

**PIRİBEDİL KATI LİPİT PARTİKÜLLERİNİN  
FORMÜLASYONU ve İN VİTRO - İN VİVO  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm.Ecz.Müzeyyen DEMİREL**

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda


**DOKTORA TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

**Danışman: Doç.Dr.Yasemin YAZAN**

Şubat 1999

Tezimin tamamının veya bir kısmının fotokopi edilmesine  
veya çoğaltılmasına izin veriyorum.

  
Müzeyyen Demirel

Müzeyyen DEMİREL'in DOKTORA tezi olarak hazırladığı "PİRİBEDİL KATI LİPİT PARTİKÜLLERİNİN FORMÜLASYONU ve İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisanüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

19.03.1999

Üye : Doç.Dr.Yasemin YAZAN( Danışman )

Üye : Prof.Dr.Günsel ALPMEN

Üye : Prof.Dr.Süheyla KAŞ

Üye : Prof.Dr.Nevin ÇELEBİ

Üye : Prof.Dr.Erden GÜLER

---

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 26.02.1999 gün ve 11/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

## ÖZET

Bu çalışmada, suda çözünürlüğü düşük ve kısa eliminasyon yarı ömre sahip dopaminerjik bir etkin madde olan piribedil'in, salım hızını modifiye etmek ve dolayısıyla biyoyararlanımı arttırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, katı lipit bir taşıyıcı ile mikron ve mikronaltı 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.

Hazırlama tekniğinden gelebilecek çözücü artıklarından kaçınabilmek için katı lipit partikül hazırlamaya yönelik olarak, soğuk ve sıcak homojenizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler yardımı ile, uygun partikül boyutu, piribedil yüklemesi ve hazırlama verimi elde edildikten sonra, formülasyon faktörlerinin partikül özelliklerine etkilerini incelemek amacıyla farklı lipit (%2.5, %10), etkin madde ( lipit içersinde %1, %5, %10) ve yüzey etken madde (%1, %1.2, %2.5, %5) konsantrasyonları ve farklı yüzey etken maddeler (Labrasol®, Tween 80®) denenerek farklı formülasyonlar hazırlanmış ve bu faktörlerin partikül özelliklerine etkili oldukları görülmüştür.

Formülasyonların in vitro salımları incelendiğinde, piribedil'in partiküllerden salımında, formülasyon faktörlerinin yanısıra, salım ortamının pH'sının da etkili olduğu görülmüştür. Tüm formülasyonlarda, piribedil'in partiküllerden salımı asit ortamda hızlı bulunmuştur. Piribedil'in mikro- ve nanopartiküllerinden salım kinetiği incelendiğinde bilinen matematiksel modellerden birine uyum saptanamamıştır.

In vitro incelemelerden, çözünme hızı ve partikül büyüklüğü deneyleri ile elde edilen sonuçlara göre seçilen formülasyon ile toz piribedil süspansiyonu farelerde yapılan tremor testiyle karşılaştırılmıştır. Hazırlanan partiküllerde, aktivite görülmemesi, etkin maddenin lipit içinde hapsedildiğini düşündürmüştür. Aynı formülasyon ile hazırlanan süspansiyon, tavşanlara peroral olarak uygulandığında, biyoyararlanımın, toz piribedil süspansiyonu uygulanan tavşanlardaki biyoyararlanımdan daha yüksek olduğu ve piribedil salımının modifiye edildiği görülmüştür.

Sonuç olarak, Parkinson hastalığı tedavisine yönelik geliştirmek istediğimiz piribedil katı lipit partiküllerinin in vitro-in vivo değerlendirmelerinde, salım hızının kontrol edilebileceği ve piribedil biyoyararlanımının artırılabilceği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Mikropartikül, Nanopartikül, Piribedil, In Vitro-In Vivo Değerlendirme

## SUMMARY

In this study, modification of the dissolution rate and thus the enhancement of the bioavailability of a dopaminergic drug, piribedil, which has a low aqueous solubility and short elimination half-life, has been aimed. For this purpose, preparation of micron and submicron particles using solid lipid carriers has been planned.

Experimental data obtained from the studies carried on active and adjuvant materials used in formulations were determined to be in accordance with the reference books and company specifications.

For the avoidance of solvent residues resulting from the preparation technique, cold and hot homogenization methods have been used to prepare solid lipid particles. Following the obtention of appropriate particle size, piribedil loading and preparation yield by the use of those methods, different formulations have been prepared with various lipid (2.5%, 10%), drug (1%, 5%, 10% of lipid) and surfactant (1%, 1.2%, 2.5%, 5%) concentrations and different surfactant materials (Labrasol<sup>®</sup>, Tween 80<sup>®</sup>), to investigate the effects of formulation factors on the particle characteristics. The factors mentioned were found to effect properties of the particles.

When the *in vitro* release from all formulations were examined, pH of the dissolution medium was determined to influence the release of piribedil from particles besides the formulation factors. Piribedil release from all formulations were found to be the fastest in acidic medium. No fit to the mathematical models known could be determined upon investigation of the release kinetics of piribedil from micro- and nanoparticles.

Suspensions of intact piribedil and a formulation selected depending on the results obtained from *in vitro* dissolution and particle size experiments were compared using tremor test in mice. When the same suspension prepared with the same formulation was applied perorally to rabbits, bioavailability was found to be higher than the bioavailability intact of piribedil and that piribedil release was modified.

As a conclusion, after *in vitro-in vivo* evaluation of piribedil solid lipid particles developed for Parkinson's disease therapy, it has been determined that release rate could be controlled and piribedil bioavailability could be improved.

**Key words:** Microparticle, Nanoparticle, Piribedil, In Vitro-In Vivo Evaluation

## TEŞEKKÜR

Bana bu araştırmada her türlü olanağı sağlayan, her zaman bilgilerinden yararlandığım, yardım ve desteğini her an hissettiğim danışman hocam Doç.Dr.Sayın Yasemin YAZAN'a içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında, iki ay süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bana her türlü kolaylığı sağlayan Berlin Freie Üniversitesi'nden Prof.Dr.Sayın Rainer H. MÜLLER'e minnet duygularımı ve sonsuz teşekkürlerimi iletmek isterim.

Yardımlarından dolayı, Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve İlaç Araştırma Merkezi Müdürü Prof.Dr.Sayın K.Hüsnü Can BAŞER'e teşekkürü borç bilirim.

Katkılarından dolayı Yard.Doç.Dr.Sayın Berrin BOZAN'a, Yard.Doç.Dr.Sayın Temel ÖZEK'e ve Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve İlaç Araştırma Merkezi personeline teşekkür ederim.

Ayrıca, değerli yardımlarından dolayı Osmangazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Sayın Kevser EROL'a, Yard.Doç.Dr.Sayın Fatma S.KILIÇ'a ve Arş.Gör. Özlem BATU'ya çok teşekkür ederim.

Yardımlarını benden esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Seramik Mühendisliği Bölümü'nden Yard.Doç.Dr.Sayın Servet TURAN'a teşekkür ederim.

Araştırmamda kullandığım maddelerin ve bazı yayınların temininde yardımcı olan Fransa Gattefosse ve Fransa Technologie Servier İlaç Firması'na içten teşekkürlerimi iletmek isterim.

Literatür teminindeki katkılarından dolayı Paris-Sud Üniversitesi'nden Prof.Dr.Sayın Monique SEILLER'e ve Dr. Gilles PONCHEL'e teşekkür ederim.

Eğitim-öğretim yaşamımda maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan değerli aileme ve eşime teşekkürlerimi iletirim.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgilerini ve yardımlarını gördüğüm bölüm arkadaşlarım, Arş.Gör.Uzm.Ecz.Gülây BÜYÜKKÖROĞLU'na, Arş.Gör.Funda ÖZTAN'a, Arş.Gör. B.Selen KALAVA'ya ve Kimyager Sefa AVCIER'e çok teşekkür ederim.

Müzeyyen DEMİREL

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
SUMMARY .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
1.GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2.KAYNAK BİLGİSİ .....	3
2.1.MİKROPARTİKÜLLER .....	3
2.1.1.    Mikropartikül Hazırlamada Kullanılan Maddeler .....	3
2.1.2.    Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri .....	4
2.1.3.    Mikropartiküllerin Uygulama Yerleri .....	5
2.2.NANOPARTİKÜLLER .....	5
2.2.1.    Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Maddeler .....	6
2.2.1.1.    Matris Maddeler .....	6
2.2.1.2.    Yüzey Etken Maddeler .....	7
2.2.2.    Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri .....	8
2.2.3.    Nanopartiküllerin Uygulama Yerleri .....	8
2.2.4.    Katı Lipit Nanopartiküller (SLN) .....	8
2.2.4.1.    Hazırlama Yöntemleri .....	10
2.2.4.1.1.    Sıcak Homojenizasyon Yöntemi .....	11
2.2.4.1.2.    Soğuk Homojenizasyon Yöntemi .....	12
2.2.4.2.    Karakterizasyon .....	12
2.2.4.2.1.    Partikül Şekli ve Boyutu .....	12
2.2.4.2.2.    İlaç Yüklenmesi ve Hapsedilmesi .....	13
2.2.4.2.3.    Rekristallenme Özellikleri .....	13
2.2.4.2.4.    Salım Hızı .....	14
2.2.4.3.    Stabilite .....	15
2.2.4.4.    Etkin Madde Hedeflemesi .....	16

2.2.4.5.	Toksosite .....	16
2.2.4.6.	Sterilizasyon .....	16
2.3.	MİKROPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERDEN ETKİN MADDE SALIMI .....	17
2.3.1.	Etkin Madde Salımının İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	17
2.3.2.	Salım Mekanizması .....	18
2.3.3.	Etkin Madde Salımını Etkileyen Faktörler .....	21
2.4.	PARKİNSON HASTALIĞI .....	22
2.5.	PIRİBEDİL .....	25
2.5.1.	Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri .....	25
2.5.2.	Tarihçesi .....	25
2.5.3.	Analiz Yöntemleri .....	26
2.5.4.	Farmakolojik Özellikleri .....	26
2.5.4.1.	Etki Mekanizması .....	27
2.5.4.2.	Farmakokinetiği .....	27
2.5.5.	Yan Etkileri ve Toksikitesi .....	30
2.6.	GLİSERİL BEHENAT (Compritol 888 ATO®) .....	30
3.	GEREÇ ve YÖNTEMLER .....	32
3.1.	MADDE ve CİHAZLAR .....	32
3.1.1.	Kullanılan Maddeler .....	32
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar .....	32
3.2.	YÖNTEMLER .....	33
3.2.1.	Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinler .....	33
3.2.1.1.	Piribedil ile Yapılan Çalışmalar .....	33
3.2.1.1.1.	Spektrumlar .....	33
3.2.1.1.1.1.	UV-Spektrumu .....	33
3.2.1.1.1.2.	IR-Spektrumu .....	34
3.2.1.1.2.	İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) .....	34

3.2.1.1.3.	Erime Derecesi Tayini .....	34
3.2.1.1.4.	Termal Analiz .....	34
3.2.1.1.5.	Piribedil Miktar Tayini .....	34
3.2.1.1.5.1.	UV-Spektrofotometre için Validasyon Çalışmaları .....	34
3.2.1.1.5.1.1.	Doğrusallık .....	34
3.2.1.1.5.1.2.	Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik .....	35
3.2.1.1.5.1.3.	Seçicilik .....	35
3.2.1.1.5.2.	YBSK için Validasyon Çalışmaları .....	35
3.2.1.1.5.2.1.	Doğrusallık .....	35
3.2.1.1.5.2.2.	Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik .....	35
3.2.1.1.5.2.3.	Seçicilik .....	35
3.2.1.1.6.	Çözünürlük Tayinleri .....	36
3.2.1.1.6.1.	Farklı Sıvı Ortamlardaki Çözünürlük Tayini .....	36
3.2.1.1.6.2.	Kullanılan Lipit İçindeki Çözünürlük Tayini .....	36
3.2.1.1.7.	Partikül Boyut Analizi .....	36
3.2.1.1.8.	X-Işını Kırınım Analizi .....	36
3.2.1.2.	Compritol® ile Yapılan Çalışmalar .....	36
3.2.1.2.1.	IR-Spektrumu .....	36
3.2.1.2.2.	Erime Derecesi Tayini .....	37
3.2.1.2.3.	Termal Analiz .....	37
3.2.1.2.4.	Reolojik Analiz .....	37
3.2.1.2.5.	X-Işını Kırınım Analizi .....	37
3.2.2.	Mikro- ve Nanopartiküller ile Yapılan Çalışmalar .....	37
3.2.2.1.	Formülasyonları .....	37
3.2.2.1.1.	Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Formülasyonlar .....	37
3.2.2.1.2.	Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Formülasyonlar .....	38
3.2.2.2.	Hazırlanışları .....	38
3.2.2.2.1.	Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlama .....	38



3.2.2.2.2.	Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlama .....	40
3.2.2.3.	Mikro- ve Nanopartiküllerin Özelliklerine ait Çalışmalar .....	41
3.2.2.3.1.	Şekilleri .....	41
3.2.2.3.2.	Partikül Büyüklük Dağılımları .....	41
3.2.2.3.3.	IR Analizleri .....	41
3.2.2.3.4.	Termal Analizleri .....	42
3.2.2.3.5.	Hazırlama Verimi .....	42
3.2.2.3.6.	Partiküllerde Piribedil Miktar Tayini .....	42
3.2.2.3.6.1.	Partiküllerde Yüklenen Piribedil Miktarı .....	42
3.2.2.3.6.1.1.	Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerde Toplam Piribedil Miktarı .....	42
3.2.2.3.6.1.2.	Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerde Toplam Piribedil Miktarı .....	42
3.2.2.3.6.2.	Partiküllerde Hapsedilen Piribedil Miktarı .....	42
3.2.2.3.7.	Saklama Koşullarında Stabilite Kontrolü .....	43
3.2.2.3.8.	X-Işını Kırınım Analizi .....	43
3.2.2.4.	Mikro- ve Nanopartiküller ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar .....	43
3.2.2.4.1.	İN Vitro Salım Çalışmaları .....	43
3.2.2.4.2.	pH 1.2 Salım Ortamındaki Stabilite Kontrolü .....	44
3.2.2.5.	İN Vivo Çalışmalar .....	44
3.2.2.5.1.	Farelerde Parkinson Modeli ile Tremor Testi .....	45
3.2.2.5.2.	Tavşanlarda Peroral Biyoyararlanım Çalışması .....	45
3.2.2.5.2.1.	Plazmadaki Piribedil'in Ekstraksiyon ile Ayrılması .....	45
3.2.2.5.2.2.	Plazmadan Ekstraksiyon ile Geri Kazanılan Piribedil Oranının Hesaplanması .....	46
3.2.2.5.2.3.	Plazmadaki Piribedil'in YBSK ile Miktar Tayini .....	46
4.	SONUÇ ve TARTIŞMA .....	48
4.1.	SONUÇLAR .....	48

4.1.1.	Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinlere ait Sonuçlar .....	48
4.1.1.1.	Piribedil ile Yapılan Çalışmalara ait Sonuçlar .....	48
4.1.1.1.1.	Spektrumlar .....	48
4.1.1.1.1.1.	UV-Spektrumu .....	48
4.1.1.1.1.2.	IR-Spektrumu .....	48
4.1.1.1.2.	İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) .....	49
4.1.1.1.3.	Erime Derecesi .....	50
4.1.1.1.4.	Termal Analiz .....	50
4.1.1.1.5.	Piribedil Miktar Tayini .....	51
4.1.1.1.5.1.	UV- Spektrofotometresi ile Validasyon Çalışmaları .....	51
4.1.1.1.5.1.1.	Doğrusallık .....	51
4.1.1.1.5.1.2.	Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik .....	52
4.1.1.1.5.1.3.	Seçicilik .....	52
4.1.1.1.5.2.	YBSK ile Validasyon Çalışmaları .....	52
4.1.1.1.5.2.1.	Doğrusallık .....	52
4.1.1.1.5.2.2.	Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik .....	53
4.1.1.1.5.2.3.	Seçicilik .....	53
4.1.1.1.6.	Çözünürlük Tayinleri .....	54
4.1.1.1.6.1.	Farklı Ortamlardaki Çözünürlük Tayini .....	54
4.1.1.1.6.2.	Kullanılan Lipit İçindeki Çözünürlük Tayini .....	54
4.1.1.1.7.	Partikül Boyut Analizi .....	55
4.1.1.1.8.	X-Işını Kırınım Analizi .....	56
4.1.1.2.	Compritol® ile Yapılan Çalışmalara ait Sonuçlar .....	57
4.1.1.2.1.	IR-Spektrumu .....	57
4.1.1.2.2.	Erime Derecesi .....	57
4.1.1.2.3.	Termal Analiz .....	57
4.1.1.2.4.	Reolojik Analiz .....	58
4.1.1.2.5.	X-Işını Kırınım Analizi .....	59

4.1.2.	Mikro- ve Nanopartiküller ile Yapılan Çalışmalara ait Sonuçlar .....	59
4.1.2.1.	Formülasyonları .....	59
4.1.2.2.	Mikro- ve Nanopartiküllerin Özelliklerine ait Sonuçlar .....	60
4.1.2.2.1.	Şekilleri .....	60
4.1.2.2.2.	Partikül Büyüklük Dağılımları .....	60
4.1.2.2.3.	Infrared Analizleri .....	67
4.1.2.2.4.	Termal Analizleri .....	69
4.1.2.2.5.	Hazırlama Verimi .....	72
4.1.2.2.6.	Partiküllerde Piribedil Miktar Tayinleri .....	72
4.1.2.2.6.1.	Partiküllerde Yüklenen Piribedil Miktarı .....	72
4.1.2.2.6.1.1.	Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerde Toplam Piribedil Miktarı .....	72
4.1.2.2.6.1.2.	Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerde Toplam Piribedil Miktarı .....	72
4.1.2.2.6.2.	Partiküllerde Hapsedilen Piribedil Miktarı .....	72
4.1.2.2.7.	Saklama Koşullarında Stabilite Kontrolü .....	73
4.1.2.2.8.	X-Işını Kırınım Analizi .....	74
4.1.2.3.	Mikro- ve Nanopartiküller ile Yapılan İn Vitro Çalışmalara ait Sonuçlar .....	75
4.1.2.3.1.	İN Vitro Salım Çalışmaları .....	75
4.1.2.3.2.	pH 1.2 Salım Ortamındaki Stabilite Kontrolü .....	76
4.1.2.4.	Mikropartiküller ile Yapılan İn Vivo Çalışmalara ait Sonuçlar .....	79
4.1.2.4.1.	Farelerde Parkinson Modeli ile Tremor Testi .....	79
4.1.2.4.2.	Tavşanlarda Peroral Biyoyararlanım Çalışması .....	79
4.1.2.4.3.	Plazmadan Ekstraksiyon ile Geri Kazanılan Piribedil Oranının Hesaplanması .....	82
4.2.	TARTIŞMA .....	82
4.2.1.	Çalışılan Maddelere ait Değerlendirmeler .....	82

4.2.1.1.	Piribedil .....	82
4.2.1.2.	Compritol® .....	83
4.2.2.	Çalışılan Mikro- ve Nanopartiküllere ait Değerlendirmeler .....	84
4.2.2.1.	Formülasyonları .....	84
4.2.2.2.	Özellikleri .....	85
4.2.2.3.	İn Vitro Çalışmalar .....	89
4.2.2.4.	İn Vivo Çalışmalar .....	91
5. KAYNAKLAR .....		94
ÖZGEÇMİŞ .....		111

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.	Mikropartiküller: Mikroküreler (a), Mikrokapsüller (b), Multinükleer Mikrokapsüller (c) ve Heterojenik Mikroküreler (d) .....	3
Şekil 2.	Nanopartiküller .....	5
Şekil 3.	Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Katı Lipit Nanopartikül Hazırlanması .....	11
Şekil 4.	Partikül ve Sürekli Faz Arasında Etkin Maddenin Difüzyon Dengesi .....	19
Şekil 5.	Etkin Madde İçeren Çekirdek-Çeper Mikropartiküllerinin Yatay Kesitlerinin Teorik Yapısı ve Salım Mekanizması .....	20
Şekil 6.	Piribedil'in Kimyasal Yapısı .....	25
Şekil 7.	Beyindeki Serebral Yolaklar .....	28
Şekil 8.	Piribedil (PD) ve Kateşol ( $M_1$ ), p-Hidroksilat ( $M_2$ ) ve N-Oksit ( $M_3$ ) Metabolitlerinin Kimyasal Yapısı .....	29
Şekil 9.	Soğuk Homojenizasyon Tekniği ile Piribedil Mikropartiküllerinin Hazırlanma Aşamaları .....	40
Şekil 10.	Sıcak Homojenizasyon Tekniği ile Piribedil Mikro- ve Nanopartiküllerinin Hazırlanma Aşamaları .....	41
Şekil 11.	Piribedil'in Farklı Ortamlardaki UV-Spektrumları .....	48
Şekil 12.	Piribedil'in IR-Spektrumu .....	49
Şekil 13.	Piribedil'in DSC Termogramı .....	50
Şekil 14.	Piribedil'in Farklı Ortamlardaki Standart Eğrileri .....	51
Şekil 15.	Piribedil'in YBSK ile Standart Eğrisi .....	53
Şekil 16.	Standart Piribedil ve Buspiron'un YBSK ile Kromatogramı .....	53
Şekil 17.	%1 Oranında Piribedil İçeren Piribedil ve Compritol® Karışımının DSC Termogramı .....	54
Şekil 18.	%5 Oranında Piribedil İçeren Piribedil ve Compritol® Karışımının DSC Termogramı .....	55

Şekil 19.	%10 Oranında Piribedil İçeren Piribedil ve Compritol® Karışımının DSC Termogramı .....	55
Şekil 20.	Piribedil'in Partikül Boyut Dağılımı .....	56
Şekil 21.	Piribedil'in X- Işını Kırınım Profili .....	56
Şekil 22.	Compritol®'ün IR Spektrumu .....	57
Şekil 23.	Compritol®'ün DSC Termogramı .....	58
Şekil 24.	Compritol®'ün Reogramı .....	58
Şekil 25.	Compritol®'ün X- Işını Kırınım Analizi .....	60
Şekil 26.	Piribedil'in Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri .....	61
Şekil 27.	Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri .....	62
Şekil 28.	Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri .....	63
Şekil 29.	Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri .....	64
Şekil 30.	Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Mikro- ve Nanopartiküllerin Partikül Dağılım Grafikleri .....	65
Şekil 31.	Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Partikül Dağılım Grafikleri .....	66
Şekil 32.	Hazırlanan Mikro- ve Nanopartiküllerin IR Spektrumları .....	67
Şekil 33.	Hazırlanan Mikro- ve Nanopartiküllerin DSC Termogramları .....	69
Şekil 34.	Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerin X-Işını Kırınım Eğrisi ...	74
Şekil 35.	Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerin X-Işını Kırınım Eğrisi ....	74
Şekil 36.	Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin Distile Su Ortamında Salım Profilleri .....	77

Şekil 37.	Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin pH 1.2 Ortamında Salım Profilleri .....	78
Şekil 38.	Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin pH 7.4 Ortamında Salım Profilleri .....	78
Şekil 39.	Tavşan Plazmalarında Toz Piribedil ve Mikropartikülünün YBSK Kromatogramları .....	80
Şekil 40.	Toz Piribedil ve Mikropartikülünün Tavşanlardaki Kan Profilleri .....	81

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa

Tablo 1.	IV Kontrollü İlaç Dağıtımını İçin Kullanılan Konvensiyonel Partiküler Sistemlerin Katı Lipit Nanopartiküllere Göre Özellikleri .....	10
Tablo 2.	Soğuk Homojenizasyon Tekniğinde Kullanılan Parametreler .....	38
Tablo 3.	Sıcak Homojenizasyon Tekniğinde Kullanılan Parametreler .....	39
Tablo 4.	Mikro- ve Nanopartikül Formülasyonlarının Kodları .....	39
Tablo 5.	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Çalışma Koşulları .....	46
Tablo 6.	Piribedil'in Farklı Ortamlarda Elde Edilen UV-Spektrumlarındaki Dalga Boyları .....	49
Tablo 7.	Piribedil'in İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanınmasına ait Sonuçlar .....	50
Tablo 8.	Piribedil'in Farklı Ortamlardaki Standart Eğri Denklemlerine ait Değerler .....	51
Tablo 9.	UV-Spektrofotometrik Yönteme ait Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik Sonuçları ..	52
Tablo 10.	Piribedil'in Farklı Ortamlardaki Çözünürlük Değerleri ve Standart Sapmaları .....	54
Tablo 11.	Piribedil'in Partikül Büyüklüğü Dağılım Bulguları .....	55
Tablo 12.	Compritol®'ün Reolojik Analizine ait Sonuçlar .....	59
Tablo 13.	Mikro- ve Nanopartiküllerin Partikül Büyüklük Dağılım Bulguları .....	65
Tablo 14.	Piribedil Mikro- ve Nanopartiküllerinin DSC Termogramlarına ait Bulgular .....	71
Tablo 15.	Mikropartikül Hazırlama Verimleri .....	72
Tablo 16.	Mikro- ve Nanopartiküllerde Yüklenen ve Hapsedilen Piribedil Yüzdeleri .....	73
Tablo 17.	Mikropartiküllerin Saklama Koşullarındaki Rf Değerleri .....	73
Tablo 18.	Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin Distile Su Ortamında Salım Yüzdeleri .....	75
Tablo 19.	Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin pH 1.2 Ortamında Salım Yüzdeleri .....	76



Tablo 20.	Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin pH 7.4 Ortamında Salım Yüzdeleri .....	77
Tablo 21.	Piribedil'in pH 1.2 Salım Ortamındaki Rf Değerleri .....	76
Tablo 22.	Tremor Testi Skor Ortalamaları ve Student t-testi Değerlendirme Sonuçları ...	79
Tablo 23.	Toz Piribedil ve Mikropartikülünün Peroral Verilişinin Ardından Tavşan Kanındaki Miktarları .....	81
Tablo 24.	Toz Piribedil ve Mikropartikülünün Biyoyararlanım Değerleri .....	81

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Her geçen gün gelişen farmasötik teknolojiyle birlikte konvansiyonel 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 etkili olarak hastaya vermeyi amaçlamaktadır. Aynı zamanda, bu sistemler, etkin maddeyi polimer (membran, matris) içine gömerek, kararlılığın sağlanması, yan etkilerin azaltılması ve etkin madde salım hızının modifiye edilmesi gibi birçok avantajlar sunmaktadır (1).

Polimerik mikro- ve nanopartiküller, genellikle, emülsiyon polimerizasyonu ve çözücü uçurulması gibi tekniklerle hazırlandıkları için toksik bozunma ürünleri, çözücü artıkları ve organik çözücüler tamamen uzak tutulamamaktadır. Bunun sonucunda ise hazırlama yönteminden gelen kontaminasyon riski vardır (2). Çalışmamızda, çözücü artıklarından kaçınmak amacıyla, hazırlama aşamalarında organik bir çözücüye gereksinim göstermeyen katı lipit taşıyıcı sistem düşünülmüştür. Bu tipte bir sistem olan, hazırlamayı amaçladığımız katı lipit nanopartiküller (SLN), diğer kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlere (polimerik nanopartiküller, emülsiyonlar, lipozomlar) bir alternatif olarak ortaya konmuş partiküler taşıyıcı sistemlerdir (3,4). Bunun yanısıra, katı lipit nanopartiküller, suda az çözünen lipofilik ilaçlar için intravenöz dağıtımına uygun sistemlerdir (5,6). Bilindiği üzere bu sistemler, sulu bir faz içinde erimiş lipitlerin emülsifikasyonu ile hazırlanmakta ve taşıyıcı matris olarak, oda sıcaklığında katı olan lipitler kullanılmaktadır (2).

Formülasyonları düşünülen partiküllerde etkin madde olarak dopamin agonisti, vazodilatör etkili bir ilaç olan piribedil seçilmiştir (7,8). Piribedil, serebral yaşlanma ve Parkinson hastalığında yaygın olarak kullanılan dopaminerjik bir maddedir. Parkinson hastalığı, yoğun dopamin eksikliğinin eşlik ettiği bir çeşit lokalize serebral yaşlanmadır ve geçmişine bakılacak olursa, genellikle 50 yaşın üzerindeki bireylerin yaklaşık %10'unda oluşmaktadır (9). Piribedil ile Parkinson hastalığının tedavisinde belirgin iyileşmeler sağlanmakta ancak tedavi sırasındaki sık ilaç alımından ve yan etkilerinden kaynaklanan sakıncaları bulunmaktadır. Bu nedenle, ilacın yan etkilerini 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, yüksek dozlarda dahi yan etkileri sınırlı ve uzatılmış salım sağlama potansiyeli olan gliseril behenat (Compritol®) tercih edilmiştir. Gliseril behenat, yağ asitleri ve gliseritlerinin bir karışımı olup, ana yapısı behenik asittir (10,11). Son zamanlarda, gliseril behenat, dikkate değer ayrıcalıkları ile sürekli etkili formülasyonlarda sık kullanılan bir bileşen olmuştur (12).

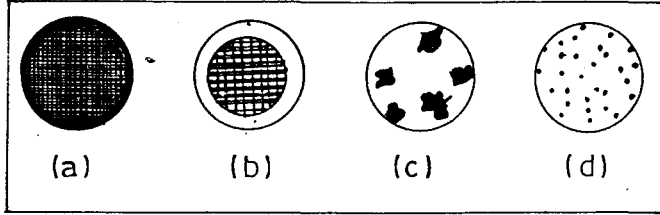
Farklı hazırlama yöntemleri ve konsantrasyon oranları ile hazırlanacak partiküllerde, önce in vitro çalışmalarla partiküllerin özellikleri (şekil, partikül büyüklüğü dağılımı, piribedil yüklenmesi, piribedil salımı ve stabilite) saptanacak, daha sonra in vivo çalışmalar ile sonuçlar karşılaştırılacaktır. Bu çalışmalara başlamadan önce, kullanılacak etkin madde ve lipitin spesifikasyonlara uygunlukları tespit edilecek, etkin maddenin in vitro ve in vivo miktar tayinleri için seçilen yöntemlerin validasyonu gerçekleştirilecektir. İn vitro çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre seçilecek bir formülasyon, biri farmakodinamik (farelerde Parkinson modeli ile tremor testi), diğeri biyofarmasötik (tavşanlarda peroral biyoyararlanım çalışması) testler olan in vivo çalışmalarla, toz piribedil ile karşılaştırılacaktır. Böylece, lipofilik bir etkin madde olan piribedil'in katı lipit taşıyıcı sistem içinde mikro- ve nanopartiküllerinin geliştirilmesi ile sık ilaç alımının azaltılmasına ve ilacın biyoyararlanımına ne oranda katkıda bulunabileceğimiz araştırılacaktır.

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. MİKROPARTİKÜLLER

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 tespit edilmiştir (1,13-15).

Mikropartiküler sistemlerin birçok sınıflandırması yapılmıştır. Yapısal karakteristiklerine bağlı olarak özellikle mikroküreler ve mikrokapsüller olarak isimlendirilebilirler. Mikrokapsüller membran ile çevrelenmiş, katı veya sıvı ilaç çekirdeğinden oluşan partiküllerdir (Şekil 1b). Mikroküreler ise, ilacın, polimer matriste baştan başa disperse olduğu veya çözündüğü, monolitik veya homojen karakterli partiküler veya moleküler halde iyi aglomere olmuş partiküller olarak tanımlanabilir (Şekil 1a) (1,13). Mikropartikül genel terimi kullanılmalıdır, çünkü, sıklıkla mikrokapsül ve mikroküreleri birbirinden ayırdetmek çok güçtür. Mikropartiküller, birkaç ilaç kristali içerdiğinde, multinükleer mikrokapsüller (Şekil 1c) veya heterojenik mikroküreler (Şekil 1d) olarak nitelendirilirler (1,13,16).



Şekil 1. Mikropartiküller: Mikroküreler (a), Mikrokapsüller (b), Multinükleer Mikrokapsüller (c) ve Heterojenik Mikroküreler (d)

#### 2.1.1. Mikropartikül Hazırlamada Kullanılan Maddeler

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 (17). Polimer materyalinin 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 etkin madde salımı, büyük oranda polimerin tipine bağlıdır (18).

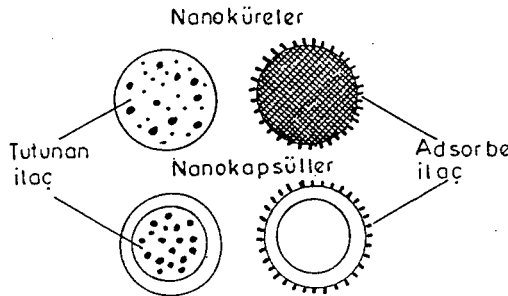
### 2.1.3. Mikropartiküllerin Uygulama Yerleri

Mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemler farklı yollar ile verilebilirler: tablet veya jelatin kapsül içine konularak oral (67); nazal olarak transmukozal (68); intraperitoneal; intraartiküler; subkütan; intramüsküler ve intravenöz. Mikropartiküler sistemlerin oral yol ile verilmesi birçok avantaj taşır. Bu sistemler, gastrointestinal alan içinde genişçe yayılarak düzenli hareketleri ile etkin maddeyi kontrollü salabilirler, etkin maddelerin emilimini artırırlar ve mide veya barsak mukozasındaki irritasyonu azaltırlar (1,69). Mikropartiküler ilaç dağıtım sisteminin oral verilmesi ile, özellikle kronik ilaç kullanılması durumunda, polimerik maddelerin istenmeyen retansiyonundan sakınılabılır (1).

Mikropartiküllerin parenteral ve oftalmik uygulamalarında, partikül büyüklükleri önemlidir. Parenteral uygulama için, subkütan veya intramüsküler enjeksiyonda, iğneden kolaylıkla geçmesini sağlamak açısından yeterli derecede ufak olmalıdır. Bundan dolayı, küçük partiküllerin üretilmesi hazırlama işleminde önemli bir koşuldur (70). Parenteral uygulamalarda, mikropartikül boyutunun 20-40  $\mu\text{m}$  olması istenir (1,71). Damarların tıkanması için büyük partiküllere ihtiyaç vardır (200-800  $\mu\text{m}$ ), fakat yine de kimyasal embolizasyon beklenebilir. İntravenöz enjeksiyondan sonra, mikropartiküllerin kandan eliminasyonu partiküllerin yüzey özelliklerine bağlıdır (72-74). Oysa, retikuloendotelial sistemde partiküller yüzey özelliklerine bağlı olmaksızın lokalize olurlar (73). Parenteral ilaç taşıyıcılar vasıtasıyla özel yerlere etkin madde taşınması başarılı bir stratejidir, çünkü diğer 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 yapılabilen ve etkin maddenin hedef bölgede kontrol edilebilen bir hızla salımı sağlanmaktadır (75-77).

## 2.2. NANOPARTİKÜLLER

Nanopartiküller, çapları 10-1000 nm arasında değişen stabil, katı, kolloidal partiküllerdir (78-82). Polimerik materyaller içinde çözünmüş, enkapsüle olmuş ve/veya adsorbe olmuş, ilaç, enzim veya antijenlerden oluşurlar (79,81).



Şekil 2. Nanopartiküller

Nanopartikül terimi, kabuk benzeri çeperli nanokapsüllerin yanısıra monolitik matris tipi sistemleri de içerir (nanoküreler) (82).

Nanopartiküller, küçük boyutları nedeniyle suda hemen dağılırlar ve mikropartiküllerin aksine ince kanallı enjektör iğnelerinden geçebilen berrak, koloidal dağılımlar oluştururlar (83). Nanopartiküller diğer koloidal ilaç sistemlerine göre üstün özelliğe sahiptirler. Bu da, özellikle farklı veriliş yollarından sonra vücut sıvılarında daha stabil olmalarıdır (82). Ayrıca, nanopartiküller, nispeten kolay üretim yöntemleri ve uzun raf ömürleri ile kolaylıkla saklanabildiklerinden, lipozomlara göre avantaj sağlarlar (84). Nanopartikül materyallerinin ve üretim yöntemlerinin farklılık gösterebilmesi de avantaj sağlar. Bu nedenle, nanopartiküller çok ümit verici ilaç dağıtım sistemleri olarak gösterilmektedir. Diğer koloidal taşıyıcı sistemler üzerindeki en büyük avantajları ise nanopartiküllerin dondurularak kurutulabilmesi ve dolayısıyla stabilitelerinin yükselmesidir (85).

İdeal bir nanopartikül ilaç dağıtım sistemi şu özellikleri taşımalıdır:

- 1) İstenen etki yerinde toplanmalı veya kalmalı,
- 2) Etkin madde, istenen etki yerinde uygun hızda salınmalı,
- 3) Uygulaması kolay ve stabilitesi açısından farmasötik olarak kabul edilebilir olmalı,
- 4) Parenteral kullanım düşünülüyor ise sterilize edilebilmeli,
- 5) Taşıyıcı materyal nontoksik ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır (83,86).

## **2.2.1. Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Maddeler**

### **2.2.1.1. Matris Maddeler**

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

- Organizmada parçalanabilmeli,
- Salım hızını denetleyebilmeli,
- Antijenik etkiye sahip olmamalı,
- Toksik etkisi çok az olmalı,
- Biyolojik yarılanma ömrü yeterince uzun olmalıdır (75).

Nanopartikül hazırlamada biyopolimerlerin yanısıra yapay polimerler de kullanılabilir (82).

Akrilatlar, oral dozaj şekillerinde kaplama materyali olarak kullanılmakta olduklarından ve hızla parçalanmaları nedeniyle uzun etkili preparat hazırlama olanağı

verdiklerinden (83), nanopartikül hazırlamada pekçok kez kullanılmışlardır (87,88-91). Poliakrilamid kullanarak hazırlanan nanopartiküllerde karşılaşılan başlıca sorun, ürün tamamlandıktan sonra monomer artıklarının toksisite tehlikesidir. Polialkilsiyanoakrilat nanopartiküllerinin ise, alkil zincir uzunluğuna bağlı olarak belli hızda parçalandıkları gösterilmiştir. İlaçsız polialkilsiyanoakrilat nanopartiküllerinin toksisitesi, kültür hücreleri ve hayvanlar üzerinde araştırıldığı zaman, akut toksisiteye rastlanmamıştır (83). Bu taşıyıcıların kendilerinin toksik olmamaları ve denenen antikanser bir ilacın yan etkilerinde bir azalmaya neden olmaları kanser tedavisi için umut vericidir (83).

Doğal makromoleküllerden hazırlanmış nanopartiküller de, biyolojik ortamda parçalanabilir oluşları ve toksik olmamaları nedeniyle üstünlük taşımaktadırlar (83). Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan doğal makromoleküllere örnek, proteinler (jelatin, albümin) ve polisakkaritler'dir (maltodekstrin, nişasta) (92).

#### **2.2.1.2. Yüzey Etken Maddeler**

Kullanılan yüzey etken maddeler mikrokürelerin emülsifikasyon ile oluşumunda önemli bir rol oynarlar. Mikrokürelerin özellikleri, yüzey etken maddelerin tipi ve HLB'sinden etkilenmektedir. Daha çok yağ asiti zincirlerinden oluşan aynı HLB'deki yüzey etken maddeler ile üretilen mikroküreler büyüktür ve yüksek etkin madde içeriklerine sahiptirler. Buna karşılık uzun polioksietilen zincirli yüzey etken maddeler ile üretilen mikroküreler küçüktür. Etkin madde içeriğinde de HLB etkilidir. Etkin madde salım hızı genellikle düşük HLB'ye sahip yüzey etken maddeler ile yavaşlatılır. Hazırlama yöntemi de önemlidir. Etkin madde içeren sulu faza hidrofilik yüzey etken maddenin ilavesi ile düşük enkapsülasyon verimi ile büyük mikroküreler hazırlanır. Hazırlanan üründe bol miktarda serbest etkin madde ve sonuçta hızlı salım görülür (93).

Farklı HLB'lerdeki polioksietilen sorbitan trioleat ve sorbitan trioleat'ın karışımları kullanıldığında elde edilen sonuçlar, mikrokürelerin oluşumunda HLB ve yüzey etken madde konsantrasyonunun önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Mikropartiküllerin büyüklükleri ve büyüklük dağılımları HLB tarafından anlamlı olarak etkilenmiştir. Bununla birlikte HLB enkapsülasyonu değiştirmemiş fakat etkin madde salım hızını etkilemiştir (94). Buna paralel olarak yapılan bir başka çalışmada da, kullanılan yüzey etken maddenin HLB değerinin uygun olarak seçilmesi ile etkin madde salımının regüle edilebileceği vurgulanmıştır (63). Yapılan bir başka çalışmada ise, yüzey etken maddenin HLB'si ile, hazırlanan partiküllerin büyüklüğü arasında bir korelasyon olmadığı bulunmuştur (95). Bir diğer çalışmada da HLB değeri 15 olan Tween 80<sup>®</sup>, en iyi kolloidal ilaç dağıtıcı madde olarak gösterilmiştir (87).

### **2.2.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri**

Nanopartiküller çok farklı yöntemlerle hazırlanabilirler (81). Uygun üretim yönteminin seçimi esas olarak nanopartiküler taşıyıcı içindeki etkin maddenin özelliklerine bağlıdır. Hidrofobik etkin maddeler için kullanılan bir yöntemde, sulu bir sürekli faz kullanılabilir. Hidrofilik etkin maddeler için ise hidrofobik bir sürekli faz uygundur (85).

