T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOTEKNOLOJİ UYGULAMASI İLE İLAÇ BİYOYARARLANIMININ ARTIRILMASINA YÖNELİK YAKLAŞIMLAR

Ecz. Tuğba GÜLSÜN

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Levent ÖNER

ORTAK TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. R. Neslihan GÜRSOY

ANKARA
2009

Sağlık Bilimler Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	
Tez Danışmanı:	Prof. Dr. Levent Öner (Hacettepe Üniversitesi)
Üye	Doç. Dr. Selma Şahin (Hacettepe Üniversitesi)
Üye	Doç. Dr. Nilüfer Yüksel (Ankara Üniversitesi)
Üye	Doç. Dr. R. Neslihan Gürsoy (Hacettepe Üniversitesi)
Üye	Öğr. Görv. Dr. Hakan Eroğlu (Hacettepe Üniversitesi)

ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve yönetim kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜRLER

Çalışmalarımı yönlendiren ve her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, büyük desteğini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Levent ÖNER'e, ilgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olan yardımcı danışman hocam Doç. Dr. R. Neslihan GÜRSOY'a ,

Çalışmalarım sırasında kullandığım ezetimib, 1-heptan sülfonik asit sodyum tuzu, asetonitrili sağlayan ve FT-IR analizinin yapılmasına olanak sağlayan Sanovel İlaç Sanayi ve Tic. Ltd. Şti.'ye, erime noktası tayininin yapılmasına olanak sağlayan ve yardımcı olan Ecz. (B.U.) Peri AYTAÇ'a, FT-IR spektrumunun yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Birsen TOZKOPARAN'a, Mass Spektrokospisi kullanımında yardımcı olan Prof. Dr. Erhan PALASKA'ya,

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan, sabrı ve sonsuz anlayışı ile bana güç ve destek veren Ecz. (B.U.) Elif AY, Dr. Ecz. Burcu SAYIN, Ecz. Mine SİLİNDİR, Uzm. Kim. Merve AYTEKİN, Ecz. Huriye DEMİR, Ecz. (B.U.) Pelin AKSUNGUR AYDIN, Dr. Ecz. Hakan EROĞLU, Yrd. Doç. Dr. Meltem ÇETİN, Bio. Raif Eren AYATA başta olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı elamanlarına,

Son olarak tüm yaşamım boyunca olduğu gibi bilim uzmanlığı tez çalışmam sırasında da daima yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen, bana inanan ve güvenen anneme, babama ve kardeşime,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

ÖZET

Gülsün, T. Nanoteknoloji Uygulaması ile İlaç Biyoyararlanımının Artırılmasına Yönelik Yaklaşımlar. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, 2009. Bu çalışmada nanoteknolojik yöntemler uygulayarak; suda çözünürlüğü az olan veya suda çözünmeyen ilaç etkin maddelerinin çözünürlüklerinin ve çözünme hızlarının, buna bağlı olarak biyoyararlanımlarının artırılması hedeflenmiştir. Nanokristal hazırlanması ile partikül büyüklüğünün küçültülmesi, buna bağlı olarak da partiküllerin yüzey alanındaki artış; çözünürlük, çözünme hızı ve biyoyararlanımda artışa neden olur. Tez çalışmamızda model ilaç olarak ezetimib kullanılmış ve bilyalı değirmen, ultrasonikasyon, yüksek hızda homojenizasyon, el homojenizatörü, birlikte çöktürme, etüvde kurutma, püskürterek kurutma yöntemleri ile ezetimibin nanokristal formülasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca, ezetimibin ve nanokristal formülasyonların karakterizasyonu FT-IR, DSC, X-ışını kırınımı analizi, partikül büyüklüğü tayini ile yapılmıştır. Hazırlanan nanokristal formülasyonlarından partikül büyüklüğü ve in vitro çözünme hızı deneyi sonuçlarına göre ultrasonikasyon, bilyalı değirmen ve püskürterek kurutma ile hazırlanan nanokristallerin tabletleri hazırlanmış ve in vitro çözünme hızı deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda nanokristal formülasyonlarının etkin maddenin çözünme hızını artırdığı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Nanoteknoloji, nanokristal, in vitro çözünme hızı, ezetimib, karakterizasyon.

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK, Proje No: 107S216 (SBAG-3710).

ABSTRACT

Gülsün, T. Approach to application of nanotechnology for improving drug bioavailability. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, M. Sc. Thesis in Pharmaceutical Technology, Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Program, Ankara, 2009. It is aimed to increase the solubility and the dissolution rate and therefore the bioavailability of poorly water soluble or insoluble active drug substances by using nanotechnological methods. One of the very common medhods is the preparing the drug nanocrystals by decreasing the particle size and increasing the surface area. In our studies ezetimib was used as a model drug and the nanocrystal formulations of ezetimib was prepared by using ball-mill, ultrasonic prob, ultra turrax, hand homogenizator, co-precipitation, heat drying and spray drying. Additionally, the formulation characteristics of ezetimib and nanocrystal formulations were determined by FT-IR, DSC, X-ray diffraction analysis, particle size analysis. Tablets were prepared containing ezetimibe nanocrystals formed by ultrasonic prob, ball-mill, spray dryer according to the results of particle size measurements and in vitro dissolution rates of the prepared nanocrystal formulations. As a result of these experiments it was found that the dissolution rate of the nanocrystal formulations were increased.

Key words: Nanotechnology, nanocrystal, in vitro dissolution rate, ezetimibe, characterization.

Supported by: The Scientific and Technological Research Council of Turkey, Project Number: 107S216 (SBAG-3710).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜRLER	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Nanoteknoloji ve Kullanım Alanları	3
1.2. İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler	4
1.2.1. Nanopartiküler Sistemler	4
1.3. Dislipidemiler	28
1.3.1. Birincil (ailevi) Dislipidemiler	29
1.3.2. Reaktif Fizyolojik Hiperlipidemiler	31
1.3.3. İkincil Hiperlipidemi Tipleri	32
1.4. Lipit Düşürücü İlaçlar	32

1.4.1. Statinler (HMG-CoA Redüktaz İnhibitörleri) 32

1.4.2. Fibratlar (Fibrik Asit Türevleri) 32

1.4.3. Reçineler (Safra Asidi Bağlayıcıları, SAB) 33

1.4.4. Nikotinik Asit (Niasin) ve Türevleri 33

1.4.5. Sitosterin 33

1.4.6. Kombine İlaç Tedavisi 33

1.5. Ezetimib 33

1.5.1. Fizikokimyasal Özellikleri 33

1.5.2. Farmakolojik Etki Mekanizması 34

1.5.3. Farmakokinetik Özellikleri 38

1.5.4. Toksisitesi 39

1.5.5. Dayanıklılığı 39

1.5.6. Ezetimibin Ticari Preparatları 39

1.6. Formülasyonda Kullanılan Yardımcı Maddeler 40

1.6.1. Pluronic F 127 (Poloxamer 407) 40

2. MATERYAL-METOD 42

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler, Malzemeler 42

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 42

2.1.2. Kullanılan Aletler 43

2.2. Yöntemler ve Deneyler 44

2.2.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 44

2.2.2. Ezetimibin Kromatografik Miktar Tayini 45

2.2.3. Çözünürlük Tayini 49

2.2.4. Nanokristal Hazırlama Yöntemleri 50

2.2.5. Tablet Formülasyonlarının Hazırlanması 52

2.2.6. Nanokristal Formülasyonlarının ve Tablet Formülasyonlarının Etkin Madde Tayini 57

2.2.7. Nanokristal Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 57

2.2.8. Çözünme Hızı Deneyi 58

3. BULGULAR 61

3.1. Ezetimibin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar 61

3.1.1. Ezetimibin FT-IR Spektrumu 61

3.1.2. Ezetimibin UV Spektrumu 63

3.1.3. Ezetimibin Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik Analizi 63

3.1.4. Ezetimibin X – Işını Kırınımı Analizi 63

3.1.5. Ezetimibin Erime Derecesi Tayini 70

3.1.6. Ezetimibin Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi 70

3.2. Ezetimibin Miktar Tayini 71

3.2.1.Kalibrasyon Doğrusu 71

3.2.2.Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 74

3.3. Çözünürlük Tayini 86

3.4. Nanokristal ve Tablet Formülasyonlarının Etkin Madde İçeriği 87

3.5. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 88

3.5.1. Formülasyonların FT-IR Spektrumları 88

3.5.2. Formülasyonların X – Işını Kırınımı Analizleri 91

3.5.3. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik Analizi 93

3.5.4. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi 95

3.6. Çözünme Hızı Deneyi 101

4. TARTIŞMA 113

5. SONUÇ 122

KAYNAKLAR 123

ÖZGEÇMİŞ 137

EKLER 138

SİMGELER VE KISALTMALAR

AUC	Plazma konsantrasyon-zaman eğrisinin altında kalan alan
BÇ	Birlikte çöktürme
BD-T	Bilyalı değirmen tablet - Ticari preparat
C_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu
CYP 450	Sitokrom P450
ÇO	Çözünme ortamı
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EH	El homojenizatörü
EK	Etüvde kurutma
EZE	Ezetimib
FDA	Amerikan ilaç ve gıda idaresi
FK	Fiziksel karışım
FT-IR	Fourier transform infrared spektrofotometresi
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HMG	3-hidroksi-3-metil glutarik asit
HMG-Co A	3-hidroksi 3-metil glutaril - koenzim A
LD_{50}	Medyan letal doz
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1

PVP	Polivinilpirolidon
SAB	Safra asidi bağlayıcıları
SCT	Salmon kalsitonin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SD-T	Püskürterek kurutma tablet - Ticari preparat
SS	Standart sapma
STC	Sodyum taurokolat
$t_{½}$	Yarılanma ömrü
t_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmak için geçen zaman
t_R	Alıkonma zamanı
UP	Ultrasonikasyon
UP-T	Ultrasonikasyon tablet - Ticari preparat
YHH	Yüksek hızda homojenizasyon
VK	Varyasyon katsayısı
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
$\overline{X}$	Aritmetik ortalama
λ_{maks}	Maksimum dalga boyu

ŞEKİLLER

		Sayfa
1. 1.	Nanokapsül yapısı	5
1. 2.	Nanoküre yapısı	6
1. 3.	Nanosünger yapısı	6
1. 4.	Nanoemülsiyon yapısı	7
1. 5.	Katı lipit nanopartikül yapısı	7
1. 6.	Lipozom yapısı	8
1. 7.	Niozom yapısı	9
1. 8.	Siklodekstrin ve inklüzyon bileşiklerinin yapısı	10
1. 9.	Oral yoldan alınan katı ilaçların emiliminin akışını gösteren şema	11
1. 10.	Bilyalı değirmen	17
1. 11.	Püskürterek kurutucu	20
1.12.	173º ve 90 º lik açılarda Log-bağıl şiddet-Partikül büyüklüğü grafiği (dalga boyu 633 nm, gerçek kırılma indisi 1.59;teorik kırılma indisi 0.001)	28
1. 13.	Ezetimibin kimyasal yapısı	34
1. 14.	Kolesterol emiliminin şematik gösterimi	37
3. 1.	Ezetimibin FT-IR spektrumu	62
3. 2.	Ezetimibin UV spektrumu	65

3. 3.	Ezetimibin DSC termogramı	66
3. 4.	Ezetimibin US 2006/0234996 A1 patentinde verilen DSC termogramı	67
3. 5.	Ezetimibin X-ışını kırınımı difraktogramı	68
3. 6.	Ezetimibin US 2006/0234996 A1 patentinde verilen X-ışını kırınımı difraktogramı	69
3. 7.	Ezetimibin Asetonitril:Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	71
3. 8.	Ezetimibin 0.01 M Sodyum Fosfat, pH 7.0/0.15% SDS içeren çözünme ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	72
3. 9.	Ezetimibin 0.05 M Asetat Tamponu, pH 4.5/0.15% SLS çözünme ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	72
3. 10.	Ezetimibin 0.05 M Asetat Tamponu, pH 4.5/0.45% SLS çözünme ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	73
3. 11.	Asetonitril:Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki ezetimibe (10 µg/ml) ait HPLC kromatogramı.	73
3. 12.	Pluronic F 127'ye ait HPLC kromatogramı	78
3.13	Laktoz monohidarat NF'e ait HPLC kromatogramı	79
3.14.	Mikrokristalin Selüloz NF'e ait HPLC kromatogramı	80
3.15.	Povidon (K29-32) USP'ye ait HPLC kromatogramı	81
3.16.	Kroskarmelloz Sodyum NF'e ait HPLC kromatogramı	82
3.17.	Sodyum Lauril Sülfat'a ait HPLC kromatogramı	83

3. 18.	Magnezyum Stearat'a ait HPLC kromatogramı	84
3. 19.	Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin, fiziksel karışımın ve yardımcı maddenin FT-IR spektrumları	90
3. 20.	Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin, fiziksel karışımın ve yardımcı maddenin X-ışını kırınımı difraktogramları	92
3. 21.	Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin, fiziksel karışımın ve yardımcı maddenin diferansiyel taramalı kalorimetre termogramları	94
3. 22.	Ezetimibe ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği	97
3. 23.	Birlikte çöktürme yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği	97
3. 24.	Etüvde Kurutma yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği	98
3. 25.	Yüksek Hızda Homojenizasyon Yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği	98
3. 26.	Fiziksel Karışıma ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği	99
3. 27.	Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği	99
3. 28.	Bilyalı Değirmen yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği	100
3. 29.	Püskürterek Kurutma yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği	100

3. 30. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 900 ml pH 7.0 0.01 M Sodyum Fosfat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları 103

3. 31. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları 105

3. 32. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları 107

3. 33. Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları 109

3. 34. Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları 111

TABLOLAR

Sayfa

2. 1.	Ezetimibin HPLC ile miktar tayinininde kullanılan kromatografik koşullar	46
2. 2.	Püskürterek kurutma cihazının deney koşulları	52
2. 3.	EP 1 353 696 B1 nolu patentte verilen ezetimib içeren tablet formülasyonunun içeriği	53
2. 4.	Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan nanokristal içeren tablet formülasyonunun içeriği	54
2. 5.	Bilyalı değirmen yöntemi ile hazırlanan nanokristal içeren tablet formülasyonunun içeriği	54
2. 6.	Fiziksel karışım içeren tablet formülasyonunun içeriği	55
2. 7.	Fiziksel karışım içeren tablet formülasyonunun içeriği	55
2. 8.	Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan nanokristal içeren tablet formülasyonunun içeriği	56
2. 9.	Çözünme hızı ortamları ve koşulları	59
3. 1.	Ezetimibin erime derecesi sonuçları	70
3. 2.	Ezetimibin Asetonitril: Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki 5 µg/ml, 20 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonları için doğruluk sonuçları	75
3. 3.	Ezetimibin Asetonitril: Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki 5 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonları için tekrar edilebilirlik sonuçları	76

3. 4.	Ezetimibin Asetonitril: Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki 5 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonları için tekrar elde edilebilirlik sonuçları	77
3. 5.	Ezetimibin Asetonitril: Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki dayanıklılığı	85
3. 6.	Ezetimibin 0.01M Sodyum Fosfat pH 7.0 / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamındaki çözünürlük testi sonucu	86
3. 7.	Ezetimibin 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamındaki çözünürlük testi sonucu	87
3. 8.	Ezetimibin 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamındaki çözünürlük testi sonucu	87
3. 9.	Nanokristal formülasyonlarının etkin madde içeriği sonuçları	88
3. 10.	Tablet formülasyonlarının etkin madde içeriği sonuçları	88
3. 11.	Etkin madde ve formülasyonların ortalama partikül büyüklükleri	96
3. 12.	Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 900 ml pH 7.0 0.01 M Sodyum Fosfat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları	102
3. 13.	Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları	104
3. 14.	Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları	106

3. 15.	Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları	108
3. 16.	Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları	110
3. 17.	Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin piyasa preparatı ile f_2 benzerlik faktörlerinin karşılaştırılması	112

GİRİŞ ve AMAÇ

Farmasötik alanda nanoteknoloji, insan sağlığının moleküler boyutta düzenlenmesinde kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin ilaç alanında yeni ve potansiyel uygulamaları; diyagnostik cihazların geliştirilmesi, ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturulması, gen tedavisi gibi konuları içermektedir. Diğer alışılagelmiş ilaçlara göre nanoteknoloji kullanılarak üretilen ilaçların üstünlükleri, temelde partikül büyüklüğüne dayanmaktadır. Nano boyuttaki ilaçlar, daha düşük derişimlerde kullanılmakta ve terapötik etkinin erken başlamasını sağlamaktadır.

Suda çözünürlüğü zayıf olan ilaçların partikül büyüklüğünü küçülterek nanokristallerini hazırlama tekniği son yıllarda hızla gelişen yöntemlerden biridir. Bu amaçla, etkin madde, su ve stabilizan (hidrofilik polimerler, iyonik olmayan sürfaktanlar, sterik stabilizanlar) kullanılarak kolloidal dispersiyon elde edilmekte, partikül büyüklüğünü küçültmek için bir işlem uygulandıktan sonra çözücü ya da dispersiyon ortamı değişik tekniklerle (liyofilizasyon gibi) uzaklaştırılmaktadır.

Tez çalışmamızda model ilaç olarak kullandığımız etkin madde (ezetimib, EZE), aterosklerozun tedavisinde ve önlenmesinde hipokolesterolemik ajan olarak kullanılmaktadır. Bağırsaktan seçici olarak sterol emilimini bozan inhibitörlerin geliştirilmesi, hiperlipidemi tedavisinde yeni ve önemli bir gelişmedir, ezetimib ise bu grubun ilk temsilcisidir.

Özellikle son yıllarda tedaviye sunulan etkin maddelerin büyük çoğunluğunun sudaki çözünürlüğü azdır. Buna bağlı olarak da bu maddelerin uygulamalarında biyoyararlanım sorunları sık karşılaşılan bir durumdur. Çalışmamızda kullandığımız ezetimib de suda çözünürlüğü hemen hemen hiç olmayan bir etkin maddedir. Ezetimib, biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre çözünürlüğü düşük, emilimi yüksek olan Sınıf II tipinde bir ilaçtır.

Bu tezin amacı, ezetimib nanokristallerinin hazırlanması ile partikül büyüklüğünün azaltılması ve buna bağlı olarak çözünürlüğünün ve çözünme hızının artırılmasıdır. Böylece etkin maddenin biyoyararlanım sorununun giderilmesi öngörülmektedir. Ayrıca, ezetimibin biyoyararlanımının artırılması, daha düşük

dozda tedaviyi mümkün kılacağından, yan etki ve toksisitenin de azalacağı düşünülmektedir.

Yukarıda bahsedilen hedeflere ulaşabilmek için ezetimibin değişik yöntemler kullanarak nanokristalleri hazırlanmıştır. Formülasyonlarda Pluronic F 127 yüzey etkin madde olarak seçilmiş, nanokristallerin karakterizasyonu ve in vitro çözünme hızı çalışmaları ile nanokristallerden hazırlanan formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmaları yapılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Nanoteknoloji ve Kullanım Alanları

Latince cüce kelimesinden türetilmiş olan nanoteknoloji; mühendislik, elektronik, fizik ve malzeme bilimlerinde mikron altı veya moleküler düzeydeki üretim alanlarında kullanılmaktadır. Nano boyuttaki materyaller bir cihaz, bir sistem, supramoleküler yapılar, kompleksler ya da bileşikler olabilir. Nanoteknoloji terimi, ilk defa 1959 yılında fizikçi Richard Feynman'ın malzeme ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi ile nano yapıların ölçülebileceği ve yeni amaçlar doğrultusunda kullanılabileceğini belirtmesiyle ortaya çıkmıştır. Albert Franks, bilim ve teknoloji alanındaki 0.1 nm ile 100 nm arasındaki büyüklükleri nanoteknoloji olarak tanımlamıştır (1, 2). Elan firması, US 7,101,576, WO 2006/074218, WO 09/666,539 numaralı patenlerinde 2000 nm ve altındaki partikül büyüklüğünü nanopartikül olarak tanımlamaktadır.

Nanoteknoloji; atomları ve molekülleri tek tek işleme ve yeniden düzenleme yoluyla kullanışlı materyal, araç ve sistem yaratma sanatı ve bilimi olarak da tanımlanmaktadır. Malzeme ve üretim sektörü, nano elektronik ve bilgisayar teknolojileri (fiber optik iletişim ağları), havacılık ve uzay araştırmaları, çevre ve enerji, tarım, kimya mühendisliği, savunma sektörü, biyoloji, biyoteknoloji, tıp ve sağlık sektörü nanoteknolojinin önemli kullanım alanları arasında yer almaktadır (3). Nanotıp ise, nanocihazlar ve nanoyapılar kullanarak, insan biyolojik sistemlerini moleküler boyutta izleme, tedavi etme ve yeniden yapılandırma bilimidir.

Nanoteknoloji sayesinde gen tedavisi, ilaç taşıyıcı sistemler, yeni ilaç keşfetme ve biyomedikal uygulama alanlarında da çok önemli gelişmeler sağlanmıştır (1). Farmasötik alanda nanoteknoloji, insan sağlığının moleküler boyutta düzenlenmesinde kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin ilaç alanında yeni ve potansiyel uygulamaları; diyagnostik cihazların geliştirilmesi, ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturulması ve gen tedavisi gibi konuları içermektedir. Diğer alışılagelmiş ilaçlara göre nanoteknoloji kullanılarak üretilen ilaçların üstünlükleri, temelde partikül büyüklüğüne dayanmaktadır. Nano boyuttaki ilaçlar, daha düşük miktarlarda kullanılabilmekte ve terapötik etkinin erken başlamasını sağlamaktadırlar (4).

Nanoteknolojiden yararlanılarak birçok ilaç taşıyıcı yeni sistem geliştirilmiştir, bu sistemlere ilişkin bilgi Bölüm 1.2.'de verilmiştir.

1.2. İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler

İlaç taşıyıcı yeni sistemler; yeni geliştirilen moleküllerin güvenlik ve etkinliğinin artırılması, bu sırada yan etkilerinin azaltılması, biyoyararlanım ve terapötik indeksinin artırılması ve hasta uyuncunun iyileştirilmesi için geliştirilmiş, bir bileşenin bir başka kimyasal ile bir ilaç uygulama aleti veya ilaç uygulama süreci ile salım hızını, dokulara salımını ya da her ikisini de kontrol eden sistemlere denilmektedir. İlaç taşıyıcı yeni sistemler; mikro ve nanopartiküler sistemler olarak iki grupta incelenebilir (5). Mikropartiküler sistemler; mikrokapsüller, mikroküreler ve mikrosüngerler olarak sınıflandırılmaktadır. Nanopartiküler sistemler ise; nanokapsüller, nanoküreler, nanosüngerler, nanoemülsiyonlar, katı lipit nanopartiküller, nanoveziküler sistemler (lipozomlar, niozomlar), moleküler sistemler (inklüzyon bileşikleri) ve nanokristaller olarak sınıflandırılabilir. Bu bölümde mikropartiküler sistemler üzerinde durulmamıştır. Tez konusu ile ilişkili olduğu için nanopartiküler sistemlerden kısaca bahsedilmiş, nanokristaller ise ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

1.2.1. Nanopartiküler Sistemler

Eczacılık alanında nanopartiküller 1976 yılında ilk olarak Speiser ve Brirenbach tarafından geliştirilmiş olup, antikanser ilaçlar ve aşı taşıyıcı sistemler olarak tasarlanmıştır (6). Nanopartiküller, büyüklükleri 10 – 1000 nm arasında olan, genellikle doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan polimerik partiküler sistemlerdir. Ayrıca, Elan Firması oral yolla uygulanan etkin maddeler için yaptıkları çalışmalarda aldıkları US 7,101,576, WO 2006/074218, WO 09/666,539 numaralı patentlerde 2000 nm ve altındaki büyüklükleri nanopartikül olarak kabul etmektedir. Nanopartiküllerde etkin madde çözündürülmüş, hapsedilmiş veya nanopartiküllerin yüzeyinde tutundurulmuş olabilir. Nanopartiküller; oral, nazal, topikal, pulmoner, parenteral, oküler ve bukkal yollardan uygulanabilir. Etkin madde taşıyıcı sistemi olarak hazırlanan ve kullanılan polimerik nanopartiküller pek çok üstünlüğü ile diğer kolloidal yapılı taşıyıcı sistemlerden ayrılmaktadır (5, 7, 8). Polimer kullanıldığında,

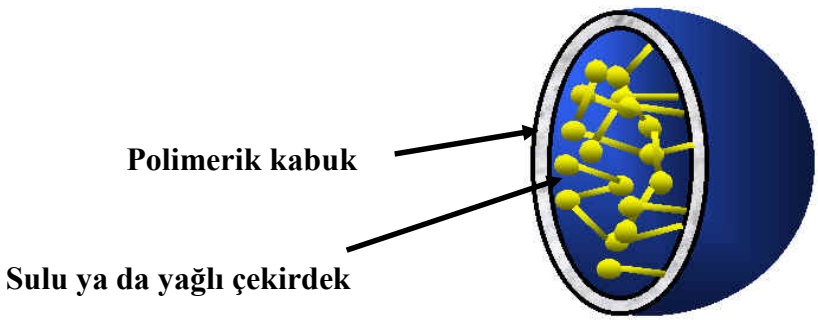
polimerik partiküler yapı etkin maddeyi parçalanmaya karşı korur. Üretim teknikleri genel olarak basit ve kolaydır. Nanopartiküllerin polimerik yapısı, etkin maddenin hücre veya dokulara hedeflendirilmesini ve kontrollü salımını sağlar. Kolaylıkla sterilize edilebilirler ve vücut sıvılarında kolayca parçalanabildikleri için toksik etkileri azdır. Kan düzeyinde oluşabilecek ani yükselmeleri önleyerek etkin maddenin yan etkilerinin azalmasına hatta etkinliğinin artmasına neden olur. Küçük partikül büyüklükleri ve geniş yüzey alanları nedeniyle etkin maddenin çözünürlüğü artacağı için küçük kapillere penetrasyon artar ve dolayısıyla biyoyararlanım yüksektir (8-14). Paklitaksel içeren Abraxane® piyasaya sunulan ilk nanopartikül dozaj şekli örneğidir.

Nanopartiküllerde aranan özellikler şunlardır;

- Yeterli derecede etkin madde yükleme kapasitesi olmalı,
- Kontrollü ve hedeflendirilmiş salım sağlamalı,
- Kullanılan polimer biyoparçalanabilir olmalı,
- Kullanılan polimer toksik özellik göstermemeli,
- Raf ömrü 30 °C'nin altında en az bir yıl olmalı,
- Parenteral uygulanacağı zaman sterilite sağlanmış olmalıdır (5).

1.2.1.1. Nanokapsüller

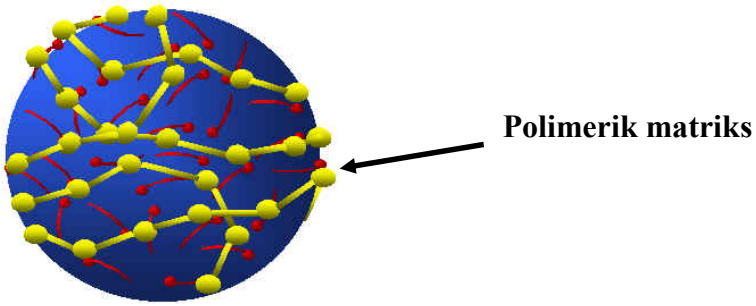
Nanokapsüller, genellikle yağ olan sıvı çekirdeğin polimerik bir kabuk tarafından sarılması ile oluşan veziküler sistemlerdir (Şekil 1.1) (8, 9, 15).



Şekil 1. 1. Nanokapsül yapısı (16).

1.2.1.2. Nanoküreler

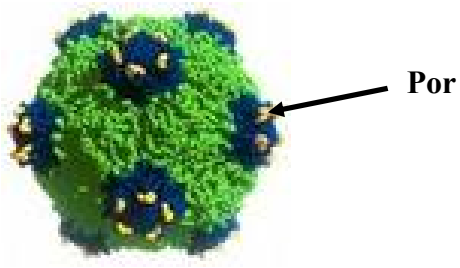
Nanoküreler, etkin maddenin polimer matriks içerisinde homojen bir şekilde dağıtılmasıyla oluşturulan sistemlerdir (Şekil 1.2) (9) .



Şekil 1. 2. Nanoküre yapısı (16).

1.2.1.3. Nanosüngerler

Üzerinde nano boyutta (0.7 – 1.2 nm) porları olan polimerlere nanosüngerler denilmektedir (Şekil 1.3) (17).

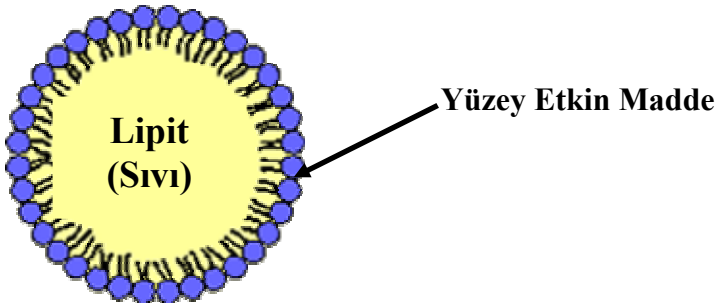


Şekil 1. 3. Nanosünger yapısı (18).

1.2.1.4. Nanoemülsiyonlar

Birbiri ile karışmayan iki sıvının oluşturduğu, damlacık boyutu makro emülsiyonlar ile mikro emülsiyonlar arasında olan (genellikle 50 – 200 nm)

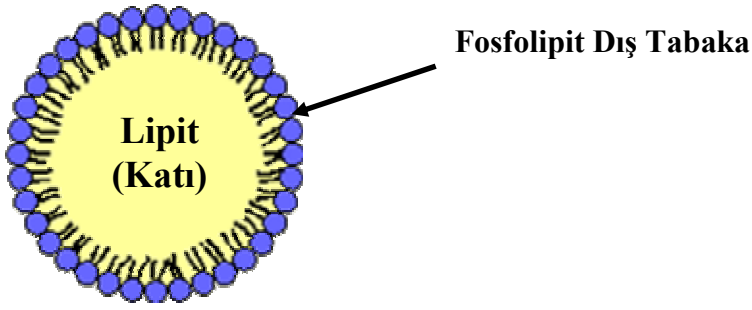
emülsiyon sistemlerine nanoemülsiyonlar denir (Şekil 1.4). Metastabil, saydam ya da yarı saydam sistemler olup, su, yağ, iyonik veya iyonik olmayan yüzey etkin madde ile yardımcı yüzey etkin maddeden oluşurlar. Çok düşük damlacık boyutu ile tanımlanabilen yağ/su veya su /yağ emülsiyonlarıdır (10, 11).



Şekil 1. 4. Nanoemülsiyon yapısı (12).

1.2.1.5. Katı Lipit Nanopartiküller

Yağ/su emülsiyonundaki sıvı yağın katı lipitle değiştirilmesi ile oluşan katı nanopartiküllerdir (Şekil 1.5). Katı lipit nanopartiküller hidrofobik bir çekirdek ve fosfolipit dış tabakadan oluşur (19).

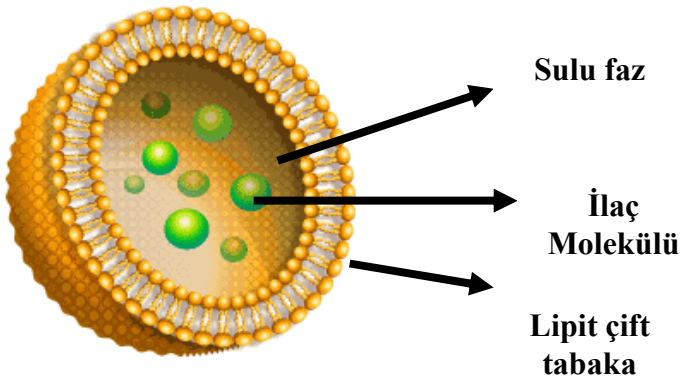


Şekil 1. 5. Katı lipit nanopartikül yapısı (12).

1.2.1.6. Nanoveziküler Sistemler

Lipozomlar

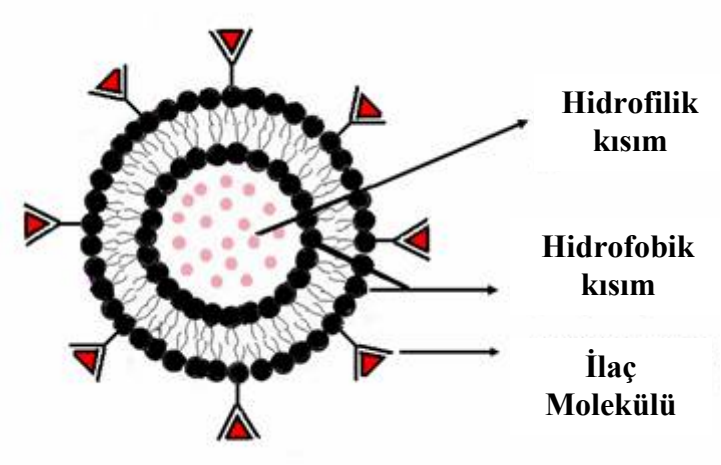
Tek veya çok sayıda lipit tabakası ve sulu fazdan oluşan küresel veziküllerdir (Şekil 1.6). Lipozomlar veya fosfolipid vezikülleri kendiliğinden bir araya gelen, doğal olarak oluşan ya da yapay olarak hazırlanan kolloidal partiküllerdir (20, 21). Doksorubisin (Doxil®), Daunorubisin (Daunoxome®) piyasada bulunan ve kanser tedavisinde kullanılan lipozom formülasyonlarına örnek olarak verilebilir.



Şekil 1. 6. Lipozom yapısı (22).

Niozomlar

Niozomlar, kolesterol ile bir veya daha fazla iyonik olmayan yüzey etkin maddenin oluşturduğu çift tabakalı yapıda sentetik veziküllerdir (Şekil 1.7) (23, 24).

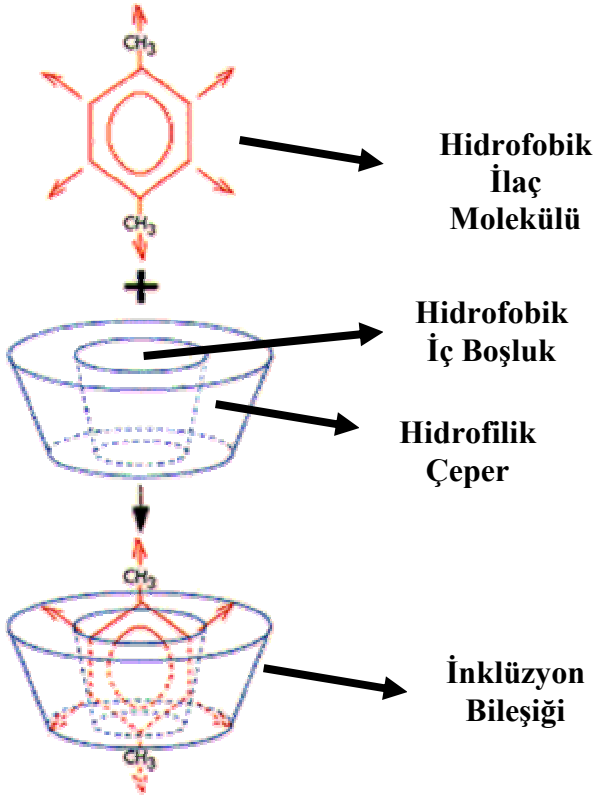


Şekil 1. 7. Niozom yapısı (25).

1.2.1.7. Moleküler Sistemler

İnklüzyon Bileşikleri

Siklodekstrinler glikozdan oluşan siklik oligomerlerdir ve iç boşluğu hidrofobik, dış yüzeyi hidrofilik özelliktedir. Yapılarının bu özelliği nedeniyle, lipofilik molekülleri ve amfifilik moleküllerin apolar kısımlarını iç boşluklarında hapsederek, onlarla inklüzyon bileşiği adı verilen kimyasal kompleksleri oluşturabilirler (Şekil 1.8). Siklodekstrinlerin kavitelerinin genişlikleri yapılarındaki glikoz sayılarına göre değişmekle birlikte genellikle nanometre boyutundadırlar (26-28). Analjezik- antienflamatuvar olarak kullanılan Cycladol® (piroksikam) piyasa preparatına örnek olarak verilebilir.

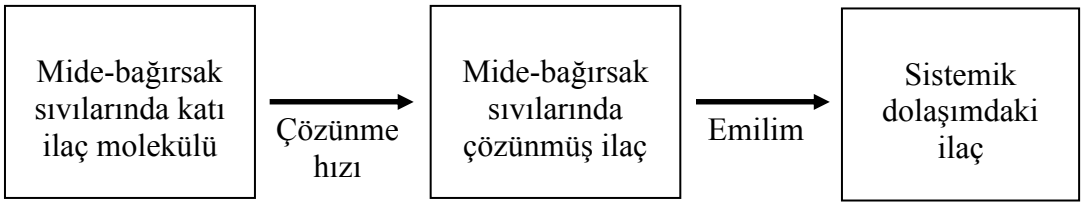


Şekil 1. 8. Siklodekstrin ve inklüzyon bileşiklerinin yapısı (29).

1.2.1.8. Nanokristaller

Oral yoldan alınan katı ilaçlar sistemik etki gösterebilmek için ince bağırsaktan emilmeden önce, mide-bağırsak ortamında çözünmelidirler (Şekil 1.9). Bu nedenle, ilaçların mide-bağırsak kanalında çözünme hızları ilaçların emilme hız ve derecelerini etkilemektedir. Bir ilaç etkin maddesinin emilimi, ilacın uygulandığı yerden kan ve lenf dolaşımına geçmesidir. Emilen miktar; etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine, farmasötik dozaj şeklinin özelliklerine ve fizyolojik etkenlere bağlıdır. İlaç etkin maddesinin mide-bağırsak kanalından tamamen emilmesi için tamamının çözünmesi gerekmektedir. Bir etkin maddenin sudaki ve vücut sıvılarındaki çözünürlüğünün bilinmesi formülasyon geliştirme çalışmaları için gereklidir, zira, sadece çözünmüş olan ilaç etkin maddesinin iyonik olmayan kısmı emilir ve dolaşıma geçerek vücutta etkisini gösterir. Kısaca, ilaç etkin maddesinin

biyoyararlanımı çözünürlüğü ile ilişkilidir. Diğer bir deyişle, suda çözünürlüğü az olan veya olmayan ilaç etkin maddelerinin oral biyoyararlanımlarının düşük olması beklenir (30, 31). Suda az çözünen ilaç etkin maddelerinin mide-bağırsak sıvılarında çözünmeleri uzun sürede gerçekleşecek, çözünme hızı düşük olacak, buna bağlı olarak da etkin madde tamamen çözünmeyeceğinden etkisini gösteremeyecektir. Nanokristal teknolojisi ile çözünen etkin madde miktarının artırılmasına bağlı olarak biyoyararlanım artırılmış olabilir. Yan etkiler ilaç derişimiyle genellikle orantılı olduğundan, etkin madde derişiminin azalması da hastalar için güvenilirliği artırabilir (32).



Şekil 1. 9. Oral yoldan alınan katı ilaçların emiliminin akışını gösteren şema (31).

İntrinsik çözünürlük, bir maddenin içinde çözündüğü çözücünün litresi başına mol sayısı olarak açıklanabilir. Çözücü ve çözelti arasındaki denge genellikle 25 °C'lik bir özgül sıcaklıkta sürdürülür. Birimler genellikle mol/L, mg/ml veya ppm olarak ifade edilir (13). Çözünürlüğü etkileyen birçok etken vardır. Bu etkenler; pH, yardımcı çözücü, yüzey etkin madde, sıcaklık ve partikül büyüklüğüdür. Bu etkenlerin değiştirilmesi ile etkin maddelerin çözünürlüğü değiştirilebilir.

Çözünme hızı ise, birim zamanda oral katı dozaj şeklinden çözünerek çözünme ortamına geçen etkin madde miktarıdır ve dinamik bir olaydır. Çözünme hızı ilk defa Noyes- Whitney tarafından 1897 yılında tanımlanmıştır. Çözünme hızını etkileyen faktörler ise; karıştırma, sıcaklık, viskozite, yüzey etkin maddeler, kristal şekli, ortamın pH'sı ve partikül büyüklüğüdür (30, 33).

$$\frac{dW}{dt} = \frac{DA(C_s - C)}{L} \qquad (1.1)$$

dW/dt = Birim zamanda çözeltiye geçen katı miktarı (çözünme hızı)

D= Etkin maddenin difüzyon katsayısı

A= Etkin maddenin yüzey alanı

C_S = Katı maddenin çözünme ortamındaki doygunluk derişimi

C= t zamanında çözeltideki etkin madde derişimi

L= Difüzyon tabakasının kalınlığı

Noyes-Whitney eşitliğine göre çözünme hızı, ortamla temas halinde bulunan etkin maddenin yüzey alanı ile doğru orantılıdır (Formül 1.1). Etkin madde partikül büyüklüğündeki değişime bağlı olarak spesifik yüzey alanı da değişeceğinden, ilacın vücut sıvılarında çözünme hızı değişir (Formül 1.2). Bu temel bilgilerden hareketle, çözünürlüğü az olan etkin maddelerin çözünme hızları ve biyoyararlanımları partikül büyüklüğü küçültülerek artırılabilir.

$$Sw = 6 / \rho . d \qquad (1.2)$$

Eşitlikteki,

Sw= spesifik yüzey alanı

ρ= partiküllerin gerçek dansitesi

d= partikül çapı

Yeni keşfedilen birçok ilaç, çok düşük çözünürlüğe ve buna bağlı olarak da düşük oral biyoyararlanıma sahiptir. Günümüzde kullanımda olan ilaç etkin maddelerinden % 40'ının, araştırma aşamasında olanların ise % 60'ının sudaki çözünürlüğü çok düşüktür (34 – 36). İlaç etkin maddelerinin % 40'ından fazlasının sudaki çözünürlüğü düşük olduğu için kullanımlarında sorunlar yaşanmaktadır. Çözünürlükleri az olan ilaçların çözünme hızları artırıldığında biyoyararlanımları olumlu etkilenecektir. Suda çözünürlüğü az olan ilaçlar, genellikle hastalar arası

değişkenlik ve bireysel olarak hastalarda dozlamayı takiben kararsız emilim gibi ciddi olumsuz klinik etkiler gösterirler. İlaç emiliminden önce etkin madde dozaj şeklinden salınmalıdır ve mide-bağırsak ortamında çözünmelidir. Yüksek geçirgenlik ve düşük çözünürlüğe sahip olan ve BCS'ye göre Sınıf II'de yer alan ilaçlar kolayca çözünmezler (37) ve bu yüzden yeterli derecede emilemeyebilirler. Mikron boyutundan daha küçük partiküller formüle edilerek yüzey alanı artırılabilir ve böylece çözünme hızı, dolayısıyla biyoyararlanım artırılabilir (38, 39).

Bir etkin maddenin geçirgenliği doğrudan insan bağırsak membranından gerçekleşen kütle transferine ya da dolaylı olarak insanlardan etkin maddenin emilme derecesine dayanmaktadır. Bu ölçüt, farmakokinetik çalışmalarla saptanır ve verilen dozun absorpsiyon derecesi % 90 ya da fazlası ise o etkin maddenin yüksek geçirgenlik gösterdiği kabul edilir (40). Tez çalışmamızda kullandığımız ezetimib Sınıf II bir ilaç olduğu için düşük çözünürlüğe ve yüksek geçirgenliğe sahiptir.

