İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ŞEKİL VE BÜYÜKLÜKTEKİ KOKRİSTALLERİN MORÖTESİ-GÖRÜNÜR BÖLGE (UV/VİS) SPEKTROSKOPİSİ İLE ÇÖZÜNME KONSANTRASYONUNUN ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sinem ELMAS

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

TEMMUZ 2020

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ŞEKİL VE BÜYÜKLÜKTEKİ KOKRİSTALLERİN MORÖTESİ-GÖRÜNÜR BÖLGE (UV/VİS) SPEKTROSKOPİSİ İLE ÇÖZÜNME KONSANTRASYONUNUN ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sinem ELMAS
(506171037)

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatma Elif GENCELİ GÜNER

TEMMUZ 2020

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506171037 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Sinem ELMAS, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "FARKLI ŞEKİL VE BÜYÜKLÜKTEKİ KOKRİSTALLERİN MORÖTESİ-GÖRÜNÜR BÖLGE (UV/VİS) SPEKTROSKOPİSİ İLE ÇÖZÜNME KONSANTRASYONUNUN ANALİZİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı :	**Doç. Dr. Fatma Elif GENCELİ GÜNER** İstanbul Teknik Üniversitesi	.....
Jüri Üyeleri :	**Prof. Dr. Hanzade AÇMA** İstanbul Teknik Üniversitesi	.....
	Doç. Dr. Didem SALOĞLU DERTLİ Yalova Üniversitesi	.....

Teslim Tarihi : 02 Haziran 2020
Savunma Tarihi : 16 Temmuz 2020

Anneme,

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında katkıda bulunan ve destek olan herkese teşekkürlerimi sunarım.

Tez danışmanım olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Fatma Elif GENCELİ GÜNER'e benimle paylaştığı bilgi ve deneyimlerinin yanı sıra gösterdiği ilgi ve aldığım kararlarda beni destekleyip cesaretlendirdiği için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Erasmus programında beni araştırma grubuna kabul eden Sayın Miroslav ŠOÓŠ ve laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Sayın Jan JİRÁT'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında destekleri ile yanımda olan arkadaşlarım Araş. Gör. Deniz Sena YALÇIN, Araş. Gör. Neslihan TURHAN, Sedef CANSIZ ve adlarını yazamadığım her zaman beni destekleyen olan tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Lise eğitimimden bu yana her konuda yanımda olan, bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Hakan SARITAŞ'a çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca aldığım her kararda beni destekleyen, eğitim ve öğrenim hayatım için ellerinden gelen tüm imkanları sunan, her zaman varlıklarını yanımda hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2020

Sinem Elmas
(Kimya Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xi**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xiii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **xvii**
SUMMARY ..... **xix**
1. GİRİŞ **1**
2. AKTİF FARMASÖTİK BİLEŞENLER **3**
3. KOKRİSTALLER VE ÖZELLİKLERİ **7**
3.1 Kokristal Nedir? 7
3.1.1 Kokristal dizaynı 7
3.1.2 Kokristal sentez yöntemleri 8
3.1.3 Kokristallerin karakterizasyon teknikleri 10
3.2 Kokristallerde Çözünme Analizi 11
3.2.1 Kokristallerin çözünme analizinde kullanılan metodlar 12
3.2.1.1 Kalibrasyon Eğrisi 12
3.2.2 Kokristallerin çözünmesine etki eden faktörler 13
3.2.2.1 Kokristallerin şekil ve büyüklüklerinin çözünmeye etkisi 13
3.2.2.2 Öğütme işleminin çözünmeye etkisi 16
3.2.2.3 pH derecesinin ve yüzey aktif maddelerin çözünmeye etkisi 17
4. DENEYSEL ÇALIŞMA **19**
4.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar 19
4.2 Kullanılan Kokristaller ve Özellikleri 19
4.3 Çözeltilerin Hazırlanması 24
4.3.1 Tween 80 çözeltisinin hazırlanması 24
4.3.2 Asidik çözeltinin hazırlanması 24
4.4 Tartım ve numune toplanması 24
4.5 UV/Vis Spektroskopisi 25
4.6 Öğütme İşlemi 25
4.7 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması 25
5. KARAKTERİZASYON SONUÇLARI VE TARTIŞMA **29**
5.1 Kokristallerin UV/Vis Spektrumları 29
5.2 Kalibrasyon Eğrisi 36
5.3 Kokristallerin Çözünme Konsantrasyonun Değerlendirilmesi 38
5.3.1 Kokristalin şeklinin çözünme konsantrasyonuna etkisi 38
5.3.2 Kokristalin büyüklüğünün çözünme konsantrasyonuna etkisi 40
5.3.3 Öğütme işleminin kokristalin çözünme konsantrasyonuna etkisi 42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER **45**
KAYNAKLAR **47**
ÖZGEÇMİŞ **51**

KISALTMALAR

AFB **:** Aktif Farmasötik Bileşen
ASA **:** Asetilsalisilik Asit
BA **:** Benzoik Asit
BSS **:** Biyofarmasötik Sınıflandırma
CAF **:** Kafein
HCl **:** Hidroklorik Asit
HPC **:** Hidroksipropil Selüloz
KMK **:** Kritik Misel Konsantrasyonu
NA **:** Nikotinamid
PEG **:** Polietilen Glikol
PVP **:** Polivinil Prolidon
TBAB **:** Tetra-n-bütil Amonyum Bromid
TEM **:** Taramalı Elektron Mikroskopisi
UV/Vis **:** Morötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 4.1 : Kullanılan kokristal örneklerinin özellikleri ve kodları **20**
Çizelge 4.2 : Kokristal örneklerinin sentezi sırasında değişen parametreler. **21**
Çizelge 4.3 : Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için kullanılan çözeltilerin konsantrasyonları ve gerekli kokristal miktarı. **26**
Çizelge 5.1 : AFB'nin konsantrasyonu bilinen kokristal çözeltilerinden ölçülen absorbans değerleri. **37**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Sedef hastalığının deri üzerinde ki görünümü [2]. **.....1**
Şekil 2.1 : AFB'lerin çeşitli katı formları. A) amorf; B) polimorf; C) kokristal; D) tuz; E) hidrat; F) solvat. **..... 4**
Şekil 3.1 : Farmasötik bir kokristalin dizayn aşamaları. **..... 7**
Şekil 3.2 : Üçlü faz diyagramı [8]. **..... 9**
Şekil 3.3 : A) Dört bıçaklı karıştırıcı. B) Çapa tipi karıştırıcı. C) Pervane şeklinde karıştırıcı. D) Manyetik karıştırıcı. **..... 15**
Şekil 4.1 : A) AFB-BA-01 (25-200 µm), B) AFB-BA-03 (25-200 µm) kokristallerine ait TEM görüntüleri. Yakınlaştırma oranları a) 3240x b) 1290x. **..... 22**
Şekil 4.2 : A) AFB-BA-02 (<25 µm), B) AFB-BA-04 (<25 µm) kokristallerine ait TEM görüntüleri. Yakınlaştırma oranı 212x. **..... 22**
Şekil 4.3 : A) AFB-BA-03 (25-200 µm), yakınlaştırma oranı 514x, B) AFB-BA-05-1 (100-200 µm), yakınlaştırma oranı 500x kokristal örneklerine ait TEM görüntüleri**. .. 23**
Şekil 4.4 : A) AFB-BA-06 (50-100 µm), kokristal örneğine ait TEM görüntüleri. A) Yakınlaştırma oranı 212x. B) Yakınlaştırma oranı 1640x. **..... 23**
Şekil 4.5 : Agilent Cary 60 UV/Vis spektrofotometresi. **..... 25**
Şekil 4.6 : Deneyin şematik gösterimi. **..... 27**
Şekil 5.1 : AFB ve benzoik asidin UV/Vis spektrumları. **..... 29**
Şekil 5.2 : AFB-BA-01 (25-200 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu. **..... 30**
Şekil 5.3 : AFB-BA-02 (<25 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu. **..... 30**
Şekil 5.4 : AFB-BA-01-1 (50-100 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **.. 31**
Şekil 5.5 : AFB-BA-01-2 (25-50 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **.... 31**
Şekil 5.6 : AFB-BA-03 (25-200 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu. **..... 32**
Şekil 5.7 : AFB-BA-04 (<25 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu. **..... 32**
Şekil 5.8 : AFB-BA-03-1 (100-200 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **33**
Şekil 5.9 : AFB-BA-03-2 (50-100 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **33**
Şekil 5.10 : AFB-BA-05-1 (100-200 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **34**
Şekil 5.11 : AFB-BA-05-2 (50-100 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **34**
Şekil 5.12 : AFB-BA-05-3 (25-50 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **.. 34**
Şekil 5.13 : AFB-BA-06 (50-200 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu. **..... 35**
Şekil 5.14 : AFB-BA-06-1 (100-200 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **35**
Şekil 5.15 : AFB-BA-06-2 (50-100 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu. **36**
Şekil 5.16 : Konsantrasyonu bilinen kokristal çözeltilerine ait UV/Vis spektrumu. **. 36**
Şekil 5.17 : Kalibrasyon eğrisi **..... 37**
Şekil 5.18 : 50-100 µm kristal büyüklüğünde olan AFB-BA-01-1, AFB-BA-03-2, AFB-BA-05-2, AFB-BA 06-2 kokristal örneklerine ait çözünme konsantrasyonları. **..... 38**
Şekil 5.19 : AFB-BA-01 (25-200µm), AFB-BA-03 (25-200µm), AFB-BA-03-1 (100-200µm), AFB-BA-03-2(50-100 µm) kokristal örneklerine ait çözünme konsantrasyonları. **39**
Şekil 5.20 : AFB-BA-01 (25-200 µm), AFB-BA-01-1 (50-100µm), AFB-BA-01-2 (25-50µm) ve AFB-BA-02 (<25 µm) kokristallerine ait çözünme konsantrasyonu. **..... 40**

Şekil 5.21 : AFB-BA-03 (25-200 µm), AFB-BA-03-1 (100-200µm), AFB-BA-03-2 (50-100 µm) ve AFB-BA-04 (<25 µm) kokristallerine ait çözünme konsantrasyonu. **..... 41**
Şekil 5.22 : AFB-BA-06 (50-200 µm), AFB-BA-06-1 (100-200 µm) ve AFB-BA-06-2 (50-100 µm) ve kokristallerine ait çözünme konsantrasyonu. **..... 42**
Şekil 5.23 : AFB-BA-03-1 (100-200 µm), AFB-BA-03-2 (50-100 µm), AFB-BA-05-1 (100-200 µm), AFB-BA-05-2 (50-100 µm) ve AFB-BA-05 (25-50 µm) kokristallerine ait çözünme konsantrasyonu**. 43**

FARKLI ŞEKİL VE BÜYÜKLÜKTEKİ KOKRİSTALLERİN MORÖTESİ-GÖRÜNÜR BÖLGE (UV/VİS) SPEKTROSKOPİSİ İLE ÇÖZÜNME KONSANTRASYONUNUN ANALİZİ

ÖZET

Sedef hastalığı Dünya nüfusunun yaklaşık olarak %2'sinde görülen bulaşıcı olmayan bir hastalıktır. En yaygın nedeni genetik faktörler olan bu hastalık çevresel ve psikolojik olaylar ile tetiklenmektedir. Hastalık kısa süreli görülebileceği gibi ömür boyunca da devam edebilmektedir. Hastalık genellikle topikal tedavilerle (krem, merhem) kontrol edilmeye çalışılsa da yetersiz kalınan durumlarda sistemik tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır.

Hastalığın tedavisinde kullanılan aktif farmasötik bileşen (AFB), düşük çözünürlüğe sahip olan immün sistemin yanıt düzenlemesinde yer alan hücreler için bir inhibitördür. Su içindeki çözünürlüğü düşük olan AFB'lerin çözünürlüğünü artırmak için birçok yaklaşım mevcuttur. Partikül boyutunu küçültme, tuz oluşumu, hidrat ve solvat oluşumu, kokristaller bu yaklaşımlardan bir kaçıdır. Bu yöntemlerden biri olan kokristalizasyon yöntemi ile bileşenlerinden biri AFB olan homojen kristal malzemeler oluşturulabilmektedir. Kokristalizasyon ile aktif maddenin sadece çözünürlüğünü değil, çözünme profili, stabilite, biyoyararlanım gibi önemli fizikokimyasal özelliklerini de geliştirmek mümkündür.

Kokristallerde çözünme analizinin yapılması biyoyarlanım performansının tahmini ve ileriki analiz aşamaları iyi bir ön çalışma olduğu için önemlidir. Nihai katı dozaj formunda yardımcı maddelerin kullanılması aktif maddenin dozajında sınırlayıcı olabilmektedir. Kokristallerin büyüklük, şekil gibi fiziksel özellikleri bu gibi durumlarda oldukça önemli olmaktadır ve ürün geliştirme sırasında kokristallerin çözünme performansının değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Büyümekte olan kokristalin şekline ve büyüklüğüne kokristalizasyon sırasında kullanılan karıştırıcının tipi, karıştırma hızı, kullanılan çözücü ve katkılar, soğutma hızı vb. faktörler etki etmektedir. Farklı şekil ve büyüklükteki kokristallerin çözünmesi de farklı olmaktadır. Kristallerin özellikleri dışında çözücü ortamı da kokristallerin çözünme profilini etkilemektedir. Ortam sıcaklığı, çözücünün pH derecesi, çözünmeyi artırmak için katkı maddelerinin kullanılması vb. durumlardan çözünme profili etkilenmektedir.

Bu çalışmada farklı şekil ve büyüklüklere sahip olan kokristaller için çözünme çalışması yapılmıştır. Kullanılan kokristal sedef hastalığının tedavisinden kullanılan bir AFB ve benzoik asit (BA) koformerden oluşmaktadır. AFB/BA molar olarak 2/1'dir. Mide sıvısı ortamına benzer çözücü koşulu yaratılması hedeflenerek asidik pH derecesinde bir çözücü ortamı hazırlanmış ve her deneme için aynı ortam şartları altında çözünme çalışması yapılmıştır.

Öğütme işlemi ilaç endüstrisinde partikül boyutunu küçültmek ya da istenilen boyutta partikül elde etmek için sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Kokristal örneklerinden birine öğütme işlemi yapılarak, öğütme sonucu çözünme konsantrasyonunun nasıl

değiştiği incelenmiştir. Kokristalin çözünme konsantrasyonu öğütme işlemi öncesi ve sonrası için aynı kristal büyüklüklerinde karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

5., 10., 20., 30., 45., 60. ve 120. dakikalarda çözeltiden alınan örneklerin morötesi-görünür bölge (UV/Vis) spektroskopisi ile 190-500 nanometre (nm) dalga boyu aralığında absorbans değerleri ölçülmüştür. Aktif bileşen 290-390 nm, benzoik asit ise 200-280 nm dalga boyu aralığında absorblanmaktadır.

Aktif bileşenin çözünmenin herhangi bir anındaki konsantrasyonunu hesaplamak için bir kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi, bir maddenin bir çözelti içindeki bilinmeyen konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bilinen konsantrasyonlarda kokristal çözeltileri hazırlanarak absorbans değerleri ölçülmüştür ve bu değerlere karşılık bir eğri çizilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin korelasyon kat sayısı (r^2) = 0,9999 olarak bulunmuştur.

Kokristallerin büyüklüğünün küçülmesi ile çözünme konsantrasyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Kristal büyüklüğü dağılımının geniş olduğu (25-200 µm) örneklerde kristal büyüklüğü dağılımının 100-200 µm, 50-100 µm ve 25-50 µm aralıklarında sınırlandırılması çözünmeyi artırmıştır. Aynı kristal büyüklüğü aralığında olan kokristal örneklerinin çözünmeleri karşılaştırıldığında ise öğütme işlemi yapılan kokristal örneğinin çözünme konsantrasyonunun en fazla olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kokristal yüzeyinin pürüzsüz ve az çıkıntılı olması durumunda çözünme konsantrasyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Yüzeyinde fazla çıkıntıları olan küme şeklindeki kokristal örneğinin çözünme konsantrasyonu tüm kristal büyüklükleri aralıklarında pürüzsüz yüzeyi olan bipiramit şeklindeki kokristalin çözünme konsantrasyonundan daha az olmuştur.

Biyoyararlanım çalışmalarının, bu çalışma sonuçlarını desteklemesi durumunda kokristallerden çözünme konsantrasyonu fazla olan kokristal formunun ilaç formülasyonunda kullanılması ve aktif maddenin dozajının azaltarak tedaviye devam edilmesi vaat edilmektedir.

ANALYSIS OF THE DISSOLUTION CONCENTRATION OF DIFFERENT SHAPE AND SIZE COCRYSTALS WITH ULTRAVIOLET-VISIBLE (UV/VIS) SPECTROSCOPY

SUMMARY

Psoriasis is an itchy skin disease where white, thick and dry dandruff is observed on a red-pink colored. This disease occurs in about 2% of the world's population. The probability of seeing the disease at any age and gender is equal. In some individuals, the disease duration may take several months, or it may reoccur at different times throughout life. The most common reason for psoriasis is genetic factors. Besides the genetic factors, it can cause disease to be triggered in environmental and psychological events. Some studies have observed that 30% of individuals diagnosed with psoriasis have become a type of psoriatic arthritis. In this type of psoriasis, severe pain and swelling are observed in the joints. Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis depends mostly on the current state of the disease. Mild disease is treated with topical therapies. Further, with the increasing severity of the disease, topical therapies might be combined with phototherapy. Systemic treatments are used in the long-term treatment of the disease.

The active pharmaceutical ingredient (API) used in the treatment of the disease is an inhibitor for cells involved in the response regulation of the immune system. APIs are generally used in formulation in crystal form, where they are thermodynamically the most stable form.

APIs have very low solubility and there are many approaches to increase solubility. There are many approaches to increase solubility. Micronization (particle size reduction), salt formation, emulsification, use of co-solvents are some of these approaches. In recent years, cocrystals have emerged as a possible solution to poor solubility.

Cocrystals are structurally homogeneous crystal materials containing two or more components found in certain stoichiometric ratios. The components in the cocrystal interact with non-covalent bonds (Van der Waals, hydrogen bond, etc.). These interactions result in crystal structure with improved chemical and physical properties (e.g. solubility, melting point, mechanical properties, stability, hydration) compared to individual solid components.

It is very important whether cocrystals have targeted properties, characterizing its physical and chemical properties, choosing the thermodynamically most durable form of the active ingredient, controlling the crystal shape, size and distribution. In this way, a possible problem that may affect production in the early stages of drug development can be prevented. While the basic physicochemical properties of cocrystals are analyzed by powder X-ray diffraction, single-crystal X-ray diffraction, infrared spectroscopy, raman spectroscopy, differential scanning calorimetry, high-performance liquid chromatography, and ultraviolet-visible (UV/Vis) spectroscopy, surface properties, and crystal sizes can be analyzed by scanning electron microscope.

Dissolution behavior is an important characterization stage for evaluating the crystal, understanding the dissolution mechanism and predicting the bioavailability of the drug. It is mentioned in the literature that the data obtained in dissolution studies are a good indicator of the drugs in vivo performance.

The dissolution of cocrystals of different shapes and sizes is also different. Apart from the properties of the crystals, the solvent environment also affects the dissolution profile of the cocrystals. Dissolution is affected by situations like ambient temperature, pH of solvent, use of surfactant to increase dissolution, etc. The shape and size of the growing cocrystal changes with the stirrer, solvent, and additives used during crystallization.

In this study, dissolution study was carried out for cocrystals of different shapes and sizes. Cocrystal contains an API used in the treatment of psoriasis and a benzoic acid (BA) coformer. An acidic solvent environment similar to the pH level of the gastric fluid was prepared. For each experiment 500 ml, acidic solution and 7,5 mg cocrystals were used. It was stirred at a temperature of 37 °C at 300 rpm in a magnetic stirrer. Dissolution study was carried out under the same ambient conditions for each experiment. Every 5, 10, 20, 30, 45, 60 and 120 minutes 2 ml of samples were collected from the solution with a pipette. Samples were measured with ultraviolet-visible (UV/Vis) spectroscopy in the 190-500 nanometer (nm) wavelength. The API absorbs in the wavelength range of 290-390 nm and benzoic acid absorbs in the range of 200-280 nm.