Nanopartikül hazırlama yöntemleri:

#### **1) Polimerizasyon reaksiyonları ile hazırlama**

##### **a- Sulu bir sürekli faz içinde emülsiyon polimerizasyonu**

Günümüzde, nanopartiküllerin hazırlanmasında en yaygın yöntem, sulu bir sürekli faz içinde emülsiyon polimerizasyonudur (89,96-101).

##### **b- Organik bir sürekli faz içinde emülsiyon polimerizasyonu**

#### **2) Doğal makromoleküllerden hazırlama**

#### **3) Çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlama (102,103).**

### **2.2.3. Nanopartiküllerin Uygulama Yerleri**

Nanopartiküller esas olarak, etkin maddelerin etki yerine hedeflendirilmesi (104-106), sürekli etkin madde salımı (107,108) ve oral (91,109,110) ya da oküler (90,111-113) biyoyararlılığın artırılması amaçları için önerilmektedir (95). Parenteral (110,114), intravenöz (115-118) ve intraarteryel veriliş yolları özellikle hedefleme için kullanılmaktadır. Sistemik sürekli etki, etkin madde yüklü nanopartiküllerin subkütan (119) veya intramusküler (116) yolla verilmesiyle sağlanabilmektedir.

Kolloidal ilaç dağıtım sistemleri esasen parenteral verilişi amaçladığı halde, nanopartiküller yukarıdakilere ek olarak değişik yollarla da verilirler (104). Bunlar transdermal (120), lenfatik (82) ve topik'tir (110). Ayrıca aşılarında yardımcı olarak da kullanım yeri bulmuşlardır (82).

### **2.2.4. Katı Lipit Nanopartiküller (SLN)**

Sulu çözeltileri halinde parenteral olarak verilemeyecek, sudaki çözünürlüğü yetersiz olan etkin maddeler için mikronaltı büyüklükte taşıyıcı sistemler geliştirmek amacı ile birçok yaklaşımlarda bulunulmuştur. Bu amacın yanısıra, etkin maddenin hedef organa ulaştırılması ve kontrollü salım için de, polimerik nanopartiküller ve mikroküreler, lipozomlar ve lipit emülsiyonlar kullanılmıştır (2). Oysa, hidrofobik etkin maddelerin parenteral olarak uygulanmasında bu taşıyıcı sistemlerle birçok dezavantaj söz konusudur. Emülsiyon polimerizasyonu ve çözücü uçurulması teknikleri ile hazırlanan polimerik nanopartiküller ve mikrokürelerin, üretim işleminden gelen artık organik çözücü, toksik monomer ve toksik bozunma ürünleri ile kontaminasyon riski vardır (2).



Polimerik nano- ve mikropartiküllerin dezavantajları (121):

- 4 haftaya kadar ulaşan oldukça düşük parçalanma ile retikuloendotelial sistemi bozarak sistemik toksik etkilere neden olabilir (122);
- Polilaktit (PLA) ve polilaktit/glikolit (PLA/GA) partiküllerinin insan granülositleri ve makrofajları tarafından fagositozundan sonra in vitro sitotoksik etkiler gözlenebilir (123);
- Üretimden gelen toksik artıklar (örneğin, çözücü uçurulması kullanıldığında organik çözücüler);
- Endüstriyel ölçekte üretim için yöntem olmaması;
- Otoklav ile sterilize etmek mümkün değildir. Gama ışınları ile sterilizasyon sonucu radikallerin ve ardından toksik reaksiyon ürünlerinin oluşum olasılığı (124).

Lipit bazlı bir sistem olan lipozomlar fizyolojik bileşenlerden oluşur. Bu sistemlerde fizikokimyasal kararsızlık söz konusudur. Füzyon eğiliminden dolayı, saklama sırasında kararsızlık gösterirler; lipoproteinlerdeki lipitlerle yer değiştirebileceğinden vasküler sistemde genellikle kararsızdırlar; vezikül büyüklüğü ve özelliklerinin tekrarlanabilir olamaması, büyük ölçekte hazırlanmalarını engellemektedir (125).

Uzun yıllardan bu yana kullanılmakta olan yağ emülsiyonları ise büyük ölçekte hazırlanabilmelerine karşın, bir çok etkin maddenin yağ damlacıkları ve kan arasındaki dağılımının yüksek olması nedeni ile salımları çok hızlıdır (121). Lipit sistemlerle ilgili diğer bir problem de, ilacın saklama sırasında dışarı ve vücut sıvılarına sızmasıdır (2).

Tüm bu sakıncalardan uzaklaşmak ve fizyolojik, biyolojik olarak bozulan bileşenler kullanarak, lipit matrislerin hazırlanması ile intravenöz olarak verilebilecek ve kontrollü salım sağlanabilecek sistemlerin hazırlanabileceği düşünülmüştür (126). Tasarımlanan bu lipit taşıyıcı sistemin aşağıdaki özelliklere sahip olabileceği öngörülmüştür (127):

- Ufak boyut. Ortalama çapın nanometre büyüklüğü aralığında olması;
- Fizyolojik bileşiklerin kullanılması ve üretim işleminden gelecek toksik artıkların bulunmaması nedeniyle toksikolojik kabul edilebilirlik;
- Lipofilik ve muhtemelen hidrofilik ilaçlarla da yeterli yükleme kapasitesi;
- Etkin maddelerin günler veya haftalar boyunca uzatılmış salımının sağlanması;
- Otoklav veya gama ışınları ile sterilizasyon olasılığı;
- Sulu dispersiyonlarda uzun süreli stabilite veya alternatif olarak dondurarak veya püskürterek kurutma;

- Yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile belirli dokuya spesiflik;
- Endüstriyel ölçekte üretim;
- Ekonomik olarak kabul edilebilirlik.

Mikron veya mikronaltı büyüklükteki taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan lipitler oda sıcaklığında katıdırlar; eritilip emülsifiye edildikten sonra soğutulduklarında tekrar katılaşırlar. Oluşan katı partiküller kümeleşme göstermezler ve katı matris olarak içerdikleri etkin maddenin dışarı sızmasını engellerler (2,128).

Diğer kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler ile alternatif olarak sunulan katı lipit nanopartiküllerin özelliklerinin karşılaştırılması **Tablo 1** 'de verilmiştir (121,126):

**Tablo 1. IV Kontrollü İlaç Dağıtım İçin Kullanılan Konvansiyonel Partiküler Sistemlerin Katı Lipit Nanopartiküllere Göre Özellikleri**

Özellik	SLN	Polimer Nanopartiküller	Lipozomlar	Yağ Emülsiyonları
Sistemik toksisite	düşük	> veya =	düşük	düşük
Sitotoksisite	düşük	> veya =	düşük	düşük
Organik çözücü artıkları	hayır	> veya =	> veya =	hayır
Büyük ölçekte üretim	evet	hayır	evet	evet
Otoklav ile sterilizasyon	evet	hayır	hayır	evet
Kontrollü salım	evet	evet	< veya =	hayır
RES'den uzak kalma	?	hayır	evet	evet

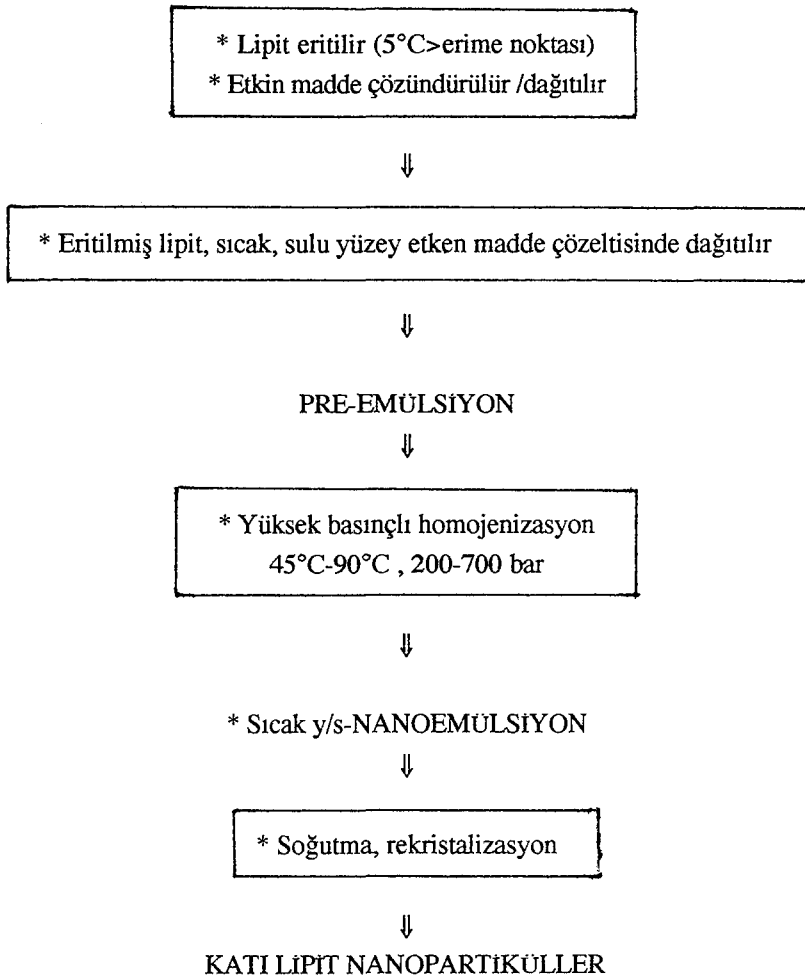
#### 2.2.4.1. Hazırlama Yöntemleri

Lipit partiküler sistemler arasındaki başlıca fark hazırlama yöntemleridir. Lipit matris boyutunun ufaltılması, formülasyon tekniklerinde değişiklikler yapılarak sağlanabilir.

Püskürterek kurutma yöntemi ile lipit nanopartiküllerin hazırlanması Eldem ve arkadaşları (129) tarafından tanımlanmıştır. Bunun yanısıra sonik banyoda veya titanyum prob kullanarak eritilmiş lipitlerin sonikasyonu ile de lipit nanopartiküller elde edilebilmiştir (127). Yüksek hızlı karıştırıcılar, sonikasyon veya herikisinin birlikte kullanımı ile nanometre boyutlarında pelletler hazırlanmıştır (127). Tüm bu yöntemlerle hazırlanan partiküler sistemlerdeki en büyük sorun, 5 µm'den büyük partiküllerin fazla olmasıdır ki bu da etkin maddenin IV verilmesine bir engel oluşturmaktadır.

### 2.2.4.1.1.Sıcak Homojenizasyon Yöntemi (Eriyik Emülsifikasyon İşlemi)

Katı lipit nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan lipit, erime derecesinin yaklaşık 5°C-10°C üzerine ısıtılır. Etkin madde bu eriyikte çözündürülür. Yüzey etken madde içeren sulu faz aynı sıcaklığa getirilir. Dispersiyonların emülsifikasyonu homojenizasyon kullanılarak gerçekleştirildikten sonra, karışım oda sıcaklığına kadar soğutulur. Bu soğutma sırasında katılaştıran yağ damlacıkları katı lipit nanopartikülleri oluşturur (123,127,130-132). Bu çok kullanılan yöntem Şekil 3 'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3. Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Katı Lipit Nanopartikül Hazırlanması

Sıcak homojenizasyon tekniği kullanılarak, diğer yöntemlere göre daha ufak partikül boyutlarında ve 5 µm'den büyük partiküllerin az sayıda olduğu katı lipit nanopartiküller elde edilir.

### **2.2.4.1.2. Soğuk Homojenizasyon Yöntemi**

Etkin madde, eritilmiş lipitte çözündürülür ve karışım soğutulur. Bu karışım, sıvı azot veya kuru buz ile öğütülerek 50-100 µm arasında toz lipit elde edilir. Toz madde, sulu yüzey etken madde çözeltisine eklenir ve lipitin erime noktasının 5°C-10°C altında, oda sıcaklığında veya oda sıcaklığının altında homojenize edilir (121,127).

Yüksek sıcaklıklarda homojenizasyonun, sıcaklığa duyarlı etkin maddeler için uygun olmayacağı açıktır (133). Bunun yanısıra lipit eriyiğinde bulunan hidrofilik etkin maddeler, sulu faz ile karıştırıldığında, sulu faza geçme eğilimi göstereceklerdir. Bu kaybı en aza indirmek için lipit sulu faz içinde katı olarak dağıtılır. Bu yöntemle, lipit erimeden düşük derecede yumuşadığı için, rekristalizasyon basamağı hızlıdır (127).

Soğuk homojenizasyon yöntemi kullanılarak, tetrakain, etomidat ve prednizolon'un model ilaç olarak kullanıldığı bir çalışmada, lipofilik ilaçların yüklenmesi için katı lipit nanopartiküllerin çok uygun olduğu bulunmuştur (133,134). Literatürde bu yöntemin kullanıldığı çalışma sayısı son derece azdır. Hidrofilik etkin maddelerin soğuk homojenizasyon yöntemi ile katı lipit nanopartiküllerinin hazırlanmasına ait iki çalışmaya rastlanmıştır. Bunlardan birinde etkin madde iotrolan (127), diğesinde ise magnetit'tir (135).

### **2.2.4.2. Karakterizasyon**

#### **2.2.4.2.1. Partikül Şekli ve Boyutu**

Katı lipit nanopartiküllerin şekillerinin belirlenmesinde, diğer partiküler sistemlerde olduğu gibi, Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) (82) ve elektron mikroskobu (126) kullanılabilir. Düz bir silikon yüzeye sabitlenen nanopartiküllerin şekilleri, Atomik Kuvvet Mikroskopisi ile hiçbir vakuma ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmiştir (136). Yeni bir yöntem olarak sunulan bu yöntem, başka bir yöntemle karşılaştırılarak uygulanabilir olduğuna karar verilmiştir.

Partikül büyüklüğü ve dağılımı, koloidal taşıyıcı sistemlerin en önemli fizikokimyasal özelliğidir. Partikül büyüklüğünün düşürülmesi, saklama sırasındaki stabilitenin artmasına ve vücutta düşük toksisiteye yol açar. Hazırlama yönteminin parametreleri, partikül büyüklüğünü ve dağılımını etkileyen önemli faktörlerdendir. Genellikle, sıcak homojenizasyon yönteminde, yüksek basınç kullanıldığında, dağılımı homojen olan ufak nanopartiküller elde edilebilmiştir (121). Hazırlama sırasında ortama düşük enerji verilmesi, homojen olmayan partikül büyüklüğü dağılımına yol açar (132). Foton korelasyon spektroskopisi ile elde edilen partikül büyüklüklerinin yanısıra, polidisperslik indisi de dağılım hakkında bilgi vermektedir (121). 0-1 arasında olan bu indis değeri, sıfır'a yaklaştıkça homojen bir dağılımı, bir'e yaklaştıkça ise daha geniş bir aralıkta

dağılım olduğunu işaret etmektedir. Optimum homojenizasyon koşulları altında hazırlanan katı lipit nanopartikül dispersiyonlarının ml'sinde 9 000-60 000 partikül olduğu bulunmuştur (121). Oysa, küçük hacimli enjeksiyonlar için, USP XXII, kap başına en fazla 10 000 partikülü geçerli saymaktadır (137). Ancak, lipit nanopartiküllerin biyolojik olarak parçalanabilirliği düşünüldüğünde, 10 000'den fazla olan partikül sayısı kabul edilebilir.

Hazırlama yönteminde kullanılan emülsifiye edici maddenin tipi ve miktarı da partikül büyüklüğünü etkiler. Genellikle, emülgatör miktarını belirli bir orana kadar arttırmak, ortalama partikül büyüklüğünü düşürmektedir (2). Emülgatör ve sterik stabilizatör, katı lipit nanopartiküllerin hazırlanması sırasındaki damlacık koalesansını ve uzun dönemdeki partikül agregasyonunu önleyecek mekanik veya elektriksel engel oluştururlar. Damlacıkların stabilitesi yeterli olarak sağlanabilirse, katılaştırma işleminden sonra elde edilen partiküllerin boyutu nanometrik aralıkta olur (138).

#### **2.2.4.2.2. İlaç Yüklenmesi ve Hapsedilmesi**

Etkin maddeler, hazırlanan katı lipit nanopartiküllerin yüzeyine tutunabilir veya katı dispersiyon veya eriyik olarak partikülün içinde hapsedilebilir. Katı lipit nanopartiküllere yüklenebilen ve hapsedilen etkin madde miktarı, taşıyıcı sistemin tasarımı, hazırlama yöntemi ve etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır.

Lipofilik etkin maddelerle (tetrakain, etomidat, prednizolon) elde edilen etkin madde hapsedilme oranı % 0.8 ila % 9.8 arasında olmuştur (127,133,134). Lipofilik etkin maddeler için bu oranlar uygun görülmektedir. Hidrofilik bir etkin madde olan iotrolan için ise % 0.5 oranında hapsedilme saptanmıştır (134). Hidrofilik etkin madde için oldukça düşük olan bu oran, etkinliği fazla olan maddeler için yeterli sayılabilir.

Katı lipit nanopartikül hazırlama yönteminde kullanılan sıcaklık, etkin madde yükleme oranını etkileyen en önemli faktördür. Tetrakain ve etomidat için, sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan nanopartikül içeriğine bağlı olarak etkin madde yüklenmesinin % 90'dan yüksek olduğu bulunmuştur (133). Etkin madde olarak prednizolon kullanılarak soğuk homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin yükleme kapasitesi % 73 iken, sıcak homojenizasyon yönteminde bu oran % 50-60'a düşmüştür (127). Bu oranlardan daha yükseklerini elde etmek mümkündür ancak oranın yükseltilmesi heterojen matris yapısındaki katı lipit nanopartiküllerden salımın hızlanmasına yol açacaktır.

#### **2.2.4.2.3. Rekristallenme Özellikleri**

Eritilmiş lipitin rekristalizasyonu nanopartikülün hazırlanmasının hemen ardından oluşmaz. Basınç altında gerçekleştirilen homojenizasyondan sonraki rekristalizasyon hızı, katı lipit nanopartikülün boyutu, erime noktası ve yüzey etken madde ile lipitin konsantrasyonunun fonksiyonudur (127). Mikropartiküllerin tersine, rekristalizasyon ve

nanokristallerin oluşumu, partikül büyüklüğünü ve lipit miktarını düşürerek ve yüzey etken madde miktarını artırarak geciktirilebilir (2,126).

Rekristalizasyon davranışı, katı lipit nanopartiküllere etkin madde yüklenmesini (örneğin katı çözelti, heterojen matris) ve daha sonra salım profilini etkiler. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve x-ışını kırınım cihazları, kristallenmeyi belirleyerek katı lipit nanopartikül oluşumunu daha iyi anlamak için kullanılmaktadır.

Sıcak homojenizasyon yöntemi ve lipit olarak gliseritlerin kullanıldığı bir katı lipit nanopartikül çalışmasında, x-ışını kırınım sonuçları ile DSC verileri karşılaştırılarak rekristalizasyon davranışı incelenmiştir (5). Etkin madde ekmeden ve ekledikten sonra elde edilen veriler karşılaştırıldığında, etkin madde konsantrasyonunun artırılması ile kristallenme özelliğinin azaldığı gösterilmiştir (5). Prednizolon'un etkin madde olarak seçildiği bir çalışmada, etkin maddenin varlığı, lipitin rekristallenme hızını düşürmüştür (134). Nanopartiküllerin erime noktası ile polimorfik geçiş süresi ve kristallenme derecesinde görülen farklılıklar, dispersiyon durumuna, emülgatör ve etkin madde varlığına ve yüzey/hacim oranının yüksek olmasına bağlanmıştır.

Erime noktaları lipitten yüksek olan etkin maddelerin sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılarak katı lipit nanopartiküllerinin hazırlanmasında, soğutma sırasında önce etkin madde kristallenecek ve ardından lipit ile rekristallenme gerçekleşecektir. Bu durum, ilaç salımında gecikmeye neden olur.

#### **2.2.4.2.4. Salım Hızı**

Katı lipit nanopartiküllerden etkin maddenin salım hızı, matris yapının, hazırlama yönteminin, yüklenen etkin madde miktarının, partikül büyüklüğünün ve etkin maddenin özelliklerinin fonksiyonudur (4). Etkin madde salımı, yalnızca difüzyon mekanizması ile değil, aynı zamanda matris yapısındaki farklılaşma tarafından kontrol edilir. Salım hızı çalışmalarından önce ve sonra elde edilen Atomik Kuvvet Mikroskop görüntüleri, partiküllerin sertliğindeki azalmaya bağlı morfolojik değişim göstermiştir (136).

Etkin madde salım profillerinin saptandığı iki çalışmada da palet yöntemi (Avrupa Farmakopesi) kullanılmıştır (133,134). Sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan tetrakain ve etomidat'ın salımında patlama etkisi görülürken (133), prednizolon için hazırlama yönteminde kullanılan sıcaklığın patlama etkisini etkilediği saptanmıştır (134). Sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan prednizolon nanopartiküllerinin salımında % 45'e kadar varan patlama etkisi görülürken, oda sıcaklığında hazırlananlarda hiçbir patlama etkisi görülmemiştir (134). Patlama etkisinin olası nedenlerinden birisi lipitin erime noktasının etkin maddeninkinden yüksek olmasıdır. Dolayısıyla lipitin yavaş kristallenmesi ve etkin maddenin katı lipit nanopartikülün yüzeyinde rekristalize olması sonucu patlama etkisi görülür (133). Patlama etkisinin diğer bir olası nedeni ise, küçük partiküllerden dolayı

#### **2.2.4.4. Etkin Madde Hedeflemesi**

Ufak boyutları, hidrofilik özellikleri ve yük taşımayan yüzeylerinden dolayı, katı lipit nanopartiküller, IV verilikten sonra retiküloendotelyal sisteme (RES) daha az alınarak, ekstrasvasküler hedef bölgelere ulaşabilirler (132).

Kan ve kemik iliğine hedeflemek için, yüzeyi modifiye edilmiş katı lipit nanopartiküller farklı homojenizasyon parametreleri kullanarak hazırlanmıştır (127). Bu çalışmada, kemik iliğinde toplamak amacı ile, lipit ve yüzey etken madde konsantrasyonunun % 5 olması ve 80-100 nm'lik partikül büyüklüğü uygun bulunmuştur.

#### **2.2.4.5. Toksikite**

İnsan granülositleri kullanılarak gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, polilaktit/glikolit nanopartiküllerin katı lipit nanopartiküllerden 10 misli daha yüksek sitotoksikiteye sahip olduğu gösterilmiştir (123). Magnetit yüklü katı lipit nanopartiküller için yapılan benzer çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (135).

İn vivo çalışmalarda da fizyolojik olmayan setil palmitat ile hazırlanan katı lipit nanopartiküllerin IV uygulama için uygun olduğu, akciğer, karaciğer ve dalak ağırlıklarında farklılığa yol açmaması ve histolojik incelemeler sonucunda karar verilmiştir (3,4). Gliseril behenat kullanılarak hazırlanan katı lipit nanopartiküller ile saptanan karaciğer ve dalak ağırlığındaki artışın ise tersinir olduğu bulunmuştur (3).

#### **2.2.4.6. Sterilizasyon**

Katı lipit nanopartiküllerin formülasyonuna bağlı olarak, otoklav ve gama ışınları kullanarak ve filtrasyon ile sterilizasyon yapılabilir (4,121). Tüm sözü geçen yöntemlerin uygun olmadığı durumlarda ise, aseptik koşullarda hazırlama önerilmektedir.

121°C ve 110°C'de 15 dakikalık otoklav sterilizasyonu ve Kobalt 60 sterilizasyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, kullanılan yüzey etken madde ve lipitin konsantrasyonuna ve cinsine bağlı olarak bu yöntemlerin kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır (130). Heriki yöntemde de partikül büyüklüklerinde ve polidisperslik indisi değerlerinde az bir artış olduğu bulunmuş ancak bu artışın sterilizasyon parametrelerinin optimizasyonu ile minimize edilebileceği gösterilmiştir.

Yüzey etken madde olarak poloksamer'in kullanıldığı nanopartiküllerde, otoklav sterilizasyonunun mümkün olmadığı görülmüştür (121). Bunun da nedeninin poloksamer'in sterik stabilizasyon yeteneğinin azalması olabileceği öne sürülmüştür.

## 2.3. MİKROPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERDEN ETKİN MADDE SALIMI

Tıbbi hedeflere ulaşmak için sadece non-toksik, non-immünojenik, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak rezorbe olabilen değil, aynı zamanda etkin madde yüklemeye ve etkin madde salım karakteristiklerine uygun partiküllere ihtiyaç vardır (141).

Katı dispersiyon teknolojisinde mikropartikül formülasyonları, suda çözünmeyen polimerlerin hidrofilik bileşimlerinin dispersiyonu ile bunların biyoyararlanımlarını ve suda kolay çözünen etkin maddelerin çözünme hızı özelliklerini ve oranlarını düzeltmek için yaygın olarak kullanılırlar (69,142). Bu nedenle mikropartiküllerin çoğu kontrollü salım dozaj formlarında ümit verici olarak ortaya çıkmıştır (143).

Antikanser ajanların kontrollü salımı için taşıyıcı olarak beyaz balmumu mikroküreleri araştırılmış, hazırlanan mikrokürelerden etkin madde salımı in vitro olarak değerlendirilmiştir. Mikroküre oluşumunun sonucu, etkin maddenin çözünme hızı oldukça yavaşlamıştır (144). İbuprofen mikrokürelerinin de aynı şekilde, göstermiş oldukları in vitro salım profilleri ile sürekli etkileri olumlu bulunmuştur (145).

### 2.3.1. Etkin Madde Salımının İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler

Katı ilaç maddelerinin 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 bazı zaman aralıklarında saptanabilir. Mikropartiküler ilaç taşıyıcı formülasyonların davranışı da, genellikle etkin madde salım profilinin in vitro ölçümü ile karakterize edilmektedir. Bu tip veriler formülasyonun in vivo davranışı hakkında fikir edinmede kullanılabilir (146). Bu nedenle, in vitro salım testleri, etkin madde emiliminde formülasyon faktörlerinin değişiminin etkisini değerlendirmede, uzatılmış salımlı dozaj formlarının kalite kontrolünde bir araç olarak kullanılır (147).

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 etken varlığı oldukça etkilidir. Bu nedenle, kullanılan çözünme hızı yöntemi önemlidir. Üstelik, birçok çalışmada in vitro salım sonuçlarına göre etkin madde salımının oral kullanım için elverişli olup olmadığına karar verilmektedir (148).

Mikropartiküler sistemlerde kullanılan çözünme hızı yöntemleri şunlardır (148):

1- USP Dissolüsyon Test Yöntemi-Palet (51,62,147,149-151)

(USP XXII Dissolution Test Apparatus-Paddle)

2- Döner Şişe Yöntemi (Rotating Bottle Apparatus) (60,66,152)



3- Çalkalayıcı İnkübatör (Shaker Incubator) (153)

4- Modifiye Akış Hücresi (Modified Recycling Flow Through Cell) (147)

Bu yöntemlerin hepsi de avantaj ve dezavantajlara sahiptir (154).

Literatürde çözünme hızı çalışmaları için daha değişik modifiye yöntemlere de rastlanmaktadır. Bazı çalışmalarda etkin maddenin in vitro salımı için USP basket yöntemi kullanılmış (24,155), bir çalışmada da mikroküreler mikrosantrifüj tüplerinde çalkalama ile inkübe edilmiştir (156). Bir diğer çalışmada ise, mikroküreler dissolüsyon ortamında su üstünde yüzmeye eğilimli oldukları için, minibasketlerin kullanıldığı modifiye edilmiş USP yöntemi kullanılmıştır (157). Bazı araştırmacılar geleneksel olarak kendi ülkelerinin farmakopelerindeki çözünme hızı yöntemini kullanmışlardır. Örnek olarak, Japon araştırmacılar mikroküre çalışmalarının in vitro salımında referans olarak JP XI'i vermişlerdir (158).

Bir başka çalışmada, farklı çözünme hızı yöntemleri değerlendirilmiş; etkin madde salımında farklı çevresel koşulların, karıştırma hızının, iyonik ve yüzey etken varlığının etkisi araştırılmıştır. 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 (148). Yapılan bir diğer çalışmada, palet yöntemi ile sürekli-akış teknikleri karşılaştırılmış, salım eğrileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (147). Farklı bir görüşe göre sink koşullarda yapılan bu salım ölçümlerinde ortam son derece seyreltiktir ve etkin madde salımı bu son derece seyreltik çözeltilerden ölçülemez (146).

Mikronaltı partiküllerden etkin madde salımının ölçülmesinde, daha iri partiküller sistemlerde karşılaşılmayan birçok güçlükler vardır. Tüm bu yöntemlerde esas güçlük, koloidal taşıyıcı süspansiyondan, sürekli faz içindeki etkin maddenin salımını ayırmaya çalışırken ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, mikrodisperse sistemlerde salım profillerinin tayini için taşıyıcı ve çözeltilerin ayrılmasına bağlı olmayan analitik teknikleri kullanmak daha iyidir. Bu analitik teknikler şunlardır: 1. Denge diyalizi, 2. Örnek ve ayırma, 3. Sürekli akış, 4. İn situ yöntemler (154,159).

### **2.3.2. Salım Mekanizması**

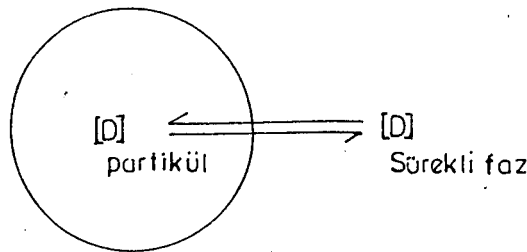
Etkin madde, mikrokürelerin hazırlanması sırasında matris içinde toplandığı gibi yüzeye de tutunabilir. Buradan, yüzey erozyonu, mikrokürenin tamamen dağılması, mikroküre hidrasyonu ve difüzyon ile salınır (76).

Mikrodisperse sistemlerden etkin madde salımında çok önemli işlemler bulunmaktadır. Bunlar:

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

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

3- Taşıyıcı, çevre tarafından bozunabilir veya çözünebilir. Bu durumda etkin madde yeterli derecede hareketsizdir, eşit zaman aralıklarında taşıyıcıdan difüze olur. Böylece taşıyıcının bozunmasını takiben sürekli fazda etkin madde birikir (154).



Şekil 4. Partikül ve Sürekli Faz Arasında Etkin Maddenin Difüzyon Dengesi (154).

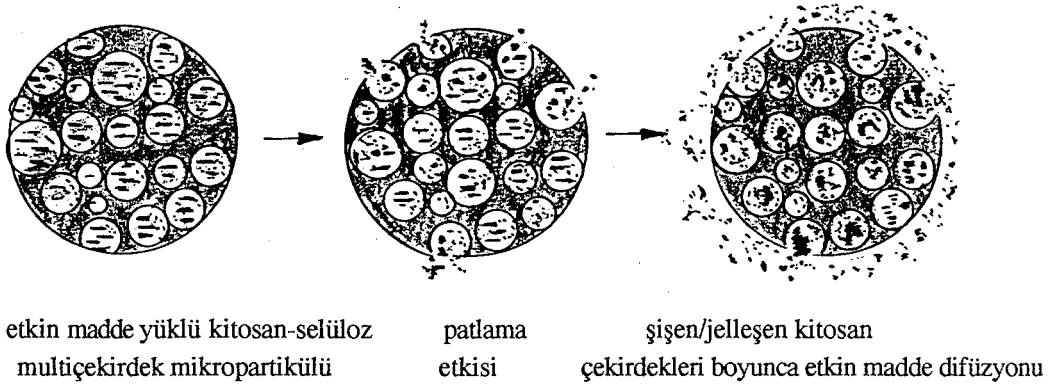
Mikropartiküller bir sistemden olası etkin madde salım mekanizması Şekil 5'de gösterilmiştir (25). Buna göre etkin madde salımı şu işlemleri içerir:

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

Bu işlemlerden dolayı, etkin madde salım hızı, mikropartiküller içindeki etkin maddenin su absorpsiyon hızı ve şişme oranı ile kontrol edilebilir (25).

Yapılan bir çalışmada, çözücü uçurma tekniği ile hazırlanan mikrokürelerden etkin maddelerin salım profilleri ve taşınma kapasiteleri incelenmiştir. 0.2-30 µm arasında farklı partikül büyüklükleri tanımlanmış etkin maddenin mikrokürelerden in vitro salım profilleri sürekli akış aleti kullanılarak tayin edilmiştir. 37°C'lik su banyosunda bir hücre bulunduran bu alet, mikrokürelerden etkin maddelerin salımı için "sink koşulları" sağlamaktadır. Etkin madde yükleme kapasitesi, partikül büyüklüğü ve özellikle ilaç ve ilaç/polimer oranına bağlı bulunmuştur. Etkin madde salımının, etkin madde yüklenmesine bağlı olduğu saptanmış ve karakteristik trifazik model ile gösterilmiştir (37,160). Etkin madde molekülleri yerlerine yerleştikten sonra, ilk baştaki yavaş fazı takibeden patlama etkisi ile taşıyıcıların yüzeyinden

uzaklaşmışlardır. Sabit yavaş salım hızı ise etkin maddelerin polimer taşıyıcıdan geçerek düşük hızda difüzyonunu göstermiştir (160).



**Şekil 5. Etkin Madde İçeren Çekirdek-Çeper Mikropartiküllerinin Yatay Kesitlerinin Teorik Yapısı ve Salım Mekanizması**

Nifedipin yüklü poli(dl-laktit-ko-glikolit) mikrokürelerinden salım değerlendirilmiş; nifedipin salımı 1 günlük patlama etkisinden sonra 15 gün içinde tamamlanmıştır. 80  $\mu\text{m}$ 'lik mikroküreler için bifazik ve 18  $\mu\text{m}$  mikroküreler için ise oldukça lineer profiller elde edilmiştir (39).

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 (29).

Bir diğer mikroküre çalışmasında ise, mikroküre örnekleri fosfat tamponu içersinde test tüplerine konularak herbir tüp döner palet aletine bağlanmıştır (70). 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 (70).

Diğer bir mikroküre çalışmasında, çözücü uçurma tekniği ve poli (dl-laktik asit) (PLA) ile 5-fluorourasil kullanılmıştır. Kullanılan polimerler üç farklı molekül ağırlığına sahiptir. Polimerlerin molekül ağırlığı ile salım hızı ve tampon çözeltilerdeki 5-fluorourasil'in çözünürlüğü arasında doğrusal bir korelasyon saptanmıştır (161). 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 madde çözünürlüğünde, yalnızca çözünme ortamının pH'sı

değil, molekül ağırlığına bağlı olarak polimer kendi başına da 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 (161).

S/y emülsiyonundan çözücü uçurulması yöntemi ile hazırlanan, progesteron içeren kitosan mikrokürelerinin salım hızları incelendiğinde salım kinetiklerinin kullanılan hazırlama yöntemi ve formülasyona bağlı olarak ciddi farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Saptanan minimum etkin madde salımının bile mikroküre hazırlamadan önce progesteronun polimer çözeltisi içindeki karıştırma periyodları ile önemli derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (162). 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 (156).

Bir başka çalışmada, her ne kadar 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 (163).

### 2.3.3. Etkin Madde Salımını Etkileyen Faktörler

Mikropartiküllerden istenilen etkin madde salım özelliklerini elde etmek için şu faktörler gözönünde tutulmalıdır: etkin maddenin mikroküre içindeki konumu; matris maddesinin tipi , miktarı (66,164) ve molekül ağırlığı (37,51); partiküllerin yüzeysel özellikleri, (164), biçim ve büyüklükleri (63,66); etkin maddenin fizikokimyasal özelliği, molekül ağırlığı ve konsantrasyonu (63,66); yardımcı maddelerin seçimi (164); salım ortamı ve koşulları (76).

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

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

a ve b sabit sayı olmak üzere M arttıkça, D azalır. Polimerler için genellikle M büyüktür ve D giderek küçülerek yok olur (165).

Genel olarak, suda çözünmeyen etkin maddelerin intestinal emiliminin önceden belirlenmesi için, mide-barsak ortamı kullanılarak yapılan çözünme hızı çalışmalarında, sınırlı hız dikkat çekmektedir (166). Dolayısıyla, etkin maddenin sudaki çözünürlüğü salım hızına etkilidir (167).

Etkin maddenin mikrokürelerden salımını mikroküre büyüklüğü etkilemektedir. 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 kısılması.

Mikrokürelerin büyüklükleri arttırıldığında ise ikinci fazdaki salım yavaşlamaktadır (76).

İbuprofen mikrokürelerinin uzatılmış salım süspansiyonları ile, in vivo etkin madde emilimi ve in vitro salım arasındaki ilişki incelenmiştir. Süspansiyonlardaki etkin madde salım hızının, mikrokürelerin iç porozitesi, ilaç-polimer oranı ve partikül büyüklüğü tarafından kontrol edildiği saptanmıştır (158). Çalışılan 3 süspansiyondan üçüncüsü ticarî granüle ile karşılaştırıldığında, 3 kat uzun plazma pik düzeyine ulaşma süresi ( $T_{maks}$ ) ve eşit emilim (AUC) ile ideal bir biyoyararlanım göstermiştir. Diğer iki süspansiyonun etkin madde salım hızları aynı olduğu halde, biyoyararlanım oranları arasında anlamlı farklılıklar olması ilginçtir. Biyoyararlanımdaki bu farklılıkların, mikrokürelerin mide-barsak alanında kalma zamanına bağlı olabileceği düşünülmüştür (158).

#### 2.4. PARKINSON HASTALIĞI

Serebral yaşlanma doğal bir olaydır ve dopamin eksikliğinin belirleyici bir rol oynadığı olaylar dizisidir. Hücreler tam olarak anlaşılammış bir nedenle metabolik kapasitelerini kaybederler.

Parkinson hastalığının gelişiminde klinik semptomların gelişmesinden önce striatal dopaminin azalması ve substantia nigranın belirginleşmiş dejenerasyonu gözlenir. Klinik semptomlar yavaş gelişir ve sıklıkla aralıklı olarak ortaya çıkar. Depresyon veya duygusal değişimler gibi emosyonel bozukluklar, çoğu kez, motor işaretlerden birkaç yıl önce görülür. Tüm bu biyolojik bozukluklar, sonuçta, Parkinson hastalığını ortaya çıkarmaktadır (9).

Dopaminerjik sistemlerin aktivitesinin azalması, serebral yaşlanma sırasında gözlenen temel fonksiyonlardaki bozulmayı, özellikle de yaşlılığın psiko-motor bozukluklarını, açıklayıcı faktörlerden birisidir. Klinik açıdan serebral yaşlanmaya, dikkat, hafıza, uyku bozuklukları, emosyonel labilite, motor bozukluklar ve nörosensoryel bozukluklar gibi nörolojik belirtiler eşlik etmektedir.

Dopamin eksikliği beyin yaşlanması sırasında oluşan en önemli bozukluktur (168). Bugün hala bilinmeyenler olmakla birlikte, serebral yaşlanmanın klinik olarak ortaya çıkmasında dopamin eksikliğinin rolü kesindir. Çünkü yaşla beraber:

- dopamin sentezi azalır,

- dopamin katabolizması artar,
- dopaminerjik reseptörlerin aktivitesi azalır.

Parkinson hastalığı da yoğun bir dopamin eksikliğinin eşlik ettiği bir çeşit lokalize serebral yaşlanmadır. Parkinson hastalığının geçmişine bakılacak olursa, genelde, 50 yaşın üzerindeki bireylerin % 10'unda oluşmaktadır (9).

Parkinson hastalığında uzun yıllar levodopa tedavisi uygulanmıştır. Ancak, bu uzun süreli levodopa tedavisinin yan etkilerinin bulunması, değişik antiparkinson ilaçlar için araştırmaya yol açmıştır. Dopamin agonistleri böylece antiparkinson ajanlar arasına katılmıştır ve bu hastalığın değişik aşamalarında kullanılabilir (169).

Dopamin agonistleri direkt olarak dopamin reseptörlerinin stimülasyonu ile etki ederler. Dopamin agonistlerinin başlıca avantajları ve levodopa'ya üstünlükleri şunlardır:

- dopamin reseptörlerinin direkt olarak stimülasyonu,
- striatal yarı ömrünün l-dopa'dan uzun olması,
- seçici reseptör aktivasyonunun mümkün olabilmesi,
- parenteral verilmiş mümkün olması (lisurid, apomorfine gibi),
- nöronların dejenerasyonunda koruyucu olarak kullanılabilmesi,
- l-dopa'nın yan etkilerinin ve başlayışın geciktirilebilmesi,
- aktif metabolitlere çevrilmemeleri,
- barsak veya KBE'de transport için yarışmaları (170).

Parkinson hastalığının patogeneğinde, oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu önemli rol oynar. Bu serbest radikaller dopaminerjik nöronlara zarar verebilir. Parkinson hastalığında yüksek etki gösteren dopamin agonistleri , levodopa gibi aktif bileşiklerin metabolizasyonuna ihtiyaç göstermemeleri ve toksik metabolitler veya serbest radikaller meydana getirmemeleri nedeniyle avantajlıdır (171).

