



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BRİNZOLAMİD İLAÇ ETKEN
MADDESİNİN IN VİTRO SALIMI
İNCELEMESİ İÇİN HPLC METODU
OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU**

ÜMMÜŞ ÇİÇEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2025



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BRİNZOLAMİD İLAÇ ETKEN
MADDESİNİN IN VİTRO SALIMI
İNCELEMESİ İÇİN HPLC METODU
OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU**

ÜMMÜŞ ÇİÇEK
(520421006)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU
İSTANBUL, 2025

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi ve tez çalışmalarım boyunca yol gösterici destekleyici olarak her zaman yanımda olan sevgili hocam Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimimde sevgi ve fedakarlıkla öğretmek için çalışan sevgili hocam Prof. Dr. Metin ÖZER'e,

Yüksek lisans eğitimime vesile olan, her adımda yanımda olan sevgili meslektaşım Ulaş ÇİFÇİOĞLU'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İçindekiler

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
SEMBOLLER.....	v
KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Brinzolamid İlaç Aktif Maddesi	2
1.2. Franz Diffüzyon İçin Analitik Çalışmalar	3
1.3. Metot Validasyonu ve Metot Optimizasyonu	11
2. YÖNTEM VE MATERYALLER.....	14
2.1. Çözelti ve Kimyasallar.....	14
2.2. Cihaz Listesi	14
2.3. Deneysel Yöntem.....	15
3. SONUÇLAR	19
3.1. Metot Optimizasyonu	19
3.1.1. HPLC Enjeksiyonu Hacmi Belirlenmesi	19
3.1.2. Alıcı ortam seçimi	29
3.1.3. Alıcı ortamdaki çözünürlüğün tespiti (sink koşulu).....	34
3.1.4. Aparat seçimi.....	36
3.1.5. Membran seçimi ve doyurma süresi belirleme	39
3.1.6. Numuneleme miktarı belirleme çalışması.....	41
3.1.7. Alıcı ortam çalışma sıcaklığı belirleme.....	41
3.1.8. Numuneleme miktarı belirleme çalışması.....	42
3.1.9. Şırınga ucu filtre çalışması	43
3.1.10. Çalışma aralığı.....	46
3.1.11. Kesinlik Parametresi Sonuçları	46
3.1.12. Doğruluk çalışması.....	52
3.1.13. Sağlamlık sonuçları	52
3.1.14. Spesifiklik çalışması	53
3.1.15. LOQ- LOD belirleme ve nicelik sınırı	57
3.1.16. Sonuçların yorumlanması.....	57

ÖZET

BRINZOLAMİD İLAÇ ETKEN MADDESİNİN IN VİTRO SALIMI İNCELEMESİ İÇİN HPLC METODU OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU

Brinzolamid, karbonik anhidraz II'ye özel afinitesi olan bir sülfonamid ve karbonik anhidraz inhibitörüdür. Bu çalışmada, Brinzolamid içeren oftalmik formülasyonların in vitro salım profillerini belirlemek için geliştirilen HPLC yöntemi optimize edilmiş ve validasyonu tamamlanmıştır. Franz difüzyon hücresi ile yapılan deneyler, yöntemin yüksek tekrarlanabilirlik, doğruluk ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir.

Metodun geliştirilmesi sürecinde membran seçimi, alıcı ortamın bileşimi ve numuneleme parametreleri kritik değişkenler olarak değerlendirilmiştir. GH Polypro (Pall) membran ile düşük varyasyon katsayıları elde edilmiştir. pH 7,4 fosfat tamponu ve asetronitril (%70:30) alıcı ortam olarak seçilmiş ve sink koşulları sağlanmıştır.

ICH-Q2 (R1) ve USP-1225 kılavuzlarına uygun yapılan validasyon çalışmaları, geri kazanım oranlarının %98-102 aralığında olduğunu ve yöntem doğruluğunun yüksek olduğunu göstermiştir. Çalışma aralığı 0,0001-0,2 mg/mL olup doğrusallık sağlanmıştır ($R^2 > 0,9997$). LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,00003 mg/mL ve 0,0001 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları, yöntemin farklı analist, cihaz ve kolon koşullarında tutarlı sonuçlar verdiğini kanıtlamıştır. Geliştirilen yöntem, çevre dostu olup daha az kimyasal atık üretmektedir. Franz difüzyon hücresiyle uyumluluğu, farmasötik test standartlarına uygunluğunu desteklemektedir.

Önceki yöntemlere kıyasla, geliştirilmiş metodoloji ile 45 dakikada %80'in üzerinde ilaç salımı elde edilmiştir. Yöntemin kombinasyon ürünler ve diğer oftalmik aktif maddeler için de uyarlanabilir olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Brinzolamid, Franz Diffüzyon, HPLC, Validasyon, Optimizasyon

ABSTRACT

HPLC METHOD OPTIMIZATION AND VALIDATION FOR IN VITRO RELEASE INVESTIGATION OF BRINZOLAMIDE ACTIVE SUBSTANCE

Brimonidine is an alpha-2 adrenergic receptor agonist commonly used in ophthalmology to reduce elevated intraocular pressure. In this study, a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method was optimized and validated to determine the in vitro release profiles of ophthalmic formulations containing Brinzolamide. Experiments conducted using Franz diffusion cells demonstrated that the method possesses high repeatability, accuracy, and selectivity.

During the method development process, critical variables were identified, including membrane selection, composition of the receptor medium, and sampling parameters. Low coefficient of variation values were achieved using GH Polypro (Pall) membranes. Phosphate buffer at pH 7.4 and acetonitrile (70:30) were selected as the receptor medium, ensuring sink conditions were met.

Validation studies conducted in accordance with ICH-Q2 (R1) and USP-1225 guidelines indicated that the recovery rates ranged from 98% to 102%, demonstrating high method accuracy. The working range was established between 0.0001 and 0.2 mg/mL with linearity achieved ($R^2 > 0.9997$). The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated to be 0.00003 mg/mL and 0.0001 mg/mL, respectively.

Repeatability and intermediate precision studies provided evidence that the method yields consistent results across different analysts, instruments, and column conditions. The developed method is environmentally friendly, producing less chemical waste. Its compatibility with Franz diffusion cells supports its compliance with pharmaceutical testing standards.

Compared to previous methods, the improved methodology achieved over 80% drug release within 45 minutes. It is also believed that the method can be adapted for combination products and other ophthalmic active ingredients.

Key Words: Brinzolamide, Franz, Diffusion, HPLC, Validation, Optimization

SEMBOLLER

C	: Konsantrasyon
h:h	: Hacim: hacim
kg	: Kilogram
mOsm/kg	: Miliosmol/kilogram
Q	: Çözünme Miktarı
rpm	: Dakika başına dönüş sayısıdır (revolutions per minute)
mg	: miligram
°C	: Santigrat Derece

KISALTMALAR

CAS	: Chemical Abstract Services Numarası
GİB	: Göz İçi Basıncı
IVRT	: İn Vitro Salım Testi
KAI	: Karbonik Anhidraz İnhibitörleri
LOD	: Limit of Dedtection Belirleme Sınırı
LOQ	: Limit of Quantitation Ölçme Sınırı
MWCO	: Molecular weight cut off
RSD	: Bağlı Standart Sapma
SS	: Standart Sapma
SLF	: Simüle Lakrimal Sıvı (Simulated lacrimal fluid)
SLS	: Sodyum lauril sülfat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Brinzolamid İlaç Aktif Maddesinin 2D Yapısı.....	1
Şekil 1.2 Dikey Difüzyon Hücresi Temsili Çizimi.....	3
Şekil 1.3 Çalışmalarımızda Kullanılan Franz Difüzyon Cihazı.....	4
Şekil 1.4 Franz Difüzyon Hücresi.....	4
Şekil 3.1 Enjeksiyon hacmi grafiği (10 µL).....	23
Şekil 3.2 Enjeksiyon hacmi grafiği (20 µL).....	25
Şekil 3.3 Enjeksiyon hacmi grafiği (30 µL).....	28
Şekil 3.4 Brinzolamid'in oftalmik emülsiyon'dan GH Polypro (Pall) 0.45 µm yoluyla farklı ortamlara salım hızı karşılaştırma grafiği.....	34
Şekil 3.5 Float A Lyzer G2 Dialysis Device.....	37
Şekil 3.6 Zamanla çözünme hızı değişimi grafiği.....	42
Şekil 3.7 Seçilen örnekleme noktalarına ait çözünme hızı grafiği.....	43
Şekil 3.8 Franz diffüzyon tekrarlanabilirlik çalışması grafiği.....	48
Şekil 3.9 Franz diffüzyon ara kesinlik çalışması grafiği.....	50
Şekil 3.10 Brinzolamid standart kromatogramı.....	54
Şekil 3.11 Azarga numune kromatogramı.....	55
Şekil 3.12 Azopt numune kromatogramı.....	56
Şekil 3.13 Simbrinza numune kromatogramı.....	57

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan reaktiflerin listesi.....	14
Tablo 2.2: Standart maddeler ve ilaçlar tablosu.....	14
Tablo 2.3. Kullanılan cihazların listesi.....	14
Tablo 3.1. Enjeksiyon hacmi için analiz programı.....	20
Tablo 3.2. Enjeksiyon hacmi tablosu (%0,1 ile %1 arası ve 10 µL).....	21
Tablo 3.3 Enjeksiyon hacmi tablosu (%5 ile %10 arası ve 10 µL).....	21
Tablo 3.4 Enjeksiyon hacmi tablosu (%20 ile %40 arası ve 10 µL).....	22
Tablo 3.5 Enjeksiyon hacmi tablosu (%60 ile %100 arası ve 10 µL).....	22
Tablo 3.6 Enjeksiyon hacmi tablosu (%200 ve 10 µL).....	22
Tablo 3.7 Enjeksiyon hacmi tablosu (%0,1 ile %1 arası ve 20 µL).....	23
Tablo 3.8 Enjeksiyon hacmi tablosu (%5 ile %10 arası ve 20 µL).....	24
Tablo 3.9 Enjeksiyon hacmi tablosu (%20 ile %40 arası ve 20 µL).....	24
Tablo 3.10 Enjeksiyon hacmi tablosu (%60 ile %100 arası ve 20 µL).....	25
Tablo 3.11 Enjeksiyon hacmi tablosu (%200 ve 20 µL).....	25
Tablo 3.12 Enjeksiyon hacmi tablosu (%0,1 ile %1 arası ve 30 µL).....	26
Tablo 3.13 Enjeksiyon hacmi tablosu (%5 ile %10 arası ve 30 µL).....	26
Tablo 3.14 Enjeksiyon hacmi tablosu (%20 ile %40 arası ve 30 µL).....	27
Tablo 3.15 Enjeksiyon hacmi tablosu (%60 ile %100 arası ve 30 µL).....	27
Tablo 3.16 Enjeksiyon hacmi tablosu (%200 ve 30 µL).....	28
Tablo 3.17 Brinzolamid'in pH: 7.4 fosfat tamponu ortamında % salım hızı sonuçları..	30
Tablo 3.18 Brinzolamid'in % salım hızına yüzey aktif madde oranlarının etkisi.....	31
Tablo 3.19 Brinzolamid'in pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: asetonitril 70:30 (h/h) ortamında % salım hızı sonuçları.....	32
Tablo 3.20 Brinzolamid'in pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: etanol 70:30 (h/h) ortamında % salım hızı sonuçları.....	32
Tablo 3.21 Brinzolamid'in pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: metanol 70:30 (h/h) ortamında % salım hızı sonuçları.....	33
Tablo 3.22 Alıcı ortam seçimi çalışması sonuçları özet tablo.....	33
Tablo 3.23 Brinzolamid'in alıcı ortamdaki çözünürlüğünün tespiti için enjeksiyon prosedürü.....	35

Tablo 3.24	Alıcı ortamda Brinzolamid sink çalışması sonuçları.....	35
Tablo 3.25	Çalışma süresince alıcı ortamın pH değerleri.....	36
Tablo 3.26	Aparat deneme sonuçları.....	38
Tablo 3.27	Membran seçimi sonuçları.....	39
Tablo 3.28	Membran seçimi sonuçları (devamı).....	40
Tablo 3.29	Membran seçimi özet tablo.....	40
Tablo 3.30	Numune hacmi belirleme çalışması sonuçları.....	41
Tablo 3.31	Alıcı ortam sıcaklığının franz difüzyon % salım sonuçlarına etkisi.....	41
Tablo 3.32	Örnekleme noktası belirlenmesi.....	42
Tablo 3.33	İlaç kalite kontrol testlerinde kullanılan çeşitli mikro gözenekli membranların temel özellikleri.....	9
Tablo 3.34	Enjektör ucu cam filtre geçimlilik çalışması sonuçları.....	44
Tablo 3.35	Enjektör ucu naylon filtre geçimlilik çalışması sonuçları.....	44
Tablo 3.36	Enjektör ucu PVDF poliviniliden florür filtre geçimlilik çalışması sonuçları.....	45
Tablo 3.37	Enjektör ucu selüloz asetat filtre geçimlilik çalışması sonuçları.....	45
Tablo 3.38	Enjektör ucu RC rejenere selüloz filtre geçimlilik çalışması sonuçları.....	45
Tablo 3.39	Enjektör ucu selüloz miks filtre geçimlilik çalışması sonuçları.....	45
Tablo 3.40	Enjektör ucu pes filtre geçimlilik çalışması sonuçları.....	45
Tablo 3.41	Çalışma sınırları sonuçları.....	46
Tablo 3.42	Sistemin Kesinliği Sonuçları.....	46
Tablo 3.43	Azopt numunesi tekrarlanabilirlik sonuçları.....	47
Tablo 3.44	Azarga Numunesi Tekrarlanabilirlik Sonuçları.....	47
Tablo 3.45	Simbrinza numunesi tekrarlanabilirlik sonuçları.....	47
Tablo 3.46	Franz diffüzyon tekrarlanabilirlik çalışması.....	48
Tablo 3.47	Azopt numunesi ara kesinlik sonuçları.....	49
Tablo 3.48	Azarga numunesi ara kesinlik sonuçları.....	49
Tablo 3.49	Simbrinza numunesi ara kesinlik sonuçları.....	49
Tablo 3.50	Franz diffüzyon ara kesinlik çalışması.....	50
Tablo 3.51	Azopt numunesinin sonuçlarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 3.52	Azarga numunesinin sonuçlarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 3.53	Simbrinza numunesinin sonuçlarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 3.54	Doğruluk çalışması sonuçları.....	52

Tablo 3.55 Sağamlık çalışması sonuçları mobil faz pH değişimi.....	52
Tablo 3.56 Sağamlık çalışması sonuçları akış hızı değişimi.....	52
Tablo 3.57 Sağamlık çalışması sonuçları kolon sıcaklığı değişimi.....	53
Tablo 3.58 Çözelti stabilitesi sonuçları.....	53
Tablo 3.59 Mobil faz stabilitesi sonuçları.....	53
Tablo 3.60 Diğer metotlar ile kıyaslama.....	64
Tablo 3.61 Diğer metotlar ile kıyaslama (devamı).....	65



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glokom ve oküler hipertansiyon, görme kaybının başlıca nedenlerinden biri olan yüksek göz içi basıncı ile karakterize edilmektedir. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan Brinzolamid, karbonik anhidraz inhibitörleri grubuna ait etkili bir ajan olup, özellikle sodyum ve bikarbonat iyonlarının taşınmasını inhibe ederek göz içi basıncını düşürmektedir. Literatürde, Brinzolamid'in farmakokinetik özellikleri ve klinik etkileri üzerine çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, in vitro salım özelliklerinin belirlenmesine yönelik validasyon çalışmaları sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, Brinzolamid içeren oftalmik formülasyonlar için Franz difüzyon hücreleri ile uyumlu, hassas ve çevreci bir HPLC metodunun geliştirilmesi ve validasyonudur. Ruhsatlandırılmış bitmiş ürünler, Brinzolamid ile birlikte başka etkin maddeler de içerebilir. Timolol Maleat ve Brimonidin Tartarat gibi etkin maddeler, Brinzolamid ile kombinasyon halinde formüle edilen ürünlerde yaygın olarak bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Brinzolamid içeren ilaçların, Franz difüzyon hücresi USP <1724> Model B kullanılarak sentetik membrandan diskriminatif bir şekilde geçişini incelemektir. Aynı zamanda, HPLC cihazıyla yeterli kromatografik ayırım sağlanarak, bu ilaçların doğru ve kesin bir şekilde analiz edilebilmesi için analitik bir metot geliştirilmesi, optimize edilmesi ve valide edilmesi hedeflenmiştir.

Franz difüzyon hücresinde metot geliştirirken; membran türünün belirlenmesi, alıcı ortamın seçilmesi, örnekleme miktarının belirlenmesi, salım gösterdiği dakikaların belirlenip profil oluşturulması ve salımın maksimuma geldiği dakikanın belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışma kapsamında bahsedilen bu parametreler belirlenecek ve optimizasyon aşamaları gerçekleştirilecektir. Bir HPLC metodu geliştirilirken ise öncelikle enjekte edilecek örnekleme miktarı ve analit konsantrasyonu, hareketli fazın bileşenlerinin oranları, pompanın akış hızı ve kolon fırının sıcaklığı belirlenerek optimizasyon işlemi yapılacaktır.

Geliştirilen Franz difüzyon ve HPLC yöntemlerinin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra validasyon işlemi yapılacaktır. Validasyon işlemi dahilinde; spesifiklik (seçicilik), kesinlik (sistem kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara-kesinlik), doğrusalılık, doğruluk, çalışma aralığı, sağlamlık, çözelti stabilitesi, belirleme (LOD) ve

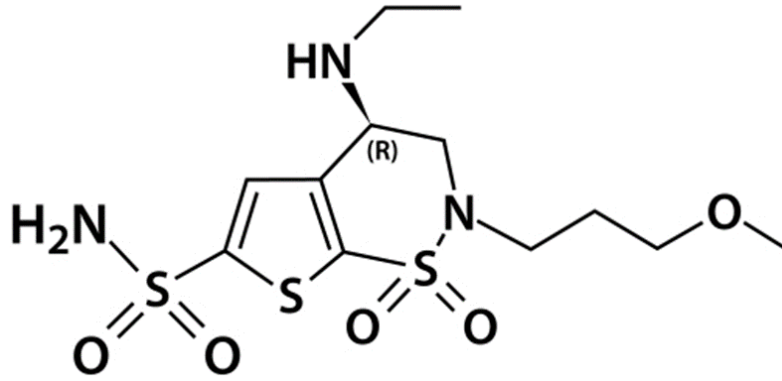
tain (LOQ) sınırı parametreleri çalışılacaktır.

Franz difüzyon metodunun yanı sıra Brinzolamid ilaç etken maddesinin kantitatif tayini için de literatürde çeşitli kromatografik analiz metotları bulunmaktadır. Çalışmamızda, literatürde geçen bu metotlardan daha kısa zamanda, daha hassas, daha doğru ve daha kesin bir analitik metot geliştirilmesi ve geliştirilen bu metodun validasyonunun başarıyla tamamlanması planlanmaktadır.