A calibration curve was prepared to determine the concentration of the active ingredient at the moment of dissolution using the absorbance value. In the calibration curve method, firstly standard solutions of the substance are prepared at known concentrations. Maximum cocrystal concentration value is taken as 0.0152 mg/ml and 8 solutions with different concentrations in decreasing value were prepared with a cocrystal. To ensure that the cocrystals dissolve completely, the mouth of the glass beakers were closed with parafilm and stirred on a magnetic stirrer at 37 °C for 24 hours at 300 rpm. Then absorbance value of API obtained for each solution. A curve was drawn using known concentration values and absorbance values obtained from UV / Vis measurements. Correlation coefficient (r^2) of the curve was found as 0,9999. The maximum absorbance value and dissolution concentration of the active ingredient absorbed at the wavelength of 290-390 nm was calculated using the calibration curve.

Milling is a frequently used method in the pharmaceutical industry to reduce the particle size or to obtain the desired size particle. Milling was done to one of the cocrystal samples and how the dissolution concentration changed evaluated.

It has been observed that the concentration of dissolution increases with the reduction of the size of the cocrystals. In samples with large crystal size distribution, the particle size distribution limited between the sizes 100-200 µm, 50-100 µm and 25-50 µm. It was observed that the concentration of dissolution increased by limiting the cocrystal size distribution.

Milled cocrystal sample dissolution concentration in the crystal size range of 25-50 µm has reached the 0,0187 mg/ml which was the highest dissolution concentration among all cocrystal samples after 120 minutes. This concentration value is higher than the dissolution concentration of bipyramid and clump shaped cocrystals that containing particles smaller than 25 µm. It shows that milling process not only reduces the particle size but also increases the surface area.

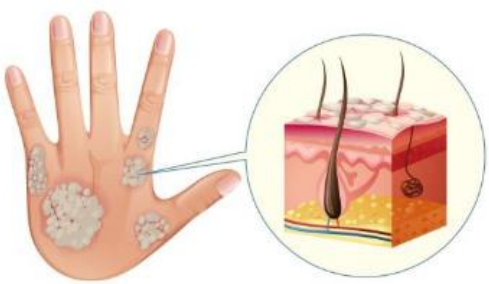
When the dissolution of the cocrystal samples in the same crystal size distribution range (50-100 µm) was compared it was observed that the dissolution concentration of the that applied on milling was the highest. This is an expected result due to the increased surface area.

Also, it has been observed that the dissolution concentration increases if the cocrystal surface is smooth and less protruding. Dissolution concentration of clump shaped cocrystal with excess protrusions on the surface, was lower than bipyramid shaped cocrystal in all particle size range.

If in vivo studies support the results of this study, it is promised to use the form with high dissolution concentration from the cocrystals in the drug formulation and continue the treatment by reducing the dosage of the API.

1. GİRİŞ

Sedef Hastalığı (psoriasis), kaşıntılı, hafif kabarık, kırmızı-pembe renkli bir zemin üzerinde beyaz, kalın ve kuru kepeklerin gözlendiği bir deri hastalığıdır. Sağlıklı bir bireyde deri hücreleri yaklaşık 30 günde olgunlaşırken sedef hastalığı olan bireylerde bu süre 4 güne kadar düşebilmektedir. Hızla çoğalan deri hücreleri, deri üzerinde birikerek üzeri beyaz kuru kepeklerle kaplı döküntüler oluşturmaktadır. Bulaşıcı olmayan bu hastalık Dünya nüfusunun yaklaşık olarak %2'sinde görülmektedir ve hastalığın, bireylerde her yaşta ve cinsiyette görülebilme ihtimali eşittir. Bazı bireylerde hastalık süresi birkaç ay ya da birkaç yıl sürerken, bazı bireylerde ömür boyunca sürebilmekte ve farklı zamanlarda tekrarlayabilmektedir [1,2].



Şekil 1.1 : Sedef hastalığının deri üzerinde ki görünümü [2].

Sedef hastalığı için kabul edilen en yaygın neden genetik faktörlerdir. Aile geçmişinde sedef hastalığı bulunan kişilerde sedef hastalığının görülme oranının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Genetik faktörlerin dışında çevresel ve psikolojik olaylarda hastalığın tetiklenmesine neden olmaktadır [2].

Hastalığın mevcut durumuna bağlı olarak tedavi şekli değişiklik gösterebilmektedir.

Topikal (yerel) tedaviler ile hafif seviyedeki sedef hastalığı türlerinin tedavisi gerçekleştirilmektedir. Bu tedavi yöntemi ile krem, merhem ve losyon gibi ilaçlar doğrudan deriye uygulanmaktadır [1,2].

Hastalığın şiddetinin artmasıyla topikal tedaviler fototerapi ile birleştirilmektedir. Fototerapi ile tedavi yöntemi, ultraviyole ışığın değişik formlarının kullanılmasıyla uygulanan bir tedavi yöntemidir. [1,2].

Sistemik tedaviler, fototerapi yönteminin yeterli olmaması durumunda ağız yoluyla alınan ilaçlarla uygulanan tedavi yöntemidir [1].

Sedef hastalığı çoğunlukla topikal tedavilerle kontrol edilmeye çalışılsa da yetersiz kalınan durumlarda sistemik tedaviye geçilmektedir. Uzun süreli sistemik tedavinin gerektiği durumlarda tedavi sırasında anti-romatizmal ilaçlar gibi ek ilaçlarında kullanılması mümkündür. Uzun süre gerektiren sistemik tedaviler için yeni bileşenlerin geliştirilmesine ve halihazırda kullanılan bileşenlerin iyileştirilmesine ihtiyacı doğmaktadır [3,4].

Sedef hastalığının tedavisinde kullanılan aktif farmasötik bileşen (AFB) immün sistemin yanıt düzenlemesinde yer alan hücreler için küçük moleküllü inhibitörlerdir. Tedavi için yeni AFB'ler keşfedilmeye devam edildiği gibi, halihazırda kullanılan AFB'lerin de özellikleri geliştirilmeye çalıştırılmaktadır [3,4].

Bu tez çalışmasında sedef hastalığının tedavisinde kullanılan aktif bileşenin farklı formlardaki kokristalleri için çözünme konsantrasyonu analiz edilerek, şekil ve kristal büyüklüğü farklılığının çözünmeye nasıl etki ettiği ve etken maddenin biyoyararlanım performansının tahmini için bir ön çalışma yapılması hedeflenmektedir.

2. AKTİF FARMASÖTİK BİLEŞENLER

Aktif farmasötik bileşen (AFB) bir ilacın (örneğin; tablet, kapsül) biyolojik olarak aktif bileşenini belirtmek için kullanılan terimdir. Bu bileşenler hastalığın teşhisinde, iyileştirilmesinde, hafifletilmesinde, tedavisinde veya önlenmesinde doğrudan rol oynamaktadır [5,6].

İlaçlar genellikle birkaç bileşenden oluşur, bu durumda AFB birincil bileşendir. Diğer bileşenler genellikle "yardımcı maddeler" olarak bilinmektedir ve bu maddelerin her zaman biyolojik olarak güvenilir olmaları gerekmektedir [6].

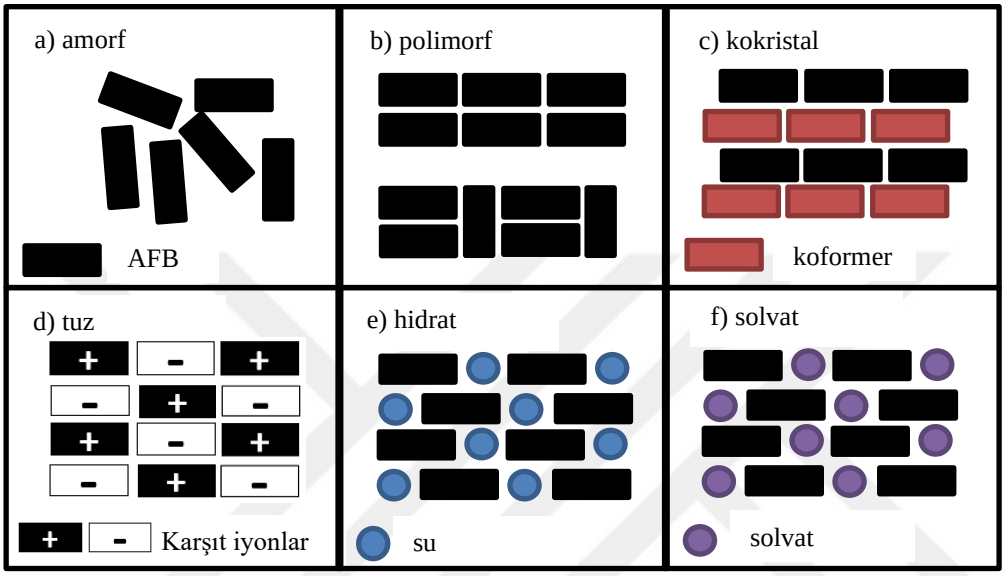
AFB bir formülasyonda genellikle termodinamik olarak en kararlı form olduğu için kristal formda kullanılmaktadır. AFB üzerinde birçok fonksiyonel grup bulunmaktadır. Bu fonksiyonel gruplar ile oluşabilecek bağlar kristal formun değişmesine neden olabilmektedir. Kristal formun değişmesi aktif bileşenlerin fiziksel özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Bu da ilacın işlenebilirliğini, stabilitesini, çözünürlüğünü ve biyoyararlanım performansını da etkilemektedir [6,7].

Kristalizasyon yöntemi ile AFB en kararlı form olan kristal formuna dönüştürülebilmektedir. Böylece aktif bileşenin kristal yapısı, partikül boyutu, partikül şekli ve fiziksel stabilite gibi birçok özelliğini geliştirebilmektedir. Bu özellikler ürünün kalitesini, ilaç formülasyonu ve üretimi için önemli olan filtrasyon, kurutma ve çözünme gibi üretim sürecindeki işlemlerin verimliliğini de etkilemektedir. Bu nedenle, ilaç endüstrisinde ilaç geliştirmede verimli iş akışı için kristalizasyon süreçlerinin anlaşılması, tasarlanması ve işletilmesi esas olmalıdır [8].

Farmasötik bileşenler katı formlarına göre Şekil 2.1'de ki gibi kategorilere ayrılmaktadır. Her katı form, farklı çözünürlük, çözünme hızı, biyoyararlanım performansı, stabilite gibi özelliklere sahiptir [8].

Şekil 2.1.A AFB moleküllerinin rastgele dizildiği amorf forma aittir. Bu formda moleküller fiziksel ve kimyasal açıdan daha az dayanıklıdırlar ve daha dayanıklı formlara dönüşme eğilimindedirler. Tablet şeklindeki bir katı ilaç içinde bulunan amorf formda aktif veya yardımcı maddenin zaman içinde tekrar kristallenmesi

tabletin sertlik, dağılma ve çözünme özelliklerini etkilemektedir. Özellikle suda çözünürlüğü çok düşük aktif maddeler için faz dönüşümleri, çözünürlükte değişikliğe yol açması nedeniyle çözünme, biyoyararlanım, ürünün stabilitesi ve görünüşü etkilenebilmektedir. Şekil 2.1.B ise aynı kimyasal yapıda ancak farklı iç kristal örgüsüne sahip olan polimorf forma aittir. Bu formda moleküller daha dayanıklı olmaktadırlar [9].



Şekil 2.1 : AFB'lerin çeşitli katı formları. A) amorf; B) polimorf; C) kokristal; D) tuz; E) hidrat; F) solvat.

Şekil 2.1.C katı formda olan bir aktif farmasötik bileşen ve koformer (kokristal yapıcı) maddeden oluşan katı formu göstermektedir. Kokristaller, belirli stokiyometrik oranlarda bulunan iki veya daha fazla bileşen içeren yapısal olarak homojen kristal malzemelerdir [9].

Şekil 2.1.D AFB'lerin tuz formuna aittir. Tuz oluşumu çözünürlüğü artırmak için etkili bir yöntem olmasına rağmen AFB'in kimyasal yapısında iyonize olabilen fonksiyonel grup içerip içermediğine bağlıdır. İyonize olabilen moleküllerin tuzu hazırlansa da sulu ortamda formun stabil kalması sağlanamamaktadır [9].

Kristal örgü içine ilave edilen çözücü ile oluşan bağlar sonucunda solvat formu elde edilmektedir (Şekil 2.1.F). Solvasyon için farmasötik olarak kabul edilen çözücü sayısı azdır, faz dönüşümleri mümkündür ve amorf moleküllerin oluşumuna öncülük etmektedir. Kristal örgü içine ilave edilen çözücü su ise, örgü içinde hidrojen bağları oluşmakta ve hidrat yapısı oluşmaktadır (Şekil 2.1.E). Yapı içindeki bu hidrojen

bağları kristalin yapışmasına ve bunun sonucunda molekülün anhidrat şekle göre daha yavaş çözünme hızı göstermesine ve emiliminin azalmasına neden olmaktadır [9].

Biyoyayarlanım ağız yoluyla alınan bir ilaçtan vücudun ne kadar yararlandığını gösteren bir ölçüdür. Yani ilaçtaki aktif maddenin emilerek edilerek sistemik dolaşıma geçme hızıdır [10]. AFB'in iyi çözünürlük ve çözünme özelliklerine sahip olması daha iyi biyoyararlanım performansına sahip formülasyonları elde etmeye olanak sağlamaktadır [9].

Genellikle yeni keşfedilen AFB'ler lipofilik olmakta ya da su içindeki çözünürlüğü çok zayıf olmaktadır. İlaç endüstrisi için önemli bir konu olan çözünürlüğü artırmak için çalışmalar önem kazanmaktadır. Çözünürlüğü etkileyen faktörler üretim sırasında kullanılan hammadde, AFB'lerin tanecik boyutu, kristal şekli vb. şeklinde sıralanmaktadır [8,10].

Son yıllarda kokristaller suda çözünürlüğü zayıf olan ilaçlar için olası bir çözüm yolu olarak ortaya çıkmıştır. Tuz ve hidrat oluşumu durumlarında görülen olumsuzlukları ortadan kaldırdığı için kokristaller tercih edilmektedir. Kokristaller aktif farmasötik bileşenlerin sadece suda çözünürlüğünü arttırmak için kullanılmaz, aynı zamanda kristal yapının, fiziksel veya kimyasal stabilitenin, biyoyararlanım gibi önemli fizikokimyasal özellikleri de geliştirmek için kullanılmaktadır [1,9].

3. KOKRİSTALLER VE ÖZELLİKLERİ

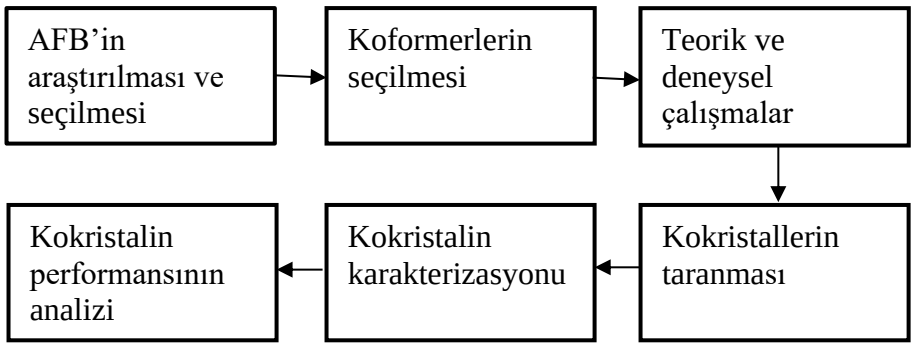
3.1 Kokristal Nedir?

Genel tanımı olarak kokristal, belirli stokiyometrik oranlarda bulunan iki veya daha fazla bileşen içeren yapısal olarak homojen kristal malzemelerdir. Bu tanımına göre farmasötik kokristal, bileşenlerinden biri aktif farmasötik bileşen olan kokristaldir. Diğer bileşen ya da bileşenlere koformerler denir [8]. Bilinen ilk kokristal 1844 yılına dayanmaktadır. Bu kokristal 1:1 oranında kuinon ve hidrokinondan oluşmaktadır [11].

Kokristal içindeki bileşenler kovalent olmayan bağlarla (Van der Waals, hidrojen bağı) etkileşmektedirler. Bu etkileşimler, gelişmiş kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip (örneğin çözünürlük, kararlılık, vb.) kristal yapı ile sonuçlanmaktadır [8].

3.1.1 Kokristal dizaynı

Şekil 3.1 farmasötik bir kokristalin dizayn aşamalarına aittir. İlk aşama, istenen özelliklere sahip kokristalin eldesi için, AFB'in yapısının incelenmesidir. Aktif bileşen ve koformer(ler) arasında moleküler etkileşimin oluşabilmesi için AFB uygun fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. İkinci aşama uygun koformerin seçilmesidir. Bir koformer seçiminde en önemli parametre koformerin farmasötik olarak kabul edilebilir olmasıdır. Aktif bileşen ve koformer seçildikten sonra seçilen bileşenler için teorik ve ampirik çalışmalar araştırılmaktadır [8,12].



Şekil 3.1 : Farmasötik bir kokristalin dizayn aşamaları.

Yapılan araştırmalardan sonra seçilen aktif bileşen ile koformerin kokristal olup olmayacağını belirlemek için küçük ölçekli deneysel çalışmalar yapılmaktadır. Bu

aşamada hedef AFB ile kokristal oluşturmaya uygun koformerler taranmakta ve uygun koformer seçilmektedir [1,13].

Kokristalde hedeflenen özelliklerin kontrolü için karakterizasyon yöntemleri ile kokristalin fiziksel, kimyasal ve kristalografik özellikleri incelenerek yeni oluşan yapının kararlılığı, çözünürlüğü, termal özellikleri vb. analiz edilmektedir [13].

Son aşama ise in vitro ve in vivo testleri içeren, kokristalin performansının analiz edildiği aşamadır. Genellikle in vitro testler kokristalin çözünme performansına odaklanırken, in vivo testleri, kokristalin biyoyararlanım ölçümü, sistemik dolaşıma ulaşan aktif bileşen miktarına odaklanmaktadır [8].

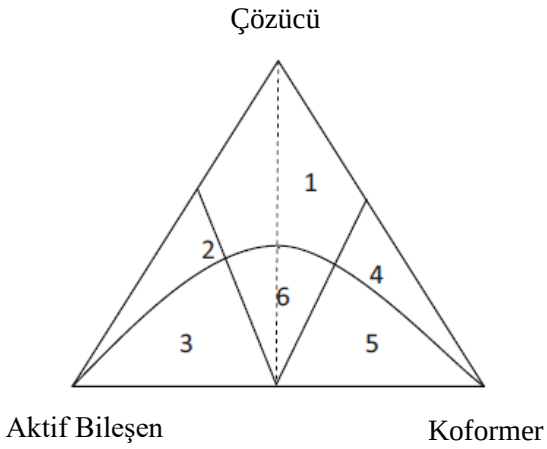
3.1.2 Kokristal sentez yöntemleri

Kokristal sentezlemenin birçok yöntemi mevcuttur. En yaygın yöntemler çözeltiden kristalizasyon ve öğütme yöntemleridir. Bu yöntemlerin dışında daha az kullanılan, aktif bileşenin ve koformerin bir arada eritilerek kristalize edilmesi ya da aktif bileşen ve koformerin bir numune hücresi içerisinde birlikte süblime edilmesi ile de kokristal hazırlanabilmektedir [9,12].

Çözeltiden kristalizasyon yöntemi ile kokristal sentezi herhangi bir kristalizasyon deneyi ile aynı metotta çalışmaktadır. Koformer ve aktif bileşen uygun çözücü ile karıştırılmakta, çözelti hem koformer hem de aktif bileşen tamamen çözülene kadar ısıtılmakta sonrasında ısıtılan çözelti soğutulmaktadır. Çözelti yüksek seviyede doygunluğa ulaştıktan sonra kristalleşme meydana gelmektedir [8].

Bu yöntem de kullanılan çözücünün aktif bileşen ile etkileşimi, kokristal oluşumu yerine fazların ayrı ayrı kristalleşmesi gibi bazı risklere sahiptir. Bazı riskler barındırmasına rağmen bu yöntem ile yeni kokristallerin sentez olasılığının yüksek olduğu görülmüştür ve üretim işlemi için uygun olmasından dolayı tercih edilmektedir. Ayrıca, bir kokristalin varlığını kanıtlamak için en iyi analiz biri olan, X-ray tek kristal difraksiyonu yöntemi için uygun kokristaller sadece çözeltiden kristalizasyon yöntemi ile hazırlanmaktadır [8].