Birçok nörolojik düzensiz davranışın tedavisindeki en büyük engel, beyin içinde, özellikle spesifik bölgelerde ilaçların dağıtımındaki yetersizliktir. Plazma ile taşınan birçok maddenin beyin içine kontrollü veya sabit hız ile girişinde var olan ana engel, kan-beyin engelidir. Bu nedenle, ilaçların beyne rahat taşınabilmesi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Örneğin, infüzyon pompaları kullanılarak intraserebral dağıtım; hangi nörotransmitterler ile salım olabiliyor ise o dokuya implantasyon gibi. Fakat, bu yöntemlerin herbirinde, şiddetli toksik yan etkiler, emniyet problemleri, etnik ve maliyet işlerini de içine alan yetersizlikler vardır. Ayrıca, her ne kadar Parkinson'lu hastalarda adrenal ve fatal doku implantlarının klinik denemeleri başlamış ise de, doku transplantlarında mekanizma ve uzun süreli etki henüz tam olarak bilinmemektedir (172). Bu güçlüklerin üstesinden gelmek için, nöroaktif

bileşiklerin direkt olarak beyin içine geçişine izin veren sistemler geliştirilmiştir. Polimerik matris sistemler diğer alternatif terapötik modellerden daha güvenilir ve az tehlikelidir (172). Polimer teknolojisindeki kontrollü salım uygulaması, nörolojik veya psikiyatrik düzensizlikler için kesin avantaj sağlamaktadır. Bu avantajların içine, güvenilirlik ve etnik kabul edilebilirlik dahil edilmektedir. Kontrollü salım teknolojisindeki gelişmeler bir taraftan sürdürülürken, farklı nöropsikiyatrik düzensizliklerin tedavisinde pratik olarak kullanılmaktadır (172).

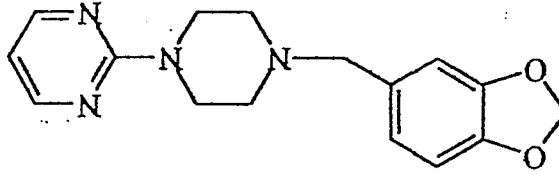
Piribedil ve parkinsonizm ile yakından ilişkili olan ve piribedil çalışmalarına ışık tutacağı düşüncesiyle dopamin araştırmalarını gözden geçirmek yararlı olacaktır. Yapılan bir çalışmada, etilen-vinil asetat (EVAc)-dopamin matris disklerinden dopaminin uzun süreli in vivo salımı değerlendirilmiş, diskin bir yanında mevcut olan tek delikten dopamin salımı izlenmiştir (173). Sistemin implantasyonunun ardından striatum'da, 20 günde, kontrol değerlerinden 200 kat daha fazla ekstraselüler dopamin konsantrasyonları gözlenmiştir. Deneysel 2 ay sürdürülmüş ve dopamin salımının stabil kaldığı gözlenmiştir. Paralel bir araştırma, in vitro karakterizasyonu içermektedir. Hazırlanan matris sistem sulu bir tampon çözeltisine batırılmış, polimer matristen dopamin salım hızının, polimerdeki ilk dopamin konsantrasyonuna bağlı olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, kontrollü dopamin salımının başarılabileceğini in vitro olarak göstermiştir (172). Yine bir başka çalışmada, dopaminin-etilen vinil asetat (EVA) kopolimeri ile kontrollü salım preparatı hazırlanmış ve salımın 0.derece kinetiğe sahip olduğu rapor edilmiştir (174). Kontrollü taşıyıcı sisteme alternatif olarak hazırlanan polimerik mikrokürelerin in vitro salım kinetiklerinin kronik dağıtım için tatmin edici olmadığı belirlenmiştir. Örnek olarak, dopaminin % 90'ı bir polilaktit polimerden 24 s içinde salınmıştır (174). Bu mikroküre çalışmasından 4 yıl sonra, yine dopamin ile bir lipozom çalışması yapılmıştır. Bu çalışmanın in vitro verilerine göre, salım 0. ve 1. derece kinetiklerle olmakta ve lipozomlardan 40 günün üzerinde kontrollü dopamin salımı elde edilmektedir (174). Yine dopamin içeren lipozomlarla yapılan bir başka çalışmada, dopaminin 40 günün üstünde in vitro uzatılmış salımı gösterilmiştir (174). Bu lipozomlar, sıçanların kısmen denerve edilmiş corpus striatumu içine stereotaktik olarak implante edilmiş, dopamin lipozomları alan bu sıçanlarda kısmen davranışsal iyileşme görülmüştür. Bu sonuçlar Parkinson hastalığının, bu çalışmada kullanılan rodent modelinde kısmen iyileşme yapabileceğini ortaya koymuş ve beyne terapötik ajanların kontrollü olarak taşınması için bu teknolojinin bir potansiyel olduğunu göstermiştir (174). During ve arkadaşları (175) benzer bir çalışmada, dopamin içeren lipozomları, Parkinson hastalığı oluşturulmuş sıçanlara stereotaktik olarak implante ederek, 25 gün süreyle dopamin salımını incelemiştir. Sonuçta, dopamin içeren lipozomların Parkinson hastalığının tedavisinde etkili olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

## 2.5. PİRİBEDİL

### 2.5.1. Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Piribedil, H. Schmitt ve M. Laubie tarafından 1964'de Suresnes Servier Araştırma Merkezi'nde sentezlenmiştir (175).

Piribedil, dopamin agonisti (7), vazodilatör etkili (8) bir ilaçtır. Açık formülü, 2-[4-(1,3 benzodioksol-5-ilmetil)-1-piperazinil] pirimidin'dir (176) ve kimyasal yapısı Şekil 6 'da gösterilmiştir. Kapalı formülü  $C_{16}H_{18}N_4O_2$ , molekül ağırlığı 298.35'tir (176). Beyaz renkte, kokusuz bir tozdur. Kloroformda serbestçe, %95'lik h/h etil alkolde yavaşça çözünür; distile suda ise pratik olarak çözünmez (177). Suda ancak 0.07 mg/ml oranında çözünebilir (178). Piribedil, yüksek lipofilisiteye ( $\log P_{oct}=2.84$ ) ve hiç veya çok az H-bağ verici asiditeye ( $\Delta \log P_{oct-hep}=0.75$ ) sahiptir (179).



Şekil 6. Piribedil'in Kimyasal Yapısı

### 2.5.2. Tarihçesi

Dopamin, 1950'li yıllardan beri tanınmasına karşın kendine özgü fonksiyonu olmayan, noradrenalin sentezinin bir basamağı olarak değerlendirilmiştir. Carlsson (180), 1959'da, hayvan çalışmaları sonuçlarından ekstrapiramidal fonksiyon ve Parkinson sendromu gibi nörolojik bozukluklarda dopaminin bir rolü olduğunu (180); daha sonra ise, 1960'larda, O.Hornykiewicz (175), dopaminin muhtemelen ayrı bir nörotransmitter olduğunu ve bazı nöronal yolların tamamen dopamine bağlı olarak belirlenebileceğini ileri sürmüştür. Değişik dopaminerjik fonksiyonların tanımlanması ve Parkinson hastalığının patogenezinde dopamin eksikliğinin sorumlu bulunmasından sonra, piribedil ve dopamin molekülleri arasındaki yapısal benzerlik, etki mekanizmaları arasında da bir benzerlik olabileceğini düşündürmüştür. Bu alanda yoğunlaşan çalışmalar sonucunda, 1971'de, piribedil'in dopaminerjik etkinliği Corrodi ve arkadaşları (180) tarafından saptanmıştır. Bu ilaç maddesi daha önceleri vazodilatör olarak kullanılıyor idi (180). 1970'li yıllarda piribedil'in santral dopamin reseptörleri üzerindeki direkt etkisinin dışında, presinaptik yapılardan dopamin salınımı da sağlayabildiği gösterilmiştir (180). Parkinson hastalığında piribedilin kullanımı yine bu yıllara rastlamaktadır. Örneğin, 1975'te yayınlanan klinik bir



çalışmada, piribedilin Parkinson tremorunda tercihli bir etkisi olduğu görülmüş ve piribedilin günlük yaşam aktivitesinde belirgin iyileşme sağladığı belirtilmiştir (180). Bugün artık biliniyor ki piribedil tamamen dopaminerjiktir, yani, dopaminin eksik olduğu her alanda kullanılabilir. Dopamin azlığının bir dopamin agonisti ile düzeltilmesi basit bir yerine koyma tedavisidir. Piribedil ile Parkinson hastalığının tedavisi temelde bu esasa dayanmaktadır.

### **2.5.3. Analiz Yöntemleri**

Piribedil, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler ile kolayca analiz edilebilir.

Piribedil ve/veya temel metabolitleri için en ilkel analiz yönteminde, ana ilacı radyoaktif olarak işaretleyerek ince tabaka kromatografisinin (TLC) uygulanması esastır (8). Piribedil dahil, birçok ilacın saptanmasında, basit, ucuz ve hızlı bir analitik yöntem olan TLC verilerinin analizi halen kullanılmaktadır (181).

Piribedil ve temel metabolitlerinin, vücut sıvılarında, azota duyarlı dedektör kullanılarak veya kütle spektrometresi ile kombine olarak sıvı gaz kromatografisinde ; son zamanlarda ise 240 nm'de ultraviyole (UV) dedektörü kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile kantitatif analizi yapılmıştır (182). HPLC yöntemi her ne kadar duyarlı ve seçici ise de, ana ilaç ve temel metabolitlerinin farklı fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı karmaşık bir ekstraksiyon prosedürü gerekmektedir (182).

Yapılan bir kantitatif çalışmada, biyolojik örneklerdeki piribedil, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak saptanmıştır. Duyarlı ve seçici bir yöntem olduğu vurgulanan bu yöntemde, beyin ve plazmadan ilacın geri alınma oranı % 70-90 olarak rapor edilmiştir (183).

Bunların yanısıra, piribedil ve temel metabolitlerinin biyolojik örneklerde tayini için kromatografik olmayan kullanışlı yöntemler de mevcuttur (8).

### **2.5.4. Farmakolojik Özellikleri**

Piribedil ve metabolitlerine olan ilgi son yıllarda artmış ve bu ilacın farmakolojik etkilerini de içine alan çalışmalar sıklaşmıştır.

Piribedil, vazodilatör aktivitesi eskiden beri bilinen bir ilaçtır. Dopaminerjik reseptörleri stimüle edebilecek kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir (184). Ayrıca, striatum yüzeyindeki asetilkolini artırır (185). Piribedil'in serebral fonksiyonlar üzerinde dopamine bağlı çeşitli etkileri belgelerle ispat edilmiştir. Örneğin, fonksiyonları düşünebilme, hareketlerde düzensizlik, motor düzen, işitme ve optik algılama. Parkinson'lu hastaların özellikle titremelerinin kontrolünde piribedil'in etkinliği ispatlanmıştır (8,169,186). Bu konuyla ilgili olarak, iki dopaminerjik agonist olan piribedil ve lisurid'in

bazı davranışsal ve histolojik değişiklikler üzerindeki etkilerini saptamak için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya ait bulgular, dopaminin serebral iskemide rol oynadığını ve bu dopaminerjik agonistlerin nörodejenerasyona neden olan iskemiye engellemede yararlı olduklarını göstermiştir (187).

Piribedil'in farmakolojik üstünlüğü diğer bazı çalışmalarda da gösterilmiştir. Sıçanlarla yapılan bir beyin mikrodializ çalışmasında, piribedil ve bromokriptinin bölgedeki kinetikleri incelenmiştir. Her iki bileşiğin de, beyin ön korteksindeki etkinliği daha önce rapor edilmiş diğer dopaminerjik ilaçlardan daha fazladır (188). Bir başka çalışmada, piribedil, 32 Parkinson'lu hastaya oral olarak verilmiştir. Bazı hastalarda tüm semptomları ortadan kaldırmak güç olsa da, piribedil'in Parkinson hastalığının tedavisi için, dopamin reseptör stimülasyonunda çok yararlı olduğu gözlenmiştir (189).

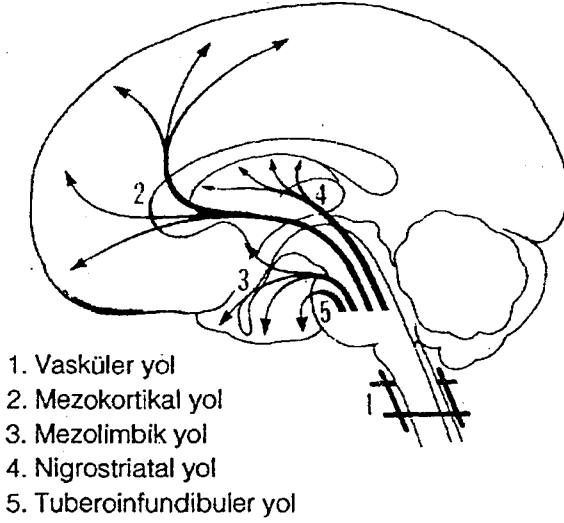
#### **2.5.4.1. Etki Mekanizması**

Piribedil'in dopamin aktivitesi, dopamin ile olan kimyasal benzerliğinden daha çok yapısına dayanmaktadır. Molekülünün üstün yapısal esnekliği dopamin reseptörlerine bağlanmasını mümkün kılmaktadır. Şu ana kadar beş adet temel dopamin reseptör alt tipi tanımlanmıştır. Bağlanma çalışmaları ile, piribedilin çeşitli dopamin reseptörlerine olan afinitesi saptanmıştır (190). Piribedil'in reseptör afinitesi ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, limbik bölgedeki D<sub>3</sub> dopamin reseptörleri için güçlü bir inhibitör olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada, piribedilin dopamin D<sub>3</sub> afinitesinin, dopamin D<sub>2</sub> reseptörleri afinitesinden 20 kez daha yüksek olduğu ve ayrıca dopamin D<sub>1</sub> reseptörü için çok düşük afiniteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Sıçan beyininde yapılmış olan bu testte, piribedil, dopamin D<sub>1</sub> reseptör bağları tarafından yüksek konsantrasyonlarda inhibe edilmiştir (191). Bir başka çalışma ise, piribedilin muskarinik reseptörler ile de bağlandığı fikrini vermektedir (192). Özellikle D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub> reseptörlerine karşı seçici afinitesi, piribedil'in çeşitli hastalıklar üzerindeki aktivitesini açıklamaktadır.

Dopamin eksikliği pekçok serebral yolağın fonksiyonunu bozmaktadır. Bu yollar **Şekil 7**'de açıkça görülmektedir. Bu yolların herbiri farklı fonksiyonları düzenler ve kontrol eder. Piribedil, bu serebral dopamin yolları üzerine etki etmek için kan-beyin engelini aşar. Postsinaptik reseptörler üzerindeki agonist etkisine bağlı olarak yollardaki dopamin eksikliğini giderir.

#### **2.5.4.2. Farmakokinetiği**

Piribedil'in plazma ve beyin kinetikleri, striatal dopamin metabolizmasındaki etkileri ve metabolitleri bilindiği için, nörokimyasal çalışmalarda sıçan türünde yaygın olarak denenmiş ve değerlendirilmiştir (193).

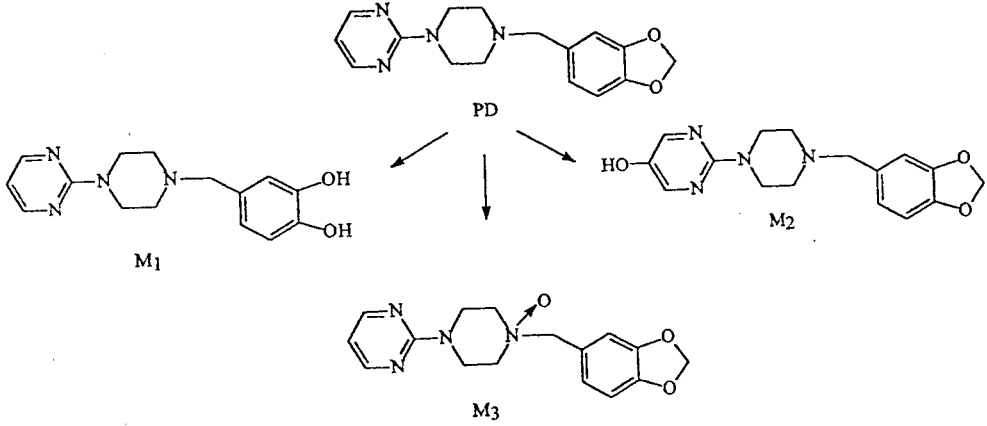


**Şekil 7. Beyindeki Serebral Yolaklar**

Piribedil'in farmakokinetiği ve metabolizması hayvanların yanısıra insanlarda da çalışılmıştır. Piribedil'in tüm türlerde hızlı ve yaygın olarak biyotransformasyona uğradığı ve türler arasındaki kantitatif farklılıklarla birlikte üç temel metaboliti, idrar ve/veya kanda teşhis edilmiştir (193). Bunlar aşağıdaki metabolik reaksiyonlar sonucu oluşmaktadır: metilendioksifenil köprüsünün dimetilasyonu ile bir kateşol ortaya çıkar: 1-[3,4-dihidroksibenzil-4-(2-pirimidinil)-piperazin] (S584, M<sub>1</sub>); pirimidin p-hidroksilasyon ile halka verir: 1-[3,4-metilen-dioksibenzil-4-(5-hidroksi-2-pirimidinil)-piperazin] (p-hidroksi piribedil, M<sub>2</sub>); ve piribedil'in N-oksidasyonu ile N-oksit (M<sub>3</sub>) (Şekil 8) (182). Piribedil, bütün türlerde karaciğer tarafından etkin bir şekilde ekstre edilir sonuçta çok düşük biyoyararlanım ortaya çıkar (8). Bunlara ilaveten, hayvanlarda yapılan in vivo çalışmalarda, minör metabolitler bulunmuştur. Ancak, bu metabolitlerin farmakokinetikleri ve insan ve hayvanlardaki farmakolojik etkileri hala anlaşılamamıştır (8).

Piribedil kısa eliminasyon yarı ömrüne sahiptir. Eliminasyon yarı ömrü 2 saattir (169). Benzer bileşiklerle kinetik ve metabolik profilleri arasındaki farklılık ve benzerlikleri tanımlamak için yapılan bir çalışmada, piribedil, i.v. enjeksiyonun ardından 30 dk'lık bir eliminasyon yarı ömrü ile vücuttan çabucak uzaklaşmıştır. Yine aynı çalışmada, tüm dokular dikkatle gözden geçirilmiş, piribedil'in genelde yaygın olarak dağıldığı, özellikle de akciğer ve yağ dokusunda toplandığı görülmüştür. Bu çalışmada incelenen 1-(2-pirimidinil)-piperazin PmP metaboliti ise, büyük oranda böbrek, akciğer ve beyinde toplanmıştır. Bu bulgular, hücre membranlarından ilaçların transportu ve dokuya bağlanması, hücresel

yapıların yağ bileşikleri içinde lipofilik ilaçların çözünürlüğünü de içine alacak birtakım farklı mekanizmalarla açıklanabilir (194).



**Şekil 8. Piribedil (PD) ve Kateşol (M<sub>1</sub>), p-Hidroksilat (M<sub>2</sub>) ve N-oksit (M<sub>3</sub>) Metabolitlerinin Kimyasal Yapısı**

Sıçanlara IV verilen piribedil'in kinetiği de saptanmıştır. Sonuçta ortaya çıkan, geniş doku dağılımı ve hızlı hepatik eliminasyon, lipofilik bir ilaç için beklenen olaylardır (194).

Sarati ve arkadaşları (193), etkin maddeyi, daha önceden test edilen dozlarda (15 ve 60 mg/kg) IP olarak injekte etmişlerdir. Piribedil'in sıçanlarda, 10-30 mg/kg IV doz için rapor edilen nispeten kısa eliminasyon yarı ömrü, bu çalışmada 15 mg/kg doz için bulunan yaklaşık 30 dk ile doğrulanmıştır. Piribedil hemen hemen tamamiyle hepatik metabolizma ile elimine edilmektedir. Son derece polar metabolitler ve diğer konjuge türevlerin biyotransformasyon tipi ise tanımlanamamıştır.

Ana maddenin beyin ve plazmaya aynı hızla geçtiği kaydedilmiştir (193). Buna rağmen beyin konsantrasyonları plazmayı aşmaktadır. Beyinden uzaklaşma, 15 ve 60 mg/kg dozlardan sonra plazmadaki ile hemen hemen paraleldir. Bu da, yani, plazmadaki piribedil değişikliklerine paralel beyin konsantrasyonları, kan/beyin engelinde karşıdan karşıya serbest ve hızlı dağıtım olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> metabolitleri ve özellikle M<sub>3</sub>, beyine ana maddeden daha düşük oranda penetre olmaktadır. Buna neden olarak, ana maddenin diğerlerinden daha yüksek polariteye sahip olduğu öne sürülmüştür (193).

Özetle bu çalışmalar şunları göstermiştir:

a- M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, IP verilen piribedilin sıçanların beyindeki, minör metabolitleridir,

b- IP ve ICV olarak enjekte edilen piribedil'in striatadaki dopamin metabolitlerinin miktarına etkisi, doza-bağımlı olarak değişmeyen ilacın kinetiğine bağlıdır. Böylece, şu ortaya çıkmaktadır: Piribedil'in bu metabolitleri sıçanlardaki dopaminerjik etkilere katkıda bulunmamaktadır (193).

#### **2.5.5. Yan Etkileri ve Toksisitesi**

Piribedil'in şiddetli yan etkilerine ait şikayetler, kullanılmaya başlandığı yıllardan bu yana dikkat çekmiştir. Tedavi değeri ile ilgili yapılan çalışmalarda, şiddetli psikiyatrik yan etkilerinden dolayı tedavinin kontrolü dahi zor olmuştur (180).

Bugün tedavi sırasında gözlenen yan etkiler arasında bulantı, kusma, bradikardi, baş ağrısı, baş dönmesi, gastrointestinal bozukluklar, diskinezi, öfori, mani, uykusuzluk, "flushing" yer almaktadır (195). Bu yan etkiler özellikle doz arttırıldığı sırada ortaya çıkmaktadır. Dozun yavaş yavaş arttırıldığı durumlarda, tüm dopaminerjik agonistler ile sıkça görülen kontrendikasyonlara (kardiyojenik şok, akut faz myokard enfarktüsü) dikkat edilmelidir (190).

Piribedil, çok yüksek dozlarda, C.T.Z. (chemoreceptive trigger zone) üzerine etkiyle kusmaya yol açar. Bu şekilde tabletler derhal atılacağından, doz aşımı ile ilgili herhangi bir veri mevcut değildir.

#### **2.6. GLİSERİL BEHENAT (Compritol 888 ATO®)**

Gliseril behenat, yağ asitleri ve gliseritlerin bir karışımı olup, esasını behenik asit oluşturur (10,11). Zayıf kokulu, akıcı bir tozdur. Erime derecesi yaklaşık 70°C'dir. Pratik olarak suda ve alkolde çözünmez, kloroformda çözünür (10). 35°'yi aşmayan sıcaklıkta, hava geçirmez kaplarda saklanır (10,11).

Gliseril behenat, pratik olarak inerttir. Bu nedenle, formülasyonlardaki aktif bileşenlerin stabilitesine katkı sağlayabilir. Gliseril behenat, son derece yüksek dozlarda uygulandığında bile yan etkileri sınırlıdır (3). Üstün vasıflarından dolayı birçok uygulamada rahatlıkla kullanılmaktadır. Örneğin, direkt basım, yağ granülasyon, sıcak eritme/ kaplama, emülsiyon kaplama, püskürterek dondurma, pelletler, minitabletler, boncuklar (12). Gliseril behenat, tablet yapımında, bağlayıcı ve lubrikan olarak da kullanılır (10). Kullanımı sırasında 80°C'den yüksek sıcaklıkta eritilmez ve karıştırılmaz (11).

Gliseril behenat, dikkate değer ayrıcalıkları ile sürekli etkili formülasyonlarda sıkça kullanılan bir bileşendir. Tüm çalışmalarda, gliseril behenat miktarı arttıkça etkin madde salım hızı azalmaktadır. Bu nedenle, yapılan çalışmalarda benzer çözünme hızı profilleri elde edilmektedir. Formülasyonlarda etkin maddenin uzatılmış salımı elde edilmiş ve tabletler in vitro çözünme hızı testi boyunca bozulmamış olarak kalmışlardır (12). % 20 gliseril behenat

ile hazırlanan teofilinin sürekli etkili formülasyonu tavşanlara oral olarak verildiğinde, in vivo uzatılmış emilimi destekleyen in vitro uzatılmış salım elde edilmiştir (12).

Gliseril behenatın uzatılmış salım sağlama potansiyeli çeşitli çalışmalarla belgelenmiştir. Örneğin, El-Sayed ve arkadaşları (196), yapmış oldukları bir çalışmada, teofilin tabletlerini üç farklı geciktirilmiş salım ajanı (Compritol 888®-gliseril behenat-, Klucel HXF®-hidroksipropil selüloz- ve Carbopol 934® P-poliakrilik asit) ile hazırlayarak, bunların salım kinetiklerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada, gliseril behenat tabletlerinin salım profillerinin diğer ajanlardan daha iyi olduğu bulunmuştur. Ayrıca, ilaç salım profillerine çözünme ortamının pH'sının etkisi de incelenmiş ve yine gliseril behenat tabletlerinde 0.1 N HCl'de ve pH 7.2 fosfat tamponunda benzer salım davranışları yani geciktirilmiş salım elde edilmiştir. Aynı araştırmacıların bir başka çalışmasında, yine aynı ajanların in vivo salım kinetikleri ve biyoyararlanımları karşılaştırılmıştır. Uzatılmış salım ajanı içeren tabletler kontrol tabletlerinden daha yavaş in vivo ilaç salımı sağlamıştır. Bu etki, gliseril behenat formülasyonlarında yüksek, hidroksipropil selülozda düşüktür. Gliseril behenat tabletlerinin salım profilleri, difüzyon kontrollü mekanizma içeren, zamanın kare kökü kinetiği ile tanımlanmıştır (197).

Tüm bu anlatılan üstünlükleri nedeni ile, gliseril behenat, birçok katı lipit nanopartikül (SLN) çalışmasında da taşıyıcı materyal olarak kullanılmıştır (3,124,134,139).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. MADDE ve CİHAZLAR

##### 3.1.1. Kullanılan Maddeler

Asetonitril	Lab-Scan, İrlanda
Buspiron	Deva, Türkiye
Derişik poliglikolize C8-C10 gliseritleri (Labrasol®)	Gattefosse, Fransa
Etanol	Tekel, Türkiye
Etil asetat (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> )	E. Merck, Almanya
Gliseril behenat (Compritol 888 ATO®)	Gattefosse, Fransa
Hekzan (n-hekzan C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> )	E. Merck, Almanya
Hidroklorik asit (HCl)	E. Merck, Almanya
Kloroform (CHCl <sub>3</sub> )	E. Merck, Almanya
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	E. Merck, Almanya
Monobazik potasyum fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	E. Merck, Almanya
Piribedil	Technologie Servier, Fransa
Polioksietilen (20) sorbitan monooleat (Tween 80®)	E. Merck, Almanya
Potasyum karbonat (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	E. Merck, Almanya
Potasyum klorür (KCl)	J.T.Baker, USA
2-Propanol	E. Merck, Almanya
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	E. Merck, Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	E. Merck, Almanya
Sodyum klorür (NaCl)	E. Merck, Almanya

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bilyalı Çelik Değirmen	Özel Tasarım, Anadolu Üniversitesi Atölyeleri
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	Mettler Toledo DSC 821
Dissolüsyon Cihazı	Aymes
Erime Derecesi Tayin Cihazı	Stuart SMP 1

Liyofilizatör	Edwards Freeze Dryer Modulyo LH Leybold-Heraeus LYVAC GT2
Magnetik Isıtmalı Karıştırıcı	Electro-Mag
Partikül Boyut Dağılım Cihazı	Coulter LS 230 Malvern Mastersizer E
pH-metre	Schott CG 841
Reometre	Brookfield DV III
Rotavapor	Bibby RE 100
Santrifüj	Hettich EBA 8
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	Philips PW 1830 Generator
Yatay Çalkalayıcı	Heidolph Unimax 1010
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi	Hewlett Packard (HP) 1100

### 3.2. YÖNTEMLER

Bu bölümde mikro- ve nanopartiküllerin formülasyonunda kullanılan etkin ve matris maddenin fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi, kullanılan miktar tayini yöntemlerinin validasyon çalışmaları, formülasyonların hazırlanışı ve bu formülasyonlarda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar anlatılacaktır.

#### 3.2.1. Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinler

##### 3.2.1.1. Piribedil ile Yapılan Çalışmalar

Piribedil'in özelliklerini ve analitik saflığını saptamak için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

##### 3.2.1.1.1. Spektrumlar

##### 3.2.1.1.1.1. UV-Spektrumu

Değişik ortamlardaki [distile su, serum fizyolojik (SF), pH 1.2 ve pH 7.4] piribedil çözeltilerinin spektrumları 300-200 nm dalga boylarında UV-Spektrofotometresi kullanılarak alınmış  $\lambda_{maks}$  ve  $\lambda_{min}$  değerleri belirlenmiştir.



### **3.2.1.1.1.2. IR-Spektrumu**

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

### **3.2.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)**

Piribedil'in İTK ile teşhisi için, alkolde 1 mg/ml konsantrasyondaki çözeltisi kılcal boru yardımıyla Silikajel 60G ve Silikajel 60HF (35:5) ile hazırlanan plaklara uygulanmıştır. Plaklar; kloroform-metanol (95:5) (h/h) ve hekzan-etil asetat-metanol (50:45:5) (h/h) hareketli fazları içeren tanklara yerleştirilmiştir. Hareketli fazlar uygulama noktasından itibaren 10 cm yürütülmüştür. Plaklar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra lekeler 254 nm'lik UV-lambası altında incelenmiş ve Rf değerleri hesaplanmıştır.

### **3.2.1.1.3. Erime Derecesi Tayini**

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

### **3.2.1.1.4. Termal Analiz**

Piribedil'in termal analizinde, diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılmıştır. Piribedil,  $10^{-4}$  hassasiyetle alüminyum örnek kabında tartılmış, kapak basınç yardımı ile kapatılıp, sıkıştırılmıştır. Alüminyum referans kullanılarak, 5 K/dk ısı artışı ve 200 ml/dk  $\text{N}_2$  akış hızında termal analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.1.1.5. Piribedil Miktar Tayini**

İn vitro çözünme hızı testlerinde UV-spektrofotometrik yöntem, in vivo peroral biyoyararlanım çalışmasında YBSK yöntemi kullanıldığından, her iki yönteminde güvenilirliğini tespit için validasyon çalışmaları yapılmıştır.

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

##### **3.2.1.1.5.1.1. Doğrusallık**

Piribedil'in standart eğrilerinin belirlenmesinde, pH 1.2 için  $0.1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ; pH 7.4, distile su ve SF için  $0.04 \text{ mg.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki stok çözeltilerinin seyreltilmesi ile 2-11  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonlarında piribedil çözeltileri hazırlanmıştır. Bu farklı ortamlardaki çözeltilerin absorbanları, çalışılan çözücünün maksimum dalga boyunda belirlenmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorban değerlerinden, herbir ortama ait doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Her konsantrasyon değeri için deney üç kez tekrarlanmıştır.

### **3.2.1.1.5.1.2. Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik**

İn vitro salım çalışmalarında çözünme ortamı olarak kullanılan, distile su, pH 1.2 ve pH 7.4 ortamlarında piribedil'in 3'er farklı konsantrasyonda (9, 17 ve 26  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin absorbansları, çalışılan çözücünün maksimum dalga boyunda belirlenmiştir. Her konsantrasyon değeri için deney altı kez yapılmıştır. 1. gün içinde yapılan tüm bu çalışmalar 2. ve 3. günlerde de tekrarlanmıştır (k=3) (198). Üç gün boyunca elde edilen sonuçlardan, gerekli formüller yardımıyla, yöntemin tekrarlanabilirlik ve günlerarası kesinlik değerleri hesaplanmıştır (199).

### **3.2.1.1.5.1.3. Seçicilik**

Yöntemin seçiciliğini araştırmak amacı ile, biri soğuk (C10-P5-L5), diğeri sıcak (C2.5-P5-T1.2) homojenizasyon tekniği ile, etkin maddesiz (plasebo) iki formülasyon hazırlanmıştır. Her iki formülasyon için, in vitro salım çalışmalarında kullanılan miktarda formülasyonlar kullanılarak, üç çözücü ortamında (distile su, pH 1.2 ve pH 7.4) üçer dissolüsyon çalışması yapılmıştır. İn vitro salım çalışmalarında kullanılan koşullarda çalışılarak, alınan örneklerin absorbansları ölçülmüş ve yöntemin seçiciliği araştırılmıştır.

### **3.2.1.1.5.2. YBSK için Validasyon Çalışmaları**

#### **3.2.1.1.5.2.1. Doğrusallık**

Standart eğrinin belirlenmesi için, piribedil ve buspiron'un (internal standart) hareketli faz içindeki stok çözeltileri kullanılarak 0.5/5, 1/5, 5/5, 10/5, 25/5, 50/5, 100/5 (piribedil  $\mu\text{g}$  / buspiron  $\mu\text{g}$ ) oranlarında karışımlar hazırlanmıştır. Bu değişik oranlardaki çözeltiler YBSK'na enjekte edilerek gradient elüsyon yöntemi ile piribedil ve buspirona ait pik alanları bulunmuştur. Herbir piribedil  $\mu\text{g}$  / buspiron  $\mu\text{g}$  değerine karşılık gelen piribedil pik alanı / buspiron pik alanı değerleri yardımı ile doğru denklemi hesaplanmıştır. Hesaplamalarda üç enjeksiyonun ortalama değerleri kullanılmıştır.

#### **3.2.1.1.5.2.2. Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik**

Bir ml'de 25  $\mu\text{g}$  piribedil / 5  $\mu\text{g}$  buspiron oranında etkin madde ve internal standart içeren bir çözelti hazırlanarak YBSK'na enjekte edilmiştir. YBSK ile yapılan in vivo analizlerdeki aynı şartlarda çalışılarak piribedil ve buspirona ait pik alanları bulunmuştur. Enjeksiyonlar 1., 2. ve 3. gün içinde altışar kez yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan gerekli formüller yardımı ile yonteme ait tekrarlanabilirlik ve günlerarası kesinlik değerleri hesaplanmıştır (199).

#### **3.2.1.1.5.2.3. Seçicilik**

Yöntemin seçiciliğini araştırmak amacı ile, tavşanlardan deney öncesi 0. zamanda alınan 20 kan örneği, in vivo analizlerde kullanılan ekstraksiyon yöntemi ile ekstre

edilmiştir. Herbir örnek yine aynı şartlarda YBSK'na enjekte edilerek, piribedil'e ait alıkonma zamanlarındaki cevaplar izlenmiştir.

### **3.2.1.1.6. Çözünürlük Tayinleri**

#### **3.2.1.1.6.1. Farklı Sıvı Ortamlardaki Çözünürlük Tayini**

Piribedil'in çözünürlüğü, distile su, serum fizyolojik, pH 1.2 ve pH 7.4'te tayin edilmiştir. pH 1.2 ve pH 7.4 tamponları, USP XXII'de belirtilen oranlar kullanılarak hazırlanmıştır (200). Bu ortamlarda piribedil'in aşırı doymuş çözeltileri hazırlandıktan sonra, ultrasonik banyoda 15 dk karıştırılmıştır. Çözeltiler, Whatman No.41 süzgeç kağıdından süzülerek sulu kısımlar ayrılmış ve çözünme ortamları ile seyreltilerek UV-spektrofotometre ile absorbanları ölçülmüştür. Çözünebilen piribedil miktarları, kalibrasyon denklemlerinden hesaplanmıştır. Bu işlemler üçer kez tekrarlanmış ve ortalamalar bulunmuştur.

#### **3.2.1.1.6.2. Kullanılan Lipit İçindeki Çözünürlük Tayini**

Piribedil'in Compritol® içindeki çözünürlüğünü saptamak amacıyla, formülasyonlarda kullanacağımız oranlarda (%1,%5,%10) piribedil içeren 10 mg ağırlığında üç adet lipit-etkin madde karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımlar alüminyum örnek kaplarına konularak, kapların kapakları basınçla sıkıştırılmıştır. Örnekler diferansiyel taramalı kalorimetre kullanarak Bölüm 3.2.1.1.4'de açıklanan koşullarda termal analiz uygulanmıştır.

#### **3.2.1.1.7. Partikül Boyut Analizi**

Piribedil'in partikül boyut dağılımı lazer tarama cihazı ile saptanmıştır.

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

Piribedil'in x-ışını kırınım analizi 4-40°C aralığında, 40 kV voltaj ve 20 mA akım şiddetinde Philips PW 1830 jeneratör yardımı ile yapılmıştır.

### **3.2.1.2. Compritol® ile Yapılan Çalışmalar**

Compritol®'ün özelliklerini ve firma spesifikasyonlarına uygunluğunu saptamak amacı ile erime derecesi, IR spektrumu, reolojik, termal ve x-ışını kırınım analiz çalışmaları yapılmıştır.

#### **3.2.1.2.1. IR-Spektrumu**

Compritol®'ün infrared (IR) spektrumu, IR spektrofotometresinde 4000-400 cm<sup>-1</sup> arasında potasyum bromür ile hazırlanan diskleri kullanılarak alınmıştır.

### 3.2.1.2.2. Erime Derecesi Tayini

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

### 3.2.1.2.3. Termal Analiz

Compritol®, aluminyum örnek kabında  $10^{-4}$  hassasiyetle ~10 mg ağırlığında tartılmış, aluminyum kapak ile kapatılmış ve kapak basınç ile sıkıştırılmıştır. Analiz, aluminyum referansına karşı, 200 ml/dk N<sub>2</sub> akış hızı, 5 K/dk ısı artışında diferansiyel taramalı kalorimetre ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.1.2.4. Reolojik Analiz

Compritol®'ün reolojik analizinde Brookfield reometresi kullanılmıştır. Reometrenin özel bölmesine ~2 mg Compritol® konularak, aletin su banyosu Compritol®'ün erime derecesi üzerindeki bir sıcaklığa, 75°C'ye ayarlanmıştır. Bu sıcaklıkta 10-250 rpm arasında reolojik analiz yapılmıştır. Kullanılan reometre, koni-tabla geometrisine sahiptir. Seçilen koninin açısı  $1.565^\circ$ , çapı 1.2 cm ve kayma hızı  $3.84 \times N$ 'dir (N=rpm).

### 3.2.1.2.5. X-Işını Kırınım Analizi

Analiz, 4-40°C aralığında, 40 kV voltaj ve 20 mA akım şiddetinde Philips PW 1830 jeneratör yardımı ile yapılmıştır.

## 3.2.2. Mikro- ve Nanopartiküller ile Yapılan Çalışmalar

### 3.2.2.1. Formülasyonları

Mikro- ve nanopartiküllerin hazırlanmasında katı lipit nanopartikül hazırlamak için önerilen soğuk ve sıcak homojenizasyon teknikleri kullanılmıştır.

#### 3.2.2.1.1. Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Formülasyonlar

Soğuk homojenizasyon yöntemi, laboratuvar koşullarımız içinde modifiye edilmiştir. Formülasyonlarda lipit yüzdesi, diğer parametrelerin formülasyonlara etkisini araştırmak için %10 olarak sabit tutulmuş, buna karşılık etkin maddenin hapsedilebilme oranını araştırmak için piribedil'in lipit içindeki oranları (%1,%5,%10) ve yüzey etken maddenin partikül boyutuna etkisini incelemek için de Labrasol®'ün değişik konsantrasyonları (%1,%2.5,%5) kullanılmıştır. Kullanılan bu oranlar, etkin maddenin lipitteki çözünürlüğü ve yüzey etken maddenin ise kullanım aralığı gözönüne alınarak seçilmiştir. Diğer formülasyon parametreleri ise sabit tutulmuştur.

Kullanılan parametreler **Tablo 2**'de özetlenmiş ve hazırlanan formülasyonların kodları **Tablo 4**'de verilmiştir.

**Tablo 2. Soğuk Homojenizasyon Tekniğinde Kullanılan Parametreler**

Parametre	Deney koşulları
Etkin madde	Piribedil (lipit içinde %1,%5,%10)
Lipit	Compritol® (%10)
Yüzey etken madde	Labrasol® (%1,%2.5,%5)
Çözünme sıcaklığı	80°C
Çözünmede karıştırma hızı	9 500 rpm
Çözünmede karıştırma süresi	5 dk
Öğütme hızı	60 rpm
Öğütme süresi	30 dk
Homojenizasyonda karıştırma hızı	24 000 rpm
Homojenizasyonda karıştırma süresi	5 dk
Kurutma	Liyofilizatör (7gün, -50°C ve 3.2 mBar)
Saklama	Desikatör

### 3.2.2.1.2. Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Formülasyonlar <sup>1</sup>

Sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılarak bir seri mikropartikül ve bu mikropartiküllerin 8 µm'lik selüloz nitrat filtreden süzülmesi ile elde edilen nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda, soğuk homojenizasyon yönteminde kullanılan lipit, etkin madde konsantrasyonları ve yüzey etken madde tipi, elde edilen mikropartiküllerin büyüklükleri yönünden değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen ön çalışmalar ve önceki deneyimler gözönünde tutularak, formülasyonda lipit yüzdesi %2.5, etkin maddenin lipit içindeki oranı %5 ve yüzey etken madde olarak Tween 80® %1.2 konsantrasyonda kullanılmıştır.

Kullanılan parametreler **Tablo 3**'de, hazırlanan partiküllerin kodları ise **Tablo 4**'de verilmiştir.

