Hazırlanan Formülasyonlar

Yine, etkin maddenin hapsedilebilme oranı ve partiküllerden salım hızının modifiye edilebilmesini araştırmak için, giren hava sıcaklığı, çıkan hava sıcaklığı, beslenme oranı, püskürtme akış basıncı ve deneyin diğer parametreleri sabit tutulmuş, sabit miktarda çözücüde, PB ve polimerin oranları değiştirilerek (etkin madde/polimer: 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4) püskürterek kurutma cihazını kullanarak partiküller hazırlanmıştır.

Kullanılan parametreler **Çizelge 3.3.**'de özetlenmiş ve formülasyonların kodları **Çizelge 3.4.**'de verilmiştir .

**Çizelge 3.3. Etkin Madde Çözündürülerek Hazırlanan Formülasyonlarda Kullanılan Parametreler**

Parametre	Deney koşulları
Etkin madde	Piridostigmin Bromür (500 mg, 1 g, 2 g)
Polimer	Eudragit® RS (1:1, 1:2, 1:3, 1:4)
Çözücü	Diklormetan
Çözündürülme sıcaklığı	Oda Sıcaklığı
Giren hava sıcaklığı	61°C
Çıkan hava sıcaklığı	43°C
Besleme oranı	7 ml.dak <sup>-1</sup>
Püskürtme akış basıncı	4 atm
Nozzle çapı	0.7 mm
Saklama	Desikatör (CaCl <sub>2</sub> , atmosfer basıncı, oda sıcaklığı)

### 3.2.2.2. Hazırlanışları

#### 3.2.2.2.1. Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlama

PB mikropartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan deney koşulları **Çizelge 3.1.**'de görülmektedir.

Yöntem kısaca şöyledir: polimer, çözücüde çözündürülmüştür. Etkin madde polimerik çözelti içinde, buz banyosunda mekanik karıştırıcı ile 1000 rpm de 10 dak karıştırılarak dağıtılmıştır. Etkin madde-polimer çözeltisi, **Çizelge 3.1.**'de belirtilen parametreler kullanılarak püskürterek kurutma yöntemi ile

mikropartiküller elde edilmiştir. Karışım cihaza beslenirken manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılmıştır. Kolektörde toplanan çökelek alınıp desikatörde 48 saat tutulmuştur.

**Çizelge 3.4. Etkin Madde Çözündürülerek Hazırlanan Mikropartikül Formülasyonlarının Kodları**

<b>Eudragit® RS (g)</b>	<b>Piridostigmin Bromür (g)</b>	<b>EtkinMadde/Polimer Oranı</b>	<b>Kod</b>
0.5	0.5	1:1	DF1
1	0.5	1:2	DF2
1.5	0.5	1:3	DF3
2	0.5	1:4	DF4
1	1	1:1	DF5
2	1	1:2	DF6
3	1	1:3	DF7
4	1	1:4	DF8
2	2	1:1	DF9
4	2	1:2	DF10
6	2	1:3	DF11
8	2	1:4	DF12

### **3.2.2.2. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlama**

PB mikropartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan deney koşulları Çizelge 3.3.'de görülmektedir.

Yöntem şöyle özetlenebilir: polimer, çözücüde çözündürülmüştür. Etkin madde polimer çözeltisi içinde, oda sıcaklığında karıştırılarak çözündürülmüştür. Etkin madde-polimer çözeltisi Çizelge 3.3.'de belirtilen parametrelerle püskürterek kurutulularak mikropartiküller elde edilmiştir. Kolektörde toplanan çökelek alınıp desikatörde 48 saat tutulmuştur.

### **3.2.2.3. Mikropartiküllerin Özelliklerine ait Çalışmalar**

#### **3.2.2.3.1. Şekilleri**

Hazırlanan partiküllerin yüzey özellikleri ve şekilleri, hem ışık hem de taramalı elektron mikroskopunda saptanmıştır. Hazırlanan partiküller ile saf PB'ü karşılaştırmak amacıyla, toz haldeki PB aynı yöntem ile incelenmiştir.

### **3.2.2.3.2. Partikül İrilik Dağılımları**

Hazırlanan her bir mikropartikül formülasyonu, ultrasonik banyoda distile su içerisinde disperse edilerek, partikül boyut dağılımları, lazer taramalı cihaz ile saptanmıştır.

### **3.2.2.3.3. IR Analizleri**

Partikül iriliği ve çözünme hızı ön testlerine göre, her hazırlama yönteminden birer formülasyon seçilmiştir. Bu formülasyonların IR spektrumu, IR spektrofotometresinde  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  arasında potasyum bromür ile hazırlanan diskler kullanılarak alınmıştır.

### **3.2.2.3.4. Termal Analizleri**

Hazırlanan PB'ün mikropartiküllerinin termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılmıştır. Mikropartikül örnekleri alüminyum örnek kaplarında duyarlı olarak tartıldıktan sonra, kapaklar sıkıştırılarak Bölüm 3.2.1.1.4'de açıklanan koşullarda termal analize tabi tutulmuştur.

### **3.2.2.3.5. X-Işını Kırınım Analizi**

Bahsi geçen iki formülasyon üzerinde, hazırlama yöntemleri arasındaki farkı incelemek amacı ile, X-ışını kırınım analizi yapılmıştır.

### **3.2.2.3.6. Hazırlama Verimi**

Kullandığımız her iki yöntemin üretim kapasitesini değerlendirebilmek için, formülasyonlardaki toplam katı miktardan hareketle, mikropartiküllerin hazırlama verimleri hesaplanmıştır (46).

### **3.2.2.3.7. Partiküllerde Piridostigmin Bromür Miktar Tayini**

#### **3.2.2.3.7.1. Filtre Materyalinin Adsorpsiyon Testi**

Filtre materyalinin adsorpsiyon testi çalışmaları için, çözünme ortamı olarak kullanılan distile su, pH 1.2 ve pH 7.4 ortamlarında PB'ün 3'er farklı konsantrasyonda (5, 12.5 ve  $25\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) çözeltileri hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar, çözünme ortamına koyduğumuz, bilinen miktardaki PB'ün belirli yüzdelerinin çözünmesi ile belirli zaman aralıklarında çözünme ortamından alacağımız örneklerde karşılaşılabileceğimiz konsantrasyonlar gözönüne alınarak seçilmiştir. Seçilen konsantrasyonlarda etkin madde içeren

çözeltilerde değişik filtre materyalleri (selüloz asetat, selüloz nitrat, poliamid) denenerek, filtre materyalinin etkin madde adsorpsiyonu belirlenmiştir. Her konsantrasyon değeri için deney üç kez yapılmıştır.

#### **3.2.2.3.7.2. Partiküllerde Yüklenen Toplam Piridostigmin Bromür Miktarı**

20 mg hassas tartılmış mikropartikül, distile su içerisinde, ultraturaks ile 8000 rpm de 15 dak çalkalanmıştır. Whatman No. 41 ile ayrılan süzüntüdeki PB miktarı UV-spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Her deney 3 kez tekrarlanmıştır.

#### **3.2.2.3.7.3. Partiküllerde Hapsedilen Piridostigmin Bromür Miktarı**

Hazırlanan mikropartiküllerde, hapsedilen PB miktarını saptamak amacıyla, mikropartiküllerin yüzeyinde ve içindeki etkin madde miktarları ayrı ayrı hesaplanmıştır. Yüzeyde tutulan etkin madde miktarını belirlemek için, hassas olarak tartılmış 20 mg mikropartikül, distile su içinde ultrasonik banyoda 5 dak tutulmuş; mikropartiküller, 0.2 µm'lik poliamid membran filtre ile ayrılmıştır. Kalan çözeltinin absorbansı UV-spektrofotometre ile ölçülerek yüzeydeki PB miktarları hesaplanmıştır.

Hapsedilen PB miktarının hesaplanması için membran filtre ile ayrılan mikropartiküller distile su'da bu kez ultraturaks kullanılarak 8000 rpm de 15 dak çalkalanmıştır. Whatman No. 41 ile ayrılan süzüntüdeki PB miktarı UV-spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve hapsedilen PB miktarı gerekli hesaplamalar ile bulunmuştur. Her deney 3 kez tekrarlanmıştır.

#### **3.2.2.4. Mikropartiküller ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmaları**

Bu çalışmalar partiküllerin in vitro davranışları hakkında fikir edinebilmek için yapılmıştır.

İN vitro koşullarda, mikropartiküllerden PB salımını değerlendirme çalışmalarında, inkübasyon yöntemi kullanılmıştır (55,72,74,97,101,103,114, 117, 133, 134, 144,164).

Hazırlanan mikropartiküllerin, 5 mg PB içeren örnekleri, 100 ml çözünme ortamında (distile su ile fizyolojik pH'lar olan pH 1.2 ve 7.4) süspanse

edilmiştir. Sıcaklık kontrollü su banyosu içeren yatay çalkalayıcı cihaza yerleştirildikten sonra, aletin sıcaklığı  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'ye, çalkalama hızı 50 rpm'e ayarlanmıştır. Çözünme ortamından belirli zamanlarda (5. dak, 10. dak, 15. dak, 30. dak, 45. dak, 1. s, 2. s, 3. s, 4. s, 5. s, 6. s, 7. s, 8. s, 12. s, 24. s, 36. s, 48. s'lerde) 0.2  $\mu\text{m}$ 'lik poliamid filtre ile süzülerek alınan örnekler (2 ml) yerine, taze ortam konulmuştur. Alınan örneklerin absorbanları, UV-spekrofotometresinde ölçülmüştür. Absorbans değerlerine göre salınan PB miktarı hesaplanmıştır. Her bir çalışma 6 kez tekrarlanmıştır.

Salım bulguları önce zamana karşı yüzde yığılmalı salım olarak grafiğe geçirilmiş, daha sonra bu amaç için yazılmış bir bilgisayar programı ile salım kinetikleri incelenmiştir (165).

## 4. SONUÇ ve TARTIŞMA

### 4.1. SONUÇLAR

Bu bölümde PB ve Eudragit® RS'in fizikokimyasal özelliklerine ait sonuçlar ile mikropartikül formülasyonları üzerinde yapılan in vitro çalışmaların sonuçları verilecektir.

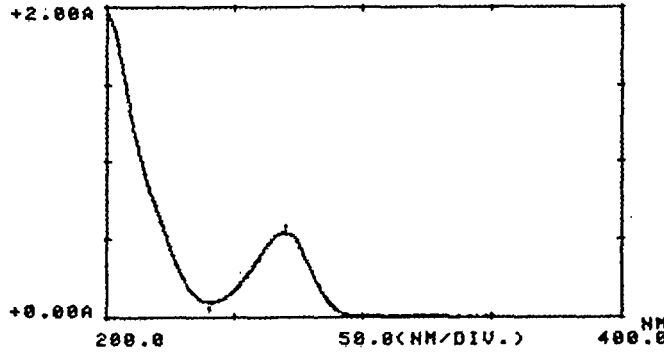
#### 4.1.1. Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinler

##### 4.1.1.1. Piridostigmin Bromür ile Yapılan Çalışmalar

###### 4.1.1.1.1. Spektrofotometrik Çalışmalar

###### 4.1.1.1.1.1. UV-Spektrofotometre

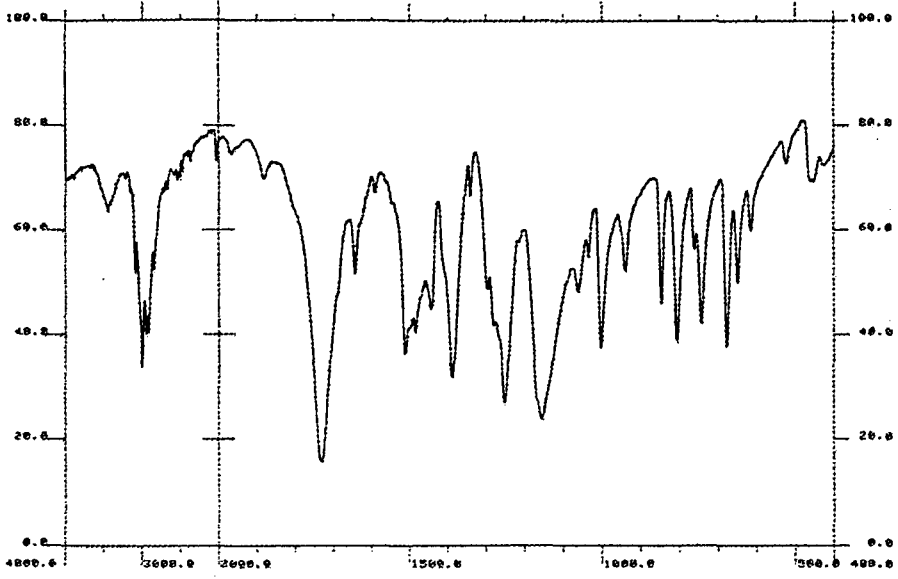
PB'ün farklı ortamlardaki spektrumları, UV-Spektrofotometresi ile Bölüm 3.2.1.1.1.1'de açıklandığı şekilde alınmıştır. Etkin maddenin çözünürlüğü pH'dan etkilenmediği için, farklı ortamlardaki spektrumların çok benzer olduğu görülmüştür. Bu nedenle, yalnızca, PB'ün distile su ortamındaki UV-spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir. Maksimum ve minimum absorbanlara ait dalga boyları, sırasıyla, 270.0 nm ve 240.4 nm'dir.



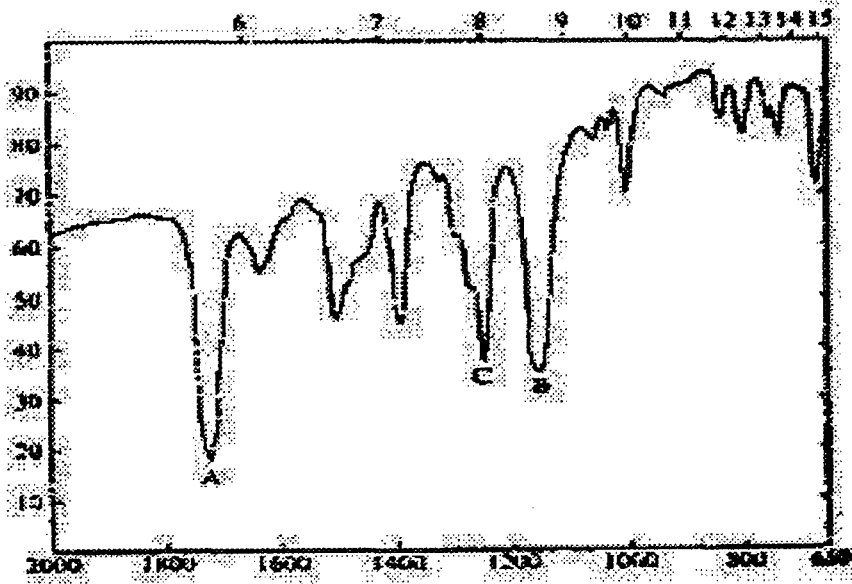
Şekil 4.1. Piridostigmin Bromür'ün Distile Su Ortamındaki UV-Spektrumu

###### 4.1.1.1.1.2. IR- Spektrofotometre

PB'ün potasyum bromür diskleri ile elde edilen IR spektrumu Şekil 4.2a 'da gösterilmiştir. Bu spektrumda, 3000-2400  $\text{cm}^{-1}$  arasında  $-\overset{1}{\text{N}}^+$ , 1730.9  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O, 1250 ve 1155  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O bantları görülmüştür. PB'ün literatür'de gösterilen IR spektrumu ise, Şekil 4.2b 'de verilmiştir (166).



(a)



A 1728, B 1156, C 1249

(b)

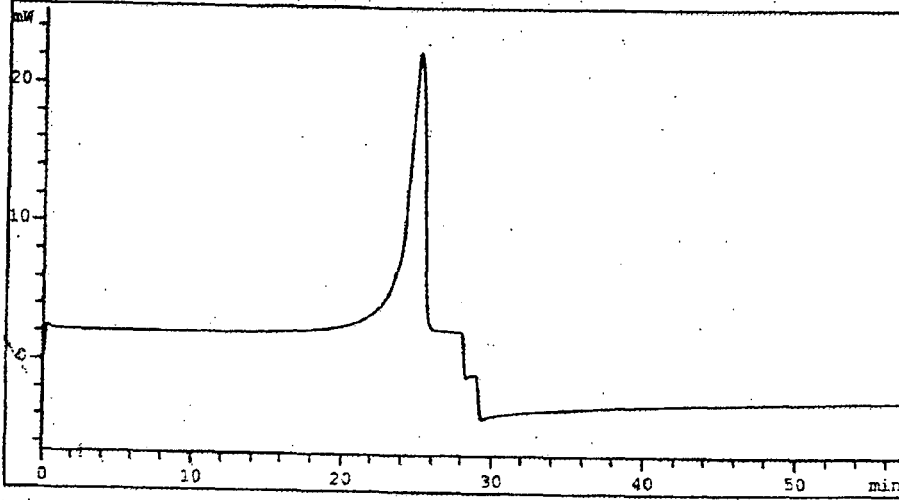
Şekil 4.2. PB'ün IR-Spektrumu; Elde Edilen IR-Spektrumu (a); Literatürde Verilen IR-Spektrumu (b)

#### 4.1.1.1.2. Erime Derecesi

Erime derecesi tayin cihazında yapılan testler sonucunda PB'ün erime derecesinin 154.2°C (n = 3) olduğu bulunmuştur.

#### 4.1.1.1.3. Termal Analiz

PB'ün diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analizi Bölüm 3.2.1.1.3'de belirtilen koşullarda yapılmıştır. PB'ün termogramı Şekil 4.3 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. PB'ün DSC Termogramı

#### 4.1.1.1.4. Piridostigmin Bromür'ün Miktar Tayini

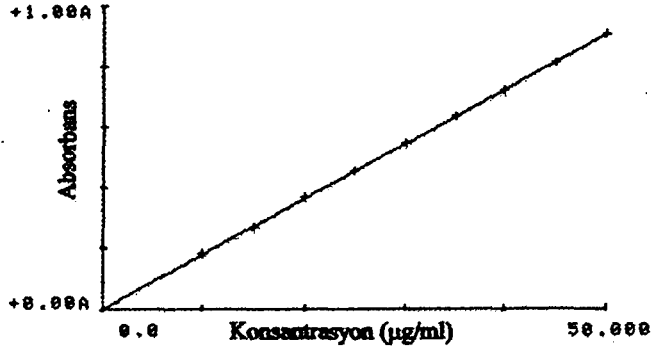
##### 4.1.1.1.4.1. UV Spektrofotometresi ile Validasyon Çalışmaları

###### 4.1.1.1.4.1.1. Doğrusallık

Bölüm 3.2.1.1.4.1.1'de açıklandığı şekilde farklı ortamlarda ve farklı konsantrasyonlardaki PB çözeltilerinin konsantrasyona karşı absorbans grafikleri çizilmiş ve bu veriler yardımıyla eşitlikler hesaplanmıştır.

Etkin maddenin çözünürlüğü pH'dan etkilenmediğinden, birbirine benzer olan eğrilerden, sadece distile su ortamındaki standart eğri Şekil 4.4'de verilmiştir. Bu eğriye ait eğim değeri 0.018, kesişim noktası 0.003 ve korelasyon katsayısı da 0.999'dur.





Şekil 4.4. PB'ün Distile Su Ortamındaki Standart Eğrisi

#### 4.1.1.1.4.1.2. Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik

Bölüm 3.2.1.1.4.1.2.'de anlatıldığı şekilde üç farklı konsantrasyon ile çalışılarak, 3 gün boyunca ( $k=3$ ), tüm çözeltilerin absorbansları UV-spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu veriler ve formüller yardımıyla tekrarlanabilirlik ve kesinlik değerleri hesaplanmıştır. Bulunan değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. UV- Spektrofotometrik Yönteme Ait Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik Sonuçları (RSD)

Konsantrasyon ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Distile Su (%)	pH 1.2 (%)	pH 7.4 (%)
<b><u>Tekrarlanabilirlik</u> *</b>			
15	0.6469	0.5814	0.5134
30	0.3074	0.2859	0.2973
45	0.2221	0.1743	0.2768
<b><u>Kesinlik</u></b>			
15	0.9886	0.6532	0.8816
30	0.5873	0.4221	0.4594
45	0.4734	0.2396	0.2906

\*  $k=3$ ,  $n=6$

#### 4.1.1.1.4.1.3. Yöntemin Uygulanabilirliği

Bölüm 3.2.1.1.4.1.3.'de açıklanan çalışmalar yapıldığında, her iki yöntem ile hazırlanan plasebo formülasyonun, her üç çözünme ortamında (distile su, pH 1.2, pH 7.4) anlamlı bir absorbanı bulunamamıştır.

#### 4.1.1.1.5. Çözünürlük Tayinleri

##### 4.1.1.1.5.1. Farklı Ortamlardaki Çözünürlük Tayini

PB'ün farklı ortamlardaki çözünürlük çalışmaları Bölüm 3.2.1.1.5.1.'de açıklandığı şekilde yapılmış ve elde edilen çözünürlük değerleri Çizelge 4.2 'da verilmiştir.

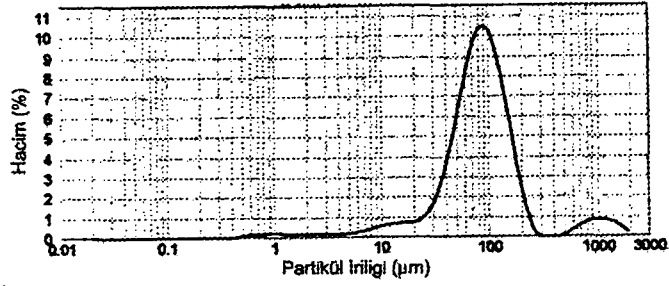
Çizelge 4.2. PB'ün Farklı Ortamlardaki Çözünürlük Değerleri ve Standart Hataları

Ortam	Çözünürlük* (mg.ml <sup>-1</sup> )
Distile su	1262.96±0.018
SF	1201.91±0.006
pH 1.2	1156.97±0.009
pH 7.4	1220.96±0.005

\*n=3

##### 4.1.1.1.6. Partikül Boyut Analizi

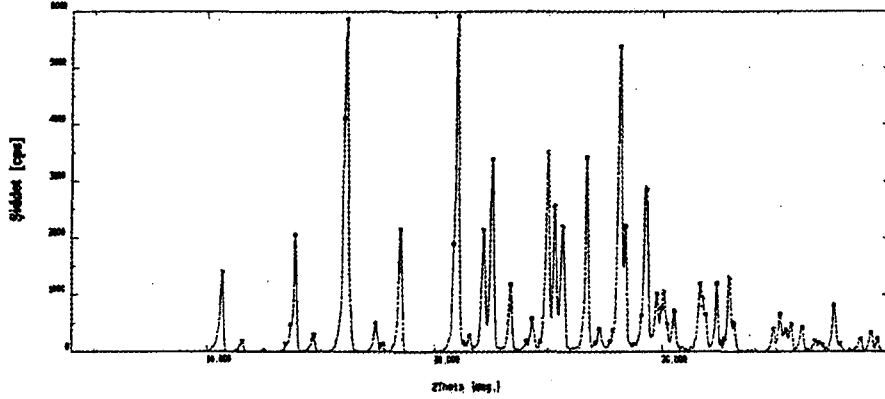
PB'ün partikül boyut analizi Bölüm 3.2.1.1.6'de de açıklandığı gibi lazer taramalı cihaz ile saptanmıştır ve dağılım profili Şekil 4.5'de, gösterilmiştir. Analiz sonucunda, PB'ün ortalama partikül boyutunun 83.842 µm, spesifik yüzey alanının ise 0.206 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.5. PB'ün Partikül İriliği Dağılımı

#### 4.1.1.1.7. X-Işını Kırınım Analizi

PB'ün X-ışını kırınım analizi Bölüm 3.2.1.1.7'de açıklandığı gibi yapılmış ve profili Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. PB'ün X-Işını Kırınım Profili

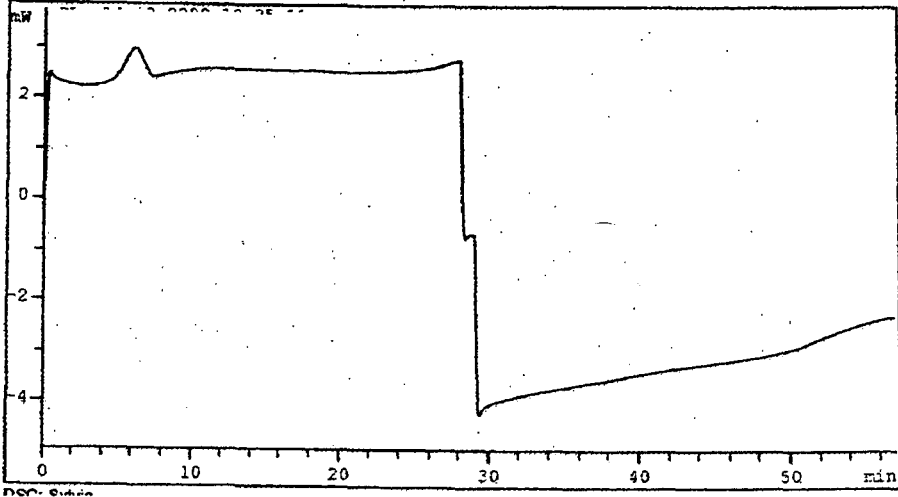
#### 4.1.1.2. Eudragit® RS ile Yapılan Çalışmalar

##### 4.1.1.2.1. Erime Derecesi

Erime derecesi tayin cihazında yapılan analiz sonucunda Eudragit®'in erime derecesi 145°C (n = 3) olarak bulunmuştur.