Yukarıda bahsedilen risklerden kaçınmak için kristalizasyon sürecini kontrol etmek üzere üçlü faz diyagramları kullanılmaktadır.



Şekil 3.2 : Üçlü faz diyagramı [8].

Şekil 3.2'de verilen üçlü faz diyagramı kokristal bileşenlerinin çözücü içinde benzer çözünürlüğe sahip olduğu durumu temsil etmektedir. 1 numaralı alan, çözeltiyi; 2 numaralı alan, sıvı faz ile dengede olan katı aktif bileşeni; 3 numaralı alan, dengede olan aktif bileşen ve kokristali, 4 numaralı alan, çözücü ile dengede olan koformeri; 5 numaralı alan, dengede olan koformer ve kokristali; 6 numaralı alan, sıvı faz ile dengede olan katı kokristali temsil etmektedir [8].

Kokristal sentezi için sıklıkla tercih edilen bir diğer yöntem ise öğütme ile kokristalizasyondur. Bu yöntemde kokristal oluşumu koformer ve aktif bileşen içeren sisteme kinetik enerji verilmesiyle gerçekleşmektedir. Enerjiyi sisteme vermek için değirmenler kullanılmaktadır [8].

Öğütme yöntemi ile kokristal oluşumu için iki farklı metot kullanılabilmektedir. İlk metot, kuru öğütme olarak da adlandırılan, belirli stokiyometrik oranlardaki kokristal bileşenlerinin birlikte karıştırılması ve öğütülmesine dayanmaktadır. İkinci metot ise sıvı destekli öğütmedir. Bu metot kristalleşmeye yardımcı olması için bir miktar çözücünün aktif bileşen ve koformer karışımına eklenerek öğütülme işlemi yapılmasına dayanmaktadır [8]. Son çalışmalar sıvı destekli öğütmenin, kuru öğütmeye göre kokristal oluşumunda başarı oranının daha yüksek olduğunu göstermektedir [14]. Az miktarda kullanılan çözücü nedeniyle öğütme metodu yeşil teknoloji olarak kabul edilmektedir ve geleneksel yöntemlerden daha düşük maliyetlidir. Ayrıca çözeltiden kristalizasyon yönteminde ortaya çıkabilecek riskler öğütme yöntemiyle ortadan kaldırılmaktadır. Öğütme yönteminin avantajları da olsa diğer kokristal üretme yöntemleri ile birlikte kullanılması önerilmektedir [8,15].

3.1.3 Kokristallerin karakterizasyon teknikleri

Bir ilaç geliştirmenin aşamalarında bileşenlerin termodinamik olarak en dayanıklı formunun seçilmesi, kristal şeklinin, büyüklüğünün ve dağılımının kontrol altında tutulması çok önem taşımaktadır. Kokristalin hedeflenen özelliklere sahip olup olmadığı, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin karakterizasyonu, katı faz özelliklerinin bilinmesi tekrarlanabilir bir ürün eldesi için önemlidir. Bu sayede ilaç geliştirmenin erken aşamalarında üretimi etkileyecek olası bir sorunun önüne geçilebilmektedir [9].

Kokristallerin temel fizikokimyasal özellikleri toz X-ray difraksiyonu, X-ray tek kristal difraksiyonu, kızılötesi spektroskopisi, raman spektroskopisi, diferansiyel tarama kalorimetresi yöntemleriyle analiz edilirken, yüzey özellikleri ve kristal büyüklükleri taramalı elektron mikroskopu (TEM) ile analiz edilebilmektedir. Çözünürlük ve çözünme profili ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi ya da morötesi-görünür bölge (UV/Vis) spektroskopisi yöntemleriyle analiz edilmektedir [8,9].

Raman spektroskopisi, bir sistemdeki titreşim, dönme ve diğer düşük frekanslı modları ayırt ederek yapısal değişiklikleri gözlemlemeye izin veren spektroskopik bir tekniktir. Analiz için numune hazırlanmasının kolay olmasından dolayı kokristal karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [16].

X-ray tek kristal difraksiyonu, kokristal oluşumunun teyit edilmesinde en kesin sonucu veren analiz yöntemidir. Kristal yapı içindeki atomların, açıların ve bağların konumunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu analiz yönteminin kullanılabilmesi için sadece tek bir kristale ihtiyaç duyulmaktadır. Nitelikli tek bir farmasötik kristalin üretilmesi her zaman mümkün olmamakta ya da kristalin büyümesi uzun zaman almaktadır. Dezavantajlarına rağmen bu analiz yöntemi kokristalin yapısına dair benzersiz bilgiler elde etmeyi mümkün kılmaktadır [12,17].

Toz X-ray difraksiyonu, kristal yapıyı analiz etmek ve kristalinite seviyesini belirlemek için kullanılan analiz yöntemidir. Toz halindeki malzemenin X-ışını kırınımına dayanarak analiz yapılmaktadır. X-ışınları, farklı açılarda ve yoğunluklarda kristal düzlemlerden kırınarak kırınım modeli oluşturur. Bu kırınım modelleri her kristal için yapıya özgün olmaktadır [17].

Diferansiyel tarama kalorimetresi, kokristallerin termal özelliklerinin belirlenmesi için kullanılan en yaygın yöntemdir. Erime noktasının sıcaklığı, faz değişikliği, kristalleşme zamanı ve sıcaklığı gibi önemli geçişlerin gözlemlenebildiği analiz yöntemidir [8].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, hareketli fazın sıvı olduğu, yüksek basınç altında hareketli faz ile sabit faz arasında maddelerin dağılma esasına dayanan bir kromatografi türüdür. İlaçlarda çözünme davranışının analizi için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Genellikle çoklu bileşen içeren formülasyonların analizinde ya da, morötesi-görünür bölge (UV/Vis) spektroskopisinin kullanılamadığı durumlarda tercih edilmektedir [18].

Morötesi-görünür bölge (UV/Vis) spektroskopisi, çözeltideki bir analitin konsantrasyonunu belirlemek ve çözünme davranışının analizi için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Çözeltinin içindeki bileşenlerin, çözeltiye gönderilen ışıktan, belirli dalga boyundaki ışığı absorblaması prensibine dayanmaktadır. UV/Vis spektroskopisi yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemine göre daha basittir, daha hızlı sonuç vermektedir ve daha ucuzdur [18,19].

3.2 Kokristallerde Çözünme Analizi

Kokristalizasyon sonucunda aktif bileşenin çözünürlük, çözünme hızı, biyoyararlanım, stabilite ve sıkıştırılabilirlik vb. fizikokimyasal ve mekanik özelliklerini optimize etmesi beklenmektedir [20].

Katı ilaç içindeki aktif madde Şekil 2.1'de görüldüğü gibi farklı katı formlara sahip olmaktadır. Kristal formunda ki aktif madde için kristallerin fizikokimyasal özellikleri bir ilacın nasıl işlendiği üzerinde önemli bir etkiye sahip olmaktadır. İlacın uzun vadeli stabilitesi ve kimyasal ve fiziksel özellikleri kristal formundan etkilenmektedir [21].

Çözünme analizi kokristalin değerlendirilmesi, çözünme mekanizmasının anlaşılması için, ilacın biyoyararlanım tahmini için önemli bir karakterizasyon aşamasıdır. Literatürde çözünme çalışmalarında elde edilen verilerin ilacın biyoyararlanımı için iyi bir belirteç olduğuna değinilmektedir. Bu nedenle kokristallerin artan fizikokimyasal özelliklerinin sonucunda daha iyi biyoyararlanıma sahip olacağı tahmin edilmektedir [22].

3.2.1 Kokristallerin çözünme analizinde kullanılan metodlar

Bölüm 3.1.3'te anlatılan karakterizasyon yöntemlerinden UV/Vis spektroskopisi kokristallerin çözünme analizinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

UV/Vis analizinde, ultraviyole dalga boyu aralığındaki ışık çözeltiye gönderilmektedir. Çözeltinin içindeki bileşenler belirli dalga boyundaki ışığı absorblamaktadır. Emilen ışığın miktarı, bileşenin konsantrasyonuyla ilişkili olmaktadır. Bu ilişki Beer-Lambert kanunu ile açıklanmaktadır [23].

$$A = \log (I_O/I) = \varepsilon \times L \times C \quad (3.1)$$

A= Absorbans

I= Örnekten geçen ışığın şiddeti

I_O= Örneğe gönderilen ışığın şiddeti

ε= Molar absorpsiyon katsayısı (lt/mol×cm ya da lt/g×cm)

L= ışık yolu (cm)

C= maddenin konsantrasyonu (g/lt ya da mol/lt)

Bir çözeltinin molar absorsiyon kat sayısı ve ölçüm yapılırken kullanılan küvetin uzunluğu biliniyorsa, çözeltinin absorbans değeri ölçülerek konsantrasyonu hesaplanabilmektedir. Bu yöntem molar absorbsiyon katsayısının (ε) değerinin bilindiği durumlarda kullanılması mümkündür [23].

3.2.1.1 Kalibrasyon Eğrisi

Molar absorbsiyon katsayısının bilinmediği durumlarda bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak konsantrasyon hesaplanması yapılması mümkündür.

Kalibrasyon eğrisi, bir maddenin bir çözelti içindeki bilinmeyen konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Konsantrasyonu bilinen bir dizi çözeltinin absorbans değerlerinin konsantrasyona karşılık olarak grafiğinin çizilmesiyle elde edilen eğriye kalibrasyon eğrisi denmektedir. Kısaca kalibrasyon eğrisi, analitik sinyal olarak adlandırılan enstrümantal tepkinin analit konsantrasyonu ile nasıl değiştiğinin bir grafiğidir [24].

Bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak konsantrasyon bulunurken absorbsiyon kat sayısını ya da küvet boyutlarını bilmeye gerek yoktur. Beer-Lambert yasasına göre absorbans ile konsantrasyon arasında orantısal bir ilişki mevcuttur. Bu nedenle konsantrasyona karşılık çizilen absorbans grafiği doğrusal bir çizgi olacaktır. Çözeltiler seyreltik olduğu sürece Beer-Lambert yasası geçerli olacaktır. Derişik çözeltilerde yasa kullanılamamaktadır ve kalibrasyon eğrisi çizilirken doğrusal bir çizgi yerine eğri elde edilmektedir [23].

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için öncelikle konsantrasyonu tespit edilmek istenilen maddenin bilinen konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanmaktadır. Daha sonrasında standart çözeltilerin UV/Vis spektroskopisi ile absorbans değerleri ölçülmektedir. Koordinat düzleminde konsantrasyona karşılık ölçülen absorbans değerleri yerleştirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmektedir [23].

Doğrusal bir çizgi şeklinde elde edilen kalibrasyon eğrisinden grafiğin eğimi ve kesim noktası bulunarak y=mx+n denkleminde yerlerine konularak konsantrasyonun hesaplanabilmesi için bir denklem elde edilmektedir. Böylece absorbans değeri denklemde yerine konarak, bileşenin konsantrasyonu hesaplanmaktadır.

y=mx+n denkleminde y, absorbans değeri; x, konsantrasyon; m, kalibrasyon eğrisinin eğimi; n, eğrinin y eksenini kestiği noktadır.

3.2.2 Kokristallerin çözünmesine etki eden faktörler

Bir bileşenin düşük çözünürlüğe sahip olması çözünme oranını etkilemektedir. Kristal özelliklerinin optimize edilmesi çözünme özelliklerinin geliştirilmesi için önemlidir. Çözünmeye etki eden birçok faktör vardır. Bunlardan bazıları kokristal miktarı, kokristalin büyüklüğü, şekli ve yüzey alanı, çözelti sıcaklığı ve pH derecesi, çözünmeyi artırıcı yardımcı maddeler kullanılmasıdır [25].

3.2.2.1 Kokristallerin şekil ve büyüklüklerinin çözünmeye etkisi

Kristallerin çözünme davranışının kristalin toplam yüzey alanına bağlı olarak değiştiğine literatürde değinilmektedir. Farklı kristal şekillerinin yüzey alanı da farklı olacağı için yüzey alanı daha fazla olan kristal şeklinde çözünme de fazla olacaktır. Kristal boyutunun küçülmesi ile toplam yüzey alanının artmasıyla çözücü ile daha fazla etkileşim olacağı nedeniyle çözünme artmaktadır. Aynı kristal şekline sahip olup

kristal büyüklüğünün farklı olması durumunda büyüklüğü daha fazla kristallerde çözünme oranının daha az olmaktadır [25,26].

Ayrıca kristal büyüklüğü ve şeklinin düzenli olması tekrarlanabilir ürün eldesi ve ürün stabilitesi için önemli bir parametredir [27].

Büyümekte olan kristalin şekline ve büyüklüğüne moleküllerin kristal ağı, kristalizasyon sırasında kullanılan çözücü ve katkılar, sıcaklık soğutma hızı vb. ortam şartları etki etmektedir [28].

Kullanılan çözücülerin kokristal şekline ve büyüklüğüne etkisi

Kokristalizasyon sırasında kullanılan çözücünün kristalin büyümesi sırasında moleküller arası etkileşime geçmesi, çözücünün kristalin büyüme mekanizması üzerinde etkili olmasına neden olmaktadır. Bu etkileşim kristalin morfolojisinde değişiklikler ile sonuçlanmaktadır [28].

Bolourtchian ve arkadaşları [29], kokristalizasyon sırasında kullanılan çözücünün karbamazepin kokristallerine etkisi üzerine çalışmışlardır. Aynı koşullar altında etanol ve aseton çözücü kullanarak iki farklı kokristalizasyon deneyi yapmışlardır. Çözücü olarak etanol kullanıldığında altıgen prizma şeklinde kokristaller elde edilirken, aseton kullanıldığında uzun yassı çubuk şeklinde kokristaller elde edildiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca çözücü olarak aseton kullanıldığı durumlarda kokristallerin daha büyük olduğunu gözlemlemişlerdir.

Soğutma hızının kokristal şekline ve büyüklüğüne etkisi

Soğutma hızı, kristalizasyon süresini etkilediği için oluşacak kristallerin şeklini ve büyüklüğünü de etkilemektedir. Yapılan birçok çalışmada yüksek soğutma hızının küçük boyutta kristal oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Soğutma hızının yüksek olmasından dolayı kristallerin büyümesi kesilmekte ve bu nedenle küçük boyutta kristaller oluşmaktadır [22,29].

Karıştırıcı tipinin ve karıştırma hızının kokristal şekline ve büyüklüğüne etkisi

Kristalizasyon sırasında farklı şekillerde ve büyüklüklerde karıştırıcılar kullanılmaktadır. Karıştırıcıları şekillerindeki farklılıklar, kristallerin de şekillerini, büyüklüklerini ve kristalizasyon verimini etkilemektedir. Kristalizasyon sürecinde kullanılan bazı karıştırıcı örnekleri Şekil 3.3'te verilmiştir. Pervane ya da çapa

şeklindeki karıştırıcılar kullanıldığında oluşan kristaller, bıçaklı tipte bir karıştırıcı kullanıldığında oluşan kristallerden daha büyük olmaktadır. Bu karıştırıcıların şekillerinden dolayı oluşan kristaller ve karıştırıcı arasında çarpışmalar daha az olmaktadır. Bu nedenle kristaller daha az kırılmaktadır ve daha büyük boyutlara ulaşabilmektedir [28,29].

Manyetik karıştırıcı kullanılması durumunda karıştırıcının hem reaktörün tabanı hem de oluşan kristaller ile etkileşiminden dolayı kristallerde yıpranma artmaktadır ve kristaller küçük boyutta olmaktadır. Sun ve Grant çalışmalarında sulfamerazin ile yaptıkları kokristalizasyon çalışmasında aynı koşullarda hazırladıkları çözeltilerde üç bıçaklı ve manyetik karıştırıcı kullanarak karıştırıcı tipinin kristalizasyona etkisini araştırmışlardır. Manyetik karıştırıcının kullanılması durumunda oluşan kokristal büyüklüğün, üç bıçaklı karıştırıcının kullanıldığı deney sonucu oluşan kokristallerin büyüklüklerinden daha küçük olduklarını gözlemlemişlerdir [30].



Şekil 3.3 : A) Dört bıçaklı karıştırıcı. B) Çapa tipi karıştırıcı. C) Pervane şeklinde karıştırıcı. D) Manyetik karıştırıcı.

Kristalizasyon sırasında kullanılan karıştırma hızı da kristallerin şeklini ve büyüklüğünü etkilemektedir. Düşük karıştırma hızlarında çekirdeklenme için aşırı doygunluk sağlanmakta ve kristallerin birbiriyle, reaktörün çeperleriyle ve karıştırıcı ile daha az etkileşimde olmasından dolayı oluşan kristaller de hasar daha az olmakta ve kristal yüzeyi daha düzgün olmaktadır. Karıştırma hızının artması kristallerin kendi arasında ve karıştırıcı ile olan çarpışmaların da artmasına neden olmaktadır. Çarpışmaların artması nedeniyle kristaller büyüme şansı bulamamakta ve daha küçük

boyutta olmaktadır. Ayrıca artan çarpışmalar dolayısı ile kristallerde oluşan hasar da fazla olmaktadır [31,32].

Aşı kristali (seed) kullanımının kokristal şekline ve büyüklüğüne etkisi

Aşı kristali, kristalizasyon sırasında büyüme ve/veya ikincil çekirdeklenmenin kontrolü için aşırı doymuş bir çözelti içine küçük bir kristal kütlesinin eklenmesidir [33]. Aşı kristalinin kullanılması son ürünün özelliklerini istenilen yönde değiştirebildiği için son yıllarda üzerinde durulan bir konu olmaktadır. Kokristalizasyon sırasında aşılama yapılması kokristal büyümesi sırasında çözeltide faz oluşmasını ve kokristalizasyon sırasında başka bir katı fazın birincil çekirdeklenmesini önlemeye yardımcı olmaktadır. Aşılama için kullanılan aşı kristalin büyüklüğü, aşı miktarı, aşılama sıcaklığı nihai ürünün büyüklüğünü etkilemektedir. Aşı miktarının artması daha fazla yüzey alanı yaratacağı için çekirdeklenme olasılığını arttırmaktadır [34].

3.2.2.2 Öğütme işleminin çözünmeye etkisi

İlaç çözünmesini arttırmak amacıyla yüzey alanında belirgin artışlar sağlamak için mikron altı boyut aralığında kristal parçacıklar üretmeye dikkat çekilmiştir [28].

Öğütme işlemi ile istenilen tane boyutunu elde etmek ve toplam yüzey alanını artırmak mümkündür. İlaç sektöründe ise öğütme işlemi genel olarak partiküllerin boyutlarını eşitleyerek karışabilirliği kolaylaştırmak, çözünme ve emilim hızlarını artırmak, yüzey alanını artırarak kurumalarını kolaylaştırmak vb. gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Bazı etkin maddelerin partikül büyüklükleri azaltılarak klinik etkileri daha fazla arttığı gözlemlenmektedir [35].

Serrano ve arkadaşları [36], Sülfadimidin aktif maddesi ve 4-Aminosalisilik asit koformeri ile yaptıkları kokristalizasyon deneyinde çözücü olarak etanol kullanılmasıyla elde edilmiş kokristallerden büyük prizmatik şekle sahip olan kokristale öğütme işlemi yapmışlardır. Öğütme işlemi sonucunda kristal boyutunun küçülmesinden dolayı yüzey alanında artış olduğunu ve çözünme davranışının geliştiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca kristal boyutunun küçülmesi ile daha fazla sayıda temas noktası oluştuğunu ve tablet kompakt sertliğinin arttığını gözlemlemişlerdir.

Öğütme işlemi istenilen büyüklükte kristallerin eldesi için önemli olmasına rağmen, heterojen ve yapışkan, ürün performansında sorunlara neden olma potansiyeli olan

parçacıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle parçacık büyüklüğü dağılımı kontrol edilmelidir [28].

3.2.2.3 pH derecesinin ve yüzey aktif madde kullanılmasının çözünmeye etkisi

Yüzey aktif maddeler kullanılarak su içinde ki çözünürlüğü ve çözünme davranışı düşük olan maddeler için iyileştirme yapmak mümkündür. Yüzey aktif maddeler kritik misel konsantrasyonu (KMK) üzerinde, sulu ortamda toplanarak (koloidal agregasyon) miseller oluşturmaktadır. Dolayısıyla KMK minimum yüzey aktif madde konsantrasyonuna denk gelmektedir. KMK'nun üstünde yüzey aktif madde içeren çözeltilerde moleküller misellerde tutunmakta ve çözünmeyen moleküller, çözünmeye başlamaktadır [37].