Yukarıda da belirtildiği gibi sudaki çözünürlüğü az olan moleküllerin alışılagelmiş yöntemler kullanarak üretilen formülasyonlarında, gerek klinik öncesi çalışmaları gerekse klinik çalışmalarında yüksek değişkenlik gözlenmektedir. Bu tür etkin maddelerle hazırlanan dozaj şekilleri genellikle hastanın açlık ve tokluk durumundan da etkilenirler. Bu da, uygun olmayan dozlamaya ve düşük biyoyararlanıma neden olur (14, 41, 42). Bu sorunları ortadan kaldırmak için; formülasyonun pH'sı, yüzey etkin madde eklenmesi (43), yardımcı çözücü etkisi, dielektrik sabiti, kompleks oluşumunun etkisi (44), kimyasal olaylar ve partikül büyüklüğü (45) araştırılmalıdır. Oral biyoyararlanımı artırmak için bazen mikron düzeyine inmek yeterli olmayabilir; bu nedenle, bir sonraki aşama olan nano düzeyine inmek gerekebilir. Yardımcı çözücü eklenmesi, siklodekstrinler, intravenöz uygulama için yağ/su emülsiyonlar hazırlanması gibi teknikler suda çözünürlüğü az olan ilaçlar için geliştirilen yöntemlerdir, ancak bu yöntemler, etkin maddelerin belirli fizikokimyasal özelliklere sahip olmasından dolayı sınırlı kullanıma sahiptir (örneğin, siklodekstrinin konik yapısı içinde sabitlenmesi için uygun moleküler ağırlığa sahip olması gibi) (34). Çözünme hızını artırmak için uygulanan yöntemlerden biri de amorf katı dispersiyonların hazırlanmasıdır (46). Teorik olarak bu sistemler, çözünme hızını artırmak için uygun yöntemlerden biridir, ancak amorf

durumdaki moleküller termodinamik olarak dayanıklı değildirler; saklama sırasında kristal şekle dönüşebilirler (47, 48). Bu dönüşüm, istenmeyen bir durumdur çünkü amorf yapıdan kristal yapıya geçişle birlikte çözünme hızı tamamen değişebilir. Öte yandan, ilaç nanokristalleri hazırlanabilirse kristal fazın dayanıklı olmasına bağlı olarak bir üstünlük sağlanmış olacaktır. Nanokristal teknolojisi, çözünme hızını katı dispersiyonlardaki gibi amorf yapısından dolayı artırmamakta, kristal yapılı etkin maddenin partikül büyüklüğünü nano boyuta indirerek yüzey alanının artırılmasına bağlı olarak çözünme hızında da artmaya neden olmaktadır (49).

Nanokristal dispersiyonları su, etkin madde ve stabilizandan oluşurlar. Eğer gerekirse tampon, tuz, şeker gibi diğer yardımcı maddeler de eklenebilir. Hazırlanmaları sırasında stabilizan kullanılarak etkin madde partiküllerinin tekrar bir araya gelmesi engellendiği için dayanıklı sistemlerdir (50). Genellikle, ilaç nanokristalleri sıvı dispersiyon ortamlarında üretilirler (çöktürme (51), dağılma yöntemlerinde olduğu gibi). Etkin madde nanokristallerinin sıvı içindeki süspansiyonları yüzey etkin madde veya polimer ile dayanıklı hale getirilebilir. Mikronize ilaçların aksine nanokristaller birçok yoldan uygulanabilirler. Süspansiyon şeklinde oral alımları mümkündür, ayrıca tablet, pellet veya kapsül içinde verilebilirler. Partikül büyüklüğünün çok küçük olması nedeniyle nanosüspansiyonlar intravenöz yoldan da uygulanabilir ve bu şekilde % 100 biyoyararlanım sağlanabilir.

Nanokristal Hazırlamak İçin Kullanılan Yöntemler

Bu tez kapsamında; etüvde kurutma, birlikte çöktürme, püskürterek kurutma, bilyalı değirmen, homojenizasyon, yüksek hızda homojenizasyon ve ultrasonikasyon gibi yöntemler kullanılarak ezetimibin nanokristalleri hazırlanmıştır.

Günümüzde uygulanmakta olan nanokristal hazırlama yöntemleri, “aşağıdan yukarıya” ve “yukarıdan aşağıya” formatında incelenebilir. “Aşağıdan yukarıya” teknolojisi molekülle başlar; etkin madde çözücü eklenerek çözündürülür ve çözücü uçurularak çöktürülür. “Yukarıdan aşağıya” teknolojide ise, değişik tipte değirmenlerin kullanıldığı dağıtma yöntemleri uygulanmaktadır. Çöktürme yöntemlerine örnek olarak; Sucker tarafından geliştirilen Hydrosols ve Soliqs/Abbott

tarafından üretilen Nanomorph^{TM} verilebilir (34, 52). Bu yöntemin esası, ilacın bir çözücüde çözündürülmesine ve çözeltinin bir nonsolvente eklenmesine dayanır. Çöktürme tekniğinin temel üstünlüğü, basit ve düşük maliyetli olmasıdır; bu yöntemde ölçek büyütme çalışmaları da basittir, ölçek büyütme çalışmalarında statik karıştırıcılar ya da mikrokarıştırıcılar kullanılır. İlaç nanokristallerini oluşturmak için iki ana dağıtma tekniği vardır. Bu tekniklerden biri, bilyalı değirmen yöntemi, diğeri ise değişik homojenizasyon tipleri ile yüksek basınçlı homojenizasyondur.

Nanokristal formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan polimerler ya da yüzey etkin maddeler, ilaç nanokristallerinin üzerine tutunup sterik engel oluşturarak stabilizasyonu sağlar. Jonghwii Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, nanokristalleri hazırlanarak partikül büyüklüğü azaltılan yedi farklı etkin maddenin, iki farklı stabilizan olan polivinilpirolidon ve hidroksipropil selüloz ile etkileşmeleri, yüzey enerjileri ve partikül büyüklükleri incelenmiştir. Sonuç olarak, stabilizanlarla ilaç etkin maddelerinin arasındaki etkileşmenin karmaşık olduğu ve fonksiyonel grupların varlığı ve yüzey enerjileri gibi birçok değişkene bağlı olduğu saptanmıştır (53). Stabilizan derişimi iyi şeçildiği zaman nanokristaller genellikle fiziksel olarak dayanıklı formülasyonlardır, seçilen stabilizan etkin madde kristallerinin yüzeyinin etkin bir şekilde çözücü ile ıslanmasını sağlamalıdır ve sterik engel oluşturmalıdır. Selüloz türevleri, poloksamerler, polisorbatlar, povidonlar gibi yaygın olarak kullanılan yardımcı maddeler, nanopartiküler dispersiyonlarda fiziksel stabilite oluşturmada uygun stabilizanlardır (14, 34).

Öğütme ile Nanokristal Hazırlanması

Eczacılıkta kullanılan aletler ve uygulanan işlemlere göre kesme, parçalama, ezme, dağıtma, ufalama ve toz etme ile kimyasal maddeler veya droglar istenilen partikül büyüklüğüne getirilebilir. Partikül büyüklüğü ve dağılımı eczacılık alanınında formülasyon geliştirme aşamasında oldukça önemlidir. Öğütme işlemi ile partiküller aynı büyüklüğe getirildiğinden karıştırma işlemi daha kolaylaşır, akış özellikleri düzelir, tablet basımı kolaylaşır (54).

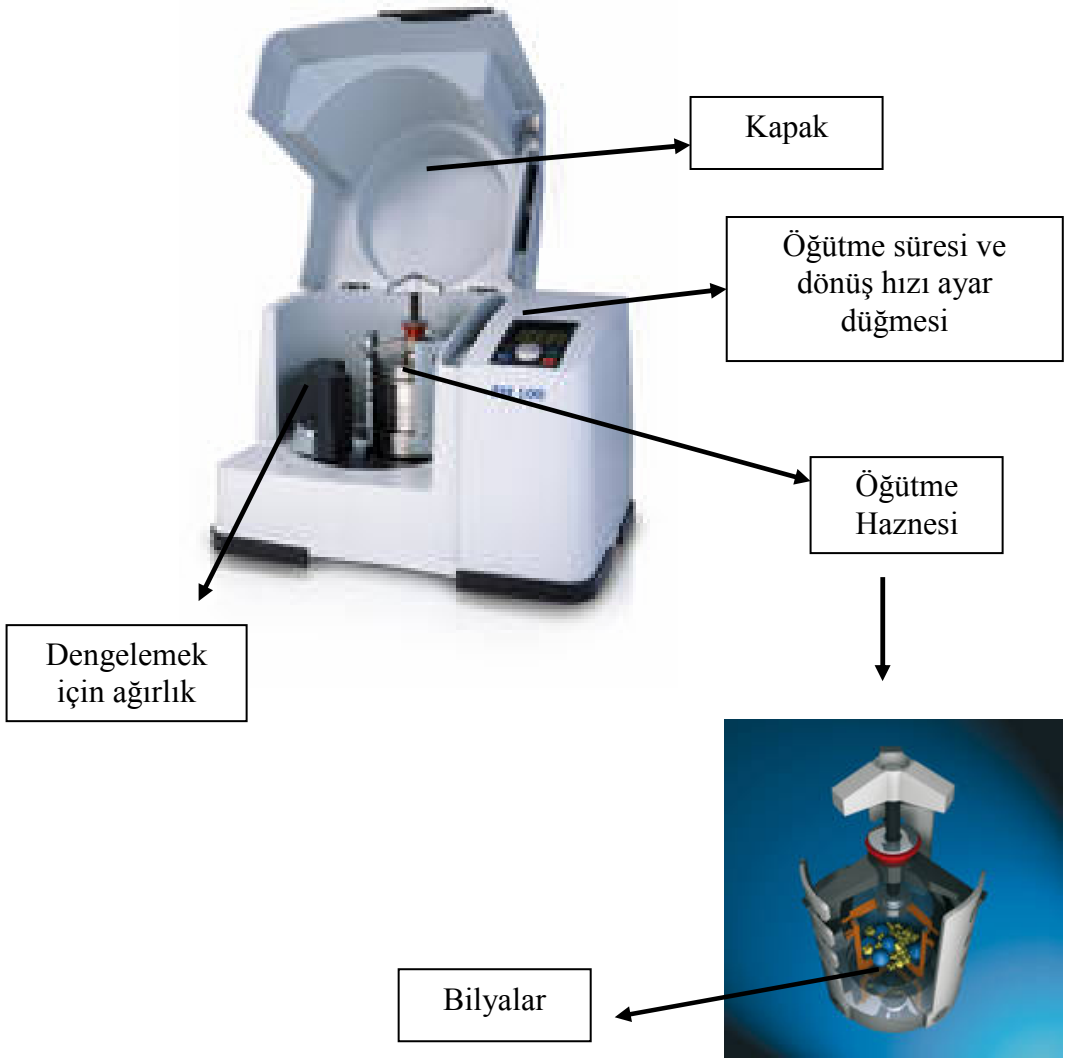
Öğütmede kullanılan alet ve öğütülen materyalin tipine göre, öğütücüler ve partikül büyüklüğü arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir (30, 33).

• **Kaba öğütme yapan öğütücüler (Çekiçli eziciler, Dönen eziciler):** Öğütülen partiküllerin parçacık büyüklükleri 840 μm (20 mesh)'den daha büyüktür.

• **Orta derecede öğütme yapan öğütücüler (Dönen kesiciler, Çekiçli ve dönen değirmenler, ezici değirmenler):** Öğütülmüş partiküllerin parçacık büyüklükleri 74 – 840 μm (200 – 20 mesh) arasındadır.

• **İnce derecede öğütme yapan öğütücüler (Çekiçli değirmenler, bilyalı değirmenler, dağıtıcı değirmenler, dövücü değirmenler, jet değirmenleri ve kolloit değirmenler):** Öğütülmüş partiküllerin parçacık büyüklükleri 74 μm (200 mesh)'den daha küçüktür (30, 33).

Nanokristal hazırlama yöntemlerinden biri olan öğütme işlemini gerçekleştirebilmek için değişik öğütücüler kullanılabilmektedir. Deneylerimiz sırasında kullandığımız bilyalı değirmen Şekil 1.10'da gösterilmiştir.



Şekil 1. 10. Bilyalı değirmen (55).

Bilyalı değirmenlerin içerisinde değişik boyutlarda bilyalar ya da küçük toplar bulunmaktadır. Öğütücü hazne paslanmaz çelik, porselen veya sert malzemeden, içindeki bilyalar ise porselen, cam, zirkon oksit, paslanmaz çelik, krom, agat veya özel polimerlerden üretilmiş malzemelerden yapılmıştır. Bu bilyaların yapıldığı malzemenin cinsi oldukça önemlidir. İlaç etkin maddeleriyle etkileşimi en az düzeyde olan agat olduğu için, çalışmamızda da farklı boyutlarda ve farklı sayılarda agat bilyalar kullanılmıştır. Bilyalı değirmenlerde öğütme üzerinde en önemli etkenlerden biri de bilyaların büyüklüğüdür. Küçük çaptaki bilyalarla öğütme süresi uzarken daha küçük partiküller elde edilir. Bilyalı değirmenlerin

çalışma mekanizmasına bakıldığında; öğütme haznesi döndürüldüğünde bilyalar da dönmektedir ve bu işlemin sonucunda tozların partikül büyüklükleri mekanik enerji uygulanması ile küçülmektedir. Bilyaların çapları ve sayıları değiştirilerek partikül büyüklüğü ayarlanabilir. Bu değirmenlerin çalışmasında öğütme haznesinin dönüş hızı oldukça önemlidir. Eğer dönüş hızı çok düşük olursa, bilyalar tam dönemeyeceğinden tam öğütme yapılamaz. Dönüş hızı çok yüksek olursa merkezkaç kuvvetinden dolayı bilyalar silindirin kenarında kalacağından ve tozların üzerine düşmeyeceğinden öğütme gerçekleşemez. Ayrıca, öğütme haznesine konulacak bilyaların hacminin, öğütme haznesi hacminin % 30 – 50'si arasında olmasına dikkat edilmelidir (33). Bilyalı değirmen yönteminde; değirmen ilaç makrosüspansiyonu ve değirmen bilyaları ile doldurulur; etkin madde, bilyaların belli hız ve sürede dönmesi sonucunda nanokristale dönüşür. Bu yöntem, G. Liversidge ve arkadaşlarının geliştirdiği ve Elan firmasının kullandığı basit bir yöntemdir. Bu yöntemin kullanıldığı ve piyasada yer alan ilk ilaçlar Rapamune® tablet (2002) ve Emend® kapsül (2003)'dür (Nanocrystal®). Bu yöntemdeki başlıca sorun; bilyaların ya da haznenin aşınması sonucu ürünün kontamine olabilmesidir. Bu nedenle, öğütme süresi ve öğütme materyali çok dikkatli seçilmelidir. Yüzey etkin madde veya polimer kullanarak bu etkileşme en az düzeye indirilebilir.

Bilyalı değirmen yöntemi ile suda az çözünen ilaç etkin maddelerinin partikül büyüklüğü, genellikle 1000 nm altına kadar azaltılabilir. Bu ilaç etkin maddeleri; tablet, kapsül, injeksiyon için steril şekiller ve inhalasyonlar gibi yaygın dozaj şekilleri halinde tedaviye sunulur (32).

Öğütme yöntemi ile hazırlanan nanokristal içeren formülasyonlarda ilaç etkin maddelerinin partikül büyüklüğü azaldığı ve yüzey alanı arttığı için, çözünme hızı ve biyoyararlanımlarının arttığı da gözlenmiştir (14, 39, 56 – 58).

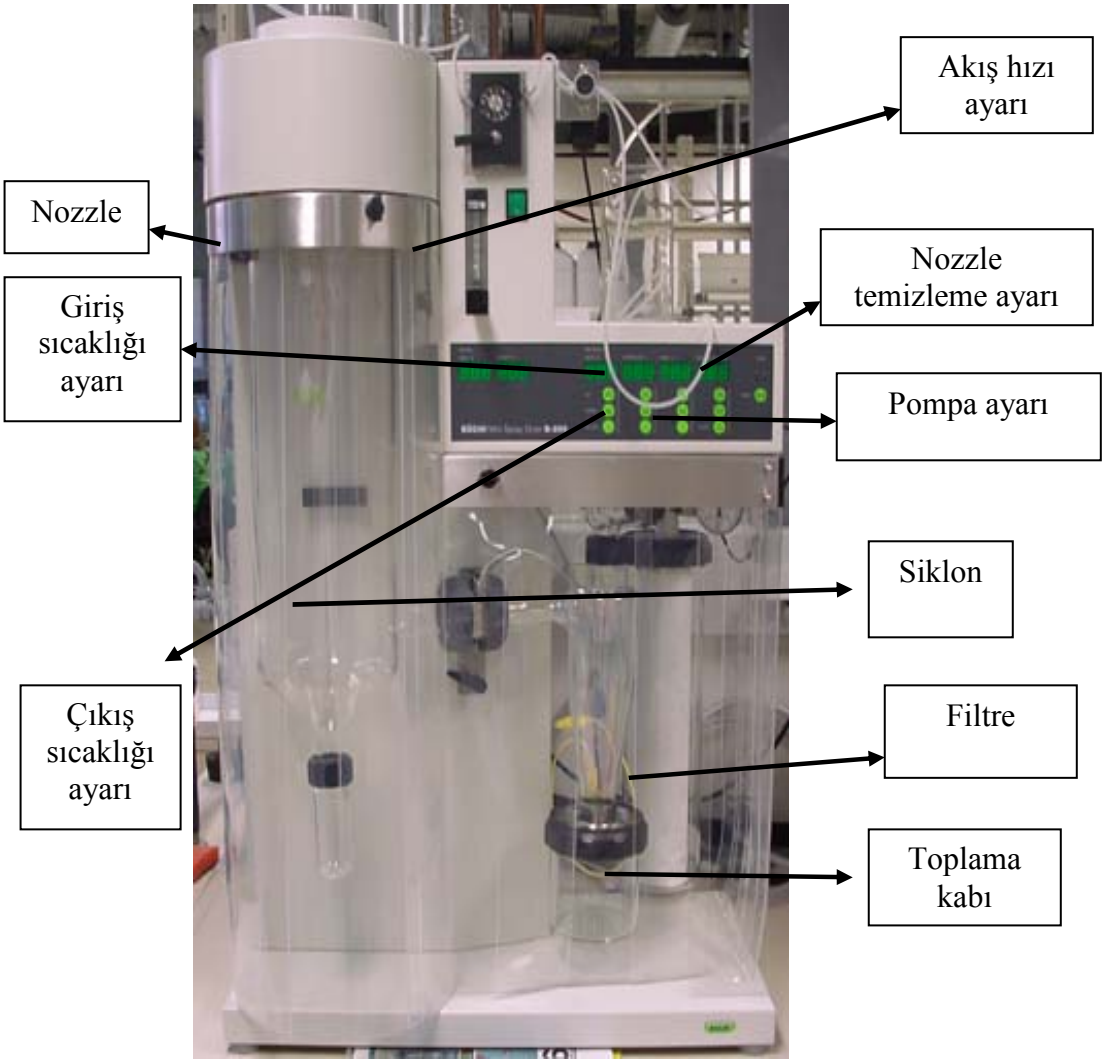
Liversidge ve arkadaşlarının araştırmalarında, naproksenin partikül büyüklüğü değirmen yöntemiyle azaltılarak mide tahriş edici etkisinin azaldığı saptanmış, emilme hızının konvansiyonel formülasyonlara göre dört kat daha fazla olduğu bulunmuştur (57).

Kimura ve arkadaşlarının çalışmalarında, silostazol süspansiyonu çekiçli değirmen ve jet değirmen kullanılarak öğütülmüş, silastazolün köpeklerdeki biyoyararlanımına partikül büyüklüğünün etkisi incelenmiştir. Uzatılmış mide boşalması, safra salgısının artması, mide pH'sının artması (asidik ilaçlar için), karın iç organı kan hızının ve gastrik sıvı hacminin artması gibi nedenlerin yanında, aç ya da tok ilaç alınmasının çözünme hızını etkilediği ve oral biyoyararlanımı değiştirdiği bulunmuştur. Ayrıca, standart yüksek yağlı bir kahvaltı etkin maddenin emilimini artırmış, bu artış maksimum plazma derişiminde yaklaşık % 91, eğri altındaki alanda ise (AUC) yaklaşık % 24 olmuştur. Silostazol % 16.5 hidroksipropil selüloz ve % 0.8 dokusat sodyum içinde disperse edilmiş ve püskürterek kurutma işlemi uygulanmış ve kurutulmuş toz ıslak değirmenle öğütülmüştür. Püskürterek kurutulmuş silostazol nanokristallerinin suda, taklit edilmiş mide ve bağırsak sıvılarında yeniden dağılabilirliğinin mükemmel olduğu görülmüştür. X-ışını analizleri, silostazolün kristal şeklinin değirmen kullanıldığında bozulmadığını göstermiş, değirmenle işlem sonucu hiçbir kimyasal değişim bulunmamıştır. Jet değirmenle öğütülen silostazolün partikül büyüklüğü 2.4 μm, çekiçli değirmenle öğütüldüğünde 13 μm ve nanokristal formülasyonunda ise 0.22 μm bulunmuştur. İn vitro çözünme hızında ise partikül büyüklüğünün azalmasına bağlı olarak artış saptanmıştır. Bu çalışmada, nanokristal formülasyonunda etkin maddenin biyoyararlanımı üzerine açlık ve tokluk durumunun etkisinin olmadığı da belirtilmiştir (39).

Püskürterek Kurutma ile Nanokristal Hazırlanması

Tez çalışmamızda kullandığımız bir diğer yöntem ise, püskürterek kurutmadır ve laboratuarda kullandığımız püskürterek kurutucu Şekil 1.11'de gösterilmiştir. Püskürterek kurutma yöntemi, genellikle çözeltilerin ve süspansiyonların kurutulmasında kullanılmaktadır. Konik veya silindirik bir kurutma kazanında, yukarıdan aşağıya doğru püskürtülen çözelti damlacıkları, aynı yönden gelen sıcak hava içinde her biri birer küresel partikül olacak şekilde kurur. Püskürtme, hızla dönen ve merkezkaç etkisi ile çözeltinin çok küçük damlacıklar halinde saçılmasını sağlayan püskürtücü ile yapılır. İçteki tüpe peristaltik pompa ile debisi ayarlanan çözelti gönderilirken, dıştaki tüpe, basıncı ayarlanabilir azot ya da hava gönderilerek uçtaki memeden püskürtme sağlanır. Püskürtme nedeniyle çok küçük damlacıklar

haline gelen kurutulacak maddenin yüzey alanı arttığından hızlı bir kurutma sağlanır. Püskürterek kurutma aletinde; kurutulan madde, kurutucu hava ve çözücü buharı ile birlikte içteki boruya teğet yaparak siklon ayırıcıya hızla girer. Merkezkaç kuvveti ile tozlar, ayırıcının iç çeperine doğru hızla savrulur ve buradan akarak toplama kabında birikir. Püskürterek kurutma kesintisiz devam ettiğinden üretim süreklidir. Çözeltinin derişimi, viskozitesi, sıcaklığı ve püskürtme hızı denetlenebildiğinden, işlem; partikül büyüklüğü, akıcılık ve kurutma hızı açısından optimize edilebilir. Püskürterek kurutma sonucu oluşan tozlar küresel olduğundan akışkanlığı iyidir ve küme dansiteleri bu nedenle yüksektir. İşlem sırasında, kurutma süreci hızlı olduğundan ve sıcaklık ayarlanabildiğinden ısıya dayanıklı maddelerin kurutulması için uygun bir yöntemdir (33).



Şekil 1. 11. Püskürterek kurutucu (59).

Yapılan bir çalışmada, hidrokortizonun değişik oranlarda polivinilpirolidon (PVP) ilavesiyle hazırlanan katı dispersiyonlarının; püskürterek kurutma, birlikte çöktürme, süperkritik karbondioksit gaz antisolvan yeniden kristallendirme teknikleri (supercritical carbon dioxide anti-solvent recrystallization process, GAS) ve fiziksel karışımlarının çözünme profilleri karşılaştırılmıştır. PVP oranı artırıldığında tüm formülasyonlarda çözünme hızının arttığı gözlenmiştir ve ayrıca fiziksel karışıma kıyasla her üç yöntemde de çözünme hızları artmıştır (60).

Başka bir çalışmada, COX-2 inhibitörü bir etkin madde ve poloksamer 50:50 oranında karıştırılmış ve püskürterek kurutulmuştur. Elde edilen nanokristalin biyoyararlanımı, aynı etkin maddenin çözündürülmüş şekli ve mikronize edilmiş şeklinin biyoyararlanımları ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, püskürterek kurutulan formülasyonun AUC'si 28961 ng.saat/ml olarak bulunurken, Nanocrystal®'in 28613 ng.saat/ml, mikronize ilacın 19870 ng.saat/ml ve çözündürülmüş ilacın ise 21212 ng.saat/ml olarak bulunmuştur (61).

Ultrasonikasyon (UP) Kullanılarak Nanokristal Hazırlanması

Tez çalışmamızda nanokristal hazırlamak için kullandığımız diğer yöntem ise ultrasonikasyon ile homojenizasyondur. Literatürdeki örneklerden de görüldüğü gibi partikül büyüklüğünü küçültme esasına dayanan her türlü homojenizasyon yöntemi nanokristal hazırlamak için kullanılabilmektedir (14, 39, 56 – 58, 61, 62).

Ultrasonik problar, sıvı ya da katı dispers fazda partikül büyüklüğünü küçültmek için kullanılırlar. Ultrasonik homojenizasyon, sert ve yumuşak partiküllerin boyutlarını azaltmak için oldukça etkindir. Ultrasonikasyonla homojenizasyonun esası yüksek frekanslı mekanik bir titreşime dayanmaktadır. Sıvılar şiddetli ultrasonikasyon ile iletilen ses dalgalarına maruz kalırlar. Ultrasonik prob kontrollü ve tekrarlanabilir ultrasonikasyon sağlar. Bu da ölçek büyütme çalışmaları ve üretilen ürünün kalitesi açısından önemlidir (63).

Homojenizasyon yöntemlerinden biri olan yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminde ise, iki tip homojenizatör bulunmaktadır, bunlar mikrofluidizasyon ve piston açıklıklı homojenizatörlerdir. Buradaki ana hedef, partikül büyüklüğünü

yüksek basınçlı homojenizasyon ile azaltmaktır. Homojenizasyon suda (DissoCubes®) ya da alternatif olarak susuz ortam veya suyu azaltılmış ortamda (Nanopure®) gerçekleştirilir. Sıvı içindeki ilaç nanokristalinin süspansiyonu nanosüspansiyon olarak isimlendirilir (34).

Amighi ve arkadaşları, araştırmalarında farklı homojenizasyon teknikleri kullanmışlardır. Hipertansiyon, anjina pektoris gibi vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ve kalsiyum kanal blokörü olan nifedipin model ilaç olarak kullanılarak yüzey etkin madde içeren sudaki süspansiyonu hazırlanmıştır. Formülasyon daha sonra Ultra Turraks ile homojenize edilmiş, yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek partikül büyüklüğü küçültülmüştür. Son aşamada, püskürterek kurutucu ile disperisyon ortamı uzaklaştırılmış ve nanokristal elde edilmiştir. Yapılan incelemelerde, nifedipinin çözünme hızı en düşükken, kullanılan yönteme göre artan çözünme hızı sırasıyla fiziksel karışım, püskürterek kurutma, yüksek hızda homojenizasyon ve yüksek basınçlı homojenizasyon olarak bulunmuştur. Nifedipinin kristal yapısının uygulanan yöntemlerin hiçbirinde değişmediği X-ışını analizleri ile gösterilmiş ve etkin maddenin nanokristal formülasyonunun uzun dönem dayanıklı olacağı belirtilmiştir (64).

Müller ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise, homojenizasyon hızı, basıncı ve süresinin partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi üzerine etkisinin olduğu gösterilmiştir. Homojenizasyon ne kadar yüksek basınçta olursa ve dönüş sayısı ne kadar fazla ise, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinin o kadar küçük olacağı bulunmuştur (65).

Yapılan bir diğer araştırmada, hidrokortizon asetatın ultra turraks ve yüksek basınçlı homojenizatör kullanılarak iki farklı formülasyonu geliştirilmiştir. Birinde, poloksamer ve kitosan klorür suda çözündürüldükten sonra ultra turraks ve yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek nanosüspansiyon oluşturulmuştur. Diğer formülasyonda ise, tüm işlemler tekrarlanmış, ancak formülasyon yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilmemiş ve mikrosüspansiyon oluşturulmuştur. Elde edilen mikrosüspansiyon partiküllerinin büyüklüklerinin, nanosüspansiyon partiküllerinin yaklaşık sekiz katı olduğu saptanmış ve nanosüspansiyon formülasyonunun çözünme hızının mikrosüspansiyona göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Çözünme ortamı

olarak 0.1 N hidroklorik asit (HCl) çözeltisi kullanıldığında nanosüspansiyondan salınan ilaç miktarının % 99'a ulaştığı, mikrosüspansiyondan ise ancak % 88'e ulaştığı belirlenmiştir (62).

Oral Yolla Uygulanan Nanokristal Formülasyonlarının Üstünlükleri ve Uygulama Alanları

Oral yolla alınan nanokristal formülasyonlarının birçok üstünlüğü vardır. Bunlar aşağıda sıralanmıştır.

- Oral biyoyararlanımı artırır,
- Hızlı etki gösterir,
- Doz orantısallığını iyileştirir,
- Yüksek biyoyararlanımdan dolayı doz azaltılabilir,
- Su bazlı olabilir, organik çözücü kullanılmayabilir,
- Tüm dozaj şekillerine uygulanabilir,
- Üretim şekli ve uygulaması kolaydır,
- Ölçek büyütme işleminin uygulanabilirliği kolaydır,
- Suda çözünürlüğü az olan lipofilik ilaçlarda gözlenen açlık ve tokluk durumlarındaki biyoyararlanım farklılığı nanokristal teknolijisi ile azaltılabilir (45, 50, 66, 67).

Daha önce de belirtildiği gibi suda çözünürlüğü az olan ilaçların nano formülasyonları geliştirilerek çözünme hızı ve biyoyararlanımları artırılmaktadır (68).

Yapılan bir çalışmada, budenosidin ticari preparatı ile nanokristal formülasyonunun bronşlara ve akciğerlere ulaşması karşılaştırılmıştır. Partikül büyüklüğünün küçüklüğünden dolayı nanokristal teknolojisi ile üretilen formülasyonda atılan dozdaki solunan fraksiyon % 60 iken piyasa preparatında % 27 olarak bulunmuştur (50).

Yapılan başka bir araştırmada, gönüllü hastalara paklitaksel nanokristali ve piyasa preparatı Taxol® uygulanmış ve zamana bağlı olarak tümör ağırlığındaki azalma izlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, paklitaksel nanokristalinin uygulandığı

hastalarda akciğer tümör ağırlığının kontrol grubuna (hiç tedavi görmeyen) ve Taxol® alanlara göre çok daha az olduğu gözlenmiştir. Nanokristal teknolojisi ile yüzey alanı arttığı için in vivo çözünme hızı artacağından etkin maddenin hızlı bir şekilde sistemik emiliminin gerçekleştiği görülmüştür (69).

Bir başka çalışmada ise, naproksenin alışılagelmiş ticari preparatlarının maksimum plazma derişimine ulaşmaları 3 – 4 saat alırken, naproksen nanokristal formülasyonu ile 20 dakikada maksimum plazma derişimine ulaşıldığı görülmüştür. Bir diğer anlatımla, nanokristal formülasyonu ile maksimum plazma derişimine (C_{maks}) konvansiyonel formülasyonlardan 9 – 12 kat daha hızlı ulaşılmıştır (14, 50).

Etkin madde olarak danazolün kullanıldığı bir çalışmada, mikronize haldeki konvansiyonel etkin madde, nanokristal şekli ile karşılaştırılmıştır. Mikronize haldeki konvansiyonel etkin maddenin emiliminin aç ya da tok olma durumuna göre daha yüksek değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (50).

Aprepitant (EMEND®) güçlü bir P/nörokinin 1 (NK_1) reseptör antagonistidir; bu madde ile yapılan klinik öncesi tablet formülasyonu çalışmalarında, besinlerin emilime etkisi araştırılmıştır. Nanokristal formülasyonu ile hem besinlerin ilaç emilimi üzerindeki etkisi ortadan kaldırılmış, hem de biyoyararlanım önemli ölçüde artırılmıştır. İlaç partiküllerinin büyüklüğünün, mikrondan mikron altına veya nanometreye azaltılmasının biyoyararlanımı önemli derecede artırdığı belirtilmiştir (70).

Partikül Büyüklüğü

Oral uygulanan ilaç formülasyonlarında, ilaçların biyoyararlanımının kontrolünde birincil değişken etkin maddenin partikül büyüklüğüdür. Eczacılıkta, hazırlanan formülasyonlarda partikül büyüklüğü dağılımının tespit edilmesi oldukça önemlidir ve partikül büyüklüğü dağılımı aşağıdaki yöntemlerden biri kullanılarak tayin edilebilir.

- Mikroskop yöntemi
- Elek yöntemi
- Sedimentasyon yöntemi
- Coulter Counter ve Hiac Royco yöntemi
- Lazer difraksiyon yöntemi
- Işık saçılımı yöntemi
- Gaz geçirgenliği yöntemi
- BET (Brunauer- Emmet-Teller) adsorpsiyon yöntemi

Tez çalışmamızda kullandığımız Malvern Nanosizer partikül büyüklüğü ölçüm cihazı; 0,6 nm ile 6 μm aralığında hassas ölçüm yapmaktadır. Hazırladığımız sistem için en uygun ölçüm aralığını sunmakta ve kullandığı ışık saçılımı ölçüm yöntemiyle oldukça güvenilir, tekrar edilebilir sonuçlar vermekte olup, bunun yanı sıra oldukça az miktarda örnek kullanılarak ölçüm yapılabildiği için bu cihaz tercih edilmiştir.

Malvern Nanosizer partikül büyüklüğü ölçüm cihazı dinamik ışık saçılımı tekniği ile çalışmaktadır. Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic light scattering DLS), (Yarı elastik ışık saçılımı: Quasi-Elastic Light Scattering, QELS; Foton korelasyon spektroskopisi: Photon correlation spectroscopy, PCS olarak da ifade edilmektedir) mikron altı partiküllerin büyüklüğünü ölçmek için kullanılan bir tekniktir (71).

DLS metodu, partikül büyüklüğüne bağlı olarak oluşan Brown hareketlerinin (Brown hareketi, bir sıvıda yüzen veya asılı parçacıkların rastgele hareketi olarak tanımlanmaktadır) neden olduğu ışık saçılım şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine ve buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın vizkozitesine ve sıcaklığa bağlıdır. Sıcaklık değişimi partiküllerin rastgele hareketini bozacağından analiz sırasında sıcaklık sabit olmalıdır. Dinamik ışık saçılımı yöntemi; hidrodinamik büyüklük, difüzyon katsayısı, dağılım indeksi ve parçacık büyüklüğü dağılımının elde edilmesinde kullanılır (71).

Brown hareketlerinin hızı, translasyonel difüzyon katsayısı olarak bilinen bir özellik tarafından tanımlanmaktadır. Partikül büyüklüğü translasyonel difüzyon

katsayısı kullanılarak hesaplanabilmektedir. Bu amaçla "Stokes-Einstein" eşitliğinden faydalanılmaktadır (71).

$$d(H)=kT/3\pi\eta D \quad (1.3)$$

d(H) = Hidrodinamik çap
D = Translasyonel difüzyon katsayısı
k = Boltzmann sabiti
T = Mutlak sıcaklık
η = Viskozite

DLS ile elde edilen çap, bir sıvı içindeki molekülün nasıl difüzlendiği ile ilgili bir değer olduğu için hidrodinamik yarıçap olarak ifade edilir ve bu teknikle elde edilen çap, partikül ile aynı translasyonel difüzyon katsayısına sahip bir kürenin çapıdır. Translasyonel difüzyon katsayısı sadece partikül büyüklüğüne değil aynı zamanda ortamda mevcut olan iyonların tipi ve konsantrasyonuna ve yüzey yapısına da bağlıdır. Bu faktörler partiküllerin difüzyon hızını etkilemektedirler (71).

Örneğin, ortamdaki iyonlar ve toplam iyon konsantrasyonu elektriksel çifte tabakanın kalınlığını değiştirerek partiküllerin difüzyon hızını etkileyebilir. Bundan dolayı düşük iletkenliğe sahip ortamlar, partikül çevresinde geniş (veya yayılmış) bir çifte tabaka, azalmış bir difüzyon hızı ve sonuç olarak da daha büyük bir hidrodinamik çap oluşturacaklardır. Bunun tam tersi olarak yüksek iletkenliğe sahip ortamlar ise, elektriksel çifte tabaka ve ölçülen hidrodinamik çapı baskılayacaklardır. DLS cihazının performansı uygun bir polistiren lateks standardı kullanılarak doğrulanmaktadır. Ölçüm öncesi standartın seyreltilmesi gerekirse bu durumda uygun ortamla seyreltilmesi önemlidir. Bu amaçla, uluslararası standard (ISO13321 Part 8 1996) polistiren seyreltmenin 10 mM NaCl çözeltisi kullanılarak yapılması gerektiğini belirtmektedir. Tuz konsantrasyonu elektriksel çifte tabakayı baskılar ve açıklanan çapın sertifikada belirtilen veya beklenen çapla aynı olmasını sağlar (71).

Difüzyon hızını etkileyen partikül yüzeyindeki herhangi bir değişim partikülün görünür büyüklüğünü değiştirecektir. Ortamda adsorbe bir polimer tabakasının bulunması difüzyon hızını azaltacaktır. Ortamdaki iyon konsantrasyon kadar, yüzey ve polimer yapısı, polimer konformasyonunu etkiler ve birkaç nanometreye kadar görünür büyüklüğü değiştirebilir (71).

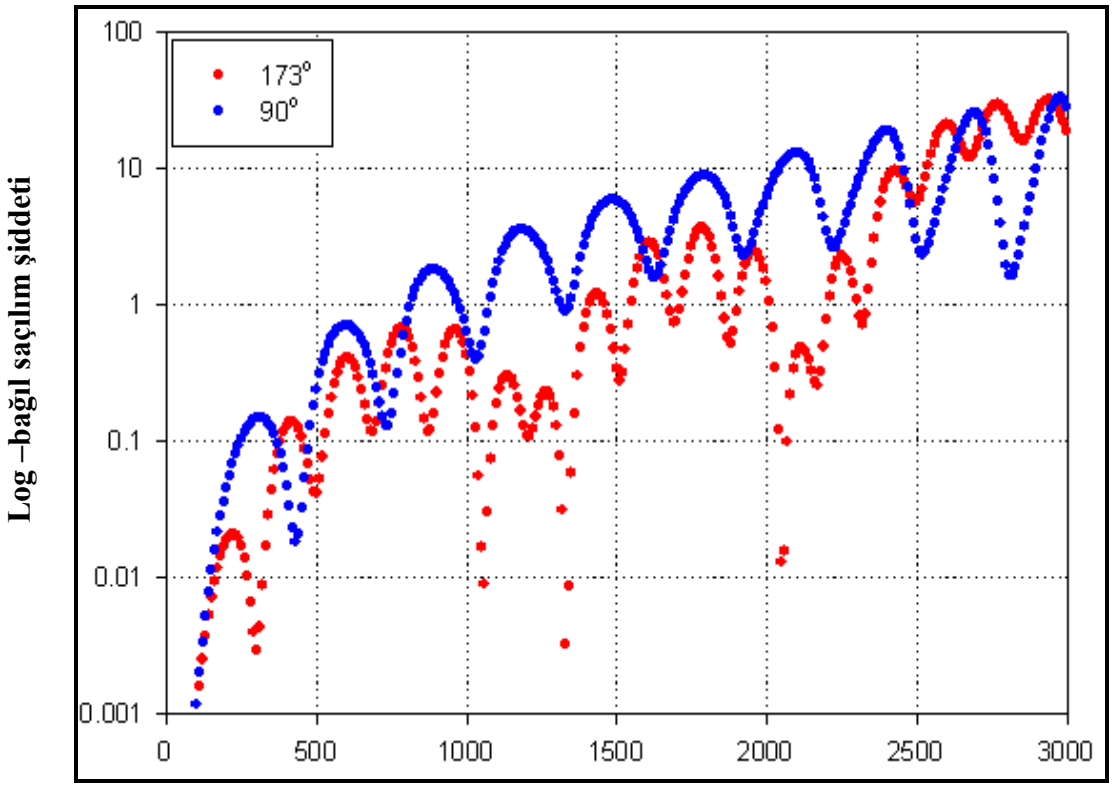
Işık saçılım teorileri

Rayleigh Saçılımı

Partiküller, kullanılan lazerin dalga boyuna (genellikle d=λ/10'dan daha az veya He-Ne lazer için 60 nm civarında) göre küçükse o zaman, dik polarize lazerle ışıklandırılmış bir partikülden saçılım temel olarak izotropiktir, başka bir deyişle, tüm yönlerde dengededir. Rayleigh yaklaşımı $I\alpha d^6$ ve $I\alpha 1/\lambda^4$ (I= saçılan ışığın şiddeti; d=partikül çapı; λ= Dalga boyu) olduğunu ifade eder. d^6 terimi, 50 nm boyutundaki partikülün 5 nm boyutundaki partiküle göre 10^6 veya 1 milyon kez daha fazla ışık saçacağını belirtmektedir. Bundan dolayı, daha küçük partiküllerden saçılan ışığın daha büyük partiküllerden saçılan ışık tarafından bastırılması tehlikesi vardır. Küçük partiküllerin toplam ışık saçılımına katkıları son derece düşük olacağından d^6 faktörü, DLS ile 1000 nm ve 10 nm partikül karışımının partikül boyutu tayininin zor olduğunu ifade eder. λ^4 ile olan ters orantı ise kullanılan lazer dalga boyunun azalması ile elde edilen ışık saçılımı şiddetinin daha yüksek olacağını belirtir (71).

Mie Teorisi

Partikül büyüklüğü, uygulanan ışığın dalga boyuna yaklaşık olarak eşit olduğunda, açıya göre maksimum ve minimumun bir kompleks fonksiyonu elde edilir (Şekil 1.12). Mie teorisi, sadece grafikte yer alan minimum ve maksimumları doğru bir şekilde açıklar ve tüm dalga boyları, büyüklük ve açılara doğru cevap verir. Mie teorisi, "Nano Software" de şiddet dağılımının hacime çevrilmesinde kullanılır (71).



Şekil 1.12. 173º ve 90 º lik açılarda Log-bağıl şiddet-Partikül büyüklüğü grafiği (dalga boyu 633 nm, gerçek kırılma indisi 1.59; teorik kırılma indisi 0.001) (71).

1.3. Dislipidemiler

Kan yağlarının oranlarında ve düzeylerinde sağlımızı bozacak şekilde gelişen değişiklikler dislipidemi olarak adlandırılmaktadır. Dislipidemi, kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkili olup, tanı değil, laboratuar bir bulgudur ve hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi, şilomikronemi vb. den oluşur (72 – 74).

Kan lipitleri trigliserit, kolesterol ve fosfolipitler olarak üçe ayrılırlar. Kolestreol ise; toplam kolesterol, Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL) kolesterol, Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL) kolesterol ve HDL dışı toplam kolesterol değerlerine göre değerlendirilmektedir (72 – 74).

Hiperlipidemiler trigliserid ve kolesterol değerlerine göre 3 gruba ayrılır; (72 – 74).

- **Hipertrigliseridemi**

Normal: < 200 mg/dL,
Sınırda yüksek: 200 – 400 mg/dL,
Yüksek: 400 – 1000 mg/dL,
Çok yüksek: > 1000 mg/dL

- **Hiperkolesterolemi**

Çocuklarda total kolesterol normal değeri: < 170 mg/dL
Normal total kolesterol : < 200 mg/dL ve LDL: < 130 mg/dL,
Sınırda yüksek total kolesterol: 200 – 239 mg/dL ve LDL: 130 – 159 mg/dL,
Yüksek total kolesterol: >240 mg/dL ve LDL: ≥160 mg/dL

- **Kombine Hiperlipidemi**

Kolesterol ve trigliserit değerlerinin birlikte yüksek olduğu durumlardır.

Dislipidemilerin etiyolojisi; birincil (ailevi) dislipidemi, reaktif fizyolojik hiperlipidemi, ikincil hiperlipidemi başlıkları altında 3 ana gruba ayrılır (72 – 74).

1.3.1. Birincil (ailevi) Dislipidemiler

1.3.1.1. Ailevi hiperkolesterolemi: Düşük dansiteli lipoprotein reseptör genindeki bir hasar sonucu plazmada LDL artışına neden olan kalıtsal bir hastalıktır (75). Arterlerde, tendonlarda ve dokularda kolesterol depolanması ve plazmada LDL artışı ile karakterizedir (76).

Poligenik hiperkolesterolemi: En sık görülen hiperkolesterolemi çeşididir. Endojen ve eksojen etkenler birarada bulunmaktadır. Genellikle kolesterol düzeyleri

200 – 300 mg/dL arasındadır. Aterosklerotik kalp hastalığı riski 2 – 3 misli daha fazladır (72 – 74).

Monogenik hiperkolesterolemi: En çok görülenler, 19. kromozom hasarlarına bağlı olup LDL'nin taşınımı, bağlanması, hücre içine alınması ve yeniden kullanımından sorumlu genlerde mutasyon olmasıyla ilgili olanlardır. Bu olguların heterozigot olanlarında LDL düzeyi 300 – 550 mg/dL arasındayken, homozigot olanlarında 500'den başlayıp binli değerlere kadar yükselebilmektedir. Özellikle homozigot olan olgular çocuklukta ve gençlikte gelişen erken ateroskleroz ve komplikasyonlarıyla ortaya çıkabilmektedir (72 – 74).