### 3.2.2.2. Hazırlanışları

#### 3.2.2.2.1. Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlama

Piribedil mikropartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan modifiye soğuk homojenizasyon tekniğinin deney koşulları **Tablo 2** 'de görülmektedir.

1 Sıcak homojenizasyon çalışmaları ile partikül boyut, x-ışını kırınımı ve termal analizler, Berlin Freie Üniversitesi'nde Prof.Dr.Rainer H.Müller denetiminde gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3. Sıcak Homojenizasyon Tekniğinde Kullanılan Parametreler**

Parametre	Deney koşulları
Etkin madde	Piribedil (lipit içinde %5)
Lipit	Compritol® (%2.5)
Yüzey Etken Madde	Tween 80® (%1.2)
Çözünme sıcaklığı	80°C
Homojenizasyonda karıştırma hızı	20 500 rpm
Homojenizasyonda karıştırma süresi	1 dk
Saklama	Oda sıcaklığı

**Tablo 4. Mikro- ve Nanopartikül Formülasyonlarının Kodları**

Compritol® (%)	Piribedil (%)	Labrasol® (%)	Yöntem	Kod
10	1	1	Soğuk homojenizasyon	C10-P1-L1
10	1	2.5	Soğuk homojenizasyon	C10-P1-L2.5
10	1	5	Soğuk homojenizasyon	C10-P1-L5
10	5	1	Soğuk homojenizasyon	C10-P5-L1
10	5	2.5	Soğuk homojenizasyon	C10-P5-L2.5
10	5	5	Soğuk homojenizasyon	C10-P5-L5 *
10	10	1	Soğuk homojenizasyon	C10-P10-L1
10	10	2.5	Soğuk homojenizasyon	C10-P10-L2.5
10	10	5	Soğuk homojenizasyon	C10-P10-L5

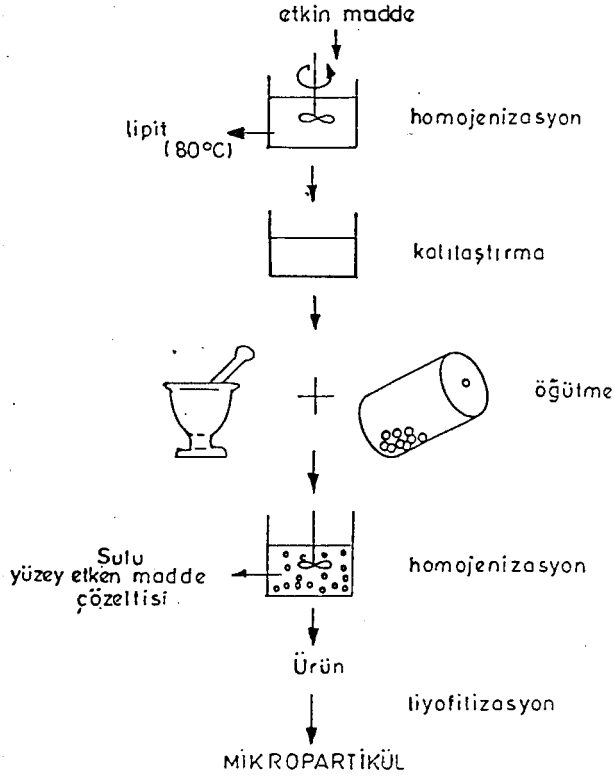
  

Compritol® (%)	Piribedil (%)	Tween 80® (%)	Yöntem	Kod
2.5	5	1.2	Sıcak homojenizasyon	C2.5-P5-T1.2
2.5	5	1.2	Sıcak homojenizasyon	c2.5-p5-t1.2

\* In vivo testler için seçilen formülasyon

Yöntem kısaca şöyledir: etkin madde eritilmiş lipit içerisinde, 80°C de, ultraturaks ile 9500 rpm de 5 dk karıştırılarak çözündürülmüş ve tekdüze dağılması sağlanmıştır. Oda sıcaklığında katılaştıran etkin madde-lipit karışımı buzdolabında 7-8 dk soğutulduktan sonra önce porselen havanda havan eli ile daha sonra bilyalı değirmende karbon buzlu altında 60

rpm'de 30 dk öğütülmüştür. Elde edilen katı madde sulu yüzey etken madde çözeltisinde 24000 rpm de 5 dk homojenize edilmiştir. Karışım liyofilizatörde kurutulularak mikropartiküller elde edilmiştir. Hazırlama aşamaları Şekil 9'da şematik olarak gösterilmiştir.



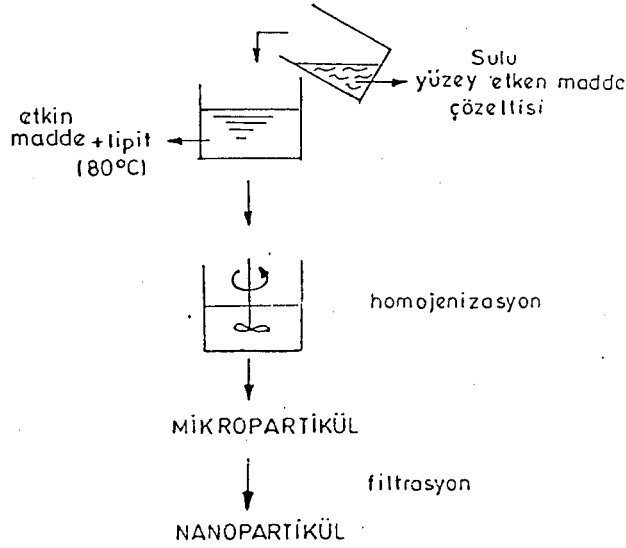
Şekil 9. Soğuk Homojenizasyon Tekniği ile Piribedil Mikropartiküllerinin Hazırlanma Aşamaları

### 3.2.2.2.2. Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlama

Sıcak homojenizasyon tekniğinin deney koşulları Tablo 3'de görülmektedir.

Yöntem şöyle özetlenebilir: etkin madde eritilmiş lipit içerisinde 80°C de çözündürülmüştür. %1.2 konsantrasyondaki sulu yüzey etken madde çözeltisi de aynı sıcaklığa getirilmiştir. Etkin madde-lipit karışımı üzerine sulu yüzey etken madde çözeltisi eklendikten sonra 80°C sıcaklıkta tutularak ultraturaks ile 20500 rpm'de 1 dk homojenize edilmiştir. Böylece, mikropartiküller elde edilmiştir. Hazırlanan mikropartiküller, daha sonra, 8 µm'lik filtreden vakum yardımı ile süzülerek nanopartiküller ayrılmıştır. Hazırlama aşamaları Şekil 10'da şematik olarak verilmiştir.

Her iki yöntem ile hazırlanan formülasyonların hepsine in vitro testler uygulanmıştır. Ancak, tek bir formülasyonda in vivo incelemeler sürdürülmüştür.



**Şekil 10. Sıcak Homojenizasyon Tekniği ile Piribedil Mikro- ve Nanopartiküllerinin Hazırlanma Aşamaları**

### 3.2.2.3. Mikro- ve Nanopartiküllerin Özelliklerine ait Çalışmalar

#### 3.2.2.3.1. Şekilleri <sup>2</sup>

Liyofilize edilmiş partiküller karbon bantı üzerine yayılıp, altın ile kaplandıktan sonra yüzey özellikleri ve şekilleri taramalı elektron mikroskopunda saptanmıştır. Hazırlanan partiküller ile piribedil'i karşılaştırmak amacıyla, toz haldeki piribedil aynı yöntem ile incelenmiştir.

#### 3.2.2.3.2. Partikül Büyüklük Dağılımları

Soğuk homojenizasyon tekniği ile hazırlanan herbir mikropartikül formülasyonu ultrasonik banyoda distile su içerisinde disperse edilerek, partikül boyut dağılımları, lazer tarama cihazı ile ölçülmüştür. Sıcak homojenizasyon tekniği ile hazırlanan mikro- ve nanopartiküllerin partikül boyut dağılımları ise lazer kırınım cihazı ile saptanmıştır.

#### 3.2.2.3.3. IR Analizleri

Hazırlanan herbir mikro- ve nanopartikül formülasyonunun infrared (IR) spektrumu, IR spektrofotometresinde  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  arasında potasyum bromür ile hazırlanan diskler kullanılarak alınmıştır.

<sup>2</sup> Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) fotoğrafları Anadolu Üniversitesi Seramik Mühendisliği'nde Yard.Doç.Dr.Servet Turan tarafından çekilmiştir.



#### **3.2.2.3.4. Termal Analizleri**

Hazırlanan piribedil mikro- ve nanopartiküllerinin termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılmıştır. ~10 mg ağırlığındaki mikropartikül örnekleri alüminyum örnek kaplarında 10<sup>-4</sup> hassasiyetle tartıldıktan sonra, kapaklar sıkıştırılarak Bölüm 3.2.1.1.4'de açıklanan koşullarda termal analize tabi tutulmuştur.

#### **3.2.2.3.5. Hazırlama Verimi**

Kullandığımız soğuk homojenizasyon yöntemindeki üretim kapasitesini değerlendirebilmek için formülasyondaki toplam katı miktardan hareketle, aşağıdaki formül kullanılarak mikropartiküllerin hazırlama verimleri hesaplanmıştır (17).

$$\% \text{ verim} = \frac{A}{B} \times 100$$

A: Elde edilen mikropartikül ağırlığı (g)

B: Formülasyonda kullanılan katı madde ağırlığı (g)

#### **3.2.2.3.6. Partiküllerde Piribedil Miktar Tayini**

##### **3.2.2.3.6.1. Partiküllerde Yüklenen Piribedil Miktarı**

###### **3.2.2.3.6.1.1. Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerde Toplam Piribedil Miktarı**

20 mg hassas tartılmış mikropartikül, pH 1.2 içersinde, ultraturaks ile 8000 rpm de 15 dk çalkalanmıştır. Mikropartiküller 0.2 µm'lik membran filtre ile ayrılarak süzüntüde UV-spektrofotometre ile miktar tayini yapılmıştır. Her deney 3 kez tekrarlanmıştır.

###### **3.2.2.3.6.1.2. Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerde Toplam Piribedil Miktarı**

100 µl mikro- veya nanopartikül süspansiyonu, pH 1.2 içersinde, ultraturaks ile 8000 rpm'de 15 dk çalkalanmıştır. Partiküller 0.2 µm'lik filtre ile ayrılarak süzüntüde UV-spektrofotometre ile miktar tayini yapılmıştır. Her deney 3 kez tekrarlanmıştır.

###### **3.2.2.3.6.2. Partiküllerde Hapsedilen Piribedil Miktarı**

Soğuk homojenizasyon ile hazırlanan mikropartiküllerde hapsedilen piribedil miktarını saptamak amacıyla, mikropartiküllerin yüzeyinde ve içindeki etkin madde miktarları ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bunun için, hassas olarak tartılmış 20 mg mikropartikül pH 1.2 içinde ultrasonik banyoda 5 dk tutulmuş, santrifüj ile mikropartiküller ayrılmıştır. Çözeltinin absorbansı UV-spektrofotometre ile ölçülerek yüzeydeki etkin madde miktarları hesaplanmıştır.

Hapsedilen piribedil miktarının hesaplanması için santrifüjle ayrılan mikropartiküller pH 1.2'de bu kez ultraturaks kullanılarak 8000 rpm de 15 dk çalkalanmıştır. Whatman No.41 ile ayrılan süzüntüdeki piribedil miktarı UV-spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve hapsedilen piribedil miktarı gerekli hesaplamalar ile bulunmuştur. Her deney 6 kez tekrarlanmıştır.

Sıcak homojenizasyon ile hazırlanan mikropartikül ve nanopartiküller, süspansiyon olarak elde edildiğinden ve yukarıda bahsedilen yöntemle sağlıklı deney yapılamadığından, hapsedilen piribedil miktarı hesaplanamamıştır.

### **3.2.2.3.7. Saklama Koşullarında Stabilite Kontrolü**

Soğuk homojenizasyon tekniği ile hazırlanan mikropartiküllerden seçilen bir formülasyon, buzdolabı ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), oda sıcaklığı ( $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), etüv ( $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) ve iklim dolabında ( $60\%$  relatif nem ve  $40\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ) saklanmıştır. 15 gün, 1, 3 ve 6 aylık saklama sürelerinin sonunda, Bölüm 3.2.1.1.2'de anlatıldığı şekilde ince tabaka kromatografisi kullanılarak piribedil'in Rf değerleri bulunmuştur.

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

Hazırlama yöntemleri arasındaki farkı incelemek amacı ve deney koşullarının sınırlı olması nedeni ile biri sıcak biri soğuk homojenizasyon tekniğinden olmak üzere iki formülasyonun x-ışını kırınım analizi yapılmıştır.

### **3.2.2.4. Mikro- ve Nanopartiküller ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar**

Bu çalışmalar partiküllerin in vitro davranışları hakkında fikir edinebilmek ve ilerleyen çalışmalarda in vivo bulgular ile bir korelasyon kurabilmek için yapılmıştır.

#### **3.2.2.4.1. İn Vitro Salım Çalışmaları**

İn vitro koşullarda, mikro- ve nanopartiküllerden piribedil salımını değerlendirme çalışmalarında, USP XXII'de tanımlanan palet yöntemi kullanılmıştır (201).

Soğuk homojenizasyon tekniği ile hazırlanmış ve tam tartılmış mikropartikül örneklerinin (500 mg) çözünme hızı çalışmaları, 900 ml çözünme ortamında (distile su ile fizyolojik pH'lar olan pH 1.2 ve 7.4),  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de, 50 rpm kullanılarak yapılmıştır. Çözünme ortamından belirli zamanlarda (5.dk, 15.dk, 30.dk, 1.s, 2.s, 4.s, 7.s, 24.s, 29.s, 48.s, 53.s, 72.s, 77.s, 96.s ve 103.s'lerde) enjektör yardımı ile alınan 5 ml'lik örneklerin, 0.2  $\mu\text{m}$ 'lik selüloz nitrat filtre ile süzülükten sonra, UV-spektrofotometresinde absorbansları ölçülmüştür. Absorbans değerlerine göre salınan piribedil miktarı hesaplanmıştır. Alınan örnek hacmi kadar taze ortam sıvısı her seferinde yerine konulmuştur. Herbir çalışma 3 kez tekrarlanmıştır.

Yapılan bu ön çalışmaların sonuçlarına göre seçilen formülasyon ile piribedil'i karşılaştırmak amacıyla aynı deneyler mikropartikül ve piribedil için 6'şar kez yapılmıştır. Piribedil'in in vitro salım çalışmalarında, seçilen mikropartikül formülasyonunun 500 mg'ında bulunan miktar kadar piribedil kullanılmıştır. Benzer çalışmalar, aynı miktarda piribedil içeren ve sıcak homojenizasyon tekniği ile hazırlanmış mikro- ve nanopartikül formülasyonları için yapılmış, deneyler 6 kez tekrarlanmıştır.

Salım bulguları önce zamana karşı yüzde salım olarak grafiğe geçirilmiş, daha sonra bu amaç için yazılmış bir bilgisayar programı ile salım kinetikleri incelenmiştir (202).

Formülasyonların in vitro salım sonuçlarını, etkin maddenin ticari preparatı ile karşılaştırmak amacı ile aynı çalışmalar piyasa tableti ile tekrarlanmıştır. Bunun için piribedil'in ticari preparatı (Trivastal 50 Retard®) üzerinde etkin madde miktar tayini yapıldıktan sonra, 900 ml'lik çözünme ortamında, 37±0.5°C'de, 50 rpm'de, basket yöntemi kullanılarak çözünme hızı çalışmaları yapılmıştır (201). Çözünme ortamından 5.dk, 15.dk, 30.dk, 45.dk, 1.s, 2.s, 3.s, 4.s, 5.s, 6.s, 7.s, 23.s, 24.s, 25.s ve 27.s'lerde enjektör yardımı ile alınan 5 ml'lik örnekler, 0.2 µm'lik selüloz nitrat filtre ile süzülerek, absorbansları UV-spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve formüller yardımıyla piribedil miktarları hesaplanmıştır. Alınan her örnekten sonra 5 ml taze ortam sıvısı yerine konulmuştur. Aynı deneyler üç farklı çözünme ortamında (distile su, pH 1.2 ve pH 7.4) üçer kez tekrarlanmıştır.

#### **3.2.2.4.2. pH 1.2 Salım Ortamındaki Stabilite Kontrolü**

Piribedil, pH 1.2'deki stabilitesi izlenmek amacıyla, 37°C lik, salım ortamında, salım süresinden daha uzun bir süre bekletilmiştir. Bu süre boyunca belirli zamanlarda alınan örnekler silikajel plaklara uygulanmış ve plaklar kloroform: metanol (95:5) (h/h) hareketli fazını içeren tanklara konulmuştur. Daha sonra Bölüm 3.2.1.1.2.'de açıklandığı gibi Rf değerleri saptanmıştır. Alınan her örneğin Rf değeri taze hazırlanmış piribedil çözeltisinin Rf değeri ile karşılaştırılmıştır.

#### **3.2.2.5. In Vivo Çalışmalar <sup>3</sup>**

Bu bölümde, hayvanlarda yapılan farmakodinamik ve biyofarmasötik testler anlatılacaktır. Seçilen formülasyon ve piribedil'in, farelerde Parkinson modeli tremor testi ve tavşanlarda biyoyararlanım çalışması gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2.5.1. Farelerde Parkinson Modeli ile Tremor Testi**

Yaklaşık 30-35 g ağırlığındaki 10 fareye 30 mg/kg dozda piribedil içeren mikropartikül, 0.5 ml'lik süspansiyonlar halinde peroral olarak verilmiştir. Aynı farelere 1 s 15 dk sonra 0.5 mg/kg dozda haloperidol IP, bundan 45 dk sonra da 200 µg/kg dozda oksotremorin IP olarak verilmiştir. Oksotremorin enjeksiyonundan 5 dk sonra fareler izlemeye alınarak 15 dk boyunca gözlenmiştir. Gözlenen tremor şiddetine göre skorlar verilerek test tamamlanmıştır (203). Bu skorlar titremenin etkisine göre verilen farklı numaralardır ve titreme sadece baş bölgesinde ise 1, hem baş hem vücut bölgesinde ise 2, titreme tüm vücutta görülüyor ise 3, hiç titreme yok ise 0 verilmektedir. Daha sonra bu skorlar Student t-testi ile değerlendirilmiştir (204).

Aynı test bir kontrol grubu için, bir de toz piribedil için, herbiri 10 adet farklı gurup farede olmak üzere tekrarlanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

### **3.2.2.5.2. Tavşanlarda Peroral Biyoyararlanım Çalışması**

Mikropartiküllerin peroral biyoyararlanımını, toz piribedil ile karşılaştırmak amacıyla, 2.5-3 kg ağırlığındaki 10 tavşana 60 mg/kg dozda toz, 10 tavşana da 60 mg/kg piribedil içeren mikropartikül, peroral olarak verilmiştir.

Her tavşandan 0.dk, 15.dk, 30.dk., 1.s, 3.s, 5.s, 10.s, ve 24.s'lerde olmak üzere 1-2 ml hacimde 8 kan örneği alınmıştır. Piribedil'in peroral uygulamadaki yarı ömrü 2 saat olduğundan son kan örneğinin 24. saatte alınması uygun bulunmuştur (169). Kan örnekleri tavşan kulak veninden, heparizine PPD enjektör ile alınmış ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Plazma örnekleri -20°C lik dipfirizde analiz yapılmaya dek saklanmıştır (118).

#### **3.2.2.5.2.1. Plazmadaki Piribedil'in Ekstraksiyon ile Ayrılması**

500 µl plazma örneğine, piribedil'in YBSK ile miktar tayininde internal standart (IS) olarak kullanılan buspiron çözeltisinden (10 µg/ml) 50 µl eklenmiştir. 5 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 0.5 M fosfat tamponu (pH 8) ile hacim 2 ml'ye tamamlanmıştır. 11 ml etil asetat-kloroform-2-propanol (85:15:5) (h/h) eklendikten sonra karışım 15 dk yatay çalkalayıcı ile çalkalanmıştır. 600 rpm hızda 10 dk santrifüj ile ayrılan 10 ml'lik organik sıvı, 1.5 ml 0.1 M hidroklorik asit içeren yeni bir test tübüne alınmış ve 15 dk daha çalkalanmıştır. 600 rpm de 10 dk santrifüjden sonra, organik faz atılmış, asidik sulu faz tekrar yukarıda anlatıldığı şekilde alkali yapılmıştır. Bu alkali faz, 10 ml kloroform-2 propanol (95:5) (h/h) ile geri ekstre edilmiş ve ayrılan organik faz rotavapor ile kuruluğa kadar uçurulmuştur (8).

### 3.2.2.5.2.2. Plazmadan Ekstraksiyon ile Geri Kazanılan Piribedil Oranının Hesaplanması

Bu çalışmada, hiçbir ilaç verilmemiş tavşanların kulak veninden alınan kan örneklerinden ayrılan plazmalar kullanılmıştır. 400 µl plazma örneğine, 100 µl piribedil çözeltisi (10 µg/ml ) ve 50 µl buspiron çözeltisi (10 µg/ml ) eklenmiştir. Bölüm 3.2.2.5.2.1.'de anlatılan ekstraksiyon prosedürü izlenerek, etkin madde ekstre edilmiştir. Herbir örnek 100 µl hareketli fazda çözülmüş ve bu çözültiden 20 µl kolona enjekte edilmiştir. Elde edilen piribedil pik alanları kullanılarak geri kazanılan piribedil oranları hesaplanmıştır. Aynı çalışma 6 kez tekrarlanmıştır. Benzer çalışmalar ilave edilen piribedil'in değişik miktarları için de yapılmıştır.

### 3.2.2.5.2.3. Plazmadaki Piribedil'in YBSK ile Miktar Tayini <sup>4</sup>

Bölüm 3.2.2.5.2.1.'de açıklandığı şekilde, üç basamaklı ekstraksiyon işlemi ile plazmadan ekstre edilen piribedil ve IS örneklerinin herbiri 100 µl hareketli fazda çözülmüş ve bu çözültiden 20 µl kolona enjekte edilmiştir (8). Gradient elüsyon yöntemi ile çalışılmış, elde edilen piribedil ve buspiron pik alanları kullanılarak doğru denklemi yardımıyla plazmadaki piribedil konsantrasyonları (µg/ml) hesaplanmıştır.

YBSK'de kullanılan deney koşulları **Tablo 5**'de gösterilmiştir.

**Tablo 5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Çalışma Koşulları**

Cihaz	Hewlett Packard HP 1100
Kolon	Ultracarb ODS C <sub>20</sub> (5µm partikül boyutlu) (çap 4.6 mm, uzunluk 150 mm)
Çözücü Sistemi	A: 0.01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.85) B: Asetonitril:0.01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.85) (50:50)
	<u>t(dk)</u> <u>B(%)</u>
	0        10
	20       90
	25       10
Dedektör	Diode Array
Çalışılan Dalga Boyu	240 nm
Akış Hızı	1.2 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µl

Toz piribedil ve mikropartiküllere ait tüm plazma örneklerinin analizleri sonucu hesaplanan plazma piribedil konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ ), zamana (s) karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafikler yardımıyla  $t_{\text{maks}}$ ,  $C_{\text{maks}}$  ve EAA 'lar hesaplanmıştır.

---

4 YBSK çalışmaları ve IR analizleri, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve ilaç Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

## 4. SONUÇ ve TARTIŞMA

### 4.1. SONUÇLAR

Bu bölümde Piribedil ve Compritol®'ün fizikokimyasal özelliklerine ait sonuçlar ile mikropartikül formülasyonları üzerinde yapılan in vitro-in vivo çalışmaların sonuçları verilecektir.

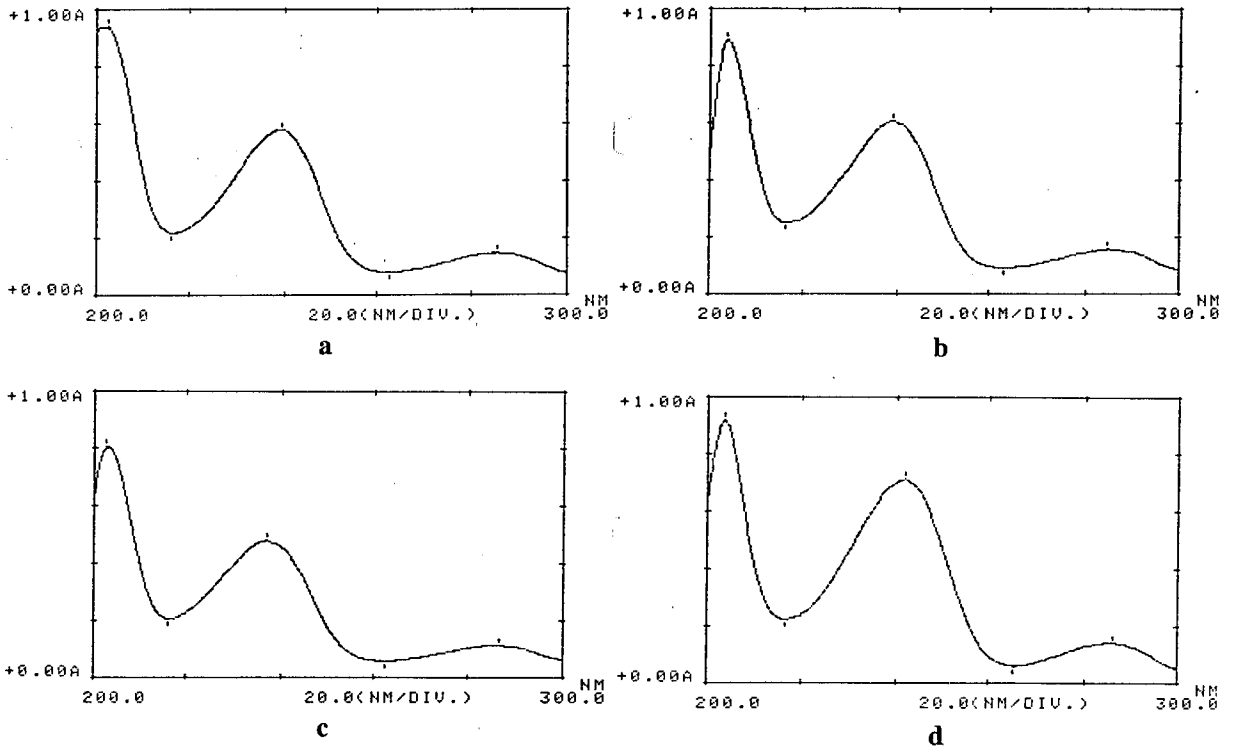
#### 4.1.1. Çalışılan Maddelerle Yapılan Tayinlere ait Sonuçlar

##### 4.1.1.1. Piribedil ile Yapılan Çalışmalara ait Sonuçlar

###### 4.1.1.1.1. Spektrumlar

###### 4.1.1.1.1.1. UV-Spektrumu

Piribedil'in değişik ortamlardaki spektrumları, UV-Spektrofotometresi ile Bölüm 3.2.1.1.1.1'de açıklandığı şekilde alınmıştır. Saptanan UV-spektrumları Şekil 11'de, maksimum ve minimum absorbanlara ait dalga boyları,  $\lambda_{maks}$  ve  $\lambda_{min}$ , Tablo 6'da verilmiştir.



Şekil 11. Piribedil'in Farklı Ortamlardaki UV-Spektrumları

a: Distile Su b: SF c: pH1.2 d: pH7.4

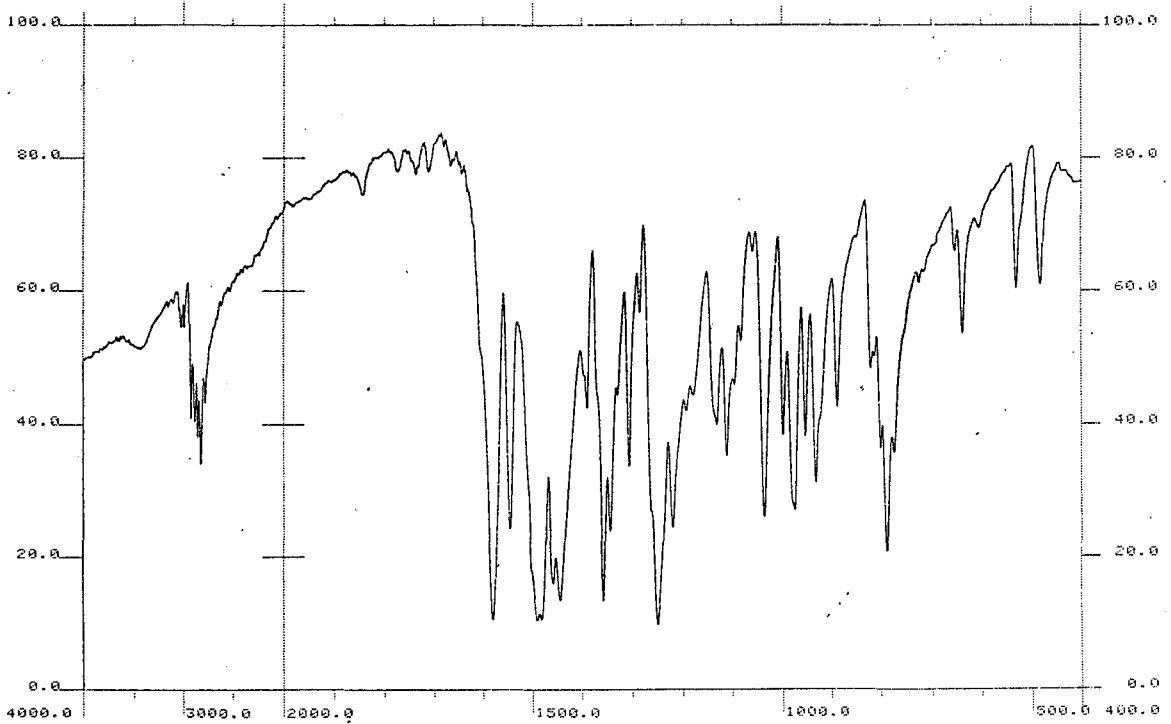
###### 4.1.1.1.1.2. IR-Spektrumu

Piribedil'in potasyum bromür diskleri ile elde edilen IR spektrumu Şekil 12 'de gösterilmiştir. Bu spektrumda:  $3022\text{ cm}^{-1}$  'de aromatik C-H,  $2883$  ve  $2772\text{ cm}^{-1}$  'de alifatik

C-H, 1580-1450  $\text{cm}^{-1}$  arasında C=N, 1251 ve 1036  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O ve 789  $\text{cm}^{-1}$ 'de 1,2,4-trisüstitüe benzen bandları görülmüştür.

**Tablo 6. Piribedil'in Farklı Ortamlarda Elde Edilen UV-Spektrumlarındaki Dalga Boyları**

Ortam	$\lambda_{\text{maks}}$ (nm)	$\lambda_{\text{min}}$ (nm)
Distile su	239.4	262.7
Serum fizyolojik	238.9	263.0
pH 1.2	236.9	262.4
pH 7.4	241.9	265.2



**Şekil 12. Piribedil'in IR-Spektrumu**

#### 4.1.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Piribedil'in ince tabaka kromatografisi kullanılarak teşhisi için Bölüm 3.2.1.1.2'de anlatılan yöntemler kullanılmış ve kullanılan çözücü sistemleri içinde, 254 nm'deki UV-lambasında gözlenen lekelerin Rf değerleri **Tablo 7**'de verilmiştir.



**Tablo 7. Piribedil'in İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanınmasına ait Sonuçlar**

Çözücü sistemi	Rf değeri
Hekzan-Etil asetat-Metanol (50:45:5)	0.65
Kloroform-Metanol (95:5)	0.75

(n=3)

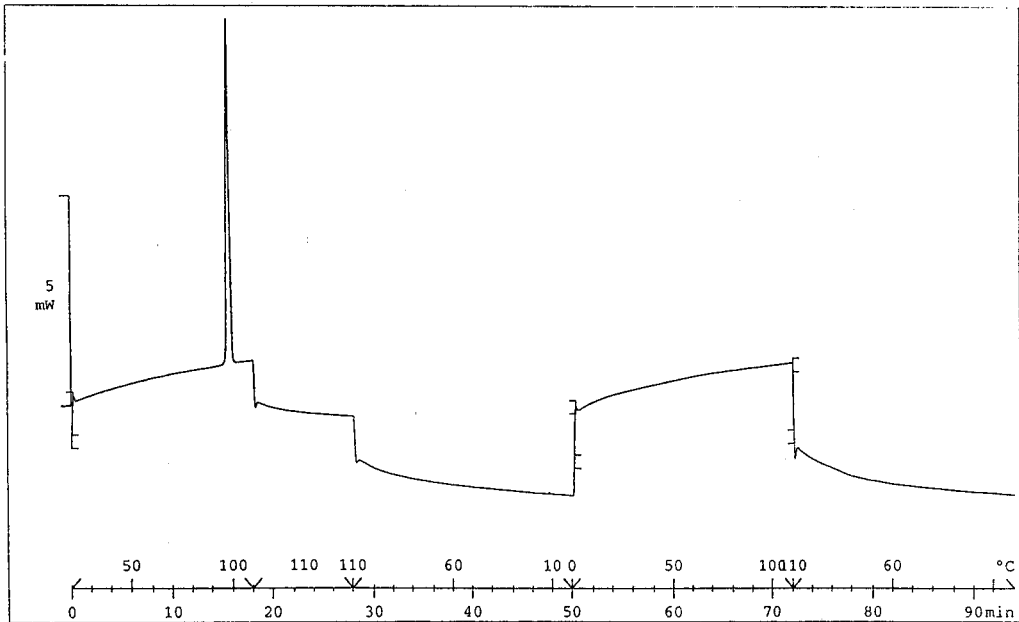
#### 4.1.1.1.3. Erime Derecesi

Erime derecesi tayin cihazında yapılan testler sonucunda piribedil'in erime derecesi 97°C bulunmuştur.

#### 4.1.1.1.4. Termal Analiz

Piribedil'in diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile Bölüm 3.2.1.1.4'de belirtilen koşullarda yapılan termal analizinde, erime sıcaklığının 97.72°C ve maddenin 1 g'ının erimesi için gerekli olan enerjinin 117.26 Joule/g olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu analizde, piribedil'in 1. erimeden sonra tekrar kristallanmediği, analiz sonuna kadar da bir değişikliğe uğramadığı gözlenmiş ve maddenin amorf olduğu belirlenmiştir. Piribedil'in termal analiz termogramı Şekil 13'de gösterilmiştir.



**Şekil 13. Piribedil'in DSC Termogramı**

#### 4.1.1.1.5. Piribedil Miktar Tayini

##### 4.1.1.1.5.1. UV Spektrofotometresi ile Validasyon Çalışmaları

###### 4.1.1.1.5.1.1. Doğrusallık

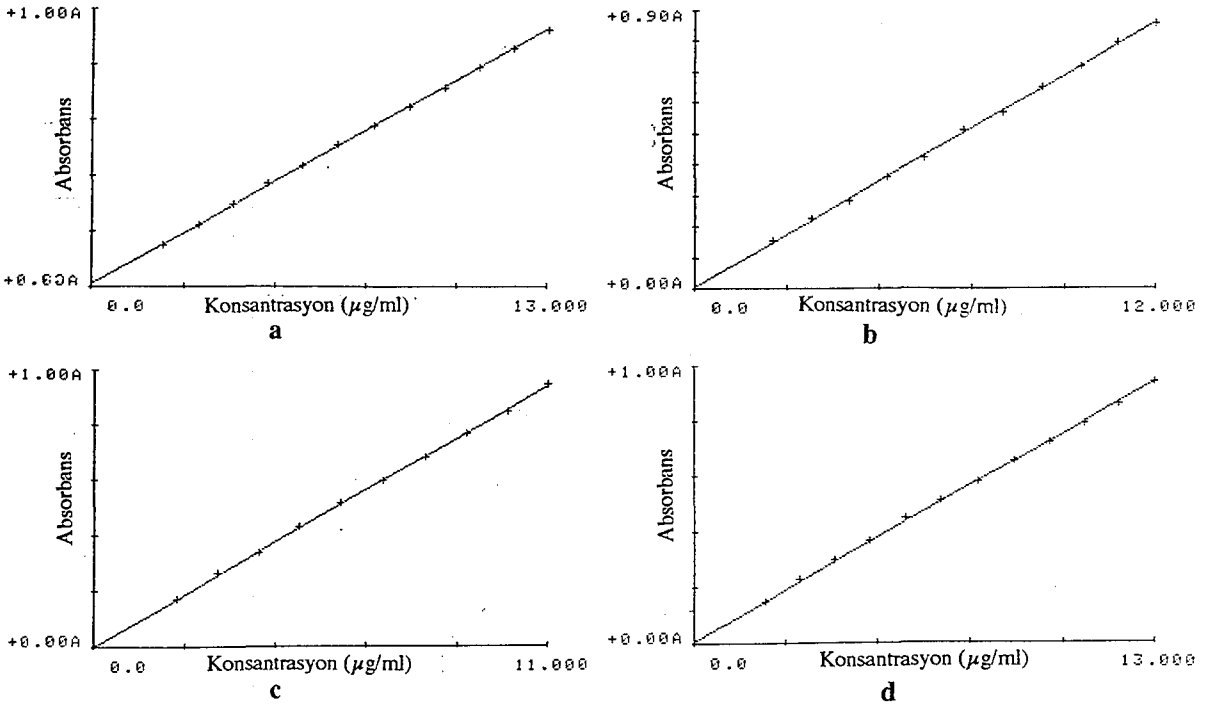
Bölüm 3.2.1.1.5.1.1.'de açıklandığı şekilde farklı ortamlarda ve farklı konsantrasyonlardaki piribedil çözeltilerinin konsantrasyona karşı absorptans grafikleri çizilmiş ve bu veriler yardımıyla eğri denklemleri hesaplanmıştır.

Elde edilen eğriler Şekil 14'de; eğri denklemlerinin eğim, kesişim noktası ve korelasyon katsayıları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Piribedil'in Farklı Ortamlardaki Standart Eğri Denklemlerine ait Değerler

Ortam	Eğim	Kesişim noktası	Korelasyon katsayısı ( $r^*$ )
Distile su	0.0702	0.0141	0.999
Serum fizyolojik	0.0706	0.0083	0.999
pH 1.2	0.0849	0.0021	0.999
pH 7.4	0.0708	0.0127	0.999

\*  $n \geq 3$



Şekil 14. Piribedil'in Farklı Ortamlardaki Standart Eğrileri

a: Distile Su b: SF c: pH1.2 d: pH7.4

#### 4.1.1.1.5.1.2. Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik

Bölüm 3.2.1.1.5.1.2.'de anlatıldığı şekilde 3 farklı konsantrasyon ile çalışılarak, 3 gün boyunca (k=3), tüm çözeltilerin absorbanları UV-spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu veriler ve formüller yardımıyla tekrarlanabilirlik ve kesinlik değerleri hesaplanmıştır. Bulunan değerler **Tablo 9**'da verilmiştir.

**Tablo 9. UV-Spektrofotometrik Yönteme ait Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik Sonuçları**

Konsantrasyon (µg/ml)	Distile Su	pH 1.2	pH 7.4
<b><u>Tekrarlanabilirlik</u> *</b>			
9	1.6673	2.0541	1.5678
17	2.0807	5.6385	1.6695
26	3.0980	2.7723	3.5251
<b><u>Kesinlik</u> *</b>			
9	13.7510	2.0541	8.4299
17	16.7781	6.0344	9.8805
26	14.4831	3.6573	8.8786

\* k=3, n=6

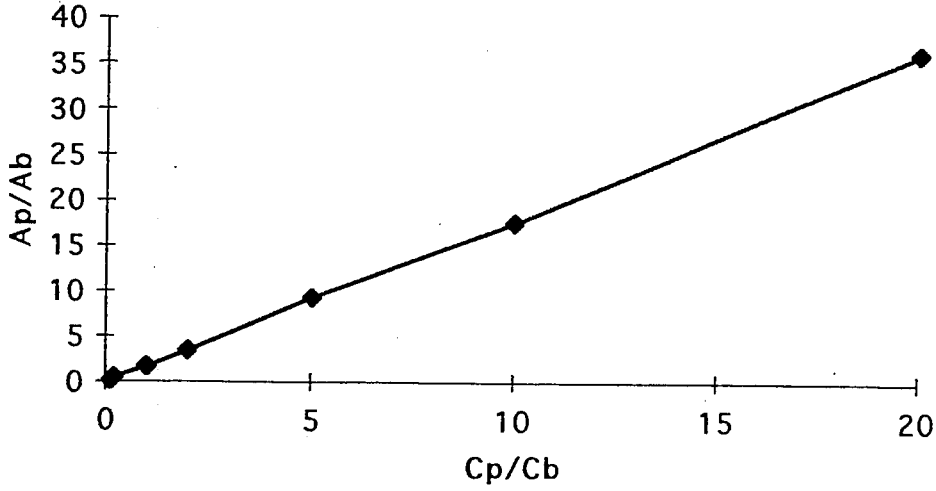
#### 4.1.1.1.5.1.3. Seçicilik

Bölüm 3.2.1.1.5.1.3.'de açıklanan çalışmalar yapıldığında soğuk homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan plasebo formülasyonun her üç çözünme ortamında da (distile su, pH 1.2, pH 7.4) dikkate değer bir absorbanı gözlenmemiştir. Ancak sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan plasebo formülasyonda ise her üç ortamda da oldukça yüksek absorbanlar izlenmiştir.