Yüzey aktif madde seçilirken dikkat edilmesi gereken unsurlar toksisite, stabilite, fizyolojik etkiler ve yüzey aktif maddenin diğer farmasötik bileşenler üzerindeki etkileridir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından kullanımı onaylanan bazı yüzey aktif maddeler şöyledir, tween (polisorbat) 20, 40 ve 80; sodyum deoksikolat; monopalmitat; polioksietillenmiş maddeler ve sorbitandır [37].

pH değişikliği de çözünürlüğü ve çözünme davranışını geliştirmek için potansiyel bir yaklaşımdır. Zayıf asit ya da zayıf baz özelliği taşıyan bileşenlerin çözünmesi ortamın pH derecesine bağlı olarak değişmektedir [38].

Yapılan birçok çalışmada yüzey aktif maddelerin ve pH derecesinin çözünmeyi etkilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca yüzey aktif maddelerin, AFB ve koformer arasındaki misel çözündürme farklılıklarından dolayı kokristalleri termodinamik olarak stabilize edebildikleri gözükmektedir [39].

Wang ve arkadaşları [40] çalışmalarında, apremilast aktif maddesi ve üç farklı koformer; nikotinamid (NA), kafein (CAF) ve asetilsalisilik asit (ASA) ile hazırladıkları kokristallerde pH değişikliğinin ve yüzey aktif maddelerin, kokristalin çözünürlüğüne etkisini araştırmışlardır. pH 2, pH 4 ve pH 6.8 derecesindeki çözeltilerde tam çözünme sonrası apremilast konsantrasyonunu analiz etmişlerdir. ASA ile hazırlanan kokristal örneği hariç apremilastın saf formu da dahil olmak üzere pH 2 derecesinde en yüksek konsantrasyon değerini gözlemlemişlerdir. Yüzey aktif maddelerin etkisini incelemek için pH 2 derecesindeki çözeltiye %1 oranında polietilen glikol (PEG) 2000, hidroksipropil selüloz (HPC), polivinil prolidon 30 (PVP K-30), Tween 80 ve tetra-n-bütil amonyum bromid (TBAB) yüzey aktif maddelerini

eklemişlerdir. PEG2000, PVP K-30 ve TBAB içeren çözeltilerde apremilastın konsantrasyonunda kayda değer bir artış gözlemlememişlerdir. HPC ve Tween 80 içeren çözeltilerde ise apremilast konsantrasyonun ortalama olarak 5 kat arttığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışma ile çözünmenin ve çözünürlüğün yüzey aktif maddenin özellikleri ve ortam şartlarıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

4. DENEYSEL ÇALIŞMA

4.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Yüzey aktif madde çözeltisinin hazırlanması için Tween80 (viskoz sıvı) Sigma-Aldrich (Berlin, Almanya) kullanılmıştır.

Asidik çözeltinin hazırlanması için %35'lik hidroklorik asit (HCl) Penta (Chrudium, Çek Cumhuriyeti) kullanılmıştır.

pH ölçümü Mettler Toledo SevenCompact Duo S213 pH/iletkenlik cihazı ile yapılmıştır.

Numune tartımı Mettler Toledo XSE205 (hassasiyet 0,01 mg) tartısı ile yapılmıştır.

Çözeltiden numune alınımı sırasında Mettler Toledo 10 ml XLS manuel pipet kullanılmıştır.

Öğütme işlemi Retsch MM 200 (Retsch, Almanya) titreşimli öğütücü ve 3 mm çapında öğütücü toplar kullanılarak yapılmıştır.

Elek olarak ISO 3310/1 standartlarında Retsch marka, 100 mm çapında ve 40 mm yüksekliğinde, 200 µm, 100 µm,50 µm ve 25 µm elek açıklığına sahip elekler kullanılmıştır.

UV/Vis analizi Agilent Cary 60 (Agilent Teknolojileri A.Ş, USA) Agilent UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak yapılmıştır.

4.2 Kullanılan Kokristaller ve Özellikleri

Çözünme konsantrasyonun değerlendirilmesi sırasında kullanılan kokristaller bu tez kapsamının dışında sentezlenmiştir[1]. Kokristallerin hazırlanmasında kullanılan aktif

[1] Tez çalışması sırasında analiz için kullanılan kokristaller, bu tez çalışmasının kapsamı dışında erasmus öğrencisi olarak bulunduğum University of Chemistry and Technology Prague tarafından daha öncesinde sentezlenmiştir. Analiz için hazır şekilde olan kokristaller kullanılarak deneyler yapılmıştır.

bileşenin adı kısıtlamalardan dolayı tez içinde belirtilmemiş, AFB-BA şeklinde kodlanmıştır. Çizelge 4.1'de kokristallerin özelliklerine ve kodlarına yer verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Kullanılan kokristal örneklerinin özellikleri ve kodları

Kodlama	Kokristalin Özellikleri
AFB-BA-01	Bipiramit şeklinde 25-200 µm partikül büyüklüğü aralığında kristaller içeren kokristal örneği
AFB-BA -01-1	AFB-BA-01 kokristal örneğinin 50-100 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış hali
AFB-BA -01-2	AFB-BA-01 kokristal örneğinin 25-50 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış hali
AFB-BA -02	Bipiramit şeklinde 25 µm'den küçük kristal taneleri içeren kokristal örneği
AFB-BA -03	Küme şeklinde 25-200 µm partikül büyüklüğü aralığında kristaller içeren kokristal örneği
AFB-BA -03-1	AFB-BA-03 kokristal örneğinin 100-200 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış hali
AFB-BA -03-2	AFB-BA-03 kokristal örneğinin 50-100 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış hali
AFB-BA -04	Küme şeklinde 25 µm'den küçük kristal taneleri içeren kokristal örneği
AFB-BA -05-1	AFB-BA-03 kokristal örneğine öğütme işlemi uygulanmış form (100-200 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış örnek)
AFB-BA -05-2	AFB-BA-03 kokristal örneğine öğütme işlemi uygulanmış form (50-100 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış örnek)
AFB-BA -05-3	AFB-BA-03 kokristal örneğine öğütme işlemi uygulanmış form (25-50 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış örnek)
AFB-BA -06	Manyetik karıştırıcı kullanılarak sentezlenen 50-200 µm partikül büyüklüğü aralığında kristaller içeren kokristal örneği
AFB-BA -06-1	AFB-BA-06 kokristal örneğinin 100-200 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış hali
AFB-BA-06-2	AFB-BA-06 kokristal örneğinin 50-100 µm partikül büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış hali

Kokristalizasyon Mettler Toledo EasyMax102 cihazı ile yapılmıştır ve 70 °C'ye ısıtılan çözelti -10 °C'ye soğutularak gerçekleştirilmiştir.

Kokristaller, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BSS) göre IV. sınıfta yer alan düşük çözünürlüğe (~7 µg/ml) sahip olan bir AFB'den ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir koformer olan benzoik asit (BA) kullanılarak üretilmiştir.

Tüm kokristallerde AFB/BA oranı molar olarak 2/1'dir ve aşı kristali kullanılmamıştır.

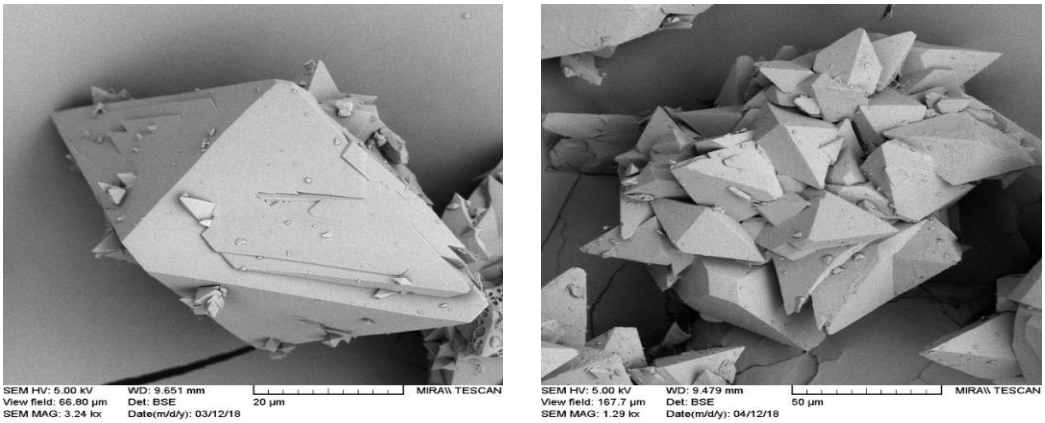
Çözücü olarak tüm kokristal örneklerinin sentezinde aynı miktarda metil etil keton kullanılmıştır.

Kokristallere ait bilgiler ile şekillerinde ve büyüklüklerini etkileyen sentez parametlereleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Kokristal örneklerinin sentezi sırasında değişen parametreler.

Kodlama	Sentez parametreleri
AFB-BA-01	4 bıçaklı kafa üstü karıştırıcı 100 mg/ml AFB başlangıç konsantrasyonu 150 rpm karıştırma hızı 1 °C/dk soğutma hızı
AFB-BA -02	Çapa tipi kafa üstü karıştırıcı 100 mg/ml AFB başlangıç konsantrasyonu 500 rpm karıştırma hızı 0,8 °C/dk soğutma hızı
AFB-BA -03	4 bıçaklı kafa üstü karıştırıcı 100 mg/ml AFB başlangıç konsantrasyonu 150 rpm karıştırma hızı 0,1 °C/dk soğutma hızı
AFB-BA -04	4 bıçaklı kafa üstü karıştırıcı 50 mg/ml AFB başlangıç konsantrasyonu 500 rpm karıştırma hızı 0,5 °C/dk soğutma hızı
AFB-BA -05	AFB-BA-03 kokristalinin öğütülmüş formu
AFB-BA-06	Manyetik karıştırıcı 50 mg/ml AFB başlangıç konsantrasyonu 125 rpm karıştırma hızı 0,5 °C/dk soğutma hızı

Aşağıda deneyler sırasında kullanılan kokristallerin TEM görüntüleri verilmiştir.

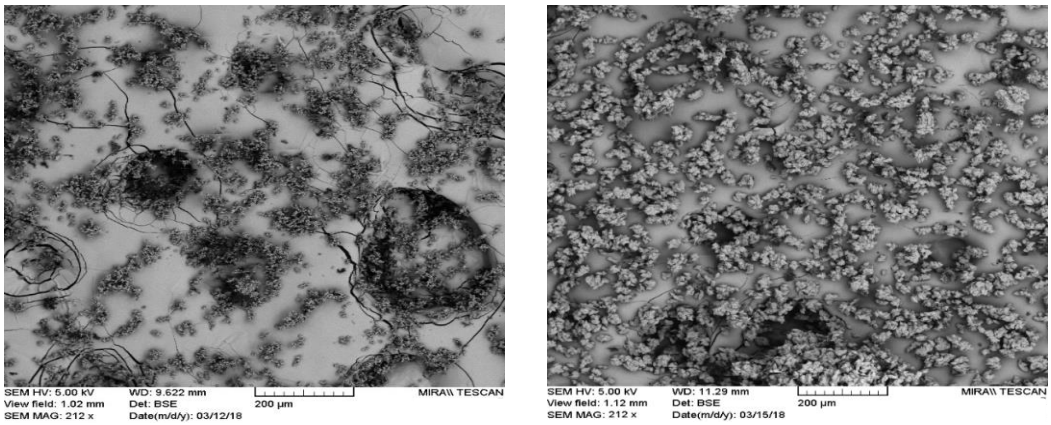


A B

Şekil 4.1 : A) AFB-BA-01 (25-200 µm), B) AFB-BA-03 (25-200 µm) kokristallerine ait TEM görüntüleri. Yakınlaştırma oranları a) 3240x b) 1290x.

Şekil 4.1.A bipiramit şekline sahip olan AFB-BA-01 kokristal örneğinin TEM görüntüsüne aittir. Bu kokristalin şekli iki tane piramidin tabanlarından birleşmiş şekline benzediği için bipiramit olarak adlandırılmaktadır. Yüzeyleri diğer örneklere göre daha pürüzsüzdür, çıkıntılar daha azdır. Şekil 4.1.B ise küme şekline sahip olan AFB-BA-03 kokristal örneğinin TEM görüntüsüne aittir. Bir kristal tanesinin çevresinden çıkan çıkıntıların kümeleşmesine benzetilmektedir.

Şekil 4.2, 25 µm'den küçük küçük kristal taneleri içeren AFB-BA-02 ve AFB-BA-04 kokristal örneklerinin TEM görüntülerine aittir. TEM görüntülerinden görüldüğü üzere kristal büyüklüğünün küçük olmasından dolayı birim alandaki kristal tanesinin sayısı fazladır.

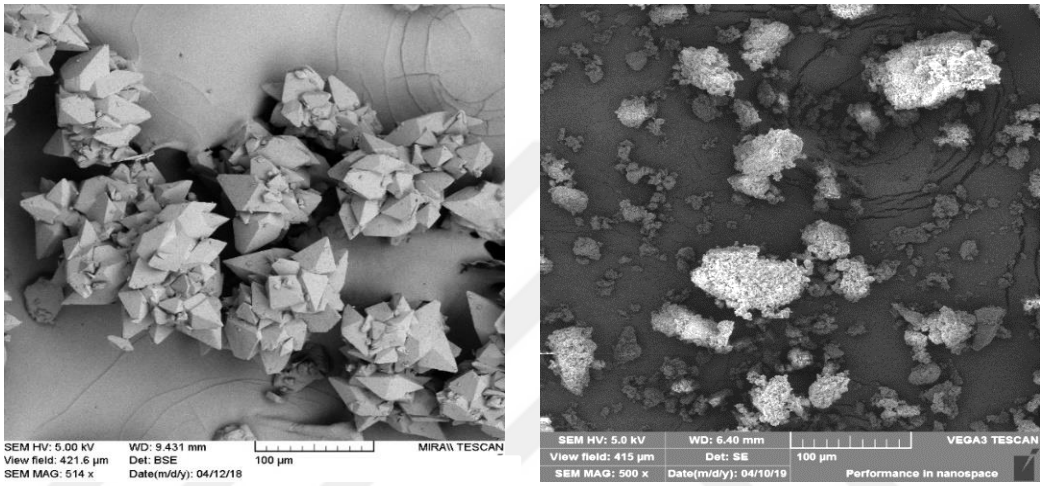


A B

Şekil 4.2 : A) AFB-BA-02 (<25 µm), B) AFB-BA-04 (<25 µm) kokristallerine ait TEM görüntüleri. Yakınlaştırma oranı 212x.

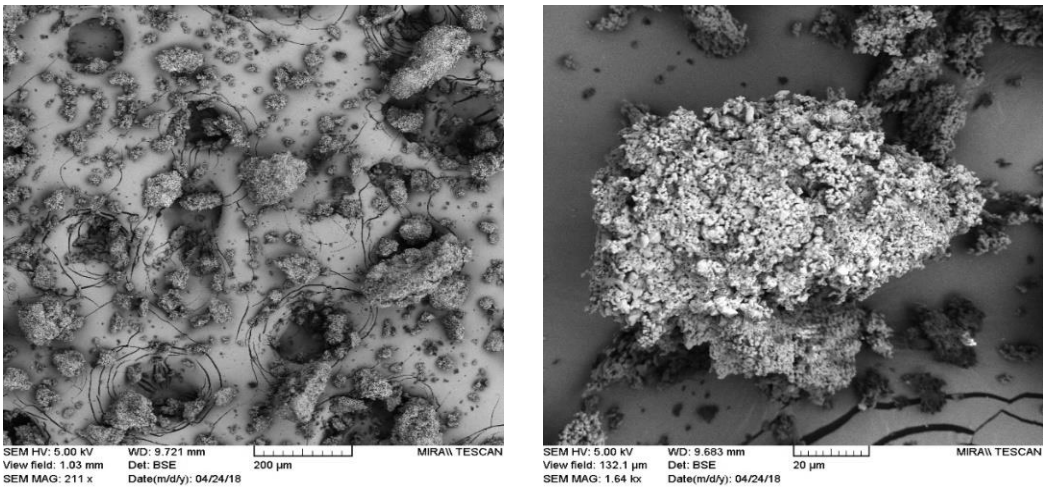
Şekil 4.3 AFB-BA-03 kokristalinin öğütme işleminden önceki ve sonrakine haline ait TEM görüntüleridir. Şekil 4.3.B'de görüldüğü üzere öğütme işlemi kokristalin şeklini tamamen değiştirmiştir.

Şekil 4.4 AFB-BA-06 kokristal örneğine ait TEM görüntüledir. Bu kokristal örneğinin sentezi sırasında manyetik karıştırıcı kullanılması sürtünmenin artmasına ve kokristalin şeklinde farklılığa neden olmuştur. Şekil 4.4.B 1640x yakınlaştırma oranında ki TEM görüntüsünde kokristalin şeklinde ki farklılık net olarak görülmektedir.



A B

Şekil 4.3 : A) AFB-BA-03 (25-200 µm), yakınlaştırma oranı 514x, B) AFB-BA-05-1 (100-200 µm), yakınlaştırma oranı 500x kokristal örneklerine ait TEM görüntüleri.



A B

Şekil 4.4 : A) AFB-BA-06 (50-200 µm), kokristal örneğine ait TEM görüntüleri. A) Yakınlaştırma oranı 212x. B) Yakınlaştırma oranı 1640x.

4.3 Çözeltilerin Hazırlanması

Denemeler sırasında çözünme konsantrasyonunun analizi için asidik çözelti kullanılmıştır. Asidik ortamda çözelti hazırlayarak mide sıvısının ortamına benzer bir çözücü koşulu yaratılması hedeflenmiştir.

4.3.1 Tween 80 çözeltisinin hazırlanması

Çözünme konsantrasyonunun inceleneceği asidik çözeltide kullanılmak üzere 0,25 mg/ml konsantrasyona sahip Tween 80 stok çözeltisi hazırlanmıştır.

1 litre 0,25 mg/ml konsantrasyona sahip Tween 80 çözeltisinin hazırlanması için 1 litrelik cam beherde 810 ml destile suya 202,5 mg (190 ml) Tween 80 katılmıştır. Cam beherin ağzı parafilm ile kapatılarak manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 300 rpm karıştırma hızında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.

4.3.2 Asidik çözeltinin hazırlanması

500 ml'lik cam beher içine 460 ml destile su ve hazırlanmış olan 0,25 mg/ml konsantrasyona sahip Tween 80 stok çözeltisinden 40 ml eklenerek %2 Tween 80 içeren bir çözelti hazırlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda 300 rpm hızda ve 37 °C sıcaklıkta sürekli olarak karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi devam ederken pH ölçer ile kontrol edilerek pH seviyesi 2 olana kadar HCl ilave edilmiştir.

4.4 Tartım ve numune toplanması

Şekil 4.6 çözeltilerin hazırlanmasına ve deney sürecinin şematik gösterimine aittir.

Her bir deney için 500 ml'lik asidik çözelti ve 7,5 mg kokristal kullanılmıştır. Her kokristal örneği için deney 2 kere tekrarlanmıştır.

Manyetik karıştırıcıda 300 rpm hızda 37 °C derece sıcaklıkta karışmakta olan asidik çözeltinin içine 7,5 mg kokristal eklenerek kronometre başlatılmıştır. Parafilm ile cam beherin ağzı kapatılmıştır. 120 dakika boyunca karıştırma işlemine devam edilmiştir. 5., 10., 20., 30., 45., 60. ve 120. dakikalarda Mettler Toledo 10 ml XLS manuel pipet ile 2 ml örnek kapaklı cam tüpe alınmıştır.

4.5 UV/Vis Spektroskopisi

UV/Vis spektrumları, Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler fiber-optik prob kullanılarak (Şekil 4.5) 190-500 nanometre dalga boyu aralığında, 600 nm/dk tarama hızında yapılmıştır.

Örnek absorbans değerlerinin doğru ve kesin sonuç vermesi ve çözücüden kaynaklanan absorbsiyon piklerinin önüne geçmek için öncelikler kör (blank) asidik çözelti kullanılarak zemin değeri (baseline) ölçümü yapılmıştır.



Şekil 4.5 : Agilent Cary 60 UV/Vis spektrofotometresi.

4.6 Öğütme İşlemi

Öğütme işlemi için 60 mg kokristal ve 3 mm çapında olan öğütücü toplar öğütücü hazneye koyularak 25 Hz. frekansta 10 dakika süre ile kuru öğütme işlemi yapılmıştır. Öğütme işlemi sonrasında kristaller elenerek belirli kristal büyüklükleri arasında sınırlandırılmıştır.