1.1. Brinzolamid İlaç Aktif Maddesi

Kimyasal İsmi: (R)-4-(Ethylamino)-3,4-dihydro-2-(3-methoxypropyl)-2H-thieno[3,2-e]-1,2-thiazine-6 sulfonamide 1,1-dioxide

Chemical Abstracts Services (CAS) Numarası: 138890-62-7



Şekil 1.1. Brinzolamid İlaç Aktif Maddesinin 2D Yapısı

Brinzolamid, göz içi basıncını (GİB) düşürmek amacıyla ticari olarak %1 oftalmik süspansiyon formunda sunulan, suda çözünürlüğü düşük bir beyaz tozdur. Etanol ve metanol gibi organik çözücülerde sınırlı çözünürlük gösterir. Brinzolamid ampirik formülü C₁₂H₂₁N₃O₅S₃'dür. Erime noktası yaklaşık 131°C'dir. Brinzolamid'in ticari olarak temin edilebilen müstahzarı, yaklaşık 7.5'lik bir pH ve 300 mOsm/kg ozmolaliteye sahip Azopt®'dur (Alcon Laboratories, Inc, Ft. Worth, Texas, ABD). Farmakolojik olarak brinzolamid, gözde aköz hümör oluşumunu baskılayabilen ve böylece GİB'yi azaltabilen oldukça spesifik, rekabetçi olmayan, geri dönüşümlü ve etkili bir karbonik anhidraz II (CA-II) inhibitörüdür. Brinzolamid, oküler hipertansiyonu ve birincil açık açılı glokomu tedavi etmek için piyasaya sürülmüştür. Bazı klinik çalışmalarda, brinzolamidin GİB'i yaklaşık %18 oranında azalttığı tahmin edilmektedir. Brinzolamid, beta-blokerlere ve prostaglandinlere eklenebilir. (Lester, 2008)

Karbonik anhidraz inhibitörleri (KAİ), oftalmolojide göz içi basıncını düşürmede

kullanılan en etkili ajanlar arasında yer alır. KAI'nin iki formu bulunmaktadır. Sistemik bir form olan asetozolamid, 1954 yılından bu yana kullanılmaktadır. Topikal KAI'lerden biri olan brinzolamid, 1998 yılından bu yana oftalmolojide kullanılmaktadır. Brinzolamid gibi topikal KAI'lerin en büyük avantajı, oral ajanların neden olduğu sistemik yan etkilerin belirgin şekilde azalmasıdır. Ancak, bazı hastalarda ciddi yan etkiler ortaya çıkabilir. Bu etken maddeyi içeren ilaçların hasta kullanımında tedaviye tam olarak cevap verebilmesi yalnızca doğru bir formülasyonun oluşturulması ve laboratuvar teknikleri ile doğrulanabiliyor olmasına bağlıdır. (DOĞANAY, 2007)

1.2. Franz Diffüzyon İçin Analitik Çalışmalar

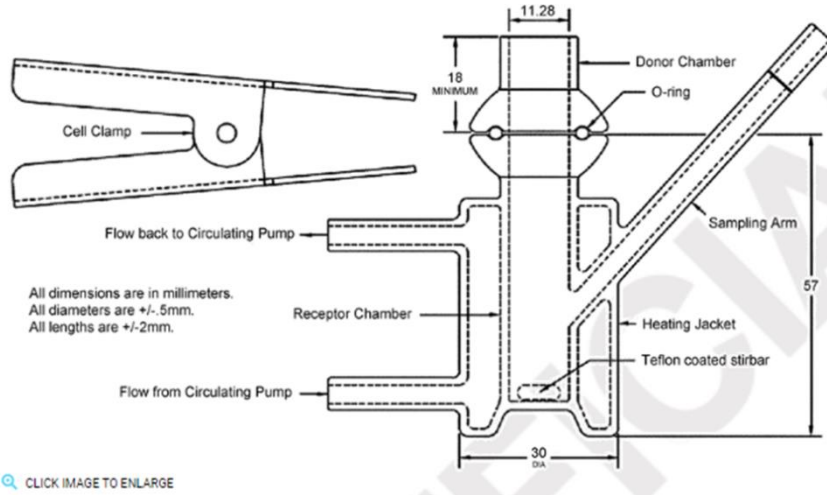


Figure 2. Vertical diffusion cell-Model B (All dimensions are in mm. All diameters are ± 0.5 mm. All lengths are ± 2 mm).

Şekil 1.2. Dikey Difüzyon Hücresi Temsili Çizimi (USP Monograph)



Şekil 1.3. Çalışmalarımızda Kullanılan Franz Difüzyon Cihazı



Şekil 1.4. Franz Difüzyon Hücresi

Yıllar geçtikçe, in vitro Franz difüzyon deneyleri, transdermal ilaç uygulamasını araştırmak için en önemli yöntemlerden biri haline geldi. Ne yazık ki, bu tür testler genellikle zayıf tekrarlanabilirlikten muzdarip olan geçirgenlik verileri verir. Ayrıca bu özellik, sentetik membranlar bariyer olarak kullanıldığında sıklıkla ortaya çıkar, bu durumda biyolojik dokuyla ilişkili değişkenlik, toplam varyasyonun bir ürünü olarak ortadan kaldırılır. Fern ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın amacı, tam doğrulama protokolünün laboratuvarlarında bulunan özel yapım bir Franz difüzyon hücreleri dizisinin (GlaxoSmithKline, Harlow, BK) performansı üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Bu amaçla hidrofobik ilaç modeli olarak ibuprofen, bariyer olarak ise sentetik membranlar kullanılmıştır. Araştırılan parametreler arasında Franz hücre boyutları, karıştırma koşulları, membran tipi, membran işlemi, sıcaklık düzenlemesi ve numune alma sıklığı yer almaktadır. Bir jel formülasyonundan kararlı durum ibuprofen geçirgenliği için varyasyon katsayısı %25,7'den %5,3'e (n = 6) düşürüldüğünden doğrulamanın türetilmiş veri değişkenliğini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu nedenle, geliştirilmiş operatör eğitimi ile birlikte protokolün doğrulanması ve iyileştirilmesi, Franz hücre deneyinde tekrar üretilebilirliği büyük ölçüde artırabilir (Fern ve ark., 2010).

Graham ve arkadaşlarının 1990 yılında yaptığı bir çalışmada model bileşikler olarak kafein ve testosteron kullanan in vitro geçirgenlik çalışmaları için statik Franz difüzyon hücre sistemini doğrulamayı amaçladı. Yazarlar, farklı Franz hücreleri kullanarak deneyler yaptılar ve kafein ve testosteronun insan derisinden geçişini test ettiler. Franz hücre sisteminin bu tür çalışmalar için uygun olduğunu ve güvenilir sonuçlar verdiğini bulmuşlardır. Yazarlar, onaylanmış yöntemin gelecekte diğer ilaçların insan derisinden geçişini araştırmak için kullanılabileceği sonucuna vardı (Graham ve ark, 1990).

Orlu ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada, insan derisi kullanılarak yapılan in vitro geçirgenlik çalışmaları için Franz difüzyon hücre test koşullarının optimizasyonu tartışılır. Yazarlar, Franz hücreleri için en uygun sıcaklığı ve karıştırma hızını belirlemek için deneyler yaptılar. 32°C'lik bir sıcaklığın ve 100 rpm'lik karıştırma hızının bu çalışma için en uygun olduğunu buldular. Yazarlar ayrıca, membran kalınlığı ve reseptör bölmesi hacmi gibi diğer faktörlerin de sonuçları etkileyebileceğini belirtmişlerdir (Orlu ve ark., 2017).

Taha ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları bir çalışma ile, Franz difüzyon hücrelerinin kullanımı da dahil olmak üzere topikal formülasyonlar için in vitro salım çalışmalarının kapsamlı bir incelemesini sunarlar. Yazarlar, formülasyon kompozisyonu, membran tipi ve deneysel tasarım gibi in vitro salım çalışmalarının sonuçlarını etkileyebilecek çeşitli faktörleri tartışmaktadır. Ayrıca deneysel tasarım ve veri analizi için öneriler sunarlar. Yazarlar, Franz difüzyon hücrelerinin in vitro salım çalışmaları için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olduğunu ve topikal formülasyonların salım kinetikleri hakkında değerli bilgiler sağlayabileceğini belirtiyor (Taha vd., 2012).

Klein ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı araştırmaya göre dikey difüzyon hücresi kullanan in vitro salım testi (IVRT), bir topikal dozaj formunun performansını değerlendirmek ve ürünün fizikokimyasal özelliklerini daha iyi anlamak için köklü bir yöntemdir. Dikey difüzyon hücresi, yarı katı ürünlerden ilaç salımını ölçmek için en sık kullanılan alettir ve elli yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır; bununla birlikte, teknik genellikle yüksek değişkenlik ve yetersiz tekrarlanabilirlik nedeniyle engellenir. Çeşitli yöntem parametreleri, ilaç salımını ve salım profillerinin ilgili varyasyonunu etkiler. Bu çalışmanın amacı, dikey difüzyon hücresi aygıtının kritik parametrelerini ve onu kullanarak geliştirilen yöntemleri incelemek ve oldukça etkili dikey difüzyon hücresi yöntemlerini geliştirmek, doğrulamak ve uygulamak için iyi anlaşılması gereken potansiyel değişkenlik kaynaklarını vurgulamaktır (Klein ve ark., 2018).

Fern ve arkadaşları 2010 yılında Franz difüzyon hücresinde farklı membranlar ile çalışmalar yapmışlardır. Topikal formülasyon kalite değerlendirmesi için Franz difüzyon hücrelerinde kullanılan sentetik membranlar, ilaç difüzyonuna karşı en az direnci sağlamalıdır. Bu çalışmada ibuprofenin on üç zardan difüzyon hızı Franz difüzyon hücreleri kullanılarak belirlendi. Membran kalınlığı, gözenek boyutu ve MWCO'nun ilaç akışlarıyla korelasyonu da yapıldı. İlaç difüzyon sonuçları, gözenekli zarların yüksek akışlı (8–18 mg/cm²/sa) ve düşük akışlı (0,1–3 mg/cm²/sa) membranlar olarak kategorize edildiğini gösterdi. İlaç akışları membran parametreleri ile güçlü korelasyonlar göstermedi ($r^2 < 0.99$). Sentetik membranlar değişken ilaç akışları verebilir, bu nedenle araştırmacılar, formülasyon kalite değerlendirmesi için membran seçerken dikkatli olmalıdır (Fern ve ark., 2010).

Klein 2013 yılında yarı katı ilaç preparatlarının in vitro ilaç salımı üzerine bir çalışma yürütmüştür. Son yıllarda, dikey difüzyon hücresi, topikal dozaj formlarının ilaç

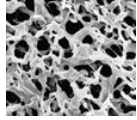
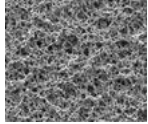
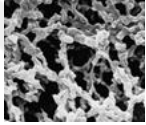
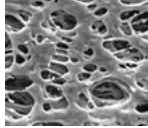
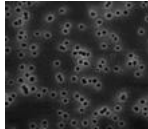
salımının test edilmesi için yararlı bir cihaz olarak ortaya çıkmıştır. Mevcut çalışmanın amacı, dikey bir difüzyon hücre düzeninde farklı test parametrelerinin kutanöz uygulama için yarı katı preparasyonlardan in vitro ilaç salımı üzerindeki etkisini incelemektir. Model bileşik olarak diklofenak seçilmiştir. Farklı test parametresi ayarlarıyla elde edilen sonuçlar, hem ilaç özelliklerinin hem de enstrümental ayrıntıların, dikey difüzyon hücresi ile in vitro difüzyon/ilaç salım çalışmalarının sonucu üzerinde büyük bir etkiye sahip olabileceğini açıkça göstermektedir. Bu nedenle, yeterli test parametrelerinin seçimi, serbest bırakma deneylerinin başarısı için çok önemlidir ve mevcut çalışmada gösterildiği gibi, optimum test parametrelerinin/koşullarının oluşturulması ve vaka bazında bir vaka incelemesinde doğrulanması gerekir (Klein ve ark., 2013).

Zsiko ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı araştırmada görülmüştür ki ilaç geliştirmede dermal ve transdermal ilaç tedavisinin önemi günümüzde giderek artmaktadır. Bu uygulama yolunun potansiyelinden tamamen yararlanmak için, ilaç salımı ve deri penetrasyon ölçümlerini optimize etmek gerekir. Bu gözden geçirme, ilaç geliştirmenin erken aşamasında farmasötik araştırma bilim adamları için destekleyici bir araç olarak ilaçların deriye penetrasyonunu in vitro değerlendirmeye yönelik en iyi bilinen ve en güncel yöntemleri kapsar. Bu makalenin amacı, dermal/transdermal araştırmalarda kullanılan çeşitli deneysel modelleri sunmak ve deri penetrasyonunu incelemek için mevcut olan başlıca in vitro yöntemler hakkındaki yeni bilgileri özetlemektir. Bu teknikler şunlardır: Difüzyon hücresi, cilt-PAMPA, bant sıyırma, iki fotonlu mikroskopi, konfokal lazer taramalı mikroskopi ve konfokal Raman mikroskobik yöntemi (Zsiko ve ark., 2019).

Li ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, Brinzolamid için oftalmik bir dağıtım sistemi olarak lipozomların yerel glokomtamaatöz terapötik etkiyi artırma potansiyelini araştırmıştır. Brinzolamid lipozomları, 84.33 ± 2.02 nm'lik bir parçacık boyutu ve 98.32 ± 1.61 'lik bir yakalama verimliliği ile üretilmiştir. Brinzolamid lipozomları, başlangıçta ani salım ve ardından sürekli salım ile in vitro iki fazlı bir salım modeli göstermiştir. Brinzolamid lipozomları ayrıca beyaz Yeni Zelanda tavşanlarında görünür geçirgenlik katsayısında 6.2 kat artış ve ticari olarak temin edilebilen formülasyondan Brinzolamid Süspansiyonu daha uzun süreli ve etkili göz içi basıncı düşüşü göstermiştir (Lee ve ark., 2016).

PSD, oftalmik süspansiyonların kritik bir özelliğidir çünkü bu, yalnızca ilaç ürününün fiziksel stabilitesini (örneğin, tortulama eğilimi) değil, aynı zamanda in vivo biyoyararlanımını ve hasta uyumunu (örneğin, uygulama sonrası göz yüzeyinde tahriş) da etkiler (Sinko, 2013). Hali hazırda piyasada bulunan oftalmik süspansiyonların genellikle birkaç mikron (örneğin, 25 µm'den daha az) boyut aralığında parçacıklara sahip olduğu bildirilmiştir (Gibson, 2016; Uddin, 2017). Ancak, son çalışmalar nanosüspansiyonlarla ürün performansında potansiyel bir iyileşme olduğunu göstermektedir (Tuomela, 2014; Peters, 2019). Bu nedenle, daha geniş bir PSD aralığına sahip süspansiyonların kalite üzerindeki etkisini değerlendirmek ilgi çekicidir. İlaç çözünmesi, süspansiyonların bir diğer önemli özelliğidir ve göz ilaç ürünleri için test edilmesi özellikle zordur. Örneğin, oftalmik süspansiyonlar göz üzerine topikal olarak uygulandıktan sonra, çözünmenin muhtemelen "mükemmel bir çözücü" koşulu altında değil (örneğin, 30 µL süspansiyonun <7 µL gözyaşı ile karşılaştırılması) gerçekleşeceği düşünülmektedir. İkincisi, hızlı ön korneal temizlenme nedeniyle, çözünmenin göz yüzeyinde çok kısa bir süre içinde gerçekleşmesi beklenmektedir. Bu zorluklar göz önüne alındığında, genellikle oral ilaç ürünlerinin çözünmesini test etmek için uygun olan çoğu çözünme yönteminin, PSD'de farklılık gösteren çeşitli oftalmik süspansiyonlar arasında ayırım yapamayabileceği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, oftalmik süspansiyonların test edilmesi için uygun, hassas ve ayırmacı bir in vitro çözünme yöntemi geliştirmek oldukça önemlidir. (Vo ve ark., 2020).

Tablo 3.33 İlaç kalite kontrol testlerinde kullanılan çeşitli mikro gözenekli membranların temel özellikleri

Membran	Üretim Yöntemi	Avantajlar	Dezavantajlar	Gözenek Morfolojisi
Hidrofilik PTFE	Isı ve Genişleme	Sulu ve organik çözeltilerle uyumlu; Düşük ekstrakte edilebilir madde; Küçük molekül API'lerine düşük bağlanma	Düşükten ortaya kadar protein bağlanması	
Hidrofobik PTFE	Isı ve Genişleme	Geniş organik çözelti aralığı ile uyumlu	Çözünme testi için uygun değil	
Hidrofilik PVDF	Daldırma döküm	Sulu çözeltilerle uyumlu; Düşük ekstrakte edilebilir madde; Protein analitlerine çok düşük bağlanma	Organik çözücülerle sınırlı uyumluluk	
Naylon	Daldırma döküm	Sulu ve organik çözeltilerle uyumlu	Analitlere yüksek bağlanma; Düşük veya yüksek pH'ta hidrolize duyarlılık	
Polieter sülfon (PES)	Daldırma döküm	Sulu çözeltilerle uyumlu; Düşük protein bağlanma	Organik çözücülerle sınırlı uyumluluk	
Rejenere Selüloz	Daldırma döküm	Sulu çözeltilerle uyumlu; Düşük ekstrakte edilebilir madde; Düşük bağlanma	Organik çözücülerle sınırlı uyumluluk	
Karışık selüloz ester (MCE)	Hava dökümü	Sulu çözeltilerle uyumlu	Organik çözücülerle sınırlı uyumluluk; Yüksek protein bağlanması	
Polikarbonat	E ışıını bombardımanı ardından kimyasal aşındırma	Mutlak gözenek boyutuna sahip silindirik gözenekler; Mikroskop için uygun pürüzsüz/cam gibi yüzey	Düşük gözeneklilik; Düşük akış hızı; Sınırlı mekanik dayanıklılık	
Polipropilen	Eriyik döküm	Sulu ve organik çözeltilerle uyumlu; Düşük ekstrakte edilebilir madde	Düşükten ortaya kadar protein bağlanması	

Seçilen membran, test formülasyonu için inert bir tutma yüzeyi sağlamalıdır, bariyer oluşturmamalıdır. Seçilen membran, dozaj formundan "serbest kalan" aktif maddenin alıcı ortama kolayca yayılmasına izin vermelidir. Membran ve formülasyon arasında fiziksel veya kimyasal etkileşim olmadığını doğrulamak da önemlidir. Formülasyonda bulunan eksipiyenler membranın fiziksel bütünlüğünü etkileyebilir veya çoğu durumda aktif bileşen membrana bağlanabilir. Buna ek olarak, membran aktif madde ile girişime sebep olabilecek herhangi bir "süzülebilir" madde içermemelidir.