#### 4.1.1.1.5.2. YBSK ile Validasyon Çalışmaları

##### 4.1.1.1.5.2.1. Doğrusallık

Bölüm 3.2.1.1.5.2.1.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak, farklı konsantrasyonlardaki piribedil ve buspiron karışımlarına karşı bunların pik alanları oranlarının grafikleri çizilmiş ve bu veriler yardımıyla YBSK ile miktar tayininde kullanılacak olan eğri denklemi hesaplanmıştır. Elde edilen eğri ile bu eğriye ait denklem ve korelasyon katsayısı **Şekil 15**'de verilmiştir. Ayrıca, bu çalışmalara ait piribedil ve buspiron'un (IS) kromatogram örneği **Şekil 16**'da gösterilmiştir. Bu kromatogramda, 10.142 dakikalık alıkonma zamanı ile gözlenen piribedil; 14.085 dakikalık alıkonma zamanı ile gözlenen ise buspiron'dur (IS).

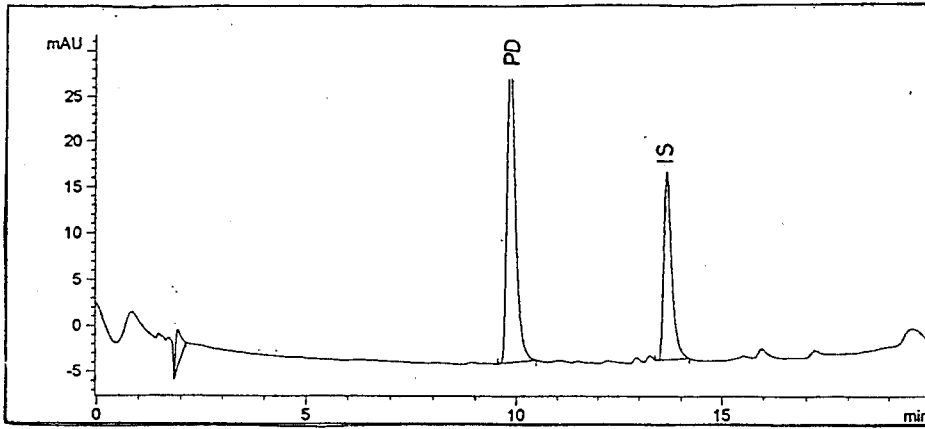


Şekil 15. Piribedil'in YBSK ile Standart Eğrisi

$$y=1.8097 x+0.0058 \quad (r=0.999)$$

Ap/Ab=Piribedil pik alanı/Buspiron pik alanı

Cp/Cb=Piribedil konsantrasyonu/Buspiron konsantrasyonu



Şekil 16. Standart Piribedil ve Buspiron'un YBSK ile Kromatogramı

#### 4.1.1.1.5.2.2. Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik

Bölüm 3.2.1.1.5.2.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak, kullanılan YBSK yöntemine ait tekrarlanılabilirlik değeri 16.2549, kesinlik değeri 17.9320 bulunmuştur.

#### 4.1.1.1.5.2.3. Seçicilik

YBSK yönteminin seçiciliği, Bölüm 3.2.1.1.5.2.3.'de açıklanan şekilde araştırılmıştır. Yapılan tüm seçicilik çalışmalarında piribedil'e ait alıkonma zamanlarında küçük de olsa pikler gözlenmiştir. Bu pik alanlarının analizlerdeki piribedil miktarlarını etkilememesi için, hesaplamalar sırasında 0. zamanda elde edilen bu pik alanları sonraki zamanlarda elde edilen alanlardan çıkarılarak hesaplamalar yapılmıştır.

#### 4.1.1.1.6. Çözünürlük Tayinleri

##### 4.1.1.1.6.1. Farklı Ortamlardaki Çözünürlük Tayini

Piribedil'in farklı ortamlardaki çözünürlük çalışmaları Bölüm 3.2.1.1.6.1.'de açıklandığı şekilde yapılmış ve elde edilen çözünürlük değerleri **Tablo 10**'da verilmiştir.

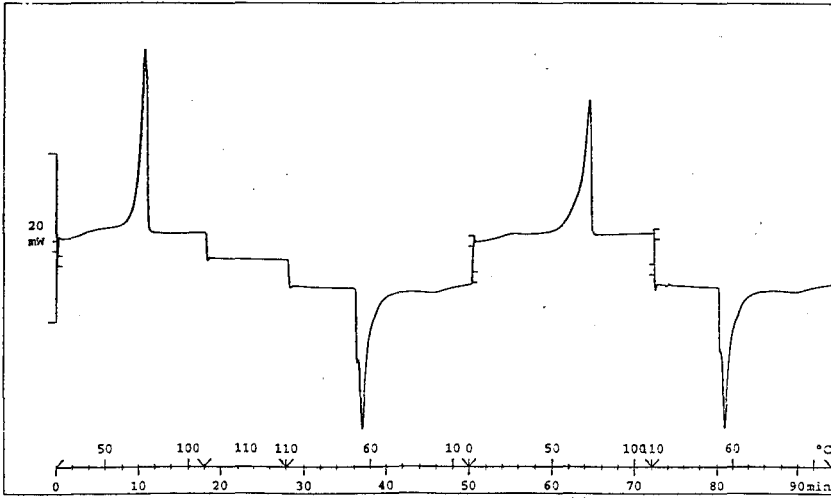
**Tablo 10. Piribedil'in Farklı Ortamlardaki Çözünürlük Değerleri ve Standart Sapmaları**

Ortam	Çözünürlük (mg.ml <sup>-1</sup> )*
Distile su	0.093±0.014
Serum fizyolojik	0.092±0.004
pH 1.2	7.763±0.455
pH 7.4	0.098±0.004

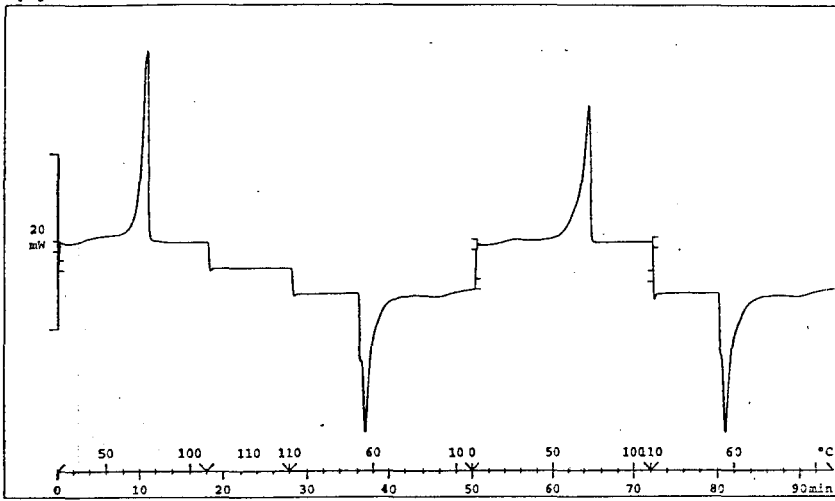
\* n≥3

##### 4.1.1.1.6.2. Kullanılan Lipit İçindeki Çözünürlük Tayini

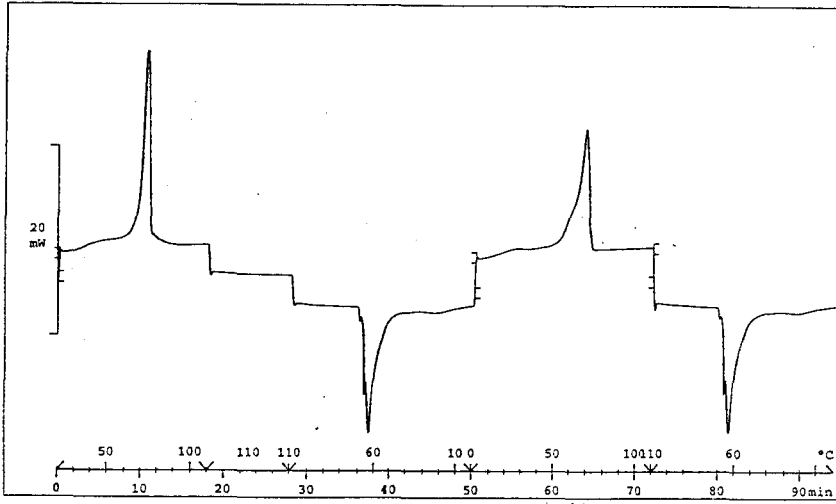
Bölüm 3.2.1.1.6.2.'de açıklandığı şekilde yapılan termal analizlerde, kullanılan her üç piribedil oranına ait (%1,%5 ve %10) termogramlarda sadece Compritol®'e ait pikler gözlenmiş, piribedil'in erime sıcaklığında gelecek olan 2. pike rastlanmamıştır. Bu çalışmalara ait termogramlar **Şekil 17-19**'da verilmiştir.



**Şekil 17. %1 Oranında Piribedil İçeren Piribedil ve Compritol® Karışımının DSC Termogramı**



Şekil 18. %5 Oranında Piribedil içeren Piribedil ve Compritol® Karışımının DSC Termogramı



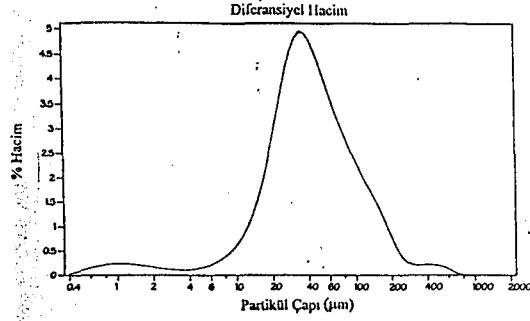
Şekil 19. %10 Oranında Piribedil içeren Piribedil ve Compritol® Karışımının DSC Termogramı

#### 4.1.1.1.7. Partikül Boyut Analizi

Piribedil'in partikül boyut analizi Bölüm 3.2.1.1.7.'de de açıklandığı gibi lazer tarama cihazı ile yapılmış ve dağılım profili Şekil 20 'de , dağılım bulguları Tablo 11 'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Piribedil'in Partikül Büyüklüğü Dağılım Bulguları

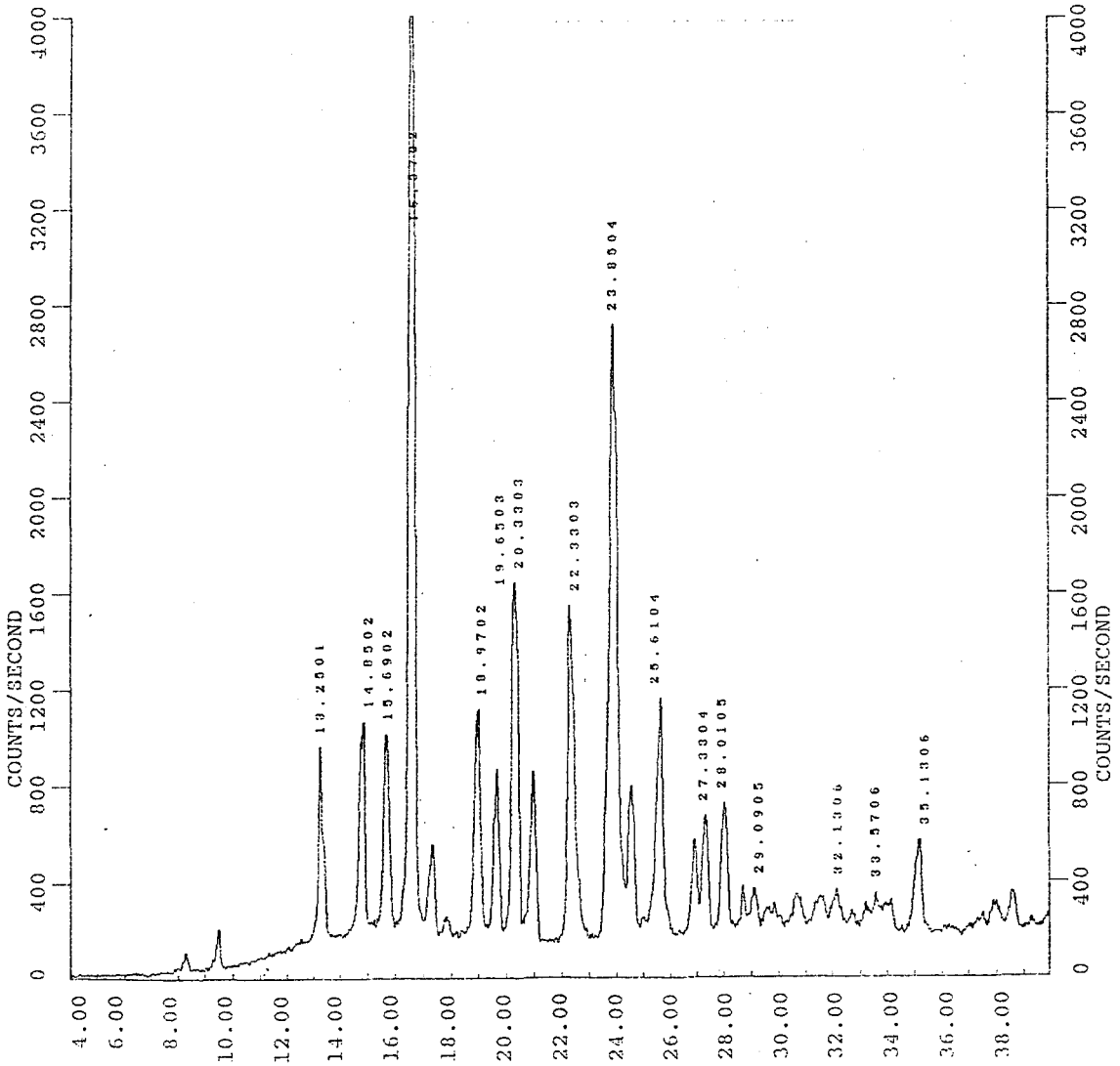
partikül büyüklüğü (µm)					
d(v,%10)	d(v,%50)	d(v,%90)	d(v,%95)	d(v,%99)	d(v,%100)
13.64	40.38	127.8	173.2	395.0	947.7



Şekil 20. Piribedil'in Partikül Boyut Dağılımı

#### 4.1.1.1.8. X-Işını Kırınım Analizi

Piribedil'in x-ışını kırınım analizi Bölüm 3.2.1.1.8'de açıklandığı gibi yapılmış ve profili Şekil 21'de verilmiştir.

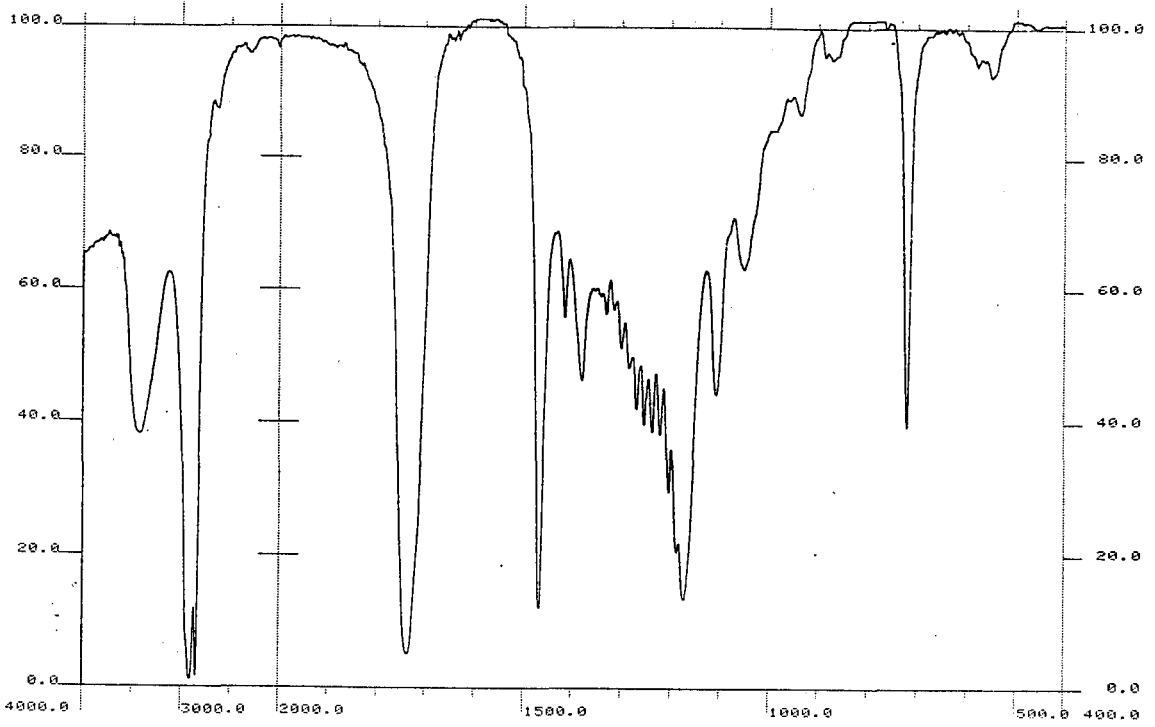


Şekil 21. Piribedil'in X-Işını Kırınım Profili

## 4.1.1.2. Compritol® ile Yapılan Çalışmalara ait Sonuçlar

### 4.1.1.2.1. IR-Spektrumu

Compritol®'ün potasyum bromür diskleri ile çekilen IR-spektrumu Şekli 22'de gösterilmiştir. Elde edilen spektrumda; 3424  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-H, 2906  $\text{cm}^{-1}$ 'de alifatik C-H gerilme, 1735  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O, 1467  $\text{cm}^{-1}$ 'de alifatik C-H eğilme ve 1172  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O bandları görülmüştür.



Şekil 22. Compritol®'ün IR Spektrumu

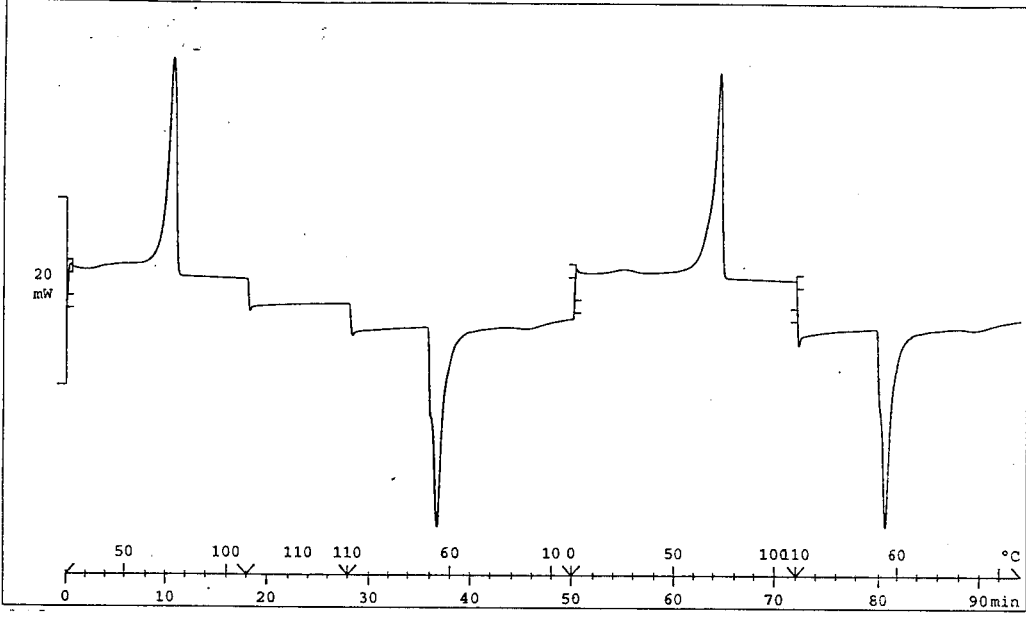
### 4.1.1.2.2. Erime Derecesi

Erime derecesi tayin cihazında yapılan analiz sonucunda Compritol®'ün erime derecesi 68°C olarak bulunmuştur.

### 4.1.1.2.3. Termal Analiz

Compritol®'ün termal analizi, diferansiyel taramalı kalorimetre ile Bölüm 3.2.1.2.3'de açıklandığı gibi yapılmış, analize ait termogram Şekil 23'de verilmiştir. Bu termograma göre; birinci ısıtmada erime noktası 72.58°C ve lipitin 1 g'ının erimesi için gerekli olan enerji 137.86 Joule/g, birinci soğutmada rekristalizasyon noktası 67.45 °C ve 1 g'ının rekristalizasyonu için kaybetmesi gereken enerji -146.87 Joule/g'dır.

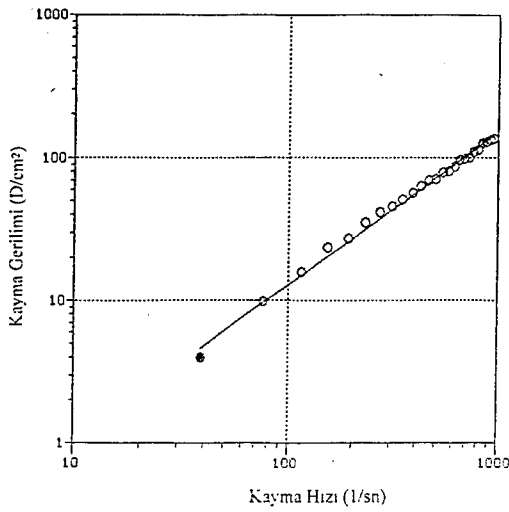




Şekil 23. Compritol®'ün DSC Termogramı

#### 4.1.1.2.4. Reolojik Analiz

Bölüm 3.2.1.2.4'de açıklandığı gibi Compritol®'ün erime derecesi üzerinde (~74.5°C) gerçekleştirilen reolojik analizinde elde edilen veriler **Tablo 12**'de gösterilmiştir. Reogram ise **Şekil 24**'de verilmiştir. Reogramdan görülebileceği üzere, Newtonian akışa yakın bir akış şekli saptanmıştır. Bu da mikropartiküllerin sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanması sırasında Compritol®'ün ideal bir çözelti oluşturduğunu belirtmektedir.



Şekil 24. Compritol®'ün Reogramı

**Tablo 12. Compritol®'ün Reolojik Analizine ait Sonuçlar**

#	RPM	Tork %	Viskozite cP	Kayma Gerilimi D/cm <sup>2</sup>	Kayma Hızı 1/sn	Sıcaklık °C	Süre dk:sn
001	10.0	0.2	10.2	3.93	38.4	74.3	00:10
002	10.0	0.2	10.2	3.93	38.4	74.3	00:10
003	20.0	0.5	12.8	9.83	76.8	74.3	00:10
004	30.0	0.8	13.7	15.7	115.2	74.3	00:10
005	40.0	1.2	15.4	23.6	153.6	74.4	00:10
006	50.0	1.4	14.3	27.5	192.0	74.4	00:10
007	60.0	1.8	15.4	35.4	230.4	74.4	00:10
008	70.0	2.1	15.4	41.3	268.8	74.4	00:10
009	80.0	2.3	14.7	45.2	307.2	74.5	00:10
010	90.0	2.6	14.8	51.1	345.6	74.5	00:10
011	100.0	2.9	14.8	57.0	384.0	74.5	00:10
012	110.0	3.2	14.9	62.9	422.4	74.5	00:10
013	120.0	3.5	14.9	68.8	460.8	74.5	00:10
014	130.0	3.6	14.2	70.8	499.2	74.6	00:10
015	140.0	4.0	14.6	78.6	537.6	74.5	00:10
016	150.0	4.1	14.0	80.6	576.0	74.6	00:10
017	160.0	4.4	14.1	86.5	614.4	74.6	00:10
018	170.0	4.9	14.8	96.3	652.8	74.6	00:10
019	180.0	5.0	14.2	98.3	691.2	74.6	00:10
020	190.0	5.1	13.7	100.3	729.6	74.6	00:10
021	200.0	5.6	14.3	110.1	768.0	74.6	00:10
022	210.0	5.8	14.1	114.0	806.4	74.6	00:10
023	220.0	6.4	14.9	125.8	844.8	74.7	00:10
024	230.0	6.6	14.7	129.8	883.2	74.6	00:10
025	240.0	6.8	14.5	133.7	921.6	74.6	00:10
026	250.0	7.0	14.3	137.6	960.0	74.7	00:10

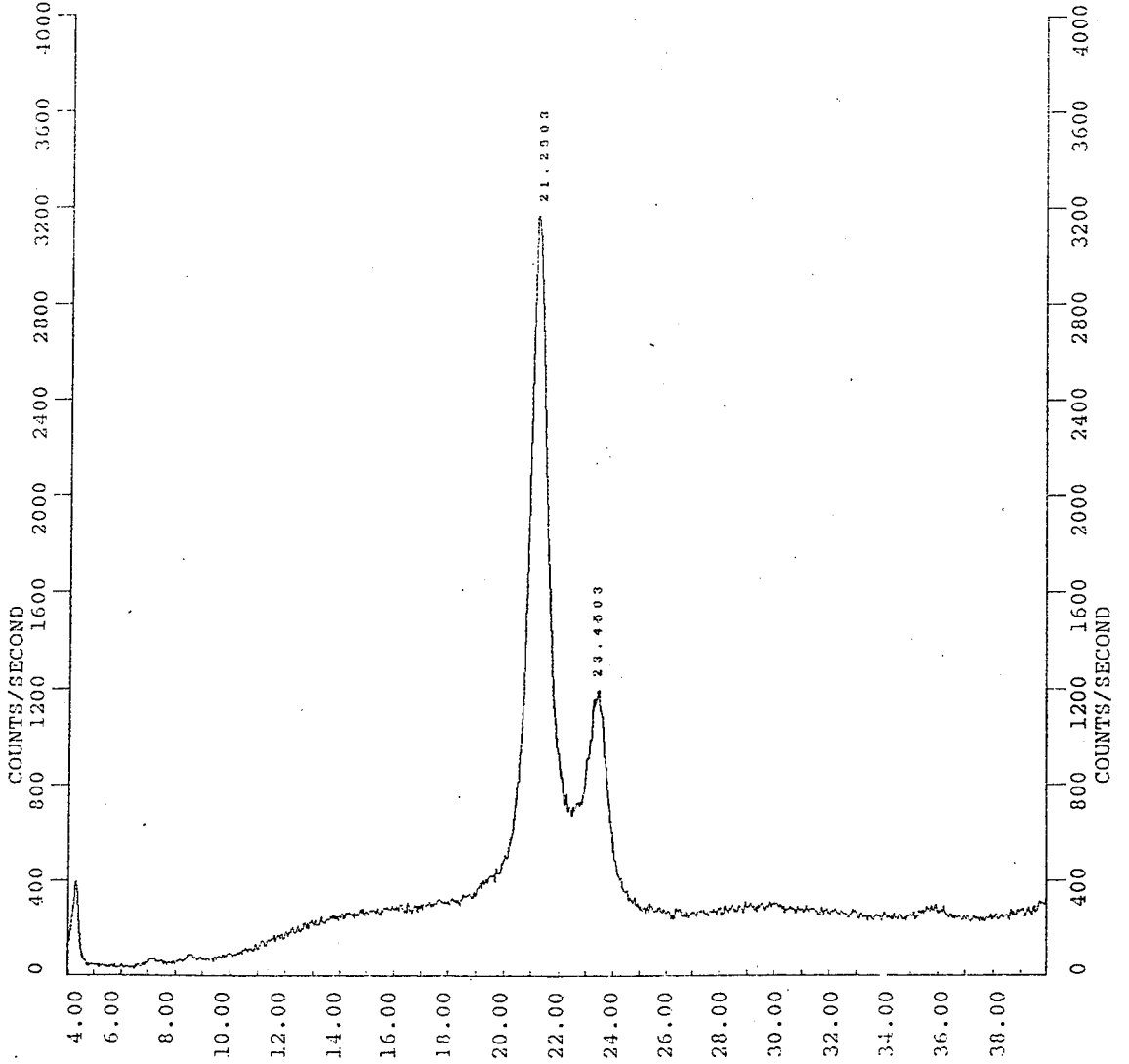
#### 4.1.1.2.5. X-Işını Kırınım Analizi

Analiz, Bölüm 3.2.1.2.5'de açıklandığı şekilde yapılmış ve profili Şekil 25'de verilmiştir.

#### 4.1.2. Mikro- ve Nanopartiküller ile Yapılan Çalışmalara ait Sonuçlar

##### 4.1.2.1. Formülasyonları

İn vitro ve in vivo deneylerde kullanılan mikro- ve nanopartiküller soğuk ve sıcak homojenizasyon tekniği ile Bölüm 3.2.2.1. ve 3.2.2.2.'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 25. Compritol®'ün X-Işını Kırınım Analizi

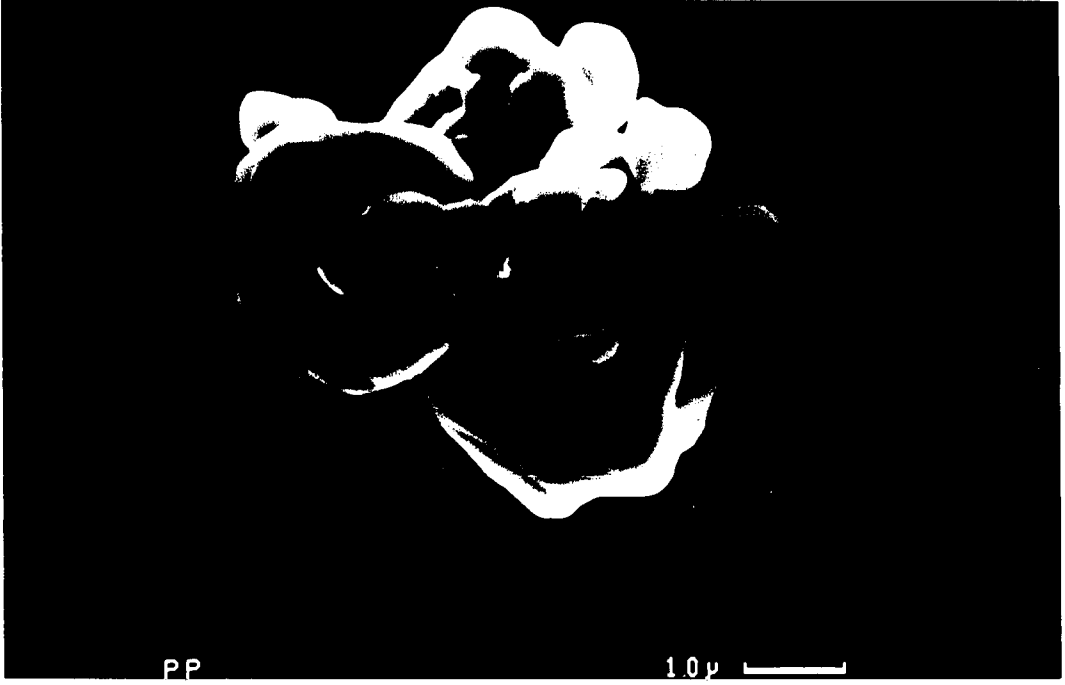
#### 4.1.2.2. Mikro- ve Nanopartiküllerin Özelliklerine ait Sonuçlar

##### 4.1.2.2.1. Şekilleri

C10-P5-L5, C2.5-P5-T1.2, c2.5-p5-t1.2 kodlu partiküller ile toz piribedil'in şekilleri Bölüm 3.2.2.3.1'de açıklandığı üzere incelenmiş ve saptanabilen görüntüler Şekil 26-29'da verilmiştir.

##### 4.1.2.2.2. Partikül Büyüklük Dağılımları

Hazırlanan mikro- ve nanopartiküllerin partikül büyüklükleri Bölüm 3.2.2.3.2'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiş ve bu çalışmalara ait bulgular Tablo 13'de verilmiştir. Ayrıca herbir formülasyona ait partikül boyut dağılım grafikleri de Şekil 30,31'de görülmektedir.



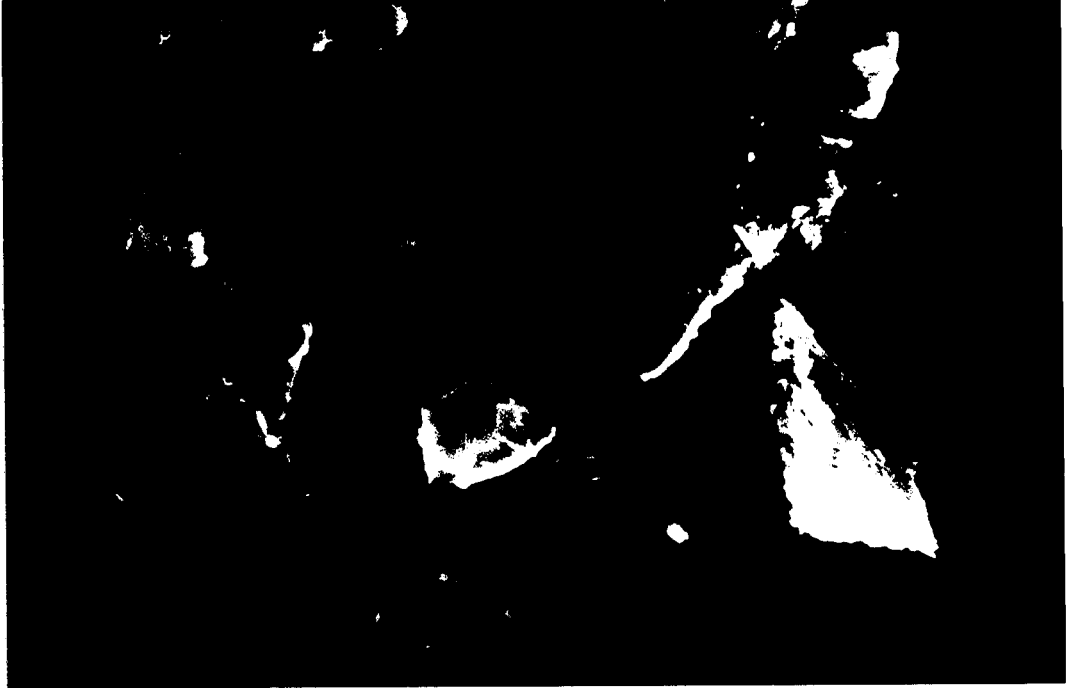
**Şekil 26. Piribedil'in Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri**



**C10-P5-L5**

**Şekil 27. Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri**

\* çatlaklıklar geri plandaki karbon bantından kaynaklanmaktadır



**C2.5-P5-T1.2**

**Şekil 28. Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri**

\* çatlaklıklar geri plandaki karbon bantından kaynaklanmaktadır



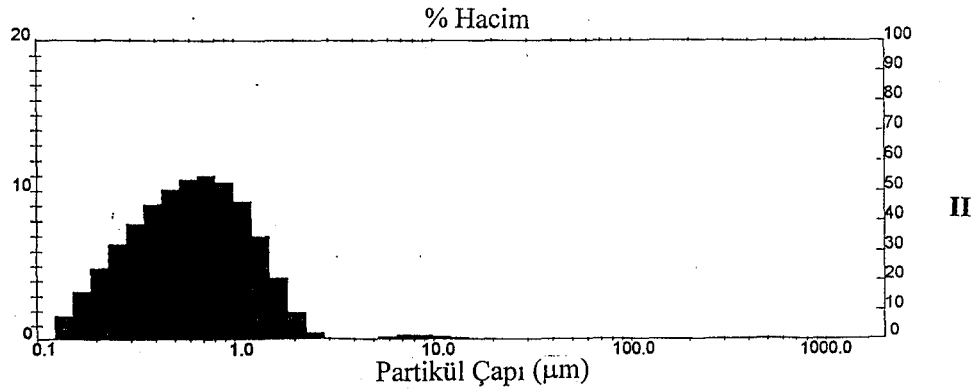
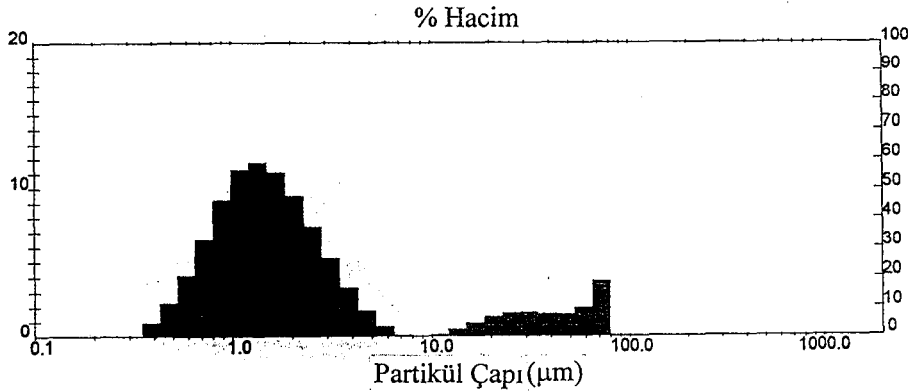
c2.5-p5-t1.2

**Şekil 29. Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri**

\* çatlaklıklar geri plandaki karbon bantından kaynaklanmaktadır

**Tablo 13. Mikro- ve Nanopartiküllerin Partikül Büyüklük Dağılım Bulguları**

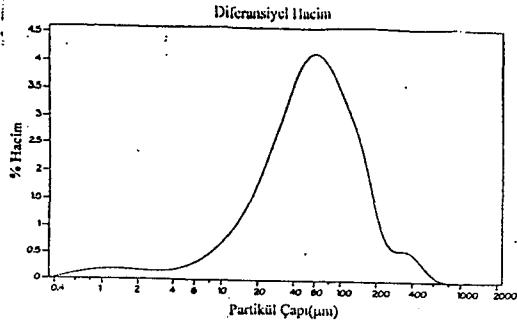
Formül	Partikül Büyüklüğü ( $\mu\text{m}$ )					
	d(v,%10)	d(v,%50)	d(v,%90)	d(v,%95)	d(v,%99)	d(v,%100)
C10-P1-L1	13.84	56.35	163.9	223.9	423.7	908.6
C10-P1-L2.5	11.59	60.13	113.9	129.6	157.3	234.1
C10-P1-L5	7.547	49.13	98.78	113.9	140.9	213.2
C10-P5-L1	15.61	50.64	103.8	121.4	150.6	194.2
C10-P5-L2.5	13.37	72.55	154.2	177.8	291.1	750.5
C10-P5-L5	7.182	49.34	108.5	126.6	157.8	234.1
C10-P10-L1	11.94	50.95	117.6	138.5	174.1	256.8
C10-P10-L2.5	17.05	72.42	141.9	161.4	196.1	282.1
C10-P10-L5	7.304	52.00	109.1	126.7	157.5	234.1
C2.5-P5-T1.2	0.76	2.02	52.05	67.39	77.65	80.00
c2.5-p5-t1.2	0.23	0.62	1.54	5.66	25.79	45.88



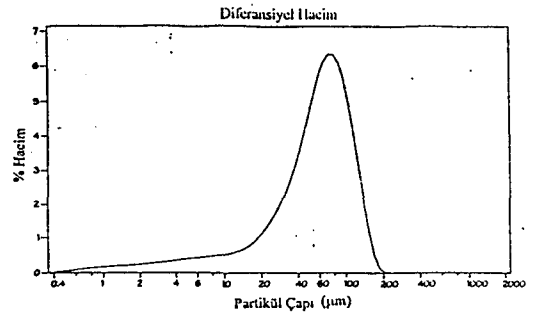
**Şekil 30. Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Mikro- ve Nanopartiküllerin Partikül Dağılım Grafikleri**

I: C2.5-P5-T1.2 II: c2.5-p5-t1.2

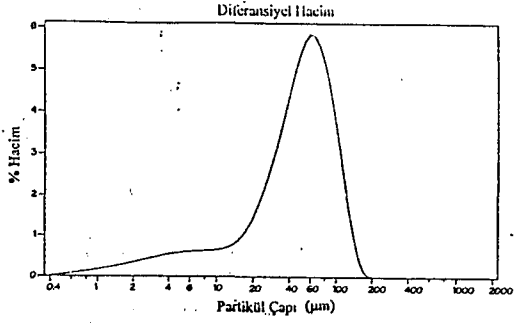




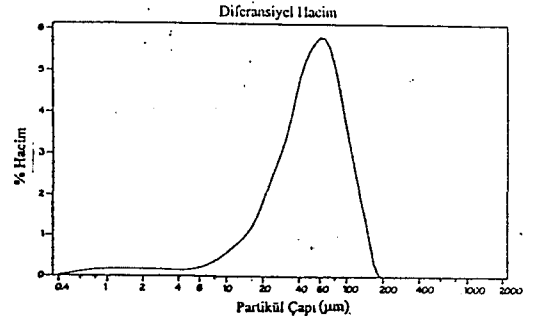
I



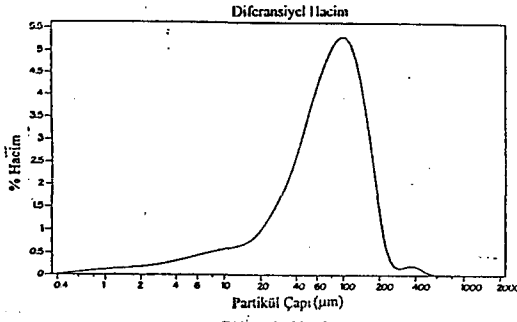
II



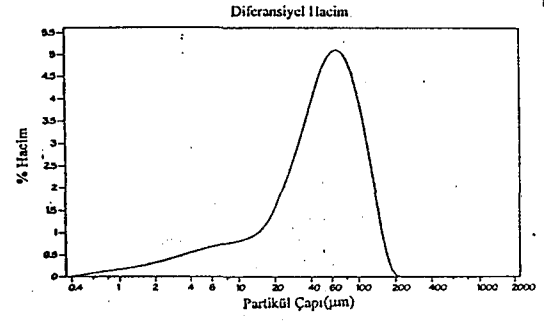
III



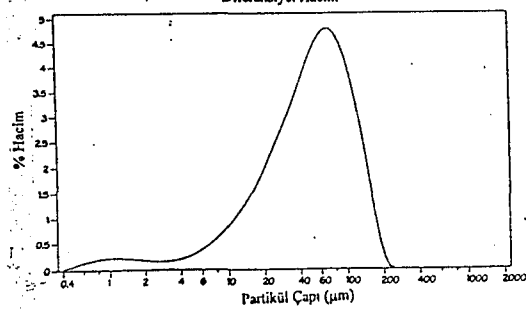
IV



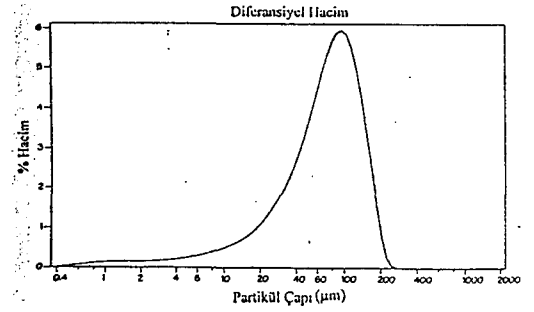
V



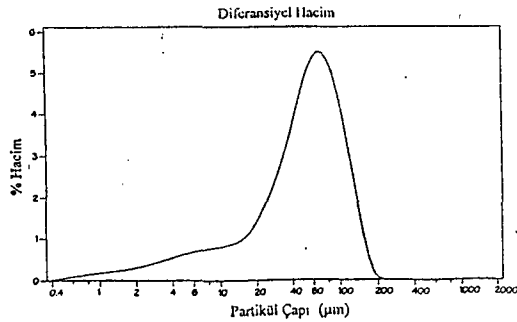
VI



VII



VIII



IX

Şekil 31. Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Mikropartiküllerin Partikül Dağılım Grafikleri