Eleme işlemi için 200 µm, 100 µm,50 µm ve 25µm elek açıklığına sahip olan elekler, aşağıdan yukarıya doğru küçük elek açıklığından büyük elek açıklığına doğru dizilmiştir. El ile sarsılarak kokristaller elenmiş, 100-200 µm, 50-100 µm ve 25-50 µm kristal büyüklüğü aralığındaki örnekler toplanmıştır.

4.7 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Bir kokristal örneği kullanılarak bilinen konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kokristal çözeltisi için maksimum konsantrasyon değeri 0,0152 mg/ml olarak alınmıştır ve azalan konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. 50 ml asidik çözeti için gerekli olan kokristal miktarı hesaplanmış ve çözeltiler 50 ml'lik cam

beherler içinde hazırlanmıştır. Çözeltilerin konsantrasyonları ve gerekli kokristal miktarı Çizelge 5.1'deki gibidir. Cam beherlerin ağızları parafilm ile kapatılarak 24 saat boyunca 300 rpm hızda 37 °C' de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Çizelge 4.3 : Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için kullanılan çözeltilerin konsantrasyonları ve gerekli kokristal miktarı.

Konsantrasyon (mg/ml)	Kokristal miktarı (mg)
0,0152	0,7600
0,0130	0,6500
0,0108	0,5400
0,0086	0,4300
0,0064	0,3200
0,0032	0,1600
0,0020	0,1000
0,0010	0,0500

1. Tween 80 çözeltisinin hazırlanması



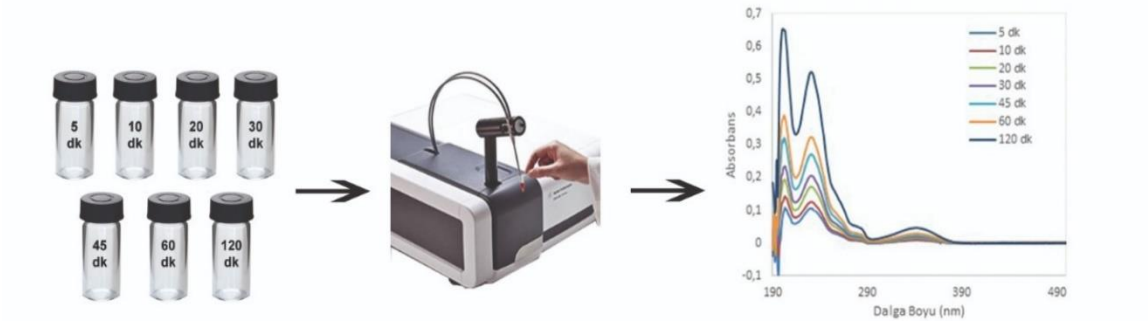
202,5 mg Tween 80 viskoz sıvı | 810 ml Distile su | %25'lik Tween 80 çözeltisi

2. Asidik çözeltinin hazırlanması ve kokristalin eklenmesi



40 ml Tween 80 çözeltisi | 460 ml Distile su | HCl | pH 2 derecesinde asidik çözelti | 7,5 mg kokristal | 37 °C, 300 rpm hızda karışan kokristal çözeltisi

3. Örneklerin toplanması ve UV/Vis ile ölçümü



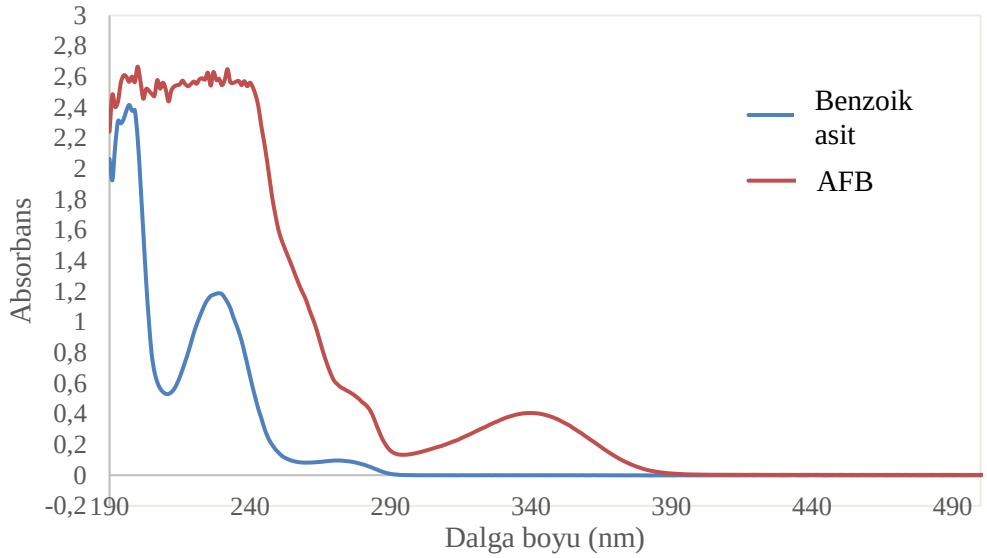
Periyodik olarak alınan örnekler | UV/Vis ile ölçüm yapılması | Dataların toplanması

Şekil 4.6 : Deneyin şematik gösterimi.

5. KARAKTERİZASYON SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Çözeltilerin UV/Vis spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçülerek AFB'nin konsantrasyonu analiz edilmiştir. Kokristaller yapılarında belirli stokiyometrik oranlarda bulunan iki veya daha fazla bileşen içeren kristal malzemeler oldukları için UV/Vis spektrumunda farklı dalga boyu aralıklarında birden fazla pik oluşmaktadır.

Bölüm 4.2'de anlatıldığı üzere analiz ettiğimiz kokristaller bir AFB ve benzoik asit koformerden oluşmaktadır. Şekil 5.1 AFB'nin ve benzoik asitin UV/Vis spektrumlarına aittir. AFB 290-390 nm. dalga boyu arasında absorblanırken, benzoik asit 200-280 nm. dalga boyu arasında absorblanmaktadır. AFB'nin absorblandığı dalga boyu aralığında benzoik asit absorblanmadığı için AFB'nin konsantrasyonu UV/Vis spektroskopisi ile ölçülen absorbans değeri ile analiz edilebilmektedir. Çözünme konsantrasyonu için hesaplamalar yapılırken AFB'nin 290-390 nm dalga boyu aralığında ki maksimum absorbans değeri alınmıştır.

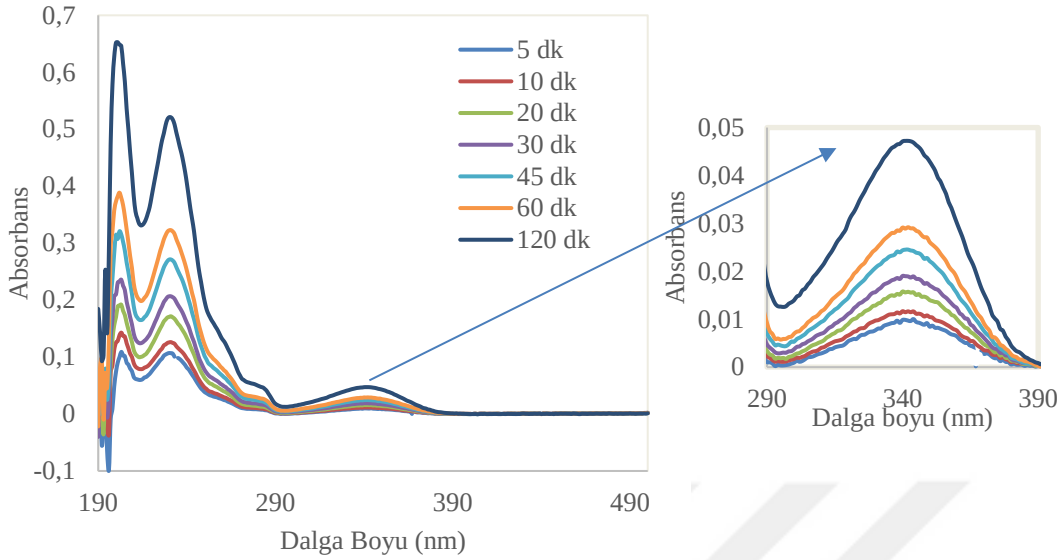


Şekil 5.1 : AFB ve benzoik asidin UV/Vis spektrumları.

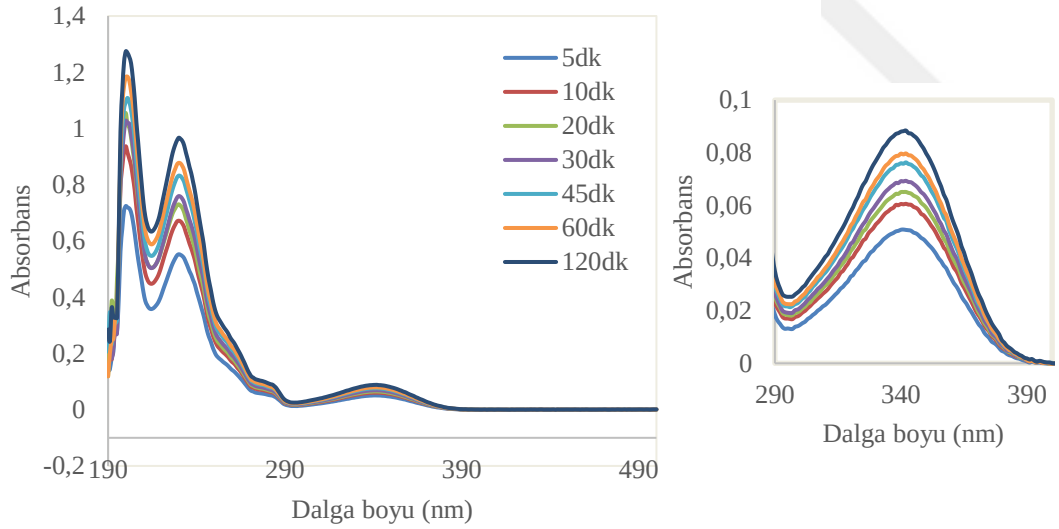
5.1 Kokristallerin UV/Vis Spektrumları

Şekil 5.2 ve Şekil 5.3 AFB-BA-01 (25-200 µm) ve AFB-BA-02 (<25 µm) kokristallerinin çözünmelerine ait UV/Vis spektrumlarıdır. Bipiramit şekline sahip olan bu kokristallerde AFB-BA-01 (25-200 µm) örneği daha büyük boyutta kristal

tanecikleri içerdiği için absorbans değeri AFB-BA-02 (<25 µm) kokristal örneğinden daha düşük olmuştur. 120 dk. sonunda absorbans değerleri sırasıyla 0,0472 ve 0,0851'dir.

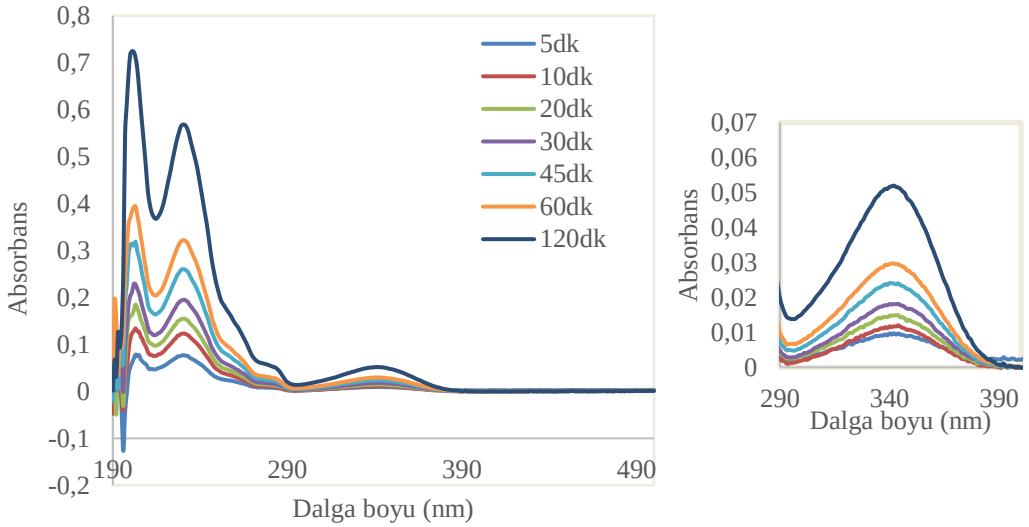


Şekil 5.2 : AFB-BA-01 (25-200 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu.

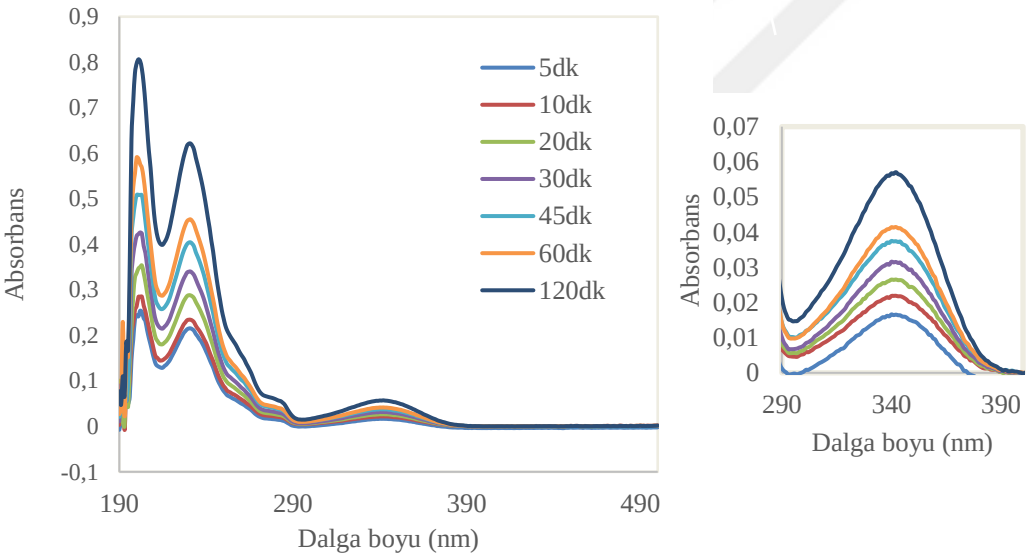


Şekil 5.3 : AFB-BA-02 (<25 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu.

Şekil 5.4 ve Şekil 5.5 ise AFB-BA-01 (25-200 µm) kokristal örneğinin eleme işlemi ile 50-100 µm ve 25-50 µm kristal taneciği büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış olan AFB-BA-01-1 (50-100µm) ve AFB-BA-01-2 (25-50 µm) kokristal örneklerinin UV/Vis spektrumlarına aittir. 120 dk. sonundaki absorbans değerleri sırasıyla 0,0532 ve 0,0570'tir. Kristal tanecik büyüklüğünün belirli aralıklarda sınırlandırılması absorbans değerinde artışa neden olmuştur.

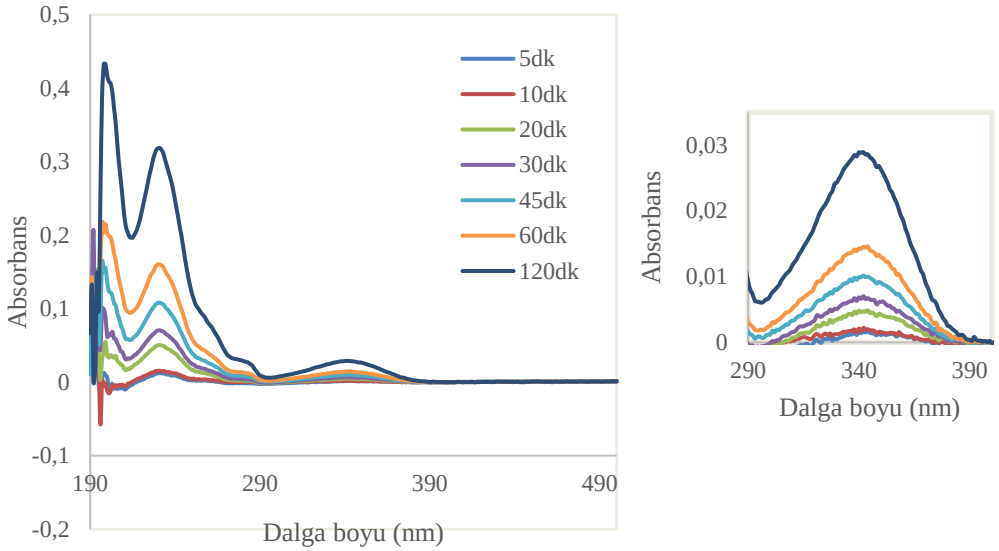


Şekil 5.4 : AFB-BA-01-1 (50-100 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.

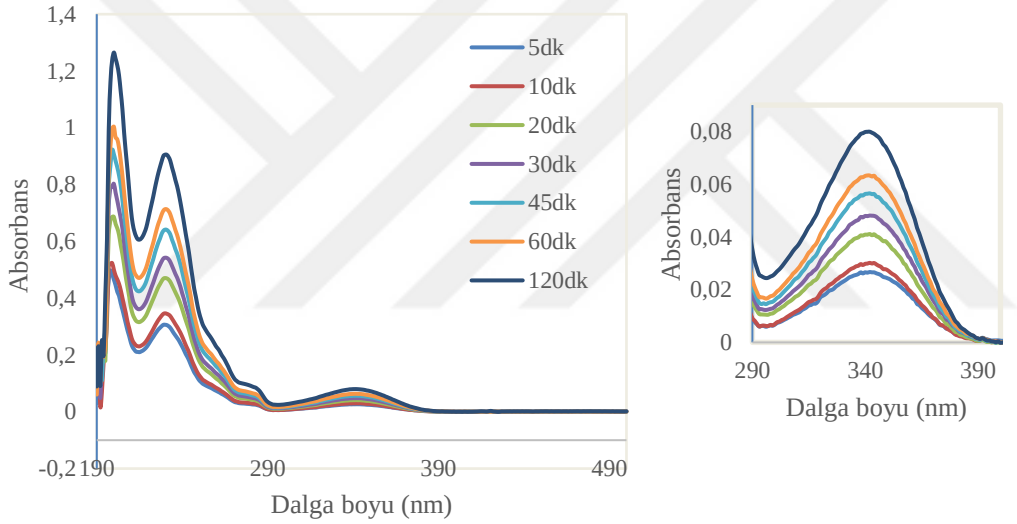


Şekil 5.5 : AFB-BA-01-2 (25-50 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.

Şekil 5.6 ve Şekil 5.7 AFB-BA-03 (25-200 µm) ve AFB-BA-04 (<25 µm) kokristallerine ait UV/Vis spektrumlarıdır. Küme şeklinde olan bu kokristallerde absorbans değerleri bipiramit şekline sahip olan kokristallerin absorbans değerlerine göre daha düşük olmuştur. 120 dk. sonunda AFB-BA-01 (25-200 µm) ve AFB-BA-02 (<25 µm) kokristallerinin absorbans değerleri 0,0472 ve 0,0851 iken AFB-BA-03 (25-200 µm) ve AFB-BA-04 (<25 µm) kokristallerinin absorbans değerleri sırasıyla sırasıyla 0,0279 ve 0,0799'dur. Bipiramit şekline sahip kokristallerin yüzeyinde ki çıkıntıların daha az olması aktif maddenin absorblanmasında artırıcı etki yaptığı gözlemlenmiştir. Bipiramit şekline sahip kokristal örneklerine benzer şekilde AFB-BA-03 (25-200 µm) örneği daha büyük boyutta kristal tanecikleri içerdiği için absorbans değeri AFB-BA-04 (<25 µm) kokristal örneğinden daha düşük olmuştur.