1.3. Metot Validasyonu ve Metot Optimizasyonu

1.3.1. Spesifiklik

Validasyon çalışmasında spesifiklik (seçicilik), analitin formülasyondaki diğer etken ve yardımcı maddelerden ayrılarak, doğru ve güvenilir bir şekilde tayin edilip edilemeyeceğini değerlendiren kritik bir parametredir. (ICH/Q2, 2024; USP/1225, 2017)

1.3.2. Doğrusallık

Analiz edilen maddenin derişimi ile HPLC cihazından elde edilen cevap arasındaki ilişkinin çalışma aralığı boyunca doğrusal olduğunun kanıtlandığı parametredir. Kantitasyon seviyesini içerek şekilde en az 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin cevaplarına karşı konsantrasyonlar kullanılarak çizilen grafik analiz edilerek, e im, kesme noktası ve korelasyon katsayısı verilir. (ICH/Q2, 2024; USP/1225, 2017)

1.3.3. Ölüm ve gözlem sınırı

1.3.3.1. Ölüm Sınırı

Kantitatif  l m yapılabilen en düşük konsantrasyon  l me sınırı LOQ (Limit of Quantitation) olarak belirlenir. Sinyal/gürültü oranının en az 10 olduğu konsantrasyon  l me sınırı olarak uygun noktadır. (ICH-Q2, 2024; USP-1225, 2017)

1.3.3.2. Gözlem Sınırı

Kantitatif  l m için yeterli olmasa da gözlem yapılabilen en düşük çalışma konsantrasyonu gözlenebilirlik sınırı LOD (Limit of Dedection) olarak belirlenir. Sinyal/gürültü oranının en az 3 olduğu konsantrasyon  l me sınırı olarak uygun noktadır. (ICH-Q2, 2024; USP-1225, 2017)

1.3.4. Doğruluk

Metodun doğruluğu teorik konsantrasyon değerlerinin deneysel sonuçlara yakınlığı ile  l l r. Farklı seviyelerde Brinzolamid içeren numune çözeltileri için teorik ve deneysel sonuçlar kullanılarak % geri kazanım hesaplaması yapılır. (ICH-Q2, 2024; USP-1225, 2017)

1.3.5. Çalışma aralığı

Uygulanan metot ile çalışılabilecek en alt ve en üst noktanın ispatlandığı validasyon parametresidir. (ICH-Q2, 2024; USP-1225, 2017)

1.3.6. Kesinlik

Kullanılan metot ile elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Kesinlik parametresi 3 başlıkta ele alınır:

- Sistemin kesinliği
- Sonuçların tekrarlanabilirliği
- Laboratuvar içi kesinlik (ara-kesinlik)

(ICH-Q2, 2024; USP-1225, 2017)

1.3.6.1. Sistemin kesinliği

Sistem kesinliği parametresinde kontrol edilen, kromatografik sistemin analize uygunluğunun gösterilmesidir. Standart çözeltisinin verileri incelenerek sistemin çalışmaya uygun olduğunun kanıtlanması amaçlanır.

1.3.6.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı anda, aynı koşullarda hazırlanmış numunelerin sonuçlarının birbirine yakınlığı ile ölçülür. Tekrarlanabilirlik parametresinde çözünme testleri için en fazla % 5,0 RSD (bağıl standart sapma) kabul edilebilir.

1.3.6.3. Ara kesinlik

Tekrarlanabilirlik çalışmasındaki numune hazırlıklarının farklı bir analist tarafından farklı kolon ve farklı cihaz kullanılarak tekrar edilmesi ile elde edilen sonuçların tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları ile arasındaki benzerliğin ölçüldüğü validasyon parametresidir. Analitik metodun, kişi veya kullanılan cihazdan bağımsız olarak çalıştığının ispatıdır. Çözünme çalışmaları için iki çalışma arasındaki farkın % 5,0'i geçmemesi beklenir.

1.3.7. Çözelti stabilitesi

Analizde kullanılan çözeltilerin bozulmadan çalışmaya uygun olarak kalabildiği sürenin tespiti için yapılan çalışmadır. Çözeltiler analitik sisteme taze hazırlandıklarında ve belirli zaman aralıklarında verilerek elde edilen pik alanları arasındaki fark hesaplanır. Farkın %2'yi geçmeden önceki son nokta çözelti stabilite süresi olarak belirlenir.

1.3.8. Sağlamlık

Metodun sağlamlığı, sistem parametrelerinde yapılan küçük değişikliklerin analitik performansa etkisini incelemek amacıyla çalışılmıştır. Bu bağlamda mobil fazın pH değeri, akış hızı, kolon sıcaklığı gibi parametreler değerlendirilmiştir. Çalışmamızda uygulayacağımız bazı metod parametresi değişiklikleri aşağıdaki gibidir;

- Mobil fazın akış hızının ayarlanması
- Mobil fazın pH değerinin değişimi
- Benzer özelliklerde ayrı bir kolonun kullanımı
- Kolon fırın sıcaklığının değiştirilmesi
- Franz difüzyon ortamının değiştirilmesi
- Franz difüzyon karıştırma hızının değiştirilmesi
- Franz difüzyon ortam sıcaklığının değiştirilmesi

(ICH-Q2, 2024; USP-1225, 2017)

1.3.9. Sistem uygunluk

Metodun her kullanımından önce sistemin analiz için uygun olup olmadığının kontrolü amacıyla dikkat edilmesi gereken noktaların belirlendiği parametredir. Eğer metod içeriyorsa sistem uygunluk çözeltisi veya standart çözeltisi kullanılarak sistem uygunluk kontrolü yapılır. Standart çözeltilerine ait pik alanları arasındaki kuyruklanma faktörü, rezolüsyon, % RSD, plaka sayısı ve benzeri parametreler kontrol edilir.

2. YÖNTEM VE MATERYALLER

2.1. Çözelti ve Kimyasallar

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan reaktiflerin listesi

Reaktif Adı	Markası
Asetonitril	JT Baker
Sodyum Klorür	Isolab
Disodyum Hidrojen Fosfat	Merck
Potasyum Klorür	Merck
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck
Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat	Merck
Sodyum Hidroksit	JT Baker
Sodyum Lauril Sülfat	Merck
Metanol	JT Baker

Tablo 2.2. Standart maddeler ve ilaçlar tablosu

İsim	Üretici
Brinzolamid Primer Standardı	USP
Azarga	Alcon
Symbrinza	Alcon
Azopt	Alcon

2.2. Cihaz Listesi

Tablo 2.3. Kullanılan cihazların listesi

İsim	Markası
Analitik Terazî	Mettler Toledo
Franz Diffüzyon	Hanson Research
HPLC	Shimadzu
Ph Metre	Mettler Toledo
Vorteks	Thermoscientific

2.3. Deneysel Yöntem

Kromatografik Şart

Kolon

Tip	: C18
Partikül Boyutu	: 5 µm
Uzunluk	: 100 mm
Çap	: 4,6 mm

Kolon Sıcaklığı : 30 °C

Numune Bölmesi Sıcaklığı: 25 °C

Dalgaboyu : 254 nm

Akış Hızı : 1,0 mL/dakika

Enjeksiyon Hacmi : 30 µL

Analiz Süresi : 7 dakika

Cihaz : HPLC Sistemi

Sistem : İzokratik Pompa, Kolon termostatu, Otomatik Gaz Giderici, UV veya PDA Dedektör, HPLC Yazılımı

Franz Difüzyon Şartları

Alıcı Ortamı : pH 7,4 Fosfat Tamponu : Metanol (70:30)

Sıcaklık : 37 °C ± 0.5

Hız (devir) : 600 rpm

Aparat : Hücre (20mL)

Difüzyon süresi : 45 dk

pH 7.4 Fosfat Tamponu Hazırlığı: 8,06 g Sodyum Klorür, 1,22 g Disodyum Hidrojen Fosfat ve 0,2 g Potasyum Klorür, 0,1956 g Potasyum Dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL Su (Milli-Q) çözülür ve karıştırılır.

Alıcı Ortam Hazırlığı: Hacimce 70:30 oranında pH 7,4 Fosfat Tamponu: Asetonitril karıştırılır (h/h).

Membran Hazırlığı:

GH Polypro membran (Pall) 0,45 µm gözenek çapı kullanılır. Membranlar Franz difüzyon hücrelerine yerleştirilmeden önce 1 saat süre ile alıcı ortam içinde ıslatılır.

Mobil Faz İçin Tampon Çözelti: 1 g Sodyum Asetat Trihidrat tartılıp 1000 mL suda

      . Asetik asit ile pH: 4,8'e ayarlanır. 0,45   filtreden s      .

Mobil Faz: 60:40 oranında tampon       : metanol (h/h) karıştırılır ve degaze edilir.

Sistem Uygunluk Parametreleri

- Standart         i için ardışık altı enjeksiyondan elde edilen bağıl standart sapma RSD $\leq$ % 2,0 olmalıdır.
- Kontrol standardından iki enjeksiyon yapılır. Standart         i ile uyumu % 98,0 - % 102,0 olmalıdır.
- Standart enjeksiyonundan elde edilen kromatogramda Brinzolamid piki için kuyruklanma fakt      en fazla 2,0 olmalıdır.
- Standart enjeksiyonundan elde edilen kromatogramda Brinzolamid piki için Teorik Plaka Sayısı 2000'den b       olmalıdır.

Standart Hazırlığı:

Yaklaşık 10,0 mg Brinzolamid tartılır ve 10 mL'lik hacme sahip balon jojeye içerisine aktarılır. Mobil faz ile         , 3 dakika sonike edilir. Bu         den 1,0 mL alınır ve 10 mL'lik hacme sahip balonjojeye aktarılır, alıcı ortamı ile balon jojenin hacmi tamamlanır ve iyice karıştırılır. Sisteme direkt enjekte edilir. ($C_{\text{Brinzolamid}} = 0,10 \text{ mg/mL}$).

Kontrol Standardı Hazırlığı:

Kontrol standardı, yukarıdaki çalışma standardı ile aynı olacak şeklinde hazırlanır.

($C_{\text{Brinzolamid}} = 0,10 \text{ mg/mL}$).

Numunelerin Hazırlığı:

  n Vitro için Numune Hazırlığı:

6 adet Franz hücresinin her birinin alıcı kısmına 20 mL alıcı ortamı transfer edilir ve $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'ye karıştırılarak ısıtılır. Çalışma boyunca karıştırma hızı 600 rpm'dir. Her bir hücrenin verici kısmına 1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş 0,45   m gözenek çaplı GH Polypro membran (Pall) membran yerleştirilir. Membran   zerine 0,2 mL Brinzolamid içeren g    damlası, süspansiyonu eklenir. Her bir analiz noktasında, mikropipet kullanarak Franz hücresinden 0,5 mL çekilir ve taze 0,5 mL alıcı ortamı eklenir. Çekilen numuneler direkt viallenir ve HPLC'de analizlenir.

Not: Analiz noktaları profil çalışması için, 5, 10, 20, 30, 45 dakikadır. Tek nokta çekim 45. dakikada yapılır.

      :

Brinzolamid için analitik metot validasyonu In Vitro salım tayini yöntemi için belirtilen

metot şartlarına uyulmalıdır. Kolonun ve sistemin şartlanması için mobil fazın kolondan yeterli süre geçirilmesi gereklidir.

İn vitro salım tayini için hazırlanan standart çözeltisinden 6 kez ve kontrol standart çözeltisi'nden 2 kez enjeksiyon yapılarak sistem uygunluk parametreleri kontrol edilir. İn vitro ilaç salım tayininde kullanılmak üzere 6 paralel numune çözeltisi hazırlığı yapılır; tek nokta çalışmaları için 45. Dakikada numune çekimi yapılır. Her bir numune çözeltisinden 1'er enjeksiyon yapılır.

Hesaplama

Tek Nokta Salım Hesaplama

$$\% \text{ Salım} : \frac{A_{\text{numune}}}{A_{\text{std}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{20}{V_{\text{numune}}} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L}$$

A_{numune} : Numune çözeltisindeki Brinzolamid pikinin alanı

A_{std} : Standart çözeltisindeki Brinzolamid pikinin alanı

W_{std} : Standart ait tartım (mg)

V_{numune} : Numune ait hacim (mL)

L : Etiket değeri (10 mg)

P : Brinzolamid standardının % aktivite değeri

İn Vitro Profili Salım Hesaplama

% Kümülatif Salım:

5.dakika

$$Q1(\%) = \frac{A_{5.\text{dk}}}{A_{\text{Std}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{\text{numune}}}$$

10.dakika

$$Q2(\%) = \left(\frac{A_{10.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}} \right) + \left(\frac{0,5}{20} \times Q1(\%) \right)$$

20.dakika

$$Q3(\%) = \left(\frac{A_{20.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}} \right) + \left(\frac{0,5}{20} \times (Q1(\%) + Q2(\%)) \right)$$

30.dakika

$$Q4(\%) = \left(\frac{A_{30.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}} \right) + \left(\frac{0,5}{20} \times (Q1(\%) + Q2(\%) + Q3(\%)) \right)$$

45.dakika

$$Q5(\%) = \left(\frac{A_{45.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{20} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}} \right) + \left(\frac{0,5}{20} \times (Q1(\%) + Q2(\%) + Q3(\%) + Q4(\%)) \right)$$

$A_{5,10,20,30,45}$ dakika : Numune çözeltisindeki Brinzolamid pikinin alanı

A_{Std} : Standart çözeltisindeki Brinzolamid pikinin alanı

W_{std} : Standart ait tartım (mg)

L : Etiket değeri (10 mg)

P : Brinzolamid standardının % aktivite değeri

V_{numune} : Numune ait hacim (mL)

3. SONUÇLAR

3.1. Metot Optimizasyonu

Brinzolamid ilaç etken maddesi % salım miktarı kantitatif tayini için geliştirilen analitik metodun optimizasyonu için filtre geçimlilik çalışması, çözünürlük çalışması, alıcı ortam seçimi çalışması, numuneleme miktarı belirleme çalışması, numuneleme zamanı seçimi çalışması, optimum akış hızı çalışması, optimum kolon sıcaklığı çalışması, enjeksiyon hacmi belirleme çalışması, membran seçimi çalışması, membran doyurma süresi belirleme çalışmaları yapılarak en uygun metot şartları belirlenmiştir.

3.1.1. HPLC Enjeksiyonu Hacmi Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Brinzolamid standardı çözeltileri, uygun enjeksiyon hacmini belirlemek için HPLC sisteminde analizlendi. Elde edilen pik alanlarına göre konsantrasyona karşı kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.

Brinzolamid çözeltisi hazırlanması

Yaklaşık 100,0 mg Brinzolamid hammaddesi tartılarak 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Mobil faz eklendi ve ultrasonik banyo içerisinde 3 dakika bekletilerek çözülmesi sağlandı. Çözündürülmesinin ardından, hacmine mobil faz kullanılarak seyreltildi. ($C_{\text{Brinzolamid}}$: 1,0 mg/mL)

1. Seviye: 0,5 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 5,0 mL alınmış ve 10 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

2. Seviye: 0,2 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 2,0 mL alınmış ve 10 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

3. Seviye: 0,1 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 1,0 mL alınmış ve 10 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

4. Seviye: 0,06 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 0,6 mL alınmış ve 10 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

5. Seviye: 0,04 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 0,4 mL alınmış ve 10 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

6. Seviye: 0,02 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 2,0 mL alınmış ve 100 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

7. Seviye: 0,01 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 1,0 mL alınmış ve 100 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

8. Seviye: 0,005 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 0,5 mL alınmış ve 100 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

9. Seviye: 0,001 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

Brinzolamid çözeltisinden 0,1 mL alınmış ve 100 mL'lik balon joje içerisine transfer edilerek, alıcı ortam ile hacmine seyreltilmiştir.

10. Seviye: 0,0001 mg/ 1 mL çözeltisinin hazırlanması

0,001 mg/ 1 mL çözeltisinden 1,0 mL alınmış ve 10 mL'ye alıcı ortam ile seyreltilmiştir. Hazırlanan çözeltiler Tablo 3.1.'de verilmiş olan enjeksiyon hacimlerinde HPLC'de analizlenmiştir.