#### 4.1.1.2.2. Termal Analiz

Eudragit®'in termal analizi, diferansiyel taramalı kalorimetre ile Bölüm 3.2.1.2.2'de açıklandığı gibi yapılmış, analize ait termogram Şekil 4.7'de verilmiştir.



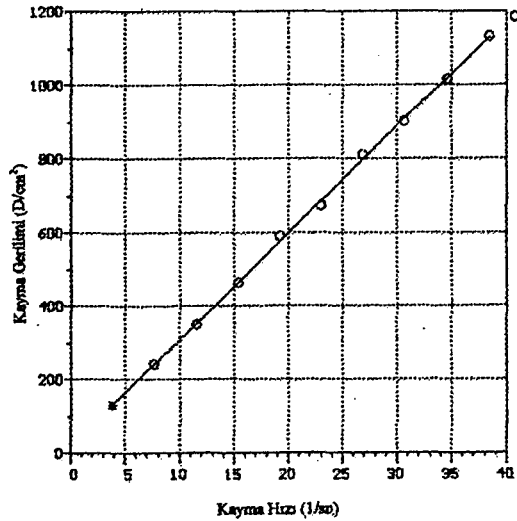
Şekil 4.7. Eudragit®'in DSC Termogramı

#### 4.1.1.2.3. Reolojik Analiz

Bölüm 3.2.1.2.3'de açıklandığı gibi Eudragit®'in reolojik özellikleri 20°C'de, 1-10 rpm arasında belirlenmiştir. Gerçekleştirilen reolojik analizde elde edilen veriler Çizelge 4.3'da gösterilmiştir. Reogram ise Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Eudragit®'in Reolojik Analizine ait Sonuçlar

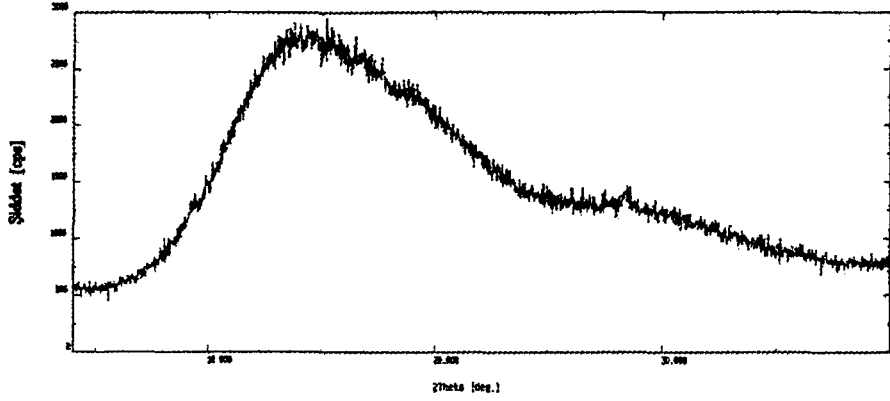
#	RPM	Tork (%)	Viskozite (mPas.sn)	Kayma Gerilimi (D/cm <sup>2</sup> )	Kayma Hızı (sn <sup>-1</sup> )	Sıcaklık (°C)
001	1.0	6.6	3379	129.8	3.84	20.0
002	2.0	12.2	3123	239.9	7.68	20.0
003	3.0	17.7	3021	348.0	11.5	20.0
004	4.0	23.5	3008	462.0	15.4	19.9
005	5.0	30.0	3072	589.8	19.2	19.9
006	6.0	34.3	2927	674.4	23.0	20.0
007	7.0	41.2	3013	810.0	26.9	20.0
008	8.0	45.9	2938	902.4	30.7	19.9
009	9.0	51.6	2935	1014	34.6	20.0
010	10.0	57.7	2954	1134	38.4	20.0



Şekil 4.8. Eudragit®'in Reogramı

#### 4.1.1.2.4. X-Işını Kırınım Analizi

Analiz, Bölüm 3.2.1.2.4'de açıklandığı şekilde yapılmış ve profili Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Eudragit®'in X-Işını Kırınım Analizi

#### 4.1.2. Mikropartiküller ile Yapılan Çalışmalar

##### 4.1.2.1. Formülasyonları

İn vitro deneylerde kullanılan mikropartiküller çözücü değiştirerek iki farklı yöntem ile Bölüm 3.2.2.1.1 ve 3.2.2.1.2'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. İki farklı yöntemle hazırlanan mikropartiküllerin kodları Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.4'de verilmiştir.

#### **4.1.2.2. Mikropartiküllerin Özellikleri**

##### **4.1.2.2.1. Şekilleri**

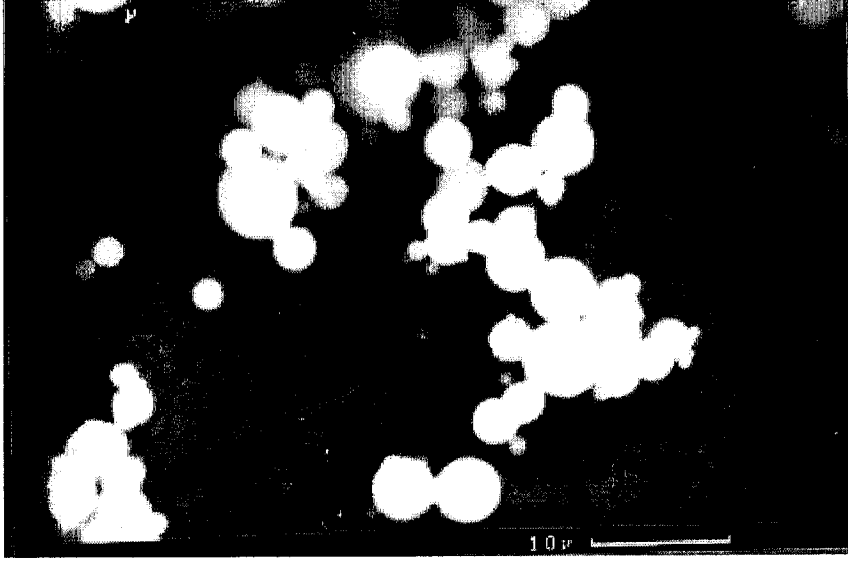
DF7, EF8 kodlu mikropartiküller ile toz PB'ün şekilleri Bölüm 3.2.2.3.1'de açıklandığı üzere incelenmiş ve saptanabilen görüntüler **Şekil 4.10**, **Şekil 4.11**, **Şekil 4.12**, **Şekil 4.13**, **Şekil 4.14** ve **Şekil 4.15**'de gösterilmiştir.

##### **4.1.2.2.2. Partikül İrilik Dağılımları**

Hazırlanan mikropartiküllerin partikül irilikleri Bölüm 3.2.2.3.2'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiş ve bu çalışmalara ait bulgular **Çizelge 4.4**'de verilmiştir. Ayrıca her bir formülasyona ait partikül boyut dağılım grafikleri de **Şekil 4.16** ve **Şekil 4.17**'de görülmektedir.



**Şekil 4.10. PB'ün Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri**



**Şekil 4.11. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri**

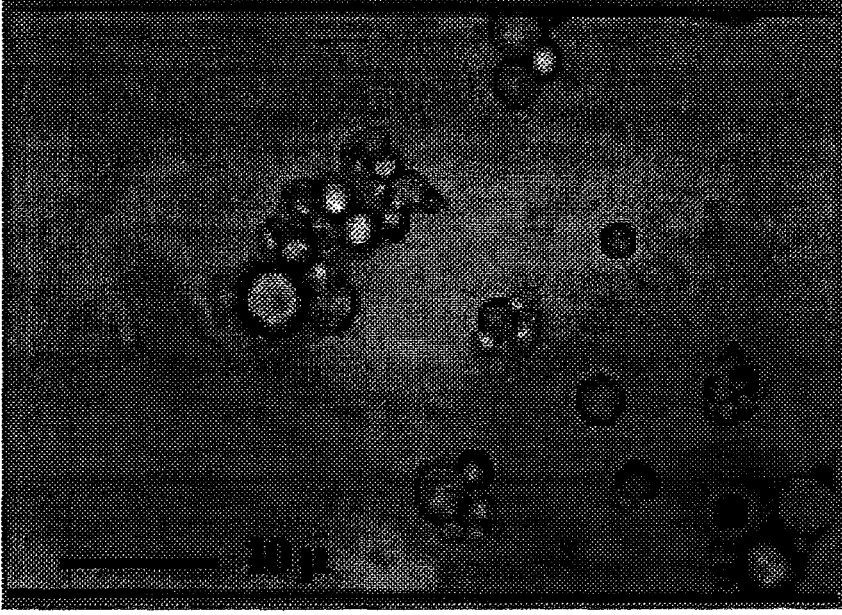




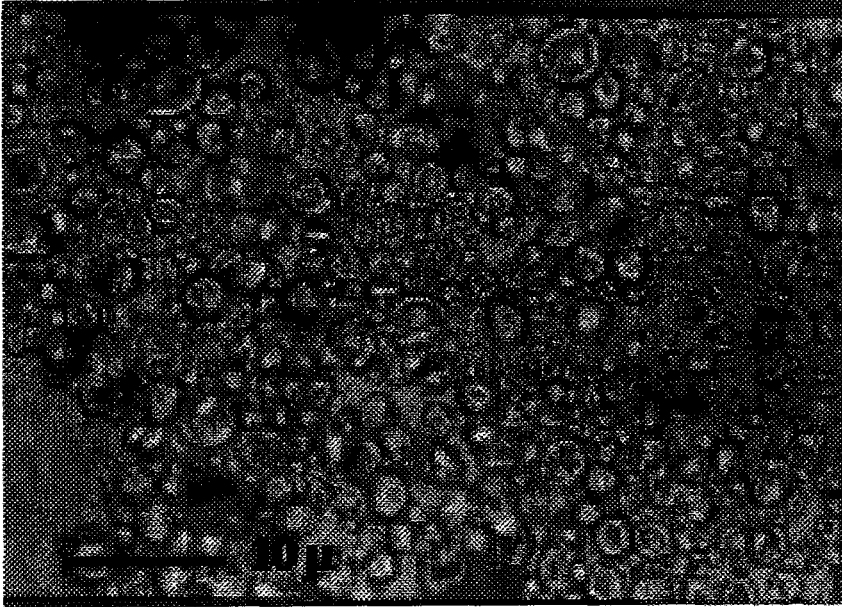
**Şekil 4.12. Etkin Maddenin Dağılımı ile Hazırlanan  
Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri**



**Şekil 4.13. PB'ün Işık Mikroskop Görüntüleri**



**Şekil 4.14. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Işık Mikroskop Görüntüleri**

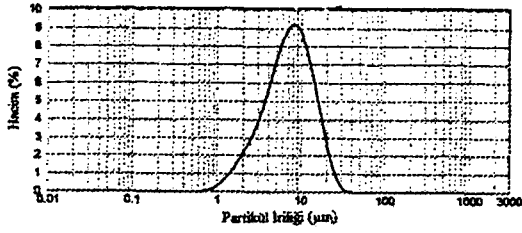


**Şekil 4.15. Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Işık Mikroskop Görüntüleri**

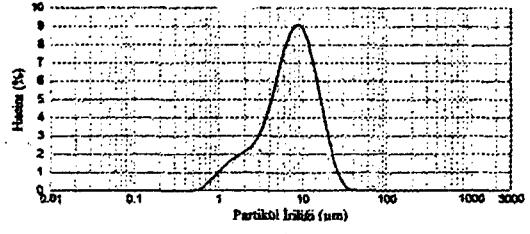
**Çizelge 4.4. Mikropartiküllerin Ortalama Partikül İriklileri ve Spesifik Yüzey Alanları**

Formülasyon	Ortalama Partikül İriği ( $\mu\text{m}$ )	Spesifik Yüzey Alan ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )
EF1	3.765	2.076
EF2	4.154	1.936
EF3	4.649	1.822
EF4	4.631	1.794
EF5	3.724	2.158
EF6	4.637	1.852
EF7	5.996	1.508
EF8	6.854	1.412
EF9	4.715	1.877
EF10	4.486	1.906
EF11	5.148	2.061
EF12	5.972	1.779
DF1	7.228	1.125
DF2	7.432	1.256
DF3	8.805	1.158
DF4	8.894	1.229
DF5	5.982	1.417
DF6	6.764	1.396
DF7	8.742	1.259
DF8	10.037	1.206
DF9	7.853	1.209
DF10	8.389	1.287
DF11	10.322	1.149
DF12	9.996	1.284

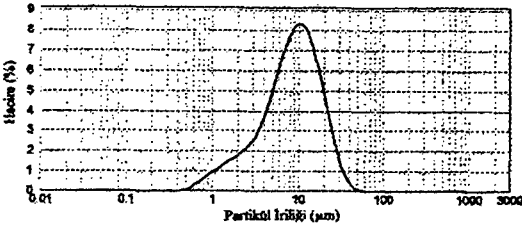
n= 3



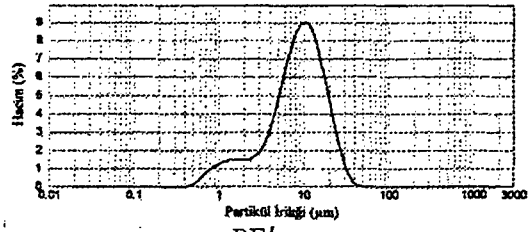
DF1



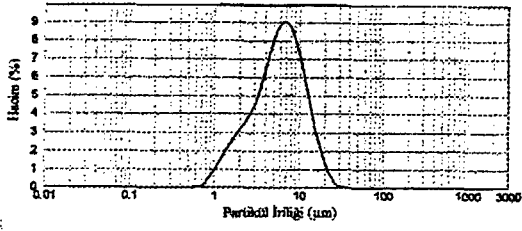
DF2



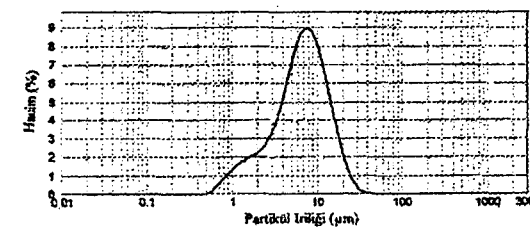
DF3



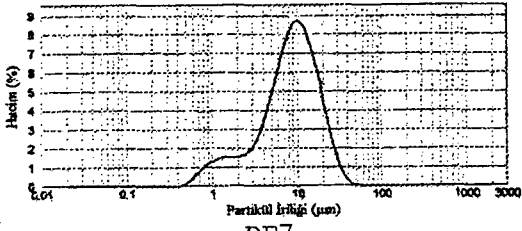
DF4



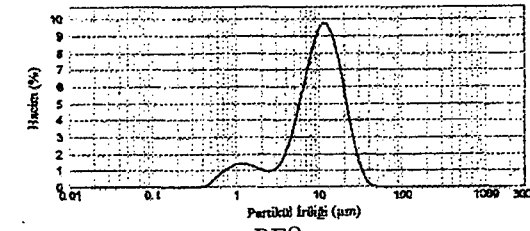
DF5



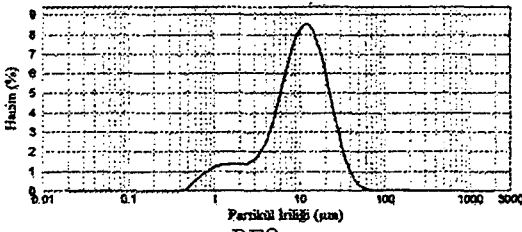
DF6



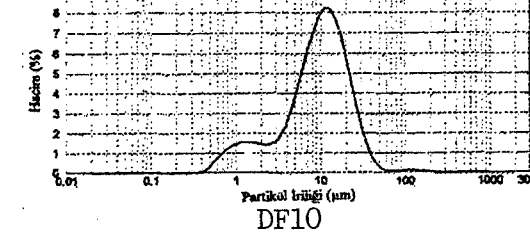
DF7



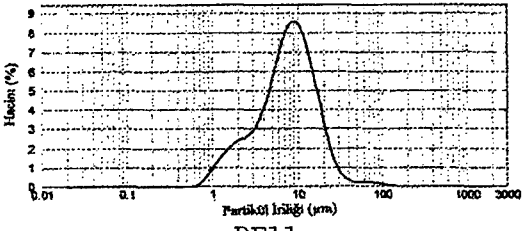
DF8



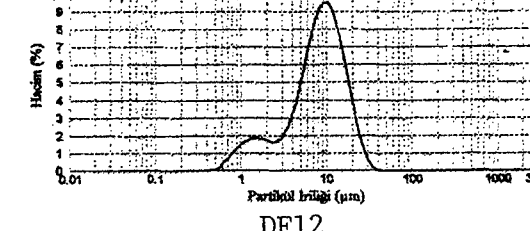
DF9



DF10



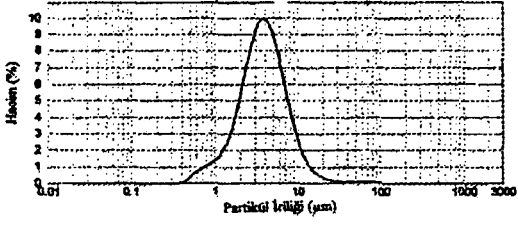
DF11



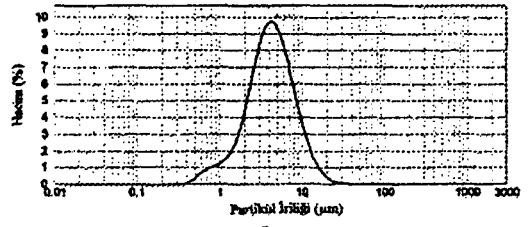
DF12

Şekil 4.16. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Partikül

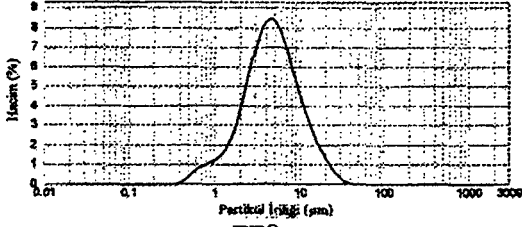
Dağılım Eğrileri



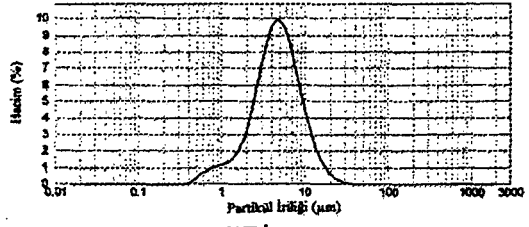
EF1



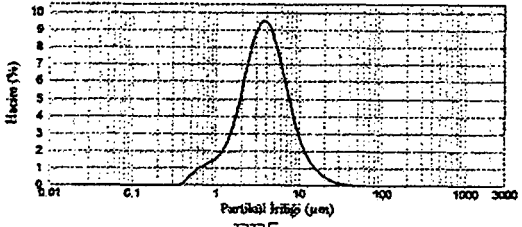
EF2



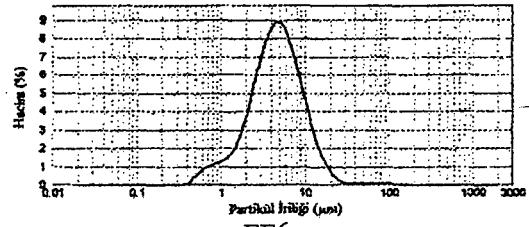
EF3



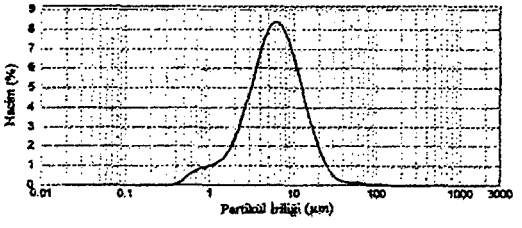
EF4



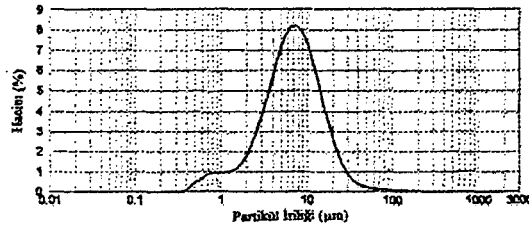
EF5



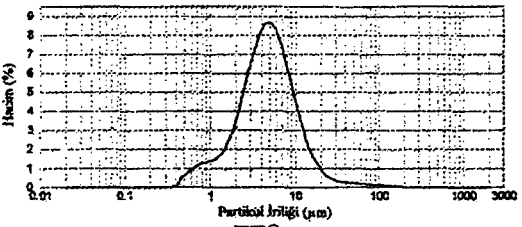
EF6



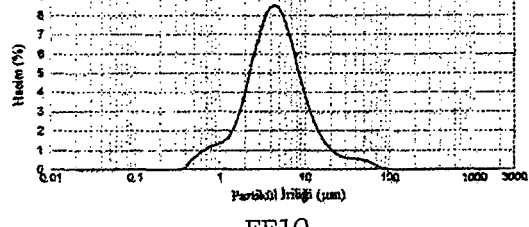
EF7



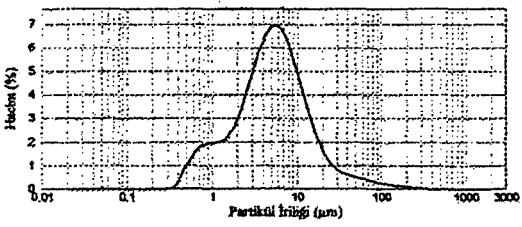
EF8



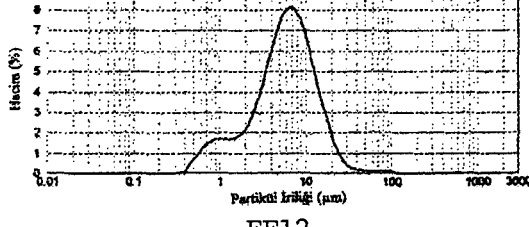
EF9



EF10



EF11

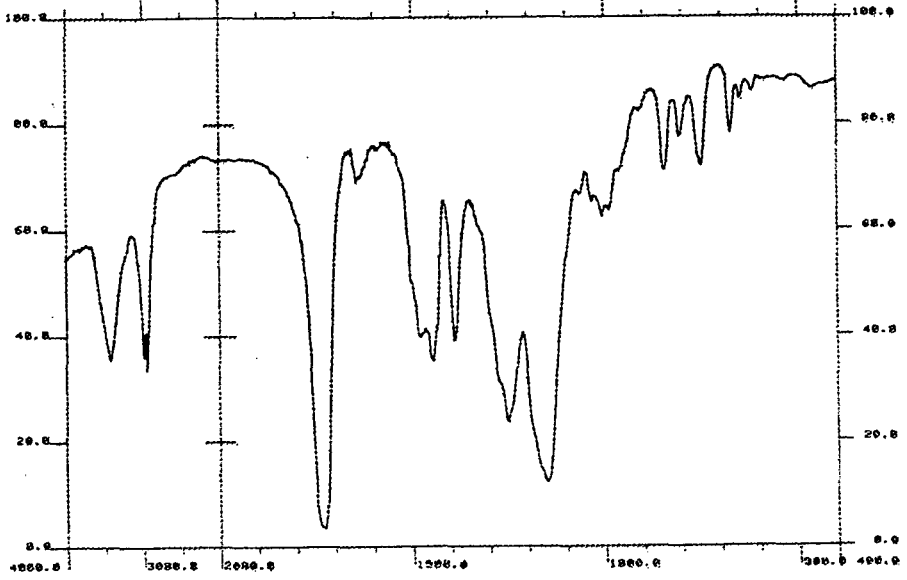


EF12

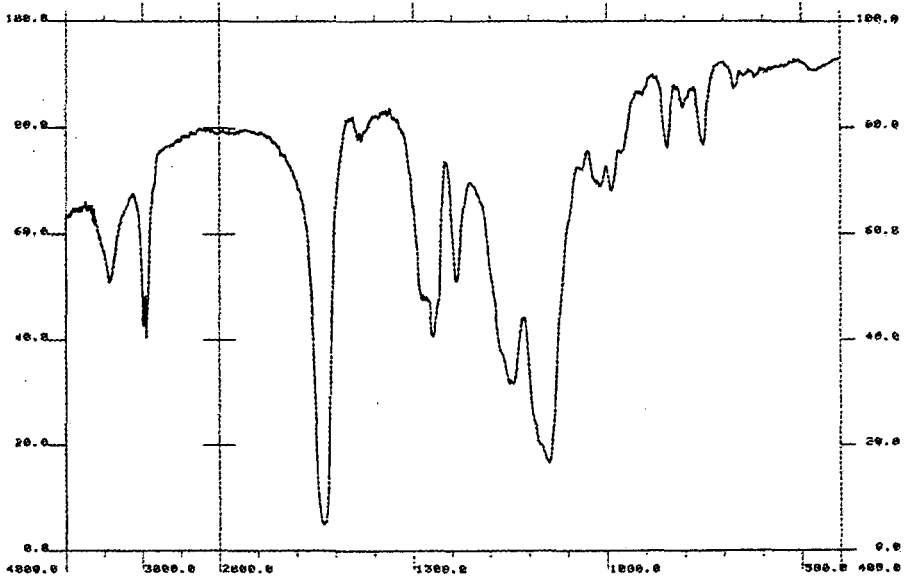
**Şekil 4.17. Etkin Maddenin Dağılımı ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Partikül Dağılım Eğrileri**