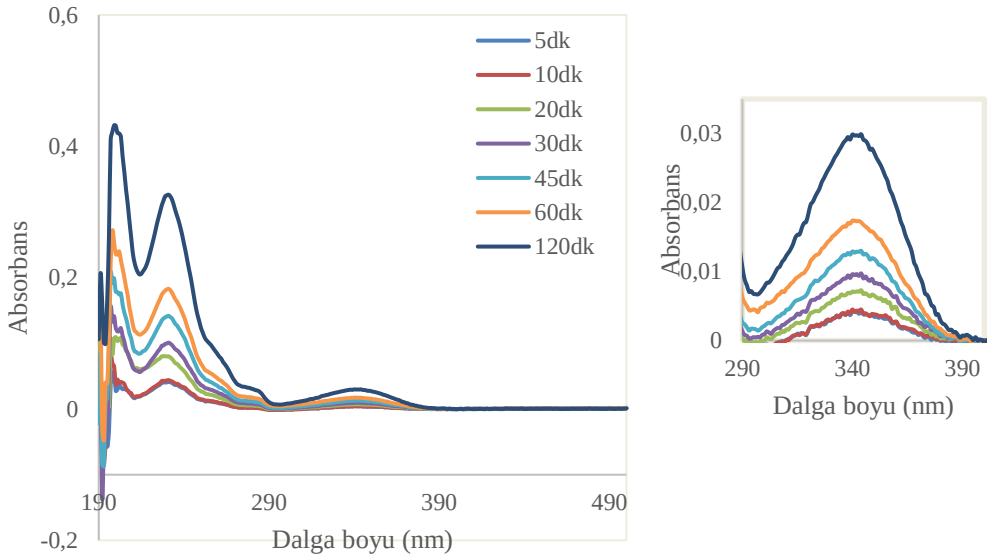


Şekil 5.6 : AFB-BA-03 (25-200 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu.

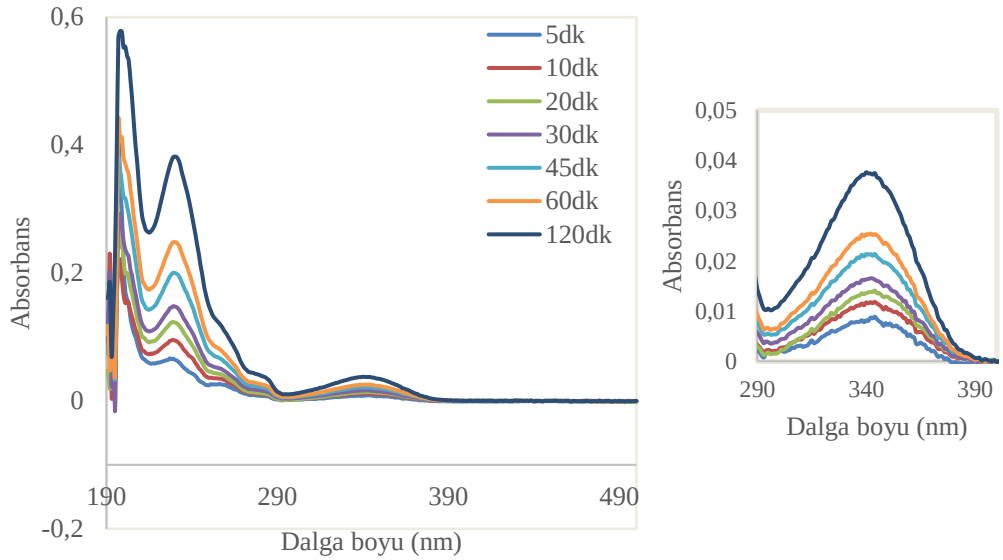


Şekil 5.7 : AFB-BA-04 (<25 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu.

Şekil 5.8 ve Şekil 5.9 ise AFB-BA-03 (25-200 µm) kokristal örneğinin eleme işlemi ile 100-200 µm ve 50-100 µm kristal taneciği büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış olan AFB-BA-03-1 (100-200 µm) ve AFB-BA-03-2 (50-100 µm) kokristal örneklerinin UV/Vis spektrumlarına aittir. 120 dk. sonundaki absorbans değerleri sırasıyla 0,0291 ve 0,0357'dir. Kristal tanecik büyüklüğünün belirli aralıklarda sınırlandırılması AFB-BA-01 (25-200 µm) kokristal örneğinin kristal taneciği büyüklüğünün sınırlandırılmış örneklerinin spektrumlarına benzer şekilde absorbans değerinde artışa neden olmuştur.

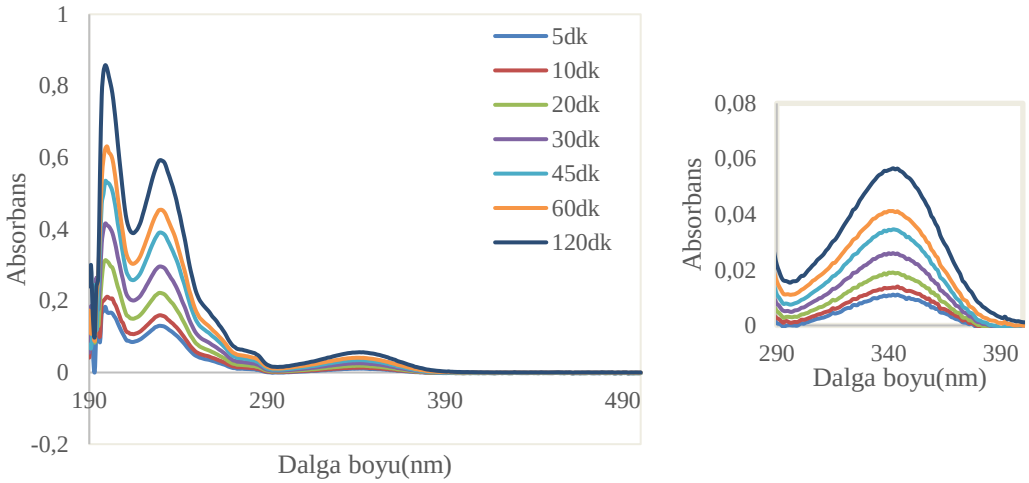


Şekil 5.8 : AFB-BA-03-1 (100-200 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.

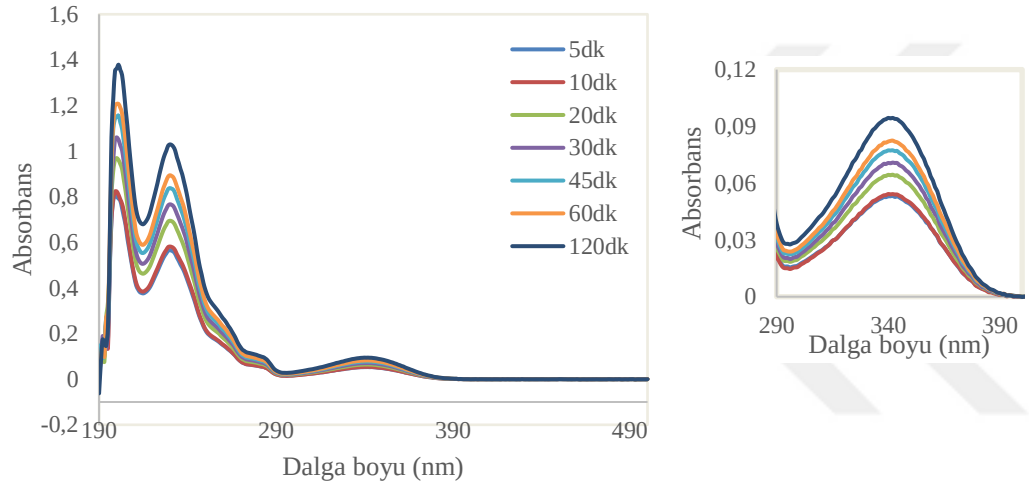


Şekil 5.9 : AFB-BA-03-2 (50-100 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.

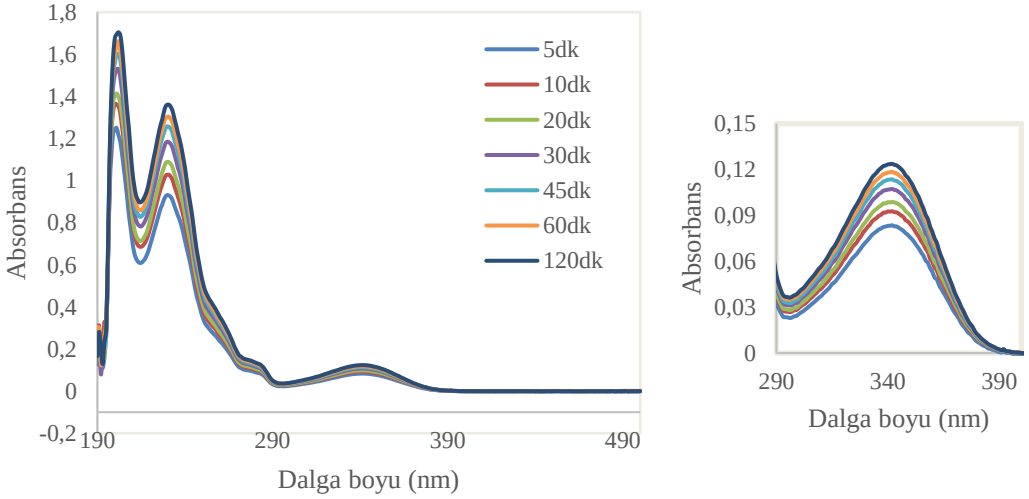
Şekil 5.10, Şekil 5.11 ve Şekil 5.12 AFB-BA-03 (25-200 µm) kokristal örneğine öğütme işlemi uygulandıktan sonra elek ile 100-200 µm, 50-100 µm ve 25-50 µm kristal taneciği büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış olan AFB-BA-05-1 (100-200 µm), AFB-BA-05-2 (50-100 µm) ve AFB-BA-05-3 (25-50 µm) kokristal örneklerinin UV/Vis spektrumlarına aittir. Absorbans değerlerinde öğütme işlemi sonrasında, kokristalin şeklinin değişmesinden ve kristal tanelerinin küçülmesinden dolayı artış olduğu gözlemlenmiştir. 120 dk. sonundaki absorbans değerleri sırasıyla 0,0554; 0,0944 ve 0,1237'dir.



Şekil 5.10 : AFB-BA-05-1 (100-200 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.

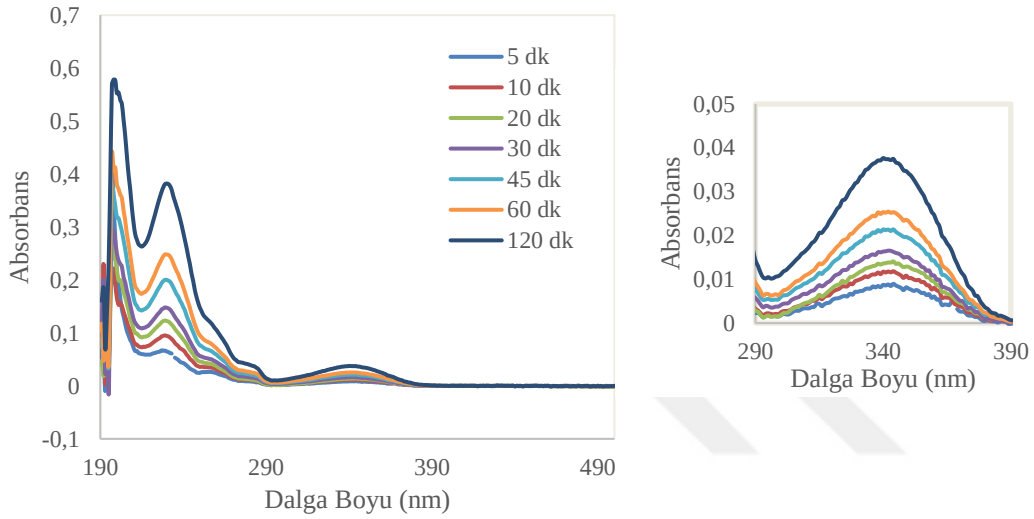


Şekil 5.11 : AFB-BA-05-2 (50-100 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.

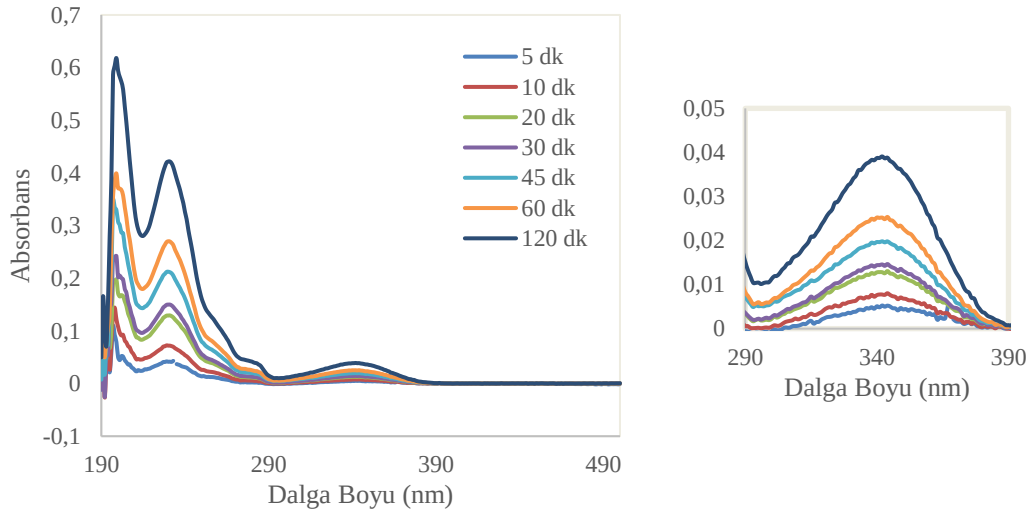


Şekil 5.12 : AFB-BA-05-3 (25-50 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.

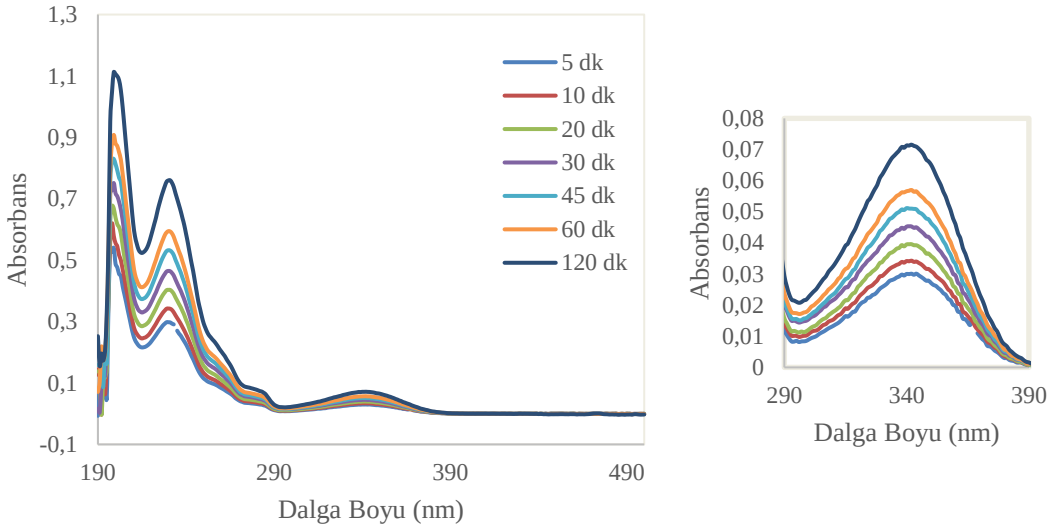
Şekil 5.13 AFB-BA-06 (50-200 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumudur. 120 dk. sonunda absorbans değeri 0,0376'dır. Şekil 5.14 ve Şekil 5.15 ise AFB-BA-06 kokristal örneğinin elek ile 100-200 µm ve 50-100 µm kristal taneciği büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış olan AFB-BA-06-1 (100-200 µm) ve AFB-BA-06-2 (50-100 µm) kokristal örneklerinin UV/Vis spektrumlarına aittir. 120 dk. sonunda absorbans değerleri sırasıyla; 0,0390 ve 0,0715'tir. 100-200 µm kristal taneciği aralığında absorbans değerinde yok sayılabilecek derecede az bir artış olmuşken, 50-100 µm kristal taneciği aralığında ise absorbans değeri neredeyse 2 kat artmıştır. Kristal büyüklüğü dağılımının sınırlanması sonucunda tüm kokristal örneklerinde AFB'nin absorbans değerinde artış gözlemlenmiştir.



Şekil 5.13 : AFB-BA-06 (50-200 µm) kokristaline ait UV/Vis spektrumu.



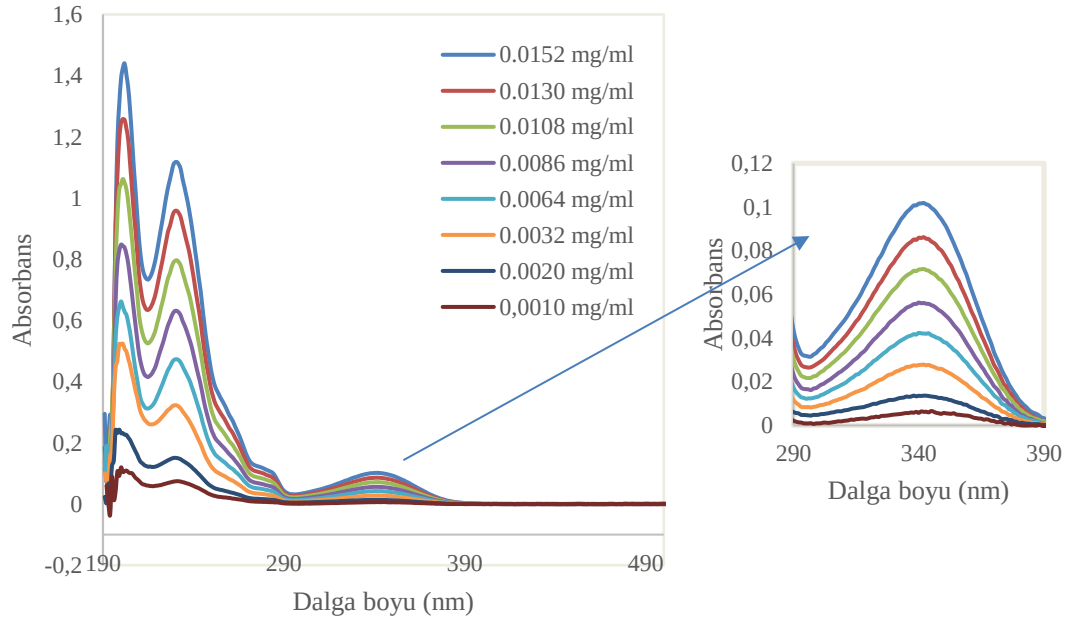
Şekil 5.14 : AFB-BA-06-1 (100-200 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.



Şekil 5.15 : AFB-BA-06-2 (50-100 µm) kokristal örneğine ait UV/Vis spektrumu.

5.2 Kalibrasyon Eğrisi

Şekil 5.16 kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için hazırlanan standart çözeltilerin UV/Vis spektrumuna aittir. AFB için UV/Vis spektrumundan okunan absorbans değerleri Çizelge 5.1'de verilmiştir.



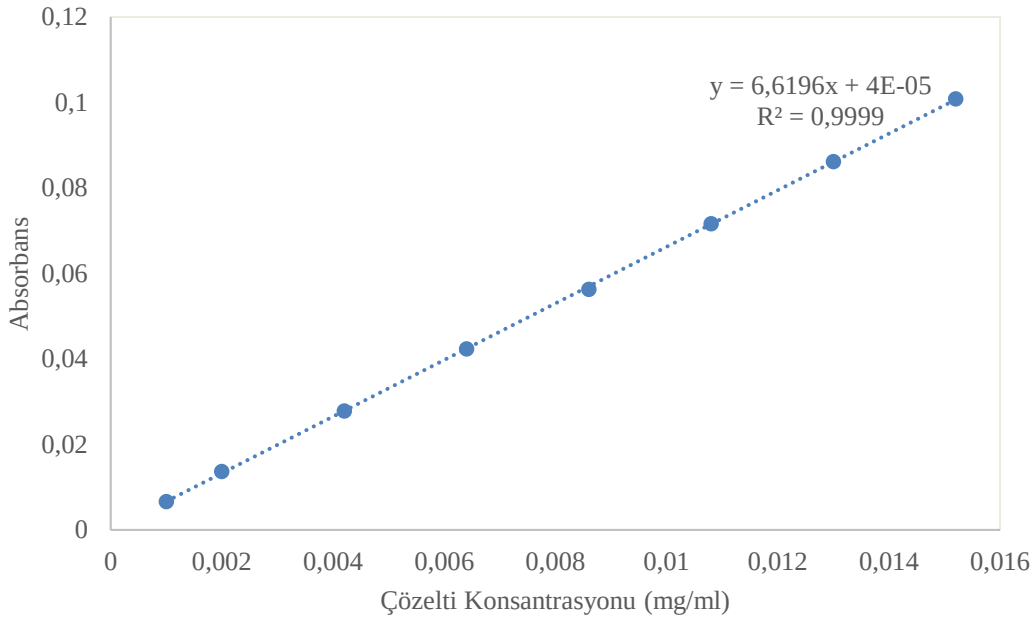
Şekil 5.16 : Konsantrasyonu bilinen kokristal çözeltilerine ait UV/Vis spektrumu.