Tablo 3.1 Enjeksiyon hacmi için analiz programı

Çözelti Konsantrasyonu (mg/mL)	Enjeksiyon Hacmi (µL)			Enjeksiyon Sayısı
0,5	10	20	30	6
0,2	10	20	30	6
0,1	10	20	30	6
0,06	10	20	30	6
0,04	10	20	30	6
0,02	10	20	30	6
0,01	10	20	30	6
0,005	10	20	30	6
0,001	10	20	30	6
0,0001	10	20	30	6

Tablo 3.2 Enjeksiyon hacmi tablosu (%0,1 ile %1 arası ve 10 µL)

	%0,1 0,0001 mg/mL		%1 0,001 mg/mL	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	1842	1,2	17586	1,2
2	1862	1,3	17668	1,1
3	1885	1,0	17143	1,2
4	1867	1,2	17270	1,2
5	1880	1,3	17570	1,2
6	1879	1,1	17618	1,2
Ortalama	1869	1,0	17476	1,2
SS	15,87	0,1	215,08	0,0
RSD	0,85	9,88	1,23	3,45

Tablo 3.3 Enjeksiyon hacmi tablosu (%5 ile %10 arası ve 10 µL)

	%5 0,005 mg/mL		%10 0,01 mg/mL	
	Alan(mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan(mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	86540	1,2	174988	1,2
2	87236	1,2	175160	1,2
3	86462	1,2	174755	1,2
4	86713	1,2	174955	1,2
5	86295	1,2	174960	1,2
6	86239	1,2	174070	1,2
Ortalama	86581	1	174815	1
SS	426,14	0,0	386,83	0,0
RSD	0,49	0,00	0,22	0,00

Tablo 3.4 Enjeksiyon hacmi tablosu (%20 ile %40 arası ve 10 µL)

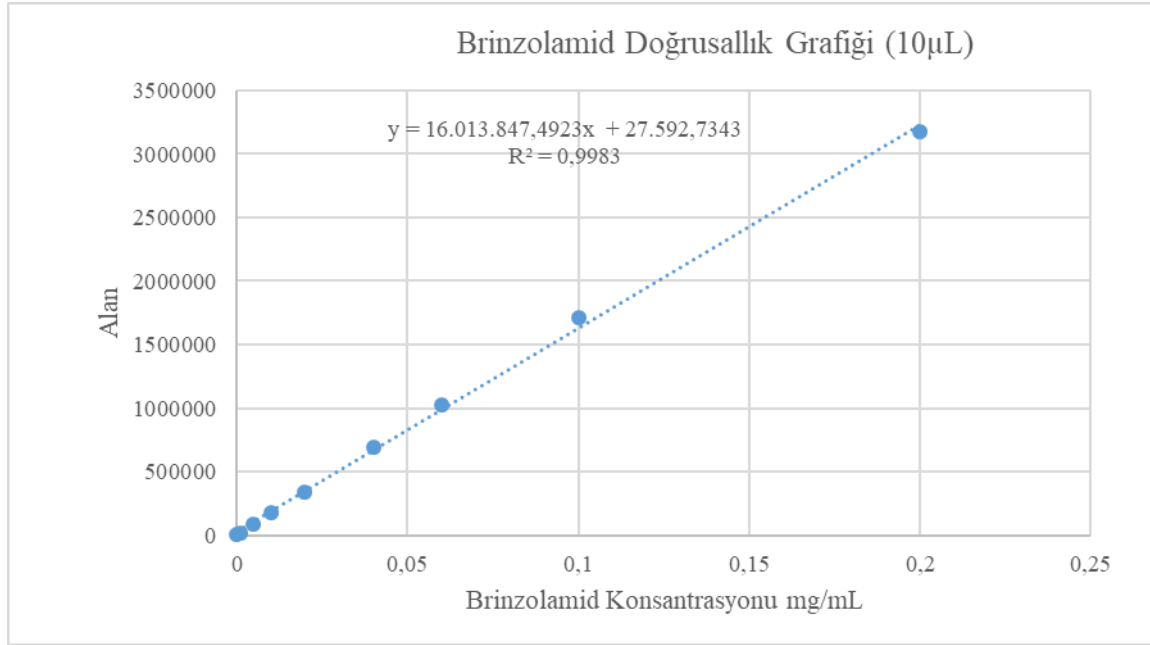
	%20 0,02 mg/mL		%40 0,04 mg/mL	
	Alan(mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan(mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	343071	1,2	692765	1,2
2	343956	1,2	693223	1,2
3	343429	1,2	692701	1,2
4	343899	1,2	692983	1,2
5	343231	1,2	692677	1,2
6	343863	1,2	692382	1,2
Ortalama	343575	1	692789	1
SS	381,25	0,0	284,71	0,0
RSD	0,11	0,00	0,04	0,00

Tablo 3.5 Enjeksiyon hacmi tablosu (%60 ile %100 arası ve 10 µL)

	%60 0,06 mg/mL		%100 0,1 mg/mL	
	Alan(mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan(mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	1029503	1,2	1712483	1,2
2	1029629	1,2	1713596	1,2
3	1028944	1,2	1712920	1,2
4	1028144	1,2	1714855	1,2
5	1027154	1,2	1713043	1,2
6	1027171	1,2	1714420	1,2
Ortalama	1028424	1	1713553	1
SS	1108,87	0,0	922,43	0,0
RSD	0,11	0,00	0,05	0,00

Tablo 3.6 Enjeksiyon hacmi tablosu (%200 ve 10 µL)

	%200 0,2 mg/m L	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	3171593	1,1
2	3170171	1,1
3	3172722	1,1
4	3174840	1,1
5	3174589	1,1
6	3173441	1,1
Ortalama	3172893	1
SS	1794,2	0,0
RSD	0,06	0,00



Şekil 3.1 Enjeksiyon hacmi grafiği (10 µL)

Tablo 3.7 Enjeksiyon hacmi tablosu (%0,1 ile %1 arası ve 20 µL)

	%0,1 0,0001 mg/mL		%1 0,001 mg/mL	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	3613	1,1	34977	1,2
2	3755	1,1	34992	1,2
3	3555	1,2	34942	1,2
4	3557	1,2	35118	1,2
5	3480	1,1	34791	1,2
6	3471	1,2	34747	1,2
Ortalama	3572	1,2	34928	1,2
SS	104,26	0,1	137,35	0,0
RSD	2,92	4,76	0,39	0,00

Tablo 3.8 Enjeksiyon hacmi tablosu (%5 ile %10 arası ve 20 µL)

	%5 0,005 mg/mL		%10 0,01 mg/mL	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	174323	1,2	350602	1,2
2	173539	1,2	350365	1,2
3	173438	1,2	349128	1,2
4	172684	1,2	349804	1,2
5	172950	1,2	348685	1,2
6	172633	1,2	348089	1,2
Ortalama	173261	1,2	349446	1,2
SS	641,95	0,0	982,93	0,0
RSD	0,37	0,00	0,28	0,00

Tablo 3.9 Enjeksiyon hacmi tablosu (%20 ile %40 arası ve 20 µL)

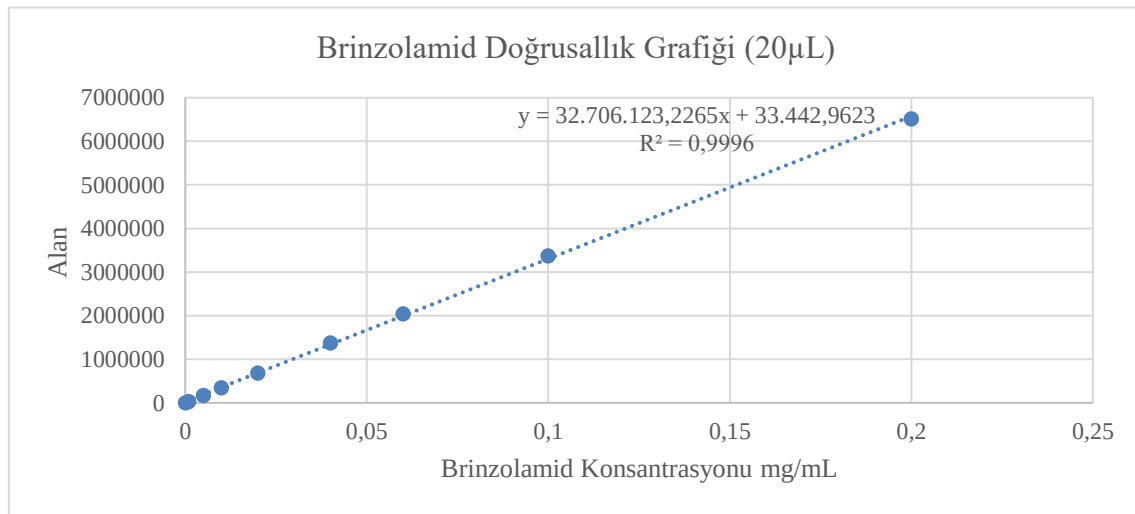
	%20 0,02 mg/mL		%40 0,04 mg/mL	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	687717	1,2	1381269	1,2
2	688680	1,2	1380490	1,2
3	687444	1,2	1378529	1,2
4	687405	1,2	1378674	1,2
5	687305	1,2	1378543	1,2
6	687111	1,2	1378002	1,2
Ortalama	687610	1,2	1379251	1,2
SS	560,0	0,0	1305,60	0,0
RSD	0,08	0,00	0,09	0,00

Tablo 3.10 Enjeksiyon hacmi tablosu (%60 ile %100 arası ve 20 µL)

	%60 0,06 mg/mL		%100 0,1 mg/mL	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	2043861	1,2	3385501	1,2
2	2042064	1,2	3383059	1,2
3	2041276	1,2	3376665	1,2
4	2043655	1,2	3372179	1,2
5	2042448	1,2	3366139	1,2
6	2038802	1,2	3365343	1,2
Ortalama	2042018	1,2	3374814	1,2
SS	1852,39	0,0	8455,97	0,0
RSD	0,09	0,00	0,25	0,00

Tablo 3.11 Enjeksiyon hacmi tablosu (%200 ve 20 µL)

	%200 0,2 mg/mL	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	6529516	1,2
2	6525925	1,1
3	6520375	1,1
4	6503292	1,1
5	6520347	1,1
6	6515908	1,1
Ortalama	6519227	1,1
Standart Sapma	9145,92	0,0
% RSD	0,14	3,66

**Şekil 3.2** Enjeksiyon hacmi grafiği (20 µL)

Tablo 3.12 Enjeksiyon hacmi tablosu (%0,1 ile %1 arası ve 30 µL)

	%0,1 0,0001 mg/mL		%1 0,001	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	5241	1,1	52644	1,2
2	5295	1,2	52608	1,2
3	5330	1,1	52593	1,2
4	5282	1,1	52433	1,2
5	5255	1,1	52522	1,2
6	5220	1,1	52565	1,2
Ortalama	5271	1,1	52561	1,2
SS	39,83	0,0	74,89	0,0
RSD	0,76	3,66	0,14	0,00

Tablo 3.13 Enjeksiyon hacmi tablosu (%5 ile %10 arası ve 30 µL)

	%5 0,005		%10 0,01	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	262477	1,2	538071	1,2
2	262335	1,2	538433	1,2
3	262164	1,2	538106	1,2
4	262188	1,2	537905	1,2
5	262245	1,2	537821	1,2
6	262202	1,2	538073	1,2
Ortalama	262269	1,2	538068	1,2
SS	118,5	0,0	210,8	0,0
RSD	0,05	0,00	0,04	0,00

Tablo 3.14 Enjeksiyon hacmi tablosu (%20 ile %40 arası ve 30 µL)

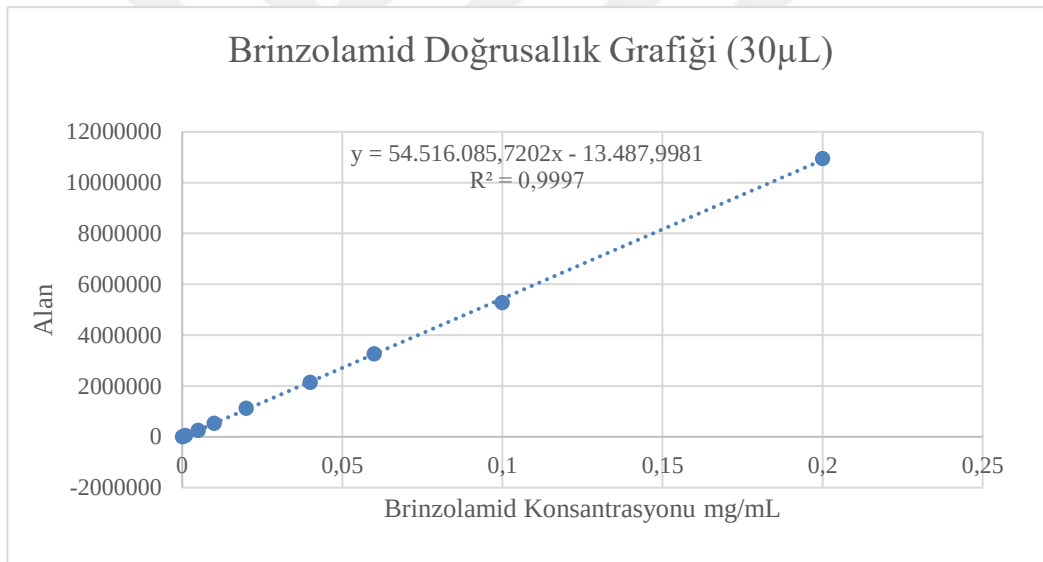
	% 20 0,02 mg/mL		%40 0,04 mg/mL	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	1127568	1,2	2146857	1,2
2	1127499	1,2	2147389	1,2
3	1127493	1,2	2146915	1,2
4	1127329	1,2	2146848	1,2
5	1126761	1,2	2146757	1,2
6	1126877	1,2	2146679	1,2
Ortalama	1127255	1,2	2146908	1,2
SS	348,3	0,0	250,1	0,0
RSD	0,03	0,00	0,01	0,00

Tablo 3.15 Enjeksiyon hacmi tablosu (%60 ile %100 arası ve 30 µL)

	%60 0,06 mg/mL		%100 0,1 mg/mL	
	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü	Alan (mAU)	Kuyruklanma Faktörü
1	3273188	1,2	5289224	1,2
2	3273590	1,2	5290128	1,2
3	3275396	1,2	5289461	1,2
4	3274449	1,2	5288607	1,2
5	3273657	1,2	5288256	1,2
6	3273952	1,2	5286396	1,2
Ortalama	3274039	1,2	5288679	1,2
SS	786,0	0,0	1296,5	0,0
RSD	0,02	0,00	0,02	0,00

Tablo 3.16 Enjeksiyon hacmi tablosu (%200 ve 30 µL)

	%200 0,2 mg/mL	Kuyruklanma Faktörü
Alan(mAU)		
1	10956822	1,2
2	10958636	1,2
3	10961086	1,2
4	10954860	1,2
5	10958077	1,2
6	10958673	1,2
Ortalama	10958026	1,2
SS	2079,9	0,0
RSD	0,02	0,00

**Şekil 3.3** Enjeksiyon hacmi grafiği (30 µL)

R^2 değerleri 10 µL, 20µL ve 30µL enjeksiyon hacimleri için birbirine yakın olmakla birlikte 30 µL çalışmasında en iyi R^2 değeri elde edilmiştir. Metotta kullanılmak üzere enjeksiyon hacmi olarak, profil çalışmalarında ilk dakikalardaki en düşük çözünürlükleri dahi iyi gözlemleyebilmek adına 30µL seçilmiştir.

3.1.2. Alıcı ortam seçimi

Birkaç farklı alıcı ortamda çalışmalar yapılarak en doğru ve uygun sonuç veren alıcı ortam seçildi.

- pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi
- pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi : % 0,5 SLS
- pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi : % 1 SLS
- pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi : Asetonitril
- pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi : Etanol
- pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi : Metanol

Membran hazırlığı:

GH Polypro membran (Pall) 0,45 µm gözenek çapı kullanılır. Membranlar Franz difüzyon hücrelere yerleştirilmeden önce 1 saat süre ile alıcı ortam içinde ıslatıldı.

Alıcı ortam hazırlıkları:

pH 7,4 fosfat tamponu hazırlığı: 8,06 g sodyum klorür, 1,22 g disodyum hidrojen fosfat ve 0,2 g potasyum klorür, 0,1956 g potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL Su (Milli-Q) çözüldü ve karıştırıldı.

1 Numaralı alıcı ortam hazırlığı: Alıcı ortam olarak sadece pH 7.4 fosfat tampon çözelti kullanıldı.

2 Numaralı alıcı ortam hazırlığı (%0,5 sodyum lauril sülfat (SLS) içeren pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi): 8,06 g sodyum klorür, 1,22 g disodyum hidrojen fosfat ve 0,2 g potasyum klorür, 0,1956 g potasyum dihidrojen fosfat ve 5 g sodyum lauril sülfat tartılarak 1000 mL Su (Milli-Q) çözüldü ve karıştırıldı.

3 Numaralı alıcı ortam hazırlığı (%1 SLS içeren pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi): 8,06 g sodyum klorür, 1,22 g disodyum hidrojen fosfat ve 0,2 g potasyum klorür, 0,1956 g potasyum dihidrojen fosfat ve 10 g sodyum lauril sülfat tartılarak 1000 mL Su (Milli-Q) çözüldü ve karıştırıldı.

4 Numaralı alıcı ortam hazırlığı: 70:30 oranında pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: Asetonitril (h/h) karıştırıldı.

5 Numaralı alıcı ortam hazırlığı: 70:30 oranında pH 7,4'e tamponlanmış fosfat

çözeltilisi: **Etanol** (h/h) karıştırıldı.

6 Numaralı alıcı ortam hazırlığı: 70:30 oranında pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltilisi: **Metanol** (h/h) karıştırıldı.

Standardın hazırlığı

Yaklaşık 10 mg Brinzolamid primer standart tartılarak 10 mL'lik hacme sahip balon joje içerisine aktarıldı. 5 mL çözücü eklenerek 3 dk ultrasonikte çözündürüldükten sonra hacmine çözücü ile seyreltildi. Hazırlanan çözeltilinin 1,0 mL'si 10 mL'lik hacme sahip balon joje içerisine aktarıldı ve hacmine çözünme ortamı ile seyreltildi. ($C_{\text{Brinzolamid}} = 0,1 \text{ mg/mL}$).

Numunelerin Hazırlığı

Brinzolamid % 0,05 oftalmik emülsiyon in vitro salım analizi numunesi hazırlanması

6 adet franz hücresinin her birinin alıcı kısmına 20 mL alıcı ortamı transfer edildi ve $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'ye karıştırılarak ısıtıldı. Her bir hücrenin verici kısmına $0,45 \mu\text{m}$ gözenek çapında GH Polypro (Pall) membran yerleştirildi. Verici membran üzerine $200,0 \mu\text{L}$ Brinzolamid %0,05 Oftalmik Emülsiyon eklendi. 45 dakika sonunda Franz hücrenin alıcı sıvısından (reseptör) şırınga kullanılarak numune çekildi.

Uygun alıcı ortam, belirli bir zaman periyodu içerisinde yeterli miktarda etken maddenin serbest bırakılmasına olanak tanınması açısından seçilmelidir. Brinzolamid %1 Oftalmik Süspansiyon formülasyonundan, pH 7,4 fosfat tamponu kullanılarak, Brinzolamid'in alıcı ortama geçiş hızı çalışılmıştır.

Tablo 3.17 Brinzolamid'in pH: 7,4 fosfat tamponu ortamında % salım hızı sonuçları

Süre	dk-5	dk-10	dk-20	dk-30	dk-45
1. Hücre	2,2	2,6	5,7	10,1	12,0
2. Hücre	2,6	2,9	4,8	9,4	16,0
3. Hücre	1,9	2,4	5,1	11,3	13,0
4. Hücre	2,0	3,6	5,4	9,7	14,1
5. Hücre	2,1	3,1	4,9	8,6	12,0
6. Hücre	2,6	3,2	5,2	9,4	11,3
Hücre	2,2	3,0	5,2	9,8	13,1
SS	0,30	0,43	0,33	0,90	1,74
% RSD	13,48	14,56	6,39	9,28	13,29

Brinzolamid'in çözünürlüğünün sulu ortamda çok az olduğu teyit edilmiş olup, çözünürlüğünü artırmak için ilk olarak yüzey aktif madde eklenmesi denenmiştir.

Tablo 3.18 Brinzolamid'in % salım hızına yüzey aktif madde oranlarının etkisi

Küvet	SLF pH 7,4 (%0,5 SLS)	SLF pH 7,4 (%1,0 SLS)
1	62,7	67,7
2	61,5	68,5
3	61,2	69,2
4	62,6	65,6
5	61,3	65,3
6	63,9	64,9
Ortalama	62,2	66,9
SS	1,06	1,82
% RSD	1,71	2,73

Farklı konsantrasyonlarda yüzey aktif madde kullanılarak Brinzolamid'in in vitro salımı sağlanamadığı için, Brinzolamid'in çözünürlüğünü arttırmak amacı ile alıcı ortama organik çözücü eklenmesi denenmiştir.