#### 4.1.2.2.3. Infrared Analizleri

Mikropartiküllerinin her hazırlama yönteminden seçilen birer formülasyonunun, Bölüm 3.2.2.3.3'de açıklandığı şekilde infrared analizleri yapılmış ve bu analizlere ait spektrumlar Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



DF7

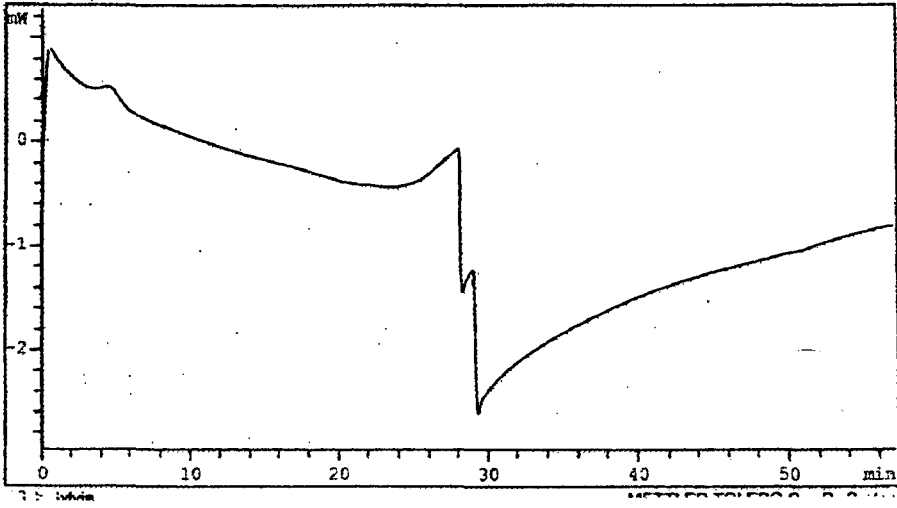


EF8

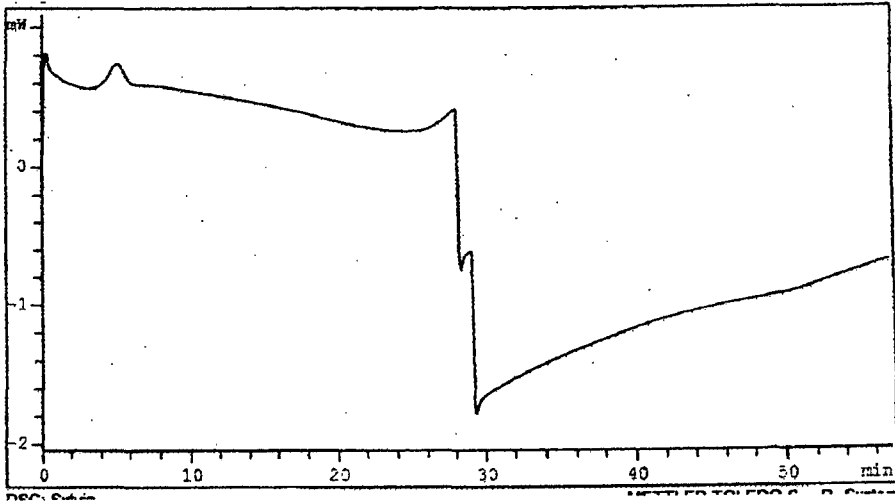
Şekil 4.18. Hazırlanan Mikropartiküllerin IR Spektrumları

#### 4.1.2.2.4. Termal Analizler

PB'ün mikropartiküllerinin Bölüm 3.2.2.3.4.'de açıklandığı şekilde termal analizleri yapılmış ve bu analizlere ait termogramlar sırası ile Şekil 4.19'de verilmiştir.



**DF7**

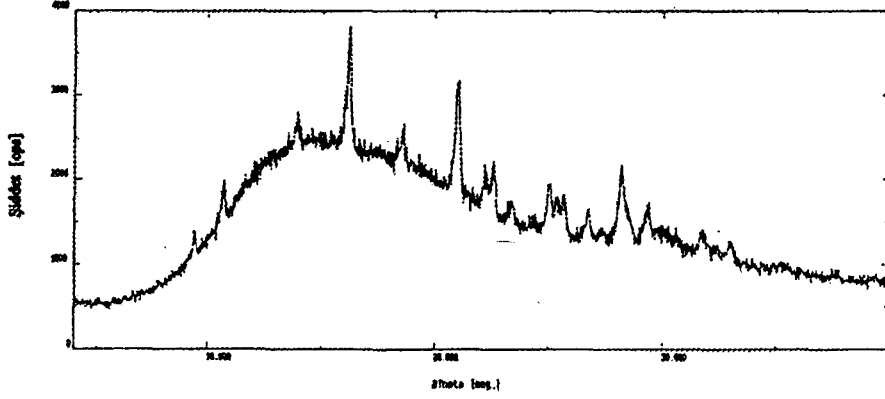


**EF8**

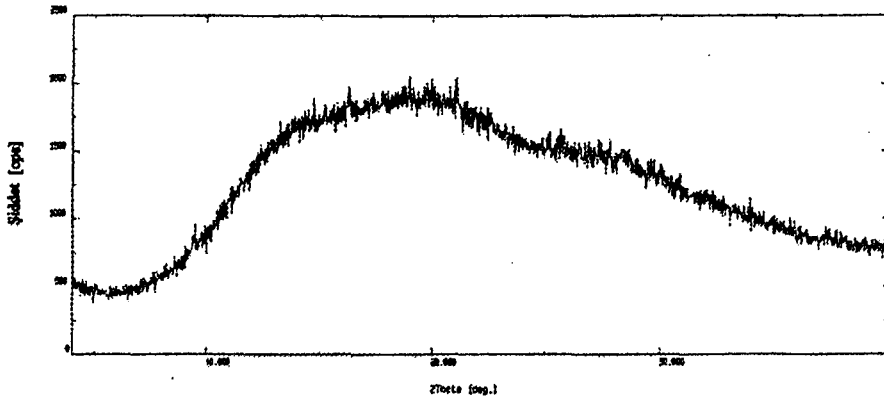
**Şekil 4.19. Hazırlanan Mikropartiküllerin DSC Termogramları**

#### 4.1.2.2.5. X-Işını Kırınım Analizi

Bölüm 3.2.1.1.8.'de anlatıldığı şekilde, biri etkin maddenin çözündürülmesi, biri etkin maddenin dağıtılması yöntemi ile hazırlanan partiküller ile yapılan iki analize ait grafikler Şekil 4.20 ve 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Partiküllerin X-Işını Kırınım Eğrisi



Şekil 4.21. Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Partiküllerin X-Işını Kırınım Eğrisi



#### 4.1.2.2.6. Hazırlama Verimi

İki tekniğin hazırlama verimleri, Bölüm 3.2.2.3.6.'da açıklandığı şekilde hesaplanmış, deney bulguları Çizelge 4.5'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Mikropartikül Hazırlama Verimleri

Formülasyon	Verim (%)
EF1	42.71
EF2	54.91
EF3	47.05
EF4	45.07
EF5	38.43
EF6	62.72
EF7	45.37
EF8	53.80
EF9	31.73
EF10	46.23
EF11	53.62
EF12	45.57
DF1	65.03
DF2	73.89
DF3	60.41
DF4	74.08
DF5	66.42
DF6	66.78
DF7	66.04
DF8	58.40
DF9	63.97
DF10	73.29
DF11	66.92
DF12	68.29

n= 3

#### 4.1.2.2.7. Mikropartiküllerde PB Miktar Tayinleri

##### 4.1.2.2.7.1. Filtre Materyalinin Adsorpsiyon Testi

Filtre materyalinin adsorpsiyon testi çalışmaları, Bölüm 3.2.2.3.6.1.'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Deney bulguları Şekil 4.22 - Şekil 4.24'de verilmiştir.

#### 4.1.2.2.7.2. Partiküllerde Yüklenen Toplam PB Miktarı

Hazırlanan mikropartiküllerde, yüklenen toplam PB miktarları, Bölüm 3.2.2.3.6.2.'de açıklandığı şekilde hesaplanmıştır. Deney bulguları, ortalamaları alınarak standart hataları ile birlikte Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7 'de verilmiştir.

#### 4.1.2.2.7.3. Partiküllerde Hapsedilen PB Miktarı

Mikropartiküllerde hapsedilen PB miktarını bulabilmek için, Bölüm 3.2.2.3.6.3.'de açıklandığı gibi çalışılmış, deney bulguları ortalama ve standart hataları ile birlikte Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7' de verilmiştir.

**Çizelge 4.6. Mikropartiküllerde Yüklenen ve Hapsedilen PB Yüzdeleri ve Standart Hataları**

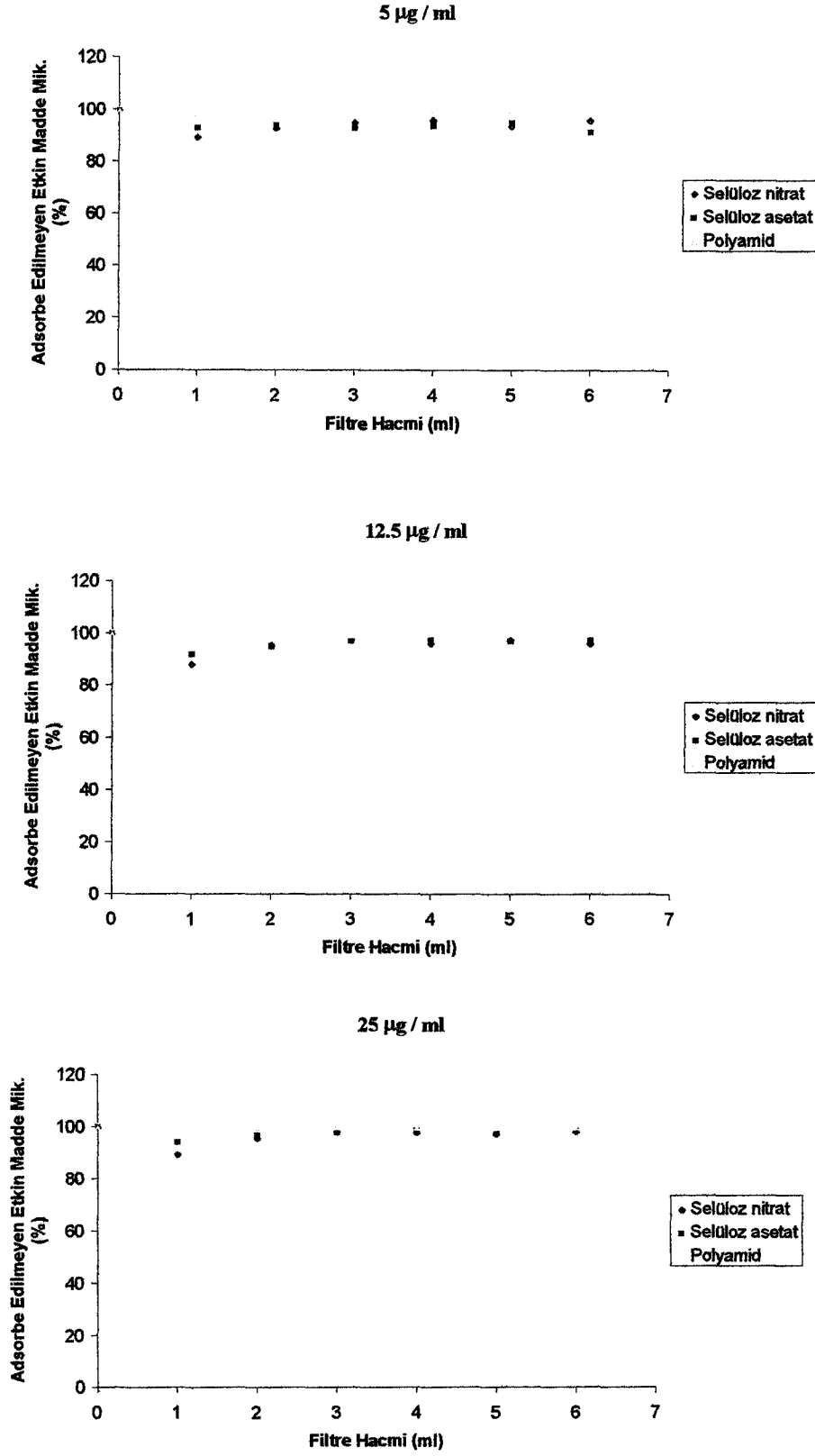
Formülasyon	Yüklenen PB (%) $\pm$ SH	Hapsedilen PB (%) $\pm$ SH
EF1	21.87 $\pm$ 0.33	0.75 $\pm$ 0.03
EF2	9.70 $\pm$ 0.36	0.39 $\pm$ 0.03
EF3	12.55 $\pm$ 0.29	0.56 $\pm$ 0.05
EF4	7.05 $\pm$ 0.13	0.42 $\pm$ 0.01
EF5	31.39 $\pm$ 0.77	3.07 $\pm$ 0.09
EF6	20.28 $\pm$ 0.63	2.86 $\pm$ 0.06
EF7	10.05 $\pm$ 0.13	2.48 $\pm$ 0.05
EF8	7.18 $\pm$ 0.44	2.25 $\pm$ 0.03
EF9	45.00 $\pm$ 0.88	3.54 $\pm$ 0.18
EF10	23.68 $\pm$ 0.95	3.14 $\pm$ 0.10
EF11	13.68 $\pm$ 0.47	2.46 $\pm$ 0.03
EF12	7.36 $\pm$ 0.24	1.32 $\pm$ 0.03
DF1	50.83 $\pm$ 0.78	1.54 $\pm$ 0.09
DF2	33.19 $\pm$ 0.60	1.81 $\pm$ 0.11
DF3	26.49 $\pm$ 0.09	3.70 $\pm$ 0.12
DF4	20.21 $\pm$ 0.08	2.51 $\pm$ 0.19
DF5	51.18 $\pm$ 0.5	3.04 $\pm$ 0.09
DF6	35.21 $\pm$ 0.74	3.39 $\pm$ 0.05
DF7	26.53 $\pm$ 0.46	5.15 $\pm$ 0.09
DF8	20.03 $\pm$ 0.25	3.26 $\pm$ 0.06
DF9	52.98 $\pm$ 2.28	6.12 $\pm$ 0.09
DF10	34.58 $\pm$ 0.58	4.19 $\pm$ 0.08
DF11	24.82 $\pm$ 0.37	1.89 $\pm$ 0.10
DF12	19.34 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.07

n=3

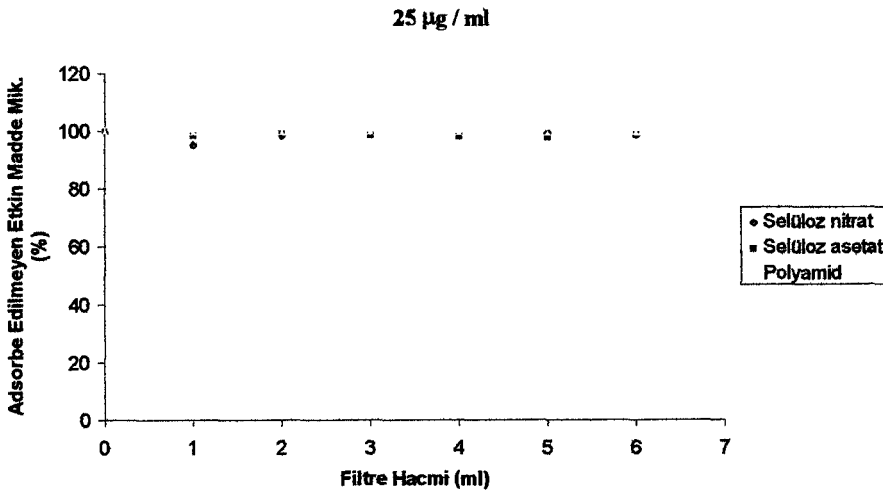
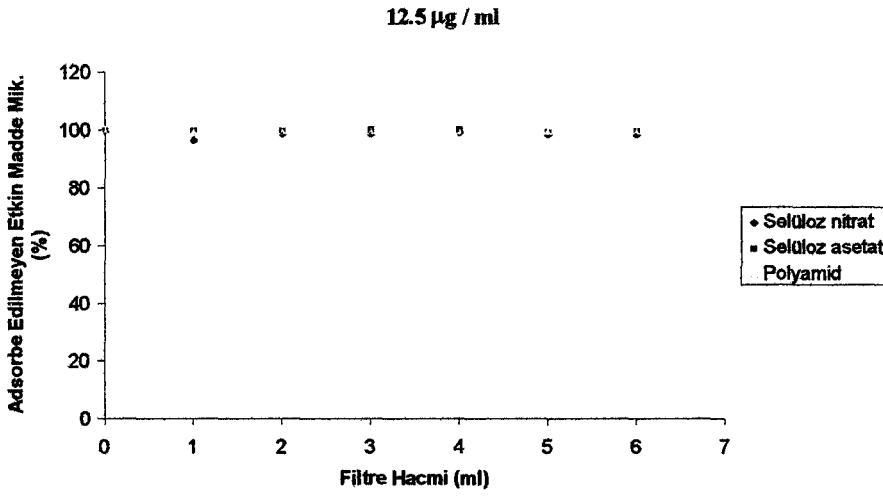
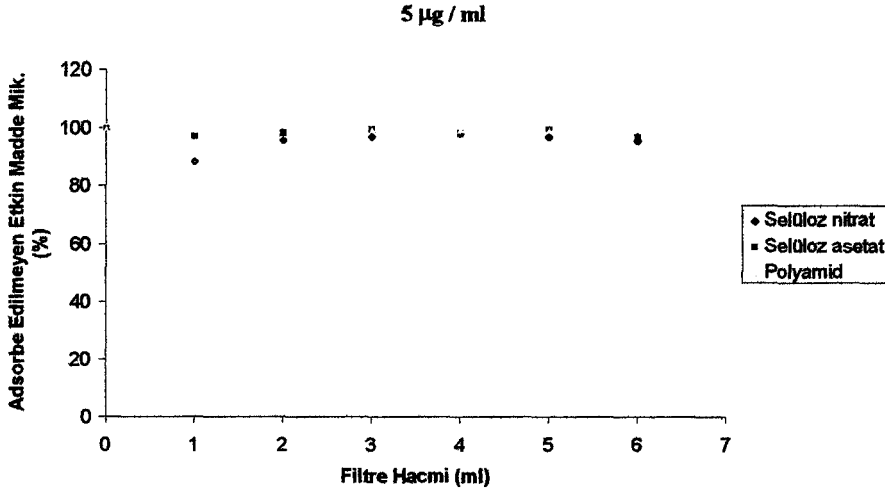
**Çizelge 4.7. Mikropartiküllerde PB Yükleme Kapasitesi ve Hapsedilme Kapasitesi Yüzdeleri ve Standart Hataları**

<b>Formülasyon</b>	<b>PB Yükleme Kapasitesi (%) ± SH</b>	<b>PB Hapsedilme Kapasitesi (%) ± SH</b>
EF1	43.75±0.68	3.42±0.14
EF2	29.10±1.09	4.02±0.37
EF3	50.20±1.16	4.51±0.36
EF4	35.25±0.62	6.04±0.20
EF5	62.78±1.55	9.79±0.30
EF6	60.84±1.89	14.11±0.30
EF7	40.20±0.50	24.70±0.44
EF8	35.92±2.23	31.32±0.46
EF9	90.01±1.77	7.87±0.39
EF10	71.04±2.83	13.28±0.44
EF11	54.72±1.87	17.96±0.22
EF12	36.81±1.22	18.03±0.42
DF1	101.67±1.56	3.04±0.17
DF2	99.58±1.79	5.44±0.35
DF3	105.98±0.36	13.98±0.46
DF4	101.05±0.39	12.44±0.93
DF5	102.36±1.00	5.94±0.18
DF6	105.62±2.23	9.63±0.14
DF7	106.12±1.85	19.41±0.32
DF8	100.17±1.28	16.30±0.30
DF9	105.97±4.56	11.55±0.17
DF10	103.75±1.74	12.11±0.24
DF11	99.30±1.49	7.61±0.41
DF12	96.70±0.56	5.09±0.40