Çizelge 5.1 : AFB'nin konsantrasyonu bilinen kokristal çözeltilerinden ölçülen absorbans değerleri.

Çözelti Konsantrasyonu (mg/ml)	Absorbans Değeri
0,0152	0,1008
0,0130	0,0862
0,0108	0,0716
0,0086	0,0562
0,0064	0,0423
0,0032	0,0228
0,0020	0,0136
0,0010	0,0065

Konsantrasyon değerlerine karşılık absorbans değerleri koordinat düzlemine yerleştirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Korelasyon değeri (r^2)= 0,9999, eğim (m)= 6,6196 ve y eksenini kesme noktası (n)= 4×10^{-5} bulunmuştur. m ve n değerleri y = mx + n denkleminde yerine konarak Denklem 5.1 elde edilmiştir. Çözünmenin herhangi bir anında ölçülen absorbans değeri ile bileşenin çözünme konsantrasyonunu Denklem 5.1'i kullanarak hesaplamak mümkündür.

$$y = 6{,}6196x + (4 \times 10^{-5}) \tag{5.1}$$



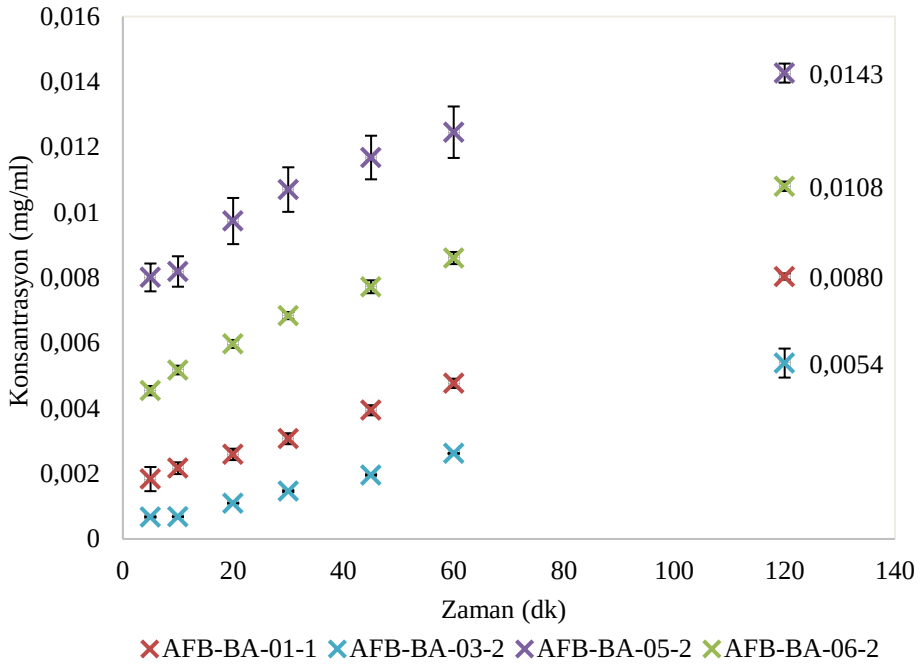
Şekil 5.17 : Kalibrasyon eğrisi.

5.3 Kokristallerin Çözünme Konsantrasyonun Değerlendirilmesi

Kalibrasyon eğrisi kullanılarak Bölüm 5.1'de verilen UV/Vis spektrumlarından elde edilen absorbans değerleri ile AFB'nin çözünme konsantrasyonu hesaplanmıştır.

5.3.1 Kokristalin şeklinin çözünme konsantrasyonuna etkisi

Şekil 5.18, kristal büyüklüğünün 50-100 µm aralığında sınırlandırıldığı farklı şekillere sahip kokristallerin çözünme konsantrasyonuna ait grafiktir. Aynı kristal büyüklüğü aralığında olan bu kokristallerde çözünme konsantrasyonun AFB-BA-05-2 (50-100 µm) kokristal örneği için tüm kokristal örneklerinden daha yüksek olduğu gözlemlenmektedir. Öğütme işlemi yapılmış olan bu kokristal örneğinde, kokristal şeklinin değişmesinden dolayı toplam yüzey alanında artış olduğu düşünülmektedir ve çözünme konsantrasyonu 0,0143±0,00029 mg/ml'ye ulaşmıştır. Toplam yüzey alanının artması ile çözünme konsantrasyonu öğütülmemiş formu olan AFB-BA-03-2 (50-100µm) kokristal örneğine kıyasla (0,0054±0,00044 mg/ml) yaklaşık olarak 3 kat artmıştır.



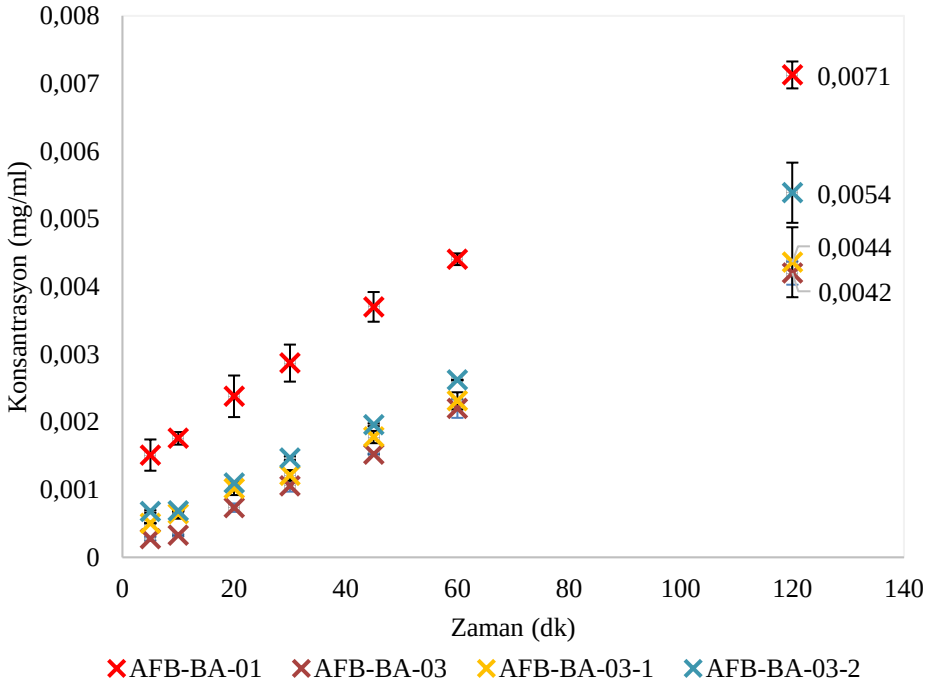
Şekil 5.18 : 50-100 µm kristal büyüklüğünde olan AFB-BA-01-1, AFB-BA-03-2, AFB-BA-05-2, AFB-BA 06-2 kokristal örneklerine ait çözünme konsantrasyonları.

AFB-BA-06-2 (50-100 µm) örneğinin çözünme konsantrasyonuna bakıldığında 0,0108±0,00014 mg/ml'ye ulaşan çözünme konsanstrasyonun AFB-BA-01-1 (50-100µm) ve AFB-BA-03-2 (50-100µm) kokristallerinin çözünme konsantrasyonundan daha yüksek değere ulaştığını gözlemlenmektedir. Buradan sentez sırasında manyetik karıştırıcı

kullanılmasından dolayı kokristal şeklinin farklılaşmasının bu kokristal örneğinin toplam yüzey alanını artırdığını söylemek mümkündür.

AFB-BA-01 (25-200 µm) ve AFB-BA-03 (25-200 µm) kodlarına sahip olan bipiramit ve küme şekline sahip olan kokristaller örneklerinin TEM görüntülerine (Şekil 4.1) bakıldığında küme şekline sahip olan kokristallerde yüzeylerindeki çıkıntıların fazla olduğu gözlemlenirken, bipiramit şekline sahip olan kokristallerin yüzeylerinin daha düzgün ve çıkıntıların daha az olduğu, gözlemlenmektedir. Kristal yüzeyindeki çıkıntıların az olması, kristal yüzeyinin pürüzsüz ve düzgün olması toplam yüzey alanını artırıcı etki yapmıştır ve AFB-BA-01-1 (50-100 µm) kokristal örneğinin çözünme konsantrasyonu 0,0080±0,00011 mg/ml'ye ulaşmıştır.

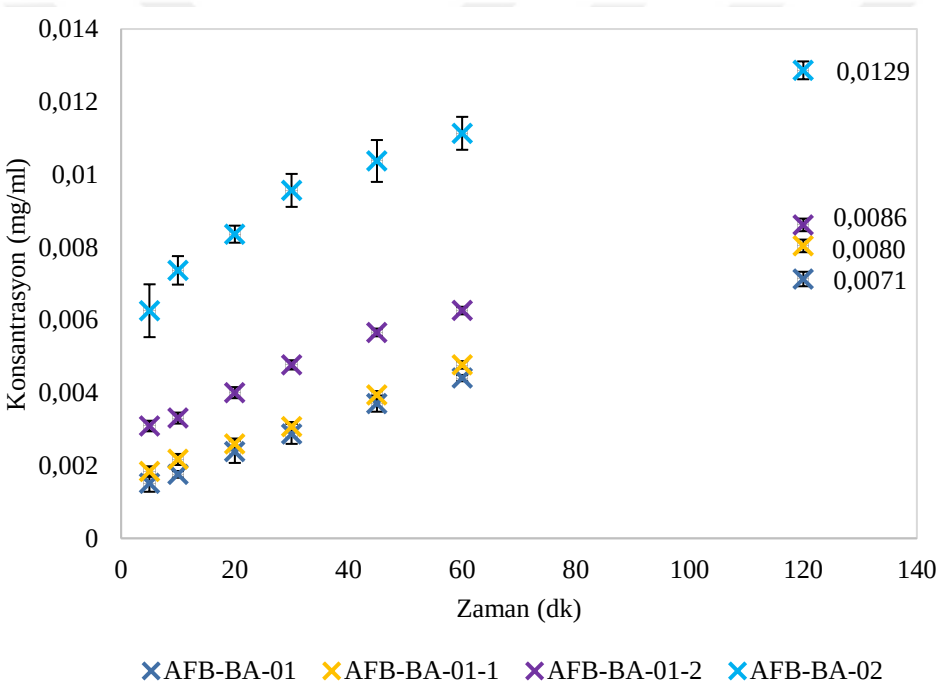
Şekil 5.19'a bakıldığında kristal yüzeyindeki kümeleşmenin çözünmeye etkisi daha iyi anlaşılmaktadır. Bipiramit şeklindeki AFB-BA-01 (25-200 µm) kokristal örneğinin çözünme konsantrasyonu 2 saatin sonunda 0,0071±0,00019 mg/ml'ye ulaşarak küme şeklindeki AFB-BA-03 (25-200 µm) ve kristal tane büyüklüğü sınırlandırılmış olan AFB-BA-03-1 (100-200 µm), AFB-BA-03-2 (50-100 µm) kokristal örneklerinin çözünme konsantrasyonundan daha yüksek olmuştur. AFB-BA-03-2 (50-100 µm) kokristal örneğini kristal büyüklüğü küçük boyutta olan kristal taneleri içermesine rağmen çözünme konsanrasyonu 0,0054±0,00044 mg/ml'ye ulaşmıştır.



Şekil 5.19 : AFB-BA-01 (25-200 µm), AFB-BA-03 (25-200µm), AFB-BA-03-1 (100 - 200 µm), AFB-BA-03-2(50-100 µm) kokristal örneklerine ait çözünme konsantrasyonları.

5.3.2 Kokristalin büyüklüğünün çözünme konsantrasyonuna etkisi

Şekil 5.20 bipiramit şekline sahip olan AFB-BA-01 (25-200 µm) ve kristal tane büyüklüğü sınırlandırılmış örnekleri olan AFB-BA-01-1 (50-100 µm), AFB-BA-01-2 (25-50 µm) ile AFB-BA-02 (<25 µm) kokristal örneklerinin çözünme konsantrasyonunun karşılaştırılmasına ait grafiktir. Çözünme konsantrasyonu AFB-BA-01 (25-20 µm) kokristal örneği için 2 saatin sonunda 0,0071±0,00019 mg/ml iken kristal tane büyüklüğünün eleme işlemi ile sınırlandırılmasıyla 50-100 µm aralığında 0,0080±0,00011 mg/ml'ye; 25-50 µm aralığında 0,0086±0,00017 mg/ml'ye ulaşmıştır. AFB-BA-02 (<25 µm) kodlu kokristal örneği çok küçük kristal taneleri içerdiği için çözünme konsantrasyonu AFB-BA-01-2 (25-50µm) kokristal örneğinin çözünme konsantrasyonuna göre yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla olarak 0,0129±0,00025 mg/ml'ye ulaşmıştır.



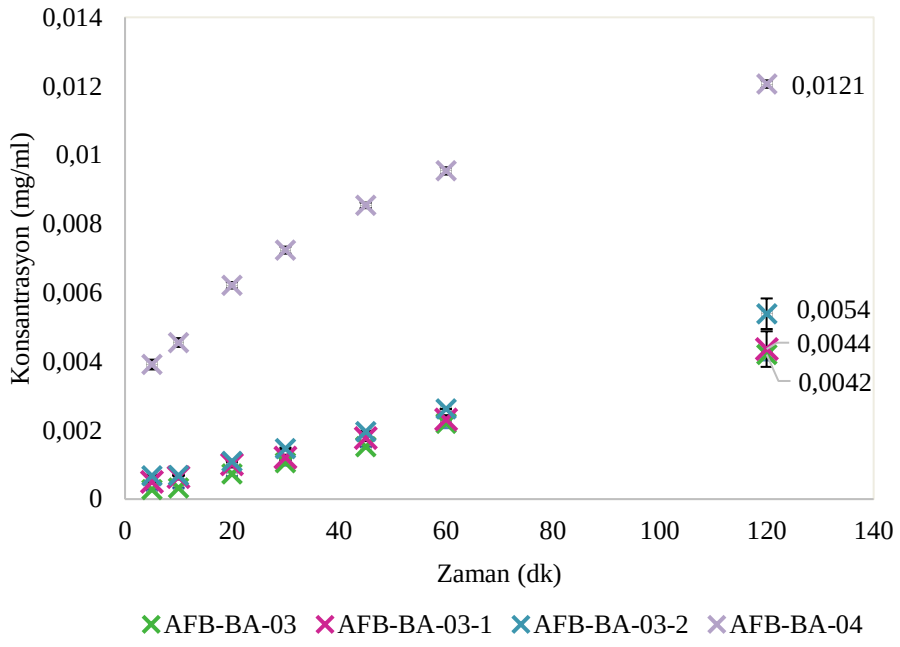
Şekil 5.20 : AFB-BA-01 (25-200 µm), AFB-BA-01-1 (50-100µm), AFB-BA-01-2 (25-50 µm) ve AFB-BA-02 (<25 µm) kokristallerine ait çözünme konsantrasyonu.

Şekil 5.21 küme şekline sahip olan AFB-BA-03 (25-200µm) ve kristal tane büyüklüğü sınırlandırılmış örnekleri olan AFB-BA-03-1 (100-200 µm), AFB-BA-01-2 (50-100µm) ile AFB-BA-04 (<25 µm) kokristal örneklerinin çözünme konsantrasyonunun karşılaştırılmasına ait grafiktir. Bipiramit şekline sahip olan kokristal örneklerinin çözünme konsantrasyonu değerlerine benzer şekilde kristal tane büyüklüğünün elek işlemi ile sınırlandırılmasıyla AFB-BA-03 (25-200µm) kokristal örneğinin çözünme konsantrasyonu 0,0042 ±0,00017 mg/ml iken 100-200 µm aralığında 0,0044±0,00051 mg/ml'ye; 50-100 µm

aralığında ise 0,0054±0,00044 mg/'ye ulaşmıştır. Çok küçük kokristal taneleri içeren AFB-BA-04 (<25 µm) kokristal örneğinde ise çözünme konsantrasyonu 0,0121±0,00011 mg/ml'ye ulaşmıştır.

Kristal boyutunun küçük olduğu kokristal örneğinin içerdiği kristal tanelerinin sayısı aynı gramajdaki büyük kristal tanelerine sahip olan kokristal örneğinin içerdiği kristal tanelerinin sayısına göre daha fazla olacaktır. Kristal tanelerinin daha fazla sayıda olması temas noktalarını ve toplam yüzey alanını artırmaktadır. Temas noktalarının artması ile birlikte çözünmenin artacağı öngörülen bir durumdur.

Kristal boyutunun küçülmesi aynı zamanda kompakt sertliği artırmaktadır. Kristal partikül boyutunun büyük olması daha kolay tablet formda üretim sağlasada, oluşan tabletler dayanıksız olmaktadır. Partikül boyutunun küçülmesi ile tablet formun daha sıkı ve güçlü olduğu gözlemlenmiştir [30,36].

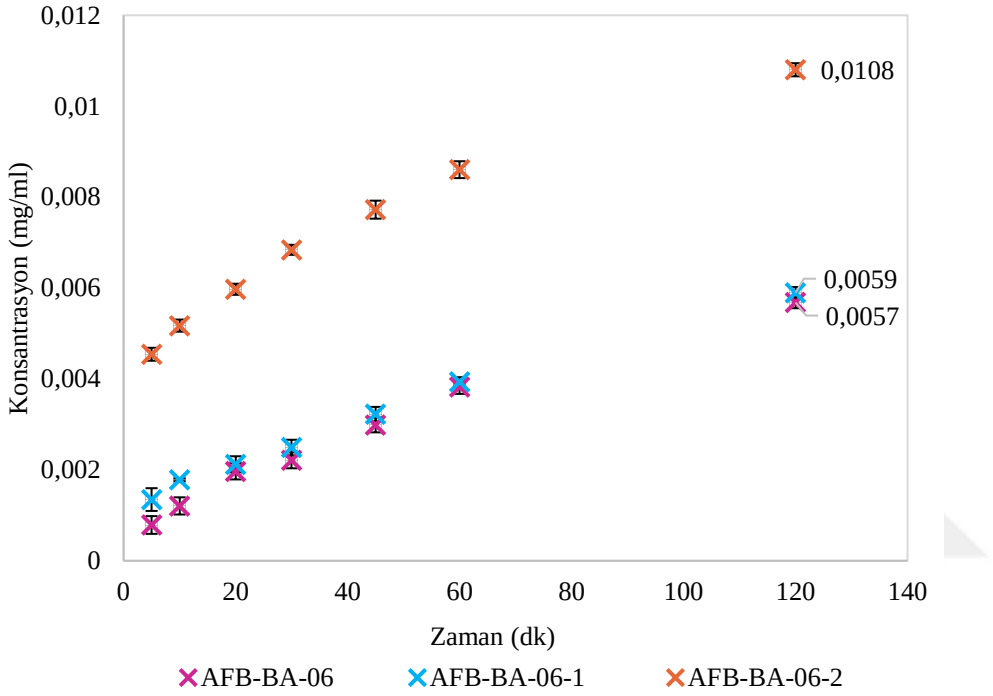


Şekil 5.21 : AFB-BA-03 (25-200 µm), AFB-BA-03-1 (100-200µm), AFB-BA-03-2 (50-100 µm) ve AFB-BA-04 (<25 µm) kokristallerine ait çözünme konsantrasyonu.

Şekil 5.22 ise AFB-BA-06 (50-200 µm) ve kristal tane büyüklüğü sınırlandırılmış örnekleri olan AFB-BA-06-1 (100-200 µm), AFB-BA-06-2 (50-100 µm) kokristal örneklerinin çözünme konsantrasyonunun karşılaştırılmasına ait grafiktir. Bu kokristal örneğinde de önceki örneklere benzer şekilde kristal tane büyüklüğünün sınırlandırılması ile AFB-BA-06 (50-200 µm) örneğinin çözünme konsantrasyonu 2 saatin sonunda 0,0057±0,00012 mg/ml iken, AFB-BA-06-1 (100-200 µm) örneğinin

çözünme konsantrasyonu 0,0059±0,00012 mg/ml; AFB-BA-06-2 (50-100µm) kokristal örneğinin çözünme konsantrasyonu 0,0108±0,00014 mg/ml'dir.