Bu olguların dışında, insanlarda 1/700 – 1/800 arasında bir oranda Apolipoprotein B 100 eksikliğine bağlı hiperkolesterolemi olduğu da bilinmektedir. Bu olgularda da toplam kolesterol düzeyleri 250 – 550 mg/dL arasında bulunmaktadır. Bu grupta yer alan hastalarda, apolipoprotein E polimorfizmine bağlı olarak diyetteki kolesterol emiliminin ve kan düzeyine diyetin etkisinin fazla olduğu bilinmektedir (72 – 74).

1.3.1.2. Ailevi kombine hiperlipidemi: Bütün hiperkolesterolemililerin %10'unu oluşturmaktadır. Ailevi hiperkolesterolemiye benzer ancak Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein (VLDL) de artmıştır. Otozomal dominant kalıtımlı, aşırı Apoprotein B 100 (Apo B 100) yapımının görüldüğü, toplam kolesterol düzeyinin 250 – 350 mg/dL arasında ve trigliserid düzeyinin 250 – 500 mg/dL arasında olduğu dislipidemidir (72 – 74).

1.3.1.3. Ailevi hipertrigliseridemi: Yaygın olarak metabolik sendrom tablosunda görülmektedir. Otozomal dominant geçişlidir. VLDL ve trigliserid yüksek iken HDL düşüktür (72 – 74).

1.3.1.4. Ailevi disbetalipoproteinemi (Tip III hiperlipidemi): Trigliserid ve toplam kolesterol değerleri 300 – 1000 mg/dL arasındadır. Nedeni, apoprotein E'nin mutasyonuna bağlı olarak LDL'nin aşırı üretimi ya da yıkılmamasıdır. Ksantomalar ve erken ateroskleroz başlıca komplikasyonları arasında yer almaktadır (72 – 74).

1.3.1.5. Şilomikronemi: Çok nadir bir metabolik bozukluktur. Genellikle hipertrigliseridemi veya kombine hiperlipidemi tablosu içinde görülmektedir (72 – 74).

1.3.1.6. Lipoprotein A Hiperlipoproteinemi: Lipoprotein A; antiplazminojen etkili, damar içi trombolizi inhibe edici etkisi olan bir apoprotein içerir, bu nedenle aterojenik etkisi vardır. Lipoprotein A düzeyinin 30 mg/dL'den yüksek olmasının ateroskleroz riskinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle kolesterol yüksekliği olanlarda, Lipoprotein A yüksekliğinin tromboembolik olay riskini artırabileceği ve tek başına kolesterol yüksekliğinden daha büyük riskinin olabileceği belirtilmiştir (72 – 74).

1.3.1.7. Ailevi hipoalfalipoproteinemi: Otozomal dominant geçişli bir sendromdur. Türkiye'de endemik olduğu bildirilmektedir. Düşük plazma HDL kolesterolü ve artmış erken koroner kalp hastalığı riski ile ortaya çıkar. HDL kolesterol seviyelerinin erkeklerde 30 mg/dL, menopoz öncesi kadınlarda 40 mg/dL'den düşük olması durumunda ortaya çıkar ve kesin nedeni bilinmemektedir (72 – 74).

1.3.1.8. Diğer ailevi dislipidemiler

Hepatik lipaz eksikliği, sitosterolemi, serebrotendinöz ksantomatozis, asid kolesteril ester hidrolaz eksikliği ve ailesel izole vitamin E eksikliği gibi bozukluklar örnek olarak verilebilir (72 – 74).

1.3.2. Reaktif Fizyolojik Hiperlipidemiler

Hafif ve diyete bağlı lipit değişiklikleridir.

1.3.2.1. Hipertrigliseridemi: Genellikle abartılı yemeklerden sonra görülmektedir.

1.3.2.2. Hiperkolesterolemi: Hayvansal yağlardan ve kolesterolden zengin gıdalarla beslenenlerde görülmektedir (72 – 74).

1.3.3. İkincil Hiperlipidemi Tipleri

1.3.3.1. Hipertrigliseridemi: Başta gelen nedenleri; şişmanlık, alkol kullanımı ve şeker hastalarının düzenli ilaç kullanmaması ve yanlış beslenmesidir (72 – 74).

1.3.3.2. Hiperkolesterolemi: Yanlış beslenme, kolestazis, nefrotik sendrom, hipotiroidi ve bazı ilaçlar neden olabilmektedir (72 – 74, 77).

1.4. Lipit Düşürücü İlaçlar

1.4.1. Statinler (HMG-CoA Redüktaz inhibitörleri)

Kolesterol düşürücü ajanlar arasında en etkili olanlardandır. Kolesterol, karaciğerde kolesterol biyosentezi için mevolanat yolağında hız kısıtlayıcı bir enzim olan, 3-hidroksi-3 metilglutaril koenzim-A redüktaz enzimi ile sentezlenir (78). Bu grup antihiperlipidemik ilaçlar, sterol sentezindeki ilk basamağı engeller ve 3-hidroksi-3 metilglutarik asidin (HMG) yapısal analogları olarak, hidroksi metilglutaril Koenzim A redüktaz (HMG-CoA redüktaz) enzimini inhibe ederek etkilerini gösterirler (79). Kolesterol sentezini inhibe ederek ve karaciğerin LDL alımını bir miktar artırarak etkili oldukları düşünülmektedir. Doza bağlı olarak etkilerinde artış olur. Lovastatin, insanlardaki klinik uygulamada kullanılan ilk statindir. Atorvastatin, fluvastatin, pravastatin, simvastatin, serivastatin, pitavastatin bu gruptaki diğer ilaçlara örnek olarak verilebilir (80).

1.4.2. Fibratlar (Fibrik asit türevleri)

Bu grupta yer alan ilaçlar fibrik asit türevleridir. Karaciğerde % 35 – 50 oranında trigliserit ile % 15 – 25 oranında HDL ve % 20 oranında LDL sentezini azaltırlar. Etki mekanizmaları; lipoprotein lipaz aktivitesini uyarmak suretiyle triaçilgliserol düzeyinde düşmeye bağlı olarak karaciğerde VLDL sentezinin azalması ve LDL tutulumunun artması olarak bildirilmiştir. Gemfibrozil, fenofibrat, etofibrat, bezafibrat, klofibrat bu gruptaki ilaçlara örnek olarak verilebilir (72 – 74, 81, 82).

1.4.3. Reçineler (Safra asidi bağlayıcıları, SAB)

Safra asitleri ve safra tuzlarını ince bağırsakta bağlayan anyon değiştirici reçinelerdir. Safra asitlerinin normal koşullarda % 90'ı geri emilip enterohepatik dolaşımla karaciğere ulaşır, fakat safra asidi bağlayıcı reçineler safra asidini ince bağırsakta bağlayarak enterohepatik dolaşımla karaciğere geri dönüşünü engellerler. Karaciğerde LDL reseptörlerini aktive ederek LDL kolesterolün düşmesine neden olurlar. Trigliseritlerde ve HDL kolesterolde artışa neden olabilirler. Bu gruptaki ilaçlara kolesterolamin ve kolestipol örnek olarak verilebilir (83).

1.4.4. Nikotinik Asit (Niasin) ve Türevleri

Niasin suda çözünen vitaminlerden biridir ve yağ dokusundaki lipolizi engeller. Bu da karaciğerde VLDL sentezinin azalmasına ve bu şekilde hem LDL kolesterol düzeyinde, hem de trigliserit düzeyinde azalmaya neden olur (84, 85).

1.4.5. Sitosterin

Sadece diyete bağlı hiperkolesterolemide etkilidir. Kolesterolün bağırsaktan emilimini engelleyerek etkisini gösterir (72 – 74).

1.4.6. Kombine İlaç Tedavisi

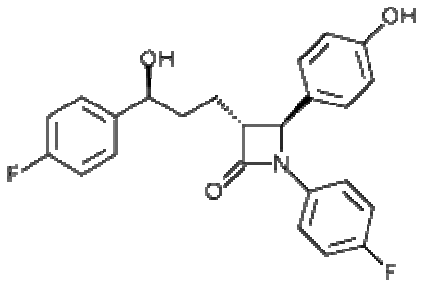
Plazma lipit düzeylerinde yeterli azalma sağlayabilmek amacıyla bazen iki antihiperlipidemik ilacı birlikte kullanmak gerekebilir. Tek başına fibratlarla toplam kolesterol ve LDL düzeylerinde % 15 – 20 düşme, reçinelerle en fazla % 30'a kadar düşme, statinlerle ise % 30 – 40 düşme sağlanabilirken, kombinasyonlarla yaklaşık % 50 kadar bir düşme elde edilebileceği bildirilmiştir (72 – 74).

1.5. Ezetimib

1.5.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Ezetimibin [(3R,4S)-1-(4-florofenil)-3-((3S)-3-(4-florofenil)-3-hidroksipropil)-4-(4-hidroksifenil)-2-azetidinon] kimyasal formülü Şekil 1.13'de

verilmiştir (86). Çalışmamızda kullandığımız ezetimib bağırsakta kolesterol emilimini engelleyerek etkisini gösterir (72 – 74, 87).



Şekil 1. 13. Ezetimibin kimyasal yapısı (86).

Kapalı formülü $C_{24}H_{21}F_2NO_3$ ve molekül ağırlığı 409.42 olan ezetimib beyaz, kristal tozdur, hidrofobik özelliğinden dolayı sulu çözeltilerde çözünmez, etanol, metanol, aseton, asetonitril gibi organik çözücülerde çözünür. Erime Derecesi 164 – 166 º C, kırılma indisi ($(\alpha]_D^{22}$) 33.9º'dir.

1.5.2. Farmakolojik Etki Mekanizması

Ezetimib, aterosklerozun tedavisinde ve önlenmesinde hipokolesterolemik ajan olarak kullanılmaktadır (88]. Aterosklerozun; elastik arterlerin (aorta, iliak arter gibi) orta ve büyük çaplı müsküler arterlerin (koroner, popliteal arter) damar duvarlarının esnekliğinin kaybı ve kalınlaşması ile karakterize olduğu bilinmektedir. Aterosklerozun gerek ortaya çıkışı ve ilerlemesinde, gerekse fizyopatolojik açıdan son basamakları oluşturan aterom plağının erozyon, fissür ve yırtılmasında damar duvarındaki enflamasyonun önemli bir rol oynadığına inanılır. Klasik patolojik çalışmalar hastalığın her döneminde monosit kökenli makrofajlar ve T lenfositleri gibi enflamatuar hücrelerin varlığını göstermiştir. Aterosklerozun ortaya çıkışı ve ilerlemesinde birincil ve ikincil risk faktörleri bulunmaktadır. Birincil faktörlerden en önemlisi ailesel yatkınlık, ikincil risk faktörleri ise hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite, sedanter yaşam ve sigara gibi kontrol edilebilir nedenlerdir (89).

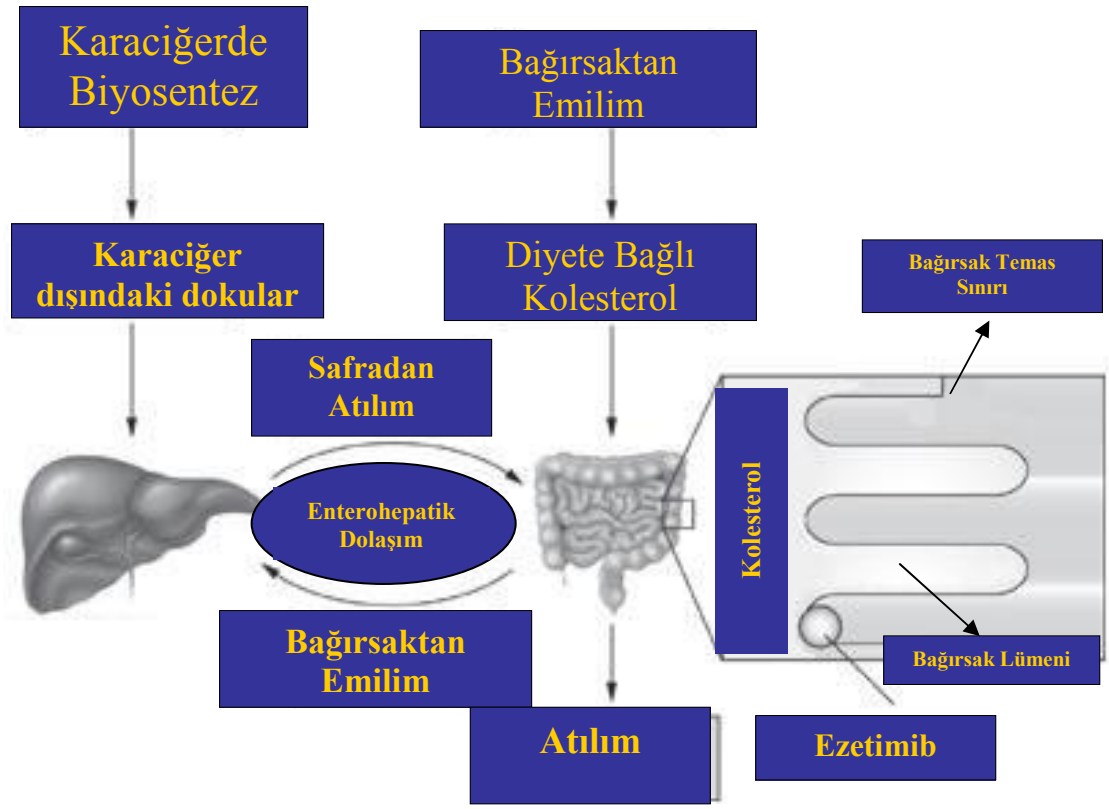
Ezetimib; kolesterolün ve ilgili fitosterollerin ince bağırsaktaki emilimini seçici olarak inhibe eden, yeni sınıf bir lipit düşürücü bileşiktir. Yağda çözünen vitaminlerin (A, D, E, K vitaminleri), trigliserit ve safra asitlerinin emilimini etkilemeden, safra ve diyete bağlı kolesterolün etkili bir şekilde ince bağırsaktan emilimini inhibe eder. Klinik çalışmalarda, ezetimibin plazma düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterol düzeyini önemli derecede düşürdüğü ve mükemmel tolerans profili ile plazma yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyelerini artırdığı görülmüştür. İnce bağırsaktan kolesterol emilimini ve enterosit alımını azalttığı ve vücuttan uzaklaştırılmak üzere kolesterolü ince bağırsak lümeninde sakladığı bilinmektedir. Bu maddenin, ince bağırsaktan hızlı bir şeklilde emildiği, ince bağırsak ve karaciğerde %80'den fazlasının glukuronat metabolizasyonuna uğradığı ve ezetimib ve metabolitinin insanlarda enterohepatik döngüye girdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ezetimib, Sitokrom P450 (CYP 450) enzimlerinin aktivitelerini etkilemediğinden; statinler, fibratlar, digoksin ve varfarin gibi diğer etkin maddelerle arasında önemli bir farmakokinetik etkileşim bulunmamıştır. Statinler gibi lipit düşürücü etkisi olan diğer etkin maddeler ezetimibin tamamlayıcılarıdır. Yapılan klinik çalışmalar, ezetimibin statinlerle birlikte uygulanmasının hem LDL'yi, hem de toplam kolesterol miktarını azaltırken, HDL'yi artırdığını göstermektedir. Ayrıca ezetimibin statinlerle birlikte kullanımının hiperkolesterolemi hastalarında koroner kalp hastalığını belirgin oranda azalttığı görülmüştür. Ezetimibin diyet tedavisine ek olarak, günde 10 mg dozda yalnız veya HMG-CoA redüktaz inhibitörleriyle (statin gibi) birlikte kullanılmasıyla toplam kolesterol, LDL ve Apo B'yi birincil hiperkolesterolemili hastalarda azalttığı bildirilmiştir (86, 90 – 96).

Ezetimib, ince bağırsaktan safra ve diyete bağlı kolesterolün emilimini engelleyerek lipit düşürücü etki gösteren ilk ilaçtır (97). Kolesterol emilimini inhibe eden bileşiklerin, statinin yüksek dozunu tolere edemeyen ve sadece statin monoterapisi ile LDL kolesterolünü düşürmeye çalışan kişiler için statinlerle kombinasyon tedavisi uygun olabilir. İki büyük, çift körlü ve plasebo kontrollü, hiperkolesterolemili hastalar üzerinde yapılan çalışmada, 10 mg/gün ezetimibin yalnız başına LDL kolesterolünü yaklaşık olarak % 18 düşürdüğü ($p < 0.01$, plaseboya karşı) ve toplam kolesterol, trigliseritler ve HDL kolesterol düzeylerinin

düzenli hale geldiği gözlenmiştir. Devam eden statin tedavisine ek olarak verildiğinde ise, statin monoterapisi ile karşılaştırıldığında, LDL kolesterolünü daha fazla düşürdüğü (% 21.4) gözlenmiştir ($p< 0.001$) (98).

Ezetimib, ince bağırsak duvarında bulunan özel taşıyıcı Niemann-Pick C1 Like 1 proteine (NPC1L1) bağlanarak kolesterol alımını inhibe eder. Ezetimib 2002 yılında Amerika'da tek başına veya statinlerle kombine halde birincil hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Ezetimib, hiperkolesterolemili hastalarda; toplam kolesterolü, LDL kolesterolü ve trigliseridi sırasıyla % 13, % 18, % 5 – 8 oranında azaltır ve HDL kolesterolü % 1 – 4 oranında artırır (99).

Ezetimibin etki mekanizması diğer kolesterol düşürücü ilaçlardan farklıdır; karaciğerde kolesterol sentezini inhibe etmez veya safra asidi boşaltımını artırmaz. Bunun yerine, ince bağırsaktan kolesterol emilimini inhibe ederek kan kolesterol seviyesini düşürür (Şekil 1.14). Bu farklı mekanizma, kolesterol sentezini inhibe eden HMG-CoA redüktaz inhibitörlerin etkisini tamamlayıcı özelliktedir (88). Ezetimibin ince bağırsağın çeperinde toplanıp, kolesterol emilimini azalttığı, bu şekilde bağırsakta bulunan kolesterolün karaciğere gitmesini de azalttığı saptanmıştır. Böylece, karaciğer kolesterol depolarında azalma ve kandan kolesterol klerensinde artış olur. Ezetimibin safra asidi salgısını artırmadığı da gösterilmiştir (99).



Şekil 1. 14. Kolesterol emiliminin şematik gösterimi (100).

Hiperkolesterolemili 18 hastada yapılan ve iki hafta süren klinik bir çalışmada, ezetimib bağırsaktan kolesterol emilimini plaseboya göre %54 oranında inhibe etmiştir. Statinler de karaciğerde kolesterol sentezini azalttığı için bu özgün mekanizmalar birarada tamamlayıcı olarak kolesterolü düşürür. Ezetimibin, statinle birlikte verildiğinde, hiperkolesterolemili hastalarda tekli tedaviden daha fazla oranda toplam-kolesterol, Apo B, ve trigliseridi azalttığı ve HDL kolesterolü yükselttiği gözlemlenmiştir. Ezetimib / simvastatinin başlangıç dozunda ve artan dozlarında alımının, atorvastatin ile karşılaştırıldığında, daha etkili ve daha iyi tolere edilebilir olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (91, 101, 102).

1.5.3. Farmakokinetik Özellikleri

Ezetimibin oral alımından sonra tamamen absorplandığı ve sistemik dolaşıma geçmeden önce ince bağırsak hücresinin içerdiği UDP-glukuronosiltransferaz (UGT)'nin Faz II metabolizasyonuna maruz kaldığı bilinmektedir. Buna ek olarak, ezetimib portal kan dolaşımından karaciğere alınarak hızla safraya salınır ve bu da etkin maddenin düşük periferal kan derişimlerinde olması ile sonuçlanır. Ezetimibin temel olarak fenolik glukuronide ve az miktarda da benzilik ve keton glukoronide bağlandığı gösterilmiştir. UGT'nin birçok izoformu (UGT 1A1, 1A3 ve 2B15), ezetimibin faz II konjugasyon reaksiyonunu katalizlemesine rağmen, UGT1A1 bu açıdan en aktif izoformudur (92, 103, 104).

Ezetimibin mutlak biyoyararlanımı suda hiç çözünmediği için saptanamamıştır. Bu maddenin % 90'nından fazlasının proteinlere bağlandığı ve yarılanma ömrü ($t_{1/2}$)'nün yaklaşık olarak 22 saat olduğu bilinmektedir. Oral uygulamadan sonra, ezetimib hızla emilir ve farmakolojik bakımdan etkin fenolik glukuronide (ezetimib-glukuronid) konjuge olur. Ortalama C_{maks}, ezetimib için, 3.4 – 5.5 ng/ml, maksimum derişime ulaşması için geçen süre (t_{maks}) ise 4 – 12 saat olarak saptanmıştır. Ortalama maksimum plazma derişimleri, ezetimib-glukuronid için 45 – 71 ng/ml, maksimum derişime ulaşması için geçen süre ise 1 – 2 saat olarak saptanmıştır (99, 105).

Etkin madde enterohepatik dolaşıma girdiğinden, etkin madde ve metabolitlerinin farmakokinetiği çoklu piklerle karakterizedir. Ezetimibin 5, 10 ve 20 mg'lık tek doz uygulaması sonucunda doğrusal farmakokinetik gösterdiği bildirilmiştir (92). ^{14}C-ezetimib (20 mg) insana oral yoldan verildikten sonra toplam ezetimib, plazmadaki toplam radyoaktivitenin yaklaşık % 93'ünü oluşturmuştur. 10 günlük toplama dönemi boyunca uygulanan radyoaktivitenin % 78'i feçeste, % 11'i idrarda tespit edilmiştir. Öte yandan, 48 saatin sonunda, plazmada ölçülebilir radyoaktivite düzeyi saptanmamıştır (99, 105).

1.5.4. Toksisitesi

Farelerde, 4 – 12 hafta süre ile yapılan toksisite çalışmalarında ezetimibin, sitokrom P450 enzimlerini aktive etmediği görülmüştür. Ayrıca, toksisite çalışmalarında; fareler, köpekler ve tavşanlarda ezetimibin HMG-CoA redüktaz inhibitörleriyle farmakokinetik etkileşimde olduğu görülmüştür (106). Ezetimibin önemli yan etkileri olmadığı bildirilmiştir. İstenmeyen yan etkiler olarak; baş ağrısı, karın ağrısı ve diyare bildirilmiştir. Yapılan klinik çalışmalar sonunda, istenmeyen yan etkilerin genellikle hafif ve geçici olduğu görülmüştür (99, 105).

1.5.5. Dayanıklılığı

Ezetimib oda sıcaklığında dayanıklı bir etkin maddedir, kuru ısıya ve oksidasyona karşı da dayanıklı olduğu gösterilmiştir. Etkin maddenin oda sıcaklığında hidrojen peroksit varlığında (% 3 ve % 20) stabil olduğu bulunmuştur. Ezetimibin sulu çözeltide 80 ºC'de bir saat ısıtılması sonucu tamamının parçalandığı bulunmuştur. Ezetimibin, alkali hidrolizinin hızlı olduğu, asitteki hidroliz hızının ise, su ve alkali ortamdakine oranla daha yavaş olduğu gösterilmiştir; 1 M sodyum hidroksit (NaOH) içinde 80 ºC'de reaksiyon o kadar hızlıdır ki, etkin maddenin sıfırıncı dakikada hemen bozunduğu gözlemlenmiştir. Etkin madde, 1 M HCl çözeltisinde iki gün boyunca güneş ışığına maruz bırakıldığında parçalanma ürünü oluşmazken, sulu çözeltisinin aynı koşullarda bozunduğu görülmüştür (91).

1.5.6. Ezetimibin Ticari Preparatları

Ezetimibin piyasada 10 mg'lik tabletleri mevcuttur (Zetia®, Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals, USA; Ezetrol® Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals, Türkiye). Ayrıca ezetimibin simvastatin (10 mg ezetimib, 10 mg simvastatin içeren tablet) ile kombinasyonu da piyasada bulunmaktadır (Vytorin ®, Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals, USA).

1.6. Formülasyonda Kullanılan Yardımcı Maddeler

1.6.1. Pluronic F 127 (Poloksamer 407)

Pluronic F 127, iyonik olmayan bir yüzey etkin madde olup polioksietilen – polioksipropilen kopolimerlerden oluşmuştur (107). Yapısı $HO(CH_2CH_2O)_a$-$(C_3H_6O)_b(CH_2CH_2O)_aH$'dır. Bütün poloksamerler kimyasal olarak aynı düzene sahiptirler. Sadece üretim sırasında eklenen propilen ve etilen oksit miktarları farklıdır. Poloxamer 407 için a=101, b=56 olup, ortalama molekül ağırlığı 9840 ile 14600 arasındadır. Yapının polioksipropilen kısmı hidrofobik, polioksietilen kısmı ise hidrofiliktir. Pluronic'in isminin yanında yer alan F, L ve P harfleri fiziksel formunu gösterir (F=Flake, L=Liquid, P=Paste). Poloksamerler dayanıklı materyaller olup, sulu çözeltileri, asit, alkali ve metal iyonları varlığında dayanıklıdır. Poloksamerler, intravenöz yağ emülsiyonlarında; emülsifiye ve stabilize edici ajan olarak, merhem, supozituvar, jel formülasyonları ve göz damlalarında; ıslatıcı ve çözünürleştirici ajan olarak kullanılırlar (90, 108).

Poloksamer 407, fenollerle ve parabenlerle geçimsizdir. Ağzı sıkı kapalı ve kuru kaplarda saklanmalıdır. Yüksek derecede sıcaklıktan korunmalıdır. Beyaz renktedir. Poloksamer 407'nin erime derecesi 53 – 57 º C'dir. Kendine özgü zayıf bir kokusu vardır. pH'sı 6 – 9 aralığındadır. n-oktanol / su partisyon katsayısı < -5'dir. Etanol, propan-2-ol ve suda kolayca çözünür. 23 ºC'de sudaki çözünürlüğü > 175 g/L'dir. Yoğunluğu 25 ºC'de 1.06 g/cm^3'tür. Hidrofilik lipofilik denge değeri 18 – 23 arasındadır. Toksik ve irritan değildir. Bu nedenle; oral, parenteral ve topikal formülasyonlarda kullanılır. Oral alındığında akut toksisitesi sıçanlarda LD_{50} > 10,000 mg/kg, dermal uygulandığında ise tavşanlarda LD_{50} > 5,000 mg/kg'dir (108, 109).

Yüzey etkin maddeler ilacın çözünürlüğü, çözünme hızı, gastrik boşalma ve membran geçirgenliği üzerine etki ederek ilaç absorbsiyonunu etkilerler. Hidrofobik ve hidrofilik gruplar taşıdıkları için suda çözünürlüğü az olan maddelerin çözünmelerini sağlarlar. Çözünme hızındaki bu artış, etkin madde ve çözünme ortamı arasındaki yüzeylerarası gerilim düşürülerek sağlanır. Yüzey etkin maddeler katı oral dozaj şekilleri içerisindeki etkin maddenin ıslanmasını sağlayarak etkin

yüzey alanın artmasına neden olur, ayrıca miseller oluşturarak çözünme hızını artırmaktadırlar. Böylece formülasyonlarda kullanılan yüzey etkin madde türünü ve oranını değiştirerek suda çözünürlüğü olmayan veya az olan ilaç etkin maddelerinin çözünürlükleri, çözünme hızları ve biyoyararlanımları artırılabilir.

Çözünme ortamındaki yüzey etkin maddeler genellikle kritik misel derişiminin üzerine çıkıldığında çözünürlüğü artırırlar. Yapılan bir çok çalışmada yüzey etkin madde kullanıldığında çözünürlüğün arttığı görülmüştür. Tez çalışmamızda kullanılan Pluronic F 127'nin çözünürlüğü artırıp biyoyararlanımı olumlu yönde etkilediği de bilinmektedir.

Yapılan bir çalışmada, düşük mide-bağırsak geçirgenliğine sahip salmon kalsitonin (SCT) gibi peptid yapıdaki ilaçların oral yolla taşınmasında iyonik olmayan sürfaktan (TX-100, Triton-X® 100) ve mukolitik ajanların (NAC, n-asetil sistein) kullanımının biyoyararlanımı 12.5 kat artırdığı ve klasik emilim artırıcılara (sodyum deoksi kolat, tauro kolat, tauro deoksi kolat) göre emilimi daha fazla artırdığı bulunmuştur (110).

Bir diğer çalışmada ise biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre sınıf IV ilaç olan albendazol kullanılmış, 8.27 mM sodyum lauril sülfat (SLS), 5 mM sodyum taurokolat (STC), kontrol grubu ve albendazol'ün ticari preparatı (Valbazen®) süspansiyon şeklinde uygulanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yüzey etkin maddelerin (SLS ve STC) albendazol gibi yağda çözünen ilaçların çözünme hızını, membran geçirgenliğini ve emilimini artırdığı görülmüştür. Kontrol grubunun AUC'si 17.30±3.16 µg.ml/saat iken; STC kullanıldığında 19.04±2.22 µg.ml/saat'e, SLS kullanıldığında ise 30.75±5.7 µg.ml/saat'e yükselmiştir (111).

2. MATERYAL-METOD

2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler, Malzemeler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Ezetimib	Dr. Reddy's, Hindistan
1-heptan sülfonik asit	Merck, Almanya
Pluronic F 127	Uniqema, Belçika
Asetonitril HPLC grade	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma, ABD
Asetik asit (%100)	Prolabo, Fransa
Aseton	Sigma Aldrich, Almanya
Diklorometan	Merck, Almanya
Borik Asit	Merck, Almanya
Etanol	Abdullah Arıcı Kozmetik & Medikal, Türkiye
Laktoz	Fako, Türkiye
Magnezyum Stearat	İ. E. Ulugay, Türkiye
Povidon K 30	Eczacıbaşı, Türkiye
Kroskarmelloz Sodyum	Fluka Sigma Aldrich, İsveç
Avicel PH 102	İ. E. Ulugay, Türkiye

2.1.2. Kullanılan Aletler

El homojenizatörü	Jimerod Engineers
Ultrasonik Prob	Bandelin/ Sonopuls, Almanya
Erime derecesi tayin cihazı	Thomas Hoover, ABD
Ultra turraks T 25 homojenizatör	IKA, Fransa
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Hassas terazi AX200	Schimadzu, Japonya
HPLC	Waters, İngiltere
HPLC dedektörü	Waters, İngiltere
HPLC kolonu	Phenomenex, ABD
Millipore DI deiyonize su sistemi	Millipore, Fransa
X-Işını Difraktometresi	Ultima, ABD
Millipore Simpak ultrasaf su sistemi	Millipore, Fransa
pH metre	Sartorius, Almanya
Liyofilizatör	Heto Power Dry PL3000, Danimarka
Ultrasonik banyo	Bransonic 220, ABD
UV Spektrofotometre	Schimadzu, Japonya
Vakum pompası	Newman, İngiltere
Rotavapor	Heidolph, Almanya
Etüv	Dedeoğlu, Türkiye
Yatay Çalkalayıcı	Gerhardt, Kart Kolb, Almanya
FT-IR	Perkin- Emler, USA
Vakum pompası	Newman, İngiltere
Termostatlı ısıtıcı	Hake, Almanya
DSC Q 100	TA Instruments, USA
Zetasizer Nano Series nano ZS	Malvern, İngiltere
Çözünme Hızı Cihazı	Sotax CH-4123, İsviçre
Bilyalı Değirmen	Retch, Almanya
Püskürterek Kurutma Cihazı	Buchi, İsviçre
Tablet makinesı	Erweka, Almanya
Granülatör	Erweka, Almanya
Progresif Karıştırıcı	Brook Motors, İngiltere

2.2. Yöntemler ve Deneyler

2.2.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Ezetimibin fizikokimyasal özelliklerini tayin etmek amacıyla Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR) ve ultraviyole (UV) spektrumları çekilmiş, erime derecesi tayini, partikül büyüklüğü dağılımı analizi, diferansiyel taramalı kalorimetrik analizi, X-ışını kırınımı analizi yapılmış, farklı ortamlardaki çözünürlükleri saptanmıştır.

2.2.1.1. FT-IR Spektrumu

Ezetimibin, toz halinde 650 – 4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında Perkin Elmer (USA) FT-IR spektrofotometresi ile spektrumu çekilmiş ve değerlendirilmiştir.

2.2.1.2. UV Spektrumu

Ezetimibin UV spektrumu, 25 µg /ml 'lik çözeltisi kullanılarak % 20 (h/h) Asetonitril:Su çözücü sisteminde 1x1 kuartz hücreler içerisinde 200 – 400 nm arasında taranmış ve verdiği maksimum dalga boyu (λ_{maks}) saptanmıştır.

2.2.1.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analiz

Ezetimibin DSC analizi, DSC Q 100 (TA Instruments, ABD) model diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak yapılmıştır. Alüminyum panlar içine yerleştirilen örneğin (5 mg) 10˚C/dak hızda 10 – 250˚C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında DSC termogramları çekilmiştir. DSC cihazının kalibrasyonu indiyum standardı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.1.4. X-Işını Kırınım Analizleri

Ezetimibin X–ışını kırınımı analizi, Ultima X-ray Difraktometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 5 mg ezetimib, iyice toz edilip plakalar arasına yerleştirilmiş, 40 kV voltajda, 0.02˚/dk tarama hızında, 2θ: 2 – 40˚ arası taranarak X-ışını difraktogramı elde edilmiştir.

2.2.1.5. Ezetimibin Erime Derecesi Tayini

Kılcal tüp içerisine konulan toz haldeki ezetimibin erime noktası, Thomas Hoover Melting Point Apparatus erime derecesi tayin cihazında saptanmıştır. Cihaz beklenen erime derecesinin 10˚C altına kadar ısıtıldıktan sonra, içinde ezetimib bulunan kılcal tüpler cihaza yerleştirilmiştir. Aletin standart ısıtma hızına göre sıcaklığı yükseltilerek, ezetimibin erimeye başladığı sıcaklık ile erimenin tamamlandığı sıcaklık aralığı kaydedilmiştir. Deney altı defa tekrarlanmıştır.

2.2.1.6. Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

Ezetimibin partikül büyüklüğü tayini için Malvern Zeta Sizer Nano Series Nano ZS aleti kullanılmıştır. 20 mg ezetimib tartılmış ve 5 ml'lik balon jojelerde distile su ile dispersiyonu hazırlanmıştır. Ezetimib dispersiyonu 3 dakika boyunca vortekslenmiş ve daha sonra partikül büyüklüğü üç defa ölçülmüştür.

2.2.2. Ezetimibin Kromatografik Miktar Tayini

Çalışmamızda, farmasötik dozaj şekillerinden ezetimibin miktar tayininde UV dedektörlü ters faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi (HPLC) sistemi kullanılmıştır. Etkin madde için; miktar tayini, çözünürlük, çözünme hızı ve dayanıklılık çalışmaları göz önünde bulundurularak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Mobil faz olarak Asetonitril: Su pH:6.8, (1-heptan sülfonik asit sodyum tuzu) karışımı 70:30 oranında kullanılmıştır ve ayrım C18 kolon ile gerçekleştirilmiş, suyun pH'sı 1-heptan sülfonik asit ve 0.1 M NaOH ile 6.8'e ayarlanmıştır, burada, 1-heptan sülfonik asit kullanılmasının nedeni, iyon çifti oluşturarak ezetimibin kolondon daha geç çıkmasını sağlamaktır (91). Ezetimibin miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1. Ezetimibin HPLC ile miktar tayinininde kullanılan kromatografik koşullar.

Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	0.5 ml/dk
Dedektör	UV
Dalga boyu	232 nm
Kolon	SphereClone C_{18} 150 X 4.6 mm
Mobil faz	Asetonitril: Su (pH:6.8, 1-heptan sülfonik asit sodyum tuzu) 70:30
Sıcaklık	25 ºC

Ezetimibin mobil fazdaki 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden hareketle 6 noktalı 6 seri çalışılmıştır. Hazırlanan 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml'lik çözeltiler kullanılarak HPLC ile λ_{maks} 232 nm'de kalibrasyon doğrusu ve kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Ayrıca, farklı çözünme ortamları için her deneyden önce ve sonra çözünme ortamında kalibrasyon serileri hazırlanıp aynı koşullarda kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir.

2.2.2.1. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Ezetimibin kalibrasyon doğrusu, etkin maddenin asetonitril içindeki 1000 µg/ml derişimdeki stok çözeltisinden hareketle uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak elde edilmiştir. Stok çözelti hazırlamak için 10 mg ezetimib asetonitrilde çözülmüştür ve 10 ml'ye asetonitril ile tamamlanmıştır. 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml derişimlerdeki ezetimib çözeltileri bu stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanmıştır. Bu derişimler ile 6 farklı kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Elde edilen 6 kalibrasyon doğrusu üzerinde regresyon analizleri ve varyasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, her analizin başında ve sonunda 2 kalibrasyon serisi hazırlanmıştır. Bu sayede, gün içi ve günler arası farklılığın olmadığı valide edilmiştir.

2.2.2.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, kullanılan analitik yöntemden elde edilen verilerin güvenilirliği hakkında bilgi verir. Ezetimibin in vitro miktar tayin yönteminin validasyonu için doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik), duyarlılık, özgünlük, saptanabilirlik sınırı ve tayin edilebilirlik sınırı, dayanıklılık (etkin maddenin saptanması ve tayini aşamasında) gibi ölçütler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (112).

Doğrusallık (Linearity)

Ezetimibin in vitro miktar tayini için kullanılan yöntemde seçilen derişim aralığında artan derişim ile doğru orantılı olarak artan ezetimib pik alanının arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığı değerlendirilmiştir. Kalibrasyon doğruları Bölüm 2.2.2.1.'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden (1 mg/ml) hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml derişimdeki örneklerin analizi HPLC ile yapılmıştır ve çözeltilerin elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerden hareketle kalibrasyon doğrusunun denklemi elde edilmiştir.

Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk incelemesi, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere yakınlığının gösterilmesi amacıyla yapılmaktadır. Çalışmamızda, düşük, orta, yüksek olmak üzere üç farklı derişimde (5 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml) örnek hazırlanmış, aynı gün içerisinde her bir örnek 6 kez analiz edilip, sonuçların gerçek değerlere yakınlıkları Formül 2.1 kullanılarak % geri kazanım hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısı değerinin her üç derişim için de % 2'den küçük olması önerilmektedir (113, 114).

% Geri Kazanım = (Tayin Edilen Derişim / Eklenen Derişim)x100 (2.1)

Kesinlik (Precision)

Kesinlik, bir yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerle ilgisi yoktur. Sayısal bir değeri yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı derişimde örnek art arda ölçülerek aritmetik ortalama ($\overline{X}$), SS ve VK hesaplaması ile değerlendirilir. Tekrar edilebilirlik (repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) kesinliğin ifade edilmesini sağlar (113, 114).

- **Tekrar Edilebilirlik (Repeatability)**

Aynı derişimdeki ezetimib çözeltisinden hareketle, aynı laboratuar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenmiştir. Stok çözeltiden 5 µg/ml ve 50 µg/ml olacak şekilde düşük ve yüksek iki derişimde örnekler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile 232 nm'de 6 kez ayrı ayrı okutulup, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için ortalama ($\overline{X}$), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın % 2'den küçük olması önerilmektedir (113, 114).

- **Tekrar Elde Edilebilirlik (Reproducibility)**

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır. Ezetimbin stok çözeltisinden 5 µg/ml ve 50 µg/ml olacak şekilde seyreltme yapılmış ve aynı derişimlerde 6 ayrı çözelti hazırlanmıştır. Çözeltilerin pik alanları HPLC ile 232 nm'de elde edilerek $\overline{X}$, SS ve VK hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın % 2'den küçük olması önerilmektedir (113, 114).

Özgünlük (Specificity)

Bir analitik yöntemin özgünlüğü; ortamda bulunan etkin maddenin, yardımcı maddeler, safsızlıklar veya parçalanma ürünleri varlığında analiz edebilmesidir. Miktar tayini için kullanılan analitik yöntemin, sadece ezetimibe ilişkin olduğunu bulmak için hazırlanan formülasyonların içinde yer alan Pluronic F 127'nin 232 nm'de etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir (113, 114).

Duyarlılık (Sensitivity)

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesine yönelik olarak saptanabilirlik ve tayin edilebilirlik sınırları incelenmiştir. Teşhis sınırı, sinyal: gürültü oranının 3:1 olduğu derişimdir. Miktar tayini sınırı ise, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikte tayin edilebileceği en düşük derişimdir. Bu değer sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu derişimdir (113, 114).

Dayanıklılık (Stability)

Analiz süresince kullanılan etkin maddenin dayanıklı olup olmadığının saptanabilmesi için yapılan bir validasyon ölçütüdür. Ezetimibin belirli derişimde hazırlanan çözeltisi, ölçüm süresince etkin maddenin dayanıklılığının gösterilebilmesi için oda sıcaklığında bekletilerek değerlendirilmiştir. 50 µg/ml derişimde hazırlanan çözeltinin absorbansları hazırlandığı anda, 4., 8. ve 12. saatlerde okunarak derişimdeki değişim incelenmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (113, 114).

2.2.3. Çözünürlük Tayini

Ezetimibin çözünme deneyleri sırasındaki sink koşullara uygunluğunun belirlenmesi amacı ile farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlükleri saptanmış, Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi'nde (FDA) ezetimib içeren tablet formülasyonu için kullanılan çözünme hızı ortamı da dahil olmak üzere üç farklı ortam incelenmiştir. Bu ortamlar; 50 mM pH 4.5 asetat tamponu (% 0.15 SDS içeren), 50 mM pH 4.5 asetat tamponu (% 0.45 SDS içeren), 0.01 M sodyum fosfat pH 7 tamponu (% 0.15

SDS içeren)'dur. Yatay çalkalayıcının sıcaklığı termostatla 37±2 ºC'ye ve devir hızı 80 rpm (devir/dk)'e ayarlanmıştır. Ölçüm yapılacak her saat için (1.ve 12. saat) kapaklı tüpler kullanılmıştır. Bu amaçla, 20 ml'lik kapaklı tüplere 50 mg ezetimib, üzerine de çözünme ortamından 17 ml eklenmiştir. Kapaklı tüpler yatay çalkalayıcıya yerleştirilmiş, belirlenen zaman aralıklarında (1 ve 12. saatlerde) 1.5 ml örnek alınmıştır. Her bir örnek üç defa HPLC ile analiz edilmiştir. Bu işlem iki tüp için de yapılmıştır. Bölüm 2.2.2.'da açıklanan miktar tayini yöntemine göre analiz yapılarak ezetimibin çözünürlüğü tespit edilmiştir. Çözünme ortamında oluşan derişim, doygunluğun çok altındaysa bir başka deyişle ortamdaki derişimin doygunluğun en fazla % 15 kadarı olduğunda sink koşul sağlandığından bahsedilir. Çözünürlük tayini yapıldıktan sonra ortamların sink koşulları sağlayıp sağlamadıkları değerlendirilmiştir.

2.2.4. Nanokristal Hazırlama Yöntemleri

Çalışmamızda ezetimibin, nanokristal formülasyonları hazırlanarak partikül büyüklüğü küçültülüp, çözünürlüğünün, dolayısıyla çözünme hızının, buna bağlı olarak da biyoyararlanımının artırılması amaçlanmıştır. Nanokristal formülasyonlarından elde edilen tabletlerin, piyasa preparatından farklı olarak SDS içermeyecek şekilde hazırlanmaları ile çözünme hızlarının artırılması hedeflenmiştir.

2.2.4.1. Etüvde Kurutma (EK) Yöntemi

Ezetimib ve Pluronic F 127 1:1 (a/a) oranında, etkin madde %3 (a/h) derişimde olacak şekilde balon jojeye alınarak gerekli hacime aseton ile tamamlanmış, tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti porselen kapsüle alınmış, aseton önce oda sıcaklığında daha sonra etüvde (50° C) tamamen uçurulmuştur.

2.2.4.2. Birlikte Çöktürme (BÇ) Yöntemi

Ezetimib ve Pluronic F 127 1:1 (a/a) oranında, etkin madde %3 (a/h) derişimde olacak şekilde balon jojeye alınarak gerekli hacime % 96'lık etanol ile tamamlanmıştır. Etkin madde tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda

karıştırılmıştır. Çözelti 100 ml'lik balona alınmış ve 40 °C'de alçak basınçta etanol uçurulmuştur.