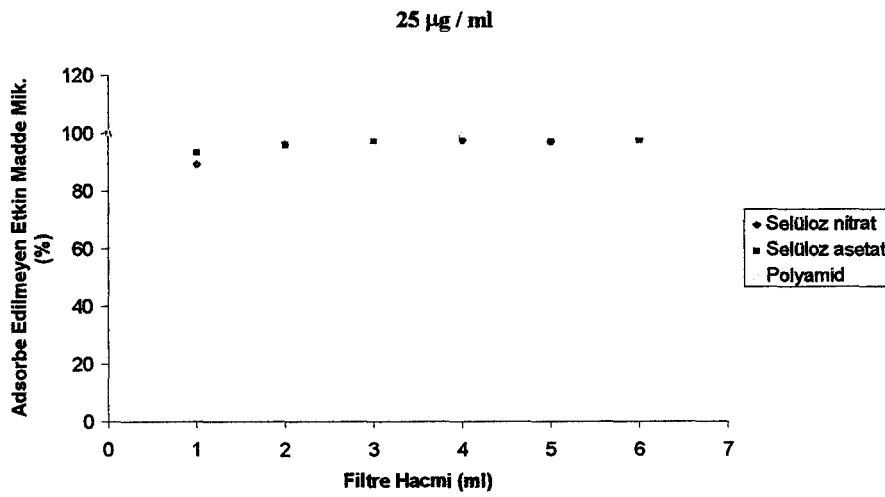
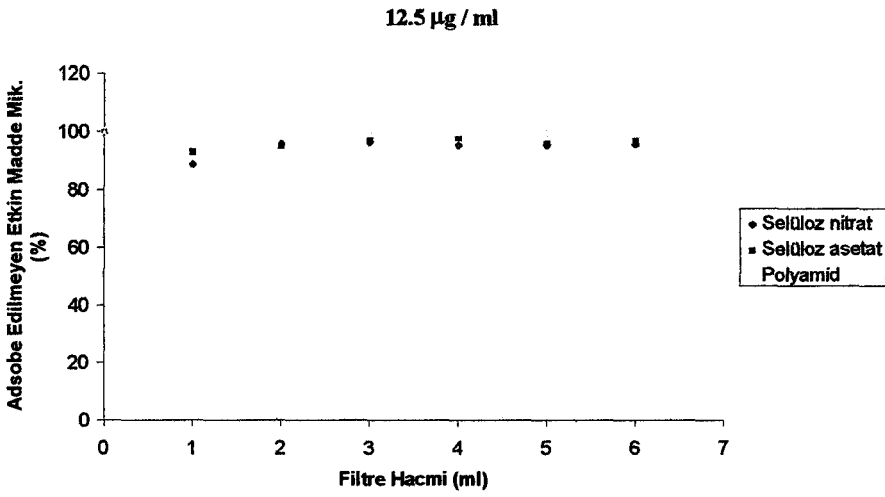
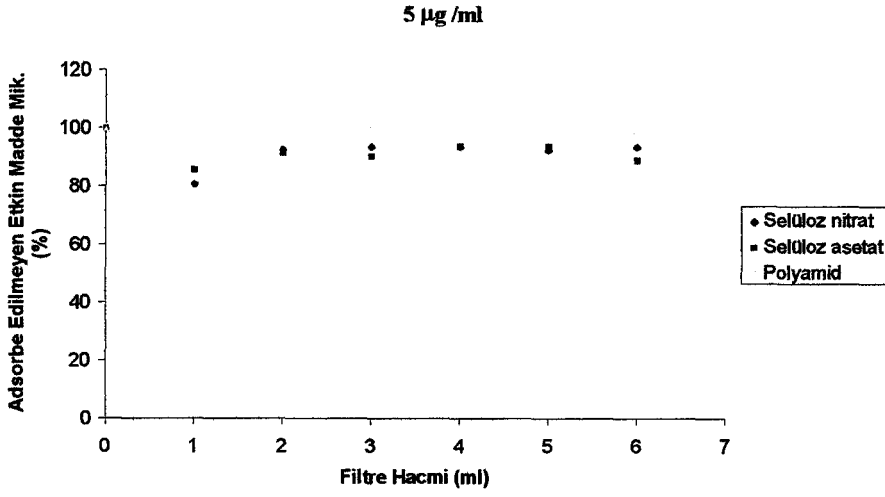
n=3



**Şekil 4.22. Filtre Materyallerinin Distile Su Ortamında Adsorbsiyon Testi Profilleri**



**Şekil 4.23. Filtre Materyallerinin pH 1.2 Ortamında Adsorbsiyon Testi Profilleri**



**Şekil 4.24. Filtre Materyallerinin pH 7.4 Ortamında Adsorbsiyon Testi Profilleri**

#### 4.1.2.3. Mikropartiküller ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmaları

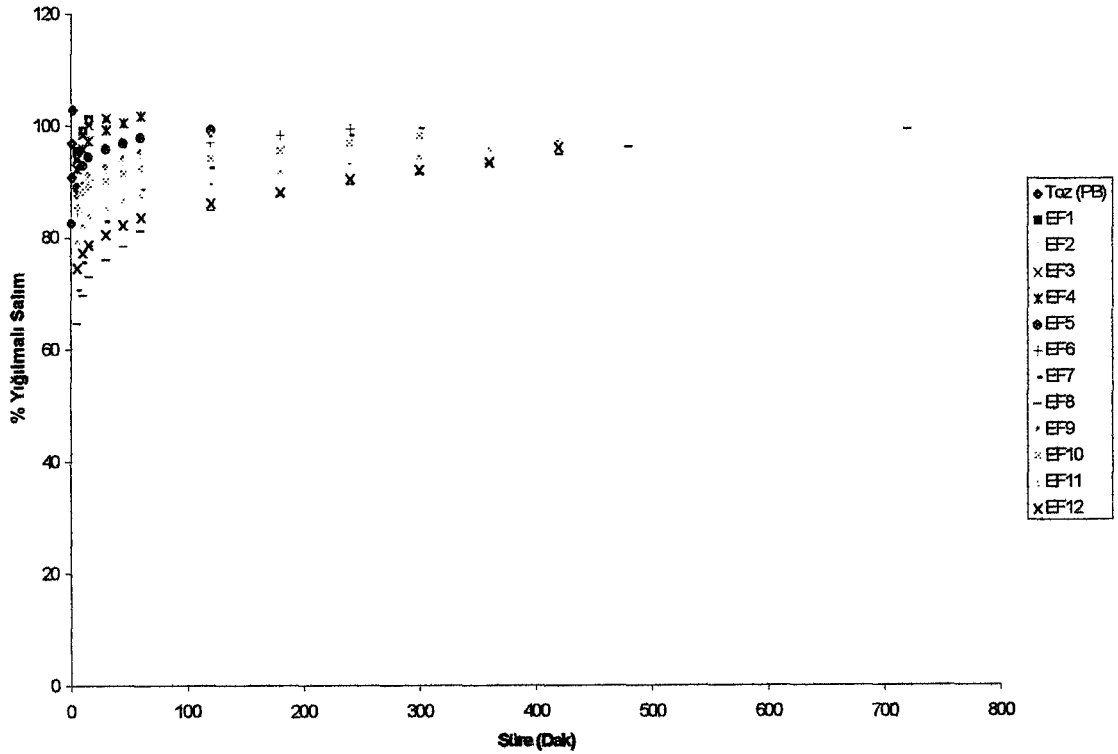
İki farklı yöntem ile hazırlanan mikropartiküllerin farklı çözünme ortamlarında (distile su, pH 1.2 ve pH 7.4), Bölüm 3.2.2.4.1'de açıklanan yöntem ile yapılan salım deneylerinin sonuçları salınan yığılmalı PB yüzdesi zamana karşı grafiğe geçirilerek, toz PB ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalara ait sonuçlar, Çizelge 4.8 - Çizelge 4.13'de, salım profilleri ise Şekil 4.25 - Şekil 4.30'da verilmiştir. Tüm bu çalışmaların sonunda, her iki yöntemden birer formülasyon (EF8, DF7), partikül irilikleri, etkin maddenin yüklenmesi ve çözünme hızı göz önüne alınarak seçilmiş ve bu iki formülasyonda daha ileri incelemeler yapılarak toz etkin madde ile karşılaştırılmıştır. Bu iki formülasyon ve saf etkin maddeye ait çözünme hızı yüzdeleri ve standart sapmaları, Çizelge 4.14'de, profilleri ise, Şekil 4.31-4.33'de gösterilmiştir.

İn vitro salım çalışmalarından elde edilen sonuçların kinetik incelemesinde, çözünme verilerinin, Hixson-Crowell (Modifiye), birinci derece, sıfır derece, Hixson-Crowell (sink), RRSBW, Q-Square root of time, Higuchi, Hopfenberg küresel, Hopfenberg silindir ve Hopfenberg slab kinetik modellerine uygulanması ile elde edilen Akaike değerleri (AIC) ve belirtme katsayıları Çizelge 4.15 'da verilmiştir. Etkin madde ile yapılan tüm in vitro salım çalışmalarında birinci dakikada % 100 salım gözleendiğinden ve tekrarlanan deneylerde bu zaman içerisinde en fazla 4 değer bulunabildiğinden, bu kadar kısa süre ve bu kadar az veri ile kinetik inceleme yapabilmemiz mümkün olmamıştır. Bu nedenle etkin maddeye uygun bir kinetik model seçilememiştir.

Akaike kriteri ve belirtme katsayılarına göre incelenen verilerden, DF7 ve EF8 kodlu formülasyonlar için en uygun kinetik modelin Modifiye Hixson-Crowell olacağına karar verilmiş ve bu kinetiğe ait eğriler Şekil 4.34-4.36 'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.8. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Distile Su Ortamında Salm Yüzdeleri**

Süre (dak)	Toz (PB)	EF1	EF2	EF3	EF4	EF5	EF6	EF7	EF8	EF9	EF10	EF11	EF12
0,25	82,88												
0,5	91,1												
0,75	97,12												
1	103,1												
5		95,56	94,56	94,22	92,54	89,22	84,88	70,89	64,89	87,56	85,56	79,78	74,78
10		99,24	99	98,66	96,06	93,1	88,58	75,75	69,96	90,08	88,48	82,71	77,49
15		101,3	101,2	100,4	97,54	94,6	90,62	78,82	73,26	91,32	89,28	84,29	78,96
30			101,8	101,5	99,46	96,06	92,54	83,1	76,21	92,68	90,42	85,54	80,77
45					100,7	97,1	94,02	86,3	78,61	94,15	91,76	87,01	82,47
60					101,9	98,12	95,38	88,8	81,43	95,4	92,68	88,15	83,84
120						99,46	97,2	92,63	85,15	98,32	94,26	90,17	86,42
180							98,56	96,37	87,78		95,72	92,32	88,36
240							99,7	98,56	89,83		97,1	94,03	90,73
300								99,82	91,76		98,34	94,96	92,34
360									93,47			96,31	93,7
420									95,17			98,11	96,5
480									96,53				
720									99,78				

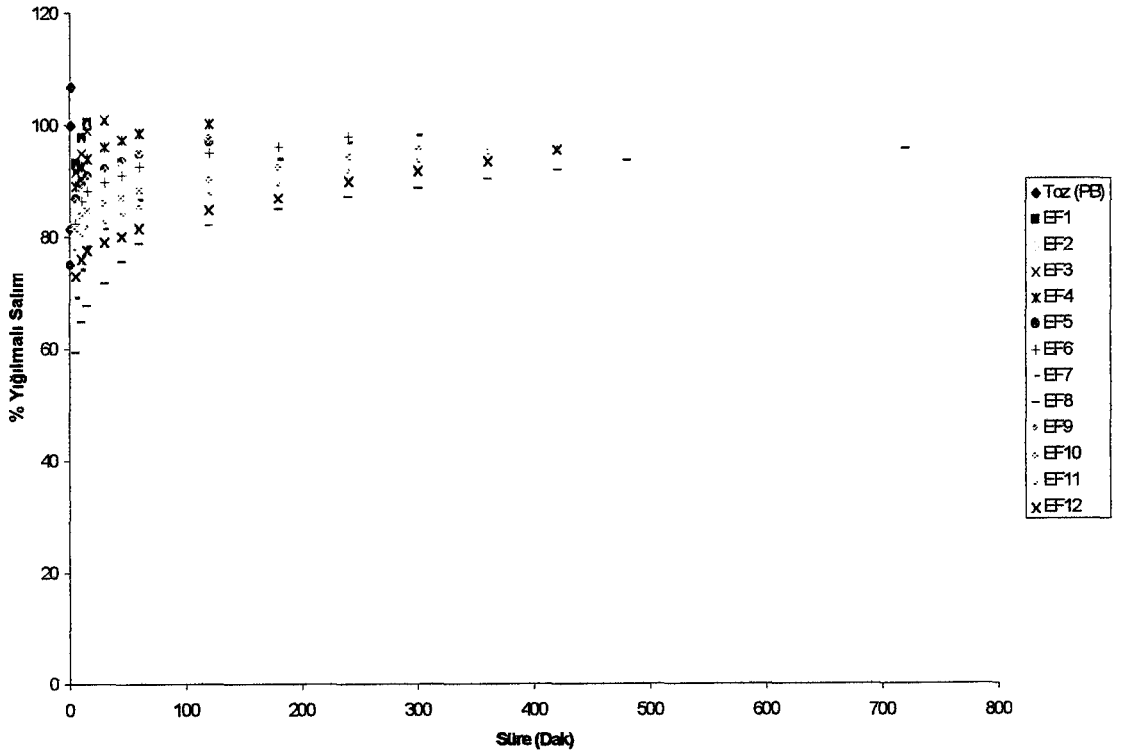


**Şekil 4.25. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Distile Su Ortamında Salm Profilleri**



**Çizelge 4.9. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 1.2 Ortamında Salım Yüzdeleri**

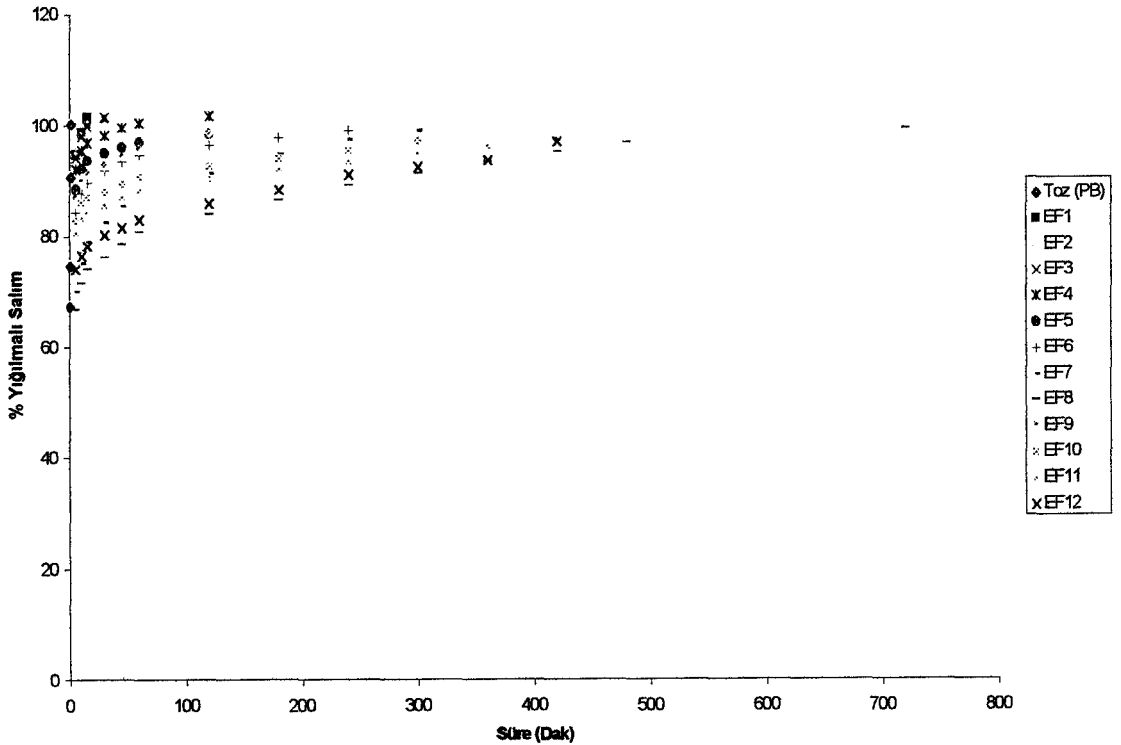
Süre (dak)	Toz (PB)	EF1	EF2	EF3	EF4	EF5	EF6	EF7	EF8	EF9	EF10	EF11	EF12
0,25	75,38												
0,5	81,68												
0,75	100,2												
1	107,0												
5		93,34	92,44	91,88	89,32	87,1	82,54	69,33	59,56	86,44	81,56	78,44	73,22
10		97,96	97,28	95,16	92,78	90,06	86,64	74,39	64,97	89,17	84,18	81,01	76,24
15		100,7	100,2	99,18	94,14	91,1	88,46	78,46	67,83	90,75	85,1	82,26	77,83
30			100,7	101,2	96,28	92,34	90,06	81,65	71,99	92,11	86,34	83,28	79,3
45					97,56	93,7	91,32	84,27	75,86	93,58	87,36	84,74	80,33
60					98,8	95,16	92,78	86,88	79,04	95,39	88,5	85,99	81,8
120					100,5	97,42	95,18	90,59	82,33	97,87	90,62	88,46	85,05
180							96,4	94,11	85,28		92,54	90,18	87,22
240							98,22	97,07	87,45		94,48	92,21	90,27
300								98,46	89,05		96,18	94,25	92,1
360									90,75			95,74	93,81
420									92,33			96,99	95,95
480									94,03				
720									96,22				



**Şekil 4.26. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 1.2 Ortamında Salım Profilleri**

**Çizelge 4.10. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 7.4 Ortamında Salım Yüzdeleri**

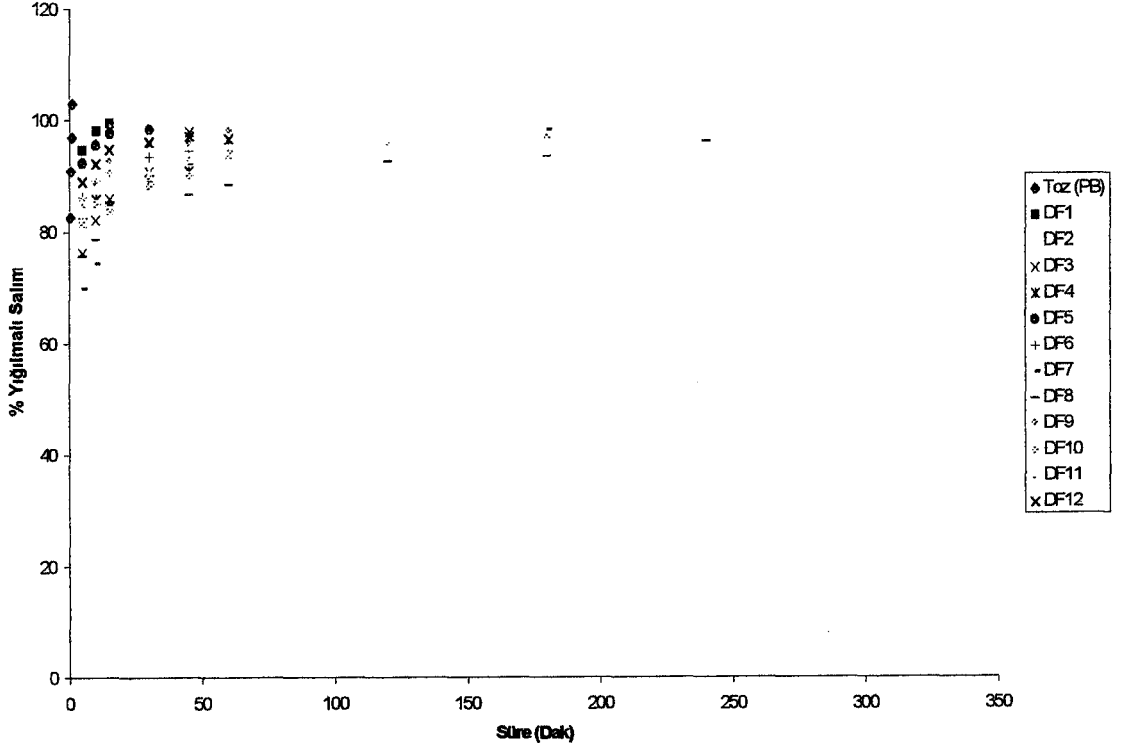
Süre (dak)	Toz (PB)	EF1	EF2	EF3	EF4	EF5	EF6	EF7	EF8	EF9	EF10	EF11	EF12
0,25	67,52												
0,5	74,86												
0,75	90,98												
1	100,5												
5		95	95,44	94,44	92,32	88,76	84,54	70,22	67	87,22	83	81,11	74,22
10		99,02	98,68	98,22	95,72	92,54	88,02	75,4	71,78	90,19	86,22	83,51	76,71
15		101,8	100,7	100,1	97,1	93,92	89,94	79,26	74,3	91,66	87,12	84,86	78,5
30			101,6	101,7	98,44	95,28	92,08	82,78	76,46	93,02	88,26	86,11	80,54
45					99,82	96,3	93,7	85,74	78,83	94,71	89,72	87,58	81,8
60					100,7	97,22	94,94	88,24	81,1	95,97	90,86	88,83	83,27
120					101,9	98,68	96,64	91,62	84,26	98,99	92,68	90,85	86,19
180							98	95,13	86,88		94,26	92,67	88,69
240							99,36	97,76	89,59		95,84	93,93	91,41
300								99,36	91,65		97,54	95,59	92,79
360									93,8			96,76	94,04
420									95,62			98,34	97,4
480									97,32				
720									99,8				



**Şekil 4.27. Toz PB ile Etkin Maddenin Dağıtılması ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 7.4 Ortamında Salım Profilleri**

**Çizelge 4.11. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Distile Su Ortamında Salm Yüzdeleri**

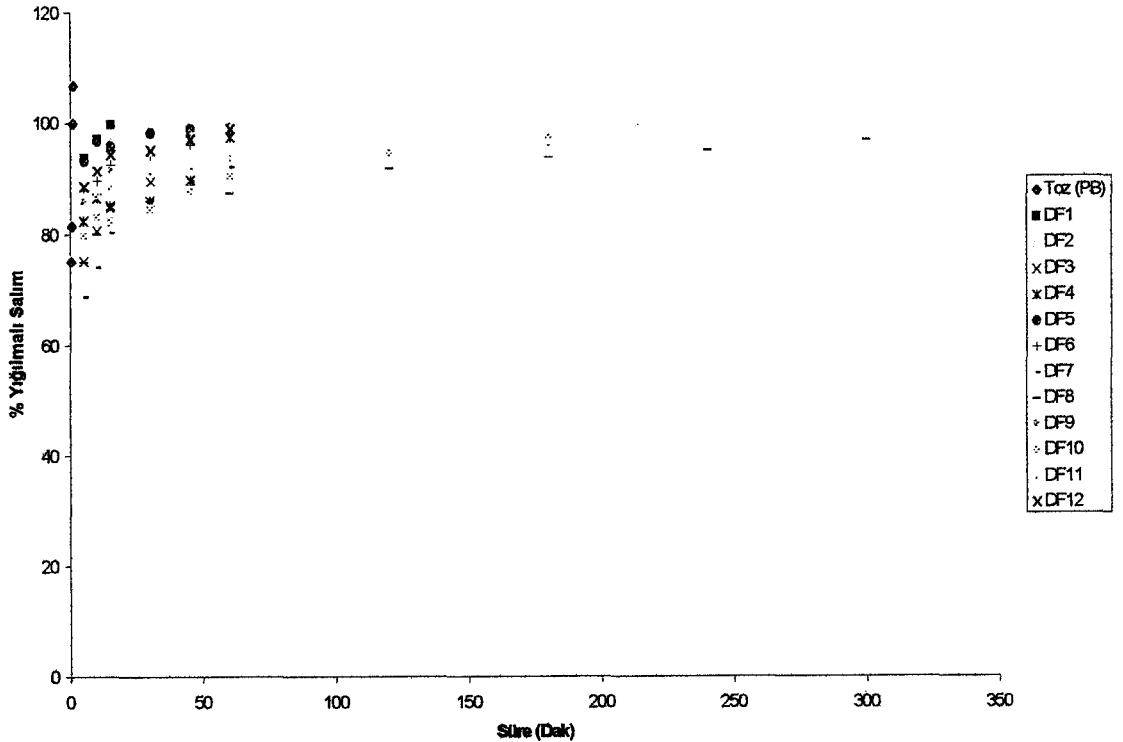
Süre (dak)	Toz (PB)	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5	DF6	DF7	DF8	DF9	DF10	DF11	DF12
0,25	82,88												
0,5	91,1												
0,75	97,12												
1	103,1												
5		94,89	93,22	76,56	81,89	92,56	86,44	70,12	75,89	85,78	81,67	85,33	89,22
10		98,34	96,09	82,42	86,08	95,74	89,4	74,62	78,85	88,72	85,19	89,71	92,45
15		99,71	99	86,17	84,91	97,88	90,98	83,36	84,77	92,74	84	91,54	94,92
30				91,02	89,66	98,59	93,67	89,18	88,11	95,59	88,42	90,46	96,31
45				98,19	91,2		94,73	92,52	86,95	95,99	90,29	93,44	97,33
60					96,9		98,08	94,7	88,7	98,33	93,77	94,94	
120								96,86	92,96		96,4	96,53	
180								98,68	93,94		97,45		
240									96,62				
300													