Tablo 3.19 Brinzolamid'in pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: asetonitril 70:30 (h/h) ortamında % salım hızı sonuçları

Süre	5 dakika	10 dakika	20 dakika	30 dakika	45 dakika
1. Küvet	37,7	64,1	68,9	77,5	89,1
2. Küvet	37,2	64,7	75,6	78,0	87,8
3. Küvet	45,8	69,3	79,6	86,4	90,9
4. Küvet	35,4	57,0	76,6	81,9	85,5
5. Küvet	29,9	48,3	67,0	75,4	84,2
6. Küvet	33,1	52,6	71,3	78,8	86,9
Ortalama	36,5	59,3	73,2	79,7	87,4
SS	5,37	8,03	4,87	3,95	2,42
% RSD	14,70	13,53	6,65	4,95	2,77

Tablo 3.20 Brinzolamid'in pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: etanol 70:30 (h/h) ortamında % salım hızı sonuçları

Süre	5 dakika	10 dakika	20 dakika	30 dakika	45 dakika
1. Küvet	12,1	14,2	16,4	20,3	31,5
2. Küvet	12,6	15,7	19,7	30,1	36,7
3. Küvet	11,1	13,2	15,4	22,3	32,5
4. Küvet	13,1	15,7	18,7	31,1	35,7
5. Küvet	14,1	14,2	14,4	25,3	32,5
6. Küvet	10,6	15,7	17,7	32,1	34,7
Ortalama	12,3	14,8	17,0	26,9	33,9
SS	1,29	1,08	2,02	4,93	2,05
% RSD	10,52	7,28	11,86	18,35	6,05

Tablo 3.21 Brinzolamid'in pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: metanol 70:30 (h/h) ortamında % salım hızı sonuçları

Süre	5 dakika	10 dakika	20 dakika	30 dakika	45 dakika
1. Küvet	13,1	12,2	20,2	28,6	36,6
2. Küvet	13,6	13,7	25,8	31,8	36,4
3. Küvet	12,1	13,2	20,8	24,3	38,2
4. Küvet	14,1	15,7	17,7	30,4	37,3
5. Küvet	12,1	14,2	21,8	25,3	35,3
6. Küvet	13,6	15,7	20,1	30,8	34,3
Ortalama	13,1	14,1	21,1	28,5	36,4
SS	0,84	1,40	2,68	3,09	1,38
% RSD	6,43	9,92	12,74	10,81	3,80

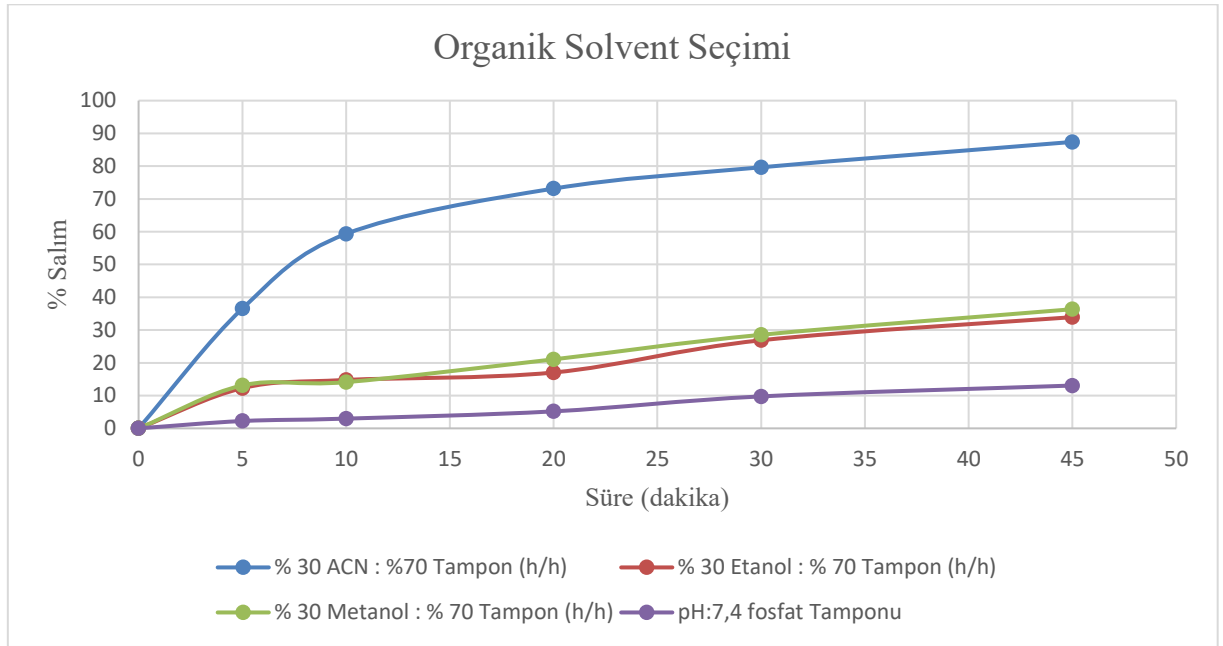
Tablo 3.22 Alıcı ortam seçimi çalışması sonuçları özet tablo

Süre (Dakika)	pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi % 100	pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: Asetonitril 70:30 (v:v)	pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: Etanol 70:30 (v:v)	pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: Metanol 70:30 (v:v)
0	0	0	0	0
5	2,2	36,5	12,3	13,1
10	3,0	59,3	14,8	14,1
20	5,2	73,2	17,0	21,1
30	9,8	79,7	26,9	28,5
45	13,1	87,4	33,9	36,4

- Brinzolamid'in asetonitril içeren tamponlu ortamdaki çözünürlüğü, yukarıda belirtilen gereklilikleri karşıladığı için,
- Ayrıca, % 30 asetonitril içeren fosfat pH 7,4 tamponu, formülasyondan membran yoluyla yeterli miktarda Brinzolamid'i geçirebildiği için,
- Erken salım gözlenebildiği ve geç salım değerlerinin %80'nin üzerinde bulunduğu için,

Alıcı ortamı olarak pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi : Asetonitril (70:30) (h:h)

seçilmiştir.



Şekil 3.4 Brinzolamid'in oftalmik emülsiyon'dan GH Polypro (Pall) 0,45 µm yoluyla farklı ortamlara salım hızı karşılaştırma grafiği

3.1.3. Alıcı ortamdaki çözünürlüğün tespiti (sink koşulu)

Bir çözünme prosedürünü geliştirirken amaç, doymuş bir ilaç maddesi çözeltisi oluşturmak için gereken hacmin en az üç katı bir hacme sahip olarak tanımlanan sink koşullarına sahip olmaktır. Sink koşulları mevcut olduğunda, çözünme sonuçlarının dozaj formunun özelliklerini yansıtması daha muhtemeldir.

20.0 mL'lik bir balon joje içerisine 10 mL alıcı ortamı (pH 7,4'e tamponlanmış fosfat çözeltisi: Asetonitril 70 : 30 h/h) eklendi. Brinzolamid hammaddesinden çökme görülene kadar eklendi. 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcılı su banyosuna konuldu, bekletildi. Belli aralıklarla vortekslendikten sonra bir miktar numune 0,45 µm filtreden süzülerek alındı, süzüntüden 75µL alınarak 25,0 mL'ye alıcı ortamı ile seyreltildi. Numune konsantrasyonunun sabit kaldığı noktaya kadar numune alma işlemlerine belirli aralıklarla devam edildi.

Tablo 3.23 Brinzolamid'in alıcı ortamdaki çözünürlüğünün tespiti için enjeksiyon prosedürü

Örnekleme Zamanı Noktası (dk)	Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
0.Saat	Standart 1	6
	Standart 2	2
	Numune 1	1
	Numune 2	1
3.Saat	Numune 1	1
	Numune 2	1
6.Saat	Numune 1	1
	Numune 2	1
72.Saat	Numune 1	1
	Numune 2	1

Çalışmalar sonunda elde edilen doygunluk konsantrasyonları aşağıda sunulan tablo ile verilmiştir.

Tablo 3.24 Alıcı ortamda Brinzolamid sink çalışması sonuçları

pH: 7,4 Fosfat Tamponu : Asetonitril (70:30) (h/h)	
Numuneleme zamanı	
3 Saat	10,11
6 Saat	10,28
72 Saat	10,30

Çalışma ürünümüz 1 mL'sinde 10 mg Brinzolamid etkin maddesi içermektedir. Sink koşulunun sağlanabilmesi için alıcı kompartımandaki çözünme ortamının, verici kompartımana uygulanan etkin maddenin en az 3 ila 10 katını çözebiliyor olması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan alıcı kompartıman 20 mL hacme sahiptir. Analiz yönteminde anlamlı sonuç elde edebilmek ve pozolojiye bağlı olarak yaklaşık 6 damlaya karşılık gelen ve 2 mg Brinzolamid içeren 200 µL'lik hacme sahip örneğin verici kompartımana yüklenmesine karar verilmiştir.

pH: 7,4 Fosfat Tamponu : Asetonitril (70:30) (h/h) kullanılarak yapılan çalışmada doygunluk konsantrasyonu 10,30 mg/mL olarak belirlenmiştir. Verici kompartımana yüklenen 200 µL ürün 2 mg Brinzolamid etkin maddesi içermektedir. Teorik olarak etkin maddenin tamamının alıcı kompartımana geçtiği düşünüldüğünde çözünme hızı ortamında 0,1 mg/mL'lik bir konsantrasyon oluşacaktır. Çalışma konsantrasyonumuz olan 0,1 mg/mL, doygunluk değeri olan 10,30 mg/mL'nin çok altında olduğundan

Çalışma konsantrasyonunun sink koşulunu sağladığı görülmüştür.

In vitro salımı alıcı ortamının pH değeri, formülasyonun pH'ı ve gözyaşının pH değeri göz önünde bulundurulduğunda 7,4 olarak belirlenmiştir. Ek olarak; Alıcı ortamın pH'ı in vitro salım çalışması süresince değişmemiştir.

Tablo 3.25 alışma süresince alıcı ortamın pH değerleri

	pH
IVRT başlangıcında	7,4
IVRT sonunda	7,4

3.1.4. Aparat seçimi

Apparat Denemesi 1

Aparat	: Beher
Alıcı Ortamı	: Fosfat Tamponu : Asetonitril (70:30) (h/h)
Sıcaklık	: 37 �C � 0.5
Hız	: 50 rpm
Difüzyon süresi	: 1 saat
Membran	: Float A Lyzer G2 Dialysis Device
Gözenek apı	: 3,5-5 kDa (MWCO)
Numune Hacmi	: 1 mL
Beher Hacmi	: 300 mL



Şekil 3.5 Float A Lyzer G2 Dialysis Device

Aparat Denemesi 1

1 adet beherin içerisine 300 mL alıcı ortam transfer edildi ve 200 rpm karıştırma hızında $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtıcı üzerine konularak ısıtılsı. Dış çevre koşullarından korunmak için beherin üstü kapakla kapatıldı.

Ayrı bir beherde Floating cell 10 dakika boyunca %10'luk asetonitril içerisinde, daha sonra 20 dakika su içerisinde bekletildi. Son olarak da 20 dakika alıcı ortam çözeltisi ile doyuruldu. Bir adet floating cell içerisine 1 mL numune eklendi ve kapağı kapatıldı. Floating cell $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılan beherin içerisine konuldu ve 45 dakika sonunda kapağı açılarak her bir floating cell'den 1,0 mL numune çekildi. Çekilen numuneler direk viallendi ve HPLC'de analizlendi.

Apparat Denemesi 2

Aparat: Franz Hücre (Franz Cell)

Alıcı Ortamı : Fosfat Tamponu : Asetonitril (70:30) (h/h)

Sıcaklık : 37 °C ± 0,5

Hız : 600 rpm

Difüzyon süresi : 45 dakika

Membran : GH Polypro (Pall)

Gözenek Çapı : 0,45 µm

Numune Hacmi : 200 µL

Hücre Hacmi : 20 mL

6 adet franz hücresinin her bir hücresine 20 mL alıcı ortam transfer edils ve 37°C±0,5 °C'ye karıştırılarak ısıtıldı. Her bir hücrenin verici kısmına 0,45 µm GH Polypro membran (Pall) membran yerleştirildi. Membran ile temasını sağlayacak kadar, hava kabarcığı kalmadan, alıcı ortam eklendi. Verici membran üzerine 200,0 µL Brinzolamid %1 Oftalmik süspansiyon yerleştirildi. 45 dakika sonunda Franz hücrenin alıcı sıvısından (reseptör) mikropipet kullanılarak 0,5 mL numune çekildi. Çekilen numuneler direk viallendi ve HPLC'de analizlendi.

Yöntem

İn vitro ilaç salım tayininde kullanılmak üzere yukarıda açıklanan şekillerde 1'er adet numune çözeltisi hazırlığı yapıldı. % salım hesaplandı.

Tablo 3.26 Aparat deneme sonuçları

	1	2	3	4	5	6
1. Aparat	23,5	21,3	25,6	22,7	21,5	23,8
2. Aparat	88,5	87,2	85,3	86,4	85,2	86,6

% 30 asetonitril içeren fosfat pH 7,4 tamponu, formülasyondan membran yoluyla yeterli miktarda Brinzolamid'i geçirebildiği için, erken salım gözlenebildiği ve geç salım değerlerinin %85'e yakın bulunduğu için, alıcı ortamı olarak pH: 7,4 Fosfat Tamponu: Asetonitril (70:30) (v:v) seçilmiştir.

3.1.5. Membran seçimi ve doyurma süresi belirleme

Çeşitli Membran filtreler ile çalışmalar yapılarak Brinzolamid salımına en uygun Membran filtre belirlenmiştir. Membranlar alıcı ortamda 1 saat boyunca doyurularak ve doyurulmadan çalışmalar yapılmıştır.

Tablo 3.27 Membran seçimi sonuçları

	Selüloz Asetat Membran 0,45µm		GH Polypro Membran 0,45 µm	
	Doyurulmadan	1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş	Doyurulmadan	1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş
1	57,6	73,8	64,8	88,5
2	52,4	85,7	61,6	87,2
3	48,6	79,9	74,3	85,3
4	55,3	78,0	65,4	86,4
5	45,8	71,1	69,6	85,2
6	47,3	82,0	73,9	86,6
Ortalama	51,2	78,2	66,9	86,5
Standart Sapma	4,7	5,3	6,60	1,3
% RSD	9,18	6,80	9,87	1,45

Tablo 3.28 Membran seçimi sonuçları (devamı)

	Type Hulb Membran 0,45µm		Glass Mikrofiber Membran 0,45 µm	
	Doyurulmadan	1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş	Doyurulmadan	1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş
1	12,6	21,8	11,8	23,5
2	15,2	25,5	10,4	34,6
3	11,9	19,8	12,3	30,1
4	13,4	27,1	13,9	26,7
5	12,8	20,4	10,7	31,6
6	11,7	23,4	11,4	33,1
Ortalama	12,9	23,0	11,8	29,9
Standart Sapma	1,3	2,9	1,3	4,2
% RSD	9,82	12,62	10,75	13,95

Tablo 3.29 Membran seçimi özet tablo

Membran No	Membran Tipi	Gözenek Çapı	Alıcı Ortam ile Doyurma Süresi	Sonuçlar
1	Type Hulb Membran	0,45µm	Doyurulmadan 1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş	>% 85 oranında son nokta salım oranı görülmüdü. >% 85 oranında son nokta salım oranı görülmüdü.
2	Glass Mikrofiber Membran	0,45µm	Doyurulmadan 1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş	>% 85 oranında son nokta salım oranı görülmüdü. >% 85 oranında son nokta salım oranı görülmüdü.
3	Selüloz Asetat membran	0,45 µm	Doyurulmadan 1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş	>% 85 oranında son nokta salım oranı görülmüdü. >% 85 oranında son nokta salım oranı görülmüdü.
4	GH Polypro membran	0,45 µm	Doyurulmadan 1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş	>% 85 oranında son nokta salım oranı görülmüdü. 45 dakikada >% 85 oranında salım görüldü

GH polypro Membran ile 1 saat doyurularak yapılan çalışmada en uygun sonuçlar gözlenmiştir.

3.1.6. Numuneleme miktarı belirleme çalışması

Aynı şartlarda farklı miktarlarda numune kullanılarak çalışmalar yapılmış,

Tablo 3.30 Numune hacmi belirleme çalışması sonuçları

	Numune Hacmi		
	50 µL	100 µL	200 µL
1	112,5	85,7	88,5
2	112,3	85,6	87,2
3	98,7	79,6	85,3
4	112,5	79,7	86,4
5	98,7	83,5	85,2
6	98,5	79,7	86,6
Ortalama	105,5	82,3	86,53
Standart Sapma	7,574	2,991	1,3
% RSD	7,18	3,63	1,45

En düşük %RSD'ye sahip olduğundan ve %85'i geçen sonuçlar elde edildiğinden çalışma miktarı olarak 200 µL seçilmiştir.

3.1.7. Alıcı ortam çalışma sıcaklığı belirleme

34°C ve 37°C sıcaklıklarda çalışmalar yapılmıştır.