2.2.4.3. Yüksek Hızda Homojenizasyon (YHH) Yöntemi

Ezetimib ve Pluronic F 127 1:1 (a/a) oranında, etkin madde %3 (a/h) derişimde olacak şekilde balon jojeye alınarak gerekli hacime distile su ile tamamlanmıştır. Homojen bir süspansiyon elde edebilmek için hazırlanan süspansiyon yarım saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon Ultra Turraks kullanılarak 3 dakika 11000 rpm'de iyice karıştırıldıktan sonra -55 º C' de 0.01 mmHg basınçta 72 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

2.2.4.4. El Homojenizatörü (EH) Yöntemi

Ezetimib ve Pluronic F 127 1:1 (a/a) oranında, etkin madde %3 (a/h) derişimde olacak şekilde balon jojeye alınarak gerekli hacime distile su ile tamamlanmıştır. Homojen bir süspansiyon elde edebilmek için hazırlanan süspansiyon yarım saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Yüksek hızda homojenizasyon yönteminden farklı olarak hazırlanan süspansiyon 50 defa el homojenizatöründen geçirilmiş, daha sonra -55 º C' de 0.01 mmHg basınçta 72 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

2.2.4.5. Ultrasonikasyon (UP) Yöntemi

Ezetimib ve Pluronic F 127 1:1 (a/a) oranında, etkin madde %3 (a/h) derişimde olacak şekilde balon jojeye alınarak gerekli hacime distile su ile tamamlanmıştır. Homojen bir süspansiyon elde edebilmek için hazırlanan süspansiyon yarım saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon ses dalgalarının %20 güçte gönderildiği ultrasonik prob kullanılarak 1 dakika karıştırıldıktan sonra -55 º C' de 0.01 mmHg basınçta 72 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

2.2.4.6. Bilyalı Değirmen Yöntemi

Ezetimib ve Pluronic F 127 1:1 (a/a) oranında, etkin madde %3 (a/h) derişimde olacak şekilde balon jojeye alınarak gerekli hacime distile su ile

tamamlanmıştır. Homojen bir süspansiyon elde edebilmek için hazırlanan süspansiyon yarım saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon 16 adet 20 mm çapında agat bilya kullanılarak 4 dakika süreyle karıştırılmıştır ve daha sonra -55 º C' de 0.01 mmHg basınçta 72 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

2.2.4.7. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Pluronic F 127 ve ezetimib (1:30 a/a) oranında diklorometanda çözündürülerek, 100 ml'ye tamamlanmış ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır. Karışım Tablo 2.2'de çalışma koşulları verilen püskürterek kurutucuda kurutulmuştur.

Tablo 2. 2. Püskürterek kurutma cihazının deney koşulları.

Özellik	**Değerler**
Nozzle Cleaner	5
Pompa (%)	25
Aspiratör (%)	100
Giriş Sıcaklığı (° C)	40
Çıkış Sıcaklığı (° C)	30
Akış hızı (m^3/saat)	30

2.2.4.8. Fiziksel Karışım (FK)

Ezetimib ve Pluronic F 127 1:1 (a/a) oranında bir porselen kapsül içinde porselen spatülle tekdüze olacak şekilde karıştırılarak fiziksel karışım elde edilmiştir.

2.2.5. Tablet Formülasyonlarının Hazırlanması

Toz nanokristal formülasyonların partikül büyüklükleri ve çözünme hızı bulguları göz önünde bulundurularak bilyalı değirmen ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan nanokristallerin tablet formülasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca, proje

kapsamında olduğu için püskürterek kurutucu kullanarak hazırlanan ezetimib mikrokristallerinin ve kontrol grubu olarak da fiziksel karışımın tablet formülasyonları hazırlanmıştır. Aşağıda da açıklandığı gibi yaş granülasyonla hazırlanan formülasyonlar, eksantrik tablet makinası kullanılarak tablet haline getirilmiştir. Ezetimib ile ilgili olarak yapılan patent taramasında EP 1 353 696 B1 numaralı patent kapsamında verilen tablet formülasyonu çalışmamızda kullanılmıştır (Tablo 2.3). Tablette laktoz monohidrat NF ve mikrokristalin selüloz NF seyreltici doldurucu, povidon (K29-32) USP bağlayıcı, kroskarmelloz sodyum NF dağıtıcı, sodyum lauril sülfat çözünürlük artırıcı yüzey etkin madde, magnezyum stearat kaydırıcı olarak kullanılmıştır.

Tablo 2. 3. EP 1 353 696 B1 nolu patentte verilen ezetimib içeren tablet formülasyonunun içeriği .

Tablet İçeriği	**mg/tablet**
Ezetimib	10
Laktoz monohidrat NF	55
Mikrokristalin Selüloz NF	20
Povidon (K29-32) USP	4
Kroskarmelloz sodyum NF	8
Sodyum Lauril Sülfat	2
Magnezyum Stearat	1
Toplam	100

Tablo 2. 4. Ultrasonikasyon Yöntemi ile hazırlanan nanokristal içeren tablet formülasyonunun içeriği .

Tablet İçeriği	**mg/tablet**
Ultrasonikasyon Yöntemi ile Hazırlanan Nanokristal	20
Laktoz	50
Avicel PH 102	20
Povidon K 30	1
Kroskarmelloz Sodyum	8
Magnezyum Stearat	1
Toplam	100

Tablo 2. 5. Bilyalı Değirmen Yöntemi ile hazırlanan nanokristal içeren tablet formülasyonunun içeriği .

Tablet İçeriği	**mg/tablet**
Bilyalı Değirmen Yöntemi ile Hazırlanan Nanokristal	20
Laktoz	50
Avicel PH 102	20
Povidon K 30	1
Kroskarmelloz Sodyum	8
Magnezyum Stearat	1
Toplam	100

Tablo 2. 6. Fiziksel Karışım içeren tablet formülasyonunun içeriği.

Tablet İçeriği	**mg/tablet**
Fiziksel Karışım	20
Laktoz	50
Avicel PH 102	20
Povidon K 30	1
Kroskarmelloz Sodyum	8
Magnezyum Stearat	1
Toplam	100

Tablo 2. 7. Fiziksel Karışım içeren tablet formülasyonunun içeriği.

Tablet İçeriği	**mg/tablet**
Fiziksel Karışım	20
Laktoz	48
Avicel PH 102	20
Povidon K 30	1
Kroskarmelloz Sodyum	8
Sodyum Lauril Sülfat	2
Magnezyum Stearat	1
Toplam	100

Tablo 2. 8. Püskürterek Kurutma Yöntemi ile hazırlanan nanokristal içeren tablet formülasyonunun içeriği.

Tablet İçeriği	**mg/tablet**
Püskürterek Kurutma Yöntemi ile Hazırlanan Nanokristal	13.33
Laktoz	56.67
Avicel PH 102	20
Povidon K 30	1
Kroskarmelloz Sodyum	8
Magnezyum Stearat	1
Toplam	100

Tablo 2.4 – 2.8' deki formülasyonlarda etkin madde yerine yukarıda sözü edilen formülasyonlardan 10 mg ezetimibe karşılık gelecek şekilde (ultrasonikasyon, bilyalı değirmen, püskürterek kurutma, SDS içeren fiziksel karışım ve SDS içermeyen fiziksel karışım) kullanılmıştır. Yardımcı maddeler piyasada kullanılan orijinal ilaçla (Zetia®) (EP 1 353 696 B1 numaralı patentte verilen formülasyonla SDS dışında, nitelik olarak) aynı olacak şekilde seçilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacı ile fiziksel karışım içeren tablet, hem SDS içerecek hem de içermeyecek şekilde hazırlanmıştır.

Tablet formülasyonlarının hazırlanması için; etkin madde, laktoz ve kroskarmelloz sodyumun 1/3'ü havana alınmıştır. Üzerine ayrı bir yerde hazırlanan %1'lik Povidon K 30'un sudaki çözeltisi toz karışımı pat kıvamına gelene kadar damla damla eklenmiş, toz karışımı homojen bir şekilde havan eli ile karıştırılmış ve granülatörden geçirilmiş, 50°C'lik etüvde kurutulmuş, 8 numaralı elekten elenmiştir. Daha sonra bu granülenin üzerine mikrokristalin selüloz (avicel PH 102) ve kroskarmelloz sodyumun geriye kalan kısmı (2/3'ü) eklenmiştir. Boş bir kavanoza magnezyum stearat konulduktan sonra üzerine hazırlanan toz karışımı eklenmiş

progresif karıştırıcıda yarım saat süreyle karıştırılmıştır ve hazırlanan toz kütlesi ile toplam ağırlığı 100 mg olan tabletler basılmıştır.

2.2.6. Nanokristal ve Tablet Formülasyonlarında Etkin Madde Miktar Tayini

Teorik olarak 5 mg ezetimib içeren karışım 25 ml'lik balon jojelere alınmıştır. Üzerine 5 ml etanol ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra çözünme ortamı ile 25 ml'ye tamamlanmış, çözelti manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırılmış ve ultrasonik banyoda 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, örneklerin içerdikleri ezetimib miktarı Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir. Kontrol grubu olarak 10 mg ezetimib kullanılmıştır.

Tablet hazırlamak için oluşturulan toz karışımının üç farklı bölgesinden örnekler alınmış, alınan örneklerin üzerine 5 ml etanol eklenmiş, iyice karıştırıldıktan sonra 25 ml'ye çözünme ortamı ile tamamlanmıştır. Örnek manyetik karıştırıcı ile 4 saat karıştırılmış ve ultrasonik banyoda 2 saat bekletilmiştir, bu süre sonunda örneklerdeki ezetimib miktarları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir.

2.2.7. Nanokristal Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

2.2.7.1. Formülasyonların FT-IR Spektrumları

Ezetmib nanokristallerinin FT–IR spektrumları, Perkin Elmer (USA) FT-IR spektrometresinde ve 4000 – 650 cm^{-1} dalga sayıları arasında kaydedilmiştir.

2.2.7.2. Formülasyonların X – Işını Kırınımı Analizleri

Formülasyonların X – ışını kırınımı analizleri Ultima X-ray Difraktometresi x-ışını kırınımı cihazı kullanılarak 40 kV voltajda, 0.02˚/dk tarama hızında, 2θ: 0 – 40˚ arası taranarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.7.3. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi

Kalorimetrik analiz, DSC Q 100 (TA Instruments, USA) model diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Alüminyum panlar içine yerleştirilen örneklerin (5 – 20 mg), 10° C / dak hızında, 10 – 250 °C sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında ısıtılarak, DSC termogramları çekilmiştir. Referans olarak boş alüminyum pan kullanılmıştır. Sıcaklıktaki artışa bağlı olarak örneklerde meydana gelen ısı değişimi ölçülmüştür.

2.2.7.4. Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü tayini için Malvern Zeta Sizer Nano Series Nano ZS aleti kullanılmıştır. Değişik yöntemlerle (birlikte çöktürme, yüksek hızda homojenizasyon, ultrasonikasyon, etüvde kurutma, el homojenizatörü, bilyalı değirmen, püskürterek kurutucu) hazırlanan nanokristal formülasyonlarından belli miktar (10 – 30 mg) tartılmıştır ve 5 ml'lik balon jojelerde distile su ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Formülasyonlar distile su içinde dağıtılarak 3 dakika boyunca vortekslenmiştir ve daha sonra partikül büyüklükleri üç defa ölçülmüştür.

2.2.8. Çözünme Hızı Deneyi

Çözünme hızı deneyi için, FDA'de "Dissolution Methods for Drug Products" kılavuzunda bildirilen çözünme ortamı da dikkate alınarak üç farklı çözünme ortamı seçilmiştir. Çözünme hızı tayini, Sotax çözünme hızı tayini cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çözünme ortamından 10., 20., 30., 45., 60., 90. ve 180. dakikalarda 5'er ml örnek alınmış ve aynı miktardaki taze ortam çözünme ortamına ilave edilmiştir. % çözünen miktarlarda 45. dakikadan sonra artış görülmediğinden deney bulguları 45 dakikaya kadar verilmiştir. Alınan örneklerde, % çözünen ezetimib miktarları hesaplanmıştır. Deney, her formülasyon için ve kontrol grupları için 6 kez tekrarlanmıştır. Her bir nanokristal formülasyonu, her bir tablet formülasyonu ve kontrol grupları için farklı çözünme ortamlarında, % çözünen ezetimib değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan çözünme deneyine ilişkin özellikler Tablo 2.9'da verilmiştir. Çözünme hızı deneylerinde 10 mg

ezetimibe karşılık gelen nanokristal formülasyonları kullanılmıştır. Tablet formülasyonlarında ise, 20 mg nanokristal formülasyonlarının içerdiği ezetimib miktarları kullanılarak % çözünen ezetimib hesaplanmıştır.

Tablo 2. 9. Çözünme hızı ortamları ve koşulları.

Kod	**Çözünme Ortamı (ÇO)**	**Çözünme Ortamı Hacmi**	**Devir Hızı**	**Aparat Türü**	**Sıcaklık**
ÇO1	0.01M Sodyum Fosfat, pH 7.0/0.15 % SLS	900 ml	50 rpm	Aygıt II (pedal)	37 ± 0.5 ºC
ÇO2	0.15 % SLS 0.05 M Asetat Tamponu, pH 4.5	500 ml	50 rpm	Aygıt II (pedal)	37 ± 0.5 ºC
ÇO3	0.45 % SLS 0.05 M Asetat Tamponu, pH 4.5	500 ml	50 rpm	Aygıt II (pedal)	37 ± 0.5 ºC

Çözünme hızı deneylerine başladığımızda ilk olarak ÇO1 kullanılmıştır. Çünkü FDA'da "Dissolution Methods for Drug Products" kısmında ezetimib için sadece ezetimib/simvastatin kombine tabletleri için kullanılan ortam hakkında bilgi bulunmaktadır. Sadece ezetimib içeren tabletler için resmi yöntem herhangi bir kaynakta bulunmadığından kombinasyon preparatın çözünme ortamı ile çalışmalar başlatılmıştır. Yüzey etkin maddenin çözünürlük ve çözünme hızına etkisinin daha iyi anlaşılması için % 0.15 SDS içeren çözünme ortamı da denemelere dahil edilmiştir. Daha sonra (14.01.2008 tarihinde) FDA sadece ezetimib içeren tabletler için çözünme ortamı olarak ÇO3'ü yayınlamıştır. Yine aynı yaklaşımla SDS oranı % 0.45'den % 0.15'e indirilerek çözünme hızı deneyleri yapılmış ve değerlendirilmiştir. İn vitro çözünme hızı profilleri f_2 benzerlik faktörü hesaplanarak değerlendirilmiştir.

$$f_2 = 50 \log\left(\left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^{n} (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \text{x } 100 \right) \quad (2.1.)$$

f_2= Benzerlik faktörü

n=Örnek alma sayısı

T_t=t anında test ürünün çözünme değerleri

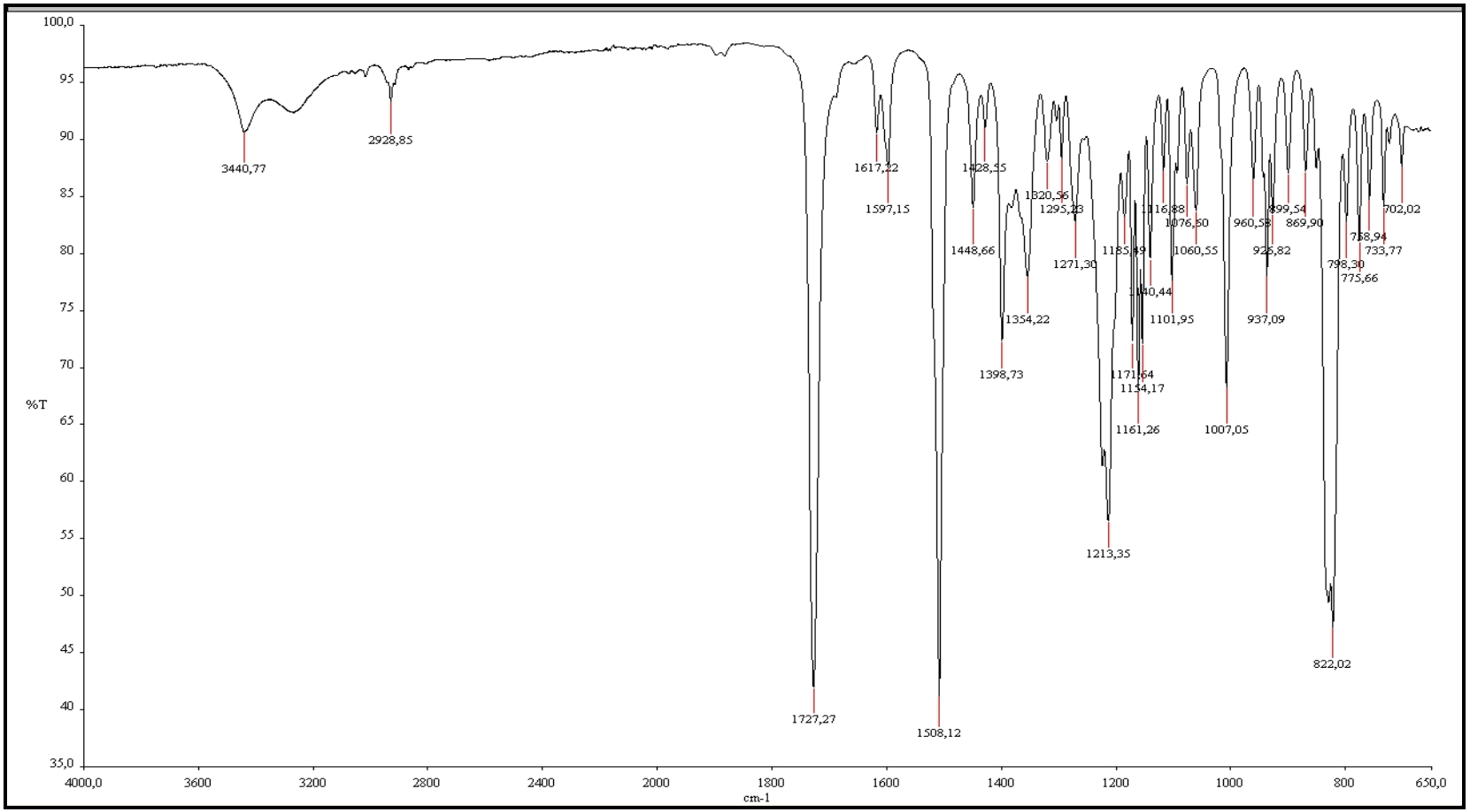
R_t= t anında referans ürünün çözünme değerleri

3. BULGULAR

3.1. Ezetimibin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

3.1.1. Ezetimibin FT-IR Spektrumu

Perkin Elmer (USA) FT-IR spektrofotometresinde 4000 – 650 cm^{-1} dalga sayıları arasında kaydedilen bulgular Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Ezetimibin FT-IR spektrumu.

Şekilde,

1760 – 1690 cm^{-1}'de karbonil grubuna ait karakteristik C=O gerilim bantları,

1600 – 1500 cm^{-1}'de aromatik halkaya ait C=C rezonans çifte bağ gerilim bantları,

1300 – 1000 cm^{-1}'de ester grubuna ait kuvvetli C-O gerilim bantları,

3000 – 2850 cm^{-1}'de kuvvetli alifatik C-H gerilim bantları,

3650 – 2700 cm^{-1}'de karboksilik asit grubuna bağlı genişlemiş O-H gerilim bantları,

1000 – 1200 cm^{-1}'de C-F gerilim bantları ve

800 – 1000 cm^{-1}'de p- disübstitüe benzen gerilim bantları görülmektedir.

3.1.2. Ezetimibin UV Spektrumu

Bölüm 2.2.1.2.'de anlatıldığı gibi ezetimibin 25 µg/ml derişimdeki çözeltisinin UV spektrumunda maksimum dalga boyu 230 – 235 nm aralığında tespit edilmiştir (Şekil 3.2). UV spektrum bilgileri Singh ve arkadaşlarının çalışması ile uyumlu bulunmuştur (115).

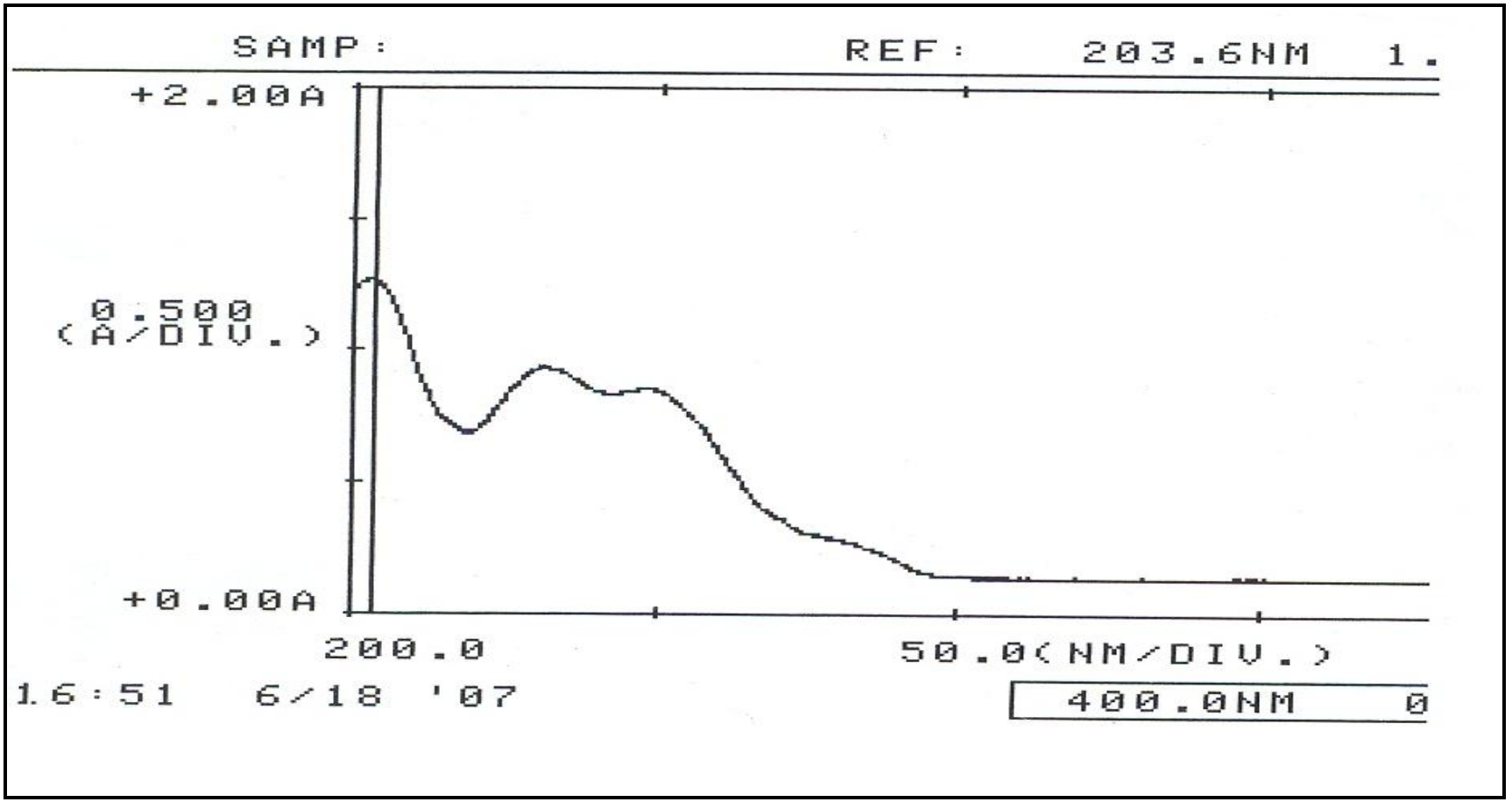
3.1.3. Ezetimibin Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik Analizi

Ezetimib için kalorimetrik analiz (DSC), bölüm 2.2.1.3.'de belirtilen koşullar altında yapılmıştır ve elde edilen termogram Şekil 3. 3'de verilmiştir. Şekil 3. 3 değerlendirildiğinde, ezetimibin erime endoterminin 164.65 ˚C'de olduğu görülmektedir. Bu sonuç da, literatürde verilen değerlerle uyumludur (Şekil 3. 4) (88).

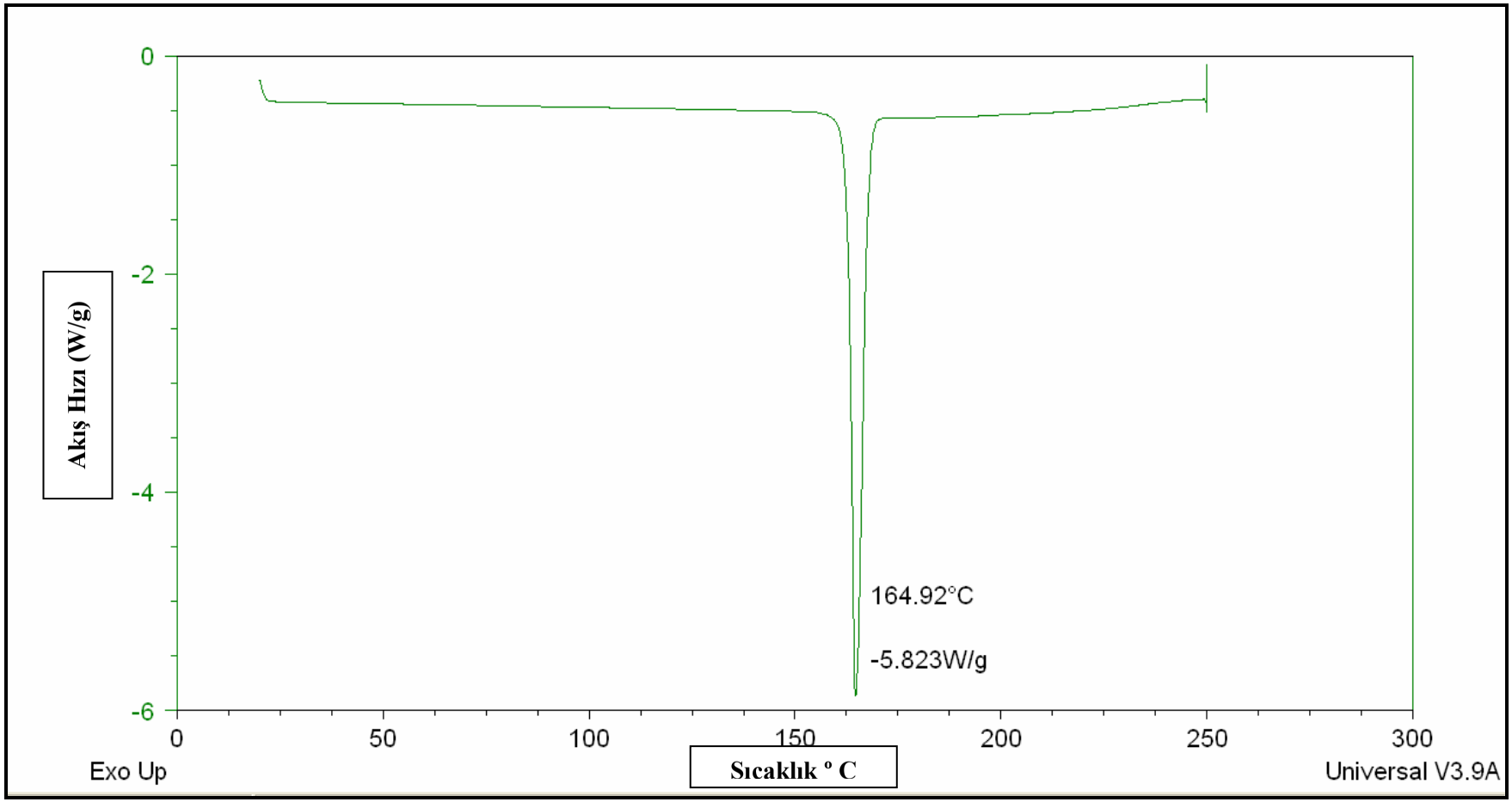
3.1.4. Ezetimibin X – Işını Kırınımı Analizi

Bölüm 2.2.1.4.'de açıklandığı gibi X-ışını kırınımı analizi yapılmıştır. Ezetimibin X-ışını kırınımı difraktogramı Şekil 3.5'de verilmiştir. X-ışını difraktogramında piklerin görülmesi kristal yapı varlığını gösterir. Amorf yapı varlığında ise, X-ışını difraktogramında herhangi bir pik gözlenmemektedir. Ezetimibin kristal yapıda olduğu difraktogramda açık bir şekilde görülmektedir. Ayrıca ezetimibin US 2006/0234996 A1 numaralı patentte verilen X-ışını

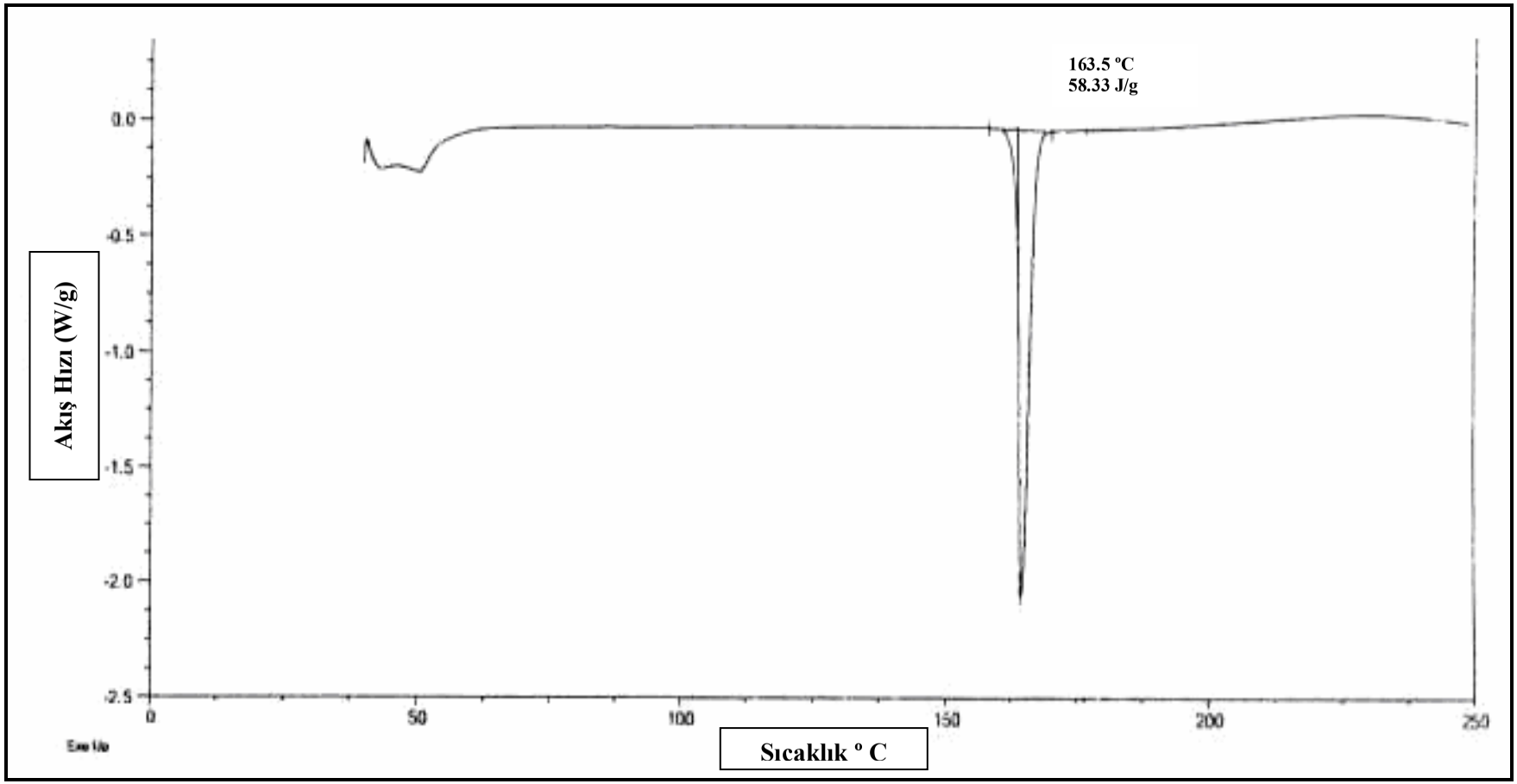
difraktogramı ile deneysel olarak elde edilen difraktogram karşılaştırıldığında benzer olduğu görülmektedir (Şekil 3.5 ve 3.6).



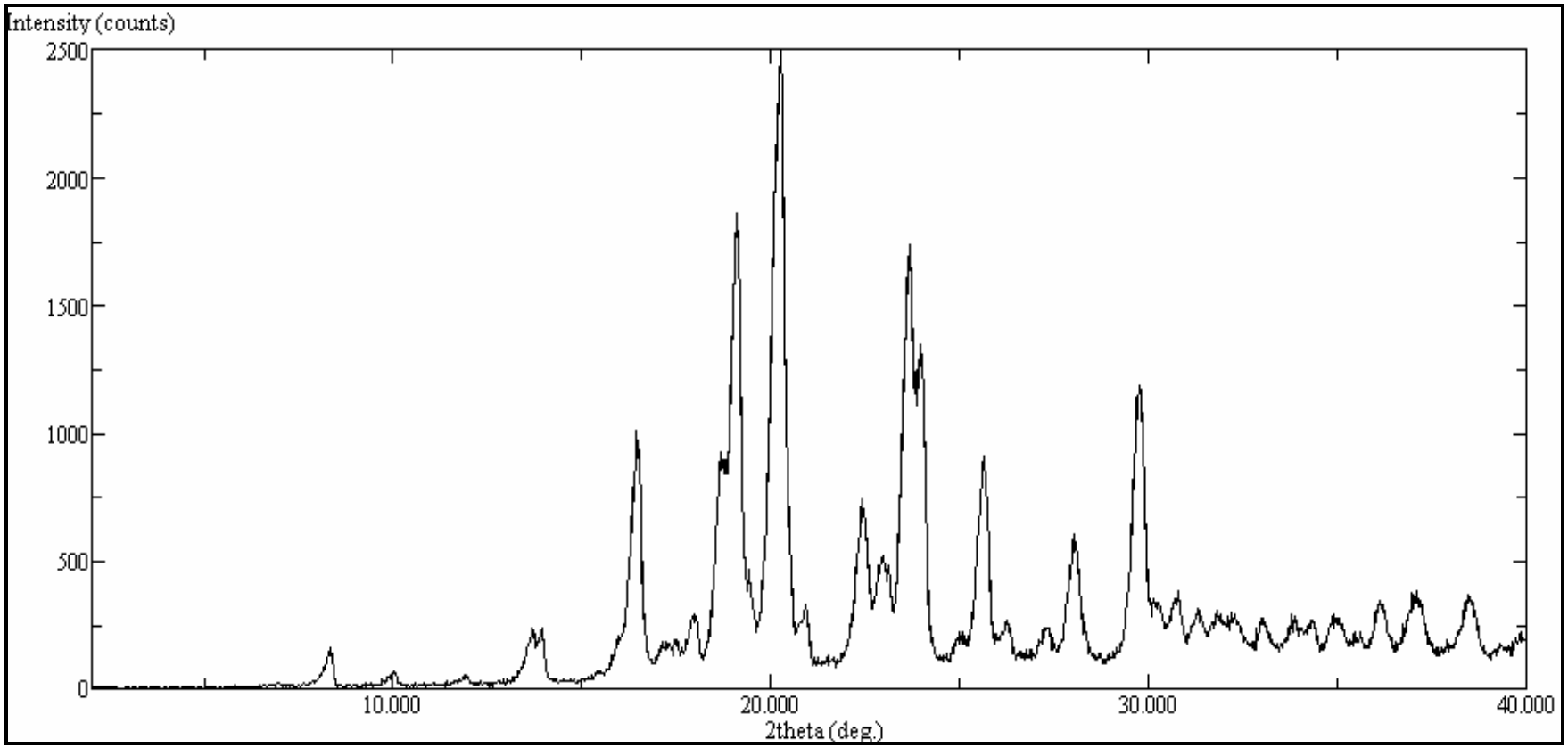
Şekil 3. 2. Ezetimibin UV spektrumu.



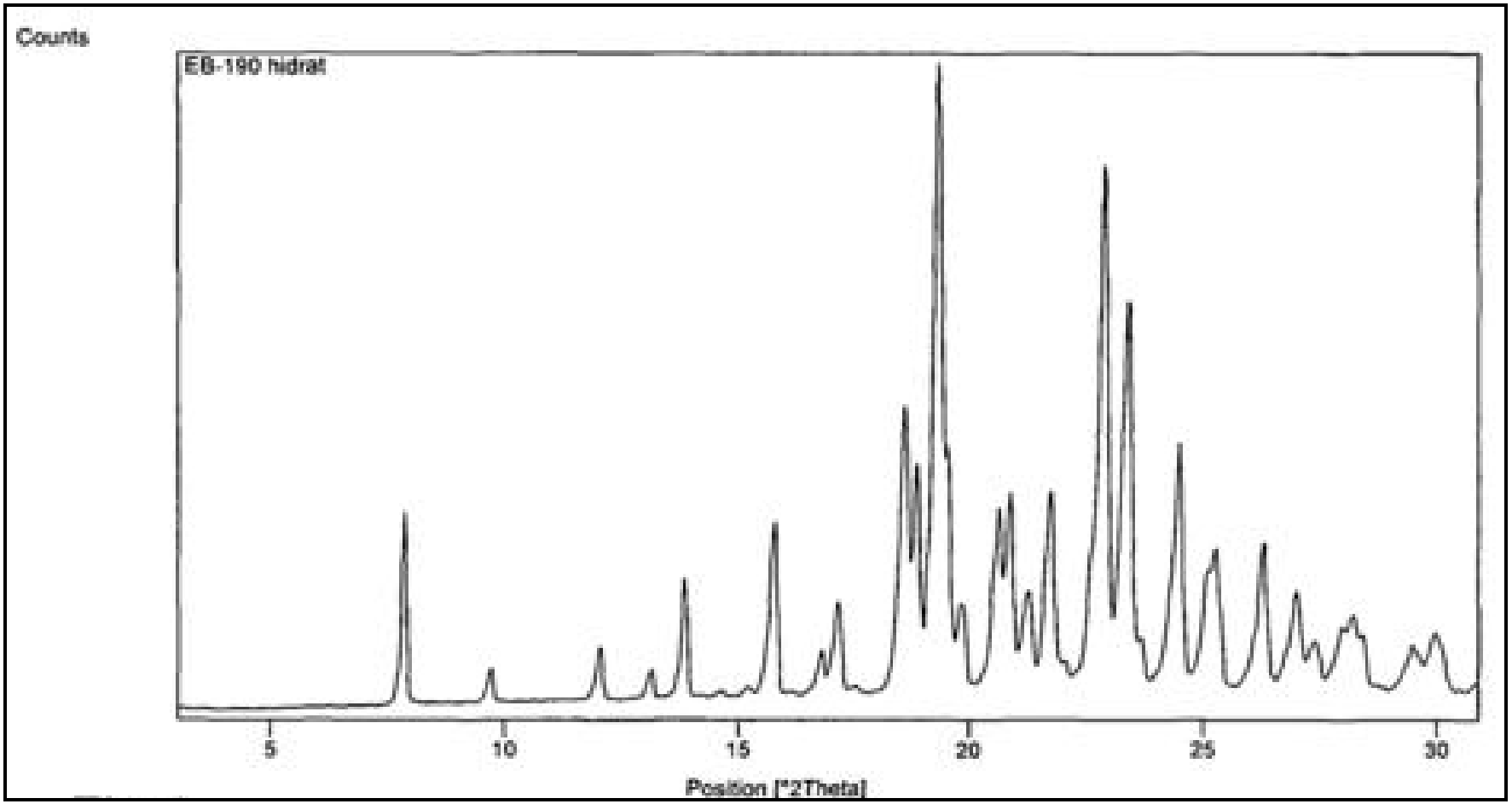
Şekil 3. 3. Ezetimibin DSC termogramı.



Şekil 3. 4. Ezetimibin US 2006/0234996 A1 patentinde verilen DSC termogramı.



Şekil 3. 5. Ezetimibin X-ışını kırınımı difraktogramı.



Şekil 3. 6. Ezetimibin US 2006/0234996 A1 patentinde verilen X-ışını kırınımı difraktogramı.

3.1.5. Ezetimibin Erime Derecesi Tayini

Erime derecesi tayini sonuçları Tablo 3.1'de verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda ezetimibin erime derecesi 161.5 ± 0.83 °C olarak bulunmuştur. Bu bulgu, literatürde verilen 161 – 165 °C aralığına uygundur (88, 91). Deneyde referans olarak borik asit kullanılmıştır. Borik asidin erime derecesi 174 – 175 ° C bulunmuştur ve bu sonuç, Merck Indeks'de verilen değerle uyumludur.

Tablo 3. 1. Ezetimibin erime derecesi sonuçları.

Deneme	**Erime Derecesi**
1	162
2	161
3	162
4	162
5	161
6	160
Ortalama	161.5
Standart Sapma	0.83
Varyasyon Katsayısı	0.51

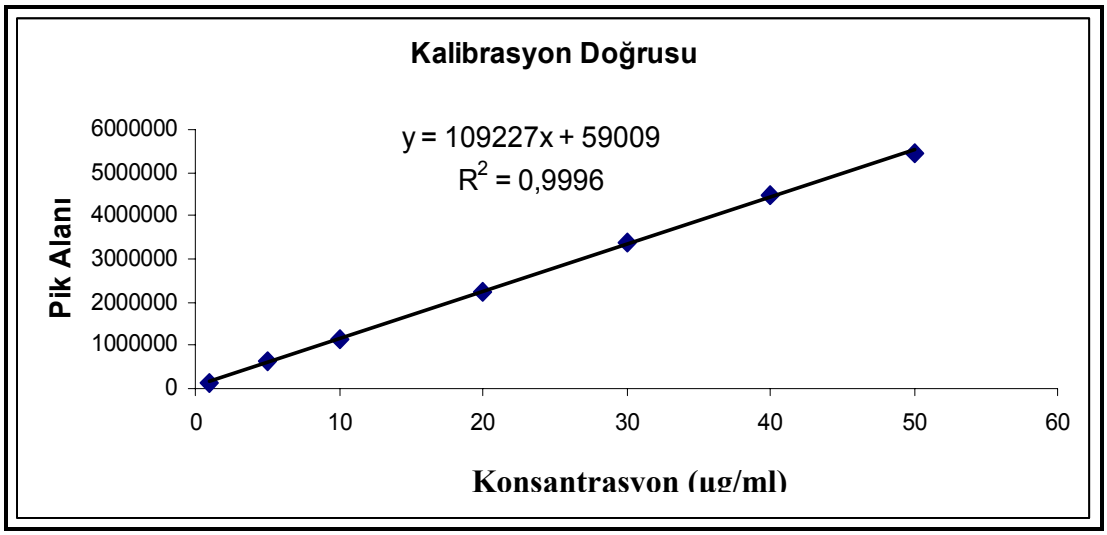
3.1.6. Ezetimibin Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü tayini için Malvern Zeta Sizer Nano Series Nano ZS aleti kullanılmıştır. İç fazın refraktif indeksi 1.59, dış fazın ise 1.33 olarak alınmıştır. Sıcaklık 25 ºC'ye ayarlanmıştır. Art arda üç ölçüm yapılmıştır ve her ölçümde on iki taramanın (run) ortalaması alınmaktadır. Ezetimibin ortalama partikül büyüklüğü intensity cinsinden 6432 ± 1024 nm bulunmuştur.