**Şekil 4.28. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Distile Su Ortamında Salm Profilleri**

**Çizelge 4.12. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 1.2 Ortamında Salım Yüzdeleri**

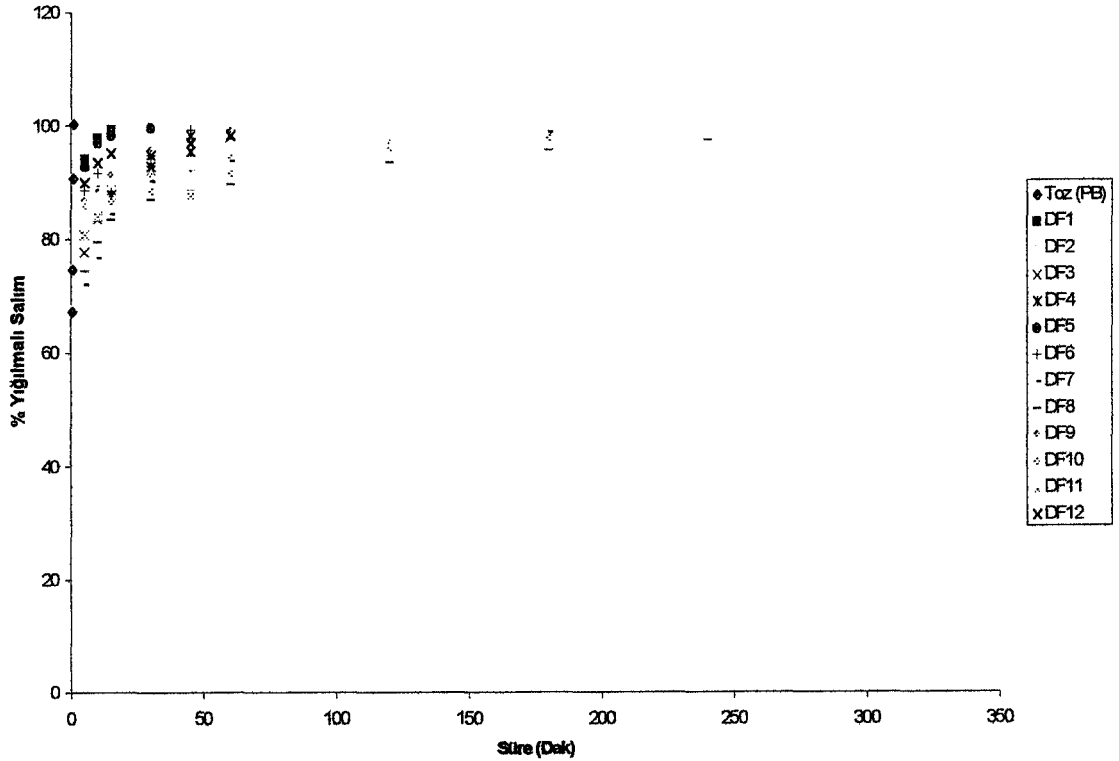
Süre (dak)	Toz (PB)	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5	DF6	DF7	DF8	DF9	DF10	DF11	DF12
0,25	75,38												
0,5	81,68												
0,75	100,2												
1	107,0												
5		94	93	75,44	82,67	93,44	88,11	69	75,22	85,67	79,89	86,78	88,78
10		97,44	95,97	80,95	86,76	97,09	89,87	74,38	80,28	88,05	83,49	87,62	91,66
15		100,0	98,1	85,03	85,36	96,13	92,76	80,56	83,13	91,73	82,3	88,94	94,58
30			99,59	89,78	86,23	98,44	94,49	86,46	86,2	95,24	84,84	91,63	95,41
45				98,76	90,02	99,26	96,41	89,82	88,91	98,2	88,11	92,58	97,43
60					97,76		98,44	92,32	87,63	99,59	90,62	94,26	99,24
120								95,26	92,16		94,78	95,85	
180								98,54	94,14		97,86	96,88	
240									95,51				
300									97,32				



**Şekil 4.29. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartiküllerin pH 1.2 Ortamında Salım Profilleri**

**Çizelge 4.13. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartikülerin pH 7.4 Ortamında Salım Yüzdeleri**

Süre (dak)	Toz (PB)	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5	DF6	DF7	DF8	DF9	DF10	DF11	DF12
0,25	67,52												
0,5	74,86												
0,75	90,98												
1	100,5												
5		94,33	93,22	77,89	81	93	88,78	72,22	74,56	86,89	81	86,22	90,11
10		97,99	97,09	83,78	84,29	97,19	91,89	76,88	79,71	88,63	84,29	89,95	93,7
15		99,48	99,02	88,87	87,99	98,46	91,14	84,62	83,68	91,4	86,76	89,76	95,39
30				92,41	93,06	99,82	95,01	90,44	87,19	95,79	88,59	91,76	95,09
45				98,48	95,71		99,42	92,32	88,6	97,21	87,85	92,8	97,2
60					98,66			94,04	89,85	99,24	91,61	95,26	98,46
120								96,4	93,87		96,46	97,65	
180								99,22	96,06		98,12		
240									97,88				
300													

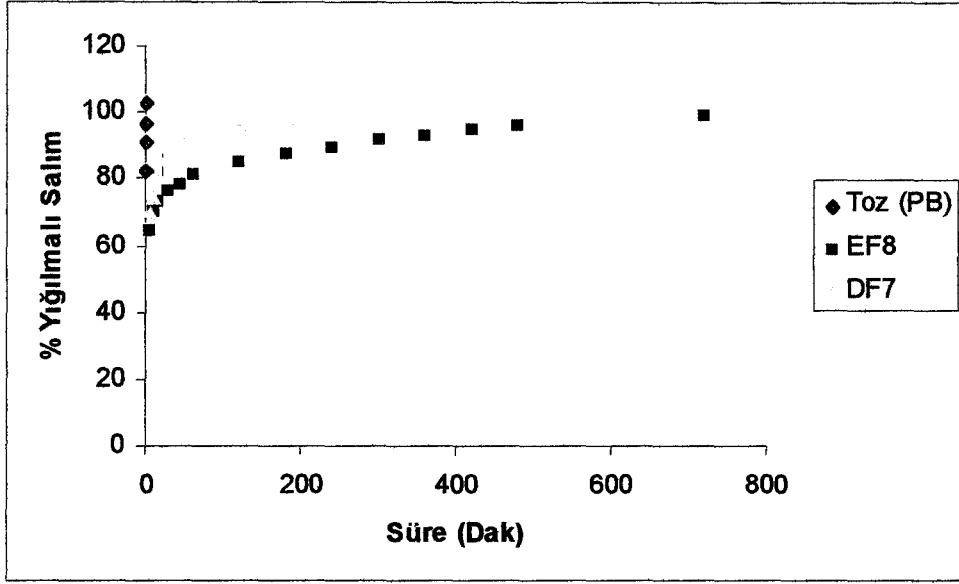


**Şekil 4.30. Toz PB ile Etkin Maddenin Çözündürülmesi ile Hazırlanan Mikropartikülerin pH 7.4 Ortamında Salım Profilleri**

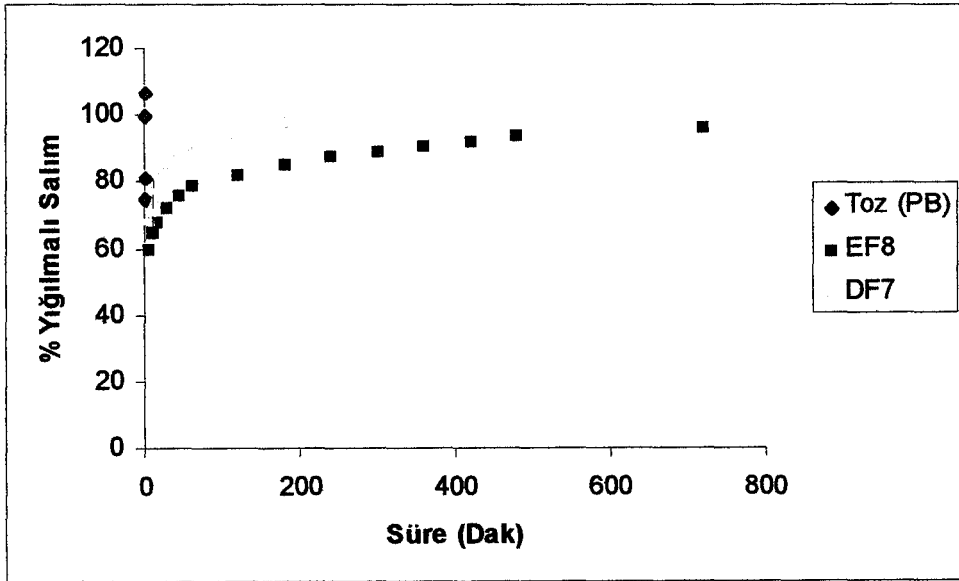
Çizelge 4.14. Toz PB, EF8 ve DF7 Kodlu Formülasyonların, Distile Su, pH 1.2 ve pH 7.4 Ortamlarındaki Salım Yüzdeleri ve Standart Sapmaları

Süre (dak)	Distile Su						pH 1.2						pH 7.4					
	Toz (PB)	SD (±)	EF8	SD (±)	DF7	SD (±)	Toz (PB)	SD (±)	EF8	SD (±)	DF7	SD (±)	Toz (PB)	SD (±)	EF8	SD (±)	DF7	SD (±)
0,25	82,88	1,03					75,38	3,74					67,52	2,03				
0,5	91,1	2,42					81,68	1,33					74,86	1,79				
0,75	97,12	1,59					100,16	3,41					90,98	2,35				
1	103,12	1,68					107,02	5,81					100,48	2,09				
5			64,89	1,45	70,12	2,76			59,56	0,84	69	2,3			67	1,01	72,22	2,25
10			69,96	1,05	74,62	2,69			64,97	0,81	74,38	0,99			71,78	1,39	76,88	1,23
15			73,26	0,9	83,36	4,31			67,83	0,87	80,56	2,37			74,3	1,58	84,62	1,78
30			76,21	0,92	89,18	3,5			71,99	1,07	86,46	2,53			76,46	0,81	90,44	1,07
45			78,61	0,92	92,52	2,75			75,86	1,23	89,82	1,36			78,83	1,21	92,32	1,68
60			81,43	1,36	94,7	1,76			79,04	1,15	92,32	1,08			81,1	1,51	94,04	1,02
120			85,15	1,35	96,86	1,52			82,33	1,19	95,26	1,09			84,26	0,85	96,4	1,07
180			87,78	0,85	98,68	0,85			85,28	1,23	98,54	0,91			86,88	1,2	99,22	0,9
240			89,83	1,32					87,45	0,99					89,59	1,27		
300			91,76	0,6					89,05	1,3					91,65	0,99		
360			93,47	0,98					90,75	0,81					93,8	1,42		
420			95,17	0,76					92,33	0,5					95,62	1,31		
480			96,53	0,78					94,03	0,73					97,32	0,53		
720			99,78	1,03					96,22	0,76					99,8	1,07		

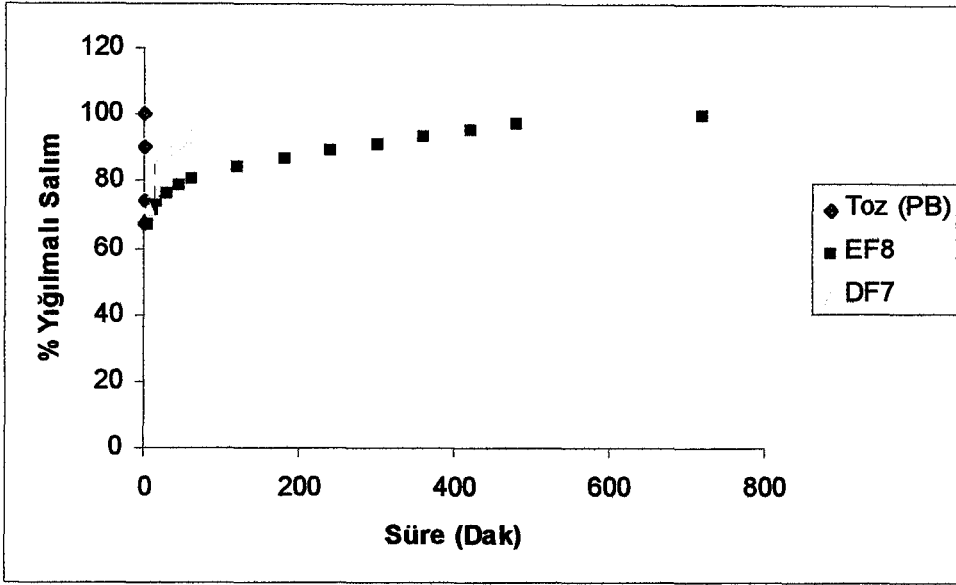
n = 6



**Şekil 4.31. Toz PB, EF8 ve DF7 Kodlu Formülasyonların Distile Su Ortamında Salım Profilleri**



**Şekil 4.32. Toz PB, EF8 ve DF7 Kodlu Formülasyonların pH 1.2 Ortamında Salım Profilleri**



**Şekil 4.33. Toz PB, EF8 ve DF7 Kodlu Formülasyonların pH 7.4 Ortamında Salm Profilleri**

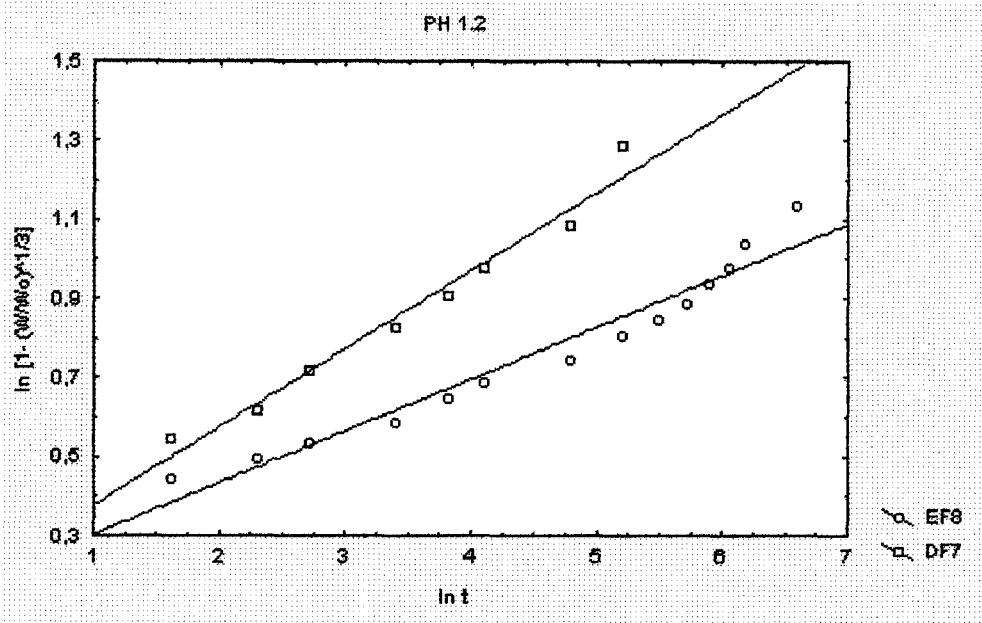
**Çizelge 4.15. Mikropartiküllerin Çözünme Hızı Kinetiklerinin Matematiksel Modellere Uyumu Çalışmalarının Bulguları**

ORTAM		Distile Su		pH 1.2		pH 7.4	
EŞİTLİK/KOD		EF8	DF7	EF8	DF7	EF8	DF7
Hixson-Crowell (Modifiye)	AIC	-71.013	-48.062	-89.469	-58.574	-63.499	-50.201
	r <sup>2</sup>	0.937	0.982	0.990	0.992	0.910	0.981
Birinci Derece	AIC	14.215	6.234	17.450	5.640	14.262	6.027
	r <sup>2</sup>	0.921	0.923	0.955	0.960	0.930	0.947
Sıfır Derece	AIC	24.049	11.947	23.140	11.639	-	12.222
	r <sup>2</sup>	0.803	0.613	0.759	0.702	0.842	0.635
Hixon-Crowell (Sink)	AIC	15.201	4.919	14.401	4.679	-	5.213
	r <sup>2</sup>	0.937	0.826	0.901	0.898	-	0.872
RRSBW	AIC	-59.697	-49.642	-79.110	-53.046	-54.217	-50.473
	r <sup>2</sup>	0.857	0.989	0.977	0.981	0.827	0.971
Q-Square Root of Time	AIC	9.931	1.577	8.096	1.045	10.263	2.006
	r <sup>2</sup>	0.944	0.789	0.918	0.861	0.965	0.803
Higuchi	AIC	-	-	-	-	-	-
	r <sup>2</sup>	0.969	0.804	0.911	0.887	0.980	0.844
Hopfenberg Küresel	AIC	21.918	10.510	22.560	10.067	21.984	10.681
	r <sup>2</sup>	0.973	0.826	0.901	0.898	0.986	0.872
Hopfenberg Silindir	AIC	25.102	12.150	24.810	11.679	25.216	12.402
	r <sup>2</sup>	0.947	0.771	0.868	0.853	0.966	0.814
Hopfenberg Slab	AIC	31.002	15.058	29.562	14.619	31.184	15.316
	r <sup>2</sup>	0.803	0.613	0.759	0.702	0.842	0.635

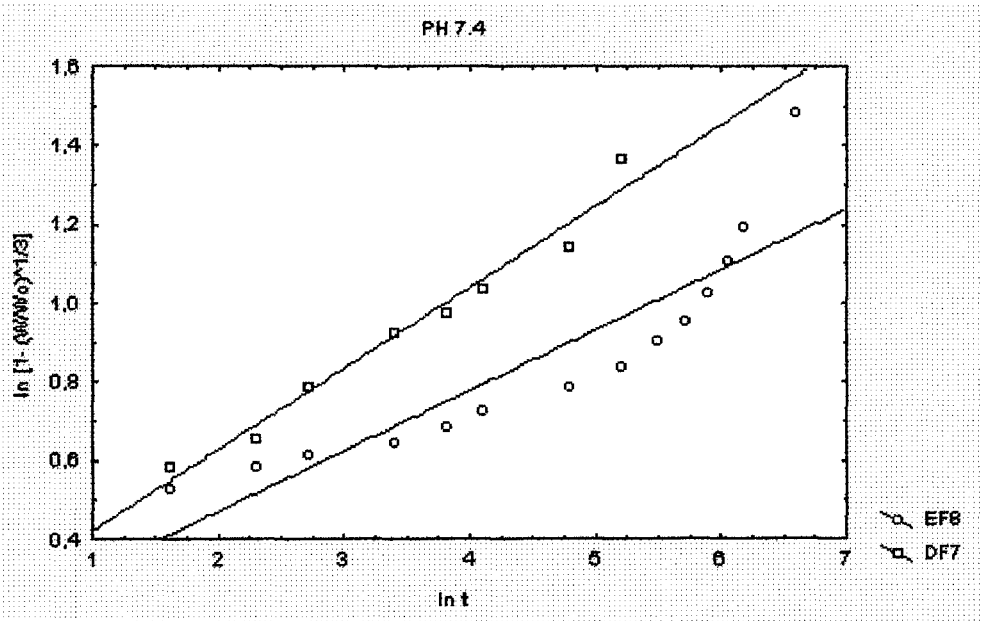
AIC = Akaike Değeri

r<sup>2</sup> = Belirtme Katsayısı

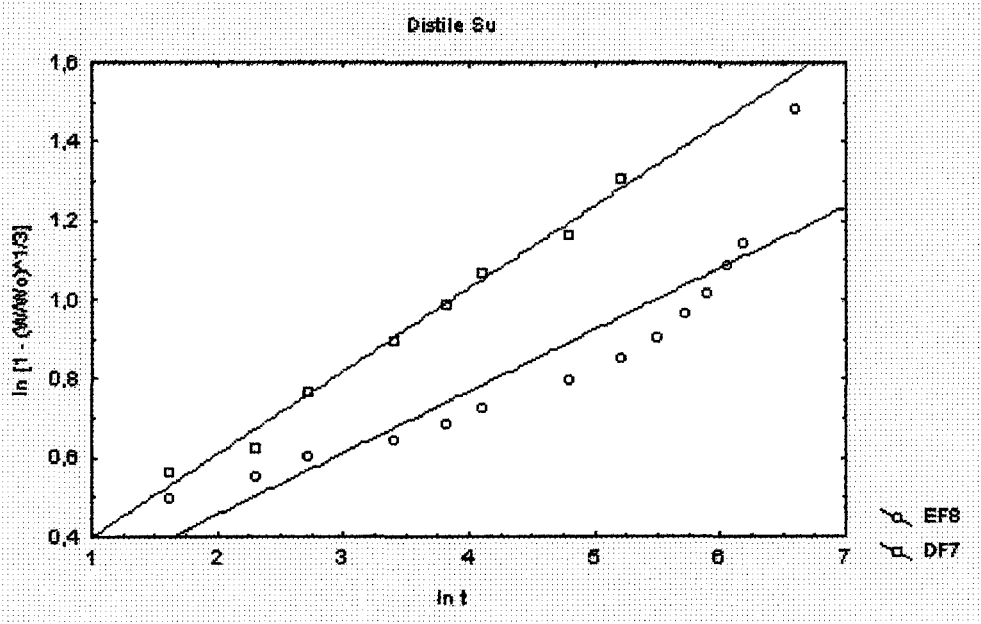




**Şekil 4.34. pH 1.2 Salm Ortamındaki Hixson-Crowell Kinetiğine Ait Eğri**



**Şekil 4.35. pH 7.4 Salm Ortamındaki Hixson-Crowell Kinetiğine Ait Eğri**



**Şekil 4.36. Distile Su Salm Ortamındaki Hixson-Crowell Kinetiğine Ait Eğri**

## 4.2. TARTIŞMA

Bu bölümde, formülasyonlarda kullanılan etkin ve yardımcı maddenin fizikokimyasal özelliklerine ait bulgular ile mikropartiküller üzerinde gerçekleştirilen in vitro çalışmalara ait bulgular tartışılacaktır.

### 4.2.1. Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinler

#### 4.2.1.1. Piridostigmin Bromür

PB'ün spektrumları incelendiğinde, UV-spektrumunda 269-270 nm'lerde maksimum absorpsiyon piki, IR- spektrumunda ise kimyasal yapısına bağlı olarak karakteristik pikler (Şekil 4.2) gözlenmiştir. Erime derecesi tayin cihazı ve diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılan analizlerde, PB'ün erime derecesi 154.2 °C (Şekil 4.3) olarak saptanmıştır. Bu bulgular literatür ile uyumludur (15,16,166).