I:C10-P1-L1

III:C10-P1-L5

V:C10-P5-L2.5

VII:C10-P10-L1

IX:C10-P10-L5

II:C10-P1-L2.5

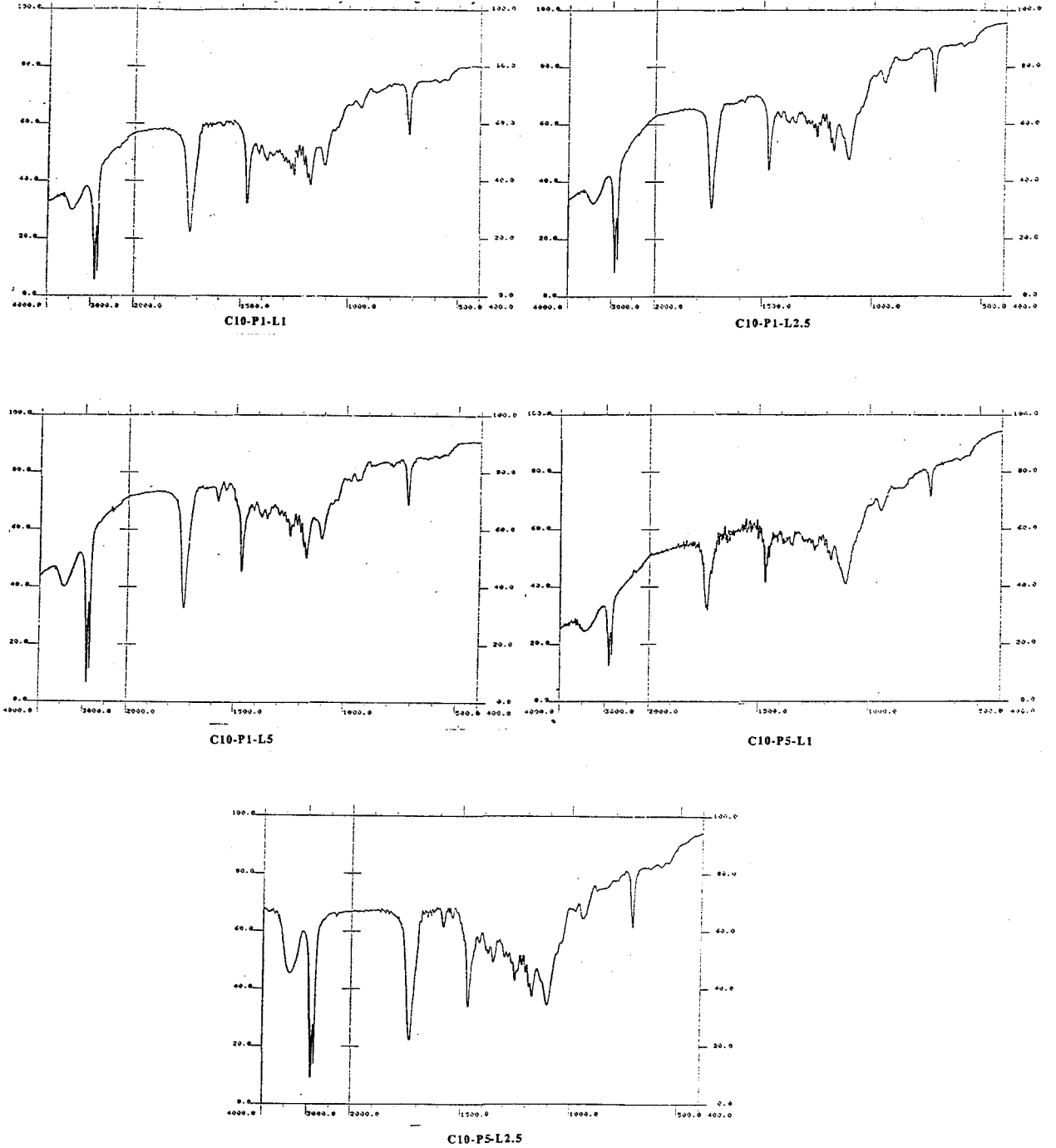
IV:C10-P5-L1

VI:C10-P5-L5

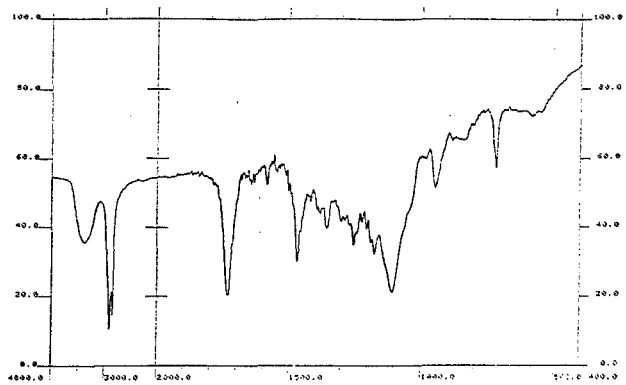
VIII:C10-P10-L2.5

#### 4.1.2.2.3. Infrared Analizleri

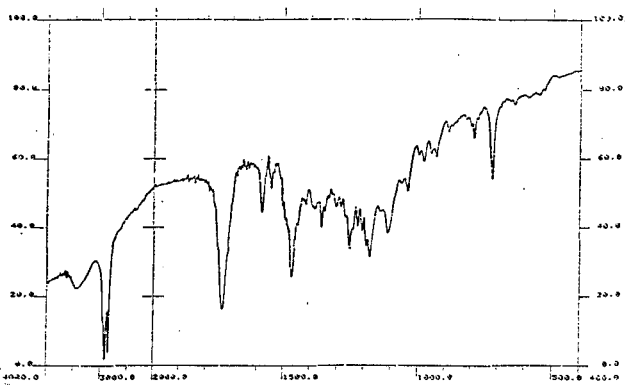
Piribedil mikro- ve nanopartiküllerinin, Bölüm 3.2.2.3.3'de açıklandığı şekilde infrared analizleri yapılmış ve bu analizlere ait spektrumlar Şekil 32'de gösterilmiştir.



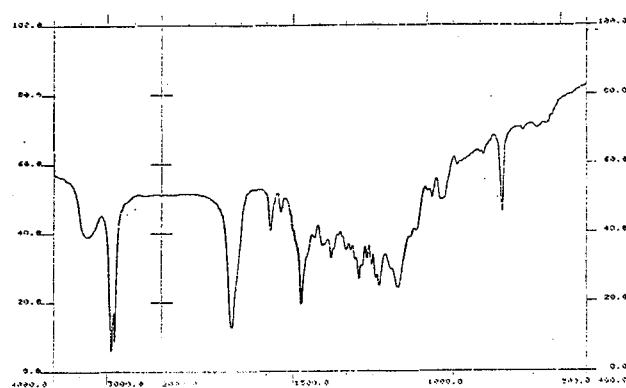
Şekil 32. Hazırlanan Mikro- ve Nanopartiküllerin IR Spektrumları



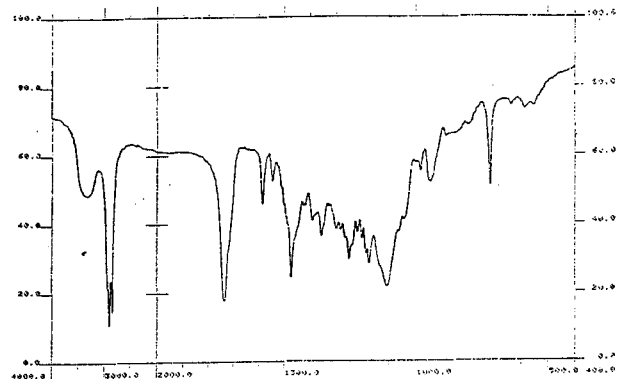
C10-P5-L5



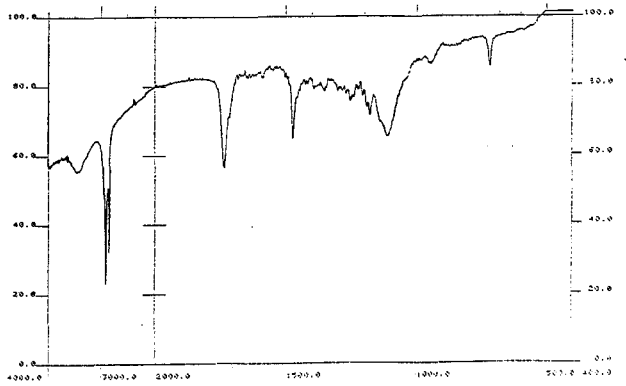
C10-P10-L1



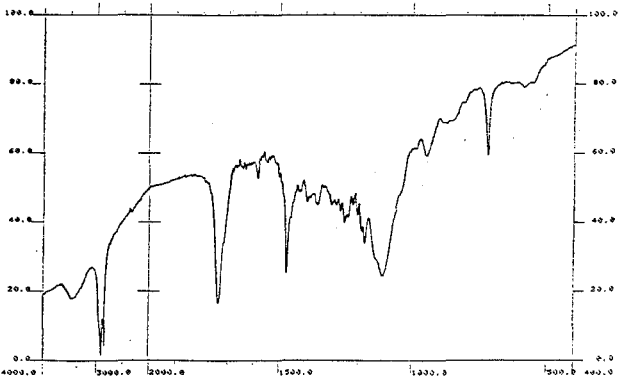
C10-P10-L2.5



C10-P10-L5



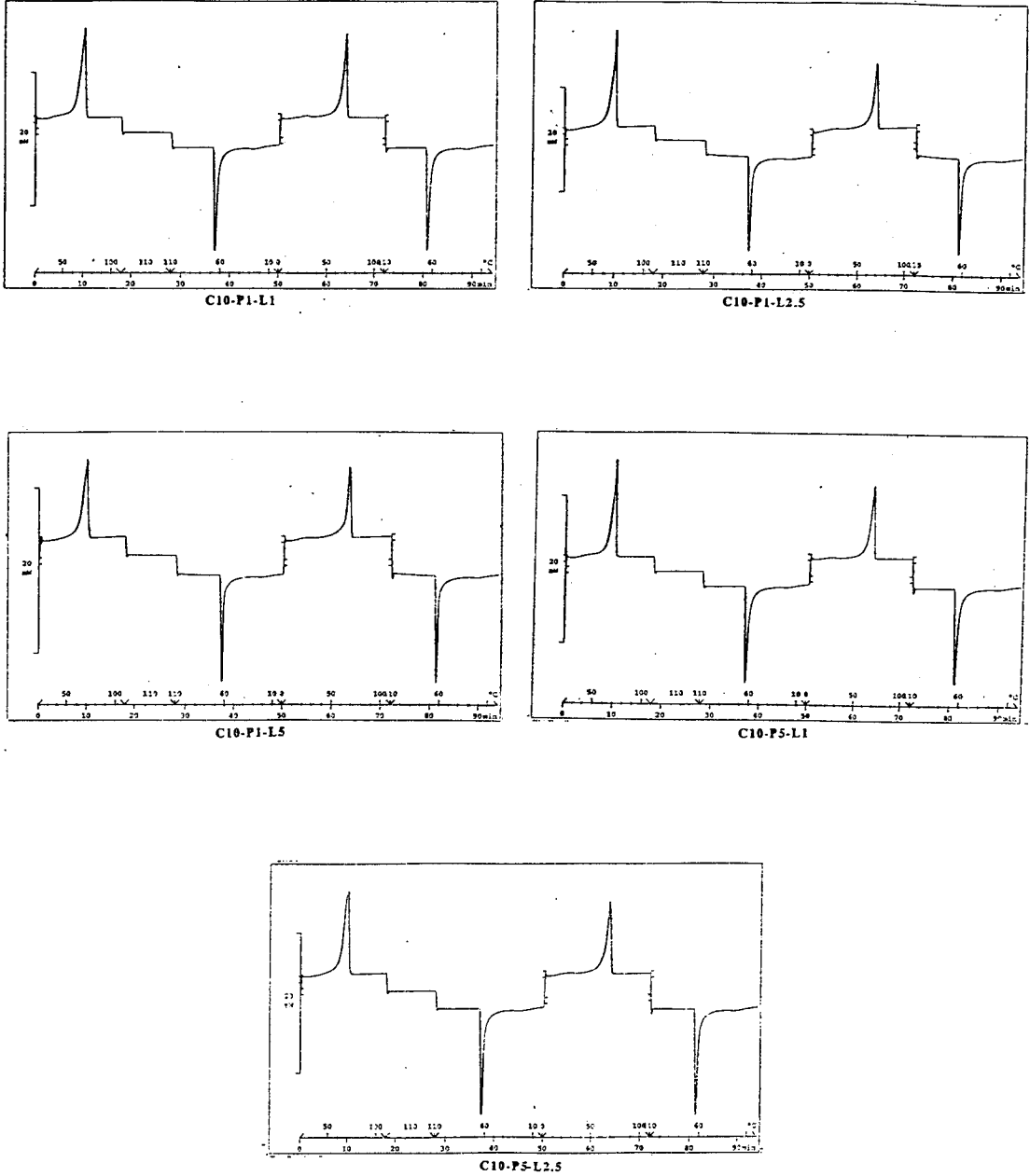
C2.5-P5-T1.2



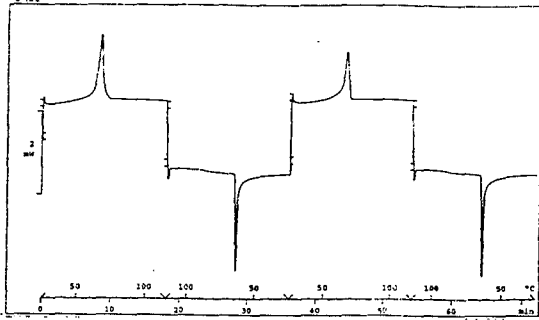
c2.5-p5-t1.2

#### 4.1.2.2.4. Termal Analizler

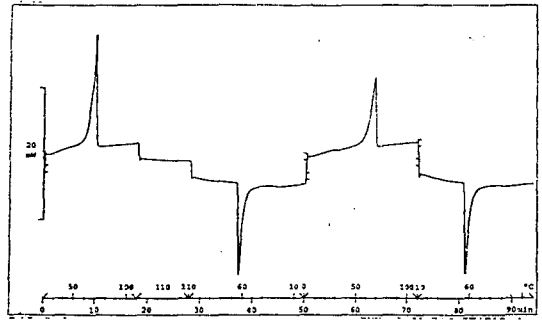
Piribedil mikro- ve nanopartiküllerinin Bölüm 3.2.2.3.4.'de açıklandığı şekilde termal analizleri yapılmış ve bu analizlere ait termogramlar sırası ile Şekil 33'de verilmiştir. Ayrıca bu termogramlardan elde edilen bulgular Tablo 14'te gösterilmiştir.



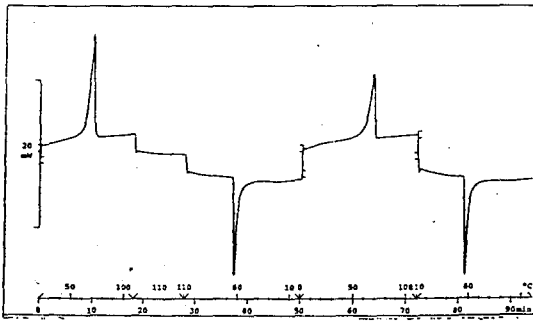
Şekil 33. Hazırlanan Mikro- ve Nanopartiküllerin DSC Termogramları



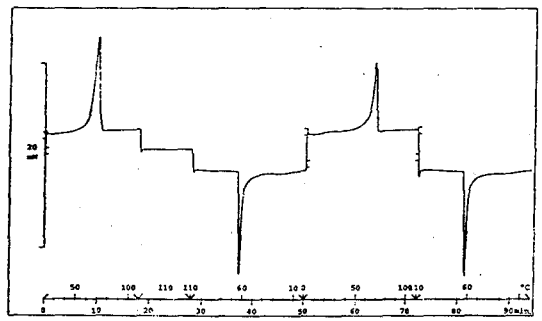
C10-P5-L5



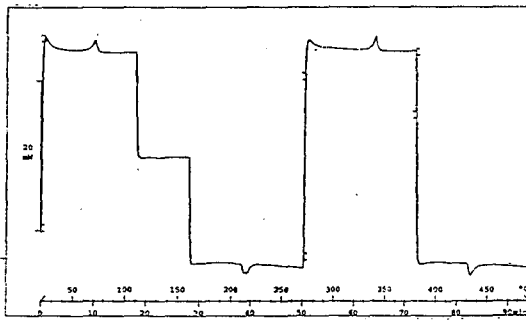
C10-P10-L1



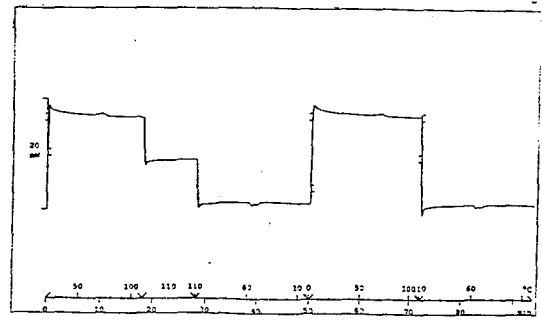
C10-P10-L2.5



C10-P10-L5



C2.5-P5-T1.2



c2.5-p5-t1.2

Tablo 14. Piribedil Mikro-ve Nanopartiküllerinin DSC Termogramlarına ait Bulgular

Formül Kodu	1. Isıtma		1. Soğutma		2. Isıtma		2. Soğutma	
	Erime Noktası(°C)	E(joule/g)	Rekristalizasyon Noktası (°C)	E(joule/g)	Erime Noktası(°C)	E(joule/g)	Rekristalizasyon Noktası (°C)	E(joule/g)
C10-P1-L1	71.33	149.46	66.32	-124.21	69.45	106.34	66.31	-122.57
C10-P1-L2.5	69.88	135.78	64.74	-101.53	68.08	109.38	64.66	-10.306
C10-P1-L5	70.20	107.91	63.73	-75.32	67.40	68.93	63.82	-83.96
C10-P5-L1	69.68	143.53	64.98	-122.15	68.20	124.29	64.98	-123.24
C10-P5-L2.5	70.12	155.39	64.39	-103.75	67.59	113.45	64.39	-99.68
C10-P5-L5	67.26	127.20	64.10	-88.09	66.69	91.98	64.02	-113.08
C10-P10-L1	69.51	140.16	64.42	-113.96	67.81	115.76	64.42	-113.75
C10-P10-L2.5	69.61	117.31	63.99	-83.04	67.04	81.77	63.99	-90.51
C10-P10-L5	69.44	126.58	63.92	-81.49	67.03	83.30	63.84	-77.62
C2.5-P5-T1.2	70.24	2.39	54.39	-2.42	69.98	2.68	56.90	-2.71
c2.5-p5-t1.2	69.58	1.08	57.02	-1.67	69.58	1.64	57.19	-1.98

#### 4.1.2.2.5. Hazırlama Verimi

Soğuk homojenizasyon tekniğinin hazırlama verimleri, Bölüm 3.2.2.3.5.'de açıklanan formül ile hesaplanmış, deney bulguları **Tablo 15**'de verilmiştir. Sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar sulu dispersiyon şeklinde elde edildiklerinden bunlarda verim hesabı yapılamamıştır.

**Tablo 15. Mikropartikül Hazırlama Verimleri**

Formül	Verim (%)
C10-P1-L1	87.84±4.34
C10-P1-L2.5	77.34±7.49
C10-P1-L5	67.79±11.54
C10-P5-L1	64.63±6.99
C10-P5-L2.5	76.26±4.23
C10-P5-L5	79.75±15.57
C10-P10-L1	72.89±6.65
C10-P10-L2.5	81.74±4.09
C10-P10-L5	71.08±9.90

#### 4.1.2.2.6. Partiküllerde Piribedil Miktar Tayinleri

##### 4.1.2.2.6.1. Partiküllerde Yüklenen Piribedil Miktarı

##### 4.1.2.2.6.1.1. Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerde Toplam Piribedil Miktarı

Soğuk homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan mikropartiküllerde yüklenen toplam piribedil miktarları Bölüm 3.2.2.3.6.1.1.'de açıklandığı şekilde hesaplanmıştır. Deney bulguları, ortalamaları alınarak standart sapmaları ile birlikte **Tablo 16**'da verilmiştir

##### 4.1.2.2.6.1.2. Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerde Toplam Piribedil Miktarı

Sıcak homojenizasyon ile hazırlanan mikro- ve nanopartiküllerdeki toplam piribedil miktarını bulabilmek için Bölüm 3.2.2.3.6.1.2.'de açıklandığı gibi çalışılmıştır. Elde edilen bulgular **Tablo 16**'da verilmiştir.

##### 4.1.2.2.6.2. Partiküllerde Hapsedilen Piribedil Miktarı

Mikropartiküllerde hapsedilen piribedil miktarını bulabilmek için Bölüm 3.2.2.3.6.2.'de açıklandığı gibi çalışılmış, deney bulguları, ortalama ve standart sapmaları

ile birlikte **Tablo 16**'da verilmiştir. Sıcak homojenizasyon ile hazırlanan iki formülasyon da süspansiyon olarak elde edildiğinden ve aynı yöntem ile güvenilir bir deney yapılamadığından bunlarda hapsedilen piribedil miktarı hesaplanmamıştır.

**Tablo 16. Mikro- ve Nanopartiküllerde Yüklenen ve Hapsedilen Piribedil Yüzdeleri**

Formül	Yüklenen* Piribedil (%)	Hapsedilen** Piribedil (%)
C10-P1-L1	84.5±2.86	10.54±1.71
C10-P1-L2.5	89.6±1.52	10.32±1.37
C10-P1-L5	95.3±2.87	12.54±2.05
C10-P5-L1	89.7±6.95	9.93±2.78
C10-P5-L2.5	87.3±7.27	7.95±1.01
C10-P5-L5	80.0±0.48	9.10±0.99
C10-P10-L1	95.2±3.02	7.56±1.35
C10-P10-L2.5	82.1±4.41	5.57±1.55
C10-P10-L5	88.8±3.31	11.59±1.47
C2.5-P5-T1.2	67.3±3.71	
c2.5-p5-t1.2	54.1±0.73	

\* n=3

\*\* n=6

#### 4.1.2.2.7. Saklama Koşullarında Stabilite Kontrolü

Mikropartiküllerin depolama koşullarındaki stabilitelelerini araştırmak amacıyla Bölüm 3.2.2.3.7'de anlatılan şartlarda çalışılmıştır. Çalışmamız başlangıçta soğuk homojenizasyon yöntemi ile sınırlı kaldığından, sadece C10-P5-L5 kodlu formülasyon üzerinde kontrol yapılmıştır. Bulunan Rf değerleri **Tablo 17**'de verilmiştir.

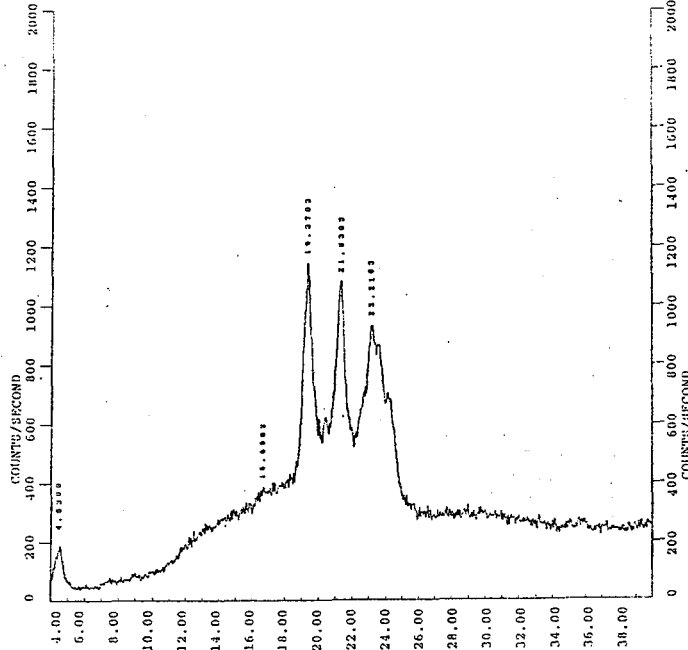
**Tablo 17. Mikropartiküllerin Saklama Koşullarındaki Rf Değerleri**

Ortam	0.5 ay	1 ay	3 ay	6 ay
Buzdolabı	0.75	0.75	0.70	0.74
Oda sıcaklığı	0.75	0.75	0.70	0.74
Etüv	0.74	0.75	0.70	0.72
Stabilite dolabı	0.74	0.78	0.70	0.72

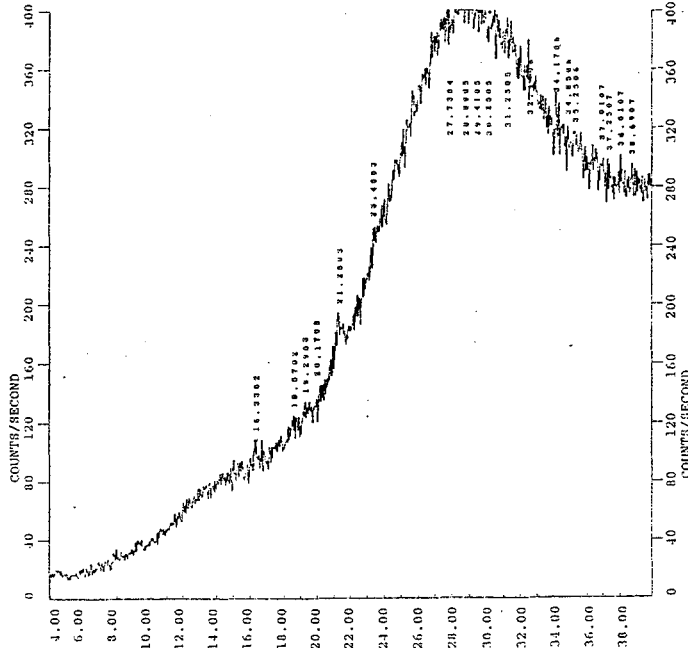


#### 4.1.2.2.8. X-Işını Kırınım Analizi

Bölüm 3.2.2.3.8.'de anlatılan şekilde, biri soğuk biri sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan partiküller ile yapılan iki analize ait grafikler Şekil 34 ve 35'de verilmiştir.



Şekil 34. Soğuk Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerin X-Işını Kırınım Eğrisi



Şekil 35. Sıcak Homojenizasyon ile Hazırlanan Partiküllerin X-Işını Kırınım Eğrisi

### 4.1.2.3. Mikro- ve Nanopartiküller ile Yapılan İn Vitro Çalışmalara ait Sonuçlar

#### 4.1.2.3.1. İn Vitro Salım Çalışmaları

Soğuk homojenizasyon 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 salım deneyleri yapılmıştır. Yapılan bu ön çalışmalarda in vitro salım çalışmalarına ait, zamana karşı, yığılmalı % salınan piribedil miktarları sonuçlarının yanısıra, partikül boyut dağılımı, hazırlama verimi, yüklenen ve hapsedilen piribedil miktarı ile IR ve termal analiz sonuçlarına göre bir formülasyon seçilmiştir. Seçilen bu formülasyon ve sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanmış iki formülasyonun salım çalışmaları aynı koşullarda tekrar edilmiş ve salım grafikleri toz piribedil ve ticari preparatı ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalara ait sonuçlar **Tablo 18-20**'de, salım profilleri ise **Şekil 36-38**'de verilmiştir.

İN vitro salım çalışmalarından elde edilen sonuçların kinetik incelemesinde Modifiye Hixson Crowell, 1.derece, sıfır derece, Hixson Crowell (sink), RRSBW, Q-Square root of time, Higushi, Hopfenberg küresel, Hopfenberg silindir ve Hopfenberg slab modellerinin hiçbirine uyum bulunamamıştır.

**Tablo 18. Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin Distile Su Ortamında Salım Yüzdeleri**

Zaman (s)	Toz Piribedil	Ticari Preparat	C10-P5-L5	C2.5-P5-T1.2	c2.5-p5-t1.2
0.08	0.74	0.47	48.32	23.99	39.91
0.25	2.23	0.67	37.97		
0.5	7.53	1.52	46.9	40.76	49.59
0.75	12.5	2.79	51.85		
1	16.84	3.43	55.59	76.3	41.19
1.5	25.47		61.41		
2	33.22	4.29	64.3	33.89	31.32
3	43.25	5.09	67.53	39.62	58.15
4	49.61	5.61	68.96		
5	55.18	5.89	70.48		
6		6.59		30.11	35.91
7		6.97			
12	61.79		87	29.74	23.32
23		11.83			
24	65.56	11.99	108	22.23	38.59
25		12.06			
27		13.13			
36	69.54		102.17	30.92	33.91
48	70.66		102.17	32	38.50

**Tablo 19. Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin pH 1.2 Ortamında Salım Yüzdeleri**

Zaman (s)	Toz Piribedil	Ticari Preparat	C10-P5-L5	C2.5-P5-T1.2	c2.5-p5-t1.2
0.08	44.48	0.66	91.04	100	73.76
0.25	86.19	1.25	81.51		
0.5	89.39	4.41	84.47	95.26	78.74
0.75	91.24	7.80	86.73		
1	92.08	11.24	87.2	100	78
1.5	94.29		86.96		
2	94.8	26.66	88.86	98.12	78.55
3	94.29	40.38	87.55	100	76.63
4	92.92	49.13	89.09		
5	94.61	61.73	90.28		
6		71.01			81.1
7		77.36			
12			92.19		84.02
23		119.59			
24		118.81	93.4		75.98
25		117.81			
27		118.86			
36			96.04		80.57
48			96.18		83.22

#### 4.1.2.3.2. pH 1.2 Salım Ortamındaki Stabilite Kontrolü

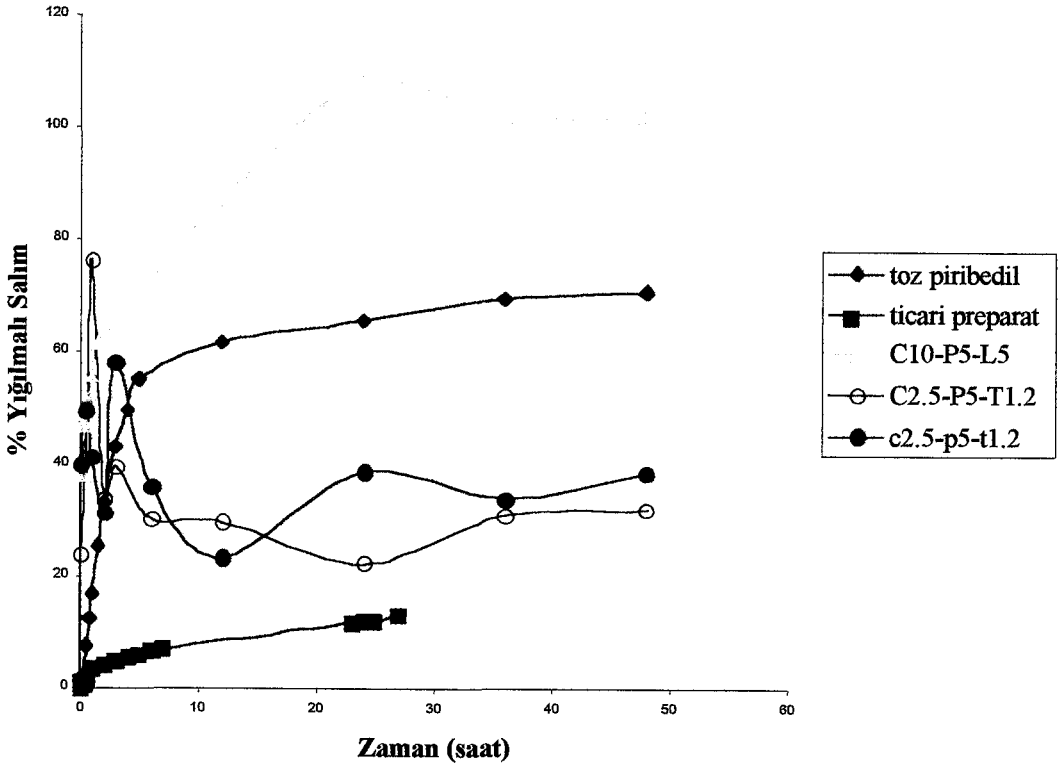
Piribedil'in pH 1.2 salım ortamındaki stabilitesini belirlemek amacı ile Bölüm 3.2.2.4.2'de anlatıldığı şekilde ince tabaka kromatografisi yöntemi ile çalışılarak elde edilen Rf değerleri, taze hazırlanan piribedil çözeltisinin Rf değerleri ile karşılaştırılmış ve sonuçlar **Tablo 21**'de verilmiştir.

**Tablo 21. Piribedil'in pH 1.2 Salım Ortamındaki Rf Değerleri**

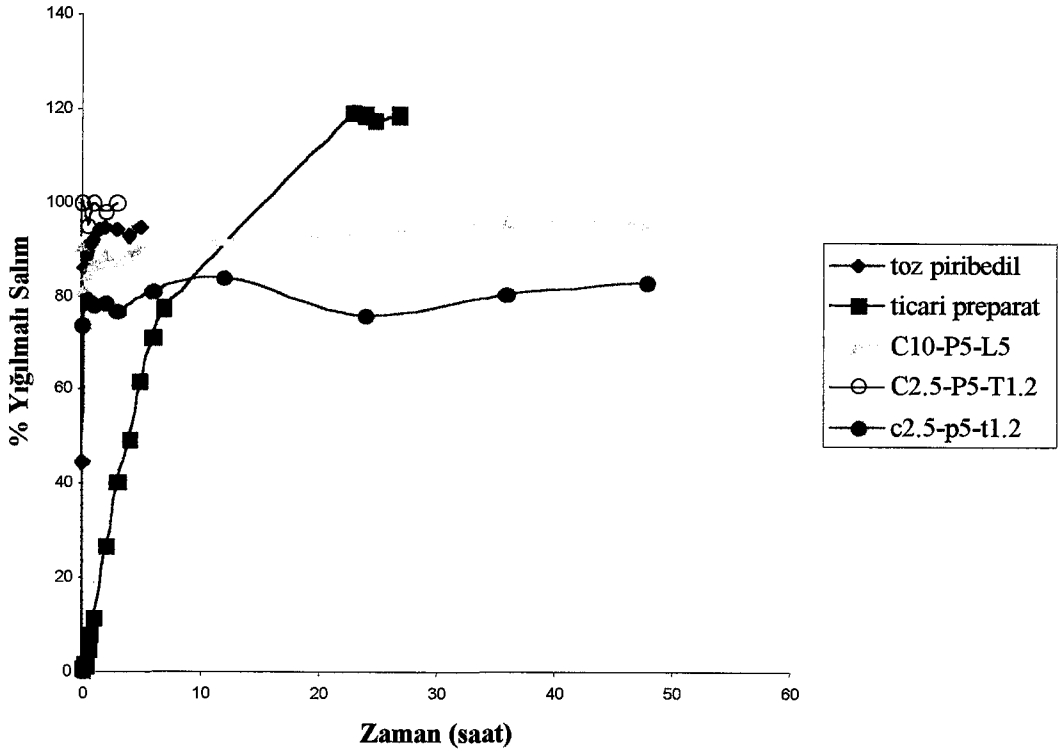
t (saat)	Rf	
	Taze çözelti	Bekletilmiş çözelti
3	0.84	0.80
5.5	0.84	0.76
24	0.84	0.80
48	0.80	0.80
72	0.80	0.80
96	0.80	0.79
168	0.70	0.70

**Tablo 20. Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin pH 7.4 Ortamında Salm Yüzdeleri**

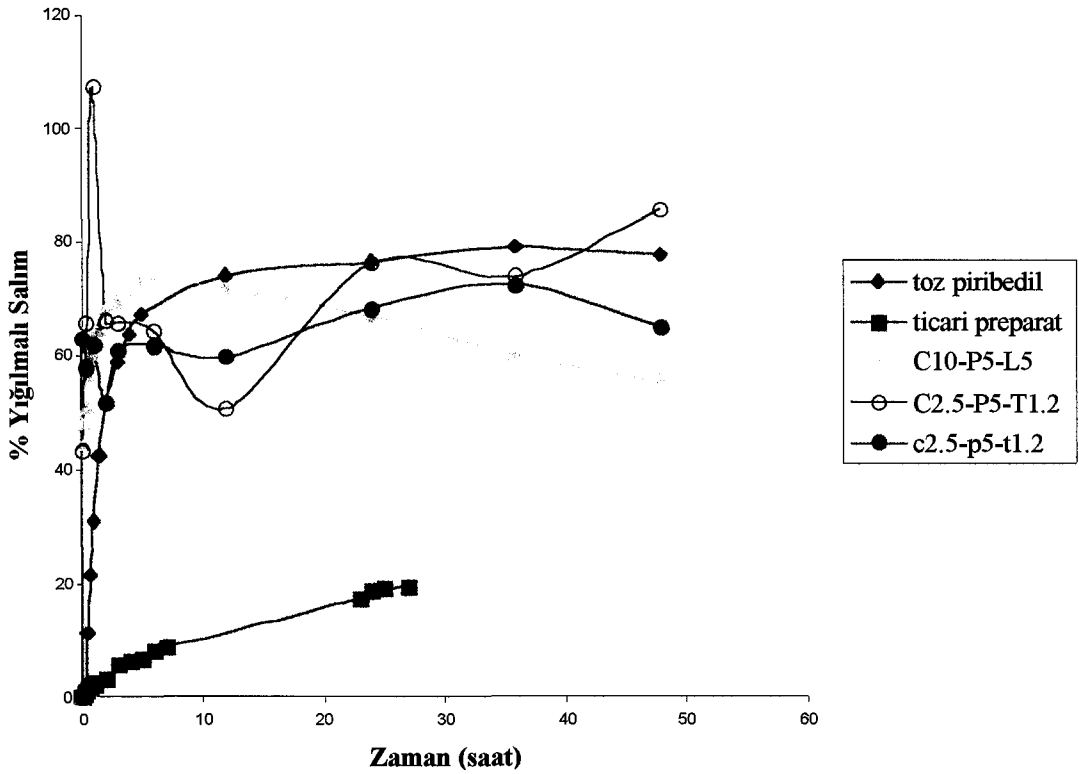
Zaman (s)	Toz Piribedil	Ticari Preparat	C10-P5-L5	C2.5-P5-T1.2	c2.5-p5-t1.2
0.08	0.55	0.13	48.14	43.6	62.99
0.25	1.89	0.48	44.6		
0.5	11.38	1.17	50.92	65.9	58.05
0.75	21.73	1.79	55.9		
1	31	2.37	60.33	107.4	62.14
1.5	42.51		64.71		
2	51.65	3.17	68.55	66.2	51.69
3	58.91	5.90	69.32	66	60.86
4	63.76	6.42	71.32		
5	67.27	6.95	73.64		
6		8.03		64.59	61.82
7		8.81			
12	74.2		72.09	50.75	59.81
23		17.39			
24	76.7	18.84	67.05	76.4	68.57
25		19.11			
27		19.44			
36	79.3		60.27	74.15	72.57
48	77.95		55.48	85.97	65.18



**Şekil 36. Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin Distile Su Ortamında Salm Profilleri**



Şekil 37. Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin pH 1.2 Ortamında Salım Profilleri



Şekil 38. Toz Piribedil, Ticari Preparatı ve Mikro- ve Nanopartiküllerinin pH 7.4 Ortamında Salım Profilleri

#### 4.1.2.4. Mikropartiküller ile Yapılan İn Vivo Çalışmalara ait Sonuçlar

##### 4.1.2.4.1. Farelerde Parkinson Modeli ile Tremor Testi

İn vitro çalışmaların sonuçlarına göre seçilen C10-P5-L5 kodlu mikropartikül Bölüm 3.2.2.5.1'de açıklandığı şekilde farelere peroral olarak verilmiştir. Yapılan tremor testinden elde edilen skorların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Sonuçlar "Student t-testi" ne göre değerlendirilmiş, diğer bulgularla birlikte **Tablo 22**'de verilmiştir.