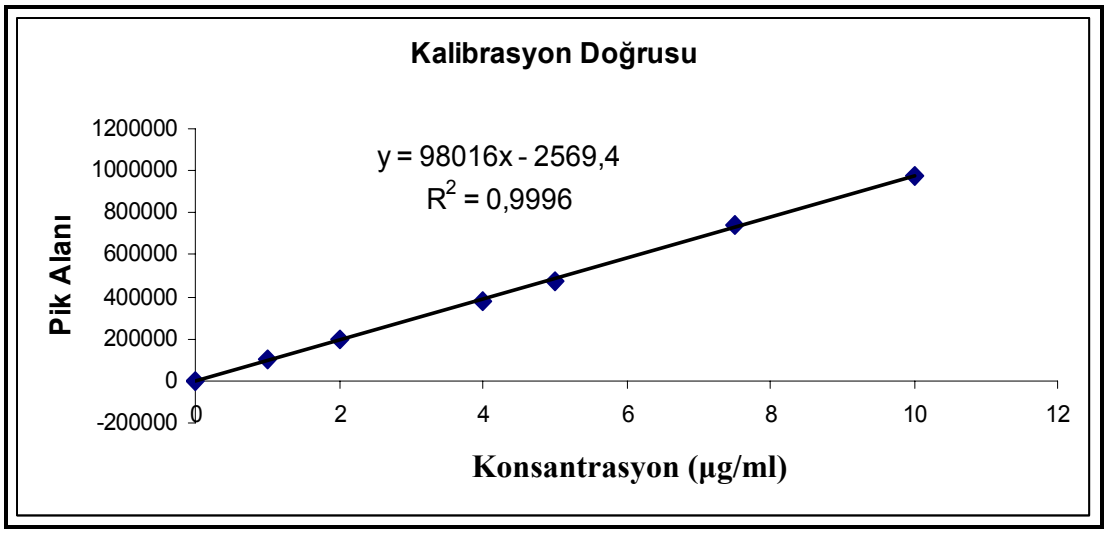
3.2. Ezetimibin Miktar Tayini

3.2.1. Kalibrasyon Doğrusu

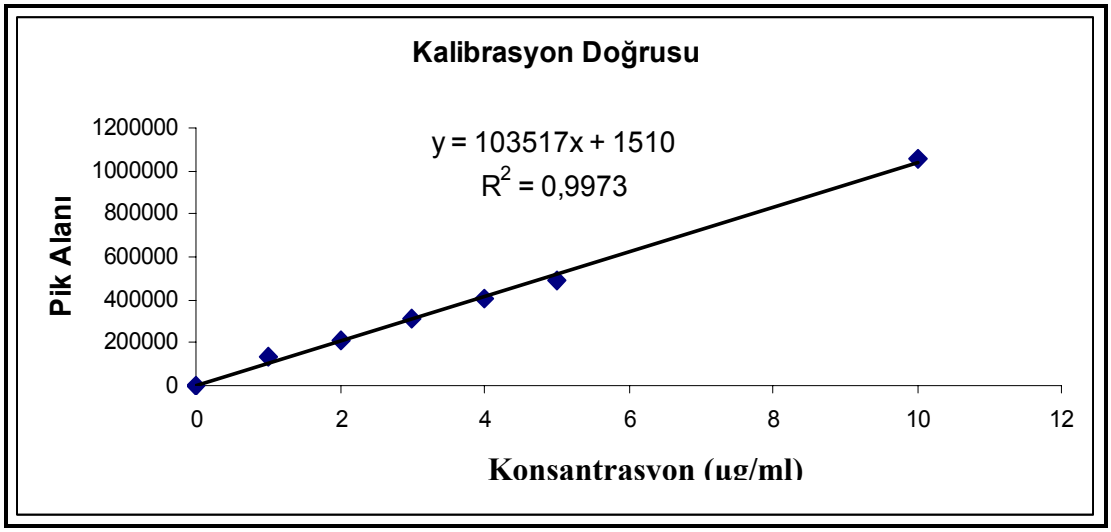
Bölüm 2.2.2.1.'de açıklandığı gibi hazırlanan farklı derişimdeki çözeltiler kullanılarak, ezetimib için kalibrasyon doğruları çizilmiş ve doğruların denklemi doğrusal regresyonla bulunmuştur. Daha sonra kalibrasyon doğrusunun doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü yapılarak, doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu bulunmuştur. Kalibrasyon doğruları Şekil 3.7 – 3.10'da verilmiştir. Ezetimibin HPLC kromatogramında da (Şekil 3.11) görüldüğü gibi ezetimibin alıkonma zamanı (t_R) 4.36 dakikadır.



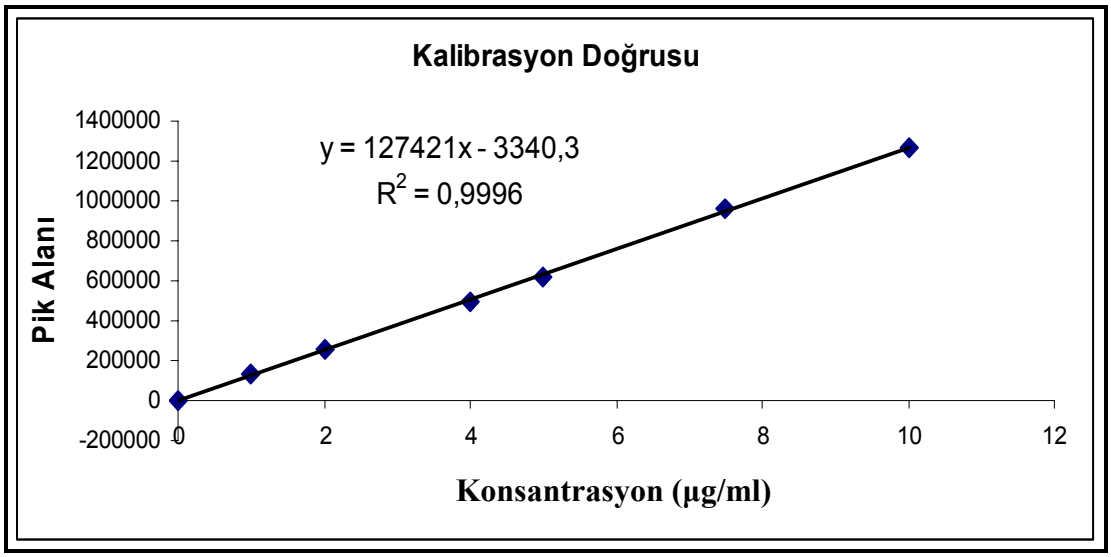
Şekil 3. 7. Ezetimibin Asetonitril:Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6) (% 95 güven aralığında $105180.08 \leq \beta_1 \leq 113273.91$).



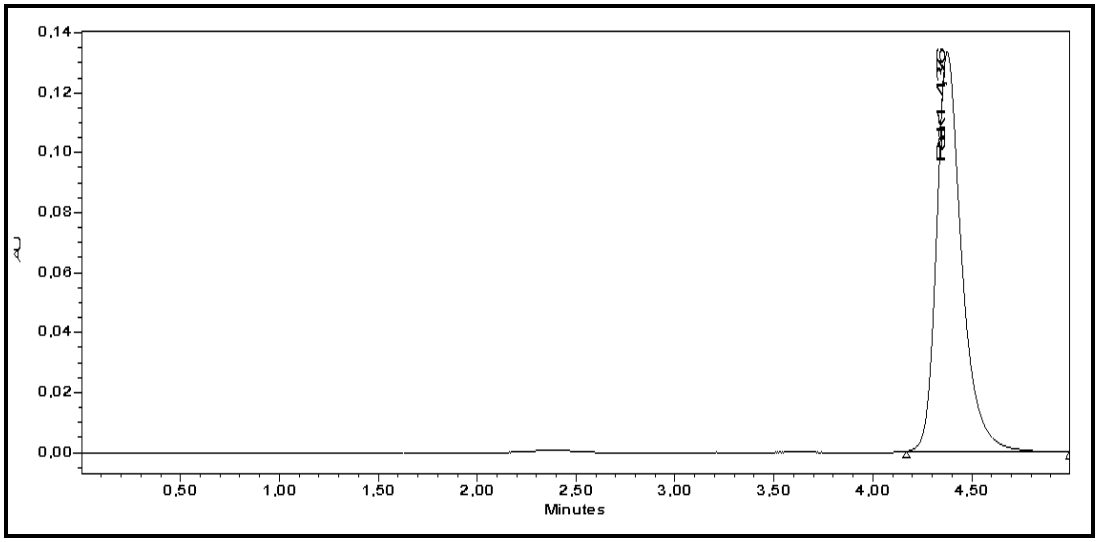
Şekil 3. 8. Ezetimibin 0.01M Sodyum Fosfat, pH 7.0/0.15 % SDS içeren çözünme ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6) (% 95 güven aralığında $86307.60 \leq \beta_1 \leq 105910.60$).



Şekil 3. 9. Ezetimibin 0.05 M Asetat Tamponu, pH 4.5/0.15 % SDS çözünme ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6) (% 95 güven aralığında $79911.61 \leq \beta_1 \leq 127122$).



Şekil 3. 10. Ezetimibin 0.05 M Asetat Tamponu, pH 4.5/0.45 % SDS çözünme ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6) (% 95 güven aralığında $118586.43 \leq \beta_1 \leq 136255.56$).



Şekil 3. 11. Asetonitril:Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki ezetimibe (10 µg/ml) ait HPLC kromatogramı.

3.2.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Ezetimibe ait miktar tayini yöntemi; doğrusallık, doğruluk, kesinlik, özgünlük, duyarlılık, dayanıklılık açısından incelenmiş ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Doğrusallık (Linearity)

Kalibrasyon doğruları Bölüm 2.2.2.1.'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden (1 mg/ml) hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml derişimdeki örneklerin HPLC analizi yapılmıştır. Pik alanlarından bunlara karşılık gelen derişimler hesaplanmış ve doğru denklemi elde edilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısı R^2 = 0,9996 olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir (Bkz. Şekil 3.7).

Doğruluk (Accuracy)

Bölüm 2.2.2.2'nin altında doğruluk kısmında açıklandığı gibi düşük, orta, yüksek olmak üzere üç farklı derişim (5 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml) seçilmiş ve örneklerin analizi sonucunda bulunan değerler kalibrasyon doğrusunda yerine konularak derişim ve % geri kazanım miktarları hesaplanmıştır. (Tablo 3.2). Her üç derişimde de varyasyon katsayısı değeri % 2'den küçük bulunmuştur.

Tablo 3. 2. Ezetimibin Asetonitril: Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki 5 µg/ml, 20 µg/ml ve 50 µg/ml derişimleri için doğruluk sonuçları(n=6).

Eklenen Derişim (µg/ml)			**Tayin Edilen Derişim (µg/ml)**			**% Geri Kazanılan**		
5	20	50	4.943	19.082	48.563	98.860	95.410	97.126
5	20	50	4.901	19.833	50.153	98.020	99.165	100.306
5	20	50	4.935	20.040	49.955	98.700	100.200	99.694
5	20	50	5.018	19.674	49.847	100.360	98.370	99.694
5	20	50	4.974	19.546	51.028	99.480	97.730	102.056
5	20	50	5.004	19.978	50.430	100.080	99.890	100.860
Ortalama			4.963	19.692	49.996	99.250	98.461	99.992
SS			0.044	0.351	0.819	0.887	1.755	1.638
VK (%)			0.894	1.783	1.638	0.894	1.783	1.638

Kesinlik

Tekrar Edilebilirlik (Repeatability)

Bölüm 2.2.2.2'nin altında tekrar edilebilirlik kısmında açıklandığı gibi, 5 µg/ml ve 50 µg/ml olacak şekilde düşük ve yüksek iki farklı ezetimib derişimi seçilmiştir. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için $\overline{X}$, SS ve VK hesaplanmıştır. VK'nın %2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir (Tablo 3.3).

Tablo 3. 3. Ezetimibin Asetonitril: Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki 5 µg/ml ve 50 µg/ml derişimleri için tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).

Örnek	Pik alanı (λ= 232 nm)	Derişim (µg/ml)	$\overline{X}_{ort} \pm SS$	VK (%)
5µg/ml	601867	4.972	4.897±0.060	1.233
	585483	4.820		
	594221	4.904		
	598590	4.941		
	595314	4.912		
	586575	4.830		
50 µg/ml	5670636	51.376	51.340±0.075	0.146
	5665370	51.329		
	5658588	51.260		
	5670497	51.374		
	5657700	51.251		
	5678516	51.447		

Tekrar Elde Edilebilirlik (Reproducibility)

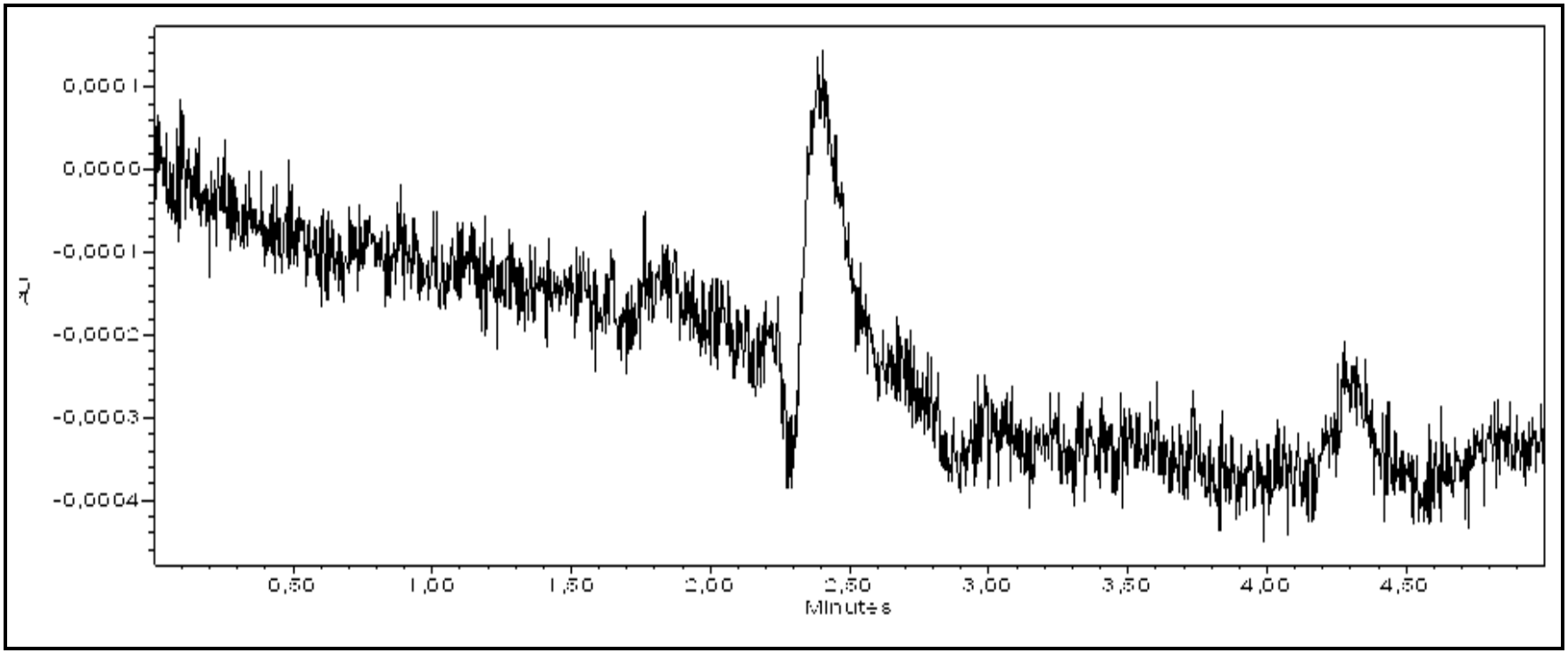
5 µg/ml ve 50 µg/ml ezetimib içeren çözelti 6 defa hazırlanmış ve çözeltilerin pik alanları HPLC ile 232 nm'de saptanmıştır. Daha sonra, bu pik alanlarına karşılık gelen derişimler için X, SS ve VK hesaplanmıştır. VK'nın % 2'den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini gösterir (Tablo 3.4).

Tablo 3. 4. Ezetimibin Asetonitril: Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki 5 µg/ml ve 50 µg/ml derişimleri için tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6).

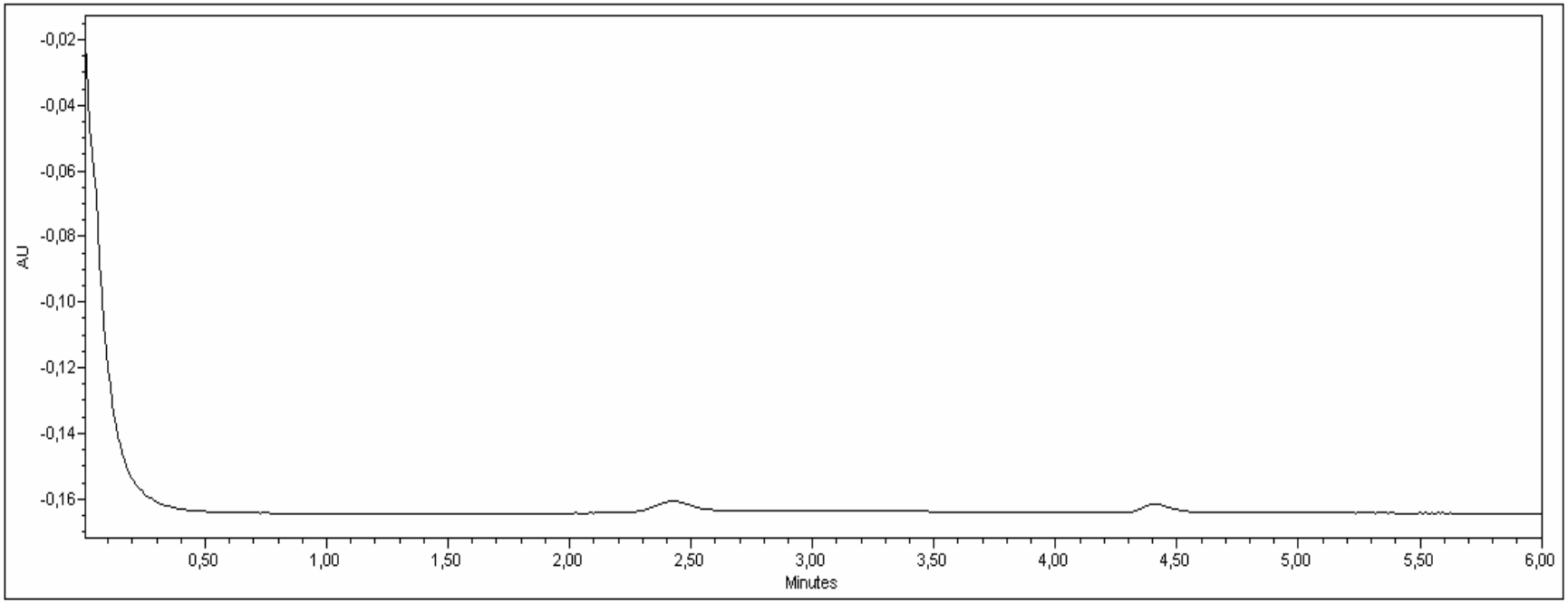
Örnek	**Pik alanı (λ= 232 nm)**	**Derişim (µg/ml)**	$\bar{X}_{ort} \pm SS$	**VK (%)**
5µg/ml	604051	4.996	4.968±0.022	0.456
	599682	4.954		
	605103	4.990		
	601867	4.973		
	597498	4.937		
	599682	4.957		
50 µg/ml	5505760	49.863	51.292±0.817	1.593
	5679417	51.458		
	5657429	51.255		
	5644744	51.130		
	5773989	52.321		
	5709117	51.722		

Özgünlük (Specificity)

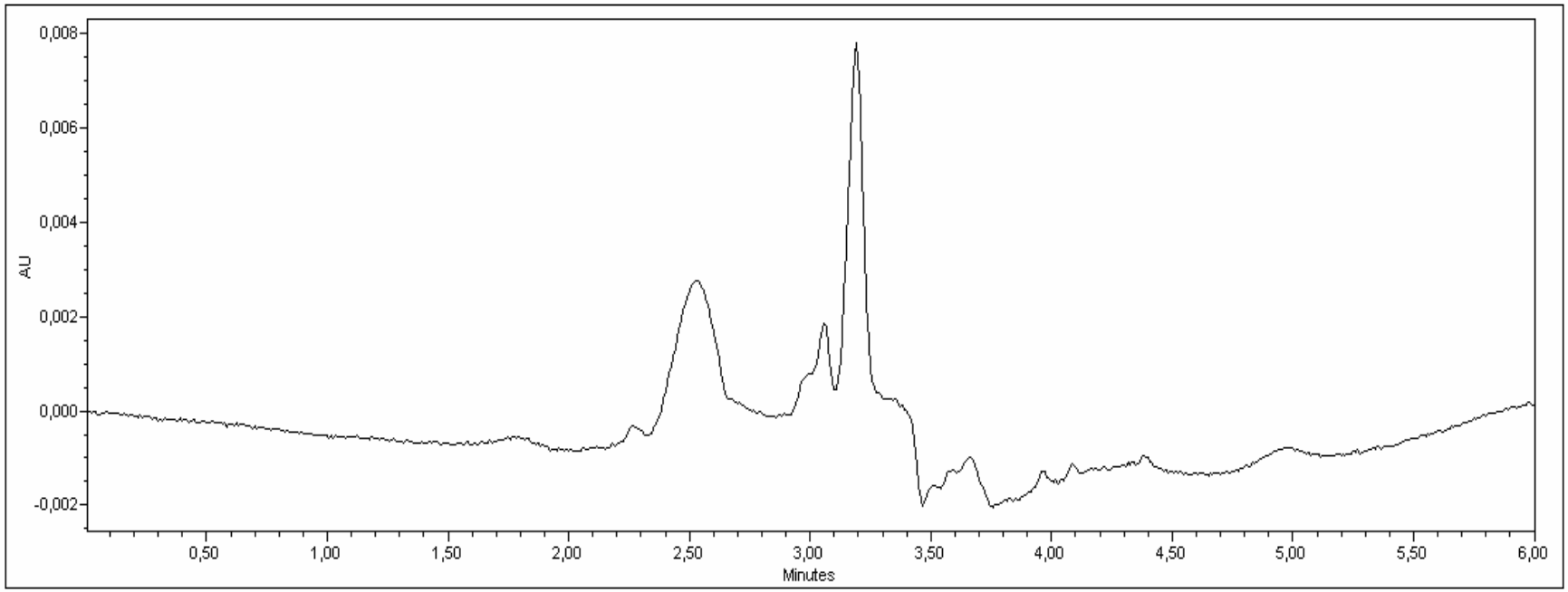
Bölüm 2.2.2.2'nin altında özgünlük kısmında açıklandığı gibi, formülasyona giren yardımcı maddenin 232 nm'de (ezetimibin absorbans verdiği dalga boyunda) herhangi bir pik verip vermediğinin test edilebilmesi için Pluronic F 127 ve tablet içindeki yardımcı maddelerin etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanarak analizi yapılmış ve Ezetimib ile Pluronic F 127 ve tabletlerde kullanılan diğer yardımcı maddelerin aynı zamanda pik vermediği gözlenmiştir. Ezetimibin alıkonma zamanı 4.36 dakika (Şekil 3.11) iken Pluronic F 127 ve tabletlerde kullanılan diğer yardımcı maddelerin ezetimib ile aynı yerde pik vermediği Şekil 3.12-3.18'de görülmektedir.



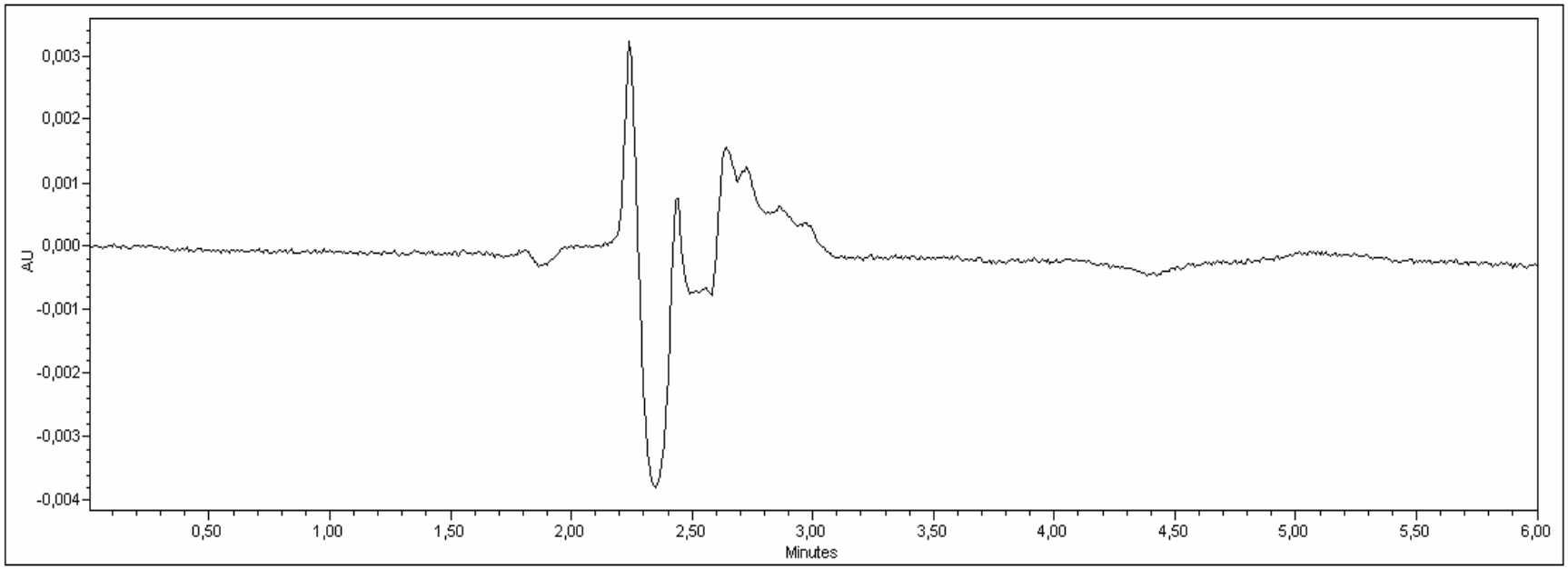
Şekil 3. 12. Pluronic F 127'ye ait HPLC kromatogramı.



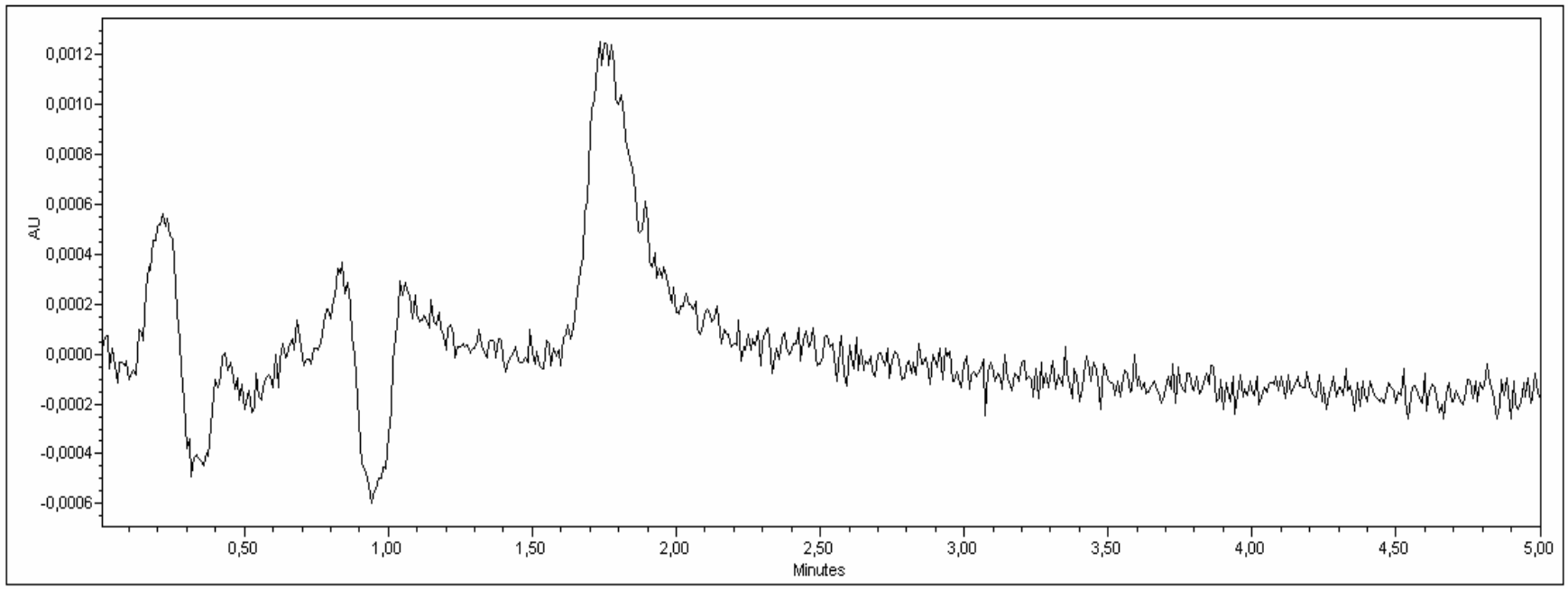
Şekil 3. 13. Laktoz monohidarat NF'e ait HPLC kromatogramı.



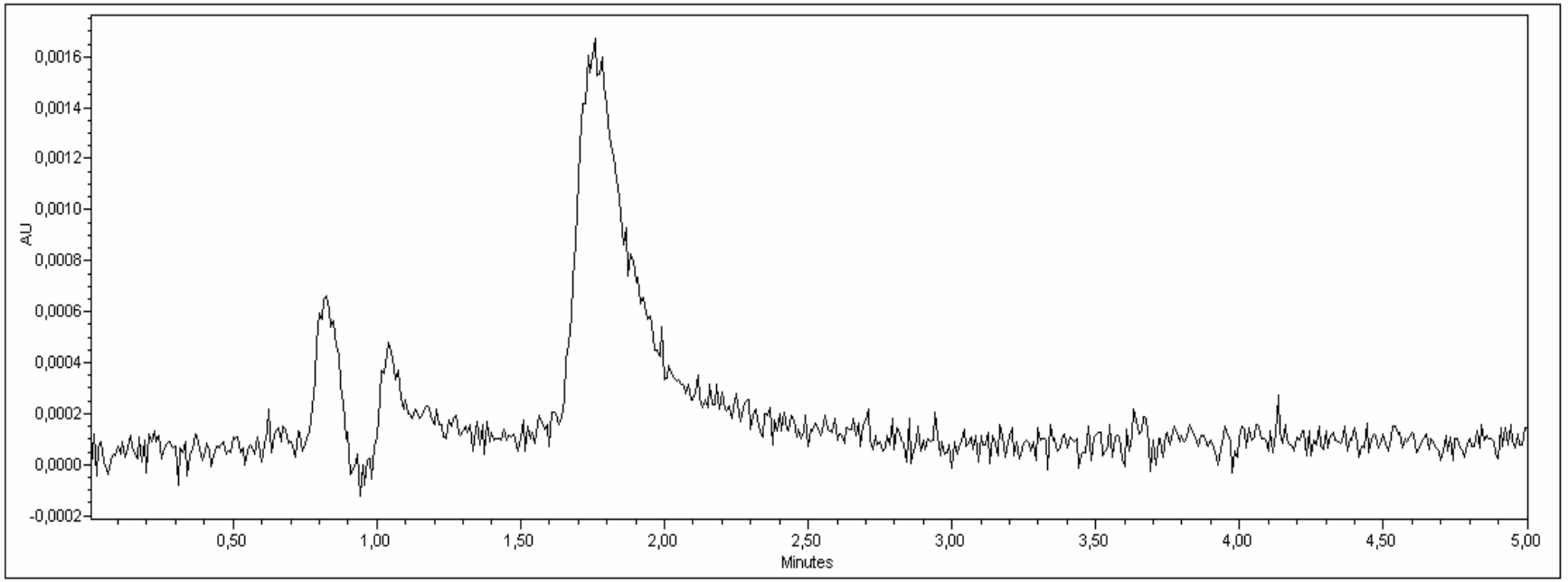
Şekil 3. 14. Mikrokristalin Selüloz NF'e ait HPLC kromatogramı.



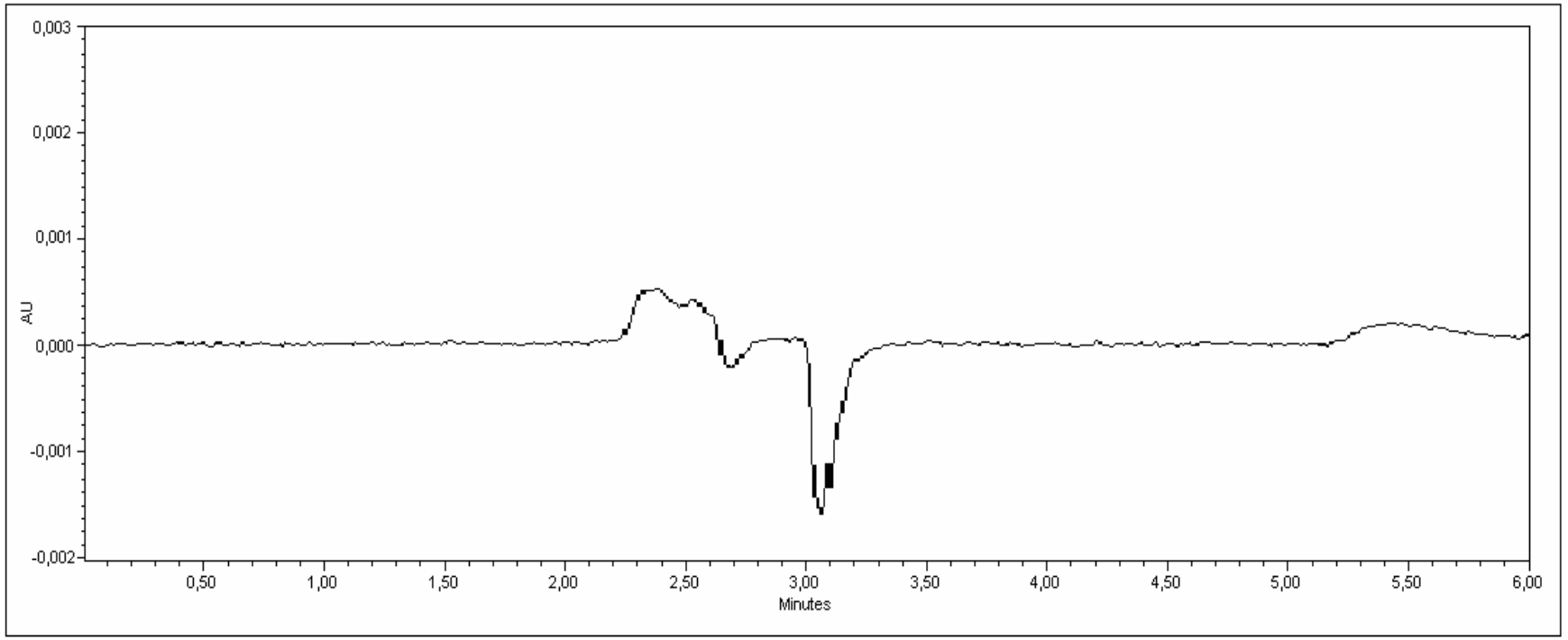
Şekil 3. 15. Povidon (K29-32) USP'ye ait HPLC kromatogramı.



Şekil 3. 16. Kroskarmelloz Sodyum NF'e ait HPLC kromatogramı.



Şekil 3. 17. Sodyum Lauril Sülfat'a ait HPLC kromatogramı.



Şekil 3. 18. Magnezyum Stearat'a ait HPLC kromatogramı.

.

Duyarlılık (Sensitivity)

Bölüm 2.2.2.2'nin altında duyarlılık kısmında açıklandığı gibi yapılan analizler ve değerlendirmeler sonucunda teşhis sınırı (LOD) 0.003 µg/ml, tayin sınırı (LOQ) ise, 0.00976 µg/ml olarak bulunmuştur.

Dayanıklılık

Ezetimibin belirli derişimde hazırlanan çözeltisi, analiz süresince etkin maddenin dayanıklılığının gösterilebilmesi için değerlendirilmiştir. Bölüm 2.2.2.2'nin altında dayanıklılık kısmında açıklandığı gibi ezetimibin dayanıklılığı, deney süresinin 12 saati geçmemesi nedeniyle 12 saat süreyle incelenmiştir. Bu süre boyunca, zamana karşı derişim farkları istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Mann-Whitney U testi, $p>0.05$). Bu sonuçlar, ezetimibin HPLC'de analiz edildiği süre boyunca dayanıklı olduğunu göstermektedir (Tablo 3.5).

Tablo 3. 5. Ezetimibin Asetonitril: Su (pH:6.8) (70:30) mobil faz sistemindeki dayanıklılığı (n=6).

Zaman (saat)	**Derişim (µg/ml)**	**Hesaplanan Derişim (µg/ml)** $\overline{X}_{ort} \pm SS$	**VK (%)**
0	50	51.125 ± 0.164	0.320
4	50	50.866 ± 0.053	0.104
8	50	50.886 ± 0.057	0.112
12	50	51.300 ± 0.098	0.191

3.3. Çözünürlük Tayini

Bölüm 2.2.3.'de anlatıldığı gibi 1 ve 12 saat boyunca yapılan çözünürlük çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular Tablo 3.6, 3.7, 3.8'de verilmiştir. 1 ve 12. saatler sonunda elde edilen çözünürlük verileri arasındaki fark istatiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Ezetimibin 12 saat sonundaki çözünürlüğü 0.01M Sodyum Fosfat pH 7.0 / 0.15 % SDS çözünme ortamında 1.15 mg/ml, 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme ortamında 0.2 mg/ml, 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme ortamında 0.03 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, ezetimibin 0.01M Sodyum Fosfat pH 7.0 / 0.15% SDS ve 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu / 0.45% SDS içeren çözünme ortamlarındaki çözünürlüğünün sink koşullar altında gerçekleştiğini göstermektedir.

Tablo 3. 6. Ezetimibin 0.01M Sodyum Fosfat pH 7.0 / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamındaki çözünürlük testi sonucu (n=3).

Zaman (saat)	Pik alanı	Derişim (µg/ml) (dil. 3/10)	Çözünürlük (mg/ml)
1	30068892	967.083	0.967
	29417014	945.602	0.945
	28760735	924.095	0.924
$\overline{X}_{ort} \pm$ VK	29415547 ± 2.235	945.593 ± 2.273	0.945 ± 2.274
12	35991587	1161.443	1.161
	35896654	1158.272	1.158
	34764183	1121.185	1.121
$\overline{X}_{ort} \pm$ VK	35550808 ± 1.935	1146.967 ± 1.951	1.147 ± 1.942

Tablo 3. 7. Ezetimibin 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamındaki çözünürlük testi sonucu (n=3).

Zaman (saat)	Pik alanı	Derişim (µg/ml) (dil. 1/2)	Çözünürlük (mg/ml)
1	2069420	34.8	0.034
	2063002	34.6	0.034
	2096891	35.2	0.035
$\overline{X}_{ort}$ ± VK	2076438 ± 0.8	34.8 ± 0.8	0.03 ± 0.8
12	2094901	35.2	0.035
	2089876	35.1	0.035
	2046620	34.4	0.034
$\overline{X}_{ort}$ ± VK	2077132 ± 1.2	34.9 ± 1.2	0.03 ± 1.2

Tablo 3. 8. Ezetimibin 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamındaki çözünürlük testi sonucu (n=3).

Zaman (saat)	Pik alanı	Derişim (µg/ml) (dil. 1/2)	Çözünürlük (mg/ml)
1	6575741	181.9	0.181
	6395924	176.9	0.176
	6609744	182.8	0.182
$\overline{X}_{ort}$ ± VK	6527136 ± 1.7	180.5 ± 1.7	0.17 ± 1.7
12	7284711	201.4	0.201
	7347780	203.1	0.203
	7287235	201.5	0.201
$\overline{X}_{ort}$ ± VK	7306575 ± 0.4	202 ±0.4	0.20 ± 0.4

3.4. Nanokristal ve Tablet Formülasyonlarının Etkin Madde İçeriği

Nanokristal formülasyonlarının etkin madde içeriği sonuçları Tablo 3.9, tablet formülasyonlarının etkin madde içeriği sonuçları ise, Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3. 9. Nanokristal formülasyonlarının etkin madde içeriği sonuçları (n=3).

Nanokristal Formülasyonu	Ezetimib İçeriği (%)
Ezetimib	100 ± 1.1
Birlikte Çöktürme	94.33 ±1.4
Etüvde Kurutma	99.61 ± 2.1
Yüksek Hızda Homojenizasyon	91.01 ± 0.9
Ultrasonikasyon	98.13 ± 2.3
El homojenizatörü	31.71 ± 2.0
Bilyalı Değirmen	97.82 ± 0.7
Püskürterek Kurutma	95.51 ±1.6

Tablo 3. 10. Tablet formülasyonlarının etkin madde içeriği sonuçları (n=3).

Tablet Formülasyonu	Ezetimib İçeriği (%)
Fiziksel Karşım (SDS içeren)	98.41 ± 1.5
Fiziksel Karşım (SDS içermeyen)	97.89 ± 1.1
Bilyalı Değirmen	95.39 ± 0.6
Ultrasonikasyon	93.51 ± 0.9
Püskürterek Kurutma	99.29 ± 1.3

3.5. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Bu bölümde formülasyonları karakterize edebilmek ve özelliklerini açıklayabilmek için FT-IR spektrumları, X-ışını kırınımları, diferansiyel taramalı kalorimetrik analizleri ve partikül büyüklüğü analizlerine ilişkin bulgular verilmiştir.

3.5.1. Formülasyonların FT-IR Spektrumları

Bölüm 2.2.4.'de açıklanan yöntem ile hazırlanan ezetimibin nanokristal formülasyonlarının FT-IR spektrumları, Perkin Elmer (USA) FT-IR

spektrofotometresinde 4000 – 650 cm^{-1} dalga sayıları arasında kaydedilmiştir. Bu analiz, üretilen nanokristal formülasyonlarının içerdiği ezetimibin yapısını koruyup korumadığının tayini için yapılmıştır.

Şekil 3.19'da gösterildiği üzere, formülasyonların FT - IR spektrumlarında da ezetimib molekülüne ait aşağıda belirtilen karakteristik pikler gözlenmektedir. Şekil 3.13'de görüldüğü gibi, formülasyonlardaki ezetimibin FT-IR spektrumları ile tek başına ezetimibin FT-IR spektrumu arasında bir fark bulunmamaktadır. Bu sonuç, nanokristal formülasyonlarında ezetimibin yapısını koruduğunu göstermektedir.