PB'ün miktar tayininde kullandığımız UV-spektrofotometrik yöntem için yapılan validasyon çalışmalarında, incelenen dört ortam (distile su, SF, pH 1.2 ve pH 7.4) için yöntemin doğrusallığının yüksek olduğu 0.999 değerindeki korelasyon katsayıları ile tespit edilmiştir. UV-spektrofotometrik yöntemin tekrarlanabilirlik ve kesinlik değerleri genel olarak %15'ten küçük olduğu için literatüre uygun bulunmuştur (167). Validasyon hakkında yazılmış kitaplara ve validasyonla ilgili literatürlere bakıldığında tekrarlanabilirlik ve kesinlik değerleri için sınır % 15 (167), hatta bazı literatürlerde % 20 olarak verilmiştir (168,169). Bu değerler gözününe alındığında, tekrarlanabilirlik ve kesinlik sonuçlarımızdaki en yüksek değer [15 µg/ml konsantrasyonda distile sudaki kesinlik değeri (0.9886)] bile % 1'in altında olması, kullandığımız yöntemin bu konsantrasyonlarda (15, 30, 45 µg/ml) son derece güvenilir olduğunu kanıtlanmıştır. Ayrıca tüm çalışma boyunca yaptığımız ölçümlerin bu konsantrasyon aralığında olmasına azami özen gösterilerek bu konsantrasyonlar dışındaki değerlerde yapılacak ölçümlerden gelebilecek hatalar da önlenmeye çalışılmıştır. Mikropartikül hazırlamada kullandığımız her iki yöntemin uygulanabilirlik araştırmalarında ise, her iki yöntem ile de etkin maddesiz formülasyonlar hazırlanmış ve bu formülasyonların kullanılan ortam ve dalga boyunda davranışları incelenmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar,

etkin maddeli çalışmaların sonuçlarına göre anlamlı olarak farklı bulunmadığı için yeterli uygulanabilirlikte olduğu düşünülmüştür. Ayrıca hazırladığımız formülasyonlar ile yaptığımız tüm miktar tayinlerinde ve dissolüsyon çalışmalarında, deneysel olarak elde ettiğimiz etkin madde miktarları, teorik olarak hesapladığımız miktarları, tüm çalışma boyunca, destekler nitelikte olduğu için, polimer veya formülasyonda kullanılan diğer maddelerden kaynaklanan bir girişim düşünülmemiştir.

PB'ün çözünürlük oranının saptanması için gerçekleştirilen çalışmalarda, çözünürlüğün pH ile anlamlı bir şekilde değişmediği görülmüştür (Çizelge 4.2). Kuvvetli asit ortamda (pH 1.2), PB çözünürlüğü  $1156.97 \text{ mg.mL}^{-1}$  iken, nötr (pH 7.4 ve distile su) ve nötr'e yakın (SF) ortamlarda sırasıyla  $1220.96$ ,  $1262.96$  ve  $1201.91 \text{ mg.mL}^{-1}$  bulunmuştur. Bu yüksek çözünürlük değerleri literatürler ile uyumludur (11,13).

PB'ün partikül boyut analizinde, partiküllerin %100'ünün,  $2187.8 \mu\text{m}$ 'in altında, ve partiküllerin ortalama irilik çapının  $83.842 \mu\text{m}$  olduğu görülmüştür. Dolayısıyla mikropartikül hazırlanması sonucu, etkin maddenin partikül boyutunun da küçültülmesi olanağının doğacağı beklenebilir. PB'ün X- ışını kırınım analizlerinin incelenmesinde,  $2\theta$  değerlerine karşılık gelen şiddetli pikler gayet net görülmüştür (Şekil 4.6). X-ışınlarının şiddetleri toz numunesinin özelliklerine göre değişmektedir. Yapısı kristalin olan, yani düzenli atom dizimlerinden meydana gelen örneklerde, belli açılarda şiddetli pikler görülür. Buna karşılık, amorf yapılar ve sıvılarda, statik toplanmadan kaynaklanan geniş bir kırınım aralığı, gaz yapılarda ise tamamen azalan şiddet değerleri görülmektedir (170).

#### 4.2.1.2. Eudragit® RS

Eudragit® RS'in fizikokimyasal özellikleri, erime derecesi tayini, termal ve reolojik analiz çalışmaları ile incelenmiştir. Eudragit® RS'in erime derecesi,  $145^\circ\text{C}$  olarak bulunmuştur. Bu değer, firma spesifikasyonu ile uyumludur (9). Eudragit® RS'in reolojik analizinde, Newtonian akışa yakın bir akış gösterdiği saptanmıştır. Artan kayma hızı ile kayma gerilimindeki artışın doğrusallık gösterdiği bu tip akış, Eudragit® RS'in içinde çözünen bir madde varlığında ideal

çözelti verebileceğini göstermesi bakımından anlam taşımaktadır. Eudragit® RS'in X- ışını kırınım analizlerinin incelenmesinde, 2  $\phi$  değerlerine karşılık gelen hiç bir pik görülmemiştir (Şekil 4.9).

## 4.2.2. Mikropartiküller ile Yapılan Çalışmalar

### 4.2.2.1. Formülasyonları

Araştırmamızda, kolinerjik özellikte olan PB'ün salımının modifiye edilebilmesi için, farklı pH değerlerine bağımlı olmayan bir akrilik polimer olan Eudragit® RS'nin kullanılmasına karar verilmiştir. Eudragit®RS, kontrollü-salım gösteren oral farmasötik preparatların hazırlanmasında kullanılmaktadır (3).

Çalışmamızda, Eudragit®RS kullanarak mikropartikül hazırlamak amacı ile, uygulanabilecek yöntemler arasından, önce emülsiyondan çözücü uçurulması ve çözücü buharlaştırma yöntemleri denenmiştir. Ön denemelerde, su-içinde-yağ-içinde-su (s/y/s) emülsiyon tekniğinde, organik çözücü olarak etilasetat, stabilizatör olarak ise Tween 80 kullanılmıştır. Ön denemeler sırasında, etkin madde-polimer oranı, organik çözücü miktarı gibi parametreleri değiştirerek, etkin madde ile yüklenmiş mikropartiküller elde etmeye çalışılmıştır. Ancak, bu yöntemle elde edilen ürünlerde etkin maddenin yüklenmemiş olduğu görülmüştür. Çalışmamızda bu yöntemin başarısız olmasının nedeni, kullandığımız etkin maddenin yüksek hidrofilik özelliğinden olabilir. Etkin madde hidrofilik yapıda ise, çözücü uçurulması yöntemi ile mikroküre içine hapsedilme yüzdesinin düşük olduğu bildirilmiştir (46).

Kullandığımız etkin madde ve polimerin özellikleri açısından (etkin maddenin erime derecesinin yüksekliği, etkin madde ve polimerin, kullanılan çözücülerde çözünürlüğü gibi özellikler), püskürterek kurutma yönteminin çalışmamızda kullanılmasının uygun olabileceği düşünülmüştür. Püskürterek kurutma yöntemi, mikropartiküllerin hazırlanmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (2,3,99). Çalışmamızda, hazırlama yönteminde kullanılan çözücünün, partikül karakteristiklerine etkisini incelemek amacıyla, aynı formülasyonlar, aynı yöntemle, değişik çözücüler kullanarak hazırlanmıştır. Organik çözücüyü değiştirerek süspansiyon (polimerik çözeltide etkin madde dağıtılarak) ve çözelti (polimerik çözeltide etkin madde çözündürülerek)

oluşturduktan sonra püskürterek kurutucuya besleme yapılma arasında bir karşılaştırma yapılmıştır. Püskürterek kurutma yönteminde bazı teknolojik parametrelere dikkat edilmesi gerekmektedir: organik çözücüdeki polimer ve etkin madde konsantrasyonu, giriş ve çıkış hava sıcaklıkları, besleme sırasındaki püskürtme oranı, havanın akış hızı, sıcaklık ve hava boşalması (2). Bunların yanısıra, organik çözücü, hazırlanan mikropartiküllerin özelliklerine anlamlı bir şekilde etki etmektedir (116). Etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan formülasyonlarda kullanılan çözücü diklormetan, etkin madde dağıtılması ile hazırlanan formülasyonlarda ise kullanılan çözücü etilasetattır. Püskürterek kurutma yönteminde kullanılan parametreler hem kullandığımız organik çözücü, polimer ve etkin maddeye, hem de literatürlere uygun olarak seçilmiştir. Hazırlama yöntemlerinde kullandığımız giren hava sıcaklığının seçiminde, hem polimer hem de etkin maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine olumsuz etki olmaması için özen gösterilmiştir. Besleme oranı ve püskürtme basıncı ise, literatürlere dayanılarak seçilmiştir (87,118). Ön denemelerde kullandığımız giriş sıcaklığı ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ile, özellikle etkin madde dağıtılması ile hazırlanan formülasyonlarda elde edilen verimlerin çok düşük olduğu görülmüştür. Laboratuvarımızda bulunan püskürterek kurutma cihazının ancak giriş sıcaklığı ayarlanabilmekte, çıkış sıcaklığı otomatik olarak giriş sıcaklığına bağlıdır. Ön denemelerde, besleme çözeltisi püskürtülmeye başlayınca, çıkış sıcaklığı istenilen değerden hemen düşmeye başlamıştır. Bu durumda ise, püskürtülen polimerik çözelti, cihazın cidarlarına film oluşturarak yapışmaktadır. Bu da verimlerin azalmasına sebep olmaktadır. Bu olay, özellikle polimer çözeltisinin konsantrasyonu yüksek olduğunda çok etkili olmaktadır. Bu nedenle, kullandığımız polimer ve etkin madde özellikleri göz önüne alınarak giriş sıcaklığı  $61\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar arttırılmıştır.

Conte ve arkadaşları (2), püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen partiküllerin karakteristiklerine, çeşitli teknolojik parametrelerin etkilerini incelediklerinde giriş/çıkış hava sıcaklıkları, besleme/püskürtme oranı ve polimerik çözeltinin konsantrasyonu gibi parametrelerin, elde edilen partiküllerin şeklini, hacmini ve etkin madde in vitro salımını önemli bir şekilde etkilediğini saptamışlardır (2). Püskürterek kurutma tekniğinde kullanılan polimerik

çözeltilerin konsantrasyonu, elde edilen partiküllerin karakteristiklerine önemli bir şekilde etki etmektedir. Polimerik çözeltilerin seyreltik olması, elde edilen partiküllerin tamamen oluşmamasına yol açmaktadır (2). Çalışmamızda, hazırlanan partiküllerde, etkin madde ve polimer miktarındaki değişimin, partiküler taşıyıcı sistemin hazırlama verimine, etkin maddenin yüklenmesine, büyüklüğüne ve in vitro salım özelliklerine etkisini sağlıklı olarak inceleyebilmek için her bir yöntemdeki hazırlama koşulları, organik çözücünün miktarı dahil olmak üzere sabit tutulmuştur.

#### **4.2.2.2. Özellikleri**

Mikropartiküllerin karakteristik incelemeleri, literatürlerde sıkça rastlanan yöntemler ile yapılmıştır: Taramalı -elektron mikroskobu, ışık mikroskobu, diferansiyel taramalı kalorimetre, partikül boyut analizi, etkin madde içeriği ve çözünme hızı çalışmaları (76,77,144,102,115).

##### **4.2.2.2.1. Şekilleri**

EF8 ve DF7 kodlu formülasyonların şekilleri, ışık ve taramalı elektron mikroskobu ile incelendiğinde, hazırlama tekniğinin partikül şekline etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.10- Şekil 4.15). Bu görüntüler toz PB ile karşılaştırıldığında partikül şeklinin değişmiş olduğu ve toz PB'ün yüksek orandaki agregasyonunun nispeten azaldığı tespit edilmiştir.

Etkin madde dağılımı ile hazırlanan mikropartiküllerin, ışık mikroskobu görüntüleri incelendiğinde, mikropartiküllerin düzensiz ve bozuk şekilli oldukları görülmüştür. Bunun yanısıra, etkin madde taneciklerinin etrafının polimer tarafından kaplandığı net bir şekilde görülmektedir. Aynı partiküllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde ise, çekirdek çukur şeklinde görülmektedir. Bu çukur gözeneksiz kabukla kaplanmış haldedir. Bu görüntüler, benzer çalışmalarda elde edilen görüntülere benzemektedir (68,87,99). Etkin madde çözüldürülerek elde edilen mikropartiküllerin ışık ve taramalı elektron mikroskobu görüntülerine bakıldığında ise, oldukça küresel, düzgün ve gözeneksiz yüzeyli mikropartiküller elde edildiği gözlenmektedir.

Sonuç olarak, çözücü değiştirilmesinin partiküllerin oluşumunda ve şekillerinde çok önemli rol oynadığı görülmektedir. Polimer çözeltilerinde etkin

madde dağıtılması ile elde edilen mikropartiküller mikrokapsül yapıda iken etkin madde çözündürülmesi ile elde edilen mikropartiküllerin matris yapıda olduğu görülmektedir.

#### 4.2.2.2.2. Partikül İrilik Dağılımları

Mikropartiküllerin ortalama partikül irilikleri lazer taramalı cihaz ile incelendiğinde, polimer konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak ortalama partikül iriliğinin de arttığı görülmüştür (Çizelge 4.4). Partikül iriliği ve polimer konsantrasyonu arasında deneysel bir ilişki olduğu literatürce de desteklenmektedir (72,99,96,171).

İki yöntemle hazırlanan mikropartiküllerin ortalama partikül iriliğinin sınırlı olduğu (3.724  $\mu\text{m}$ –10.322  $\mu\text{m}$  arasında) görülmektedir. Benzer çalışmalarda paralel bulgular elde edilmiştir (87,116,96). Ancak, bir çalışmada ortalama partikül iriliği 2-5  $\mu\text{m}$  arasında değişirken (172), başka bir çalışmada 100  $\mu\text{m}$ 'ye kadar partiküller olduğu saptanmıştır (3).

Çalışmamızda elde edilen partiküllerin ortalama partikül irilikleri incelendiğinde, hazırlama yönteminin etkisi açıkça görülmektedir. Etkin madde dağıtılması ile hazırlanan mikropartiküllerin 3.724-6.854  $\mu\text{m}$  arasında olan ortalama partikül iriliğinin, etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan mikropartiküllerin 5.982-10.322  $\mu\text{m}$  arasında olan ortalama partikül iriliğine göre daha küçük olduğu görülmektedir. Bu da, çözücünün etkisine bağlı olabilir (68).

Partiküllerin ortalama partikül iriliğine etki eden faktörlerden birisi, giriş ve çıkış sıcaklıkları gibi deneysel parametrelerdir. Bir çalışmada, giriş ve çıkış sıcaklıklarını değiştirerek farklı boyutta partiküller elde edilmiştir (2). Ancak, bizim çalışmamızın bütün formülasyonlarında, hava giriş ve çıkış sıcaklıkları sabit tutulduğu için bu konuda bir yorum yapılamamaktadır.

Mikropartiküllerin hazırlanması sırasında, etkin madde konsantrasyonunda yapılan değişiklikler, partikül iriliği açısından anlamlı bir farka yol açmamıştır. Bunun nedeni, etkin madde çözündürülerek hazırlama yönteminde etkin maddenin polimer çözeltisi içinde çözünerek polimer ile birlikte hareket etmesi; etkin madde dağıtılarak hazırlama yönteminde ise, etkin



maddenin polimer çözeltisi içinde buz banyosunda karıştırılıp öğütülmesi ile, etkin madde dağıtılmasının yeterli oranda standardize edilmesi olabilir.

#### 4.2.2.2.3. IR Analizleri

Mikropartiküllerde yapılan analizlerin sonucu elde edilen spektrumlarda karakteristik PB pikleri gözlenmiştir. Etkin madde dağıtılması ile hazırlanan partiküllerde, 3000-2400  $\text{cm}^{-1}$  arasında  $-\overset{+}{N}-$ , 1729.5  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O, 1250 ve 1148  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O bandları görülürken, etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan partiküllerde, 3000-2400  $\text{cm}^{-1}$  arasında  $-\overset{+}{N}-$ , 1729  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O, 1252 ve 1151  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O bandları görülmüştür. Bunun yanısıra, spektrumlarda 500-1100  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bölgede etkin maddeye ait pikler kütleşmiş ve sayıları azalmıştır. Elde edilen sonuçlar, mikropartiküllerin hazırlanmasında kimyasal değişiklikler veya kimyasal etkileşme olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda elde edilen IR sonuçları, benzer çalışmalarda elde edilen benzer sonuçlar ile desteklenmektedir (87,97,3).

#### 4.2.2.2.4. Termal Analizler

Kullanılan etkin madde, polimer ve hazırlanan partiküllerin termal incelemelerinde, diğer termal analiz yöntemlerine göre pekçok üstünlükleri literatürlerce desteklenen diferansiyel taramalı kalorimetri kullanılmıştır.

Yapılan tüm termal analizlerde, örneklere bir ısıtma ve bir soğutma uygulanmıştır. EF8 ve DF7 formülasyonlarına ait termogramlar, kullanılan polimere ait termograma oldukça benzerlik göstermektedir. Etkin maddeye ait pikler, EF8 ve DF7 termogramlarında görülmemiştir. Bunun nedeninin, etkin maddenin erime noktasının, kullandığımız polimerin erime noktasının biraz üstünde ve yakın bir değer olması sebebiyle, cihazın soğutmaya geçtiği aşamada başlamış olan pik içerisinde gözlenememiş olduğu düşünülmüştür. Bu düşünceye dayalı olarak, etkin maddenin çözündürülmesi ve dağıtılması yöntemi ile hazırlanan iki formülasyon arasındaki fark da sağlıklı olarak izlenememiştir. Bu sonuçlar, PB ve Eudragit® RS ile hazırlanan veya hazırlanacak formülasyonların termal incelemeleri için maksimum sıcaklık olarak 165°C'den yüksek bir sıcaklığın seçilmesinin daha uygun olacağını göstermiştir. Çünkü, bu çalışmada olduğu gibi, kullanılan taşıyıcı maddelerin erime noktaları formüle edilmelerinden

sonra veya cihazlar arası farklılıklardan dolayı kayma gösterebilir. Bu değişikliklerin oluşabileceği gözönüne alınarak, termal incelemelerde maksimum sıcaklığın daha dikkatli seçilmesi, termogramların sağlıklı olarak yorumlanabilmesinde faydalı olacaktır.

#### 4.2.2.2.5. X- Işını Kırınım Analizleri

Karşılaştırma yapabilmek amacıyla, önce, kullanılan etkin madde ve polimerin analizi yapılmış, daha sonra hazırlama yönteminden gelebilecek değişiklikleri izlemek amacıyla, kullanılan yöntemlere ait birer formülasyonda inceleme yapılmıştır.

Etkin madde dağıtılarak hazırlanan formülasyonun X-ışını kırınım analizinde, pikler daha keskin ve saf maddenin piklerine uygundur. Oysa, etkin madde çözündürülerek hazırlanan formülasyonun X-ışını kırınım analizinde etkin maddeye ait pikler görülmemiştir. Bunun nedeni, hazırlanan mikropartiküllerde etkin maddenin durumu olabilir. Analiz sonuçları, etkin madde dağıtılarak hazırlanan partiküllerde etkin maddenin kristal durumda olduğunu, etkin madde çözündürülerek hazırlanan partiküllerde ise etkin maddenin amorf durumda olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, literatürler ile desteklenmektedir (97,3,103,96).

#### 4.2.2.2.6. Hazırlama Verimi

İki farklı yöntem ile hazırlanan mikropartiküllerin verimleri incelendiğinde, etkin madde dağıtılması ile hazırlanan partiküllerin verimlerinin, etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan partiküllerin verimlerine oranla oldukça düşük olduğu bulunmuştur (**Çizelge 4.5**). Etkin madde dağıtılması ile hazırlanan partiküllerin verimlerinin ortalaması % 47.27 iken, etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan partiküllerin verimlerinin ortalaması % 66.96 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen hazırlama verimlerinin, benzer çalışmalarda bulunan %40 civarındaki değerlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (87,2,97,116).

Hazırlamadan gelen kayıpların nedeni, püskürterek kurutma cihazının donanımından kaynaklanmış olabilir. Tamamen kurutulmamış embriyonik mikropartiküller, kurutucu bölmenin cidarlarında film oluşmasına yol açmakta, dolayısıyla hazırlama verimlerini azaltmaktadır (116).

#### 4.2.2.2.7. Piridostigmin Bromür Yükleme ve Hapsedilmesi

Literatürde, etkin madde yükleme kapasitesinin, mikropartikülün iriliği ile ilişkili olduğu (76,142), etkin madde ve etkin madde-polimer oranına bağlı bulunduğu (39,99) saptanmıştır. Çalışmamızda hazırlanan mikropartiküllerde, yüklenen ve hapsedilen PB miktarlarına bakıldığında (Çizelge 4.6), değişen parametrelere bağlı olarak belirgin bir korelasyon olduğu görülmüştür. Etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan partiküllerde, yüklenen PB miktarının polimer konsantrasyonu ile ilişkili olduğu, ancak, etkin maddenin konsantrasyonunun etkisi olmadığı görülmüştür. Bu partiküllerde, hapsedilen PB miktarına bakıldığında ise, DF1-DF8 kodlu formülasyonlarda hapsedilen PB miktarı genellikle polimer konsantrasyonu arttıkça artarken, DF9-DF12 formülasyonlarda ise hapsedilen PB miktarı azalmış görülmektedir. Etkin madde dağıtılması ile hazırlanan mikropartiküllerde yüklenen PB miktarı hem polimer konsantrasyonu ile hem de etkin madde konsantrasyonu ile ilişkilidir. Yine bu partiküllerde, hapsedilen PB miktarının, etkin madde konsantrasyonu ve etkin madde-polimer oranı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Hazırlanan mikropartiküllerin PB yükleme kapasitesi karşılaştırıldığında, (Çizelge 4.7) etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan partiküllerde, etkin madde dağıtılması ile hazırlanan partiküllere göre kapasitenin daha yüksek olduğu görülmüştür. Etkin madde çözündürülerek hazırlanan formülasyonlarda, PB yükleme kapasitesi ortalama % 102.36 iken, etkin madde dağıtılarak hazırlanan formülasyonlarda % 50.89 olduğu bulunmuştur. Buna karşın, etkin madde dağıtılarak hazırlanan partiküllerdeki PB hapsedilme oranının, etkin madde çözündürülerek hazırlanan partiküllerdeki hapsedilme oranına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Etkin madde çözündürülerek hazırlanan formülasyonlarda, PB yükleme kapasitesi ortalaması % 102.36 çıkmasının sebebinin, hazırlanmış sırasında kayıp olan polimer miktarının, etkin maddenin miktarına oranla daha fazla olabileceği düşünülmektedir. Yine sonuçlara bakıldığında (Çizelge 4.7), etkin madde yükleme ve hapsedilme kapasitesinin, mikropartiküllerin ortalama partikül iriliği ile ilişkili olduğu görülmektedir. Etkin madde dağıtılması ile hazırlanan partiküllerde, ortalama partikül iriliği arttıkça,

PB yükleme kapasitesi azalırken, PB hapsedilme kapasitesi artmaktadır. Etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan partiküllerde ise, PB yükleme kapasitesi, ortalama partikül iriliğinden etkilenmezken, ortalama partikül iriliği arttıkça, PB hapsedilme kapasitesi genellikle artmaktadır.

#### 4.2.2.3. Mikropartiküller ile Yapılan İn Vitro Salım Çalışmaları

Her iki yöntemle hazırlanan mikropartiküllerin, üç değişik ortamda (distile su, pH 1.2, pH 7.4) yapılan çözünme hızı çalışmalarında, çözünme ortamı pH'sının, çözünme hızına anlamlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç, PB'ün tampon çözeltilerdeki çözünürlüğüne ait olabilir. PB'ün distile su ve tampon çözeltilerdeki çözünürlük oranının birbirlerine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8- Çizelge 4.13). Benzer in vitro çalışmalarda, etkin maddenin tampon çözeltilerdeki çözünürlüğünün fonksiyonu olarak, çözünme hızında doğrusal bir ilişki tespit edilmiştir. Yani, etkin maddenin dissolüsyon ortamında salınan miktarı, yüksek pH'lardaki çözünürlüğüne bağlı olarak artmıştır (144,173).