**Tablo 22. Tremor Testi Skor Ortalamaları ve Student t-testi Değerlendirme Sonuçları**

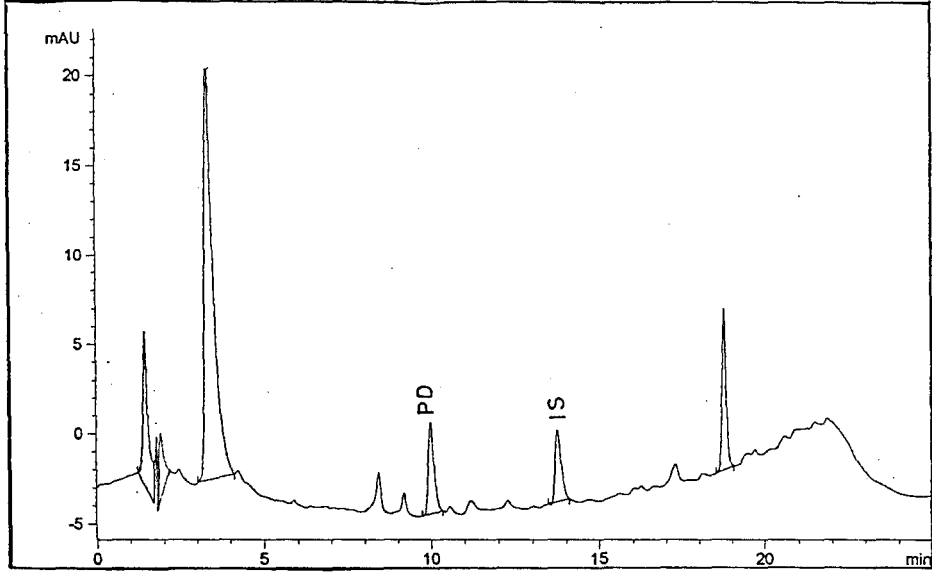
	Kontrol grubu	Toz piribedil	Mikropartikül
1. fare	2.71	1.66	2.3
2. fare	2.03	2.11	2.39
3. fare	2.02	1.48	1.75
4. fare	1.67	1.67	2.22
5. fare	2.28	1.53	1.89
6. fare	2.17	1.82	2.51
7. fare	2.1	1.81	1.65
8. fare	1.92	1.27	2.39
9. fare	2.37	2.37	2.42
10. fare	2.01	1.72	2.64
	2.128±0.281	1.744±0.314* t=2.88>2.10 p<0.05	2.213±0.332 t=0.62<2.10 p>0.05

Skorlar: 0- titreme yok 1- baş 2- baş ve vücut 3- tüm vücut

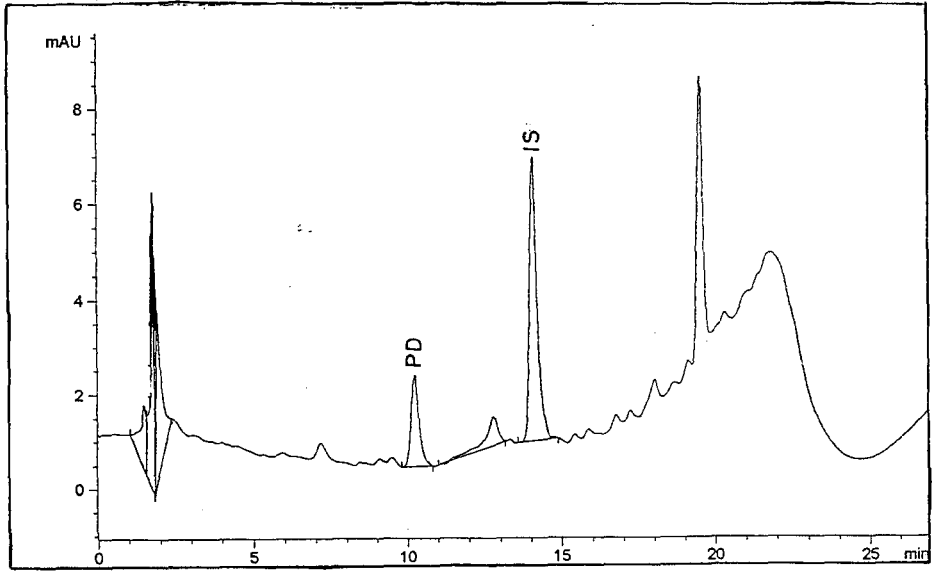
##### 4.1.2.4.2. Tavşanlarda Peroral Biyoyararlanım Çalışması

10 tavşana, in vivo çalışmalar için seçilen C10-P5-L5 kodlu formülasyon, 10 tavşana da toz piribedil 60 mg/kg dozda peroral olarak verilmiştir. Bölüm 3.2.2.5.2.'de anlatılan şekilde çalışılarak belirli zaman aralıklarında kan örnekleri toplanmıştır. Elde edilen plazma örnekleri Bölüm 3.2.2.5.2.1.'de anlatılan yöntem ile ekstre edildikten sonra, YBSK yöntemi kullanarak hazırlanan standart eğri yardımıyla her bir plazma örneğindeki etkin madde miktarları hesaplanmıştır (YBSK çalışmalarında gözlenen toz piribedil ve mikropartiküle ait kromatogramlar **Şekil 39**'da görülmektedir). Daha sonra, her iki grup için zamana karşı hesaplanan etkin madde plazma konsantrasyonları önce **Tablo**'ya (**Tablo**

23 ) ve ardından grafiğe geçirilmiştir (Şekil 40 ). Bulunan  $t_{maks}$ ,  $C_{maks}$  ve trapez yöntemi ile hesaplanan eğri altındaki alan (EAA) değerleri Tablo 24'de gösterilmiştir.



I



II

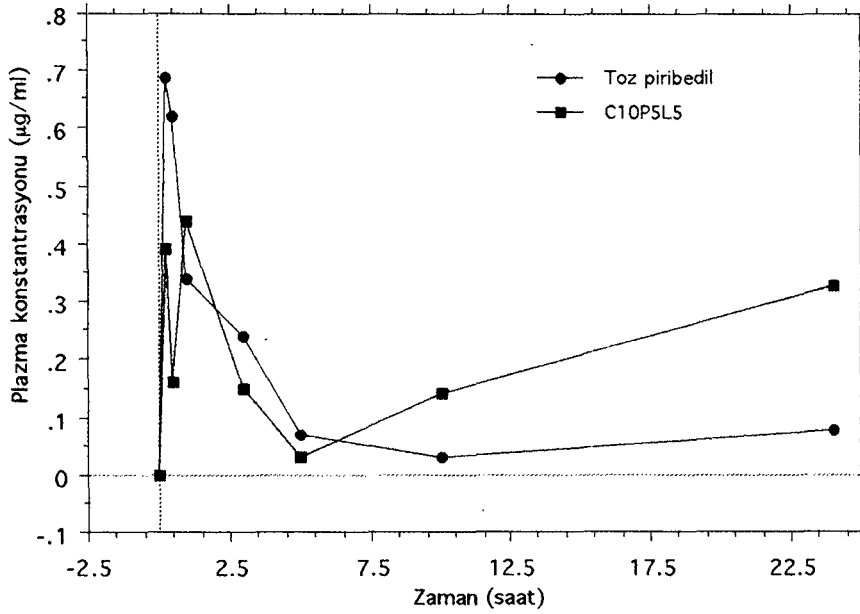
Şekil 39. Tavşan Plazmalarında Toz Piribedil ve Mikropartikülün YBSK Kromatogramları

I: Toz Piribedil II: Mikropartikül

**Tablo 23. Toz Piribedil ve Mikropartikülünün Peroral Verilişinin Ardından Tavşan Kanındaki Miktarları**

zaman (saat)	plazma konsantrasyonu ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	toz piribedil	C10-P5-L5
0.25	0.69 $\pm$ 1.32	0.39 $\pm$ 0.36
0.5	0.62 $\pm$ 0.89	0.16 $\pm$ 0.16
1	0.34 $\pm$ 0.49	0.44 $\pm$ 0.36
3	0.24 $\pm$ 0.25	0.15 $\pm$ 0.20
5	0.07 $\pm$ 0.10	0.03 $\pm$ 0.03
10	0.03 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.22
24	0.08 $\pm$ 0.17	0.33 $\pm$ 0.50

n=10



**Şekil 40. Toz Piribedil ve Mikropartikülünün Tavşanlardaki Kan Profilleri**

**Tablo 24. Toz Piribedil ve Mikropartikülünün Biyoyararlanım Değerleri**

	toz piribedil	C10-P5-L5
$t_{\text{maks}}$	0.25 saat	1 saat
$C_{\text{maks}}$	0.69 $\mu\text{g/ml}$	0.44 $\mu\text{g/ml}$
EAA <sub>0-24</sub>	2.21 $\mu\text{g.ml/saat}$	4.76 $\mu\text{g.ml/saat}$



#### **4.1.2.4.3. Plazmadan Ekstraksiyon ile Geri Kazanılan Piribedil Oranının Hesaplanması**

Bölüm 3.2.2.5.2.2.'de açıklandığı şekilde çalışılarak, plazmadan ekstraksiyon ile geri kazanılan piribedil oranları hesaplanmıştır. Yapılan altı deneyin ortalaması alındığında geri kazanılan piribedil oranı % 62.5 bulunmuştur. Aynı çalışmalar yüksek miktarda piribedil ile tekrarlandığında bu oran % 91.5'e çıkmakta, düşük miktarlarda ise yöntemin seçicilik çalışmalarında gözlenen piklerden dolayı sağlıklı bir hesaplama yapılamamaktadır.

#### **4.2. TARTIŞMA**

Bu bölümde formülasyonlarda kullanılan etkin ve yardımcı maddenin fizikokimyasal özelliklerine ait bulgular ile mikro- ve nanopartiküller üzerinde gerçekleştirilen in vitro-in vivo çalışma bulguları tartışılmıştır.

##### **4.2.1. Çalışılan Maddelere ait Değerlendirmeler**

###### **4.2.1.1. Piribedil**

Piribedil'in spektrumları incelendiğinde, UV-spektrumunda 240 nm ve 263 nm'lerde absorpsiyon pikleri, IR-spektrumunda kimyasal yapısına bağlı olarak karakteristik pikler (Şekil 12) gözlenmiştir. Erime derecesi tayin cihazı ve diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılan analizlerde piribedil'in erime derecesi 97°C (Şekil 13) olarak saptanmış, bu bulgu literatürlerdeki 98°C ile uyumlu bulunmuştur (176,177). Yapılan termal analizde, maddenin amorf yapıda olduğu belirlenmiştir. Literatürde, amorf şekil, bir ilacın kristal yapıya sahip olmayan katı materyali olarak tarif edilmektedir (205). Amorf şekil hazırlama, çözünürlüğü düşük ilaçların çözünürlük/dissolüsyon oranlarını düzeltmede, ürünün raf ömrü esnasında dozaj formundaki kararlılığı korumada kullanılan bir yöntemdir.

Piribedil'in miktar tayininde kullandığımız UV-spektrofotometrik ve YBSK yöntemleri için yapılan validasyon çalışmalarında her iki yönteminde doğrusallığının yüksek olduğu 0.999 değerindeki korelasyon katsayıları ile tespit edilmiştir. UV-spektrofotometrik yöntemin tekrarlanabilirlik ve kesinlik değerleri genel olarak [17 µg/ml konsantrasyonda distile sudaki kesinlik değeri hariç (16.7781)] % 15'ten küçük olduğu için literatüre uygun bulunmuştur (206). YBSK yöntemine ait tekrarlanabilirlik ve kesinlik değerleri % 15'ten büyük olmakla birlikte, in vivo çalışmalarda, günüçi tekrarlanabilirlik değerlerinin yüksek olması nedeniyle analizler sırasında herbir gün için kalibrasyon yapılarak sonuçların güvenilirliği artırılmıştır. Ayrıca tekrarlanabilirlik ve kesinlik değerleri için sınır bazı literatürlerde % 20 olarak da verilmektedir (207).

Her iki yöntemin seçicilik araştırmalarında ise, C10-P5-L5 kodlu formülasyon için UV-spektrofotometrik; piribedil için YBSK yönteminin, heriki yöntemde de etkin maddesiz yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, etkin maddeli çalışmaların sonuçlarına göre

anlamli bulunamadığı için, yeterli seçicilikte olduğu düşünölmüştür. Soğuk homojenizasyon ile hazırlanan diğler formölyasyonlarda da aynı etkin ve yardımcı maddeler kullanıldığından, bunlar için ayrıca seçicilik araştırılmamıştır. Piribedil ile yapılan in vivo çalışmalarda, YBSK yöntemi literatürde sıkça kullanıldığından ve seçiciliğinin yüksek olduğu vurgulandığından tercih edilmiştir (8,182). Hesaplamalarda, boş plazmada piribedil'in alikonma zamanında gözlenen ufak pik alanları çıkarılmıştır. Böylece, bu yönde gelebilecek bir hatanın önüne geçilebileceği düşünölmüştür. Aynı zamanda, çalışmamızda toz piribedil ile mikropartikölünün karşılaştırılması amaçlandığından ve iki çalışma da aynı şartlarda yapıldığından, bu çıkartma işleminin genel sonucu fazlaca etkilemeyeceği düşünölebilir. Ancak yapılan çalışmalarda C2.5-P5-T1.2 kodlu formölyasyon için UV-spektrofotometrik yöntemin yeterli seçicilikte olmadığı görölmüştür. Sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan bu formölyasyonda, soğuk homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan C10-P5-L5 kodlu formölyasyondan farklı olarak Tween 80 kullanıldığından bu olumsuzluğun Tween 80'den kaynaklandığı düşünölmüştür.

Piribedil'in çözünürlük oranının saptanması için gerçekleştirilen çalışmalarda, çözünürlüğün pH ile değıştiğı görölmüştür (Tablo 10). Kuvvetli asit ortamda (pH 1.2) çözünürlük oranı 7.8 mg.ml<sup>-1</sup> iken, nötr (pH 7.4 ve distile su) ve nötr'e yakın (SF) ortamlarda 0.09 mg.ml<sup>-1</sup> bulunmuştur. Piribedil'in distile sudaki düşük çözünürlük değeri 0.07 mg.ml<sup>-1</sup> olan literatür değeri ile uyumludur (178).

Piribedil'in kullanılan lipit içindeki çözünürlük oranının tayini için, piribedil ve Compritol® karışımlarının termal analizinde, Compritol®'ün erime sıcaklığında bir pik gözlenmiş, piribedil'in erime sıcaklığında ise ikinci bir pike rastlanmadığı için piribedil'in Compritol® içinde çözünmüş olduğuna karar verilmiştir (Şekil 17-19). Bu bulgular piribedil'in lipofilik bir ilaç olduğunu destekler niteliktedir ve literatüre uygundur (179).

Piribedil'in partiköl boyut analizinde, partiköllerin %100'ünün 947.7 µm'nin altında, %50'sinin 40.38 µm'nin altında olduğu görölmüştür (Tablo 11). Tablo'dan da göröleceğı üzere, %1'lik gibi küçük bir kısmın boyutu mm'ye yakındır. Dolayısıyla mikro-ve nanopartiköl hazırlanması sonucu, etkin maddenin partiköl boyutunun da küçültölmesi olanağı doğacağı beklenebilir.

#### 4.2.1.2. Compritol®

Compritol®'ün fizikokimyasal özellikleri, IR-spektrumu, erime derecesi tayini, termal ve reolojik analiz çalışmaları ile incelenmiştir.

Compritol®'ün erime derecesi, erime derecesi tayin cihazı ile 68°C, diferansiyel taramalı kalorimetre ile termal analizinde 73°C (Şekil 23) bulunmuştur. Analiz bulguları firma spesifikasyonları olan 69.0-74.0 °C ile uyumlu bulunmuştur (208,127).

Compritol®'ün reolojik incelemesinde Şekil 24'de de görülebileceği üzere, Newtonian akışa yakın bir akış şekli saptanmıştır. Bu da mikropartiküllerin sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanması sırasında Compritol®'ün ideal bir çözelti oluşturduğunu belirtmektedir.

#### **4.2.2. Çalışılan Mikro- ve Nanopartiküllere ait Değerlendirmeler**

##### **4.2.2.1. Formülasyonları**

Araştırmamızda katı bir lipit olan Compritol® kullanarak mikropartikül hazırlamak için, hazırlama tekniğinden gelebilecek çözücü artıklarından kaçınabilmek amacı ile, sulu bir faz içinde erimiş lipitlerin emülsifikasyonundan oluşan sıcak ve soğuk homojenizasyon yöntemleri seçilmiştir. Kullandığımız etkin maddenin, lipofilik karakterli olması ve suda çözünmemesi nedenleri ile literatürde sıkça kullanılan emülsiyon-çözücü uçurma vb. yöntemlerden yararlanmayı düşünmedik, çünkü bu yöntemler daha çok suda çözünen ilaçlar ve proteinler için uygun bulunmuştur. Kullandığımız yöntem, eritilmiş lipitte etkin maddenin çözünmesine imkan verdiğinden dolayı amacımıza uygundur.

Soğuk homojenizasyon yönteminde kullanılan alet parçaları, karbon buzuna dayanıklılığı ve var olan motor özelliklerine göre tasarlanmış ve orijinal olarak yaptırılmıştır.

Soğuk homojenizasyon yöntemi kullanarak yapılan ön denemelerde, çelik bilyalı değirmenle yapılan 15 dk'lık öğütme süresi ve kullanılan sıvı azot ile yeterli öğütme sağlanamadığından değiştirilme yoluna gidilmiştir. Sonraki çalışmalarda, öğütme süresi 30 dk'ya çıkarılmış, sıvı azot yerine sadece karbon buzunu kullanılmıştır. Aynı şekilde, bu denemelerde erimiş lipit içerisinde etkin maddenin çözünerek tekdüze dağıtılmasında kullanılan manyetik ısıtıcı karıştırıcı da yeterli düzeyde homojenizasyonu sağlayamadığı için ultraturaks ile değiştirilmiştir.

Yöntem optimize edildikten sonra, formülasyon koşullarının partikül karakteristiklerine etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda piribedil (%1, %5, %10) ve yüzey etken madde (Labrasol® %1, %2.5, %5) kullanılmıştır. Etkin ve yüzey etken maddenin konsantrasyon değişikliklerinin, partiküler taşıma sisteminin hazırlanma verimine, etkin maddenin yüklenme oranına, oluşan partiküllerin büyüklüğüne ve in vitro salım özelliklerine etkisini sağlıklı olarak inceleyebilmek için, lipit konsantrasyonu ve diğer hazırlama koşulları sabit tutulmuştur.

Sıcak homojenizasyon tekniğine ait ön denemelerde ise öncelikle üç değişik yüzey etken madde (Labrasol<sup>®</sup>, Pluronic F68<sup>®</sup> ve Tween 80<sup>®</sup>) kullanılmıştır. Partikül büyüklüğü bakımından Tween 80<sup>®</sup> ile hazırlanan formülasyonlar daha iyi görülerek çalışmalar bu yüzey etken madde ile yürütülmüştür. Aynı yöntem, farklı lipit, etkin madde ve yüzey etken madde konsantrasyonları denenerek ideal partikül büyüklüğüne ulaşılmaya çalışılmıştır. Çalışmalarda %10, %5 ve %2.5 lipit konsantrasyonları denendiğinde, lipit konsantrasyonu azaldıkça, partikül büyüklüğünün ufaldığı gözlenmiş ve %2.5 konsantrasyon uygun görülmüştür. Hazırlama sırasında kullanılan karıştırma hızının da partikül büyüklüğünde direkt etkili olması nedeniyle karıştırma hızı 8 000 rpm'den 20 500 rpm'e çıkarılmıştır. Önceki deneyimler doğrultusunda kullanılan %1.2 konsantrasyondaki yüzey etken madde yeterli görülerek değiştirilmemiştir. Sonuçta, bir formülasyonda karar kılınarak karakteristik incelemeler bu formülasyon üzerinde yapılmıştır.

#### 4.2.2.2. Özellikleri

Mikro- ve nanopartiküllerin karakteristik incelemeleri literatürlerde sıkça rastlanan yöntemler ile yapılmıştır: çözünme hızı çalışmaları, taramalı elektron mikroskobu, diferansiyel taramalı kalorimetre (61), partikül boyut analizi ve ilaç içeriği (41).

#### Şekilleri

C10-P5-L5, C2.5-P5-T1.2 ve c2.5-p5-t1.2 kodlu formülasyonların şekilleri taramalı elektron mikroskobu ile incelendiğinde hazırlama tekniğinin partikül şekline etkili olduğu görülmüştür (Şekil 27-29). Bu görüntüler toz piribedil ile karşılaştırıldığında partikül şeklinin değişmiş olduğu ve toz piribedil'in yüksek orandaki agregasyonunun nispeten azaldığı tespit edilmiştir. Sıcak homojenizasyon ile hazırlanan mikro- ve nanopartiküllerin görüntülerinde partiküllerin bozuk şekilli ve köşeli oldukları görülmüştür (Şekil 28,29). Soğuk homojenizasyon ile hazırlanan mikropartiküllerin ise daha küresel olduğu saptanmıştır (Şekil 27).

Farklı literatürlerde, farklı partikül şekilleri izlenmektedir. Bazı literatürlerde oldukça küresel ve düzgün mikropartiküller görülürken (35,36,40,209), bazılarında çalışmamızda olduğu gibi düzensiz ve bozuk şekillere de rastlanmaktadır (23,110,210). Genellikle çözücü uçurma yöntemi ile küresel formlar elde edilmiştir (36,209,210). Literatürler incelendiğinde hazırlanan partikül şekline hazırlama yönteminin ve kullanılan taşıyıcı maddenin etkisi açıktır.

Tüm formülasyonlarda aynı lipit madde kullanıldığından, taşıyıcı maddenin partikül şekli üzerine etkisi belirlenememiştir. Ancak, hazırlama yöntemi ile partikül şeklinin değişebileceği saptanmıştır. Bununla birlikte aynı yöntem ve lipit ile hazırlanan partiküllere ait bir çalışmaya rastlanmadığından karşılaştırma yapılamamıştır.

### Partikül Büyüklük Dağılımları

Farmasötik maddelerin çoğu sınırlı çözünürlükleri ve/veya çözeltideki kimyasal kararsızlıklarından dolayı katı taşıyıcı sistemler içinde verilirler. Bu tip maddeler için iyi tasarlanmış taşıyıcı partiküler sistemler özel öneme sahiptir. Eğer etkin maddenin sudaki çözünürlüğü düşük ise, partikül büyüklüğünün küçültülmesi önem taşır. Partikül büyüklüğü ufaltıldığında, etkin maddenin toplam dışyüzeyi ve dolayısıyla vücut sıvısı ile temas alanı artar. Bu da, ilacın biyoyararlanımının iyileşmesine neden olur (95).

Soğuk homojenizasyon ile hazırlanan partiküllerin boyut dağılımları lazer tarama cihazı ile, yüzey etken madde miktarındaki artışa bağlı olarak incelendiğinde, partikül büyüklüğünün genellikle azaldığı görülmüştür. Partikül büyüklüğü ve stabilizatör konsantrasyonu arasında deneysel bir ilişki olduğu literatürlerce de desteklenmektedir (47). Yapılan bir çalışmada ise PVA'nın konsantrasyonu azaldıkça, mikropartikül büyüklüğünde kademeli bir artış meydana gelmiştir (43). Kullanılan yüksek yüzey etken madde konsantrasyonu da partikül büyüklük ölçümünde ufak partiküller ile sonuçlanmıştır. Aynı zamanda, yüzey etken madde partikül hazırlamanın son basamağında kullanıldığından ve ultraturakda hızlı bir karıştırma, partikül büyüklüğünün ufaltılmasında olumlu yönde etki etmiştir. Ayrıca, liyofilizasyon sırasında oluşabilecek agregatların sonuçları etkilemesini önlemek için partikül analizi öncesi formülasyonların sulu dispersiyonları hazırlanmıştır.

Mikropartikül hazırlama sırasında, etkin madde konsantrasyonunda yapılan değişiklikler ise partikül büyüklüğü bakımından anlamlı bir farka yol açmamıştır. Buna sebep, etkin maddenin lipit içinde çözünerek lipit ile birlikte hareket etmesi olabilir. Ayrıca partikül büyüklüğü bakımından hazırlamada önemli bir basamak olan öğütme aşamasında kullandığımız, havan ile elle öğütme yeterli oranda standardize edilememiş bu da partikül büyüklüğünü olumsuz etkilemiştir.

Hazırlanan formülasyonlara ait partikül büyüklük dağılım bulgularına bakıldığında hazırlama yönteminin partikül büyüklüğüne olan etkisi ortadadır. Bunun nedeni, sıcak homojenizasyon yönteminde lipitin aynı sıcaklıktaki sulu yüzey etken madde çözeltisine ilavesi nedeniyle lipitin katılaşmasına fırsat verilmemesi olarak düşünülebilir. Ancak, soğuk homojenizasyonda etkin madde erimiş lipit içerisinde çözündürülüp tekdüze dağıldıktan sonra ani olarak oda sıcaklığına alınmaktadır. Bu sırada ve daha sonra buzdolabında katılaştıran lipitin yeniden öğütülmesi oldukça güçtür.

Sıcak homojenizasyon yönteminin ön denemelerinde lipit konsantrasyonunun, karıştırma hızının ve yüzey etken madde cinsinin partikül büyüklüğüne etkili olduğu izlenmiştir. Bu denemelerin sonuçlarında, karıştırma hızını arttırmakla ve lipit oranını düşürmekle partikül boyutunu küçültebildiğimiz görülmüştür. Aynı şekilde, yüzey etken maddenin cinsi de partikül büyüklüğünde direkt olarak etkilidir. Sıcak homojenizasyon

yönteminde Labrasol<sup>®</sup>, Tween 80<sup>®</sup> ve Pluronic F68<sup>®</sup> olmak üzere üç tip yüzey etken madde denenmiş ve tüm denemelerde Tween 80<sup>®</sup> ile hazırlanan partiküller, partikül büyüklüğü açısından daha iyi bulunmuştur. Denenen yüzey etken madde sayısı az olduğundan bunun nedeninin araştırılmasına gidilmemiştir. Yazılı kaynaklarda mikrokürelerin özelliklerinde yüzey etken maddenin tipinin etkili olduğu vurgulanmıştır (93). Elde edilen sonuçlar, mikrokürelerin oluşumunda, HLB ve yüzey etken madde konsantrasyonunun önemli bir rol oynadığını, büyüklük dağılımlarının HLB tarafından anlamlı olarak etkilendiğini göstermiştir (94). Yapılan diğer çalışmalarda da, mikrokürelerin ortalama çapının, emülsiyon stabilizatörünün tipi, polimer konsantrasyonu, sulu ve organik faz hacmi ve karıştırma hızı ile etkilendiğine dair sonuçlar elde edilmiştir (37).

Partikül büyüklüğü dağılımı c2.5-p5-t1.2 nanopartiküllerinin elde edilmesinde olduğu gibi filtrasyon ile modifiye edilebilir. Ancak filtrasyona rağmen az da olsa karışımda iri partiküllere rastlanmaktadır. Bunun nedeni filtrasyonda kullanılan vakum sırasında partiküllerin agregasyonu olabilir.

#### IR Analizleri

Yapılan analizler sonucunda elde edilen spektrumlarda karakteristik piribedil ve Compritol<sup>®</sup> pikleri gözlenmiştir. Etkin madde ve lipit konsantrasyonuna bağlı olarak pik uzunlukları değişmiştir. Bunun yanısıra tüm spektrumlarda 800-1100 cm<sup>-1</sup> arasındaki bölgede etkin maddeye ait pikler kütleşmiş ve sayıları azalmıştır.

Aynı şekilde dekzametazon ve tolmetin ile yapılan iki mikropartikül çalışmasında da etkin maddenin IR pik boyları, mikroküre hazırlamadan sonra ufalmış ve kütleşmiştir (56,69). Bu çalışmada elde edilen IR sonuçları da, literatürü destekler görünmektedir.

#### Termal Analizleri

Kullanılan madde ve hazırlanan partiküllerin termal incelemelerinde, diğer termal analiz yöntemlerine pekçok üstünlükleri olan diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılmıştır.

Gerek termogramlardan, gerekse **Tablo 14** 'den de görüleceği üzere tüm formülasyonlarda ikişer ısıtma ve soğutmadan kaynaklanan, iki endotermik ve iki ekzotermik pik bulunmaktadır. Bu pikler daha önce Compritol<sup>®</sup> 'ün termogramlarında görülen piklerdir. Bu termogramlarda endotermik ve ekzotermik piklerin kaybolmamış olması veya lipite ait yeni bir pikin ortaya çıkmamış olması etkileşme ve geçimsizlik olmadığını göstermiştir. Çünkü termal analizde endotermik veya ekzotermik bir pikin kaybolması veya yeni bir pik ortaya çıkması etkileşme ve geçimsizlik olarak değerlendirilir (211). Etkin maddeye ait pikler bu analizlerde görülmemiştir. Çünkü, etkin maddenin erime noktası kullandığımız lipitinkinden daha yüksektir ve etkin madde bu sıcaklığa ulaşmaya dek lipit içerisinde çözünmüş olacaktır.

Genellikle katı ilaç maddeleri için kullanılan bu termal analiz yöntemi sıcak homojenizasyon ile hazırlanan C2.5-P5-T1.2 ve c.5-p5-t1.2 formülasyonları gibi sulu dispersiyon halindeki karışımlar için de kullanılabilir. Bu iki formülasyonun da termogramlarında iki endotermik, iki ekzotermik pik olmak üzere her aşamada birer pik görülmüştür. Ancak pikler küçülmüş ve karışımın 1 g'ının erimesi veya kristallenmesi için gerekli enerji miktarları azalmıştır. Bu sonuç, karışım sulu dispersiyon halde olduğu için içerdiği katı miktarının diğer ölçümlere göre az olmasından kaynaklanmaktadır.

Genel olarak ikinci endotermik piklerde erime derecelerinin birinciye göre düşük olması, etkin maddenin amorf hale geçtiğini düşündürmüştür.

### Hazırlama Verimi

Soğuk homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan mikropartiküllerin verimleri incelendiğinde tüm formülasyonlarda verim oldukça yüksek bulunmuştur. Sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlarda hazırlamadan gelen bir kayıp olmadığından ve bu formülasyonlar sulu dispersiyon şeklinde kullanıldıklarından verim hesabı yapılmamıştır.

Literatürdeki farklı yöntemler ile % 36-92 aralığında bulunan verim oranlarıyla karşılaştırma yapıldığında, elde edilen verimin yüksek değerlere yakın olduğu görülmüş (47) ve buna sebep olarak hazırlama yönteminde herhangi bir kimyasal reaksiyona ihtiyaç duyulmadığı düşünülmüştür. Eritilmiş lipitin, sulu yüzey etken madde çözeltisi içinde emülsifikasyonundan sonra katı partikül elde edilmiş, tüm lipit partiküller mikropartikül olsun veya olmasın verim içinde hesaplanmışlardır. Bu da verimi yükseltmiştir.

### Piribedil Yükleme ve Hapsedilmesi

Literatürlerde etkin madde yükleme kapasitesinin mikroküre büyüklüğü ile ilişkili olduğu (41), ilaç ve ilaç-polimer oranına bağlı bulunduğu (160) saptanmıştır. Hazırlanan mikropartiküllerde yüklenen ve hapsedilen piribedil miktarlarına bakıldığında (**Tablo 16**), değişen parametrelere bağlı olarak belirgin bir korelasyon görülememiştir. Bununla birlikte hapsedilen piribedil miktarının genel ortalaması %9.46'dır. Yapılan bir çalışmada, lipofilik model ilaçlar için maksimum %10 ilaç yüklemesi elde edilmiştir (4). Bir başka çalışmada, lipit matrisin ilaç yükleme kapasitesi %9.8 bulunmuştur (127). Bu değerler gözönüne alındığında sonucumuz literatür ile desteklenmektedir.

Bazı çalışmalarda hapsedilen etkin madde, C10-P10-L2.5 kodlu formülasyonda olduğu gibi, %5'e ve hatta %4'e kadar düşmüştür (66,144). Aynı düşüşün gözlemlendiği iki farklı çalışmada, hapsedilen miktar yüklenen ilaç miktarı ile doğrudan orantılıdır. Bu literatürlerden birinde yüklenen ilaç miktarı % 37'den % 77'ye çıktığında, mikropartiküllerdeki hapsedilen miktar % 4'ten, % 8'e yükselmiştir (212). Benzer şekilde bir başka çalışmada da yüklenen etkin madde % 27 iken hapsedilen etkin madde % 2.7

iken, yüklenen etkin madde % 57 olduğunda hapsedilen miktarın % 6.7 olduğu bulunmuştur (213). **Tablo 16**'ya bakıldığında, C10-P10-L2.5 kodlu formülasyonumuzda da aynı paralellik izlenmekte ve literatürde görülen yüklenen etkin madde miktarı artması ile partiküllerde hapsedilen miktarın arttığı gözlenmektedir.

#### Saklama Koşullarında Stabilite Kontrolü

Mikropartiküllerin saklama koşullarındaki stabilitelerinin saptanması amacıyla, buzdolabı (4°C), oda (20°C), etiv (40°C) ve stabilite dolabı'nda (40°C ve %60 relatif nem) bekletilmesi ile (0.5,1,3 ve 6 aylık sürelerde), İTK yardımıyla Rf değerlerindeki değişiklikler belirlenmeye çalışılmıştır.

Mikropartiküllerin saklandığı her dört ortamda da Rf değerlerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiş ve sonuçta partiküllerin 40°C sıcaklığa ve %60 relatif neme dayanıklı oldukları bulunmuştur. İlacın katı formda ve katı lipid bir matrisin içinde bulunmasının stabiliteye katkı sağladığı düşünülmüştür.

#### X-Işını Kırınım Analizleri

Aynı parametreler kullanılarak, yapılan soğuk ve sıcak homojenizasyon yöntemiyle hazırlanmış birer formülasyona ait analizlerin her ikisinde de piribedil ve Compritol®'ün karakteristik pikleri görülmüştür.

Karşılaştırma yapabilmek amacıyla, önce, kullanılan etkin madde ve lipitin analizi yapılmıştır. Daha sonra hazırlama yönteminden gelebilecek değişiklikleri izlemek amacıyla kullanılan yöntemlere ait birer formülasyonda inceleme yapılmıştır. Soğuk homojenizasyonun X-ışını kırınım analizinde pikler daha keskin ve saf bileşiklerin piklerine daha uygundur. Sıcak homojenizasyonun X-ışını kırınım analizinde ise bu denli keskin pikler yoktur. Bununla birlikte, bu analiz, katı lipid formülasyonların değerlendirilmesinde tek başına yeterli olamaz.

#### **4.2.2.3. In Vitro Çalışmalar**

##### Piribedil Salımı

Soğuk homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan mikropartiküllerin üç değişik ortamda (distile su, pH 1.2, pH 7.4) yapılan çözünme hızı çalışmalarında, çözünme ortamı pH'sının, çözünme hızına etkili olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, piribedil'in tampon çözeltilerdeki çözünürlüğünün fonksiyonu olarak, çözünme hızı ile doğrusallık tespit edilmiştir. Literatürde aynı doğrusallığın vurgulandığı iki çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde 5-fluorourasil'in dissolüsyon ortamında salınan miktarı yüksek pH'lardaki çözünürlüğüne bağlı olarak artmıştır (161). Diğer literatürde ise etkin maddenin sudaki çözünürlüğünün salım oranını etkilediği belirtilmiştir (167).



Tüm formülasyonlarda başlangıç zamanlarında, toz piribedile oranla hızlı salım gözlenmiştir. Bu iki nedenden ileri gelmiş olabilir. Birincisi, etkin maddenin çözünme hızında hazırlama aşamalarından kaynaklanan bir gelişme olmuştur. Literatürde benzer profillere rastlanmaktadır. Örneğin sudaki çözünürlüğü düşük, önemli bir steroidal ilaç olan dekzametazon'un polimerik kitosan içinde püskürterek kurutma yöntemi ile hapsedilmesi sonucu, etkin maddenin çözünme hızında gelişme kaydedilmiştir (56). İkincisi, ilk zamanlarda gözlenen hızlı salım, mikropartikül yüzeyine yakın ve yüzeydeki piribedil'in hızlı çözünmesi sonucunda salım ortamına geçmesinden kaynaklanmıştır. Son literatürlerdeki salım sonuçlarına göre kısa sürede gözlenen bu yüksek salım "burst effect" (patlama etkisi) tanımı ile açıklanmıştır (29). Bu patlama etkisiyle salınan etkin maddenin, organizmada hızlı başlangıç etki sağlayabileceği düşünülebilir yararlı görülmektedir.

Çalışmalarda, etkin madde ve yüzey etken madde konsantrasyonları ile çözünme hızı arasında anlamlı sonuçlar verecek doğrusallık gözlenmemiştir. Ön denemeler, bazı formülasyonlarda ikinci faz salım izlenimi verseler de sınırlı deney sayıları ile sadece etkin maddenin ilk fazdaki çözünürlük artışını göstermiştir. Ön çalışmalara göre seçilen C10-P5-L5 kodlu formülasyon, kullanılan yöntemler ve partikül büyüklükleri arasındaki farkı izlemek amacıyla, sıcak homojenizasyon ile hazırlanan mikro- ve nanopartiküller ile, çözünme hızı yönünden karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda da salım hızının, ortamın pH'sının fonksiyonu olduğunu desteklemiştir; yine etkin maddeden daha hızlı salımlar izlenmiştir. C10-P5-L5 mikropartiküllerinin distile su ortamında bifazik salım karakteristiği izlenmesine karşılık, bu özellik diğer ortamlarda (pH 1.2 ve pH 7.4) çok belirgin görülmemiştir.

Sıcak homojenizasyon ile hazırlanan mikro- ve nanopartiküllerin çözünme hızı profillerinde gözlenen iniş ve çıkışlardan dolayı bunların çözünme hızı ile ilgili anlamlı bir açıklama yapılamamıştır. Bunun nedeni UV-spektrofotometrik yöntemin piribedil miktar tayini için yeterli doğrusallık, tekrarlanabilirlik ve kesinlikte olmasına karşın, aynı yöntemin sıcak homojenizasyon ile hazırlanan formülasyonların çözünme hızı çalışmalarında seçici olmadığına bağlanmıştır. Bu sonucu destekleyen validasyon çalışmaları sonrasında, bu formülasyonlar için seçiciliği yüksek başka bir analitik yöntem araştırılması ve çözünme hızı testlerinin başka bir yöntem ile tekrarlanması gereği düşünülmüştür. Piribedil'in ticari preparatı ile yapılan salım testlerinde 23. saat'ten sonra % 100'ün üzerinde görülen salımının, preparatın plasebosu hazırlanamadığı için, seçicilik araştırması yapılamamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çözünme hızı çalışmalarında, literatürlerin de önemle vurguladığı, çözünme ortamından çözünmüş etkin maddenin ayrılmasında karşılaşılan önemli güçlükler çözünme hızı deneylerine olumsuz etkide bulunmuştur. Özellikle sıcak homojenizasyon ile hazırlanan partiküller santrifüj ile ayrılmadığından süzmeden gelen birçok problem yaşanmıştır.

Elde edilen çözünme hızı sonuçları bilinen kinetik modellere uygulanmış ancak bir uyum sağlanamamıştır. Katı lipit ile matris sistem hazırlanması, polimerlere oranla daha yeni bir konu olduğundan, sağlıklı bir fikir elde edebilmek için in vivo çalışmalara geçilmiştir. Ayrıca, çözünme hızı çalışmaları sonunda, kullanılan lipit matrisin özelliğinden dolayı, partiküllerin ilk görünüşleri bozulmamış, değişmeden kalmıştır. Bu durum, ilacın difüzyon mekanizması ile salındığını belirtmektedir. Literatürde de benzer sonuçlar verilmektedir. Bir çalışmada, kullandığımız lipit ile hazırlanan tabletlerde Higuchi difüzyon modeli ile etkin maddenin uzatılmış salımı elde edilmekte ve tabletler in vitro çözünme hızı testi boyunca bozulmamaktadır (12). Hazırladığımız partiküller hidrofobik karakterli olduğundan, hidrofilik taşıyıcılara göre sulu dissolüsyon ortamında oldukça kararlıdır. Bu sonuç farklı çalışmalarda da öne sürülmüştür (75).

Piribedil'in ticari preparatı ile yapılan karşılaştırmada ise distile su ve pH 7.4'te yavaş olan çözünme hızı hazırlanan formülasyonlar ile artmış, pH 1.2'deki hızlı olan salım C10-P5-L5 kodlu formülasyon ile 20. saatten sonra nispeten kontrol altına alınmıştır. Ancak ticari preparat üzerinde in vivo çalışmalar yapılmadığından bu fikir oldukça sınırlı kalmıştır.