Tablo 3.31 Alıcı ortam sıcaklığının franz difüzyon % salım sonuçlarına etkisi

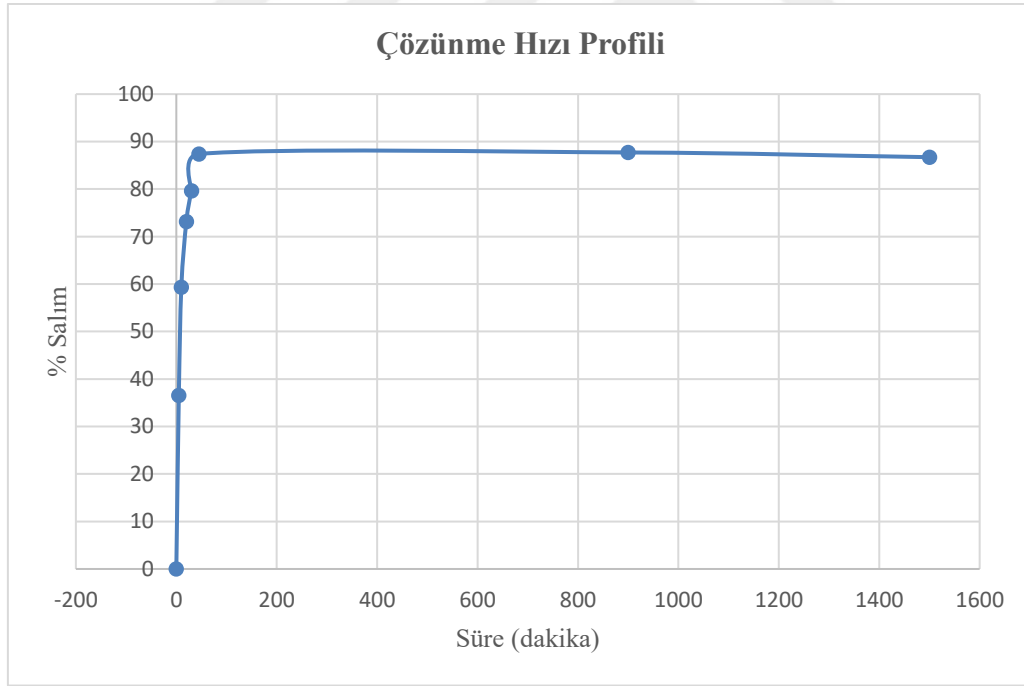
Örnekleme Zamanı	Sıcaklık	
	34°C	37°C
5 dakika	15,5	36,5
10 dakika	38,9	59,3
20 dakika	52,0	73,2
30 dakika	59,0	79,7
45 dakika	70,0	87,4

3.1.8. Numuneleme miktarı belirleme çalışması

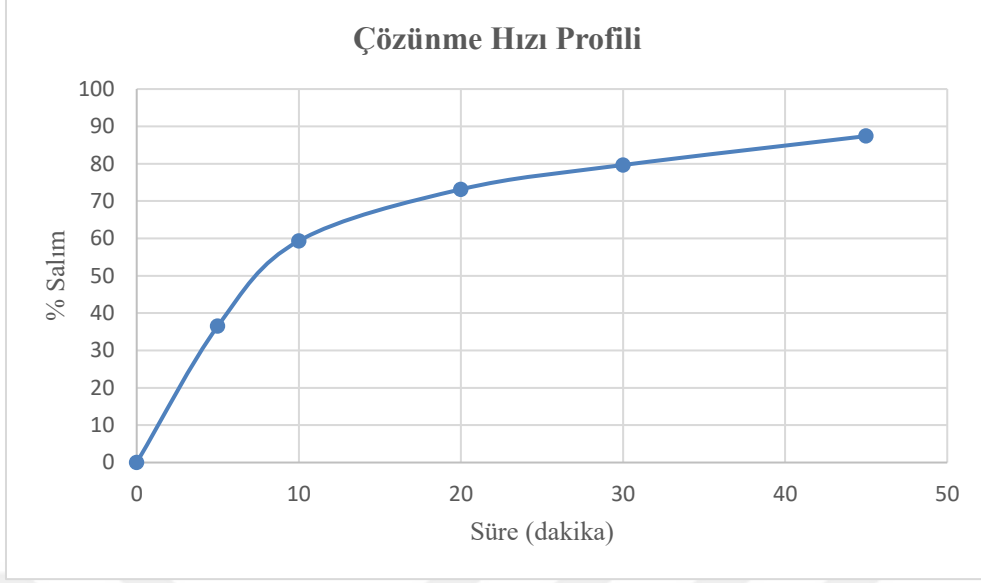
Örnekleme noktası, Brinzolamid'in erken aşamadaki salım değerlerine ve salımın belirgin artış göstermeyi bıraktığı noktada bir platoya ulaşmasına bağlı olarak seçildi.

Tablo 3.32 Örnekleme noktası belirlenmesi

Örnekleme Zamanı	Brinzolamid% 0.05 Oftalmik Emülsiyon
5 dakika	36,5
10 dakika	59,3
20 dakika	73,2
30 dakika	79,7
45 dakika	87,4
15 saat	87,7
25 saat	86,7



Şekil 3.6 Zamanla çözünme hızı değişimi grafiği



Şekil 3.7 Seçilen örnekleme noktalarına ait çözünme hızı grafiği

3.1.9. Şırınga ucu filtre çalışması

Filtrasyon, ilaç çözünme testinde kritik öneme sahiptir çünkü filtrasyon çözünme sürecini durdurur ve çözünmüş ve çözünmemiş bileşenlerin ayrılması yoluyla doğru kantifikasyona olanak tanır.

Test edilen membran filtrelerinin ticari olarak temin edilebilen filtre kartuşları ile bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Brinzolamid'in standart çözeltileri aşağıdaki tabloda belirtilen membran filtrelerden geçirilmiş olup, "süzülmüş" olan Standart çözeltiler Brinzolamid'in geri kazanımını belirlemek için analiz edilmiştir.

Hazırlanan standart çözeltisi ve 45 dakika sonunda Franz Hücreden alınan numuneler 0.45 µm filtrelerden süzülerek ve de süzülmeden direk olarak HPLC sistemine verilmiştir. Sonuçlar, Tablo 3.33 - Tablo 3.39'da sunulmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde cam ve PES filtrelerde tutunma olduğu gözlenmiştir. In vitro salım standart ve numunelerinin hem filtrelenenmeden hem de 3 mL çözelti ile doyurulduktan sonra PVDF, selüloz asetat, RC rejenere slüloz ve selüloz miks filtreler kullanılarak hazırlanmasının uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 3.34 Enjektör ucu cam filtre geçimlilik çalışması sonuçları

Çözelti Adı	Filtrelenmemiş	1 mL ile doyurulmuş	2 mL ile doyurulmuş	3 mL ile doyurulmuş
Standart	100,2	101,7	100,4	100,3
Numune	87,9	77,0	77,0	77,0

Tablo 3.35 Enjektör ucu naylon filtre geçimlilik çalışması sonuçları

Çözelti Adı	Filtrelenmemiş	1 mL ile doyurulmuş	2 mL ile doyurulmuş	3 mL ile doyurulmuş
Standart	100,2	100,2	100,4	100,4
Numune	87,9	80,0	85,0	87,4

Tablo 3.36 Enjektör ucu pvdf poliviniliden florür filtre geçimlilik çalışması sonuçları

Çözelti Adı	Filtrelenmemiş	1 mL ile doyurulmuş	2 mL ile doyurulmuş	3 mL ile doyurulmuş
Standart	100,2	100,2	100,3	100,1
Numune	87,9	83,2	87,5	87,8

Tablo 3.37 Enjektör ucu selüloz asetat filtre geçimlilik çalışması sonuçları

Çözelti Adı	Filtrelenmemiş	1 mL ile doyurulmuş	2 mL ile doyurulmuş	3 ml ile doyurulmuş
Standart	100,2	100,1	100,2	100,4
Numune	87,9	87,3	87,7	87,8

Tablo 3.38 Enjektör ucu RC rejenere selüloz filtre geçimlilik çalışması sonuçları

Çözelti Adı	Filtrelenmemiş	1 mL ile doyurulmuş	2 mL ile doyurulmuş	3 mL ile doyurulmuş
Standart	100,2	100,1	100,3	100,2
Numune	87,9	87,5	87,8	87,9

Tablo 3.39 Enjektör ucu selüloz miks filtre geçimlilik çalışması sonuçları

Çözelti Adı	Filtrelenmemiş	1 mL ile doyurulmuş	2 mL ile doyurulmuş	3 mL ile doyurulmuş
Standart	100,2	100,6	100,6	100,0
Numune	87,9	87,5	87,5	87,6

Tablo 3.40 Enjektör ucu pes filtre geçimlilik çalışması sonuçları

Çözelti Adı	Filtrelenmemiş	1 mL ile doyurulmuş	2 mL ile doyurulmuş	3 mL ile doyurulmuş
Standart	100,2	100,3	100,1	100,2
Numune	87,9	83,6	84,4	84,8

3.1.10. Çalışma aralığı

Analitik metodun ölçüm yapabildiği en düşük (LOQ) ile en yüksek derişim aralığı çalışma aralığı olarak tanımlanır. Doğrusallık çalışması, minimum ve maksimum derişimlerde çözeltiiler kullanılarak test edilir. Güvenilir metotta, minumum derişimden temin edilen % RSD en fazla %10 ve en yüksek derişimden temin edilen % RSD en fazla %2 olması gerekmektedir. Yapılan incelemeler sonucunda çalışma aralığı, minumum derişimi olan 0,0001 mg/mL ile maksimum derişimi olan 0,2 mg/mL arasında olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.41 Çalışma sınırları sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Brinzolamid Pik Alanı (mAU)	
	0,0001 mg/mL Brinzolamid	0,2 mg/mL Brinzolamid
1	5241	10956822
2	5295	10958636
3	5330	10961086
4	5282	10954860
5	5255	10958077
6	5220	10958673
Ortalama	5271	10958026
Standart Sapma	39,83	2079,9
% RSD	0,76	0,02

3.1.11. Kesinlik Parametresi Sonuçları

Tablo 3.42 Sistemin Kesinliği Sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Alan (mAU)
1	5015545
2	5017284
3	5014015
4	5020202
5	5019066
6	5014384
Ortalama Alan	5016749
SD	2533,60
RSD	0,05
Kuyruklanma	1,2
Plaka Sayısı	1786
Standart Uyumu	%99,8

Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Analitik Metot Kesinlik Çalışması

Tablo 3.43 Azopt numunesi tekrarlanabilirlik sonuçları

Numune Sayısı	Azopt % Brinzolamid
1	99,8
2	99,9
3	99,6
4	99,8
5	99,7
6	99,3
Ortalama	99,7
SD	0,19
RSD	0,19

Tablo 3.44 Azarga numunesi tekrarlanabilirlik sonuçları

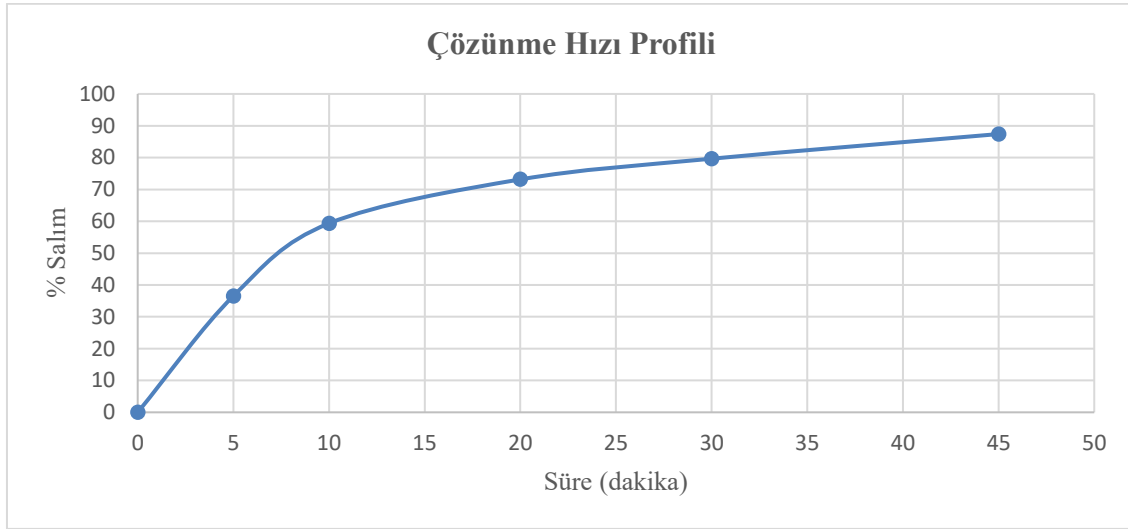
Numune Sayısı	Azarga % Brinzolamid
1	100,0
2	100,1
3	99,9
4	100,0
5	100,0
6	99,9
Ortalama	100,0
SS	0,08
RSD	0,08

Tablo 3.45 Simbrinza numunesi tekrarlanabilirlik sonuçları

Numune Sayısı	Simbrinza % Brinzolamid
1	99,9
2	100,0
3	99,8
4	99,9
5	99,8
6	100,0
Ortalama	99,9
SS	0,08
RSD	0,08

Tablo 3.46 Franz diffüzyon tekrarlanabilirlik çalışması

Küvet Sayısı	% Brinzolamid Salımı				
	5. Dakika	10.Dakika	20.Dakika	30.Dakika	45.Dakika
1	37,7	64,1	68,9	77,5	89,1
2	37,2	64,7	75,6	78,0	87,8
3	45,8	69,3	79,6	86,4	90,9
4	35,4	57,0	76,6	81,9	85,5
5	29,9	48,3	67,0	75,4	84,2
6	33,1	52,6	71,3	78,8	86,9
Ortalama	36,5	59,3	73,2	79,7	87,4
SS	5,4	8,0	4,9	3,9	2,4
RSD	14,70	13,53	6,65	4,95	2,77

**Şekil 3.8** Franz diffüzyon tekrarlanabilirlik çalışması grafiği

Çözünme testleri için yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında, 6 paralel analiz sonucunda elde edilen %RSD değeri kabul edilebilir sınırın (%5,0) altında bulunmuştur.

Ara kesinlik sonuçları

Analitik metot ara kesinlik çalışması

Farklı kolonlar, farklı HPLC sistemleri ve farklı Franz cihazları kullanılarak, hedef konsantrasyonda hazırlanan numune çözeltileri ve Franz difüzyon cihazında profil çalışmasıyla elde edilen numune çözeltileri ile referans standart çözeltisi enjekte edilmiştir. Bu çözeltilerdeki Brinzolamid miktarları, % cinsinden hesaplanmıştır. Hesaplanan Brinzolamid miktarları arasındaki % RSD 2,0'den az olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, tekrarlanabilirlik çalışmasından hesaplanan Brinzolamid

miktarı ile ara kesinlik çalışmasından elde hesaplanan Brinzolamid miktarı arasındaki farkın %2,0'den fazla olmadığı gözlemlenmiştir.

Tablo 3.47 Azopt numunesi ara kesinlik sonuçları

Numune Sayısı	Azopt % Brinzolamid
1	100,0
2	99,5
3	98,6
4	100,0
5	98,9
6	99,8
Ortalama	99,5
SD	0,60
RSD	0,60

Tablo 3.48 Azarga numunesi ara kesinlik sonuçları

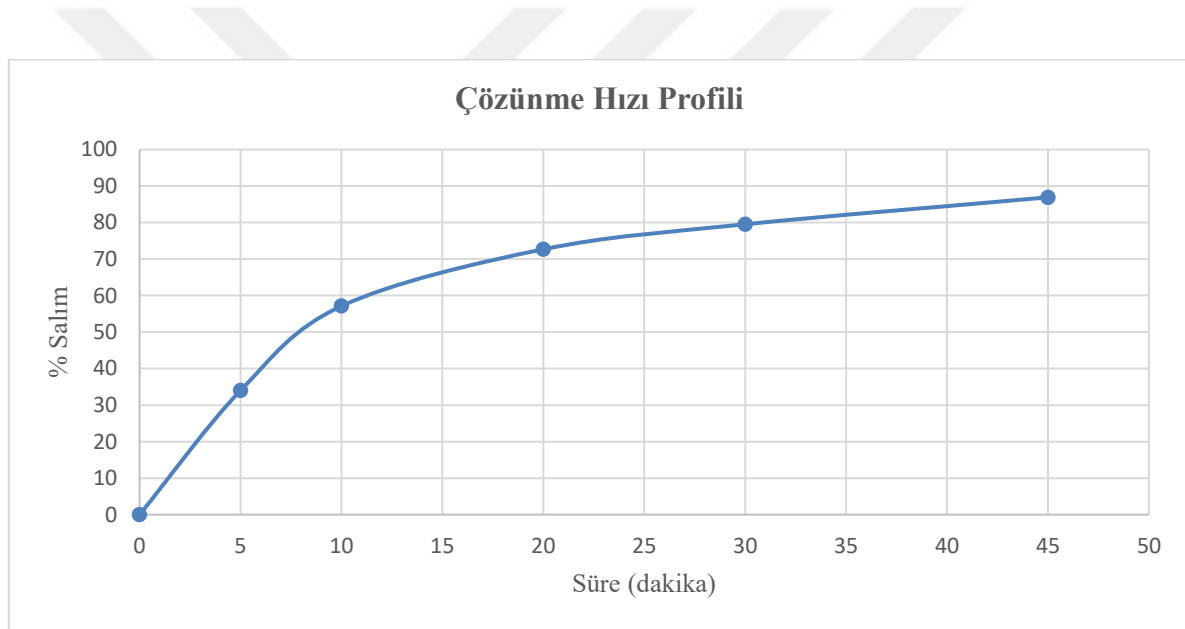
Numune Sayısı	Azarga % Brinzolamid
1	99,8
2	99,2
3	100,0
4	99,7
5	99,9
6	99,7
Ortalama	99,7
SD	0,29
RSD	0,29

Tablo 3.49 Simbrinza numunesi ara kesinlik sonuçları

Numune Sayısı	Simbrinza % Brinzolamid
1	98,7
2	99,8
3	100,0
4	97,8
5	100,1
6	99,6
Ortalama Alan	99,3
SD	0,91
RSD	0,91

Tablo 3.50 Franz diffüzyon ara kesinlik çalışması

Küvet sayısı	% Brinzolamid salımı (Azarga)				
	5. dakika	10. dakika	20. dakika	30. dakika	45. dakika
1	33,4	59,7	68,7	79,4	86,8
2	35,0	60,3	75,4	77,8	85,5
3	28,5	47,3	67,8	76,5	85,1
4	33,2	54,8	76,5	81,8	87,6
5	42,9	66,0	78,5	87,2	92,0
6	30,9	54,7	69,1	74,4	84,6
Ortalama	34,0	57,1	72,7	79,5	86,9
SD	4,9	6,4	4,6	4,5	2,7
% RSD	14,50	11,17	6,40	5,69	3,13



Şekil 3.9 Franz diffüzyon ara kesinlik çalışması grafiği

Tablo 3.51 Azopt numunesinin sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek sayısı	% Brinzolamid salım miktarı (Tekrarlanabilirlik)	% Brinzolamid salım miktarı (laboratuvar içi kesinlik)
1	99,8	100,0
2	99,9	99,5
3	99,6	98,6
4	99,8	100,0
5	99,7	98,9
6	99,3	99,8
Ortalama	99,7	99,5
SS	0,19	0,60
% RSD	0,19	0,60
% Fark	$0,2 \leq \%2,0$	

Tablo 3.52 Azarga numunesinin sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek sayısı	% Brinzolamid salım miktarı (Tekrarlanabilirlik)	% Brinzolamid salım miktarı (laboratuvar içi kesinlik)
1	100,0	99,8
2	100,1	99,2
3	99,9	100,0
4	100,0	99,7
5	100,0	99,9
6	99,9	99,7
Ortalama	100,0	99,7
SS	0,08	0,29
% RSD	0,08	0,29
% Fark	$0,30 \leq \%2,0$	

Tablo 3.53 Simbrinza numunesinin sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek sayısı	% Brinzolamid salım miktarı (Tekrarlanabilirlik)	% Brinzolamid salım miktarı (laboratuvar içi kesinlik)
1	99,9	98,7
2	100,0	99,8
3	99,8	100,0
4	99,9	97,8
5	99,8	100,1
6	100,0	99,6
Ortalama	99,9	99,3
SD	0,08	0,91
% RSD	0,08	0,91
% Fark	$0,6 \leq \%2,0$	

3.1.12. Doğruluk çalışması

Tablo 3.54 Doğruluk çalışması sonuçları

	Teorik Miktar mg/mL	Deneysel Miktar mg/mL	Geri Kazanım %	Ortalama %
%50	0,0522	0,052	99,6	100,0
	0,0523	0,052	99,4	
	0,0515	0,052	101,0	
%100	0,1031	0,103	99,9	100,0
	0,1028	0,103	100,2	
	0,1030	0,103	100,0	
%150	0,1531	0,152	99,3	100,0
	0,1520	0,152	100,0	
	0,1510	0,152	100,7	

%50, %100 ve %150 seviyelerde brinzolamid içeren numuneler ile franz difüzyon çalışması yapılmış, teorik ve deneysel bulgular ile hesaplanan geri kazanım sonuçları % 95 - %105 arasında olduğundan uygun bulunmuştur.