1760 – 1690 cm^{-1}'de karbonil grubuna ait karakteristik C=O gerilim bantları,

1600 – 1500 cm^{-1}'de aromatik halkaya ait C=C rezonans çifte bağ gerilim bantları,

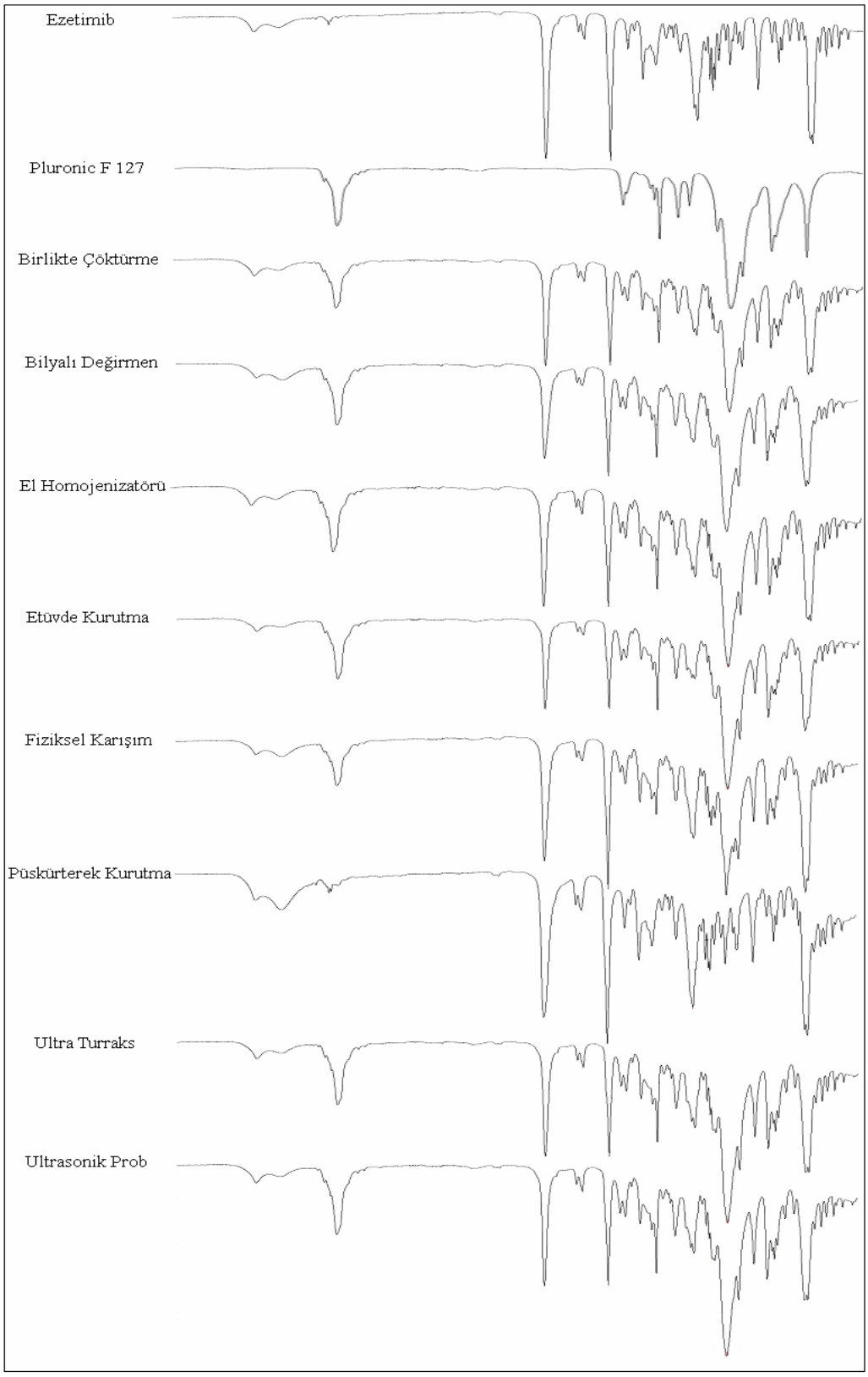
1300 – 1000 cm^{-1}'de ester grubuna ait kuvvetli C-O gerilim bantları,

3000 – 2850 cm^{-1}'de kuvvetli alifatik C-H gerilim bantları,

3650 – 2700 cm^{-1}'de karboksilik asit grubuna bağlı genişlemiş O-H gerilim bantları,

1000 – 1200 cm^{-1}'de C-F gerilim bantları,

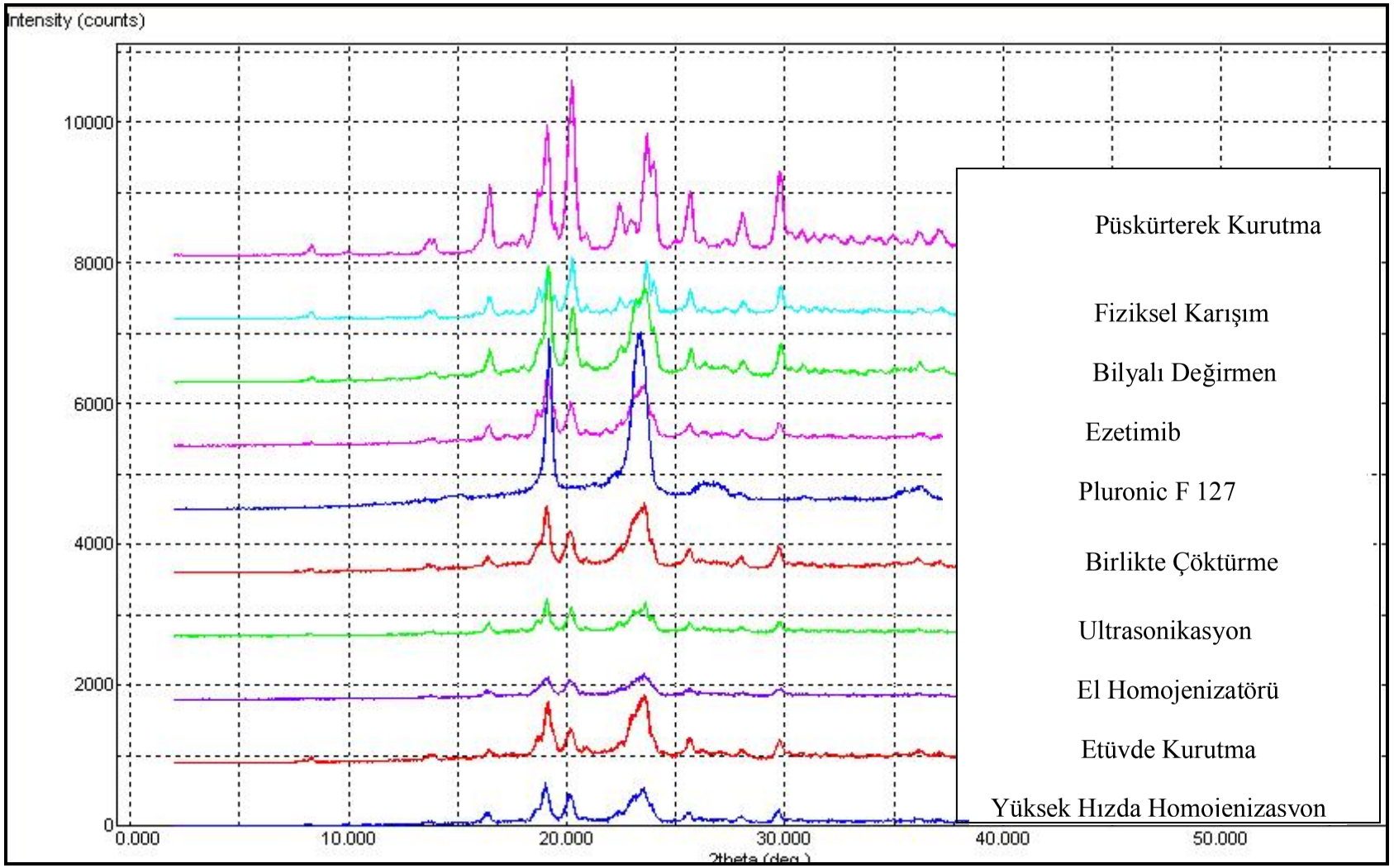
800 – 1000 cm^{-1}'de p- disübstitüe benzen gerilim bantları görülmektedir.



Şekil 3. 19. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin, fiziksel karışımın ve yardımcı maddenin FT-IR spektrumları.

3.5.2. Formülasyonların X – Işını Kırınımı Analizleri

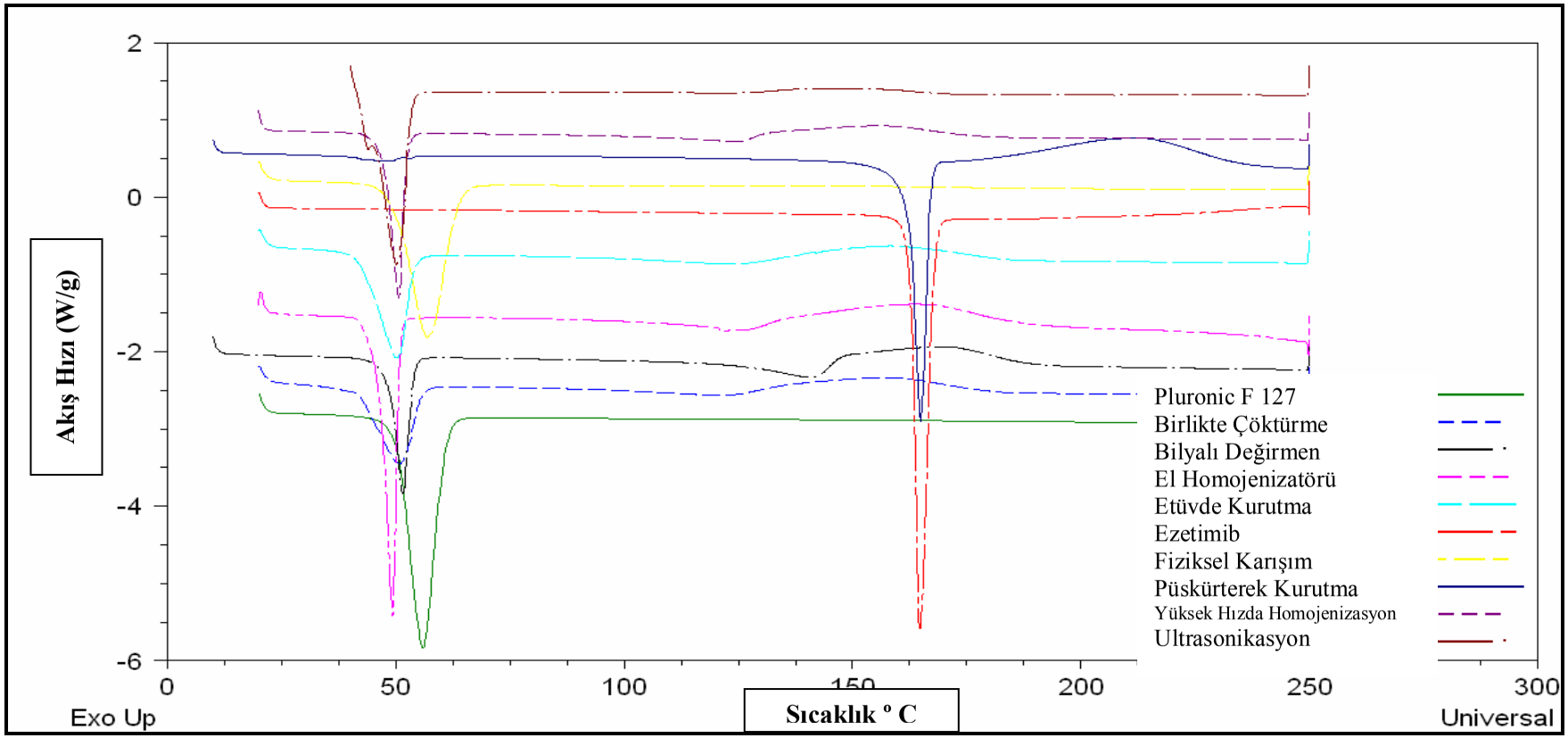
Formülasyoların X – ışını kırınımı analizleri Bölüm 2.2.7.2.'de açıklandığı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, nanokristal formülasyonlarında etkin maddenin kristal formunun bulunup bulunmadığının veya kristal yapıda azalma olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan nanokristal formülasyonların difraktogramları ile yardımcı madde olarak kullanılan Pluronic F127'nin, etkin maddenin ve fiziksel karışımın difraktogramlarını da içerecek şekilde karşılaştırmalı olarak Şekil 3.20'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi formülasyonların kristal yapısında hiçbir değişiklik yoktur, etkin madde kristal yapısını tüm formülasyonlarda korumaktadır.



Şekil 3. 20. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin, fiziksel karışımın ve yardımcı maddenin X-ışını kırınımı difraktogramları.

3.5.3. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik Analizi

Formülasyonların diferansiyel taramalı kalorimetrik analizleri Bölüm 2.2.7.3.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.21'de nanokristal formülasyonlarının, etkin maddenin, yardımcı madde olarak kullanılan Pluronic F 127'nin ve fiziksel karışımın DSC termogramları verilmiştir. Şekile bakıldığında, ezetimibin erime endoterminin nanokristal formülasyonlarında tamamen kaybolduğu görülmektedir. Bu bulgu, ezetimibin nanokristal formülasyonlarında Pluronic F 127 ile tamamen kaplandığını göstermektedir. Sadece püskürterek kurutma ile hazırlanan formülasyonda etkin madde piki gözlenmektedir.



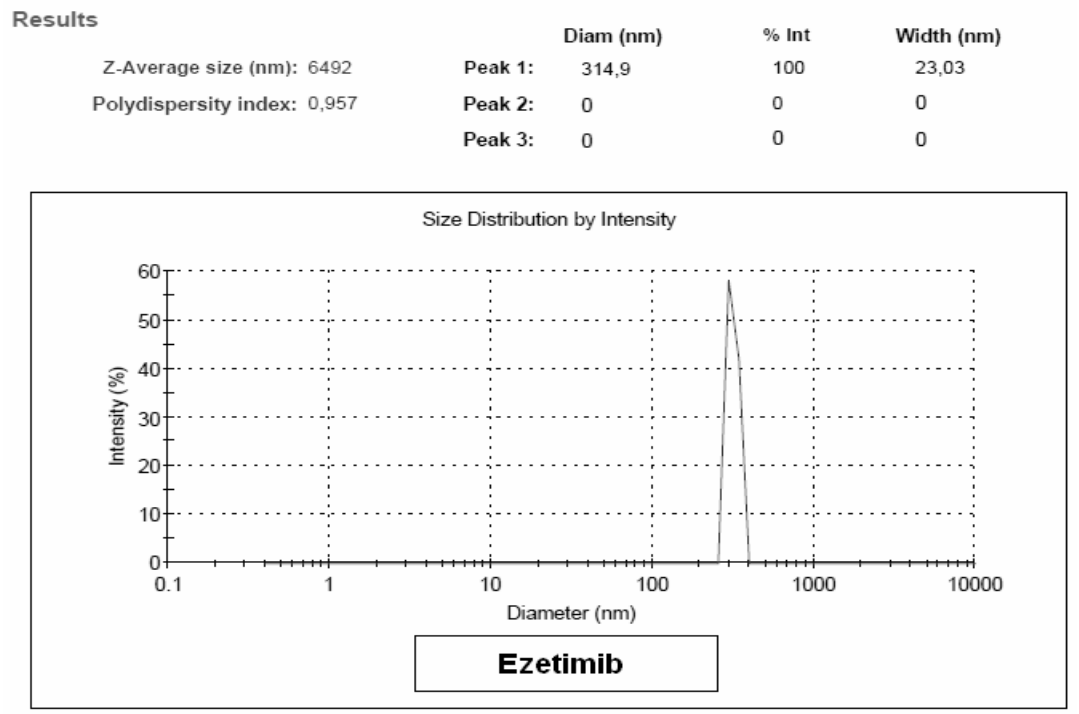
Şekil 3. 21. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin, fiziksel karışımın ve yardımcı maddenin diferansiyel taramalı kalorimetre termogramları.

3.5.4. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

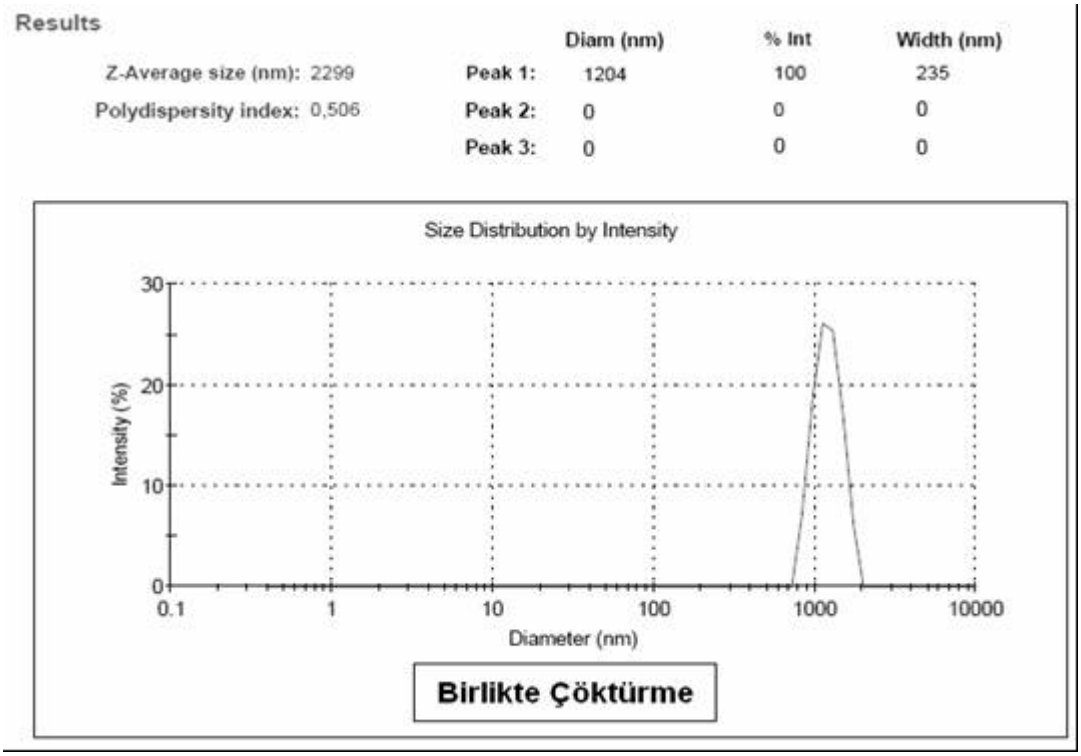
Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü tayini için Malvern Zeta Sizer Nano Series Nano ZS aleti kullanılmıştır. Bu formülasyonlara ilişkin partikül büyüklükleri dağılımı Tablo 3.11'de verilmiştir. Bu verilere göre, nanokristal formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü, ezetimib ve fiziksel karışıma oranla önemli ölçüde küçülmüştür ve istatistiksel olarak aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur (Kruskall – Wallis, $p < 0.05$). Tablo 3.11'e bakıldığında, ezetimibin ortalama partikül büyüklüğü intensity cinsinden 6432 ±1024 nm ve fiziksel karışımın 6302 ± 670 nm iken, el homojenizatörü yönteminde ortalama partikül büyüklüğünde % 82, bilyalı değirmen yönteminde % 80, ultrasonikasyon yönteminde % 73, etüvde kurutma yönteminde % 73, birlikte çöktürme yönteminde % 69 ve yüksek hızda homojenizasyon yönteminde % 67 azalma olduğu bulunmuştur. Öte yandan, püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak hazırlanan formülasyonun ortalama partikül büyüklüğü ezetimibden daha büyük bulunmuştur. Bu yöntem kullanılarak partikül büyüklüğü küçültülemediği gibi partiküllerin üzeri yüzey etkin madde ile kaplanmış olabileceği için ortalama partikül büyüklüğü ezetimibden de fazla bulunmuştur. Ezetimibe ve formülasyonların ortalama partikül büyüklüklerine ait grafikler Şekil 3.22-3.29'da verilmiştir.

Tablo 3. 11. Etkin madde ve formülasyonların ortalama partikül büyüklükleri.

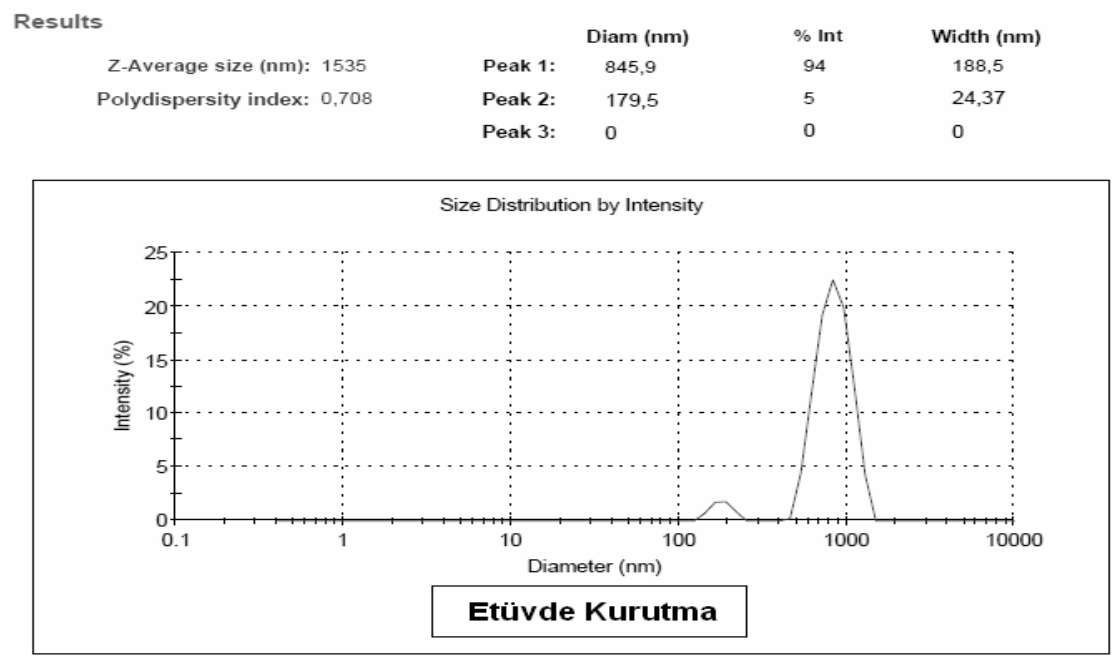
Formülasyon	**Partikül Büyüklüğü (nm)** $\overline{X}_{ort}$ **± SS (n=3).**
Ezetimib	6432 ± 1024
El homojenizatörü	1189± 92
Bilyalı Değirmen	1259± 62
Ultrasonikasyon	1736±88
Etüvde kurutma	1749 ± 158
Birlikte çöktürme	2019 ±199
Yüksek Hızda Homojenizasyon	2121 ±445
Fiziksel Karışım	6302 ± 670
Püskürterek Kurutma	8977± 1027



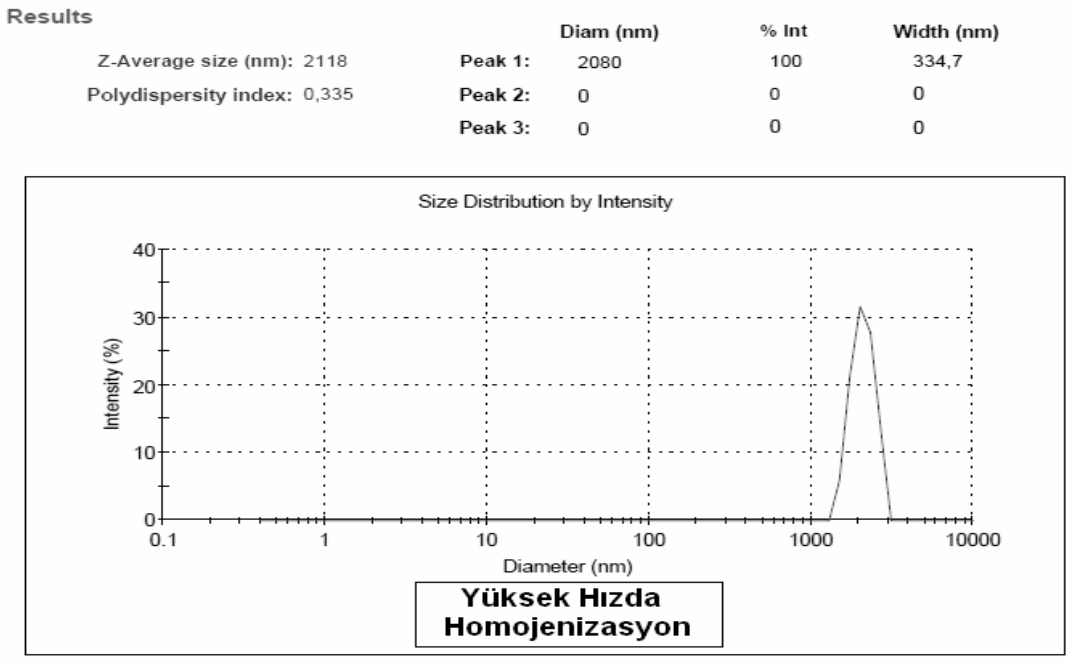
Şekil 3. 22. Ezetimibe ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.



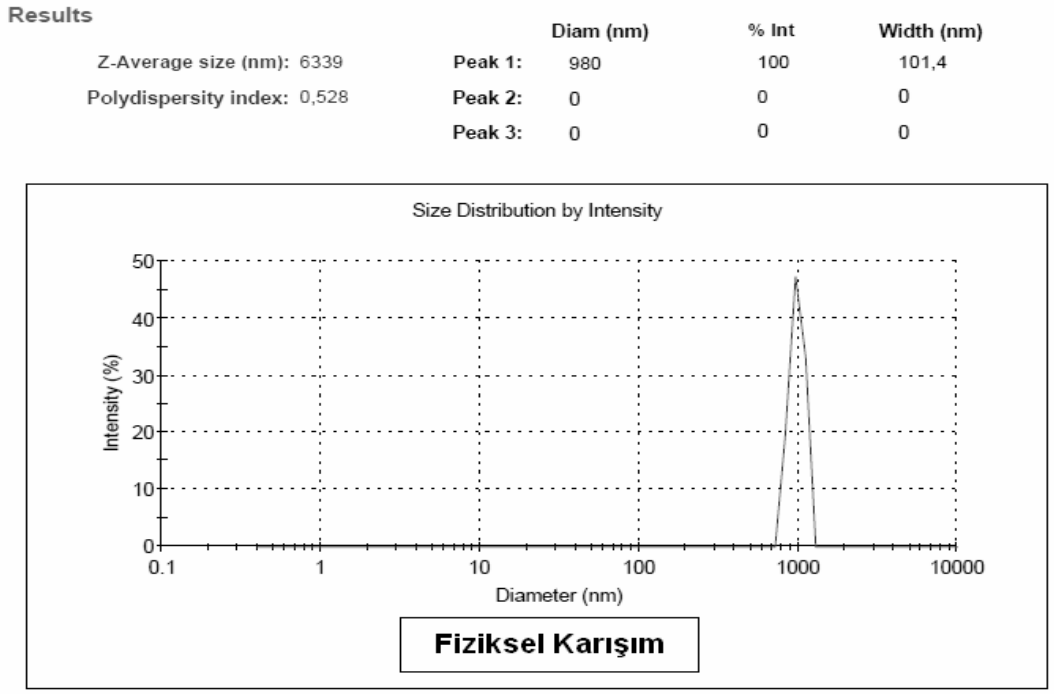
Şekil 3.23. Birlikte çöktürme yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.



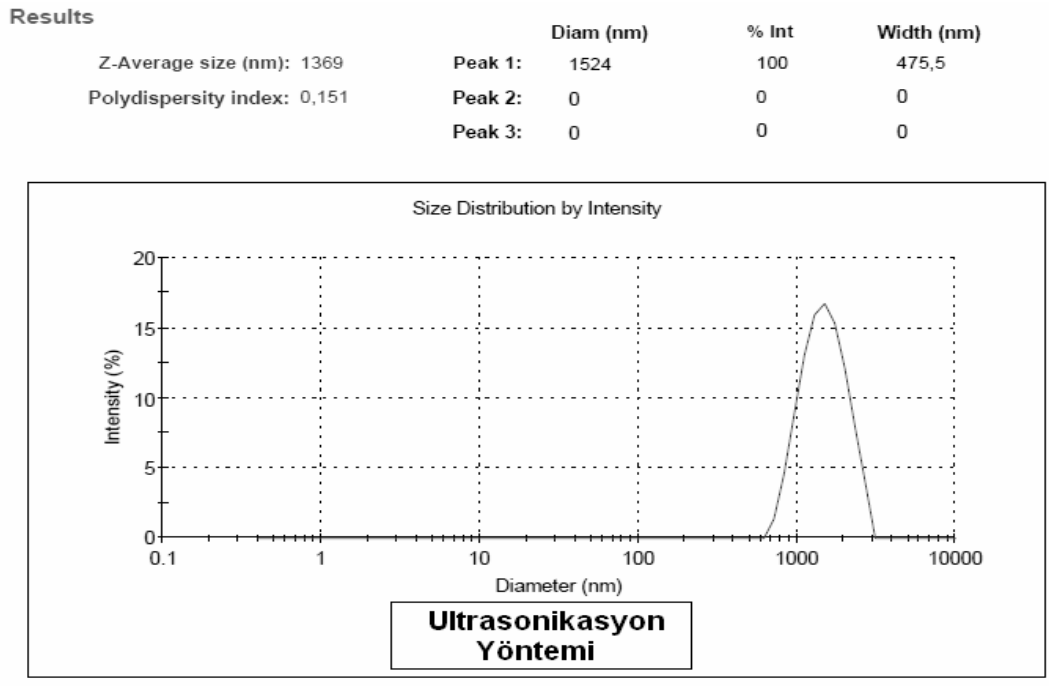
Şekil 3. 24. Etüvde Kurutma yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.



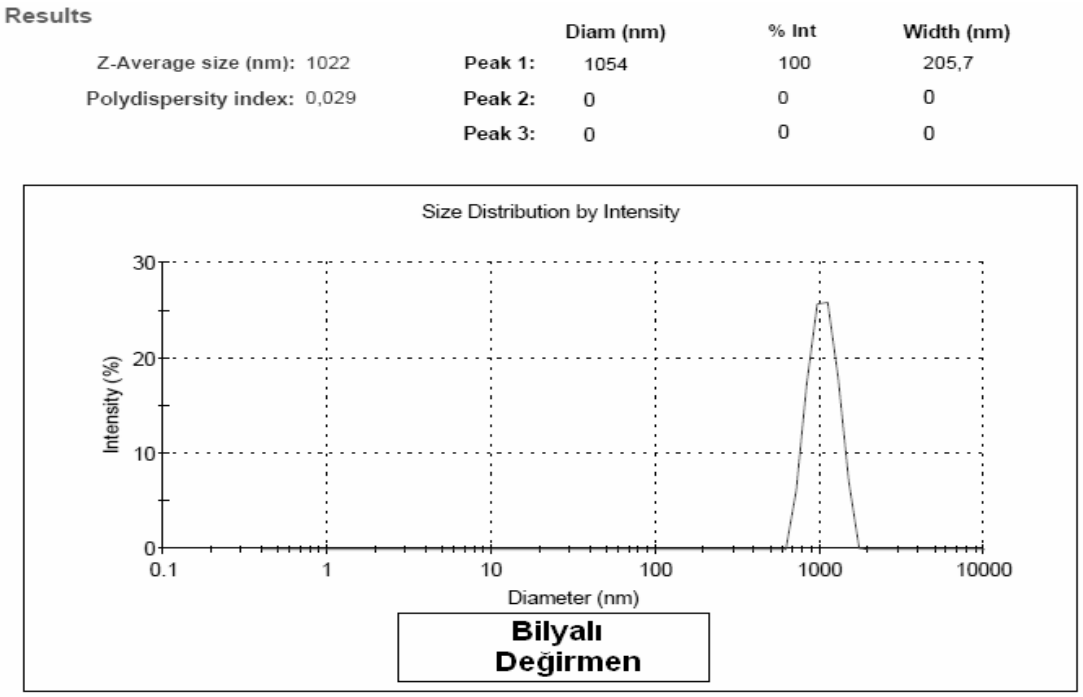
Şekil 3. 25. Yüksek Hızda Homojenizasyon Yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.



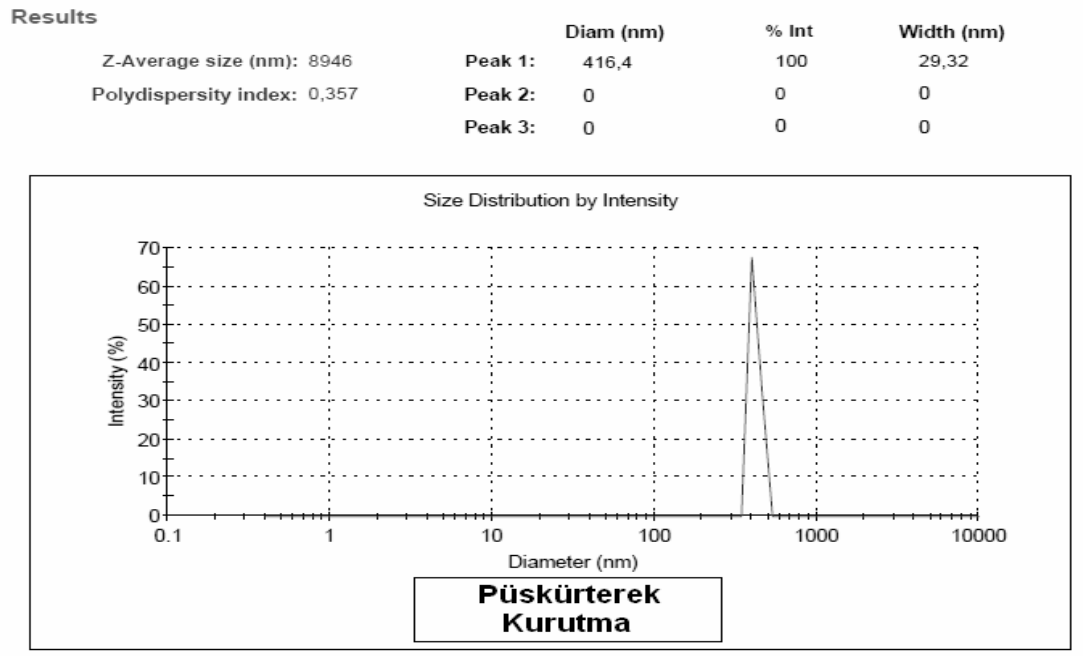
Şekil 3. 26. Fiziksel Karışıma ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.



Şekil 3. 27. Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.



Şekil 3. 28. Bilyalı Değirmen yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.



Şekil 3. 29. Püskürterek Kurutma yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.

3.6.Çözünme Hızı Deneyi

Çözünme hızı deneyi Bölüm 2.2.8.'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Her bir formülasyon için Bölüm 2.2.8.'de belirtilen çözünme ortamlarında, % çözünen ezetimib değerleri zamana karşı grafiğe aktarılmış ve sonuçlar Tablo 3.12 – 3.14'de ve Şekil 3.30 – 3.32'de verilmiştir. Tablet formülasyonlarının % 0.15 SDS ve % 0.45 SDS içeren çözünme ortamlarındaki çözünme hızı profilleri ise Tablo 3.15, 3.16'da ve Şekil 3.33, 3.34'de verilmiştir.

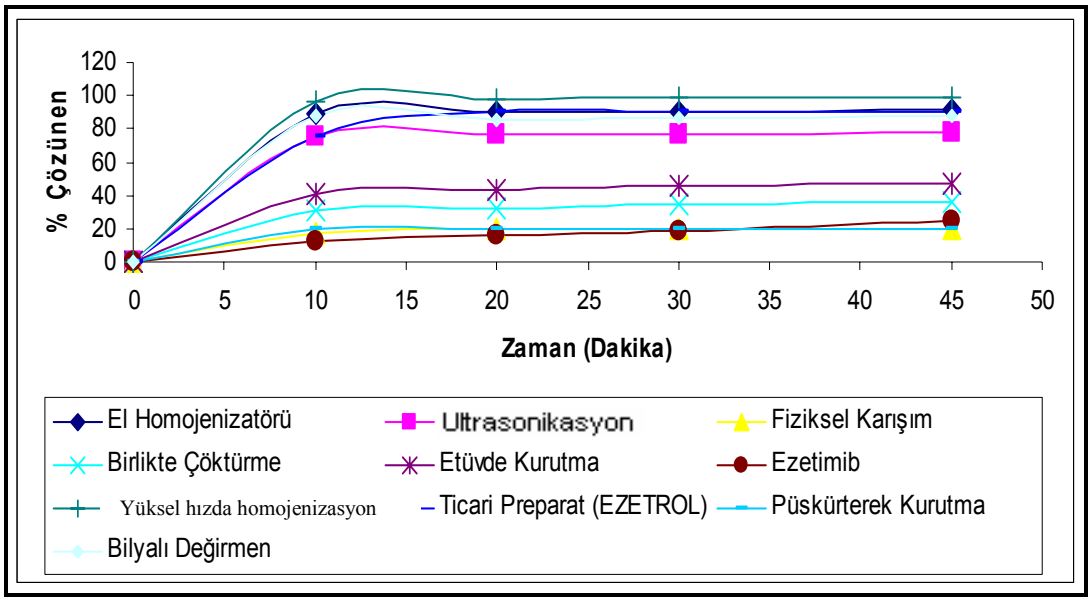
Tablo 3. 12. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 900 ml pH 7.0 0.01 M Sodyum Fosfat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

ZAMAN (dk)		EZE	FK	EZETROL	BÇ	EK	EH	YHH	UP	PK	BD
10	$\bar{X}$	12.445	17.002	75.985	31.486	41.001	89.450	96.764	75.824	19.236	88.233
	% VK	28.912	7.731	5.116	7.435	12.043	0.861	3.634	7.689	6.678	4.785
20	$\bar{X}$	16.633	19.337	89.936	32.491	43.112	89.990	97.821	76.884	19.319	85.611
	% VK	19.959	8.948	1.148	3.270	6.458	2.494	3.027	5.396	4.850	2.830
30	$\bar{X}$	18.491	19.744	90.433	34.929	46.276	90.516	98.593	77.017	19.833	87.099
	% VK	16.740	3.790	0.203	2.147	8.274	1.477	3.008	2.393	9.971	1.975
45	$\bar{X}$	24.614	19.833	90.535	35.823	47.107	91.368	98.601	77.504	19.472	87.314
	% VK	2.774	15.233	0.041	2.096	3.914	2.921	3.231	1.160	3.742	1.234

EZE: Ezetimib **EZETROL:** Piyasa Preparatı (EZETROL®) **EK:** Etüvde Kurutma **YHH:** Yüksek Hızda Homojenizasyon

PK: Püskürterek Kurutma **FK:** Fiziksel Karışım **BÇ:** Birlikte Çöktürme **EH:** El Homojenizatörü **UP:** Ultrasonikasyon

BD: Bilyalı Değirmen



Şekil 3. 30. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 900 ml pH 7.0 0.01 M Sodyum Fosfat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

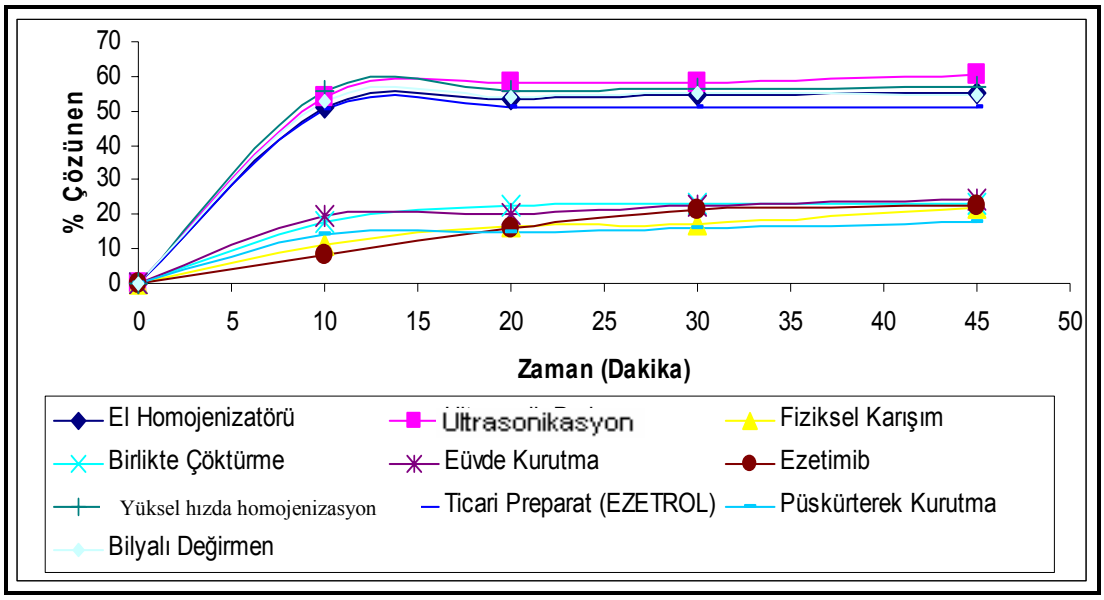
Tablo 3. 13. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

ZAMAN (dk)		EZE	FK	EZETROL	BÇ	EK	EH	YHH	UP	PK	BD
10	$\overline{X}$	8.325	11.353	50.281	17.854	19.832	51.025	55.733	53.830	14.533	52.821
	% VK	22.651	16.663	0.307	1.785	0.451	6.924	8.085	4.363	17.453	9.874
20	$\overline{X}$	15.893	16.397	50.839	22.829	19.933	53.103	55.757	57.87	15.125	54.235
	% VK	0.998	14.798	1.254	3.747	6.464	7.588	4.410	6.6247	9.847	6.861
30	$\overline{X}$	21.489	17.257	50.866	23.278	22.417	54.619	56.131	58.068	15.884	54.910
	% VK	6.627	18.534	1.051	1.973	1.828	7.514	3.195	4.241	5.830	7.321
45	$\overline{X}$	22.756	21.801	50.954	23.311	24.475	54.906	56.784	60.463	17.932	54.525
	% VK	1.104	9.032	0.552	2.634	0.063	7.057	0.888	2.595	3.721	2.381

EZE: Ezetimib **EZETROL:** Piyasa Preparatı (EZETROL®) **EK:** Etüvde Kurutma **YHH:** Yüksek Hızda Homojenizasyon

PK: Püskürterek Kurutma **FK:** Fiziksel Karışım **BÇ:** Birlikte Çöktürme **EH:** El Homojenizatörü **UP:** Ultrasonikasyon

BD: Bilyalı Değirmen



Şekil 3.31. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

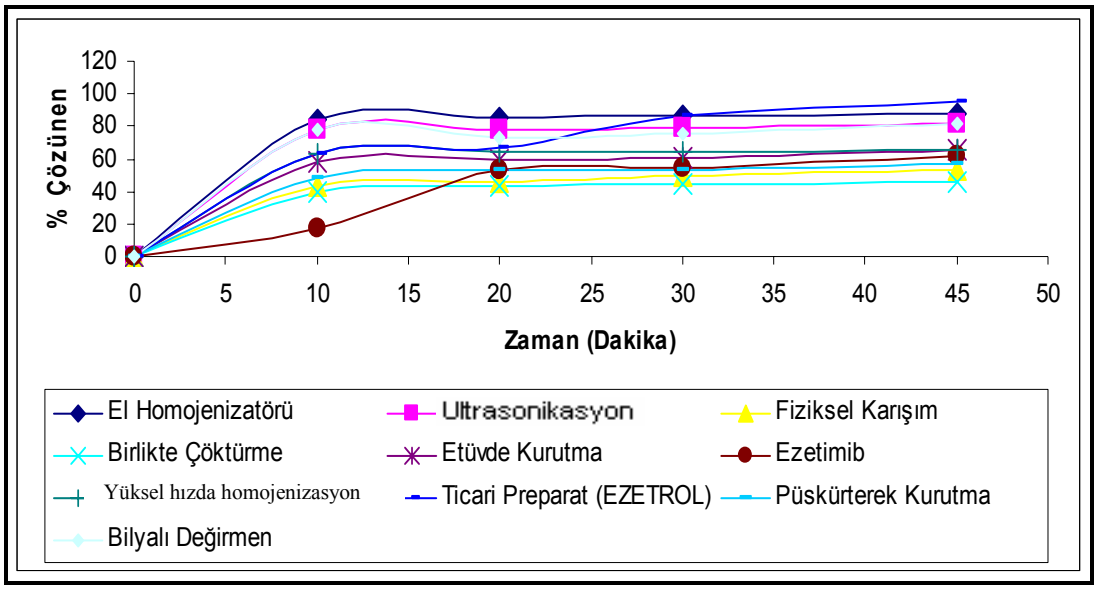
Tablo 3. 14. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

ZAMAN (dk)		EZE	FK	EZETROL	BÇ	EK	EH	YHH	UP	PK	BD
10	$\overline{X}$	17.357	43.684	63.414	39.494	57.597	83.824	63.504	77.384	48.647	78.321
	% VK	12.350	18.732	4.386	2.853	5.815	5.466	13.030	6.285	7.838	4.032
20	$\overline{X}$	52.922	45.977	67.409	43.643	59.825	85.257	64.851	78.227	53.561	73.516
	% VK	9.279	12.940	2.7343	1.760	2.943	3.517	4.817	4.071	6.943	2.819
30	$\overline{X}$	54.931	49.331	87.096	44.168	60.425	87.189	64.919	79.710	53.457	75.420
	% VK	1.081	8.265	0.596	1.935	1.320	2.884	1.745	2.930	3.755	1.998
45	$\overline{X}$	61.439	53.655	95.816	46.002	65.922	87.231	65.212	81.785	56.459	81.571
	% VK	4.728	10.593	0.749	0.475	0.851	0.121	1.951	3.478	1.300	1.269

EZE: Ezetimib **EZETROL:** Piyasa Preparatı (EZETROL®) **EK:** Etüvde Kurutma **YHH:** Yüksek Hızda Homojenizasyon

PK: Püskürterek Kurutma **FK:** Fiziksel Karışım **BÇ:** Birlikte Çöktürme **EH:** El Homojenizatörü **UP:** Ultrasonikasyon

BD: Bilyalı Değirmen

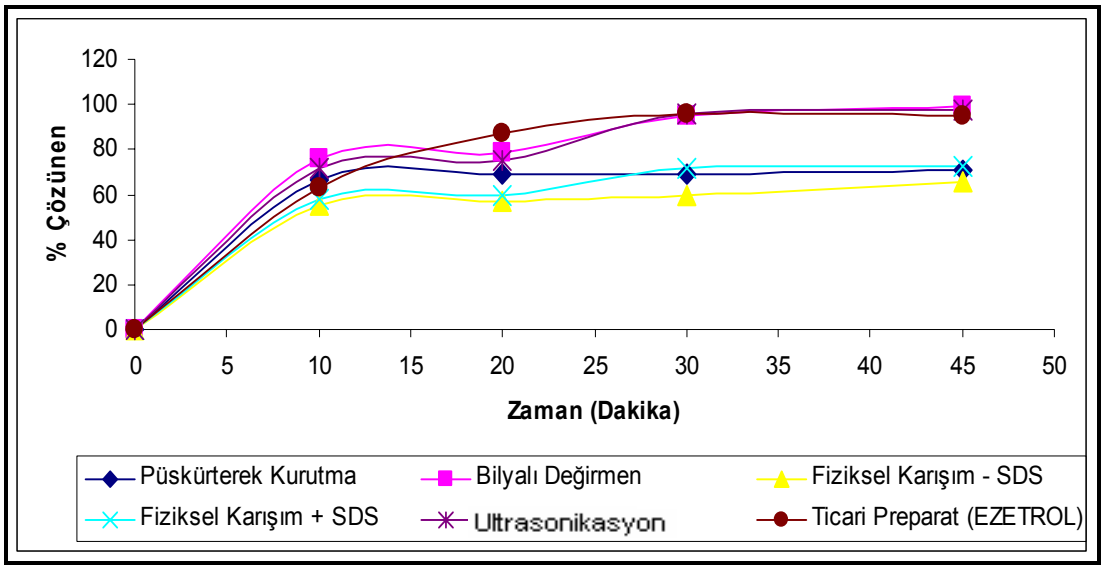


Şekil 3. 32. Nanokristal formülasyonlarının, ezetimibin ve fiziksel karışımın 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

Tablo 3. 15. Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

ZAMAN (dk)		PK	BD	FK-SDS	FK+SDS	UP	EZETROL
10	$\overline{X}$	66.715	75.941	55.181	57.843	71.390	63.826
	% VK	5.227	1.321	1.709	1.351	1.431	3.278
20	$\overline{X}$	68.742	88.720	57.066	59.218	75.464	87.093
	% VK	4.010	0.933	1.653	2.584	1.293	1.389
30	$\overline{X}$	69.224	95.132	59.151	71.540	95.819	95.813
	% VK	5.847	0.785	1.438	8.093	1.047	0.966
45	$\overline{X}$	71.165	99.342	65.263	72.361	97.253	95.115
	% VK	3.583	1.126	2.912	8.534	0.906	0.784

PK: Püskürterek Kurutma **BD:** Bilyalı Değirmen **FK-SDS:** Sodyum Lauril Sülfat içermeyen Fiziksel Karışım **FK+SDS:** Sodyum Lauril Sülfat içeren Fiziksel Karışım **UP:** Ultrasonikasyon **EZETROL:** Piyasa Preparatı (EZETROL®)

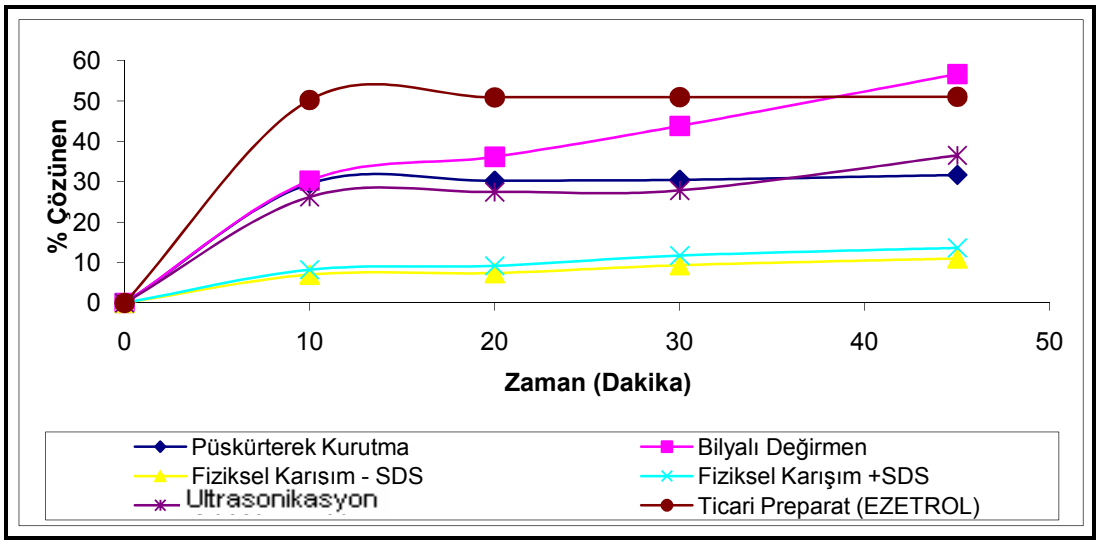


Şekil 3. 33. Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

Tablo 3.16. Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

ZAMAN (dk)		PK	BD	FK- SDS	FK+ SDS	UP	EZETROL
10	$\bar{X}$	29.557	30.257	7.028	8.245	26.234	50.288
	% VK	2.195	5.869	12.255	9.571	8.011	2.417
20	$\bar{X}$	30.263	36.181	7.409	9.209	27.467	50.954
	% VK	2.191	3.076	4.941	3.102	4.590	0.933
30	$\bar{X}$	30.520	43.813	9.342	11.765	27.854	51.002
	% VK	1.636	1.396	4.373	5.082	4.0737	0.966
45	$\bar{X}$	31.728	56.659	11.025	13.660	36.514	51.085
	% VK	2.324	2.623	8.392	7.453	3.441	1.273

PK: Püskürterek Kurutma **BD:** Bilyalı Değirmen **FK-SDS:** Sodyum Lauril Sülfat içermeyen Fiziksel Karışım **FK+SDS:** Sodyum Lauril Sülfat içeren Fiziksel Karışım **UP:** Ultrasonikasyon **EZETROL:** Piyasa Preparatı (EZETROL®)



Şekil 3. 34. Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS çözünme hızı ortamında zamana karşı % çözünen etkin madde miktarları (n=6).

Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin piyasa preparatı (Ezetrol®) ile çözünme hızı profilleri arasındaki fark, model bağımsız yöntemler kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.17'de verilmiştir. İn vitro çözünme hızı profillerinin karşılaştırılması, f_2 (benzerlik faktörü) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Benzerlik testi, in vitro çözünme hızı testinin bulgularının karşılaştırılması amacıyla yapılmaktadır. Benzerlik faktörü değerinin 50 ya da daha büyük olması durumunda, in vitro çözünme profillerinin benzerliğinden bahsedilmektedir.

Tablo 3.17. Nanokristal formülasyonlarını içeren tabletlerin piyasa preparatı ile f_2 benzerlik faktörlerinin karşılaştırılması.

Çözünme Ortamı	**f_2 Faktörleri**		
	SD-T	**BD-T**	**UP-T**
50 mM Asetat Tamponu / 0.15 % SDS (500 ml, pH 4.5)	40.634	49.860	39.244
50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS (500 ml, pH 4.5)	45.332	61.855	62.889

SD-T: Püskürterek Kurutma Tablet - Ticari Preparat

BD-T: Bilyalı Değirmen Tablet - Ticari Preparat

UP-T: Ultrasonikasyon Tablet - Ticari Preparat

Ticari preparat referans olarak alınıp nanokristal içeren tablet formülasyonları test ürün olarak alındığında elde edilen sonuçlar Bkz. Tablo 3.17'de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS içeren çözünme hızı ortamında bilyalı değirmen ve ultrasonikasyon ile hazırlanan tabletler piyasa preparatı ile benzer bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

Bu bölümde, tez çalışmamız süresince gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmaların ve elde edilen bulguların genel bir değerlendirilmesi yapılarak sonuçlar tartışılmıştır. Bu amaçla, kullanılan etkin madde ezetimibin fizikokimyasal özelliklerinden başlanarak, analitik yöntem validasyonu, çözünürlük çalışmaları, nanokristal formülasyonlarının hazırlanması, elde edilen formülasyonların in vitro karakterizasyonu ile nanokristal formülasyonlarını içeren tablet formülasyonlarının hazırlanması, formülasyonlardaki etkin madde içeriğinin tayini ve in vitro çözünme hızı çalışmaları sonuçları değerlendirilmiştir.

Bu tezin amacı, ezetimib nanokristallerinin hazırlanması ile partikül büyüklüğünün azaltılması ve buna bağlı olarak çözünürlüğünün ve çözünme hızının artırılmasıdır. Böylece etkin maddenin biyoyararlanımının artırılması öngörülmektedir. Ayrıca, ezetimibin biyoyararlanımının artırılması, daha düşük dozda tedaviyi mümkün kılacağından, yan etkilerinin ve toksisitenin de azalacağı düşünülmektedir. Tez çalışmamızda model ilaç olarak kullandığımız ezetimibin suda çözünürlüğü hemen hemen hiç olmadığı için mutlak biyoyararlanımı çok düşüktür. Ezetimib, biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre çözünürlüğü düşük, emilimi yüksek olan Sınıf II bir ilaçtır ve aterosklerozun tedavisinde ve önlenmesinde hipokolesterolemik ajan olarak kullanılmaktadır. Bağırsaktan seçici olarak sterol emilimini bozan inhibitörlerin geliştirilmesi hiperlipidemi tedavisinde yeni ve önemli bir gelişmedir, ezetimib ise bu grubun ilk temsilcisidir (87, 99, 105).

Formülasyon çalışmalarına başlamadan önce, etkin madde olan ezetimibin üzerinde fizikokimyasal incelemeler yapılmıştır ve sonuçlar literatür verileri ile karşılaştırılarak maddenin karakterizasyonu ve saflık kontrolü yapılmıştır. Ezetimibin fizikokimyasal özelliklerini tayin etmek amacıyla FT-IR ve UV spektrumları çekilmiş, erime derecesi tayini, partikül büyüklüğü dağılımı analizi, diferansiyel taramalı kalorimetrik analizi, X-ışını kırınımı analizi yapılmış, farklı ortamlardaki çözünürlüğü tespit edilmiştir. Buna göre, ezetimib % 20 (h/h) Asetonitril:Su çözücü sisteminde literatüre uygun olarak 230 – 235 nm aralığında maksimum absorbans vermiştir (Bkz. Şekil 3.2) (115).

Ezetimibin DSC termogramında 164.65 °C'de erime endotermi görülmüştür ve bu değer US 2006/0234996 A1 numaralı patent ile uyumlu bulunmuştur (Bkz. Şekil 3.4). X-ışını difraktogramında piklerin görülmesi kristal yapı varlığını gösterir. Amorf yapı varlığında ise, X-ışını difraktogramında herhangi bir pik gözlenmemektedir. Ezetimibin kristal yapıda olduğu difraktogramda açık bir şekilde görülmektedir. Ayrıca ezetimibin US 2006/0234996 A1 nolu patentte verilen X-ışını difraktogramı ile deneysel olarak elde edilen difraktogram karşılaştırıldığında benzer olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 3.6) (88, 116). Ezetimibin FT-IR spektrumu, 1760 – 1690 cm^{-1}'de karbonil grubuna ait karakteristik C=O gerilim bantlarını, 1600 – 1500 cm^{-1}'de aromatik halkaya ait C=C rezonans çifte bağ gerilim bantlarını, 1300 – 1000 cm^{-1}'de ester grubuna ait kuvvetli C-O gerilim bantlarını, 3000 – 2850 cm^{-1}'de kuvvetli alifatik C-H gerilim bantlarını, 3650 – 2700 cm^{-1}'de karboksilik asit grubuna bağlı genişlemiş O-H gerilim bantlarını, 1000 – 1200 cm^{-1}'de C-F gerilim bantlarını ve 800 – 1000 cm^{-1}'de p- disübstitüe benzen gerilim bantlarını göstermektedir. Bu sonuçlar ezetimibin kimyasal yapısı ve literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur (88). Ayrıca, ezetimibin erime derecesi ölçülmüş ve sonucun literatür ve DSC verileri ile desteklendiği görülmüştür (88, 91). Ezetimibin partikül büyüklüğü tayini de hem karakterizasyonu hem de nanokristal formülasyonları ile karşılaştırabilmek için yapılmıştır.

Literatürde ezetimibin miktar tayini için HPLC ve UV spektroskopisi yöntemleri kullanılmaktadır (86, 92, 115, 117 – 120). İn vitro çalışmalar için bu yöntemler arasından daha güvenilir ve hassas sonuçlar elde edileceğini düşündüğümüz için HPLC tercih edilmiştir. Sistla ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, ezetimibin miktar tayini yöntemi için örnek alınmıştır (86). Bu çalışmadan farklı olarak internal standart kullanılmamıştır. Bölüm 2.2.2.1'de açıklandığı gibi, ezetimibin mobil fazdaki 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden hareketle hazırlanan 5 – 50 µg/ml aralığında çözeltiler kullanılarak kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Ayrıca, farklı çözünme ortamları için her deneyden önce ve sonra çözünme ortamında kalibrasyon serileri hazırlanıp aynı koşullarda kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir (Bkz. Şekil 3.7 – 3.10). HPLC ile tayinde ezetimibe ait kromatogram Bkz. Şekil 3.11'de verilmiştir. Kromatogramda görüldüğü gibi, ezetimib tam olarak ayrılmış ve t_R 4.36 dakika olarak belirlenmiştir. Fakat Sistla ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada ezetimibin alıkonma zamanı 5.97 dakika olarak bulunmuştur. Bu farklılığın nedeninin mobil faz içeriğinde bulunan maddelerin, suyun ve kolonun farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ezetimibin in vitro miktar tayin yönteminin validasyonu için doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik), duyarlılık, özgünlük, saptanabilirlik ve tayin edilebilirlik sınırları, dayanıklılık gibi ölçütler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yöntemin doğrusallık tayini için, Bölüm 2.2.2.2'nin altında doğrusallık kısmında belirtildiği gibi ezetimibin 5 – 50 µg/ml konsantrasyon aralığındaki çözeltileri kullanılarak, konsantrasyon ile elde edilen pik alanları arasındaki doğrusal ilişki araştırılmıştır. Kalibrasyon doğrusuna ait tanımlayıcılık katsayısı 0.9996 olarak saptanmıştır. Yöntemin doğruluğu Bölüm 2.2.2.2'nin altında doğruluk kısmında belirtildiği gibi yapılarak değerlendirildiğinde çalışılan üç farklı konsantrasyon için hesaplanan VK değerleri % 2'den küçük bulunmuştur (Bkz. Tablo 3.2). Analitik yöntemin kesinliği ile ilgili tekrar edilebilirlik ölçütünün değerlendirildiği Bkz. Tablo 3.3'te tekrarlayan iki farklı konsantrasyonda yapılan ölçümlerde de VK % 2'den küçük bulunmuştur. Aynı deney koşullarında hazırlanan, aynı konsantrasyondaki 6 farklı örnek ile elde edilen tekrar elde edilebilirlik bulguları için VK çalışılan iki farklı konsantrasyonda da % 2'den küçük bulunmuştur (Bkz. Tablo 3.4). Özgünlük tayini için Bölüm 2.2.2.2'nin altında özgünlük kısmında açıklandığı gibi, hazırlanan formülasyonların içinde kullanılan Pluronic F 127'nin, 232 nm'de etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiş ve pik vermediği tespit edilerek yöntemin özgün olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 3.12). Yöntem duyarlılığı için, saptama sınırı $3x10^{-3}$ µg/ml, tayin sınırı ise, $9.76x10^{-3}$ µg/ml olarak bulunmuştur. Dayanıklılık bulguları değerlendirildiğinde, 50 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan ezetimib çözeltisi hazırlanır hazırlanmaz, 4, 8 ve 12 saat sonra HPLC ile analizi sonucunda elde edilen konsantrasyonlar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılarak değişimin anlamsız olduğu gösterilmiştir ($p>0.05$) ve VK değerleri % 2'nin altında bulunmuştur. Bu da ezetimibin analiz süresince dayanıklı kaldığını kanıtlamaktadır (Bkz. Tablo 3.5). Bu sonuçların tümü Sistla ve arkadaşlarının çalışmasındaki validasyon sonuçları ile uyumludur (86).

Ayrıca, Bölüm 2.2.3'te açıklandığı gibi ezetimibin üç farklı çözünme hızı ortamında çözünürlüğü tayin edilmiştir. Buradan elde edilen bulgulara göre, ezetimibin 0.01M Sodyum Fosfat pH 7.0 / 0.15% SDS ve 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu / 0.45% SDS içeren çözünme hızı ortamlarında sink koşulu sağladıkları, fakat 50 mM pH 4.5 Asetat Tamponu /0.15 % SDS içeren çözünme hızı ortamında sink koşulu sağlamadığı görülmektedir.

Nanokristal formülasyonlarında partikül büyüklüğü önemli derecede küçüldüğü için etkin madde moleküllerinin biraraya gelme eğilimleri yüksektir, bu nedenle, aglomerizasyonu önlemek için mutlaka stabilizan kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla, nanokristal formülasyonlarını hazırlarken yüzey etkin madde olarak Pluronic F 127 kullanılmıştır. Bu yüzey etkin maddenin kullanılmasındaki nedenlerin başında, FDA'dan onaylı olması, toksik olmaması, dayanıklı olması, biyolojik olarak uyumlu ve biyoparçalanabilir olması gelmektedir (121 – 123). Ayrıca, hazırlama yönteminin tekrarlanabilir olması, partikül büyüklüğü dağılımının kolay kontrol edilmesi de formülasyonlarda kullanımına devam edilmesini sağlamıştır. Pluronic F 127 hidrofilik bir yüzey etkin madde olduğu için, partiküllerin ıslanmasını artırıp, etkin maddenin çözünme hızının ve biyoyararlanımının artmasına neden olacağı düşünülerek seçilmiştir (124).

Nanokristal hazırlamak için literatürde değirmen (125), çöktürme (126) ve homojenizasyon (127) yöntemleri kullanılmaktadır. Tez çalışmamızda laboratuar imkanlarımız dahilinde yöntemler geliştirilmiştir ve bu yöntemlerden etüvde kurutma, el homojenizatörü, ultrasonikasyon literatürde henüz bulunmamaktadır. Kullandığımız tüm yöntemlerin uygulaması kolaydır. Aynı zamanda üretim sırasında çeşitli ölçütlerin değiştirilmesi ile istenilen amaca uygun nanokristaller elde edilebilmektedir (128). Püskürterek kurutma yöntemi dışındaki bütün yöntemlerde partikül büyüklüğünün küçülmesi, kristal yapının korunması, çözünürlüğün ve çözünme hızının artması sonucunda istenen özellikte nanokristaller elde edilebilmiştir (50).

Toz nanokristal formülasyonların partikül büyüklükleri ve çözünme hızı bulguları göz önünde bulundurularak bilyalı değirmen ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan nanokristallerin tabletleri basılmıştır. Ayrıca, proje kapsamında olduğu

için püskürterek kurutucu kullanarak hazırlanan nanokristal formülasyonunun da, partikül büyüklüğü küçültülemediği halde, tableti hazırlanmıştır. Kontrol olarak, hazırlanan fiziksel karışımın tabletleri basılmıştır. Ezetimib ile ilgili olarak yapılan patent taramasında EP 1 353 696 B1 numaralı patent kapsamında verilen formülasyon modifiye edilerek hazırlanmıştır (Bkz. Tablo 2.3). Bu patent çalışmasında bulunan formülasyondan farklı olarak tabletlerde SDS kullanılmamıştır. SDS, piyasa preparatının içinde muhtemelen ezetimibin çözünürlüğünü artırmak için bulunmaktadır. Tez çalışmamızda ürettiğimiz ezetimib içeren nanokristal formülasyonları ile ezetimib tabletlerinin çözünme hızını artırdığımız için yaptığımız ön formülasyon çalışmaları sonucunda SDS kullanılmasının gerekli olmadığı düşünülmüştür.

Hazırlanan nanokristal formülasyonlarının ve tablet fomülasyonlarının ezetimib içeriği Bölüm 2.2.6'da belirtilen şekilde belirlenmiştir. Nanokristal formülasyonlarının içinde teorikte beklediğimiz etkin madde miktarını pratikte bulduğumuza oranlayarak nanokristallerin hazırlama verimi hesaplanmıştır. Etkin madde içeriği tayin edilirken ezetimibin tamamen çözünmesini sağlamak için etanol kullanılmıştır. Kontrol olarak ezetimib kullanılmış ve etkin madde içeriği % 100 bulunmuştur. Öte yandan, formülasyonlardaki ezetimib miktarı incelendiğinde, etkin madde içeriği % 100'e yakın bulunmuştur. Bunun nedeninin, ezetimibin küçük partiküllü toz şeklinde, kullanılan yardımcı maddenin ise pulsu şekilde olması ve bu iki maddenin etkin bir şekilde karıştırılamaması ile kapsülden balon jojeye maddelerin aktarımı sırasında oluşan kayıp olduğu düşünülmektedir. Ölçek büyütmede validasyonda işlem kritik işlem olarak düşünülmektedir. Ayrıca, Pluronic F 127 su ile ilk temas ettiğinde ya da organik çözücüde dağıtıldığında yapışkan bir hal almaktadır. Bu nedenle kullanılan cam malzemelerin duvarlarına, manyetik karıştırma sırasında balığın etrafına yapışabilmekte ve bunun da verimin azalmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca analitik yönteme bağlı hata da olabilir. Tablet formülasyonlarında miktarın değişkenliği nanokristal formülasyonlarına bağlı olabilir.

Formülasyonları karakterize edebilmek ve özelliklerini açıklayabilmek için FT-IR spektrumları, X-ışını kırınımları, diferansiyel taramalı kalorimetrik analizleri,

partikül büyüklüğü analizleri yapılmıştır. Bölüm 3.2.5.1 ve Bkz. Şekil 3.1'de gösterildiği üzere, formülasyonların FT-IR spektrumlarında da ezetimib molekülünün fonksiyonel gruplarına ait karakteristik pikler gözlenmiştir (88). Bu ve yapılan diğer fizikokimyasal incelemeler, hazırlanan formülasyonlarda ezetimibin kimyasal veya morfolojik olarak bir değişime uğramadığını göstermektedir. Ayrıca bu fonksiyonel gruplarda bir değişim olmaması, nanokristal formülasyonlarının bileşiminin ya da hazırlama yönteminin, ezetimibin kimyasal stabilitesi üzerine görünen bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Formülasyonların X-ışını kırınımı analizi, nanokristal formülasyonlarında etkin maddenin kristal halinde bulunup bulunmadığının ve kristal miktarında azalma olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır. Nanokristal formülasyonlarının literatüre bakıldığında kristal yapıda oldukları görülmektedir. Kristaller, yapıları nedeniyle raf ömürleri boyunca dayanıklı sistemler olup, çözünme hızı profilleri kararsız değildir. Amorf yapıdaki formülasyonların ise, çözünme hızları kristal yapıdaki formülasyonlara göre daha fazla artmasına rağmen formülasyonlar dayanklı değillerdir ve amorf yapıdan kristal yapıya geçme eğilimi gösterirler. Bu da raf ömürleri ve salım profillerini olumsuz etkiler (66). Sonuçlara bakıldığında, ezetimibin (88) ve Pluronic F 127'nin (129) tek başlarına kristal yapıda oldukları ve nanokristal formülasyonlarında da kristal yapılarını korudukları görülmektedir. Nanokristal formülasyonlarında piklerin şiddetinin etkin madde ve yardımcı maddeden farklı olması bu maddelerin etkileştiklerini göstermektedir. Ayrıca, her formülasyonda farklı üretim yöntemleri kullanıldığı için etkin ve yardımcı maddenin etkileşmeleri farklı olacağından, formülasyondaki pik şiddetinin birbirinden farklı olabileceği belirlenmiştir.

Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz, geliştirilen nanokristal formülasyonlarındaki bileşenlerin termal davranışlarının incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaç ile, formülasyonların ve formülasyon bileşenlerinin DSC termogramları karşılaştırmalı olarak alınmıştır. Kristal yapıdaki moleküller DSC termogramlarında erime piki verirken amorf özellik gösteren moleküller pik vermemektedir (130). Bkz. Şekil 3.3'te görüldüğü gibi ezetimib molekülüne ait 164.65 ˚C'de görülen keskin erime pikinin nanokristal formülasyonlarında ortadan

kaybolduğu görülmektedir. Bu sonuç da, ezetimib moleküllerinin Pluronic F 127 ile tamamen kaplandığı göstermektedir. Sadece püskürterek kurutma ile üretilen formülasyonda ezetimib piki görülmektedir. Bu sonuç ışığında, püskürterek kurutma yöntemi kullanıldığında ezetimib moleküllerinin Pluronic F 127 ile tam olarak kaplanmadığı şeklinde yorumlanmaktadır.

Ezetimib içeren nanokristal formülasyonlarının partikül büyüklükleri Bölüm 2.2.7.4'te anlatıldığı gibi ölçülmüştür. Bkz. Tablo 3.11'de, ezetimibin partikül büyüklüğünün farklı homojenizasyon ve öğütme yöntemleri kullanılarak küçültüldüğü görülmektedir. Püskürterek kurutma dışındaki yöntemlerle elde edilen nanokristal formülasyonlarının partikül büyüklükleri 2000 nm'nin altında olduğu için literatürde de belirtildiği üzere, nano olarak ifade edilebilmektedir (131) (Bkz. Tablo 3.11). Partikül büyüklüğünün küçülme nedeninin saptanması amacıyla fiziksel karışımın da partikül büyüklüğü ölçülmüştür ve partikül büyüklüğündeki küçülmenin kullanılan yöntemlerden kaynaklandığı gösterilmiştir. Yüzey etkin madde kullanıldığı için agregasyon engellenmiş ve partiküller biraraya gelmemiştir. En düşük partikül büyüklüğü (1189 ± 92 nm) el homojenizatörü yönteminde elde edilmiştir. Fakat bu yöntemde elde edilen nanokristallerin verimi, aletin kullanım şeklinden kaynaklanan kayıplardan dolayı çok düşük olmuştur. Bu nedenle, bu yöntemin tablet formülasyonları hazırlanmamıştır. Bilyalı değirmen yönteminde ise, hem 1259 ± 62 nm gibi küçük partikül büyüklüğü elde edilmiş hem de etkin madde içeriği % 97.82 ± 0.7 olarak bulunmuştur. Bu yöntemde, ezetimib süspansiyonu uygun büyüklükte ve sayıda agat bilyalar kullanılarak öğütülmüştür. Bu yöntem kolay uygulanabilir olup, bilyaların sayısı, büyüklüğü, karıştırma hızı ve yönü gibi parametreler değiştirilerek istenilen partikül büyüklüğü ayarlanabilir. Ultrasonikasyon yönteminde partikül büyüklüğü 1736±88 nm'ye düşürülmüş ve etkin madde içeriği % 98.13 ± 2.3 bulunmuştur. Bu yöntemde, ultrasonik ses dalgalarına maruz bırakılarak ezetimib süspansiyonunun partikül büyüklüğü küçültülmüştür. Bu yöntem de kolaydır ve probun çalışma süresi, % gücü ayarlanarak istenilen partikül büyüklüğüne ulaşılabilmektedir. Hem verimlerinin yüksek olması, hem partikül büyüklüklerinin küçük olması, hem de istenilen karakterizasyon özelliklerine sahip olmalarından dolayı bilyalı değirmen ve ultrasonikasyon ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarının tabletleri

hazırlanmıştır. Etüvde kurutma, birlikte çöktürme ve yüksek hızda homojenizasyon yöntemlerinde de partikül büyüklükleri ezetimibe ve fiziksel karışıma göre önemli ölçüde küçülmüştür ve istatistiksel olarak aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Püskürterek kurutma yönteminde ise, partikül büyüklüğü küçülmediği gibi ezetimibe oranla artmıştır. Bunun nedeni olarak, kullanılan püskürterek kurutma cihazının nozzle genişliğinin istenilenden büyük olması düşünülmektedir. Ayrıca, diğer formülasyonlardan farklı olarak etkin madde:yüzey etkin madde oranı 30:1 kullanıldığı için ezetimib molekülleri yüzey etkin madde ile tam kaplanamamış ve aglomere olmuş olabilir. Püskürterek kurutma yönteminde Pluronic F 127 miktarının düşürülmesinin sebebi, yüksek oranda kullanıldığında siklonun çeperine ezetimible birlikte yapışmasıdır. Pluronic F 127'nin erime derecesi 56 °C (109) olduğu için bu sıcaklığın altında sert ve katı iken bu sıcaklığın üzerinde yumuşak, esnek ve yapışkandırlar. Püskürterek kurutma yönteminde kullanılan organik çözücünün uçurularak uzaklaşması için de belli bir sıcaklığa gerek duyulduğundan erime derecesinin altında organik çözücü uzaklaştırılamamıştır. Hazırlanan karışımlardan sadece Pluronic F 127 ve ezetimib oranı 1:30 olduğunda uygun, toz halinde bir formülasyon hazırlanabilmiştir.

İn vitro çözünme hızı deneyleri Bölüm 2.2.8'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamızın başlangıç sürecinde, ezetimib ile ilgili yaptığımız çözünme koşulları araştırmalarında ezetimib-simvastatin sabit kombinasyonlu preparatın çözünme koşullarına ilişkin verilere FDA'da "Dissolution Methods for Drug Products" bölümünde ulaşılabilmiştir. Bu nedenle çalışmamızın başlangıç sürecinde ezetimib-simvastatin sabit kombinasyon ürünün çözünme ortamı seçilmiştir. Ancak güç çözünen maddelerde sıklıkla rastlanan bir durum olan yüzey etkin madde konsantrasyonunun çözünürlük ve çözünme hızındaki etkisini araştırmak, etkin madde ve/veya formülasyondaki farklılıkları ayırt edebilmek için SDS miktarı % 0.5'den % 0.15'e düşürülmüştür. Kaldı ki yapılan ön çalışmalarda % 0.5 SDS içeren çözünme ortamında, çözünme hızındaki artışların etkin madde ve/veya formülasyon farklılıklarından mı yoksa SDS'den mi kaynaklandığı ayırt edilememiştir. Bu nedenle artışın SDS'den mi kaynaklandığını saptayabilmek için konsantrasyon % 0.5'den % 0.15'e düşürülmüştür. Daha sonra 14.01.2008 tarihinde FDA'da sadece ezetimib içeren tabletler için yayınlanan çözünme ortamında da yine

aynı yaklaşımla SDS oranı % 0.45'den % 0.15 'e indirilerek çözünme hızı deneyleri karşılaştırmalı olarak yapılmış ve değerlendirilmiştir. Çözünme hızı profillerine bakıldığında partikül büyüklüğü küçüldükçe her üç ortamda da çözünen miktarların arttığı görülmektedir (132, 133). Kontrol grubu olarak, ezetimib ve fiziksel karışımda da çözünme hızı deneyleri yapılmış ve ezetimibin nanokristalleri hazırlandığında çözünme hızının sadece ezetimib ve fiziksel karışımla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı görülmüştür (Bkz. Şekil 3.30– 3.34). Nanokristal formülasyonlarındaki çözünme hızı artışının ortamda % 0.15 ve % 0.45 oranında bulunan yüzey etkin maddeden (SDS) kaynaklanmadığı kontrol grubu sonuçlarına bakıldığında görülmüştür. Ayrıca, ticari preparat olan Ezetrol® ile karşılaştırma yapılmış ve nanokristal formülasyonlarının çözünme hızları piyasa preparatına yakın bulunmuştur (Bkz. Şekil 3.30 – 3.34).

Toz nanokristal formülasyonları üzerinde ön denemeler yapıldıktan sonra etkin madde içeriği ve çözünme hızı yüksek, partikül büyüklüğü düşük olan formülasyonların tabletleri hazırlanıp piyasa preparatı ile karşılaştırılmıştır. Bilyalı değirmen ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan nanokristallerin çözünme hızı profilleri tablet formülasyonuna benzer bulunmuştur. Ayrıca, tüm formülasyonlar için çözünme ortamındaki SDS miktarı artırılınca çözünme hızının arttığı görülmüştür. Model bağımsız yöntemlerden f_2 benzerlik faktörü çözünme profillerini karşılaştırmada kullanılmıştır (134). Hazırlanan tablet formülasyonları ticari preparat ile karşılaştırıldığında, bilyalı değirmen ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan nanokristal tabletleri 500 ml pH 4.5 50 mM Asetat Tamponu / 0.45 % SDS ortamında referans ürüne benzer bulunmuştur.

5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, ezetimib etkin maddesi ve Pluronic F 127 yüzey etkin maddesi kullanılarak nanokristal formülasyonları hazırlanmıştır. Ezetimib nanokristalleri; el homojenizatörü, yüksek hızda homojenizasyon, ultrasonikasyon, birlikte çöktürme, etüvde kurutma, bilyalı değirmen ve püskürterek kurutma teknikleri kullanılarak hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak ise ezetimibin piyasa preparatı olan Ezetrol®, fiziksel karışım (Ezetimib : Pluronic F 127; 1:1) ve sadece ezetimib kullanılmıştır. Bu çalışmada X-ışını difraktometresi ile formülasyonların analizi yapılmış ve nanokristal formülasyonlarının hazırlanması sonrasında da ezetimibin kristal yapısının korunduğu ve dayanıklı olduğu saptanmıştır. Nanokristallerin hazırlanması sonrası ezetimibin 6302 ± 670 nm olan ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık olarak % 70 oranında azalarak püskürterek kurutma dışında tüm yöntemlerde 2000 nm'nin altına düşmüştür. Yapılan çözünme hızı deneyleri sonucunda, partikül büyüklüğü azaldıkça çözünme hızının arttığı saptanmıştır. Çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin nanokristalleri hazırlanarak çözünme hızı ve dolayısıyla in vivo biyoyararlanımın artabileceği birçok çalışmada belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca ezetimib nanokristalleri içeren tabletler hazırlanarak bunların da çözünme hızları saptanmıştır. Bu çalışmalarda da, hazırlanan tabletler SDS yardımcı maddesini içermediği halde çözünme hızları piyasa preparatına benzer bulunmuştur.

Sonuç olarak; bu çalışma ile, hiperkolesterolemik etkiye sahip ve suda çözünürlüğü olmayan ezetimibin, çeşitli yöntemlerle nanokristalleri hazırlanarak sudaki çözünürlüğünün ve çözünme hızının artırılması, bu tez kapsamındaki çalışmalarla mümkün olmuştur. Bu çalışmanın devamı bir proje olarak, nanokristal formülasyonlarının in vivo olarak değerlendirilmesi ve biyoyararlanım çalışmalalarının yapılması düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Zhang, L., Webster, T. J. (2009). Nanotechnology and Nanomaterials: Promises for Improved Tissue Regeneration. *Nano Today*, 4, 66-80.

2. Sahoo, S. K., Labhasetwar, V. (2003). Nanotech Approaches to Drug Delivery and Imaging. *Drug Discovery Today*, 8 (24), 1112-1120.

3. Mamalis, A.G. (2007). Recent Advances in Nanotechnology. *Journal of Materials Processing Technology*, 181, 52–58.

4. Chan, V. S. W. (2006). Nanomedicine: An Unresolved Regulatory Issue. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 46, 218–224.

5. Kaş, S., Öner, L., Gürsoy, A. (2002). Kontrollü salım Sistemleri. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği.

6. Birrenbach, G., Speiser, P.P. (1976). Polymerized Micelles and Their Use As Adjuvants In Immunology. *Journal of Pharmaceutial Sciences*, 65, 1763-1766.

7. Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E. (1993). Drug-Loaded Nanoparticles Preparation Methods and Drug Targeting Issues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 39 (5), 173-191.

8. Couvreur, P., Kante, B., Grislain, L., Roland, M., Speiser, P. (1982). Toxicity of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles II: Doxorubicin-Loaded Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutial Sciences*, 71(7), 790-792.

9. Lambert, G., Fattal, E., Couvreur, P. (2001). Nanoparticulate Systems for The Delivery of Antisense Oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 99-112.

10. Taglietti, M., Hawkins, C. N., Rao, J. (2008). Novel Topical Drug Delivery Systems and Their Potential Use in Acne Vulgaris. *Skin Therapy Letter* 13(5), 6-8.

11. Sarker, D. K. (2005). Engineering of Nanoemulsions for Drug Delivery. *Current Drug Delivery*, 2(4), 297-310.

12. *Drug Delivery Systems - Markets and Applications for Nanotechnology Derived Drug Delivery Systems. (t.y.). Erişim: 12.12.2008, www.azonano.com/details.asp*

13. *Leading Edge Predictors for Drug Discovery. (t.y.). Erişim: 15 Mayıs 2007, http://www.chemsilico.com/CS_prWS/WSintro.html*

14. Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G. G., Cooper, E. R. (2003). Nanosizing: A Formulation Approach for Poorly-Water-Soluble Compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 18(2), 113-120.

15. Mayer, C. (2005). Nanocapsules As Drug Delivery Systems. *International Journal of Artificial Organs*, 28(11), 1163-71.

16. *Oligonucleotide and Nanoparticles. (t.y.). Erişim: 26 Eylül 2007, http://ajetudes.club.fr/nano/index.html.*

17. Li, D., Ma, M. (2000). Nanosponges for Water Purification. *Clean Products and Processes*, 2, 112–116.

18. *Nanotechnology and the Environment. (t.y.). Erişim: 18 Ekim 2007, http://www.millsave.com/*

19. Müller, R.H., Mehnert, W., Lucks, J. S., Schwarz, C., Zur Mühlen, A., Weers, H., Freitas, C., Rühl, D. (1995). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) - An Alternative Colloidal Carrier System for Controlled Drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 41, 62–69.

20. Weiner, N., Martin, F., Riaz, M. (1989). Liposomes As a Drug Delivery System. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 15(10), 1523-1554.

21. Lasic, D.D. (1998). Novel Application of Liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16, 307-321.

22. *Liposomal NanoPharmaceuticals. (t.y.). Erişim: 7 Nisan 2007, http://www.pharmainfo.net/luckypharmacist/liposomal-nanopharmaceuticals*

23. Uchegbu, I. F. (2000). Synthetic Surfactant Vesicles: Niosomes and Other Non-Phospholipid Vesicular Systems, CRC Press

24. Arunothayanun, P., Bernard, M.S., Craig, D.Q.M., Uchegbu, I.F., Florence, A.T. (2000). The effect of Processing Variables on the Physical Characteristics of Non-Ionic Surfactant Vesicles (niosomes) Formed from a Hexadecyl Diglycerol Eether. *International Journal of Pharmaceutics,* 201, 7–14.

25. *Niosome: An Unique Drug Delivery System, (t.y.), Erişim: 12 Haziran 2007, http://www.pharmainfo.net/reviews/niosome-unique-drug-delivery-system*

26. Loftsson, T., Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 85 (10), 1017-1025.

27. Rajewskix, R. A., Stella, V. J. (1996). Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. In Vivo Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85 (11), 1142-1169.

28. *Cyclodextrins. (t.y.). Erişim: 9 Mayıs 2007, http://www.lsbu.ac.uk/water/cyclodextrin.html*

29. *Cyclosystem Complex. (t.y.). Erişim: 13 Mayıs 2007, http://www.cyclosystem.it/*

30. Yazan, Y., Hekimoğlu, S., Çalış, S., Öner, L. (2004). Farmasötik Teknoloji Temel Konular ve Dozaj Şekilleri. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği

31. Lieberman, H. A., Lachman, L. (1980). Pharmaceutical Dosage Forms. New York and Basel:Marcel Dekker, Inc.

32. Coppola, D. (2003). Nanocrystal Technology Targets Poorly Water Soluble Drugs. *Pharmaceutical Technology*, 27 (11), 20.

33. Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Değim, T. (2006). Modern Farmasötik Teknoloji. Ankara:Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını

34. Keck, C. M., Müller, R. H. (2006). Drug Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs Produced by High Pressure Homogenisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 62, 3-16.

35. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings., *Advanced Drug Delivery Reviews,* 23, 3-25.

36. Müller, R.H., Runge, S., Ravelli, V., Mehnert, W., Thünemann, A. F., Souto, E. B. (2006). Oral Bioavailability of Cyclosporine: Solid Lipid Nanoparticles (SLN®) Versus Drug Nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics*, 317, 82-89.

37. Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., Crison, J. R. (1995). A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413-420.

38. Crisp, M. T., Tucker, C. J., Rogers, T. L., Williams, R. O., Johnston, K. P. (2007). Turbidimetric Measurement and Prediction of Dissolution Rates of Poorly Soluble Drug Nanocrystals. *Journal of Controlled Release*, 117, 351-359.

39. Jinno, J. , Kamada, N., Miyake, M., Yamada, K., Mukai, T., Odomi, M. (2006). Effect of Particle Size Reduction on Dissolution and Oral Absorption of a Poorly Water-Soluble Drug, Cilostazol, in Beagle Dogs. *Journal of Controlled Release*, 111, 56-64.

40. Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalance studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System (2000). U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

41. Venkatesh, S., Lipper, R. A. (2000). Role of the Development Scientist in Compound Lead Selection and Optimization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89 (2), 145-154.

42. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry,* 45(12), 2615-2623.

43. Jamzad, S., Fasihsi, R. (2006). Role of Surfactant and pH on Dissolution Properties of Fenofibrate and Glipizide-A Technical Note. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 7(2), E1-E6.

44. Kimura, K., Hırayama, F., Arıma, H., Uekama, K. (2000). Effects of Aging on Crystallization, Dissolution and Absorption Characteristics of Amorphous Tolbutamide-2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin Complex. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(5), 646-650.

45. Müller, R. H., Keck, C. M. (2004). Challenges and Solutions for the Delivery of Biotech Drugs: a Review of Drug Nanocrystal Technology and Lipid Nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 113, 151-170.

46. Law, D., Wang, W., Schmitt, A. E., Qiu, Y., Krill, S. L., Fort, J. J. (2003). Properties of Rapidly Dissolving Eutectic Mixtures of Poly(ethylene glycol) and Fenofibrate:The Eutectic Microstructure. *Journal Of Pharmaceuiical Sciences*, 92(3), 505-515.

47. Serajuddin, A. T. M. (1999). Solid Dispersion of Poorly Water-Soluble Drugs: Early Promises, Subsequent Problems, and Recent Breakthroughs. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 88,(10), 1058-1066.

48. Pokharkar, V. B., Mandpe, L. P., Padamwar, M. N., Ambike, A. A., Mahadik, K. R., Paradkar, A. (2006). Development, Characterization and Stabilization of Amorphous Form of a Low Tg drug. *Powder Technology*, 167, 20–25.

49. Waard, H., Hinrichs, W. L. J., Frijlink, H.W. (2008). A Novel Bottom–Up Process to Produce Drug Nanocrystals: Controlled Crystallization During Freeze-Drying. *Journal of Controlled Release*, 128, 179-183.

50. *Technology Focus Helping you bring products to market. (t.y.). Erişim: 23 Mart 2007 http://www.elan.com/Images/Elan_Technology_07v1_tcm3-17145.pdf*

51. Trottaa, M., Gallaratea, M., Pattarinob, F., Morel, S. (2001). Emulsions Containing Partially Water-Miscible Solvents for the Preparation of Drug Nanosuspensions. *Journal of Controlled Release,* 76, 119–128.

52. Liversidge, G. G., Conzentino P., (1995). Drug Particle Size Reduction for Decreasing Gastric Irritancy and Enhancing Absorption of Naproxen in Rats. *International Journal of Pharmaceutics.* 125, 309-313.

53. Choi, J. Y., Yoo, J. Y., Kwak, H. S., Uk Nam, B., Lee, J. (2005). Role of Polymeric Stabilizers for Drug Nanocrystal Dispersions. *Current Applied Physics*, 5, 472-474.

54. Bacher, C., Olsen, P. M., Bertelsen, P., Sonnergaard, J. M. (2008). Compressibility and Compactibility of Granules Produced by Wet And Dry Granulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 358, 69-74.

55. *RETSCH - Solutions in Milling & Sieving. (t.y.). Erişim: 12.12.2008, http://www.retsch. com*

56. Yamada, T., Saito, N., Imai, T., Otagiri, M. (1999). Effect of Grinding with Hydroxypropyl Cellulose on the Dissolution and Particle Size of a Poorly Water-Soluble Drug. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin,* 47(9), 1311-1313.

57. Liversidge, G. G., Conzentino, P. (1995). Drug Particle Size Reduction for Decreasing Gastric Irritancy and Enhancing Absorption of Naproxen In Rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 125, 309-313.

58. Kondo, N., Iwao, T., Masuda, H., Yamanoouchi, K., Ishihara, Y., Yamada, N. ve diğerleri. (1993). Improved Oral Absorption of a Poorly Water-Soluble Drug, HO-221, by Wet-Bead Milling Producing Particles in Submicron Region. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(4), 737-740.

59. *Mini Spray Dryer B-290. (t.y.). Erişim: 23 Nisan 2008 http://www.buchi.com/Mini_Spray_Dryer_B-290.179.0.html*

60. Corrigan, O. I., Crean, A. M. (2002). Comparative Physicochemical Properties of Hydrocortisone / PVP Composites Prepared Using Supercritical Carbon Dioxide by the GAS Anti-Solvent Recrystallization Process, by Coprecipitation and by Spray Drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 245, 75-82.