#### pH 1.2 Salım Ortamındaki Stabilite Kontrolü

Piribedil'in pH 1.2 salım ortamındaki stabilitesi ince tabaka kromatografisi yöntemi ile incelendiğinde, piribedil'in Rf değerleri ile saf maddenin Rf değerleri arasında anlamlı farklılık görülmemiştir (Tablo 21). Bu sonuçlardan piribedil'in salım çalışmaları süresince pH 1.2 salım ortamında kararlı kaldığı düşünülmüştür.

#### **4.2.2.4. In Vivo Çalışmalar**

##### Farelerde Parkinson Modeli ile Tremor Testi

Parkinson'lu hastaların titremelerinin kontrolünde piribedil'in etkinliği ispatlanmış olduğundan (8,169,186), bu yönde fareler ile bir test yapılmıştır. Ancak Tablo 22'de ve Student t-testi sonucunda da görüldüğü üzere toz piribedil'de sonuç olumlu, mikropartikülde ise olumsuz yani aktivite yoktur. Elde edilen bu sonuç etkin maddenin lipit içinde hapsedildiği düşünüldüğünde oldukça anlamlı bulunmuştur. Her ne kadar in vitro çözünme hızı sonuçlarında partikül yüzeyinde ve yüzeye yakın yerlerde piribedil olduğu vurgulanmış ise de bu miktarın tremoru azaltmada yeterli olmadığı düşünülmüştür.

Bununla birlikte, mikropartikülün peroral biyoyararlanım çalışması yapılarak  $t_{maks}$  ve  $C_{maks}$  değerleri bulunduktan sonra, aynı tremor testinin bu  $t_{maks}$ 'ı içine alan zaman periyodunda tekrarlandığında olumlu sonuçlar elde edilebileceği düşünülebilir.

### Tavşanlarda Peroral Biyoyararlanım Çalışması

Bu çalışmada duyarlı ve seçici olduğu için YBSK yöntemi seçilmiş, fakat son derece karmaşık bir ekstraksiyon prosedürüne maruz kalınmıştır. Buna karşılık plazmadan ekstraksiyon ile geri kazanılan piribedil oranları hesaplandığında % 62.5 olarak bulunmuş ve bu tipte çalışmalar için uygun bir değer olduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda bu değer, ekstraksiyon prosedürünün alındığı literatürdeki %  $70 \pm 7$  değeri ile uyumlu görülmüştür (8).

Plazmadaki etkin madde miktarının hesaplanması sırasında YBSK'nde gözlenen piribedil ve buspiron (internal standart) spektrumları literatür ile uyumludur (214).

Biyoyararlanım çalışmaları sırasında ve sonrasında, kullanılan tavşanların yaşamsal fonksiyonlarında herhangi bir farklılık gözlenmediğinden kullanılan katı lipitin biyogeçimli olduğu düşünülmüştür.

Tavşanlar ile yapılan biyoyararlanım çalışmasına ait tablolar (Tablo 23,24) ve grafik (Şekil 40) incelendiğinde, piribedil mikropartiküllerinin peroral verilmesiyle piribedil biyoyararlanımının arttığı görülmüştür. Birçok çalışmada benzer etkiler gözlenmiştir. Örneğin, suda yavaş çözünen antikanser bir ilaç olan sisplatin'in mikroküreleri hazırlanıp kullanıldığında toksik etkileri azalmış ve sisplatin'in terapötik potansiyeli artmıştır (215). Benzer şekilde, poli (akrilik asit) mikropartiküllerindeki biyoyararlanım artışı, mide-barsak kanalından geçiş zamanının uzatılmasına bağlanmıştır (58).

Çalışmamızda, biyoyararlanım artmasına neden olan faktörler in vitro çözünme hızının modifiye edilmesi ve in vivo salımın kullanılan katı lipid tarafından kontrol edilmiş olmasıdır. Bunun yanısıra mikropartiküllerin mide-barsak alanına genişçe yayılarak etkin maddenin absorpsiyonunu arttırmış olabileceği de unutulmamalıdır. İn vivo ve in vitro sonuçlar gözden geçirildiğinde, etkin maddenin çözünürlüğünün artması biyoyararlanımının artması anlamında düşünüldüğünde, çalışmalar arasında bir korelasyon vardır.

Son derece lipofilik (ve genellikle suda az çözünen) bileşiklerin, klinik yararı, bunların düşük ve kararsız peroral biyoyararlanımı ile sınırlıdır. Böyle bileşikler, lipitler, lipidik eksipyanlar ve/veya yağlı yiyeceklerle birlikte verildiğinde biyoyararlanımları çoğu kez düzeltilebilir (216). Çalışmamızın sonuçları bu bulgular ile uyumlu bulunmuştur. Düşük biyoyararlanıma sahip piribedil'in, katı bir lipid ile mikropartikülü hazırlandığında biyoyararlanımı artmıştır.

Mikropartiküllerin peroral olarak verilmesinin ardından elde edilen zamana karşı plazma konsantrasyonu grafiği trifazik özellikte olduğundan biyolojik yarı ömür hesaplanamamıştır.

Oral ilaç formülasyonlarında, etkin maddenin intestinal membrana geçmeme, kimyasal/biyolojik kararsızlık ve suda çözünmeme gibi özellikleri, çoğu kez, oral verilişten

sonra çok düşük ve değişken biyoyararlanıma neden olmaktadır. Bundan dolayı oral ilaç formülasyonlarının geliştirilmesindeki başarının anahtarı, gelişmenin ilk aşamasında, yüksek emilim potansiyeli ve yüksek farmakolojik etkenliğin her ikisine de sahip olan etkin maddeleri seçmektir.

Genel olarak suda çözünmeyen etkin maddelerin barsaktan emiliminde mide-barsak ortamındaki çözünme hızı dikkate alınır. Toz piribedil'in 15. dk'da ortaya çıkan  $t_{maks}$ 'ı etkin maddenin mide ortamındaki çözünme hızıyla orantılıdır. Mikropartiküllerle ise, barsak ortamında etkin maddenin çözünme hızının toz piribedil'e oranla yüksek olmasına rağmen, 4 kat uzun plazma pik seviyesine ulaşma süresi ve daha yavaş in vivo ilaç salımı gözlenmiş bu da biyoyararlanım artışına neden olmuştur. 24. saatteki plazma konsantrasyonunun toz piribedilden yüksek olması etkin madde salımının uzatılmış olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar muhtemelen uzatılmış salım ajanı olarak kullanılan Compritol®'den kaynaklanmaktadır. Klucel HXF® (hidroksipropil selüloz), Carbopol 934P® (carbomer) ile Compritol®'ün (gliseril behenat) karşılaştırıldığı bir çalışmada, gliseril behenat ile hazırlanan tabletlerde salım profilleri difüzyon kontrollü bir mekanizma ile daha yavaş in vivo etkin madde salımı sağlanmıştır (197).

Çalışmamızda tek doz oral verilişin ardından gözlenen 24 saatten uzun in vivo salım profili, formülasyonların geliştirilebileceği yönünde fazlasıyla ümit vericidir. Çalışmamızın amacına dönersek, bu yavaş in vivo salım ile uzun süreli etki elde edilebileceği, buna paralel olarak sık ilaç kullanımının ortadan kalkabileceği düşünülebilir.

İlaçların biyoyararlanımını düzeltmek için, çoğunlukla emülsiyon veya lipozomlar gibi lipit dispersiyon sistemlerden birisi düşünülür. Katı lipit partiküller de, sudaki çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin biyoyararlanımını arttırmaya yönelik olarak, gelecek vaat eden taşıyıcı sistemlerdir. Günümüzde lipofilik ilaçların oral absorpsiyonunun düzeltilmesi yolunda mikropartikül formülasyonlarının uygun kullanımları araştırılmaktadır (166).

## 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. K. Westesen, B. Siekmann, M.H.J. Koch, Investigations on the Physical State of Lipid Nanoparticles by Synchrotron Radiation X-Ray Diffraction, **Int. J. Pharm.**, 93, 189-199 (1993).
3. H. Weyhers, S. Ehlers, W. Mehnert, H. Hahn, R.H. Müller, "Solid Lipid Nanoparticles"-Determination of In Vivo Toxicity, Proceeding of the 1st World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology APGI/APV, 9-11 May 1995, Budapest, pp. 489-490 (1995).
4. R.H. Müller, W. Mehnert, Potential of Solid Lipid Nanoparticles(SLN) for Controlled Drug Delivery, Proceeding of the 1st World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology APGI/APV, 9-11 May 1995, Budapest, pp. 463-464 (1995).
5. B. Siekmann, K. Westesen, Thermoanalysis of the Recrystallization Process of Melt-Homogenized Glyceride Nanoparticles, **Coll. Surf. B: Biointerfaces**, 3, 159-175 (1994).
6. B. Siekmann, K. Westesen, Solid Lipid Nanoparticles Stabilized by Tyloxapol, **Eur. J. Pharm. Sci.**, 2, 177 (1994).
7. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 29th Edition, London The Pharmaceutical Press, p.1021 1989.
8. S.Sarati, G. Guiso, R.Spinelli, S. Caccia, Determination of Piribedil and its Basic Metabolites in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography, **J. Chromatog.**, 536, 323-332 (1991).
9. W.C. Koller, When does Parkinson's Disease Begin?, **Neurology**, 42 (Suppl 4), 27-31 April (1992).
10. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th Edition, London The Pharmaceutical Press, p.1027, 1993.
11. U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP XXII/NF XVII, Mack Printing Company, Easton, pp. 1934-1935, 1990.
12. Ph. Barthélémy, N. Farah, J.P. Laforêt, A New Wax Matrix Excipient for Sustained Release Formulations in Tablets or Capsules, Gattefossé, 1995.
13. 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).
14. M. Güllük-Demirel, Salbutamol Sülfat Mikrokapsülleri Üzerinde Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1993.

15. A.Gürsoy, B.Dortunç, E.Pişkin, N.A.Peppas, Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler, "Mikrokapsüller ve Mikroküreler", Marmara Univ. Eczacılık Fak.Yay.No.469/5, İstanbul, 120-152, 1989.
16. 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).
17. K. Çiftçi, Biyolojik Olarak Parçalanabilen 5-fluorourasil Mikrokürelerinin Tasarımı ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmeleri, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1993.
18. M. Sriwongjanya, R. Bodmeier, Entrapment of Drug Loaded Ion-Exchange Particles within Polymeric Microparticles, **Int. J. Pharm.**, **158 (1)**, 29-38 (1997).
19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. 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).
23. Z. Ramtoola, O. I. Corrigan, E. Bourke, Characterisation of Biodegradable Microspheres Containing Dehydro-Iso-Androsterone, **Drug Dev. Ind. Pharm.**, **17(13)**, 1857-1873 (1991).
24. 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).
25. 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).
26. İ. Vural, H. S. Kaş, A. Atilâ Hıncal, Chitosan-Treated Albumin Microspheres of Sulphasalazine: I. Formulation and In Vitro Release Profiles, **Hacettepe University J. Fac. Pharm.**, **14(2)**, 57-65 (1994).

27. 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).
28. 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).
29. 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).
30. 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).
31. L.A.Luzzi, Microencapsulation, **J. Pharm. Sci.**, **59**(10), 1367-1376, (1970).
32. 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).
33. 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 (1994).
34. 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).
35. 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).
36. 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).
37. 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).
38. 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).

39. 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).
40. 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).
41. 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).
42. 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).
43. 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).
44. 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).
45. 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).
46. 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).
47. R. Arshady, Preparation of Biodegradable Microspheres and Microcapsules: 2-Polyactides and Related Polyesters, **J. Control. Rel.**, **17**, 1-22 (1991).
48. A. Gürsoy, M. Türkoğlu, B. Şenyücel, F. Kalkan, I. Okar, Evaluation of Tableted Microspheres of Dipyridamole, **Drug Dev. Ind. Pharm.**, **21(4)**, 503-507 (1995).
49. 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).
50. 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).



51. 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).
52. 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).
53. 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).
54. J. Broadhead, S.K. Edmond Rouan, C.T. Rhodes, The Spray Drying of Pharmaceuticals, **Drug Dev. Ind. Pharm.**, **18(11&12)**, 1169-1206 (1992).
55. 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).
56. 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).
57. 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).
58. 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).
59. 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 ( $w_1/o$ ) $w_2$  Emulsion Solvent Evaporation Method, **Int. J. Pharm.**, **111**, 137-145 (1994).
60. 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).
61. 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).
62. S. Malamataris, A. Avgerinos, Controlled Release Indomethacin Microspheres Prepared by Using an Emulsion Solvent-Diffusion Technique, **Int. J. Pharm.**, **62**, 105-111 (1990).
63. 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).

64. 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).
65. 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).
66. K. Thoma, B. Schlütermann, Relationships Between Manufacturing Parameters and Pharmaceutical-Technological Requirements on Biodegradable Microparticles, Part 6: In Vitro Release Characteristics of Cinchocaine and Bubivacaine from Biodegradable Microparticles, **Pharmazie**, **47**, 436 (1992).
67. 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).
68. 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).
69. R. Pignatello, M.A. Vandelli, P. Giunchedli, 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).
70. 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).
71. K. Thoma, B Schlütermann, Relationships Between Manufacturing Parameters and Pharmaceutical-Technological Requirements on Biodegradable Microparticles, **Pharmazie**, **47**, 199 (1992).
72. 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).
73. 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).
74. 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).
75. Ö.H. Ocak, Bleomisinin Manyetik Albumin Mikroküreleri ile Hedeflendirilmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1992.
76. 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).

77. 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).
78. J. Kreuter, Physicochemical Characterization of Polyacrylic Nanoparticles, **Int. J. Pharm.**, **14**, 43-58 (1993).
79. A. Bender, V. Schäfer, A.M. Steffan, C. Royer, J. Kreuter, H. Rübsamen-Waigmann, H. von Briesen, Inhibition of HIV In Vitro by Antiviral Drug-Targeting Using Nanoparticles, **Res. Virol.**, **145**, 215-220 (1994).
80. G.M. Jantzen, J.R. Robinson, Sustained-and Controlled-Release Drug Delivery Systems, Modern Pharmaceutics, Eds. G.S. Banker, C. T. Rhodes, Marcel Dekker, Inc., New York, 575-604, 1996.
81. J. Kreuter, Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems I: Preparation Methods, **Pharm. Acta Helv.**, **58** (7), 196-208 (1983).
82. J. Kreuter, Drug Targeting with Nanoparticles, **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.**, **3**, 253-256 (1994).
83. F. Öner, Nanopartiküller: Katı Kolloidal İlaç Taşıyıcı Sistemler, **FABAD J. Pharm. Sci.**, **8**, 250-260 (1983).
84. J. Kreuter, Liposomes and Nanoparticles As Vehicles for Antibiotics, **Infection**, **19** Suppl. 4, 224-228 (1991).
85. J. Kreuter, Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems III: Materials, Stability, Toxicity, Possibilities of Targeting and Use, **Pharm. Acta Helv.**, **58** (9-10), 242-250 (1983).
86. R.C. Oppenheim, Solid Colloidal Drug Delivery Systems: Nanoparticles, **Int. J. Pharm.**, **8**, 217-234 (1981).
87. 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).
88. M.A. Vandelli, M. Fresta, G. Puglisi, F. Forni, An Interpretative Analysis of the Effect of the Surfactants Used for the Preparation of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles on the Release Process, **J. Microencapsulation**, **11**(5), 531-538 (1994).
89. R.F. Urrusuno, E. Fattal, D. Porquet, J. Feger, P. Couvreur, Interactions of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles with Rat Hepatocytes Cultured Ex Vivo, Prooceding of the In Vitro and Ex Vivo Test Systems to Rationalize Drug Design and Delivery European Symposium, 13-14 December 1993, Paris APGI/FIP pp. 255-264 (1993)
90. R.W. Wood, V.H.K. Li, J. Kreuter, J.R. Robinson, Ocular Disposition of Poly-Hexyl-2-Cyano[3-<sup>14</sup>C] Acrylate Nanoparticles in the Albino Rabbit, **Int. J. Pharm.**, **23**, 175-183 (1985).

91. M. Kukan, V. Koprda, S. Bezek, J. Kalal, J. Labsky, T. Trnovec, Disposition of Lyophilized (methylmethacrylate-<sup>14</sup>C, 2-hydroxyethylmethacrylate, butylacrylate) Nanoparticles in Rats and Their Effect on Zoxazolamine Paralysis Time, **Pharmazie**. **46**, 37-39 (1991).
92. T. Baykara, Nanopartiküller: Hazırlama Yöntemleri ve Uygulamaları, **Aktüel Eczacı**, **2(20)**, 32-36 (1995).
93. L.S.C. Wan, P.W.S. Heng, L.W. Chan, Surfactant Effects on Alginate Microspheres, **Int. J. Pharm.**, **103**, 267-275 (1994).
94. 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).
95. 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).
96. G. Lukowski, R.H. Müller, B.W. Müller, M. Dittgen, Acrylic Acid Copolymer Nanoparticles for Drug Delivery: I. Characterization of the Surface Properties Relevant for In Vivo Organ Distribution, **Colloid & Polymer Sci.**, **271**, 100-105 (1993).
97. P. Beck, D. Scherer, J. Kreuter, Separation of Drug-Loaded Nanoparticles From Free Drug by Gel Filtration, **J. Microencapsulation**, **7(4)**, 491-496 (1990).
98. P. Beck, J. Kreuter, R. Reszka, I. Fichtner, Influence of Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles and Liposomes on the Efficacy and Toxicity of the Anticancer Drug Mitoxantrone in Murine Tumour Models, **J. Microencapsulation**, **10(1)**, 101-114 (1993).
99. M. Fresta, G. Puglisi, G. Giammona, G. Cavallaro, N. Micali, P.M. Furneri, Pefloxacin Mesilate-and Ofloxacin-Loaded Polyethylcyanoacrylate Nanoparticles: Characterization of the Colloidal Drug Carrier Formulation, **J. Pharm. Sci.**, **84(7)**, 895-902, (1995).
100. A. Zimmer, E. Mutschler, G. Lambrecht, D. Mayer, J. Kreuter, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Aspects of an Ophthalmic Pilocarpine Nanoparticle-Delivery-System, **Pharm. Res.**, **11(10)**, 1435-1442 (1994).
101. S. Gibaud, J.P. Andreux, C. Weingarten, M.H. Andreux, P. Couvreur, Cultures of Haematopoietic Progenitors to Evaluate the Myelosuppressive Effects of Doxorubicin-Loaded Nanoparticles, Proceeding of the In Vitro and Ex Vivo Test Systems to Rationalize Drug Design and Delivery European Symposium, 13-14 December 1993, Paris APGI/FIP, pp. 276-281 (1993)
102. T. Verrecchia, D. V. Bazile, A.M. Brelier, J.P. Plard, G. Spenlehauer, Conformation/Immunogenicity Relationship of Human Serum Albumin Bound to Poly( $\alpha$ -Hydroxy Acid) Nanoparticles, Proceeding of the In Vitro and Ex Vivo Test Systems to Rationalize Drug Design and Delivery European Symposium, 13-14 December 1993, Paris APGI/FIP, pp. 269-275 (1993)

103. J. Molpeceres, M. Guzman, M.R. Aberturas, M. Chacon, L. Berges, Application of Central Composite Designs to the Preparation of Polycaprolactone Nanoparticles by Solvent Displacement, **J. Pharm. Sci.**, **85** (2), 206-213 (1996).
104. J. Kreuter, Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems II: Comparison of the Body Distribution of Nanoparticles with the Body Distribution of Microspheres (Diameter >1  $\mu\text{m}$ ), Liposomes and Emulsions, **Pharm. Acta Helv.**, **58**(8), 217-226 (1983).
105. V. Schäfer, H.V. Briesen, H. Rübsamen-Waigmann, A.M. Steffan, C. Royer, J. Kreuter, Phagocytosis and Degradation of Human Serum Albumin Microspheres and Nanoparticles in Human Macrophages, **J. Microencapsulation**, **11** (3), 261-269 (1994).
106. S.S. Davis, L. Illum, Colloidal Carriers and Drug Targeting, **Acta Pharm. Technol.**, **32**(1), 4-9 (1986).
107. S.H. Michelland, M.J. Alonso, A. Andremont, P. Maincen, J. Sauzières, P. Couvreur, Attachment of Antibiotics to Nanoparticles: Preparation, Drug-Release and Antimicrobial Activity In Vitro, **Int. J. Pharm.**, **35**, 121-127 (1987).
108. E. Fattal, J. Rojas, L. Roblot-Treupel, A. Andremont, P. Couvreur, Ampicillin-Loaded Liposomes and Nanoparticles: Comparison of Drug Loading, Drug Release and In Vitro Antimicrobial Activity, **J. Microencapsulation**, **8**(1), 29-36 (1991).
109. J-C. Leroux, R.M. Cozens, J.L. Roesel, B. Galli, E. Doelker, R. Gurny, pH-Sensitive Nanoparticles: An Effective Means to Improve the Oral Delivery of HIV-1 Protease Inhibitors in Dogs, **Pharm. Res.**, **13**(3), 485-487 (1996).
110. R. Bodmeier, H. Chen, P. Tyle, P. Jarosz, Spontaneous Formation of Drug-Containing Acrylic Nanoparticles, **J. Microencapsulation**, **8**(2), 161-170 (1991).
111. A. Zimmer, J. Kreuter, J.R. Robinson, Studies on the Transport Pathway of PBCA Nanoparticles in Ocular Tissues, **J. Microencapsulation**, **8**(4), 497-504 (1991).
112. L. Marchal-Heussler, D. Sirbat, M. Hoffman, P. Maincent, Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanocapsules in Corteolol Ophthalmic Delivery, **Pharm. Res.**, **10**(3), 386-390 (1993).
113. S.K. Das, I.G. Tucker, D.J.T. Hill, N. Ganguly, Evaluation of Poly (Isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles for Mucoadhesive Ocular Drug Delivery. I. Effect of Formulation Variables on Physicochemical Characteristics of Nanoparticles, **Pharm. Res.**, **12**(4), 534-540 (1995).
114. D.V. Bazile, C. Ropert, P. Huve, T. Verrecchia, M. Marlard A. Frydman, M. Veillard, G. Spenlehauer, Body Distribution of Fully Biodegradable [ $^{14}\text{C}$ ]-Poly (Lactic acid) Nanoparticles Coated with Albumin After Parenteral Administration to Rats, **Biomaterials**, **13**(15), 1093-1102 (1992).
115. D. Leu, B. Manthey, J. Kreuter, P. Speiser, P.P. DeLuca, Distribution and Elimination of Coated Polymethyl [2- $^{14}\text{C}$ ]Methacrylate Nanoparticles After Intravenous Injection in Rats, **J. Pharm. Sci.**, **73**(10), 1433-1437 (1984).

116. J. Kreuter, U. Täuber, V. Illi, Distribution and Elimination of Poly (methyl-2-<sup>14</sup>C-methacrylate) Nanoparticle Radioactivity After Injection in Rats and Mice, **J. Pharm. Sci.**, **68(11)**, 1443-1447 (1979).
117. S.D, Tröster, U. Müller, J. Kreuter, Modification of the Body Distribution of Poly (methyl methacrylate) Nanoparticles in Rats by Coating With Surfactans, **Int. J. Pharm.**, **61**, 85-100 (1990).
118. A. Rolland, Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Doxorubicin-Loaded Polymethacrylic Nanoparticles in Rabbits, **Int. J. Pharm.**, **42**, 145-154 (1988).
119. L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts, M. Roland, D. Deprez-Decampeneere, P. Speiser, Pharmacokinetics and Distribution of a Biodegradable Drug-Carrier, **Int. J. Pharm.**, **15**, 335-345 (1983).
120. M.J. Cappel, J. Kreuter, Effect of Nanoparticles or Transdermal Drug Delivery, **J. Microencapsulation**, **8(3)**, 369-374 (1991).
121. C. Schwarz, W. Mehnert, J.S. Lucks, R.H. Müller, Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery. I. Production, Characterization and Sterilization, **J. Control. Rel.**, **30**, 83-96 (1994).
122. A. Smith, I.M. Hunneyball, Evaluation of Poly/Lactic Acid as a Biodegradable Drug Delivery System for Parenteral Administration, **Int. J. Pharm.**, **30**, 215-220 (1986).
123. S. MaaBen, C. Schwarz, W. Mehnert, J.S. Lucks, F. Yunis-Specht, B.W. Müller, R.H. Müller, Comparison of Cytotoxicity Between Polyester Nanoparticles and Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioactive Mater., **20**, 490-491 (1993).
124. C. Schwarz, W. Mehnert, Sterilization of Drug-Free and Tetracaine-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Proceeding of the 1st World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology APGI/APV, 9-11 May 1995, Budapest, pp. 485-486 (1995).
125. R.R.C. New, Liposomes-a Practical Approach, Oxford University Press, New York, 100-102, 1992.
126. B. Siekmann, K. Westesen, Submicron-Sized Parenteral Carrier Systems Based on Solid Lipids, **Pharm. Pharmacol. Lett.**, **1**, 123,126 (1992).
127. R.H. Müller, W. Mehnert, J.S. Lucks, C. Schwarz, A. zur Mühlen, H. Weyhers, C. Freitas, D. Rühl, Solid Lipid Nanoparticles (SLN)- An Alternative Colloidal Carrier System for Controlled Drug Delivery, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, **41(1)**, 62-69 (1995).
128. K. Westesen, B. Siekmann, Comparison of Parenteral Lipid Emulsions and Solid Lipid Nanoparticles, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, **40 (Suppl.)**, 35S (1994).
129. T. Eldem, P. Speiser, A. Hincal, Optimization of Spray-Dried and Congealed Lipid Micropellets and Characterization of Their Surface Morphology by Scanning Electron Microscopy, **Pharm. Res.**, **8**, 47-54 (1991).

130. R.H. Müller, C. Schwarz, W. Mehnert, J.S. Lucks, Production of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioactive Mater.*, 20, 480-481 (1993).
131. R.H. Müller, J.S. Lucks, Arzneistoff-träger aus Festen Lipidteilchen-Feste Lipid Nanosphären (SLN). German Patent Application p 41 31 562.6 (1991).
132. B. Siekmann, K. Westesen, Melt-Homogenized Solid Lipid Nanoparticles Stabilized by the Nonionic Surfactant Tyloxapol, I. Preparation and Particle Size Determination, **Pharm. Pharmacol. Lett.**, 3, 194-197 (1994).
133. R.H. Müller, C. Schwarz, A. zur Mühlen, W. Mehnert, Incorporation of Lipophilic Drugs and Drug Release Profiles of Solid Lipid Nanoparticles (SLN), *Proceed. Inter. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 21, 146-147 (1994).
134. A. zur Mühlen, W. Mehnert, Drug Incorporation and Delivery of Prednisolone Loaded Solid Lipid Nanoparticles, *Proceeding of the 1st World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology APGI/APV, 9-11 May 1995, Budapest*, pp. 455-456 (1995).
135. R.H. Müller, S. Maaßen, H. Weyhers, F. Specht, J.S. Lucks, Cytotoxicity of Magnetite-Loaded Polylactide, Polylactide/Glycolide Particles and Solid Lipid Nanoparticles, **Int. J. Pharm.**, 138, 85-94 (1996).
136. A. zur Mühlen, E. Mühlen, H. Niehus, W. Mehnert, Characterisation of Solid Lipid Nanoparticles by Atomic Force Microscopy, **Eur. J. Pharm. Sci.**, 2, 178 (1994).
137. U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP XXII/NF XVII, Mack Printing Company, Easton, pp. 1596-1597, 1990.
138. P. Ahlin, J. Kristl, J. Smid-Korbar, Optimization of Procedure Parameters and Physical Stability of Solid Lipid Nanoparticles in Dispersions, *Baskıda*.
139. C. Freitas, J.S. Lucks, R.H. Müller, Effect of Storage Conditions on Long-Term Stability of "Solid Lipid Nanoparticles" (SLN) in Aqueous Dispersions, *Proceeding of the 1st World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology APGI/APV, 9-11 May 1995, Budapest*, pp. 493-494 (1995).
140. C. Schwarz, W. Mehnert, R.H. Müller, Lyophilisation of Solid Lipid Nanoparticles (SLN), **Eur. J. Pharm. Sci.**, 2, 177 (1994).
141. 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. Williams, S.E. Dunn, Microspheres for Targeting Drugs to Specific Body Sites, **J. Control. Rel.**, 24, 157-163 (1993).
142. M.G. Vachon, J.G. Nairn, Physico-Chemical Evaluation of Acetylsalicylic Acid-Eudragit® RS 100 Microspheres Prepared Using a Solvent-Partition Method, **J. Microencapsulation**, 12(3), 287-305 (1995).

143. A. Berthold, K. Cremer, J. Kreuter, Collagen Microparticles: Carriers for Glucocorticosteroids, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, **45**, 23-29 (1998).
144. L.I. Giannola, V. DI Stefano, V. De Caro, White Beeswax Microspheres: A Comparative In Vitro Evaluation of Cumulative Release of the Anticancer Agents Fluorouracil and Ftorafur, **Pharmazie**, **48**, 123-126 (1993).
145. 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).
146. C. Washington, F. Koosha, Drug Release from Microparticulates Deconvolution of Measurement Errors, **Int. J. Pharm.**, **59**, 79-82 (1990).
147. 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).
148. 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).
149. 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).
150. 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).
151. 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).
152. H.Okada, M. Yamanoto, T. Heya, Y. Inoue, S. Kamei, Y. Ogawa, H. Toguchi, Drug Delivery Using Biodegradable Microspheres, **J. Control. Rel.**, **28**, 121-129 (1994).
153. 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).
154. C. Washington, Drug Release from Microdisperse Systems: a Critical Review, **Int. J. Pharm.**, **58**, 1-12 (1990).
155. 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).



156. 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).
157. 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).
158. 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).
159. S. Benita, Microencapsulation; Methods and Industrial Applications, Marcel Dekker, Inc, New York, 155-176, 1996.
160. 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).
161. 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).
162. 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).
163. M. Kyo, S.H. Hyon, Y. Ikada, Effects of Preparation Conditions of Cisplatin-Loaded Microspheres on the In Vitro Release, **J.Control. Rel.**, **35**, 73-82 (1995).
164. M, Çelik, L. Maganti, Formulation and Compaction of Microspheres, **Drug Dev. Ind. Pharm.**, **20(20)**, 3115-3173 (1994).
165. 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).
166. S. Yamashita, T. Furubayashi, In Vitro-In Vivo Correlations: Application to Water Insoluble Drugs, **Bul. Tech. Gattefossé**, **91**, 25-31 (1998).
167. 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).
168. Servier, Bilimsel Derlemeler, Trivastal 50 Retard, "Dopamin ve Serebral Yaşlanma", s.7-16 1987.
169. J.L. Montastruc, O Rascol, J.M. Senard, Current Status of Dopamine Agonists in Parkinson's Disease Management, **Drugs**, **46(3)**, 384-393 (1993).
170. J. Jankovic, Pergolide: Clinical Experience, Current Trends in the Treatment of Parkinson's Disease, Edited by Yves Agid John Libbey & Company Ltd. ,USA, s. 93-103 (1998).

171. D.Bravi, V.Nohria, L.F.Megas, Dopamine Agonists in the Clinical Management of Parkinson's Disease; Symptomatic or Neuroprotective Treatment?, **Eur. J. Neur.**, **3(suppl:1)**, 13-18 (1996).
172. A. Freese, B.A. Sabel, W. M. Saltzman, M.J. During, R. Langer, Controlled Release of Dopamine from a Polymeric Brain Implant: In Vitro Characterization, **Exp. Neur.**, **103**, 234-238 (1989).
173. M.J. During, A. Freese, B. A. Sabel, W. M. Saltzman, A. Deutch, R.H. Roth, R. Langer, Controlled Release of Dopamine from a Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization, **Annals of Neur.**, **25(4)**, 351-356 (1989).
174. M.J. During, A. Freese, A.Y. Deutch, P.G. Kibat, B.A. Sabel, R. Langer, R. H. Roth, Biochemical and Behavioral Recovery in a Rodent Model of Parkinson's Disease following Stereotactic Implantation of Dopamine-Containing Liposomes, **Exp. Neur.**, **115**, 193-199 (1992).
175. Servier, Bilimsel Derlemeler, Trivastal 50 Retard, "Dopamin, Trivastal 50 Retard ve Dünya Çapındaki Araştırmalar", s.5-6 1987.
176. The Merck Index, Eleventh Edition, Merck & Co., Inc., New Jersey, U.S.A., p. 1190 (1989).
177. Technologie Servier, Piribedil Lot/Batch n°48585, Firma Spesifikasyonları, 1995.
178. J.Y. Legendre, I. Rault, A. Petit, W. Luijten, I. Demuynck, S. Horvath, Y.M. Ginot, A. Cuine, Effects of  $\beta$ -cyclodextrins on skin: Implications for the Transdermal Delivery of Piribedil and a Novel Cognition Enhancing-Drug, S-9977, **Eur. J. Pharm. Sci.**, **3**, 311-322 (1995).
179. R.S. Tsai, N. El-Tayar, P.A. Carrupt, B. Testa, Physicochemical Properties and Transport Behaviour of Piribedil.: Considerations on its Membrane-Crossing Potential, **Int. J. Pharm.**, **80**, 39-49 (1992).
180. J. Engel, A.K. Granerus, A. Svanborg, Piribedil in Parkinson's Syndrome: A Clinical Study, **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, **8**, 223-226 (1975).
181. G. Romano, G. Caruso, G. Musumarra, D. Pavone, G. Cruciani, Qualitative Organic Analysis. Part 3. Identification of Drugs and Their Metabolites by PCA of Standardized TLC Data, **J. Planar Chromatogr. Mod. TLC**, **7(3)**, 233-41 (1994).
182. S. Sarati, S. Caccia, Solid-Phase Extraction of Piribedil and its Metabolites from Plasma and Urine Without and After Deconjugation, by High Performance Liquid Chromatography, **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.**, **17(3)**, 205-211 (1992).
183. S. Caccia, A. Notarnicola, M.H. Fong, E. Benfenati, Identification and Quantitation of 1-Arylpiperazines, Metabolites Resulting From Side-Chain Cleavage of (4-Substituted Aryl-1-Piperazinyl) Alkyl Heterocyclic Derivatives In Rat Plasma and Brain, **J. Chromatog.**, **283**, 211-221 (1984).

184. P.Jenner, C.D. Marsden, The Influence of Piribedil (ET 495) on Components of Locomotor Activity, **Eur. J. Pharmacol.**, **33**, 211-215 (1975).
185. R. Fanelli, A. Frigerio, Determination of Piribedil in Biological Materials by Gas-Liquid Chromatography-Mass Fragmentography, **J. Chromatog.**, **93**, 441-446 (1974).
186. M.D. Hall, P. Jenner, C.D. Marsden, Differential Labelling of Dopamine Receptors in Rat Brain In Vivo: Comparison of [<sup>3</sup>H] Piribedil, [<sup>3</sup>H] S 3608 and [<sup>3</sup>H] ~, N, n-Propylnorapomorphine, **Eur. J. Pharmacol.**, **87**, 85-94 (1983).
187. M.A. Caldwell, J.M. Reymann, D. Bentue-Ferrer, H. Allain, B.E. Leonard, The Dopamine Agonists Lisuride and Piribedil Protect Against Behavioral and Histological Changes Following 4-vessel Occlusion in the Rat, **Neuropsychobiology**, **34(3)**, 117-124 (1996).
188. R. Pagliari, L. Peyrin, O. Crambes, Differential Regional and Kinetics Effects of Piribedil and Bromocriptine on Dopamine Metabolites: a Brain Microdialysis Study in Freely Moving Rats, **J. Neural. Transm.: Gen. Sect.**, **101 (1-3)**, 13-26 (1995).
189. R.D.Sweet, C. Wasterlain, F.H. McDowell, Piribedil, a Dopamine Agonist, in Parkinson's Disease, **Clin. Pharmacol. Ther.**, **16(6)**, 1077-1082 (1974).
190. Servier, Trivastal 50 Retard, "I.Trivastal 50 Retard, Birçok Endikasyon, Bir Tek Farmakolojik Profil", s.4-13 1998.
191. A. Cagnotto, L. Parotti, T. Mennini, In Vitro Affinity of Piribedil for Dopamine D<sub>3</sub> Receptor Subtypes, an Autoradiographic Study, **Eur. J. Pharmacol.**, **313**, 63-67 (1996).
192. B. Jardon, N. Bonaventure, Different Effects of Dopamine and Piribedil (a Dopamine D<sub>2</sub> Agonist) on Frog Monocular Optokinetic Nystagmus Asymmetry, **Vision Res.**, **35(19)**, 2665-73 (1995).
193. S. Sarati, G. Guiso, S. Garattini, S. Caccia, Kinetics of Piribedil and Effects on Dopamine Metabolism. Hepatic Biotransformation is not a Determinant of its Dopaminergic Action in Rats, **Psychopharmacology**, **105**, 541-545 (1991).
194. S. Caccia, M.H. Fong. G. Guiso, Disposition of the Psychotropic Drugs Buspirone, MJ-13805 and Piribedil, and of Their Common Active Metabolite 1-(2-Pyrimidinyl)-Piperazine in the Rat, **Xenobiotica**, **15(10)**, 835-844 (1985).
195. Rasyonel İlaç Rehberi 94, Editör S. Eralp Bellibaş, Egem Tıbbi Yayıncılık, İzmir, s.896, 1994.
196. G.M.El-Sayed, Y. El-Said, M.M. Meshali, J.B. Schwartz, Kinetics of Theophylline Release from Different Tablet Matrices, **S.T.P. Pharma Sci.**, **6(6)**, 390-397 (1996).
197. G. El-Sayed, Y. El-Said, M. Meshali, J.B. Schwartz, Comparative Bioavailability of Theophylline from Tablets with Different Sustained Release Kinetics, **S.T.P. Pharma Sci.**, **6(6)**, 398-402 (1996).

198. 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).
199. J.Caporal-Gautier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Cuilloteau, M. Histe, M. Lallier, J.J. N'Guyen-Huu, R. Russotto, **S.T.P. Pharma Prat.**, **2**, 202-226 (1992).
200. U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP XXII/NF XVII, Mack Printing Company, Easton, pp. 1784-1785, 1990.
201. U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP XXII/NF XVII, Mack Printing Company, Easton, pp. 1578-1579, 1990.
202. I.Ağabeyoğlu, Sürekli Etki Çözünme Kinetiğine Yeni Bir Denklem ve Kinetik Hesapları için Bir Bilgisayar Programı, Tebliğ, Ulusal Eczacılık Kongresi, İstanbul, Ekim 1981.
203. I. Şahin, M. Tuncer, M. İlhan, Dopamine Receptor Agonists, N,N-dipropyl-2-aminotetralin (TL-68) and 2-di-n-propylamino-4,7-dimethoxyindane (RDS-127) Antagonize Oxotremorine-Induced Tremors by Antimuscarinic Action in Mice, **Arch. Int. de Physi. Biochimie** **98**, 7-9 (1990).
204. K. Sümülüoğlu, Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik, Çağ Matbaası, Ankara 121-122, 1978.
205. S.C. Mehta, Issues and Approaches for Improving the Solubility and Bioavailability of Poorly Water Soluble Compounds, **Bull. Tech. Gattefossé**, **91**, 65-71 (1998).
206. Eds. L. Öner, M. Şumnu, A.A. Hıncal, Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlilik Genel İlkeler, A. Yeşilada, "Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlilik Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemler ve Bu Yöntemlerin Validasyonu", Ankara, 171-183 1995.
207. 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).
208. Gattefosse, Specifications Sheet Compritol® 888 ATO, 1996.
209. F.M. Veronese, F. Marsilia, P. Caliceti, P. De 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)
210. M.D. Abd El-Hameed, I.W. Kellaway, Preparation and In Vitro Characterisation of Mucoadhesive Polymeric Microspheres as Intra-Nasal Delivery Systems, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, **44**, 53-60 (1997).
211. P.Bulut, F.Dinçol, Oksolamin Sitrat ile Tablet Yardımcı Maddeleri Arasındaki Geçimsizliğin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi ile Araştırılması, **FABAD Farm. Bil. Der.**, **16**, 209-214 (1991).

212. A.G.A. Coombes, Ming-Kung Yeh, E.C. Lavelle, S.S. Davis, The Control of Protein Release from Poly (DL-Lactide co-Glycolide) Microparticles by Variation of the External Aqueous Phase Surfactant in the Water-in Oil-in Water Method, **J. Control. Rel.**, **52**, 311-320 (1998).
213. H. Takahata, E.C., Lavelle, A.G.A. Coombes, S.S. Davis, The Distribution of Protein Associated with Poly (DL-Lactide co-Glycolide) Microparticles and its Degradation in Simulated Body Fluids, **J. Control. Rel.**, **50**, 237-246 (1998).
214. M. Bogusz, M. Erkens, Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Database of Retention Indices and UV Spectra of Toxicologically Relevant Substances and its Interlaboratory Use, **J. Chromatog. A**, **674**, 97-126 (1994).
215. C. Sakakura, T. Takahashi, A. Hagiwara, M. Itoh, T. Sasabe, M. Lee, S. Shobayashi, Controlled Release of Cisplatin from Lactic Acid Oligomer Microspheres Incorporating Cisplatin: In Vitro Studies, **J. Control. Rel.**, **22**, 69-74 (1992).
216. W.N. Charman, Lipids and Oral Bioavailability: Are There Yet-to-be Realised Opportunities?, **Bull. Tech. Gattefossé**, **91**, 55-63 (1998).