3.1.13. Sağlamlık sonuçları

Tablo 3.55 Sağlamlık çalışması sonuçları mobil faz pH değişimi

pH	% RSD	Alıkonma Zamanı	Plaka Sayısı	Kuyruklanma	Standart çözeltilerinin korelasyonu
4,7	0,06	2,1	5841	1,2	%99,9
4,8	0,05	2,1	5564	1,2	%99,7
4,9	0,11	2,1	5794	1,2	%99,5

Tablo 3.56 Sağlamlık çalışması sonuçları akış hızı değişimi

Akış Hızı	% RSD	Alıkonma Zamanı	Plaka Sayısı	Kuyruklanma	Standart çözeltilerinin korelasyonu
0,8	0,07	2,5	5468	1,2	%99,2
1,0	0,05	2,1	5564	1,2	%99,7
1,2	0,05	1,9	5531	1,2	%99,0

Tablo 3.57 Sağlamlık çalışması sonuçları kolon sıcaklığı değişimi

Kolon Sıcaklığı	%RSD	Alıkonma Zamanı	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma	Standart çözeltilerinin korelasyonu
30 °C	0,07	2,0	5254	1,2	%99,2
35 °C	0,05	2,1	5564	1,2	%99,7
40 °C	0,02	1,8	5523	1,2	%99,4

Sağlamlık parametresi dahilinde yapılan değişikliklere ait sonuçların tamamının sistem uygunluk parametrelerini karşıladığı gözlenmiştir ve bu metodun sağlam olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 3.58 Çözelti stabilitesi sonuçları

Standart çözeltisi			Numune çözeltisi		
Zaman	Alan	% Değişim	Zaman	Alan	% Zaman
Başlangıç	5063024	-	0	3842147	-
12. saat	5077443	0,3	12. saat	3869941	0,72
24. saat	5088681	0,5	24. saat	3880931	1,01
48. saat	5097346	0,7	48. saat	3880554	1,00

Analitik çözeltilerin stabilitesi 48 saat boyunca değerlendirilmiş, bu süre zarfında pik alanlarındaki değişim %2'nin altında bulunmuştur. Bu nedenle çözeltiler oda koşulunda en az 48 saat boyunca stabil kabul edilmiştir.

Tablo 3.59 Mobil faz stabilitesi sonuçları

Süre	0.gün % Brinzolamid	15. Gün % Brinzolamid	% Değişim
Azopt	99,7	99,2	0,5
Azarga	100,0	99,8	0,2
Simbrinza	99,9	100,0	0,1

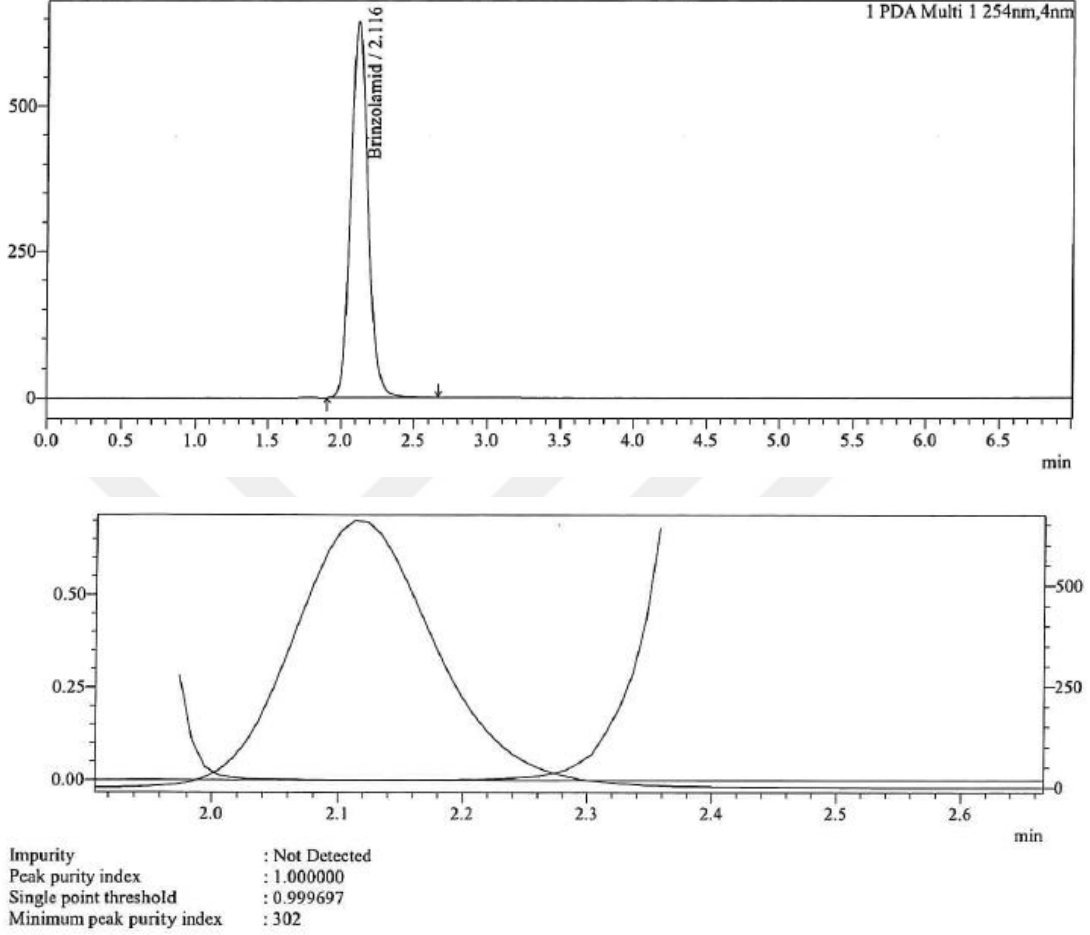
Taze ve 15 gün bekletilmiş mobil fazlar ile yapılan analizler arasındaki farkın %2'den küçük olduğu görüldüğünden mobil fazın 15 gün dayanıklı olduğu kanıtlanmıştır.

3.1.14. Spesifiklik çalışması

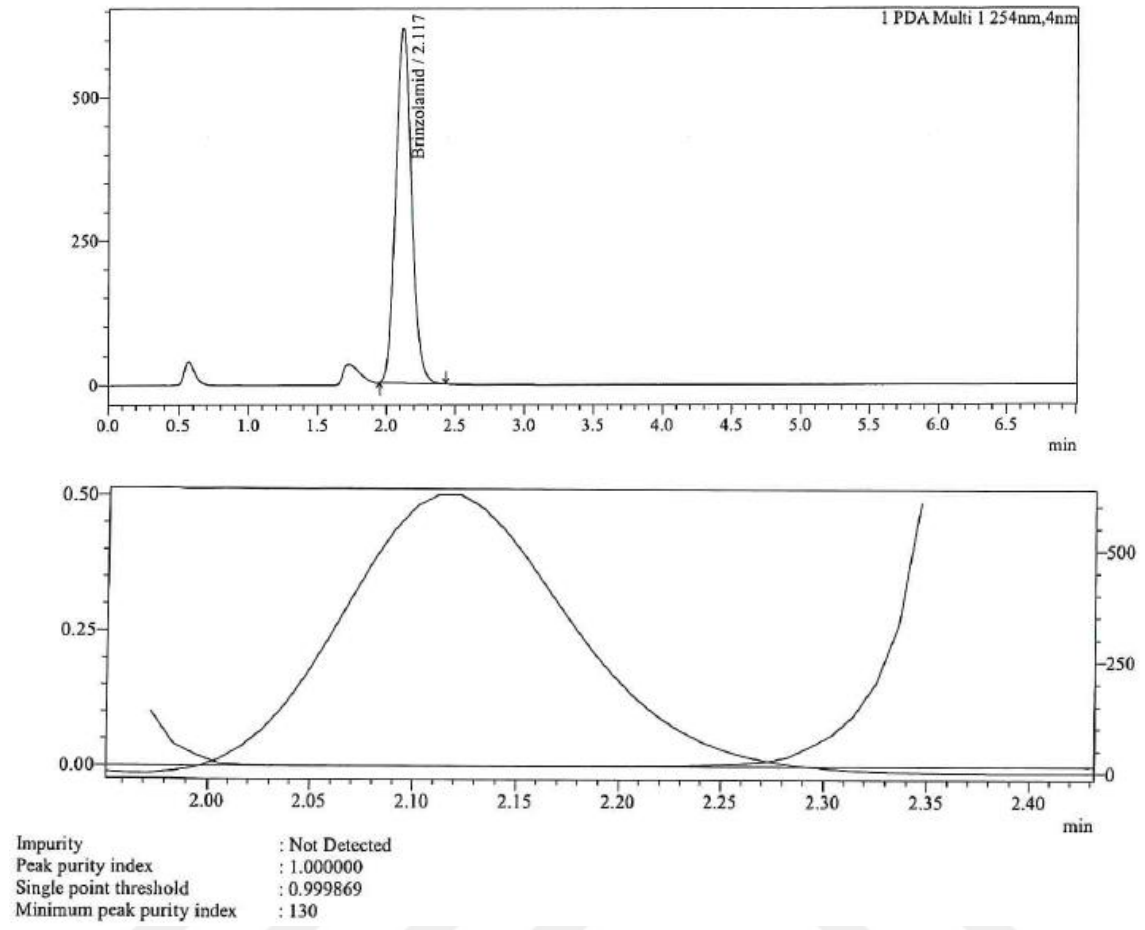
Çözücü ve ürünün diğer bileşenlerinden kaynaklı etken madde ile girişim yapan pik olmamalıdır.

Brinzolamid standart çözeltisinden, Azarga, Simbrinza ve Azopt numunelerinden elde

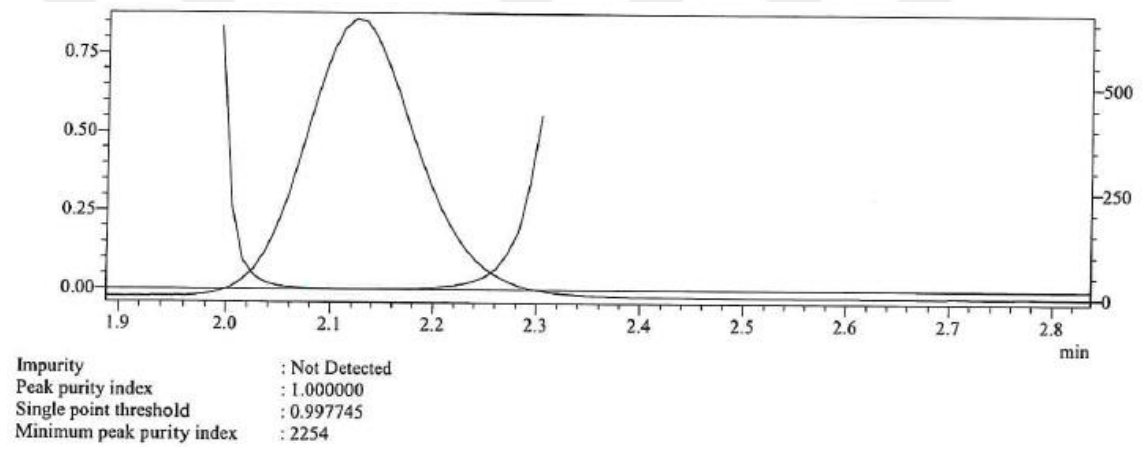
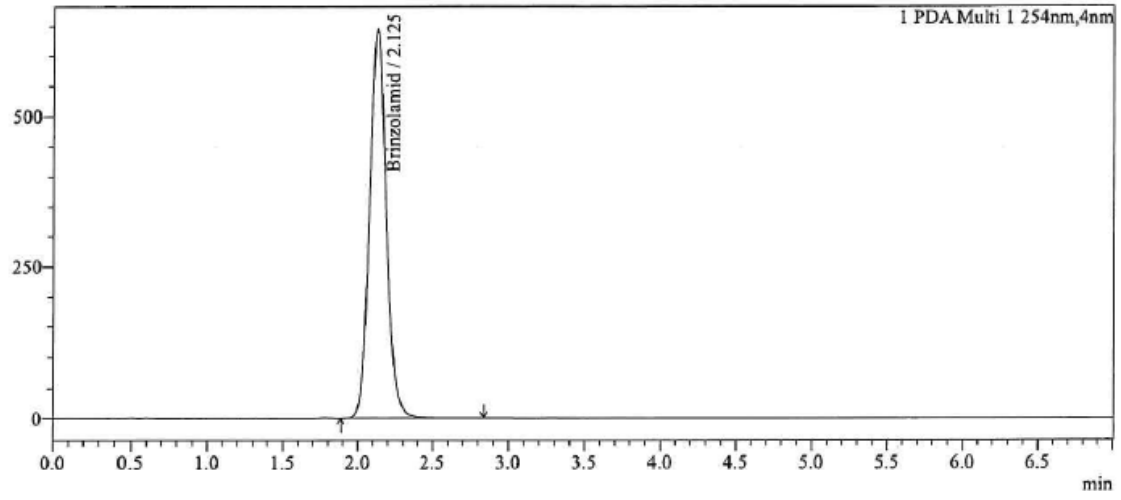
edilen HPLC kromatogramlarında brinzolamid ile girişim yapan pik gözlenmemiştir. Pikler spektral olarak saf bulunmuştur. Elde edilen kromatogramlar aşağıdaki şekillerde görülmektedir. Metot piyasada bulunan Brinzolamid içeren göz damlaları için spesifikdir.



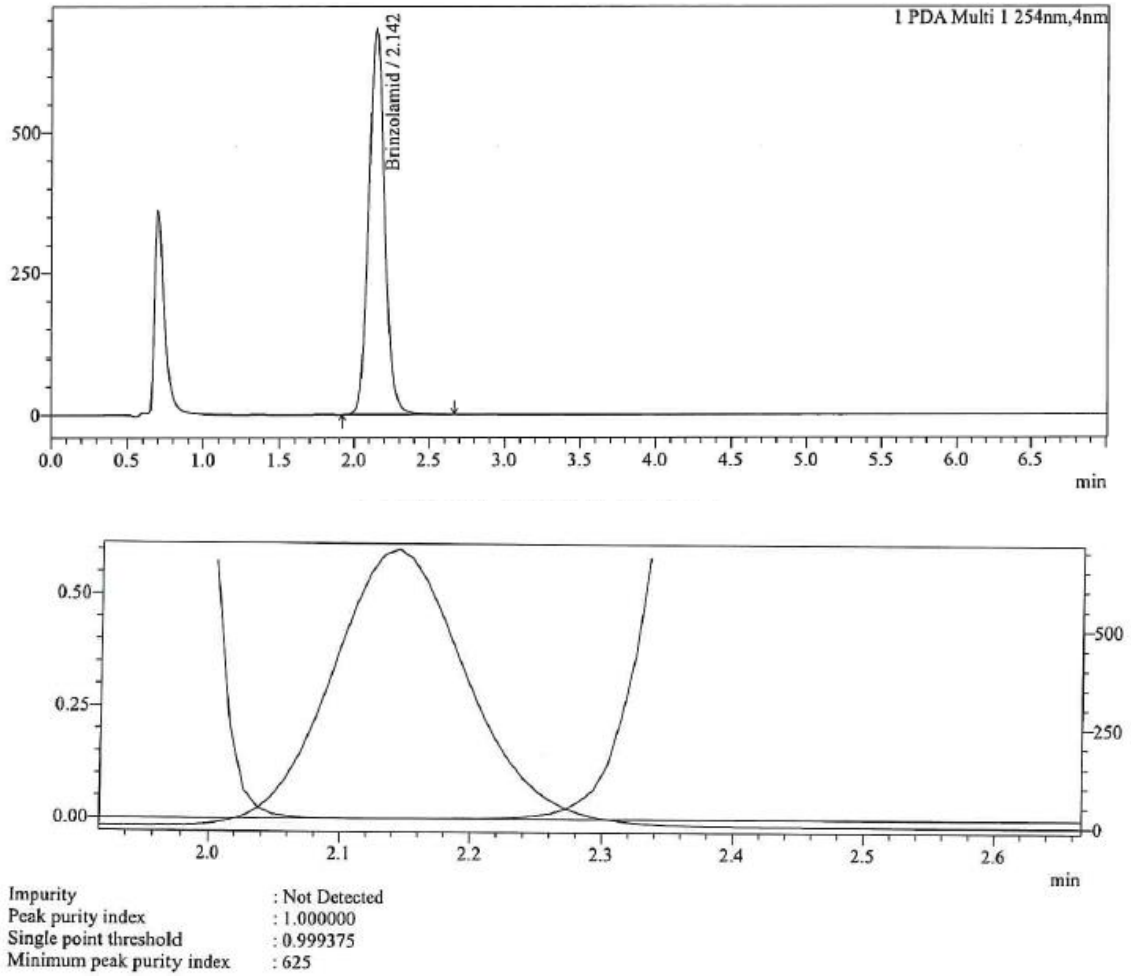
Şekil 3.10 Brinzolamid standart kromatogramı



Şekil 3.11 Azarga numune kromatogramı



Şekil 3.12 Azopt numune kromatogramı



Şekil 3.13 Simbrinza numune kromatogramı

3.1.15. LOQ- LOD belirleme ve nicelik sınırı

Doğrusallık çalışmasından elde edilen 0,0001 mg / mL konsantrasyonu metodumuzun nicelik sınırı LOQ olarak tespit edilmiştir. Bu seviyedeki S/N sinyal / gürültü oranı 12 olarak tespit edilmiştir. Belirleme sınırı 0,00003 mg/mL olarak belirlenmiş, S/N oranı 4 olarak belirlenmiştir.

3.1.16. Sonuçların yorumlanması

Bu çalışmada, Brinzolamid içeren oftalmik formülasyonların in vitro salım profillerini incelemek amacıyla geliştirilen HPLC yöntemi, optimizasyon ve validasyon süreçlerinden başarıyla geçmiştir. Franz difüzyon hücresi kullanılarak gerçekleştirilen deneyler, yöntemin tekrarlanabilirlik, doğruluk ve seçicilik açısından yüksek performansa

sahip olduğunu göstermiştir.

Metot optimizasyonu sırasında seçilen membran türü, alıcı ortamın bileşimi ve numuneleme parametreleri gibi kritik değişkenlerin titizlikle değerlendirilmesi, yöntem geliştirme sürecinin temel taşlarını oluşturmuştur. Çalışmada kullanılan GH Polypro (Pall) membran, düşük varyasyon katsayıları ve tutarlı salım verileri sunarak, Brinzolamid salım profillerinin güvenilir bir şekilde belirlenmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca, pH 7,4 fosfat tamponu ve asetonitril karışımının (%70:30) alıcı ortam olarak seçilmesi, Brinzolamid'in çözünürlüğünü artırmış ve sink koşullarının elde edilmesini mümkün kılmıştır.