Tüm formülasyonlarda, başlangıçta, hızlı salım gözlenmiştir. Bu iki nedenden ileri gelmiş olabilir: birincisi, ilk zamanlarda gözlenen hızlı salım, mikropartikül yüzeyine yakın ve yüzeydeki PB'ün hızlı çözünmesi ile salım ortamına geçmesinden kaynaklanmıştır (94). İkincisi, bazı partiküllerin tamamen oluşmamasından olabilir (2). Mikrokapsül şeklindeki partiküllerde olduğu gibi, etkin madde kristalleri, polimerik çözelti tarafından ya çok ince film membran ile kaplanmış ya da partiküllerin kaplanması tamamlanmamış olabilir (94). Literatürlerde incelenen salım sonuçlarına göre, kısa sürede gözlenen bu hızlı salım "burst effect" (patlama etkisi) tanımı ile açıklanmıştır (63,3). Patlama etkisiyle salınan etkin maddenin, organizmada hızlı başlangıç etki sağlayabileceği düşünülerek yararlı görülmektedir. Partiküllerin salım sonuçlarına bakıldığında, her iki yöntemde in vitro çözünme hızı testinde, etkin maddenin salım hızının mikropartiküllerin ortalama partikül iriliği ve partiküllerde etkin maddenin hapsedilme kapasitesi ile etkilendiği rastlanmaktadır. Ortalama partikül iriliği arttıkça etkin maddenin çözünme hızının yavaşlandığı gözlenmiştir. Bunun büyük bir olasılıkla iki nedeni vardır (58,134); birincisi, salım olayı için kullanılabilir yüzey alanının büyümesi.

İkincisi, etkin maddelerin dışarıya difüzyonu için gerekli olan mesafesinin kısalması.

Partiküllerde etkin maddenin hapsedilme kapasitesi arttıkça, mikropartiküllerden etkin maddenin çözünme süresinin uzadığı gözlenmiştir.

Partiküllerin salım profillerine bakıldığında (Şekil 25- Şekil 30), etkin madde-polimer oranı ile çözünme hızı arasında anlamlı sonuçlar verecek doğrusallık gözlenmiştir. Etkin madde/polimer oranı azaldıkça, çözünme süresinin uzadığı görülmüştür. İki yöntemle hazırlanan partiküllerin salım profilleri karşılaştırıldığında, etkin madde dağıtılması ile hazırlanan partiküllerin salım yüzdesinin, etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan partiküllerin salım yüzdesine göre daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan DF7 kodlu formülasyondan etkin maddenin yığılmalı salımı, 3. saatte % 100'e ulaşırken, etkin madde dağıtılması ile hazırlanan EF8 kodlu formülasyondan yığılmalı salımın, 12. saatte % 100'e ulaştığı gözlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen bu bulgular, literatürle desteklenmektedir. Lucy ve arkadaşları (94), etkin madde olarak teofilin'i kullanarak polimerik çözelti içinde hem dağıtılarak hem de çözündürülerek, iki farklı yöntemle mikropartikül hazırlamışlardır. Etkin madde dağıtılması ile hazırlanan partiküllerin dissolüsyon  $T_{\%50}$ 'i 64.7 dak olarak bulunurken, etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan partiküllerin dissolüsyon  $T_{\%50}$ 'i 33.4 dak olarak bulunmuştur. Mikrokapsül yapısındaki partiküllerden çözünme zamanının, matris yapısındaki partiküllerin çözünme zamanına oranla önemli şekilde daha uzun olması iki faktöre ait olabilir: etkin madde taneciklerinin etrafındaki kaplama ve hazırlanan partiküller içindeki büyük hacimli etkin madde kristalleri. Bu iki faktör etkin madde salımını yavaşlatabilmektedir (94). Bunun yanısıra, matris yapının yüzeyinde bulunan mikroporlar, etkin madde salımını hızlandırabilir.

Saf etkin madde ve iki farklı yöntem ile hazırlanan formülasyonlardan seçilen iki formülasyon (EF8 ve DF7) ile yapılan in vitro salım çalışmalarından elde edilen sonuçların kinetik incelemesi, Dissol. 92 adlı bilgisayar programı ile yapılmıştır (165). Bu incelemede sonuçlar, Hixson-Crowell (modifiye), birinci derece, sıfır derece, Hixson-Crowell (sink), RRSBW, Q-Square root of time, Higuchi, Hopfenberg küresel, Hopfenberg silindir ve Hopfenberg slab kinetik

modellerine uygulanmıştır. Bu incelemenin sonunda (Çizelge 4.15) in vitro salım çalışmalarının yapıldığı her üç ortamda da, her iki formülasyonun Modifiye Hixson-Crowell modeline daha fazla uyum gösterdiği saptanmıştır. Her ne kadar DF7 kodlu formülasyon distile su içerisinde RRSBW modeline daha uyumlu ise de, Modifiye Hixson-Crowell modeli ile arasında Akaike kriteri ve determinasyon katsayısı açısından çok büyük bir fark olmadığı ve her iki formülasyonun her üç ortamda da aynı kinetik model ile karşılaştırılmasını yapabilmek için bu formülasyonun da kinetik verileri Modifiye Hixson-Crowell modeli ile izlenmiştir.

Etkin madde ile yapılan tüm in vitro salım çalışmalarında ilk birinci dakikada % 100 salım gözleendiğinden ve tekrarlanan deneylerde bu zaman içerisinde en fazla 4 değer bulunabildiğinden, bu kadar kısa bir süre ve bu kadar az bir veri ile kinetik inceleme yapabilmemiz mümkün olmamıştır. Bu nedenle etkin maddeye uygun bir kinetik model seçilememiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular incelendiğinde, mikropartiküllerden etkin madde salım oranının daha çok mikropartikülün yapısından etkilendiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, her iki yöntemle hazırlanan mikropartiküllerden PB'ün salım hızının azaltılabileceği bulunmuştur. Ancak, etkin madde dağıtılması ile hazırlanan mikropartiküllerden salım hızının, etkin madde çözündürülmesi ile hazırlanan mikropartiküllerden salım hızına göre daha yavaş olduğu saptanmıştır. Çözünme hızının düşürülmesi ile sık ilaç alımının engellenmesi düşüncesi, formülasyonda daha ileri çalışmalar ile desteklenmelidir.

## 5. KAYNAKLAR

1. B. Conti, P. Giunchedi, U. Conte, Cellulose Microparticles in Drug Delivery, *S.T.P. Pharma Sci.*, 7(5), 331-342 (1997).
2. U. Conte, B. Conti, P. Giunchedi, L. Maggi, Spray Dried Polylactide Microsphere Preparation: Influence of the Technological Parameters, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 20(3), 235-258 (1994).
3. R. Pignatello, M.A. Vandelli, P. Giunchedi, G. Puglisi, Properties of Tolmetin-Loaded Eudragit RL100 and Eudragit RS 100 Microparticles Prepared by Different Techniques, *S.T.P. Pharma Sci.*, 7(2), 148-157 (1997).
4. A. Sghirlanzoni, D. Pareyson, C. Benvenuti, G. Cei, V. Cosi, M. Lombardi, M. Nicora, R. Ricciardi, F. Cornelio, Efficacy of Intranasal Administration of Neostigmine in Myasthenic Patients, *J. Neurology*, 239, 165-169 (1992).
5. M.C. Lintern, M.E. Smith, C.B. Ferry, Effects of Pyridostigmine on Acetylcholinesterase in Different Muscles of the Mouse, *Human Exper. Toxicol.*, 16, 18-24 (1997).
6. M.B. Abou-Donia, K.R. Wilmarth, A.A. Abdel-Rahman, K.F. Jensen, F.W. Oehme, T.L. Kurt, Increased Neurotoxicity Following Concurrent Exposure to Pyridostigmine Bromide, DEET, and Chlorpyrifos, *Fund. Appl. Toxicol.*, 34, 201-222 (1996).
7. K. Lehmann, M. Aßmus, H. Bössler, D. Dreher, C. Liddiard, H.U. Petereit, G. Rothgang, W. Weisbrod, T. Beckert, Practical Course in Film Coating of Pharmaceutical Dosage Forms with Eudragit®, Pharma Polymers, Röhm GmbH, Almany, p. 123-133 (1999).
8. M.C. Davies, I.R. Wilding, R.D. Short, M.A. Khan, J.F. Watts, C.D. Melia, An Aalysis of the Surface Chemical Structure of Polymethacrylate (Eudragit) Film Coating Polymers by XPS, *Int. J. Pharm.*, 57, 183-187 (1989).

9. Röhm, A Company of the Hüls Group, Specifications and Test Methods of Eudragit® RL, Eudragit® RS, Pharma Polymers, Röhm GmbH, Alanya, Standards Sheet (1996).
10. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31<sup>th</sup> Edition, The Pharmaceutical Press, London, p.1426-1427 (1996).
11. The Pharmaceutical Codex, Eleventh Edition, p. 765-766, p. 1045 (1979).
12. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30<sup>th</sup> Edition, The Pharmaceutical Press, London, p.1120-1121 (1993).
13. E.G.C. Clarke, *Isolation and Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press, London, p. 527-528 (1978).
14. European Pharmacopoeia-Supplement, p.437- 438 (1998).
15. The Merck Index, Eleventh Edition, Merck & Co., Inc., U.S.A., p. 7985 (1989).
16. U.S. Pharmacopoeia National Formulary, USP 24 / NF19, United States Pharmacopoeial Convention, Inc., U.S.A., p. 1446-1447 (2000).
17. K. Wæhler, P.O. Roksvaag, T. Waaler, Determination of Pyridostigmine and the Main Degradation Product in Tablets by High-Performance Liquid Chromatography, *Int. J. Pharm.*, **97**, 55-59 (1993).
18. H.C. Michaelis, Determination of Pyridostigmine Plasma Concentrations by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatog.*, **534**, 291-294 (1990).
19. S.L. Malcolm, M.J. Madigan, N.L. Taylor, Thermospray Mass Spectrometer as a Quantitative Specific, Sensitive, Detector for Liquid Chromatography. Its Application to the Analysis of Pyridostigmine in Human Plasma, *J.Pharm. Biomed. Analysis*, **8(8-12)**, 771-776 (1990).
20. M. Nisikawa, M. Tatsuno, S. Suzuki, H. Tsuchihashi, The Analysis of Quaternary Ammonium Compounds in Human Urine by Direct Inlet Electron Impact Ionization Mass Spectrometry, *Forensic Sci. Int.*, **51**, 131-138 (1991).



21. H.G. Meyer, B.J. Lukey, R.T. Gepp, R.P. Corpuz, C.N. Lieske, A Radioimmunoassay for Pyridostigmine, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **247 (2)**, 432-438 (1988).
22. S.O. Kayaalp, *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 3. Baskı, Ulucan Matbaası, Ankara, s. 2206-2220 (1986).
23. K. Yamamoto, Y. Sawada, T. Iga, Comparative Pharmacokinetics of Four Cholinesterase Inhibitors in Rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **18(9)**, 1292-1295 (1995).
24. W.M. Kluwe, J.G. Page, J.D. Toft, W.E. Ridder, H. Chung, Pharmacological and Toxicological Evaluation of Orally Administered Pyridostigmine in Dogs, *Fund. Appl. Toxicol.*, **14**, 40-53 (1990).
25. T. Taylor, D.R. Hawkins, T.J. Forrest, H. Chung, Pharmacokinetics of Pyridostigmine in Dogs, *J.Pharm.Sci.*, **80(4)**, 353-356 (1991).
26. B.S. Levine, R.M. Parker, Reproductive and Developmental Toxicity Studies of Pyridostigmine Bromide in Rats, *Toxicol.*, **69**, 291-300 (1991).
27. U. Breyer-Pfaff, A. Schmezer, U. Maier, A. Brinkmann, F. Schumm, Neuromuscular Function and Plasma Drug Levels in Pyridostigmine Treatment of Myasthenia Gravis, *J. Neurology, Neurosurg. Psych.*, **53**, 502-506 (1990).
28. L.A. Stephenson, M.A. Kolka, Acetylcholinesterase Inhibitor, Pyridostigmine Bromide, Reduces Skin Blood Flow in Humans, *Amer. J. Physiol.*, **258** (4 part 2), R951-R957 (1990).
29. E. Kott, I. Kott, Myasthenia Gravis Rarity of Gallstones in Patients Treated by Pyridostigmine Bromide Mestinon, *J. Neurology*, **237**, (Suppl. 1), S 18 (1990).
30. C.D. Kay, J.D. Morrison, The Effects of Ingestion of 60 mg Pyridostigmine Bromide on Contrast Sensitivity in Man, *Human Toxicol.*, **7**, 347-352 (1988).
31. T. Henze, M. Nenner, H.C. Michaelis, Determination of Erythrocyte-Bound Acetylcholinesterase Activity for Monitoring Pyridostigmine Therapy in Myasthenia Gravis, *J. Neurology*, **238**, 225-229 (1991).

32. J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Gilman, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., U.S.A., pp. 161-174 (1996).
33. U. Breyer-Pfaff, U. Maier, A.M. Brinkmann, F. Schumm, Pyridostigmine Kinetics in Healthy Subjects and Patients with Myasthenia Gravis, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **37(5)**, 495-501 (1985).
34. F.L. Bamba, J. Wepierre, Role of Appendageal Pathway in the Percutaneous Absorption of Pyridostigmine Bromide in Various Vehicles, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, **18(4)**, 339-348 (1993).
35. A.K. Mitra, D.J. Wirtanen, The Effect of Skin Penetration Enhancers on the Transdermal Delivery of Pyridostigmine Bromide, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **15(11)**, 1855-1863 (1989).
36. *Rasyonel İlaç Rehberi 94/98*, Editör S. Eralp Bellibaş, Egem Tıbbi Yayıncılık, İzmir, s. 551, (1994).
37. G.L. Harris, H.I. Maibach, Allergic Contact Dermatitis Potential of 3 Pyridostigmine Bromide Transdermal Drug Delivery Formulations, *Contact Dermatitis*, **21**,189-193 (1989).
38. D.M. Rothenberg, A.S. Berns, R. Barkin, R.H. Glantz, Bromide Intoxication Secondary to Pyridostigmine Bromide Therapy, *J. American Med. Assoc.*, **263(8)**, 1121-1122, (1990).
39. P. Giunchedi, U. Conte, Spray-Drying as a Preparation Method of Microparticulate Drug Delivery Systems: an Overview, *S.T.P. Pharma Sci.*, **5(4)**, 276-290 (1995).
40. M. Güllük-Demirel, *Salbutamol Sülfat Mikrokapsülleri Üzerinde Çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (1993).
41. A. Gürsoy, B. Dortunç, E. Pişkin, N.A. Peppas, *Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler*, Marmara Üniv. Eczacılık Fak. Yay. No.469/5, Tekno Grafik & Ada ofset, İstanbul, 120-152 (1989).
42. R. Arshday, Naming Microcapsules, *J. Microencapsulation*, **9(2)**, 187-190 (1992)

43. S. Aftabroushad, E. Doelker, Factors Influencing the Entrapment of a Water Soluble Model Drug into Injectable Microparticles Prepared Using Solvent Evaporation and Phase Separation Techniques, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **40(4)**, 237-242 (1994).
44. P.P. Speiser, Local and Systemic Toxicity of Synthetic Materials for Microparticulate Matter, 9<sup>th</sup> Int. Symposium on Microencapsulation, Hacettepe University, Ankara, 13-15 September (1993).
45. Ö.H. Ocak, *Bleomisin'in Manyetik Albumin Mikroküreleri ile Hedeflendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara (1992).
46. K. Çiftçi, *Biyolojik Olarak Parçalanabilen 5-fluorourasil Mikrokürelerinin Tasarımı ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmeleri*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara (1993).
47. M. Sriwongjanya, R. Bodmeier, Entrapment of Drug Loaded Ion-Exchange Particles within Polymeric Microparticles, *Int. J. Pharm.*, **158(1)**, 29-38 (1997).
48. S.P. Sanghvi, J.G. Nairn, Effect of Viscosity and Interfacial Tension on Particle Size of Cellulose Acetate Trimellitate Microspheres, *J. Microencapsulation*, **9(2)**, 215-227 (1992).
49. S.B. Bhardwaj, A.J. Shukla, C.C. Collins, Effect of Varying Drug Loading on Particle Size, Distribution and Drug Release Kinetics of Verapamil Hydrochloride Microspheres Prepared with Cellulose Esters, *J. Microencapsulation*, **12(1)**, 71-81 (1995).
50. B. Ronneberger, T. Kissel, J.M. Anderson, Biocompatibility of ABA Triblock Copolymer Microparticles Consisting of Poly (L-lactic-co-Glycolic-Acid) A-Blocks Attached to Central Poly (Oxyethylene) B-Blocks in Rats After Intramuscular Injection, *Eur.J.Pharm.Biopharm.*, **43**, 19-28 (1997).

51. C.R. López, M.L. Lorenzo-Lamosa, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Development of New Chitosan-Cellulose Multicore Microparticles for Controlled Drug Delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 49-56 (1998).
52. Y.M. Wang, H. Sato, I. Horikoshi, In Vitro and In Vivo Evaluation of Taxol Release from Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres Containing Isopropyl Myristate and Degradation of the Microspheres, *J. Control. Rel.*, **49**, 157-166 (1997).
53. Z. Ramtoola, O.I. Corrigan, E. Bourke, Characterisation of Biodegradable Microspheres Containing Dehydro-Iso-Androsterone, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **17(13)**, 1857-1873 (1991).
54. I. Morishita, M. Morishita, K. Takayama, Y. Machida, T. Nagai, Enteral Insulin Delivery by Microspheres in 3 Different Formulations Using Eudragit L100 and S100, *Int. J. Pharm.*, **91**, 29-37 (1993).
55. İ. Vural, H.S. Kaş, A.A. Hıncal, Chitosan-Treated Albumin Microspheres of Sulphasalazine: I. Formulation and In Vitro Release Profiles, *Hacettepe University Journal of Faculty of Pharmacy*, **14(2)**, 57-65 (1994).
56. L.S.C. Wan, P.W.S. Heng, L.W. Chan, Surfactant Effects on Alginate Microspheres, *Int. J. Pharm.*, **103**, 267-275 (1994).
57. L.S.C. Wan, P.W.S. Heng, L.W. Chan, Influence of Hydrophile-Lipophile Balance on Alginate Microspheres, *Int. J. Pharm.*, **95**, 77-83 (1993).
58. Y. Akiyama, M. Yoshioka, H. Horibe, S. Hirai, N. Kitamori, H. Toguchi, Novel Oral Controlled-Release Microspheres Using Polyglycerol Esters of Fatty Acids, *J. Control. Rel.*, **26**, 1-10 (1993).
59. B. Sjöström, B. Bergenstahl, B. Kronberg, A Method for the Preparation of Submicron Particles of Sparingly Water-Soluble Drugs by Precipitation in Oil-in-Water Emulsions, II: Influence of the Emulsifier, the Solvent, and the Drug Substance, *J. Pharm. Sci.*, **82(6)** 584-589 (1993).

60. G. Puglisi, G. Giammona, M. Fresta, B. Carlisi, N. Micali, A. Villari, Evaluation of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles as a Potential Drug Carrier: Preparation, Morphological Characterization and Loading Capacity, *J. Microencapsulation*, **10** (3), 353-366 (1993).
61. N. Nihant, C. Schugens, C. Grandfils, R. Jérôme, P. Teyssié, Polylactide Microparticles Prepared by Double Emulsion/Evaporation Technique. I. Effect of Primary Emulsion Stability, *Pharm. Res.*, **11**(10), 1479-1484 (1994).
62. J. Herrmann, R. Bodmeier, Biodegradable, Somatostatin Acetate Containing Microspheres Prepared by Various Aqueous and Non-Aqueous Solvent Evaporation Methods, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 75-82, (1998).
63. M.J.B. Prieto, E. Fattal, A. Gulik, J.C. Dedieu, B.P. Roques, P. Couvreur, 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. Rel.*, **43**, 81-87 (1997).
64. R. Bodmeier, H. Wang, D.J. Dixon, S. Mawson, K.P. Johnston, Polymeric Microspheres Prepared by Spraying into Compressed Carbon Dioxide, *Pharm. Res.*, **12**(8), 1211-1217 (1995).
65. L.A. Luzzi, Microencapsulation, *J. Pharm. Sci.*, **59**(10), 1367-1376 (1970)
66. N. Hegazy, *Ketorolak Trometaminin Değişik Farmasötik Dozaj Şekilleri Üzerine Çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (1996).
67. C. Thomasin, P. Johansen, R. Alder, R. Bemsel, G. Hottinger, H. Altorfer, A.D. Wright, G. Wehrli, H.P. Merkle, B. Gander, A Contribution to Overcoming the Problem of Residual Solvents in Biodegradable Microspheres Prepared in Coacervation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **42**(1), 16-24 (1996).

68. H. Sah, Microencapsulation Techniques using EthylAcetate as a Dispersed Solvent: Effects of its Extraction Rate on the Characteristics of PLGA Microspheres, *J.Control. Rel.*, **47**, 233-245 (1997).
69. P.D. Scholes, A.G.A. Coombes, L. Illum, S.S. Davis, M. Vert, M.C. Davies, The Preparation of Sub-200 nm Poly (Lactide-co-Glycolide) Microspheres for Site-Specific Drug Delivery, *J. Control. Rel.*, **25**, 145-153 (1993).
70. A.G.A. Coombes, S. Tasker, M. Lindblad, J. Holmgern, K. Hoste, V. Toncheva, E. Schacht, M.C. Davies, L. Illum, S.S. Davis, Biodegradable Polymeric Microparticles for Drug Delivery and Vaccine Formulation: the Surface Attachment of Hydrophilic Species Using the Concept of Poly (Ethylene Glycol) Anchoring Segments, *Biomaterials*, **18 (17)**, 1153-1161 (1997).
71. P.J. Watts, C.G. Wilson, M.C. Davies, C.D. Melia, Radiolabelling of Polymer Microspheres for Scintigraphic Investigations by Neutron Activation. 2. Effects of Irradiation on the Properties of Eudragit RS-Sulphasalazine Microspheres, *Int. J. Pharm.*, **98**, 63-73 (1993).
72. U.V. Singh, N. Udupa, In Vitro Characterization of Methotrexate Loaded Poly(Lactic-co-Glycolic) Acid Microspheres and Antitumor Efficacy in Sarcoma-180 Mice Bearing Tumor, *Pharm. Acta Helv.*, **72**, 165-173 (1997).
73. Y. Tian, D. Parasrampur, M. Kanke, A.J. Hickey, Manufacture and In-Vitro Assessment of Bromsulphthalein and Phenolphthalein Loaded Polyester Microspheres, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **20(7)** 1159-1178 (1994).
74. P. Sansdrap, A.J. Moës, In Vitro Evaluation of the Hydrolytic Degradation of Dispersed and Aggregated Poly (DL-Lactide-co-Glycolide) Microspheres, *J.Control. Rel.*, **43**, 47-58 (1997).
75. P.J. Watts, C.G. Wilson, M.C. Davies, C.D. Melia, Radiolabelling of Polymer Microspheres for Scintigraphic Investigations by Neutron Activation 3. Changes in the Physical Properties of Eudragit RS-

- Sulphapyridine Microspheres from Incorporating Samarium Oxide, *Int. J. Pharm.*, **98**, 75-82 (1993).
76. A. Sánchez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Development of Biodegradable Microspheres and Nanospheres for the Controlled Release of Cyclosporin A, *Int. J. Pharm.*, **99**, 263-273 (1993).
  77. H. Rafati, A.G.A. Coombes, J. Adler, J. Holland, S.S. Davis, Protein-Loaded Poly (DL-Lactide-co-Glycolide) Microparticles for Oral Administration: Formulation, Structural and Release Characteristics, *J.Control. Rel.*, **43**, 89-102 (1997).
  78. C. Yan, J.H. Resau, J. Hewetson, M. West, W. L. Rill, M. Kende, Characterization and Morphological Analysis of Protein-Loaded Poly (Lactide-co-Glycolide) Microparticles Prepared by Water-in-Oil-in Water Emulsion Technique, *J. Control. Rel.*, **32**, 231-241 (1994).
  79. R. Arshady, Preparation of Biodegradable Microspheres and Microcapsules: 2-Polyactides and Related Polyesters, *J.Control. Rel.*, **17**, 1-22 (1991).
  80. A. Gürsoy, M. Türkoğlu, B. Şenyücel, F. Kalkan, İ. Okar, Evaluation of Tableted Microspheres of Dipyridamole, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21(4)**, 503-507 (1995).
  81. Wen-I Li, K. W. Anderson, R.C. Menta, P.P. DeLuca, Prediction of Solvent Removal Profile and Effect on Properties for Peptide-Loaded PLGA Microspheres Prepared by Solvent Extraction/Evaporation Method, *J. Control. Rel.*, **37**, 199-214 (1995).
  82. R. Bodmeier, H. Chen, P. Tyle, P. Jarosz, Pseudoephedrine HCl Microspheres Formulated into an Oral Suspension Dosage Form, *J. Control. Rel.*, **15**, 65-77 (1991).
  83. M. Kyo, S.H. Hyon, Y. Ikada, Effects of Preparation Conditions of Cisplatin-Loaded Microspheres on the In Vitro Release, *J.Controlled Release*, **35**, 73-82 (1995).