61. Yin, S. X., Franchini, M., Chen, J., Hsieh, A., Jen, S., Lee, T. ve diğerleri. (2005). Bioavailability Enhancement of a COX-2 Inhibitor, BMS-347070, from a Nanocrystalline Dispersion Prepared by Spray-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 94 (7), 1598–1607.

62. Möschwitzer, J., Müller, R. H. (2006). Spray Coated Pellets as Carrier System For Mucoadhesive Drug Nanocrystals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62, 282–287.

63. *Ultrasonic Devices for Any Volume. (t.y.). Erişim: 1 Ocak 2009, http://www.hielscher.com/ultrasonics/products.htm*

64. Hecq, J., Deleers, M., Fanara, D., Vranckx, H., Amighi, K. (2005). Preparation and Characterization of Nanocrystals for Solubility and Dissolution Rate Enhancement of Nifedipin. *International Journal of Pharmaceutics*, 299, 167-177.

65. Müller, R. H., Peters, K. (1998). Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs: I. Preparation by a Size-Reduction Technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 160, 229-237.

66. Teeranachaideekul, V., Junyaprasert, V. B., Souto, E. B., Müller, R. H. (2008). Development of Ascorbyl Palmitate Nanocrystals Applying the Nanosuspension Technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 354, 227-334.

67. Möschwitzera, J. M., Achleitner, G., Pomper, H., Müller, R. H. (2004). Development of an Intravenously Injectable Chemically Stable Aqueous Omeprazole Formulation Using Nanosuspension Technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 58, 615–619.

68. Lee, J. (2003). Drug Nano- and Microparticles Processed into Solid Dosage Forms: Physical Properties. *Journal of Pharmaceutical Science*, 92, 2057-2068.

69. Sharma, D., Chelvi, T. P., Kaur, J., Chakravorty, K., De, T. K., Maitra, A. ve diğerleri. (1996). Novel Taxol® Formulation: Polyvinylpyrrolidone Nanoparticle-Encapsulated Taxol® for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Oncology Research*, 8(7-8), 281-286.

70. Wu, Y., Loper, A., Landis, E., Hettrick, L., Novak, L., Lynn, K., Chen, C. Ve diğerleri.(2004). The Role of Biopharmaceutics in the Development of a Clinical Nanoparticle Formulation of MK-0869: a Beagledog Model Predicts Improved Bioavailability and Diminished Food Effect on Absorption in Human. *International Journal of Pharmaceutics*, 285, 135-146.

71. *Particle Measurement for Dry Samples (t.y.). Erişim : 14 Ocak 2009, arhttp://www.malvern.com/LabEng/products/iwtm/particle_size.htm*

72. Çil, E., Kimya, Y., Heper, C., Sunay, B., Heper, Y. ve diğerleri, (2002). Multidisipliner Kardiyoloji, Bursa: Nobel & Güneş Tıp Kitabevleri

73. Heper, C., Heper, Y., Moğol, E. (2000). Kardiyoloji, İstanbul:Alfa Basım Yayım Dağıtım

74. Mycek, J. M., Harvey, R. A., Champe, P.C., (1998). Farmakoloji, İstanbul:Nobel Tıp Kitapevleri

75. Balat, A., Akıncı, A., Turgut, M., Çekmen, M., Orhan, S. (1997). Ailevi Hiperkolesterolemi. *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 4(3),302-305.

76. Damgaarda, D., Jensena, J. M., Larsena, M. L., Soerensena, V. R., Jensenb, H. K., Gregersenc, N. ve diğerleri. (2004). No Genetic Linkage or Molecular Evidence for Involvement of the PCSK9, ARH or CYP7A1 Genes in the Familial Hypercholesterolemia Phenotype in a Sample of Danish Families without Pathogenic Mutations in the LDL Receptor and apoB Genes. *Atherosclerosis*, 177(2), 415–422.

77. Hachem, S. B., Mooradian, A. D. (2006). Familial Dyslipidaemias an Overview of Genetics, Pathopysiology and Management. *Drugs*, 66(15), 1949-1969.

78. Goldstein, J. L. ve Brown, M. S. (1990). Regulation of the Mevalonate Pathway. *Nature*, 343, 425-430.

79. Istvan, E. S. (2001). Bacterial and Mammalian HMG-CoA Reductases: Related Enzymes with Distinct Architectures. *Current Opinion in Structural Biology*, 11, 746–751.

80. Liao, J. K., Laufs, U. (2005). Pleiotropic Effects of Statins. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology, 4*5(1), 89-121.

81. Tamer, İ., Dabak, R., Tamer, G., Orbay, E., Sargın, M. (2007). Güncel Kılavuzlar Işığında Hiperlipidemi. *Aile Hekimliği Dergisi*, 2 (3), 1-10.

82. Lee, T. K. (2004). Fibrates in Perspective. *Perspectives in Cardiology*, 10, 34-38.

83. Gotto, A. M. (2002). Management of Dyslipidemia. *The American Journal of Medicine*, 112 (8A), 10S-18S.

84. Pahan, K. (2006). Biomedicine&Diseases: Review lipid-lowering drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 1165-1178.

85. Hotz, W. (1983). Nicotinic Acid And Its Derivatives: A Short Survey. *Advances in Lipid Research*, 20, 195-217.

86. Sistla, R., Tata, V. S. S. K., Kashyap, Y. V., Chandrasekar, D., Diwan, P. V. (2005). Development and Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for the Determination of Ezetimibe in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 517–522.

87. Kosoglou, T., Statkevich, P. ve diğerleri. (2005). Ezetimibe a Review of Its Metabolism, Pharmacokinetics and Drug Interactions. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(5), 467-494.

88. Adin, I., Iustain, C. (2006). Novel Crystalline Form of Ezetimibe and Processes for the Preparation There of, US2006/70234996A1. United States:Arrlington.

89. Sarı, H., Tangürek, S. A., Tangürek, B., Can, G. (2003). Dejenere Lomber Spinal Stenoz ile Aterosklerotik Damar Hastalığı, Hiperkolesterolemi, Hipertansiyon ve Diabetes Mellitus Arasındaki İlişki. *Turkish Journal of Geriatrics*, 6(1), 1-5.

90. Budavari, S. (1989). The Merck Index 3rd Edition, USA.

91. Singh, S., Singh, B., Bahuguna, R., Wadhwa, L., Saxena, R. (2006). Stress Degradation Studies on Ezetimibe and Development of a Validated Stability-Indicating HPLC Assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 1037-40.

92. Basha, S.J.S., Naveed, S. A., Tiwari, N. K., Shashikumar, D., Muzeeb, S., Kumar, T. R., Kumar, N. V., Rao, N. P. ve diğerleri. (2007). Concurrent Determination of Ezetimibe and its Phase-I and II Metabolites by HPLC with UV Detection: Quantitative Application to Various In Vitro Metabolic Stability Studies and for Qualitative Estimation in Bile. *Journal of Chromatography B*, 853(1-2), 88-96.

93. Zhaoqi, Y. (2006). Microwave-Assisted Rapid Synthesis of Intermediate of Ezetimibe. *Chemistrymag,* 8(5), 37-40.

94. Stolk, M. F. J., Becx, M. C. J. M., Kuypers, K. C., Seldenrijk, C. A. (2006). Severe Hepatic Side Effects of Ezetimibe. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4, 908-911.

95. Gustavson, L. E., Schweitzer, S. M., Burt, D. A. ve diğerleri. (2006). Evaluation of the Potential for Pharmacokinetic Interaction Between Fenofibrate and Ezetimibe: A Phase I, Open-Label, Multiple-Dose, Three-Period Crossover Study in Healthy Subjects. *Clinical Therapeutics*, 28(3), 373-387.

96. Ghosal, A., Hapangama, N., Yuan, Y., Achanfuo-Yeboah, J., Iannucci, R., Chowdhury, S. ve diğerleri. (2004). Identification of Human UDP-Glucuronosyltransferase Enzyme(s) Responsible for the Glucuronidation of Ezetimibe (Zetia). *Drug Metabolism and Disposition*, 32(3), 314-320.

97. Salisbury, B. G., Davis, H. R., Burrier, R. E., Burnett, D. A., Boykow, G. ve diğerleri. (1995). Hypocholesterolemic Activity of a Novel Inhibitor of Cholesterol Absorption, SCH 48461. *Atherosclerosis*, 115(1), 45-63.

98. Ballantyne, C. M. (2002). Ezetimibe: Efficacy and Safety in Clinical Trials. *European Heart Journal Supplements,* 4, *(Supplement J),* J9–J18.

99. Physicians' Desk Reference ® 58 Edition (2004).

100. Gotto, A. M., Farmer, J. A. (2006). Drug Insight: Te Rle of Satins in Combination with Ezetimibe to Lower LDL Cholesterol, *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine,* 3, 664-672

101. Goldberg, R. B., Guyton, J. R., Mazzone, T., Weinstock, R. S., Polis, A., Edwards, P., Tomassini, J. E., Tershakovec, A. M. ve diğerleri. (2006). Ezetimibe/Simvastatin vs Atorvastatin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Hypercholesterolemia: the VYTAL Study. *Mayo Clinic Proceedings*, 81(12), 1579-88.

102. Cignarella, A., Bellosta, S., Corsini, A., Bolego, C. (2006). Hypolipidemic Therapy for the Metabolic Syndrome. *Pharmacological Research,* 53(6), 492-500.

103. Bays, H., Rhyne, J., Abby, S., Lai, Y., Jones, M. (2006). Lipid-Lowering Effects of Colesevelam HCl in Combination with Ezetimibe, *Current Medical Research and Opinion*, 22(11), 2191-2200.

104. Al-Shaer, M. H. (2004). The Effects of Ezetimibe on the LDL-Cholesterol Particle Number. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 18(4), 327-328.

105. *Zetia Ezetimibe Tablets Label (t.y.). Erişim: 23 Şubat 2008, http://www.fda.gov/*

106. Zhang, Z., Feng, S. (2006). Self-Assembled Nanoparticles of Poly(lactide)–Vitamin E TPGS Copolymers for Oral Chemotherapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 324, 191–198.

107. Reynolds, J. E. F. (1989). Martindale The Extra Pharmacopoeia Twenty Nineth Edition, London: The Pharmaceutical Press.

108. Kibbe, A. H. (2000). Handbook of Pharmaceutical Excipients Third Edition, London, United Kingdom.

109. *BASF The Chemical Company Safety Data Sheet Pluronic F 127 NF Prill Poloxamer 407. (t.y.). Erişim: 23 Aralık 2007 http://www.basf.com/group/corporate/en/*

110. Takatsuka, S., Morita, T., Koguchi, A., Horikiri, Y., Yamahara, H., Yoshino, H. (2006). Synergistic Absorption Enhancement of Salmon Calcitonin and Reversible Mucosal Injury by Applying a Mucolytic Agent and a Non-Ionic Surfactant. *International Journal of Pharmaceutics*, 316, 124–130.

111. Virkela, G., Imperialea, F., Lifschitza, A., Pisa, A., Alvarezb, A., Merinob, G., Prietob, J., Lanussea, C. (2003). Effect of Amphiphilic Surfactant Agents on the Gastrointestinal Absorption of Albendazole in Cattle. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 24, 95–103.

112. Buick, A. R., Doig, M. V., Jeal, S. C., Land, G. S., McDowall, R. D. (1990). Method Validation in the Bioanalytical Laboratory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 8(8-12), 629-637.

113. Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures: Methodology Final Guidance, Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, (1999), 2-13

114. Niopas, I., Daftsios, A. C. (2003). Determination of Nifedipine in Human Plasma by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography: Validation and Application to Pharmacokinetic Studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 32, 1213-1218.

115. Imran, M., Singh, R. S., Chandran, S. (2006). Stability Indicating Ultraviolet Spectroscopic Method for the Estimation of Ezetimibe and Carvedilol. *Pharmazie*, 61(9), 766-769.

116. Dixit, R. P., Nagarsenker, M. S. (2008). Formulation and In Vivo Evaluation of Self-Nanoemulsifying Granules for Oral Delivery of a Combination of Ezetimibe and Simvastatin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(12), 1285–1296.

117. Li, S., Liu, G., Jia, J., Li, X., Yu, C. (2006). Liquid Chromatography-Negative Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantification of Ezetimibe in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(4), 987-992.

118. Oliveira, P. R., Barth, T., Todeschini, V., Dalmora, S. L. (2007). Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Ezetimibe and Simvastatin in Pharmaceutical Products. *Journal of AOAC International,* 90, 1566-1572.

119. Shah, D. A., Bhatt, K. K., Mehta, R. S., Baldania, S. L. (2008). Determination of Nebivolol Hydrochloride and Hydrochlorothiazide in Tablets by First-Order Derivative Spectrophotometry and Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*, 91(5), 1075-1082.

120. Chaudhari, B. G., Patel, N. M., Shah, P.B., Patel, L. J., Patel, V. P. (2007). Stability-indicating Reversed-Phase Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Atorvastatin and Ezetimibe from Their Combination Drug Products. *Journal of AOAC International*, 90, 1539-1546.

121. Wenzel, G.W. J., Balaji, K. S. S., Koushik, K., Navarre, C., Duranb, S. H., Rahec, C. H., Kompellaa, U. B. (2002). Pluronic® F127 Gel Formulations of Deslorelin and GnRH Reduce Drug Degradation and Sustain Drug Release and Effect in Cattle. *Journal of Controlled Release*, 85, 51-59.

122. Kamil, S. H., Eavey, R. D., Vacanti, M. P., Vacanti, C. A., Hartnick, C. J. (2004). Otolaryngol Tissue-Engineered Cartilage as a Graft Source for Laryngotracheal Reconstruction A Pig Model. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery,* 130, 1048-1051.

123. Lee, S. H., Lee, J. E., Baek, W. Y., Lim, J. O. (2004). Regional delivery of Vancomycin Using Pluronic F-127 to Inhibit Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Growth in Chronic Otitis Media In Vitro and In Vivo. *Journal of Controlled Release*, 96(1), 1– 7.

124. Wong, S.M., Kellaway, I.W., Murdan, S. (2006). Enhancement of the Dissolution Rate and Oral Absorption of a Poorly Water Soluble Drug by Formation of Surfactant-Containing Microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 317, 61–68.

125. Gubskaya, A., Lisnyak, Y., Blagoy, Y. (1995). Effect of Cryogrinding on Physico-Chemical Properties of Drugs. I. Theophylline: Evaluation of Particle Size and the Degree of Crystallinity, Relation to Dissolution Parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21, 1953–1964.

126. Sjöstrom, B., Kronberg, B., Carlfors, J. (1993). A Method for the Preparation of Submicron Particles of Sparingly Water-Soluble Drugs Precipitation in Oil-in-Water Emulsions. I: Influence of Emulsification and Surfactant Concentration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82(6), 579-583.

127. Müller, R.H., Keck, C.M. (2004). Challenges and Solutions for The Delivery of Biotech Drugs – A Review of Drug Nanocrystal Technology and Lipid Nanoparticles. *Journal of Biotechnology, 113, 151–170.*

128. Gao L., Zhang, D., Chen M. (2008). Drug Nanocrystals for the Formulation of Poorly Soluble Drugs and Its Application as a Potential Drug Delivery System. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 845–862.

129. Zhang, R., Weng, W., Du, P., Zhao, G., Shen, G., Han G. (2004). Effect of Pluronic F127 on the Pore Structure of Macrocellular Biodegradable Polylactide Foams. *Polymers for Advanced Technologies*, 15, 425–430.

130. Bresciani, M., Magarotto, L., Dobetti, L. (2003). Process of Thermodynamical Activation of Water-Insoluble Drugs Loaded into Crosslinked Polymers, WO 03/002097. Milano:Italy

131. Liversidge, G., Jenkins, S. (2006). Nanoparticulate Candesartan Formulations, WO 2006/074218A2. Washington DC:USA

132. Rasenack, N., Müller, B. W. (2002). Dissolution Rate Enhancement In Situ Micronization of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutical Research*, 19(12), 1894-1900.

133. Jounela, A. J., Pentikäine, P. J., Sothmann, A. (1975). Effect of Particle Size on the Bioavailability of Digoxin. *European Journal of Clinical Pharmacology,* 8, 365-370.

134. Jounela, A. J., Pentikainen, P. J., Sothmann, A. (1995). Guidance for Industry Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation. *Center for Drug Evaluation and Research,* 1-25.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Tokat'ta doğdu. Tokat'ta Namık Kemal İlkokulunu bitirdi. Daha sonra ortaokul öğrenimini Plevne Ortaokulu'nda 1997 yılında, lise öğrenimini ise Gazi Osman Paşa Süper Lisesi'nde 2001 yılında tamamladı. Aynı yıl girdiği Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimine başladı ve 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesine yatay geçiş yaparak 2005 yılında yüksek öğrenimini bitirdi. Aynı yıl, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programında yüksek lisansa başladı ve 2006 yılından itibaren araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

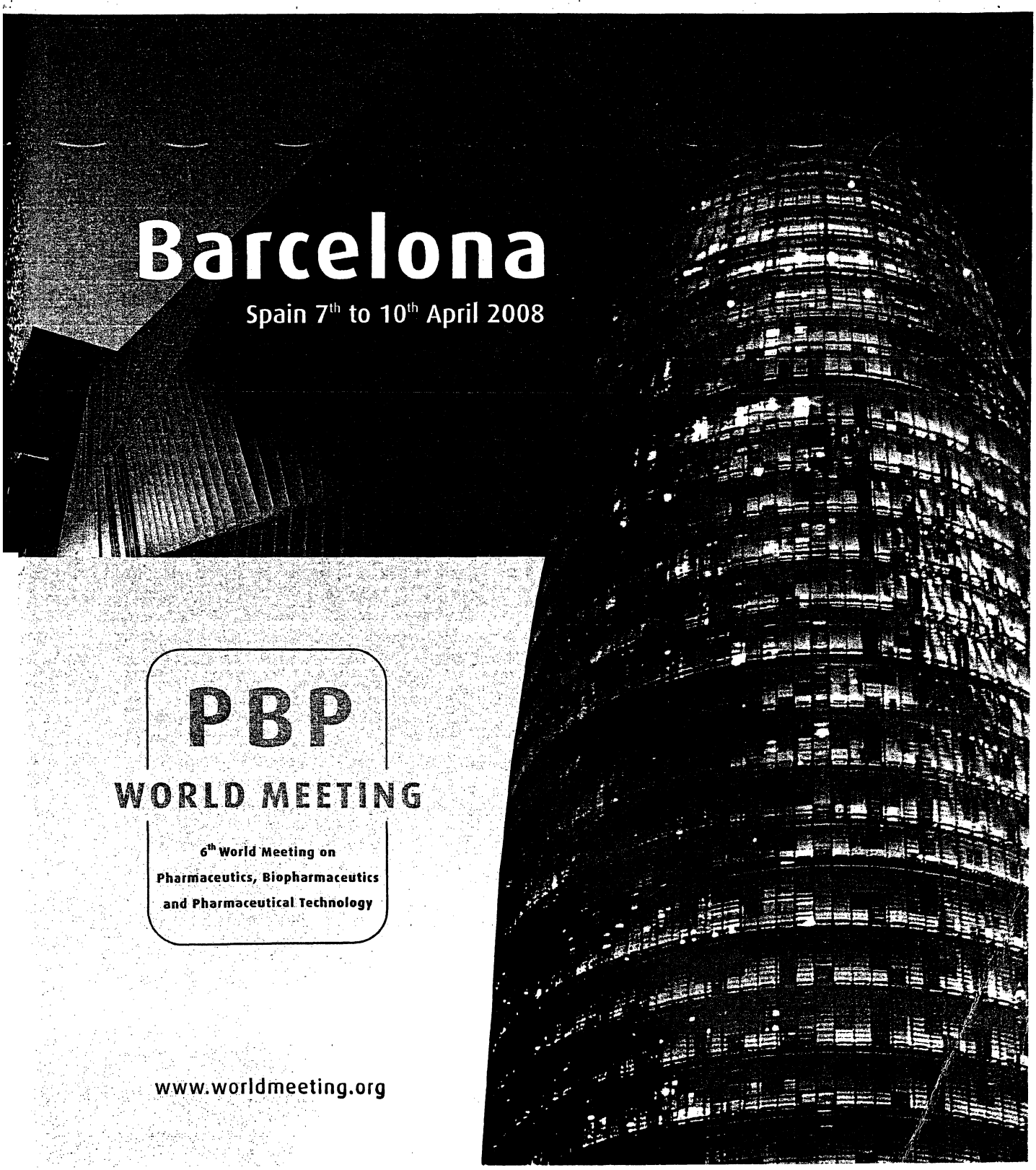
EKLER

EK 1: Uluslararası Bildiriler

EK 2: Transkript

6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology

Industry meets academia and authorities: Shared research for scientific progress



Barcelona

Spain 7th to 10th April 2008

PBP

WORLD MEETING

6th World Meeting on
Pharmaceutics, Biopharmaceutics
and Pharmaceutical Technology

www.worldmeeting.org

APPLICATION OF NANOTECHNOLOGY FOR THE IMPROVEMENT OF DISSOLUTION PROPERTIES OF A POORLY WATER-SOLUBLE DRUG, EZETIMIBE

T. Gülsün[1], R. N. Gürsoy[1], L. Öner[1]

[1]Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara-TURKEY

Introduction

Nanotechnology has been improving especially in recent years and has a variety of application fields, including pharmaceutics. In pharmaceutics, nanotechnology is used to improve human health at the molecular level. The novel and potential applications of nanotechnology in pharmaceutics are; development of diagnostic tools, formulation of drug carrier systems and gene therapy. The advantages of nanotech drugs compared to conventional counterparts lie on the basis of particle size. Drugs with "nano" dimensions can be used at a lower concentration and can lead to early onset of bioactivity [1].

Most of the new chemical compounds developed on a drug have a poor solubility in water [2]. Thus, solubility, dissolution rate and therefore, bioavailability of poorly water-soluble drugs can be increased by nanotechnological methods, such as preparation of drug nanocrystals.

The model drug ezetimibe, is a new lipid-lowering compound which selectively inhibits the absorption of cholesterol and releated phytosterols from the intestine. It inhibits absorption of cholosterol due to bile and diet without affecting the absorption of trigliserides, oil soluble vitamins (A, D, E, K vitamins) and bile acids. Therefore, it is used in the prophylaxis and treatment of atherosclerosis. However, ezetimibe is almost insoluble in water, and thus, its bioavalibility is low.

The objective of this work hence is to improve the dissolution properties of ezetimibe by decreasing the particle size to nanodimensions (i.e. nanocrystal formation) utilizing several techniques such as; homogenization, co-precipitation, spray drying, and milling.

Experimental Methods

- **Preparation of formulations**

Co-precipitation: A 3% (w/v) solution of ezetimibe and poloxamer F127 (Uniqema, Belgium) (1:1 w/w) was prepared in ethanol. The solvent was then removed under reduced pressure at 40 °C and the precipitate was desiccated until use.

Heat-drying: A 3% (w/v) solution of ezetimibe and poloxamer F127 (1:1 w/w) was prepared in acetone. The solvent was evaporated at room temperature and the mixture was dried in a 50 °C oven.

Ultraturrax mixing: A 3% suspension of ezetimibe and poloxamer F127 (1:1 w/w) was prepared in distilled water and mixed with an Ultraturrax® T25 Basic (IKA Labortechnik, Germany) at 11000 rpm for 3 minutes. The dispersion medium was then removed by lyophilization.

- **Solubility of ezetimibe**

The saturation solubility of ezetimibe in the dissolution medium was determined in order to establish sink conditions during dissolution studies. Hence, 50 mg of the drug was dissolved in 17 ml of the dissolution medium (0.05% SDS in 10 mM pH 7.0 phosphate buffer) and kept in a shaking water bath at 37 °C with 80 rpm rate for 12 hours. The amount of drug dissolved was determined by HPLC.

- **Determination of drug content**

The actual amount of drug present in each formulation was determined by HPLC and using the following equation:

% drug = (practical amount / theoretical amount) x 100

- **Dissolution studies**

The dissolution studies were carried out utilizing the USP apparatus II (pedal) method. A 10 mg of the formulations corresponding to 5 mg of the drug was placed in the apparatus containing 900 ml of 0.15% SDS / 10 mM pH 7.0 phosphate buffer at 37±0.5 °C with 50 rpm rate. The commercial tablet (Ezetrol®, Merck-Schering Plough Pharmaceuticals) containing 10 mg of

ezetimibe and 10 mg of ezetimibe were also tested as controls. A 5 ml sample was withdrawn at each of the predetermined time intervals and, the amount of the drug was determined by HPLC.

- **HPLC analysis**

A validated HPLC method was utilized for the quantification of ezetimibe. The mobile phase comprised water (0.05% w/v 1-heptane sulfonic acid, pH 6.8) and acetonitrile (30:70 v/v). A SphereClone ODS column (80 °A, 5 μm, 150x 4.6 mm) was used and the flow rate was set to 0.5 ml/min with an injection volume of 20 μl. The analysis was carried out at 232 nm and the retention time of the drug was determined to be at 4.4 min.

Results and Discussion

- **Solubility of ezetimibe**

In order to be able to carry out the dissolution studies of ezetimibe, sink conditions should be established. The saturation solubility of ezetimibe in the dissolution medium was determined to be 1.082 mg/ml. Thus, it could be said that sink conditions were established in the dissolution studies.

- **Drug content**

The amount of drug present in each of the formulations prepared by co-precipitation, heat-drying and ultraturrax mixing was found to be more than 95%.

- **Dissolution studies**

The dissolution profiles of ezetimibe in the formulations, commercial tablet formulation and as is, are given in Figure 1. The dissolution profile of the drug in the formulations prepared by co-precipitation, heat-drying and ultraturrax mixing appears to be significantly improved as compared to the drug alone and is comparable to the profile of the commercial tablet formulation. It could be clearly seen from the figure that the drug was dissolved almost completely within 5 minutes when formulated by co-precipitation and heat-drying. Also, approximately 80% of the drug was dissolved within 5 minutes when formulated by ultraturrax mixing. Meanwhile, no drug was dissolved when tested alone and less than 50% of the drug was dissolved from the commercial tablet formulation within the first 5 minutes of dissolution testing. Moreover, the dissolution profiles of the drug indicate that similar amount of drug was dissolved from the formulations prepared by the three methods at the end of 3 hours as compared to the commercial tablet formulation.

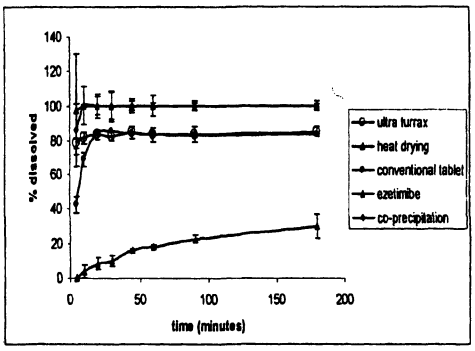


Figure 1. Dissolution profile of ezetimibe in formulations prepared by co-precipitation, heat-drying, ultraturrax mixing, commercial tablet formulation and alone (n = 3)

Conclusion

These preliminary results obtained indicate that the dissolution profile of ezetimibe, a poorly water-soluble drug, could be improved by several methods, such as; co-precipitation, heat-drying and ultraturrax mixing. The results could be attributed to the increased solubility of the drug due to the presence of the surface active agent, poloxamer F127, and the method of preparation.

Acknowledgments

This project is supported by a grant from the TUBITAK Scientific and Technologic Research Project Support Program (SBAG-3710, No: 107S216). Ezetimibe was a kind gift from Sanovel Pharmaceuticals, Turkey.

References

[1] V.S.W. Chan, Reg. Toxic. Pharmacol. 46: 218 – 224 (2006).

[2] R.H. Müller, S. Runge, V. Ravelli, W. Mehnert, A.F. Thünemann, E.B. Souto, Int. J. Pharm. 317: 82 – 89 (2006).

EUFEPS Conference on

When Variability Becomes an Issue in Drug Development: How to Understand, Predict and Manage?

Centro Congressi GSK • Verona • Italy • May 13-14, 2008

Exhibitors at the Conference:

- **Applied Biosystems, Monza MI IT**
- **Cross Alliance, Arzo CH**
- **Simulation Plus Inc, Lancaster CA USA**

Exhibition Organiser:

HEALTH LINKS

Health Links is the appointed Exhibition Organiser
Attn: Chris Hanney
3rd Floor, Windsor House, 11A High Street
Kings Heath, Birmingham B14 7BB, United Kingdom
Tel No: +44 208 7496471
Fax No: +44 121 2483390
Email: chrishanney@btclick.com
http://www.health-links.co.uk

PO-13 Abstract of MSc. Studies

Tugba Gülsün

Nanotechnology has been improving since the 90's and has a variety of application fields. Such fields are; materials and manufacturing sector, nanoelectrics and computer technologies (fiber optic communication networks), biology, aviation and space research, environment and energy, agriculture, chemical engineering, defense industry, biotechnology, medicine and health sectors (1).

In pharmaceutics, nanotechnology is used to improve human health at molecular level. The novel and potential applications of nanotechnology in pharmaceutics are; development of diagnostic tools, formulation of drug carrier systems and gene therapy. The advantages of nanotech drugs compared to conventional counterparts lie on the basis of particle size. Drugs with nano dimens can be used at a lower concentration and can lead to early onset of bioactivity (2).

Most of the new chemical compounds developed on a drug have a poor solubility in water (3). Thus, solubility, dissolution rate and therefore, bioavailability of poorly water-soluble drugs can be increased by nanotechnical methods, one of the means to improve solubility, dissolution rate and bioavailability in preparation of drug nanocrystals. In recent years, much effort has been directed towards this field.

The model drug ezetimibe which is used in the project is hidrofobic and almost insoluble in its aqueous solutions. Ezetimibe is a new lipid-lowering compound which selectively inhibits the absorption of cholesterol and releated phytosterols from the intestine. It inhibits absorption of cholesterol due to bile and diet without effecting the absorption of trigliserits, oil soluble vitamins (A, D, E, K vitamins) and bile acids. Ezetimibe is a hypocholesterolemic agent used in the prophylaxis and treatment of atherosclerosis. As, ezetimibe is almost insoluble in water, its bioavailability can not be detected and its bioavailability is low.

The objective of the current project proposal is the improvement of the solubility, dissolution rate, and hence, bioavailability of poorly water soluble drugs by decreasing particle size to nanodimensions (nanocrystal formulation) utilizing several techniques such as, spray drying, milling, homogenization, co-precipitation, ultra turrax, ultrasonic probe and heat drying. Since increase in drug solubility lead to increase in drug bioavailability, the results which will be obtained at the end of this project will play a role in drug efficacy. Thus, the results that will be obtained from this project will contribute to science and pharmaceutical industry (national and international) during the formulation development period.

Farm Vestn 2008
UDK 615 CODEN FMVTA, SLO ISSN 0014-8229

Farmacevtski vestnik



7th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutical Systems

September 18-20, 2008, Hotel M... Ljubljana, Slovenia

SPECIAL ISSUE · SEPTEMBER 2008 · LETNIK 59

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

CHARACTERIZATION OF NANOCRYSTAL FORMULATIONS WHICH CONTAIN POORLY WATER SOLUBLE DRUG, EZETIMIBE

Tuğba Gülsün[1], Neslihan Gürsoy[1], Levent Öner[1]

[1]Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100, Ankara, Turkey

INTRODUCTION

Many new drugs can be classified an Class II drugs according to the Biopharmaceutical Classification Systems (BCS). Drug, which are Class II, are poorly/not soluble in water however their permeability is high, so when they are dissolved, they are easily absorbed. The model drug ezetimibe is a white crystalline powder and Class II drug. It is the first marketed lipid lowering drug that inhibits intestinal uptake of dietary and biliary cholesterol without affecting the absorption of bile acids, triglycerids, fat-soluble vitamins and is used in the treatment and prophylaxis of atherosclerosis. It belongs a family of azetidinone compounds. Its chemical structure is (3R, 4S)-1-(4-fluorophenyl)-3-[(3S)-3-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropyl]-4-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone.
Poor solubility of the drug is associated with poor dissolution rate and thus low oral bioavailability. [1,2,3,4].
The purpose of this study is to increase the spesific surface area of the drug following particle size reduction and to enhance ezetimibe solubility and dissolution charecteristics by preparing drug nanocrystals. Moreover, characterization of nanocrystal formulations, prepared by several techniques, such as; homogenization, co-precipitation and heat drying, were carried out.

EXPERIMENTAL METHODS

▪ Materials

Poloxamer F127 was obtained from Uniqema (Belgium) and Ezetimibe was a kind gift from Dr. Reddy's Laboratories (India).

▪ Preparation of Formulations

Co-precipitation (BC): A solution of ezetimibe and poloxamer F127 was prepared in ethanol. The solvent was then removed under reduced pressure at 40 °C and the precipitate was desiccated until use.
Heat-drying (EK): A solution of ezetimibe and poloxamer F127 was prepared in acetone. The solvent was evaporated at room temperature and the mixture was dried in a 50 °C oven.
Ultraturrax mixing (UT): A suspension of ezetimibe and poloxamer F127 was prepared in distilled water and mixed with an Ultraturrax® T25 Basic (IKA Labortechnik, Germany). The dispersion medium was then removed by lyophilization.
Ultrasonic Probe (UP): A suspension of ezetimibe and poloxamer F127 was prepared in distilled water and mixed with an Ultrasonic Probe. The dispersion medium was then removed by lyophilization.
Hand Homogenization (EH): A suspension of ezetimibe and poloxamer F127 was prepared in distilled water. The formulation was then homogenized with a Hand Homogenizator. The dispersion medium was then removed by lyophilization.
Physical Mixture (FK): Ezetimibe and poloxamer F 127 was mixed using a mortar.

▪ Dissolution Studies

In vitro dissolution studies were performed using SOTAX dissoltion apparatus. The dissolution studies were carried out utilizing the USP apparatus II (pedal) method. A 10 mg of the formulations corresponding to 5 mg of the drug was placed in the cells. Three dissolution media were used in this work. First dissolution media contained 900 ml of 0.15% SDS / 10 mM pH 7.0 phosphate buffer (DM1), second dissolution medium contained 500 ml 0.15% SDS in 50 mM pH 4.5 acetate buffer (DM2), and third one contained 500 ml 0.5% SDS in 50 mM pH 4.5 acetate buffer (DM3) all stirred at 37±0.5 °C with 50 rpm rate. A 10 mg of ezetimibe powder was also tested as a control. A 5 ml sample was withdrawn at each of the predetermined time intervals, and the amount of the drug was determined by HPLC.

▪ HPLC Analysis

A validated HPLC method was utilized for the quantification of ezetimibe [5]. The mobile phase comprised water (0.05% w/v 1-heptane sulfonic acid, pH 6.8) and acetonitrile (30:70 v/v). A SphereClone ODS column (80 °A, 5 µm, 150x 4.6 mm) was used and the flow rate was set to 0.5 ml/min with an injection volume of 20 µl during the experiment. The analysis was carried out at 232 nm and the retention time of the drug was determined to be 4.4 min

▪ Characterization of Formulations

1. DSC Analysis

Differential Scanning Calorimeter (DSC) was used to determine the degree of crystallinity and melting of ezetimibe, Pluronic F 127 and the formulations. Thermal properties of the powder samples were

invastigated using a DSC Q 100 (TA Instruments, USA). Approximately, a 10 mg sample in a aluminum pan. A heating rate of 10 °C/ min was employed in the range 10-250 °C. Analyses were performed under a nitrogen purge at 1.5 bar.

2. X-ray Analysis

X-ray diffractograms of each formulation, Pluronic F 127 and ezetimibe were recorded using a X-Ray Diffractometer (Ultima, Japan). Standart runs using a 40 kV voltage, a 40 mA current and a scanning rate of 0.02° min^{-1} over a 2 θ range of 0 - 40 ° were used.

3.FT-IR Analysis

Samples were analysed using a Fourier Transform Infrared Spectrometer (Perkin Emler, USA). The infrared spectra were detected over the wavenumber range of 4000 - 650 cm^{-1}.

RESULTS AND DISCUSSION

- **Dissolution Studies**

The dissolution profiles of ezetimibe in different formulations, powder and physical mixture form are given in Table 1[6].

Table 1. Amount of drug dissolved (%) at the end of 45 min from the formulations in different dissolution media (DM: dissolution media; EZE: ezetimibe powder; FK: physical mixture).

	Amount of drug dissolved (%)						
DM	**EH**	**UP**	**UT**	**EK**	**EZE**	**FK**	**BC**
DM1	91	77	100	41	25	20	32
DM2	55	63	57	25	23	24	23
DM3	87	74	65	60	53	49	44

- **Formulation Characterization**

1. DSC Analysis

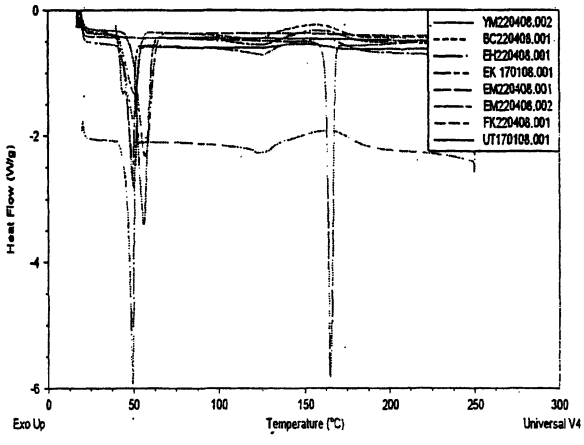


Figure 1. DSC termograms of ezetimibe (EM), Pluronic F127 (YM), physical mixture (FK) and nanocrystal formulations (BC, EK, UT,UP, EH)

2. X-ray Analysis

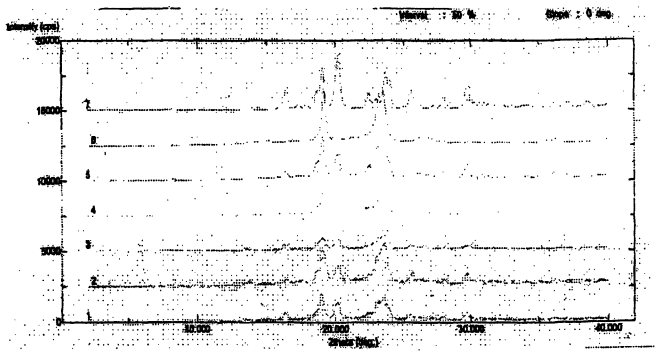


Figure 2. X-ray patterns of ezetimibe (7), Pluronic F127 (6) and nanocrystal formulations; BC (5), EK (2), UT (1), UP (4), EH (3).

3. FT-IR Analysis

FT-IR analyses were performed and similar spectra were found for ezetimibe and nanocrystal formulations.

CONCLUSION

X-ray diffraction patterns showed that drug was covered with Pluronic F 127 and this prevented the aggregation and provided a faster dissolution rate. Thus, intensity of the X-ray peaks and dissolution profiles appear to be inversely related. DSC analyses results indicate that ezetimibe and Pluronic F 127 interacted with each other in all formulations. FT-IR spectra showed that structure of formulations were the same regardless of the preparation method. These preliminary results obtained indicate that the dissolution profile of ezetimibe, a poorly water-soluble drug, could be improved by several methods, such as; ultrasonic probe and hand homogenization. The results could be attributed to the increased solubility of the drug due to the presence of the surface active agent, poloxamer F127 and the method of preparation.

REFERENCES

1. Teddy Kosolou, *et. al.* Clin Pharmacokinet, 44 (5); 467-494 (2005)
2. Novel Crystalline Form of Ezetimibe and Processes for the preparation thereof, US 2006 / 0234996 A1 (2006)
3. Harry R. Davis, International Congress Series, 1262; 243-246.
4. H. De Waard, *et. al.* Journal of Controlled Release, Article in press (2008)
5. R. Sistla, *et. al.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 39 (3-4); 517-522 (2005)
6. T. Gülsün, *et. al.* Application of Nanotechnology for the Improvement of Dissolution Properties of a Poorly Water-Soluble Drug, Ezetimibe, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (2008)

ACKNOWLEDGEMENT

This project is supported by a grant from the TUBITAK Scientific and Technologic Research Project Support Program (SBAG-3710, No:107S216).

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NOT ÇİZELGESİ (TRANSKRİPT)

25/3/2009

Adı Soyadı:	TUĞBA GÜLSÜN	**Baba Adı:**	Erol
Doğum Yeri,Tarihi:	Tokat, 28/11/1983	**Uyruğu:**	T.C.
No:	2512015	**T.C. Kimlik No:**	******18492

Anabilim Dalı:	Farmasötik Teknoloji		
Program Adı:	Biyofarmasötik Ve Farmakokinetik-Tezli Yüksek Lisans		
Program Türü:	Birinci Öğretim	**Kayıt Tarihi:**	3-10-2005
Alınacak Derece:	Tezli Yüksek Lisans		
Zorunlu Kredi Yükü:	24	**Kazanılmış Kredi:**	29
Akademik Ortalama:	3.86	**Danışman:**	Prof. LEVENT ÖNER

Akademik Dönem :	**2005-2006 GÜZ**		**Ects**	**Genel Notu**
	Yabancı Dil Geliştirme			

Akademik Dönem :	**2005-2006 BAHAR**		**Ects**	**Genel Notu**
EFT 666	PATENT HAKLARI UYGULAMALARI VE İLAÇ ENDÜSTRİSİ	3-0-3	6	A1
EBF 651	TEMEL BİYOFARMASİ VE KATI DOZAJ ŞEKİLLERİNE UYGULANMASI	4-0-4	8	A1
EBF 606	BİYOFARMASÖTİK DENEY DÜZENLEME VE OPTİMİZASYON TEKNİKLERİ	2-2-3	6	A1
EFT 641	İLAÇ TAŞIYICI YENİ SİSTEMLER [1]	2-4-2	4	A2
Dönem Ortalama:	**3.92**			
Dönem Kredisi:	**12**			

Akademik Dönem :	**2006-2007 GÜZ**		**Ects**	**Genel Notu**
EBF 615	İN VİTRO-İN VİVO KORELASYON	3-	6	A1

		0-3		
EBF 691	BİYOFARMASÖTİK VE FARMAKOKİNETİK SEMİNERLERİ I	1-0-0	0	G
BIS 535	BİYOİSTATİSTİK	3-0-3	6	B1
EAK 741	YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOGRAFİSİ	3-4-4	8	A1
EFT 650	REAKSİYON KİNETİĞİ VE STABİLİTESİ	4-0-4	8	A1
Dönem Ortalama:	**3.79**			
Dönem Kredisi:	**14**			

Akademik Dönem :	**2006-2007 BAHAR**		**Ects**	**Genel Notu**
EFT 615	YÜZEY KİMYASI	2-3-3	6	A1
EBF 600	ÖZEL KONULAR	4-0-0	30	G
Dönem Ortalama:	**4.00**			
Dönem Kredisi:	**3**			

Akademik Dönem :	**2007-2008 GÜZ**		**Ects**	**Genel Notu**
EBF 600	ÖZEL KONULAR	4-0-0	30	G
Dönem Ortalama:	**-**			
Dönem Kredisi:	**0**			

Akademik Dönem :	**2007-2008 BAHAR**		**Ects**	**Genel Notu**
	Normal Uzatma			
EBF 600	ÖZEL KONULAR	4-0-0	30	G
Dönem Ortalama:	**-**			
Dönem Kredisi:	**0**			

Akademik Dönem :	**2008-2009 GÜZ**		**Ects**	**Genel Notu**
	Normal Uzatma			
EBF 600	ÖZEL KONULAR	4-0-0	30	G
Dönem Ortalama:	-			
Dönem Kredisi:	**0**			

Akademik Dönem :	**2008-2009 BAHAR**		**Ects**	**Genel Notu**
EBF 600	ÖZEL KONULAR	4-0-0	30	-
Dönem Ortalama:	-			

Danışman : *Prof. LEVENT ÖNER*

Tez : *NANOTEKNOLOJİ UYGULAMASI İLE İLAÇ BİYOYARARLANIMININ ARTIRILMASI*

Tez Başlama Tarihi : *31/1/2007*

NOT SİSTEMİ
A1 : 4,00 (90 - 100) A2 : 3,50 (85 - 89) B1 : 3,00 (75 - 84) B2 : 2,50 (70 - 74) C1 : 2,00 (65 - 69) C2 : 1,50 (60 - 64) D1 : 1,00 (55 - 59) D2 : 0,50 (50 - 54) F1 : Devamsız F2 : Sınava Girmedi F3 : (0 - 49) Geçmez

KISALTMALAR
T: Teorik Saat P: Pratik Saat K: Kredi G: Geçer K: Kalır

DİPNOTLAR
1 : Özel öğrenciyken alınan dersler.