Geliştirilen yöntemin optimizasyon çalışmaları sonucunda, sistem uygunluk parametrelerinin tümü farmakopelerde belirtilen kriterler dahilinde bulunmuştur. Enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı, akış hızı ve hareketli faz bileşimi gibi parametreler detaylı bir şekilde incelenmiş, optimize edilen şartlar altında tüm analizlerde yüksek duyarlılık ve doğruluk elde edilmiştir. Sistemin kesinliği çalışmaları sırasında, ardışık analizlerde RSD değerlerinin %1'in altında olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, metodun hem sistem uygunluğunu hem de ölçüm tekrarlanabilirliğini açıkça ortaya koymaktadır.

Yöntemin validasyon çalışmaları, ICH-Q2 (R1) ve USP-1225 kılavuzları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Doğruluk çalışmaları sonucunda, teorik konsantrasyonlarla deneysel veriler arasında %98 ile %102 arasında değişen geri kazanım oranları elde edilmiş, bu da metodun yüksek doğruluk seviyesini doğrulamaktadır. Çalışma aralığı, 0,0001 mg/mL ile 0,2 mg/mL arasında belirlenmiş ve bu aralıkta doğrusallık sağlanmıştır (korelasyon katsayısı $R^2 > 0,9997$). LOD değerinin 0,00003 mg/mL ve LOQ değerlerinin 0,0001 mg/mL olarak hesaplanması, metodun düşük konsantrasyonlarda dahi güvenilir sonuçlar sunduğunu göstermiştir.

Kesinlik parametreleri kapsamında yapılan tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları, metodun farklı analist, cihaz ve kolon koşullarında dahi tutarlı sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur. İki analistin bağımsız olarak gerçekleştirdiği ara kesinlik çalışmaları arasında elde edilen sonuçların %5'lik kabul sınırını aşmaması, metodun güvenilirliğini artırmıştır.

Elde edilen tüm veriler, geliştirilen HPLC yönteminin in vitro salım çalışmalarında Brinzolamid içeren oftalmik formülasyonların kantitatif analizinde etkili bir araç olduğunu göstermektedir. Çevre dostu bir yaklaşımla tasarlanan bu metot, daha az

kimyasal atık oluşumuna yol açarak sürdürülebilir laboratuvar uygulamalarına katkı sağlamaktadır. Franz difüzyon hücresiyle uyumlu olması, yöntemin tekrarlanabilirliğini artırırken, otoriteler tarafından önerilen farmasötik test standartlarıyla da uyumluluğu ortaya koymaktadır.

Bu çalışma, Brinzolamid içeren oftalmik ürünlerin in vitro salım analizinde kullanılabilecek validasyon aşamalarını tamamlamış bir analitik yöntem sunmaktadır. Geliştirilen metodun, kombinasyon ürünler ve diğer oftalmik aktif maddelerin analizi için de uyarlanabilir olduğu düşünülmektedir. Gelecekteki çalışmalar için, yöntemin klinik araştırmalarla desteklenerek biyoeşdeğerlik değerlendirmelerinde daha geniş bir uygulama alanı bulabileceği önerilmektedir.

Geliştirilen franz difüzyon ve HPLC metotları kombinasyonu diğer metotlara oranla daha geniş konsantrasyon aralığında çalışma, daha kısa HPLC ve dissolüsyon çalışma süreleri ile çalışabilmeyi mümkün kılmıştır. Ako ve arkadaşlarının kullanmış olduğu in vitro yönteminde diyaliz tüp kullanılmış 3 saatte % 54 ilaç salımı görülmüşlerdir. optimize ve valide ettiğimiz yöntem ile 45 dakikada % 80 üzerinde ilaç salımı elde edilebilmektedir.

Karar Verilen Metot Şartları

Kromatografik Şart

Kolon

Tip	: C18
Partikül Boyutu	: 5 µm
Uzunluk	: 100 mm
Çap	: 4,6 mm
Kolon Sıcaklığı	: 30 °C
Numune Bölmesi Sıcaklığı	: 25 °C
Dalgaboyu	: 254 nm
Akış Hızı	: 1,0 mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	: 30 µL
Analiz Süresi	: 7 dakika
Cihaz	: HPLC Sistemi
Sistem	: İzokratik Pompa, Kolon termostatu, Otomatik Gaz

Giderici, UV veya PDA Dedektör, HPLC Yazılımı

Franz Difüzyon Şartları

Alıcı Ortamı : pH 7.4 Fosfat Tamponu : Metanol (70:30)

Sıcaklık : 37 °C ± 0,5

Hız (devir) : 600 rpm

Aparat : Hücre (20mL)

Difüzyon süresi : 45 dk

pH 7.4 Fosfat Tamponu Hazırlığı: 8,06 g Sodyum Klorür, 1,22 g Disodyum Hidrojen Fosfat ve 0,2 g Potasyum Klorür, 0,1956 g Potasyum Dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL Su (Milli-Q) çözülür ve karıştırılır.

Alıcı Ortam Hazırlığı: Hacimce 70:30 oranında pH 7,4 Fosfat Tamponu: Asetonitril karıştırılır (h/h).

Membran Hazırlığı:

GH Polypro membran (Pall) 0,45 µm gözenek çapı kullanılır. Membranlar Franz difüzyon hücrelerine yerleştirilmeden önce 1 saat süre ile alıcı ortam içinde ıslatılır.

Mobil Faz İçin Tampon Çözelti: 1 g Sodyum Asetat Trihidrat tartılıp 1000 mL suda çözülür. Asetik asit ile pH: 4,8'e ayarlanır. 0,45µ filtreden süzülür.

Mobil Faz: 60:40 oranında tampon çözelti: metanol (h/h) karıştırılır ve degaze edilir.

Sistem Uygunluk Parametreleri

- Standart çözeltisi için ardışık altı enjeksiyondan elde edilen bağıl standart sapma RSD $\leq$ % 2,0 olmalıdır.
- Kontrol standardından iki enjeksiyon yapılır. Standart çözeltisi ile uyumu % 98,0 - % 102,0 olmalıdır.
- Standart enjeksiyonundan elde edilen kromatogramda Brinzolamid piki için kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Standart enjeksiyonundan elde edilen kromatogramda Brinzolamid piki için Teorik Plaka Sayısı 2000'den büyük olmalıdır.

Standart Hazırlığı:

Yaklaşık 10,0 mg Brinzolamid tartılır ve 10 mL'lik hacme sahip balon jojeye içerisine aktarılır. Mobil faz ile çözülür, 3 dakika sonike edilir. Bu çözeltiden 1,0 mL alınır ve 10

mL'lik hacme sahip balonjojeye aktarılır, alıcı ortamı ile balon jojenin hacmi tamamlanır ve iyice karıştırılır. Sisteme direkt enjekte edilir. ($C_{\text{Brinzolamid}} = 0,10 \text{ mg/mL}$).

Kontrol Standardı Hazırlığı:

Kontrol standardı, yukarıdaki çalışma standardı ile aynı olacak şekilde hazırlanır.

($C_{\text{Brinzolamid}} = 0,10 \text{ mg/mL}$).

Numunelerin Hazırlığı:

İn Vitro için Numune Hazırlığı:

6 adet Franz hücresinin her birinin alıcı kısmına 20 mL alıcı ortamı transfer edilir ve $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'ye karıştırılarak ısıtılır. Çalışma boyunca karıştırma hızı 600 rpm'dir. Her bir hücrenin verici kısmına 1 saat alıcı ortam ile doyurulmuş $0,45 \mu\text{m}$ gözenek çaplı GH Polypro membran (Pall) membran yerleştirilir. Membran üzerine 0,2 mL Brinzolamid içeren göz damlası, süspansiyonu eklenir. Her bir analiz noktasında, mikropipet kullanarak Franz hücresinden 0,5 mL çekilir ve taze 0,5 mL alıcı ortamı eklenir. Çekilen numuneler direkt viallenir ve HPLC'de analizlenir.

Not: Analiz noktaları profil çalışması için, 5, 10, 20, 30, 45 dakikadır. Tek nokta çekim 45. dakikada yapılır.

İşlem:

Brinzolamid için analitik metot validasyonu In Vitro salım tayini yöntemi için belirtilen metot şartlarına uyulmalıdır. Kolonun ve sistemin şartlanması için mobil fazın kolondan yeterli süre geçirilmesi gereklidir.

In vitro salım tayini için hazırlanan standart çözeltisinden 6 kez ve kontrol standart çözeltisi'nden 2 kez enjeksiyon yapılarak sistem uygunluk parametreleri kontrol edilir. İn vitro ilaç salım tayininde kullanılmak üzere 6 paralel numune çözeltisi hazırlığı yapılır; tek nokta çalışmaları için 45. Dakikada numune çekimi yapılır. Her bir numune çözeltisinden 1'er enjeksiyon yapılır.

Hesaplama

Tek Nokta Salım Hesaplama

$$\% \text{ Salım} : \frac{A_{\text{numune}}}{A_{\text{std}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{20}{V_{\text{numune}}} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L}$$

A_{numune}	: Numune çözeltisindeki Brinzolamid pikinin alanı
A_{std}	: Standart çözeltisindeki Brinzolamid pikinin alanı
W_{std}	: Standart ait tartım (mg)
V_{numune}	: Numune ait hacim (mL)
L	: Etiket değeri (10 mg)
P	: Brinzolamid standardının % aktivite değeri

İn Vitro Profili Salım Hesaplama

% Kümülatif Salım:

5.dakika

$$Q1(\%) = \frac{A_{5.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}}$$

10.dakika

$$Q2(\%) = \left(\frac{A_{10.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}} \right) + \left(\frac{0,5}{20} \times Q1(\%) \right)$$

20.dakika

$$Q3(\%) = \left(\frac{A_{20.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}} \right) + \left(\frac{0,5}{20} \times (Q1(\%) + Q2(\%)) \right)$$

30.dakika

$$Q4(\%) = \left(\frac{A_{30.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}} \right) + \left(\frac{0,5}{20} \times (Q1(\%) + Q2(\%) + Q3(\%)) \right)$$

45.dakika

$$Q5(\%) = \left(\frac{A_{45.dk}}{A_{Std}} \times \frac{W_{std}}{10} \times \frac{1}{20} \times \frac{P}{100} \times \frac{100}{L} \times \frac{20}{V_{numune}} \right) + \left(\frac{0,5}{20} \times (Q1(\%) + Q2(\%) + Q3(\%) + Q4(\%)) \right)$$

$A_{5,10,20,30,45 \text{ dakika}}$: Numune çözeltisindeki Brinzolamid pikinin alanı

A_{Std} : Standart çözeltisindeki Brinzolamid pikinin alanı

W_{std} : Standart ait tartım (mg)

L : Etiket değeri (10 mg)

P : Brinzolamid standardının % aktivite değeri

V_{numune} : Numune ait hacim (mL)

Tablo 3.60 Diğer metotlar ile kıyaslama

Kaynak	Analiz Amacı	Ekipman Türü	Alıkonma Zamanı	Çalışma Aralığı
Tiwari vd., 2020	Miktar Tayini	HPLC	6,6 dk	0,01- 0,5 mg/mL
Mandour vd., 2023	Miktar Tayini	HPLC	5,6 dk	0,02- 0,12 mg/mL
Ako-Adounvo vd., 2024	İn Vitro	Diyaliz Tüpü, HPLC (USP monograf metodu uyarlaması)	3,7 dk	0,001- 0,12 mg/mL
Bu Çalışma	İn Vitro	Franz Diffüzyon Hücresi, HPLC	2,1 dk	0,0001- 0,2 mg/mL

Tablo 3.61 Diğer metotlar ile kıyaslama (devamı)

Kaynak	Mobil Faz	Alıkonma Zamanı	Çalışma Aralığı
Tiwari vd., 2020	Potasyum dihidrojen fosfat: Asetonitril 60:40	6,6 dk	0,01- 0,5 mg/mL
Mandour vd., 2023	Trietilamin tamponu pH:3,5 :Asetonitril 20:80	5,6 dk	0,02- 0,12 mg/mL
Ako-Adounvo vd., 2024	Trietilamin tamponu pH:3.0 : Asetonitril 80:20 (USP API aynı tampon 75:25)	3,7 dk	0,001- 0,12 mg/mL
Bu Çalışma	1g Sodyum asetat trihidrat/1000 mL pH:4,8 (asetik asit ile) Tampon: Metanol (60:40)	2,1 dk	0,0001- 0,2 mg/mL
USP - Bitmiş ürün monografi	11.75g Amonyum asetat/1000 mL pH:5,2 (asetik asit ile) tampon: Metanol (65:35)	-	0,2 mg/mL

KAYNAKLAR

Ako-Adounvo, A.-M.; Karla, P.K. (2024) Preparation and In Vitro Testing of Brinzolamide-Loaded Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Nanoparticles for Sustained Drug Delivery. *J. Clin. Transl. Ophthalmol*, 2, 1–14.

Fern S., Rouse, J., Sanderson D. and G. Eccleston (2010). A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells, *Pharmaceutics*, 2, 209-223.

Fern, S. Ng., Rouse, J.J., Sanderson, F. D., Meidan, V. and Eccleston, G. M. (2010). Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies, *AAPS PharmSciTech*, 11, 3.

Graham, D., Smith, J. L. and Bouvet, A. (1990). What Happens to Tablets and Capsules in the Stomach: Endoscopic Comparison of Disintegration and Dispersion Characteristics of Two Microencapsulated Potassium Formulations, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 5.

ICH Q2-R2 (2024). Analitik yöntemlerin validasyonu: Metin ve metodoloji, Uluslararası Uyum Konferansı.

Klein S. (2013). Influence of different test parameters on in vitro drug release from topical diclofenac formulations in a vertical diffusion cell setup, *Pharmazie*;68(7):565-71.

Klein, R. R., Heckart1, J. L. and Thakker K. D., (2018). In Vitro Release Testing Methodology and Variability with the Vertical Diffusion Cell, *Dissolution Technologies* 52.

Lester, M. (2008). Brinzolamide ophthalmic suspension: a review of its pharmacology and use in the treatment of open angle glaucoma and ocular hypertension. *Clinical ophthalmology* 2008;2(3) 517-523

Li, H., Liu, Y., Zhang, Y., Fang, D., Xu, B., Zhang, L., Chen, T., Ren, K., Nie, Y., Yao,

S. and Song, X. (2015). Liposomes as a Novel Ocular Delivery System for Brinzolamide: In Vitro and In Vivo Studies, AAPS PharmSciTech, 17,3.

Mandour, A.A.; Nabil, N.; Zaazaa, H.E.; Ibrahim, M.M.; Ibrahim, M.A. (2023) Two Stability Indicating Chromatographic Methods: TLC Densitometric versus HPLC Method for the Simultaneous Determination of Brinzolamide and Timolol Maleate in Ophthalmic Formulation in the Presence of Probable Carcinogenic Oxidative Degradation Product of Timolol Maleate. Separations, 10, 37.

Orlu, M. K., Ugwu, I. C. and Tekade, A. G. (2017). In vitro release of metoprolol from matrix tablets: comparison of the Franz diffusion cell method and a novel modified dissolution apparatus, Journal of Drug Delivery Science and Technology.

Smith, J., George, J., Nadler, T. and Joshi, V. (2020) Dissolution Technologies EMD Milipore Corp., Burlington, MA, USA.

Taha, A., Al-Salami, H., Lim, S. S., Moghaddam, M. F. H. and Chowdhury, M. Z. (2012). In vitro drug release from topical semisolids: Franz diffusion cell versus infinite dose model. Drug Development and Industrial Pharmacy.

Tiwari B, Shirsat MK, Kulkarni A, (2020) Analytical method development and validation for the determination of Brinzolamide by RP-HPLC, Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 10(1):92-96

USP-1225 (2015). Kompaniyel Yöntemlerin Validasyonu. Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi.

Vo, A., Feng, X. Patel, D., Mohammad, A., Patel, M., Zheng, J., Kozak, D., Choi, S., Asharf, M., Xu, X. (2020). In vitro physicochemical characterization and dissolution of brinzolamide ophthalmic suspensions with similar composition, (110-126)

Zsiko, S., Csanyi, E., Kovacs, A., Szücs, M. B., Gacsi A. and Berko, S. (2019). Methods

to Evaluate Skin Penetration In Vitro, Sci. Pharm, 87(3), 19.



Poster Sunumu Ulusal Kimya Kongresi-2024 (Diyarbakır)

35. ULUSAL KİMYA KONGRESİ
35TH NATIONAL CHEMISTRY CONGRESS
9-12 EYLÜL / SEPTEMBER 2024



Dicle Üniversitesi 15 Temmuz Kültür ve Kongre Merkezi-DIYARBAKIR

Poster Sunumları / Poster Presentations

PS-269 [Analitik Kimya]

Brinzolamid İlaç Etken Maddesinin *in Vitro* Salımı İncelemesi için HPLC Metodu Optimizasyonu ve Validasyonu

Ümmüş Çiçek

Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, İstanbul

Brinzolamid, karbonik anhidraz II'ye özel afinitesi olan bir sülfonamid ve karbonik anhidraz inhibitörüdür. Karbonik anhidraz inhibitörleri (KAI), oftalmolojide göz içi basıncını düşürmek için kullanılan en güçlü ajanlardandır. Orijinal olarak piyasaya ilk defa çıkmak isteyen ilaç firmaları klinik deney yapmak zorunda olsalar da jenerik ilaç üretecek ilaç firmalarının klinik deney yapmadan ürettiği ilacın orijinal ilaca benzediğini araştırma ve deneyler ile kanıtlamaları otorite tarafından kabul görebilmektedir. Bu noktada jenerik ilaç üretecek firmanın klinik deneyin ortaya çıkardığı mali yükten kurtulmak için, orijinal ilaca benzediğini ispatlayan raporu oluşturma önemli deneysel kısım *in-vitro* olarak adlandırılabilir.

In-vitro raporu parametrelerinin en önemlilerinden birisi ilaç salınımidir. İlaç salınımını incelemek için kullanılan yöntemlerin başlıcaları; USP I Basket Aparatı, USP II Pedal Aparatı, USP III Pistonlu Silindir, USP IV Flow Through Cell, dikey difüzyon hücresi (Franz difüzyon)'dir. Bunların arasında Franz difüzyon hücresi cihazlarının kullanımı diğerlerine kıyasla daha az alıcı ortamın kullanılmasına olanak sağlarken, tekrarlanabilirliği daha yüksektir. Bu çalışma kapsamında Franz difüzyon hücresi cihazında, formülünde brinzolamid etken maddesi içeren ilaçların içerisindeki brinzolamid etkeninin salımını ölçmek amacıyla Franz difüzyon hücresi, membran ve HPLC cihazları kullanılarak bir analiz metodu geliştirilecek, optimize edilecek ve valide edilecektir.



Şekil 1. Franz difüzyon cihazı.

Anahtar Kelimeler: Brinzolamid, Franz difüzyon, HPLC, validasyon.