84. Wen-I Li, K.W. Anderson, P.P. DeLuca, Kinetic and Thermodynamic Modeling of the Formation of Polymeric Microspheres Using Solvent Extraction/Evaporation Method, *J.Control. Rel.*, **37**, 187-198 (1995).
85. R. Jalil, J.R. Nixon, Biodegradable Poly (Lactic Acid) and Poly (Lactide-co-Glycolide) Microcapsules: Problems Associated with Preparative Techniques and Release Properties, *J. Microencapsulation*, **7(3)**, 297-325 (1990).
86. K. Thoma, B. Schlütermann, Relationships Between Manufacturing Parameters and Pharmaceutical-Technological Requirements on Biodegradable Microparticles Part 5: Relationships Between Manufacturing Parameters, Surface Properties and Degradation Characteristics, *Pharmazie*, **47**, 368 (1992).
87. B. Conti, C. Bucolo, C. Giannavola, G. Puglisi, P. Giunchedi, U. Conte, Biodegradable Microspheres for the Intravitreal Administration of Acyclovir: In Vitro/In Vivo Evaluation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **5**, 287-293 (1997).
88. F. Castelli, B. Conti, G. Puglisi, U. Conte, G. Mazzone, Calorimetric Studies on Tolmetin Release from Poly-DL-Lactide Microspheres to Lipid Model Membrane, *Int.J. Pharm.*, **103**, 217-223 (1994).
89. J. Broadhead, S.K. Edmond Rouan, C.T. Rhodes, The Spray Drying of Pharmaceuticals, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18(11&12)**, 1169-1206 (1992).
90. T. Hino, S. Shimabayashi, N. Ohnishi, M. Fujisaki, H. Mori, O. Watanabe, K. Kawashima, K. Nagao, Development of a New Type Nozzle and Spray- Drier for Industrial Production of Fine Powders, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **49**, 79-85 (2000).
91. B. Rotthäuser, G. Kraus, P. C. Schmidt, Optimization of an Effervescent Tablet Formulation Containing Spray Dried L- leucine and Polyethylene Glycol 6000 as Lubricants using a Central Composite Design, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **46**, 85-94 (1998).



92. S. T. Tzannis, S. J. Prestrelski, Activity-Stability Consideration of Trypsinogen During Spray Drying: Effects of Sucrose, *J. Pharm. Sci.*, **88(3)**, 351-359 (1999).
93. H. Takeuchi, T. Yasuji, T. Hino, H. Yamamoto, Y. Kawashima, Spray-Dried Composite Particles of Lactose and Sodium Alginate for Direct Tableting and Controlled Releasing, *Int. J. Pharm.*, **174**, 91-100 (1998).
94. L.S.C. Wan, P.W.S. Heng, C.G.H. Chia, Spray Drying as a Process for Microencapsulation and the Effect of Different Coating Polymers, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18(9)**, 997-1011 (1992).
95. F. X. Lacasse, P. Hildgen, J. N. McMullen, Surface and Morphology of Spray-Dried Pegylated PLA Microspheres, *Int. J. Pharm.*, **174**, 101-109 (1998).
96. F. Forni, G. Coppi, M. A. Vandelli, R. Cameroni, Drug Release from Spray-Dried and Spray-Embedded Microparticles of Diltiazem Hydrochloride, *Chem. Pharm. Bull.*, **39(8)**, 2091-2095 (1991).
97. I. Genta, F. Pavanetto, B. Conti, P. Giunchedi, U. Conti, Improvement of Dexamethasone Dissolution Rate from Spray-Dried Chitosan Microspheres, *S.T.P. Pharma Sci.*, **5(3)**, 202-207 (1995).
98. S. Lin, Y. Kao, Solid Particulates of Drug- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes Directly Prepared by a Spray-Drying Technique, *Int. J. Pharm.*, **56**, 249-259 (1989).
99. F. Forni, G. Coppi, M. A. Vandelli, M. T. Bernabei, An Interpretation of the Diffusion-Type Mechanism of Drug Release from Microcapsules, *Int. J. Pharm.*, **60**, 83-88 (1990).
100. S. Lin, Y. Kao, Tablet Formulation Study of Spray-Dried Sodium Diclofenac Enteric-Coated Microcapsules, *Pharm. Res.*, **8(7)**, 919-924 (1991).
101. B. Conti, I. Genta, P. Guinchedi, T. Modena, Testing of "In Vitro" Dissolution Behaviour of Microparticulate Drug Delivery Systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21(10)**, 1223-1233 (1995).

102. A. Ganza-González, S. Anguiano-Igea, F. J. Otero-Espinar, J. B. Méndez, Chitosan and Chondroitin Microspheres for Oral-Administration Controlled Release of Metoclopramide, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **48**, 149-155 (1999).
103. X. Guo, R. Bodmeier, Polymeric Microparticles Prepared by Spray-Drying a Drug-Containing, Aqueous Colloidal Acrylic Polymer Dispersion, Eudragit RS 30D, *S.T.P. Pharma Sci.*, **7(6)**, 521-528 (1997).
104. P Stjärnkvist, L. Degling, I. Sjöholm, Biodegradable Microspheres XIII: Immune Response to the DNP Hapten Conjugated to Polyacryl Starch Microparticles, *J. Pharm. Sci.*, **80(5)**, 436-440 (1991).
105. B. Kriwet, T. Kissel, Poly(Acrylic Acid) Microparticles Widen the Intercellular Spaces of Caco-2 Cell Monolayers: An Examination by Confocal Laser Scanning Microscopy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **42(4)**, 233-240 (1996).
106. M.J.B. Prieto, F. Delie, E. Fattal, A. Tartar, F. Puisieux, A. Gulik, P. Couvreur, Characterization of V3BRU Peptide-Loaded Small PLGA Microspheres Prepared by a (w<sub>1</sub>/o)<sub>w</sub><sub>2</sub> Emulsion Solvent Evaporation Method, *Int. J. Pharm.*, **111**, 137-145 (1994).
107. M. Iwata, J.W. McGinity, Dissolution, Stability and Morphological Properties of Conventional and Multiphase Poly (DL-Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres Containing Water-Soluble Compounds, *Pharm. Res.*, **10(8)**, 1219-1227 (1993).
108. R. Bodmeier, H. Chen, P. Tyle, P. Jarosz, Pseudoephedrine HCl Microspheres Formulated into an Oral Suspension Dosage Form, *J. Control. Rel.*, **15**, 65-77 (1991).
109. S. Malamataris, A. Avgerinos, Controlled Release Indomethacin Microspheres Prepared by Using an Emulsion Solvent-Diffusion Technique, *Int. J. Pharm.*, **62**, 105-111 (1990).
110. B. Ekman, I. Sjöholm, Improved Stability of Proteins Immobilized in Microparticles Prepared by a Modified Emulsion Polymerization Technique, *J. Pharm. Sci.*, **67(5)**, 693-696 (1978).

111. W.W. Thompson, D.B. Anderson, M.L. Heiman, Biodegradable Microspheres as a Delivery System for Rismorelin Porcine, a Porcine-Growth-Hormone-Releasing-Hormone, *J.Control. Rel.*, **43**, 9-22 (1997).
112. K. Thoma, B. Schlütermann, Relationships Between Manufacturing Parameters and Pharmaceutical-Technological Requirements on Biodegradable Microparticles, Part 6: In Vitro Release Characteristics of Cinchocaine and Bupivacaine from Biodegradable Microparticles, *Pharmazie*, **47**, 436 (1992).
113. F. Pavanetto, B. Conti, I. Genta, P. Giunchedi, Solvent Evaporation, Solvent Extraction and Spray Drying for Polylactide Microsphere Preparation, *Int. J. Pharm.*, **84**, 151-159 (1992).
114. M. L. Lorenzo-Lamosa, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonso, Design of Microencapsulated Chitosan Microspheres for Colonic Drug Delivery, *J. Control. Rel.*, **52**, 109-118 (1998).
115. M. Lück, K. Pistel, You-Xin Li, T. Blunk, R. H. Müller, T. Kissel, Plasma Protein Adsorption on Biodegradable Microspheres Consisting of Poly (D,L-Lactide-co-Glycolide), Poly (L-Lactide) or ABA Triblock Copolymers Containing Poly (Oxyethylene) Influence of Production Method and Polymer Composition, *J. Control. Rel.*, **55**, 107-120 (1998).
116. B. Bittner, M. Morlock, H. Koll, G. Winter, T. Kissel, Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) Loaded Poly (Lactide-co-Glycolide) Microspheres: Influence of the Encapsulation Technique and Polymer Purity on Microsphere Characteristics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 295-305 (1998).
117. C. Witschi, E. Doelker, Influence of the Microencapsulation Method and Peptide Loading on Poly (Lactic Acid) and Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) Degradation During In Vitro Testing, *J. Control. Rel.*, **51**, 327-341 (1998).
118. P. Giunchedi, B. Conti, S. Scalia, U. Conte, In Vitro Degradation Study of Polyester Microspheres by a New HPLC Method for Monomer Release Determination, *J. Control. Rel.*, **56**, 53-62 (1998).

119. J. Thies, B.W. Müller, Size Controlled Production of Biodegradable Microparticles with Supercritical Gases, *Eur. J. Pharm.Biopharm.*, **45**, 67-74 (1998).
120. S. McClean, E. Prosser, E. Meehan, D. O'Malley, N. Clarke, Z. Ramtoola, D. Brayden, Binding and Uptake of Biodegradable Poly-DL-Lactide Micro- and Nanoparticles in Intestinal Epithelia, *Eur. J. Pharm.Sci.*, **6**, 153-163 (1998).
121. S.S. Davis, L. Illum, S.M. Maghimi, M.C. Davies, C.J.H. Porter, I.S. Muir, A. Brindley, N.M. Christy, M.E. Norman, P. Willams, S.E. Dunn, Microspheres for Targeting Drugs to Specific Body Sites, *J. Control. Rel.*, **24**, 157-163 (1993).
122. M.G. Vachon, J.G. Nairn, Physico-Chemical Evaluation of Acetylsalicylic Acid-Eudragit<sup>®</sup> RS 100 Microspheres Prepared Using a Solvent-Partition Method, *J. Microencapsulation*, **12(3)**, 287-305 (1995).
123. A. Berthold, K. Cremer, J. Kreuter, Collagen Microparticles: Carriers for Glucocorticosteroids, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 23-29 (1998).
124. L.I. Giannola, V.D. Stefano, V.D. Caro, White Beeswax Microspheres: A Comparative In Vitro Evaluation of Cumulative Release of the Anticancer Agents Fluorouracil and Ftorafur, *Pharmazie*, **48**, 123-126 (1993).
125. R.S. Al-Kassas, C.A. Gilligan, A. Li Wan Po, Processing Factors Affecting Particle Size and In Vitro Drug Release of Sustained-Release Ibuprofen Microspheres, *Int. J. Pharm.*, **94**, 59-67 (1993).
126. W.A. Hanson, *Handbook of Dissolution Testing*, 2nd Edition, Aster Publishing Corporation, U.S.A., pp. 27-52 (1991).
127. C. Washington, F. Koosha, Drug Release from Microparticulates Deconvolution of Measurement Errors, *Int. J. Pharm.*, **59**, 79-82 (1990).
128. C. Graffner, M. Särkelä, K. Gjellan, G. Nork, Use of Statistical Experimental Design in the Further Development of a Discriminating In Vitro Release Test for Ethyl Cellulose ER-Coated Spheres of Remoxipride, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **4**, 73-83 (1996).

129. M.A.Radwan, J.C. Price, R.L. Tackett, In Vitro Release of Disopyramide from Cellulose Acetate Butyrate Microspheres, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21(12)**, 1453-1462 (1995).
130. N. Belcheva, J. Smid, N. Lambov, N. Danchev, P. Peikov, A. Zlatkov, C. Tsvetanov, Polymeric Sustained Release Formulations of the Bronchial Dilator Vephylline, *J. Control. Rel.*, **37**, 43-48 (1995).
131. Y. Akiyama, M. Yoshioka, H. Horibe, S. Hirai, N. Kitamori, H. Toguchi, pH-Independent Controlled-Release Microspheres Using Polyglycerol Esters of Fatty Acids, *J. Pharm. Sci.*, **83(11)**, 1600-1607 (1994).
132. H.Okada, M. Yamamoto, T. Heya, Y. Inoue, S. Kamei, Y. Ogawa, H. Toguchi, Drug Delivery Using Biodegradable Microspheres, *J. Control. Rel.*, **28**, 121-129 (1994).
133. B.R. Conway, H.O. Alpar, Double Emulsion Microencapsulation of Proteins as Model Antigens Using Polylactide Polymers: Effect of Emulsifier on the Microsphere Characteristics and Release Kinetics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **42(1)**, 42-48 (1996).
134. H. Gürkan, H. S. Kaş, Mikroküreler II. Hedeflendirilmeleri ve Etken Maddeyi In Vitro Salma Özellikleri, *Doğa, Tıp ve Ecz. D.*, **10(3)**, 267-281 (1986).
135. C. Washington, Drug Release from Microdisperse Systems: a Critical Review, *Int. J. Pharm.*, **58**, 1-12 (1990).
136. Lin-Shu Liu, Shu-Qin Liu, S. Y. Ng, M. Froix, T. Ohno, J. Heller, Controlled Release of Interleukin-2 for Tumour Immunotherapy Using Alginate/Chitosan Porous Microspheres, *J. Control. Rel.*, **43**, 65-74 (1997).
137. F. W. Okumu, J.L. Cleland, R.T. Borchardt, The Effect of Size, Charge and Cyclization of Model Peptides on Their In Vitro Release from DL-PLGA Microspheres, *J. Control. Rel.*, **49**, 133-140 (1997).
138. C.M. Adeyeye, J.C. Price, Development and Evaluation of Sustained-Release Ibuprofen-Wax Microspheres. II. In Vitro Dissolution Studies, *Pharm. Res.*, **11(4)**, 575-579 (1994).

139. G. Owusu-Ababio, J. A. Rogers, Formulation and Release of Ciprofloxacin from Poly (L-Lactic Acid) Microparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **42** (3), 188-192 (1996).
140. Y. Kawashima, T. Iwamoto, T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, Uniform and Improved Bioavailability of Newly Developed Rapid and Sustained Release Suspensions of Ibuprofen Microspheres, *Int. J. Pharm.*, **89**, 9-17 (1993).
141. S. Benita, *Microencapsulation; Methods and Industrial Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 155-176 (1996).
142. F. Koosha, R.H. Müller, S.S. Davis, A Continuous Flow System for In-Vitro Evaluation of Drug-Loaded Biodegradable Colloidal Carriers, *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 131 (1988).
143. H. Marchais, F. Boury, C. Damge, J.E. Proust, J.P. Benoit, Formulation of Bovine Serum Albumin Loaded PLGA Microspheres Influence of the Process Variables on the Loading and In Vitro Release, *S.T.P. Pharma Sci.*, **6**(6), 417-423 (1996).
144. K. Çiftçi, A.A. Hıncal, H.S. Kaş, M.T. Ercan, Ş. Ruacan, Microspheres of 5-Fluorouracil Using Poly (dl-Lactic acid): In Vitro Release Properties and Distribution in Mice After I.V. Administration, *Eur. J. Pharm.Sci.*, **1**, 249-258 (1994).
145. I. Orienti, K. Aiedeh, C. Ponti, E. Gianasi, V. Zecchi, Progesterone Loaded Chitosan Microspheres Effect of Triethylene Glycol Glutarate Linked to the Chitosan Molecule on Drug Release, *S.T.P. Pharma Sci.*, **6**(6), 424-429 (1996).
146. M. Çelik, L. Maganti, Formulation and Compaction of Microspheres, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **20**(20), 3151-3173 (1994).
147. N. Erden, N. Çelebi, Biyolojik Olarak Parçalanabilen Polimer Sistemlerin Peptit ve Proteinlere Uygulanması: Sürekli Etki Sağlayan Laktid / Glikolid Mikroküreleri, *FABAD J. Pharm. Sci.*, **18**, 161-171 (1993).
148. S. Yamashita, T. Furubayashi, In Vitro-In Vivo Correlations: Application to Water Insoluble Drugs, *Bul. Tech. Gattefossé*, **91**, 25-31 (1998).

149. Y. Akiyama, M. Yoshioka, H. Horibe, S. Hirai, N. Kitamori, H. Toguchi, Mechanism of Drug Release from Polyglycerol Ester of Fatty Acid-Based Microspheres, *J. Control. Rel.*, **27**, 37-45 (1993).
150. P.G. Jenkins, K. A. Howard, N.W. Blackhall, N.W. Thomas, S.S. Davis, D.T. O'Hagan, Microparticulate Absorption from the Rat Intestine, *J. Control. Rel.*, **29**, 339-350 (1994).
151. D. Ridley, A.C. Perkins, N. Washington, C.G. Wilson, M.L. Wastie, P. O'Flynn, A. Blattman, G. Ponchel, D. Duchêne, The Effect of Posture on Nasal Clearance of Bioadhesive Starch Microspheres, *S.T.P. Pharma Sci.*, **5(6)**, 442-446 (1995).
152. K. Thoma, B. Schlütermann, Relationships Between Manufacturing Parameters and Pharmaceutical-Technological Requirements on Biodegradable Microparticles, *Pharmazie*, **47**, 199 (1992).
153. R.H. Müller, K.H. Wallis, S.D. Tröster, J. Kreuter, In Vitro Characterization of Poly (Methyl-Methacrylate) Nanoparticles and Correlation to Their In Vivo Fate, *J. Control. Rel.*, **20**, 237-246 (1992).
154. P. Arturson, T. Laakso, P. Edman, Acrylic Microspheres In Vivo IX: Blood Elimination Kinetics and Organ Distribution of Microparticles with Different Surface Characteristics, *J. Pharm. Sci.*, **72(12)**, 1415-1420 (1983).
155. S. Rudt, R.H. Müller, In Vitro Phagocytosis Assay of Nano- and Microparticles by Chemiluminescence. III. Uptake of Differently Sized Surface-Modified Particles, and its Correlation to Particle Properties and In Vivo Distribution, *Eur. J. Pharm.Sci.*, **1**, 31-39 (1993).
156. B.G. Müller, H. Leuenberger, T. Kissel, Albumin Nanospheres as Carriers for Passive Drug Targeting: An Optimized Manufacturing Technique, *Pharm. Res.*, **13(1)**, 32-37 (1996).
157. A. Rolland, N. Wagner, A. Chatelus, B. Shroot, H. Schaefer, Site-Specific Drug Delivery to Pilosebaceous Structures Using Polymeric Microspheres, *Pharm. Res.*, **10(12)**, 1738-1744 (1993).

158. B. Arıca, Beyine İlaç Taşınmasında Kullanılan Mikropartiküllü Sistemler, *TÜFTAD Haberler*, **4(6)**, 13 (1997)
159. J.P. Benoit, P. Menei, M.B. Celle, Stereotactic Implantation of Biodegradable 5-Fluorouracil-Loaded Microspheres, *Proceed. Intern. Symp., Control. Rel. Bioact. Mater.*, Controlled Release Society, Inc., **21**, p. 148-149 (1994).
160. J.D. Barackman, M. Singh, M. Ugozzoli, G.S. Ott, D.T. O'Hagan, Oral Immunization with Poly (Lactide-co-Glycolide) Microparticles Containing an Entrapped Recombinant Glycoprotein (gD<sub>2</sub>) from Herpes Simplex Type 2 Virus, *S.T.P. Pharma Sci.*, **8(1)**, 41-46 (1998).
161. L. Fotzing, M. Fillet, I. Bechet, Ph. Hubert, J. Crommen, Determination of Six Water-Soluble Vitamins in a Pharmaceutical Formulation by Capillary Electrophoresis, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, **15**, 1113-1123 (1997).
162. J. Caporal-Gautier, J. M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, M. Lallier, J. J. N'Guyen-Huu, R. Russotto, *S.T.P. Pharma Prat.*, **2(4)**, 205-226 (1992).
163. U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP XXII/NF XVII, Mack Printing Company, Easton, p. 1784-1785 (1990).
164. K. Çiftçi, H.S. Kaş, A.A. Hıncal, T. M. Ercan, O. Güven, Ş. Ruacan, In Vitro and In Vivo Evaluation of PLAGA (50/50) Microspheres Containing 5-Fluorouracil Prepared by a Solvent Evaporation Method, *Int. J. Pharm.*, **131**, 73-82 (1996).
165. İ. Ağabeyoğlu, Sürekli Etki Çözünme Kinetiğine Yeni Bir Denklem ve Kinetik Hesapları için Bir Bilgisayar Programı, Tebliğ, Ulusal Eczacılık Kongresi, İstanbul, Ekim 1981.
166. E.G.C. Clarke, *Isolation and Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press, London, p. 760 (1978).
167. A. Yeşilada, "Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlilik Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemler ve Bu Yöntemlerin Validasyonu", Eds.: L.



- Öner, M. Şumnu, A.A. Hıncal, *Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlilik Genel İlkeler*, Ankara, 171-183 (1995).
168. V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Vismanathan, *Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies, Conference Report*, (December 31, 1990).
169. C.M. Riley, T.W. Rosanske, *Development and Validation of Analytical Methods*, Vol. 3, Hoechst Marion Roussel, Inc., U.S.A., p. 249-292 (1996).
170. N. Ay, H. Mandal, E. Erkmén, B. Karasu, F. Kara, XRD ve XRF Teori ve Uygulama, *Seminer Notları*, Seramik Araştırma Merkezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir (Ocak 1999).
171. M. M. Meshali, A. F. El-Helw, E. A. El-Fattah, A Study on Different Systems for the Preparation of Microcapsules of Water Soluble Drug Using Eudragit-RS as a Wall Forming Material, *Acta Pharm. Fen.*, **101**, 127-134 (1992).
172. F.M. Veronese, F. Marsilio, P. Caliceti, P.D. Filippis, P. Giunchedi, S. Lora, Polyorganophosphazene Microspheres for Drug Release: Polymer Synthesis, Microsphere Preparation, In Vitro and In Vivo Naproxen Release, *J. Control. Rel.*, **52**, 227-237 (1998).
173. M. Demirel, *Piribedil Katı Lipit Partiküllerinin Formülasyonu ve In Vitro-In Vivo Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (1999).