Kristal büyüklüğü dağılımının geniş aralıkta olması durumunda kokristal örneklerinde çözünme konsantrasyonu değeri daha az olmuştur. Kristal büyüklüğü dağılımını sınırlandırmanın aktif maddenin çözünmesini artırdığı gözlemlenmiştir. Çözünme konsantrasyonunun artmasının yanı sıra partikül büyüklüğünü sınırlandırmak nihai dozaj formunun tekrarlanabilir özellikleri sağlamak için önemlidir [26].



Şekil 5.22 : AFB-BA-06 (50-200 µm), AFB-BA-06-1 (100-200 µm) ve AFB-BA-06-2 (50-100 µm) ve kokristallerine ait çözünme konsantrasyonu.

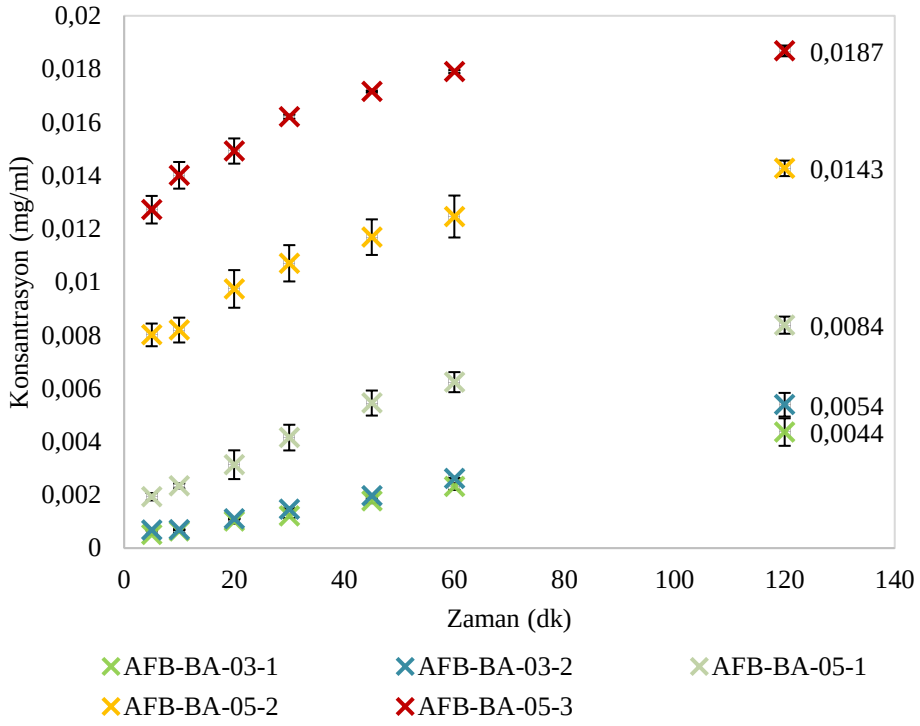
5.3.3 Öğütme işleminin kokristalin çözünme konsantrasyonuna etkisi

Şekil 5.23 AFB-BA-03 (25-200 µm) kodlu küme şeklinde ki kokristal örneğine ve öğütme işlemi sonrası eleme işlemi kristal büyüklüğü sınırlandırılmış olan AFB-BA-05-1 (100-200 µm), AFB-BA-05-2 (50-100 µm) ve AFB-BA-05-3 (25-50 µm) kokristal örneklerinin çözünme konsantrasyonlarının karşılaştırıldığı grafiğe aittir.

100-200 µm ve 50-100 µm kristal büyüklüğü aralıklarında sınırlandırılmış olan AFB-BA-03-1 (100-200 µm), AFB-BA-05-1 (100-200 µm) ve AFB-BA-03-2 (50-100 µm), AFB-BA-05-2 (50-100 µm) kokristal örneklerinden öğütme işlemi uygulanmış olan AFB-BA-05-1 ve AFB-BA-05-2 kodlu kokristal örneklerinin çözünme konsantrasyonları 2 saatin sonunda sırasıyla 0,0084±0,00032 mg/ml ve 0,0143±0,00029 mg/ml'ye ulaşarak

öğütülmeden önceki formlarınnın çözünme konsantrasyonuna göre daha fazla olmuştur. Bölüm 3.2.2.2'de bahsedilen öğütme işleminin kristal yüzey alanını artırıcı etkisinden dolayı aynı kristal büyüklüğü aralığında sınırlandırılma yapılmasına rağmen öğütme işlemi yapıldıktan sonra kokristal örneğinin çözünme konsantrasyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. 50-100 µm kristal büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış olan kokristal örneklerinde çözünme konsantrasyonu yaklaşık 3 kat artmışken, 100-200 µm kristal büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış olan kokristal örneklerinde çözünme konsantrasyonun yaklaşık olarak 2 kat arttığı gözlemlenmiştir. Çözünme konsantrasyonundaki artışlara bakarak öğütme işleminin kokristalin toplam yüzey alanında artışa neden olduğunu söylemek mümkündür.

AFB-BA-05-3 (25-50µm) kokristal örneğinin ise çözünme konsantrasyonu 0,0187±0,00020 mg/ml'ye ulaşmıştır.Kristal büyüklüğünün küçük boyutlarda sınırlandırılmasından dolayı aktif maddenin çözünme konsantrasyonu değerinin arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 5.23 : AFB-BA-03-1 (100-200 µm), AFB-BA-03-2 (50-100 µm), AFB-BA-05-1 (100-200 µm), AFB-BA-05-2 (50-100 µm) ve AFB-BA-05 (25-50 µm) kokristallerine ait çözünme konsantrasyonu.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kokristallerin farklı fiziksel özelliklerinin çözünme davranışına nasıl etki ettiği araştırılmıştır.

Mide sıvısının pH derecesine benzer asidik bir çözelti koşulu hazırlanarak çözünme çalışmaları yapılmıştır. Çözeltide yüzey aktif madde kullanılarak yüzey geriliminin azaltılması amaçlanmıştır.

Farklı şekil ve büyüklüklere sahip olan kokristal örnekleri kullanılarak çözünme analizi yapılmıştır. Kokristal örneklerinden seçilen bir örneğe öğütme işlemi yapılarak istenilen partikül boyutunu elde etmek için sıklıkla kullanılan bu yöntemin çözünmeye nasıl etki ettiği analiz edilmiştir. Öğütme işlemi ile kokristalin şekli tamamen değişmiştir. 25-50 µm kristal büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış olan AFB-BA-05-3 kokristal örneğinin 120 dakika sonunda ki çözünme konsantrasyonu 0,0187±0,00020 mg/ml, 50-100 µm kristal büyüklüğü aralığında sınırlandırılmış olan AFB-BA-05-2 kokristal örneğinin 120 dakika sonunda çözünme konsantrasyonu ise 0,0143±0,00029 mg/ml'dir. Bu konsantrasyon değerleri tüm kokristal örneklerinin 120 dakika sonundaki çözünme konsantrasyonundan daha fazladır. Bu da öğütme işleminin sadece partikül boyutunu küçültmediğini aynı zamanda yüzey alanını da arttırdığını göstermektedir.

25 µm'den küçük kristal taneleri içeren AFB-BA-02 ve AFB-BA-04 kokristallerinin 120 dakika sonunda ki çözünme konsantrasyonları sırasıyla 0,0129±0,00025 mg/ml ve 0,0121±0,00011 mg/ml'dir. Öğütme işlemi sonucu artan yüzey alanına rağmen AFB-BA-05-1 (100-200 µm) kokristal örneğinin 120 dakika sonunda ki çözünme konsantrasyonu büyük kristal tanelerinden dolayı AFB-BA-02 (<25 µm) ve AFB-BA-04 (<25 µm) kokristal örneklerinin çözünme konsantrasyonundan daha düşük olarak 0,0084±0,00020 mg/ml'ye ulaşmıştır. Literatürde benzeri görülen bir durum olan partikül boyutunun çok küçülmesi durumunda artan temas noktalarından dolayı çözünme artmaktadır.

Temel olarak benzer şekilde olan AFB-BA-01 (25-200 µm) ve AFB-BA-03 (25-200 µm) kokristal örneklerinde AFB-BA-01 (25-200 µm) kodlu bipiramit şeklinde ki kokristal örneğinin yüzeyinde ki çıkıntıların az olması çözünmeyi artırmıştır.

AFB-BA-03 (25-200 µm) kodlu kokristal örneğinde yüzeyinde ki çıkıntıların kümeleşmesi toplam yüzey alanıda azaltıcı etki yaptığı düşünülmektedir.

Kokristallerin çözünmesinin, kokristalin toplam yüzey alanına bağlı olarak değiştiğine literatürde yer verilmiştir. Buna sebeple çözünme konsantrasyonu değeri en fazla olan AFB-BA-05-3 (25-50µm) kokristal örneğinin toplam yüzey alanının en fazla olması beklenmektedir. Tüm kokristaller için toplam yüzey alanı ölçümü yapılarak çözünme konsantrasyonu ile kristalin toplam yüzey alanı arasında paralellik çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Kokristalin yüzey özellikleri ve büyüklükleri sadece çözünmeyi değil aynı zamanda kristalin tabletlenmesinde de etkilidir. Yüzey şekilleri daha düzgün olan ve küçük boyuttaki kristallerin tabletlenmesinin daha iyi olduğu, daha sıkı tabletlerin elde edildiği ve tablet ilacın yüzey alanının kokristallerin yüzey alanına bağlı olduğu bilinmektedir. Küçük kristal taneleri içermelerinden dolayı AFB-BA-02 (<25 µm), AFB-BA-04 (<25 µm) ve AFB-BA-05-3 (25-50 µm) kokristal örneklerinin tabletlenmeye uygun olması beklenmektedir. Tabletlenebilirlik performansı değerlendirilerek, yüksek çözünme konsantrasyonuna sahip olan kokristallerin tablet formunun stabilitesi ve kompaktlığı ileriki çalışmalar olarak değerlendirilmelidir.

Literatürde çözünme verilerinin ilacın biyoyararlanım performansı için iyi bir belirteç olduğuna değinilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların biyoyararlanım koşullarının tahmininde kullanıp kullanılamayacağını görmek için in vivo çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Çözünme konsantrasyonu fazla olan kokristal örneklerinde tabletmeye uygun olması durumunda biyoyararlanımın fazla olması beklenmektedir. In vivo çalışmaları ile parallelik sağlanır ise sedef hastalığının tedavisi için kullanılan bu aktif maddeye ait kokristallerden çözünme konsantrasyonu fazla olan formun ilaç formülasyonunda kullanılması aktif maddenin dozajını azaltarak tedaviye devam etmeyi vaat etmektedir. Hem hasta hem de ilaç şirketleri açısından yararlı olan bu durum için kokristallerin çözünmesinin değerlendirilmesi ilk aşamadır. İleriki çalışmalar ile bu çalışmadan elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak nihai ürün formülasyonunda yenilenme vaat edilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Jirát, J., Ondo D., Babor M., Ridvan L. & Šoóš M. (2019). Complex methodology for rational design of Apremilast-benzoic acid co-crystallization process. *International Journal of Pharmaceutics*, 570, 118639. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118639.

[2] Url-1 < https://gskpro.com/tr-tr/tedavi-alanlari/tr/dermatoloji/sedef-psoriasis-nedir./>, erişim tarihi: 16.11.2019.

[3] Iversen, L., Dauden, E., Segaert, S., Freeman, K., Magina, S., Rigopoulos, D. & Thaci, D. (2017). Reformulations of well-known active ingredients in the topical treatment of psoriasis vulgaris can improve clinical outcomes for patients - A Review. *Journal of the European Academy Dermatology and Venereology*, 31(8), 1271-1284. doi: 10.1111/jdv.14277.

[4] Deeks, E. (2015). Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Drugs*, 75(12), 1393–1403.

[5] Url-2 < https://www.registrarcorp.com/definitions/.>, erişim tarihi: 28.11.2019.

[6] Understanding Active Pharmaceutical Ingredients. (Agbenyega, J.). Erişim: 05 Ocak 2020, https://www.iucr.org/news/research-news/understanding-active-pharmaceutical-ingredients.

[7] Chan, E. J., Gao, Q., & Dabros, M. (2014)**.** Understanding the structure details when drying hydrate crystals of pharmaceuticals - Interpretations from diffuse scattering and inter-modulation satellites of a partially dehydrated crystal. *Acta Crystallographica Section B Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, 70(3), 555–567.

[8] Qiao, N., Li, M., Schlindwein, W., Malek, N., Davies, A. & Trappitt, G. (2011). Pharmaceutical cocrystals: An overview, *International Journal of Pharmaceutics*, 419(1-2), 1–11. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.037.

[9] Renkoğlu, P. (2010). *Polimorfizm gösteren etkin maddenin farmasötik kokristallerinin hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi üzerine çalışmalar.* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[10] Çelik, G. ve Birdane, Y.O. (2015). Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik - Derleme. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 8(1), 85–94.

[11] Stahly, G. P. (2009). A survey of cocrystals reported prior to 2000. *Crystal Growth and Design*, 9(10), 4212-4229 doi: 10.1021/cg900873t.

[12] Miroshnyk, I., Mirza, S. & Sandler N. (2009). Pharmaceutical co-crystals - An opportunity for drug product enhancement. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(4), 333-341 doi: 10.1517/17425240902828304.

[13] Zhang, G. G. Z., Henry, R. F., Borchardt, T. B. & Lou, X. (2007). Efficient co-crystal screening using solution-mediated phase transformation. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 96(5), 990-995. doi: 10.1002/jps.20949.

[14] Friščič, T. & Jones, W. (2009). Recent advances in understanding the mechanism of cocrystal formation via grinding. *Crystal Growth and Design*, 9(3), 1621-1637. doi: 10.1021/cg800764n.

[15] Friščić, T., Trask, A. V., Jones, W., & Motherwell, W. D. S. (2006). Screening for inclusion compounds and systematic construction of three-component solids by liquid-assisted grinding., *Angewandte Chemie International Edition,* 45, 7546-7550. doi: 10.1002/anie.200603235.

[16] Öztürk T. P. (2015). *Embriyo Atık Kültür Sıvısının Raman Spektroskopisi ile Analizi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[17] Li, S., Wu, X., Pan, Q., Cheng, Q., & Li, H. (2014). Comparison of the accuracy of powder and single-crystal X-ray diffraction techniques in determining organic crystal structure. *Chinese Science Bulletin,* 59(5-6), 497-501. doi: 10.1007/s11434-013-0074-8.

[18] Kamberi, M. & Tran, T.N. (2012). UV-visible spectroscopy as an alternative to liquid chromatography for determination of everolimus in surfactant-containing dissolution media: A useful approach based on solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 94-100. doi: 10.1016/j.jpba.2012.05.038.

[19] Gemperline, P. J., Cho, J., Baker, B., Batchelor, B. & Walker, D. S. (1997). Determination of multicomponent dissolution profiles of pharmaceutical products by in situ fiber-optic UV measurements. *Analytica Chimica Acta*, 345, 155-159. doi: 10.1016/S0003-2670(97)00095-0.

[20] Aljohani, M., Pallipurath, A. R., McArdle, P. & Erxleben, A. (2017). A comprehensive cocrystal screening study of chlorothiazide. *Crystal Growth and Design,*17(10), 5223–5232. doi: 10.1021/acs.cgd.7b00745.

[21] Chadha, R., Gupta, S. & Shukla, G. (2011). Crystal habit, characterization and pharmacological activity of various crystal forms of arteether. *Acta Pharmaceutica Sinica B,* 1(2), 129–135. doi:10.1016/j.apsb.2011.06.010

[22] Adhiyaman, R. & Basu, S. K. (2006). Crystal modification of dipyridamole using different solvents and crystallization conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, 321, 27–34. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.04.021.

[23] Url-3 < https://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/analysis.html>,erişim: 16.01.2020.

[24] Lavagnini, I. & Magno, F. (2006). A statistical overview on univariate calibration, inverse regression, and detection limits: Application to gas chromatography/mass spectrometry technique. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 1–18. doi: 10.1002/mas.20100.

[25] Dizaj, S. M., Vazifehasl, Z., Salatin S., Adibkia K., ve Javadzadeh K. (2015). Nanosizing of drugs: Effect on dissolution rate. *Research in Pharmaceutical Science,* 10(2), 95–108.

[26] Bukovec, P., Meden, A., Smrkolj, M. ve Vrečer, F. (2015). Influence of crystal habit on the dissolution of simvastatin single crystals., *Acta Chimica Slovenica*, 62(4), 958–966, doi: 10.17344/acsi.2015.1849.

[27] Tapas A., Kawtikwar P. ve Sakarkar D. (2012). An improvement of micromeritic properties and dissolution behaviors of carvedilol spherical agglomerates crystallized in presence of Inutec SP1., *Turkish Journal of Pharmacautical Science*, 9(1), 101–112.

[28] Blagden, N., de Matas, M., Gavan, P. T. & York, P. (2007). Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 617-630. doi: 10.1016/j.addr.2007.05.011.

[29] Bolourtchian, N., Nokhodchl, A. & Dinarvand, R. (2001) The effect of solvent and crystallization conditions on habit modification of carbamazepine. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1-2), 12-22.

[30] Sun, C., & Grant, D. J. W. (2001). Influence of crystal structure on the tableting properties of sulfamerazine polymorphs. *Pharmaceutical Research,* 18(3), 274–280.

[31] Ahmadpanah, S.J., Shahini, M., Ahari S.J. & Kakavand M. (2007). Study of parameters affecting the crystal size dıstrıbutıon of sodium chloride in bench scale crystallizers. *Petroleum&Coal*, 49(1), 54–60.

[32] Akrap, M., Kuzmanić, N. & Prlić-Kardum, J. (2010). Effect of mixing on the crystal size distribution of borax decahydrate in a batch cooling crystallizer. *Journal of Crystal Growth*, 312(24), 3603-3608. doi: 10.1016/j.jcrysgro.2010.09.023.

[33] Linga, Å. (2017). *Effects of Seeding on the Crystallization Behaviour and Filtration Abilities of an Aromatic Amine* (Master's thesis), Norwegian University of Science and Technology, Department of Chemical Engineering, Norway. https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/2461109.

[34] Mohammad, K. A., Rahim, S. A. & Abu Bakar, M. R (2017). Effect of Seed Loading and Temperature of Seeding on Carbamazepine-Saccharin Co-Crystal. *Indian Journal of Science and Technology*, 10(6), 1–5. doi: 10.17485/ijst/2017/v10i6/111137.

[35] Değim, Z. (2009). Öğütme. *Modern Farmasötik Teknoloji*, 2, 1–8.

[36] Serrano, D. R., O'Connell, P., Paluch, K. J., Walsh, D. & Healy, A. M. (2015). Cocrystal habit engineering to improve drug dissolution and alter derived powder properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(5), 665–677. doi: 10.1111/jphp.12476.

[37] Lau, E. (2001). Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. Ahuja, S. & Scypinski, S. (Ed.), *Preformulation studies (c.3*, 173-233). https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149639501800076?via%3Dihub

[38] Sareen, S., Joseph, L. & Mathew, G. (2012). Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. *International Journal of Pharmaceutical Investigation,* 2(1), 12-17.

[39] Cao, F., Amidon, G. L., Rodriguez-Hornedo, N. & Amidon, G. E. (2016). Mechanistic Analysis of Cocrystal Dissolution as a Function of pH and Micellar Solubilization. *Molecular Pharmaceutics*, 13(3), 1030–1046. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00862.

[40] Wang, F.Y., Zhang, Q., Zhang, Z., Gong, X., Wang, J.R. & Mei, X. (2018). Solid-state characterization and solubility enhancement of apremilast drug-drug cocrystals. *CrystEngComm*, 20(39), 5945-5948. doi: 10.1039/c8ce00689j.

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad **:** Sinem Elmas
Doğum Tarihi ve Yeri **:** 09.09.1995 / Kadıköy
E-posta **:** sinem95.12@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:** 2017, İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği
- **Yükseklisans** **:** 2020, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimya Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Ağustos – Aralık 2019, Watsons Türkiye, Kalite Güvence (MT Programı)
- Ekim 2017 – Ağustos 2018, Diversey Kimya, İş Geliştirme (Yarı Zamanlı)
- Haziran – Eylül 2016, Arçelik A.Ş, Ar-Ge Stajyeri